

Aus dem Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Inflammatorischer Stress induziert die
endotheliale Transzytose in pulmonalen
Kapillaren über den Signalweg der sauren
Sphingomyelinase

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Claudia Wittenberg
aus Berlin

Datum der Promotion: 11.12.2015

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung/Abstract	5
1. Einleitung	7
1.1. Das pulmonale interstitielle Ödem	7
1.1.1. Hydrostatischer Stress	7
1.1.2. Inflammationsstress	8
1.1.3. Physikalische Grundlagen	9
1.2. Die Permeabilität des kontinuierlichen Endothels unter physiologischen Bedingungen	10
1.2.1. Die Rolle der Transzytose	12
1.2.2. Transzytose auf molekularer Ebene	13
1.3. Die Permeabilität des kontinuierlichen Endothels unter pathologischen Bedingungen	16
1.3.1. Gesteigerte parazelluläre Gefäßpermeabilität	16
1.3.2. Thrombin als Mediator endothelialer Permeabilität	17
1.3.3. Hinweise auf einen regulierbaren transzellulären Transport	17
1.4. Die Funktion der sauren Sphingomyelinase	19
1.5. Ziel der Arbeit	20
2. Material und Methoden	22
2.1. Tabellarische Übersicht	22
2.1.1. Materialien	22
2.1.2. Geräte und Software	23
2.1.3. Chemikalien	24
2.1.4. Lösungen	25
2.1.5. Puffer	27
2.2. Versuchstiere	27
2.2.1. Aortenbanding	28
2.2.2. Isoliert-perfundierte Rattenlunge	29
2.3. Perfusionssystem	30
2.4. Intravitalmikroskopie	31
2.4.1. Allgemeiner Aufbau	31
2.4.2. Visualisierung von Endothelzellen und Albumin	31
2.4.3. Messung des intrazellulären Calciums	33

2.5.	Elektronenmikroskopie	33
2.5.1.	Herstellung goldmarkierten Albumins	34
2.5.2.	Fixation und Schnitt	35
2.6.	Experimentelle Versuchsgruppen	35
2.6.1.	Kontrolle	35
2.6.2.	Thrombin	35
2.6.3.	Imipramin	36
2.6.4.	Akuter hydrostatischer Stress	36
2.6.5.	Chronischer hydrostatischer Stress	36
2.7.	Statistische Analysen	36
3.	Ergebnisse	37
3.1.	Der Einfluss von inflammatorischem Stress auf die pulmonal-kapilläre Albuminpermeabilität	37
3.1.1.	Intravitalmikroskopie	37
3.1.2.	Elektronenmikroskopie	38
3.2.	Der Einfluss von akutem hydrostatischem Stress auf die pulmonal-kapilläre Albuminpermeabilität	39
3.2.1.	Intravitalmikroskopie	39
3.2.2.	Elektronenmikroskopie	41
3.3.	Der Effekt von Imipramin auf die pulmonal-kapilläre Albuminpermeabilität unter inflammatorischem- und akutem hydrostatischen Stress	41
3.4.	Der Einfluss chronisch erhöhten linksatrialen Druckes auf die pulmonal-kapilläre Albuminpermeabilität	46
3.5.	Der Effekt von inflammatorischem- und akutem hydrostatischen Stress auf das endotheliale Calcium	48
4.	Diskussion	51
4.1.	Methodendiskussion	51
4.1.1.	Die isoliert-perfundierte Lunge	51
4.1.2.	Intravitalmikroskopie	52
4.1.3.	Elektronenmikroskopie	53
4.2.	Transzytose und ihre Signifikanz	54
4.2.1.	Transzytose unter physiologischen Bedingungen	54
4.2.2.	Transzytose unter inflammatorischem Stress	57
4.3.	Der Einfluss von Sphingolipiden auf die vaskuläre Permeabilität	59
4.4.	Die pulmonal-kapilläre Reaktion auf hydrostatischen Stress	60
4.4.1.	Akuter hydrostatischer Stress	60
4.4.2.	Chronischer hydrostatischer Stress	62
4.5.	Die Rolle intrazellulären Calciums in der endothelialen Hyperpermeabilität	65

4.6. Klinische Wertung der Ergebnisse und Ausblick	66
5. Literaturverzeichnis	68
6. Abkürzungsverzeichnis	77
A. Eidesstattliche Versicherung	79
B. Anteilserklärung an erfolgter Publikation	80
C. Lebenslauf	81
D. Publikationsliste	82
E. Danksagung	83

Zusammenfassung

Ein konstanter Sauerstoffaustausch in der Lunge durch eine intakte Membran zwischen Atemwegen und Blutgefäßen ist essentiell für den Menschen und wird von fein abgestimmten Regulationsmechanismen aufrechterhalten. Durch inflammatorischen und hydrostatischen Stress kann es zu einer Schädigung dieser Membran kommen mit dramatischen Folgen für Organ und Organismus.

Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass die endotheliale Albuminpermeabilität intakter pulmonaler Kapillaren fast ausschließlich durch caveolär vermittelte Transzytose aufrechterhalten wird. Die endotheliale Permeabilitätssteigerung unter pathologischen Bedingungen wurde in der Vergangenheit hingegen ausschließlich einer Störung parazellulärer Endothelkontakte angelastet.

In der vorliegenden Arbeit konnte mithilfe der Intravital- und Elektronenmikroskopie erstmals gezeigt werden, dass unter inflammatorischem Stress mindestens ein Teil der endothelialen Hyperpermeabilität tatsächlich auf einen erhöhten transzellulären Transport zurückzuführen ist. Dieser wird offenbar durch die saure Sphingomyelinase reguliert, da ihre Inhibition zu einer Reduktion des Transzytoseanstiegs führte.

Im Gegensatz dazu sahen wir unter akutem hydrostatischen Stress keine Steigerung des transzellulären Transports; hier scheint es tatsächlich allein durch zelluläre Kontraktion und Desintegration interendothelialer Kontakte zu vermehrter Permeabilität zu kommen. Im Gegenteil, wir sahen in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen sogar deutlich weniger goldmarkierte Albuminmoleküle in Caveolen, was auf eine inverse Beziehung zwischen trans- und parazellulärer Permeabilität hinweist. In Gefäßen, die chronischem hydrostatischen Stress ausgesetzt waren, sahen wir nur einen leichten Anstieg der Albuminextravasation, was auf die Effektivität des pulmonal-vaskulären Remodelings als Adaptationsmechanismus verweist. Es konnte sowohl unter inflammatorischem-, als auch hydrostatischem Stress ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration beobachtet werden, was auf die Verbindung zwischen Transzytose und Calciumsignalweg hinweist.

Die vorliegende Arbeit gewährt neue wesentliche Einblicke in die Pathophysiologie des inflammationsbedingten Lungenödems und weist auf den Signalweg der sauren Sphingomyelinase als mögliches Ziel einer therapeutischen Intervention in diesem Szenario hin. Zudem lassen die erbrachten Ergebnisse Zweifel an der bisher geltenden Definition und Messung des Permeabilitätsödems aufkommen, da Albuminextravasation per se, wie wir zeigen konnten, kein eindeutiger Parameter für eine gestörte parazelluläre Endothelbarriere darstellt. Dies ist sowohl von experimenteller als auch diagnostischer Relevanz.

Abstract

The constant exchange of oxygen between the respiratory tract and blood vessels in the lung through an intact membrane is essential for human beings. It is maintained by finely tuned regulatory mechanisms. Under certain circumstances, such as inflammatory and hydrostatic stress, this membrane can be damaged with fatal consequences for the organism. Numerous studies show that caveolae-mediated transcytosis is the major process for albumin to leave pulmonary microvessels under physiological conditions. However, no results about transcytosis under inflammatory or hydrostatic stress have been published so far.

For the first time the present study shows by the use of intravital and electron microscopy, that the increase in permeability under inflammatory stress has to, at least partly, be attributed to an increased transcellular transport. This transport seems to be regulated by the acid sphingomyelinase, as its inhibition, results in the reduction of transcytosis.

By contrast, transcellular transport was not increased by hydrostatic stress. In this case cellular contractions and disintegration of interendothelial contacts seem to be in fact the only cause of increased permeability of albumin. We could even see a decrease of electronmicroscopically visible goldlabeled albumin molecules in caveolae, which indicates an inverse relationship between trans- and paracellular permeability. In vessels exposed to chronic hydrostatic stress no increase in the extravasation of albumin could be noticed, which indicates the efficiency of pulmonary vascular remodeling as an adaption mechanism. Both under inflammatory and hydrostatic stress an increase in intracellular calcium concentration was observed, which points to the connection of transcytosis and the calcium pathway.

The current study allows a new substantial insight into the pathophysiology of permeability type pulmonary oedema and hints at the pathway of acid sphingomyelinase as a possible target of therapeutic intervention. Additionally, it questions the currently applied definition and measurement of permeability type oedema since the extravasation of albumin as such is not a specific indicator of a malfunction of the paracellular endothelial barrier. This finding is both of experimental and diagnostic relevance.

1. Einleitung

1.1. Das pulmonale interstitielle Ödem

Als Endothel bezeichnet man die dem Lumen zugewandte Zellschicht eines Lymph- oder Blutgefäßes. Diese Schicht ist unabhängig vom perfundierten Organsystem stets einlagig, in seiner Permeabilität für Blutbestandteile aber sehr variabel. So werden ein sehr undurchlässiges kontinuierliches Endothel (z.B. Gefäß-Hirn-Schranke), ein fenestriertes Endothel (z.B. Darm, Nierenglomerulus) und ein durch weite Interzellularabstände gekennzeichnetes sehr permeables diskontinuierliches Endothel (z.B. Leber) unterschieden. Pulmonale Kapillaren werden von ersterem, dem durch interendotheliale *tight junctions* sehr undurchlässigen kontinuierlichen Endothel ausgekleidet. Eine übermäßige Permeabilität für Makromoleküle wie Albumin durch Schädigung der Endothelzellen oder ihrer Zellkontakte führt zum interstitiellen Ödem zwischen Alveole und pulmonaler Kapillare und stellt den ersten Schritt der Entstehung eines Lungenödems dar. Mögliche Ursachen hierfür sind:

1. ein erhöhter kapillärer Druck (z.B. bei Linksherzinsuffizienz),
2. eine gesteigerte kapilläre Permeabilität (z.B. bei Inflammation),
3. eine reduzierte Lymphdrainage (z.B. bei Karzinom mit Lymphangitis),
4. ein verminderter interstitieller Druck (z.B. nach Pneumothorax),
5. ein verminderter kolloidosmotischer Druck (z.B. vermindertes Serumalbumin),
6. andere Einflüsse wie Höhe, neurogene Störungen, Hyperinflation, Heroin [1].

Die klinisch wichtigsten unphysiologischen Belastungen, die zu einem vermehrten Austritt von Plasmabestandteilen aus pulmonalen Gefäßen führen können, sind eine akute oder chronische hydrostatische Belastung sowie inflammatorischer Stress.

1.1.1. Hydrostatischer Stress

Die chronische Linksherzinsuffizienz (CHI) hat in den USA eine Prävalenz von 10/1.000 bei den über 65-jährigen und führt zu mehr als 1 Million Krankenhausaufenthalten pro Jahr [2, 3]. Sechzig bis achtzig Prozent der Patienten entwickeln konsekutiv einen erhöhten kapillären Druck im Lungenkreislauf [4]. Ab einem kritischen Druckgradienten kann es so zu einem interstitiellen- und konsekutiv zu einem alveolären Ödem kommen. Die hydrostatische Belastung entsteht dabei nicht

nur rein passiv aufgrund des linksventrikulären Pump- und Rückwärtsversagens, es kommt außerdem zu einem vaskulären Remodeling mit Entwicklung eines erhöhten vaskulären Widerstandes [5]. Diese Adaptation führt zusammen mit einer gesteigerten Lymphdrainage dazu, dass CHI-Patienten deutlich höheren kapillären Drücken ausgesetzt sein können als gesunde Patienten, ohne ein Ödem auszubilden [6]. Neben der CHI als häufigsten Grund des interstitiellen Lungenödems können aber auch ein akuter Myokardinfarkt, Hypervolämie und valvuläre Pathologien zu einer Zunahme des pulmonalkapillären Druckes führen.

Beim Menschen beginnen pulmonale Kapillaren ab einem pulmonalvenösen Verschlussdruck, dem klinisch messbaren Pendant, von rund 15mmHg vermehrt Plasmabestandteile, darunter Makromoleküle, über das Endothel zu filtrieren [7]. Es bildet sich ein pulmonales interstitielles Ödem aus. In diesem Stadium wird das beginnende Ödem von der niedrigen interstitiellen Compliance, der dichten alveolären Membran und der höchst effektiven lymphatischen Drainage, die bis auf das 10fache des physiologischen Wertes ansteigen kann, in seiner Ausbreitung limitiert. Ab einem pulmonalvenösen Verschlussdruck von mehr als 25mmHg kommt es durch das Versagen der epithelialen Barriere zum alveolären Ödem. Dadurch wird die alveoläre Diffusionsstrecke erheblich verlängert, was zu einer relevanten Störung des pulmonalen Gasaustauschs führt [7]. Die schrittweise Entwicklung des hydrostatischen pulmonalen Ödems lässt sich an der typischen Entwicklung der radiologischen Befunde nachvollziehen. Zunächst wird eine Dilatation pulmonaler Venen sichtbar, dann folgt eine interstitielle Dichtezunahme, und schließlich kommt es zur Bildung eines alveolären Ödems mit lokalen azinösen Verschattungen im Röntgenthorax [8].

1.1.2. Inflammationsstress

Dem nicht-kardiogenen Ödem liegt ein Schaden des Lungenparenchyms und damit der sensiblen, nur 0,1 bis 0,5µm dünnen Schranke zwischen Alveole und Kapillare zugrunde, weshalb es auch Ödem vom Permeabilitätstyp genannt wird. Das akute progressive Lungenversagen (ARDS) gilt als Prototyp dieses Ödems.

Das ARDS entsteht durch eine direkte (z.B. Aspirationstrauma, Kontusion, Pneumonie) oder indirekte (z.B. Sepsis, Schock) pulmonale Schädigung. Angaben zur Inzidenz des ARDS variieren sehr stark und liegen je nach Studie zwischen 3 und 109 pro Jahr [9]. Die Letalität dieser kritischen Erkrankung beträgt unbehandelt 90% [10]. Die 2011 aktualisierte „Berliner Definition“ des ARDS verlangt einen akuten Beginn, eine non-kardiale Genese, schwere Hypoxämie und bilaterale pulmonale Infiltrate im Röntgenthoraxbild, die nicht durch eine andere Lungenerkrankung erklärt werden können, als typische Charakteristika. Außerdem wird der Schweregrad der Erkrankung am sogenannten Horowitz-Quotienten, dem Verhältnis des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes (P_{aO_2}) zur inspiratorischen Sauerstoffkonzentration (F_{iO_2}) gemessen: mild (200mmHg bis 300mmHg), moderat (100mmHg bis 200mmHg), und schwer (≤ 100 mmHg). Die Schweregrade korrelieren gut mit den statistischen Letalitäten von 27%, 32% bzw. 45% [11].

Kurzgefasst liegen dem ARDS folgende pathophysiologische Prozesse zugrunde; durch eine direk-

te oder indirekte pulmonale Schädigung wie z.B. im Rahmen einer Sepsis sezernieren inflammatorische Zellen Zytokine, die die pulmonale Strombahn erreichen. Besonders Tumornekrosefaktor- α und Interleukin- 1β sind dafür bekannt, durch mikrovaskuläre Lecks und die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten am Endothel ein ARDS auslösen zu können [12]. Dies führt zur exsudativen Phase der Erkrankung; durch die endotheliale Permeabilitätssteigerung entsteht ein proteinreiches, interstitielles Ödem, und hyaline Membranen bilden sich aus. Die Basalmembran ist in diesem Stadium noch intakt. Jedoch kommt es schon jetzt durch den ausgedehnten, auch epithelialen Gewebsschaden zur Flüssigkeitsansammlung im Alveolarraum. Die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und T-Lymphozyten, sowie mechanischer und oxidativer Stress führen zur weiteren Ausbreitung und Manifestation der Schädigung. Nach ca. 2 Wochen beginnt die Proliferationsphase, in der es zum fibrösen Umbau des Ödems, Verbreiterung alveolärer Septen und durch eine dysregulierte Koagulation zur Bildung von Thromben in der pulmonalen Mikrozirkulation kommt. Die dritte Phase ist durch Narbenbildung und verminderte Compliance gekennzeichnet [13]. Ein ARDS läuft im Gegensatz zum druckinduzierten Ödem in Bezug auf die alveolokapilläre Membran also nicht zweistufig ab, sondern führt bereits frühzeitig zu zellulären Schäden in Endothel und Epithel und zum alveolären Ödem [13].

1.1.3. Physikalische Grundlagen

Ein Ödem entsteht durch ein Ungleichgewicht zwischen Flüssigkeitsaustritt ins Gewebe und der Menge an Flüssigkeit, die von den Lymphgefäßen abtransportiert werden kann [14]. Der normale interstitielle Flüssigkeitsgehalt der menschlichen Lunge beträgt 300–400ml und kann im Lungenödem auf über 2l ansteigen [15]. Der molekulare Übertritt vom Lumen ins Gewebe ist generell abhängig vom hydrostatischen und osmotischen Druck beider Kompartimente und der Durchlässigkeit des pulmonalen Endothels für Wasser und Löslichkeitsprodukte. Nach Starling [16] werden diese Zusammenhänge wie folgt dargestellt:

$$J_v = K_f(P_{ka} - P_{is}) - \sigma(\Pi_{ka} - \Pi_{is}) \quad (1.1)$$

Danach ergibt sich der Flüssigkeitsübertritt von Kapillare ins Interstitium (J_v ; ml/min) aus den hydrostatischen ($P_{ka} - P_{is}$) und osmotischen ($\Pi_{ka} - \Pi_{is}$) Druckgradienten zwischen Kapillare und Interstitium, die in ihrer Gesamtheit auch als Starling-Kräfte bezeichnet werden, dem Filtrationskoeffizienten (K_f), der selbst ein Produkt der endothelialen hydraulischen Leitfähigkeit (L_p) mit der der Filtration zur Verfügung stehenden endothelialen Oberfläche (S) ist, sowie dem osmotischen Reflexionskoeffizienten (σ), der die Durchlässigkeit des Endothels für unterschiedliche Proteine beschreibt.

Der transvaskuläre Flux von Plasmaproteinen (J_p ; mg/min) ist ein Produkt aus Konvektions- und Diffusionskräften. In Beziehung gesetzt werden diese in der von Patlak beschriebenen und später

von Kedem-Katchalsky [17] modifizierten Gleichung

$$J_p = J_v(1 - \sigma)C_s + PS(\Delta C) \quad (1.2)$$

C_s steht für die Konzentration des Löslichkeitsproduktes in der theoretischen Pore, durch die Flüssigkeit oder Partikel treten, P die Permeabilität, S die endotheliale Oberfläche, ΔC bezeichnet die Differenz der Konzentration des gelösten Stoffes über der endothelialen Wand. Bei erhöhter endothelialer Permeabilität, wie sie unter inflammatorischem Stress entsteht, steigt der Filtrationskoeffizient K_f , während der osmotische Reflexionskoeffizient σ sinkt. Das Abfallen von σ trägt zu einem Anstieg des Flüssigkeitsübertritts J_v bei. Der durch den Schaden zustande gekommene Anstieg in J_v und PS führen zu einem Anstieg des transvaskulären Fluxes von Plasmaproteinen ins Lungengewebe. Das hydrostatische, meist kardiogene Ödem kommt also vorrangig durch ein Ungleichgewicht zwischen den Starling-Kräften ($P_{ka} - P_{is}$) und ($\Pi_{ka} - \Pi_{is}$) zustande, während das Ödem vom Permeabilitätstyp durch Änderung der endothelialen Eigenschaften (K_f , σ und P) entsteht. *In vivo* ist diese Differenzierung jedoch nicht derart rigide und es wird durch Studien der letzten Jahre immer deutlicher, dass durchaus Überschneidungen beider Pathomechanismen existieren [18].

1.2. Die Permeabilität des kontinuierlichen Endothels unter physiologischen Bedingungen

Das Gleichgewicht zwischen Proteingehalt in Plasma und Interstitium und dem dadurch entstehenden transvaskulären osmotischen Druck sind also maßgebend für die Aufrechterhaltung der pulmonal-vaskulären Membran. Albumin ist das quantitativ bedeutendste Plasmaprotein und trägt dadurch maßgeblich zur Aufrechterhaltung des kapillären onkotischen Druckes bei. Albumin geht aber auch aktive Interaktionen mit dem Endothel ein, beispielsweise haftet es an der luminalen Oberfläche und bindet durch seine kolloidosmotischen Kräfte Wasser und Ionen, die deshalb die Endothelschranke langsamer passieren [19]. Neben der Aufrechterhaltung des onkotischen Drucks des Plasmas hat es als Serumtransportprotein hydrophober Substanzen wie Fettsäuren, Steroidhormonen und zahlreicher Medikamente eine zentrale Bedeutung [20, 21, 22].

Das kontinuierliche Endothel, das beispielweise in der Mikrozirkulation der Lunge, der Skelettmuskulatur, des Myokards und im Hirn vorkommt, ist in seiner Permeabilität selektiv reguliert. Pappenheimer und Grotte postulierten diesbezüglich in den 50er Jahren die „Zweiporentheorie“.

Danach können unter physiologischen Bedingungen hydrophile Moleküle mit einem Durchmesser von $<3\text{nm}$ wie Elektrolyte, Wasser, Glukose, Kohlenmonoxid durch kleine interendotheliale Lücken das Gefäß verlassen und so zum Stoffwechsel des umliegenden Gewebes beitragen. Für Moleküle mit einem Durchmesser ab 3nm (Serumalbumin rund 15nm) ist das kontinuierliche Endothel größenunabhängig bis zu viermal weniger permeabel, weswegen Pappenheimer und

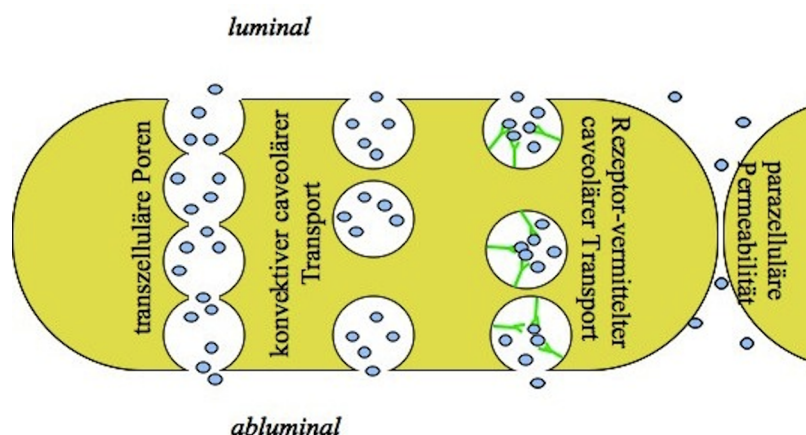


Abbildung 1.1.: Schema der makromolekularen Permeabilität im intakten kontinuierlichen Endothel.

Vier Passagewege, die die Permeabilität von Makromolekülen im kontinuierlichen Endothel gewährleisten könnten, werden diskutiert. Von links nach rechts: 1. ein konvektiver passiver Transport über transzelluläre Poren (VVO), 2. ein passiver -, 3. rezeptorvermittelter caveolärer Transport und 4. eine geringe parazelluläre Permeabilität.

Grotte hier eine zweite unbekannt Pore vermuteten [23, 24]. Heute werden vier potentielle der großen Pore entsprechende Passagewege diskutiert, die in der Lage wären, den geringen interstitiellen Bedarf an Makromolekülen zu decken. Diese sind 1. ein konvektiver Transport durch transendotheliale Poren in Form von Vesikel-Vakuolen-Organellen (VVO), 2. ein passiver oder 3. aktiver rezeptorvermittelter transzellulärer Transport durch kleine zelluläre Vesikel, Caveolen genannt oder 4. ein geringer parazellulärer Stoffaustausch (siehe Abbildung 1.1). Ob und inwieweit die einzelnen Mechanismen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen relevant sind, ist derzeit noch Diskussionsgegenstand. VVOs entstehen durch eine Verschmelzung mehrerer zellulärer Vesikel, wodurch eine transzelluläre Pore oder Kanal entsteht, durch die konvektiv kleine und auch große Moleküle die Endothelschranke überwinden können. Bisher ist zwar bekannt, dass gewisse inflammatorische Stimuli die Bildung von VVOs provozieren können, ihr Beitrag zur basalen Albuminpermeabilität und die zugrunde liegenden molekularen Vorgänge sind aber derzeit noch weitestgehend unbekannt [18].

Die Rolle des parazellulären Transports in kontinuierlichen Endothelien wird kontrovers diskutiert. Einerseits spricht die Mehrzahl der Studien für einen unter physiologischen Bedingungen fast ausschließlich transzellulär ablaufenden Proteintransport über dem kontinuierlichen Endothel, andererseits sprechen beispielsweise Temperaturreduktionsstudien auch hier für einen vorrangig parazellulären Transport [25, 26]. Nach aktuellem Ermessen ist davon auszugehen, dass der aktive, rezeptorvermittelte transzelluläre Transport durch zelluläre Caveolen, Transzytose genannt, der relevanteste Passageweg für den transzellulären Transport von Makromolekülen unter physiologischen Bedingungen im kontinuierlichen Endothel darstellt. Gleichzeitig scheinen unspezifische Wechselwirkungen zu bewirken, dass es durch eine gesteigerte rezeptorvermittelte transzelluläre Transportrate auch zu einem vermehrten Transport ungebundener Moleküle kommt [26].

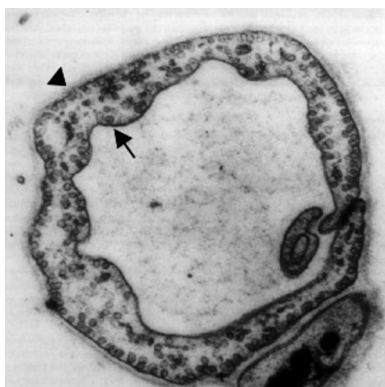


Abbildung 1.2.: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer einzelnen gefäßbildenden Endothelzelle. Vesikuläre Caveolen werden sowohl luminal (Pfeil) als auch abluminal (Pfeilspitze) sowie in Clustern und vereinzelt intrazellulär sichtbar. Die Vergrößerung beträgt 47.025. Quelle: Wagner und Casley-Smith, 1981 [35] mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

1.2.1. Die Rolle der Transzytose

Die Transzytose wurde bereits als dominierender Passageweg für viele Makromoleküle wie Albumin [27, 28, 29] Insulin, Transferrin, Caeruloplasmin, HDL und LDL im kontinuierlichen Endothel identifiziert [30, 31]. Als zelluläres Vehikel dienen der Transzytose Caveolen, die erstmals 1953 von Palade beschrieben wurden [32]. Sie stellen sich als Ω -förmige Zellvertiefungen mit einem Durchmesser von 50 bis 100nm und einer flaschenhalsförmigen Öffnung mit einem Durchmesser von rund 35nm dar (siehe Abbildung 1.2). Jede Endothelzelle vom kontinuierlichen Typ enthält im Durchschnitt 10.000 - 30.000 Caveolen, die damit einen Anteil von 13% - 15% am Gesamzellvolumen ausmachen. In Endothelzellen pulmonaler Kapillaren ist die Dichte an Caveolen mit rund $600/\mu\text{m}^3$ besonders hoch [33, 34], was die These der caveolär vermittelten Permeabilität bekräftigt und darauf hinweist, dass das pulmonale Endothel in seiner Albuminpermeabilität besonders streng reguliert ist.

Caveolen sind hauptsächlich zur luminalen, teilweise aber auch zur basolateralen Seite geöffnet. Transzytose lässt sich in großem Rahmen in Endothelzellen von Herz und Lunge, Skelettmuskulatur, Fettgewebe, Hoden und arteriellem Endothel darstellen und wird außerdem in vielen polaren Epithelien wie dem intestinalen und lymphatischen Epithel, Hepatozyten und im proximalen Nierentubulus aber auch in anderen Zelltypen wie Osteoklasten und Neuronen beobachtet [36]. Eine besonders hohe Transzytoseaktivität wird im riesigen Netz kapillärer Endothelzellen beschrieben. So stellten mehrere Arbeitsgruppen schon vor 20 Jahren fest, dass goldmarkiertes und damit elektronendichtes Albumin fast ausschließlich durch vesikuläre Strukturen durch diese Endothelien transportiert wird [27, 37].

