

***Untersuchung der Lokalisation und Interaktion von
Caveolinen im Endothel und Atemwegsepithel mittels
indirekter Immunfluoreszenz und CLSM-FRET-Analyse***

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gabriela Krasteva

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. h. c. R. Leiser

und

Institut für Anatomie und Zellbiologie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang Kummer

***Untersuchung der Lokalisation und Interaktion von
Caveolinen im Endothel und Atemwegsepithel mittels
indirekter Immunfluoreszenz und CLSM-FRET-Analyse***

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Gabriela Krasteva

Tierärztin aus Gabrovo, Bulgarien

Gießen 2006

**Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan: Prof. Dr. R. M. Reinacher

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. h. c. R. Leiser

Prof. Dr. W. Kummer

Tag der Disputation: 15.01.2007

Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG	1
I.1	FRET	1
I.2	Caveoline	2
I.3	Ziel der Arbeit	4
II.	LITERATURÜBERSICHT	5
II.1	Caveolae	5
	<i>II.1.1 Morphologie und Zelltypen</i>	<i>5</i>
	<i>II.1.2 Aufbau</i>	<i>6</i>
	<i>II.1.3 Caveoline</i>	<i>6</i>
	Caveolin-1	7
	Caveolin-2	7
	Caveolin-3	7
	Caveolin-Gene und zelltypspezifische Expression	8
	Strukturelle Eigenschaften	8
II.2	Biogenese von Caveolae	10
II.3	Funktionelle Bedeutung von Caveolinen/Caveolae	10
	Caveoline und weitere caveoläre Proteine	10
	Caveoline und Viren	12
	eNOS und Caveoline	12
II.4	Cav-defiziente Mäuse	14
	Cav-1-defiziente Maus	14
	Cav-2-defiziente Maus	14
	Cav-3-defiziente Maus	15
II.5	Atemwegsepithel	15
	Aufbau	15
	Zelluläre Regulation der Zilienschlagfrequenz	16
	eNOS und respiratorischen Epithel	17
	CHT1 im respiratorischen Epithel	17
II.6	FRET	18
III.	MATERIAL UND METHODEN	23
III.1	Gewebegewinnung	23

III.1.1 Tiere	23
III.1.2 Gewinnung von unfixiertem Gewebe	23
III.1.3 Gewinnung von unfixiertem Trachealepithel und <i>M. trachealis</i>	23
III.1.4 Perfusionsfixierung	24
III.1.5 Paraffineinbettung	24
III.1.6 Gewinnung und Fixierung von humanen Glomustumoren	24
Besondere Präparationsverfahren	25
III.1.7 Transtracheale Füllung mit. O.C.T.-Compound	25
III.2 Konventionelle Elektronmikroskopie	25
III.3 Immunhistochemische Verfahren	26
III.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz an Kryoschnitten	26
III.3.2 Indirekte Doppelimmunfluoreszenz an Kryoschnitten mittels Alexa Fluor Labeling Kit	27
III.3.3 Indirekte Immunfluoreszenz an Paraffinschnitten	28
III.4 Immunhistochemische Untersuchungen	28
III.4.1 Immunhistochemische Untersuchungen der Lokalisation von Cav-1, Cav-2 und Cav-3 in den Atemwegen der Ratte	28
III.4.2 Immunhistochemische Untersuchungen zur Kolokalisation von Cav-1 α /Cav-1 $\alpha\beta$ und Cav-1 α /Cav-2 in den Atemwegen der Ratte	29
III.4.3 Immunhistochemische Untersuchungen zur Zelltypenbestimmung der Cav-1 α -, Cav-1 $\alpha\beta$ - und Cav-2- immunreaktiven Zellen der Atemwege der Ratte	30
III.4.4 Immunhistochemische Untersuchungen zur Zelltypenbestimmung der Cav-3-immunreaktiven Zellen der Atemwege der Ratte	31
III.4.5 Identifizierung des Cav-3-immunreaktiven Kompartimentes der Atemwegsepithelzellen	32
III.4.6 Immunhistochemische Untersuchungen der Lokalisation von Cav-1 α in den Atemwegen der Maus und des Menschen	33
III.4.7 Indirekte Doppelimmunfluoreszenz zur Untersuchung der Assoziation von Cav-1 α und Cav-2	33
III.4.8 Kontrollen zu den immunhistochemischen Untersuchungen.....	34

Präabsorption	34
III.5 Indirekte Doppelimmunfluoreszenz für FRET-Untersuchungen	35
<i>III.5.1 Indirekte Doppelimmunhistochemie zur Untersuchung der</i> <i>Assoziation von Cav-1α und Cav-2</i>	<i>35</i>
<i>III.5.2 Indirekte Doppelimmunfluoreszenz für FRET-</i> <i>Untersuchungen an Endothelzellen in situ</i>	<i>36</i>
<i>III.5.3 Indirekte Doppelimmunfluoreszenz für FRET-</i> <i>Untersuchungen an Atemwegsepithelzellen in situ</i>	<i>37</i>
III.6 FRET	37
<i>III.6.1 Detektion von FRET</i>	<i>37</i>
<i>III.6.2 Statistische Auswertung</i>	<i>38</i>
III.7 RT-PCR	39
<i>III.7.1 RNA-Isolation</i>	<i>39</i>
<i>III.7.2 DNase-Verdau und reverse Transkription</i>	<i>39</i>
<i>III.7.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	<i>40</i>
<i>III.7.4 Gelelektrophorese</i>	<i>41</i>
<i>III.7.5 Kontrollreaktionen</i>	<i>42</i>
III.8 Laser-assistiertes Zellpicken	42
<i>III.8.1 Gewinnung von Trachealepithelzellen für RT-PCR-</i> <i>Analysen</i>	<i>42</i>
<i>III.8.2 Reverse Transkription</i>	<i>42</i>
<i>III.8.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	<i>43</i>
<i>III.8.4 DNA-Aufreinigung und Sequenzierung</i>	<i>44</i>
<i>III.8.5 Kontrollreaktionen</i>	<i>44</i>
<i>III.8.6 Spezielle Kontrollen</i>	<i>44</i>
III.9 Real-time quantitative PCR	45
<i>III.9.1 RT-PCR</i>	<i>45</i>
<i>III.9.2 Berechnung der relativen Expression</i>	<i>46</i>
<i>III.9.3 Kontrollreaktionen</i>	<i>46</i>
III.10 Western Blot	47
<i>III.10.1 Proteingewinnung, Elektrophorese, Proteintransfer und</i> <i>Proteindetektion</i>	<i>47</i>
<i>III.10.2 Kontrollreaktionen</i>	<i>49</i>
IV. ERGEBNISSE	50

IV.1 FRET	50
<i>IV.1.1 Detektion einer engen räumlichen Assoziation von Cav-1α und Cav-2 durch immunhistochemische Doppelmarkierung und FRET-CLSM-Analyse an Gewebeschnitten</i>	50
<i>IV.1.2 Verdünnungsreihen mit Cy-3-konjugiertem Sekundärantikörper</i>	53
<i>IV.1.3 Vergleich der Eignung von ΔIF und $FRET_{eff}$ zur FRET-Detektion in Gewebeschnitten</i>	55
<i>IV.1.4 Einfluss der Inkubationsreihenfolge der Sekundärantikörper</i>	56
<i>IV.1.5 Einfluss der Verwendung von $F(ab')_2$-Fragmenten und sequenzieller vs. simultaner Applikation der Sekundärreagenzien</i>	56
<i>IV.1.6 Anwendbarkeit der Methodik auf archiviertes humanes Gewebe am Beispiel von Glomus caroticum-Tumoren</i>	58
<i>IV.1.7 Detektion einer engen räumlichen Assoziation von Cav-1 und Cav-2 in den Zellkompartimenten einer einzelnen Endothelzelle</i>	59
IV.2 Cav-1 und Cav-2	61
<i>IV.2.1 Lichtmikroskopische Immunhistochemie</i>	61
Herz	61
Lunge und Mediastinum	62
Trachea und Bronchien	64
<i>Ratte</i>	64
Zilientragende Zellen	66
Basalzellen	67
Sekretorische Zellen und Clarazellen	67
Bürstenzellen	67
<i>Mensch</i>	68
<i>Maus</i>	69
<i>IV.2.2 Elektronenmikroskopie</i>	69
<i>IV.2.3 RT-PCR</i>	71
<i>IV.2.4 Laser-assistierte Mikrodissektion</i>	74
<i>IV.2.5 Western Blot</i>	74
<i>IV.2.6 Detektion einer engen räumlichen Assoziation von Cav-1 und Cav-2 in Trachealepithelzellen in Gewebeschnitten durch</i>	

<i>immunhistochemische Doppelmarkierung und FRET-CLSM-Analyse</i>	76
IV.3 Cav-3	78
<i>IV.3.1 Lichtmikroskopische Immunhistochemie</i>	78
Trachea und Bronchien	78
Zilientragende Zellen	79
Sekretorische Zellen und Clarazellen	80
<i>IV.3.2 RT-PCR</i>	81
<i>IV.3.3 RT-PCR an durch laser-assistierte Mikrodissektion gewonnenen Proben</i>	87
<i>IV.3.4 Western Blot</i>	90
<i>IV.3.5 Elektronenmikroskopie</i>	90
V. DISKUSSION	94
V.1 Indirekte Immunfluoreszenz kombiniert mit FRET-CLSM-Analyse	94
V.2 Caveoline	100
<i>Cav-1 und Cav-2</i>	100
<i>Cav-3</i>	104
VI. ZUSAMMENFASSUNG	108
VII. SUMMARY	110
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	112
IX. ERKLÄRUNG	131
X. VERZEICHNIS DER EIGENEN ARBEITEN	132
X.1 Originalarbeiten	132
X.2 Abstracts	133
XI. DANKSAGUNG	134

Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	α -smooth muscle actin
ACh	Azetylcholin
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
AS	Aminosäure
β -MG	β -mikroglobulin
BDMA	N-Benzyl dimethylamine
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
CaM-Kinase	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängigen Kinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cav	Caveolin
Cav-1	Caveolin-1
Cav-2	Caveolin-2
Cav-3	Caveolin-3
CBF	Zilienschlagfrequenz
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
ChAT	Cholinazetyltransferase
CHT1	Cholintransporter-1
CFP	Cyan-Fluoreszenz-Protein
CLSM	konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
C-MAD	COOH-Terminus-Membranbindungsdomäne
Cy-3	Indocarbocyanin
Cy-5	Indodicarbocyanin
Δ	Differenz
Δ IF	Anstieg in der Donorfluoreszenz
DDSA	Dodecanyl Succinic Anhydride
DG-Komplex	Dystrophin-Glykoprotein-Komplex
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGF	epithelial growth factor epithelialer Wachstumsfaktor
eNOS	endotheliale NOS
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	et alii (lat.): und andere
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FP	fluoreszierendes Protein
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer; Förster-Resonanz-Energie-Transfer
FRET _{eff}	FRET-Effizienz
GFP	Green-Fluorescent-Protein
G-Protein	Guaninnukleotid-bindende Regulatorproteine
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTPase	Guanosintriphosphatase
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IP ₃ -R	Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor
Konz.	Konzentration
LBs	Lewy Bodies
MAP-Kinase	mitogen-activated-protein-kinase
kDa	kilo Dalton
M2-Azetylcholinrezeptor	muskarinischer M2-Azetylcholinrezeptor
MNA	Methyl Nadic Anhydride
MHC	major histocompatibility complex Haupthistocompatibilitätskomplex
MhC	Myosin heavy chain
MDCK-Zellen	Madin-Darby canine kidney (cells) Epithelzellen der Niere
NGS	normales Ziegenserum
NHS	normales hitzeinaktiviertes Pferdeserum
N-MAD	NH ₂ -Terminus-Membranbindungsdomäne
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid Synthetase
ns.	nicht signifikant

OCT	organische Kationentransporter
OT	Objektträger
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor von Thrombozyten freigesetzter Wachstumsfaktor
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PP	Phosphatpuffer
ROC	receiving operator characteristics curve
ROI	region of interest
SB	Standardbedingungen
SC-Domäne	<i>scaffolding</i> Domäne
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
Ser/Thr-Kinase	Serin/Threonin-Kinase
SP-D	Surfactant Protein-D
SPF	spezifiziert Pathogen-frei
SV40	Simian Virus 40
TBS	TRIS-buffered saline
Tyr-Kinase	Tyrosin-Kinase
VACHT	vesikuläre Azetylcholintransporter
VEGF	vascular endothelial growth factor endothelialer Gefäßwachstumsfaktor
VIP	vesicular integral-membrane protein
Vol.	Volumen
WT	Wildtypstamm
YFP	Yellow-Fluorescent-Protein

I. Einleitung

I.1 FRET

Die Funktion eines Proteins wird von mit ihm interagierenden Proteinen moduliert. Die Identifikation seiner Interaktionspartner ist wichtig, um Einblicke in die Funktion eines Proteins zu gewinnen. Von hoher Relevanz sind dabei die subzelluläre Lokalisation der Protein-Protein-Assoziation in der Zelle sowie die Umstände, die zur Interaktion führen. Viele Techniken wurden entwickelt, um Protein-Protein-Assoziationen in Zellkultur und in Gewebehomogenaten zu untersuchen. Diese Methoden liefern jedoch nur eine eingeschränkte Information über die Situation in situ. In der Zellkultur ist das System in seiner Komplexität sehr reduziert, und Gewebehomogenate erlauben keinen Rückschluss über den Zelltyp, in dem die Interaktion stattfindet. Deswegen ist es erstrebenswert, die enge räumliche Assoziation von Proteinen in Zellen innerhalb des natürlichen Gewebes zu detektieren und dabei auch die Zellkompartimente zu identifizieren, in denen diese Interaktion erfolgt.

Das Ziel dieser Arbeit war, eine geeignete Methodik zu entwickeln, um eine enge räumliche Assoziation von zwei Proteinen zu detektieren, deren Expression nicht pathologisch verändert wurde. Als Ansatz wählten wir die indirekte Immunhistochemie kombiniert mit Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Analyse anhand konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM). Als Modellsystem wurde die Interaktion zwischen Caveolin (Cav)-1 α und Cav-2 untersucht, zwei Hauptproteinen von Caveolae, die Heterooligomere bilden (Razani et al., 2002). Weil der Transport von Cav-2 zu den Caveolae von der Koexpression von Cav-1 abhängig ist (Capozza et al., 2005; Drab et al., 2001), stellten wir die Hypothese auf, dass beide Proteine in den Caveolae interagieren und somit ein geeignetes Model darstellen, um die Applikation der Doppelimmunfluoreszenz kombiniert mit FRET-CLSM-Analyse zu testen. Da es von großer Bedeutung ist, über eine Methode zu verfügen, die die Untersuchung von Signalwegen im humanen Gewebe unter pathologischen Bedingungen ermöglicht, wurde weiterhin überprüft, ob diese Technik an humanen Geweben, das bei chirurgischen Eingriffen gewonnen wurde, angewendet werden kann.

I.2 Caveoline

Caveolae sind omega-förmige Invaginationen der Plasmamembran mit einem Durchmesser von 50 bis 100 nm. Sie finden sich in einer Reihe von unterschiedlichen Zelltypen, wie zum Beispiel Pneumozyten Typ I, Adipozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Herzmuskelzellen, glatte Muskelzellen, Skelettmuskelfasern und Chondrozyten (Palade, 1953; Napolitano, 1963; Mobley und Eisenberg, 1975; Gabella, 1976, Schwab et al., 1999; Razani et al., 2002). Manche Zelltypen besitzen keine Caveolae (Neuronen und Lymphozyten) (Fra et al., 1994; Cameron et al., 1997). Die Ursache für dieses zelltypspezifische Vorkommen von Caveolae ist nicht bekannt. Die Bildung von Caveolae ist abhängig von der Expression der Caveoline (Cav). Drei Cav-Isoformen sind bekannt. Cav-1 und Cav-2 sind weitverbreitet exprimiert, dagegen gilt Cav-3 als muskelspezifische Isoform (Cohen et al., 2004). Cav-1 tritt seinerseits in zwei Isoformen auf, Cav-1 α und Cav-1 β (Kogo und Fujimoto, 2000). Beide Isoformen zeigen eine zelltyp-spezifische Verteilung in der Alveolarregion (Endothelzellen vs. Alveolarepithelzellen Typ I) (Kogo et al., 2004).

Caveolae sind in mehrere Funktionen der Zellen involviert, wie Signaltransduktionsmechanismen, Endozytose, intrazellulärer Transport und Cholesterolumhomöostase (Cohen et al., 2004). Verschiedene pathogene Mikroorganismen nutzen Caveolae, um sich Eintritt in die Zellen zu verschaffen (Norkin, 2001). Nach der Akkumulation in den Caveolae gelangen sie direkt zum endoplasmatischen Retikulum (ER). Auf diese Weise wird der klassische endosomale-lysosomale Transportweg umgangen und eine Inaktivierung der pathogenen Mikroorganismen verhindert (Norkin et al., 2002; Pelkmans et al., 2002). Es wurde gezeigt, dass die Infektiosität des humanen Adenovirus Typ C in plasmolytischen Zellen durch die Expression einer dominant-negativen Cav-1-Mutante sehr stark reduziert wird (Zabner et al., 1997). Diese Ergebnisse zeigen eine Rolle von Caveolae in Infektionsprozessen an. Ferner wurde vor kurzem gezeigt, dass *Chlamydia pneumoniae* nach einer Infektion mit Cav-1 und Cav-2 intrazellulär kolokalisiert vorliegt, und es wird eine mögliche Rolle der beiden Proteine im Entwicklungszyklus von *Chlamydiae* diskutiert (Webley et al., 2004). Der respiratorische Human Coronavirus 229E, der Infektionen des Respirationstraktes

verursacht, dringt in die Zellen über einen caveolae-abhängigen Mechanismus ein (Lassing et al., 2005; Nomura et al., 2004).

Obwohl das Atemwegsepithel eine Eintrittspforte für pathogenen Mikroorganismen sein kann, Funktionen wie Endo- und Transzytose erfüllt, die verbunden mit Caveolae sind, und Rezeptoren beherbergt, die ihrerseits mit Caveolae assoziiert sind (Razani et al., 2002), fehlen Untersuchungen zu der Expression von Caveolinen, zu der Interaktion zwischen den Cav-Isoformen und zur Präsenz von Caveolae in Tracheal- und Bronchialepithelzellen. Die Anwesenheit von „Vesikeln, die manchmal auch noch mit der Zellmembran in Verbindung stehen“, wurde von Pavelka (1976) auf elektronmikroskopischer Ebene in Basalzellen des respiratorischen Epithels der Maus beschrieben. Mehr als 70 % der Plasmamembran im Alveolarbereich der Lunge sind mit Caveolae belegt (Gil, 1983). Darüber hinaus wurden Caveolae in vom Bronchialepithel abgeleiteten Zelllinien (Ehrhardt et al., 2006) detektiert, was auf die Anwesenheit von Caveolae im Epithel der großen Atemwege hindeutet.

Cav-1 und Cav-2 weisen ein ähnliches Expressionsmuster auf, aber es scheint, dass sie unterschiedliche Funktionen haben. Die Expression von Cav-1 ist hinreichend, um zu einer Bildung von Caveolae zu führen (Frau et al., 1995). Hingegen wird allgemein angenommen, dass eine Expression von Cav-2 alleine nicht ausreicht, um zu einer Bildung von Caveolae zu führen. Das Fehlen von Caveolae in Cav-1-defizienten Mäusen ist mit einer starken Reduktion des Cav-2-Proteingehalts assoziiert (Drab et al., 2001). Obwohl Caveolae in Cav-2-defizienten Mäusen noch präsent sind, zeigen diese Mäuse den stark pathologischen Alveolarphänotyp der Cav-1-defizienten Mäusen (Razani et al., 2001). Dies weist darauf hin, dass Cav-2, obwohl es alleine nicht zur Caveolae-Bildung führt, einen wichtigen Einfluss auf die Funktion der Caveolae hat. Da zwar eine selektive Assoziation zwischen Cav-2 und Chlamydia-Spezies (ausgenommen Chlamydia pneumoniae) beschrieben wurde, nicht hingegen aber zwischen Cav-1 und Chlamydia-Spezies, wird angenommen, dass beide Proteine im infektiösen Prozess divergente Funktionen haben. Deswegen ist es notwendig, die Expression und die Lokalisation von beiden Proteinen zu untersuchen.

König und Mitarbeiter (2005) zeigten, dass die zilienträgenden Epithelzellen der Atemwege endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) exprimieren und Stickstoffmonoxid (NO) produzieren, welches seinerseits die ziliäre Schlagfrequenz des Flimmerepithels in Atemwegen erhöht (Li et al., 2000; Ricciardolo, 2003). Bei

exogener Applikation von NO wurde hingegen keine Veränderung der Frequenz detektiert (Wanner et al., 1996). Da eNOS durch die Bindung an Cav-1 und Cav-3 gehemmt wird, nicht jedoch durch Cav-2, kommen Cav-1 und Cav-3 als mögliche Interaktionspartner von eNOS im Atemwegsepithel in Betracht (Garcia-Cardena et al., 1997). Die Lokalisation der eNOS im Epithel liegt apikal an den Basalkörperchen der Kinozilien (Xue et al., 1996; König et al., 2005). Graf und Stockinger (1966) wiesen auf „eine auffällige Ähnlichkeit der Flimmertätigkeit mit der rhythmischen Kontraktion des Herzens“ hin. Sie vertraten die Meinung, dass es sich im Flimmerepithel und im Herzmuskel um das gleiche System handelt, das die Kontraktion auslöst.

In Kardiomyozyten verschiedener Spezies konnte eNOS nachgewiesen werden (Bloch et al., 1999; Gödeke et al., 2001) und ist dort an Cav-3 assoziiert (Feron et al., 1996). Dies ermöglicht eine funktionelle Kopplung mit Rezeptoren, die in Caveolae lokalisiert sind, beispielsweise β -adrenerge Rezeptoren (Barouch et al., 2002). In Kardiomyozyten ist Cav-3 für die Bildung von Caveolae essenziell. Beta-adrenerge Rezeptoren sind in den zilienträgenden Atemwegsepithelzellen vorhanden.

I.3 Ziel der Arbeit

In Anbetracht dieser Daten ist es von zentraler Bedeutung, Einblick in die Expression von Caveolinen und Bildung von Caveolae im Bronchial- und Trachealepithel zu gewinnen. Deswegen wurden in dieser Arbeit die Expressionen von Cav-1, Cav-2 und Cav-3 auf mRNA- und Proteinebene, die Lokalisation von Cav-1 α , Cav-1 β , Cav-2 und Cav-3 mittels Immunhistochemie und die Anwesenheit von Caveolae mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Zur näheren Charakterisierung der molekularen Zusammensetzung der Caveolae wurde die Assoziation von Cav-1 und Cav-2 in Trachealepithelzellen in Gewebeschnitten mittels indirekter Doppelimmunhistochemie kombiniert mit CLSM-FRET-Analyse untersucht.

II. Literaturübersicht

II.1 Caveolae

II.1.1 Morphologie und Zelltypen

Caveolae sind 50-100 nm große kolbenförmige, im Schnitt omega-förmige Invaginationen der Plasmamembran der Zellen. Sie wurden zum ersten Mal von Palade im Jahr 1953 (Palade, 1953; Yamada et al, 1955) als „Caveolae“, intrazelluläre oder plasmalemmale Vesikel beschrieben. Erst 40 Jahre später, nachdem das Marker- und hauptsächliche Strukturprotein der Caveolae, Caveolin, entdeckt wurde, erweiterte sich die Definition von Caveolae. Jetzt werden in dem Begriff Caveolae auch caveolinhaltige Vesikel eingeschlossen, die nicht in Verbindung mit der Plasmamembran stehen, die in Gruppen in Form von Trauben oder Rosetten assoziiert sind, oder sogar miteinander verschmolzen sind und Tubuli oder transzelluläre Kanäle bilden (Razani et al., 2002).

