Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie

Zentrum für Anästhesiologie und Intensivmedizin

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. Alwin E. Goetz

Analyse der Rolle von Heparansulfat bei der H_2O_2-induzierten endothelialen Signaltransduktion in humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Katharina-Juliane Kirsche

aus Uelzen

Hamburg 2014

Die vorliegende Dissertation wurde durch das Werner-Otto-Stipendium gefördert.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 04.03.2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg:

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. A. E. Goetz

Prüfungsausschuss: Zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. M. Bockelmann

Prüfungsausschuss: Dritter Gutachter: PD Dr. med. S. Kluge

Meiner Familie

Out of the night that covers me,
Black as the pit from pole to pole,
I thank whatever gods may be
For my unconquerable soul.

In the fell clutch of circumstance
I have not winced nor cried aloud.
Under the bludgeonings of chance
My head is bloody, but unbowed.

Beyond this place of wrath and tears
Looms but the Horror of the shade,
And yet the menace of the years
Finds and shall find me unafraid.

It matters not how strait the gate,
How charged with punishments the scroll.
I am the master of my fate:
I am the captain of my soul.

William Ernest Henley

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 Der akute Lungenschaden 1

1.2 Pathogenese des akuten Lungenschadens 2

1.3 Produktion von Radikalen 4

1.4 Allgemeines zur Glykokalyx 5

1.5 Aufbau der Glykokalyx 6

1.6 Das Heparansulfat 8

1.7 Der CD44-Rezeptor 9

1.8 Die Rolle des Kalziums 9

1.9 Zielsetzung und Fragestellung 11

2. Material und Methoden 12

2.1 Zellkultur 12

2.1.1 Zelllinie 12

2.1.2 Zellkultivierung 14

2.2 Fluoreszenzmikroskopie 15

2.2.1 Ca^{2+} - Messungen 19

2.3 RNA-Isolation, cDNA-Synthese und rt-PCR 21

2.3.1 RNA-Isolation 25

2.3.2 Bestimmung der RNA-Konzentration und cDNA-Synthese 26

2.3.3 rt-PCR 27

2.4 Endothelzellstimulation 28

2.4.1 HPMEC-Stimulation über eine Stunde mit H_2O_2 30

2.5 H_2O_2-Assay 31

2.6 Einschlusskriterien 34

2.7 Versuchsprotokolle für die Messung des intrazellulären Ca^{2+} 35

2.7.1 H_2O_2 - Stimulation 35

2.7.2 Ca^{2+} - Messungen unter Kontrollbedingungen 35

2.7.3 Heparinase III - Applikation 36

2.7.4 Heparinase III Applikation vor H_2O_2 - Stimulation 37

2.7.5 Heparansulfat - Applikation 37

2.7.6 Anti CD44-Antikörper Applikation vor H_2O_2 - Stimulation 38

2.7.7 HPMEC-Stimulation über eine Stunde mit H_2O_2 39

2.7.8 HPMEC-Stimulation über eine Stunde mit H_2O_2, nach Vorinkubation mit einem Anti CD44-Antikörper 40

2.8 Applizierte Substanzen 41

2.8.1 Heparansulfat 41

2.8.2 Heparinase III 41

2.8.3 Mouse Anti-Human CD44 Monoclonal Antibody, Clone B-F24 41

3. Statistik 42

4. Ergebnisse 43

4.1 Fluoreszenzmikroskopie 43

4.1.1 Ca^{2+} - Messungen unter Kontrollbedingungen und nach H_2O_2-Stimulation . 44

4.1.2 Exemplarische Ca^{2+}-Messung zur Dosisfindung, mit Einzelwertdarstellung 45

4.1.3 Versuche zur Dosisfindung 46

4.1.4 Ca^{2+} – Messung nach Heparinase III Applikation, nach Vorinkubation mit Heparinase III und anschließender Stimulation mit 400 µM H_2O_2, sowie nach Applikation von Heparansulfat 48

4.1.5 Ca^{2+} – Messung nach Vorinkubation mit dem Anti CD44-Antikörper, Klon B-F24 und Stimulation mit 400 µM H_2O_2 49

4.1.6 Intergruppenvergleich 50

4.2 HPMEC-Genexpression nach H_2O_2-Stimulation über eine Stunde 51

4.2.1 GAPDH 51

4.2.2 CD44 52

4.2.3 iNOS 53

4.3 H_2O_2-Assay 54

5. Diskussion 55

5.2 Diskussion der Methodik 55

5.2.1 Humane pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen 55

5.2.2 Fluoreszenzmikroskopie 56

5.2.3 Molekularbiologie 58

5.3 Die Glykokalyx und das Heparansulfat 59

5.4 Rolle und Funktion der Heparinase III 60

5.5 Der CD44-Rezeptor 62

5.6 Reaktive Sauerstoff-Moleküle und Radikale 65

5.7 Bedeutung des H_2O_2 68

5.8 Bedeutung der Antioxidantien 72

6. Zusammenfassung 74

7. Literatur 77

8. Danksagung 101

9. Eidesstattliche Versicherung 102

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AK	Antikörper
ALI	*acute lung injury*
ARDS	*adult respiratory distress syndrome*
ATP	Adenosintriphosphat
BL	Baseline
BSA	*bovine serum albumin*
°C	Temperatur in Celsius
Ca^{2+}	Kalzium-Ionen
CaM	Calmodulin
CD	*cluster of differentiation*
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm^2	Quadratzentimeter
CO_2	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Enzym
CS	Chondroitin-/Dermatansulfat
Cys	Cystein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
EC	Endothelzelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fe^{2+}	Eisen-Ionen

FBS	*fetales bovines serum*
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
GPx	Glutathion-Peroxidase
GSH	Glutathion
GS-SH	Glutathion-Dislufid
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HA	Hyaluronsäure
Hep III	Heparinase III
HPMEC	Humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen
HS	Heparansulfat
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
eR	endoplasmatisches Retikulum
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP_3R	Inositol-1,4,5-Triphosphat
LOX	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid entspricht Endotoxin
mA	Milliampere
MAPK	*mitogen-activated protein kinase*
min	Minute
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

µM	mikromolar
µmol	mikromol
µm	Mikrometer
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	*messenger* Ribonukleinsäure
mU	*milliunit*
n	Anzahl
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF- κB	*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer*
nm	Nanometer
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NOX	NADPH-Oxidase
O_2	Sauerstoff
$O_2^{\bullet-}$	Superoxid
$OH^{\bullet}$	Hydroxyl-Radikal
OH^{-}	Hydroxid-Ion
$ONOO^{-}$	Peroxinitrit
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction
PKC	Proteinkinase C
PIP_2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
Prx	Peroxiredoxin

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	*reactive oxygen species*
rt-PCR	*reverse transcriptase polymerase chain reaction*
RyR	Ryanodin-Rezeptor
Sec	Sekunde
SEM	*standard error of the mean*
sGC	*soluble guanylate cyclase*
SOD	Superoxid-Dismutase
Std	Stunden
t	Zeit
TNF	Tumor Nekrose Faktor
U	*unit*
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VF	Verdünnungsfaktor
W	Watt
XO	Xanthin-Oxidase
ZS	Zellsuspension

Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen und Protokolle

Abbildung 1-1 Schematische Darstellung der Pathogenese des akuten Lungenschadens 2

Abbildung 1-2 Schematische Darstellung der Glykokalyx 7

Abbildung 1-3 Schematische Darstellung der Arbeitshypothese der vorliegenden Arbeit 11

Abbildung 2-1 Versuchsaufbau des Fluoreszenzmikroskops 19

Abbildung 2-2 Versuchsanordnung der einstündigen Stimulation mit 100 und 800 µM H_2O_2 30

Abbildung 2-3 Versuchsanordnung der einstündigen Stimulation mit 100 und 800 µM H_2O_2 nach Vorinkubation mit einem Anti CD44-Antikörper 30

Abbildung 2-4 Originalabbildung der Versuchsanordnung einer 96-Wellplatte für den H_2O_2-Assay 33

Abbildung 4-1 Floureszenzmikroskopische Aufnahmen 44

Abbildung 4-2 Exemplarische Darstellung eines einzelnen Versuchs zur Dosisfindung nach Stimulation mit 400 µM H_2O_2 45

Abbildung 4-3 a Zusammenfassung der Dosisfindung 46

Abbildung 4-3 b Keine Stimulation von HPMEC 47

Abbildung 4-3 c Stimulation mit 50 µM H_2O_2 47

Abbildung 4-3 d Stimulation mit 100 µM H_2O_2 47

Abbildung 4-3 e Stimulation mit 200 µM H_2O_2 47

Abbildung 4-3 f Stimulation mit 400 µM H_2O_2 45

Abbildung 4-3 g Stimulation mit 800 µM H_2O_2 47

Abbildung 4-3 h Stimulation mit 1200 µM H_2O_2 47

Abbildung 4-4 a Stimulation mit Heparansulfat 48

Abbildung 4-4 b Stimulation mit Heparinase III 48

Abbildung 4-4 c Vorinkubation mit Heparinase III und anschließende Stimualtion mit 400 µM H_2O_2 48

Abbildung 4-5 a Stimulation mit dem Anti CD44-Antikörper, Klon B-F24. 49

Abbildung 4-5 b Vorinkubation mit dem Anti CD44-Antikörper, Klon B-F24 und anschließender Stimulation mit 400 µM H_2O_2 49

Abbildung 4-5 c Intergruppenvergleich 50

Abbildung 4-6 GAPDH-Genexpression nach HPMEC-Stimulation über eine Stunde 51

Abbildung 4-7 CD44-Genexpression nach HPMEC -Stimulation über eine Stunde 52

Abbildung 4-8 iNOS-Genexpression nach HPMEC-Stimulation über eine Stunde **53**

Abbildung 4-9 Auswertung des H_2O_2-Assays **54**

Abbildung 5-1 Zusammenspiel von ROS und Ca^{2+} **57**

Abbildung 5-2 Das "Sandwich-Modell" **63**

Abbildung 5-3 Signalwege der ROS-Formationen **66**

Abbildung 5-4 Modell der H_2O_2-Elemination **70**

Tabelle 1 Ansatz des HBS Puffers **18**

Tabelle 2 Ansatz des Tris Puffers **18**

Tabelle 3 Ansatz des cDNA Synthese-Mixes **23**

Tabelle 4 Ansatz der PCR-Reagenz **24**

Tabelle 5 PCR-Programme **27**

Protokoll 1 H_2O_2 – Stimulation **35**

Protokoll 2 Ca^{2+} - Messungen unter Kontrollbedingungen **35**

Protokoll 3 Heparinase III – Applikation **366**

Protokoll 4 Heparinase III Applikation und anschließende H_2O_2 – Stimulation **377**

Protokoll 5 Heparansulfat – Applikation **377**

Protokoll 6 Anti CD44-Antikörper - Applikation vor H_2O_2 – Stimulation **38**

Protokoll 7 HPMEC-Stimulation über eine Stunde mit H_2O_2 **39**

Protokoll 8 HPMEC-Stimulation über eine Stunde mit H_2O_2, nach Vorinkubation mit einem Anti CD44-Antikörper **40**

1. Einleitung

1.1 Der akute Lungenschaden

Im Jahr 1967 beschrieb ASHBAUGH et al. anhand von 12 Patienten erstmals das klinische Syndrom des akute Lungenschadens (ALI). Zu den Symptomen gehören Tachypnoe und eine schwere Dyspnoe, ein zunehmend schlechterer Gasaustausch (Hypoxämie), diffuse alveoläre Infiltrationen in Röntgenaufnahmen und eine abnehmende Compliance der Lunge (Bernard et al. 1994). Vier Jahre später bezeichneten PETTY et al. die schwerere Ausprägung des ALI bei Erwachsenen als das akut progressive Lungenversagen ARDS (*adult respiratory distress syndrome*).

Mit einer Inzidenz von 86,2 pro 100.000 Einwohnern und einer Letalität von rund 40% (Rubenfeld et al. 2005, Matthay et al. 2005, Gross et al. 2003, Ware und Matthay 2000) zählt der akute Lungenschaden zu einer häufigen und lebensbedrohlichen Komplikation auf Intensivstationen; nach bakterieller, viraler oder von Pilzen stammenden Pneumonien, nach Aspiration, Polytrauma, Verbrennung, Ischämie-Reperfusion, Massentransfusion oder akuter Pankreatitis. Eine der häufigsten Ursachen für das ALI ist jedoch die Sepsis (Randolph AG 2009, Ware und Matthay 2000, Bachofen und Weibel 1977, Ashbaugh et al. 1967).

Eine sehr frühe und zusätzlich lebensbedrohliche Komplikation der Patienten ist der mikrovaskuläre Austritt von Makromolekülen und Flüssigkeit in das Lungengewebe (Heckel et al. 2011, Heckel et al. 2004, Mulligan et al. 1994, Rose et al. 1994). Diese kapillare Permeabilität manifestiert sich klinisch als schweres Lungenödem und stellt ein wesentliches Problem der intensivmedizinischen Behandlung und der Prognose der Patienten dar (Gropper MA 2004, Petty und Ashbaugh 1971, Ashbaugh et al. 1967).

Durch den bisher unbekannten pathophysiologischen Mechanismus besteht derzeit leider kein kausaler Therapieansatz.

1.2 Pathogenese des akuten Lungenschadens

Bei dem akuten Lungenschaden handelt es sich um einen inflammatorischen Entzündungsprozess der Lunge. Dabei wird die Auskleidung der Gefäße, Glykokalyx genannt, abgebaut und Blutzellen wie Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten haben Kontakt mit dem Gefäßendothel (siehe Abbildung 1-1).

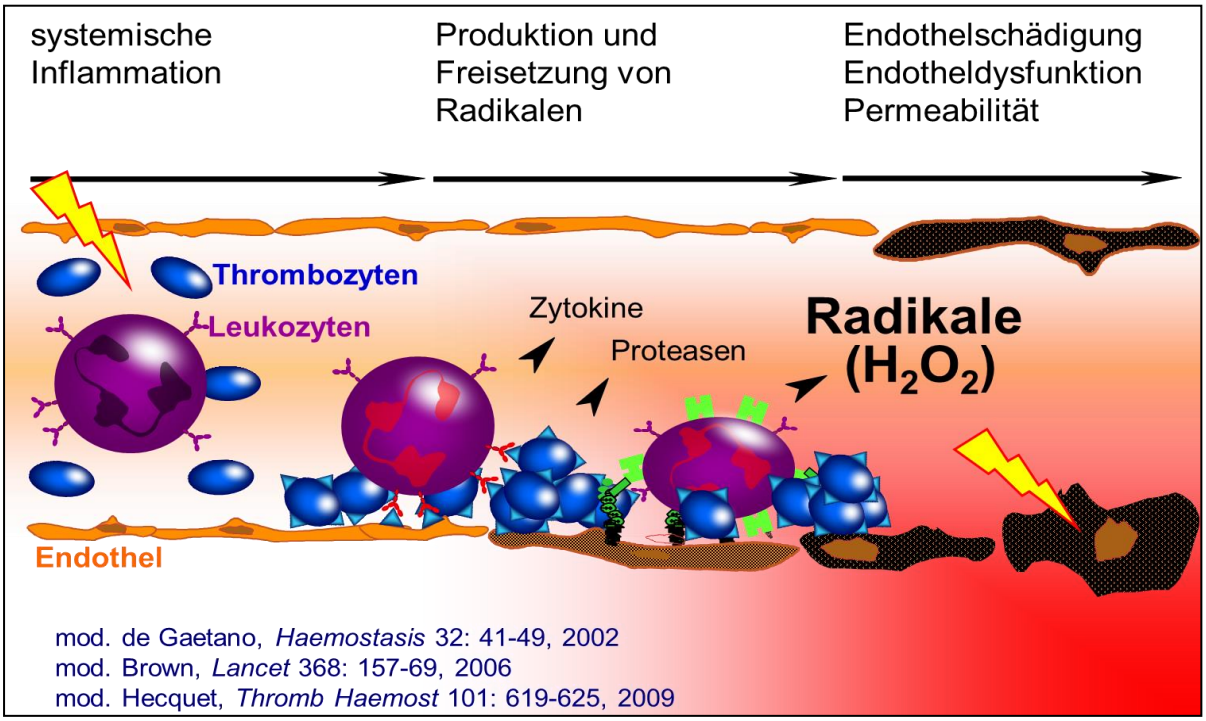


Abbildung 1-1 Schematische Darstellung der Pathogenese des akuten Lungenschadens

Modifiziert nach de Gaetano (2002), Brown (2006) und Hecquet (2009). Inflammatorischer Entzündungsprozess vereinfacht dargestellt. Eine systemische Inflammation führt über die Produktion und Freisetzung von Radikalen zur Endothelzellschädigung.

Interaktionen von Leukozyten mit Adhäsionsmolekülen des Gefäßendothels führen zu einer Verlangsamung des Blutflusses und zum Rollen der Leukozyten entlang des Endothels (Wang et al. 2002). Leukozyten können nun verstärkt durch abgespaltete Bestandteile der Glykokalyx und bereits haftende Chemokine (Ley K 2003, Rot und Andrian 2004) gebunden werden (Scheiermann et al. 2010). Dies aktiviert zusätzlich die Endothelzellen (EC) (Zimmermann et al. 1999) im Sinne einer Leukozyten/Endothelzell-Interaktion (Burns und Doerschuk 1994, Springer TA 1990 und 1994), welche mit der Produktion von Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und diversen proinflammatorischen Molekülen reagieren (Cohen 2002, Bauer et al. 2000, Carlos und Harlan 1994, Morrison und Ryan 1987). Darüber hinaus aktivieren Leukozyten ein hochwirksames Arsenal an Enzymen, setzen Radikale frei (siehe Abbildung 1-1) und führen so zu einer mikrovaskulären Schädigung (Kiefmann et al. 2004a,b).

Das prominenteste Sauerstoffradikal, das dabei *in vivo* in hoher Konzent*ratio*n von Leukozyten freigesetzt wird, ist das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Gonzales et al. 1996, Kietzmann et al. 1993).

Dabei nimmt die Lunge, im Vergleich zu anderen Organen wie Herz, Leber und Niere, eine Sonderstellung ein. Durch Ihr großes Kapillarbett besitzt sie eine sehr große Endotheloberfläche, welche sie sehr anfällig macht, da das gesamte Blut durch sie hindurch strömt. Bereits unter physiologischen Bedingungen hat das Endothel ubiquitär Kontakt zum physiologischen Leukozyten-Pool in der Lunge. Kommt es im Zuge einer Inflammation zur Aktivierung zirkulierender Leukozyten, fungiert das Endothel als zusätzlicher Leukozytenfilter (Doerschuk et al. 1989).

1.3 Produktion von Radikalen

Aktivierte Leukozyten produzieren hochreaktive Sauerstoffmetabolite (ROS). Dazu zählen das Superoxidradikal ($O_2^{\bullet-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Peroxinitrit ($ONOO^-$) (siehe Abbildung 5-3). Sie verursachen DNA-Schäden, zerstören Proteine und Enzyme, sowie Fette.

Viele Studien beschreiben einen progredienten Verlauf des akuten Lungenversagens durch reaktive Sauerstoffradikale (Ward PA 2010, Tasaka et al. 2008, Wang et al 2007).

Um oxidativen Stress zu reduzieren sind Endothelzellen mit einer Reihe von Enzymen ausgestattet. Dabei können Abwehrmechanismen gegen Sauerstoff-radikale nach intrazellulären- und extrazellulären Radikalfängern unterschieden werden. Zu den intrazellulären Radikalfängern gehören Katalase, Superoxid-Dismutase (SOD) und Glutathion-Peroxidase (GPx) (siehe Abbildung 5-4). Vitamin E und Vitamin C gehören zu den extrazellulären Abwehrmechanismen.

Während inflammatorischer Prozesse kommt es am Lungenendothel zur Produktion von Stickstoff-Monoxid (NO) (Cross et al 1994). NO spielt eine elementare Rolle in der Funktion und Pathophysiologie der Lunge (Khatri et al. 2003, Dweik RA 2001, Dweik et al. 2001, Schmidt und Walter 1994). Im Rahmen einer unspezifischen Immunabwehr sind Endothelzellen in der Lage über die Expression der induzierbare NO-Synthase (iNOS) große Mengen NO zu bilden (Barnes und Belvisi 1993) (siehe Abbildung 5-1). Die Produktion von NO korreliert mit der Endothelzellschädigung (Tang et al. 2008).

Bisher ist in der Literatur nicht bekannt über welche Mechanismen Radikale, insbesondere H_2O_2, zu einer endothelialen Stimulation führen. Untersuchungen von KIEFMANN et al. (2004a,b und 2003) weisen darauf hin, dass die Aktivierung proinflammatorischer endothelialer Signalkaskaden während eines akuten

Lungenschadens im Rahmen einer Sepsis in einen *Circulus vitiosus* münden könnten, der zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen und der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) führt.

Die anatomische Schicht zwischen Radikalen die in der Mikrozirkulation zirkulieren oder dort freigesetzt werden und der Endothelzelloberfläche, ist die Glykokalyx. Diese könnte einerseits Radikale abfangen und andererseits spezifische Rezeptorfunktionen übernehmen (siehe Abbildung 1-2).

1.4 Allgemeines zur Glykokalyx

Die vaskuläre Oberfläche des Endothels ist unter physiologischen Bedingungen mit einer Schicht aus verschiedenen membrangebundenen Makromolekülen ausgestattet, die als Glykokalyx bezeichnet wird. Bedeutend ist ihre Funktion für Erkrankungen wie Diabetes mellitus (Singh et al. 2011, Perrin et al. 2007, Nieuwdorp et al. 2006a,b), Arteriosklerose (Becker et al. 2010, Nagy et al. 2010), Entzündungen (Devaraj et al. 2009a,b, Henrich et al. 2010, Hofmann-Kiefer et al. 2009) und Ischämie/Reperfusion (Chappell et al. 2010, Rehm et al. 2007, Mulivor und Lipowsky, 2004, Henry und Duling, 2000). Aber auch im Gerinnungssystem (Chappell et al. 2009a, Levi M 2008), bei der Aufrechterhaltung der Permeabilität sowie als Gefäßbarriere spielt sie eine sehr wichtige Rolle.

Die Glykokalyx schützt die Endothelzellen nicht nur vor Radikalen, sondern fungiert in den Kapillaren auch als Gleitfilm für Erythrozyten (Damiano ER 1998). Als negativ geladene ‚Permeable' lässt sie nur bestimmte Moleküle ins Zellinnere hindurch (Vink und Duling 2000, Dull et al. 1991). Zusätzlich wird ihr in der Mikrozirkulation zunehmend eine mehr oder weniger spezifische Rezeptorfunktion zugeschrieben (Mehta und Malik 2006, Tkachenko et al. 2005, Park et al. 2000).

Sie wirkt als empfindlicher Sensor für Scherkräfte (*shear stress*) des Blutstroms (Moon et al. 2005, Weinbaum et al. 2003) und überträgt diese auf das Zytoskelett der Zelle (siehe Abbildung 1-3). Dort werden die Scherkräfte in eine biochemische Antwort (Mechanotransduktion) umgewandelt und können z.B. die endotheliale Produktion von NO regulieren (Florian et al. 2003, Mochizuki et al. 2003).

Heparinasen, Pronasen und Hyaluronidasen (Pries et al. 2000, Henry und Duling 1999, Desjardins und Duling 1990), sowie während inflammatorischer Prozesse (Mulivor und Lipowsky 2004) freigesetzte Oxidantien (Constantinescu et al. 2001, Vink et al. 2000), Tumor Nekrose Faktor α (Henry und Duling 2000) und leukozytäre kationische Proteine (Dull et al. 2003) können die Dicke der Glykokalyx insgesamt reduzieren. Dieses scheint sich auf die endotheliale Permeabilität (van den Berg et al. 2003) und die Thrombozyten-/Leukozyten-Retention (Jacob et al. 2006, Vink et al. 2000) auszuwirken.

1.5 Aufbau der Glykokalyx

Die Glykokalyx ist eine bis zu 0,5 µm dicke, überwiegend aus Kohlenhydraten bestehende Oberflächenbeschichtung der Endothelzellen. Wie die modifizierte Abbildung 1-2 nach WEINBAUM et al. (2007) zeigt, sind Glykoproteine und Proteoglykane über kovalent gebundenen Seitenketten (Jackson et al. 1991) aus Glykosaminoglykanen (GAG) (Chappell et al. 2009c, Nieuwdorp et al. 2005) mit dem Endothel verbunden. Diese gebundenen Sulfate tragen zur negativen Ladung der Glykokalyx bei. Zu den verschiedenen Gruppen der GAG zählen Heparansulfat (HS), Chondroitin-/Dermatansulfat (CS) und Hyaluronsäure (HA) (Oohira et al. 1983). Letzteres ist unter anderem über den CD44-Rezeptor, ein Transmembranmolekül, in der Glykokalyx verankert (siehe Abbildung 5-2).

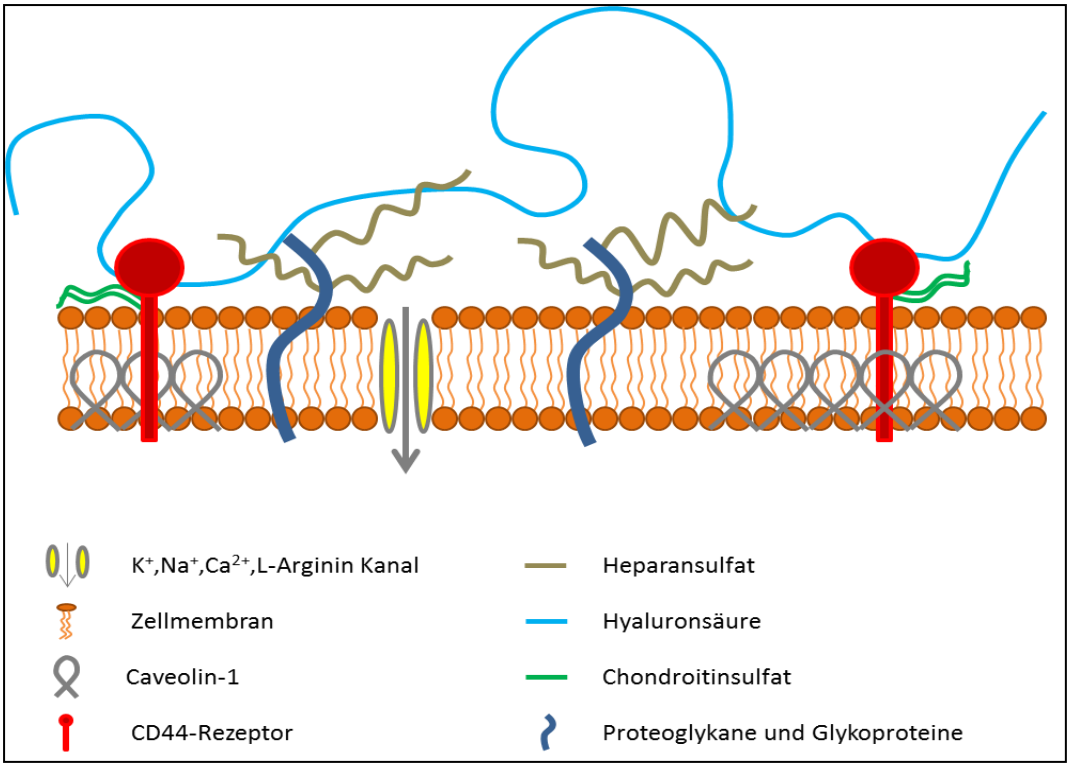


Abbildung 1-2 Schematische Darstellung der Glykokalyx

Mod. nach WEINBAUM et al. (2007). In der Zellmembran befindet sich Caveolin-1. Hyaluronsäure ist ein sehr langes Glykosaminoglykan, welches der Glykokalyx aufliegt und an CD44 bindet. CD44 als Transmembranmolekül kann Chondroitinsulfat, Heparansulfat und diverse andere Mehrfachzucker als Seitenketten haben und befindet sich meistens in der Nähe von Caveolin-1.