In kapillären Endothelzellen besetzen Caveolen, transzelluläre Kanäle und clathrinbeschichtete Vesikel bestimmte Mikrodomänen der Zellmembran. Diese Mikrodomänen sind maßgeblich am transzellulären Transport beteiligt. Die spezifischen caveolär besetzten Membrandomänen (cMD) sind reich an gerüstgebendem Caveolin-1 (Cav-1), G-Proteinen, G-Protein assoziierten Rezeptoren

und Tyrosinkinasen der Src-Familie, Moleküle, die nach dem aktuellen Verständnis, Schlüsselrollen in der Signalkaskade der Transzytose spielen [38, 39]. Durch die Bindung von Makromolekülen an die biochemisch unterschiedlich differenzierten Mikrodomänen werden sie sortiert und zu Zielstrukturen wie dem Golgi-Apparat, den Lysosomen oder über die Zelle an den basolateralen Pol der Zelle transportiert [40]. Grundsätzlich ist ein bidirektionaler Transport zwischen luminalem und abluminalen Zellpol möglich. Der von luminal nach interstitiell weisende Konzentrationsgradient scheint aber deutlich zu dominieren. Es wird davon ausgegangen, dass Bestandteile des Plasmas einschließlich Makromolekülen auch passiv über Konvektion und Adsorption in Caveolen transzytiert werden [40]. Häufig im Serum vertretene Moleküle werden beim Abschnürprozess mit in die Caveole einbezogen oder aber durch elektrostatische Interaktionen mit Oberflächenproteinen adsorptiv angezogen und im Rahmen des Rezeptorvermittelten Transports als „blinde Passagiere“ mit nach abluminal transportiert [40]. Die nicht unerhebliche Rate der auf diese Art transportierten Proteine hängt folglich von der Anzahl aktiver Caveolen, der Plasmakonzentration des betreffenden Moleküls und intermolekularer Konkurrenz ab [40].

1.2.2. Transzytose auf molekularer Ebene

Für das bessere Verständnis der Arbeit wird im Folgenden kurz auf die molekularen Grundlagen der Transzytose eingegangen. Die Signalkaskade, die zum transzellulären Albumintransport durch eine Caveole führt, wird durch das Andocken eines Albuminmoleküls an ein spezielles albuminbindendes Glykoprotein ausgelöst. Bisher wurden 18-, 31-, 60- und 75- kDa große Glykoproteine mit albuminbindenden Eigenschaften und caveolärer Lokalisation identifiziert. Verschiedene Studien zeigten unter Zuhilfenahme kreuzvernetzender Antikörper, dass das 60kDa große Glykoprotein (Gp60) die höchste Affinität für natives Albumin besitzt, in cMDs in besonders hoher Konzentration vorliegt und eine essentielle Rolle für die Transzytose von Albumin spielt [25, 27, 28]. Die Aktivierung des von Gp60 führt zu einer 2- bis 3-fach gesteigerten transzellulären Permeabilität radioaktiv markierten Albumins. Auf der anderen Seite reduziert eine verminderte Expression von Gp60 sowohl die Albuminbindung als auch den -transport in pulmonalen Mikrogefäßen [41]. Durch Bindung von Albumin an seinen Rezeptor wird G-Protein-vermittelt eine Tyrosinkinase aus der Src-Familie aktiviert [41, 42]. Diese phosphoryliert daraufhin innerhalb von Minuten Cav-1 und die GTPase Dynamin, die daraufhin einen Komplex bilden, die Caveole von der Zelloberfläche abtrennen und über einen negativen Feedbackmechanismus die Src-Aktivität drosseln [43, 44]. Wird die Phosphorylierung beispielsweise durch Herbimycin A und Genistein, zwei unspezifische Tyrosinkinaseinhibitoren, unterbrochen, so findet keine Gp60-induzierte Aufnahme von Albumin statt, was dafür spricht, dass es sich bei der Src-Tyrosinkinase um ein weiteres Schlüsselenzym der Transzytose handelt [45].

Caveolin-1, das strukturgebende Protein der Caveolen gehört zu einer multigenen Familie, deren Vertreter sich strukturell zwar ähneln, bezüglich Verteilung und Eigenschaften aber Unterschiede aufweisen. So zeigt Caveolin-2 beispielsweise eine ähnliche Verteilung wie Caveolin-1, Caveolin-

3 wurde dagegen bisher lediglich in Muskelzellen identifiziert. Die Bedeutung von Caveolin-2 ist derzeit noch Gegenstand der Forschung [46]. Cav-1 hingegen wurde als entscheidendes Protein für die Bildung von Caveolen identifiziert, indem einerseits gezeigt wurde, dass die Menge von exprimierten Cav-1 eng mit der Anzahl von Caveolen korreliert [47], und andererseits an Studien mit Caveolin-knockout Mäusen (*Cav-1^{-/-}*) gesehen wurde, dass diese weder zur Caveolenbildung noch zu Transzytose fähig sind [48, 49, 50]. Interessanterweise zeigen diese Mäuse Defekte in der Morphologie der interzellulären *tight junctions* und Abnormalitäten bezüglich der endothelialen Zelladhäsion an der Basalmembran pulmonaler Kapillaren, sodass es zu einer gesteigerten parazellulären Permeabilität kommt. Cav-1 scheint an fast allen Prozessen der Transzytose direkt oder indirekt beteiligt zu sein. So trägt es beispielsweise direkt zur Abschnürung der Caveole bei und ist maßgeblich an deren Transport und an der zellulären Signalübertragung beteiligt [28, 41].

Die caveoläre Abschnürung von der Zellmembran wird nach Phosphorylierung durch die Src-Kinase über die 100kDa große GTPase Dynamin vermittelt, die sich wie ein Kragen um den Hals der Caveole herum anreichert. In dieser oligomerisierten Form, steigt die interne GTPasenaktivität bis auf das 10-fache an und das Dynamin generiert eine konstringierende Kraft um den Caveolenhals [51] (siehe Abbildung 1.3 auf der nächsten Seite). Liegt die Caveole nach der Abschnürung durch Dynamin nun frei im Zytosol, wird sie von zytosolischen Tubuli durch die Zelle geleitet. Die treibende Kraft ist bis dato unbekannt. Es ist anzunehmen, dass dieser Transport durch das visköse Zytosol Energie benötigt. Wie wird der caveoläre Inhalt nun am abluminalen Pol sezerniert? Die Exozytose wird nach heutigem Erkenntnisstand über sogenannte SNAREs vermittelt. Die mit der caveolären Membran assoziierten v-SNAREs und die auf der Zielmembran lokalisierten t-SNAREs gehen dabei mithilfe des N-Ethylmaleimid-sensiblen Faktors (NSF) einen Komplex ein, der die Exozytose reguliert [52]. Studien haben gezeigt, dass ein funktionierender Apparat aus v- und t-SNAREs entscheidend für die Fusion von Caveolae und Zellmembran ist [53]. Welche Rolle spielt die Transzytose nun aber im Falle einer endothelialen Schädigung?

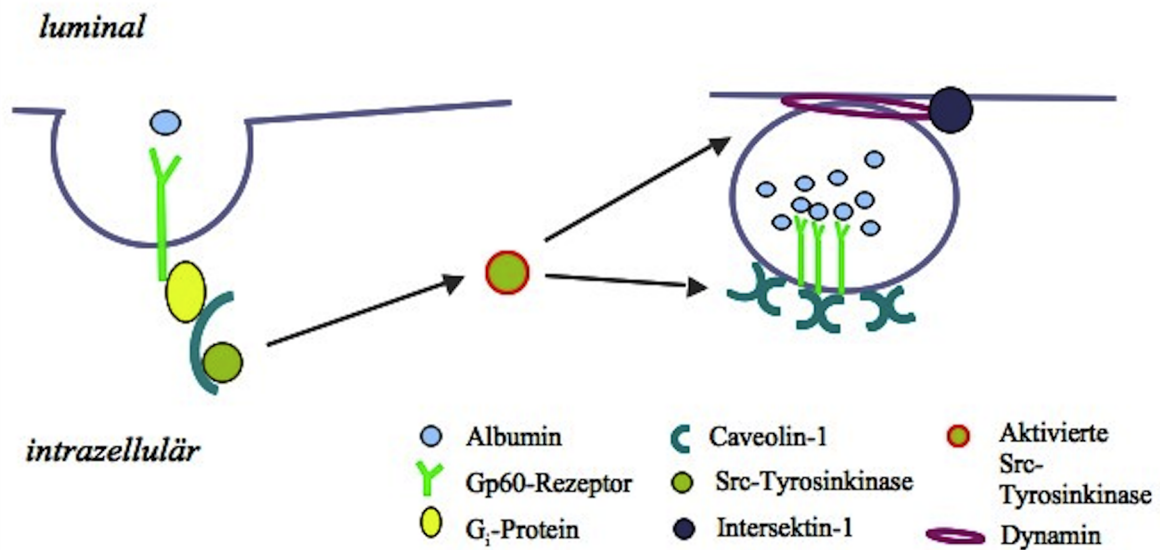


Abbildung 1.3.: Molekulare Mechanismen caveolärer Endozytose. Die Bindung von Albumin an seinen spezifischen caveolären Rezeptor Gp60 führt über ein G-Protein zur Aktivierung einer Src-Tyrosinkinase, die Caveolin-1 und Dynamin phosphoryliert und damit die caveoläre Abschnürung von der Zellmembran einleitet. Durch elektrostatische Interaktionen wird nicht nur rezeptorgebundenen sondern auch -ungebundenen Albumin in die Caveole eingeschlossen.

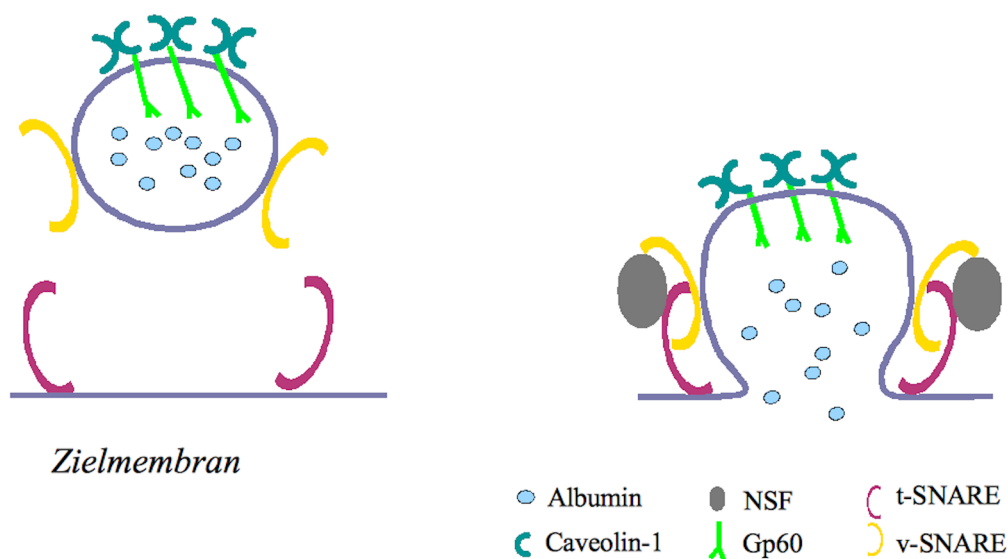


Abbildung 1.4.: Molekulare Mechanismen caveolärer Exozytose. Caveoläre v-SNAREs und membranständige t-SNAREs interagieren über noch unbekannte Mechanismen und führen damit zur caveolären Fusion mit der Zellmembran. Der N-Ethylmaleimid-sensible Faktor (NSF) löst die SNARE-Proteine anschließend wieder voneinander.

1.3. Die Permeabilität des kontinuierlichen Endothels unter pathologischen Bedingungen

Es existieren zwar viele Arbeiten, die die zellulären Prozesse, die zur Steigerung parazellulärer Permeabilität beitragen, untersuchen, der Gedanke jedoch, dass auch die Transzytose in relevantem Maße an einer pathologisch gesteigerten Proteinextravasation beteiligt sein könnte, wurde bislang kaum untersucht. Die Rolle der endothelialen Transzytose an der Entstehung des interstitiellen und pulmonalen Ödems zu entschlüsseln, ist jedoch von großem klinischen Interesse, um neue Therapieansätze zu entwickeln. Der Anstieg parazellulärer Permeabilität unter inflammatorischem und hydrostatischem Stress wird bis dato wie folgt erklärt.

1.3.1. Gesteigerte parazelluläre Gefäßpermeabilität

Bisher wurde die entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der endothelialen Barrierefunktion unter Stress den interendothelialen Kontakten benachbarter Zellen zugesprochen. Diese werden durch intermolekulare Verbindungen von Transmembranproteinen der *adherens junctions* und *tight junctions* gebildet. Diese Proteine werden von verschiedenen Mediatoren reguliert. Faktoren, die zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität beitragen, wirken über Desintegration beteiligter molekularer Verbindungen. Während Signalkaskaden, die die endotheliale Barriere stabilisieren, zur vermehrten Expression oder stärkeren Bindung beteiligter Proteine führen.

Vielfach untersuchte permeabilitätssteigernde Agonisten wie Tumornekrosefaktor- α , Histamin, Lipopolysaccharid (LPS), Sauerstoffradikale und Thrombin bewirken die Aktivierung der kleinen GTPase RhoA. Diese induziert die Kontraktion von Myosin-Leichtketten (MLC)-assoziierten Aktinfasern und damit des gesamten Zytoskeletts. Dieser Prozess bewirkt *in vitro* nicht nur eine Kontraktion der Zelle, sondern gleichzeitig wird das an der Bildung der *adherens junctions* beteiligte VE-Cadherin in die Zelle retrahiert. Dadurch verliert Cadherin den Kontakt zu seinem kontralateralen Partner und parazelluläre Spalten bilden sich [54].

Ein Anstieg des intrazellulären Calciums ($[Ca^{2+}]_i$) mit nachfolgender Zellkontraktion ist ein weiteres Schlüsselement sowohl in Entzündungsprozessen als auch unter hydrostatischem Stress [55, 56]. Der Calciumanstieg ist dabei zweiphasig. Initial kommt es Inositol-Triphosphat (IP_3)-vermittelt zur schnellen Freigabe aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern des endoplasmatischen Retikulums. Nach Leerung dieses Speichers kommt es durch Öffnung membranständiger Kanäle aus der TRP-Familie zum verzögerten aber langanhaltenden Einstrom extrazellulären Calciums. Hier findet RhoA wiederum einen Angriffspunkt, indem es den Ca^{2+} -Einstrom durch bestimmte TRP-Kanäle erhöht [54].

1.3.2. Thrombin als Mediator endothelialer Permeabilität

Thrombin ist vorrangig durch seine zentrale Rolle in der Gerinnungskaskade bekannt. Es entsteht durch die proteolytische Spaltung des inaktiven Prothrombins durch die Gerinnungsfaktoren V und X und hat im Plasma eine Halbwertszeit von etwa 5min, bevor es durch aktiviertes Protein C abgebaut wird. In der Pathogenese septischer Prozesse, wie sie auch dem ARDS zugrunde liegen können, kommt es unter anderem zur Bildung von Mikrothromben, in denen Thrombin bis zu 1.000-fach konzentriert vorliegt. Wird es durch fibrinolytische Prozesse freigesetzt, trägt es maßgeblich zur vaskulären Hypermeabilität bei [54, 57].

Die durch Thrombin *in vitro* vermittelte Signalkaskade, die zum interendothelialen Kontaktverlust führt, beginnt mit der Bindung an den membranständigen Proteinase-aktivierten-Rezeptor-1 (PAR-1). Dies löst eine in ihrer Stärke von Anzahl und Affinität des PAR-1 abhängige Reaktion aus und führt innerhalb von Minuten zu einer Zunahme der endothelialen Permeabilität [18]. Diese wird über einen Anstieg zytosolischen Calciums, MLC-Phosphorylierung und damit einhergehender Zytoskelettkontraktion, sowie einer Internalisierung von an *adherens junctions* beteiligten VE-Cadherinen ausgelöst [58]. Gleichzeitig wird RhoA aktiviert, was wie beschrieben ebenfalls zur Zellkontraktion beiträgt. Der aktivierte PAR-1 interagiert außerdem mit mehreren an der Permeabilitätskontrolle beteiligten G-Proteinen (siehe Abbildung 1.5 auf der nächsten Seite).

Allerdings sind, wie wir kürzlich zeigten [59], diese Beobachtungen *in vitro* nicht auf die Prozesse im intakten Organ übertragbar. *In vivo* scheinen vielmehr eine Steigerung des Gefäßtonus' und -widerstandes zur erhöhten Permeabilität zu führen. Wurden diese Effekte eliminiert, so verursachte Thrombin kein pulmonales Ödem mehr [60, 61]. Wie es zu dieser Diskrepanz zwischen *in situ* und *in vitro* Daten kommt, ist bisher noch weitestgehend unklar. Durch eine mangelnde Expression des Thrombinrezeptors PAR-1 im intakten Endothel ist sie jedoch nicht zu erklären, da es auch an der isoliert-perfundierten Lunge zu einem Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ kommt [59].

1.3.3. Hinweise auf einen regulierbaren transzellulären Transport

Entgegen zahlreicher Studien, die sich auf die parazelluläre Permeabilitätssteigerung konzentrieren, berichten einige Autoren über Beobachtungen, die für einen regulierbaren transzellulären Transport sprechen. So gibt es Hinweise darauf, dass aktivierte neutrophile Granulozyten die Src-Kinase in Endothelzellen aktivieren und dadurch zur Caveolin-1-Phosphorylierung führen, wie in der initialen Phase der caveolären Endozytose [62]. Außerdem kam sowohl in isolierten Kaninchenlungen, die mit LPS stimuliert wurden, als auch in isoliert-perfundierten Rattenlungen im Schockmodell sowie an der Blut-Hirn-Schranke, in denen das vaskuläre Bett mit Bradykinin und Leukotrien C4 stimuliert wurde, die initiale endotheliale Permeabilitätssteigerung nicht durch die Desintegration interzellulärer Kontakte, sondern durch einen gesteigerten als "vesikulär" beschriebenen Transport zustande [63, 64, 65]. Hier ergeben sich also durchaus Hinweise auf eine gesteigerte Transzytoserate unter inflammatorischen Bedingungen.

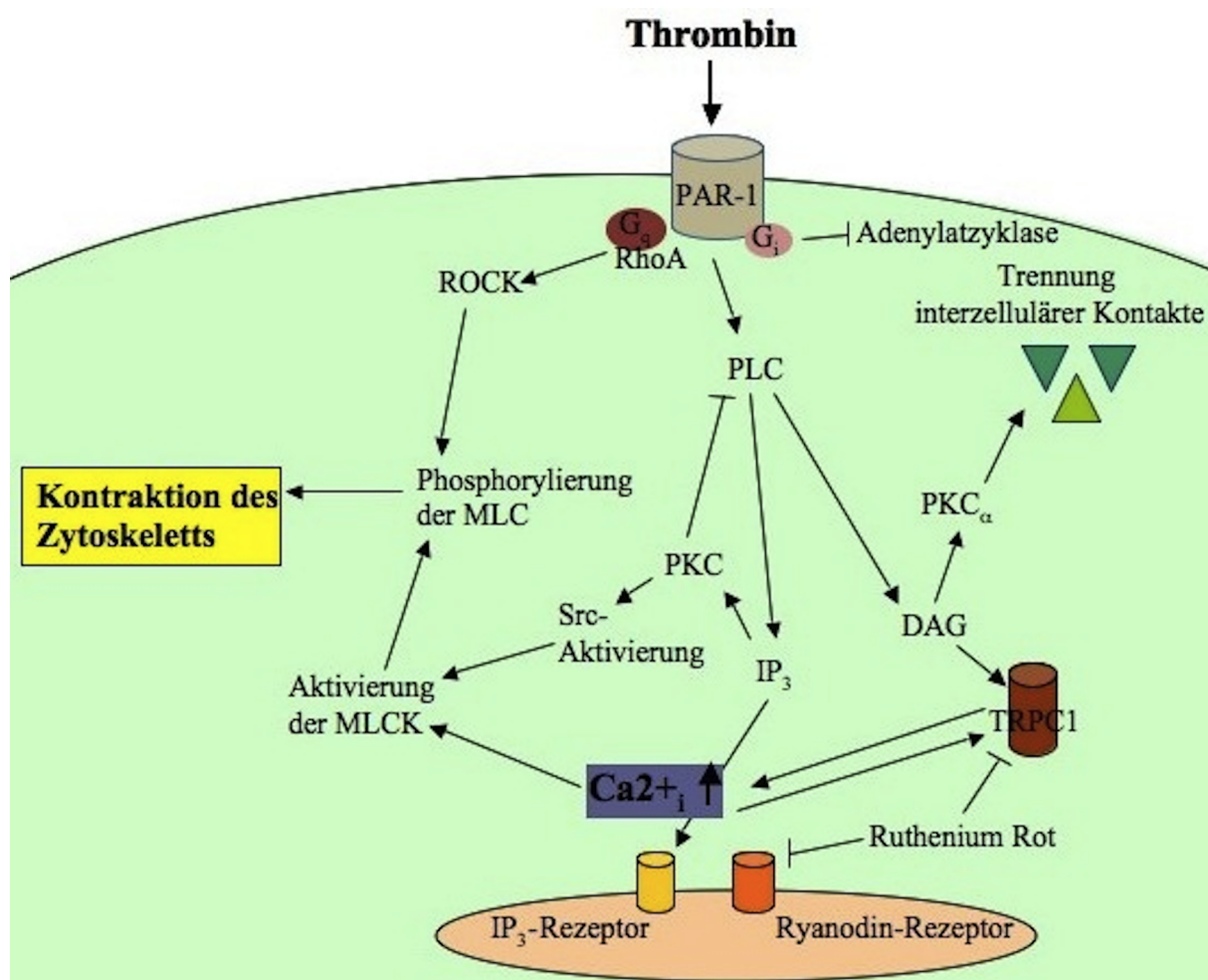


Abbildung 1.5.: Schema der durch die Interaktion von Thrombin mit seinem endothelialen Rezeptor PAR-1 initiierten Signalkaskade. Durch die Bindung von Thrombin an PAR-1 steigt $[Ca^{2+}]_i$ und die Proteinkinase C_α wird aktiviert. Die MLC-Phosphorylierung führt zur Kontraktion des Zytoskeletts. Außerdem kommt es PKC α vermittelt zur Trennung von Proteinen der Zonula adherens (VE-Cadherine, p120, β -Catenin). Beides bewirkt eine interendotheliale Spaltenbildung. PAR1, proteinaseaktivierter Rezeptor-1; RhoA, Mitglied A der Ras-homologen Genfamilie; ROCK, Rho-assoziierte Proteinkinase; PLC, Phospholipase C; PKC, Proteinkinase C; MLC, Myosinleichtkette; MLCK, Myosinleichtkettenkinase; IP₃, Inositoltriphosphat; DAG, Diacylglycerin; TRPC1, Calciumkanal der TRPC-Familie; Ca²⁺_i, intrazelluläres Calcium.

Bis dato sind aber sowohl der Signalweg als auch die quantitative Bedeutung der Transzytose für die Extravasation von Plasmaproteinen unter inflammatorischen Bedingungen unbekannt. Im Vorfeld unserer Untersuchungen beobachteten unsere Kooperationspartner um Prof. Stefan Uhlig (Institut für Pharmakologie und Toxikologie; Uniklinik RWTH Aachen) an (HMVEC-L) eine gesteigerte Transzytoserate nach Thrombinstimulation (unveröffentlichte Daten Kooperationsprojekt AG Kübler/Charité Berlin - AG Uhlig/RWTH Aachen).

1.4. Die Funktion der sauren Sphingomyelinase

Vereinfacht dargestellt bestehen biologische Zellmembranen aus Sphingolipiden, Cholesterin und Phospholipiden. Der häufigste Vertreter der Sphingolipide in humanen Zellmembranen ist Sphingomyelin, das aus einem hydrophoben Ceramidteil und einer hydrophilen Phosphorylcholingruppe besteht. Durch ihre hohen Schmelztemperaturen steigern Sphingolipide die membranöse Steifigkeit und tragen zur Organisation der Zellmembran bei. In ihrer unmittelbaren Nähe reichern sich Cholesterinmoleküle an, die die Abstände zwischen den voluminösen Sphingolipiden füllen. Sphingolipide stehen sowohl untereinander als auch mit den umliegenden Cholesterinmolekülen über hydrophobe und hydrophile Verbindungen sowie Sauerstoffbrücken in Verbindung. Dadurch grenzen sich sphingolipid- und cholesterinreiche Membrandomänen von phospholipidreichen Domänen strukturell und funktionell ab und formen sogenannte „Rafts“ [66]. Rafts sind sowohl Sammelpunkte von Rezeptoren als auch Ankerpunkte des Zytoskeletts, was vermuten lässt, dass diese Membranabschnitte von besonderer Bedeutung für die Triggerung zellulärer Signalkaskaden sind. Durch die Erkenntnisse über Rafts und Hinweise darauf, dass Sphingolipide, die in ihrer signalübertragenden Bedeutung hinlänglich bekannte Proteinkinase C inhibieren [67], entwickelte sich ein über die strukturelle Bedeutung hinausgehendes Interesse an Sphingolipiden als biochemisch aktive Moleküle. Im Zentrum des Interesses stehen dabei Derivate der Sphingomyeline, die Ceramide.

Ceramide entstehen entweder durch de novo Synthese oder durch eine über Sphingomyelinasen vermittelte Hydrolyse aus Sphingomyelin (siehe Abbildung 1.6 auf der nächsten Seite). Nach Samet and Barenholz werden 5 Gruppen von Sphingomyelinasen unterschieden [68]. Die lysosomal lokalisierte saure Sphingomyelinase (ASM) und die sekretorische zinkabhängige ASM sind die am besten untersuchten Vertreter. Außerdem existieren eine magnesiumabhängige sowie –unabhängige neutrale und eine rein in intestinalen Zellen vorkommende alkalische Sphingomyelinase [69]. Die saure Sphingomyelinase wurde in den letzten Jahren vielfach untersucht, und festgestellt, dass ihre Aktivität durch inflammatorische Mediatoren wie LPS, Endotoxin und plättchenaktivierenden Faktor (PAF) aber auch viele andere Einflüsse gesteigert wird [70]. Als Folge hydrolysiert die aktivierte ASM aus Sphingomyelin Ceramid. Die Synthese von Ceramiden verändert die biophysikalischen Eigenschaften der Zellmembran, da Ceramidmoleküle zur Ansammlung neigen und ceramidreiche Makrodomänen bilden. Diese Akkumulation von Ceramiden lockt wiederum Rezeptoren verschiedener Signalkaskaden an. Es ist anzunehmen, dass es durch die entstehende hohe Rezeptorendichte zu einer effektiveren Signalübertragung von der Zellmembran zum Zytosol kommt, dass ceramidreiche Membrandomänen also nicht Teil eines spezifischen Signalweges sind, sondern die zelluläre Signalübertragung über gewisse Rezeptoren generell erleichtern und beschleunigen [70].

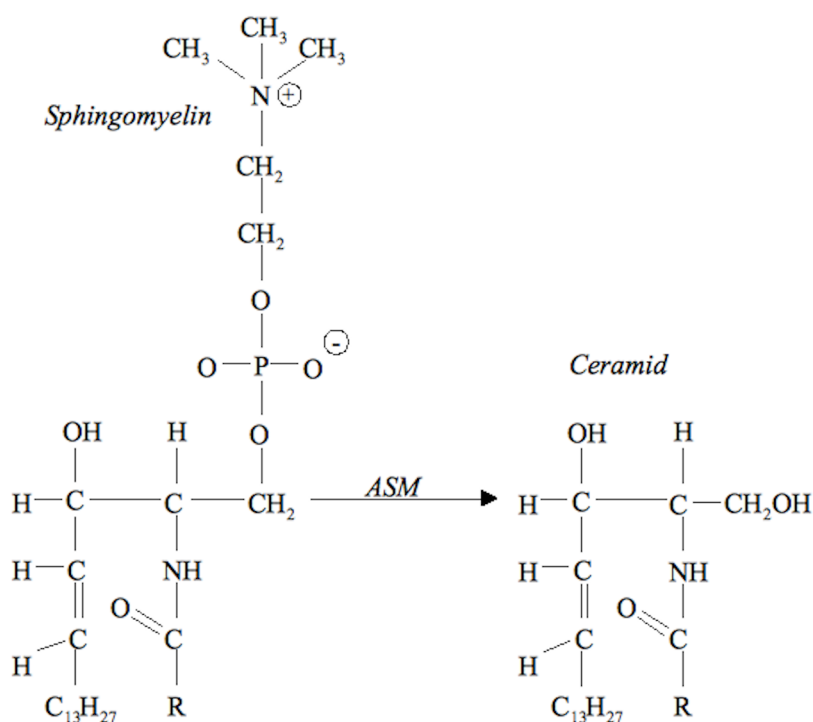


Abbildung 1.6.: Hydrolyse von Ceramid aus Sphingomyelin. Das in Zellmembranen lokalisierte Sphingomyelin besteht aus einem hydrophoben Ceramidteil und einer hydrophilen Phosphorylcholin-Gruppe. Die saure Sphingomyelinase (ASM) spaltet diese beiden Teile.

Es gibt auch Hinweise darauf, dass Ceramid die caveoläre Transzytose beschleunigen könnte. 95% allen membranös vorhandenen Cholesterins und Sphingomyelins reichert sich in Caveolen an [66], die ASM-Aktivität ist caveolär besonders hoch und die Stimulation mit exogener Sphingomyelinase hat eine Biogenese von Caveolen zur Folge. Es gibt also offenbar weitreichende Interaktionen zwischen dem Signalweg der ASM und Ceramiden und caveolären Membrandomänen, weswegen fraglich ist, inwieweit sich Rafts und caveoläre Membrandomänen überhaupt voneinander unterscheiden [71, 66]. Diese Ergebnisse machten uns auf die ASM aufmerksam. Könnte sie eventuell an der Regulation der Transzytose beteiligt sein?