Caveolae wurden zum ersten Mal in Kapillarendothelzellen (Palade, 1953) und in Epithelzellen der Gallenblase der Maus (Yamada, 1955) beschrieben. Seitdem wurden Caveolae in einer Reihe von unterschiedlichen Zelltypen entdeckt. Caveolae sind in den meisten differenzierten Zellen präsent, aber die Anzahl und die Form variieren. Adipozyten, Endothelzellen, Pneumozyten Typ I, Fibroblasten, glatte Muskelzellen und quergestreifte Muskulatur haben eine sehr hohe Anzahl von Caveolae (Napolitano et al., 1963; Mobley und Eisenberg, 1975; Gabella et al., 1976; Gil et al., 1983). Manche Zellen, wie Neuronen und Lymphozyten, besitzen keine Caveolae. Im Gegensatz dazu besteht in der Lunge mehr als 70% der Plasmamembran der Zellen der Alveolen (Pneumozyten Typ I und Endothelzellen) aus Caveolae (Gil et al., 1983). In den Bronchial- und Trachealepithelzellen sind keine Caveolae beschrieben. „Vesikel, die ab und zu mit der Plasmamembran verschmolzen sind“ wurden von Pavelka (1976) in den Basalzellen der Maus elektronenmikroskopisch beobachtet. Die Ursache für die Unterschiede in der Häufigkeit und in der gewebe- und zelltypspezifischen Expression der Caveolae könnte im Zusammenhang mit einer zelltypspezifischen Funktion sein.

Die unterschiedlichen Formen von Caveolae sind in den unterschiedlichen Zelltypen unterschiedlich vertreten. Die Traubenform ist beispielsweise vorwiegend in nicht differenzierten Skelettmuskelzellen vertreten, die Rosette in Adipozyten und freie Vesikel und Tubuli in Endothelzellen (Simionescu et al., 1975; Scherer et al., 1994; Parton et al., 1997). Caveolae sind keine statischen Strukturen der Zellmembran. Zwei Formen von Caveolae existieren, tief invaginiert und flach invaginiert (Fujimoto et al., 2000). Es wird angenommen, dass die Form eine wichtige Rolle für die Funktion spielt. Die Mechanismen, die zu der Bildung von Caveolae führen, sind unbekannt. Bekannt ist, dass Caveoline essenziell für ihre Bildung sind.

II.1.2 Aufbau

Die Plasmamembran wurde früher als zwei-dimensionales unstrukturiertes „Fluid-Mosaik“ (Singer und Nicolson, 1972) betrachtet, in dem die Membranproteine frei zwischen Phospholipiden schwimmen und leicht diffundieren. Heute weiß man, dass der Aufbau der Plasmamembran viel heterogener ist, als es früher angenommen wurde. In der Plasmamembran existieren sowohl Domänen in einem strukturierten Zustand als auch Domänen in einem unstrukturierten Zustand. Die strukturierten Domänen, genannt „lipid rafts“, bestehen aus Glycosphingolipiden und Sphingomyelin, die im Golgi-Apparat aggregieren und danach zu der Plasmamembran geliefert werden, sowie weiterhin aus Cholesterol und Proteinen. Die hohen Lipid- und Sphingolipidkonzentrationen bestimmen einige Eigenschaften der Caveolae, nämlich geringe Dichte und Unlöslichkeit in schwachen, nicht-ionisierenden Detergenzen, wie Triton X-100. Das Entdecken dieser Eigenschaften wurde zur Grundlage für die spätere Identifizierung, Aufreinigung und Charakterisierung der Caveolae (Brown und Rose, 1992; Lisanti et al., 1994b). Caveolae werden auf Grund ihrer ähnlichen biochemischen Charakteristiken für eine Form von „lipid rafts“ gehalten (Brown und London, 1998; Simons und Toomre, 2000). Trotz mancher gemeinsamen biochemischen Eigenschaften sind Caveolae und „lipid rafts“ nicht identisch. Dafür spricht die Tatsache, dass manche Proteine entweder in Caveolae, oder in „lipid rafts“ lokalisiert sind (Liu et al., 1997).

II.1.3 Caveoline

Caveolin-1

Caveolin und „vesicular integral-membrane protein“ (VIP21) wurden gleichzeitig unabhängig von zwei Arbeitsgruppen identifiziert. 1989 isolierten Glenney und Zokas ein Protein von 22 kD von mit Rous Sarcoma Virus transformierten Fibroblasten und vermuteten, dass dieses Protein eine Rolle in der Onkogenese spielt. Antikörper gegen das Protein markierten die Zellmembran. Die markierten Bereiche zeigten eine caveolae-ähnliche Verteilung. Rothberg und Mitarbeiter (1992) gelang es elektronenmikroskopisch, eine Assoziation von Caveolin und Caveolae zu zeigen. In der gleichen Zeit lokalisierten Kurzchalia und Mitarbeiter (1992) VIP21 im Golgi-Apparat, in der Plasmamembran und in plasmatischen Vesikeln in Epithelzellen. Nach dem Klonieren beider Proteinen zeigte Glenney (Glenney und Soppet, 1992; Glenney, 1992), dass ihre Sequenzen identisch sind. Diese Caveolin-Isoform ist jetzt als Caveolin-1 (Cav-1) bekannt (Way und Parton, 1995; Scherer et al., 1996; Tang et al., 1996). Cav-1 hat zwei Isoformen, α und β . Die α -Isoform besteht aus den Aminosäuren (AS) 1-178 und die β -Isoform aus AS 32-178, was in einem um etwa 3 kD kleineren Protein resultiert (Li et al., 1996; Scherer et al., 1995). Die Synthese der β -Isoform wird von einer alternativen Translationstelle in Position 32 initiiert. Beide Cav-Isoformen führen zu der Formation von Caveolae (Li et al., 1996). Cav-1 α ist vorwiegend in den tief invaginierten Caveolae lokalisiert und ist effizienter bei der Bildung von Caveolae als Cav-1 β , welches vorwiegend zu der Bildung von flach invaginierten Caveolae führt (Fujimoto et al., 2000; Scherer et al., 1995). Die genauere funktionelle Bedeutung der beiden Isoformen ist nicht bekannt.

Caveolin-2

Caveolin-2 (Cav-2) ist die zweite Caveolin-Isoform. Sie wurde beim Versuch kloniert, weitere caveoläre Proteine zu identifizieren. Die Proteinsequenz enthält 162 Aminosäuren (Scherer et al., 1996). Neben der α -Gesamtprotein-Isoform von Cav-2 sind noch zwei Isoformen bekannt, β und γ . Die β -Isoform gilt als eine alternative Spleißvariante, die eine andere Lokalisation als die α -Isoform aufweist (Kogo et al., 2002). Es fehlen Untersuchungen zur genaueren funktionellen Bedeutung der β - und γ -Isoform.

Caveolin-3

Caveolin-3 (Cav-3) wurde durch klassisches Screening der cDNA-Bibliothek nach Cav-1-homologen Genen entdeckt (Tang et al., 1996).

Caveolin-Gene und zelltypspezifische Expression

Die Caveolin-Gene weisen untereinander eine ausgeprägte Homologie auf und sind in den unterschiedlichen Spezies sehr konserviert. Das humane Cav-2 ist zu 38 % identisch und zu 58 % ähnlich mit Cav-1, und Cav-3 ist zu 65 % identisch und zu 85 % ähnlich mit Cav-1. Die strukturelle Ähnlichkeit zeigt sich auch dadurch, dass in allen Spezies eine „caveolin signature sequence“ genannte Domäne, bestehend aus den Aminosäuren „FEDVIAEP“, nachgewiesen wurde. Andere wichtige Domänen in der Caveolin-Sequenz sind die membranspannende, die „scaffolding“ Domäne und die Oligomerisierungsdomäne (Razani et al., 2002).

Alle drei Cav-Isoformen sind Markerproteine für Caveolae und haben eine hohe Expression in differenzierten Zellen. Das Lokalisierungsmuster von Cav-1 unterscheidet sich von dem von Cav-3. Cav-1 ist kolokalisiert mit Cav-2, und beide sind sehr hoch exprimiert in Adipozyten, in Endothelzellen, in Pneumozyten Typ I und Fibroblasten. Cav-3 gilt als muskelspezifisch, wird aber auch von Chondrozyten exprimiert (Schwab et al., 1999). In Skelettmuskelfasern und in Kardiomyozyten ist die Expression sehr hoch, in den glatten Muskelzellen ist hingegen niedrig (Parton 1996; Song et al., 1996; Tang et al., 1996). Cav-3 ist kolokalisiert mit Cav-2. Die Expression von Cav-2 ist in glatten Muskelzellen sehr hoch und in Skelettmuskelfasern sowie in Kardiomyozyten niedrig (so wie auch die Expression von Cav-1) (Scherer et al., 1997; Rybin et al., 2003; Capoza et al., 2005). Manche Zelltypen, wie beispielsweise glatte Muskelzellen, exprimieren alle drei Isoformen, wobei ihre Expression von der Differenzierung der Zellen abhängt. Cav-3 wird nur von nicht-proliferierenden, differenzierten Myoblasten exprimiert, wohingegen Cav-1 und -2 sehr hoch von proliferierenden Myoblasten exprimiert werden (Tang et al., 1996; Way und Parton, 1995).

Strukturelle Eigenschaften

Der N-Terminus und der C-Terminus von Cav-1 sind zytoplasmatisch gerichtet (Dupree et al., 1993). Monier und Mitarbeiter (1995) zeigten eine Proteolysesensitivität von membrangebundenem Cav-1, was für eine zytoplasmatische Lokalisation der beiden Termini spricht. Ein weiterer Hinweis dafür

sind Phosphorylierungs- und Palmitolierungsstellen, die im N- und im C-Terminus lokalisiert sind (Dietzen et al., 1995; Li et al., 1996). Cav-1 besitzt eine sehr kurze hydrophobe Domäne bestehend aus 32 AS (102-134), die für die transmembranäre Lokalisation verantwortlich ist (Monier et al., 1995). Zwei andere Regionen sind für die Membranbindung essenziell. Diese Regionen werden als NH₂-Terminus-Membranbindungsdomäne (N-MAD, AS 82-101) und COOH-Terminus-Membranbindungsdomäne (C-MAD, AS 135-150) bezeichnet (Schegel und Lisanti, 2000). C-MAD steuert die Trans-Golgi-Lokalisation von Cav-1, und N-MAD steuert Cav-1 zu den Caveolae in der Plasmamembran.

Eine weitere wichtige Domäne ist die Cav „scaffolding domain“ (CS-Domäne). Diese Domäne umfasst die AS 82-101 und mediiert die Protein-Protein-Interaktionen (Couet et al., 1997a und b; Jagannadham et al., 2002; Li et al., 1996; Song et al., 1997). Die CS-Domäne hält die Proteine in der Caveola, kann aber auch die Aktivität der Proteine entweder aktivieren oder inhibieren und dadurch einige Signalkaskaden regulieren.

Cav-1 bildet hochmolekulare Oligomerkomplexe von etwa 400 kD (Monier et al., 1995; Sargiacomo et al., 1995). Cav-1 besitzt eine Oligomerisierungsdomäne (AS 61-101), die die Homooligomerisierung von 14-16 Cav-1-Molekülen ermöglicht (Sargiacomo et al., 1995). Diese Cav-1-Oligomere werden einer weiteren Oligomerisierung während des Transports von der Trans-Golgi-Region zu den Plasmamembrancaveolae ausgesetzt, bei dem einige Oligomere via ihres COOH-Terminus miteinander interagieren. Auf diese Weise wird ein Netz aus Caveolin aufgebaut (Song et al., 1997).

Dagegen ist Cav-2 nicht in der Lage, allein hochmolekulare Homooligomere zu bilden (Scherer et al., 1996). Diese Eigenschaft steht wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Unfähigkeit von Cav-2 zu Bildung von Caveolae. Cav-2 bildet Heterooligomere mit Cav-1 im ER. Diese Assoziation führt zu einer Stabilisierung von Cav-2 gegenüber proteosomaler Degradierung und führt zu einem Transport von Cav-2 vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran (Mora et al., 1999; Parolini et al., 1999; Razani et al., 2001; Scherer et al., 1997).

Cav-3 kann hochmolekulare Homooligomere in situ in einer Cav-1-ähnlichen Art und Weise bilden (Smythe et al., 2003; Tang et al., 1996). Lange Zeit herrschte die Meinung, dass Cav-3 nicht an Cav-2 bindet (Das et al., 1999), jedoch konnten beide

Proteine aus Extrakten isolierter neonataler Kardiomyozyten und glatter Muskelzellen koimmunpräzipitiert werden (Rybin et al., 2003; Woodman et al., 2004).

II.2 Biogenese von Caveolae

Eine kritische Rolle für die Bildung von Caveolae spielt Cholesterol. In mit Agenzien wie Nystatin, Filipin oder Cyclodextrin behandelten Zellen fehlen morphologisch identifizierbare Caveolae (Rothberg et al., 1992; Schnitzer et al., 1994; Hailstones et al., 1998). Diese Agenzien greifen in den Cholesterolmetabolismus ein und zerstören lipidhaltige Mikrodomänen. (Grassmé et al., 2003). Für eine Bildung von Caveolae muss eine bestimmte Mindestmenge von Cholesterol vorliegen (Hailstones et al., 1998). Der Cholesterolspiegel beeinflusst auch die Bildung von „clathrin-coated pits“ und endozytotischen Vesikeln und ist damit nicht der Hauptfaktor bei der Bildung von Caveolae (Rodal et al., 1999; Thiele et al., 2000)

Überexpression von Cav-1 in Lymphozyten oder transformierten Fibroblasten, die kein Cav-1 exprimieren und dementsprechend keine Caveolae besitzen, führt zur de novo Bildung von Caveolae (Fra et al., 1995; Engelman et al., 1997; Li et al., 1998). Die Herabregulation von Cav-1 in Zellen mit Caveolae resultiert im Verlust der Caveolae (Galbiati et al., 1998; Liu et al., 2001). Diese Daten zeigen den Zusammenhang zwischen der Expression von Cav-1 und der Formierung von Caveolae.

II.3 Funktionelle Bedeutung von Caveolinen/Caveolae

Caveolae werden mehrere Funktionen zugeschrieben. Sie dienen der Trans- und Endozytose, der Regulation der Cholesterolhomöostase in der Zelle und der Aggregation vieler Proteine, die eine wichtige Rolle in Signaltransduktionsprozessen spielen (Razani et al., 2002). So finden sich in Caveolae unter anderem Rezeptoren, Proteinkinasen und weitere Bestandteile von Signalkaskaden. Daher werden Caveolae als Mikrodomänen angesehen, die die an der Signalkaskade beteiligten Moleküle in enger räumlicher Nähe beherbergen und so eine effektive Signaltransduktion ermöglichen (Kenworthy, 2002; Razani et al., 2002).

Caveoline und weitere caveoläre Proteine

Caveolae beheimaten viele Rezeptoren, darunter auch solche, die zu einer Aktivierung der eNOS führen. Zusätzlich zu der Funktion, die diese Rezeptoren in anderen Zelltypen haben, können sie die Zilienschlagfrequenz im Epithel beeinflussen. Hier seien beispielhaft der Bradykinin B2-Rezeptor, der EGF-Rezeptor und der VEGF-Rezeptor genannt (Feron et al., 1997; Haasemann et al., 1998; Feng et al., 1999; Igarashi et al., 2000).

Lokalisation in Caveolae	Literatur
<i>G-Protein-gekoppelte Rezeptoren:</i>	
Bradykinin B2-Rezeptor	Haasemann et al., 1998
β_1 - und β_2 -adrenerge Rezeptoren	Schwenke et al., 1999 Rybin et al., 2000
M2-Azetylcholinrezeptor	Rybin et al., 2000
<i>G-Proteine:</i>	
$G\alpha_{i1}$	Lisanti et al., 1994a, Rybin et
$G\alpha_{i2}$	al., 2000
<i>Wachstumsfaktorrezeptoren:</i>	
PDGF-Rezeptor	Yamamoto et al., 1999
EGF-Rezeptor	Mineo et al., 1999
VEGF-Rezeptor	Feng et al., 1999
Ca^{2+} -ATPase	Fujimoto, 1993 Schnitzer et al., 1995
<i>weitere Membranproteine:</i>	
H^+ -ATPase	Mineo und Anderson, 1996
Plasmamembran- Ca^{2+} -Pumpe	Darby et al., 2000
<i>Enzyme:</i>	
eNOS	(siehe oben)

Tabelle 1: Beispiele für in Caveolae lokalisierte Proteine (Razani et al., 2002)

Weitere in Caveolae lokalisierte Proteine sind Tyr-Kinasen (Bsp. Src), Ser/Thr-Kinasen (PKA), GTPasen (Bsp. H-Ras), Strukturproteine (Bsp. Aktin) und Adaptorproteine (E-Cadherin) (Razani et al., 2002).

Caveoline und Viren

Caveolae sind an endozytotischen Prozessen beteiligt. Dynamin spielt eine wichtige Rolle bei der Internalisierung von Caveolae (Oh et al., 1998). Die Aktivierung des tyrosinkinase-abhängigen Signalwegs ist notwendig für die Endozytose von Caveolae (Pelkmans und Helenius, 2002). Einige Liganden, einschließlich pathogener Mikroorganismen, die durch Caveolae internalisiert werden, aktivieren den Tyrosinkinase-Signalweg mittels Bindung an Rezeptoren in den Caveolae (Chen und Norkin, 1999; Norkin, 2001; Norkin et al., 2002; Parton et al., 1994). Am besten studiert ist die Internalisierung von Simian Virus 40 (SV40), die spezifisch über die Caveolae stattfindet (Pelkmans et al., 2001; Pelkmans et al., 2002). SV40 wird in den Caveolae und in den Caveosomen (Cav-1 enthaltende Vesikel) akkumuliert. Danach wird SV40 an das ER geliefert. Auf diese Weise wird der lysosomale Weg umgangen und der Inaktivierung von SV40 vorgebeugt (Norkin et al., 2002; Pelkmans et al., 2001). Welche pathogenen Mikroorganismen diesen Internalisierungsweg benutzen, sowie der genaue Mechanismus der Internalisierung sind nicht bekannt. Eine Reihe von pathogenen Agenzien, einschließlich Viren, Bakterien und bakterieller Toxine (Cholera- und Tetanustoxine), Pilze und sogar Prionen, interagieren mit Membrandomänen der Caveolae (Cohen et al., 2004; Anderson et al., 1996; Parton et al., 1994; Shin et al., 2000).

eNOS und Caveoline

Stickstoffmonoxid (NO) wird mittels des Enzyms Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) gebildet. NO ist an der Regulation des Blutdrucks, der Kontraktilität des Herzens, des Zilienschlags des Flimmerepithels (siehe unten), der Apoptose, mitochondrialer Stoffwechselwege und einer Vielzahl weiterer Prozesse beteiligt (Bredt, 1999; Furchgott, 1999; Ignarro 1999; Runer et al., 1999). Endotheliale NOS wird durch die Bindung an Cav-1 und Cav-3 gehemmt, nicht jedoch durch die Bindung an Cav-2 (Garcia-Cardena et al., 1997). Cav-2 bindet möglicherweise andere Proteine als Cav-1 und Cav-3 (Couet et al., 1997a; Razani et al., 2002). Die eNOS besitzt ein Bindungsmotiv für die CS-Domäne von Cav-1 und Cav-3 (Garcia-Cardena et al.,

1997) und ist mit immunhistochemischen und biochemischen Methoden in Caveolae nachweisbar (Garcia-Cardena et al., 1996; Andries et al., 1998; Reiner et al., 2001). Eine Mutation in der Oxygenase-Domäne (AS 350-358) der humanen eNOS verhindert die Inhibition der eNOS durch Cav-1 (Garcia-Cardena et al., 1997). Allerdings interagiert eNOS mit Cav-1 nicht nur in diesem Bereich. Es gibt Hinweise, dass es weitere Bindungsstellen für Cav in der Reduktase-Domäne gibt, die auch wichtig für die Inhibition der eNOS sind (Ghosh et al., 1998). Aktivierte eNOS löst sich von Cav, um nach der Beendigung der NO-Synthesephase wieder mit Cav zu interagieren und somit inhibiert zu werden (Feron et al., 1998). Dabei scheint die Bindung von Calmodulin an eNOS der entscheidende Schritt zur Dissoziation der eNOS von Cav zu sein (Michel et al., 1997). Der hemmende Einfluss von Cav-1 auf die eNOS konnte durch Untersuchungen an Cav-1-defizienten Mäusen bestätigt werden. In Endothelzellen dieser Mäuse sind die basale Freisetzung von NO und die Konzentration von cGMP deutlich höher als im Wildtyp (Drab et al., 2001; Razani et al., 2001). Die Lokalisation in Caveolae inhibiert die eNOS nicht nur, sie ist wichtig für die effiziente Signaltransduktion zur Aktivierung von eNOS. In Endothelzellen aktivieren nur diejenigen Östrogenrezeptoren die eNOS, die in den Caveolae lokalisiert sind (Chambliss et al., 2002). Durch die Zugabe von membrangängigen Peptiden der CS-Domäne konnte die Aktivierung von eNOS durch Azetylcholin verhindert werden (Bucci et al., 2000). In Lungenkapillaren wurde durch eine erhöhte Wandschubspannung die Lösung der Bindung zwischen Cav-1 und eNOS sowie eine Assoziation von eNOS und Calmodulin verursacht, was zu einer direkten Aktivierung der eNOS in Caveolae führte (Rizzo et al., 1998). Der Prozess, bei dem eNOS sich durch Aktivierung von dem inhibitorischen Caveolin-Komplex löst und nach Inaktivierung der eNOS erneut an Cav-1 bindet, wird als eNOS/Caveolin Regulationskreislauf bezeichnet (Feron et al., 1998). Ob es hierbei zu einer Translokation der eNOS aus den Caveolae kommt, ist unklar. Für eine Translokation sprechen In situ-Studien an Kapillaren des Herzens (Prabhaker et al., 1998). Nach einer Stimulation der eNOS durch Bradykinin konnten Reiner und Mitarbeiter (2001) eine Verminderung der immunhistochemisch nachweisbaren eNOS an der Zellmembran und eine Vermehrung der Immunreaktivität in intrazellulären Kompartimenten nachweisen. Im Gegensatz hierzu fanden Fulton und Mitarbeiter (2002) nach einer Stimulation keine Translokation von eNOS von der Membran zum Golgi-Apparat.

II.4 Cav-defiziente Mäuse

Cav-1-defiziente Maus

Die Charakterisierung von Cav-1-defizienten Mäusen erfolgte gleichzeitig von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander (Drab et al., 2001; Razani et al., 2001). Beide bestätigten, dass Cav-1 essenziell für die Bildung von Caveolae ist. In Endothelzellen und Adipozyten von Cav-1-defizienten Mäusen fanden sich keine Caveolae und zeigten sich Fehler beim Sortieren von glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Proteinen und lipidmodifizierten Proteinen (Sotgia et al., 2002). Die Proteinmenge von Cav-2 ist in den Cav-1-defizienten Mäusen bis zu 90-95 % reduziert (Drab et al., 2001; Razani et al., 2001). Der Cav-2-mRNA-Spiegel bleibt unverändert. Der Transport von Cav-2 zur Plasmamembran findet nicht statt, Cav-2 wird destabilisiert und durch den proteasomalen Weg abgebaut. Zellen Cav-1-defizienter Mäuse nehmen kein Albumin auf, da dessen Endozytose durch Caveolae mediiert wird (Razani et al., 2001; Schubert et al., 2001). Mehr als 70 % der Plasmamembran der Alveolarzellen der Lunge sind belegt von Caveolae (Gumbleton, 2001). Das Fehlen von Caveolae in der Lunge Cav-1-defizienter Mäuse resultiert in einer sehr ausgeprägten Lungenpathologie. Der Durchmesser der Alveolen ist reduziert und die Alveolarsepten sind dicker und hyperzellulär (Drab et al., 2001; Razani et al., 2001). Die Ablagerung extrazellulärer Matrix ist in den Cav-1-defizienten Lungen erhöht. Dieses Bild ist oft bei restriktiven Lungenerkrankungen zu finden, z. B. bei Lungenfibrose. Die Cav-1-defizienten Mäuse zeigen eine reduzierte Ausdauer im Schwimmtest (Drab et al., 2001; Razani et al., 2001). Zu den pathologischen Veränderungen des vaskulären Systems zählen eine reduzierte Angiogenese-Kapazität, erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität, Hyperplasie der Neointima, arterielle Hyperrelaxation, hypertrophische Kardiomyopathie, Hyperaktivierung der Signalkaskaden der eNOS und der Ras-p42/44 MAP-Kinase; die Lebensdauer ist reduziert (Cohen et al., 2004).