Folglich könnte über den CD44-Rezeptor eine Signaltransduktion nach intrazellulär in Gang gesetzt werden.

HENRY und DULING (1999) zeigten, dass nach einer zweistündigen Behandlung mit einer spezifischen Hyaluronidase die Permeabilität der Glykokalyx nur gering verändert ist, was darauf schließen lässt, dass die verbleibenden Bestandteile ebenfalls eine dichte Schicht oberhalb der Zellmembran bilden.

Plasmaproteine (Adamson und Clough 1992), Enzyme, Enzyminhibitoren, Wachstumsfaktoren, Zytokine, Aminosäuren und Wasser (Di Cera 2003) beteiligen sich ebenfalls am komplexen Aufbau (Pries et al. 2000, Bernfield et al. 1999,

Jackson et al. 1991). Durch Ihre Struktur ist die Glykokalyx eine Barriere für Flüssigkeiten und Makromoleküle (Gao und Lipowsky 2010, Tarbell JM 2010). Es ist fraglich, ob sie eine Funktion als physiologische Gleitschicht für Blutbestandteile darstellt (Jocob et al. 2007, Reitsma et al. 2007, Pries und Kuebler 2006, Pries et al. 2000). Ferner wurde die mögliche Rezeptorfunktion für Scherkräfte untersucht (Tarbell und Ebong 2008, Pahakis et al. 2007, Dull et al. 2003).

Ihre potentielle Rolle in der Signaltransduktion für Radikale ist jedoch noch völlig unklar. Die Glykokalyx könnte Radikale vom Endothel abschirmen oder spezifische Rezeptorfunktionen haben.

1.6 Das Heparansulfat

Das am häufigsten auf Endothelzellen vorkommende Glykosaminoglykan ist das Heparansulfat (Turnbull et al. 2001). Es macht 50 - 90% der Gesamtoberfläche aus (Pries et al. 2000, Nandi et al. 2000, Oohira 1983). Exprimiert wird es zwischen der Endothelzelloberfläche und der extrazellulären Matrix. So könnte es sich zur selektiven Regulierung und Interaktion mit vielen Proteinen eignen (Ori et al. 2008, Powell et al. 2004). Das Heparansulfat besitzt drei Kernproteine, unter denen die transmembranen Syndekane und membrangebundenen Glypikane am bekanntesten sind. Ferner ist noch das matrix-assoziierte Perlekan zu erwähnen (Rosenberg et al. 1997). Während der Inflammation fungiert Heparansulfat als Ligand für P- und L-Selektine und fördert so die Adhäsion von Leukozyten (Götte M 2003).

WANG et al. (2005) zeigten, dass Endothelzellen, welche weniger Heparansulfat auf Ihrer Oberfläche exprimieren, unfähig sind Selektine zu binden und somit eine Inflammation zu fördern.

1.7 Der CD44-Rezeptor

Der CD44-Rezeptor ist ein wichtiges Adhäsionsmolekül der Glykokalyx (siehe Abbildung 1-2 und Abbildung 1-3). Er besitzt eine kurze intrazelluläre und eine lange extrazelluläre Domäne (Banerji et al. 2007).

Die bei inflammatorischen Prozessen freigesetzten Radikale degradieren Glykokalyxbestandteile in kleinere Fragmente. Diese führen durch Interaktionen mit dem CD44-Rezeptor zu einer vermehrten Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen (Siegelman et al. 1999).

Neueste Literatur weist immer deutlicher darauf hin, dass der CD44-Rezeptor während inflammatorischer Prozesse eine wichtige Rolle spielen könnte.

So zeigten zum Beispiel Versuche von CAMPO et al. (2010 und 2009), LIANG et al. (2007) und WANG et al. (2002) dass bei Inflammation der CD44-Rezeptor dazu beiträgt, dass intrazellulär die Proteinkinase C (PKC) erhöht wird, es zu einer Steigerung des Transkriptionsfaktors NFκB kommt und iNOS konsekutiv vermehrt exprimiert wird.

1.8 Die Rolle des Kalziums

Kalzium (Ca^{2+}) ist ein wichtiger zytosolischer *second messenger* in der proinflammatorischen endothelialen Stimulation. Eine Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration kann ein wesentlicher Hinweis für eine mikrovaskuläre endotheliale und inflammatorische Reaktion in Endothelzellen sein (Kiefmann et al. 2008).

Endothelzellen generieren Ca^{2+}-Signale in dem sie intra- und extrazelluläre Ca^{2+}-Speicher mobilisieren. Zu den intrazellulären Speicherorten gehören das endoplasmatische Retikulum (eR), die Mitochondrien und der Nucleolus.

Die Ca^{2+}-Konzentration wird über spezifische Transporter, Pumpen und Kanäle kontrolliert (Berridge et al. 1998). Die Freisetzung wird über Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP_3) und die Ryanodin-Rezeptoren (RyR) reguliert.

Oxidativer Stress kann Ca^{2+}-Signale induzieren (Doan et al. 1994).

Zum Beispiel ist für H_2O_2 bekannt, dass es über Ca^{2+}-Kanäle zu einer Ca^{2+}-Freisetzung aus intrazellulären Speichern führt (Hidalgo und Donoso 2008).

1.9 Zielsetzung und Fragestellung

Heparansulfat-Glykosaminoglykane sind zentraler Bestandteil der Glykokalyx. Die Rolle der Glykokalyx bei der Weiterleitung inflammatorischer Signale in das Zellinnere von Endothelzellen ist bisher nur wenig untersucht.

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass das Radikal H_2O_2, welches während Inflammation ubiquitär produziert und freigesetzt wird, über Heparansulfat und den CD44-Rezeptor eine spezifische Signaltransduktion nach intrazellulär in Gang setzt und folglich ein intrazelluläres Ca^{2+}-Signal auslöst (siehe Abbildung 1-3). Auf diesem Weg könnte eine proinflammatorische Genexpression, z.B. der iNOS ausgelöst werden, da bekannt ist, dass zytoplasmatische Ca^{2+}-Signale die Genexpression verändern können.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu untersuchen, ob die Glykokalyx von pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen als molekularer „Rezeptor“ von H_2O_2 fungiert und eine spezifische endotheliale Signaltransduktion induziert. Die Kenntnis dieser pathophysiologischen Mechanismen könnte folglich neue kausale Möglichkeiten zur therapeutischen Intervention eröffnen.

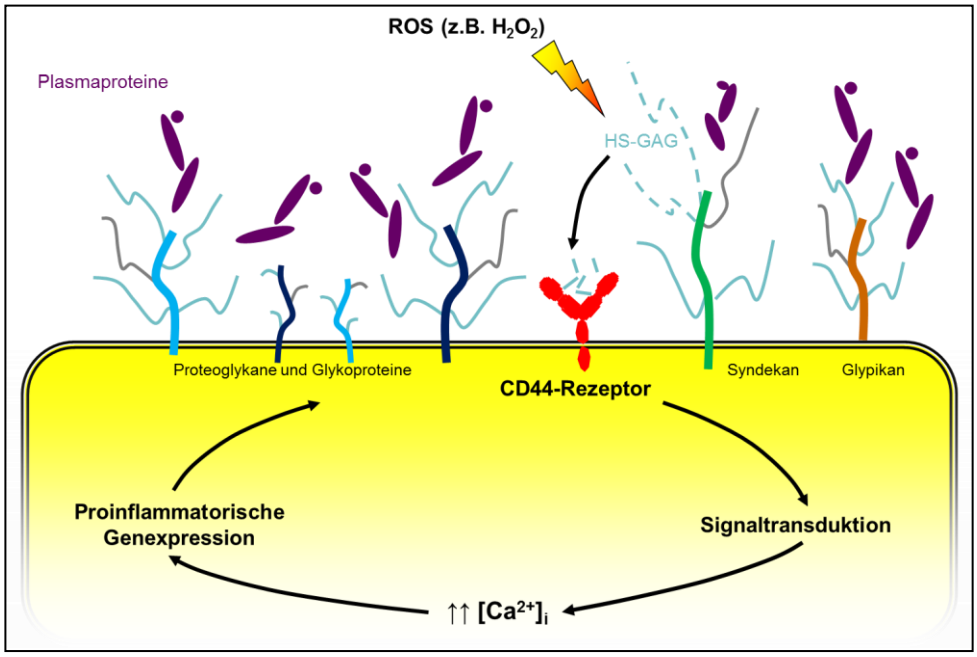


Abbildung 1-3 Schematische Darstellung der Arbeitshypothese der vorliegenden Arbeit

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinie

Die Versuche wurden mit human pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells) der Firma PromoCell GmbH, Heidelberg durchgeführt.

Verwendete Geräte

• Sterile Werkbank mit Laminar Flow	Heraeus Holding GmbH, Hanau
• CO_2-Inkubator	Heraeus Holding GmbH, Hanau
• Wasserbad 37°C	GFL mbH, Burgwedel
• Zentrifuge	Hettich Lab Technology, Tuttlingen
• Lichtmikroskop	Olympus Optical Ltd., Japan
• 75 cm² Kulturflaschen	Sarstedt Inc. Newton, NC/USA
• Handzellzähler	
• Minishaker	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Verwendete Instrumente

• Sterile 5 ml, 10 ml, 25 ml Transferpipetten	Sarstedt Inc. Newton, NC/USA
• Sterile 14 ml Zentrifugenröhrchen	Becton Dickinson Labware, USA
• Sterile 50 ml Plastikröhrchen	Becton Dickinson Labware, USA

• Zählkammer Neubauer	
• Sterile Eppendorfröhrchen (2 ml)	Sarstedt Inc. Newton, NC/USA
• Eppendorfpipetten	Eppendorf Vertrieb GmbH, Wesseling-Berzdorf
• Pipettenspitzen	Sarstedt Inc. Newton, NC/USA
• Kulturflaschen (75 ml)	Sarstedt Inc. Newton, NC/USA
• Deckgläser	VWR International GmbH, Darmstadt
• 6-Wellplatten	Becton Dickinson Labware, USA
• 2-Kammer Objektträger	Becton Dickinson Labware, USA
• Sterile Pinzetten	Sarstedt Inc. Newton, NC/USA

Verwendete Lösungen und Ansätze

• Medium	
○ Supplement-Mix	PromoCell GmbH, Heidelberg
○ Penicillin / Streptomycin	Invitrogen GmbH, Darmstadt
○ EC Growth Medium MV	PromoCell GmbH, Heidelberg
• Trypsin / EDTA Solution	Biochrom AG, Berlin
• Fetal Bovine Serum	Biochrom AG, Berlin
• PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
• Trypanblau Lösung (0,4%)	VWR International GmbH, Darmstadt

2.1.2 Zellkultivierung

Humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen (HPMEC) wurden in 75 cm² Kulturflaschen im CO_2-Inkubator (5% CO_2, 21% O_2, 37°C) kultiviert. Die Zellaussaat erfolgte in einer Dichte von 20.000 bis 25.000 Zellen/cm². Das Kulturmedium wurde dreimal in der Woche erneuert. Bei 80-90 %iger Konfluenz wurden die Zellen gesplittet und subkultiviert.

Dafür wurde das alte Medium abgesaugt, die EC-Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin / EDTA überzogen und bei 37°C, 5% CO_2 inkubiert.

Nach 4 min wurden die Endothelzellen aus dem CO_2-Inkubator herausgenommen und unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Waren die Endothelzellen vom Flaschenboden gelöst, wurde mittels 7 ml Fetales Bovines Serum (FBS) die weitere Wirkung des Trypsins blockiert. Die abgelösten Zellen wurden dann in ein 14 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und 5 min bei Raumtemperatur und 1.000 U/min zentrifugiert.

Nach Abgießen des Überstandes wurden die Zellen mit 3 ml Medium resuspendiert und die Zellzahl in der Neubauer Zählkammer bestimmt. Hierzu wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau vermischt und anschließend 10 µl in die Zählkammer pipettiert.

Berechnet wurden die Zellen in der Zellsuspension (ZS) nach folgender Formel:

$$\text{Zellen/ml in ZS} = \left(\frac{\text{Anzahl der Zellen in 4 Großquadraten x VF}}{4} \right) \text{x } 10.000$$

Nach der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen erneut mit einer Dichte von 20.000 bis 25.000 Zellen/cm² in T75 Kulturflaschen, 2-Kammer Objektträger oder 6-Wellplatten ausgesät.

2.2 Fluoreszenzmikroskopie

Verwendete Geräte

- Auflichtfluoreszenzmikroskop — Olympus, Hamburg
- 100 W Quecksilber-Lampe HBO — Olympus, Hamburg
- Lambda 10-2, Optical Filter Changer — Sutter Instrument Company, CA, USA
- Reflektorschieber 3FL — Olympus, Hamburg
- Objektiv: Achroplan 40x/0,80 W — Olympus, Hamburg
- Hochauflösende Digitalkamera: Charge Coupled Device (CCD), CoolSNAP-HQ — Photometrics, AZ, USA
- MetaFluor Imaging Software — Molecular Devices Corporation, PA, USA
- Wasserbad 37°C — GFL mbH, Burgwedel
- Beckmann pH-Meter — Beckman Coulter GmbH, Krefeld
- Waage — Sartorius AG, Göttingen

Verwendete Instrumente

- Eppendorfpipetten — Eppendorf Vertrieb GmbH, Wesseling-Berzdorf
- Pipettenspitzen — Sarstedt Inc. Newton, NC, USA

- 2-Kammer Objektträger — Becton Dickinson Labware, USA

Verwendete Lösungen und Ansätze

- Certi PUR Pufferlösung pH 4,7,10 — Merck KGaA, Darmstadt
- Natronlauge — Merck KGaA, Darmstadt
- Salzsäure — Merck KGaA, Darmstadt
- FURA-2/AM
    - FURA-2/AM — Invitrogen GmbH, Darmstadt
    - Pluronic — Invitrogen GmbH, Darmstadt

    50 µl FURA-2/AM + 10 µl Pluronic + 100 µl HBS

    am Versuchstag: 20 µl FURA + 980 µl HBS
- Mouse Anti-Human CD44 Monoclonal Antibody, Clone B-F24 — Abcam plc, Großbritannien
- Wasserstoffperoxid 30% — Merck KGaA, Darmstadt

  1. Verdünnung: 1:100 mit Aqua ad iniectabilia (50 µl ad 5 ml)
  2. Verdünnung: 1:100 mit HBS-Puffer
- Heparinase III Flavobact. heparinum (10 U) — Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

  Auflösung in 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 → 0,1 U/ml

  + 0,1 mg/ml BSA

  + 4 mM $CaCl_2$
- ATP — Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

- Tris-Puffer
    - Aqua ad iniectabilia — Baxter, Unterschleißheim
    - Tris-HCl — Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
    - BSA — Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
    - $CaCl_2$ — Merck KGaA, Darmstadt

- HBS Puffer
    - HEPES — Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
    - $CaCl_2$ — Merck KGaA, Darmstadt
    - $MgCl_2$ — Merck KGaA, Darmstadt
    - KCl — Merck KGaA, Darmstadt
    - NaCl — Mallinckrodt Baker, Griesheim
    - Dextran — Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
    - Glukose — Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
    - Aqua ad iniectabilia — Baxter, Unterschleißheim

	MW	mM	Vol.(1 l)
HEPES	238,3	20	4,766 g
$CaCl_2$	111	1	0,111 g
$MgCl_2$	203,31	1	1 ml
KCl	74,55	5	0,373 g
NaCl	58,44	150	8,77 g
Dextran	74.000	0,16	40 g
Glukose	180,16	10	1,8 g
H_2O			1 l
pH= 7,4			

Tabelle 1: Ansatz des HBS Puffers

	MW	Volumen (100 ml)
H_2O		100 ml
Tris-HCl	158 g/mol	320 mg
BSA	60 g/mol	10 mg
$CaCl_2$	111 g/mol	44 mg
pH= 7,5		

Tabelle 2: Ansatz des Tris Puffers

2.2.1 Ca^{2+} - Messungen

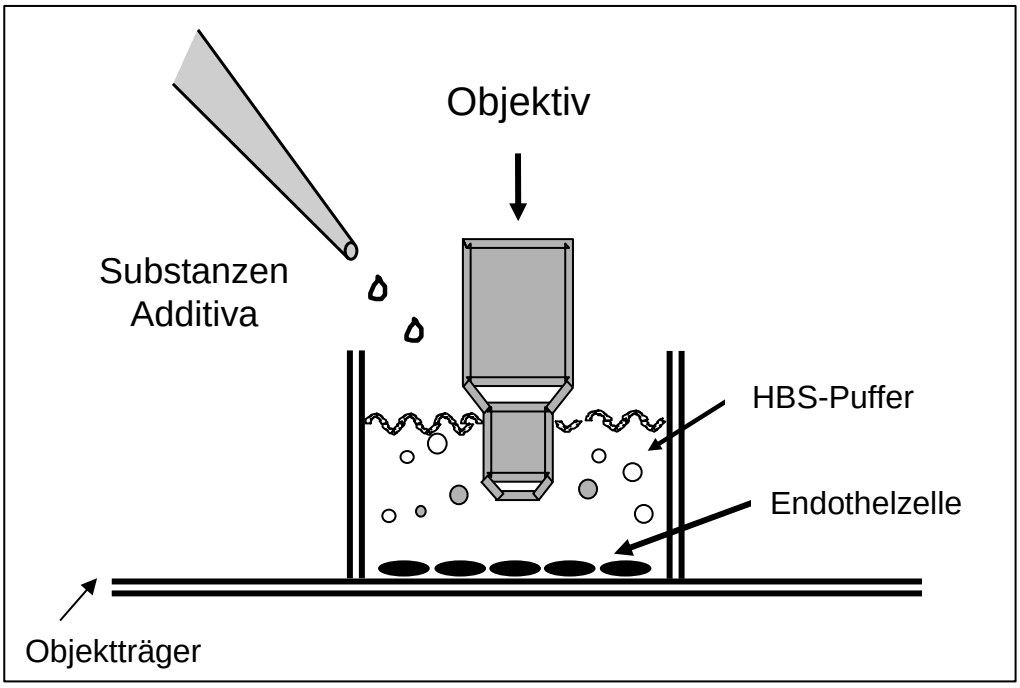


Abbildung 2-1 Versuchsaufbau des Fluoreszenzmikroskops

Das Prinzip der fluoreszenzmikroskopischen Messung beruht auf der Tatsache, dass Veränderungen der Ionenkonzentrationen, in diesem Fall Kalzium (Ca^{2+}), zu einer Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften von spezifischen Fluorochromen führen. Der kalziumsensitive Farbstoff FURA-2/AM kann durch seine lipophilen Eigenschaften die Zellmembran durchdringen und wird spezifisch für die intrazelluläre Messung von Ca^{2+}-Ionen verwendet. Damit FURA-2/AM intrazellulär verbleibt, spalten spezifische intrazelluläre Esterasen die hydrophile Carboxylatgruppe ab (Roe et al. 1990). Die Chelatbildung von FURA-2 mit freiem Kalzium ändert die Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffes bei den Wellenlängen 340 nm und 380 nm. Im Versuchsaufbau werden die Endothelzellen (EC) mit diesen Wellenlängen angeregt. Eine hohe intrazelluläre

Kalziumkonzentration lässt die Fluoreszenzintensität bei einer Wellenlänge von 340 nm steigen und umgekehrt bei einer Wellenlänge von 380 nm abfallen.

Beide Anregungswellen werden miteinander verrechnet und als *‚Ratio‘* bezeichnet.

$$Ratio_{340\ nm\ /\ 380\ nm} = \frac{\text{Fluoreszenz (340 nm) – Autofluoreszenz (340 nm)}}{\text{Fluoreszenz (380 nm) – Autofluoreszenz (380 nm)}}$$

Anhand dieser gemessenen *Ratio* kann die freie Ca^{2+}-Konzentration im Zytoplasma bestimmt werden. Dabei ist eine hohe intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration mit einer hohen *Ratio* und eine niedrige *Ratio* mit einer niedrigen intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration gleichzusetzen.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse auf Einzelzell-Ebene wurden die EC 48 Stunden in einem 2-Kammer Objektträger kultiviert bis sie eine Konfluenz von 90% erreichten. Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen mit HBS-Puffer. Danach wurden die EC für 30 Minuten mit FURA-2/AM inkubiert und erneut mit HBS-Puffer gewaschen (siehe Tabelle 1).

Nach Abschluss der Inkubationsphase wurden die Objektträger unter einem Auflichtfluoreszenzmikroskop positioniert. Als Lichtquellen des Mikroskops diente eine 100 W Quecksilber-Lampe. Über ein Filterrad konnten entsprechende Filtersätze in den Strahlengang des Mikroskops eingebracht werden. Somit konnten die applizierten Fluorochrome selektiv zur Fluoreszenz angeregt werden. Das von den Endothelzellen emittierte Fluoreszenzlicht wurde von Objektiven gebündelt und gelangte über einen Reflexionspassfilter zum Okular bzw. zu einer hochauflösenden Digitalkamera. Die digitalen Bilder wurden mittels der Bildverarbeitungssoftware MetaFluor verarbeitet, auf DVD archiviert und später offline in Einzelbildanalyse ausgewertet und quantifiziert.

2.3 RNA-Isolation, cDNA-Synthese und rt-PCR

Um zu untersuchen welche Auswirkungen H_2O_2 unter inflammatorischen Bedingungen auf die Genexpression von HPMEC hat, wurden diese mittels *Reverse Transcriptase* Polymerasekettenreaktion (rt-PCR) untersucht.

Verwendete Geräte

• Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
• Zentrifuge	Eppendorf Vertrieb GmbH, Wesseling-Berzdorf
• Electrophoresis power supply	Consort, Turnhout, Belgien
• Gelkammer + Gelkämme	VWR International GmbH, Darmstadt
• GeneGenius System, Syngene	VWR International GmbH, Darmstadt
• NanoDrop-1000	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
• Waage	Sartorius AG, Göttingen
• Minishaker	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Verwendete Instrumente

• 0,2 ml Strip Tube and Cap for PCR	VWR International GmbH, Darmstadt
• Amplitube thin wall reaction tube	Simport, Beloeil, Kanada

• Eppendorfpipetten	Eppendorf Vertrieb GmbH, Wesseling-Berzdorf
• Pipettenspitzen	Sarstedt Inc. Newton, NC/USA
• Zellschaber	Sarstedt Inc. Newton, NC/USA
• Ql Shredder	Qiagen GmbH, Hilden
• Collection Tubes (2 ml)	Qiagen GmbH, Hilden

Verwendete Lösungen und Ansätze

• Hot StarTaq DNA Polymase	Qiagen GmbH, Hilden
• Omniscript RT Kit	Qiagen GmbH, Hilden
• RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
• Protector RNase Inhibitor (40 U/µl)	Roche Deutschland GmbH
• Primer $p(dT)_{15}$ for cDNA Synthesis (8 nmol)	Roche Deutschland GmbH
• 100mM dNTP Set PCR Grade	Invitrogen GmbH, Darmstadt
• Nucleae-free water	Qiagen GmbH, Hilden
• Gel Pilot 100 bp Plus Ladder	Qiagen GmbH, Hilden
• 6x Loading Buffer	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt
• 2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
• Ethidiumbromid (1%ige Lösung in H_2O)	Merck KGaA, Darmstadt
• TAE-Puffer 50xpH, 8,3Tris-Acetat-EDTA-Puffer	Merck KGaA, Darmstadt
• RNase Zap	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

- Ethanol — Merck KGaA, Darmstadt
- Agarose Electrophoresis Grade — Invitrogen GmbH, Darmstadt
- Aqua ad iniectabilia — Baxter, Unterschleißheim
- Primer

Hu-GAPDH — Eurofins MWG Operon, Ebersberg

forward 5´-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3´

reverse 5´-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3´

Hu-CD44H — Eurofins MWG Operon, Ebersberg

forward 5´-TCC CAG ACG AAG ACA GTC CCT GGA-3´

reverse 5´-TTC AGA TCC ATG AGT GGT ATG GGA-3´

Hu-iNOS — Eurofins MWG Operon, Ebersberg

forward 5´-GTG AGG ATC AAA AAC TGG GG-3´

reverse 5´-ACC TGC AGG TTG GAC CAC-3´

- cDNA Synthese-Mix — Qiagen GmbH, Hilden

Ansatz für eine Probe [2 µg RNA]

10x Buffer-RT	2 µl
dNTP Mix (5 mM/dNTP)	2 µl
Oligo-dT Primer [1 µM]	0,5 µl
RNase Inhibitor [10 U/µl]	1 µl
Omniscript RT [4 U/20µl]	1 µl
RNase freies H_2O	2 µl
Template (RNA/DNA-Ansatz)	11,5 µl
Endvolumen	20 µl

Tabelle 3: Ansatz des cDNA Synthese-Mixes

- 1%iges (2%iges) Agarose-Gel:
    - 66 ml TAE-Laufpuffer
    - 166 µl TAE-Puffer
    - 666 mg (1,332 mg) Agarose
    - 6 µl (8 µl) Ethidiumbromid
- TAE-Laufpuffer:
    - 20 ml TAE-Puffer
    - 980 ml Aqua ad iniectabilia
- PCR-Reagenz Qiagen GmbH, Hilden

	Volumen/Reaktion	Ansatz / Probe
10x PCR-Buffer (enthält 15mM $MgCl_2$)		5 µl
5x Q-Solution		10 µl
Hot StarTaq DNA Polymerase (5 U/µl)		0,25 µl
RNase freies H_2O	variabel	28,25 µl
dNTP (10 mM)		1 µl
Primer *forward* (100 pmol/µl)	0,1-0,5 µM	0,25 µl
Primer *reverse* (100 pmol/µl)	0,1-0,5 µM	0,25 µl
Endvolumen	50 µl (inkl. 5 µl cDNA)	45 µl

Tabelle 4: Ansatz der PCR-Reagenz

2.3.1 RNA-Isolation

Um die Reinheit der RNA zu gewährleisten wurden nicht mehr als 7 x 10^7 Endothelzellen isoliert. Die Isolationen fanden bei Raumtemperatur statt.

Nach Abtragen des Mediums wurden die Zellen in einer 6-Wellplatte (Fläche 9,5 cm²) mit 350 µl RLT Plus Puffer aus dem RNeasy Plus Mini Kit benetzt. Anschließend wurde mit einem Zellschaber der Boden der Wellplatte abgefahren um EC-Zellen von der Platte zu lösen. Das Lysat wurde in *collection tubes* (2 ml) überführt.