1.5. Ziel der Arbeit

Die Rolle der Transzytose in pulmonalen Endothelzellen wird bis dato kontrovers diskutiert. Unter physiologischen Bedingungen wird ihr eine signifikante Bedeutung an der Aufrechterhaltung der Proteinhomeostase besonders im kontinuierlichen Endothel wie dem der Lunge zugesprochen. Für die Beteiligung der Transzytose an der unter pathologischen Bedingungen wie inflammatorischem oder hydrostatischem Stress gesteigerten kapillären Permeabilität gibt es vereinzelte Hinweise, ohne dass bisher ein vermittelnder Signalweg entdeckt worden wäre. In der vorliegenden Arbeit wurden intravitalmikroskopische- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an isoliert-

perfundierten Rattenlungen durchgeführt, um die Beantwortung folgender klinisch relevanter Fragen voranzubringen:

1. Haben inflammatorische Mediatoren wie Thrombin Auswirkungen auf die Transzytose in pulmonalen Kapillaren?
2. Lösen akute und chronische pulmonal-kapilläre Druckbelastungen eine Steigerung der endothelialen Transzytose aus?
3. Welchem Signalweg unterliegt die Transzytose?
4. Inwiefern ist intrazelluläres Calcium an der Regulation der endothelialen Transzytoseaktivität beteiligt?

2. Material und Methoden

2.1. Tabellarische Übersicht

2.1.1. Materialien

Material	Name	Hersteller
Dialyseschläuche	Spectra/ Por 2	Carl Roth GmbH & Co.
Flügelkanülen	Vacutainer Brand	Becton Dickinson & Co.
Gasgemisch	5% CO ₂ , 20% O ₂ , 75% N ₂	Linde
Mikrokatheter	Fine bore polyethylene tubing, Ref. 800/110/100, 0,61mm Außendurchmesser	Smiths Medical
Sterilfilter	FP 30/0,2 CA-S, Ø 0,2µm	Schleicher & Schuell Microscience

Tabelle 2.1.: Übersicht, Material

2.1.2. Geräte und Software

Gerät/Software	Name	Hersteller
CCD Kamera	Sensicam	PCO
Intravitalmikroskop	Axiotech vario 100HD	Zeiss
Filter	BP 450-490	Zeiss
Emissionsfilter	FT 510, LP 520	Zeiss
Objektiv	UAPO 40x W2/340	Olympus Optical Co.
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf
Monochromator	Polychrom IV	T.I.L.L. Photonics GmbH
Rollerpumpe	Peristaltic Pump P-3	Pharmacia Fine Chemicals
Software zur Messung und Darstellung der Drücke des Perfusionssystems	Labview 5.1.1	National Instruments
Software zur digitalen Bildverarbeitung	TILLvisION 4.0	T.I.L.L. Photonics GmbH
Software zur statistischen Analyse	Sigmaplot 11.0	Systat Software
Spektrophotometer	Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences
Tischzentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus Instruments
Transmissions-Elektronenmikroskop	LEO 902	Zeiss
Ultrazentrifuge	Sorvall SLA-1500	Thermo Fisher Scientific Inc.
Ultrazentrifugenbecher	Sorvall PC Dry Spin Bottle 250 ml	Kendro Laboratory Products
Ventilator	Rodent Ventilator Model 131	Valley Scientific Co.
Wasserbad	Thermostat 2761	Eppendorf

Tabelle 2.2.: Übersicht, Geräte und Software

2.1.3. Chemikalien

Chemikalie	Name	Hersteller
Dextran	Dextran 60, pyrogen-free, Mr 60.000-90.000Da	Serva Feinbiochemica GmbH & Co.
FITC-Albumin	Albumin, Fluorescein isothiocyanate Conjugate, bovine	Sigma-Aldrich Co.
Fura-2AM	Fura-2AM	Invitrogen
Heparin N25000	Liquemin	Roche
Imipramin	Imipramine, Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Co.
Ketamin	Ketaminhydrochlorid	Pharmacia & Upjohn GmbH
Metamizol	Novalgin	Aventis Pharma
Physiologische Natrium-Chlorid- Lösung	Plastipur	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Pluronic	Pluronic F-127	Molecular Probes
Thrombin	Alpha-Thrombin, human	Molecular Probes
Urethan	Urethane Minimum 99%	Sigma-Aldrich Co.
Xylazinhydrochlorid	Rompun	Bayer Vital GmbH

Tabelle 2.3.: Übersicht, Chemikalien

2.1.4. Lösungen

Lösung	Name	Hersteller
5% BSA-Lösung (pH 7,4, 300mosmol/l)	6g NaCl	Merck
	1,1g CaCl ₂	Merck
	0,3g KCl	Merck
	0,23g MgC x 6 H ₂ O	Merck
	2,45g Na ⁺ -Laktat	Merck
	1,5g Glukose	Merck
5% BSA in 10mM Na ⁺ -Phosphat-Puffer	30g Serumalbumin vom Kalb 1l H ₂ O	Sigma-Aldrich Co.
1mM EDTA in 2% Natriumhydrogencarbonat (pH 8)	0,37g Triplex III	Fluka
	20g NaHCO ₃	Merck
	1l H ₂ O	
1mM EDTA (pH 8)	0,37g Triplex III 1l H ₂ O	Fluka
1mM EDTA in 2% Natriumhydrogencarbonat (pH 8)	0,37g Triplex III	Fluka
	20g NaHCO ₃	Merck
	1l H ₂ O	
Fixierungsgemisch mit HEPES (pH 7,35)	Stammlösung	
	78,084g HEPES	Merck
	800ml Aqua bidest (750mosmol/l)	
	Fixierungsgemisch	
	500ml 0,3 M HEPES	Merck
	60ml 25% Glutardialdehyd	
	60ml 25% Paraformaldehyd	Carl Roth
	280ml Aqua bidest (800 – 900mosmol/l)	GmbH & Co. Merck

Lösung	Name	Hersteller
Fixierungsgemisch mit HEPES (pH 7,35)	2.370ml H ₂ O	Sigma-Aldrich Co.
	30ml 1% HAuCl ₄	
	450ml H ₂ O	Mallincrodt
	120ml 1% Trinatriumcitrat	Riedel-de Haen
	6ml 1% Tanninsäure	
<hr/>		
Goldlösung		
Lösung A	2.370ml H ₂ O	Sigma-Aldrich Co.
	30ml 1% HAuCl ₄	
Lösung B	450ml H ₂ O	Mallincrodt
	120ml 1% Trinatriumcitrat	Riedel-de Haen
	6ml 1% Tanninsäure	
	<hr/>	
10% NaCl-Lösung	2g NaCl/ 20ml H ₂ O	Merck
Ringerlösung (pH 7.4)	8.0g NaCl	Merck
	0.2g CaCl	Merck
	0.1g KCl	Merck
	0.1g NaHCO	Merck
	per 1,000 ml H ₂ O	
<hr/>		
1% Tanninsäure	200mg Tanninsäure	Riedel-de Haen
	20ml H ₂ O	
<hr/>		
1% Tri-Natriumcitrat	3,42g Tri-Nacitrat * 2 H ₂ O	Merck
	300ml H ₂ O	

Tabelle 2.5.: Übersicht, Lösungen

2.1.5. Puffer

Puffer	Name	Hersteller
HEPES-Puffer, Ca ²⁺ -reich	4,76g HEPES	Merck
	0,11g CaCl ₂	Merck
	0,20g MgCl ₂	Merck
	8,78g NaCl	Merck
	0,374g KCl	Merck
	3,964g Glukose	Merck
	1l H ₂ O (Reinst)	
	pH 7,4 bei 37°C, 295 ± 5mosmol/l	
0.2M Natrium-Phosphat-Puffer (pH 6,1)	Lösung A	
	2,76g NaH ₂ PO ₄ / 100ml H ₂ O	Merck
	Lösung B	
	1,78g Na ₂ HPO ₄ / 50ml pH 6,1	Merck
10mM Natriumphosphatpuffer	1ml 0,2M Na-Phosphat-Puffer mit H ₂ O auf 20ml verdünnt	

Tabelle 2.6.: Übersicht, Puffer

2.2. Versuchstiere

Die Experimente der vorliegenden Arbeit erfolgten im Zeitraum von März 2006 bis Februar 2011 am Institut für Physiologie der Charité, Campus Benjamin Franklin. Die vorliegenden Untersuchungen wurden an 96 männlichen Sprague-Dawley-Ratten mit einem mittleren Körpergewicht von 350 bis 400g durchgeführt. Bis zum jeweiligen Versuch wurden die Tiere entsprechend der Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes in Käfigen im Tierstall des Institut für Physiologie der Charité, Campus Benjamin Franklin mit freiem Zugang zu Wasser und Trockenfutter gehalten. Vor Beginn der Untersuchungen wurden die Unternehmungen bei der Landesbehörde (Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin) angezeigt und genehmigt (Registrierung: O0158/01, behördlich genehmigt am 10.09.2001 und G0038/06, behördlich genehmigt am 01.09.2006).

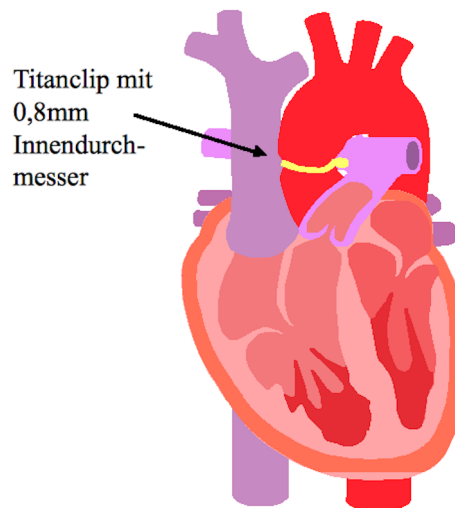


Abbildung 2.1.: Suprakoronarer Titanclip zur Erzeugung einer chronischen linksventrikulären Druckbelastung. Der Clip wurde am Arcus aortae nach Abgang der koronaren Herzgefäße angelegt. In den folgenden 9 Wochen entwickelten die so operierten Ratten eine chronische Linksherzinsuffizienz mit sekundärer pulmonaler Hypertonie.

2.2.1. Aortenbanding

Zur Simulation einer chronischen Linksherzbelastung auf die pulmonalendotheliale Transzytose-rate wurde ein Modell zur Induktion einer sekundären pulmonalen Hypertonie angewandt und einige junge Versuchstiere einem suprakoronaren Aortenbanding unterzogen.

Anästhesie und Beatmung

Hierzu wurden junge männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem mittleren Körpergewicht von $100\text{g} \pm 10\text{g}$ und einem Alter von 32-36 Tagen durch intraperitoneale Injektion von Xylazin (13 mg/kg Körpergewicht) und Ketamin (87mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Nach Erlöschen des Zwischenzehenreflexes wurden die Ratten mittels eines oral eingeführten Tubus mit Raumluft beatmet.

Operation

Nach Setzen eines ca. 1 – 2cm großen Hautschnittes über dem dritten Interkostalraum (3.ICR) links wurde zuerst der M.pectoralis major und danach der M.sternalis entfernt. Daraufhin wurde der M.intercostalis im 3.ICR durchtrennt und der Thymus mithilfe einer Thoraxklemme an der zweiten Rippe fixiert. Auf die freipräparierte Aorta wurde suprakoronar ein Titanclip mit einem Innendurchmesser von 0,8mm gesetzt. Anschließend wurden Interkostalnaht und Hautnaht gesetzt. Die Operation wurde mit einem handelsüblichen OP-Set durchgeführt. Die Letalität betrug bei dieser Operation unter optimalen Bedingungen ca.20%.

Nachbehandlung

Nach erfolgreicher Operation wurden die Tiere weitere 20 Minuten beatmet und anschließend bis zum nächsten Tag unter Aufsicht einzeln in Käfigen gehalten. Zur Analgesie wurde ihnen direkt nach dem Aufwachen Metamizol (250mg/kg) in den M.quadriceps femoris injiziert. Im Anschluss wurden die Ratten neun Wochen mit freiem Zugang zu Wasser und Trockenfutter gehalten. Bis zu diesem Zeitpunkt erreichten die Tiere ein mittleres Körpergewicht von 360g.

2.2.2. Isoliert-perfundierte Rattenlunge

Bei den Ratten wurde eine Allgemeinanästhesie mit Urethan (1,5g/kg Körpergewicht) und Ketamin (50mg/kg Körpergewicht) durchgeführt. Nach erloschenem Zwischenzehenreflex wurde ein longitudinaler Hautschnitt gesetzt und die Trachea stumpf freigelegt. Nach Tracheotomie wurden die Tiere über eine 16G Kanüle mit einer Frequenz von 110/min und einem Tidalvolumen von 25ml mit Raumluft ventiliert. Nach anschließender Thorakotomie wurde der rechte Ventrikel mit einer 21G Flügelkanüle punktiert und 800U Heparin injiziert. Nach ca.30s Zirkulationszeit wurden ca.8 - 10ml Vollblut entnommen, wobei es zur initialen Tachykardie und schließlich zu Stillstand des Herzens und damit zum Tod des Versuchstieres kam.

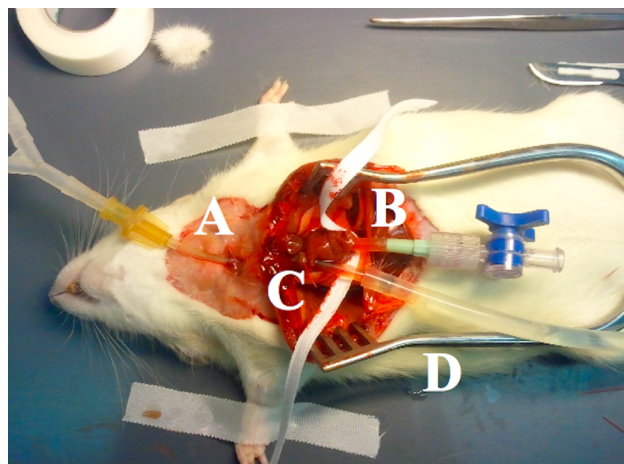


Abbildung 2.2.: Offener Rattensitus. Nach stumpfer Präparation der Trachea und Tracheotomie wurde die Lunge durch einen Katheter kontinuierlich ventiliert (A). Vom Processus xiphoideus ausgehend wurde eine Sternotomie durchgeführt. Nach Heparininjektion in den rechten Ventrikel wurden 8 - 10ml Blut abgesaugt. Im Anschluss wurde über einen Schnitt im rechten bzw.links kardialen Ventrikel ein pulmonalerarterieller (C) bzw. linksatrialer Katheter (B) gelegt. Im Anschluss wurde die beatmete Lunge vorsichtig explantiert und an ein Perfusionssystem angeschlossen. (D) Wundspreizer.

Durch einen Schnitt durch das Myokard des rechten bzw.links Ventrikels wurden vorsichtig je ein Katheter mit einem Innendurchmesser von 3mm über den rechten Ventrikel in die Pulmonalarterie bzw. über den linken Ventrikel in das linke Atrium vorgeschoben und dort mit handelsüblichem Garn doppelt fixiert. Schließlich wurden Lunge und Herz en bloc vorsichtig exzidiert, in eine Petrischale ausgelagert, und an ein Perfusionssystem angeschlossen. Während der folgenden Stunden

wurden die Lungen regelmäßig von außen befeuchtet und durch Klarsichtfolie vor dem Austrocknen bewahrt.

2.3. Perfusionssystem

Das Perfusionssystem diente der Simulation der physiologischen Blutzirkulation, über das die isolierte Lunge mit 35ml einer 5%igen Serumalbuminlösung vom Kalb (BSA-Lösung) und 5 - 8ml autologem heparinisiertem Blut perfundiert wurde. Die Zugabe von autologem, der Ratte während der Operation entnommenen Blutes, wirkte sich dabei positiv auf die Erhaltung der natürlichen endothelialen Barriere und des physiologischen Milieus aus [72]. Das Perfusionssystem setzte sich aus einem venösem und einem arteriellen Reservoir sowie einem Wasserbad und einer Rollerpumpe zusammen. Ausgehend vom venösen, höhenadjustierbaren Reservoir wurde das Blutgemisch angetrieben von der Pumpe mit 14ml/min durch ein Wasserbad geleitet. Dort wurde es auf 38°C erwärmt und gelangte über ein arterielles Reservoir durch einen Katheter in die Pulmonalarterie der Lunge. Nach Passage des Lungenkreislaufes floss das Blutgemisch über den Katheter im linken Herzatrium wieder in den venösen Schenkel zurück. Die Drücke im arteriellen (P_{PA}) und pulmonalvenösen Schenkel (P_{LA}) wurden permanent registriert, aufgezeichnet und ggf. mittels eines Shunts reguliert.

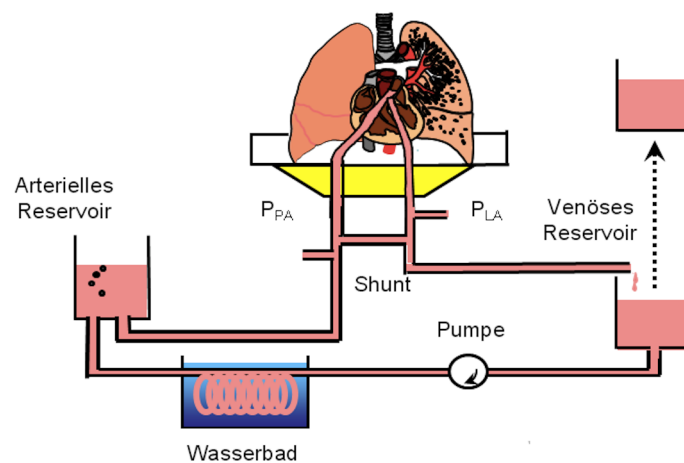


Abbildung 2.3.: Perfusionssystem. Ausgehend vom venösen Reservoir wurde das Perfusat aus BSA-Lösung und homologem Blut über eine Rollerpumpe durch ein auf 38°C erwärmtes Wasserbad ins arterielle Reservoir geleitet. Von dort gelangte es über den rechtsventrikulär platzierten Katheter in Pulmonalarterie und Lunge. Nach Passage der pulmonalen Gefäßstrombahn floss das Perfusat über einen Katheter im linken Atrium zurück ins venöse Reservoir. Pulmonalarterieller- und linksatrialer Druck wurden ständig registriert und gegebenenfalls über einen arteriell-venösen Shunt reguliert. P_{LA} , linksatrialer Druck; P_{PA} , pulmonalarterieller Druck.

2.4. Intravitalmikroskopie

2.4.1. Allgemeiner Aufbau

Die explantierte Lunge wurde auf einem vibrationsfreien Tisch unter einem selbstkonstruierten Auflichtintravitalmikroskop positioniert und kontinuierlich mit einem Raumluft äquivalenten Gasgemisch ventiliert. Die endotheliale Fluoreszenz (zur Fluoreszenzbeladung siehe Abschnitt 2.4.2) oberflächlicher pulmonaler Mikrogefäße wurde bei nahe monochromatischem Strahl von einem digital kontrollierten galvanometrischen Scanner angeregt. Die Emission wurde durch das Intravitalmikroskop ausgerüstet mit einem apochromatischen Objektiv und passenden dichroischen- und Emissionsfiltern, aufgefangen, von einer CCD Kamera aufgenommen und einer digitalen Bildanalyse mittels der Software TILLvisION zugeführt.

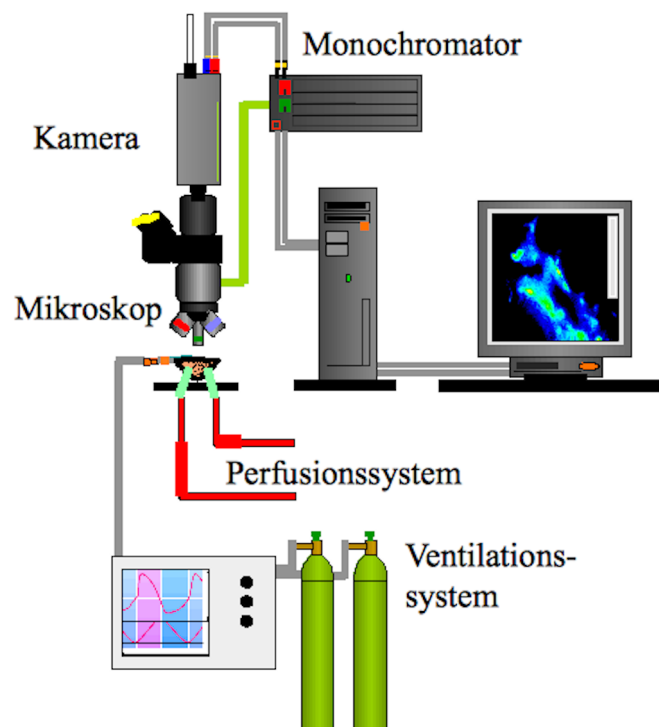


Abbildung 2.4.: Allgemeiner Aufbau zur Visualisierung der mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen Endothelzellen. Die isoliert-perfundierte Lunge wurde unter einem aufrechten Intravitalmikroskop positioniert und über einen nahezu monochromatischen Strahl beleuchtet. Durch entsprechende Emissionsfilter wurden die zuvor mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen beladenen Gefäße sichtbar gemacht und von einer CCD-Kamera aufgenommen. Anhand digitaler Bildanalyse wurden Fluoreszenzintensitäten verschiedener Farbstoffe quantifiziert.

2.4.2. Visualisierung von Endothelzellen und Albumin

Endothelzellen wurden mittels Fura-2-acetoxymethylester (Fura-2AM) gefärbt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff kann frei nach intrazellulär diffundieren und reichert sich hier nach Abspaltung seiner

Estergruppe durch intrazelluläre Esterasen an. Es wurden 50µg Fura-2AM mit 10µl Pluronic-F127 zentrifugiert und eine 5µM Lösung mit der Trägersubstanz HEPES (siehe Abschnitt 2.1.5 auf Seite 27) hergestellt. Zur Darstellung der intra- und extrazellulären sowie -vasalen Albuminverteilung wurden 3ml Fluorescein-Isothiocyanats (FITC)-markiertes Albumin in HEPES-Puffer (1mg/ml) injiziert. Zur Anreicherung beider Farbstoffe in einem begrenzten Gebiet der untersuchten Lunge wurde ein Mikrokatheter (0,61mm Außendurchmesser) vom venösen Schenkel des Perfusionsystems ausgehend durch den linken Herzvorhof und eine passende Pulmonalvene nach distal geschoben. Das Ziel war es, den Katheter so weit peripher wie möglich zu platzieren, ohne das pulmonale Gewebe zu beschädigen. So wurde eine lokal begrenzte Infusion der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe in einem oberflächlichen Untersuchungsareal erzielt. Die Lage des Katheters wurde während einer Untersuchung nicht verändert, die Größe des infundierten Gebietes differierte aber naturgemäß zwischen einzelnen Versuchen. Um diesen und den Effekt anderer variierender Faktoren wie Gewebeeigenschaften und -präparation möglichst gering zu halten, galt die Intensität der endothelialen Gegenfärbung von Fura-2AM, am isosbestischen Punkt von 360nm gemessen, stets als Referenz zur Albuminintensität.

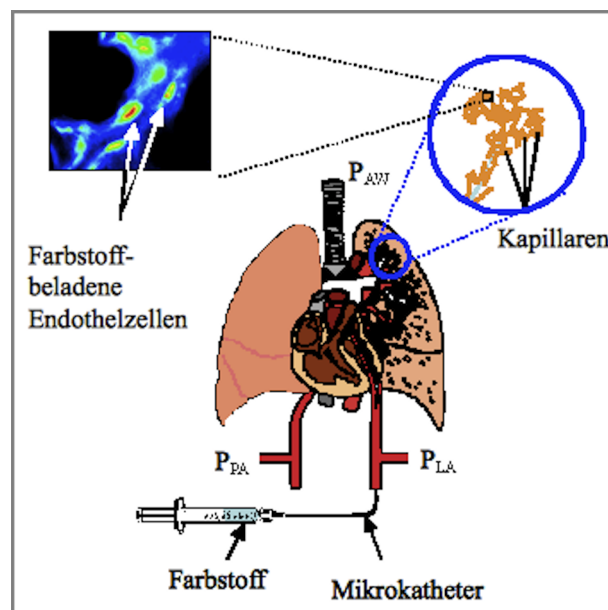


Abbildung 2.5.: Beladung von Mikrogefäßen mit Fluoreszenzfarbstoffen. In die isoliert-perfundierten Lungen wurde vom venösen Schenkel des Perfusionssystems ausgehend ein Mikrokatheter durch den linksatrial platzierten Katheter so weit wie möglich nach peripher geschoben. Über diesen Mikrokatheter wurde ein umschriebener oberflächlicher Bereich der Lunge mit den Fluoreszenzfarbstoffen beladen. Die Lage des Katheters wurde während der gesamten Untersuchung nicht mehr verändert. P_{LA} , linksatrieller Druck; P_{PA} , pulmonalarterielle Druck; P_{AW} , Atemwegsdruck.

Nach der Beladung mit den Fluoreszenzfarbstoffen (jeweils mit 50µl/min) wurde die Fluoreszenz im mikroskopischen Beobachtungsareal bei Wellenlängen von 360nm (isosbestische, calciumunabhängige Exzitationswellenlänge von Fura-2AM) und bei 470nm dem Exzitationsmaximum von FITC angeregt. Pro Versuch wurden 10-15 Kapillaren untersucht. Dabei wurde auf einen ver-

gleichbaren Gefäßdurchmesser geachtet, um die segmentalen Unterschiede, die pulmonale Gefäße im Hinblick auf Proteinpermeabilität und Reaktivität auf inflammatorische Stimuli aufweisen, gering zu halten. Über eine CCD Kamera wurden Fluoreszenzintensitäten registriert und an einen Computer mit digitalem Bildverarbeitungssystem geleitet. Die dort generierten Abbildungen der Gefäße wurden hinsichtlich der Fluoreszenzintensitäten bei 360 und 470nm ausgewertet. Zum Vergleich der verschiedenen Versuchsreihen und Beurteilung der lokalen Verteilung wurden die aufgenommenen Bilder der beiden Wellenlängen im Rot-Grün-Farbraum ausgewertet und 90° zur Gefäßachse verlaufende Intensitätsprofile gezogen.

2.4.3. Messung des intrazellulären Calciums

Zur Messung der zytosolischen Calciumkonzentration der pulmonalen Endothelzellen wurde ebenfalls der calciumsensitive Fluoreszenzfarbstoff Fura-2AM verwendet. Dieser hat durch seine geringe Störanfälligkeit, die Möglichkeit der nicht-invasiven Messung und einer hohen Selektivität der Bindung an Ca^{2+} -Ionen hierfür hervorragende Eigenschaften [73]. Wie in Abschnitt 2.4.2 auf Seite 31 erläutert reichert sich Fura-2 nach Abspaltung seiner Estergruppe intrazellulär an und bindet daraufhin im Sinne eines Chelators intrazelluläres Ca^{2+} . Je nachdem, ob und wieviel Fura-2 an Calcium gebunden vorliegt, also wieviel intrazelluläres Calcium vorliegt, verschiebt sich die zu messende Fluoreszenzintensität zwischen den Exzitationswellenlängen von 340 und 380nm (Abbildung 2.6 auf dieser Seite).

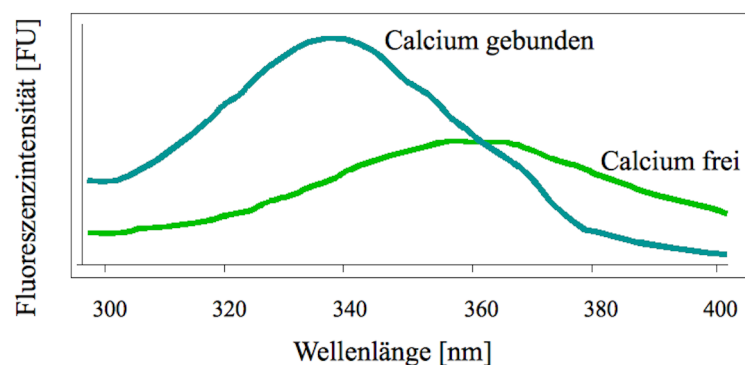


Abbildung 2.6.: Exzitationsspektren von Fura-2 in Abhängigkeit von dessen Calciumbindung. Das Maximum der Fluoreszenzintensität divergiert abhängig von der Bindung von Fura-2 an $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Durch eine Ratio der Werte bei beiden Wellenlängen wird eine Amplifikation des Signals und ein von den optischen Gegebenheiten unabhängiger Wert erzielt.

2.5. Elektronenmikroskopie

Um die Verteilung von Albumin über dem Gefäßendothel in noch höherer Auflösung darzustellen, nutzten wir außerdem die Möglichkeiten der Elektronenmikroskopie (EM). Hierfür wurde je ein Albuminmoleküle mit einem 8nm großen elektronenmikroskopisch dichten Goldpartikel markiert.

Die goldmarkierten Albuminmoleküle wurden unter verschiedenen Untersuchungsbedingungen perfundiert, und anschließend die Verteilung der Goldmoleküle in der EM ausgewertet.