Cav-2-defiziente Maus

In Cav-2-defizienten Mäusen bleiben die Expression von Cav-1, die Membranlokalisation von Cav-1 und die Bildung von Caveolae intakt (Razani et al., 2002). In der Lunge der Cav-2-defizienten Mäuse beträgt aber die Cav-1-Expression nur etwa 50 % im Vergleich zum Wildtyp. Cav-2-defiziente Mäuse weisen

Lungenerkrankungen auf. Trotz der Existenz von Caveolae finden sich die gleichen Lungenerkrankungen wie bei den Cav-1-defizienten Mäusen (erhöhte Zellzahl, Verdickung der Alveolarsepten). Die Cav-2-defizienten Mäuse zeigen eine reduzierte Ausdauer beim Schwimmtest, und zwar in dem gleichen Ausmaß, wie die Cav-1-defizienten Mäuse. Diese Daten sprechen dafür, dass Cav-2 und die Zusammensetzung der Caveoline in den Caveolae eine essenzielle Rolle für die Lungenfunktion spielen. Hypertrophische Kardiomyopathie wurde bei den Cav-2-defizienten Mäusen nicht gefunden (Cohen et al., 2004).

Cav-3-defiziente Maus

Untersuchungen in Cav-3-defizienten Mäusen zeigten ein Fehlen von Caveolae in Skelettmuskelzellen, Dysassoziation des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes (DG-Komplex) von Caveolae und Desorganisation des T-Tubulus-System im Muskelgewebe (Galbiati et al., 2001). Die Expression von Cav-1 und Cav-2 sowie die Caveolae blieben unverändert im Nicht-Muskelgewebe. Cav-3-defiziente Mäuse weisen eine Herzmuskelhypertrophie auf. Es wurde Hyperaktivierung des Ras-p42/44 MAP-Kinase-Signalwegs in den Kardiomyozyten gefunden, die zur Hypertrophie führte. Histopathologisch wurden perivaskuläre Fibrose und zelluläre Infiltration festgestellt (Woodman et al., 2002). Angaben zu einer Lungenerkrankung der Cav-3-defizienten Mäuse fehlen in der Literatur.

II.5 Atemwegsepithel

Aufbau

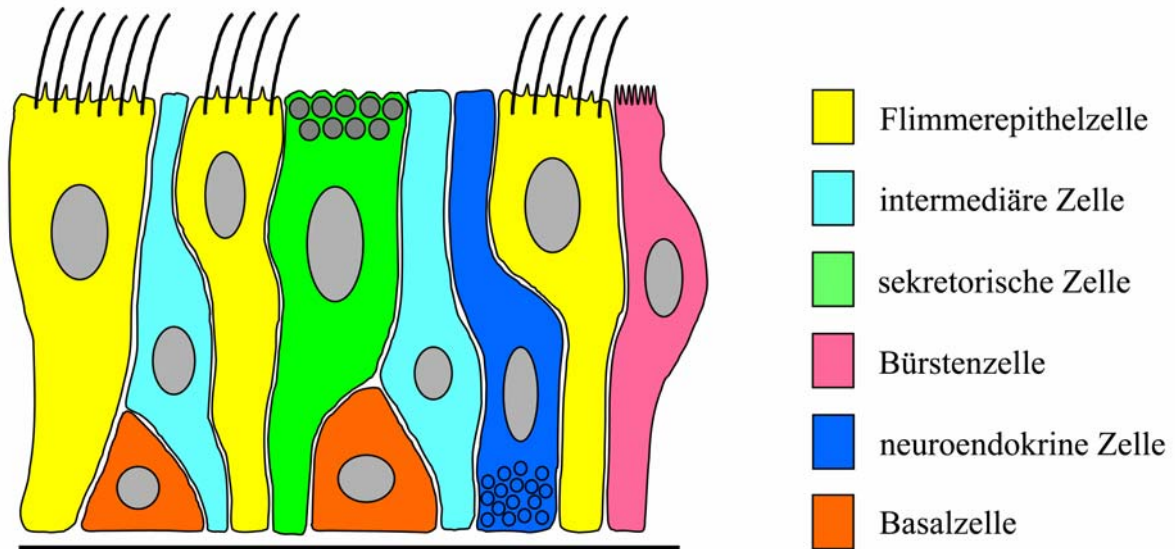


Abbildung II-1. Schematische Darstellung der Zusammensetzung des Trachealepithels.

Der prozentuelle Anteil der unterschiedlichen Zelltypen hängt vom Abschnitt der Atemwege und von der Spezies ab. Allgemein gilt, dass im distalen Abschnitt der Trachea die Zahl der Basalzellen abnimmt und die Zahl der Bürstenzellen zunimmt. In der Maus, in der Ratte und im Menschen befinden sich in den Flimmerzellen Basalknötchen. Diese dienen der Verankerung der Zilien im Zytoplasma. Zwischen den Basalknötchen und knapp unterhalb der Basalknötchen befindet sich eine große Anzahl von Membranvesikeln und Tubuli (Pavelka et al., 1976). Diese Strukturen sind bei allen Spezies vorhanden, sind aber besonders ausgeprägt bei der Ratte. Diesen Doppelmembransystemen, die sich den Basalknötchen oft eng anlegen, wird eine mögliche Koordinationsfunktion der Flimmertätigkeit zugeschrieben (Pavelka et al., 1976).

Zelluläre Regulation der Zilienschlagfrequenz

Zunehmende Konzentrationen von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) erhöhen die Zilienschlagfrequenz (CBF) bei Menschen (Di Benedetto et al., 1991). Dieses führt zu Aktivierung von Proteinkinase A (PKA) und anschließend zur Phosphorylierung von Zielproteinen in den Zilien. Proteinkinase C (PKC) ist auch in der Regulation der CBF involviert. Ihre Aktivierung führt zur Verminderung der CBF beim Schaf (Kobayashi et al., 1992). Geary und Mitarbeiter (1995) berichteten, dass zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) die CBF in kultivierten humanen Atemwegsepithelzellen erhöht. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ist auch entscheidend für die Regulation der CBF (Girard et al., 1986; Di Benedetto et al.,

1991; Lansley et al., 1992; Salathé et al., 1995). Ca^{2+} beeinflusst die CBF im Epithel durch Calmodulin (Di Benedetto et al., 1991; Verdugo et al., 1983). Calmodulin kann abhängig oder unabhängig von einer Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinase (CaM-Kinase) die Wirkung von Ca^{2+} vermitteln (Wanner et al., 1996). Weiterhin spielt NO eine wichtige Rolle in der Regulation der CBF der Atemwege (siehe unten). Weiterhin stimulieren aus dem NS bekannten Mediatoren die CBF, so zum Beispiel die Katecholamine über β_2 -Rezeptoren und Substanz P (NK_1 - NK_3) (Verdugo et al., 1980; Wong et al., 1991) und ACh über M3-Rezeptoren (Wanner et al., 1996).

Endotheliale NOS im respiratorischen Epithel

König und Mitarbeiter (2005) konnten unter der Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen den C-Terminus der eNOS in der Trachea der Ratte eine Markierung der Flimmerepithelzellen zeigen. Im Epithel ist die Immunreaktion auf ein schmales Band apikal des Kerns beschränkt. Diese Lokalisation wurde auch von Xue und Mitarbeiter (1996) beschrieben, die die eNOS-Immunreaktivität an den Basalkörperchen der Kinozilien fanden. In kleineren Bronchien und Bronchiolen war im Flimmerepithel keine Immunreaktion festzustellen. In verschiedenen Spezies konnte belegt werden, dass NO die CBF im Respirationstrakt erhöht (Jain et al., 1993; Sisson 1995; Runer et al., 1999; Li et al., 2000). Neben der eNOS sind im Flimmerepithel der Ratte auch der Rezeptor für NO, die lösliche Guanylatcyclase, und die cGMP-abhängige Proteinkinase 1β nachgewiesen (Zhan et al., 1999). Darüber hinaus ist an Explantaten aus der Trachea der Ratte mittels des NO-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs DAF-2DA gezeigt worden, dass Flimmerepithelzellen in situ NO herstellen und dass dieses NO die Schlagfrequenz der Zilien steigert (Li et al., 2000).

CHT1 im respiratorischen Epithel

In cholinergen Neuronen wird Acetylcholin (ACh) durch das Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT) aus Acetyl-Coenzym A und Cholin synthetisiert. ACh wird durch den vesikulären Acetylcholintransporter (VAChT) in synaptische Vesikel verpackt, darin gespeichert und durch vesikuläre Exozytose freigesetzt. Postsynaptisch kann ACh an nikotinische und muskarinische Acetylcholinrezeptoren binden. Extrazellulär wird es durch Cholinesterasen in Azetat und Cholin gespalten.

Das essenzielle Cholin muss in die Zelle wieder aufgenommen werden. Dies wird durch den hochaffinen Cholintransporter-1 (CHT1) vermittelt (Okuda und Haga, 2000a; Okuda et al., 2000b). Das wieder aufgenommene Cholin steht erneut der Synthese von ACh zur Verfügung. CHT1-mRNA wurde im abradierten Trachealepithel und in der mikrodisszezierten supranukleären Region der Trachealepithelzellen mittels RT-PCR nachgewiesen. Das CHT1-PCR-Produkt entsprach in Größe und Sequenz dem des neuronalen CHT1 (Pfeil et al., 2003). Im Western Blot wurde eine Bande von 51 kD nachgewiesen, eine zelltypspezifische Modifikation von CHT1 (Okuda et al., 2002b; Pfeil et al., 2003). Das CHT1-Protein wurde in den kinzilientragenden Zellen des Trachealepithels gefunden. Immunelektronmikroskopisch wurde CHT1 in der apikalen Membran der zilientragenden Zellen nachgewiesen. CHT1 kommt in denselben Trachealepithelzellen vor, in denen auch das ACh-Syntheseenzym ChAT lokalisiert ist. ChAT ist unter der apikalen Membran nachgewiesen (Lips et al. 2003a, Wessler et al., 2003). Ebenfalls in der apikalen Membran wurden diejenigen organischen Kationtransporter (OCT) nachgewiesen, die ACh freisetzen können (Lips et al., 2005). Die subzelluläre Lokalisation von CHT1, ChAT und OCT deutet darauf hin, dass ACh in das Lumen der Trachea abgegeben wird. Dort könnte es unter anderem für die Regulation der CBF verantwortlich sein (Melville et al., 1975; Salathe et al., 1997).

II.6 FRET

Eine Methode zur Untersuchung der Lokalisation von zwei Proteinen im Gewebe ist die Doppelimmunhistochemie am Kryogewebeschnitt. Auf dem konventionellen lichtmikroskopischen Niveau beträgt die maximale räumliche Auflösung etwa 200 nm (Garini et al., 2005). Diese Auflösung ist nicht ausreichend, um zu bestimmen, ob die Proteine nahe genug beieinander liegen, um miteinander zu interagieren.

Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), auch Förster-Resonanz-Energie-Transfer genannt, ist der nicht-radiative Transfer von Energie zwischen zwei Fluorophoren. Das Energie abgebende Fluorophor wird als Donor und das Energie aufnehmende wird als Akzeptor bezeichnet (Jares-Erijman und Jovin, 2003; Kenworthy et al., 2001). Da die Effizienz des Energietransfers mit der sechsten Potenz der Distanz zwischen den beiden Fluorophoren abnimmt, kann ein effizienter

Energietransfer zwischen zwei Fluorophoren nur dann stattfinden, wenn diese weniger als 10 nm voneinander entfernt sind (Jares-Erijman und Jovin, 2003). Diese Technik wird bei der Bestimmung der Distanz zwischen zwei Fluorophoren eingesetzt (Clegg, 1996; Gordon et al., 1998). Die Effizienz des Energietransfers kann berechnet werden (Jares-Erijman und Jovin, 2003; Gordon et al., 1998). Hierbei werden die Überlappung zwischen dem Emissionsspektrum des Donors und dem Anregungsspektrum des Akzeptors berechnet, sowie auch der Absorptionskoeffizient des Donors und die relative Orientierung der beiden Fluorophore.

Dieses FRET-Phänomen kann genutzt werden, um die räumliche Assoziation zwischen zwei Proteinen zu untersuchen, wenn die Proteine mit Fluorophoren markiert werden.

Die direkte Markierung von zwei Proteinen, direkt oder mittels genetischer Methoden, verändert die Proteine selbst und/oder ihren Proteingehalt in der Zelle und entspricht daher nicht der Situation in situ. Außerdem können diese Techniken nicht am humanen Gewebe praktiziert werden und können demzufolge auch nicht für Untersuchungen am pathologischen humanen Material eingesetzt werden. Eine sehr einfache und preiswerte Methode, endogene Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen in Gewebeschnitten zu markieren, die auch auf humanes Gewebe angewandt werden kann, ist die Immunfluoreszenz. In der Tat wurden direkte und indirekte Immunfluoreszenz erfolgreich in der Detektion von Protein-Protein-Interaktionen in Zellkultur eingesetzt (Kenworthy et al., 2001). Direkte Markierung von kleinen Mengen von Antikörpern mit Fluorophoren kann im Prinzip mit kommerziell verfügbaren Kits durchgeführt werden. Die meisten kommerziell verfügbaren Antikörper sind aber mit beträchtlichen Mengen von anderen Proteinen gemischt. Diese stören die Reaktion bei der Proteinmarkierung, wodurch die praktische Anwendung dieser Methode eingeschränkt wird.

Bis jetzt wurde indirekte Immunfluoreszenz für FRET-Experimente auf Gewebeschnitten in zwei Studien angewandt. Sharma und Mitarbeiter (2001) untersuchte pathologische Proteinaggregate in Lewy Bodies (LBs) und detektierten eine räumliche Assoziation zwischen TorsinA und α -Synuclein, aber keine Assoziation zwischen TorsinA und Ubiquitin. Diese Situation entspricht aber nicht-physiologischen Proteinkonzentrationen. Mills und Mitarbeiter (2003) verwendeten für ihre Untersuchung das technisch sehr aufwändige Zwei-Photon-CLSM-Setup, welches an den meisten Standorten nicht zur Verfügung steht.

FRET kann nur dann stattfinden, wenn das Emissionsspektrum des Donorfluorophores mit dem Anregungsspektrum des Akzeptorfluorophores zu einem Teil überlappt. Wichtige Faktoren für die FRET-Messungen sind die Lebenszeit der Fluorophore und passende Filtersets. Um einen falsch-positiven FRET-Effekt, der durch Detektion von Akzeptorfluoreszenz im Donorkanal oder durch Detektion von Donorfluoreszenz im Akzeptorkanal entstehen kann, auszuschließen, müssen passende Filtersets benutzt und Korrekturen durchgeführt werden (Gordon et al., 1998).

Es gibt 22 unterschiedliche Methoden zur FRET-Detektion (Jares-Erijman und Jovin, 2002). Die von uns angewandte basiert auf der Quantifizierung der Donorfluoreszenz einerseits in der Anwesenheit eines Akzeptors, und andererseits in dessen Abwesenheit. Diese Bedingungen können erreicht werden, wenn man die Donorfluoreszenz in dem gleichen Präparat vor und nach dem Bleichen des Akzeptors vergleicht (Wouters et al., 1998; Kenworthy et al., 2000; Bastiaens et al., 1996). Wenn ein FRET-Phänomen zwischen beiden Molekülen stattfindet, wird ein Anstieg in der Donorfluoreszenz nach dem Bleichen des Akzeptors detektiert (Kenworthy, 2001) (Abbildung II-2).

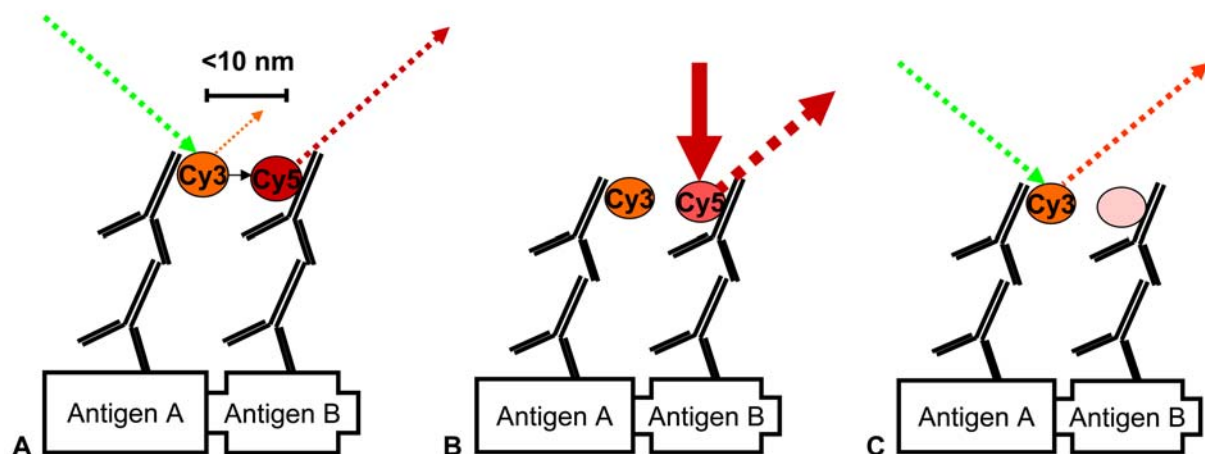


Abbildung II-2. FRET. Schematische Darstellung der Methode des Akzeptorbleichens am Beispiel der indirekten immunhistochemischen Doppelmarkierung. (A) Donor wird angeregt. Energietransfer zwischen dem Donor und dem Akzeptor findet statt, wenn die Distanz zwischen den beiden Fluorophore weniger als 10 nm beträgt. (B) Akzeptorfluorophor wird gebleicht. (C) Akzeptorfluorophor ist ausgebleicht, somit kann der Akzeptor keine Energie mehr vom Donor aufnehmen, dieser emittiert daher stärker.

Die FRET-Effizienz wird durch die folgende Formel ausgerechnet:

$$E = (I_{DA\uparrow} - I_{DA}) / I_{DA\uparrow}$$

In der Formel bedeuten I_{DA} die Intensität der Donorfluoreszenz in der Gegenwart des Akzeptors und $I_{DA\uparrow}$ die Intensität der Donorfluoreszenz in der Gegenwart des geblichenen Akzeptors (Kenworthy, 2001). Die zitierte Formel ist in dem angegebenen Artikel mit Schreibfehler gedruckt worden, die Erklärung der Formel stimmt mit der von mir angegebenen Formel überein.

Wichtig für die FRET-Untersuchungen ist die Wahl des Fluorophorpaars. Das Donorfluorophor muss während des Akzeptorbleichens stabil bleiben, dagegen muss das Akzeptorfluorophor relativ leicht zu bleichen sein. Ein Fluorophorpaar, das diesen Kriterien entspricht, ist Cy-3/Cy-5 (Kenworthy, 2001) (Abbildung II-3).

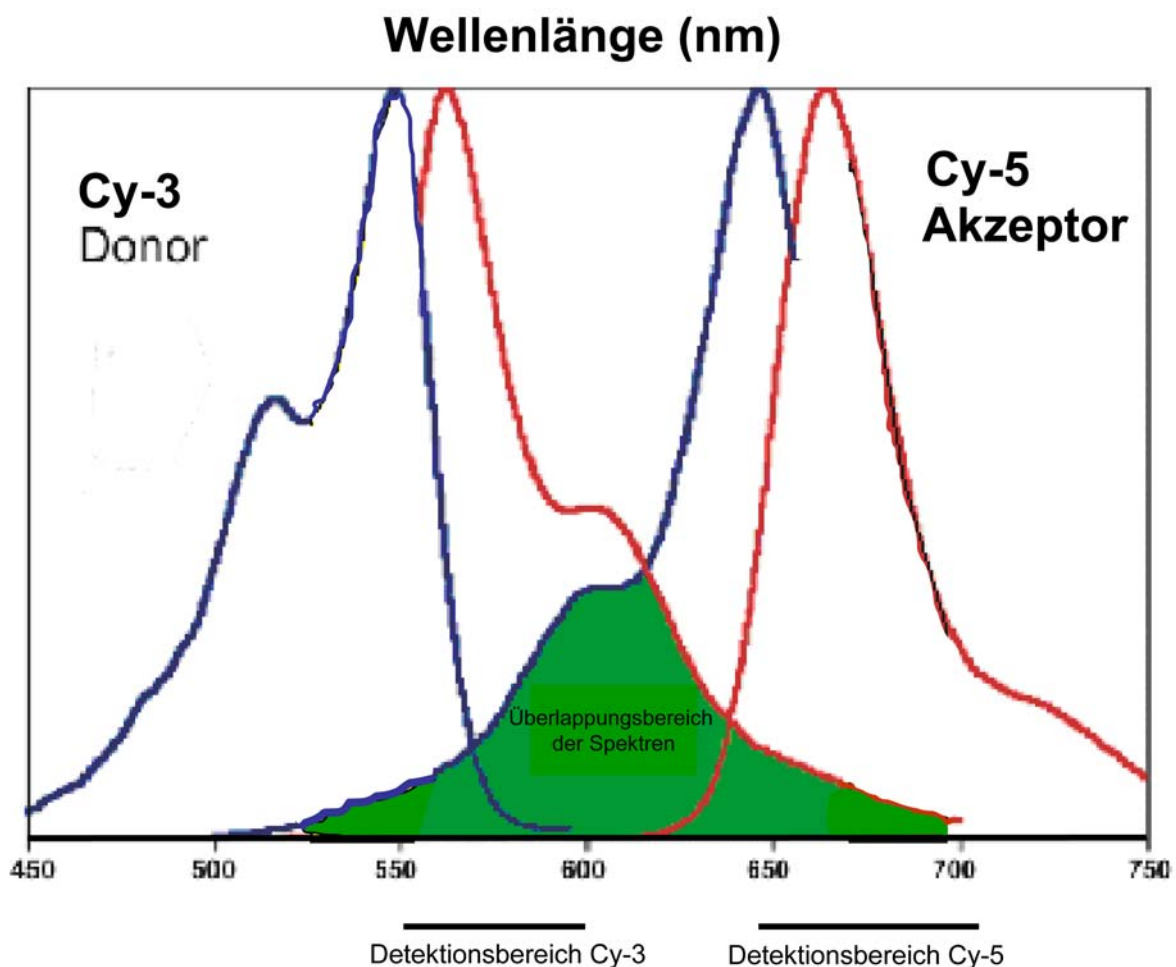


Abbildung II-3. Cy-3 besitzt ein Absorptionsmaximum bei 550 nm und ein Emissionsmaximum bei 570 nm, Cy-5 weist ein Absorptionsmaximum bei 650 nm und ein Emissionsmaximum bei 670 nm auf. Mit Hilfe von passenden Filtersets können beide Spektren leicht von einander getrennt werden.

Andere mögliche Fluorophorkombinationen sind Cyan-Fluoreszenz-Protein (CFP)/Yellow-Fluorescent-Protein (YFP), Green-Fluorescent-Protein (GFP)/Cy-3, GFP/Cy-3,5 (Ng et al., 1999; Wouters und Bastiaens, 1999).

III. Material und Methoden

III.1 Gewebegewinnung

III.1.1 Tiere

Für die Versuche wurden Wistar Ratten beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht von 150-250 g verwendet. Die Ratten stammten aus der Zucht des Physiologischen Institutes des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen (Standardbedingungen; SB) sowie aus einer spezifiziert-pathogenfreien Haltung (SPF; Harlan Winkelmann, Borchem). Weiterhin wurden Cav-1 defiziente Mäuse (Drab et al., 2001) und Mäuse aus dem dazugehörigen C57/Bl6 Wildtypstamm (WT, Drab et al., 2001) verwendet, beide gezüchtet unter SPF-Bedingungen. Die aktuellen Vorschriften in der BRD für die Zucht von Labortieren und Versuche mit Labortieren wurden eingehalten. Die Tiere wurden durch Inhalation von Halothan (Rüsch, Böblingen) getötet.

III.1.2 Gewinnung von unfixiertem Gewebe

Die Tiere wurden wie schon beschrieben getötet. Nach der Entnahme wurde das Gewebe in Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Für immunhistochemische Untersuchungen wurde das Gewebe in Einbettungsmedium (O.C.T.-Compound, Sakura, Zoeterwoude, Holland) in schmelzendem Isopentan schockgefroren und bei -80°C gelagert.