Das Lysat wurde auf die erste Filtersäule geben und die Probe 3 min lang mit >14.000 U/min zentrifugiert. Der Filter wurde verworfen und das Lysat erneut auf die DNA Filtersäule pipettiert. Diese wurden anschließend für 30 sec bei >10.000 U/min zentrifugiert. Nun wurden 350 µl Ethanol (70%ig) auf den Überstand gegeben und mehrmals aspiriert. Nachfolgend wurden 350 µl auf eine RNeasy Filtersäule pipettiert und diese 20 sec mit >10.000 U/min zentrifugiert. Diesmal wurde der Überstand verworfen und 650 µl RW-1-Puffer auf die Filtersäule pipettiert. Erneutes zentrifugieren für 20 sec bei >10.000 U/min. Nachdem erneut der Überstand verworfen und 500 µl RPE-Puffer hinzugefügt wurden, wurde für 20 sec mit >10.000 U/min zentrifugiert. Letzteres wurde ein weiteres Mal wiederholt, diesmal jedoch 2 min lang zentrifugiert. Nach Beendigung wurde die Filtersäule in ein neues *collection tube* überführt und 1 min bei >14.000 U/min trockenzentrifugiert. Im letzten Schritt wurden 40 µl RNase-freies H_2O in die Mitte der Filtermembran pipettiert. Erneut wurde 1 min bei >10.000 U/min zentrifugiert. Im *collection tube* befand sich nun die isolierte RNA.

2.3.2 Bestimmung der RNA-Konzentration und cDNA-Synthese

Um die komplementäre DNS (cDNA) zu synthetisieren wurde die RNA-Menge der Probe bestimmt. Hierzu wurde der NanoDrop-1000 verwendet. Dabei wurde der Extinktionsquotient aus den Wellenlängen 260 nm und 280 nm berechnet. Werte zwischen 1,8 - 2,1 gelten hierbei als reine RNA. Werte <1,85 deuten auf eine Verunreinigung mit DNA oder Salzen hin. Für die Versuche wurde ausschließlich RNA mit einem hohen Reinheitsgrad verwendet.

Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht einer RNA-Konzentration von 44 µg/ml. Daraus lässt sich die Konzentration der RNA wie folgt berechnen:

$$\text{RNA – Konzentration [µg/µl]} = A_{260} \times 44 \times \text{Verdünnung}$$

Durch entsprechende Verdünnung mit RNase-freiem H_2O wurde ein RNA-Volumen von 13,5 µl auf eine RNA-Konzentration von 2 µg/µl eingestellt (*template*). Um zu überprüfen ob sich in allen Proben die gleiche RNA-Menge befand, wurde eine Gelelektrophorese der RNA angefertigt. Nach Herstellung und Abkühlung des 1%igen Agarose-Gels wurden 2 µl des *templates* und 2 µl des *loading buffers* in die vorgefertigten Geltaschen appliziert, mit Laufpuffer (siehe Tabelle 2) überschichtet und 30 min bei einer Spannung von 90 V und 70 mA laufen gelassen. Zeigten sich in der UV-Lichtaufnahme (abgebildet durch GeneGenius, Fa. Syngene) zwei regelrechte, gleich starke RNA-Banden wurde dieses dokumentiert und das *template* wurde weiterverwendet. Somit wurden die verbliebenen 11,5 µl des *templates* für 5 min bei 65°C in den PCR *cycler* überführt, um die RNA zu denaturieren.

Anschließend wurde der cDNA Synthese-Mix (siehe Tabelle 3) angesetzt. Entsprechend der eingesetzten RNA-Menge wurden 8,5 µl [2 µg] in jede Probe

pipettiert. Danach wurden die Proben erneuet für eine Stunde und bei 37°C im *cycler* inkubiert.

2.3.3 rt-PCR

Zur Herstellung einer rt-PCR aus der zuvor gewonnenen cDNA wurden die *primer* (siehe 2.3) zusammen mit der PCR-Reagenz gemischt. Hierzu wurden 45 µl des Gemisches aus Primer und PCR-Reagenz mit 5 µl cDNA vermengt, 5 sec bei 10.000 U/min zentrifugiert und erneut in den *cycler* überführt. Die Amplifikation der DNA erfolgte für jedes *primer*-Paar nach folgendem Programm:

Gen	Denat.	Amplifik.	Elong.	Zyklen	Elong.
Hu-GAPDH	94°C, 1 min	54°C	72°C, 1 min	28	72°C, 10 min
Hu-CD44H		54°C		30	
Hu-iNOS		53°C		30	

Tabelle 5: PCR-Programme

Als letzter Schritt wurde ein 2%iges Agarose-Gel angefertigt. Dafür wurden 6 µl DNA-Probe und 3 µl *loading puffer* in die Geltaschen pipettiert und mit Laufpuffer (siehe Tabelle 2) überzogen. Die Gelelektrophorese wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 1 Stunde bei 90 V und 70 mA. Anschließend wurde das Gel fotografiert und semiquantitativ densitometrisch mit Hilfe eines molekularen Gewichtsstandards sowie eines Konzentrationsstandards ausgewertet.

2.4 Endothelzellstimulation

Verwendete Geräte

• Sterile Werkbank mit Laminar Flow	Heraeus Holding GmbH, Hanau
• CO_2-Inkubator	Heraeus Holding GmbH, Hanau
• Wasserbad 37°C	GFL mbH, Burgwedel
• Lichtmikroskop	Olympus Optical Ltd., Japan
• Minishaker	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Verwendete Instrumente

• Sterile 5, 10, 25 ml Transferpipetten	Sarstedt Inc. Newton, NC/USA
• Sterile 50 ml Plastikröhrchen	Becton Dickinson Labware, USA
• Sterile Eppendorfröhrchen (2 ml)	Sarstedt Inc. Newton, NC/USA
• Eppendorfpipetten	Eppendorf Vertrieb GmbH, Wesseling-Berzdorf
• Pipettenspitzen	Sarstedt Inc. Newton, NC/USA
• Zellschaber	Sarstedt Inc. Newton, NC/USA
• RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden

Verwendete Lösungen und Ansätze

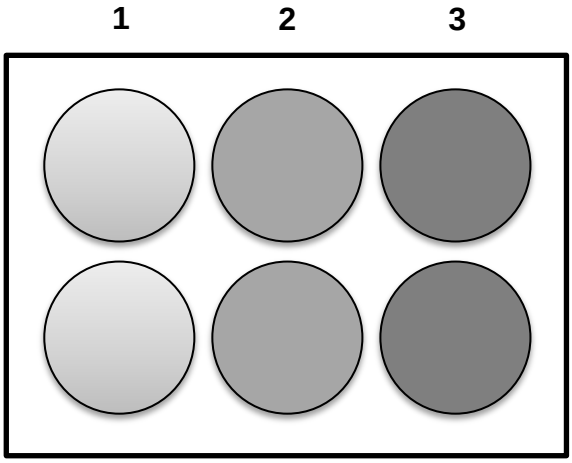
- Medium
    - Supplement-Mix — PromoCell GmbH, Heidelberg
    - Penicillin / Streptomycin — Invitrogen GmbH, Darmstadt
    - EC Growth Medium MV — PromoCell GmbH, Heidelberg
- PBS Dulbecco — Biochrom AG, Berlin
- 2-Mercaptoethanol — Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- Wasserstoffperoxid 30% — Merck KGaA, Darmstadt

1. Verdünnung: 1:100 mit Aqua ad iniectabilia (50 µl ad 5 ml)
2. Verdünnung: 1:100 mit Medium (2,5% FBS)

- Mouse Anti-Human CD44 Monoclonal Antibody, Clone B-F24 — Abcam plc, Großbritannien
- Heparan sulfate sodium salt from bovine kidney — Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

2.4.1 HPMEC-Stimulation über eine Stunde mit H_2O_2

Humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen wurden in 6-Wellplatten ausgesät und 48 Stunden im Wärmeschrank inkubiert (5% CO_2, 21% O_2, 37°C). Nach zwei Tagen wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop kontrolliert (siehe Einschlusskriterien 2.6) und mit 3 ml frischem Medium (2,5% FBS) überzogen. Nun wurden die Endothelzellen mit 100 und 800 µM H_2O_2 stimuliert (siehe Abbildung 2-2) oder zusätzlich mit einem monoklonalen Anti CD44-Antikörper Klon B-F24 vorinkubiert (siehe Abbildung 2-3). Während der Inkubationsdauer wurden die 6-Wellplatten in den CO_2-Inkubator zurückgestellt.

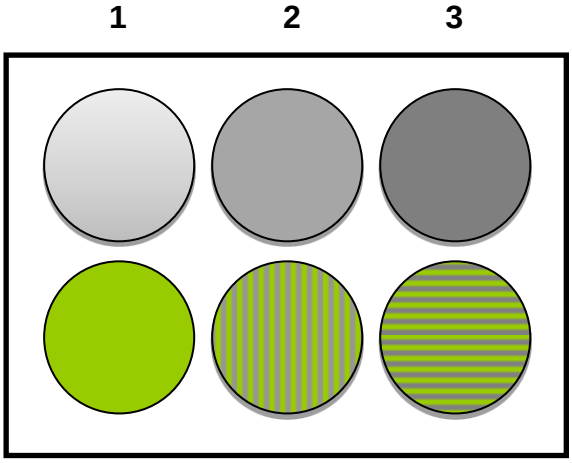


Spalte 1: unstim. HPMEC

Spalte 2: Stim. mit 100 µM H_2O_2

Spalte 3: Stim. mit 800 µM H_2O_2

Abbildung 2-2 Versuchsanordnung der einstündigen Stimulation mit 100 und 800 µM H_2O_2



Spalte 1: unstim. HPMEC

Spalte 2: Stim. mit 100 µM H_2O_2

Spalte 3: Stim. mit 800 µM H_2O_2

Reihe 1: ohne Antikörper (grau)

Reihe 2: Anti CD44-Antikörper (grün)

Abbildung 2-3 Versuchsanordnung der einstündigen Stimulation mit 100 und 800 µM H_2O_2 nach Vorinkubation mit einem Anti CD44-Antikörper

Nach einer Stunde Stimulation wurde der Überstand abgenommen, jedes *well* mit PBS gewaschen und mit frischem Medium (5% FBS) überzogen. Nach weiteren 24 Stunden wurden die HPMEC isoliert. Dazu wurden 350 µl RLT *buffer* in jedes *well* pipettiert, die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber von der Platte gelöst und in ein steriles Eppendorfröhrchen pipettiert um daraus die mRNA zu gewinnen.

2.5 H_2O_2-Assay

Um zu untersuchen, ob H_2O_2 im verwendeten Zellkulturmedium stabil ist, wurde die H_2O_2-Konzentration im Medium unter Ausgangsbedingungen und nach einer Stunde bestimmt.

Verwendete Geräte

• Multiscan Spectrum	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
• Software: ScanIt RE for MSS 2.2	
• Minishaker	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
• Beckmann pH-Meter	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

Verwendete Instrumente

• Mikrowellplate 96-well round bottom	Sarstedt Inc. Newton, NC/USA
• Reagent Reservoir	VWR International GmbH, Darmstadt

- Multi Channel Pipette — Eppendorf Vertrieb GmbH , Wesseling-Berzdorf
- Pipettenspitzen — Sarstedt Inc. Newton, NC/USA

Verwendete Lösungen und Ansätze

- Tetramethylbenzidine 3,3´,5,5´ — Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- Peroxidase Type I from horseradish — Merck KGaA, Darmstadt
- Dimethylsulfoxid (DMSO) — Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

  ACS Spectrophotometric grade > 99,9%

  - 1 g / 1 ml Aqua ad iniectabilia

  → 3 ml ansetzen und am Versuchstag mit 3 ml NaH_2PO_4 - Puffer mischen
- Natronlauge — Merck KGaA, Darmstadt
- Salzsäure — Merck KGaA, Darmstadt
- Natriumdihydrogenphosphat — Merck KGaA, Darmstadt
  - 0,96 g / 100 ml Aqua ad iniectabilia → 0,08 M
- Wasserstoffperoxid 30% — Merck KGaA, Darmstadt

1. Verdünnung: 1:100 mit Aqua ad iniectabilia (50 µl ad 5 ml)
2. Verdünnung: 1:100 mit Medium (2,5% FBS)

- Di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei — Merck KGaA, Darmstadt
  - 1,136 g /100 ml Aqua ad iniectabilia → 0,08 M

  NaH_2PO_4 - Puffer ansetzen: 30 ml der oberen 0,08 M Lösung mit 3 ml der unteren 0,08 M Lösung auf einen pH von 6 einstellen

Bei diesem semiquantitativen Assay führte die Reaktion von H_2O_2 mit Tetramethylbenzidine unter enzymatischem Einfluss der Meerrettich-Peroxidase zu einem Farbumschlag, der bei 691 nm im Multiscan Spektrum Photometer gemessen werden konnte.

Wie in Abbildung 2-4 dargestellt wurde zunächst in jedes *well* 50 µl des NaH_2PO_4-Puffers pipettiert. Nun wurde die H_2O_2 Standardreihe (Spalte 1 und 2) angelegt. Hierfür wurden 50 µl der 2. H_2O_2-Verdünnung in die oberen Felder pipettiert und nach unten hin verdünnt (Reihe A-G). Dabei bleibt die unterste Reihe, der *blank,* (Reihe H) frei. Sie dienten als Leerwerte. 50 µl der zu untersuchenden Probe wurden in die freien Felder der ersten Reihe (A) vorgelegt und ebenfalls nach unten hin verdünnt. So entstanden Verdünnungsreihen des Standards und der Proben. Im Anschluss wurden 6 ml des Gemisches aus DMSO und NaH_2PO_4 mit 30 µl Meerrettich-Peroxidase versetzt und hiervon jeweils 50 µl in jedes *well* pipettiert und 10 min unter dem Abzug inkubiert. Anhand der Standardverdünnungsreihe wurde eine Eichgerade ermittelt. Die jeweils gemessenen Absorptionen der Proben wurden mit dem Leerwert korrigiert und die H_2O_2-Konzentrationen anhand der Eichgerade der Standardreihe berechnet.

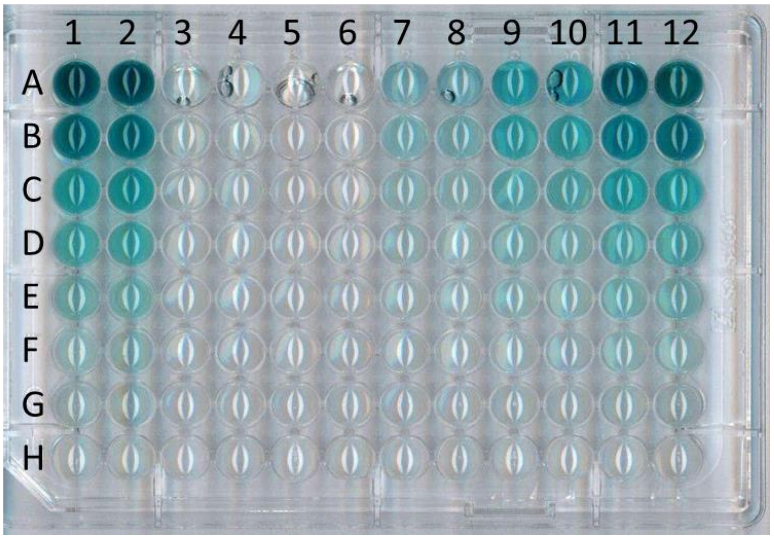


Abbildung 2-4 Originalabbildung der Versuchsanordnung einer 96-Wellplatte für den H_2O_2-Assay

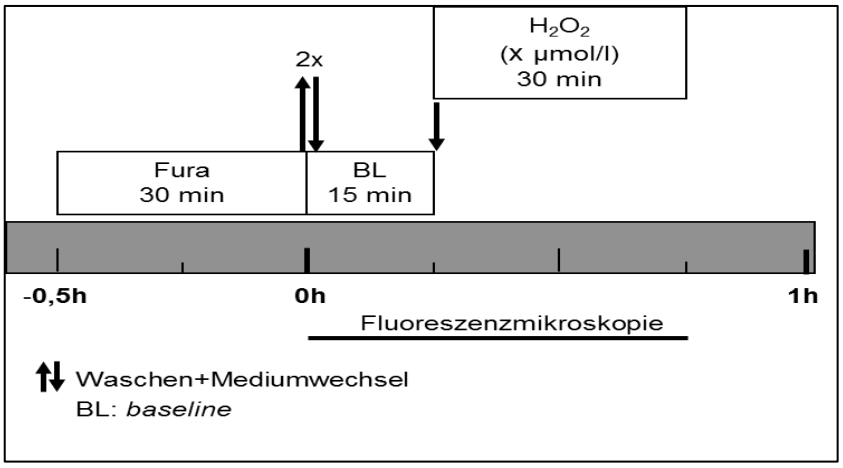
2.6 Einschlusskriterien

Die humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen wurden unter einem Lichtmikroskop kontrolliert und nur nach Erfüllung folgender Kriterien verwendet:

- Zelldichte: 20.000 – 25.000 Zellen/cm²
- HPMEC der Passagen 4-7
- Keine lichtmikroskopisch erkennbaren intrazellulären Vakuolen
- Intakter Zellkern
- 80 – 90 %ige Zellkonfluenz
- Reproduzierbares Ca^{2+} - Signal auf ATP – Applikation
- Physiologische Morphologie der Endothelzellen

2.7 Versuchsprotokolle für die Messung des intrazellulären Ca^{2+}

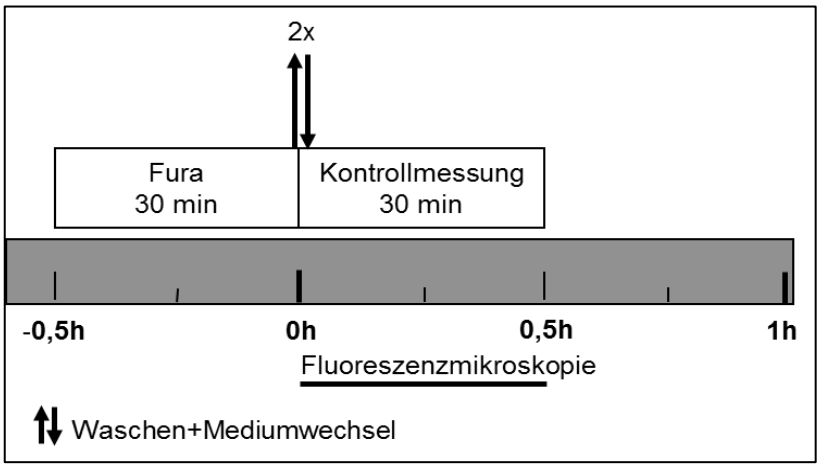
2.7.1 H_2O_2 - Stimulation



Protokoll 1: H_2O_2 – Stimulation

Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse auf Einzelzell-Ebene wurden HPMEC 30 min lang mit FURA-2/AM beladen und zweimalig mit HBS-Puffer (Pfeile) gewaschen. Anschließend wurde über 15 min die Ausgangswerte (BL) gemessen. Danach erfolgte die EC-Stimulation mit verschiedenen H_2O_2- Konzentrationen (50 - 1200 µM) jeweils über einen Zeitraum von 30 min und parallel dazu die fluoreszenzmikroskopische Messung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration.

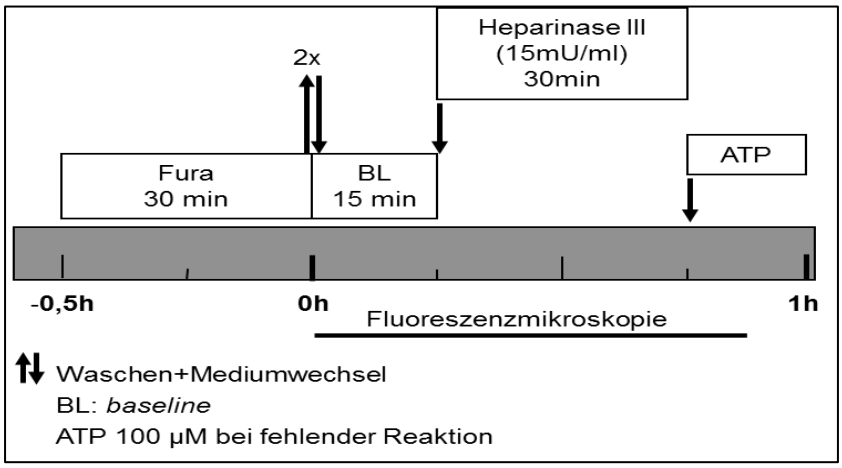
2.7.2 Ca^{2+} - Messungen unter Kontrollbedingungen



Protokoll 2: Ca^{2+}- Messungen unter Kontrollbedingungen

Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse auf Einzelzell-Ebene wurden HPMEC 30 min lang mit FURA-2/AM beladen und zwei Mal mit HBS-Puffer (Pfeile) gewaschen. Anschließend wurde über 30 min die intrazelluläre Kalziumkonzentration mittels fluoreszenzmikroskopischer Messung bestimmt.

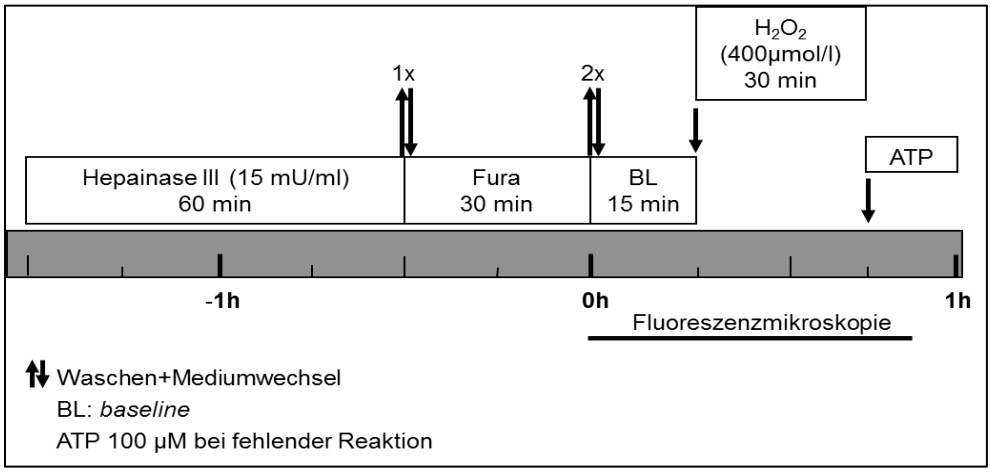
2.7.3 Heparinase III - Applikation



Protokoll 3: Heparinase III – Applikation

Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse auf Einzelzell-Ebene wurden HPMEC 30 min lang mit FURA-2/AM beladen und zwei Mal mit HBS-Puffer gewaschen (Pfeile). Anschließend wurden 15 min lang die Ausgangswerte gemessen (BL) und Heparinase III appliziert. Gemessen wurde über einen Zeitraum von 30 min mit anschließender Applikation von ATP zur Vitalitäts-Kontrolle und parallel dazu erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Messung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration.

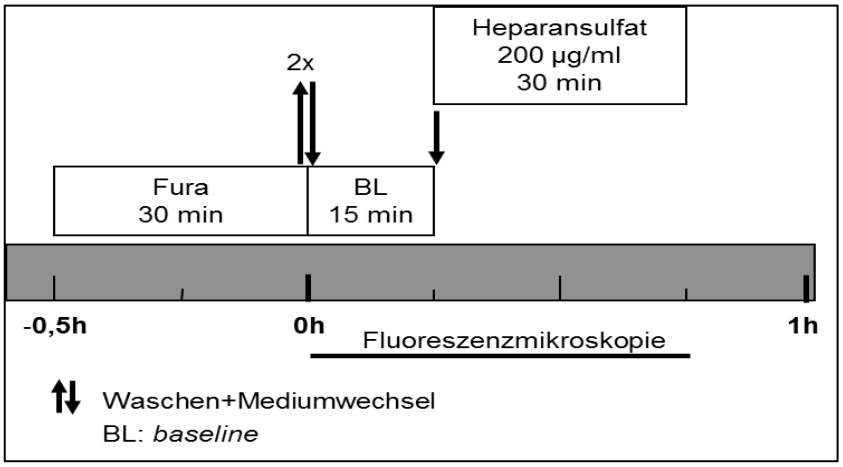
2.7.4 Heparinase III Applikation vor H_2O_2 - Stimulation



Protokoll 4: Heparinase III Applikation und anschließende H_2O_2 - Stimulation

Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse auf Einzelzell-Ebene wurden HPMEC 60 min lang mit Heparinase III vorinkubiert, zweimalig mit HBS-Puffer gewaschen (Pfeile) und mit FURA-2/AM beladen. Es folgte ein erneuter Waschgang und einer 15-minütigen Messung der Ausgangswerte (BL). Danach Stimulation mit 400 µM H_2O_2 über 30 Minuten, sowie eine anschließende Vitalitäts-Kontrolle mittels ATP und parallel dazu erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Messung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration.

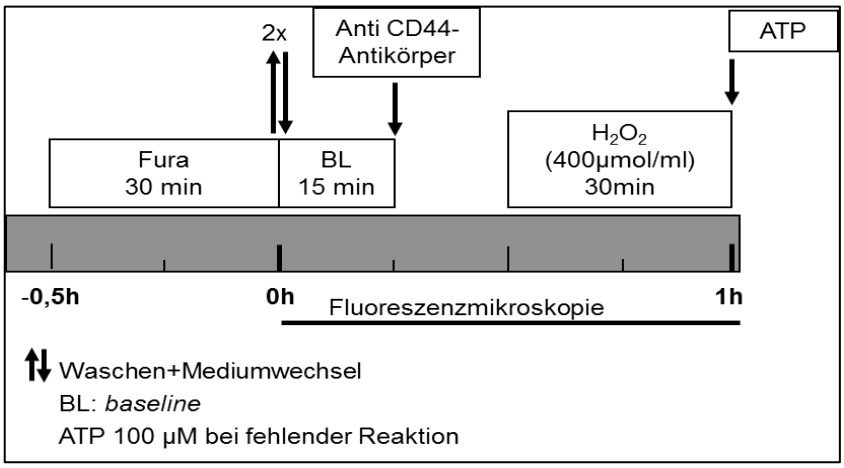
2.7.5 Heparansulfat - Applikation



Protokoll 5: Heparansulfat - Applikation

Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse auf Einzelzell-Ebene wurden HPMEC 30 min lang mit FURA-2/AM beladen und zweimalig mit HBS-Puffer (Pfeile) gewaschen. Anschließend wurden über 15 min eine *baseline* (BL) gemessen mit darauffolgender Applikation von Heparansulfat - parallel dazu wurde die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt.

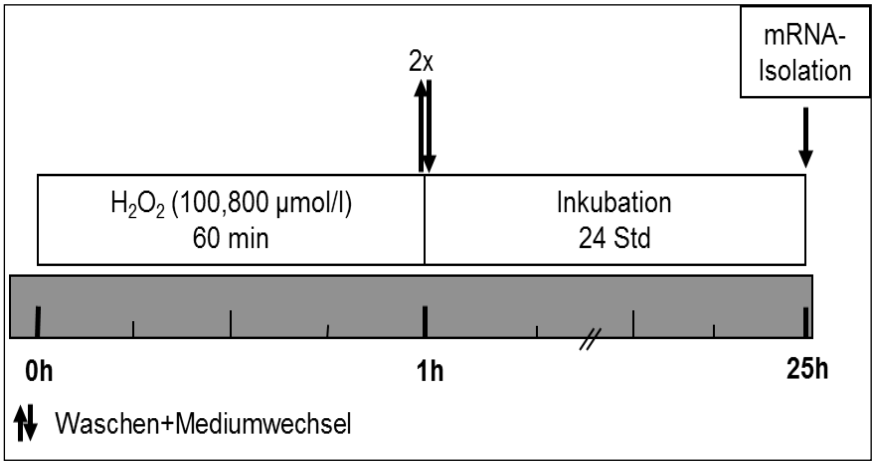
2.7.6 Anti CD44-Antikörper Applikation vor H_2O_2 - Stimulation



Protokoll 6: Anti CD44-Antikörper - Applikation und anschließende H_2O_2 - Stimulation

Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse auf Einzelzell-Ebene wurden HPMEC 30 min lang mit FURA-2/AM beladen und zwei Mal mit HBS-Puffer gewaschen (Pfeile). Anschließend wurden über 15 min die Ausgangswerte gemessen und die HPMEC mit dem Anti CD44-Antikörper Klon B-F24 inkubiert. Nach 15 min wurden 400 µM H_2O_2 appliziert. Als Positivkontrolle diente ATP. Parallel dazu wurde die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration mittels Fluoreszenzmikroskopie gemessen.