2.5.1. Herstellung goldmarkierten Albumins

Zunächst wurden 3l einer Lösung 8nm großer Goldpartikel nach Slot und Geuze hergestellt [74]. Hierfür wurde Lösung A (siehe Abschnitt 2.1.4 auf Seite 25) bestehend aus einer 1%-igen Goldchloridlösung in H₂O auf 60°C ± 2°C erhitzt und schnell mit Lösung B (siehe Abschnitt 2.1.4 auf Seite 25), die zuvor ebenfalls auf 60°C ± 2°C erhitzt wurde, vermischt. Um das Volumen der Lösung zu minimieren, wurde das Gemisch dann vorsichtig bei 90 - 95°C gekocht, und das Ursprungsvolumen somit auf ~25% reduziert. Im Anschluss wurden 25ml eines 0.2M Natriumphosphat(NaP)-Puffers rasch mit 500ml Goldmischung verrührt.

Im nächsten Schritt wurde je ein BSA-Molekül an ein Goldpartikel gebunden. Dafür wurde zunächst in einer Verdünnungsreihe durch Zugabe von 5%-iger BSA-Lösung in 10mM NaP-Puffer, die Konzentration an BSA bestimmt, die die Goldlösung gerade vor der Agglutination durch 10%-ige NaCl-Lösung bewahrt. Die kleinste Menge an BSA-Lösung, die in der Verdünnungsreihe nicht zu einer Agglutination führte, wurde auf 525ml Goldlösung hochgerechnet und in 10mM NaP-Puffer auf den Boden eines großen Becherglases gegeben. 525ml der Goldlösung wurden rasch dazu gegossen und verrührt. Als Kontrolle wurden die nun entstandenen Gold-Albumin-Partikel wiederum mit der 10%-igen NaCl-Lösung versetzt und auf einen eventuellen Farbumschlag geachtet. Fand ein Farbumschlag als Zeichen der Agglutination statt, so wurde die Lösung verworfen.

Zuletzt erfolgte nochmals eine deutliche Volumenreduktion. Hierzu wurden 6 x 250ml der Lösung über 120min bei 4°C und 34.000g ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag wiederum über 90min bei 34.000g zentrifugiert. Der Niederschlag der zweiten Zentrifugation wurde nun in einseitig verschlossene Dialyseschläuche mit einer Porengrößen von 12.000 – 14.000 Dalton gefüllt. Die Schläuche waren zuvor über 10min in einer 1mM EDTA-Lösung in 2%-igem Natriumhydrogenkarbonat gekocht worden. Die Goldlösung wurde nun 3 x 24 Stunden bei 4°C gegen Ringerlösung dialysiert, anschließend tröpfchenweise in flüssigen Stickstoff gefroren und bei -70°C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde die Lösung langsam auf Körpertemperatur erwärmt, durch einen Sterilfilter (0,2µm Porengröße) geleitet und in einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 525nm die optische Dichte als Maß der Konzentration der Goldpartikel bestimmt.

Zur Infusion in die Lungen wurden 5ml Goldgemisch zu 30ml Perfusat gegeben. Je nach Versuchsgruppe (siehe Abschnitt 2.6 auf der nächsten Seite) wurde dem Perfusat Thrombin in einer Konzentration von 50U/ml zugesetzt und dieses 30min zirkulieren gelassen oder das venöse Reservoir über 30min erhöht um den P_{LA} auf 15cm H₂O zu steigern.

2.5.2. Fixation und Schnitt

Anschließend fixierten wir die Lungen mit 4%-igem Paraformaldehyd und 0,1%-igem Glutaraldehyd über Blutgefäße und Atemwege. Die weiteren Schritte der elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden durch unseren Kooperationspartner Prof. Christian Mühlfeld am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen durchgeführt. Nach einer Lagerung von mindestens 24 Stunden bei 4°C wurden den Lungen stichprobenartig Gewebsblöcke entnommen. Diese wurden für 2 Stunden in 1% Osmiumtetroxid gewaschen, in Alkohol dehydriert und zuletzt in Epoxidharz eingelegt. Aus drei Gewebsblöcken pro Lunge wurden ultradünne Scheiben geschnitten und mit Uranylacetat und Bleizitrat gefärbt. Die Schnitte wurden nun mittels eines Transmissions-Elektronenmikroskops hinsichtlich der Verteilung der goldmarkierten Albuminmoleküle untersucht.

2.6. Experimentelle Versuchsgruppen

2.6.1. Kontrolle

Die Kontrollgruppe wurde den Erläuterungen in Abschnitt 2.2.2 auf Seite 29 entsprechend operiert, an ein Perfusionssystem angeschlossen und mit einer angefeuchteten Klarsichtfolie vor dem oberflächlichen Antrocknen geschützt. Die Lungen wurden kontinuierlich mit einem Gasgemisch aus 20% O₂, 5% CO₂, 75% N₂ bei einem positiven Atemwegsdruck von 5cm H₂O ventiliert. Der P_{Pa} wurde mittels eines arteriovenösen Shunts bei 10cm H₂O, der P_{La} bei 5cm H₂O gehalten. Die Drücke wurden mithilfe einer Labview Software ständig aufgezeichnet. Für die intravital-mikroskopischen (IVM) Untersuchungen erfolgte die Beladung mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fura-2AM bzw. FITC-gebundenem Albumin über den pulmonalvenösen Mikrokatheter (siehe Abschnitt 2.4.2 auf Seite 31). Die Injektion der Farbstoffe dauerte 20 bzw. 2 x 30min und erfolgte in einem abgedunkelten Raum. Nach Anfärbung wurden Mikrokatheter und Klarsichtfolie über dem angefärbten Areal entfernt und selbes mit einem Deckgläschen abgedeckt. Nun wurde das Mikroskop an die Lunge herangefahren. Der Tisch, auf dem die Lunge gelagert war, konnte in der Horizontalen und Vertikalen bewegt werden, was die genaue Positionierung des zu untersuchenden Areals der Lunge erlaubte. Es wurden 10 - 15 verschiedene Gefäße pro Versuch untersucht.

2.6.2. Thrombin

Thrombin wurde dem FITC-Albumin in einer Konzentration von 50U/ml zugegeben und über einen Zeitraum von 30min über den pulmonalvenösen Mikrokatheter infundiert. Für die EM-Untersuchungen wurde es in selber Konzentration dem zirkulierenden Perfusat zugesetzt und ebenso lang zirkulieren gelassen.

2.6.3. Imipramin

Das trizyklische Antidepressivum Imipramin fungiert als indirekter Inhibitor der sauren Sphingomyelinase (ASM). Es wurde in einer Konzentration von 10 μ mol/l sowohl gemeinsam mit FITC-Albumin über den pulmonalen Mikrokatheter als auch über das Perfusat über 30min infundiert.

2.6.4. Akuter hydrostatischer Stress

Eine akute pulmonalvenöse Drucksteigerung wurde durch Höhenadjustierung des venösen Reservoirs erreicht. Der linksatriale Druck wurde unter kontinuierlicher Messung von 5cmH₂O auf 10 bzw. 15cmH₂O über 30min erhöht und auch während der intravitalmikroskopischen Untersuchungen aufrecht erhalten.

2.6.5. Chronischer hydrostatischer Stress

Zur Simulation einer chronischen Linksherzinsuffizienz wurden wie in 2.2.1 auf Seite 28 beschrieben junge Ratten ca. neun Wochen vor Organexplantation mit einem suprakoronaren Titanclip versehen.

2.7. Statistische Analysen

Alle Daten sind als Standardmittelwerte \pm SEM angegeben. Die Versuchsgruppen wurden mittels eines t-Tests im Softwareprogramm SigmaPlot (Version 11.0, Systat Software) verglichen. Graphische Darstellungen von Ergebnissen wurden bis auf wenige Ausnahmen (Abbildungen 3.3 und 3.7 auf Seiten 39 und 43), die mittels Microsoft Excel angefertigt wurden, ebenfalls mittels SigmaPlot erstellt. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen. In allen Versuchsschritten wurden die Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis eingehalten.

3. Ergebnisse

3.1. Der Einfluss von inflammatorischem Stress auf die pulmonal-kapilläre Albuminpermeabilität

3.1.1. Intravitalmikroskopie

Um die Albuminverteilung über der Gefäßwand pulmonaler Mikrogefäße quantitativ zu erfassen, wurden isoliert-perfundierte Rattenlungen über einen Mikrokatheter mit einem endothelialen Fluoreszenzfarbstoff sowie fluoreszierendem Albumin beladen. Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2AM wird dabei nach Passage der Zellmembran deesterifiziert und bindet intrazelluläres Calcium, wodurch er sich endothelial anreichert [75]. Ausgewählte pulmonale Kapillaren wurden in umschriebenen Regionen hinsichtlich der veränderten Intensität von FITC und Fura-2, der daraus resultierenden FITC/Fura-2 Ratio sowie der Fluoreszenzverteilung 90° zur Gefäßachse untersucht.

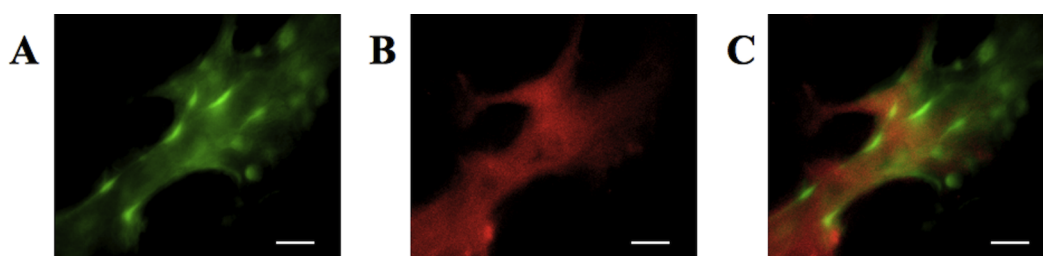


Abbildung 3.1.: Repräsentative pulmonale Kapillare nach Beladung mit Fura-2AM und FITC-Albumin. A, B und C zeigen dieselbe pulmonale Kapillare nach 20- bzw.60-minütiger Beladung mit Fura-2AM bzw.FITC-Albumin. Bei 360nm Wellenlänge fluoresziert der in den vaskulären Endothelzellen akkumulierte Fura-2-Farbstoff und indiziert damit den Gefäßverlauf und das Zytosol der gefäßauskleidenden Endothelzellen (A). Die FITC-Albumin-Intensität wurde jeweils beim Exzitationsmaximum von 470nm gemessen. Sie diente der quantitativen Bestimmung der räumlichen Verteilung von Albumin im Gefäß und über der Gefäßwand (B). Durch die Übereinanderlagerung beider Bilder erhält man einen Eindruck von der Albuminverteilung über der Gefäßwand (C). In dem präsentierten unstimulierten Gefäß war diese vorrangig luminal begrenzt. Maßstab, 10µm.

Nach Stimulation mit dem Inflammationsmediator Thrombin stieg die FITC/Fura-2 Fluoreszenzratio signifikant auf über 300% gegenüber unbehandelten Kontrolllungen an ($1,33 \pm 0,20$ vs. $0,38 \pm 0,05$, Abbildung 3.2 auf Seite 38, Teil D). Die absolute FITC-Intensität in Fluoreszenzeinheiten

(FE) der Gefäßwand stiegen mit ($1202 \pm 243\text{FE}$ vs. $482 \pm 81\text{FE}$) auf über 200% des Ausgangswertes. Die Fura-2-Intensität war in der thrombinstimulierten Gruppe etwas schwächer als in der Kontrollgruppe ($1051 \pm 178\text{FE}$ vs. $1472 \pm 202\text{FE}$). Dies lag wahrscheinlich an den in Kapitel 2.4 erwähnten Limitation der Intravitalmikroskopie.

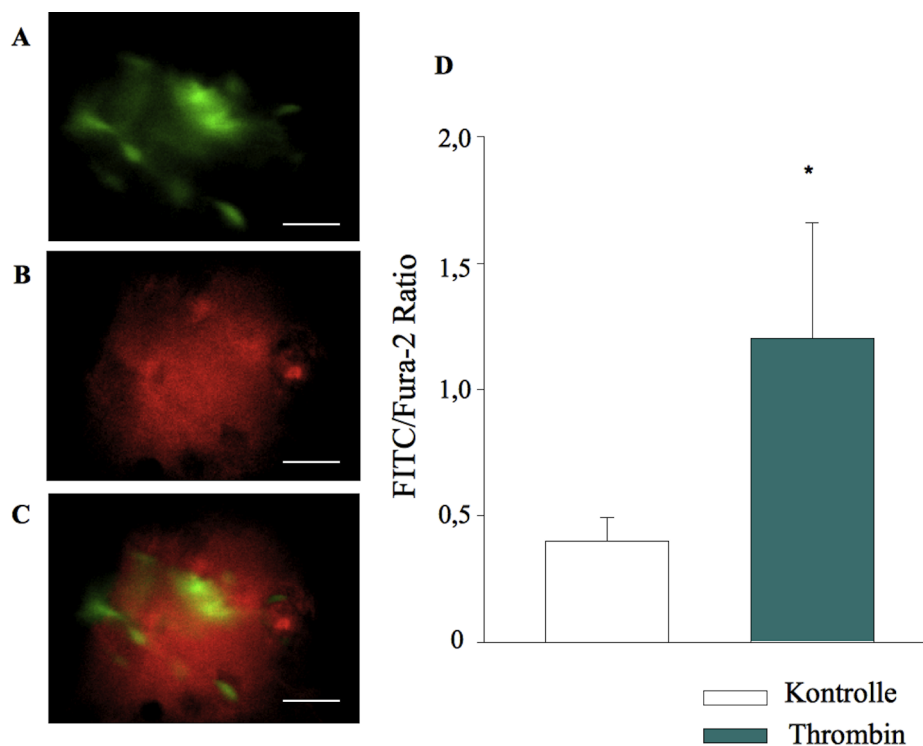


Abbildung 3.2.: Repräsentative thrombinstimulierte Kapillare. Das zellgängige Fura-2 markiert die Endothelzellen (A). Die FITC-Intensität verlagerte sich im Vergleich zu unstimulierten Gefäßen vom vaskulären ins intraendotheliale und interstitielle Kompartiment (B). Dadurch stieg die Ratio beider Farbstoffe signifikant um über 200% (C, D). n, 8 pro Versuchsgruppe; * $p < 0,05$ gegen Kontrolle; Maßstab, $10\mu\text{m}$.

3.1.2. Elektronenmikroskopie

Für eine noch höhere Auflösung führten wir elektronenmikroskopische Studien durch, indem wir die Verteilung einzelner Albuminmoleküle, die zuvor eins zu eins mit elektronenmikroskopisch dichten Goldpartikeln beladen worden waren, auswerteten. Aus unbehandelten und thrombinstimulierten Lungen wurden stichprobenhaft zentrale und periphere Gewebsblöcke entnommen. War interalveoläres Parenchym zu sehen, wurden die dort sichtbaren Goldpartikel quantitativ den Kompartimenten „intrazellulär“ und „luminal“ zugeordnet.

Dabei zeigte sich in beiden Gruppen eine hohe Anzahl endothelialer Caveolen (Pfeilspitzen in Abbildung 3.4 auf Seite 40). In beiden Gruppen wurden intrazelluläre Goldpartikel gesehen, die von Caveolen komplett oder nur teilweise umschlossen waren (Pfeile in Abbildung 3.4 auf Seite 40). In Kapillaren der Kontrollgruppe wurden signifikant mehr Goldpartikel luminal gezählt (2285 vs. 1810 , Abbildung 3.3 auf Seite 39, Teil A). In thrombinstimulierten Lungen sahen wir hingegen

caveolär signifikant mehr Goldpartikel als in Kontrolllungen (769 vs. 535, Abbildung 3.4 auf Seite 40, Teil B), einem Anteil von 30% aller gezählten Goldpartikel gegen 19% in der Kontrollgruppe entsprechend. Parazellulär oder alveolär wurden in keiner der beiden Gruppen Goldpartikel gesehen.

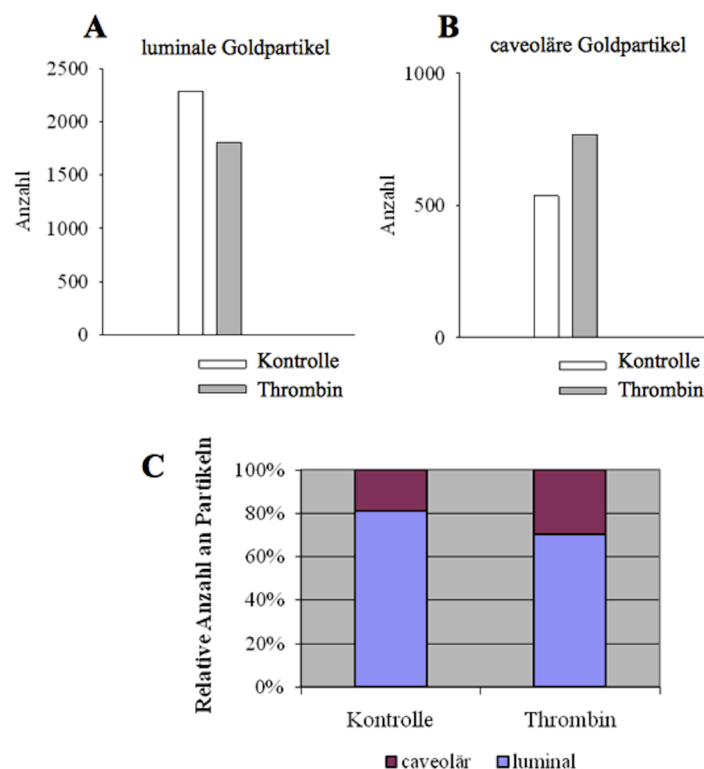


Abbildung 3.3.: Einfluss von Thrombin auf die Verteilung goldmarkierter Albuminmoleküle. In stichprobenhaft gewonnenen Gewebsblöcken aus unstimulierten und thrombinexponierten pulmonalen Endothelzellen intakter Lungen wurden endotheliale (**A**) und luminale (**B**) Goldpartikel gezählt. Die Kontingenztabelle (**C**) zeigt die relative Verteilung der Goldpartikel. Es wird sichtbar, dass sich deren Verteilung in der Thrombingruppe zugunsten der Menge caveolärer Goldpartikel verschiebt. n, 2 pro Gruppe.

3.2. Der Einfluss von akutem hydrostatischem Stress auf die pulmonal-kapilläre Albuminpermeabilität

3.2.1. Intravitalmikroskopie

Ein akut erhöhter linksatrialer Druck (P_{LA}) und eine konsekutive hydrostatische Stressbelastung des pulmonalen Gefäßsystems spielen im klinischen Kontext beispielsweise in der ersten Phase des akuten Myokardinfarkts eine zentrale Rolle. Durch Höhenadjustierung des venösen Reservoirs des Perfusionssystems setzten wir die isoliert-perfundierten Rattenlungen über 90min einem erhöhten P_{La} von 10 bzw. 15 cm H_2O aus. Die FITC/Fura-2 Ratio stieg unter diesen Bedingungen von $0,38 \pm$

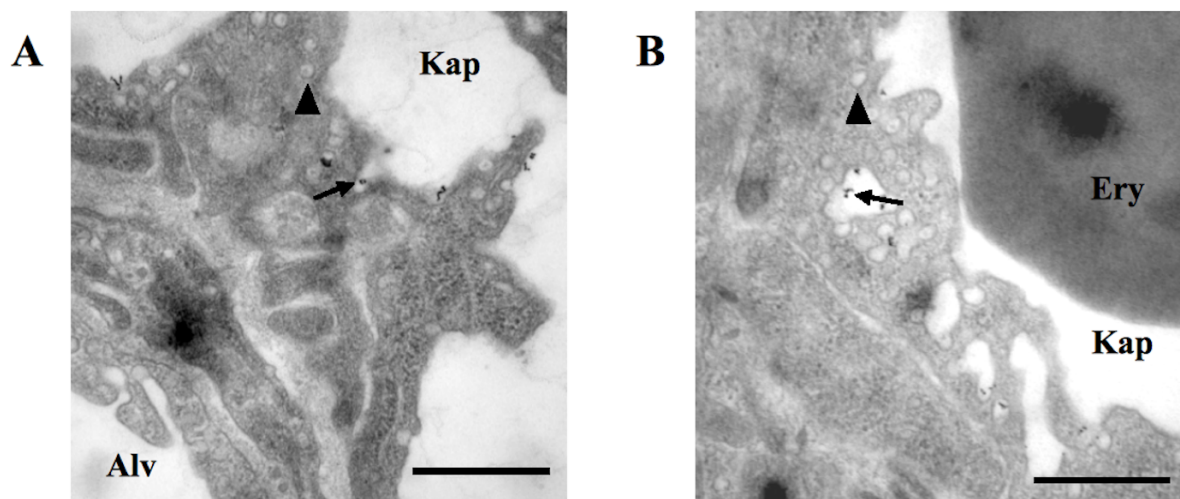


Abbildung 3.4.: Repräsentative EM-Aufnahmen von unbehandelten vs. thrombinstimulierten pulmonalen Endothelzellen. Sowohl in Endothelzellen des unstimulierten Gefäßes (A) als auch in thrombinstimulierten Lungen (B) wurden zahlreiche, teilweise mit der Zellmembran konfluierende Caveolen sichtbar (Pfeilspitzen). Die Anzahl intrazellulärer albumingebundener Goldpartikel (Pfeile) nahm in thrombinexponierten Gefäßen zu Lasten luminaler Goldpartikel zu. Parazelluläre oder alveoläre Goldpartikel waren in keiner der Versuchsgruppen präsent. Alv, Alveole; Kap, Kapillare; Ery, Erythrozyt; Vergrößerung, 50.000; Maßstab, 500nm; n, 2 pro Gruppe.

0,05 in der Kontrollgruppe, die bei 5cm H₂O P_{LA} perfundiert wurde, auf $0,57 \pm 0,06$ bei 10cm H₂O bzw. $0,84 \pm 0,2$ bei 15cmH₂O P_{LA}. Die Fura-2-Intensitäten der verschiedenen Versuchsgruppen zeigten keine statistisch relevanten Unterschiede (1472 ± 201 FE; 1062 ± 189 FE bzw. 1300 ± 207 FE), während die FITC-Intensität in den untersuchten Kapillaren deutlich anstieg (482 ± 81 FE; 551 ± 99 FE bzw. 1046 ± 302 FE).

Um die typische räumliche Verteilung des an Albumin gebundenen FITC-Farbstoffes über dem Gefäß und der Gefäßwand quantitativ zu erfassen, berechneten wir in Linienprofilen den Intensitätsverlauf der beiden Fluoreszenzfarbstoffe senkrecht zur Gefäßachse (unterbrochene Linie, Abbildung 3.6 auf Seite 42 Teil A-C). In den unten abgebildeten repräsentativen Darstellungen lässt sich erkennen, dass bei erhöhtem P_{LA} die FITC- im Vergleich zur Fura-Intensität anstieg, wobei sich aber keine Intensitätsmaxima über den Endothelzellen zeigten.

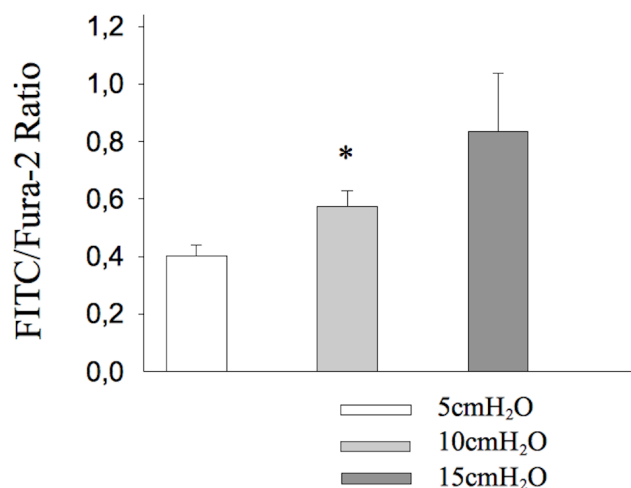


Abbildung 3.5.: Entwicklung der FITC/Fura-2 Ratio unter akutem hydrostatischem Stress. Die Ratio von an Albumin gebundenem FITC gegen Fura-2 über pulmonalen Kapillaren stieg bei akuter Druckbelastung kontinuierlich und parallel zum zunehmenden Druck an. * $p < 0,05$ gegen Kontrolle bei 5cm H₂O; n, 8 pro Gruppe.

3.2.2. Elektronenmikroskopie

In der Elektronenmikroskopie wurden sowohl in unstimulierten als auch in druckexponierten pulmonal-kapillären Endothelzellen intrazelluläre Caveolen sichtbar (Pfeilspitzen, Abbildung 3.7 auf Seite 43, Teil A, B), diese waren teilweise mit Goldpartikeln assoziiert (Pfeile, Abbildung 3.7 auf Seite 43, Teil A, B). Die quantitative Auswertung aller gezählten Goldpartikel dieser Versuchsgruppen zeigt aber, dass die Partikel unter Druck seltener intrazellulär sichtbar waren als in der unstimulierten Kontrollgruppe (247 vs. 535). Damit ergibt sich ein relativer Anteil vesikulärer Goldpartikel von knapp 10% in druckexponierten Endothelzellen, während der entsprechende Wert in Kontrollzellen bei rund 19% lag (Abbildung 3.7 auf Seite 43, Teil C).

3.3. Der Effekt von Imipramin auf die pulmonal-kapilläre Albuminpermeabilität unter inflammatorischem- und akutem hydrostatischen Stress

Das trizyklische Antidepressivum Imipramin ist ein bekannter indirekter Inhibitor der sauren Sphingomyelinase (ASM) [75], blockiert also die durch ASM vermittelte Ceramidsynthese. Imipramin wurde in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ sowohl dem über den pulmonalen Mikrokatheter infundierten FITC-Albumin als auch dem Perfusat zugegeben. Zunächst wurden Kontrolllungen untersucht, um eine Wirkung von Imipramin auf die basale Albumintranszytose auszuschließen.

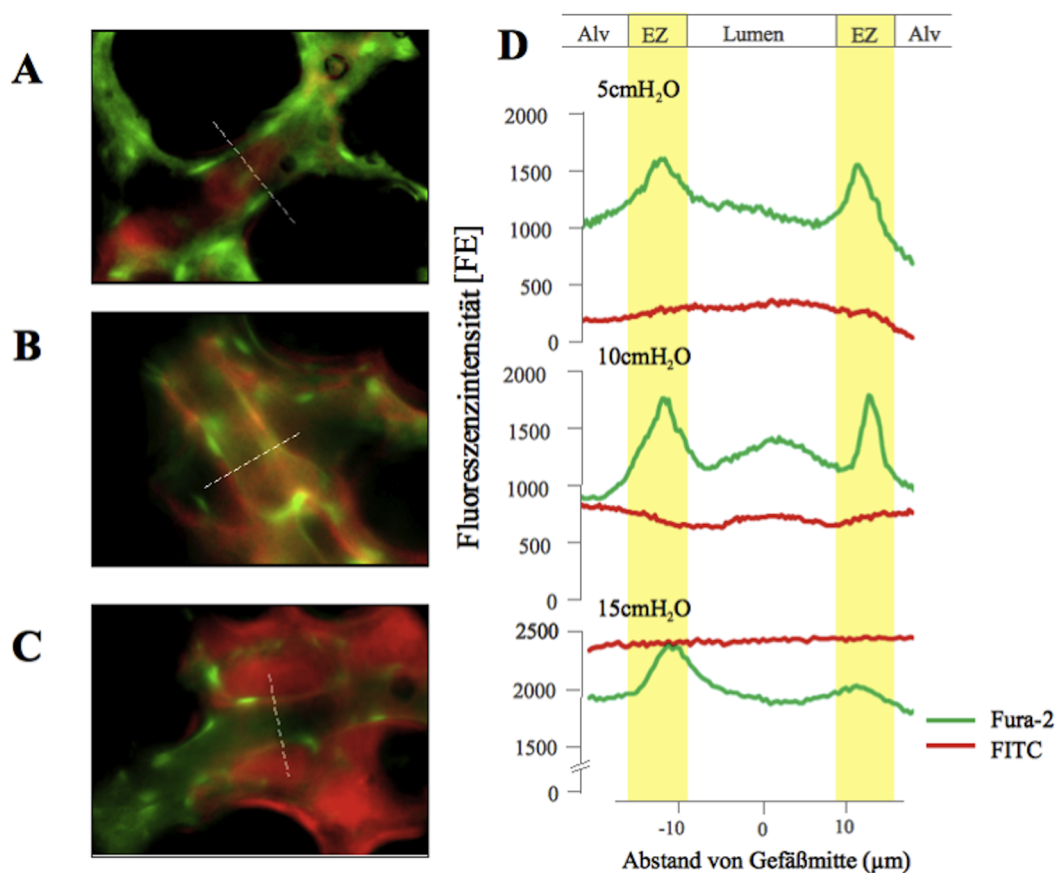


Abbildung 3.6.: Repräsentative Gefäße und Fluoreszenzintensitätsprofile unter akutem hydrostatischem Stress. Unter Kontrollbedingungen bei 5cmH₂O P_{LA} wurde der Großteil der FITC-Fluoreszenzintensität im Gefäßlumen gemessen. Jenseits der Endothelzellen lag sie deutlich unter den luminalen Werten (**A** und **D** oben). Bei einem P_{LA} von 10cmH₂O verlagerte sich die FITC-Albuminintensität auf die Gefäßwand (**B** und **D** Mitte). Bei einem weiteren Anstieg des P_{LA} auf 15cmH₂O nahm die extravaskuläre FITC-Intensität parallel zu (**C** und **D** unten). Es wurden repräsentative Gefäße mit ähnlichem Durchmesser analysiert. Intensitätsprofile liegen 90° zur Gefäßachse (unterbrochene Linie in **A-C**). Der gelb unterlegte Streifen in **D** kennzeichnet die begrenzenden Endothelzellen (EZ). Alv, Alveole.