III.1.3 Gewinnung von unfixiertem Trachealepithel und *M. trachealis*

Der Thorax wurde eröffnet, Pars cervicalis und Pars thoracalis der Trachea wurden freigelegt und vom Oesophagus abpräpariert. Anschließend wurde die Trachea in der Höhe des Kehlkopfs und der Bifurcatio tracheae abgetrennt und aus dem Körper herausgenommen. Die Trachea wurde längst aufgeschnitten. Mittels vorsichtigen Abrollens eines Wattestäbchens wurde das Trachealepithel von der Basalmembran gelöst, in einer Pufferlösung (siehe Kapitel III.7. RT-PCR oder III:10. Western Blot)

aufgenommen und direkt danach aufgearbeitet. Der Musculus trachealis wurde unter mikroskopischer Sicht vorsichtig von dem umliegenden Gewebe abgetrennt und in Lysispuffer für real-time RT-PCR (siehe Kapitel III.7) aufgenommen.

III.1.4 Perfusionsfixierung

Der Thorax wurde eröffnet und das Herz freigelegt. Das rechte Herzohr wurde eingeschnitten, der linke Ventrikel kanüliert und das Blut mit einer Vorspüllösung (25 g/l Polyvinylpyrrolidon MG 40000, 9 g/l NaCl, 5 g/l Procainhydrochlorid in Wasser, 2 ml/l Heparin in Wasser [5000 I. E. /ml; Ratiopharm, Ulm, Germany], eingestellt auf pH 7,4) aus dem Kreislauf gewaschen. Somit wurden die Lungengefäße retrograd freigespült, die Gefäße des Körperkreislaufs anterograd. Anschließend wurde das Tier durch die liegende Kanüle mit dem Fixans (1,5% Glutardialdehyd und 2% Paraformaldehyd (PFA) in 0,1 M Phosphatpuffer (PP), eingestellt auf pH 7,4) perfundiert und die Gewebe entnommen. Anschließend wurden die Gewebe noch für 5 h in dem Fixans nachfixiert. Dann wurde das Gewebe in 0,1 M TRIS-HCl Puffer; pH 7,4 gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe für die Elektronmikroskopie aufgearbeitet.

III.1.5 Paraffineinbettung

Humane Bronchien (n=4) wurden entnommen, in 10% Formalinlösung fixiert und nach dem Standardverfahren mittels eines Einbettautomaten im Institut für Pathologie der Justus-Liebig-Universität Giessen in Paraffin eingebettet.

III.1.6 Gewinnung und Fixierung von humanen Glomustumoren

Die Glomustumoren (n=4) wurden zwischen den Jahren 1997-2003 durch einen chirurgischen Eingriff in der HNO-Klinik der Justus-Liebig-Universität, Giessen entnommen und pathologisch begutachtet. Die Glomustumoren wurden in 1x1 cm Stücke geteilt und in Zamboni-Fixativ (1,85% Formaldehyd, 15% gesättigte Pikrinsäurelösung in 0,1 M PP, pH 7,4) für 6 Stunden fixiert. Nach mehreren Waschschritten mit PBS wurden die Proben über Nacht mit 18% Saccharose in 0,1 M PP, pH 7,4, zum Gefrierschutz inkubiert. Die Gewebeproben wurden auf

Filterpapier in O.C.T.-Compound orientiert, in schmelzendem Isopentan schockgefroren und bei -80° aufbewahrt.

Besondere Präparationsverfahren

III.1.7 Transtracheale Füllung mit O.C.T.-Compound

Der Thorax der Maus oder der Ratte wurde eröffnet, die Trachea freigelegt, eingeschnitten und eine Venenverweilkanüle (2,2 mm Durchmesser für Ratte und 1,1 mm für Maus; Braun, Melsungen) in die Trachea eingeführt. Über die liegende Kanüle wurde die Lunge mit ca. 7 ml (für Ratte) oder 2 ml (für Maus) O.C.T.-Compound, verdünnt mit dem gleichen Volumen 0,1 M PP (pH 7.4), gebläht, die Kanüle herausgezogen und die Trachea im zervikalen Abschnitt abgebunden. Zwei weitere Ligaturen wurden im thorakalen Abschnitt der Trachea gelegt. Nach Herauspräparation des Thoraxpaketes (Herz, Lunge, Trachea, Oesophagus, Thymus, Aorta thoracica) wurde die Trachea in der Höhe des Lungenhilus abgeschnitten. Die Gewebe wurden auf Filterpapier orientiert in schmelzendem Isopentan schockgefroren und bei -80° aufbewahrt. Die Ligaturen wurden vor der Anfertigung von Schnitten entfernt.

III.2 Konventionelle Elektronmikroskopie

Für konventionelle Elektronmikroskopie wurden Tracheen von Wistar-Ratten (n=2, SB-Haltung), Cav-1 defizienten Mäusen (n=2, SPF-Haltung), und C57/Bl6 WT-Mäusen (n=2, SPF-Haltung) eingesetzt. Das Gewebe wurde fixiert (siehe Kapitel III.1.4). Nach dem Waschen in 0,05 M Tris-HCl, pH 7,6, erfolgte die Osmierung für eine Stunde in 1% OsO₄ in Wasser. Danach wurden die Tracheen für 3 x 15 min in 0.05 M Maleinsäure-NaOH-Puffer (Maleatpuffer), pH 5.2, gewaschen. Anschließend erfolgte die Kontrastierung in 1% Uranylazetat in 0.05 M Maleatpuffer, pH 6.0, en block für 1 h. Einer Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe folgte die Einbettung in Epon (480 g/kg Epoxyresin (Agar Scientific, Essex, England), 320 g/kg Dodeceny Succinic Anhydride (DDSA; Agar Scientific), 200 g/kg Methyl Nadic Anhydride (MNA; Agar Scientific) und 3% N-Benzyl dimethylamine (BDMA, Agar Scientific)) und die

Polymerisation über Nacht bei 60°C. Semidünnschnitte wurden angefertigt und geeignete Regionen im Durchlichtmikroskop aufgesucht. Anschließend wurden Ultradünnschnitte von 80 nm angefertigt (Reichert Ultracut E, Leica, Bensheim) und mit einem Transmissionselektronenmikroskop EM 902 (Zeiss, Jena) ausgewertet und fotografiert.

III.3 Immunhistochemische Verfahren

III.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz an Kryoschnitten

Von den zu untersuchenden Geweben wurden Kryoschnitte mit einer Dicke von 10 µm angefertigt (Microm HM 560, MICROM International GmbH, Walldorf) und auf Objektträger SuperFrost Plus (Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen. Natives Gewebe wurde entweder für 10 min in bei -20°C vorgekühltem Aceton fixiert, oder für 20 min in 4% Paraformaldehyd (PFA) bei Raumtemperatur und nachfolgend 2x10 min in PBS und 1x10 min in destilliertem Wasser gewaschen. Alle Schnitte wurden danach eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Die Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen erfolgte für eine Stunde mit einer der folgenden Blocklösungen: Aceton-behandelte Schnitte mit 5% normalem Ziegenserum (NGS; DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) und 5% Rinderserumalbumin (BSA) in 0.05 M PBS; für PFA-behandelte Schnitte und fixiertes Gewebe mit 10% normalem hitzeinaktiviertem Pferdeserum (NHS, Schlachthof Marburg), 0,5% Tween 20, 0,1% BSA in PBS, pH 7,4. Die primären Antikörper (s.u.) wurden in PBS mit einem Zusatz von 0.01% NaN_3 und 0.05 M NaCl (PBS+ NaN_3 +S) in der Gebrauchsverdünnung angesetzt und die Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3x10 min Waschen mit PBS wurden die entsprechenden sekundären Antikörper in PBS+ NaN_3 +S für eine Stunde auf die Schnitte aufgetragen. Nach 3x10 min Waschen mit PBS wurden die Schnitte für weitere 10 min in 4% PFA postfixiert, um die Bindung zwischen dem primären und dem sekundären Antikörpern zu fixieren. Nach einem abschließenden Waschschrift wurden die Objektträger mit karbonat-gepuffertem Glycerol (pH 8,6) eingedeckelt und bei 4°C dunkel gelagert. Zur gleichzeitigen Markierung zweier Antigene wurden Mischungen von Primär-beziehungsweise Sekundärantikörpern in den angegebenen Endverdünnungen verwendet.

III.3.2 Indirekte Doppelimmunfluoreszenz an Kryoschnitten mittels Alexa Fluor Labeling Kit

Die Schitte wurden wie oben schon beschrieben angefertigt, mit Aceton fixiert und die unspezifischen Bindungen wurden für eine Stunde mit einer Blocklösung (5% NGS (DakoCytomation) und 5% BSA in 0.05 M PBS) abgesättigt. Einer der primären Antikörper (s.u.) wurde in PBS mit einem Zusatz von 0.1% NaN_3 und 0.5 M NaCl (PBS+ NaN_3 +S) in der Gebrauchsverdünnung angesetzt und über Nacht bei Raumtemperatur auf die Schnitte aufgetragen. Nach 3x10 min Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit dem Cy-3-konjugierten sekundären Antikörper in PBS+ NaN_3 +S für eine Stunde inkubiert. Nach 3x10 min Waschen mit PBS und Nachfixieren in 4% PFA für 10 min wurden die Schnitte mit dem zweiten primären Antikörper, einem monovalenten Fab-Fragment, für eine Stunde inkubiert. Dieses wurde zuvor mit dem Alexa-647-Fluorophor gekoppelt. Diese Markierung des Antikörpers mittels Alexa Fluor Labeling Kit (Invitrogen) erfolgte wie folgt:

Der Antikörper wurde für 5 min mit der Labeling Komponente A inkubiert, danach wurde der markierte Antikörper mit dem gleichen Volumen der Blocking Komponente B für 5 min inkubiert (Tabelle III-1). Nach Auffüllen mit einer PBS+ NaN_3 +S-Lösung auf das Endvolumen wurde die Antikörperlösung 5 min im Reaktionsgefäß inkubiert und auf die Schnitte pipettiert. Pro 1 μg IgG1 wurden 10 μl der Komponente A/B eingesetzt.

AK-Antigen	AK-Konz. [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	AK-Verdünnung	Anzahl der OT	Vol. des verdünnten AK [μl]	entspricht μl AK	entspricht μg AK	Vol. der Labeling Komponenten A=B [μl]
Cav-3	250	1:50 (indirekte IHC 1:200)	2	100	2	0,5	5

Tabelle III-1. Beispiel für Berechnung des Volumens der Kit-Komponenten. AK=Antikörper, IHC=Immunhistochemie.

Nach 3x10 min Waschen mit PBS wurden die Schnitte für weitere 10 min in 4% PFA postfixiert, um die Bindung zwischen dem primären Antikörper und dem Fab-Fragment zu fixieren. Nach einem abschließenden Waschschrift wurden die Objektträger mit gepuffertem Glycerol (pH 8,6) eingedeckelt und bei 4°C dunkel gelagert.

III.3.3 Indirekte Immunfluoreszenz an Paraffinschnitten

Von den zu untersuchenden Geweben wurden Paraffinschnitte mit einer Dicke von 8 µm angefertigt (Tetrandor, Jung, Heidelberg) und auf Objektträger SuperFrost Plus (Menzel-Gläser, Braunschweig) mit einem Tropfen Wasser aufgezogen. Die Schnitte wurden über Nacht im Wärmeschrank (Heraeus) bei 37°C getrocknet, damit das Gewebe auf dem Objektträger besser haftet. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur bis zum Gebrauch aufbewahrt. Vor der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Schnitte entparaffiniert (2x5 min in Xylol, absoluter, 96%, 80%, 70% und 50% Alkohol, jeweils für 5 min). Die Inkubation mit den Antikörpern wurde nach einem Waschschrift mit der Blockung unspezifischer Bindungen (s.o., Kapitel III.3.1) fortgesetzt.

III.4 Immunhistochemische Untersuchungen

III.4.1 Immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation von Cav-1, Cav-2 und Cav-3 in den Atemwegen der Ratte

Es wurden Immunfluoreszenzuntersuchungen mit folgenden Primär- (Tabelle III-2) und Sekundärantikörpern (Tabelle III-3) durchgeführt.

Antigen	Wirtspezies/Klon	Verdünnung	Quelle
Cav-1 α (N-20) N-Terminus (human)	Kaninchen, polyklonal, sc-894	1:320	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg,
Cav-1 $\alpha\beta$ AS zwischen der	Maus, monoklonal, Klon 2297	1:200	Transduction Laboratories, Heidelberg

FEDVIAEP- und TM-Domäne der RSV-CEF			
Cav-2 TM-Domäne (human)	Maus, monoklonal, Klon 65	1:400	Transduction Laboratories, Heidelberg
Cav-3 AS 3-24 (Ratte)	Maus, monoklonal, Klon 26	1:200	Transduction Laboratories, Heidelberg

Tabelle III-2. Primärantikörper zur Untersuchung von Cav-Isoformen in den Atemwegen.

Antigen	Wirtsspezies	Konjugat	Verdünnung	Quelle
Kaninchen-IgG	Esel	Cy-3	1:2000	Chemicon, Temecula, USA
Maus-IgG	Esel	Cy-3	1:1000	Dianova, Hamburg

Tabelle III-3. Sekundärantikörper zur Untersuchung von Cav-Isoformen in den Atemwegen.

III.4.2 Immunhistochemische Untersuchungen zur Kolo-kalisation von Cav-1 α /Cav-1 $\alpha\beta$ und Cav-1 α /Cav-2 in den Atemwegen der Ratte

Es wurden Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen mit folgenden Primär- (Tabelle III-4) und Sekundärantikörpern (Tabelle III-5) durchgeführt.

Antigen	Wirtsspezies/Klon	Verdünnung	Quelle
Cav-1 α (N-20) N-Terminus (human)	Kaninchen, polyklonal, sc-894	1:320	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg,
Cav-1 $\alpha\beta$ AS zwischen der FEDVIAEP- und TM- Domäne der RSV-CEF	Maus, monoklonal, Klon 2297	1:200	Transduction Laboratories, Heidelberg
Cav-2 TM-Domäne (human)	Maus, monoklonal, Klon 65	1:400	Transduction Laboratories, Heidelberg

Tabelle III-4. Primärantikörper zur Untersuchung der Kolokalisation von Cav-Isoformen in den Atemwegen.

Antigen	Wirtsspezies	Konjugat	Ig-Größe	Verdünnung	Quelle
Kaninchen-IgG	Esel	Cy-3	gesamtes Molekül	1:2000	Chemicon, Temecula, USA
Maus-IgG	Esel	FITC	F(ab') ₂ Fragmente	1:200	Dianova, Hamburg

Tabelle III-5. Sekundärantikörper zur Untersuchung der Kolokalisation von Cav-Isoformen in den Atemwegen

III.4.3 Immunhistochemische Untersuchungen zur Zelltypenbestimmung der Cav-1 α -, Cav-1 $\alpha\beta$ - und Cav-2-immunreaktiven Zellen der Atemwege der Ratte

Es wurden Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen mit folgenden Primär- (Tabelle III-6) und Sekundärantikörpern (Tabelle III-7) durchgeführt.

Antigen	Wirtsspezies/Klon	Verdünnung	Quelle
Cav-1 α (N-20) N-Terminus (human)	Kaninchen, polyklonal, sc-894	1:400	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg,
Cav-2 TM-Domäne (human)	Maus, monoklonal, Klon 65	1:200	Transduction Laboratories, Heidelberg
eNOS AS 1025-1203 (human)	Maus, monoklonal, Klon 3	1:200	Transduction Laboratories, Heidelberg
Surfactant Protein-D (SP-D), Lektin-Domäne	Maus, monoklonal, Klon VI F11	1:100	Dianova, Hamburg
Villin	Kaninchen, polyklonal	1:2000	Drenckhahn et al.; 1983

Tabelle III-6. Primärantikörper zur Zelltyp-Bestimmung der Cav-1 α -, Cav-1 $\alpha\beta$ - und Cav-2-immunreaktiven Zellen in den Atemwegen.

Antigen	Wirtsspezies	Konjugat	Ig-Größe	Verdünnung	Quelle
Kaninchen-IgG	Esel	Cy-3	gesamtes Molekül	1:2000	Chemicon, Temecula, USA
Maus-IgG	Esel	FITC	F(ab') ₂ Fragmente	1:200	Dianova, Hamburg

Tabelle III-7. Sekundärantikörper zur Zelltyp-Bestimmung der Cav-1 α -, Cav-1 $\alpha\beta$ - und Cav-2-immunreaktiven Zellen in den Atemwegen.

III.4.4 Immunhistochemische Untersuchungen zur Zelltypenbestimmung der Cav-3-immunreaktiven Zellen der Atemwege der Ratte

Es wurden Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen mit folgenden Primärantikörpern (Tabelle III-8) durchgeführt.

Antigen	Wirtsspezies/Klon	Verdünnung	Quelle
Cav-3 AS 3-24 (Ratte)	Maus, monoklonal, Klon 26	1:200	Transduction Laboratories, Heidelberg
eNOS AS 1025-1203 (human)	Maus, monoklonal, Klon 3	1:200	Transduction Laboratories, Heidelberg
Surfactant Protein-D (SP-D) Lektin-Domäne	Maus, monoklonal, Klon VI F11	1:100	Dianova, Hamburg
CHT1	Kaninchen, polyklonal	1:800	Lips et al., 2003b

Tabelle III-8. Primärantikörper zur Zelltyp-Bestimmung der Cav-3-immunreaktiven Zellen in den Atemwegen.

Die Antikörper gegen SP-D und eNOS wurden mit einem Cy-3-konjugierten Antikörper gegen Maus-Ig detektiert. In der CHT1/Cav-3-Doppelimmunhistochemie wurden der anti-CHT1-Antikörper mit einem Cy-3-konjugierten Antikörper gegen Ratten-Ig und der anti-Cav-3-Antikörper mit einem Cy-5-konjugierten Antikörper gegen Maus-Ig markiert (Tabelle III-9).

Antigen	Wirtsspezies	Konjugat	Ig-Größe	Verdünnung	Quelle
Maus-IgG	Esel	FITC	F(ab') ₂ Fragmente	1:200	Dianova, Hamburg
Maus-IgG	Esel	Cy-5	gesamtes Molekül	1:200	Dianova, Hamburg
Kaninchen-IgG	Esel	Cy-3	gesamtes Molekül	1:2000	Chemicon, Temecula, USA

Tabelle III-9. Sekundäntikörper zur Zelltyp-Bestimmung der Cav-3-immunreaktiven Zellen in den Atemwegen.

In den Doppelimmunfluoreszenzen Cav-3/eNOS, Cav-3/SP-D wurde der Cav-3-Antikörper mit dem Alexa Labeling Kit wie oben beschrieben angesetzt (Tabelle III-1).

III.4.5 Identifizierung des Cav-3-immunreaktiven Kompartimentes der Atemwegsepithelzellen

Folgende Antikörper wurden zur Identifizierung des Cav-3-immunreaktiven Kompartimentes in den zilientragenden Zellen der Ratte eingesetzt:

Antigen	Wirtsspezies/Klon	Verdünnung	Quelle
Cav-3 AS 3-24 (Ratte)	Maus, monoklonal, Klon 26	1:200	Transduction Laboratories, Heidelberg
Beta-Tubulin IV	Maus, monoklonal, Klon ONS1A6	1:800	BioGenex, Den Haag, Niederlande

Tabelle III-10. Primärantikörper zur Identifizierung des Cav-3-immunreaktiven Kompartimentes in Flimmerzellen der Atemwege der Ratte.

Antigen	Wirtsspezies	Konjugat	Ig-Größe	Verdünnung	Quelle
Kaninchen-IgG	Esel	Cy-5	F(ab') ₂ Fragmente	1:50	Dianova, Hamburg

Tabelle III-11. Sekundärantikörper zur Identifizierung des Cav-3-immunreaktiven Kompartimentes in Flimmerzellen der Atemwege der Ratte.

In der Doppelimmunhistochemie Cav-3/Tubulin wurde der Cav-3-Antikörper mit dem Alexa Labeling Kit wie oben beschrieben angesetzt (Tabelle III-1).

III.4.6 Immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation von Cav-1α in den Atemwegen der Maus und des Menschen

Es wurden Immunfluoreszenzuntersuchungen mit folgenden Primär- (Tabelle III-12) und Sekundärantikörpern (Tabelle III-13) durchgeführt.

Antigen	Wirtsspezies/Klon	Verdünnung	Quelle
Cav-1α (N-20) N-Terminus (human)	Kaninchen, polyklonal, sc-894	1:400	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg,

Tabelle III-12. Primärantikörper zur Untersuchung von Cav-1α in den Atemwegen des Menschen, der Cav-1-defizienten Mäuse und der dazugehörigen Wildtypmäuse.

Antigen	Wirtsspezies	Konjugat	Ig-Größe	Verdünnung	Quelle
Kaninchen-IgG	Esel	Cy-3	gesamtes Molekül	1:2000	Chemicon, Temecula, USA

Tabelle III-13. Sekundärantikörper zur Untersuchung von Cav-1α in den Atemwegen des Menschen, der Cav-1-defizienten Mäuse und der dazugehörigen Wildtypmäuse.

III.4.7 Indirekte Doppelimmunfluoreszenz zur Untersuchung der Assoziation von Cav-1α und Cav-2

Es wurden Immunfluoreszenzuntersuchungen mit folgenden Primär- (Tabelle III-14) und Sekundärantikörpern (Tabelle III-15) durchgeführt.

Antigen	Wirtspezies/Klon	Verdünnung	Quelle
Cav-1 α (N-20) N-Terminus (human)	Kaninchen, polyklonal, sc-894	1:320	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg,
Cav-2 TM-Domäne (human)	Maus, monoklonal, Klon 65	1:400	Transduction Laboratories, Heidelberg

Tabelle III-14. Primärantikörper zur Untersuchung der Assoziation von Cav-1 α und Cav-2 in Endothelzellen und Atemwegsepithelzellen der Ratte.

Antigen	Wirtsspezies	Konjugat	Ig-Größe	Verdünnung	Quelle
Maus-IgG	Esel	Cy-3	gesamtes Molekül	1:1000	Dianova, Hamburg
Kaninchen- IgG	Esel	Cy-5	F(ab') ₂ Fragmente	1:50	Dianova, Hamburg

Tabelle III-15. Sekundärantikörper zur Untersuchung der Assoziation zwischen Cav-1 α und Cav-2 in Endothelzellen und Atemwegsepithelzellen der Ratte.

III.4.8 Kontrollen zu den immunhistochemischen Untersuchungen

Kryoschnitte von Cav-1 defizienten Mäusen wurden mit dem Cav-1 α -Antikörper zur Bestätigung der Spezifität der Markierung inkubiert. Die Spezifität der Markierung mit dem anti-Cav-1 $\alpha\beta$ - und dem anti-Cav-2-Antikörper wurde bereits in Versuchen mit Cav-1- und Cav-2-defizienten Mäusen von anderen Arbeitsgruppen gezeigt (Razani et al., 2002; Woodman et al, 2002). Zur Bestimmung der Spezifität der Markierung der sekundären Antikörper wurden diese unter Auslassung einer Inkubation mit den primären Antikörper nach einer Inkubation mit nur PBS+NaN₃+S auf die Schnitte aufgetragen.

Präabsorption

Zur Bestimmung der Spezifität der Cav-3-Markierung wurde der anti-Cav-3-Antikörper gegen die AS 3-24 der Cav-3 der Ratte mit einem Cav-3-Antigen (Cav-3-Peptid, 100 µg/ml; AS 3-24 der Cav-3 der Ratte; Transduction Laboratories) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in der Immunfluoreszenz eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde Primärantikörper ohne Antigen mitgeführt. Als spezifisch wurden nur Markierungen angesehen, die durch Zugabe des Antigens verhindert werden konnten.

III.5 Indirekte Doppelimmunfluoreszenz für FRET-Untersuchungen

III.5.1 Indirekte Doppelimmunhistochemie zur Untersuchung der Assoziation von Cav-1α und Cav-2

Es wurden Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen mit folgenden Primär- (Tabelle III-16) und Sekundärantikörpern (Tabelle III-17) durchgeführt.

Antigen	Wirtspezies/Klon	Verdünnung	Quelle
Cav-1α (N-20) N-Terminus (human)	Kaninchen, polyklonal, sc-894	1:320	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg,
Cav-2 TM-Domäne (human)	Maus, monoklonal, Klon 65	1:400	Transduction Laboratories, Heidelberg

Tabelle III-16. Primärantikörper zur Untersuchung der Assoziation von Cav-1α und Cav-2 in Endothelzellen und Atemwegsepithelzellen der Ratte.