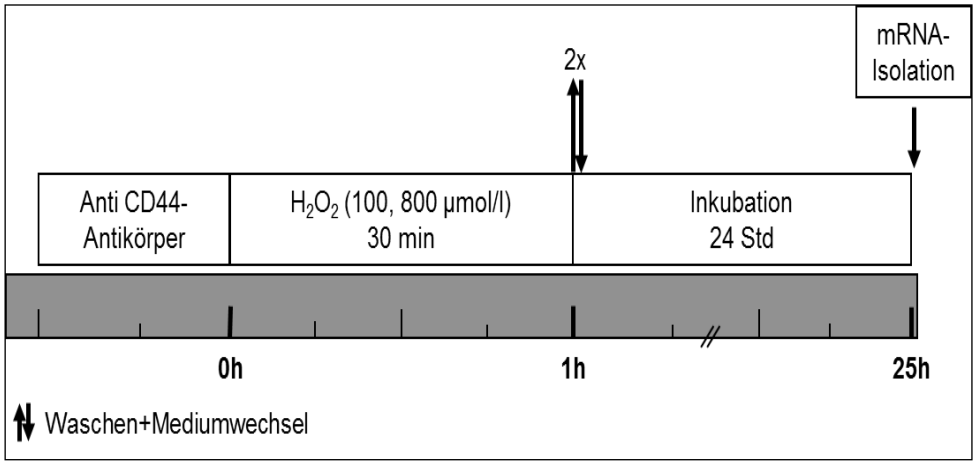
2.7.7 HPMEC-Stimulation über eine Stunde mit H_2O_2



Protokoll 7: HPMEC-Stimulation über eine Stunde mit H_2O_2

Zur mRNA-Isolation wurden HPMEC 60 min mit 100 oder 800 µM H_2O_2 stimuliert. Anschließend zweimalig mit HBS-Puffer gewaschen (Pfeile) und inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die mRNA isoliert.

2.7.8 HPMEC-Stimulation über eine Stunde mit H_2O_2, nach Vorinkubation mit einem Anti CD44-Antikörper



Protokoll 8: HPMEC-Stimulation über eine Stunde mit H_2O_2 nach Vorinkubation mit einem Anti CD44-Antikörper

HPMEC wurden für 30 min mit einem Anti CD44-Antikörper Klon B-F24 vorinkubiert. Anschließend erfolgte die 60minütige Stimulation mit 100 oder 800 µM H_2O_2. Nach zweimaligem Waschen mit HBS-Puffer und Mediumwechsel (Pfeile) wurden die EC für weitere 24 Stunden inkubiert und darauffolgend die mRNA isoliert.

2.8 Applizierte Substanzen

2.8.1 Heparansulfat

Heparansulfat gehört zu den GAG und wird auf Endothelzelloberflächen am häufigsten exprimiert. Somit könnte es sich zur selektiven Regulierung und Interaktion mit vielen Proteinen eignen (Ori et al. 2008, Pries et al. 2000). Hier wurden HPMEC mit nativem HS (HS sodium salt from bovine kidney, Fa. Sigma, München) stimuliert. Mit einem Volumen von 2 ml HBS-Puffer und einer HS-Konzentration von 200 µg/ml wurden die EC 30 min inkubiert.

2.8.2 Heparinase III

Heparinase III (Flavobact. heparinum (10 U), Fa. Sigma, München) ist ein Enzym, welches HS spezifisch degradiert (Okada et al. 2002, Oike et al. 2008). Hier wurde eine Hepatinase III-Konzentration von 15 mU/ml (Dull et al. 2004) in 2 ml HBS-Puffer angesetzt und die EC für 60 min inkubiert.

2.8.3 Mouse Anti-Human CD44 Monoclonal Antibody, Clone B-F24

Der CD44-Rezeptor der Glykokalyx spielt eine immer bedeutendere Rolle während inflammatorischer Prozesse (Campo et al. 2010, Wang et al. 2002). Der hier verwendete Anti CD44-Antikörper, Clone B-F24, der Fa. Abcam, wurde 50fach verdünnt und in einer Endkonzentration von 20 µl/ml auf ein Volumen von 2 ml auf die EC appliziert. Nach einer 30minütigen Vorinkubation verblieb der Antikörper auf den EC.

3. Statistik

Die fluoreszenzmikroskopischen Versuche wurden gemittelt und mit dem jeweiligen Standardfehler des Mittelwerts (*SEM:* standard error of means) dargestellt.

Um auszuschließen, dass Unterschiede der absoluten Genexpression an verschiedenen Versuchstagen die Resultate beeinflussen können, wurden die Versuchsergebnisse prozentualisiert. Hierbei wurden die Daten auf die unstimulierte Expression des jeweiligen Gens (= 100 %) bezogen.

Zur statistischen Ermittlung der Signifikanz dieser Mittelwerte wurde die *One-Way ANOVA* angewendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0{,}05$ wurde als signifikant betrachtet. Dieses wurde in den graphischen Darstellungen mit * gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

4.1 Fluoreszenzmikroskopie

Exemplarisch für jedes Versuchsprotokoll (siehe 2.7) sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gezeigt. Dabei wird das Fluoreszenzintensitätsverhältnis von 340 nm / 380 nm als *Ratio* angegeben und in Falschfarbe dargestellt. So steht eine *Ratio* von < 1 für eine niedrige intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration und zeigt blaue Endothelzellen (siehe Abbildung 4-1a). Endothelzellen, welche durch H_2O_2 stimuliert wurden haben eine *Ratio* von > 1, im Sinne einer hohen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und stellen sich rot dar (siehe Abbildung 4-1d).

4.1.1 Ca^{2+} - Messungen unter Kontrollbedingungen und nach H_2O_2-Stimulation

Zu Beginn der fluoreszenzmikroskopischen Messung (*baseline*) (Bild a) findet sich in den HPMEC eine niedrige intrazelluläre Kalzium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) bei einer *Ratio* von 0,64 ± 0,03, dadurch bedingt stellen sich die EC blau dar. Auch nach fünf-minütiger Messung zeigt sich keine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels (Bild b) gemessen als 340 nm / 380 nm *Ratio* – die HPMEC bleiben gleichmäßig blau. Werden unstimulierte Endothelzellen (Bild c) mit 400 µM H_2O_2 stimuliert, steigt $[Ca^{2+}]_i$ an, da sich die *Ratio* auf 1,53 ± 0,13 erhöht - die EC stellen sich nun in der Falschfarbe rot dar.

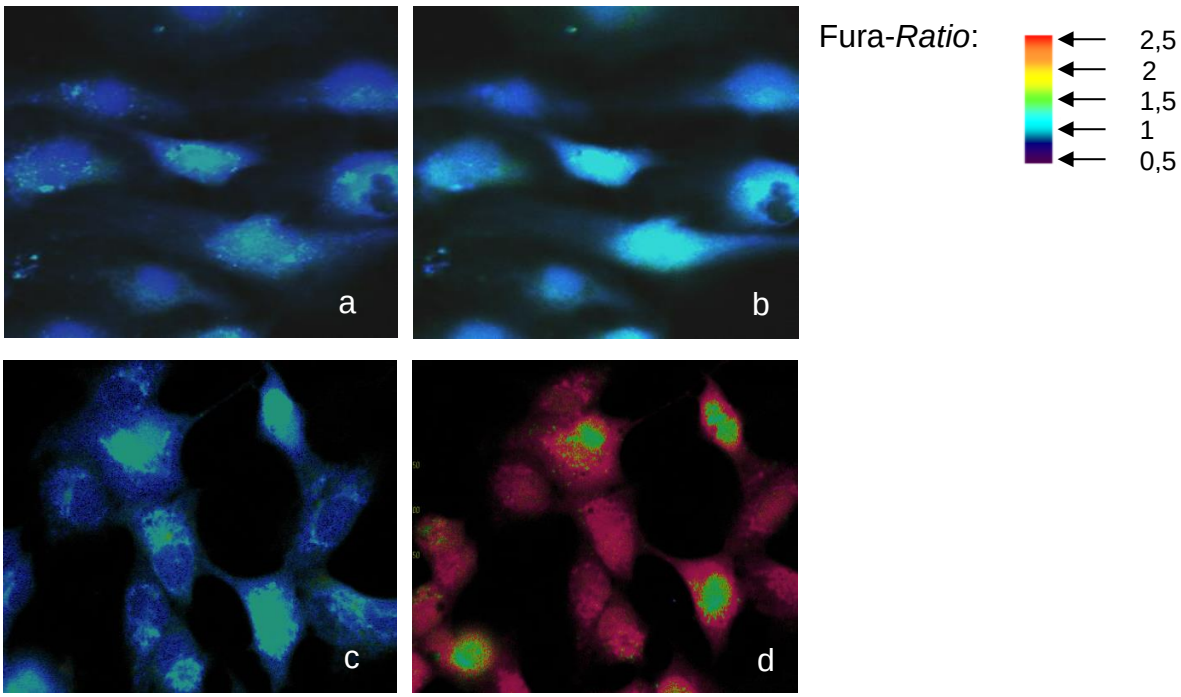


Abbildung 4-1 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

Bild a zeigt Endothelzellen in HBS-Puffer unter Kontrollbedingungen (*baseline*). Nach weiteren 5 Minuten zeigen die Endothelzellen keinen Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ (Bild b). Bild c zeigt unstimulierte Endothelzellen unter Ausgangsbedingungen. Nach Stimulation mit 400 µM H_2O_2 steigt die intrazelluläre Ca^{2+} - Konzentration an (Bild d) und die Endothelzellen stellen sich bei erhöhter 340 nm / 380 nm *Ratio* in der Falschfarbe rot dar.

4.1.2 Exemplarische Ca^{2+} - Messung zur Dosisfindung, mit Einzelwertdarstellung

Zur Darstellung je eines exemplarischen Versuchs dient Abbildung 4-2. Hierzu wurde die intrazelluläre Kalzium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) der Endothelzellen in HBS-Puffer mittels Fluoreszenzmikroskopie gemessen. Unter Kontrollbedingungen zeigten die EC keinen Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ bei einer *Ratio* von 0,66 ± 0,12 (schwarze Linie, horizontal verlaufend). Im Gegensatz dazu zeigten Endothelzellen, welche nach 15 Minuten (*baseline)* mit 400 µM H_2O_2 stimuliert wurden, einen Anstieg der 340 nm / 380 nm *Ratio* von 0,56 ± 0,03 auf maximal 3,94 (rote Punkte stellen einzelne Messpunkte in stimulierten Endothelzellen dar, der schwarze Graph innerhalb dieser Messpunkte stellt den Median dar).

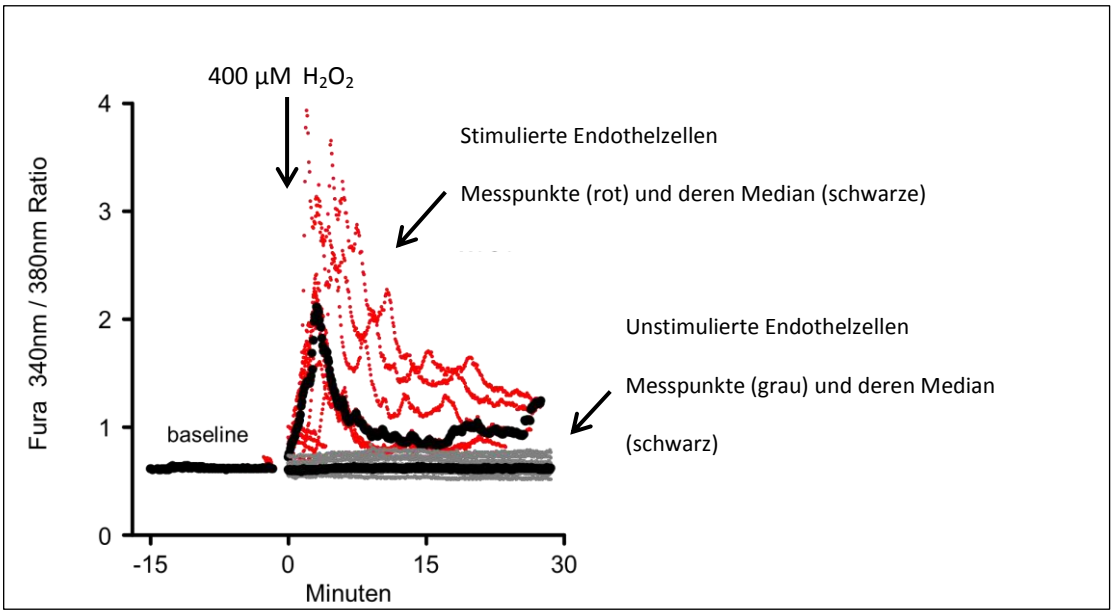


Abbildung 4-2 Exemplarische Darstellung eines einzelnen Versuchs zur Dosisfindung nach Stimulation mit 400 µM H_2O_2.

Endothelzellen wurden 15 min in HBS Puffer inkubiert (*baseline*) und anschließen mit 400 µM H_2O_2 stimuliert. Während HPMEC unter Kontrollbedingungen ohne Stimulation und in HBS Puffer keinen Anstieg auf H_2O_2 verzeichneten (schwarze Linie, horizontal verlaufend ab 0 Minuten), reagierten stimulierte EC mit einem Anstieg des intrazellulären Kalziums (rote Messpunkte – innerhalb der Messpunkte verläuft der Median dieser Messung – schwarzer Graph) welches aus einer Erhöhung der 340 nm / 380 nm *Ratio* resultiert.

4.1.3 Versuche zur Dosisfindung

Die Ergebnisse der Stimulationsversuche mit unterschiedlichen H_2O_2-Konzentrationen fasst Abb. 4-3 a jeweils als maximale *Ratio* der EC zusammen.

Die mittleren 340 nm / 380 nm *Ratio's* der Einzelversuche (je n = 10) sind in Abb. 4-3 b – h zusammengefasst. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM der Ausgangswerte und bei unterschiedlichen H_2O_2-Konzentrationen. Dabei zeigten die Endothelzellen auf H_2O_2-Konzentrationen < 200 µM bei einer *Ratio* von 0,75 ± 0,06 keinen signifikanten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ im Vergleich zur Ausgangsmessung (siehe Abbildungen 4-3 b bis d). Ist die Stimulationskonzentration ≥ 400 µM H_2O_2, reagierten die Zellen mit einem signifikanten Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ (siehe Abbildung 4-3 f bis h) bei Erhöhung der *Ratio* auf 2,86 ± 0,88, im Vergleich zur Ausgangsmessung.

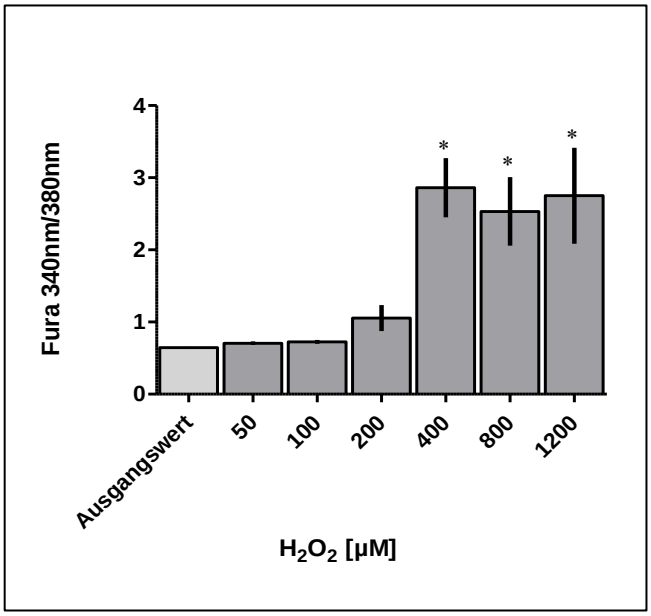


Abbildung 4-3 a Zusammenfassung der Dosisfindung

Mittelwerte ± SEM der Ausgangswerte und unterschiedliche H_2O_2-Konzentrationen. Dargestellt ist die maximalen (a) 340 nm / 380 nm *Ratio* (b – h) pro H_2O_2-Konzentration. Bis einschließlich einer Konzentration von 200 µM H_2O_2 ist kein signifikanter Anstieg der *Ratio* zu erkennen. Erst Konzentrationen zwischen 400 und 1200 µM H_2O_2 führen zu einem signifikanten Anstieg der *Ratio*.

* $p < 0,05$ vs. Ausgangswert

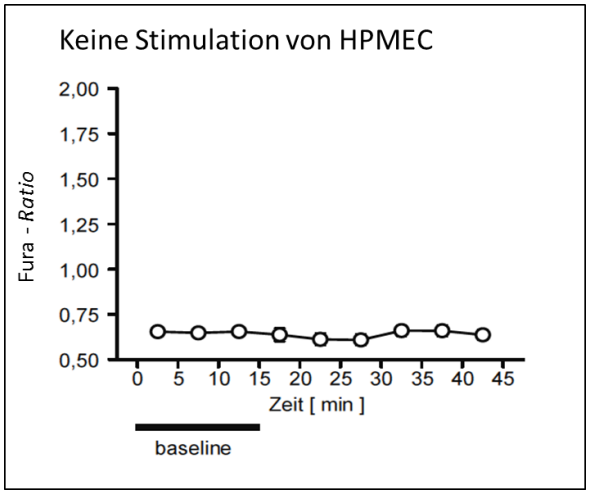


Abbildung 4-3 b Keine Stimulation von HPMEC

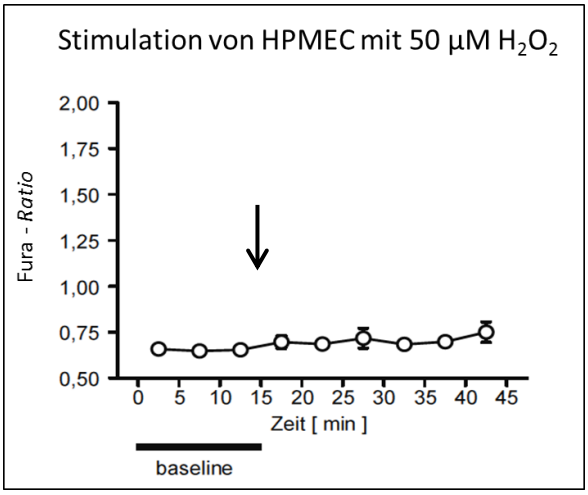


Abbildung 4-3 c Stimulation mit 50 µM H_2O_2

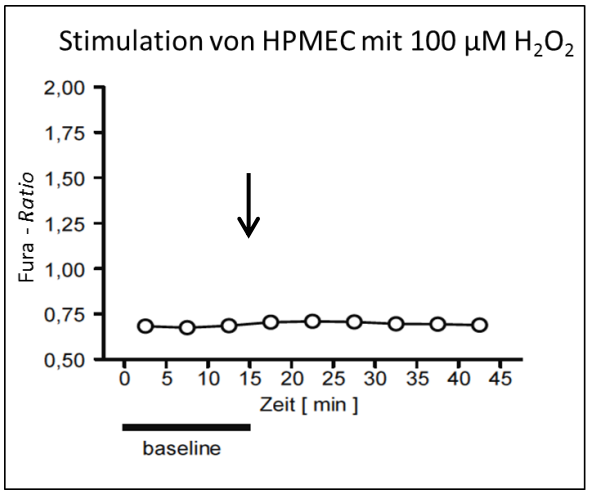


Abbildung 4-3 d Stimulation mit 100 µM H_2O_2

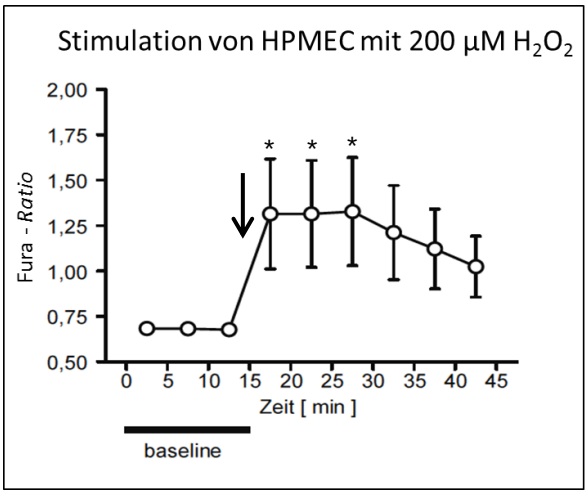


Abbildung 4-3 e Stimulation mit 200 µM H_2O_2

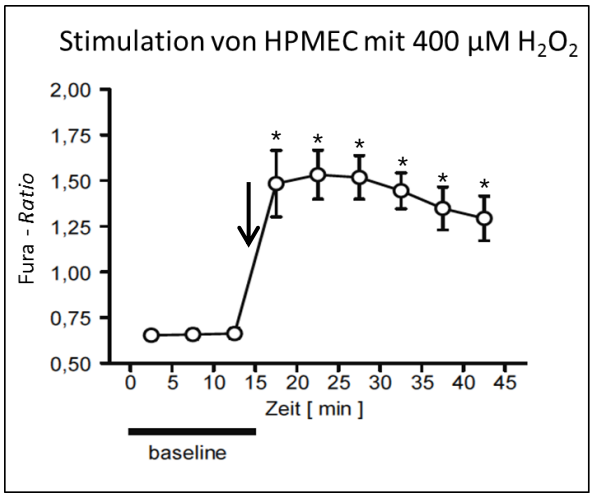


Abbildung 4-3 f Stimulation mit 400 µM H_2O_2

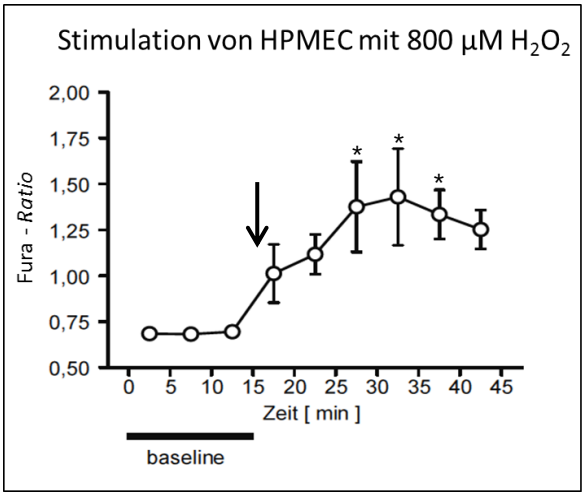


Abbildung 4-3 g Stimulation mit 800 µM H_2O_2

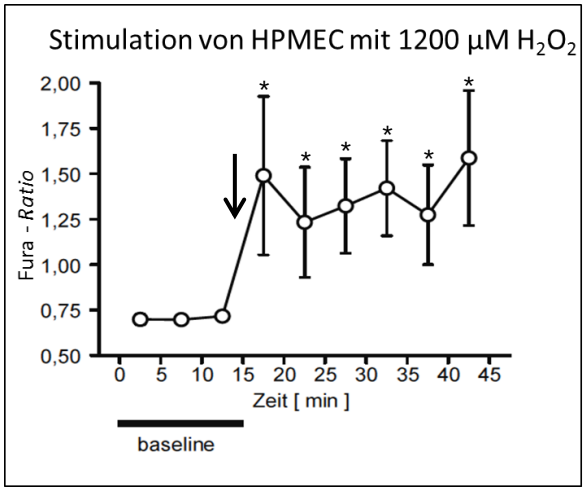


Abbildung 4-3 h Stimulation mit 1200 µM H_2O_2

* $p < 0,05$ vs. Ausgangswert (*baseline*)

4.1.4 Ca^{2+} – Messung nach Heparinase III Applikation, nach Vorinkubation mit Heparinase III und anschließender Stimulation mit 400 µM H_2O_2, sowie nach Applikation von Heparansulfat

Die Inkubation von Endothelzellen mit HS führte per se zu keinem Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ (*Ratio* 0,72 ± 0,23) (siehe Abbildung 4-4 a). Auch auf die Applikation von Heparinase III alleine reagierten die EC nicht mit einem Anstieg der *Ratio* (0,83 ± 0,5) (siehe Abbildung 4-4 b). Auch nach anschließender Stimulation mit 400 µM H_2O_2 blieb eine Reaktion der HPMEC, bei einer *Ratio* von 0,81 ± 0,66, aus (siehe Abbildung 4-4 c). Insgesamt wurde jeder Versuchsaufbau sieben Mal durchgeführt und als Mittelwerte ± SEM der Ausgangswerte und zu unterschiedlichen Zeitpunkten dargestellt.