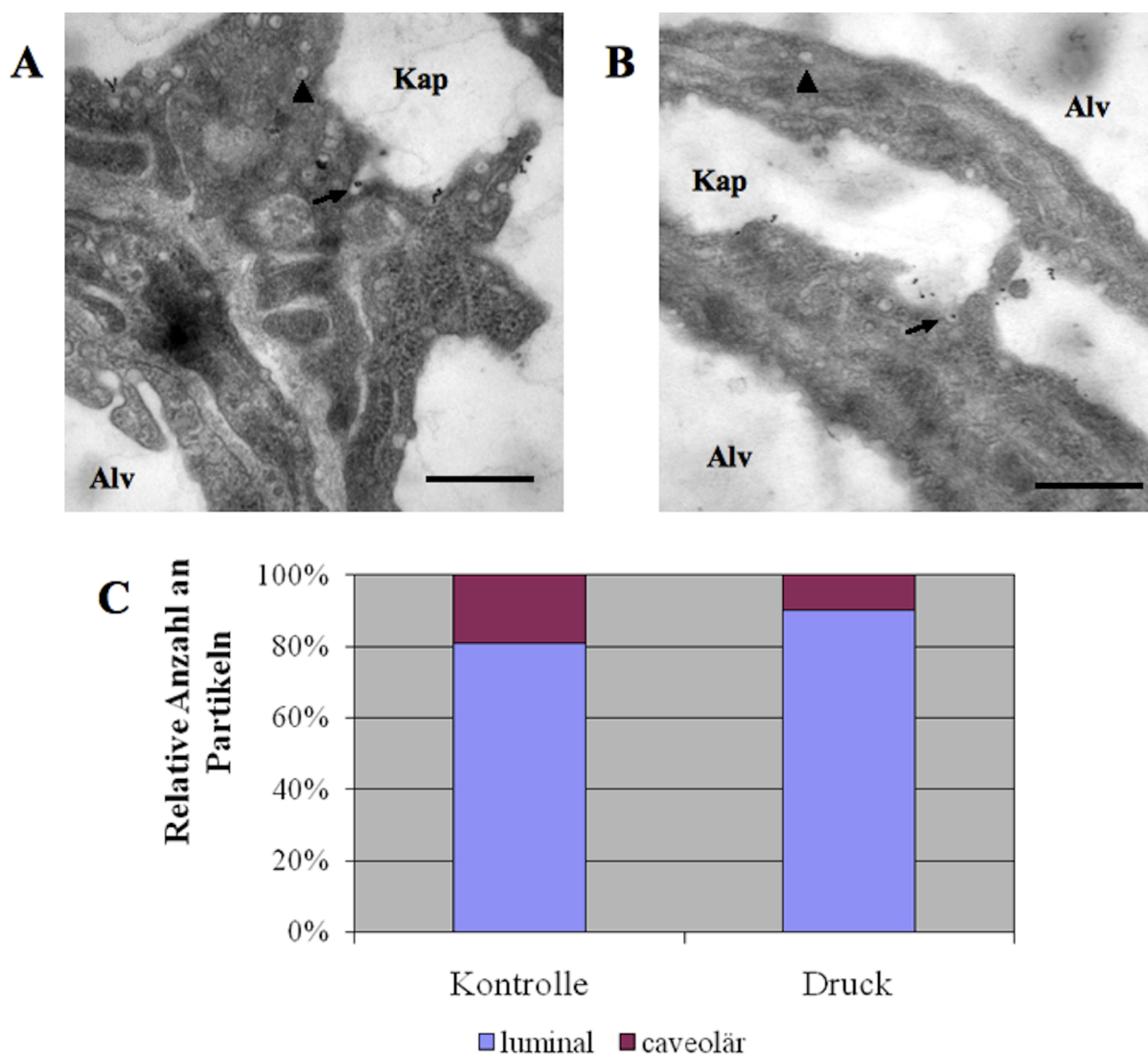


Abbildung 3.7.: Verteilung albumingebundener Goldpartikel in pulmonal-kapillären Endothelzellen unter akutem hydrostatischem Stress. In Endothelzellen der Kontrollgruppe, die bei 5cmH₂O perfundiert wurde, zeigten sich Caveolen (A, Pfeilspitze) und einige caveolär (halb-)umschlossene Goldpartikel (A, Pfeil). In Kapillaren, die über 30min bei 15cmH₂O P_{LA} perfundiert wurden, sind ebenfalls endotheliale Caveolen (B, Pfeilspitze), aber nur selten umschlossene Goldpartikel zu sehen (B, Pfeil). Die quantitative Auswertung bestätigte die Beobachtung an diesem repräsentativen Gefäßausschnitt; die Anzahl albumingebundener Goldpartikel in den druckexponierten pulmonalen Kapillaren war intrazellulär vermindert und luminal erhöht gegenüber der Kontrollgruppe (C). Alv, Alveole; Kap, Kapillare; Vergrößerung, 50.000; Maßstab, 500nm; n, 2 pro Gruppe.

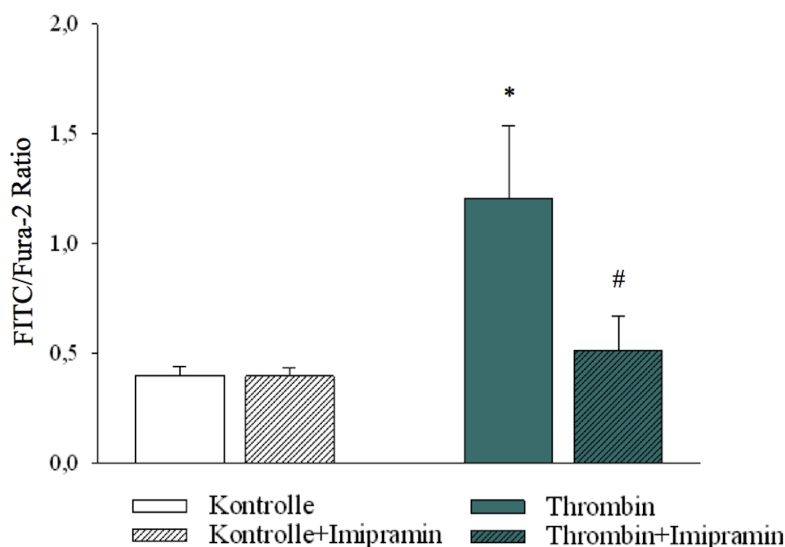


Abbildung 3.8.: Änderung der FITC/Fura-2-Ratio thrombinstimulierter Gefäße durch Zugabe von Imipramin. Imipramin wurde dem Perfusat und dem FITC-Albumin, das per Mikrokateter appliziert wurde, in einer Konzentration von $10\mu\text{mol}$ zugegeben. Wurde es parallel zu Thrombin appliziert, kam es zu einer signifikant geringeren Zunahme der FITC/Fura-2 Ratio. n, 8 pro Gruppe; * $p < 0,05$ gegen Kontrolle; # $p < 0,05$ gegen thrombinstimulierte Gruppe.

Erwartungsgemäß hatte Imipramin keinen signifikanten Effekt auf die FITC/Fura-2 Ratio ($0,41 \pm 0,03$ vs. $0,38 \pm 0,05$).

Wurde die ASM parallel zur Thrombinstimulation mit Imipramin inhibiert, kam es nur zu einem geringen Anstieg der FITC-Albuminintensität ($567 \pm 193\text{FE}$ vs. $482 \pm 81\text{FE}$), auch die FITC/Fura-2 Ratio nahm nur leicht und statistisch nicht signifikant zu ($0,52 \pm 0,1$ vs. $0,38 \pm 0,05$). Linienprofile, die im 90° Winkel über repräsentative Gefäße gezogen wurden, lassen einen Anstieg der FITC-Intensität nach Thrombinstimulation insbesondere über der Gefäßwand erkennen. Unter paralleler Thrombin- und Imipraminbehandlung kam es nur zu einem minimalen Anstieg der FITC-Intensität.

Um zu untersuchen, ob Imipramin auch die druckinduzierte Albuminextravasation beeinflusst, behandelten wir isolierte Rattenlungen während einer 90-minütigen P_{LA} -Erhöhung auf 10 bzw. 15 cm H_2O mit Imipramin. Wir konnten dabei keinen signifikanten Effekt von Imipramin auf die Transzytose von Albumin in Gefäßen unter Ausgangsbedingungen oder während Druckexposition feststellen. So lag das Verhältnis von FITC zu Fura-2 unter Kontrollbedingungen ($P_{\text{LA}} = 5\text{cm H}_2\text{O}$) bei $0,38 \pm 0,05$ ohne vs. $0,41 \pm 0,04$ mit Imipramin, bei einem P_{LA} von 10 cm H_2O bei $0,66 \pm 0,13$ ohne vs. $0,57 \pm 0,06$ mit Imipramin und bei einem P_{LA} von 15 cm H_2O bei $0,6 \pm 0,12$ ohne vs. $0,83 \pm 0,2$ mit Imipramin ohne statistische Signifikanz.

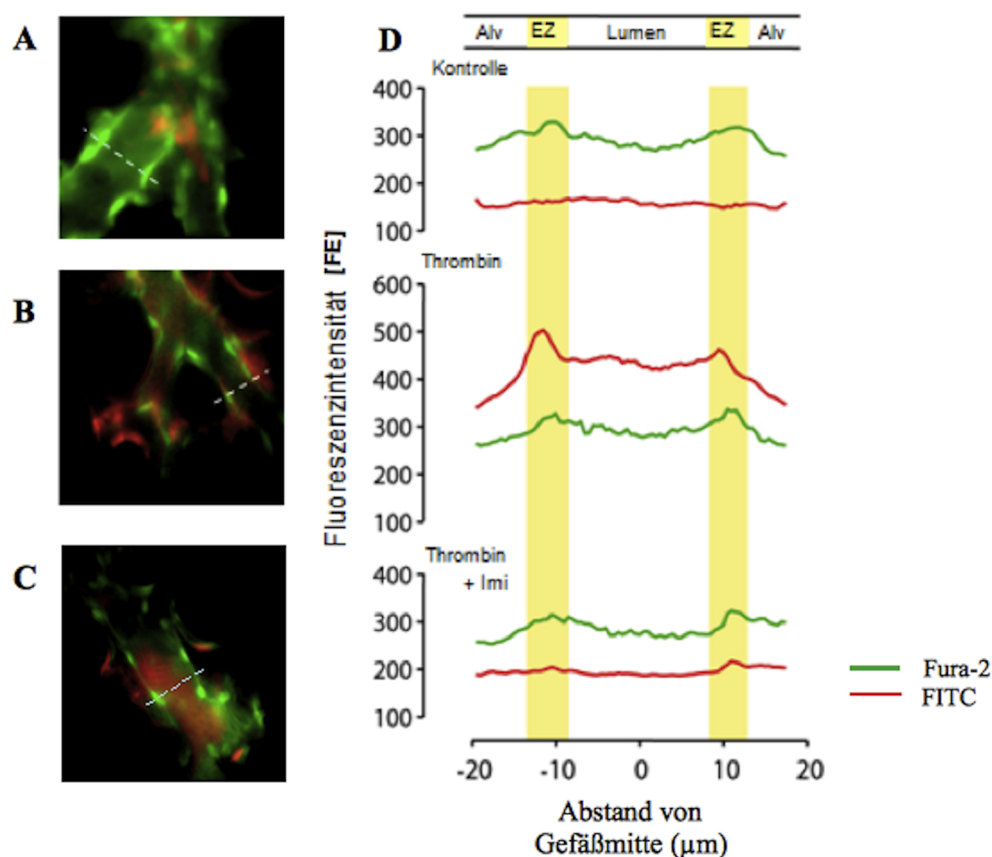


Abbildung 3.9.: Repräsentative Gefäße und Fluoreszenzintensitätsprofile nach Thrombinstimulation.

In der Kontrollgruppe überstieg die über den Endothelzellen akkumulierende Fura-2-Intensität im Intensitätsprofil (unterbrochene Linie A-C) die gleichmäßig über das Gefäß verteilte FITC-Intensität (A und D oben). Nach Thrombinstimulation stieg die FITC-Intensität insgesamt und akkumulierte endothelial (B und D Mitte). Nach gleichzeitiger Thrombin- und Imipraminexposition wird nur ein minimaler FITC-Intensitätsanstieg mit marginaler endothelialer Akkumulation sichtbar (C und D unten). Es wurden repräsentative Gefäße mit ähnlichem Durchmesser analysiert. Intensitätsprofile liegen 90° zur Gefäßachse (unterbrochene Linie in A-C). Der gelb unterlegte Streifen in D kennzeichnet die begrenzenden Endothelzellen (EZ). Alv, Alveole; Imi, Imipramin.

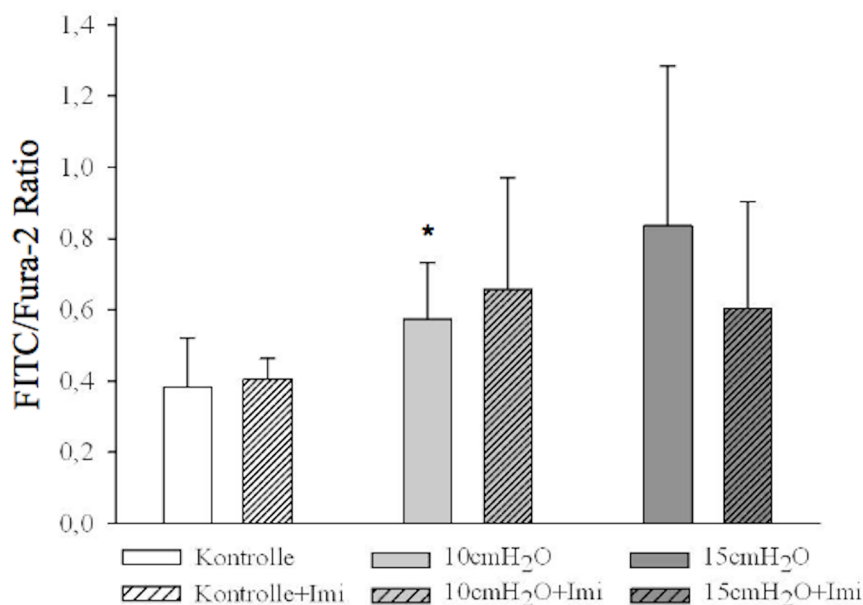


Abbildung 3.10.: Der Effekt von Imipramin auf die druckinduzierte Albuminextravasation. Unter Druckbelastung stieg wie in Abbildung 3.5 auf Seite 41 beschrieben die FITC/Fura-2 Ratio parallel zu P_{LA} an. Die ASM-Inhibition mit Imipramin führte zu keiner statistisch signifikanten Änderung dieses Anstieges. n, 8 für alle Gruppen; * $p < 0,05$ gegen Kontrolle; Imi, Imipramin.

3.4. Der Einfluss chronisch erhöhten linksatrialen Druckes auf die pulmonal-kapilläre Albuminpermeabilität

Um auch den Einfluss eines chronisch erhöhten linksatrialen Druckes, wie er beispielsweise für die pulmonale Hypertonie infolge Linksherzinsuffizienz charakteristisch ist, auf die pulmonal-kapilläre Transzytose zu untersuchen, wurde 32 - 36 Tage alten Ratten operativ ein Clip um die ascendierende Aorta implantiert. Über eine Latenzperiode von 9 Wochen entwickelten die Tiere eine chronische Herzinsuffizienz, durch welche die pulmonale Mikrozirkulation chronisch pathologisch erhöhten Drücken ausgesetzt war [76]. Nach 9 Wochen wurden Herz und Lunge explantiert und wiederum die Intensitätsverteilung perfundierten FITC-Albumins im Vergleich zur Fura-2 Intensität bestimmt. Außerdem wurden Intensitätsprofile im Winkel von 90° Winkel zur Gefäßachse gezogen, um die Fluoreszenzintensität dem luminalen endothelialen und paravaskulären Kompartiment zuzuordnen. Dabei konnten wir feststellen, dass die FITC/Fura-2-Ratio in Lungen von Ratten mit chronischer Herzinsuffizienz nur leicht erhöht und nicht signifikant über den Werten der Kontrolllungen lag ($0,47 \pm 0,1$ vs. $0,38 \pm 0,05$, Abbildung 3.11 auf der nächsten Seite auf Seite, Teil B). Im Linienprofil wurde eine den Kontrollgefäßen vergleichbare FITC-Intensitätsverteilung sichtbar (Abbildung 3.11 auf der nächsten Seite, Teil C).

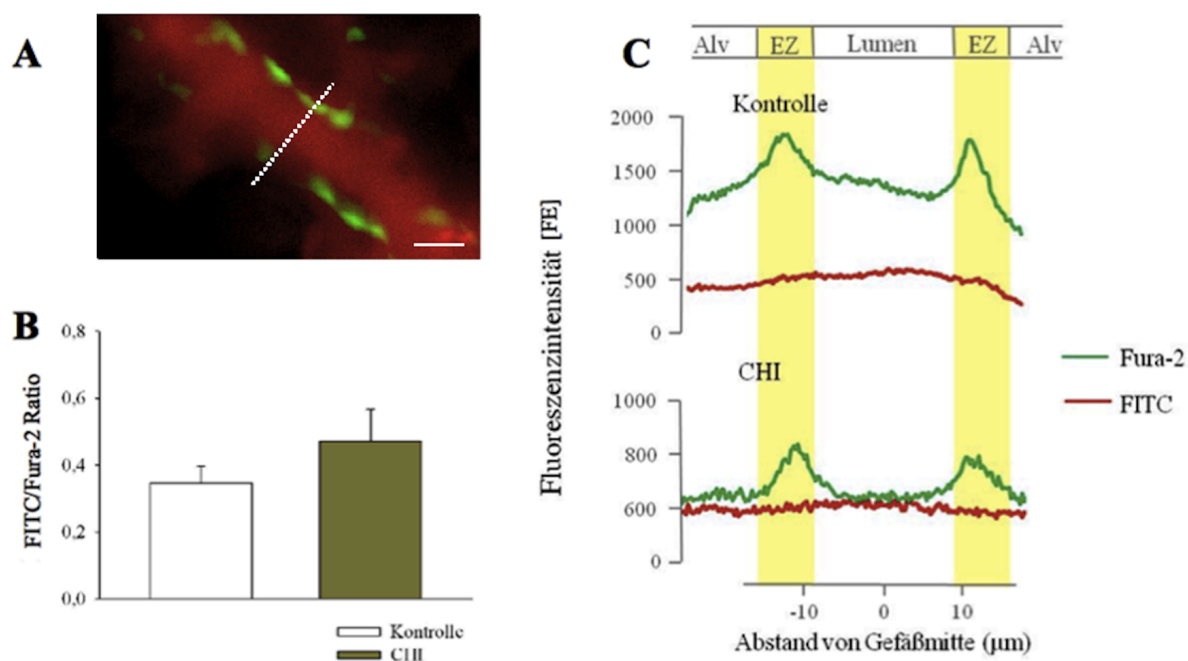


Abbildung 3.11.: Der Einfluss chronischer Linksherzinsuffizienz auf die Albuminextravasation. **A** zeigt ein repräsentatives Bild der Verteilung des rot dargestellten FITC-Albumins über den grün markierten Endothelzellen einer CHI-Lunge. Die FITC/Fura-2-Ratio stieg in Gefäßen von CHI-Tieren nur geringfügig und ohne statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle (**B**). Im Fluoreszenzintensitätsprofil zweier repräsentativer Gefäße zeigt sich keine endotheliale Akkumulation der FITC-Intensität (**C**). n, 6 pro Gruppe; Maßstab, 10µm. CHI, chronische Herzinsuffizienz; EZ, Endothelzelle; Alv, Alveole.

3.5. Der Effekt von inflammatorischem- und akutem hydrostatischen Stress auf das endotheliale Calcium

Da Calcium wie in 1.3.1 auf Seite 16 erwähnt essentiell für die Aufrechterhaltung interzellulärer Kontakte ist, und es unter verschiedenen pathologischen Stimuli wie Thrombin zu einem intrazellulären Anstieg kommt, maßen wir endotheliales Calcium unter Thrombinstimulation und unter akuter hydrostatischer Belastung.

Pulmonale Endothelzellen isolierter Rattenlungen wurden über einen distal liegenden Mikrokatheter mit Fura-2AM über einen Zeitraum von rund 30min gefärbt. Im Anschluss wurden mittels digitaler Bildbearbeitung die Fluoreszenzintensitäten bei 340, 360 und 380nm Exzitationswellenlänge ermittelt und dargestellt. Die calciumunabhängige Intensität bei 360nm wurde für die Berechnung der FITC/Fura-2 Ratio verwendet. Aus dem Verhältnis der Fura-2-Fluoreszenzintensitäten bei 340 und 380nm konnten unter Berücksichtigung der entsprechenden Kalibrierungsparameter [77, 78] Absolutwerte des intrazellulären Calciums einzelner Endothelzellen berechnet werden. Die Thrombinstimulation ließ die Werte des intrazellulären Calciums im pulmonalvaskulären Endothel von $22,51 \pm 2,87\text{nM}$ unter Ausgangsbedingungen auf $44,32 \pm 9,27\text{nM}$ 60min nach Zugabe von Thrombin ansteigen (Abbildung 3.13 auf Seite 50).

Akuter hydrostatischer Stress führte wie in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe beschrieben [79, 56] parallel zu steigenden intrazellulären Calciumwerten ($22,51 \pm 2,87\text{nM}$ bei P_{LA} , 5cm H₂O; $26,52 \pm 1,21\text{nM}$ bei P_{LA} , 10cm H₂O und $38,6 \pm 6,42\text{nM}$ bei P_{LA} , 15cm H₂O).

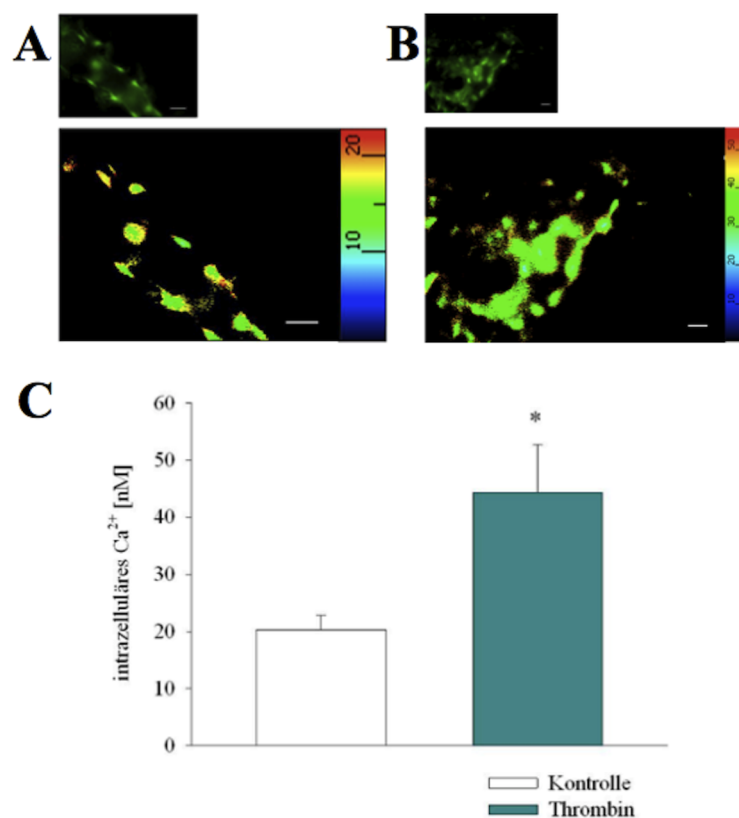


Abbildung 3.12.: Thrombinstimulierter intrazellulärer Calciumanstieg. **A** zeigt eine repräsentative unstimulierte Kapillare bei 360nm Exzitation; unten die aus dem Verhältnis der Fura-Intensität bei 340nm und 380nm berechnete Calciumkonzentration. **B** zeigt eine thrombinstimulierte Kapillare; das zelluläre Calcium stieg durch die Thrombinstimulation auf fast 200% des Ausgangswertes (**C**). Maßstab, 10 μm ; n, 5 pro Gruppe; *p<0,05 versus Kontrolle.

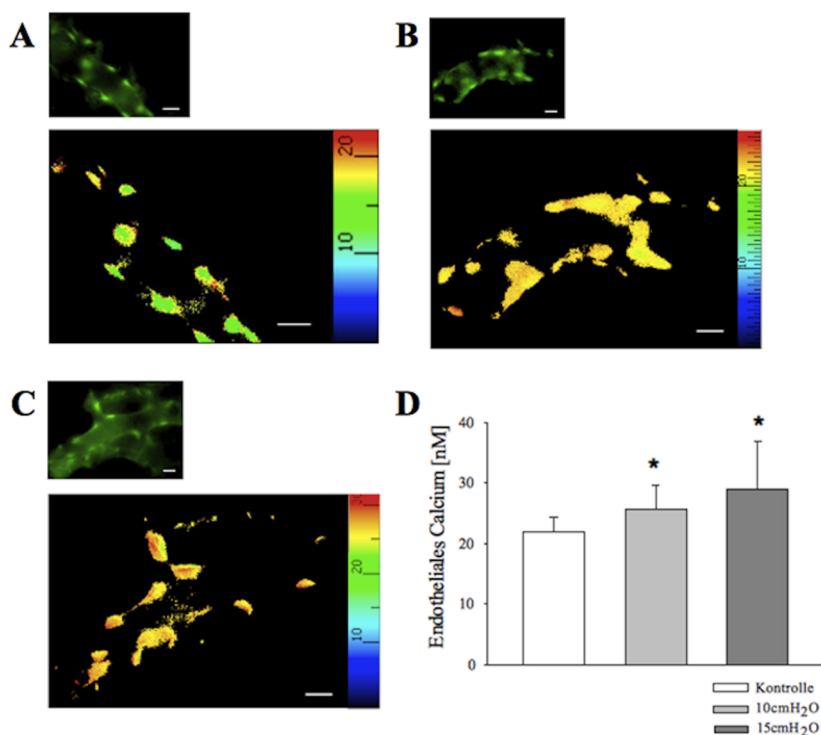


Abbildung 3.13.: Der Anstieg intrazellulären Calciums unter akuter hydrostatischer Druckbelastung.

Repräsentative Gefäße bei einem P_{LA} von **A** 5cmH₂O, **B** 10cmH₂O und **C** 15cmH₂O bei einer Exzitationswellenlänge von 360nm (jeweils kleines Bild oben links) und nach Berechnung des intrazellulären Calciums unter Zuhilfenahme der Ratio der Fluoreszenzintensitäten bei 340 und 380nm. Unter hydrostatischer Druckbelastung kam es zu einem signifikanten druckabhängigen Anstieg intrazellulären Calciums **D**. Maßstab, 10 μ m; n, 8 pro Gruppe; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle bei P_{LA} , 5cmH₂O, P_{LA} , linksatrialer Druck.

4. Diskussion

Das Ziel unserer Studie war es, die Rolle der endothelialen Transzytose in der pulmonalen Mikrozirkulation unter verschiedenen pathophysiologischen Stimuli zu untersuchen. Hierfür wurden isoliert-perfundierte Rattenlungen einerseits mit dem Inflammationsparameter Thrombin stimuliert, andererseits einer akuten oder chronischen pulmonalkapillären Druckbelastung ausgesetzt. Ein weiteres Anliegen war es, durch Blockade der sauren Sphingomyelinase (ASM), die Rolle ihres Signalweges zu untersuchen.

In unseren Untersuchungen konnten wir feststellen, dass eine Steigerung der endothelialen Transzytoserate zumindest anteilig an der durch Thrombin initiierten vaskulären Albuminhyperpermeabilität beteiligt ist. Erhöhter pulmonalkapillärer Druck führte hingegen ausschließlich durch Erhöhung der parazellulären Permeabilität zur endothelialen Barrierestörung, während die Albumintranszytoserate sank. Die Inhibition der ASM durch Imipramin konnte einen Anstieg der Proteinpermeabilität durch Thrombin fast vollständig verhindern, auf die erhöhten Albuminwerte im pulmonalen Gewebe nach akuter Druckerhöhung hatte sie keinen nachweislichen Effekt. Eine chronische linksatriale Druckbelastung hatte in unseren Versuchen nur einen geringen Einfluss auf die mikrovaskuläre Albuminpermeabilität.

Wir sahen außerdem, dass sowohl die endotheliale Stimulation mit Thrombin als auch eine akute kapilläre Druckbelastung zu einer Zunahme des intrazellulären Calciums führten.