Antigen	Wirtsspezies	Konjugat	Ig-Größe	Verdünnung	Quelle
Maus-IgG	Esel	Cy-3	gesamtes Molekül	1:1000	Dianova, Hamburg
Kaninchen- IgG	Esel	Cy-5	F(ab') ₂ Fragmente	1:50	Dianova, Hamburg

Tabelle III-17. Sekundärantikörper zur Untersuchung der Assoziation von Cav-1α und Cav-2 in Endothelzellen und Atemwegsepithelzellen der Ratte.

III.5.2 Indirekte Doppelimmunfluoreszenz für FRET-Untersuchungen an Endothelzellen in situ

Bei der Optimierung der FRET-Technik an Gewebeschnitten wurden unterschiedliche Inkubationsprotokolle verwendet. Als Basisprotokoll für die Anfertigung von Doppelimmunfluoreszenzpräparaten wurde das folgende Protokoll angewandt:

Zehn μm -dicke Kryoschnitte von unfixiertem Gewebe wurden mit Aceton fixiert und mit einer Blocklösung (5% NGS + 5% BSA in 0.05 M PBS) 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die primären und sekundären Antikörper wurden auf die Endverdünnung mit PBS (0,9% NaCl) oder mit PBS+NaCl (1,8% NaCl) verdünnt. Beide sekundären Antikörper waren zuvor vom Hersteller gegen Serumproteine der Ratte sowie auch gegen Serumproteine derjenigen Spezies, in den die Primärantikörper gewonnen wurden, präadsorbiert. Der anti-Cav-1 α - und der anti-Cav-2-Antikörper (siehe Kapitel III.5.1) wurden gleichzeitig auf die Schnitte aufgetragen und die Inkubation wurde über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt. Die sekundären Antikörper wurden 1 Stunde bei Raumtemperatur getrennt inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden in PBS gewaschen, nachfixiert in 4% PFA, wieder gewaschen und entweder mit gepuffertem Glycerol, pH 8,6, oder mit Mowiol 4-88, pH 8,6, eingedeckelt.

Eine wichtige Besonderheit ist, dass die Objektträger einzeln in Küvetten gewaschen wurden, damit eine Diffusion des primären Antikörpers zwischen den Objektträgern und nachfolgende Bindung an Schnitten anderer Objektträger verhindert wird.

Folgende Variationen des Protokolls wurden vorgenommen:

1. Um zu bestätigen, dass das gemessene FRET-Signal nicht durch eine Kreuzreaktivität der sekundären Antikörper entstanden war, wurde entweder der Cav-1 α - oder der Cav-2-Antikörper weggelassen.
2. Um zu überprüfen, welches die geringste Menge gebundenen sekundären Antikörpers ist, bei welches immer noch ein FRET-Signal detektiert wird, wurde bei gleichbleibender Konzentration des Cav-1 α -Antikörpers und des Cy-5-konjugierten Anti-Maus-Ig-Antikörpers (1:50) der Cy-3-konjugierte Anti-Kaninchen-Ig-Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 bis 1:32000 eingesetzt.
3. Um zu bestimmen, ob die Inkubationsreihenfolge der sekundären Antikörper das FRET-Signal beeinflusst, wurden die sekundären Antikörper in unterschiedlicher Reihenfolge auf die Schnitte appliziert.

4. Um zu bestimmen, ob die Größe der sekundären Antikörper die Höhe des FRET-Signals beeinflusst, wurde der Cy-5-konjugierte Anti-Kaninchen-IgG Antikörper durch Cy-5-konjugierte Anti-Kaninchen-Ig F(ab')₂ Fragmente ersetzt.

III.5.3 Indirekte Doppelimmunfluoreszenz für FRET-Untersuchungen an Atemwegsepithelzellen in situ

Das oben beschriebene Basisprotokoll wurde verwendet. Die Schnitte wurden zuerst mit dem Cy-3-konjugierten Anti-Maus-Ig-Antikörper und nach einem Waschschrift mit dem Cy-5-konjugierten Anti-Kaninchen-Ig F(ab')₂ Fragment inkubiert. Als Kontrolle für die Spezifität des FRET-Signals wurden Schnitte nur mit dem Cav-2 Antikörper und beiden sekundären Antikörper inkubiert. Dies dient als Kontrolle auf eine eventuelle Kreuzreaktivität der Sekundärantikörper.

III.6 FRET

III.6.1 Detektion von FRET

FRET-Versuche wurden in Gewebeschnitten sowohl an Endothelzellen von Gefäßen des Mediastinums des Herzen der Ratte als auch an Atemwegsepithel durchgeführt. FRET wurde am konfokalen Laserscanningmikroskop (Leica CLSM TCS SP2 AOBS; Leica, Bensheim) mittels Ölimmersionsobjektiv mit einer Vergrößerung von 63-fach, 1,4 numerische Apertur, gemessen. Zur FRET-Detektion wurde die Methode des Akzeptorbleichens eingesetzt. Folgende CLSM-Einstellungen wurden bei den Messungen benutzt: Anregen von Cy-3: mit HeNe-Laser 543 nm (51% Laseraktivität), Anregen von Cy-5: mit HeNe-Laser 633 nm (20% Laseraktivität); Wellenlänge der Detektion von Cy-3: 550-602 nm, Wellenlänge der Detektion von Cy-5: 642-705 nm. Das Pinhole wurde auf 3 Airy Units eingestellt. Die Photomultipliereinstellungen lagen zwischen 480 und 591 V (noch im linearen Messbereich). Die Einstellungen wurden bei jedem Versuch konstant gehalten. Bereiche von Interesse („region of interest“ = ROI) wurden ausgesucht und in diesen Bereichen wurde der Donor geblichen. Cy-5 wurde zehn mal in dem ausgewähltem Bereich unter der höchstmöglichen Nachvergrößerung (Zoom 32x) mit 100% Aktivität des 633 nm HeNe-Lasers geblichen.

Die Messungen wurden wie folgt durchgeführt: Vor und nach dem Bleichen wurden jeweils in dem Cy-3(Donor)- und Cy-5(Akzeptor)-Kanal gleichzeitig Bilder aufgenommen. Um das Rauschen in den Aufnahmen zu reduzieren, wurden die Bilder dreimal eingescannt und das Signal gemittelt. FRET wurde durch die Messung der Intensität der Donorfluoreszenz (Cy-3) vor und nach dem Bleichen in dem geblichenen Bereich quantifiziert. Weil sich bei den Messungen oft in dem geblichenen Bereich das Gefäßlumen oder nicht-immunreaktive Bereiche befanden, wurden mittels eines Software-Werkzeugs Regionen innerhalb des geblichenen Bereich (ROI) per Hand umkreist und auch in diesen Regionen wurden FRET-Messungen durchgeführt.

Als Kontrolle für die Stabilität des Messsystems wurden auch außerhalb des geblichenen Bereiches benachbarte Regionen von gleicher Fläche gemessen. Wenn in diesen Regionen Werte in der FRET-Effizienz von über 2% gemessen wurden, wurde diese Messserie von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Für jedes Tier wurden 6 Messungen für jede Experimentalbedingung durchgeführt.

III.6.2 Statistische Auswertung

Die Veränderungen in der Fluoreszenzintensität wurden sowohl als Anstieg in der Donorfluoreszenz (ΔI_F) als auch als FRET-Effizienz ($FRET_{eff}$) dargestellt.

Der Anstieg in der Donorfluoreszenz wurde nach der folgenden Formel errechnet:

$$\Delta I_F = I_{DA} - I_{DB}$$

Die $FRET_{eff}$ wurde in Prozent nach der folgenden Formel errechnet:

$$FRET_{eff} = ((I_{DA} - I_{DB}) / I_{DA}) \times 100.$$

In den beiden Formeln bedeuten

I_{DA} , die Intensität der Donorfluoreszenz nach dem Bleichen des Akzeptors und

I_{DB} , die Intensität der Donorfluoreszenz vor dem Bleichen des Akzeptors.

Um zwei experimentelle Bedingungen und die dazugehörigen Kontrollen zu vergleichen, wurden alle Gruppen untereinander mittels des Kruskal-Wallis-Tests verglichen (signifikant: $p \leq 0,05$; hoch signifikant: $p \leq 0,01$). Nur wenn sich in diesem Test ein $p \leq 0,05$ ergab, wurden nachfolgend zwei einzelne Gruppen durch den Mann-Whitney-Test miteinander verglichen (Maurer und Lehmacher, 1995).

Um zu bestimmen, ob sich ΔI_F oder $FRET_{eff}$ besser für die Auswertung der Vergleiche zwischen Experimenten und Kontrollen eignet, wurden „receiving operator

characteristics curves (ROC)“ von $FRET_{eff}$ oder ΔIF hergestellt und die Fläche unter jeder der ROC-Kurven wurde mit Hilfe der Methode von Hanley verglichen (Hanley und McNeil, 1982).

ΔIF wurde im Bezug auf die folgenden Faktoren analysiert: a) Antikörpergröße, b) Reihenfolge bei der Applikation der sekundären Antikörper.

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Softwareprogramm SPSS Version 12.0 oder 11.5.1 (SPSS GmbH Software, München) durchgeführt. Die ROC-Kurven wurden mit dem Programm MedCalc Version 8.1.0.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgien) ausgewertet.

III.7 RT-PCR

III.7.1 RNA-Isolation

Die Trachealepithelzellen von der Ratte (n=6) wurden mittels Wattestäbchen sorgfältig von der Trachea abgeschabt. Gesamt-RNA von den Zellen wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA-Menge wurde photometrisch bestimmt, auf 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mit Aqua destillata verdünnt und die Lösung bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

II.7.2 DNase-Verdau und reverse Transkription

Zur Zerstörung genomischer DNA wurde ein DNase-Verdau mittels DNase-I (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) durchgeführt. Hierzu wurde 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ der isolierten RNA mit 1 μl DNase-I (1 U/ μl , Invitrogen), 1 μl 10x DNase I Reaction Buffer (Invitrogen) und 8 μl Wasser für 15 min bei 25°C inkubiert und anschließend das Enzym durch die Zugabe von 1 μl Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (25 mM, pH 8,0, Invitrogen) inaktiviert.

Zum Umschreiben der mRNA in cDNA wurde der Ansatz mit 1 μl Oligo-dT₅ (500 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Perkin Elmer, Ohio, USA) für 10 min bei 65°C inkubiert und dann auf Eis für mindestens 5 min gestellt. Dem Ansatz wurden 4 μl 5x First Strand Buffer (Invitrogen), 1 μl dNTP-Mix (10 mM jedes dNTP, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und 2 μl Dithiothreitol (DTT) (0,1 M, Invitrogen) zugesetzt, auf 42°C für 2 min erhitzt, anschließend 1 μl Superscript II Reverse Transcriptase (200 U/ μl ,

Invitrogen) zugegeben und für 50 min bei 42°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Superscript II Enzyms wurde der Ansatz für 10 min auf 72°C erhitzt und anschließend bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

III.7.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation bekannter DNA-Abschnitte wurden 1 µl cDNA und jeweils 0,5 µl eines intronspannenden Forward- und Reverseprimerpaars (s. u. Tabelle III-18) (je 20 pM; Synthese: MWG Biotech, Ebersberg) zu einem Mastermix bestehend aus: 0,5 µl 10xPCR Buffer II (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3), 2 µl MgCl₂ (15 mM), 0,5 µl dNTPs (10 mM je dNTP), 0,1 µl AmpliTaq Gold Polymerase (5 U/µl; alle Reagenzien von Applied Biosystems, Darmstadt) und 17,9 µl H₂O, in ein 200 µl Reaktionsgefäß gegeben. Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler (Mastergradient Personal, Eppendorf) mit folgendem Protokoll: Zuerst wurde doppelsträngige DNA durch Erhitzung auf 95°C für 12 min geschmolzen und das Enzym AmpliTaq Gold Polymerase aktiviert. Dann wurden 40 Zyklen folgenden Ablaufs durchlaufen: 30 s Erhitzung auf 95°C zum Schmelzen doppelsträngiger DNA, 30 s bei 59°C (für jedes Primerpaar spezifische Anlagerungstemperatur), 30 s bei 72°C zur Synthese neuer DNA-Fragmente. Nach Beendigung der Zyklen wurde die Temperatur für 7 min auf 72°C gehalten, um die noch nicht abgeschlossene Synthese von DNA-Fragmenten zu vollenden.

Gen	Genbank Accession No	Primerpaare	Produkt- größe (bp)	Position der amplifizierten DNA- Fragmente (bp)
Cav-1	Z46614.1	Forward: CAGCATGTCTGGGGGTAAAT Reverse: TGCTTCTCATTACCTCGTCT	123	25-147
Cav-1	Z46614.1	Forward: GGCTAGCTTCACCACCTTCA Reverse: GTGCAGGAAAGAGAGGATGG	121	165-285
Cav-2	BC062059.1	Forward: TGTTTCTAGCCATCCCCTTG Reverse: ACCATGAGGCAGGTCTTCAC	106	392-497
Cav-2	BC062059.1	Forward: CCTACAGCCACCACAGTGTC	127	176-302

		Reverse: GGTTCTGCGATCAGATCCTC		
Cav-3	NM_019155	Forward: CCCAAGAACATCAATGAGGAC Reverse: GGAGACGGTGAAAGTGGTGT	120	218-337
Cav-3	NM_019155	Forward: CGGATCATCAAGGACATTCA Reverse: ACCGCCATCGAAGCTGTAAGT	137	167-303
eNOS	NM_021838.2	Forward: TCCGATTCAACAGTGTCTCCT Reverse: ACAGAAGTGCGGGTATGATGCTC	151	1835-1986
MhC	AY953023	Forward: AGATGCCGCCTCACATCTAT Reverse: ATGCCACCACAGCCAAATAC	153	14-166
α -SM-actin	X06801	Forward: CTGTGCTGTCCCTCTATGCT Reverse: CACGCTCAGTCAGGATCTTC	177	461-637
β -MG	NM_012512	Forward: TGTCTCAGTTCCACCCACCT Reverse: GGGCTCCTTCAGAGTGACG	191	147-337

Tabelle III-18. Oligonukleotidprimer für Cav-1, Cav-2, Cav-3, eNOS, Myosin Heavy Chain (MhC), α -Smooth Muscle Actin (α -SM-actin) und β -Microglobulin (β -MG) für RT-PCR-Analysen

III.7.4 Gelelektrophorese

Die Größe der PCR-Produkte wurde durch Elektrophorese in einem 2% TRIS-Azetat-EDTA-Agarose Gel (20 g/l Agarose (Genagarose L.E.; iNNO-TRAIN Diagnostik GmbH, Kronberg, Deutschland), 482 g/l TRIS (USB, Cleveland, USA), 104,2 ml/l Eisessig (Merck, Darmstadt), 200 ml/l 0,5 M EDTA (Invitrogen), ad 1 l H₂O), pH 8,0 mit einem Zusatz von 8 μ l/l Ethidiumbromid (1%; Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) überprüft. Fünfundzwanzig μ l der PCR-Produkte wurden mit 5 μ l Ladepuffer (0,1 g Orange G due (Sigma), 5,88 ml 87%iges Glycerol (Sigma), 250 μ l TRIS-HCL-Puffer (pH 8,0), 1 ml EDTA-Lösung (pH 8,0; Sigma), ad 10 ml H₂O) gemischt und in das Gel aufgetragen. Die PCR-Produkte wurden durch eine horizontale Elektrophorese in einer Horizon 11-14 Kammer (Life Technologies, Gibco) aufgetrennt. Als Marker wurde 10 μ l 100bp DNA Ladder (Invitrogen) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte mit einer Spannung von 150 V über 45 min. Die PCR-Fragmente wurden im Gel unter UV-Licht detektiert.

III.7.5 Kontrollreaktionen

Als Kontrolle für eine Verunreinigung der Proben mit genomischer DNA wurden PCR-Reaktionen mit Wasser anstatt Zugabe von cDNA durchgeführt. Zusätzlich wurden auch Kontrollreaktionen ohne Reverse Transcriptase durchgeführt. Als Kontrolle für die Effizienz der RNA-Isolierung und der cDNA-Synthese wurden Reaktionen mit einem Primerpaar für β -2-Microglobulin (β -MG) durchgeführt.

III.8 Laser-assistiertes Zellpicken

III.8.1 Gewinnung von Trachealepithelzellen für RT-PCR-Analysen

Lasermikrodissektion wurde zum Isolieren von einzelnen Epithelzellen aus Kryoschnitten von unfixierten Tracheen der Ratte angewandt (n=6, SPF; n=2, Standardbedingungen). Diese Zellen wurden anschließend für mRNA-Analysen eingesetzt. Die Tracheen wurden entnommen und eingefroren wie schon beschrieben (s. o., Kapitel III.1.2). Seriengefrierschnitte von 6 μ m Dicke wurden angefertigt (Kryostat CM 1900, Leica, Bensheim) und auf PALM Membranobjektträger (P.A.L.M. Microlaser Technologies, Bernried, Deutschland), die im voraus für 30 min mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt wurden, aufgezogen. Das mittels Laser ausgeschnittene Epithel wurde durch Hochdruck in den Deckel eines 0,5 ml Reaktionsgefäßes katapultiert (MicroBeam System, P.A.L.M. Microlaser Technologies). Damit die katapultierten Zellen an dem Deckel haften, wurde dieser vorher an der Innenseite mit 2,5 μ l Mineralöl beschichtet. In jedem Reaktionsgefäß wurde eine Menge von Trachealepithelzellen aufgenommen, die 50% der Zellen eines Querschnittes durch die Trachea entsprach. Die Zellen wurden innerhalb von 2 Stunden nach der Anfertigung der Schnitte aufgefangen. Pro Tier wurden Zellen in mindestens zwei Reaktionsgefäßen aufgefangen. Danach wurden zu jeder Probe 346,5 μ l Lysispuffer (Qiagen) und 3,5 μ l β -Mercaptoethanol (Sigma) zugegeben. Bei einem kurzen Zentrifugationsschritt wurden die Zellen von dem Deckel in die Pufferlösung überführt. Die Proben wurden im flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zum nächsten Tag bei -80°C aufbewahrt.

III.8.2 Reverse Transkription

Die Gesamt-RNA der gepickten Zellen wurde mit Hilfe des RNeasy Micro Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Der DNase-Verdau wurde ausgelassen, da bei diesem Schritt RNA zerstört werden könnte. Weil intronspannende Primerpaare benutzt wurden, konnte eventuell noch vorhandene genomische DNA von den neusynthetisierten DNA-Fragmenten in der abschließenden Gel-Analyse eindeutig differenziert werden.

Zehn μl RNA wurden für 5 min auf Eis inkubiert, kurz zentrifugiert und danach in einem Thermocycler 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde nach einer zweiten Inkubation auf Eis für 2 min und einem Zentrifugationsschritt ein RT-Mix bestehend aus 2 μl 10xPCR Puffer II (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3), 4 μl MgCl_2 (25 mM), 1 μl dNTPs (10 mM), 1 μl Random Hexamers (50 mM), 0,5 μl RNase Inhibitor (20 U/ μl), 1 μl MuLV reverse Transkriptase (50 U/ μl) und 0,5 μl H_2O (alle Reagenzien von Applied Biosystems) zugegeben. Die RNA wurde 75 min bei 43°C umgeschrieben. Zur Inaktivierung des MuLV Enzyms wurde der Ansatz für 5 min bei 99°C erhitzt, auf 4°C abgekühlt und bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

III.8.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die nachfolgende PCR wurden 4 μl cDNA und jeweils 0,5 μl eines intronspannenden Forward- und Reverseprimers (s. o., Tabelle III-18) (je 20 pM; Synthese: MWG Biotech, Ebersberg) zu einem Mastermix bestehend aus 2,5 μl 10xPCR Buffer II (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3), 2 μl MgCl_2 (15 mM), 0,5 μl dNTPs (10 mM je dNTP), 0,2 μl AmpliTaq Gold Polymerase (5 U/ μl ; alle Reagenzien von Applied Biosystems, Darmstadt) und 14,8 μl H_2O , in ein 200 μl Reaktionsgefäß gegeben. Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler (Mastergradient Personal, Eppendorf) mit folgendem Protokoll: Zuerst wurde doppelsträngige DNA durch Erhitzung auf 95°C für 5 min geschmolzen und das Enzym AmpliTag Gold Polymerase aktiviert. Dieses ermöglichte das schrittweise Aktivieren des Enzyms, so dass die Synthese der cDNA-Fragmente effizienter erfolgen kann. Dann wurden 50 Zyklen folgenden Ablaufs durchlaufen: 20 s Erhitzung auf 95°C zum Schmelzen doppelsträngiger DNA, 20 s bei 59°C (für jedes Primerpaar bei spezifischer Anlagerungstemperatur), 20 s bei 72°C zur Synthese neuer DNA-Fragmente. Die kurzen 20 s Schritte verhinderten das Amplifizieren unspezifischer Produkte. Nach

Beendigung der Zyklen wurde die Temperatur für 7 min auf 72°C gehalten, um die noch nicht abgeschlossene Synthese von DNA-Fragmenten abzuschließen. Die Größe der PCR-Produkte wurde durch Elektrophorese im 2% TRIS-Azetat-EDTA-Agarosegel überprüft.

III.8.4 DNA-Aufreinigung und Sequenzierung

Die zu bestimmenden Banden wurden aus dem Agarosegel unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Der DNA-Gehalt wurde photometrisch bestimmt und 20 ng DNA pro 100 bp wurden sequenziert. Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde von MWG Biotech durchgeführt.

III.8.5 Kontrollreaktionen

Als Kontrolle für eine Verunreinigung der Proben mit genomischer DNA wurden PCR-Reaktionen mit Wasser anstatt mit Zugabe von cDNA durchgeführt. Da intronspannende Primerpaare benutzt wurden, konnten die neusynthetisierten DNA-Fragmenten von eventuell noch vorhandener genomischer DNA eindeutig differenziert werden. Regionen mit O.C.T.-Compound von gleicher Zahl und ähnlicher Größe wie die Regionen mit gepickten Trachealepithelzellen wurden gepickt und als Kontrollen für eine eventuelle Kontamination mit RNA von anderen Zelltypen, die durch das Schneiden in Richtung des Epithels verschleppt werden könnte und dort zu einem falsch-positiven Nachweis führen könnte, eingesetzt. Diese Regionen befanden sich anliegend auf der luminalen Seite der Regionen mit gepickten Epithelzellen. Die PCR-Produkte wurden von MWG Biotech sequenziert.

III.8.6 Spezielle Kontrollen

Um die Möglichkeit einer Kontamination der Epithelzellen mit mRNA von glatten Muskelzellen, die bei dem Präparieren oder Schneiden zustande kommen könnte, zu überprüfen, wurden Tracheen von 4 Tieren (n=2, SPF; n=2 SB) in zwei Teile geteilt. Ein Teil wurde horizontal orientiert (Abbildung III-1/A) und ein Teil vertikal (Abbildung

III-1/B). So enthielten Schnitte, die von den vertikal orientierten Tracheen angefertigt wurden, glatte Muskelzellen, dagegen enthielten die Schnitte von den horizontal orientierten Tracheen keine glatte Muskelzellen des M. trachealis.

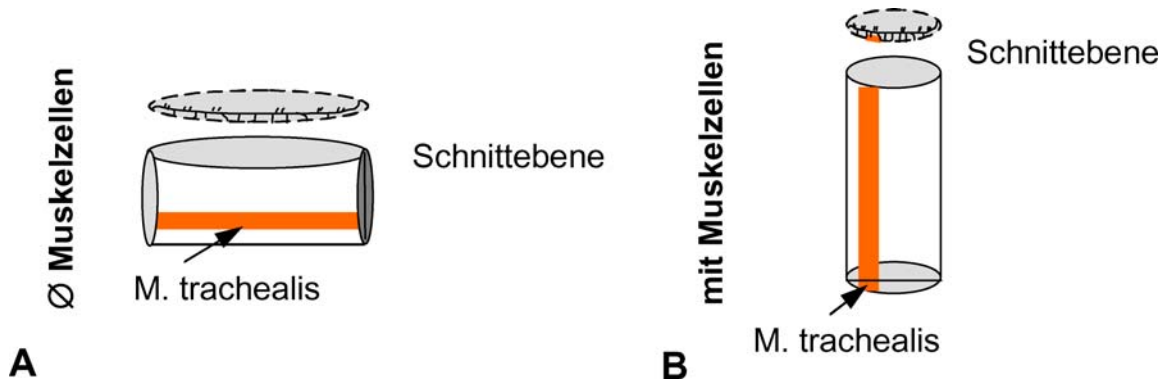


Abbildung III-1. Darstellung der Schnittebene der Trachea. A. Die angefertigten Schnitte enthalten keine Muskelzellen. B. Die angefertigten Schnitte enthalten Muskelzellen.