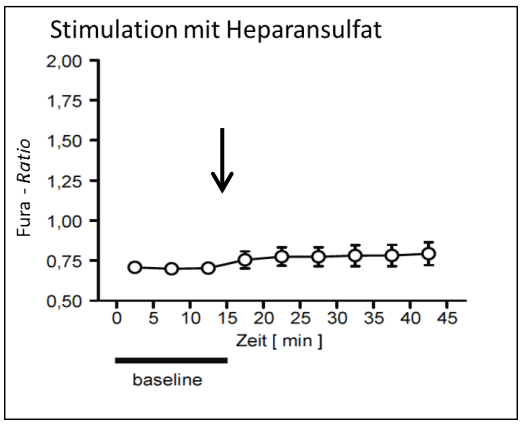


Abbildung 4-4 a Stimulation mit Heparansulfat

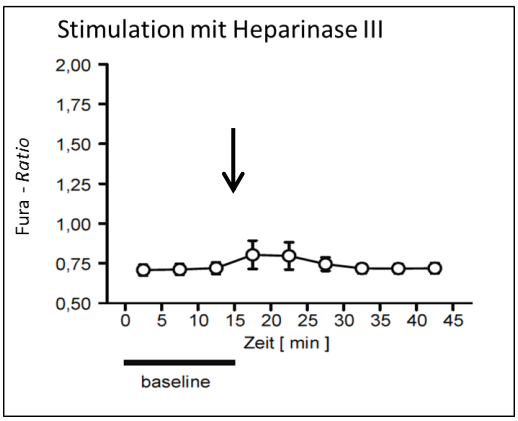


Abbildung 4-4 b Stimulation mit Heparinase III

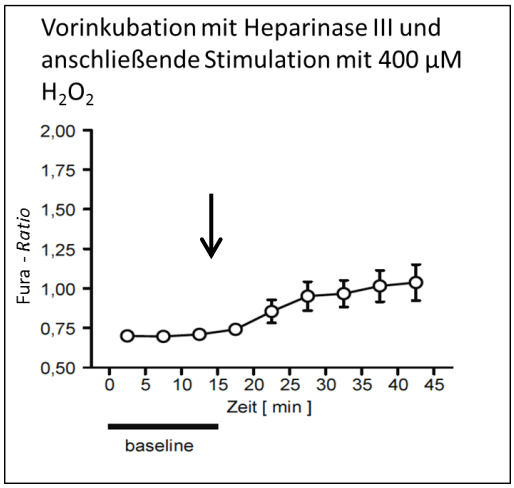


Abbildung 4-4 c Vorinkubation mit Heparinase III und anschließender Stimulation mit 400 µM H_2O_2

4.1.5 Ca^{2+} – Messung nach Vorinkubation mit dem Anti CD44-Antikörper, Klon B-F24 und Stimulation mit 400 µM H_2O_2

Auf die Applikation des Anti CD44-Antikörpers Klon B-F24, reagierten die Endothelzellen nicht mit einem Anstieg der Ratio (0,66 ± 0,92), im Vergleich zur Ausgangsmessung (siehe Abbildung 4-5 a). Die anschließende Applikation von 400 µM H_2O_2 führte zu keinem signifikanten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration, resultierend aus einem fehlendem Anstieg der Fura-*Ratio* (0,71 ± 0,02) (siehe Abbildung 4-5 b). Dargestellt sind die Ergebnisse von zehn Versuchen mit Ihren Mittelwerten ± SEM der Ausgangswerte und zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

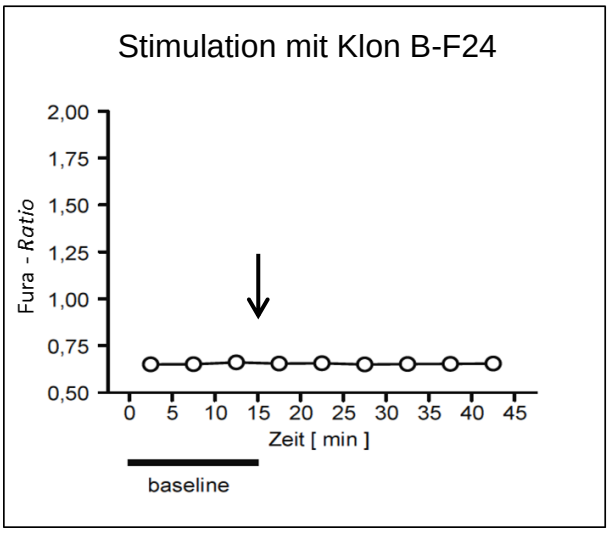


Abbildung 4-5 a Stimulation mit dem Anti CD44-Antikörper, Klon B-F24

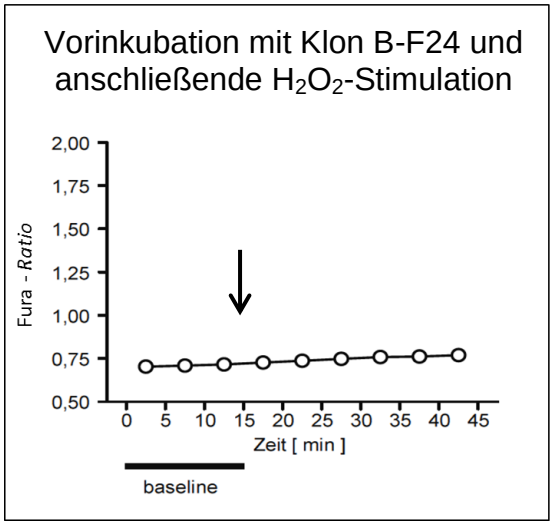


Abbildung 4-5 b Vorinkubation mit dem Anti CD44-Antikörper, Klon B-F24 und anschließender Stimulation mit 400µM H_2O_2

4.1.6 Intergruppenvergleich

Die bisherigen Resultate werden in einem Intergruppenvergleich in Abbildung 4-5 c zusammengefasst. Die Applikation von 400 µM H_2O_2 führte zu einem signifikanten Anstieg der Fura-Ratio im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle von 0,61 ± 0,03 auf 1,53 ± 0,13 (jeweils der Zeitpunkt 5 – 10 Minuten nach Beginn der jeweiligen Stimulation). Sowohl die Vorbehandlung der Zellen mit Hep III als auch mit dem Anti CD44-Antikörper Klon B-F 24 blockierten diesen H_2O_2-induzierten Anstieg.

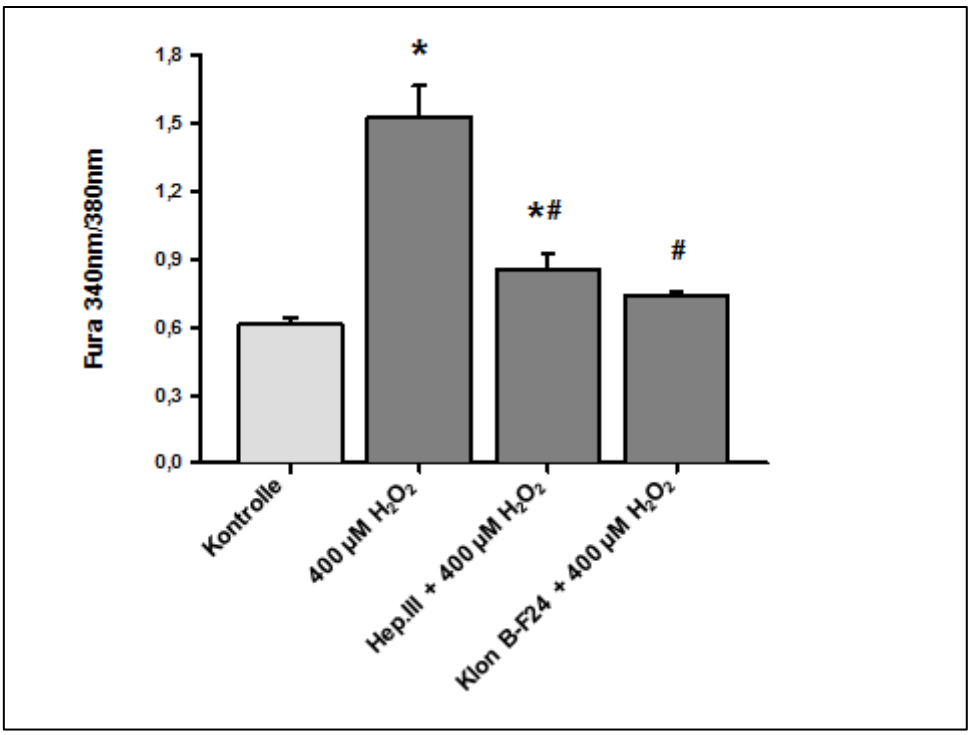


Abbildung 4-5 c Intergruppenvergleich

Mittelwerte ± SEM der Fura *Ratio* jeweils zum Zeitpunkt 5 - 10 Minuten nach Beginn der jeweiligen Stimulation.

Die dargestellten Werte entsprechen den Abbildungen 4-3 b (Kontrolle), 4-3 f (400 µM H_2O_2) , 4-4 c (Hep III + 400 µM H_2O_2) und 4-5 b (Klon B-F24 + 400 µM H_2O_2).

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle

\# $p < 0,05$ vs. 400 µM H_2O_2

4.2 HPMEC-Genexpression nach H_2O_2-Stimulation über eine Stunde

4.2.1 GAPDH

Als Kontrollgen diente in allen Versuchen die GAPDH. Abbildung 4-6 zeigt die Ergebnisse der densitometrischen Auswertungen der rt-PCR-Gele. Es ergab sich nach einer Stunde kein signifikanter Expressionsunterschied nach Stimulation mit 100 µM oder 800 µM H_2O_2, im Vergleich zu unstimulierten EC. Auch die Vorinkubation mit dem Anti CD44- Antikörper Klon B-F24 zeigte keinen Effekt auf die GAPDH-Expression. Die Stimulationen wurden fünfmalig pro Versuchsgruppe durchgeführt.

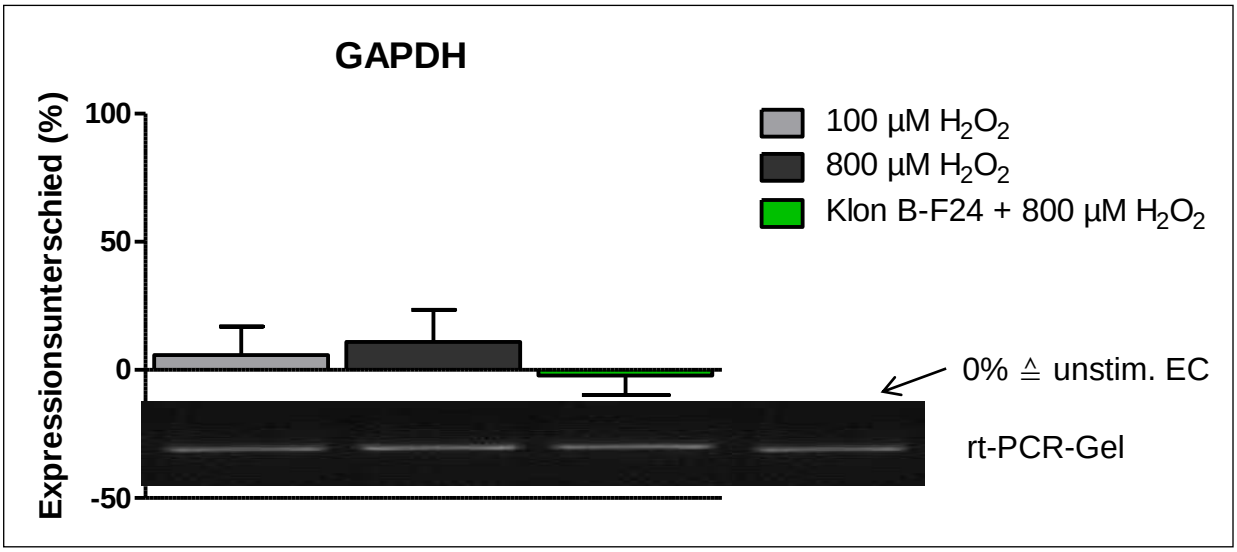


Abbildung 4-6 GAPDH-Genexpression nach HPMEC-Stimulationen über eine Stunde

Mittelwerte ± SEM der Expression der GAPDH Menge [%] im Verhältnis zu unstimulierten Endothelzellen. Hellgrau: 1 Stunde Stimulation mit 100 µM H_2O_2, dunkelgrau: 1 Stunde Stimulation mit 800 µM H_2O_2, grün: 30 Minuten Vorinkubation mit dem Anti CD44-Antikörper Klon B-F24 und anschließende einstündige Stimulation mit 800 µM H_2O_2.

4.2.2 CD44

Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertungen der rt-PCR-Gele sind in Abbildung 4-7 zusammengefasst. Es ergab sich kein signifikanter Expressionsunterschied von CD44 nach einstündiger Stimulation mit 100 µM (6,01% ± 8,56%) oder 800 µM H_2O_2 (9,56% ± 11,57%) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Der Anti CD44-Antikörper Klon B-F24 hatte keinen Einfluss auf die CD44-Genexpression (-3,25% ± 6,24%). Die Stimulationen wurden fünfmalig pro Versuchsgruppe durchgeführt.

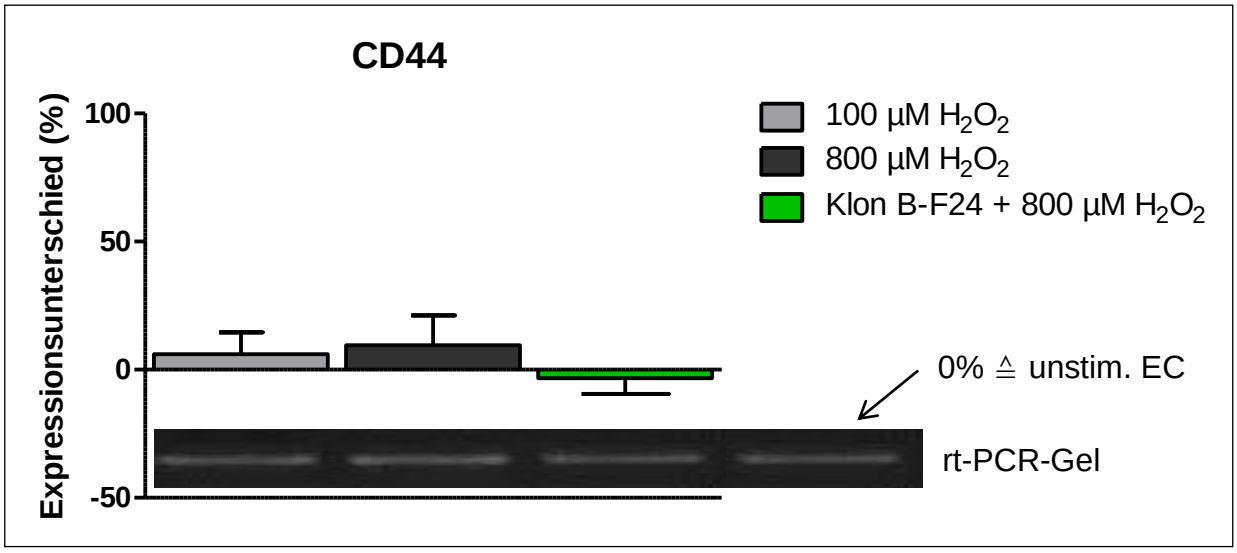


Abbildung 4-7 CD44-Genexpression nach HPMEC-Stimulationen über eine Stunde

Mittelwerte ± SEM der Expression von CD44 [%] im Verhältnis zu unstimulierten Endothelzellen. Hellgrau: 1 Stunde Stimulation mit 100 µM H_2O_2, dunkelgrau: 1 Stunde Stimulation mit 800 µM H_2O_2, grün: 30 Minuten Vorinkubation mit einem Anti CD44-Antikörper Klon B-F24 und anschließende einstündige Stimulation mit 800 µM H_2O_2.

4.2.3 iNOS

Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertungen der rt-PCR-Gele zeigt Abbildung 4-8. Die Stimulation mit 100 µM (171,9% ± 40,99%) oder 800 µM (147,21% ± 34,34%) H_2O_2 führte gegenüber unstimulierten HPMEC zu einer signifikanten Expression der iNOS nach einer Stunde. Durch Vorinkubation mit dem Anti CD44-Antikörpern Klon B-F24 konnte die H_2O_2-induzierte iNOS-Expression verhindert werden (-26,48% ± 6,03%). Die Stimulationen wurden fünfmalig pro Versuchsgruppe durchgeführt.

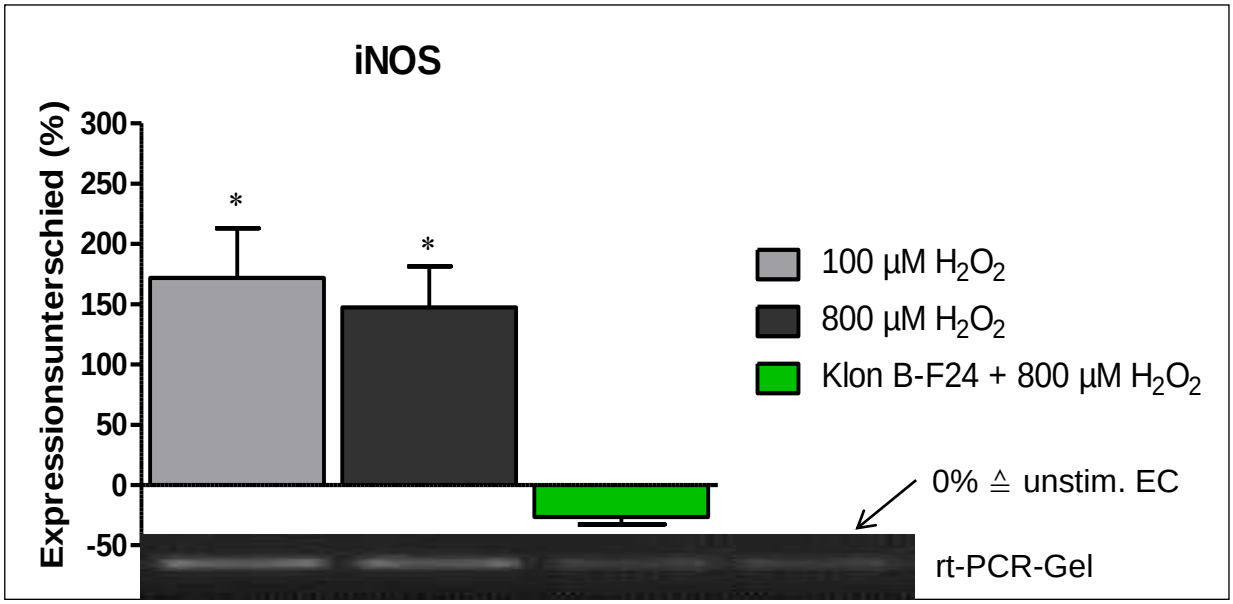


Abbildung 4-8 iNOS-Genexpression nach HPMEC-Stimulationen über eine Stunde

Mittelwerte ± SEM der Expression von iNOS [%] im Verhältnis zu unstimulierten Endothelzellen. Hellgrau: 1 Stunde Stimulation mit 100 µM H_2O_2, dunkelgrau: 1 Stunde Stimulation mit 800 µM H_2O_2. Es kommt zu einem signifikanten Anstieg der iNOS-Genexpression gegenüber unstimulierten HPMEC. Grün: 30 Minuten Vorinkubation mit dem Anti CD44-Antikörper Klon B-F24 und anschließend 1 Stunde Stimulation mit 800 µM H_2O_2.

* $p < 0,05$ vs. unstimulierte Endothelzellen

4.3 H_2O_2-Assay

Abbildung 4-9 zeigt die Konzentrationen von Wasserstoffperoxid im Medium nach Beginn der Applikation. Es ist ersichtlich, dass sich nach direkter H_2O_2-Applikation die applizierten Konzentrationen nicht von den Ausgangskonzentrationen unterscheiden. Im Gegensatz dazu zeigten die Messungen eine Stunde nach Beginn der Stimulation eine signifikante Reduktion der H_2O_2-Konzentrationen (z.B. bei 400 µM auf 67,81 µM ± 9,33 µM und 3200 µM H_2O_2 auf 915,01 µM ± 118,04 µM). Insgesamt wurden zu jedem Zeitpunkt fünf Versuche pro H_2O_2-Konzentration durchgeführt.

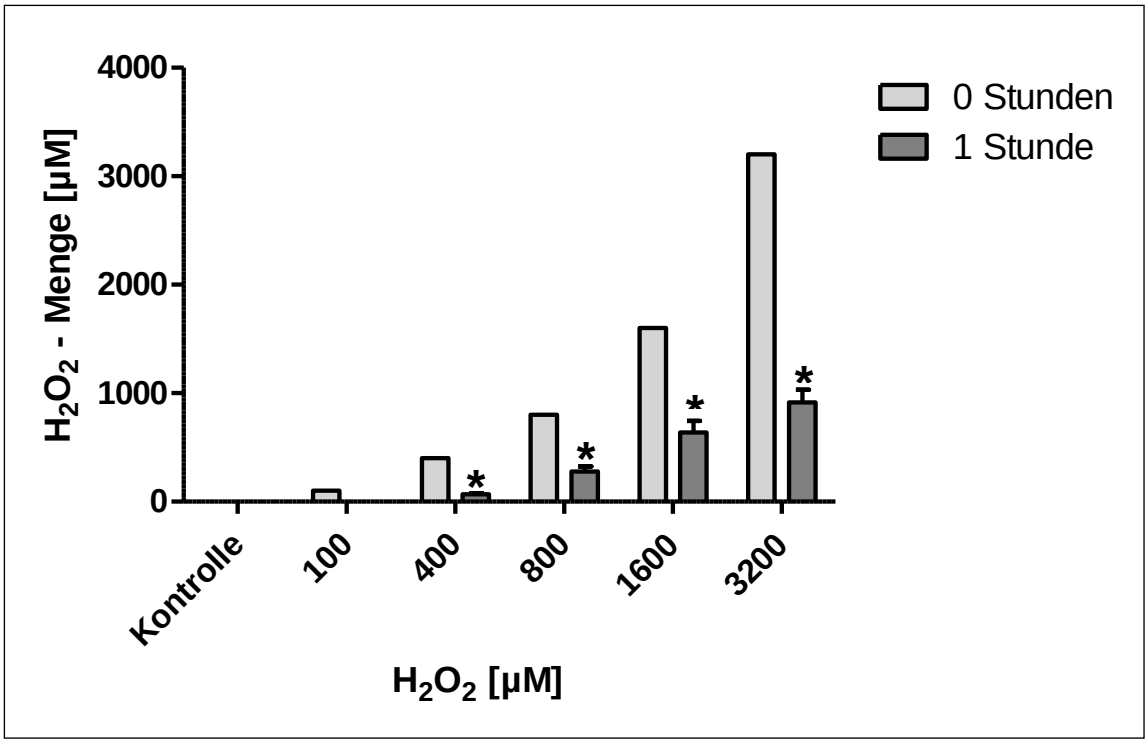


Abbildung 4-9 Auswertung des H_2O_2-Assays.

Mittelwerte ± SEM der H_2O_2-Mengen [µM] im Medium zu zwei Zeitpunkten und unterschiedlichen Konzentrationen. Hellgrau: direkt nach H_2O_2-Applikation, dunkelgrau: 1 Stunde nach H_2O_2-Applikation.

* $p < 0,05$ vs. Ausgangskonzentration

5. Diskussion

5.2 Diskussion der Methodik

5.2.1 Humane pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen

Die Lunge nimmt im Vergleich zu anderen Organen wie Herz, Leber und Niere, eine Sonderstellung ein, da sie durch ihr großes Kapillarbett eine sehr große Endotheloberfläche und einen großen physiologischen ‚Leukozytenpool' besitzt. Meiner Arbeit liegt zu Grunde, dass bei einem akuten Lungenschaden (*ALI*) und beim *ARDS* das mikrovaskuläre Endothel der Lunge als erstes in Kontakt mit aktivierten Leukozyten kommt. Diese setzen ein hochwirksames Arsenal an Enzymen frei (siehe Abbildung 1-1), welches so zu einer mikrovaskulären Schädigung (Kiefmann et al. 2004 a,b) führen könnte.

Humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen (HPMEC) in Primärkultur wurden bisher nur unzureichend untersucht, bieten sie jedoch ideale Ausgangsbedingungen um den Pathomechanismus des akuten Lungenschadens zu untersuchen.

Endothelzellen befinden sich nicht nur in der Lunge und in der Nabelschnur, sondern auch in der Haut, im Darm, im Gehirn und in der Plazenta. Obwohl sich mikrovaskuläre Endothelzellen (EC) in vielen funktionellen und morphologischen Eigenschaften ähneln, unterscheiden sie sich doch deutlich von makrovaskulären EC. Auch innerhalb eines Organes gibt es große Unterschiede in der Morphologie, den Oberflächenproteinen, der Genexpression und der Funktion (Aird WC 2010, Thorin und Shreeve 1998, Geiger et al. 1997, Spanel-Borowski et al. 1994, Fenyves et al. 1993). Derweilen gibt es leider nur sehr wenige Untersuchungen auf dem Gebiet der Heterogenität der EC (Tse und Stan 2010, Molema G 2010, Pries und Kuebler 2006, Ribatti et al. 2002, Goerdt und Sorg 1992, McCarthy et al. 1991,

Belloni und Tressler 1990, Gerritsen ME 1987) und noch weniger auf dem Gebiet der HPMEC (Stevens T 2005, Gebb und Stevens 2004).

Eines der größten Probleme und Einschränkung stellt die schwierige Kultivierung dar. So verlieren und/oder verändern HPMEC spezifische Zelleigenschaften und Fähigkeiten nach mehrfachem Passagieren (Smith et al. 1996). Das hierfür eigens entwickelte Protokoll für die Zellkultur (siehe 2.1.2) behandelte HPMEC so schonend wie möglich. Trotzdem wurden EC für die Versuche bis maximal Passage 7 eingeschlossen, um potentiell veränderte Zelleigenschaften durch mehrfaches Passagieren auszuschließen. Weitere Voraussetzungen für die Verwendung der EC waren eine Zelldichte von 20.000 bis 25.000 Zellen/cm², eine homogene Reaktion der Zellen auf ATP, 80-90%ige Zellkonfluenz und physiologische Endothelzellen-Morphologie in der lichtmikroskopischen Kontrolle (siehe 2.6).

Umweltfaktoren und genetische Prädispositionen sind Gegenstand aktueller Forschung und sollen Grund der vielfältigen Heterogenität (le Noble et al. 2004, Aird WC 2003, Reese et al. 2002, Othman-Hassan et al. 2001) und insbesondere der Beschaffenheit (Aird et al. 1997, Page et al. 1991) der EC sein. Auch die Zellzyklen sind bei HPMEC deutlich kürzer als bei makrovaskulären Zellen (Parra-Bonilla et al. 2010).

5.2.2 Fluoreszenzmikroskopie

Einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in Endothelzellen könnte ein wesentlicher Hinweis für eine mikrovaskuläre, endotheliale und inflammatorische Reaktion sein (Kiefmann et al. 2008). Diese kann, wie in der

vorliegenden Arbeit, mittels des Radikals H_2O_2 hervorgerufen werden (siehe Abbildung 5-1).

Zur Messung der intrazellulären endothelialen Ca^{2+}-Konzentration $[Ca^{2+}]_i$ wurde bei den Versuchen membranpermeables Fura 2-AM appliziert, um die Zellen in der Mikrozirkulation mit Fura anzureichern (siehe 2.2.1).

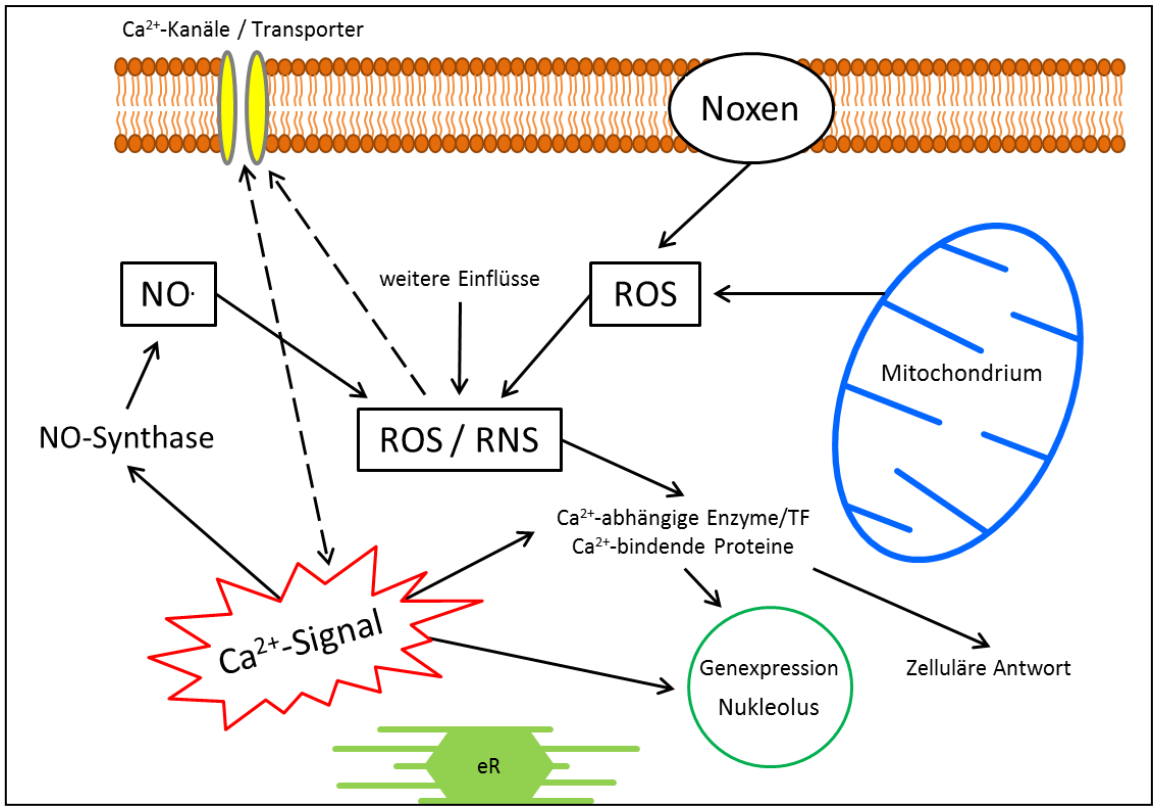


Abbildung 5-1 Zusammenspiel von ROS und Ca^{2+}

Mod. nach Hidalgo und Donoso (2008). ROS modifiziert eR-Ca^{2+}-Kanäle und führt dadurch zu einer Ca^{2+}-Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Darüber verändert es die Funktionalität von Ca^{2+}-abhängigen Enzymen und Transkriptions-Faktoren. Entstehende Ca^{2+}-Signale führen zu einem positiven ‚*feed-back*'- Mechanismus bzgl. ROS-Produktion und Ca^{2+}-Freisetzung, so dass sie Einfluss auf die Genexpression und andere zelluläre Mechanismen haben könnten.