Unsere Befunde zeigen also erstmals eine Regulation des transzellulären Albumintransports durch einen inflammatorischen Stimulus und identifizieren den Signalweg der ASM als zugrundeliegenden Mechanismus.

4.1. Methodendiskussion

4.1.1. Die isoliert-perfundierte Lunge

Das Modell der isoliert-perfundierten Lunge, das seit mehr als einem halben Jahrhundert als etabliertes Modell für die Bewertung pathophysiologischer pulmonaler Vorgänge fungiert [80], hatte für unsere Untersuchungen viele Vorteile. So ähneln die Untersuchungsbedingungen sehr den Verhältnissen *in vivo*, durch die Elimination systemischer Einflüsse wie beispielsweise dem imigrierender Leukozyten liegen aber definierte Filtrationsbedingungen vor [81]. Durch die Elimination protektiver Regulationsmechanismen wie dem Anstieg der lymphatischen Drainage war das

Gewebe anfälliger für Ödementwicklung. Ein Problem des Modells ist der durch die Operation, Explantation, Antikoagulation und Farbstoffbeladung auftretende Stress und Entzündungsreiz, der potentiell per se zu Veränderungen der Permeabilität des Endothels führen kann [81]. Dieser systematische Fehler wurde jedoch durch den Vergleich mit Kontrollgruppen korrigiert. Außerdem war der Zeitraum, in dem das isolierte Organ mit Fluoreszenzfarbstoffen beladen-, mit Stimuli provoziert- und anschließend untersucht wurde, mit nicht mehr als max.2,5h relativ kurz.

4.1.2. Intravitalmikroskopie

Fluoreszenz- und Intravitalmikroskopie (IVM) sind etablierte Methoden, die seit den 1940er bzw. den 1950er Jahren für die unterschiedlichsten Studien regelmäßig verwendet wurden [82, 80]. Für unsere Untersuchungen zur Proteinpermeabilität war die IVM besonders geeignet, da sie erstens die gezielte, fokale Beladung eines pulmonalen Areals mit Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht, und zweitens durch ihre hohe räumliche und zeitliche Auflösung ideal für die Darstellung dynamischer Prozesse auf Zellebene ist. In Bezug auf eine gerade erst beginnende Proteinextravasation erlaubt die IVM dabei eine deutlich sensiblere Detektion als beispielsweise die bronchoalveoläre Lavage, die Bestimmung des Feuchttrockengewichts oder gar eine im klinischen Umfeld gebräuchliche Bildgebung [64]. Wir achteten darauf, Kapillaren ähnlichen Durchmessers zu untersuchen, da sich Proteinpermeabilität und Reaktion auf inflammatorische und hydrostatische Stimuli in unterschiedlichen Endotheltypen voneinander unterscheiden. Da die Mikrogefäße von Nagetieren durch eine fehlende Lamina muscularis und kleine Durchmesser von nicht mehr als 30µm, anatomisch generell dem Anspruch einer Kapillare genügen, haben wir in der vorliegenden Arbeit nicht zwischen Venolen, Arteriolen und Kapillaren unterschieden, sondern bezeichnen die untersuchten Mikrogefäße in der vorliegenden Arbeit generell als Kapillaren [83].

Die IVM birgt das Problem, dass sie, wie generell die Mikroskopie, nur eine zweidimensionale oberflächliche Sicht auf das zu untersuchende dreidimensionale Gewebe erlaubt, was zu Fehlinterpretationen und Messfehlern führen kann. Auch wir konnten ausschließlich oberflächliche Mikrogefäße untersuchen, die unter der nicht kapillarisierten viszeralen Pleura lagen. In der Berechnung der Fluoreszenzintensitäten zu untersuchender Gefäße, flossen außerdem teilweise Fluoreszenzen kreuzender Gefäße mit ein. Außerdem hatten auch Endothelzellen, die unter dem Gefäßlumen lagen, Einfluss auf die Höhe der dort gemessenen Intensität. Wir versuchten diesen Effekt durch das Anwählen einer störungsarmen Region über dem Gefäß zu minimieren. Außerdem wurde vorrangig die Ratio zwischen FITC- zu Fura-2- Intensität ausgewertet. In den Linienprofilen des Ergebnisteils (3.6 auf Seite 42, 3.9 auf Seite 45, 3.11 auf Seite 47) wurde die Restaktivität jenseits des Gefäßes als „Hintergrundrauschen“ von den dargestellten Fluoreszenzintensitäten subtrahiert. Als weiterer Nachteil der Methode stellte sich der relativ kleine und nur oberflächlich einsehbare Ausschnitt der Lungen dar. Zwar konnten bis zu 15 Gefäße pro Lunge untersucht werden, insgesamt war aber kein Rückschluss auf zentrale Lungenabschnitte oder eine gesamtheitliche Beurteilung der Lunge möglich. Generell war für die Untersuchungen ein vibrationsfreier Tisch von

oberster Priorität, und Ventilation und Perfusion der Lunge mussten streng kontinuierlich erfolgen, da für die Messung der einzelnen Fluoreszenzintensitäten bei unterschiedlicher Wellenlänge ein konstanter Gefäßausschnitt zwingend notwendig war.

Bei der Verwendung des FITC-Fluoreszenzfarbstoffes gab es insbesondere die von Wu und Mitarbeitern beschriebene bis zu 15%-ige Abnahme der Fluoreszenzintensität nach 30-minütiger intermittierender Beleuchtung von 5s/min zu beachten [84]. In unseren Messungen konnten wir aber keinen Trend zur FITC-Intensitätsminderung über die Dauer der Untersuchung feststellen. Dies kann erstens dadurch bedingt sein, dass unsere Aufzeichnungen insgesamt selten länger als 30min dauerten, zweitens die intermittierende Belichtung in unseren Versuchen seltener und kürzer erfolgte als bei Wu und Mitarbeitern und drittens die Lichtintensität nicht sehr hoch war. Um unsere Ergebnisse in einer noch höheren Auflösung und unbeeinträchtigt vom Fluoreszenzfarbstoff zu verifizieren, führten wir außerdem elektronenmikroskopische Studien durch.

4.1.3. Elektronenmikroskopie

Die adäquate Darstellung dynamischer Prozesse in und um eine einzelne Endothelzellen ist allein durch die Elektronenmikroskopie möglich [64], die daher in unseren Experimenten Anwendung fand. Die Markierung von Albuminmolekülen mit jeweils einem elektronenmikroskopisch dichten Goldpartikel ist eine von Heckel und Mitarbeitern durch ihre hohe Auflösung als äußerst sensitiver Marker des beginnenden Lungenschadens beschriebene Methode [64]. Hierbei wird nicht nur wie in der IVM eine Mehranreicherung von Albumin in der Gefäßwand im Vergleich zum -lumen sichtbar und quantifizierbar, sondern es kann in dieser hohen Auflösung jeder Goldpartikel und damit jedes Albuminmolekül einem Kompartiment zugeordnet werden. Dabei ist außerdem und besonders ergänzend zu unseren IVM-Studien von Vorteil, dass nach Beladung und Fixierung der Lunge, jeder Bereich inklusive zentraler Ausschnitte einer Untersuchung zugänglich wird. Gold hat in vorangegangenen *in vivo* Experimenten weder phototoxische noch allergische Reaktionen hervorgerufen [64]. Die Untersuchungen wurden durch die hohe Auflösung der EM aber auch limitiert, da es lediglich möglich war, Lungenparenchym im Mikrometerbereich zu betrachten, ohne einen Gesamtüberblick zu erlangen. Diesem Problem wurde durch die stichprobenartige, von Lobi und Segmenten unabhängige Probenentnahme begegnet. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Vorteile der IVM in der Untersuchung am intakten Organ, der potentiell möglichen Erfassung dynamischer Prozesse bei hoher zeitlicher Auflösung und in der gleichzeitigen Korrelation zu anderen Signalwegen liegen. Während die EM eine sehr hohe räumliche Auflösung ermöglicht.

In der Auswertung der Befunde der goldbeladenen Albuminmoleküle ist zu beachten, dass wir derzeit nicht wissen, ob und inwieweit eine Goldmarkierung den trans- oder parazellulären Albumintransport beeinflusst. Das nicht unerhebliche Gewicht der Goldpartikel könnte durchaus deren Transport verlangsamen. Auf der anderen Seite könnte Gold auch als Stimulus für einen beschleunigten transzellulären Albumintransport wirken, so wie es Galis und Mitarbeiter für Fett-

säuren beschrieben [85]. Schnitzer und Mitarbeiter stellten fest, dass modifiziertes Albumin einen anderen Weg durch die Endothelzelle nimmt als natives [86]. Sie fanden dabei heraus, dass nicht nur das als typischer Rezeptor für Albumin bekannte Glykoprotein 60 (Gp60), sondern vor allem Glykoprotein 18 und 30 als caveoläre Rezeptoren für durch Goldpartikel modifiziertes Albumin agiert. Ein beträchtlicher Anteil dieses Albumins akkumulierte in Schnitzers Studie in Lysosomen, während natives Albumin nach der Internalisierung unverändert basolateral exozytiert wurde. Dem widerspricht eine Studie von Milici und Mitarbeitern, die schon 1987 die wichtige Frage nach der Vergleichbarkeit der Transzytose zwischen monomerem und polymerem, z.B. goldbeladenem Albumin adressierte [27]. Dabei erkannte man, dass sich sowohl monomeres als auch polymeres Albumin an der luminalen Öffnung endothelialer Caveolen anheftete, sich in offenbar frei im Zytoplast befindlichen Caveolen anreichterte und durch Caveolen am basolateralen Zellpol ins Gewebe entlassen wurde. Der Vergleich ergab dabei lediglich Unterschiede bezüglich der Geschwindigkeit und Affinität, nicht aber der Qualität des Transports, wobei die goldmarkierten Albuminmoleküle fester an der endothelialen Oberfläche hafteten und später an der abluminalen Zellseite freigesetzt wurden als natives Albumin. Die Forscher beschrieben zwar auch, dass sowohl monomeres als auch polymeres Albumin zu einem geringen Anteil in endosomengleichen Vesikeln gefunden wurde, heute würde man diese Strukturen jedoch als intrazelluläre Caveosomen bezeichnen. Da es noch weitere Studien gibt, die unter Zuhilfenahme goldmarkierter Albuminmoleküle der allgemeinen Datenlage konkordante Ergebnisse lieferten [64, 26], akzeptierten wir die eventuellen Störfaktoren in unserer Studie.

4.2. Transzytose und ihre Signifikanz

Die Funktion der Transzytose in polarisierten Epithelien ist in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt. Dabei divergieren die Meinungen darüber, inwieweit Transzytose, abgesehen von der ubiquitären Anwesenheit ihres morphologischen Korrelats der Caveolen, Verantwortung für die endotheliale Permeabilität von Makromolekülen übernimmt [26].

4.2.1. Transzytose unter physiologischen Bedingungen

Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich der Frage gewidmet, ob ein aktiver oder passiver Albumintransport im gesunden Gewebe dominiert, und dabei verschiedenste Methoden angewandt [87, 72]. Ein Beispiel sind Temperaturreduktionsstudien, die auf der simplen Vorstellung beruhen, dass die Aktivität eines energieverbrauchenden Prozesses in hypothermischer Umgebung deutlich abnehmen muss. In von Rippe und Mitarbeitern [87] bei 22°C isoliert-perfundierten Lungen waren die Unterschiede in der Albuminextravasation nicht ausreichend signifikant, als dass einem rezeptorvermittelten aktiven Transport eine entscheidende Rolle im Albumintransport hätte zugesprochen werden können. Da andere Temperaturreduktionsstudien betreffs endozytotischer

Prozesse jedoch häufig bei deutlich niedrigeren Temperaturen, nämlich $<15^{\circ}\text{C}$ durchgeführt wurden, könnte eine mangelnde Temperaturreduktion eine einfache Erklärung für diese kontroversen Ergebnisse sein [88]. In einer anderen Studie verhielt sich die Albuminpermeabilität am selben Modell proportional zum onkotischen Druck des Perfusats, was ebenfalls gegen eine relevante Beteiligung aktiver Prozesse am basalen transendothelialen Albumintransport spricht [72].

Im Gegensatz dazu gibt es zahlreiche licht- und elektronenmikroskopische Studien, die demonstrieren, dass unterschiedlich präparierte makromolekulare Marker und Albuminmoleküle unfernestrierte Kapillaren nicht über Lücken in parazellulären Verbindungen sondern über vesikuläre Strukturen verlassen. Ein elegantes Beispiel hierfür sind die Untersuchungen von Wagner und Chen, die die Elektronenmikroskopie mit dem Gebrauch elektronenopaker Marker kombinierten. Sie untersuchten die Extravasation von Terbium (Tb^{3+}) durch die Wand kontinuierlicher Kapillaren des Rete mirabile des Aals. Tb^{3+} hinterließ dabei eine elektronenmikroskopisch nachvollziehbare Spur, die zu abluminalen endothelialen Caveolen und nicht durch interendotheliale Spalten führte [89]. Ein weiterer Hinweis auf einen aktiven, gerichteten Prozess ist die hohe Geschwindigkeit, mit der Makromoleküle über das Endothel transportiert werden. Dies zeigten bereits einige der ersten Untersuchungen zu dieser Fragestellung in Form von EM-Studien an Mäusegefäßen, die entweder mit Gold- oder Radioiod-markiertem Albumin (^{125}I -Albumin) perfundiert wurden. Bereits nach drei Minuten waren rund 90% der Gold-Albumin-Partikel in offenen Vesikeln an der luminalen Endothelmembran gebunden. Die darauffolgende Caveoleninternalisierung wurde von einer zeit- und konzentrationsabhängigen Transzytose mit anschließender Exozytose an der basolateralen Membran gefolgt [90, 27]. Eine andere Studie von Schnitzer und Mitarbeitern stellte anhand von *in vivo* Kameraaufnahmen fest, dass Antikörper, die gegen die in Caveolen pulmonaler Endothelzellen in hoher Konzentration vorkommende Aminopeptidase P gerichtet waren, bereits innerhalb der ersten 60s nach intravenöser Injektion an die Zellmembran gebunden und nach abluminal transzytiert wurden. Anhand bildgebender Verfahren konnte gezeigt werden, dass sich die radioaktiv markierten Antikörper, die gegen Aminopeptidase P gerichtet waren, im Gewebe anreicherten und dort Stunden bis Tage in erhöhter Konzentration messbar waren. Antikörper gegen ACE, Immunglobulin G u.a. reicherten sich im Gegensatz dazu nur kurzzeitig im pulmonalen Gewebe an und waren außerdem wesentlich unspezifischer in ihrer Verteilung. Außerdem wurde festgestellt, dass unmarkierte Antikörper gegen Aminopeptidase P die Aufnahme der ^{125}I -markierten Aminopeptidase P-Antikörper reduzierten. Somit wurde neben der hohen Geschwindigkeit sowohl eine Spezifität des Transportprozesses als auch eine kompetitive Hemmung festgestellt, was die These eines rezeptorvermittelten Transports weiter untermauert [91].

Um Caveolen als wichtige mikroanatomische Strukturen beim transzellulären Transport zu identifizieren, wurden Studien durchgeführt, die mit Reagenzien arbeiteten, die bekanntlich die Caveolenbildung bzw. den -transport stören. Hierzu wurden in der Vergangenheit gern Filipin, das zur Bildung von Caveolen essentielles Cholesterin bindet, und N-Ethylmaleimid (NEM), das die Fusion von Vesikeln mit der Zellmembran verhindert, benutzt. Schnitzer und Mitarbeiter zeigten, dass mit Filipin exponierte pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen *in vitro* keine Caveolen aus-

bildeten, und dass der Albumintransport über diese Zellen inhibiert war. In isoliert-perfundierten Rattenlungen berichtete dieselbe Arbeitsgruppe von einer Reduktion des Albumintransports von bis zu 80% durch Filipin, während sich die Permeabilität von Inulin, einem Molekül, das das Gefäßbett bekanntlich durch parazelluläre Spalten verlässt, nicht änderte [92]. Der negative Effekt von NEM auf den transzellulären Albumintransport wurde mehrfach *in vitro* und *ex vivo* beschrieben [93, 94]. So zeigten Predescu und Mitarbeiter, dass NEM den Transport von dinitrophenyliertem Albumin (ADNP), einem markierten, dem nativen aber sehr ähnlichen Albumin, durch koronare Mikrogefäße um 80% reduzierte, genauso wie die caveoläre Anreicherung mit ADNP [93]. John und Mitarbeiter berichteten von ähnlichen Daten wie Predescu, nämlich einer durch das caveolenzerstörende Agens Methyl- β -Dextrin hervorgerufenen 80%-igen Inhibition des Albumintransports über die Endothelzellen kontinuierlicher Mikrogefäße. Außerdem beschäftigte sich diese Studie spezifisch mit dem Albumintransport, und ob dieser unter physiologischen Albuminkonzentrationen gesättigt sei. Sie zeigten in Rattenendothelzellen, dass vesikuläre Transporter, möglicherweise also endotheliale Caveolen in den Transportprozess involviert sind, dass außerdem die endotheliale Albuminaufnahme von der luminalen -konzentration abhängig ist, und dass dieser Transport bei physiologischen Serumalbuminwerten noch nicht maximal aktiv ist. Das spricht also erneut dafür, dass der rezeptorvermittelte Albumintransport unter physiologischen Bedingungen noch nicht gesättigt und entsprechend modifizierbar ist [29]. Weiterhin belegen zahlreiche Antikörperstudien eine signifikante Rolle der rezeptorvermittelten spezifischen Transzytose. Tirupathi und Mitarbeiter zeigten beispielsweise, wie Antikörper gegen Gp60 die Aufnahme von ^{125}I -Albumin inhibierten. Die Stimulation mit Albumin oder kreuzvernetzenden sekundären anti-Gp60-Antikörpern führte zu einem 2- bis 3-fachen Anstieg der Albuminaufnahme, die offenbar nicht durch parazelluläre Prozesse zustande kam [45].

Rippe und Taylor veröffentlichten 2001 jedoch auch Daten, die zeigten, dass sowohl Filipin als auch NEM in ihren Studien an isoliert-perfundierten Rattenlungen die mikrovaskuläre Permeabilität für Albumin sogar erhöhten [87]. Diese scheinbar kontroversen Ergebnisse sind gut mit den Studien von Armstrong und Mitarbeitern vereinbar. Diese berichteten anhand von *in vitro* und *ex vivo* Lungenmodellen über eine inverse, wechselseitige Regulierung von transzellulärer und parazellulärer Permeabilität am unstimulierten Endothel. Dabei wurden mehrere bekannte pharmakologische Inhibitoren wie auch NEM und der zellgängige Dynamininhibitor Dynasore sowie eine Temperaturreduktion auf 14°C benutzt, wobei jede der Interventionen eine Minderung der Transzytose und einen Anstieg parazellulärer Permeabilität zur Folge hatte. Die Interaktion scheint dabei über die Rho-GTPase RAC, Dynamamin und Aktin vermittelt zu sein [94]. Studien an Cav-1^{-/-}-Mäusen hatten im Vorfeld ähnliche Ergebnisse erzielt, indem sie zeigten, dass in pulmonalen Endothelzellen dieser Tiere, erwartungsgemäß keine Transzytose stattfand, aber durch Defekte der interzellulären *tight junctions* und der endothelialen Zelladhäsion an der Basalmembran eine gesteigerte parazelluläre Permeabilität vorlag [48, 49].

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass in zahlreichen Studien Belege für einen unter physiologischen Bedingungen stattfindenden modifizierbaren transzellulären Albumintransport gesam-

melt wurden, der über in Caveolen angereicherte spezifische Rezeptoren wie Gp60 stattfindet. Diesem Prozess kommt offenbar eine wichtige Rolle in der Albuminpermeabilität zu, ohne dass man bisher einen Signalweg oder Regulationsmechanismus hätte identifizieren können. Die in 1.3 beschriebene enorme Dichte an caveolären Vesikeln in pulmonalen Endothelzellen unterstützt dabei die These, dass besonders im Organ der Lunge, welches so sensitiv auf eine vermehrte paravaskuläre Albuminanreicherung reagiert, dieser transzelluläre Albumintransport von hoher Relevanz ist. Außerdem scheinen sich Transzytose und parazelluläre Permeabilität wechselseitig zu beeinflussen.

4.2.2. Transzytose unter inflammatorischem Stress

Von Hinweisen auf einen unter inflammatorischem Stress gesteigerten vesikulären Proteintransport in Endothelzellen wurde bisher nur vereinzelt berichtet. Heckel und Mitarbeiter stellten im kapillären Endothel von Kaninchenlungen *in vivo* sowohl einen Anstieg der totalen Caveolenanzahl als auch eine auf das Vielfache gesteigerte Anzahl vesikulärer goldmarkierter Albuminmoleküle durch eine Stimulation mit dem Inflammationsmediator LPS fest. Zudem kam es zu einer Anreicherung von Goldpartikeln in Alveolen [64]. Pietra und Johns führten konfokal- und elektronenmikroskopische Studien an Rattenlungen durch, in denen besonderes Augenmerk auf der Verteilung und Extravasation von FITC-markiertem Albumin beim wasserstoffperoxidinduzierten Lungenödem lag. Für die EM wurde das fluoreszenzmikroskopische Signal des FITC-Albumins durch Photooxidation in ein elektronendichtes Signal umgewandelt. Die Forscher beobachteten, dass in den pulmonalen Arterien der Lungenschaden stets mit einer zunehmenden zellulären Vakuolisierung bei intakten interzellulären Verbindungen begann, und dass die vermehrten intrazellulären Vakuolen das elektronendichte Korrelat des FITC-Albumins anreicherten [95]. Childs und Mitarbeiter machten an Mesenterialgefäßen von Ratten den Umkehrschluss, indem sie zeigten, dass im hämorrhagischen Schock eine leichte (34°C) bis moderate (30°C) Hypothermie einen protektiven Einfluss auf die Entwicklung einer vaskulären Hyperpermeabilität im Vergleich zu normothermen Tieren hatte. Gemeinsam sprechen die Befunde für einen Beitrag von aktiven, temperatursensiblen Transportprozessen zur schock- und entzündungsinduzierten vaskulären Hyperfiltration [63].

Im Vorfeld der vorliegenden Arbeit beobachteten unsere Kooperationspartner um Prof. Stefan Uhlig (Institut für Pharmakologie und Toxikologie; Uniklinik RWTH Aachen), dass Thrombin in Zellkulturen der pulmonalen Mikrostrombahn (HMVEC-L) zu keiner sichtbaren interzellulären Spaltenbildung führte. In den ersten drei Stunden nach Thrombinstimulation lag die FITC-Albumin-Translokationsrate außerdem deutlich über dem Verlust des transendothelialen Widerstandes, der als Indikator für die Integrität zellulärer Kontakte dient. Dies ist ein eindeutiger Hinweis auf eine durch Thrombin stimulierte erhöhte transzelluläre Transportrate des FITC-Albumins. In thrombinstimulierten HMVEC-L kam es zu einem Anstieg auf bis zu 500% der zuvor als Maximum der passiven Permeabilitätsrate definierten FITC-Albumin-Translokationsrate. In pulmonal-arteriellen Endothelzellen vom Kalb (BPAE) stieg im Gegensatz dazu auch bei sehr hohen Thrombinkonzen-

trationen die Albumintranslokationsrate nur bis auf höchstens 50% der maximalen parazellulären Permeabilität. Diese Beobachtungen wiesen also darauf hin, dass in Endothelzellen pulmonaler Mikrogefäße nicht aber in Zellen pulmonaler Makrogefäße, Thrombin eine Steigerung des transzellulären Transports bewirkt (unveröffentlichte Daten Kooperationsprojekt AG Kübler/Charité Berlin - AG Uhlig/RWTH Aachen). Letztere Ergebnisse stehen in gewissem Widerspruch zu den Ergebnissen von Pietra und Mitarbeitern [95], nach denen hauptsächlich pulmonalarterielle Endothelzellen vom Wasserstoffperoxid-induzierten Transzytoseanstieg betroffen waren. Hier könnten tatsächlich einfach unterschiedliche Angriffspunkte der beiden inflammatorischen Mediatoren vorliegen. Ferner handelte es sich bei den Versuchen von Pietra und Mitarbeitern anders als bei Uhlig und Mitarbeitern um *in situ* Experimente.

Unsere IVM-Versuche zeigten nun eine Verlagerung der FITC-Intensität nach extravaskulär. Ob sich Albumin tatsächlich endothelial anreicherte, lässt sich aus der IVM nicht sicher ableiten. Wie in 1.3.2 auf Seite 17 beschrieben, kann aber nach der aktuellen Studienlage nicht von einer parazellulären Permeabilitätssteigerung durch Thrombin *in situ* ausgegangen werden. Zwar ist die durch Thrombin ausgelöste Steigerung des Gefäßtonus' mit einhergehender parazellulärer Permeabilitätssteigerung nicht gänzlich auszuschließen, grundsätzlich wurden die Drücke im pulmonalen Gefäßbett von uns aber aufgezeichnet und ggf. reguliert. Somit kann unter den gegebenen Umständen mit einiger Sicherheit von einer gesteigerten Transzytoserate als Transportweg des FITC-Albumins ausgegangen werden. Außerdem weisen die fusionierten Darstellungen der monochromatischen Fluoreszenzintensitäten für Fura-2 und FITC (Abbildung 3.2 auf Seite 38) und die repräsentativ aufgeführten Intensitätsprofile senkrecht zur Gefäßachse auf eine intraendotheliale Anreicherung von FITC-Albumin hin. Ein Beweis für diese These war mittels der IVM jedoch nicht möglich, sondern bedurfte höherauflösender Untersuchungen. Die aus diesem Grund von uns durchgeführte EM untermauerte die Ergebnisse. So wurden in der thrombinstimulierten Gruppe caveolär signifikant mehr goldmarkierte Albuminmoleküle gezählt als in der Kontrollgruppe. Die luminale Menge an Goldpartikeln war im Vergleich reduziert (Abbildung 3.3 auf Seite 39). Dies bestätigte, dass Thrombin die caveoläre Aufnahme von Albumin induziert. Der mangelnde Nachweis alveolärer Goldpartikel kann einer recht kurzen Stimulationszeit geschuldet sein. Eine immunhistochemische Darstellung von Caveolin war unserem Kooperationspartner in Gießen aus organisatorischen Gründen leider nicht möglich, dennoch wird aus vorangegangenen Studien ersichtlich, dass es sich bei den elektronenmikroskopisch sichtbaren intraendothelialen Vesikeln aus morphologischen Gründen und wegen des ubiquitären Auftretens nur um caveoläre Vesikel handeln kann. Wird der Anstieg der Albumintranszytoserate nun aber tatsächlich über die ASM reguliert?

4.3. Der Einfluss von Sphingolipiden auf die vaskuläre Permeabilität

Neben den in 1.4 auf Seite 19 genannten scheinbar sehr vorteilhaften Effekten der Ceramide auf den Organismus scheint die Biosynthese von Ceramiden durch die ASM auch negative Folgen zu haben. So haben eine erhöhte ASM-Aktivität und hohe Ceramidspiegel beispielsweise einen nachgewiesenen negativen Effekt auf die vaskuläre Barrierefunktion und die Überlebensrate von Sepsiskranken. So wiesen Überlebende einer Sepsis eine relativ geringe ASM-Aktivität auf, während in Patienten, die der Sepsis erlagen, die ASM-Aktivität sowie Ceramidwerte erhöht waren [96]. Außerdem konnten im LPS-Modell die zwei ASM-Inhibitoren Imipramin und D609 der Entstehung eines Lungenödems bzw. der pulmonalen Inflammation entgegenwirken und D609 die Mortalität nachweislich senken [97, 98]. Diese Ergebnisse könnten also sehr gut zu einer erhöhten Transzytoserate von Makromolekülen durch eine durch Thrombin stimulierte ASM passen, die durch die ASM-Inhibition durch Imipramin oder D609 wieder normalisiert wird.

Über welchen Signalweg aber hat die ASM einen Einfluss auf die endotheliale Barriere? Durch Stimulation mit dem vielfach untersuchten PAF, der nachweislich zur Steigerung der ASM-Aktivität und somit zur Hydrolyse von Ceramid aus Sphingomyelin führt, konnte weder ein Zuwachs der Anzahl endothelialer Caveolen noch eine caveoläre Größenzunahme in Endothelzellen *in situ* beobachtet werden [99]. Andererseits führt die Infektion von Säugetierzellen mit *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylokokkus aureus* und Rhinoviren regelmäßig zu deren zellulärer Internalisierung. Die Pathogene aktivieren die ASM und triggern damit die Hydrolyse von Ceramid und die Bildung ceramidangereicherter Membrandomänen, die für die Internalisierung der Pathogene entscheidend zu sein scheinen [100]. Die vorangegangenen *in vitro* Studien an HMVEC-L führten außerdem zu einem durch Thrombin induzierten raschen Anstieg der ASM-Aktivität, was wiederum zur Ceramidsynthese und zur Rekrutierung von Cav-1 in caveolären Membrandomänen führte. In BPAE war dies wiederum nicht der Fall. Um eine Regulation der an der parazellulären Permeabilität beteiligten Signalwege durch ASM auszuschließen, wurde der Einfluss von ASM und Y27632 verglichen, wobei Y27632 ein bekannter Rhokinaseninhibitor ist und somit einen parazellulären Permeabilitätsanstieg verhindert. Y27632 allein reduzierte die Albumintranslokation in einem vergleichbaren Maße wie der ASM-Inhibitor Imipramin oder spezifische Ceramidantikörper. Eine nahezu komplette Reduktion der FITC-Translokationsrate nach Thrombinstimulation war nur durch eine parallele Exposition mit Y27632 und Imipramin möglich, was für eine synergistische Wirkung aus Rhokinasen-vermittelter parazellulärer und ASM-abhängiger transzellulärer Albumintranslokationsrate spricht (unveröffentlichte Daten Kooperationsprojekt AG Kübler/Charité Berlin - AG Uhlig/RWTH Aachen).