III.9 Real-time quantitative PCR

III.9.1 RT-PCR

Die Gesamt-RNA wurde von abgeschabten Trachealepithelzellen der Ratte isoliert ($n=6$, SPF; $n=3$, SB) und in DNA wie schon beschrieben (siehe Kapitel III.7) umgeschrieben. Real-time quantitative PCR wurde in einem I-Cycler (Bio-Rad, München) unter der Anwendung des QuantiTec SYBR Green PCR-Kits (Qiagen) durchgeführt. Die cDNA wurde 1:2, 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 in Wasser vorverdünnt, um diejenige Verdünnung der cDNA zu bestimmen, bei der die Amplifikation der PCR-Produkte die höchste Effizienz hatte. Zu 2 μ l cDNA, verdünnt auf 1:2, wurden 12,5 μ l 2x QuantiTecProbe Master-Mix, jeweils 0,75 μ l (20 pM) eines intronspannenden Forward- und Reverseprimers und 9 μ l H₂O gegeben. Primerpaare für β -MG, α -SM-actin, MhC und für Cav-1 (amplifizierte Nukleotidsequenz: 25-147 bp), Cav-2 (amplifizierte Nukleotidsequenz: 392-497 bp) und Cav-3 (amplifizierte Nukleotidsequenz: 167-303 bp) wurden eingesetzt (s. o., Tabelle III-18). Die PCR-Bedingungen schlossen Schmelzen der DNA für 10 min bei 95°C, gefolgt von 50 Zyklen 20 s bei 95°C, 20 s bei 59°C und 20 s bei 72°C ein. Jede Probe wurde dreifach bestimmt und der Mittelwert wurde gebildet.

Quantifiziert wird der Anstieg der SYBR Green-Fluoreszenz, der durch die Bindung an die im Laufe der PCR-Reaktion zunehmende doppelsträngige DNA entsteht. Für jede Zykluszahl wird eine Fluoreszenzintensität ermittelt. Ein Schwellenwert wird für jeden Lauf in der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion festgelegt, so dass die Fluoreszenzintensität maximal weit über der nicht-spezifischen Fluoreszenz liegt. Als C_T -Wert wird diejenige Zykluszahl bezeichnet, in der die Fluoreszenz der Produkte den Schwellenwert übersteigt.

III.9.2 Berechnung der relativen Expression

Bei der Quantifizierung wird die Expression des untersuchten Gens (Target Gene) im Vergleich zur Expression eines bekannten Gens (Housekeeping Gene) in der selben Probe errechnet. Als Housekeeping Gene wurde hier β -MG verwendet.

Für jede mRNA wurde aus der dreifachen Bestimmung in jeder Probe ein C_T -Mittelwert gebildet. Die Differenz zwischen dem C_T -Wert des untersuchenden Gens und dem β -MG C_T -Wert wurde gebildet.

$$\Delta C_T = C_{T \text{ Target Gene}} - C_{T \beta\text{-MG}}$$

$$\text{Relative Expression}_{\beta\text{-MG}} = 2^{\Delta C_T \text{ target gene} - \Delta C_T \beta\text{-MG}}$$

Die $\Delta\Delta C_T$ von Cav-2 zu Cav-1 wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\Delta\Delta C_{T \text{ Cav-1/2}} = \Delta C_{T \text{ Cav-1}} - \Delta C_{T \text{ Cav-2}},$$

$\Delta\Delta C_T$ bedeutet hier, wieviel Mal höher Cav-2 im Vergleich zu Cav-1 exprimiert ist.

Die $\Delta\Delta C_T$ von Cav-3 zu MhC und α -SM-actin wurde nach den entsprechenden Formeln berechnet:

$$\Delta\Delta C_{T \text{ Cav-3}} = \Delta C_{T \text{ MhC}} - \Delta C_{T \text{ Cav-3}} \text{ und}$$

$$\Delta\Delta C_{T \text{ Cav-3}} = \Delta C_{T \alpha\text{-SM-actin}} - \Delta C_{T \text{ Cav-3}}.$$

Die relative mRNA-Expression von Cav-3 zu MhC und α -SM-actin wurde nach den entsprechenden Formeln berechnet:

$$\text{Relative Expression}_{\text{Cav-3}} = 2^{\Delta C_{T \text{ MhC}} - \Delta C_{T \text{ Cav-3}}}$$

$$\text{Relative Expression}_{\text{Cav-3}} = 2^{\Delta C_{T \alpha\text{-SM-actin}} - \Delta C_{T \text{ Cav-3}}}$$

III.9.3 Kontrollreaktionen

Die Größe der PCR-Produkte wurde durch Elektrophorese im 2% TRIS-Azetat-EDTA-Agarosegel überprüft. Die Reinheit des amplifizierten Produkts wurde anhand

der ermittelten Schmelzkurve überprüft. Die Schmelztemperatur (T_m) ist die Temperatur, bei der 50% der doppelsträngigen DNA als Einzelstrang vorliegen. Da diese Temperatur von der Basenzusammensetzung abhängig ist, ist sie für jede DNA spezifisch. Abweichungen in der Schmelzkurve geben einen Hinweis auf Kontamination oder Primerdimere. Dabei ist es wichtig, die Schmelzkurve von der Probe mit derjenigen der dazugehörigen Wasser-Kontrolle zu vergleichen. Eine Übereinstimmung ist ein Hinweis auf eine Kontamination.

III.10 Western Blot

III.10.1 Proteingewinnung, Elektrophorese, Proteintransfer und Proteindetektion

Abgeschabte Trachealepithelzellen von der Ratte (n=5), Herz- und Lungengewebe von der Ratte sowie Lungen von Cav-1 defizienten Mäusen und Wildtypmäusen (jeweils n=2) wurden unter Zusatz eines Lysispuffers (Razani et al., 2002) mit einer Kugelmühle (Retsch, Haan) homogenisiert. Der Lysispuffer enthielt 10 mM Tris (pH 7,5), 50 mM NaCl, 1% Triton X-100, 60 mM Octylglucoside (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) und eine Tablette Proteaseinhibitoren per 10 ml Pufferlösung (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablet, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Die Proteinlösungen wurden für 1 h auf Eis bei 4°C inkubiert und danach 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Da die Pufferlösung eine sehr hohe Konzentration von Octylglucoside enthielt, war die Proteinbestimmung photometrisch nicht möglich. Unterschiedliche Mengen von jedem Gewebe- oder Zellhomogenat wurden auf das Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteinmengen wurden auf Grund der Auftrennung und der Intensität der Proteinbanden, die durch eine Färbung mit Simply BlueTM Safe Stain (Invitrogen, Carlsbad, USA) sichtbar gemacht wurden, mit Wasser auf 10 µl angeglichen. Zu 10 µl Proteinlösung wurden 2 µl of 5x Probenpuffer, enthaltend: 320 mM Tris-HCl (pH 6,8), 5% Natrium-Dodecylsulfat (SDS), 50% Glycerol, und 0,25 mg/ml Bromphenolblau und 1% β-2-Mercaptoethanol, gegeben. Um die Proteine der Probe vollständig zu lösen, eventuelle Proteasen zu inaktivieren und die Tertiärstruktur zu unterbinden, wurden die Proben 5 min auf 95°C erhitzt. Um eine bessere Auftrennung der Proteine im Trennbereich von 10-60

kDa zu erreichen, wurde ein 15% SDS-PAGE-Trenngel (15 ml 30% Acrylamid (Roth, Karlsruhe): 5,6 ml 2M TRIS-HCl, pH 8,8; 150 µl 20% SDS (Serva, Heidelberg); 160 µl 10% Ammoniumpersulfat (APS; Merck, Darmstadt); 12 µl TEMED (Roth, Karlsruhe); 9,25 ml H₂O), gegossen, das nach dem Auspolymerisieren von einem Sammelgel (1 ml 30% Acrylamid; 50 µl 20% SDS; 1,25 ml 1M TRIS-HCl, pH 6,8; 80 µl 10% APS; 10 µl TEMED; 7,7 H₂O) überschichtet wurde. Die Elektrophorese wurde unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Ein Liter Elektrophoresepuffer enthielt 0,025 M TRIS, 0,192 M Glycin, 2,5 ml 20% SDS und Wasser. Das Sammeln der aufgetragenen Proteine wurde für 20 min bei 75 V durchgeführt. Die Proteintrennung erfolgte 45 min bei 200 V. Danach wurden die Proteine des Gels elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran (Bio-Rad, München) übertragen. Filterpapier und Membran wurden in einem Blottpuffer (NuPAGE Transfer Buffer, Invitrogen, Karlsruhe) getränkt.

Anschließend wurden die Membran und das Gel zwischen 6 Lagen Filterpapier gebettet, so dass sich dazwischen keine Luftblasen befanden, und für 1 h bei 100 mA geblottet. Das Proteintransfer von dem Gel auf das Membran wurde durch eine Ponceaurot-Färbung (Ponceau S, Sigma) der Membran überprüft. Nach 3x5 min Waschen in einer Pufferlösung (TTBS; 0,01 M Tris-HCl (pH 8,0), 0,2 NaCl und 0.05% Tween-20) wurden die unspezifischen Proteinbindungen mit 10% Magermilchpulver (Sucofin, Zeven), gelöst in TTBS, für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Die Membran wurde mit einem Primärantikörper (s. u.) in 5% Magermilchpulver in TTBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 6x5 min Waschen erfolgte eine Inkubation mit einem peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper (siehe Tabelle III-19) in 2,5% Magermilchpulver in TTBS für 1 h bei Raumtemperatur. Für die Visualisierung der Proteine wurde die Membran mit einem Chemilumineszenzsubstrat (Super Signal West Pico Chemiluminescence Substrate, Pierce, Bonn, Deutschland) 5 min abgedunkelt inkubiert. Die Chemilumineszenzreaktion wurde mittels eines Films (Amersham, München, Deutschland) detektiert. Der Film wurde von 1 min bis zu 1 Stunde der Membran exponiert, um die Sensitivität der Detektion zu erhöhen. Danach wurden die Filme manuell entwickelt.

Antigen	Wirtsspezies	Konjugat	Verdünnung	Quelle
---------	--------------	----------	------------	--------

Maus-IgG	Ziege	Peroxidase	1:10000	Pierce, Bonn
Kaninchen-IgG	Ziege	Peroxidase	1:10000	Pierce, Bonn

Tabelle III-19. Sekundärantikörper für Western Blot Untersuchungen.

III.10.2 Kontrollreaktionen

Zur Bestimmung der Spezifität der Markierung der sekundären Antikörper wurden diese in einer Inkubation ohne primäre Antikörper eingesetzt. Die Spezifität der Cav-1 α und Cav-2 Antikörper wurden in Versuchen mit Lungenhomogenaten von Cav-1 defizienten Mäusen überprüft.

IV. Ergebnisse

IV.1 FRET

IV.1.1 Detektion einer engen räumlichen Assoziation von Cav-1 α und Cav-2 durch immunhistochemische Doppelmarkierung und FRET-CLSM-Analyse an Gewebeschnitten

Unter Verwendung von indirekter Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Cav-1 α und Cav-2 konnten wir in den Endothelzellen des Mediastinums einschließlich des Herzens der Ratte unabhängig von den experimentellen Bedingungen stabil ein FRET-Signal detektieren (Abbildung IV-1).

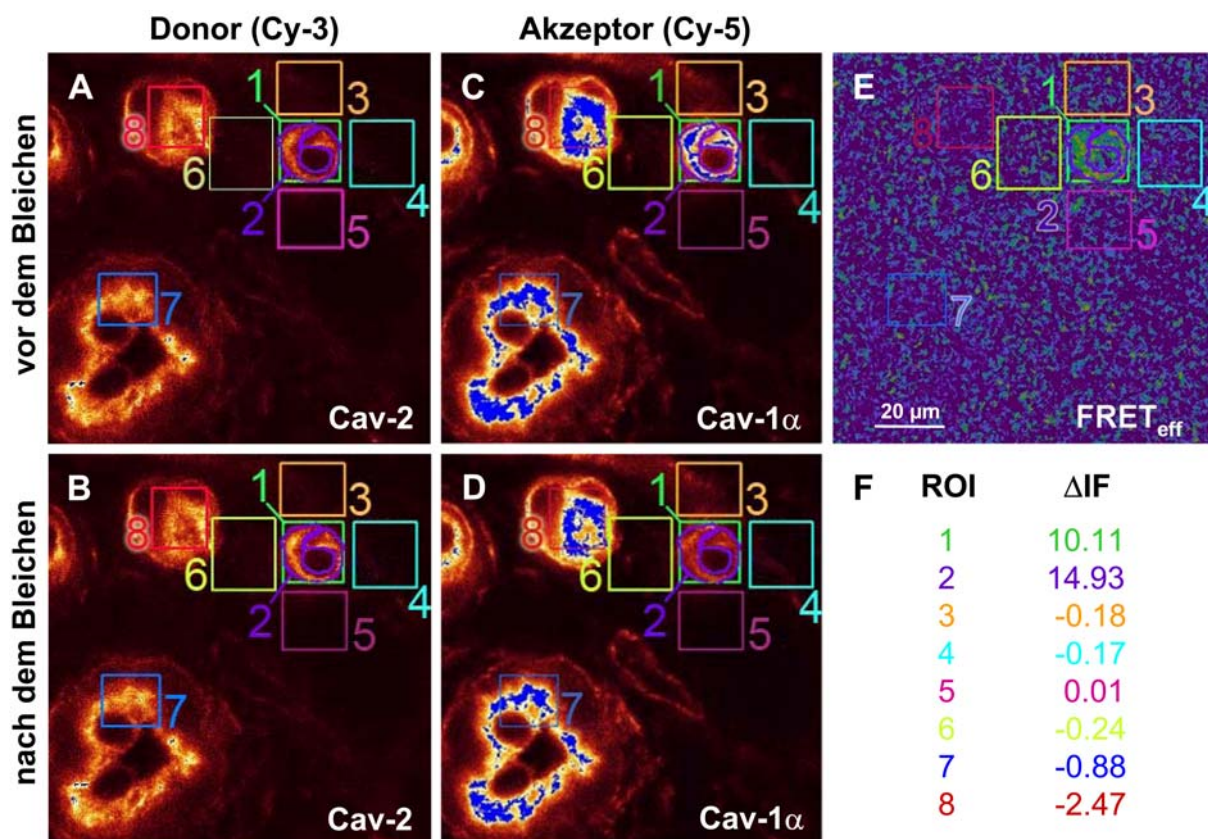


Abbildung IV-1. Detektion einer Assoziation von Cav-1 und Cav-2 in Endothelzellen mittels indirekter Immunfluoreszenz kombiniert mit FRET in Gewebeschnitten des Mediastinums der Ratte. Donorfluoreszenz (Cav-2 mit einem Cy-3-konjugierten Anti-Maus-IgG Sekundärantikörper markiert, A-B) und Akzeptorfluoreszenz (Cav-1 α mit einem Cy-3-konjugierten Anti-Kaninchen-IgG Sekundärantikörper markiert, C-D). Cy-5 wurde in der ROI

1 geblichen (vergleiche ROI 1, C und D). E: Die FRET-Effizienz ist kodiert in Falschfarben dargestellt (blau zeigt ein schwaches Signal, gelb zeigt ein starkes Signal). Die minimale $FRET_{eff}$ in den Regionen nahe der geblichenen Region ist auf ein Rauschen während der Bildaufnahme zurückzuführen. F: Veränderungen in $\Delta I F$ für jede ROI. ROI 1: geblichener Bereich (vergleiche C und D). ROI 2: per Hand umfahrene Region mit Endothelzellen im geblichenen Bereich. ROI 3-8: Kontrollbereiche außerhalb der geblichenen Region.

Um auf eine Kreuzreaktivität der Sekundärantikörper zu testen, wurde einer der Primärantikörper bei der Inkubation ausgelassen, aber beide Sekundärantikörper eingesetzt (Abbildung IV-2). Wurde derjenige Primärantikörper ausgelassen, gegen den der Cy-5-markierte Sekundärantikörper gerichtet war, wurde kein FRET-Signal gemessen (Mittelwert: $FRET_{eff}$: 0 %, $\Delta I F$: -0,56). Es gab hierbei keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zu einer Inkubation mit einem einzigen Primärantikörper gefolgt von einem Cy-3-konjugierten Sekundärantikörper (Mittelwert: $FRET_{eff}$: 0 %, $\Delta I F$: -1,00). Das Auslassen desjenigen Primärantikörpers, gegen den der Cy-3-konjugierte Sekundärantikörper gerichtet war, führte hingegen zu einem deutlichen FRET-Signal (Mittelwert: $FRET_{eff}$: 10,94 %, $\Delta I F$: 2,99) bei nachfolgender Inkubation mit beiden Sekundärantikörpern. $FRET_{eff}$ - und $\Delta I F$ -Werte in den Kontrollen waren dennoch signifikant niedriger im Vergleich zu der experimentellen Gruppe.

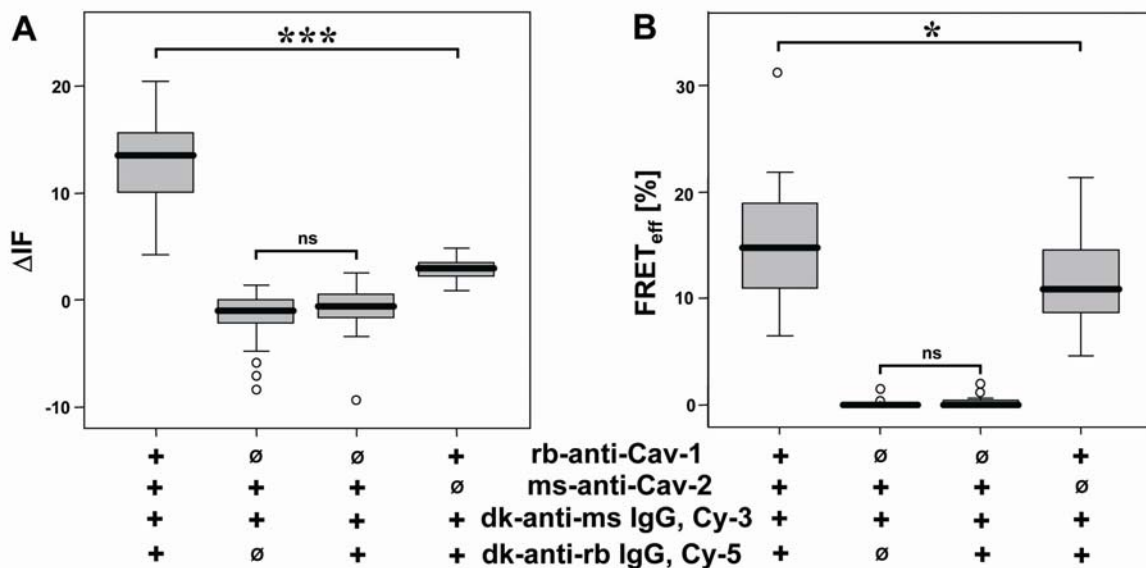


Abbildung IV-2. Kontrolleexperimente (Gewebeschnitte von 4 Tieren, pro Tier 6 Messungen). Applikation von beiden Primärantikörpern und beiden Sekundärantikörpern verglichen mit einer Applikation von nur einem Primärantikörper und beiden Sekundärantikörpern, sowie mit

einer Applikation von anti-Cav-2 und Cy-3-konjugierten Sekundärantikörpern. A: Unterschiede in ΔIF , B: Die gleichen Daten als $FRET_{eff}$ angegeben. $*$ = $p < 0,05$, $***$ = $p < 0,01$, nicht signifikant (ns)= $p > 0,05$. Boxplots: Minimum, Maximum und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile. Mit den Sekundärantikörper wurde sequenziell inkubiert (zuerst mit dem Cy-5-konjugierten).

Veränderungen in den ROIs außerhalb des geblichenen Bereiches gaben einen Hinweis auf falsch positive FRET-Signale im geblichenen Bereich. Diese Veränderungen entstanden nicht infolge eines FRET-Phänomens, sondern infolge einer Verschiebung des Präparates in der z-Achse. Ursachen für diese Verschiebung waren Luftbewegungen, die von der Klimaanlage oder dem Öffnen der Tür des Mikroskopieraums ausgingen. Da diese Veränderungen durch Kontrolle der ROIs außerhalb des geblichenen Bereiches festgestellt werden konnten, wurden diese falsch-positiven Experimente erkannt und die entsprechenden Messserien von einer weiteren Auswertung ausgeschlossen (Abbildung IV-3).

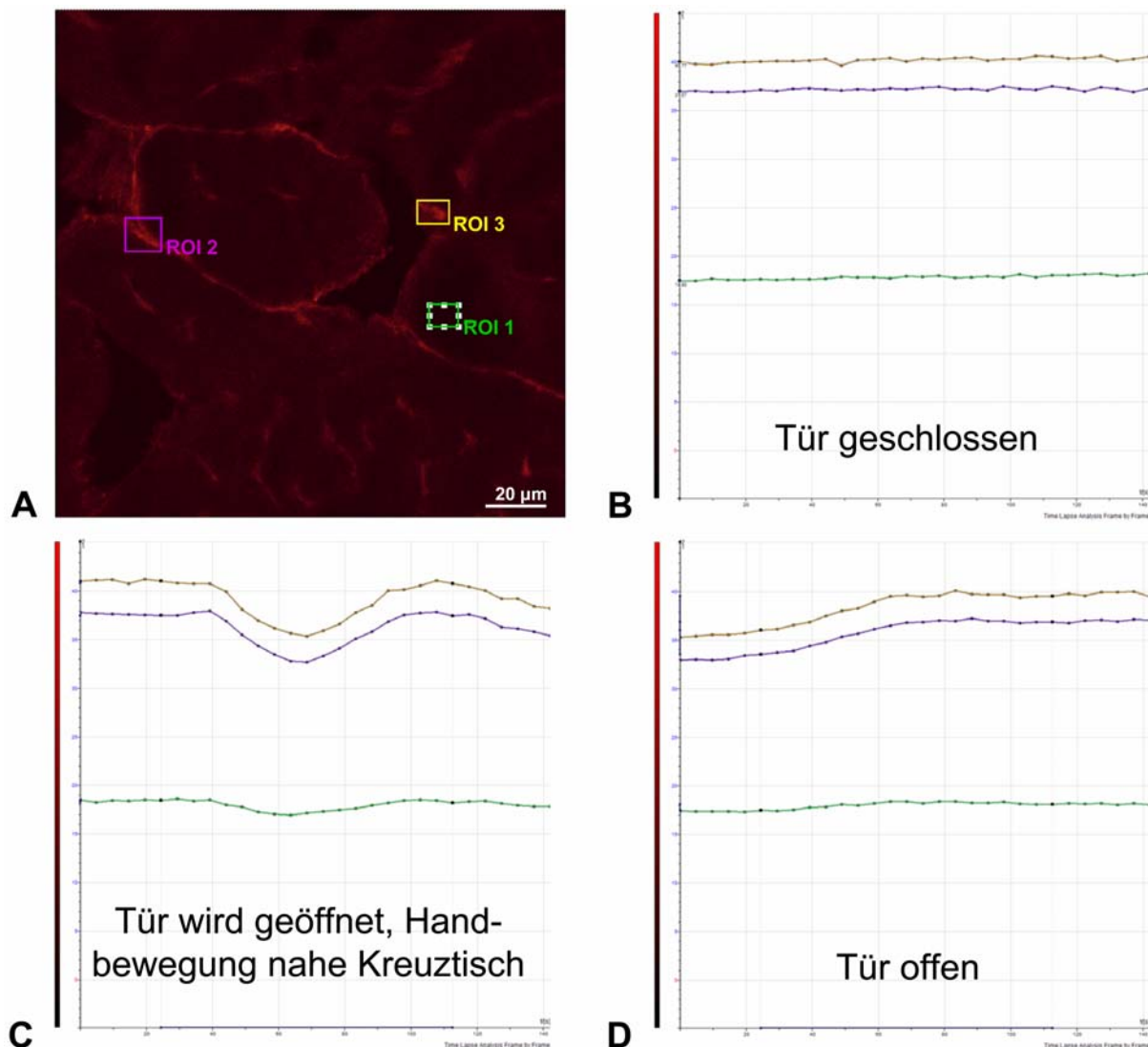


Abbildung IV-3. Einfluss der Luftbewegung im Raum auf die Stabilität des Messsystems. A: Cav-2-Immunfluoreszenz im Herzen. Drei ROIs wurden ausgewählt (grünes, oranges und blaues Viereck) und die Intensität der Immunfluoreszenz wurde alle fünf Sekunden gemessen. B-D: Zeitserie der durchschnittlichen Immunfluoreszenz in drei ROIs (x-Achse: t/s, y-Achse: durchschnittliche IF/Unit). Jeder Punkt entspricht eine Aufnahme pro 5 s. B: Fluoreszenzaufnahme bei stabilen Meßbedingungen. Es wurden keine massiven Abweichungen der Fluoreszenz von der Mittellinie detektiert. C: Sehr starke Abweichungen in der Fluoreszenzintensität nach einer Handbewegung in der Nähe des Kreuztisches. D: Drift in der Fluoreszenzintensität nach dem Öffnen der Tür des Mikroskopieraums.