Intrazellulär wird Fura2-AM zu Fura-2 hydrolysiert, welches durch die Änderung der Fluoreszenzeigenschaften bei der Chelat-Bildung mit Kalzium als Ca^{2+}-sensitiver Farbstoff fungiert (Grynkiewicz et al. 1984). Aus dem Fluoreszenzintensitäts-Verhältnis zwischen den Anregungs-Wellenlängen bei

340 nm und 380 nm lässt sich die Beladung von Fura mit Ca^{2+} und somit die $[Ca^{2+}]_i$ berechnen (Kiefmann et al. 2009, Ying et al. 1996, Roe et al. 1990). Fura-2 ist das bekannteste Fluorchrom mit dem Veränderungen des freien Kalziums dynamisch und an intakten Zellen aufgezeichnet werden können (Hayashi und Miyata 1994). Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit der Anregung mit zwei unterschiedlichen Wellenlängen. So errechnet sich die intrazelluläre Kalziumkonzentration durch die *Ratio*, welche unabhängig von der Leuchtintensität und dem *bleaching* der Endothelzellen ist. Allerdings können auch hier Probleme auftreten - wie eine unzureichende Hydrolisierung durch ubiquitäre zytosolische Esterasen, Sequestrierungen in anderen Kompartimenten der Zelle (z.B. zytoplasmatische Organellen), Beladungsprobleme und somit ein frühzeitiges Nachlassen der Fluoreszenz, Verblassen der Fluoreszenz durch zwei-sekündliche Belichtungen und minimale Verschiebungen in den Absorptionsmaxima (Roe MW et al. 1990). Die Kenntnis dieser Limitationen ist Voraussetzung für die Anwendung des Fluorochroms. Die Stabilität des Messsystems unter Kontrollbedingungen wurde vor jeder Messung überprüft.

5.2.3 Molekularbiologie

Die rt-PCR ist Methodik der Wahl um Veränderungen in der Genexpression auf mRNA-Ebene zu zeigen. Sie ist hoch spezifisch und gut semiquantitativ auswertbar. Der Einfluss von H_2O_2 auf den Oberflächenmarker und den potentiellen Rezeptor CD44, das *housekeeping* Gen GAPDH, sowie das proinflammatorische Enzym iNOS lassen sich durch rt-PCR darstellen (siehe 2.3.3). Die Expression in den Kontrollgruppen war stets stabil.

RNAsen sind sehr stabile und aktive Enzyme, welche die RNA innerhalb von Minuten abbauen. Dieses konnte durch RNAse freie Plastik- und Glaswaren in den Versuchen verringert werden sowie durch spezielle Puffer und RNase-freies Wasser. Des Weiteren wurde auf Eis gearbeitet um das Risiko der RNA-Degradierung so gering wie möglich zu halten. Ebenso wurden die Denaturierung und das *Annealing* in getrennten Schritten durchgeführt, um die Bildung von RNA-Sekundärstrukturen zu unterbinden. HotStarTaq und Puffer der Fa. QIAGEN erhöhen die Spezifität der rt-PCR und sind somit ausschlaggebend für eine hoch sensitive rt-PCR.

5.3 Die Glykokalyx und das Heparansulfat

In den vorliegenden Versuchen wurde Heparansulfat auf Endothelzellen appliziert (siehe 4.1.4), woraufhin es zu keinem signifikanten Unterschied des intrazellulären Ca^{2+} gegenüber unstimulierter Endothelzellen kam.

Bedeutend hierbei ist, dass zwischen den einzelnen Bestandteilen der Glykokalyx ein Gleichgewicht herrscht. Bei der Biosynthese kommt es zu einem permanenten Umbau, was sich auf die Dicke der Glykokalyx auswirkt (Lipowsky HH 2005). Daher kann keine differenzierte Aussage über die genaue Zusammensetzung der Glykokalyx gemacht werden. Lediglich statische Momentaufnahmen sind möglich (siehe Abbildung 1-2). Durch einen hohen metabolischen Umsatz regulieren Endothelzellen die physikochemischen Eigenschaften der Glykosaminoglykane, um sich auch bei veränderten Umweltbedingungen anzupassen (Arisaka et al. 1995, Vijayagopal et al. 1988). Die Länge von HS kann stark variieren und hängt, laut SEOG et al. (2005), vornehmlich mit dem pH-Wert zusammen, wobei sie unter physiologischen pH-Werten am längsten sind. Aus diesem Grund wurden

alle Versuchsprotokolle sowie sämtliche applizierte Substanzen unter physiologischen pH-Werten durchgeführt bzw. angesetzt (siehe Tabelle 1 und 2). Für diese Komponenten sind auch funktionelle und strukturelle Modifikationen bekannt (Tarbell und Pahakis 2006). Zusätzlich sind Kernproteine, wie zum Beispiel das Syndekan, integraler Bestandteil von spezifischen Transportprozessen der Zellmembran (Tarbell und Pahakis 2006).

5.4 Rolle und Funktion der Heparinase III

In den vorliegenden Versuchen konnte gezeigt werde, dass Endothelzellen welche zuvor mit Heparinase III vorinkubiert und anschließend mit Wasserstoffperoxid stimuliert wurden (siehe 4.1.4), keinen signifikanten Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ zeigten -im Gegensatz zur H_2O_2-Reaktion bei unbehandelten HPMEC (siehe Abbildung 4-4 c).

Heparinase III, auch Heparitinase I oder Heparin Lyase III genannt, ist eine β-Endoglukoronidase des Flavobacteriums heparinum welches HS an spezifischen Stellen schneidet (Okada et al. 2002). Dabei entfernt es die Liganden-Bindungsstelle entweder durch Ablösung des HS vom Kernprotein oder durch Veränderungen der Zucker-Struktur (Bame KJ 2001).

Die Herkunft der Heparinase bei inflammatorischen Prozessen ist vielseitig. Endothelzellen und diverse Leukozyten produzieren diese insbesondere dann, wenn sie proinflammatorischen Zytokinen ausgesetzt sind (Parish et al. 1998, Nieuwdorp et al. 2006, van den Berg 2006, Kato et al. 1998). Ebenso setzen degranulierende Thrombozyten Heparinasen frei (Bartlett et al. 1995, Vlodavsky et al. 1992). Die Heparinase-Aktivität korreliert direkt mit entzündlichen Prozessen, oder auch mit dem metastatischem Potential von Tumoren (Potter und Damiano 2008, Vlodavsky et al. 2007). SHAFAT et al. (2006) konnte zeigen, dass

Patienten mit einem aggressiven Tumor erhöhte Konzentrationen von Heparinase in Blut und Urin hatten.

NELSON et al. (2008) konnten nachweisen, dass vermehrt HS bei Patienten mit einer Sepsis im Blut zirkuliert.

DULL et al. (2003) untersuchten *in vitro,* mittels Stimulation durch Poly-Arginin und Poly-Lysin, den Einfluss der Glykokalyx auf die endotheliale Permeabilität. Sie setzten Heparinase III in gleicher Konzentration wie in der vorliegenden Arbei (s. 2.8.2) ein und konnten zeigen, dass mittels Heparinase III 67% des HS entfernt wurden und es zu einer starken Reduktion der Permeabilität der Endothelzellschicht kam (Vogel et al. 2000, Pries et al. 1997, Desjardins and Duling 1990).

Ebenso zeigten HPMEC-Versuche unseres Labors, unter gleichen Bedingungen, in der FACS-Analyse eine Reduktion des HS um mehr als die Hälfte (*personal communicated*, Anke Schuster). Der Grad der Degradierung von HS auf EC nach Applikation von Heparinase III, wurde in der vorliegenden Arbeit daher nicht erneut bestimmt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Heparinase III alleine kein intrazelluläres Ca^{2+}-Signal auslöst (siehe Abbildung 4-4 b).

OIKE et al. (2008) untersuchten bovine aortale Endothelzellen während Hypotonie und fanden heraus, dass es nach einer zweistündigen Vorbehandlung mit Heparinase III zu keinem Ca^{2+}-Einstrom in die aortalen Zellen kommt. Darüber hinaus führte eine anschließende Positivkontrolle mittels ATP in der vorliegenden Arbeit, wie auch bei OIKE et al., zu einem starken Anstieg des intrazellulären Ca^{2+}.

Auch Ischämie/Reperfusion, chirurgische Operationen, TNF-α, oxidierte Lipoproteine, Zytokine und Proteasen führen zur Degradation des HS in der Glykokalyx (Chappell et al. 2009a,b, 2008 und 2007, Rehm et al. 2007, Parish CR

2005, Rubio-Gayosso 2004, Moore et al. 2002, Constantinescu et al. 2001, Janeway et al. 2001, Vink et al. 2000, Henry und Duling 1999).

Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass das HS eine elementare Rolle in der inflammatorischen Radikalen-induzierten Ca^{2+}-Signaltransduktion spielen könnte.

5.5 Der CD44-Rezeptor

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es nach einer Vorinkubation mit dem Anti CD44-Antikörper B-F24 und anschließender H_2O_2-Stimulation zu keinem signifikanten Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} kam (siehe Abbildung 4-5 b). Ebenso veränderte die alleinige Applikation von B-F24 die $[Ca2+]_i$ nicht (siehe Abbildung 4-5 a).

Auf genetischer Ebene zeigte sich, dass es nach Stimulation mit 100 und 800µM H_2O_2 zu keinem signifikanten Unterschied in der Genexpression von GAPDH (siehe Abbildung 4-6) und CD44 (siehe Abbildung 4-7) kam. Allerdings wurde die iNOS nach einstündiger Stimulation mit beiden H_2O_2-Konzentrationen, im Vergleich zu unstimulierten Zellen, signifikant erhöht exprimiert (s. Abbildung 4-8).

Wurden HPMEC zuvor mit dem Anti CD44-Antikörper Klon B-F24 vorinkubiert und anschließend mit H_2O_2 stimuliert, zeigte sich bei der GAPDH (siehe Abbildung 4-6) und CD44 (siehe Abbildung 4-7) kein signifikanter Unterschied in der Expression, gegenüber unstimulierten EC. Die iNOS-Expression konnte nach Vorinkubation mit dem Anti CD44-Antikörpern vollständig gehemmt werden (siehe Abbildung 4-8).

Der CD44-Rezeptor ist ein Adhäsionsmolekül der Glykokalyx (siehe Abbildung 1-2 und Abbildung 1-3). Er besitzt eine kurze intrazelluläre und eine lange extrazelluläre Domäne und ist an die Hyaluronsäure (HA) gebunden (Banerji et al. 2007). Er besteht aus 19 Exons, wobei 12 von ihnen durch variables *splicing* der

mRNA verändert werden können (Screaton et al. 1992). Das bedeutet, dass Chondroitin-Sulfat oder HS die eigene Struktur modifizieren können. Jedoch ist HS das einzige Molekül, welches nur am Exon V3 vorzufinden ist (Tuhkanen et al. 1997). Da JOHNSON et al. (2000) auf Leukozyten keine Bindung zwischen dem CD44-Rezeptor und der HA nachweisen konnten, gehen sie von einem "Sandwich-Modell" aus, in dem das Zusammenspiel zwischen Endothelzellen, HA und Leukozyten spezifisch reguliert wird (siehe Abbildung 5-2).

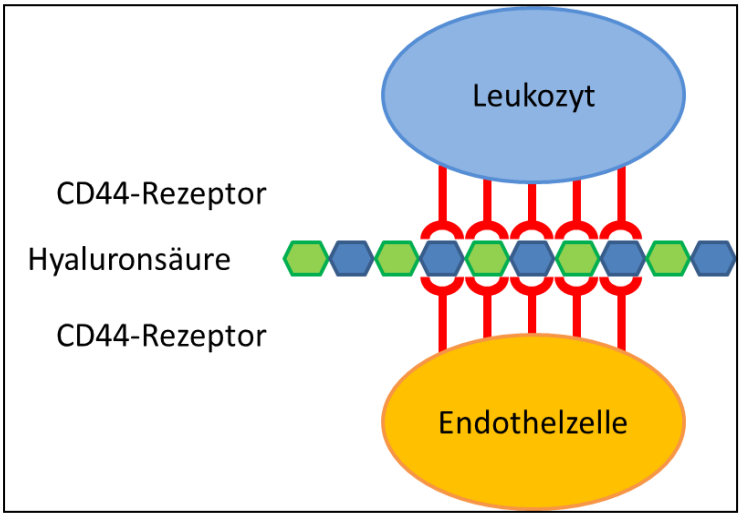


Abbildung 5-2 Das "Sandwich-Modell".

Mod. nach RUFFELL und JOHNSON (2011). Exprimiertes CD44 auf aktivierten Leukozyten bindet an Hyaluronsäure, welches über den CD44-Rezeptor auf Endothelzellen präsentiert wird. Es kommt zu einer Zell-Zellinteraktion, welche besonders unter inflammatorischen Bedingungen erhöht ist.

Auch mechanische Verletzungen, sowie bei inflammatorischen Prozessen freigesetzte Radikale degradieren HA und HS in kleinere Fragmente. Diese führen über chemotaktische Reize (Horton et al. 1998) zu einer verstärkten Leukozyten-Rekrutierung und durch Interaktikonen mit dem CD44-Rezeptor zu einer vermehrten Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen (s. Abbildung 1-1), wie TNF-α und IL-1β (Siegelman et al. 1999). Durch Interaktionen mit HA steigert

CD44 die Expression von Genen, die an der Proliferation und Inflammation beteiligt sind (Cai H 2005, Deed et al. 1997). Dieses kann jedoch durch eine Blockierung des CD44-Rezeptors aufgehoben werden (McKee et al. 1996).

Ich konnte in meiner Arbeit ebenfalls zeigen, dass HPMEC nach Inkubation mit dem Anti CD44-Antikörper Klon B-F24 nicht mehr auf H_2O_2 reagierten (siehe Abbildung 4-7).

Der Anti CD44-Antikörper Klon B-F24 ist ein spezifischer AK für die CD44v10 Isoform. Die H_2O_2-induzierte Expression der iNOS war nach Vorinkubation mit selbigem Antikörper ebenfalls vollständig unterdrückt (siehe Abbildung 4-8).

Neueste Literatur weist immer deutlicher darauf hin, welch wichtige Rolle der CD44-Rezeptor während inflammatorischer Prozesse spielen könnte. So zeigten Versuche von CAMPO et al. (2010 und 2009), LIANG et al. (2007) und WANG et al. (2002) dass bei Inflammation der CD44-Rezeptor dazu beiträgt, dass intrazellulär die Proteinkinase C (PKC) erhöht wird, es zu einer Steigerung des Transkriptionsfaktors NFκB kommt und iNOS im Zuge dessen vermehrt exprimiert wird. Alle drei Autoren blockten CD44 oder nutzen CD44 *knock out*-Mäuse und konnten zeigen, dass es zu einem signifikanten Abfall dieser proinflammatorischen Enzyme kam.

MC KEE et al. (1996) konnten zeigen, dass nach Blockierung des CD44-Rezeptors die Induktion von proinflammatorischer Zytokinen inhibiert werden konnte. Die Bedeutung von CD44 beim Hyperoxie induzierten Lungenschaden wird durch WINDT et al. (2011) gezeigt.

Somit weist vieles darauf hin, dass die Glykokalyx, besonders der CD44-Rezeptor, eine bedeutende Rolle in der inflammatorischen Signalkaskade darstellt.

5.6 Reaktive Sauerstoff-Moleküle und Radikale

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression der iNOS untersucht, um anhand derer das Ausmaß der Inflammation zu beurteilen.

Ich konnte zeigen, dass eine Stimulation mit 100 und 800 µM H_2O_2 zu einem signifikanten Anstieg der iNOS-Expression führte, welche mit dem Anti CD44-Antikörpern Klon B-F24 signifikant verringert werden konnte (siehe Abbildung 4-8).

Reaktive Sauerstoff-Moleküle (ROS) wie Sauerstoffmonoxid (NO), Superoxid ($O_2^{\bullet-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Peroxinitrit ($ONOO^-$) sind bei inflammatorischen Prozessen, Immunantworten, Relaxation von glatten Gefäßmuskeln, Aktivierung von Trankriptionsfaktoren und zusätzlichem oxidativen Stress, beteiligt (Hidalgo und Donoso 2008, Winterbourn CC 2008, Salvemini et al. 2006). Die Formation von reaktiven Sauerstoffmolekülen ist sehr vielfältig und kann Abbildung 5-3 entnommen werden.

Unter physiologischen Bedingungen und in intakten Geweben liegt die Sauerstoff-Konzentration zwischen 1 und 150 µM, wobei die höchste Konzentration in der Lunge zu finden ist (Dweik et al. 1998, Abu-Soud et al. 1996, Vanderkooi et al. 1991). Die Lunge wird bei jedem physiologischem Atemzug 21%igem Sauerstoff ausgesetzt.

Dabei ist die O_2 - Konzentration bei beatmeten Patienten oft wesentlich höher.

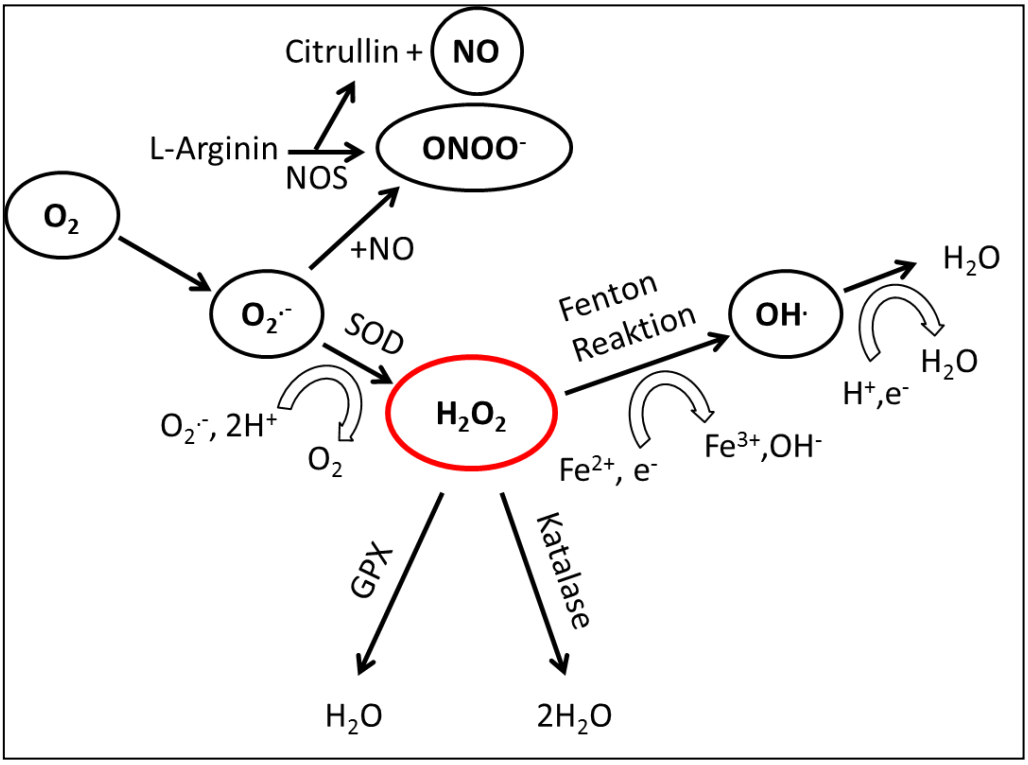


Abbildung 5-3 Signalwege der ROS-Formationen

Mod. nach HIDALGO und DONOSO (2008) und DWEIK RA (2005). Superoxid Anionen ($O2^{\bullet-}$) werden aus molekularem Sauerstoff (O_2) durch Enzyme der Atmungskette gebildet. Hierzu zählen NADPH-Oxidase, Xanthin-Oxidase, Cyclooxigenasen und Lipoxygenasen. Spontan oder enzymatisch kann $O2^{\bullet-}$ in H_2O_2 durch die SOD (Superoxid-Dismutase) umgewandelt werden oder mit NO-Produkten reagieren und Peroxinitrit ($ONOO^-$) generieren. GPX (Glutathion-Peroxidase) und Katalase wandeln H_2O_2 in Wasser um. Alternativ kann H_2O_2 mit reaktiven Metall-Ionen, wie Fe^{2+} reagieren und Hydroxyl-Radikale ($OH^{\bullet}$) bilden.

Die Fähigkeit von ROS, $O_2^{\bullet-}$ und Hydroxyl-Radikalen ($OH^{\bullet}$), GAG abzubauen ist somit gegeben (Moseley et al. 1997). Größtenteils werden zelluläre Prozesse wie Wachstum, Proliferation und Apoptose durch den Redox-Zustand der Zelle reguliert (Cai H 2005, Davies KJ 1999). Sehr hohe ROS-Konzentrationen schädigen Endothelzellen (Liu et al. 2005, Seaver und Imlay 2001).

1989 wurde die enzymatische NO-Synthase (NOS) das erste Mal beschrieben und bis 1994 drei Formen nachgewiesen:

1. Neuronale NOS (nNOS) (Bredt et al. 1991)
2. Induzierbare NOS (iNOS) (Xie et al. 1992)
3. Endotheliale NOS (eNOS) (Lamas et al. 1992)

nNOS und eNOS werden im Gegensatz zur iNOS konstitutiv exprimiert und produzieren NO in geringen Mengen im nM Bereich. Beide Formen werden über den intrazellulären Ca^{2+}-Haushalt gesteuert (Dweik 2005).

Die iNOS wird von Endothelzellen nach Stimulation mit z.B. Zytokinen oder Lipopolysacchariden (LPS) exprimiert und produziert NO in wesentlich höheren Konzentrationen im µM Bereich (Albrecht et al. 2003). Dabei wird die Expression auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene über NF-κB oder die MAP-Kinasen (MacMicking et al.1997) reguliert.

In den vorliegenden Versuchen konnte ich zeigen, dass die Expression von iNOS nach einstündiger Stimulation mit 100 und 800 µM H_2O_2 signifikant erhöht war (siehe Abbildung 4-8).

Die Bedeutung von Heparansulfat bei der NO-Produktion ist durch die Untersuchungen von KUMAGAI et al. (2009), FLORIAN et al. (2003) und PAHAKIS et al. (2007) belegt. Sie konnten zeigen, dass nach Entfernung des HS mittels Heparinase III die NO-Produktion sowie die inflammatorische Signaltransduktion bei HUVEC nahezu erloschen war. Die Versuche von POTTER et al. (2009) an HUVECs zeigten, dass EC aber in der Lage sind, nach Glykokalyx-Degradierung mit TNF-α oder Heparinase III diese nach fünf bis sieben Tagen fast vollständig wieder aufzubauen.

THIEMERMANN (1997) und GUIKEMA et al. (2005) fanden heraus, dass durch iNOS produziertes NO eine kritische Rolle bei der Pathophysiologie des ALI und der Sepsis spielen könnte. Unterstützt wird die Beobachtung von BHATIA und MOOCHHALA (2004), die erhöhte iNOS-Konzentrationen bei Patienten mit einem ARDS fanden.

Die Expression von eNOS und nNOS hängt von der Verfügbarkeit des Ca^{2+}/CaM-Komplexes ab (Bruch-Gerharz et al. 1998, Govers und Rabenlink 2001). Eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} führt zu einer festeren Bindung zwischen Ca^{2+} und CaM und somit zu einer vermehrten Produktion von eNOS und nNOS, welches wiederum zu einer Aktivierung der NO-Synthase führt (Deliconstantinos et al. 1995). Abbildung 5-1 zeigt, dass ein direkter Zusammenhang zwischen intrazellulärem Ca^{2+} und der NO-Produktion besteht (Knowles und Moncada 1994, Marletta MA 1994, Alderton et al. 2001).

5.7 Bedeutung des H_2O_2

In den vorliegenden Versuchen wurde H_2O_2 als inflammatorischer Reiz verwendet. Ich konnte einen klaren Zusammenhang zwischen der Applikation von H_2O_2 auf HPMEC und dem damit verbunden Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration zeigen (siehe Abbildung 4-3 a).

H_2O_2 ist eine Verbindung aus Wasserstoff und Sauerstoff und gehört zu der Gruppe der reaktiven Sauerstoffmoleküle (ROS).

Es zerstört Proteine, Lipide und Aminosäuren. Es wird größtenteils durch die Superoxid-Dismutase (SOD) und die Xanthin-Oxidase produziert (Kelley et al. 2010, Yu BP 1994) (siehe Abbildung 5-3). Im chemischen Zustand ist H_2O_2 wenig reaktiv (Bienert et al. 2006, Halliwell et al. 2000). H_2O_2 wird während des Zellkreislaufes kontinuierlich in den Mitochondrien produziert, kann durch die Zellmembran von Peroxisomen und dem Zytoplasma frei diffundieren und besitzt eine längere Halbwertszeit als andere reaktive Sauerstoff-Moleküle (D'Autreaux und Toledano 2007, Antunes und Cadenas 2000).