In der vorliegenden Arbeit wurden Rattenlungen zunächst als Kontrolle isoliert, dann zusätzlich zu Thrombin bzw. akuter Druckbelastung mit dem ASM-Inhibitor Imipramin exponiert. Unter physiologischen Bedingungen kam es zu einem nicht signifikanten Anstieg der FITC/Fura-Ratio unter

Imipramin. Dies widerspricht aber nicht der These eines durch Thrombin induzierten Anstiegs der ASM- und Transzytoseaktivität, die in diesem Fall durch Imipramin blockiert werden kann, denn welche Signalwege an der Aufrechterhaltung der viel geringeren basalen Dynamik der Caveolen beteiligt sind, bleibt derweil noch unbekannt. Die durch Thrombin hervorgerufene Steigerung der FITC/Fura-Ratio konnte durch Imipramin auf Werte gesenkt werden, die nur leicht über dem Kontrollwert lagen. Im repräsentativen Gefäß und Linienprofil in Abbildung 3.6 auf Seite 42 zeigt sich ebenfalls der revidierende Effekt von Imipramin, besonders in Bezug auf die endotheliale Akkumulation des Fluoreszenzsignals, was also dafür spricht, dass Imipramin tatsächlich den gesteigerten transzellulären Transport von FITC-Albumin zu hemmen scheint.

Um die Rolle der ASM im Zusammenhang mit der druckassoziierten Albuminextravasation zu untersuchen, inhibierten wir die ASM in isolierten Lungen gleichzeitig zur Druckbelastung mit Imipramin. Hier kam es zu keiner signifikanten Minderung der FITC/Fura-2 Ratio, was also gegen einen Einfluss der Transzytose auf eine unter diesen Bedingungen erhöhte Proteinextravasation spricht. Entsprechende Hinweise gaben gleichzeitig die EM-Bilder der druckbelasteten Gefäße, worin erstens keine erhöhte Caveolenzahl unter hydrostatischer Druckbelastung gesehen wurde, und zweitens die Anzahl der ausgezählten Goldpartikel luminal sogar noch höher als in der Kontrollgruppe lag, was die These einer inversen Beziehung zwischen trans- und parazellulärer Permeabilität unterstützt.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse also, dass die gesteigerte endotheliale Transzytoserate in pulmonalen Kapillaren unter dem inflammatorischem Stimulus Thrombin über eine erhöhte ASM-Aktivität vermittelt zu sein scheint, und dass diese durch Imipramin offenbar inhibierbar ist. Eine akute hydrostatische Belastung scheint im Gegensatz dazu tatsächlich zu einem Anstieg der parazellulären Permeabilität zu führen, die nicht über die ASM vermittelt wird und entsprechend auch nicht durch Imipramin inhibiert werden konnte.

4.4. Die pulmonal-kapilläre Reaktion auf hydrostatischen Stress

4.4.1. Akuter hydrostatischer Stress

Die Pathogenese des hydrostatischen Lungenödems wird nach der auf Seite 9 zitierten Formel $J_v = K_f(P_{ka} - P_{is}) - \sigma(\Pi_{ka} - \Pi_{is})$ traditionell einem Missverhältnis zwischen den hydrostatischen (P_{ka} und P_{is}) und onkotischen Drücken (Π_{ka} und Π_{is}) angelastet. Vor allem ein steigender hydrostatischer Gefäßdruck (P_{ka}) und ein sinkender onkotischer Druck im umgebenden Interstitium (Π_{is}) prädisponieren zur Ödembildung. Heute wissen wir, dass abgesehen von diesen passiven Kräften, das Endothel selbst eine aktive Rolle an der Regulation seiner Permeabilität übernimmt. So zeigten Parker und Mitarbeiter, dass die endotheliale Konstante der Permeabilität, der Filtrationskoeffizient (K_f) bei steigendem P_{ka} zunimmt, und dass dieser Anstieg durch Agonisten des cAMP-Signalwegs reduziert werden kann [101]. Das heißt, dass es endotheliale Wege zur Permeabilitätsregulierung

geben muss, die durch die Option einer medikamentösen Interaktion wissenschaftliches Interesse wecken.

Kübler und Mitarbeiter konnten einen direkten Zusammenhang zwischen einer hydrostatischen Druckbelastung und einem $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg im pulmonalvaskulären Endothel nachweisen [102, 79]. In einer Arbeit von Yin konnte die Aktivierung des membranständigen Calciumkanals TRPV4 und die daraufhin aktivierte MLCK als Ursache des K_f -Anstiegs identifiziert werden [103]. Guazzi und Mitarbeiter veröffentlichten Daten, die die These einer reversiblen Störung der endothelialen Barrierefunktion durch Zellkontraktion weiter unterstützten [104]. Diese Arbeitsgruppe untersuchte die Gasdiffusionsleitfähigkeit der alveolokapillären Barriere an Patienten, die kurz zuvor einen akuten Myokardinfarkt erlitten hatten und dadurch in unterschiedlicher Ausprägung einer akuten linksatrialen Druckerhöhung ausgesetzt waren. Dabei stellte sich heraus, dass es in der ersten Woche nach dem Infarkt zu einer Abnahme der Gasdiffusionsleitfähigkeit, also einer Verbreiterung der alveolokapillären Membran kam. Außerdem führte in der gleichen Zeitspanne die pulmonale Perfusion einer relativ geringen Menge physiologischer Kochsalzlösung von 150ml zu einer weiteren Reduktion derselben. Dies deutet auf eine pathologische K_f -Steigerung des Endothels hin. Beide Veränderungen waren binnen einer Woche regredient, was darauf hinweist, dass der endotheliale Schaden durch einen reversiblen Prozess zustande gekommen sein muss und gegen eine beispielsweise durch Fujiwara und Mitarbeiter beobachtete Apoptoseinduktion durch akuten hydrostatischen Stress spricht [104, 105]. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den Studien von Yin und Guazzi kann also eine transiente endotheliale Hyperpermeabilität unter akuter Druckbelastung durch eine Aktivierung und induzierte Expression membranständiger TRPV4-Kanäle erklärt werden, die zu einer vermehrten MLCK-vermittelten Phosphorylierung und Retraktion des endothelialen Zytoskeletts mit parazellulärer Permeabilitätssteigerung führen. Gegenregulierende, protektive Maßnahmen scheinen jedoch ebenfalls rasch aktiv zu werden, da die K_f -Veränderung in den Patienten aus Guazzis Studie nach nur einer Woche wieder regredient war [104].

Ein weiterer endothelialer Faktor, der durch seine bekannten Interaktionen mit Calcium in der Frage der endothelialen Antwort auf hydrostatischen Druck eine wichtige Rolle spielt, ist Stickstoffmonoxid (NO). In Versuchen an isolierten Rattenlungen, die einem hydrostatischen Druck von 15cmH₂O ausgesetzt waren, führte der NO-freisetzende Mediator GSNO zur Reduktion des druckinduzierten K_f -Anstiegs, während der NO-Synthetase Inhibitor L-NAME den Anstieg der endothelialen Permeabilität noch verstärkte. NO scheint also unter hydrostatischem Stress eine protektive Funktion für das vaskuläre Endothel zu übernehmen. Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass NO im Rahmen eines negativen Feedbackmechanismus' den druckinduzierten Calciumeinstrom beschränkt und damit protektiv auf die endotheliale Barrierefunktion wirkt [103]. Stickstoffmonoxid ist ferner ein für uns interessanter endothelialer Faktor, da es mit Caveolen zu interagieren und im Zusammenspiel mit ihnen eine Rolle in der endothelialen Reaktion auf hydrostatischen Stress zu spielen scheint. In Cav-1^{-/-}-Mäusen war die endotheliale NO-Synthetase (eNOS) enthemmt, weswegen mehr NO synthetisiert wurde [106]. Zhao und Malik schlussfolgerten daraus, dass eNOS durch Bindung an Caveolin-1 gehemmt wird.

In Studien an Cav-1-defizienten myokardialen mikrovaskulären Endothelzellen zeigte sich ein weiterer Hinweis darauf, dass Caveolen an der Vermittlung druckinduzierter zellulärer Signale beteiligt zu sein scheinen. Die Arbeitsgruppe stellte hier im Gegensatz zu Zellen, die Cav-1 bilden konnten, eine fehlende zytoskeletäre Reaktion auf eine hydrostatische Druckbelastung fest [107]. Da schon zuvor über eine direkte physikalische Verbindung zwischen Caveolin-1 und dem für das Zytoskelett essentiellen F-Aktin berichtet worden war [108], ergibt sich hier also erneut der Hinweis darauf, dass caveolär angeordnete Proteine an der Signalübertragung an das Zytoskelett maßgeblich beteiligt sind. Die einzige Studie, die nach unserem Wissen einen direkten Zusammenhang zwischen einer hydrostatischen Belastung und der endothelialen Transzytoserate feststellte, war eine fast schon historische Arbeit von 1977 von Westergaard und Mitarbeitern. Hier wurde gezeigt, dass der caveolär transportierte Marker Meerrettichperoxidase, der in cerebrale Gefäße injiziert wurde, unter akutem hydrostatischen Stress vermehrt über einen vesikulären und transzellulären Prozess über das cerebrale Endothel transportiert wurde [109].

Aus unseren IVM-Versuchen können wir zunächst zweifelsfrei ableiten, dass es parallel zur Steigerung des hydrostatischen Stresses auf $10\text{cmH}_2\text{O P}_{\text{LA}}$ und $15\text{cmH}_2\text{O P}_{\text{LA}}$ zu einem Anstieg und zur extravaskulären Verlagerung der Fluoreszenzintensität von FITC-Albumin kam. Im Gegensatz zur thrombininduzierten Umverteilung von FITC-Albumin konnten wir jedoch keine Intensitätsmaxima über den angrenzenden Endothelzellen feststellen. Durch die Druckbelastung verlagerte sich die Fluoreszenzintensität vielmehr nach interstitiell, wie an dem Verlauf der Intensität im Linienprofil in Abbildung 3.9 auf Seite 45 repräsentativ dargestellt wird. In der Elektronenmikroskopie von mit $15\text{cmH}_2\text{O P}_{\text{LA}}$ exponierten Lungen wurde entsprechend sichtbar, dass es nicht nur zu keiner Zunahme goldgebundenen Albumins in Caveolen kam, sondern dass die Anzahl der caveolären Goldpartikel sogar vermindert war. Auf der anderen Seite stieg die relative Anzahl luminaler Goldpartikel. Es lässt sich also schlussfolgern, dass das Endothel die Transzytoserate als Reaktion auf eine hydrostatische Stressbelastung und damit einhergehende erhöhte parazelluläre Permeabilität gemäß dem bereits angesprochenen inversen Zusammenhang zwischen para- und transzellulärer Permeabilität reduziert. Leider konnte in keiner der drei Gruppen interzelluläre Goldpartikel identifiziert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es viele Hinweise auf eine caveoläre Beteiligung bei der Vermittlung der zellulären Antwort auf hydrostatischen Stress gibt. Die zunehmende Albuminpermeabilität unter diesen Bedingungen scheint aber nicht durch einen gesteigerten transzellulären Transport zustande zu kommen, sondern ist vielmehr als Resultat einer vermehrten parazellulären Albuminleakage zu interpretieren. Die Albumintranszytoserate nahm gemäß einer inversen Regulation zwischen para- und transzellulärer Permeabilität ab.

4.4.2. Chronischer hydrostatischer Stress

In der klinischen Medizin ist bekannt, dass Patienten mit einer chronisch bestehenden Herzinsuffizienz bei gleicher linksatrialer Druckbelastung weniger anfällig für die Entstehung eines pulmona-

len Ödems sind als kardial gesunde Patienten [110, 111]. Dies erklärt, warum eine akute hydrostatische Belastung wie beim akuten Myokardinfarkt regelmäßig zur Entstehung pulmonaler Ödeme mit kritischer klinischer Prognose kommt, während Patienten mit chronisch erhöhtem Druck im pulmonalen Kreislauf wie bei einer Mitralstenose unter dieser Belastung quasi asymptomatisch sein können [112].

Mehrere Studien an Tieren und Menschen haben mittlerweile vielfältige pulmonale Adaptationsvorgänge nachgewiesen, die zu dieser vaskulären Druckresistenz beitragen können. Durch chronische Druckbelastung kommt es zur:

- Verbreiterung der kapillären Basalmembran und kapillärer Dilatation, während insgesamt die Gewebisdichte an Kapillaren sinkt,
- Muskularisierung von Arteriolen und Venolen,
- Zunahme des Durchmessers der arteriellen und venösen Intima und Fibrosierung der vaskulären Adventitia,
- Zunahme interstitiellen Gewebes,
- Verbreiterung der alveolären Membran aufgrund von Kollagenablagerungen,
- Anreicherung von kuboiden Progenitor-Epithelzellen,
- Vermehrung von Pneumozyten Typ II,
- Hypertrophie der glatten Bronchialmuskulatur [1].

Diese Veränderungen führen zu einer Reduktion des K_f und wirken der Ausbildung eines pulmonalen Ödems protektiv entgegen. Daher lässt sich in isolierten Lungen von CHI-Tieren erst bei einer deutlich höheren kapillären Druckbelastung ein akutes Lungenödem auslösen als in Kontrolltieren [110, 6]. Die Druckadaptation führt allerdings auch zu einer Verlängerung der Gasdiffusionsstrecke und langfristig zu irreversibler pulmonaler Hypertonie [1].

Konträr zu diesen histologischen Veränderungen stellten De Pasquale und Mitarbeiter in Ratten, die 7 Wochen zuvor durch Ligatur der linken Koronararterie einen akuten Myokardinfarkt erlitten hatten, eine erhöhte Transportrate von ^{125}I -Albumin über der kapillären Gefäßwand und dem alveolären Epithel fest. Dabei stieg in den Tieren, die durch die Operation einen hochgradigen Myokardinfarkt erlitten hatten, der Transport von ^{125}I -Albumin ins extravaskuläre Gewebe von luminal unter Vernachlässigung einer zunehmenden lymphatischen Drainage um 247%. Deshalb konstatierten die Wissenschaftler, dass es trotz der adaptativen strukturellen Veränderungen des Lungenparenchyms zu einem Anstieg der Proteinpermeabilität käme [113]. Diese These unterstützen Beobachtungen an Patienten mit pulmonaler Fibrose, da auch hier die kapilläre Proteinpermeabilität trotz Verbreiterung der alveolokapillären Barriere erhöht ist [114]. Hinweise auf einen Anstieg inflammatorischer Marker in druckexponierten Endothelzellen wie z.B. erhöhtes P-Selectin, vermehrte Einwanderung neutrophiler Granulozyten und eine Zunahme der Myeloperoxidase wurden bereits beschrieben [56, 115]. Eine weitere alternative Erklärung für De Pasquales Ergebnisse lieferte eine Studie von Huang und Mitarbeitern; in ihr wurden Meerschweinchen durch

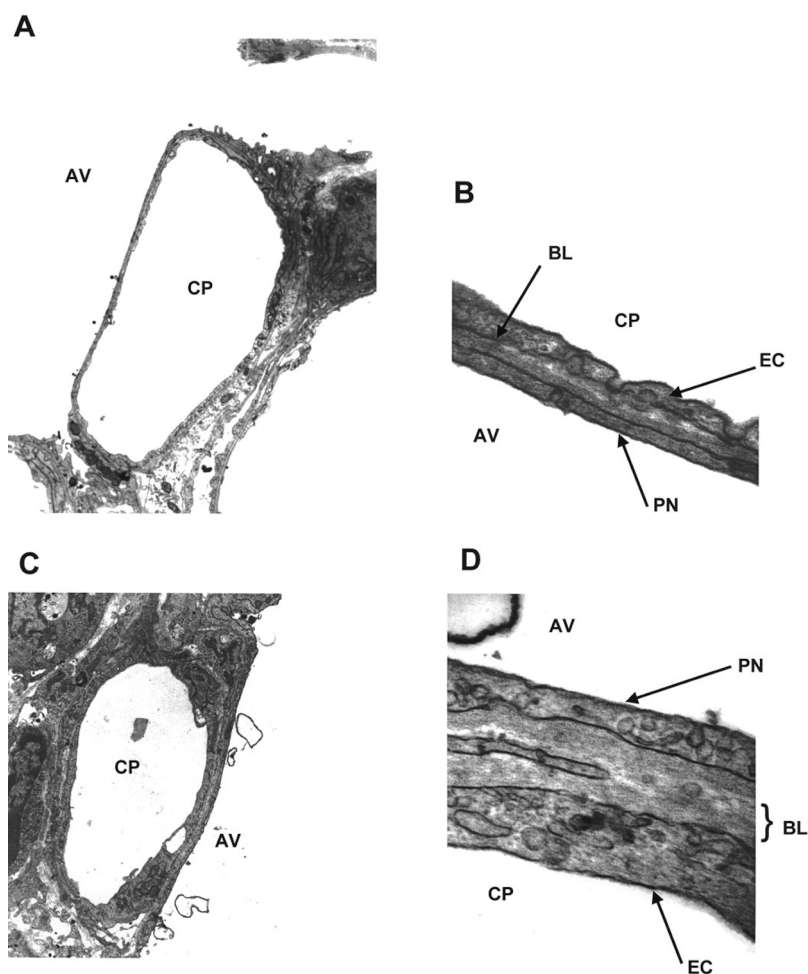


Abbildung 4.1.: Morphologische Unterschiede chronisch druckexponierter Kapillaren. Unstimulierte Kapillaren (CP) von Meerschweinlungen in niedriger (A) und hoher (B) Auflösung im Vergleich zu Kapillaren von über 5 Monate einer chronischen linksatrialen Druckbelastung ausgesetzten Meerschweinlungen in niedriger (C) und hoher (D) Auflösung. Auffällig sind die Verdickung der Basalmembran (BL), die zelluläre Infiltration und die Vergrößerung der Zellen in druckbelasteten Lungen. AV, Alveole; PN, Pneumozyt Typ 1; BL, Basalmembran; CP, Kapillare; EC, Endothelzelle; niedrige Auflösung, x7.625; hohe Auflösung, x76.710, Quelle: Huang W, Kingsbury MP, Turner MA et al.2001[110], mit freundlicher Genehmigung von Cardiovascular Research.

Ligatur der Aorta ascendens einer pulmonalen Druckbelastung ausgesetzt und anschließend Lunge und Herz in unterschiedlichen postoperativen Intervallen untersucht. Dabei stellten die Forscher fest, dass sich K_f abhängig vom postoperativen Zeitintervall änderte. K_f war in den ersten 6 Tagen nach Ligatur leicht erhöht, normalisierte sich um den 58. postoperativen Tag und lag am 150. Tag, den eingangs erwähnten morphologischen Veränderungen entsprechend, sogar deutlich unter dem physiologischen Wert. Entsprechend war auch der Anteil von Flüssigkeit im pulmonalen Gewebe im Gegensatz zu allen anderen Organen 150 Tage nach Operation deutlich vermindert. Somit führten die Adaptationsmechanismen der Lunge nach diesem Zeitraum zu einer effektiven Ödemprävention [110]. Es kann also sein, dass die Beurteilung des ^{125}I -Albumin-Transports am 49. postoperativen Tag schlichtweg in einem noch zu frühen Stadium erfolgte, in dem die struktu-

rellen Adaptationsvorgänge noch nicht voll ausgebildet waren.

Unsere Arbeitsgruppe fasste die zahlreichen zellulären Veränderungen zusammen, zu denen es im pulmonal-mikrovaskulären Endothel unter CHI kommt. Hervorzuheben ist dabei das massive zytoskelettale Remodeling, das mit Veränderungen im NO- und Ca^{2+} -Haushalt zusammenzuhängen scheint. Außerdem beschäftigte sich die Arbeit mit der unterschiedlichen Reaktion auf akute Druckbelastungen in chronisch druckexponierten- gegenüber Kontrollgefäßen. In diesem Zusammenhang wurde ein mangelnder Anstieg zellulären NOs und das Fehlen von Ca^{2+} -Oszillationen sowie eine verminderte Expression der membranständigen Calcium-Kanäle TRPV2 und TRPV4 und damit einhergehende niedrigere $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Level festgestellt [76].

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Model zur Induktion einer chronischen sekundären pulmonalen Hypertonie ist in unserer Arbeitsgruppe etabliert; die entsprechenden Veränderungen der CHI-Tiere wurden von A.Kerem ausgiebig dargestellt und diskutiert [76]. Kerem stellte nach rund 63 Tagen linksatrialer Druckbelastung einen leichten Anstieg des Feucht/Trocken-Verhältnisses im Vergleich zu Kontrolllungen fest ($5,22 \pm 0,02$ vs. $4,75 \pm 0,01$) [76], was zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit passt, in der wir einen leichten Anstieg der FITC/Fura-2 Ratio von $0,38 \pm 0,05$ auf $0,47 \pm 0,1$ feststellten. Das repräsentative Linienprofil in Abbildung 3.11 auf Seite 47 zeigt, dass der leichte Zuwachs der FITC/Fura-2-Ratio nicht durch eine erhöhte Albuminpermeabilität zustande zu kommen scheint. Diese Ergebnisse könnten also als Hinweis darauf gelten, dass es nach der Latenzzeit von 63 Tagen, in Übereinstimmung mit den Daten von Huang und Mitarbeitern[110], schon zu einem teilweise wirksamen protektiven vaskulären Remodeling gekommen ist. Wir fanden keinen Hinweis auf eine erhöhte Transzytoserate zu diesem Zeitpunkt. Interessant wären natürlich Untersuchungen nach einer längeren postoperativen Latenz.

4.5. Die Rolle intrazellulären Calciums in der endothelialen Hyperpermeabilität

Calcium ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff, der zahlreiche zelluläre Funktionen reguliert. Obwohl Calcium essentiell für die Aufrechterhaltung interzellulärer Kontakte ist, führt der Anstieg intrazellulären Calciums auf unphysiologische Werte zur Barrieredysfunktion [116]. Inflammationsmediatoren wie Thrombin steigern *in vitro* die endotheliale Permeabilität durch eine PAR-1 vermittelte Aktivierung des Calciumsignalweges in Endothelzellen. Doch auch in isoliert-perfundierten Lungen wurden intrazelluläre Calciumanstiege beobachtet, trotz fehlender direkter Wirkung auf die endotheliale Albuminpermeabilität [59]. Dabei setzt Thrombin Signalwege in Gang, die zunächst zur Leerung intrazellulärer Calciumspeicher des endoplasmatischen Retikulums (Abbildung 1.5 auf Seite 18) führen und initiiert dadurch im zweiten Schritt den zur Plateauphase führenden Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum durch sogenannte TRP-Kanäle [117, 118].

Caveoläre Membrankompartimente sind überaus reich an Rezeptoren und Kanälen, die mit dem Calciumstoffwechsel in Verbindung stehen: Ca^{2+} -ATPasen, IP_3 -Rezeptoren sowie calciumspe-

zifische TRPC1-Kanälen [119, 120]. Studien zeigten, dass die Bindung von Cav-1 an TRPC1 essentiell für dessen Funktion und Interaktion mit dem IP₃-Rezeptor ist; entsprechend kam es in Endothelzellen von Cav-1^{-/-}-Mäusen zu keinem Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum [121, 122]. Da außerdem feststeht, dass der Calciumsignalweg essentiell an der Regulation endothelialer Permeabilität beteiligt ist, sprechen all diese Erkenntnisse dafür, dass Caveolen eine Schlüsselfunktion an der Weiterleitung von Calciumsignalen und damit der Aufrechterhaltung und auch Zerstörung endothelialer Zellkontakte zukommt.

In den intravitalmikroskopischen Untersuchungen konnten wir durch Berechnungen der Intensitäten des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 bei 340 und 380nm Anregungswellenlänge die Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration der pulmonal-kapillären Endothelzellen unter verschiedenen Stimuli bestimmen. Die basale intrazelluläre Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) lag bei durchschnittlich 22,5nmol/l und stieg durch die Stimulation mit Thrombin auf nahezu 200% des Ausgangswertes, nämlich durchschnittlich 44nmol/l an. Allerdings berichteten Tirupathi und Mitarbeiter von einem noch deutlich größeren Calciumanstieg nach Thrombinstimulation, nämlich auf das 5-10fache [123], wobei diese Werte *in vitro* erreicht wurden. Dieser Calciumanstieg kann zweierlei bedeuten; einerseits lässt die oben genannte morphologische Nachbarschaft zwischen essentiellen Bestandteilen des Calciumsignalweges und Caveolen eine Interaktion vermuten, andererseits führt Thrombin wie wir wissen zu einer vaskulären Kontraktion, die wiederum mit steigenden endothelialen $[Ca^{2+}]_i$ -Werten einhergeht [61].

Wie im Vorfeld beschrieben [79] hatte eine akute hydrostatische Belastung ebenfalls einen steigenden Effekt auf intrazelluläre Calciumwerte. So stellten wir parallel zum Druckanstieg steigende intrazelluläre Calciumkonzentrationen auf 26,5nmol/l bei 10cmH₂O bzw. 38,6nmol/l bei 15cmH₂O fest. Diese Anstiege sind am ehesten im Rahmen einer zellulären Antwort auf Stress zu verstehen, die Signalkaskaden zum Schutz der Zelle in Gang setzt [79].

Zusammenfassend kann man postulieren, dass das intrazelluläre Calcium sowohl unter inflammatorischem- als auch hydrostatischem Stress ansteigt, unabhängig davon, ob der verursachte endotheliale Permeabilitätsanstieg trans- oder parazellulär bedingt ist. Dabei können wir nicht ausschließen, dass der thrombinstimulierte Calciumanstieg allein durch eine endotheliale Kontraktion zustande kommt. Die morphologische Nachbarschaft zwischen Caveolen und Proteinen des Calciumsignalweges legt dabei eine Interaktion durchaus nahe.

4.6. Klinische Wertung der Ergebnisse und Ausblick

Die Frage, ob parazelluläre oder transzelluläre Transportvorgänge an der pulmonalen Albuminhyperpermeabilität unter pathologischen Bedingungen beteiligt sind, ist klinisch besonders im Feld der Intensivmedizin von Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass der Inflammediator Thrombin, der beispielsweise bei Sepsis und ARDS durch eine Initiation der Gerinnungskaskade aktiviert wird, die Rate des transzellulären Proteintransports über pulmonal-

kapillären Endothelzellen steigert. Zwar trägt die Störung interendothelialer Kontakte durch einen Anstieg des hydrostatischen Druckes über eine thrombininduzierte Vasokonstriktion zur pulmonalen Ödemneigung fraglos bei, die Steigerung der Transzytoserate sollte aber ebenfalls Eingang in die pathophysiologischen Vorstellungen in diesem Szenario finden. Weitere Studien sind erforderlich, um eine quantitative Gegenüberstellung beider Prozesse vorzunehmen, und die Transzytose auch in Bezug auf weitere Inflammationsmediatoren zu untersuchen. Bereits zum aktuellen Zeitpunkt finden sich vereinzelte Hinweise dafür, dass es weitere Faktoren gibt, die die endotheliale Albuminpermeabilität über einen Transzytoseanstieg steigern [64, 95].

Die Inhibition der sauren Sphingomyelinase mit darauffolgender Inhibition der gesteigerten Transzytose weist auf einen fein regulierten zellulären Mechanismus hin; ein Umstand, der in Anbetracht der Ödemsuszeptibilität des pulmonalen Parenchyms und der großen Signifikanz einer integren alveolokapillären Diffusionsmembran für den Organismus nicht verwundert. Der Signalweg der sauren Sphingomyelinase scheint hier eine zentrale Rolle zu spielen, der neue pharmakologische Optionen bei der Behandlung des Lungenschadens und -ödems aufzeigt.

Im Gegensatz zum Permeabilitätsödem bestätigen unsere Ergebnisse, dass Albumin unter akutem kapillären Druck, das mikrovaskuläre Gefäßbett tatsächlich durch parazelluläre Spalten zu verlassen scheint. Unter akuter hydrostatischer Belastung war die endotheliale Albuminhyperpermeabilität durch eine Blockade der sauren Sphingomyelinase nicht zu verhindern, sondern scheint durch eine intrazelluläre Calciumsteigerung mit konsekutiver Zytokontraktion und Desintegration interendothelialer Verbindungsproteine von *tight junctions* zustande zu kommen. Erstaunlicher Weise fanden wir sogar Hinweise auf eine im Vergleich zum unstimulierten Endothel reduzierte Transzytoserate, was die These einer inversen Beziehung zwischen para- und transzellulärer Proteinpermeabilität stützt.