IV.1.2 Verdünnungsreihen mit Cy-3-konjugiertem Sekundärantikörper

Um zu überprüfen, ob das in den negativen Kontrollen detektierte FRET-Signal durch eine Kreuzreaktivität zwischen den sekundären Antikörpern bedingt wurde, wurde eine Kreuzreaktivität durch die Markierung von einem primären Antikörper mit zwei

sekundären Antikörpern, Cy-3- und Cy-5-konjugiert, simuliert. Da beide sekundären Antikörper, die in diesem Experiment eingesetzt wurden, an den gleichen primären Antikörper binden (in diesem Fall ein Kaninchen-IgG), ist diese Situation vergleichbar zu einer Kreuzreaktivität bei Verwendung von nicht spezies-spezifischen Sekundärseren.

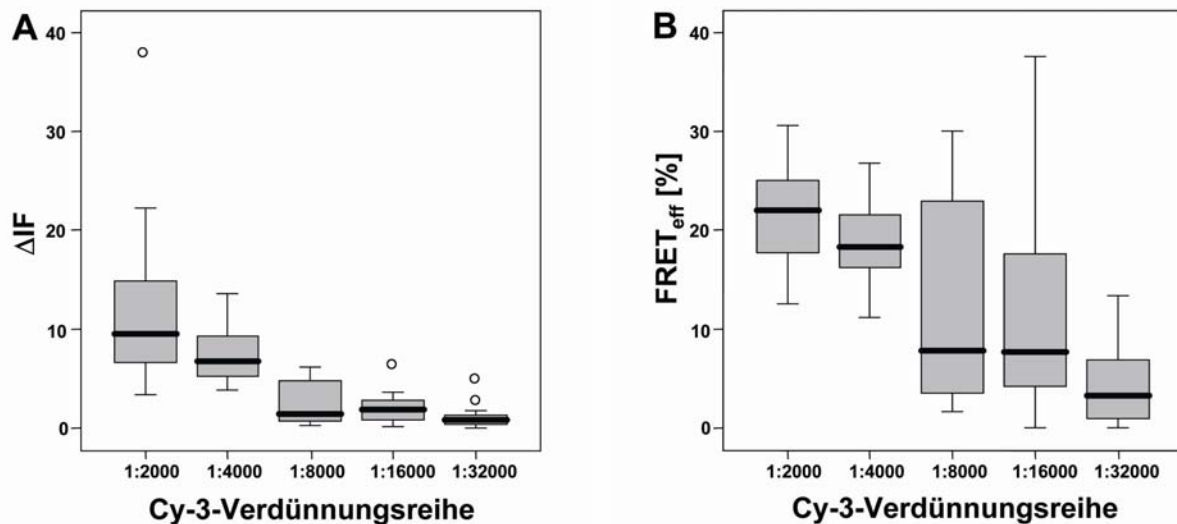


Abbildung IV-4. Simulation von Kreuzreaktivität der Sekundärseren durch Detektion des Cav-1 Primärantikörpers mit zwei Sekundärantikörpern. Der Cy-3-konjugierte Sekundärantikörper wurde von 1:2000 bis zu 1:32000 verdünnt, die Konzentration des Cy-5-konjugierten Sekundärantikörpers wurde konstant gehalten. A: Daten präsentiert als ΔIF . B: Daten präsentiert als $FRET_{eff}$. Boxplots: Minimum, Maximum und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile, Daten außerhalb der dreifachen Standardabweichung sind durch kleine Kreise dargestellt.

Der Cy-3-konjugierte Antikörper wurde in einer Verdünnungsreihe eingesetzt. Damit wurde Kreuzreaktivität simuliert, die durch die Bindung von geringen Mengen eines kreuzreagierenden sekundären Antikörpers entsteht. Ein hohes FRET-Signal von bis zu 30 % (Medianwert 21,98 %) konnte bei der höchsten Konzentration des angewendeten Cy-3-markierten Sekundärantikörpers („Donor“) detektiert werden. Die weitere Verdünnung des Cy-3-konjugierten Sekundärantikörpers reduzierte das FRET-Signal. Bei der höchsten Verdünnung von 1:32000 wurde noch immer $FRET_{eff}$ bis zu 12 % detektiert, obwohl eine Cy-3-Fluoreszenz nicht mehr mikroskopisch sichtbar war und der absolute Anstieg der Fluoreszenz sehr niedrig war (Medianwert 0,82) (Abbildung IV-4). Dies zeigt, dass die Bindung von winzigen Mengen eines Cy-3-konjugierten Antikörpers, die als Folge einer geringen Kreuzreaktivität auftreten

kann, zu einer erheblichen $FRET_{eff}$ führen kann, wobei aber der absolute Anstieg der Fluoreszenz (ΔIF) minimal ist.

IV.1.3 Vergleich der Eignung von ΔIF und $FRET_{eff}$ zur FRET-Detektion in Gewebeschnitten

Da hohe $FRET_{eff}$ eine Folge von sehr kleinen Anstiegen in der ΔIF sein kann, die ihrerseits durch eine Kreuzreaktivität des donor-gekoppelten sekundären Antikörpers entstehen können, wenn die Donorausgangsfluoreszenz (Fluoreszenz des Donors vor dem Bleichen des Akzeptors) sehr gering ist (siehe IV.1.2), wurde berechnet, ob die ΔIF der geeignetere Parameter für die Detektion von FRET mittels indirekter Immunfluoreszenz ist. Hierfür wurde die Eignung von $FRET_{eff}$ und ΔIF , zwischen Kontroll- und Experimentalgruppen zu unterscheiden, mit Hilfe von ROC-Darstellungen bewertet (Abbildung IV-5). Hierbei wird „die Fläche unter der Kurve“ als Bewertungsparameter herangezogen. Diese war in der ΔIF -Darstellung hoch signifikant ($p < 0,001$) größer, was zeigt, dass ΔIF besser als $FRET_{eff}$ zwischen einem realen FRET-Phänomen und Kontrollexperimenten unterscheiden kann (Abbildung IV-5).

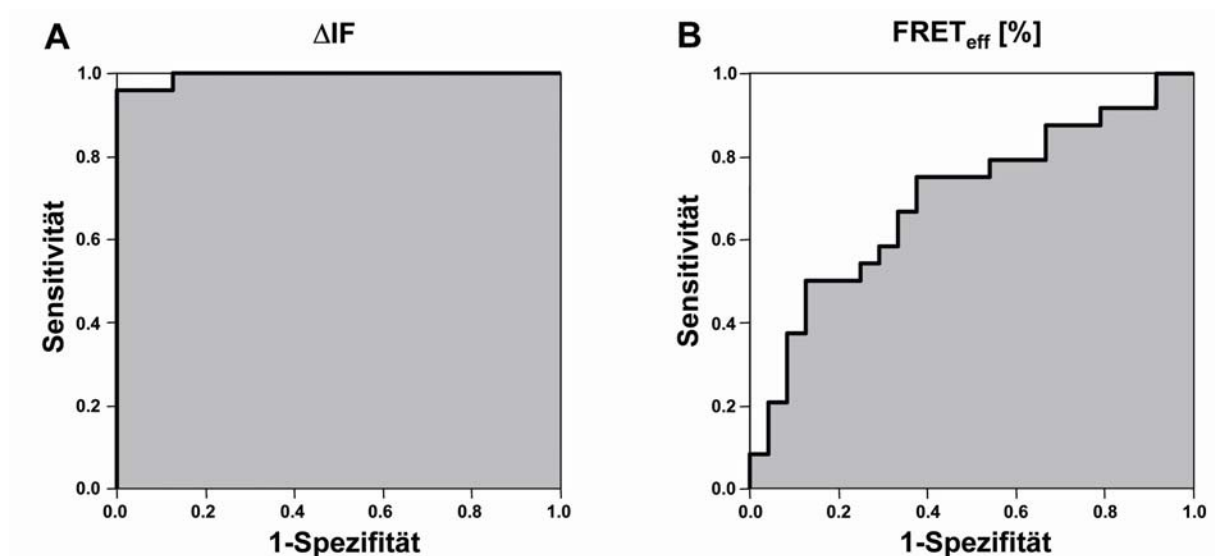


Abbildung IV-5. Vergleich zwischen $FRET_{eff}$ und ΔIF des gleichen Daten-Sets mittels ROC-Darstellungen. Die Boxplots dieser Daten sind in Abbildung IV-2 (erster Boxplot: Experimentalgruppe, vierter Boxplot: Kontrollgruppe) dargestellt. Die Flächen unter den Kurven (area under the curve, AUC), hier gezeigt in grau, wurden verglichen. Die Spezifität und die Sensitivität des Testes wird an Hand der AUC-Fläche bewertet. Eine Größe der AUC

von 1,00 wird bei 100 % Spezifität und Sensitivität des Testes gemessen. A: $\Delta I F$ AUC-Fläche = 0,995. B: $FRET_{eff}$ AUC-Fläche = 0,696.

IV.1.4 Einfluss der Inkubationsreihenfolge der Sekundärantikörper

Der Einfluss der Inkubationsreihenfolge der Sekundärantikörper auf $\Delta I F$ und $FRET_{eff}$ wurde untersucht. Eine Inkubation mit dem Cy-5-konjugierten Sekundärantikörper (Akzeptor) vor der Inkubation mit dem Cy-3-konjugierten Sekundärantikörper (Donor) resultierte in einem höheren FRET-Signal (Medianwerte: $FRET_{eff}$: 6,64 %, $\Delta I F$: 4,76) im Vergleich zu Inkubationen, in denen der Cy-3-konjugierte Sekundärantikörper zuerst appliziert wurde (Medianwerte: $FRET_{eff}$: 4,61 %, $\Delta I F$: 2,19; Abbildung IV-6).

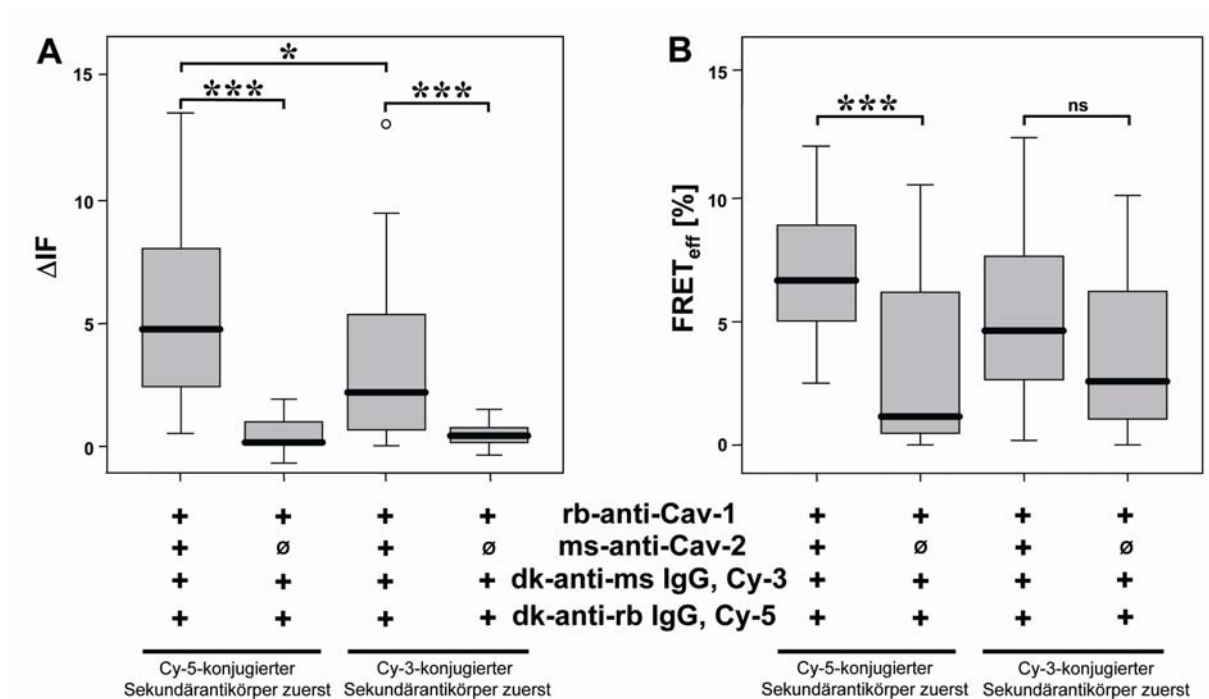


Abbildung IV-6. Einfluss der Applikationsreihenfolge der Sekundärantikörper auf das FRET-Signal. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, nicht signifikant (ns): $p > 0,05$. Boxplots: Minimum, Maximum und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile, ein Wert außerhalb der dreifachen Standardabweichung ist durch einen kleinen Kreis dargestellt.

IV.1.5 Einfluss der Verwendung von $F(ab')_2$ -Fragmenten und sequenzieller vs. simultaner Applikation der Sekundärreagenzien

IV.1.6 Anwendbarkeit der Methodik auf archiviertes humanes Gewebe am Beispiel von Glomus caroticum-Tumoren

Die Anwendbarkeit dieser Technik auf humanes Gewebe wurde an resezierten humanen Glomus caroticum-Tumoren getestet, die zuvor immersionsfixiert unter Kryoprotektion eingefroren und bei -80°C über Monate bis Jahre gelagert worden waren. Histologisch zeigten die Glomus-Tumoren das charakteristische Bild einer Organisation der Tumorzellen in „Zellballen“ mit dazwischen gelagertem stark vaskularisiertem Stroma (Lack et al., 1994). Die Endothelzellen dieser erweiterten Gefäße wiesen eine ausgeprägte Cav-1- und Cav-2-Immunfluoreszenz auf. In diesen Präparaten konnte ein robustes FRET-Signal bei Verwendung von Antikörpern gegen Cav-1 und Cav-2 detektiert werden (Medianwerte: ΔIF Experimentalgruppe: 4,81, Kontrollgruppe: 1,25; $p < 0,000$; Abbildung IV-8). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Methodik zur Analyse von humanen Proben, die bei chirurgischen Eingriffen gewonnen wurden und fixiert langfristig bei -80°C gelagert wurden, einsetzbar ist.

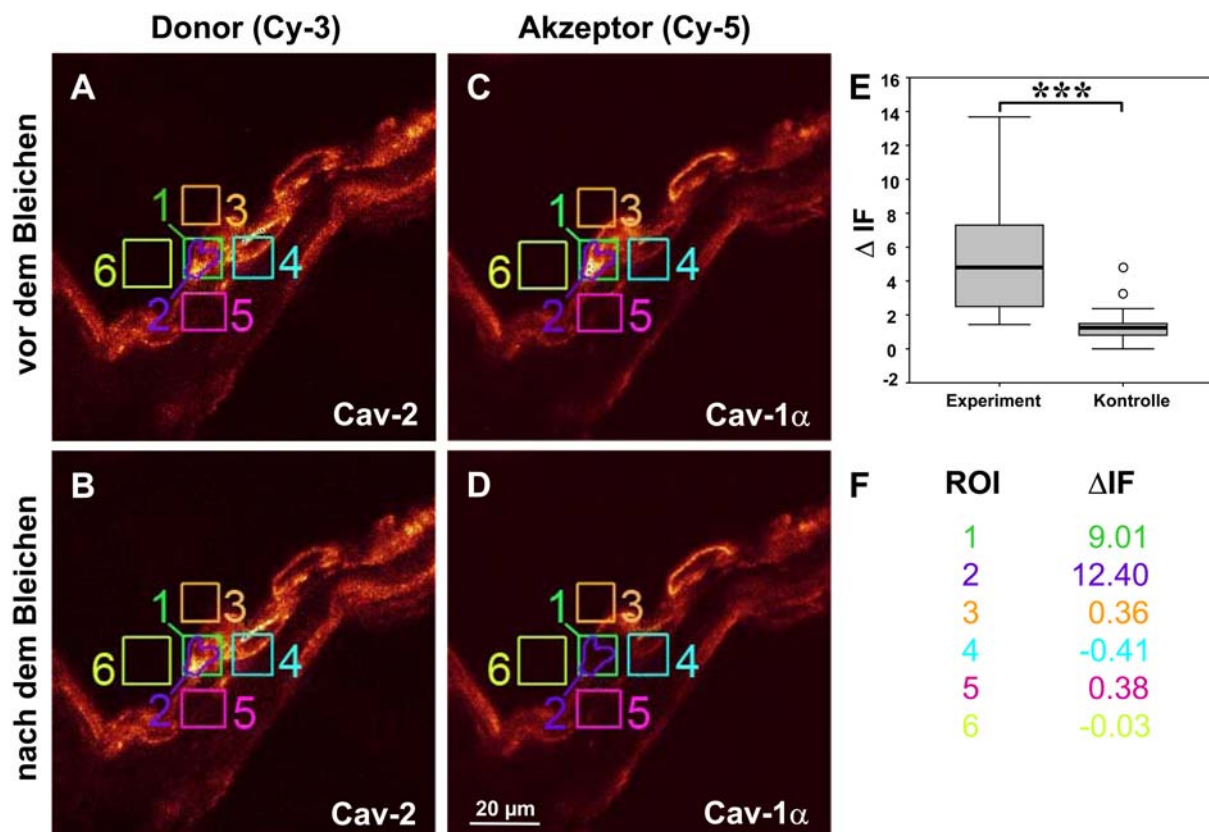


Abbildung IV-8. Detektion einer engen räumlichen Assoziation von Cav-1 und Cav-2 in Endothelzellen in Gewebeschnitten eines Glomus caroticum-Tumors des Menschen mittels

indirekter Immunfluoreszenz kombiniert mit FRET-CLSM-Analyse. Donorfluoreszenz (Cav-2 mit einem Cy-3-konjugierten Anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper markiert, A-B) und Akzeptorfluoreszenz (Cav-1 α mit einem Cy-3-konjugierten Anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper markiert, C-D). Cy-5 wurde in der ROI 1 gebleicht (vergleiche ROI 1, C und D). E: Datenanalyse. Boxplots: Minimum, Maximum und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile. *** $p < 0,001$ ($p < 0,000$). o = Ausreißerwerte. F: Veränderungen in $\Delta I F$ für jede ROI. ROI 1: gebleicher Bereich (vergleiche C und D). ROI 2: per Hand umkreiste Region mit Endothelzellen in dem gebleichten Bereich. ROI 3-6: Kontrollbereiche außerhalb der gebleichten Region.

IV.1.7 Detektion einer engen räumlichen Assoziation von Cav-1 und Cav-2 in den Zellkompartimenten einer einzelnen Endothelzelle

Diese Untersuchung wurde in Endothelzellen der Aorta der Ratte an Gewebeschnitten durchgeführt. Bei höchstmöglicher Vergrößerung wurden ROIs an verschiedenen Stellen innerhalb einer einzelnen Zelle gelegt. Mittels indirekter Doppelimmunfluoreszenz und FRET-CLSM-Analyse konnte eine Assoziation zwischen Cav-1 und Cav-2 sowohl an der Zellmembran als auch in der Zellregion, in der der Golgi-Apparat anzunehmen ist, detektiert. (Abbildung IV-9).

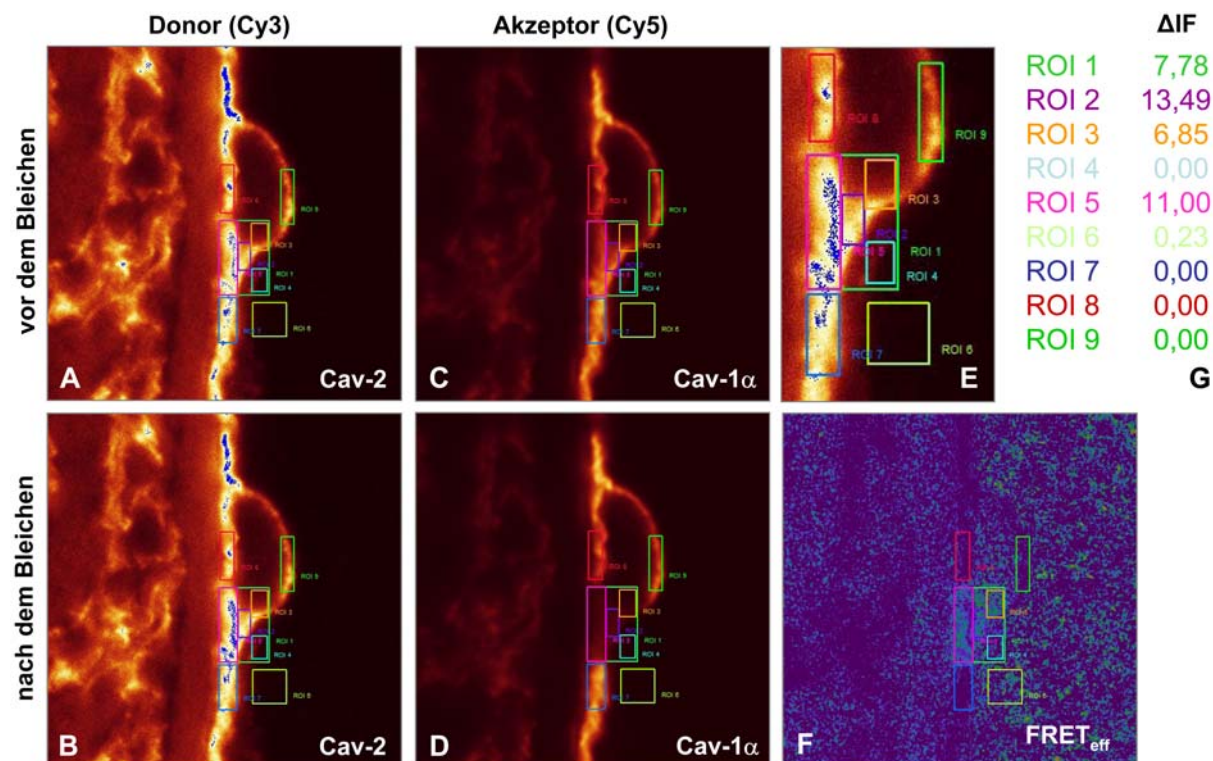


Abbildung IV-9. Detektion einer Assoziation von Cav-1 und Cav-2 in einer einzelnen Endothelzelle mittels indirekter Immunfluoreszenz kombiniert mit FRET in einem Gewebeschnitt der Aorta der Ratte. Donorfluoreszenz (Cav-2 mit einem Cy-3-konjugierten Anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper markiert, A-B) und Akzeptorfluoreszenz (Cav-1 α mit einem Cy-3-konjugierten Anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper markiert, C-D). Cy-5 wurde in der ROI 1 geblichen (vergleiche ROI 1, C und D). E: Vergrößerte Aufnahme der Donorfluoreszenz (siehe B). F: Die FRET-Effizienz ist kodiert in Falschfarben dargestellt (blau für schwaches Signal, gelb für hohes Signal). Die minimale FRET_{eff} in den Regionen nahe der geblichenen Region ist auf ein Rauschen während der Bildaufnahme zurückzuführen. G: Veränderungen in ΔF für jede ROI. ROI 1: geblichener Bereich (vergleiche C und D). ROI 2-5: Regionen in dem geblichenen Bereich. ROI 2, 3 und 5: Kompartimente der Endothelzelle. ROI 4: Region außerhalb der Endothelzelle. ROI 6-9: Kontrollbereiche außerhalb des geblichenen Bereiches.