Wie die nach ADIMORA et al. (2010) modifizierte Abbildung 5-4 zeigt wird H_2O_2 über vier verschiedene Wege metabolisiert:

1. Katalase
2. Glutathion-Peroxidase (GPx): $2\ GSH + H_2O_2 \rightarrow GS–SG + 2\ H_2O$

   Dabei katalysiert GPx die Reaktion von H_2O_2 und Glutathion (GSH) zu einem Glutathion-Disulfid (GS-SH) und 2 Molekülen Wasser.
3. Peroxiredoxin (Prx) im Zusammenhang mit NADPH
4. Oxidation von Cystein-Derivate

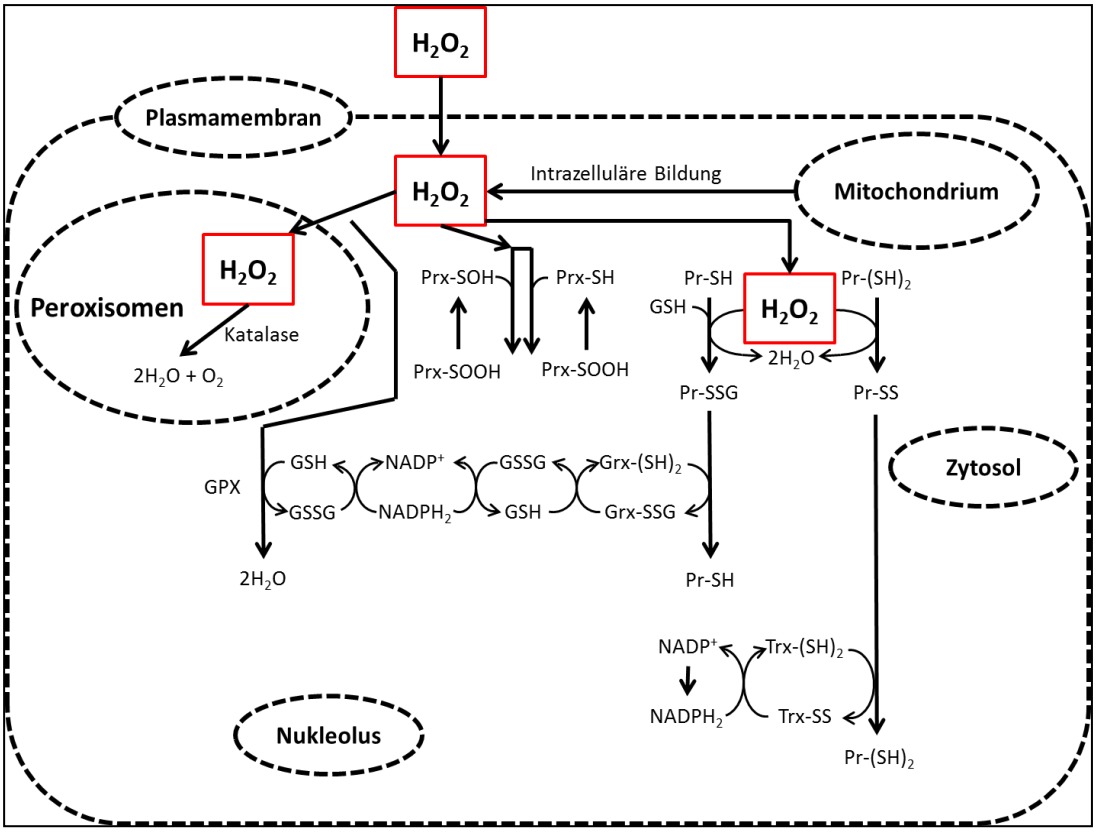


Abbildung 5-4 Modell der H_2O_2-Elemination

Mod. nach ADIMORA et al. (2010). Hier werden 3 Kompartimente beschrieben: die Extrazelluläre Matrix, der intrazellular Raum, und das Peroxisomen. Pfeile deuten die verschiedenen Wege der Metabolisierung an.

Nimmt die H_2O_2-Konzentration zu, kommt es zur Proliferation der Endothelzellen - aber auch zu Zellschäden, da die Konzentration der Hydroxyl-Radikale parallel dazu zunimmt (Cai H 2005, Lakshminarayanan et al. 1997). Bis zum µM-Konzentrationsbereich können Endothelzellen adaptieren.

Ab Konzentrationen im mM Bereich induziert H_2O_2 die Apoptose (Oliveira-Marques et al. 2009).

In den vorliegenden Versuchen ist eine deutliche Zunahme des intrazellulären Ca^{2+} nach Stimulation mit H_2O_2 (siehe Abbildung 4-3 a) zu erkennen. H_2O_2-Konzentrationen < 200 µM führten zu keinem signifikanten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (siehe Abbildungen 4-3 c und d).

Ab H_2O_2-Konzentrationen > 400 µM wurden signifikant erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration gemessen, resultierend aus einer erhöhter Fura-*Ratio* (siehe Abbildungen 4-3 e bis h).

Endothelzellen generieren Ca^{2+}-Signale in dem sie intra- und extrazelluläre Ca^{2+}-Speicher mobilisieren (siehe Abbildung 5-1). Zu den intrazellulären Speicherorten gehören das endoplasmatische Retikulum (eR), die Mitochondrien und der Nucleolus. Die Ca^{2+}-Konzentration wird über spezifische Transporter, Pumpen und Kanäle kontrolliert (Berridge et al. 1998). Die Freisetzung wird über Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP_3) und die Ryanodin-Rezeptoren (RyR) reguliert. Oxidativer Stress kann Ca^{2+}-Signale induzieren (Doan et al. 1994).

So fanden ROVERI et al. (1992) an glatten Muskelzellen heraus, dass geringer Stress, hervorgerufen durch H_2O_2, die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration ansteigen lässt auch wenn Ca^{2+}-freies Medium verwendet wurde. Wurde die Ca^{2+}-Freisetzung aus intrazellulären Speichern vorher geblockt, war kein Ca^{2+}-Anstieg mehr messbar.

ROVERI et al. steigerte die H_2O_2-Konzentrationen weiter und konnte dann bei millimolaren Konzentrationen einen Ca^{2+}-Einstrom von extrazellulär nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Konzentrationen > 800 µM H_2O_2 für Versuche zur Genexpression und Fluoreszenzmikroskopie daher nicht verwendet.

Um zu untersuchen ob und wie lange H_2O_2 im Zellkulturmedium stabil ist, wurde ein semiquantitativer Assay angewandt (siehe 2.5). Hierzu wurde im Zellkulturmedium die H_2O_2-Konzentration bestimmt. Es zeigte sich, dass schon nach 60 Minuten die eingesetzten H_2O_2-Konzentrationen signifikant reduziert waren (siehe Abbildung 4-9).

5.8 Bedeutung der Antioxidantien

Antioxidantien dienen als Radikalfänger von ROS und führen so zu einem Abbau von oxidativem Stress. Sie können nach intrazellulären und extrazellulären Radikalfängern klassifiziert werden. Zu den intrazellulären Abwehrmechanismen gehören Katalase, SOD und GPx. Zu den extrazellulären Mechanismen zählen Vitamin C und E und das Ceruloplasmin.

Bekannt ist, dass bei Patienten mit einem ALI oder ARDS eine höhere H_2O_2-Konzentration im Urin (Kietzmann et al. 1993) und in der Atemluft (Quinlan et al. 1994) nachgewiesen wurde. Niedrige H_2O_2-Konzentrationen regen die Genexpression von Antioxidantien an und es kommt zum Abbau von ROS (Sablina et al. 2005). Hohen Konzentrationen von Glutathion (GSH) und anderen antioxidativen Mechanismen können einen suffizienten Schutz gegen ROS bewirken (Ng et al. 2007). Veranschaulicht wird dieses in Abbildung 5-4.

Glutathion-Peroxid (GPx), im Gegensatz zur Katalase und zur SOD, wird bei Patienten mit einem ARDS nicht verstärkt exprimiert (Leff et al. 1993).

Bekannt ist, dass HS in der Glykokalyx SOD bindet und so eine Funktion als extrazellulärer Radikal-Fänger ausüben könnte. SOD ist ein Enzym welches zwei Superoxid-Anionen und Wasser (H_2O) zu einem Sauerstoffmolekül (O_2), drei Hydroxidionen (OH^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umsetzt:

$$2\ O_2^{\bullet -} + 2\ H_2O \rightarrow H_2O_2 + 2\ OH^- + O_2$$

NIEUWDORP et al. (2005) zeigte, dass eine verminderte Expression von HS auf der Endothelzelle zu weniger gebundenem SOD an seiner Oberfläche führt. Dies lässt darauf schließen, dass der Abbau der Glykokalyx durch Radikale verursacht

wird. Auch Katalase ist ein Enzym, welches Wasserstoff (H_2O_2) zu Sauerstoff (O_2) und Wasser (H_2O) umwandelt und ubiquitär vorkommt:

$$2\ H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2\ H_2O$$

VINK und DULING (2000) applizierten SOD und Katalase auf Endothelzellen und konnten zeigen, dass der Abbau der Glykokalyx durch Radikale verhindert wurde. Zudem wurde die Katalaseexpression auf HUVEC mittels adenoviraler Transfektion hochreguliert, und anschließend wurden die HUVEC mit 500 µM H_2O_2 stimuliert. Es zeigte sich, dass in der Gruppe der nicht-transfizierten Zellen nur 37% in Kultur überlebten, wohingegen alle in der Gruppe der transfizierten überlebten (Erzurum et al. 1993).

6. Zusammenfassung

Laut dem Kompetenznetzwerk Sepsis (SepNet) erkranken derzeit allein in Deutschland jährlich etwa 150.000 Patienten an einer schweren Sepsis.

60.000 dieser Patienten versterben trotz intensiver klinischer und experimenteller Erforschung dieser systemischen Inflammation. Der akute Lungenschaden ist dabei eine lebensbedrohliche Komplikation der Initialphase, die von einer schweren Störung der endothelialen Integrität geprägt ist, so dass eine zum Teil massive Verschlechterung des Gasaustausches resultiert. Durch den bisher unbekannten Pathomechanismus besteht derzeit kein kausaler Therapieansatz.

Die Rolle der Glykokalyx bei der Weiterleitung inflammatorischer Signale in das Zellinnere von Endothelzellen ist bisher nicht untersucht.

Heparansulfat-Gykosaminoglykane sind zentraler Bestandteil der Glykokalyx und eng mit dem CD44-Rezeptor assoziiert. Ca^{2+} ist ein wichtiger zytosolischer *second messenger* in der proinflammatorischen endothelialen Stimulation und führt unter anderem über die induzierbare NO-Synthase (iNOS) zur Freisetzung des Radikals NO.

Die Hypothese der Studie war, dass das Radikal H_2O_2, welches während Inflammation ubiquitär produziert und freigesetzt wird, über Heparansulfat und den CD44-Rezeptor eine spezifische Ca^{2+}-Signaltransduktion nach intrazellulär in Gang setzt und somit die Expression der iNOS auslöst.

Wir haben daher humane, pulmonale Endothelzellen (HPMEC) mit dem Ca^{2+}-sensitiven Fluorochrom Fura-2AM fluoreszenzmarkiert. Mittels Einzelzell-Epifluoreszenzmikroskopie wurde das Fluoreszenzintensitätsverhältnis F_{340}/F_{380} zwischen den Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm gemessen, das die zytosolische Ca^{2+}-Konzentration widerspiegelt. Die Expression der iNOS wurde mittels rt-PCR semiquatitativ gemessen.

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnten folgende Resultate erzielt werden:

1. Die Stimulation von HPMEC mit unterschiedlichen Dosen H_2O_2 führte ab einer Konzentration von 200 µM zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+}.
2. Die alleinige Applikation von Heparinase III zur enzymatischen Degration der Glykokalyx führte zu keiner Veränderung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration.
3. Eine 30minütige Vorinkubation mit Heparinase III blockierte den H_2O_2-induzierten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration.
4. Die Applikation von nativem Heparansulfat führte in allen durchgeführten Versuchen zu keiner Veränderung der Fura *Ratio*.
5. Die Applikation des Anti CD44-Antikörpers Klon B-F24 führte ebenfalls zu keiner Veränderung des 340 nm / 380 nm Verhältnisses.
6. Die 15minütige Vorinkubation mit dem Anti CD44-Antikörper Klon B-F24 konnte den H_2O_2- induzierten Anstieg der Fura *Ratio* blockieren.
7. Die Genexpression des Kontrollgens GAPDH war in allen Versuchsgruppen unverändert.
8. HPMEC-Stimulationen über eine Stunde mit 100 oder 800 µM H_2O_2 führten nach densitometrischer Auswertung zu keiner Veränderung der CD44-Expression.
9. HPMEC-Stimulationen über eine Stunde mit 100 oder 800 µM H_2O_2 führten im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen zu einer signifikanten Zunahme der iNOS-Expression.
10. Eine 30minütige Vorinkubationen mit dem Anti CD44-Antikörper Klon B-F24 konnte den H_2O_2-induzierten Anstieg der iNOS-Expression unterdrücken.

Zusammenfassend führte die Stimulation der Endothelzellen mit H_2O_2 zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration.

Der H_2O_2-induzierte Kalziumanstieg konnte sowohl durch Vorbehandlung der Zellen mit Heparinase III, als auch durch Blockade des CD44-Rezeptors mittels des Anti CD44-Antikörpers Klon B-F24 verhindert werden.

Des Weiteren wurde im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen das proinflammatorische Enzym iNOS, nach Applikation des Radikals H_2O_2, vermehrt exprimiert.

Wurde der CD44-Rezeptor mit dem Anti CD44-Antikörper Klon B-F24 geblockt, konnte auch die H_2O_2-induzierte iNOS-Expression unterdrückt werden.

Schlussfolgernd zeigen die Ergebnisse, dass H_2O_2 über Heparansulfat und den CD44-Rezeptor eine endotheliale Ca^{2+}-Signaltransduktion auslösen könnte, welche wiederum die Expression der iNOS induziert.

Die erwarteten Ergebnisse könnten anästhesiologisch und intensivmedizinisch von höchstem wissenschaftlichem Interesse sein, da sie die Hypothese stützen, dass die Glykokalyx eine zentrale Rolle bei der Pathogenese des endothelzell-mediierten akuten Lungenschaden spielen könnte.

7. Literatur

1. **Abu-Soud HM, Rousseau DL, Stuehr DJ. 1996.** Nitric oxide binding to the heme of neuronal nitric-oxide synthase links its activity to changes in oxygen tension. J Biol Chem. Dec 20;271(51):32515-8.

2. **Adamson RH, G Clough**. 1992. Plasma proteins modify the endothelial cell glycocalyx of frog mesenteric microvessels. J Physiol. Jan;445:473-86.

3. **Adimora NJ, DP Jones, ML Kemp.** 2010. A model of redox kinetics implicates the thiol proteome in cellular hydrogen peroxide responses. Antioxid Redox Signal. Sep 15;13(6):731-43.

4. **Aird WC**. 2010. Proximate and evolutionary causation of endothelial heterogeneity. Semin Thromb Hemost. Apr;36(3):276-85.

5. **Aird WC**. 2003. Endothelial cell heterogeneity. Crit Care Med 31:S221-S230

6. **Albrecht EW, CA Stegeman, P Heeringa, RH Henning, H van Goor.** 2003. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. J. Pathol. 199: 8-17

7. **Alderton WK, CE Cooper, RG Knowles.** 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J. Aug 1;357(Pt 3):593-615.

8. **Antunes F, E Cadenas.** 2000. Estimation of H2O2 gradients across biomembranes. FEBS Lett. Jun 16;475(2):121-6.

9. **Ashbaugh DG, DB Bigelow, TL Petty, BE Levine**. 1967. Acute respiratory distress in adults. Lancet 2:319-323.

10. **Arisaka T, M Mitsumata, M Kawasumi, T Tohjima, S Hirose, Y Yoshida**. 1995. Effects of shear stress on glycosaminoglycan synthesis in vascular endothelial cells. Ann N Y Acad Sci. Jan 17;748:543-54.

11. **Bachofen M, ER Weibel**. 1977. Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. Am Rev Respir Dis 116: 589-615.

12. **Bame KJ**. 2001. Heparanases: endoglycosidases that degrade heparan sulfate proteoglycans. Glycobiology. Jun;11(6):91R-98R.

13. **Banerji S, AJ Wright, M Noble, DJ Mahoney, ID Campbell, AJ Day, DG Jackson**. 2007. Structures of the Cd44-hyaluronan complex provide insight into a fundamental carbohydrate-protein interaction. Nat Struct Mol Biol. Mar;14(3):234-9.

14. **Barnes PJ, MG Belvisi.** 1993. Nitric oxide and lung disease. Thorax 48: 1034-1043.

15. **Bartlett MR, PA Underwood, CR Parish.** 1995. Comparative analysis of the ability of leucocytes, endothelial cells and platelets to degrade the subendothelial basement membrane: evidence for cytokine dependence and detection of a novel sulfatase. Immunol Cell Biol. Apr;73(2):113-24.

16. **Bauer P, CW Lush, PR Kvietys, JM Russell, DN Granger.** 2000. Role of endotoxin in the expression of endothelial selectins after cecal ligation and perforation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 278, 1140-1147

17. **Becker BF, D Chappell, M Jacob.** 2010. Endothelial glycocalyx and coronary vascular permeability: the fringe benefit. Basic Res Cardiol. Nov;105(6):687-701.

18. **Belloni PN, RJ Tressler**. 1990. Microvascular endothelial cell heterogeneity: interactions with leukocytes and tumor cells. Cancer Metastasis Rev. Feb;8(4):353-89.

19. **Bernard GR, A Artigas, KL Brigham, J Carlet, K Falke, L Hudson, M Lamy, JR Legall, A Morris, R Spragg**. 1994. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. Am.J.Respir.Crit Care Med. 149:818-824

20. **Bernfield M, M Götte, PW Park, O Reizes, ML Fitzgerald, J Lincecum, M Zako**. 1999. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. Annu Rev Biochem. 68:729-77.

21. **Berridge MJ, MD Bootman, P Lipp**. 1998. Calcium - a life and death signal. Nature. Oct 15;395(6703):645-8.

22. **Bhatia M, S Moochhala.** 2004. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. J Pathol. Feb;202(2):145-56.

23. **Bienert GP, JK Schjoerring, TP Jahn.** 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. Biochim Biophys Acta. Aug;1758(8):994-1003.

24. **Bredt DS, PM Hwang, CE Glatt, C Lowenstein, RR Reed, SH Snyder**. 1991. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. Nature. Jun 27;351(6329):714-8.

25. **Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF**. 2006. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. Lancet. Jul 8;368(9530):157-69.

26. **Bruch-Gerharz D, T Ruzicka, V Kolb-Bachofen.** 1998. Nitric ocide in human skin: Current status and future prospects. J Invest Dermatol 110:1-7

27. **Burns AR, CM Doerschuk**. 1994. Quantitation of L-selectin and CD18 expression on rabbit neutrophils during CD18-independent and CD18-dependent emigration in the lung. J.Immunol. 153: 3177-3188

28. **Cai H**. 2005. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. Cardiovasc Res. Oct 1;68(1):26-36.

29. **Campo GM, A Avenoso, A Micali, G Nastasi, F Squadrito, D Altavilla, A Bitto, F Polito, MG Rinaldi, A Calatroni, A D'Ascola, S Campo.** 2010. High-molecular weight hyaluronan reduced renal PKC activation in genetically diabetic mice. Biochim Biophys Acta Nov;1802(11):1118-30.

30. **Campo GM, A Avenoso, S Campo, A D'Ascola, P Traina, A Calatroni**. 2009. Differential effect of molecular size HA in mouse chondrocytes stimulated with PMA. Biochim Biophys Acta. Oct;1790(10):1353-67.

31. **Carlos TM, JM Harlan.** 1994. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. Blood. 84, 2068-2101

32. **Chappell D, N Dörfler, M Jacob, M Rehm, U Welsch, P Conzen, BF Becker.** 2010. Glycocalyx protection reduces leukocyte adhesion after ischemia/reperfusion. Shock. Aug;34(2):133-9.

33. **Chappell D, M Jacob, K Hofmann-Kiefer, M Rehm, U Welsch, P Conzen, BF Becker.** 2009a. Antithrombin reduces shedding of the endothelial glycocalyx following ischaemia/reperfusion. Cardiovasc Res. Jul 15;83(2):388-96.

34. **Chappell D, K Hofmann-Kiefer, M Jacob, M Rehm, J Briegel, U Welsch, P Conzen, BF Becker.** 2009b. TNF – alpha induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. Basic Res. Cardiol. 104: 78–89.

35. **Chappell D, M Westphal, M Jacob**. 2009c. The impact of the glycocalyx on microcirculatory oxygen distribution in critical illness. Curr.Opin.Anaesthesiol. 22:155-162

36. **Chappell D, M Jacob, M Rehm, M Stoeckelhuber, U Welsch, P Conzen, BF Becker.** 2008. Heparinase selectively sheds heparan sulphate from the endothelial glycocalyx. Biol Chem 389: 79–82.

37. **Chappell D, M Jacob, K Hofmann-Kiefer, D Bruegger, M Rehm, P Conzen, U Welsch, BF Becker**. 2007. Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx. Anesthesiology 107: 776–784.

38. **Cohen J.** 2002. The immunopathogenesis of sepsis. Nature. 420, 885-891

39. **Constantinescu AA, H Vink, JA Spaan**. 2001. Elevated capillary tube hematocrit reflects degradation of endothelial cell glycocalyx by oxidized LDL. Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol 280: H1051-H1057

40. **Cross CE, A van der Vliet, CA O'Neill, JP Eiserich**. 1994. Reactive oxygen species and the lung. Lancet. Oct 1;344(8927):930-3.

41. **D'Autréaux B, MB Toledano**. 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol. Oct;8(10):813-24.

42. **Damiano ER**. 1998. The effect of the endothelial-cell glycocalyx on the motion of red blood cells through capillaries. Microvasc Res. 55(1):77-91.

43. **Davies KJ.** 1999. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. IUBMB Life. Jul;48(1):41-7.

44. **Deed R, P Rooney, P Kumar.** 1997. Early-response gene signaling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecularweight hyaluronan. Int J Cancer 71:251–256, 1997

45. **Deliconstantinos G, V Villiotou, JC Stavrides**. 1995. Modulation of particulate nitric oxide synthase activity and peroxynitrite synthesis in cholesterol enriched endothelial cell membrans. Biochem Pharmacol 49(11): 1589-1600

46. **Desjardins C, BR Duling**. 1990. Heparinase treatment suggests a role for the endothelial cell glycocalyx in regulation of capillary hematocrit. Am.J.Physiol 258: H647-H654

47. **Devaraj S, U Singh, I Jialal**. 2009a. The evolving role of C-reactive protein in atherothrombosis. Clin Chem. Feb;55(2):229-38.

48. **Devaraj S, JM Yun, G Adamson, J Galvez, I Jialal**. 2009b. C-reactive protein impairs the endothelial glycocalyx resulting in endothelial dysfunction. Cardiovasc Res. Dec 1;84(3):479-84.

49. **Di Cera E**. 2003. Atherosclerosis: testing the water. Arterioscler Thromb Vasc Biol. Oct 1;23(10):1713-4.

50. **Doan TN, DL Gentry, AA Taylor, SJ Elliott**. 1994. Hydrogen peroxide activates agonist-sensitive Ca(2+)-flux pathways in canine venous endothelial cells. Biochem J. Jan 1;297 (Pt 1):209-15.

51. **Doerschuk CM, MF Allard, JC Hogg**. 1989. Neutrophil kinetics in rabbits during infusion of zymosan-activated plasma. J.Appl.Physiol. 67: 88-95.

52. **Dull RO, R Dinavahi, L Schwartz, DE Humphries, D Berry, R Sasisekharan, JG Garcia**. 2003. Lung endothelial heparan sulfates mediate cationic peptide-induced barrier dysfunction: a new role for the glycocalyx. Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol 285: L986-L995.

53. **Dull RO, H Jo, H Sill, TM Hollis, JM Tarbell**. 1991. The effect of varying albumin concentration and hydrostatic pressure on hydraulic conductivity and albumin permeability of cultured endothelial monolayers. Microvasc Res. May;41(3):390-407.

54. **Dweik RA.** 2001. The promise and reality of nitric oxide in the diagnosis and treatment of lung disease. Cleve Clin J Med. Jun;68(6):486, 488, 490, 493.

55. **Dweik RA, SA Comhair, B Gaston, FB Thunnissen, C Farver, MJ Thomassen, M Kavuru, J Hammel, HM Abu-Soud, SC Erzurum**. 2001. NO chemical events in the human airway during the immediate and late antigen-induced asthmatic response. Proc Natl Acad Sci USA. Feb 27;98(5):2622-7.

56. **Dweik RA.** 2005. Nitric oxide, hypoxia, and superoxide: the good, the bad, and the ugly! Thorax. Apr;60(4):265-7.

57. **Dweik RA, Laskowski D, Abu-Soud HM, Kaneko F, Hutte R, Stuehr DJ, Erzurum SC**. 1998. Nitric oxide synthesis in the lung. Regulation by oxygen through a kinetic mechanism.J Clin Invest. 1998 Feb 1;101(3):660-6.

58. **Erzurum SC, P Lemarchand, MA Rosenfeld, JH Yoo, RG Crystal.** 1993. Protection of human endothelial cells from oxidant injury by adenovirus-mediated transfer of the human catalase cDNA. Nucleic Acids Res. Apr 11;21(7):1607-12.

59. **Fenyves AM, J Behrens, K Spanel-Borowski.** 1993. Cultured microvascular endothelial cells (MVEC) differ in cytoskeleton, expression of cadherins and fibronectin matrix. A study under the influence of interferon-gamma. J Cell Sci. Nov;106 (Pt 3):879-90.

60. **Florian JA, JR Kosky, K Ainslie, Z Pang, RO Dull, JM Tarbell.** 2003. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. Circ.Res. 93: e136-e142.

61. **Gao L, Lipowsky HH.** 2010. Composition of the endothelial glycocalyx and its relation to its thickness and diffusion of small solutes. Microvasc Res. Dec;80(3):394-401.

62. **Gebb S, Stevens T**. 2004. On lung endothelial cell heterogeneity. Microvasc Res.Jul;68(1):1-12.

63. **Geiger M, Stone A, Mason SN, Oldham KT, Guice KS**. 1997. Differential nitric oxide production by microvascular and macrovascular endothelial cells. Am J Physiol. Jul;273(1 Pt 1):L275-81.

64. **Gerritsen ME.** 1987. Functional heterogeneity of vascular endothelial cells. Biochem Pharmacol. Sep 1;36(17):2701-11.

65. **Goerdt S, Sorg C.** 1992. Endothelial heterogeneity and the acquired immunodeficiency syndrome: a paradigm for the pathogenesis of vascular disorders. Clin Investig. Feb;70(2):89-98.

66. **Gonzales PK, J Zhuang, SR Doctrow, B Malfroy, PF Benson, MJ Menconi, MP Fink**. 1996. Role of oxidant stress in the adult respiratory distress syndrome: Evaluation of a novel antioxidant strategy in a porcine model of endotoxin-induced acute lung injury. Shock 6: S23-S26

67. **Goss CH, Brower RG, Hudson LD, Rubenfeld GD.** 2003. ARDS Network. Incidence of acute lung injury in the United States. Crit Care Med 2003; 31: 1607–1611

68. **Götte M**. 2003. Syndecans in inflammation. FASEB J. Apr;17(6):575-91.

69. **Govers R, Rabelink TJ**. 2001. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. Am J Physiol Renal Physiol. Feb;280(2):F193-206.

70. **Gropper MA**. 2004. Evidence-based management of critically ill patients: analysis and implementation. Anesth Analg. Aug;99(2):566-72.

71. **Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY**. 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem. Mar 25;260(6):3440-50.

72. **Guikema BJ, Ginnan R, Singer HA, Jourd'heuil D.** 2005. Catalase potentiates interleukin-1beta-induced expression of nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. Free Radic Biol Med. Mar 1;38(5):597-605.

73. **Halliwell B, Clement MV, Long LH**. 2000. Hydrogen peroxide in the human body. FEBS Lett. Dec 1;486(1):10-3.

74. **Hayashi H, Miyata H.** 1994. Fluorescence imaging of intracellular Ca^{2+}. J Pharmacol Toxicol Methods. Feb;31(1):1-10.