Unter chronischer Druckbelastung konnten wir insgesamt kaum eine Steigerung der Proteinpermeabilität feststellen, was wahrscheinlich durch die vielfältigen vaskulären Adaptationsvorgänge bedingt war.

An der bis dato gängigen Definition des Permeabilitätsödems, welches als eine parazelluläre Albuminleakage nach Disruption der Endothelbarriere definiert wird, lassen unsere Ergebnisse somit Zweifel aufkommen. Wir zeigen erstmals, dass eine erhöhte Albuminpermeabilität im kontinuierlichen Endothel per se kein Beweis für eine gestörte parazelluläre Endothelbarriere ist.

5. Literaturverzeichnis

- [1] Kee K, Naughton MT. Heart failure and the lung. *Circ J*, 2010. 74(12):2507–2516.
- [2] Johnson JM. Management of acute cardiogenic pulmonary edema: a literature review. *Adv Emerg Nurs J*, 2009. 31(1):36–43.
- [3] Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, Ford E, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott M, Meigs J, Mozaffarian D, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong N, Wylie-Rosett J, Hong Y. Heart disease and stroke statistics—2009 update a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, 2009. 119(3):480–486.
- [4] Ghio S, Gavazzi A, Campana C, Inserra C, Klersy C, Sebastiani R, Arbustini E, Recusani F, Tavazzi L. Independent and additive prognostic value of right ventricular systolic function and pulmonary artery pressure in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 2001. 37(1):183–188.
- [5] Delgado JF, Conde E, Sánchez V, López-Ríos F, Gómez-Sánchez MA, Escribano P, Sotelo T, de la Cámara AG, Cortina J, Carlos S. Pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension due to chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*, 2005. 7(6):1011–1016.
- [6] Townsley MI, Fu Z, Mathieu-Costello O, West JB. Pulmonary microvascular permeability. Responses to high vascular pressure after induction of pacing-induced heart failure in dogs. *Circ Res*, 1995. 77(2):317–325.
- [7] Miserocchi G, Negrini D, Passi A, De Luca G. Development of lung edema: interstitial fluid dynamics and molecular structure. *News Physiol Sci*, 2001. 16(2):66–71.
- [8] Gluecker T, Capasso P, Schnyder P, Gudinchet F, Schaller MD, Revelly JP, Chiolero R, Vock P, Wicky S. Clinical and radiologic features of pulmonary edema. *Radiographics*, 1999. 19(6):1507–1531.
- [9] Lewandowski K, Lewandowski M. Epidemiology of ARDS. *Minerva Anesthesiol*, 2006. 72(6):473–477.
- [10] Guérin C, Reignier J, Richard J, Beuret P, Gacouin A, Boulain T, Mercier E, Badet M, Mercat A, Baudin O, Clavel M, Chatellier D, Jaber S, Rosselli S, Mancebo J, Sirodot M, Hilbert G, Bengler C, Richecoeur J, Gannier M, Bayle F, Bourdin G, Leray V, Girard R,

- Baboi L, Ayzac L. Prone positioning in severe acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, 2013. 368(23):2159–2168.
- [11] Ranieri V, Rubenfeld G, Thompson B, Ferguson N, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky A. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*, 2012. 307(23):2526–2533.
- [12] Pugin J, Ricou B, Steinberg KP, Suter PM, Martin TR. Proinflammatory activity in bronchoalveolar lavage fluids from patients with ARDS, a prominent role for interleukin-1. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996. 153(6):1850–1856.
- [13] Bellingan G. The pulmonary physician in critical care* 6: The pathogenesis of ALI/ARDS. *Thorax*, 2002. 57(6):540–546.
- [14] Aukland K, Reed R. Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume. *Physiol Rev*, 1993. 73(1):1–78.
- [15] Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stern EJ, Hudson LD. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med*, 2005. 353(16):1685–1693.
- [16] Starling EH. On the absorption of fluids from the connective tissue spaces. *The Journal of physiology*, 1896. 19(4):312–326.
- [17] Kedem O, Katchalsky A. Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes. *Biochem et Biophys Acta*, 1958. 27:229–246.
- [18] Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev*, 2006. 86(1):279–367.
- [19] Curry F, Michel C. A fiber matrix model of capillary permeability. *Microvasc Res*, 1980. 20(1):96–99.
- [20] Forker E, Luxon B. Albumin binding and hepatic uptake: the importance of model selection. *J Pharm Sci*, 1983. 72(10):1232–1233.
- [21] Pardridge WM, Mietus LJ. Transport of steroid hormones through the rat blood-brain barrier: primary role of albumin-bound hormone. *J Clin Invest*, 1979. 64(1):145–154.
- [22] Reed RG, Feldhoff RC, Clute O, Peters Jr T. Fragments of bovine serum albumin produced by limited proteolysis. Conformation and ligand binding. *Biochemistry*, 1975. 14(21):4578–4583.
- [23] Grotte G. Passage of dextran molecules across the blood-lymph barrier. *Acta Chir Scand Suppl*, 1956. 211:1–84.
- [24] Pappenheimer J, Renkin E, Borrero L. Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes. *Am J Physiol*, 1951. 167(1):13–46.
- [25] Rippe B, Rosengren BI, Carlsson O, Venturoli D. Transendothelial transport: the vesicle controversy. *J Vasc Res*, 2002. 39(5):375–390.
- [26] Predescu D, Vogel SM, Malik AB. Functional and morphological studies of protein

- transcytosis in continuous endothelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004. 287(5):L895–L901.
- [27] Milici A, Watrous N, Stukenbrok H, Palade G. Transcytosis of albumin in capillary endothelium. *J Cell Biol*, 1987. 105(6):2603–2612.
- [28] Schnitzer JE, Oh P. Albondin-mediated capillary permeability to albumin. Differential role of receptors in endothelial transcytosis and endocytosis of native and modified albumins. *J Biol Chem*, 1994. 269(8):6072–6082.
- [29] John TA, Vogel SM, Tiruppathi C, Malik AB, Minshall RD. Quantitative analysis of albumin uptake and transport in the rat microvessel endothelial monolayer. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003. 284(1):L187–L196.
- [30] Rutledge JC. Temperature and hydrostatic pressure-dependent pathways of low-density lipoprotein transport across microvascular barrier. *Am J Physiol*, 1992. 262(1 Pt 2):H234–H245.
- [31] Simionescu M, Simionescu N. Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis. A look from cell biology. *Cell Biol Rev*, 1990. 25(1):5–78.
- [32] Palade GE. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem*, 1953. 1(4):188–211.
- [33] Simionescu M, Simionescu N, Palade GE. Morphometric data on the endothelium of blood capillaries. *J Cell Biol*, 1974. 60(1):128–152.
- [34] Bruns RR, Palade GE. Studies on blood capillaries. I. General organization of blood capillaries in muscle. *J Cell Biol*, 1968. 37(2):244–276.
- [35] Wagner RC, Casley-Smith JR. Endothelial vesicles. *Microvasc Res*, 1981. 21(3):267–298.
- [36] Tuma PL, Hubbard AL. Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev*, 2003. 83(3):871–932.
- [37] Predescu D, Palade GE. Plasmalemmal vesicles represent the large pore system of continuous microvascular endothelium. *Am J Physiol*, 1993. 265:H725–H733.
- [38] Chun M, Liyanage UK, Lisanti MP, Lodish HF. Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(24):11728–11732.
- [39] Li S, Song KS, Koh SS, Kikuchi A, Lisanti MP. Baculovirus-based expression of mammalian caveolin in Sf21 insect cells. A model system for the biochemical and morphological study of caveolae biogenesis. *J Biol Chem*, 1996. 271(45):28647–28654.
- [40] Simionescu M, Popov D, Sima A. Endothelial transcytosis in health and disease. *Cell Tissue Res*, 2009. 335(1):27–40.
- [41] Minshall RD, Tiruppathi C, Vogel SM, Malik AB. Vesicle formation and trafficking in endothelial cells and regulation of endothelial barrier function. *Histochem Cell Biol*, 2002. 117(2):105–112.

- [42] Igishi T, Gutkind JS. Tyrosine kinases of the Src family participate in signaling to MAP kinase from both Gq and Gi-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. 244(1):5–10.
- [43] Minshall RD, Tiruppathi C, Vogel SM, Niles WD, Gilchrist A, Hamm HE, Malik AB. Endothelial cell-surface gp60 activates vesicle formation and trafficking via Gi-coupled Src kinase signaling pathway. *J Cell Biol*, 2000. 150(5):1057–1070.
- [44] Cao H, Courchesne WE, Mastick CC. A phosphotyrosine-dependent protein interaction screen reveals a role for phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14 recruitment of C-terminal Src kinase. *J Biol Chem*, 2002. 277(11):8771–8774.
- [45] Tiruppathi C, Song W, Bergenfeldt M, Sass P, Malik AB. Gp60 activation mediates albumin transcytosis in endothelial cells by tyrosine kinase-dependent pathway. *J Biol Chem*, 1997. 272(41):25968–25975.
- [46] Razani B, Wang XB, Engelman JA, Battista M, Lagaud G, Zhang XL, Kneitz B, Hou H, Christ GJ, Edelmann W, Lisanti MP. Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol Biol Cell*, 2002. 22(7):2329–2344.
- [47] Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG. De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(19):8655–8659.
- [48] Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia T. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science*, 2001. 293(5539):2449–2452.
- [49] Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, Marks CB, Macaluso F, Russell RG, Li M, Pestell RG, Di Vizio D, Hou HJ, Kneitz B, Lagaud G, Christ G, Edelmann W, Lisanti M. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem*, 2001. 276(41):38121–38138.
- [50] Schubert W, Frank PG, Razani B, Park DS, Chow CW, Lisanti MP. Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *J Biol Chem*, 2001. 276(52):48619–48622.
- [51] Warnock DE, Hinshaw JE, Schmid SL. Dynamin self-assembly stimulates its GTPase activity. *J Biol Chem*, 1996. 271(37):22310–22314.
- [52] Whiteheart SW, Matveeva EA. Multiple binding proteins suggest diverse functions for the N-ethylmaleimide sensitive factor. *J Struct Biol*, 2004. 146(1):32–43.
- [53] McIntosh DP, Schnitzer JE. Caveolae require intact VAMP for targeted transport in vascular endothelium. *Am J Physiol*, 1999. 277(6):H2222–H2232.
- [54] Vandenbroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB. Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. 1123(1):134–145.

- [55] Murphy JT, Duffy SL, Hybki DL, Kamm K. Thrombin-mediated permeability of human microvascular pulmonary endothelial cells is calcium dependent. *J Trauma*, 2001. 50(2):213–222.
- [56] Kuebler WM, Ying X, Singh B, Issekutz AC, Bhattacharya J. Pressure is proinflammatory in lung venular capillaries. *J Clin Invest*, 1999. 104(4):495–502.
- [57] Lum H, Malik AB. Mechanisms of increased endothelial permeability. *Can J Physiol Pharmacol*, 1996. 74(7):787–800.
- [58] Lum H, Malik A. Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am J Physiol*, 1994. 267(3):L223–L241.
- [59] Uhlig S, Yang Y, Waade J, Wittenberg C, Babendreyer A, Kuebler WM. Differential regulation of lung endothelial permeability in vitro and in situ. *Cell Physiol Biochem*, 2013. 34(1):1–19.
- [60] Waypa GB, Vincent PA, Morton CA, Minnear FL. Thrombin increases fluid flux in isolated rat lungs by a hemodynamic and not a permeability mechanism. *J Appl Physiol*, 1996. 80(4):1197–1204.
- [61] Horgan M, Fenton J, Malik A. Alpha-thrombin-induced pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol*, 1987. 63(5):1993–2000.
- [62] Tinsley JH, Ustinova EE, Xu W, Yuan SY. Src-dependent, neutrophil-mediated vascular hyperpermeability and beta-catenin modification. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. 283(6):C1745–C1751.
- [63] Childs EW, Udobi KF, Hunter FA, Dhevan V. Evidence of transcellular albumin transport after hemorrhagic shock. *Shock*, 2005. 23(6):565–570.
- [64] Heckel K, Kiefmann R, Doerger M, Stoeckelhuber M, Goetz AE. Colloidal gold particles as a new in vivo marker of early acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004. 287(4):L867–L878.
- [65] Hashizume K, Black KL. Increased endothelial vesicular transport correlates with increased blood-tumor barrier permeability induced by bradykinin and leukotriene C4. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2002. 61(8):725–735.
- [66] Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 1997. 387(6633):569–572.
- [67] Hannun Y, Loomis C, Merrill A, Bell R. Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *J Biol Chem*, 1986. 261(27):12604–12609.
- [68] Samet D, Barenholz Y. Characterization of acidic and neutral sphingomyelinase activities in crude extracts of HL-60 cells. *Chem Phys Lipids*, 1999. 102(1):65–77.
- [69] Goñi FM, Alonso A. Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. *FEBS Lett*, 2002. 531(1):38–46.

- [70] Gulbins E, Li PL. Physiological and pathophysiological aspects of ceramide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006. 290(1):R11–R26.
- [71] Liu P, Anderson RG. Compartmentalized production of ceramide at the cell surface. *J Biol Chem*, 1995. 270(45):27179–27185.
- [72] Haraldsson B, Rippe B. Orosomuroid as one of the serum components contributing to normal capillary permselectivity in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*, 1987. 129(1):127–135.
- [73] Tsien R, Rink T, Poenie M. Measurement of cytosolic free Ca^{2+} in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell calcium*, 1985. 6(1):145–157.
- [74] Slot JW, Geuze HJ. A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. *Eur J Cell Biol*, 1985. 38(1):87–93.
- [75] Albouz S, Le Saux F, Wenger D, Hauw J, Baumann N. Modifications of sphingomyelin and phosphatidylcholine metabolism by tricyclic antidepressants and phenothiazines. *Life Sci*, 1986. 38(4):357–363.
- [76] Kerem A, Yin J, Kaestle SM, Hoffmann J, Schoene AM, Singh B, Kuppe H, Borst MM, Kuebler WM. Lung endothelial dysfunction in congestive heart failure: Role of impaired Ca^{2+} signaling and cytoskeletal reorganization. *Circ Res*, 2010. 106(6):1103–1116.
- [77] Ying X, Minamiya Y, Fu C, Bhattacharya J. Ca^{2+} waves in lung capillary endothelium. *Circ Res*, 1996. 79(4):898–908.
- [78] Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 1985. 260(6):3440–3450.
- [79] Kuebler WM, Ying X, Bhattacharya J. Pressure-induced endothelial Ca^{2+} oscillations in lung capillaries. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002. 282(5):L917–L923.
- [80] Zollinger H. Zur Technik der intravitalen Phasenmikroskopie. *Experientia*, 1952. 8(2):78–79.
- [81] Parker JC, Townsley MI. Evaluation of lung injury in rats and mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004. 286(2):L231–L246.
- [82] Patton RL, Metcalf RL. The demonstration of the protozoan parasite of quail malaria by fluorescence microscopy. *Science*, 1943. 98:184.
- [83] Tsukada H, Ying X, Fu C, Ishikawa S, McKeown-Longo P, Albelda S, Bhattacharya S, Bray BA, Bhattacharya J. Ligation of endothelial $\alpha_v\beta_3$ integrin increases capillary hydraulic conductivity of rat lung. *Circ Res*, 1995. 77(4):651–659.
- [84] Wu NZ, Klitzman B, Rosner G, Needham D, Dewhirst MW. Measurement of material extravasation in microvascular networks using fluorescence video-microscopy. *Microvasc Res*, 1993. 46(2):231–253.

- [85] Galis Z, Ghitescu L, Simionescu M. Fatty acids binding to albumin increases its uptake and transcytosis by the lung capillary endothelium. *Eur J Cell Biol*, 1988. 47(2):358–365.
- [86] Schnitzer J, Bravo J. High affinity binding, endocytosis, and degradation of conformationally modified albumins. Potential role of gp30 and gp18 as novel scavenger receptors. *J Biol Chem*, 1993. 268(10):7562–7570.
- [87] Rippe B, Taylor A. NEM and filipin increase albumin transport in lung microvessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. 280(1):H34–H41.
- [88] Descamps L, Dehouck MP, Torpier G, Cecchelli R. Receptor-mediated transcytosis of transferrin through blood-brain barrier endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 1996. 270(4):H1149–H1158.
- [89] Wagner RC, Chen SC. Transcapillary transport of solute by the endothelial vesicular system: evidence from thin serial section analysis. *Microvasc Res*, 1991. 42(2):139–150.
- [90] Ghitescu L, Fixman A, Simionescu M, Simionescu N. Specific binding sites for albumin restricted to plasmalemmal vesicles of continuous capillary endothelium: receptor-mediated transcytosis. *J Cell Biol*, 1986. 102(4):1304–1311.
- [91] Oh P, Borgström P, Witkiewicz H, Li Y, Borgström BJ, Chrastina A, Iwata K, Zinn KR, Baldwin R, Testa JE, Schnitzer JE. Live dynamic imaging of caveolae pumping targeted antibody rapidly and specifically across endothelium in the lung. *Nat Biotechnol*, 2007. 25(3):327–337.
- [92] Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol*, 1994. 127(5):1217–1232.
- [93] Predescu D, Horvat R, Predescu S, Palade G. Transcytosis in the continuous endothelium of the myocardial microvasculature is inhibited by N-ethylmaleimide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(8):3014–3018.
- [94] Armstrong S, Khajoe V, Wang C, Wang T, Tigdi J, Yin J, Kuebler WM, Gillrie M, Davis S, Ho M, Lee WL. Co-regulation of transcellular and paracellular leak across microvascular endothelium by dynamin and Rac. *Am J Pathol*, 2012. 180:1308–1323.
- [95] Pietra G, Johns L. Confocal-and electron-microscopic localization of FITC-albumin in H₂O₂-induced pulmonary edema. *J Appl Physiol*, 1996. 80(1):182–190.
- [96] Delogu G, Famularo G, Amati F, Signore L, Antonucci A, Trinchieri V, Di Marzio L, Cifone MG. Ceramide concentrations in septic patients: a possible marker of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med*, 1999. 27(11):2413–2417.
- [97] von Bismarck P, García Wistädt CF, Klemm K, Winoto-Morbach S, Uhlig U, Schutze S, Adam D, Lachmann B, Uhlig S, Krause MF. Improved pulmonary function by acid sphingomyelinase inhibition in a newborn piglet lavage model. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008. 177(11):1233–1241.

- [98] Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C, Bayoumy S, Garzotto M, McLoughlin M, Gallily R, Edwards CK, Schuchman EH, Fuks Z, Kolesnick R. Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation. *J Exp Med*, 1997. 186(11):1831–1841.
- [99] Yang Y, Yin J, Baumgartner W, Samapati R, Solymosi EA, Reppien E, Kuebler WM, Uhlig S. Platelet-activating factor reduces endothelial nitric oxide production: role of acid sphingomyelinase. *Eur Resp J*, 2010. 36(2):417–427.
- [100] Schenck M, Carpinteiro A, Grassmé H, Lang F, Gulbins E. Ceramide: physiological and pathophysiological aspects. *Arch Biochem Biophys*, 2007. 462(2):171–175.
- [101] Parker JC, Ivey CL. Isoproterenol attenuates high vascular pressure-induced permeability increases in isolated rat lungs. *J Appl Physiol*, 1997. 83(6):1962–1967.
- [102] Kuebler WM, Parthasarathi K, Lindert J, Bhattacharya J. Real-time lung microscopy. *J Appl Physiol*, 2007. 102(3):1255–1264.
- [103] Yin J, Hoffmann J, Kaestle SM, Neye N, Wang L, Baeurle J, Liedtke W, Wu S, Kuppe H, Pries AR, Kuebler WM. Negative-feedback loop attenuates hydrostatic lung edema via a cGMP-dependent regulation of transient receptor potential vanilloid 4. *Circ Res*, 2008. 102(8):966–974.
- [104] Guazzi M, Arena R, Guazzi MD. Evolving changes in lung interstitial fluid content after acute myocardial infarction: mechanisms and pathophysiological correlates. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. 294(3):H1357–H1364.
- [105] Gotoh N, Kambara K, Jiang XW, Ohno M, Emura S, Fujiwara T, Fujiwara H. Apoptosis in microvascular endothelial cells of perfused rabbit lungs with acute hydrostatic edema. *J Appl Physiol*, 2000. 88(2):518–526.
- [106] Zhao YY, Malik AB. A novel insight into the mechanism of pulmonary hypertension involving caveolin-1 deficiency and endothelial nitric oxide synthase activation. *Trends Cardiovasc Med*, 2009. 19(7):238–242.
- [107] Müller-Marschhausen K, Waschke J, Drenckhahn D. Physiological hydrostatic pressure protects endothelial monolayer integrity. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008. 294(1):C324–C332.
- [108] Stahlhut M, van Deurs B. Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell*, 2000. 11(1):325–337.
- [109] Westergaard E, Van Deurs B, Brøndsted H. Increased vesicular transfer of horseradish peroxidase across cerebral endothelium, evoked by acute hypertension. *Acta Neuropathol*, 1977. 37(2):141–152.
- [110] Huang W, Kingsbury MP, Turner MA, Donnelly JL, Flores NA, Sheridan DJ. Capillary filtration is reduced in lungs adapted to chronic heart failure: morphological and haemodynamic correlates. *Cardiovasc Res*, 2001. 49(1):207–217.

- [111] Davies SW, Bailey J, Keegan J, Balcon R, Rudd RM, Lipkin DP. Reduced pulmonary microvascular permeability in severe chronic left heart failure. *Am Heart J*, 1992. 124(1):137–142.
- [112] Lassers BW, George M, Anderton JL, Higgins MR, Philp T. Left ventricular failure in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 1970. 25(5):511–522.
- [113] De Pasquale CG, Bersten AD, Doyle IR, Aylward PE, Arnold LF. Infarct-induced chronic heart failure increases bidirectional protein movement across the alveolocapillary barrier. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 284(6):H2136–H2145.
- [114] Harrison N, Glanville A, Strickland B, Haslam P, Corrin B, Addis B, Lawrence R, Millar A, Black C, Turner-Warwick M. Pulmonary involvement in systemic sclerosis: the detection of early changes by thin section CT scan, bronchoalveolar lavage and 99m Tc-DTPA clearance. *Respir Med*, 1989. 83(5):403–414.
- [115] Ichimura H, Parthasarathi K, Issekutz AC, Bhattacharya J. Pressure-induced leukocyte margination in lung postcapillary venules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005. 289(3):L407–L412.
- [116] Tiruppathi C, Minshall RD, Paria BC, Vogel SM, Malik AB. Role of Ca²⁺ signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol*, 2002. 39(4):173–185.
- [117] Putney JW. TRP, inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors, and capacitative calcium entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(26):14669–14671.
- [118] Freichel M, Schweig U, Stauffenberger S, Freise D, Schorb W, Flockerzi V. Store-operated cation channels in the heart and cells of the cardiovascular system. *Cell Physiol Biochem*, 1999. 9(4-5):270–283.
- [119] Lockwich TP, Liu X, Singh BB, Jadowiec J, Weiland S, Ambudkar IS. Assembly of Trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains. *J Biol Chem*, 2000. 275(16):11934–11942.
- [120] Stan RV, Roberts WG, Predescu D, Ihida K, Saucan L, Ghitescu L, Palade G. Immunolocalization and partial characterization of endothelial plasmalemmal vesicles (caveolae). *Mol Biol Cell*, 1997. 8(4):595–605.
- [121] Sundivakkam PC, Kwiatek AM, Sharma TT, Minshall RD, Malik AB, Tiruppathi C. Caveolin-1 scaffold domain interacts with TRPC1 and IP3R3 to regulate Ca²⁺ store release-induced Ca²⁺ entry in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. 296(3):C403–C413.
- [122] Murata T, Lin MI, Stan RV, Bauer PM, Yu J, Sessa WC. Genetic evidence supporting caveolae microdomain regulation of calcium entry in endothelial cells. *J Biol Chem*, 2007. 282(22):16631–16643.
- [123] Tiruppathi C, Ahmed GU, Vogel SM, Malik AB. Ca²⁺ signaling, TRP channels, and endothelial permeability. *Microcirculation*, 2006. 13(8):693–708.

6. Abkürzungsverzeichnis

Π_{is}	interstitieller osmotischer Druck
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläres Calcium
Π_{ka}	kapillärer osmotischer Druck
σ	osmotischer Reflexionskoeffizient
^{125}I -Albumin	mit radioaktivem Iod markiertes Albumin
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym
ADNP	dinitrophenyliertes Albumin
ARDS	akutes progressives Lungenversagen
ASM	saure Sphingomyelinase
ATP	Adenosintriphosphat
BPAE	pulmonal-arterielle Endothelzellen vom Kalb
BSA	Serumalbumin vom Kalb
Ca^{2+}	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cav-1	Caveolin-1
Cav-1 ^{-/-}	Caveolin-1 knockout
CHI	Chronische Linksherzinsuffizienz
cMD	caveoläre Zellmembrandomänen
Da	Dalton
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
eNOS	endotheliale NO-Synthetase
FE	Fluoreszenzeinheiten
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Fura-2AM	Fura-2-acetoxymethylester
Gp60	60kDa großes albuminbindendes Glykoprotein
GSNO	S-Nitrosoglutathion
GTP	Guanosintriphosphat

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMVEC-L	humane pulmonal-mikrovaskuläre Endothelzellen
ICR	Interkostalraum
Imi	Imipramin
IP ₃	Inositoltriphosphat
IVM	Intravitalmikroskopie
J _v	Flüssigkeitsübertritt von Kapillare ins Interstitium
K _f	Filtrationskoeffizient
L-NAME	N-Nitro-L-Argininmethylester
LPS	Lipopolysaccharid
M	molare Masse
MLC	Myosinleichtkette
NEM	N-Ethylmaleimid
NSF	N-Ethylmaleimid-sensibler Faktor
P _{is}	interstitieller hydrostatischer Druck
P _{ka}	kapillärer hydrostatischer Druck
P _{LA}	linksatrialer Druck
P _{PA}	pulmonalarterieller Druck
PAF	plättchenaktivierender Faktor
PAR-1	proteinaseaktivierter Rezeptor-1
RhoA	Mitglied A der Ras-homologen Genfamilie
SNARE	Bindungsprotein des löslichen N-Ethylmaleimid-sensiblen Faktors
Src	eine protoonkogene Tyrosinkinase
t-SNAREs	Bindungsprotein des löslichen N-Ethylmaleimid-sensiblen Faktors der Zielmembran
TRPC	membranständiger Calciumkanal der TRPC-Familie
TRPV	membranständiger Calciumkanal der TRPV-Familie
v-SNAREs	Bindungsprotein des löslichen N-Ethylmaleimid-sensiblen Faktors der Caveole
vs.	versus
VVO	Vesikel-Vakuolen-Organell
Y27632	Inhibitor der Rhokinase C

A. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Claudia Wittenberg, geb.Scheffler, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „**Inflammatorischer Stress induziert die endotheliale Transzytose pulmonaler Kapillaren über den Signalweg der sauren Sphingomyelinase**“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

B. Anteilserklärung an erfolgter Publikation

Claudia Wittenberg hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Uhlig S, Yang Y, Waade J, Wittenberg C, Babendreyer A, Kuebler WM. Differential regulation of lung endothelial permeability *in vitro* and *in situ*. *Cell Physiol Biochem*. 2014;34(1):1-19.

Beitrag im Einzelnen: Frau Wittenberg hat einen Teil der in dieser Publikation dargestellten Daten (Fig. 3) generiert, und war an der Erstellung des Manuskripts beteiligt. Insgesamt beträgt ihr Anteil an der Publikation ca. 20%.

C. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

D. Publikationsliste

Posterpräsentation auf dem Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft: „Acid sphingomyelinase regulates endothelial albumin transcytosis in intact rat lungs“, Hannover, 2007.

Uhlig S, Yang Y, Waade J, Wittenberg C, Babendreyer A, Kuebler WM. Differential regulation of lung endothelial permeability *in vitro* and *in situ*. *Cell Physiol Biochem*. 2014;34(1):1-19.

in preparation: Wittenberg C, Kuebler WM, Reppien E, Kaestle SM, Lindner K, Winoto-Morbach S, Drab M, Mühlfeld C, Dombrowsky H, Ochs M, Schütze S and Uhlig S. Thrombin stimulates albumin transcytosis in lung microvascular endothelial cells via activation of acid sphingomyelinase.

E. Danksagung

Ich möchte Herrn Prof W.M.Kuebler für die Vergabe des Themas und die stets freundliche und konstruktive Betreuung danken, sowie musikalischen Austausch.

Meinen Koooperationspartnern, Herrn Prof.S.Uhlig in Aachen und Herrn Prof.C.Mühlfeld in Gießen, danke ich für die *in vitro* - bzw.elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Meinen Eltern, Ursula und Rolf Scheffler, gilt mein besonderer Dank für ihre große Geduld und Unterstützung über die Jahre bis zur Fertigstellung der Arbeit.

Für Krisenmanagement und Perspektivwechsel danke ich meinen Studienfreundinnen Nora Jahn, Katharina Kowalczyk, Lena-Maria Goldhahn und Anna Thormann sowie Julia Hoffmann und Rudi Samapati.

Zuletzt geht mein Dank an meinen Ehemann, Carsten Wittenberg, für seine praktische Hilfe, Geduld und letzten Motivationsschub.