75. **Heckel K, Winkelmann B, Strunden MS, Basedow A, Schuster A, Schumacher U, Kiefmann R, Reuter DA, Goetz AE**. 2011. Tetrastarch sustains pulmonary microvascular perfusion and gas exchange during systemic inflammation. Crit Care Med. Sep 15.

76. **Heckel K, Kiefmann R, Dörger M, Stoeckelhuber M, Goetz AE**. 2004. Colloidal gold particles as a new in vivo marker of early acute lung injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004 Oct;287(4):L867-78. Epub 2004 Jun 11.

77. **Henrich M, Gruss M, Weigand MA.** 2010. Sepsis-induced degradation of endothelial glycocalix. ScientificWorldJournal. May 18;10:917-23.

78. **Henry CB, Duling BR**. 2000. TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol 279: H2815-H2823.

79. **Henry CB, Duling BR**. 1999. Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. Am.J.Physiol 277: H508-H514.

80. **Hecquet CM, Malik AB**. 2009. Role of H2O2-activated TRPM2 calcium channel in oxidant-induced endothelial injury. Thromb Haemost Apr;101(4):619-25.

81. **Hidalgo C, Donoso P**. 2008. Crosstalk between calcium and redox signaling: from molecular mechanisms to health implications. Antioxid Redox Signal. Jul;10(7):1275-312.

82. **Hofmann-Kiefer KF, Kemming GI, Chappell D, Flondor M, Kisch-Wedel H, Hauser A, Pallivathukal S, Conzen P, Rehm M.** 2009. Serum Heparan Sulfate Levels are Elevated in Endotoxemia. Eur J Med Res. Dec 14;14(12):526-31.

83. **Horton MR, Burdick MD, Strieter RM, Bao C, Noble PW**. 1998. Regulation of hyaluronan-induced chemokine gene expression by IL-10 and IFN-gamma in mouse macrophages. J Immunol. Mar 15;160(6):3023-30.

84. **Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD**. 1991. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. Physiol Rev. Apr;71(2):481-539.

85. **Jacob M, Bruegger D, Rehm M, Stoeckelhuber M, Welsch U, Conzen P, and Becker BF**. 2007. The endothelial glycocalyx affords compatibility of Starling's principle and high cardiac interstitial albumin levels. Cardiovasc Res. Feb 1;73(3):575-86

86. **Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchick M**. 2001. Immunobiology: The Immune Systeme in Health and Disease. Janeway (Hrg.) 5. Auflg., Garland Science.

87. **Johnson P, Maiti A, Brown KL, Li R.** 2000. A role for the cell adhesion molecule CD44 and sulfation in leukocyte-endothelial cell adhesion during an inflammatory response? Biochem Pharmacol. Mar 1;59(5):455-65.

88. **Kato M, Wang H, Kainulainen V, Fitzgerald ML, Ledbetter S, Ornitz DM, Bernfield M.** 1998. Physiological degradation converts the soluble syndecan-1 ectodomain from an inhibitor to a potent activator of FGF-2. Nat Med. 4:691– 697.

89. **Kelley EE, Khoo NK, Hundley NJ, Malik UZ, Freeman BA, Tarpey MM**. 2010. Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. Free Radic Biol Med. Feb 15;48(4):493-8.

90. **Khatri SB, Hammel J, Kavuru MS, Erzurum SC, Dweik RA**. 2003. Temporal association of nitric oxide levels and airflow in asthma after whole lung allergen challenge. J Appl Physiol. Jul;95(1):436-40; discussion 435.

91. **Kiefmann R, Islam MN, Lindert J, Parthasarathi K, Bhattacharya J**. 2009. Paracrine purinergic signaling determines lung endothelial nitric oxide production.Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. Jun;296(6):L901-10.

92. **Kiefmann R, Rifkind JM, Nagababu E, Bhattacharya J**. 2008. Red blood cells induce hypoxic lung inflammation. Blood. May 15;111(10):5205-14.

93. **Kiefmann R, Heckel K, Dörger M, Schenkat S, Stoeckelhuber M, Wesierska-Gadek J, Goetz AE.** 2003. Role of poly(ADP-ribose) synthetase in pulmonary leukocyte recruitment. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. Nov;285(5):L996-L1005.

94. **Kiefmann R, Heckel K, Schenkat S, Dörger M, Wesierska-Gadek J, Goetz AE**. 2004a. Platelet-endothelial cell interaction in pulmonary micro-circulation: the role of PARS. Thromb Haemost. Apr;91(4):761-70.

95. **Kiefmann R, Heckel K, Doerger M, Schenkat S, Kupatt C, Stoeckelhuber M, Wesierska-Gadek J, Goetz AE**. 2004b. Role of PARP on iNOS pathway during endotoxin-induced acute lung injury. Intensive Care Med 30: 1421-1431.

96. **Kietzmann, D, R Kahl, M Müller, H Burchardi, D Kettler**. 1993. Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS. Intensive.Care Med. 19: 78-81.

97. **Knowles RG, Moncada S.** 1994. Nitric oxide synthases in mammals. Biochem J. Mar 1;298 (Pt 2):249-58.

98. **Kumagai R, Lu X, Kassab GS**. 2009. Role of glycocalyx in flow-induced production of nitric oxide and reactive oxygen species. Free Radic Biol Med. Sep 1;47(5):600-7.

99. **Lakshminarayanan V, Beno DW, Costa RH, Roebuck KA**. 1997. Differential regulation of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 by H2O2 and tumor necrosis factor-alpha in endothelial and epithelial cells. J Biol Chem. Dec 26;272(52):32910-8.

100. **Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T**. 1992. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. Proc Natl Acad Sci USA. Jul 15;89(14):6348-52.

101. **Laurent TC, Fraser JR.** 1992. Hyaluronan. FASEB J. Apr;6(7):2397-404.

102. **Leff JA, Parsons PE, Day CE, Taniguchi N, Jochum M, Fritz H, Moore FA, Moore EE, McCord JM, Repine JE.** 1993. Serum antioxidants as predictors of adult respiratory distress syndrome in patients with sepsis. Lancet. 1993 Mar 27;341(8848):777-80.

103. **Le Noble F, MoyonD, Pardanaud L.** 2004. Flowregulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. Development 131:361–375

104. **Levi M**. 2008. The coagulant response in sepsis. Clin Chest Med. 2008 Dec;29(4):627-42, viii.

105. **Ley K.** 2003. Arrest chemokines. Microcirculation. Jun;10(3-4):289-95.

106. **Liang J, Jiang D, Griffith J, Yu S, Fan J, Zhao X, Bucala R, Noble PW.** 2007. CD44 is a negative regulator of acute pulmonary inflammation and lipopolysaccharide-TLR signaling in mouse macrophages. J Immunol. Feb 15;178(4):2469-75.

107. **Lipowsky HH.** 2005. Microvascular rheology and hemodynamics. Microcirculation. Jan-Feb;12(1):5-15.

108. **Liu H, Colavitti R, Rovira II, Finkel T**. 2005. Redox-dependent transcriptional regulation. Circ Res. Nov 11;97(10):967-74.

109. **MacMicking J, Xie QW, Nathan C**. 1997. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol. 15:323-50.

110. **Marletta MA**. 1994. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. Cell. Sep 23;78(6):927-30.

111. **Matthay, M. A. and G. A. Zimmerman**. 2005. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 33:319-327.

112. **McCarthy SA, Kuzu I, Gatter KC, Bicknell R.** 1991. Heterogeneity of the endothelial cell and its role in organ preference of tumour metastasis. Trends Pharmacol Sci. Dec;12(12):462-7.

113. **McKee CM, Penno MB, Cowman M, Burdick MD, Strieter RM, Bao C, Noble PW.** 1996. Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. J Clin Invest. Nov 15;98(10):2403-13.

114. **Mehta D, Malik AB**. 2006. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. Physiol Rev. 86: 279-367.

115. **Mochizuki S, Vink H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Spaan JA, and Kajiya F**. 2003. Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release. Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol 285: H722-H726.

116. **Molema G.** 2010. Heterogeneity in endothelial responsiveness to cytokines, molecular causes, and pharmacological consequences. Semin Thromb Hemost. Apr;36(3):246-64.

117. **Moon JJ, Matsumoto M, Patel S, Lee L, Guan JL, Li S**. 2005. Role of cell surface heparan sulfate proteoglycans in endothelial cell migration and mechanotransduction. J Cell Physiol. Apr;203(1):166-76.

118. **Moore TM, Shirah WB, Khimenko PL, Paisley P, Lausch RN, Taylor AE.** 2002. Involvement of CD40 – CD40L signaling in postischemic lung injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 283: L1255–1262.

119. **Morrison DC, Ryan JL.** 1987. Endotoxins and disease mechanisms. Annu Rev Med. 38, 417-432.

120. **Moseley R, Waddington RJ, Embery G. 1997.** Degradation of glycosaminoglycans by reactive oxygen species derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. Biochim Biophys Acta. Dec 31;1362(2-3):221-31.

121. **Mulivor AW, Lipowsky HH.** 2004. Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. Am J Physiol Heart Circ Physiol. May;286(5):H1672-80.

122. **Mulligan MS, Till GO, Smith CW, Anderson DC, Miyasaka M, Tamatani T, Todd RF 3rd, Issekutz TB, Ward PA.** 1994. Role of leukocyte adhesion molecules in lung and dermal vascular injury after thermal trauma of skin. Am J Pathol. May;144(5):1008-15.

123. **Nagy N, Freudenberger T, Melchior-Becker A, Röck K, Ter Braak M, Jastrow H, Kinzig M, Lucke S.** 2010. Inhibition of hyaluronan synthesis accelerates murine atherosclerosis: novel insights into the role of hyaluronan synthesis. Circulation. Nov 30;122(22):2313-22.

124. **Nandi A, Estess P, Siegelman MH.** 2000. Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44. J Biol Chem. May 19;275(20):14939-48.

125. **Nelson A, Berkestedt I, Schmidtchen A, Ljunggren L, Bodelsson M**. 2008. Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma. Shock. Dec;30(6):623-7.

126. **Ng CF, Schafer FQ, Buettner GR, Rodgers VG**. 2007. The rate of cellular hydrogen peroxide removal shows dependency on GSH: mathematical insight into in vivo H2O2 and GPx concentrations. Free Radic Res. Nov;41(11):1201-11.

127. **Nieuwdorp M, Mooij HL, Kroon J, Atasever B, Spaan JA, Ince C, Holleman F, Diamant M, Heine RJ, Hoekstra JB, Kastelein JJ, Stroes ES, Vink H.** 2006 a. Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes. Diabetes. Apr;55(4):1127-32.

128. **Nieuwdorp M, van Haeften TW, Gouverneur MCLG, Mooij HL, van Lieshout MHP, Levi M, Meijers JCM, Holleman F, Hoekstra JBL, Vink H, Kastelein JJP, Stroes ESG**. 2006. Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo. Diabetes. 55:480–486.

129. **Nieuwdorp M, Meuwese MC, Vink H, Hoekstra JB, Kastelein JJ, Stroes ES**. 2005. The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease. Curr Opin Lipidol.Oct;16(5):507-11.

130. **Oike M, Watanabe M, Kimura C.** 2008. Involvement of heparan sulfate proteoglycan in sensing hypotonic stress in bovine aortic endothelial cells. Biochim Biophys Acta. Oct; 1780 (10):1148-55.

131. **Okada Y, Yamada S, Toyoshima M, Dong J, Nakajima M, Sugahara K.** 2002. Structural recognition by recombinant human heparanase that plays critical roles in tumor metastasis. Hierarchical sulfate groups with different effects and the essential target disulfated trisaccharide sequence. J Biol Chem. Nov 8;277(45):42488-95.

132. **Oliveira-Marques V, Marinho HS, Cyrne L, Antunes F**. 2009. Role of hydrogen peroxide in NF-kappaB activation: from inducer to modulator. Antioxid Redox Signal. Sep;11(9):2223-43.

133. **Oohira A, Wight TN, Bornstein P.** 1983. Sulfated proteoglycans synthesized by vascular endothelial cells in culture. J Biol Chem. Feb 10;258(3):2014-21.

134. **Ori, A, Wilkinson MC, Fernig DG.** 2008. The heparanome and regulation of cell function: Structures, functions and challenges. Front. Biosci. 13, 4309–4338.

135. **Page C, M Rose, M Yacoub and R Pigott.** 1991. Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. Am J Pathol 141:677–683.

136. **Pahakis MY, Kosky JR, Dull RO, Tarbell JM.** 2007. The role of endothelial glycocalyx components in mechanotransduction of fluid shear stress. Biochem Biophys Res Commun. Mar 30;355(1):228-33.

137. **Parish CR**. 2005. Heparan sulfate and inflammation. Nat Immunol. 6:861–862

138. **Parish CR, Hindmarsh EJ, Bartlett MR, Staykova MA, Cowden WB, Willenborg DO**. 1998. Treatment of central nervous system inflammation with inhibitors of basement membrane degradation. Immunol Cell Biol. Feb;76(1):104-13.

139. **Park PW, Reizes O, Bernfield M**. 2000. Cell surface heparan sulfate proteoglycans: selective regulators of ligand-receptor encounters. J Biol Chem. Sep 29;275(39):29923-6.

140. **Parra-Bonilla G, Alvarez DF, Al-Mehdi AB, Alexeyev M, Stevens T**. 2010. Critical role for lactate dehydrogenase A in aerobic glycolysis that sustains pulmonary microvascular endothelial cell proliferation. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2010 Oct;299(4):L513-22.

141. **Perrin RM, Harper SJ, Bates DO.** 2007. A role for the endothelial glycocalyx in regulating microvascular permeability in diabetes mellitus. Cell Biochem Biophys. 49(2):65-72.

142. **Petty TL and Ashbaugh DG**. 1971. The Adult Respiratory Distress Syndrome: Clinical Features, Factors Influencing Prognosis and Principles of Management. Chest 60: 233-239.

143. **Potter DR, Jiang J, Damiano ER.** 2009. The recovery time course of the endothelial cell glycocalyx in vivo and its implications in vitro. Circ Res. Jun 5;104(11):1318-25.

144. **Potter DR, Damiano ER**. 2008. The hydrodynamically relevant endothelial cell glycocalyx observed in vivo is absent in vitro. Circ Res 102: 770–776

145. **Powell AK, Yates EA, Fernig DG, Turnbull JE**. 2004. Interaction of heparin/heparan sulfate with proteins: Appraisal of structural factors and experimental approaches. Glycobiology 14, 17–30.

146. **Pries AR, Kuebler WM.** 2006. Normal endothelium. Handb Exp Pharmacol. (176 Pt 1):1-40.

147. **Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P**. 2000. The endothelial surface layer. Pflugers Arch. 440: 653-666.

148. **Pries AR, Secomb TW, Jacobs H, Sperandio M, Osterloh K, Gaehtgens P.** 1997. Microvascular blood flow resistance: role of endothelial surface layer. Am J Physiol 273:H2272-H2279

149. **Quinlan GJ, Evans TW, Gutteridge JM**. 1994. 4-hydroxy-2-nonenal levels increase in the plasma of patients with adult respiratory distress syndrome as linoleic acid appears to fall. Free Radic Res. Aug;21(2):95-106.

150. **Randolph AG**. 2009. Management of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in children. Crit Care Med. Aug;37(8):2448-54.

151. **Rehm M, Bruegger D, Christ F, Conzen P, Thiel M, Jacob M, Chappell D, Stoeckelhuber M, Welsch U, Reichart B, Peter K, Becker BF.** 2007. Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. Circulation. Oct 23;116(17):1896-906.

152. **Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncali L, Dammacco F**. 2002. Endothelial cell heterogeneity and organ specificity. J Hematother Stem Cell Res. Feb;11(1):81-90.

153. **Roe MW, Lemasters JJ, Herman B**. 1990. Assessment of Fura-2 for measurements of cytosolic free calcium. Cell Calcium. Feb-Mar;11(2-3):63-73.

154. **Rose CE Jr, Juliano CA, Tracey DE, Yoshimura T, Fu SM.** 1994. Role of interleukin-1 in endotoxin-induced lung injury in the rat. Am J Respir Cell Mol Biol. Feb;10(2):214-21.

155. **Rosenberg RD, Shworak NW, Liu J, Schwartz JJ, Zhang L.** 1997. Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. Specific structures emerge but how is synthesis regulated? J Clin Invest. Dec 1;100(11 Suppl):S67-75.

156. **Rot A, von Andrian UH**. 2004. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. Annu Rev Immunol. 22:891-928.

157. **Roveri A, Coassin M, Maiorino M, Zamburlini A, van Amsterdam FT, Ratti E, Ursini F**. 1992. Effect of hydrogen peroxide on calcium homeostasis in smooth muscle cells. Arch Biochem Biophys. Sep;297(2):265-70.

158. **Rubenfeld, G. D., E. Caldwell, E. Peabody, J. Weaver, D. P. Martin, M. Neff, E. J. Stern, and L. D. Hudson**. 2005. Incidence and outcomes of acute lung injury. N.Engl.J.Med. 353:1685-1693.

159. **Rubio-Gayosso I, Platts S, Duling BR**. 2004. Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol.290:2247–2256.

160. **Ruffell B, Johnson P**. 2009. The regulation and function of hyluronan binding by CD44 in the immune system. GlycoForum/GlycoScience/Science of Hyaluronan. Jan 7

161. **Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM.** 2005. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. Nat Med. Dec;11(12):1306-13.

162. **Salvemini D, Doyle TM, Cuzzocrea S**. 2006. Superoxide, peroxynitrite and oxidative/nitrative stress in inflammation. Biochem Soc Trans. Nov;34(Pt 5):965-70.

163. **Scheiermann C, Kunisaki Y, Jang JE, Frenette PS.** 2010. Neutrophil microdomains: linking heterocellular interactions with vascular injury. Curr. Opin. Hematol. 17:25-30

164. **Schmidt HH, Walter U**. 1994. NO at work. Cell. Sep 23;78(6):919-25.

165. **Screaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI**. 1992. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. Proc Natl Acad Sci USA. Dec 15;89(24):12160-4.

166. **Seaver LC, Imlay JA**. 2001. Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing Escherichia coli. J Bacteriol. Dec;183(24):7182-9.

167. **Seog J, Dean D, Rolauffs B, Wu T, Genzer J, Plaas AH, Grodzinsky AJ, Ortiz C.** 2005. Nanomechanics of opposing glycosaminoglycan macromolecules. J Biomech. Sep;38(9):1789-97.

168. **Shafat I, Zcharia E, Nisman B.** 2006. An ELISA method for the detection and quantification of human heparanase. Biochem Biophys Res Commun 341: 958–963

169. **Siegelman MH, DeGrendele HC, Estess P.** 1999. Activation and interaction of CD44 and hyaluronan in immunological systems. J Leukoc Biol. Aug;66(2):315-21.

170. **Singh A, Fridén V, Dasgupta I, Foster RR, Welsh GI, Tooke JE, Haraldsson B, Mathieson PW, Satchell SC.** 2011. High glucose causes dysfunction of the human glomerular endothelial glycocalyx. Am J Physiol Renal Physiol. Jan;300(1):F40-8.

171. **Smith JM, Meinkoth JH, Hochstatter T, Meyers KM.** 1996. Differential distribution of von Willebrand factor in canine vascular endothelium. Am J Vet Res. 1996 May;57(5):750-5.

172. **Spanel-Borowski K, Fenyves A.** 1994. The heteromorphology of cultured microvascular endothelial cells. Arzneimittelforschung. Mar;44(3A):385-91.

173. **Springer, T. A.** 1990. Adhesion receptors of the immune system. Nature 346: 425-433, 419.

174. **Springer, T. A.** 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation und leukocyte emigration: the multistep paradigm. Cell 76: 301-314.

175. **Stevens T**. 2005. Molecular and cellular determinants of lung endothelial cell heterogeneity. Chest. Dec;128(6 Suppl):558S-564S.

176. **Tang PS, Mura M, Seth R, Liu M.** 2008. Acute lung injury and cell death: how many ways can cells die? Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. Apr;294(4):L632-41.

177. **Tarbell JM.** 2010. Shear stress and the endothelial transport barrier. Cardiovasc Res. Jul 15;87(2):320-30.

178. **Tarbell JM, Ebong EE.** 2008. The endothelial glycocalyx: a mechano-sensor and -transducer. Sci Signal. Oct 7;1(40):pt8.

179. **Tarbell JM and Pahakis MY**. 2006. Mechanotransduction and the glycocalyx. *J.Intern.Med.* 259: 339-350.

180. **Tasaka S, Amaya F, Hashimoto S, Ishizaka A**. 2008. Roles of oxidants and redox signaling in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. Antioxid Redox Signal. Apr;10(4):739-53.

181. **Thiemermann C**. 1997. Nitric oxide and septic shock. Gen Pharmacol. Aug;29(2):159-66.

182. **Thorin E, Shreeve SM**. 1998. Heterogeneity of vascular endothelial cells in normal and disease states. Pharmacol Ther. Jun;78(3):155-66.

183. **Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M**. 2005. Syndecans: new kids on the signaling block. Circ Res. Mar 18;96(5):488-500.

184. **Tuhkanen AL, Tammi M, Tammi R.** 1997. CD44 substituted with heparan sulfate and endo-beta-galactosidase-sensitive oligosaccharides: a major proteoglycan in adult human epidermis. J Invest Dermatol. Aug;109(2):213-8.

185. **Tse D, Stan RV. 2010**. Morphological heterogeneity of endothelium. Semin Thromb Hemost. 2010 Apr;36(3):236-45.

186. **Turnbull JE, Miller RL, Ahmed Y, Puvirajesinghe TM, Guimond SE.** 2010**.** Glycomics profiling of heparan sulfate structure and activity. Methods Enzymol. 480:65-85.

187. **van den Berg BM, Spaan JA, Rolf TM, Vink H.** 2006. Atherogenic region and diet diminish glycocalyx dimension and increase intima media ratios at the murine carotid artery bifurcation. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 290:915–920.

188. **van den Berg BM, Vink H, Spaan JA**. 2003. The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema. Circ.Res. 92: 592-594.

189. **Vanderkooi JM, Erecińska M, Silver IA.** 1991. Oxygen in mammalian tissue: methods of measurement and affinities of various reactions. Am J Physiol. Jun; 260(6 Pt 1):C1131-50.

190. **Vijayagopal P, Srinivasan SR, Dalferes ER Jr, Radhakrishnamurthy B, Berenson GS**. 1988. Effect of low-density lipoproteins on the synthesis and secretion of proteoglycans by human endothelial cells in culture. Biochem J. Oct 15;255(2):639-46.

191. **Vink H, Duling BR**. 2000. Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume. Am J Physiol Heart Circ Physiol. Jan;278(1):H285-9.

192. **Vink H, Constantinescu AA, and Spaan JA.** 2000. Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer : implications for platelet-endothelial cell adhesion. Circulation 101: 1500-1502.

193. **Vlodavsky I, Ilan N, Nadir Y.** 2007. Heparanase, heparin and the coagulation system in cancer progression. Thromb Res 120 [Suppl 2]: S112–S120

194. **Vlodavsky I, Eldor A, Haimovitz-Friedman A, Matzner Y, Ishai-Michaeli R, Lider O, Naparstek Y, Cohen IR, Fuks Z**. 1992. Expression of heparanase by platelets and circulating cells of the immune system: possible involvement in diapedesis and extravasation. Invasion Metastasis. 12(2):112-27.

195. **Vogel J, Sperandio M, Pries AR, LinderkampO, Gaehtgens P, KuschinskyW.** 2000. Influence of the endothelial glycocalyx on cerebral blood flow in mice. J Cereb Blood Flow Metab 20:1571–1578

196. **Wang L, Brown JR, Varki A, Esko JD**. 2002. Heparin's anti-inflammatory effects require glucosamine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L- and P-selectins. J Clin Invest. Jul;110(1):127-36.

197. **Wang L, Fuster M, Sriramarao P, Esko JD**. 2005. Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. Nat Immunol. Sep;6 (9):902-10.

198. **Wang Q, Teder P, Judd NP, Noble PW, Doerschuk CM.** 2002. CD44 deficiency leads to enhanced neutrophil migration and lung injury in Escherichia coli pneumonia in mice. Am J Pathol. Dec;161(6):2219-28.

199. **Wang X, Adler KB, Erjefalt J, Bai C**. 2007. Airway epithelial dysfunction in the development of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. Expert Rev Respir Med. Aug;1(1):149-55.

200. **Ward PA**. 2010. Oxidative stress: acute and progressive lung injury. Ann N Y Acad Sci. 2010 Aug;1203:53-9.

201. **Ware LB, Matthay MA**. 2000. The Acute Respiratory Distress Syndrome. N Engl J Med 342: 1334-1349.

202. **Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER.** 2007. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. Annu Rev Biomed Eng. 9:121-67.

203. **Weinbaum S, Zhang X, Han Y, Vink H, and Cowin SC**. 2003. Mechanotransduction and flow across the endothelial glycocalyx. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 100: 7988-7995.

204. **Windt GJ, Schouten M, Zeerleder S, Florquin S, Poll T.** 2011. CD44 is protective during hyperoxia-induced lung injury. Am J Respir Cell Mol Biol. 2011 Mar;44(3):377-83.

205. **Winterbourn CC**. 2008. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. Nat Chem Biol. May;4(5):278-86.

206. **Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C**. 1992. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. Science. Apr 10;256(5054):225-8.

207. **Ying X, Minamiya Y, Fu C, Bhattacharya J.** 1996. Ca2+ waves in lung capillary endothelium. Circ Res. Oct;79(4):898-908.

208. **Yu BP.** Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiol Rev. 1994 Jan;74(1):139-62.

209. **Zimmerman GA, Albertine KH, Carveth HJ, Gill EA, Grissom CK, Hoidal JR, Imaizumi T , Maloney CG, McIntyre TM, Michael JR, Orme JF, Prescott SM, Topham MS.** 1999. Endothelial activation in ARDS. Chest. 116, 18-24

8. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Direktor: Prof. Dr. med. Alwin E. Goetz) durchgeführt.

Nach Beendigung der Arbeit gilt mein besonderer Dank:

Herrn Prof. Dr. med. A.E. Goetz für die freundliche Aufnahme in das Zentrum für Anästhesiologie und Intensivmedizin und die großartige Unterstützung bei der Bewerbung für das Werner-Otto Stipendium.

Herrn Prof. Dr. med. R. Kiefmann für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis Lungenforschung, dessen wissenschaftliche und produktive Atmosphäre er maßgeblich prägte. Während meiner experimentellen Tätigkeit forderte und förderte er mich stetig. Seine Anregungen und seine konstruktiven Kritiken waren mir stets eine große Hilfe.

Herrn Dr. med. K. Heckel für die jahrelange und unermüdliche Unterstützung bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit, sowie der Bewerbung für das Werner-Otto Stipendium. Durch seine zahlreichen Erfahrungen in laborchemischen Methoden, der Fluoreszenzmikroskopie als auch der Molekularbiologie, verdanke ich ihm ein sehr umfangreiches und präzises Arbeiten. Herr Dr. Heckel unterstützte mich bei internationalen Kongressen, bei Einreichungen von *Abstracts* und Postern.

Frau Dipl. rer. nat. Anke Schuster für den unglaublichen Einsatz und die herzliche Unterstützung bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit. Viele Ideenansätze und molekularbiologische Arbeitstechniken verdanke ich Ihr.

Meinen Familien in Bad Bevensen und Ravensburg, die mich tatkräftig unterstützen und oft entbehren mussten.

9. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Katharina-Juliane Kirsche