IV.2 Cav-1 und Cav-2

IV.2.1 Lichtmikroskopische Immunhistochemie

Herz

Cav-1-Immunreaktivität fand sich im Herzen überall mit Cav-2-Immunreaktivität kolokalisiert. Die Endothelzellen der Kapillaren, der Koronararterien und der Venen wiesen beide Immunreaktivitäten auf (Abb. IV-10). Die Markierung war hauptsächlich an der Plasmamembran und im geringeren Maße im Zytoplasma zu finden. Die Markierungsintensität der Endothelzellen kleiner Gefäße bis hin zu Arteriolen und Venulen war stärker als die der Endothelzellen größerer Gefäße. Die Fibroblasten des fibrösen Gerüsts der Herzklappen und der umgebenden Ventilebene zeigten kräftige Cav-1- und Cav-2-Immunreaktivität. Weiterhin waren die Endothelien des Endokards und die Mesothelien des Epikards Cav-1- und Cav-2-positiv. Da Cav-2 sowohl in Endothelzellen als auch in den Kardiomyozyten hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert ist, war es in Gewebeschnitten wegen der räumlichen Nähe dieser Zellen meist unmöglich, die Immunmarkierung eindeutig einem der beiden Zelltypen zuzuordnen. Im Zytoplasma von Kardiomyozyten war, wenn überhaupt, nur eine geringe Cav-2-Immunreaktivität zu beobachten.

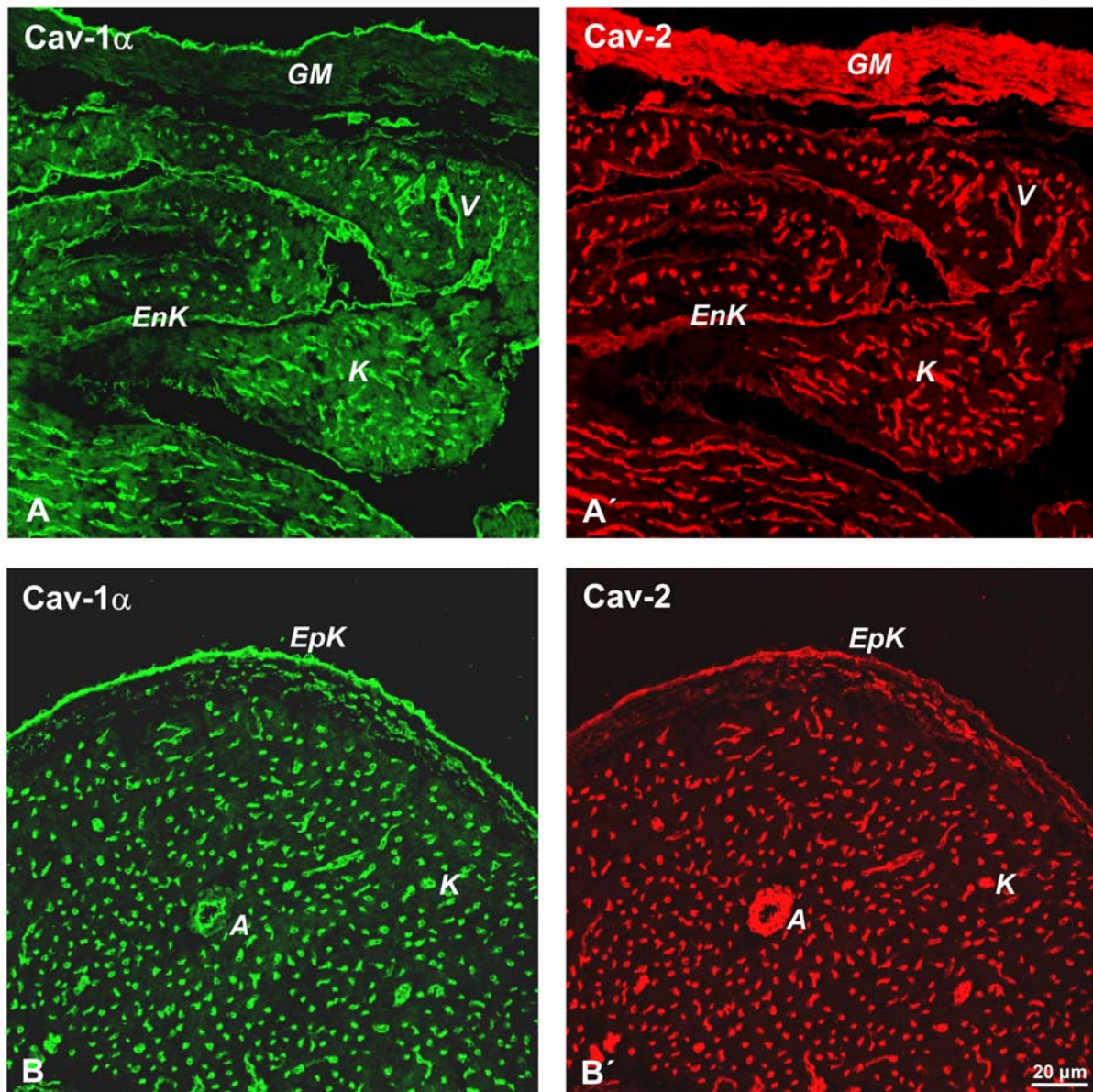


Abbildung IV-10. Cav-1 α - und Cav-2-Immunreaktivität im Herzen, Doppelimmunfluoreszenz. A und B. Cav-1 α -Immunreaktivität im Herzen. A' und B'. Cav-2-Immunreaktivität im Herzen. Cav-1 α und Cav-2 sind kolokalisiert in den Mesothezellen des Epikards (*EpK*), den Endothelzellen des Endokards (*EnK*), der Kapillaren (*K*), der Arterien (*A*), der Venen (*V*) sowie in der glatten Gefäßmuskulatur (*GM*).

Lunge und Mediastinum

Cav-1 (α - und β -Isoform) und Cav-2 fanden sich wie im Herzen in der Lunge kolokalisiert. Die Endothelzellen der Lungengefäße waren Cav-1- und Cav-2-immunreaktiv. Die Markierungsintensität war in den Endothelzellen von Arteriolen und Venulen vergleichsweise stärker als in größeren Gefäßen. In Kapillaren der Alveolarregion konnte ebenfalls Cav-1- und Cav-2-Immunreaktivität nachgewiesen

werden. Zusätzlich fand sich eine starke Immunfluoreszenz der Alveolarepithelzellen. Diese Zellen konnten als Pneumozyten Typ I identifiziert werden (Abb. IV-11A' und B'). In der Herzmuskulatur der Pulmonalvenen markierte der Cav-1-Antikörper nur das Kapillarendothel, dagegen fand sich eine sehr geringe Cav-2-Immunreaktivität zusätzlich in den Kardiomyozyten. Die glatten Muskelzellen der Gefäße und der Bronchien zeigten eine intensive Cav-2-Markierung ohne eindeutige Cav-1-Immunreaktivität. Zusätzlich zeigten alle verwendeten Caveolin-Antikörper eine Markierung der Fibroblasten in den mediastinalen Bindegewebelementen sowie der Perineuralzellen der Nervenfaserbündel. In diesen Perineuralzellen war die Cav-1 α -Markierung ausgeprägter als die Cav-2-Markierung (Abb. IV-11A und B).

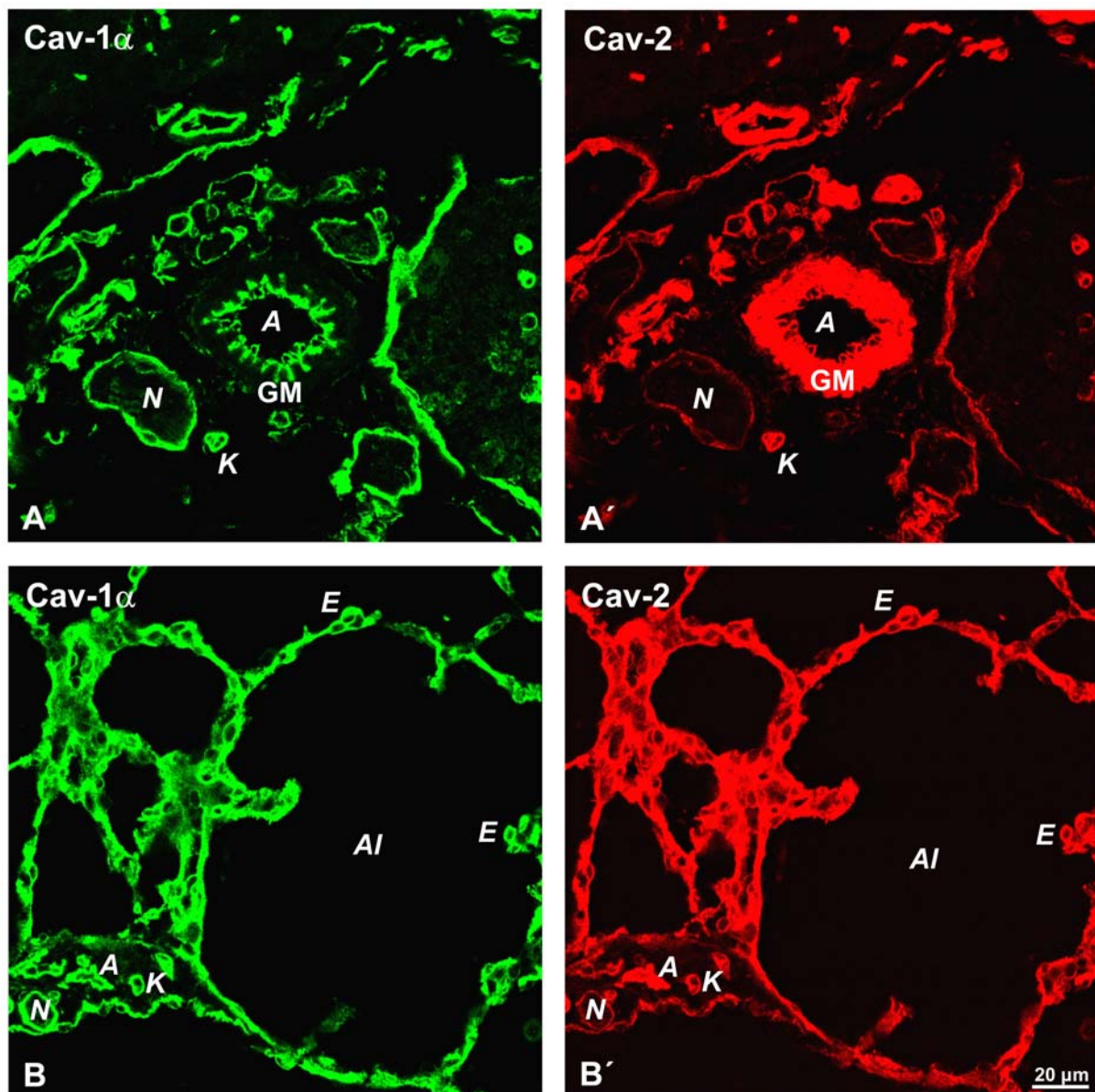


Abbildung IV-11. Cav-1 α - und Cav-2-Immunreaktivität im Mediastinum (A, A') und in der Lunge (B, B') der Ratte, Doppelimmunfluoreszenz. A, A'. Im Mediastinum finden sich Cav-1 α - und Cav-2-Immunreaktivität in den Endothelzellen der Arterien (A) und der Kapillaren (K), sowie in der glatten Gefäßmuskulatur (GM). Cav-1 α - und Cav-2-Markierung weisen auch die Perineuralzellen der Nervenfaserbündel (N) auf. B, B'. In der Alveolarregion der Lunge finden sich Cav-1 α - und Cav-2-Immunreaktivität in den Alveolarepithelzellen (E) sowie in den in den Septen gelegenen Endothelzellen der Kapillaren und den Endothelzellen der intra-azinären Arterien (A). Al=Alveolae.

Trachea und Bronchien

Ratte

In der Ratte wurden Cav-1- und Cav-2-Immunreaktivität in den Epithelzellen der großen Atemwege detektiert (Abbildung IV-12, A-C). Als große Atemwege wurden hier die mit Knorpelspannen gestützten Atemwege definiert, dies sind die großen Bronchien und die Trachea. Im Unterschied zu den großen Atemwegen wurden weder Cav-1- noch Cav-2-Immunreaktivität in den Epithelzellen der kleinen nichtknorpeligen Atemwege der Ratte beobachtet (Abbildung IV-12, D-F). Cav-1- und Cav-2-Immunreaktivität wurde in glatten Muskelzellen der Trachea und der Bronchi sowie in den Endothelzellen der Gefäße gefunden. Zusätzlich fanden sich Cav-1- und Cav-2-Immunreaktivität in nicht näher identifizierten Zellen der Lamina propria, wahrscheinlich Fibroblasten.

Unterschiede sowohl im Muster als auch in der Intensität der Markierung gleicher Zelltypen wurden mit zwei unterschiedlichen anti-Cav-1-Antikörpern detektiert: Eingesetzt wurden ein monoklonaler anti-Cav-1 α -Antikörper, der spezifisch nur die α -Untereinheit erkennt, sowie ein polyklonaler anti-Cav-1 $\alpha\beta$ -Antikörper, der beide (α , β) Cav-1-Untereinheiten bindet. Die Markierung mit dem anti-Cav-1 α -Antikörper war im Endothel stärker ausgeprägt, während die Markierung mit dem anti-Cav-1 $\alpha\beta$ -Antikörper im Epithel intensiver war (Abbildung IV-12A und B).

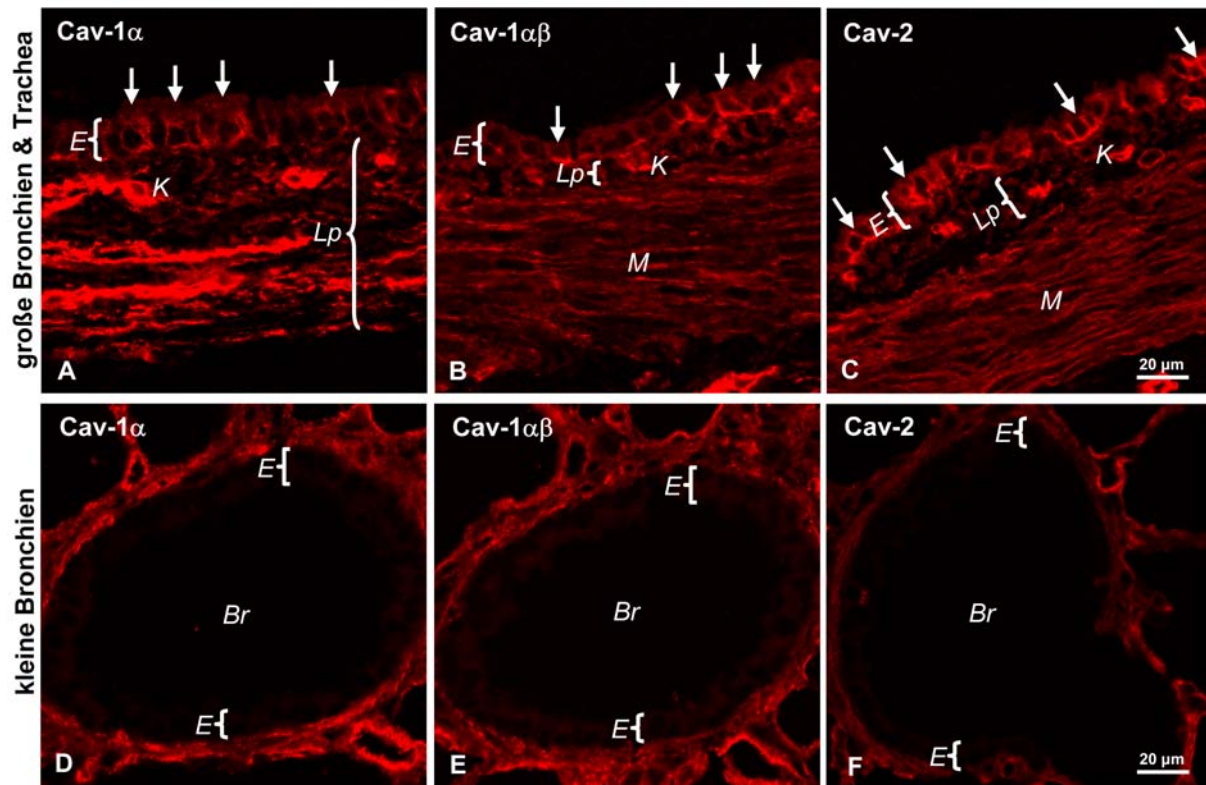


Abbildung IV-12. Cav-1- und -2-Immunreaktivität in den Atemwegen der Ratte. (A-C) Große Atemwege. (A) Epithelzellen (*E*, Pfeile) und einige Zellen in der Lamina propria (*Lp*) sind Cav-1 α -immunreaktiv. Die Markierung der Kapillarendothelzellen (*K*) in der Lamina propria ist stärker als die der Epithelzellen. (B) Der anti-Cav-1 $\alpha\beta$ -Antikörper markiert die gleichen Zelltypen wie der anti-Cav-1 α -Antikörper (Pfeile), jedoch ist hier die Markierung des Epithels stärker als die der Zellen der Lamina propria und der glatten Muskelzellen des Musculus trachealis (*M*). (C) Epithelzellen (Pfeile) sowie auch Zellen der Lamina propria und glatte Muskelzellen sind Cav-2-immunreaktiv. (D-F) Kleine Atemwege, Bronchioli (*Br*). Die Endothelzellen und die Epithelzellen Typ I der umliegenden Alveoli sind immunreaktiv für Cav-1 α , Cav-1 $\alpha\beta$ und Cav-2. Das Bronchiolarepithel (*E*) zeigt hingegen keine Immunreaktivität.

Weiterhin war die Zahl der Epithelzellen, die Cav-1 $\alpha\beta$ -Immunreaktivität aufwiesen, höher als die Zahl der Cav-1 α -immunreaktiven Epithelzellen (Abbildung IV-13A-C). Cav-2-Immunreaktivität wurde in den gleichen Zelltypen wie die Cav-1-Immunreaktivität gefunden (siehe oben). Bemerkenswerterweise zeigten nicht alle Epithelzellen, die Cav-2-positiv waren, gleichzeitig Cav-1 α -Immunfluoreszenz (Abbildung IV-13D-F). Im Epithel war die Cav-2-Markierung stärker als in den glatten Muskelzellen (Abbildung IV-12C). Wie schon bei Cav-1 wurde auch keine Cav-2-

Immunreaktivität in den Epithelzellen der kleinen Bronchien beobachtet (Abbildung IV-12F).

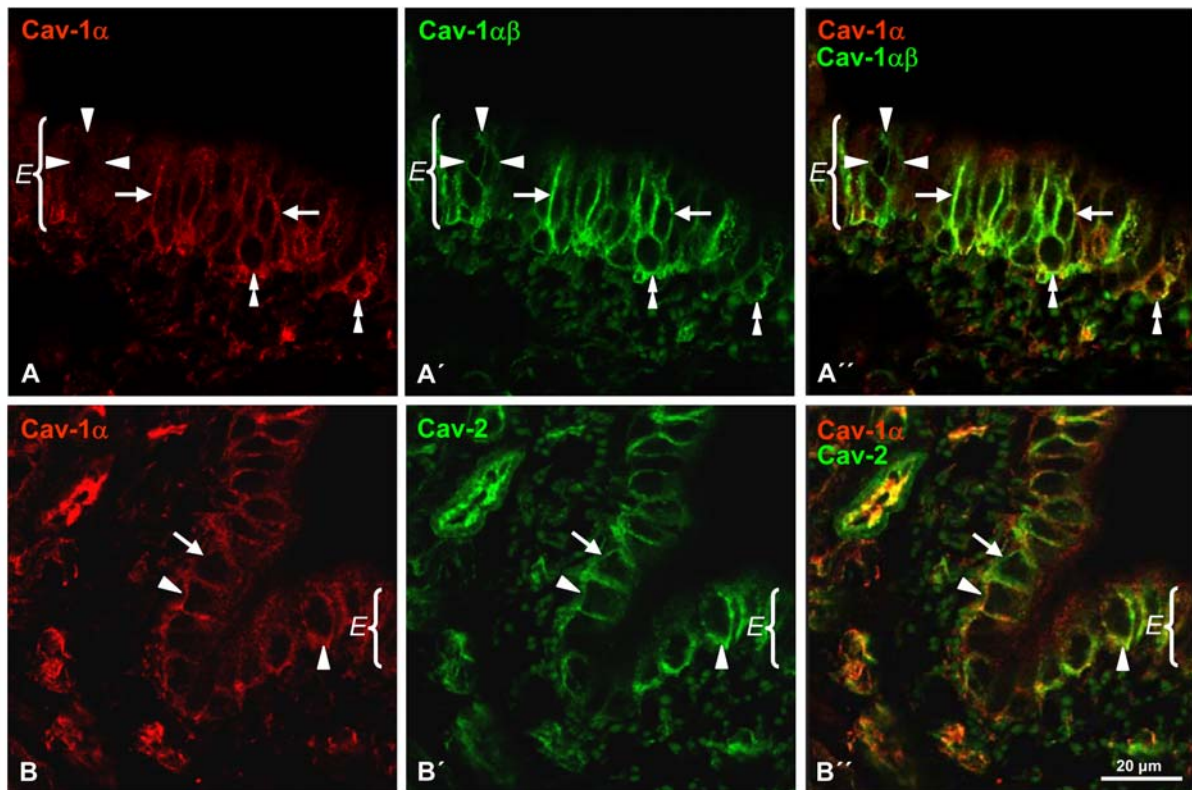


Abbildung IV-13. Doppelimmunfluoreszenz, CLSM, große Atemwege, Ratte. (A-A'') Cav-1 α - (A) und Cav-1 $\alpha\beta$ -Immunreaktivität (A') sind kolokalisiert in den Basalzellen (doppelte Pfeilköpfe) sowie basolateral in einer Subpopulation von prismatischen Epithelzellen (Pfeile). Einige Zellen zeigen eine Cav-1 $\alpha\beta$ -, aber keine Cav-1 α -Immunfluoreszenz (Pfeilköpfe). (B-B'') Cav-1 α - (B) und Cav-2-Markierung (B') finden sich kolokalisiert in der basolateralen Membran der Epithelzellen (B'', Pfeilköpfe). Einige Epithelzellen zeigen nur Cav-2-Immunreaktivität (Pfeile). Epithel=E

Zur genaueren **Differenzierung der Cav-immunreaktiven Epithelzellen** wurden immunhistochemische Doppelmarkierungen mit zelltypspezifischen Markerantikörpern durchgeführt.

Zilientragende Zellen

Entlang der ganzen Trachea und der großen Bronchien fanden sich Cav-1 α - und Cav-1 $\alpha\beta$ -Immunreaktivität in den zilientragenden Epithelzellen. Diese zilientragenden Zellen wurden einerseits an Hand ihrer eindeutigen Morphologie identifiziert,

zusätzlich wurde als Marker für zilienträgende Zellen ein monoklonaler Antikörper gegen eNOS verwendet (Xue et al. 1996, König et al., 2005). In der Doppelimmunfluoreszenz wurde Cav-1 α -Immunreaktivität in den eNOS-positiven Flimmerepithelzellen der Trachea und der großen Bronchien gefunden. Subzellulär war Cav-1 α jedoch nicht mit eNOS kolokalisiert. Der eNOS-positive Saum apikal im Bereich der Basalkörperchen war Cav-1 α -negativ. Cav-1 α -Immunreaktivität fand sich in der basolateralen Plasmamembran (Abbildung IV-14A).

Basalzellen

Die Basalzellen wiesen starke Cav-1 α - und Cav-1 $\alpha\beta$ -Immunreaktivität auf. Diese Zellen wurden auf Grund ihrer eindeutigen Morphologie und ihrer Lage unmittelbar an der Basalmembran identifiziert (Abbildung IV-14A-C).

Sekretorische Zellen und Clarazellen

Als Marker sekretorischer Zellen wurde ein monoklonaler Antikörper gegen Surfactant Protein D (SP-D) verwendet (Crouch et al. 1992, Kasper et al. 2002). Der anti-SP-D-Antikörper markiert im Epithel der Trachea und der großen Bronchien die sekretorischen Zellen. In den kleinen Atemwege markiert der anti-SP-D-Antikörper die Clarazellen und die Pneumozyten Typ II. Diese beiden Zelltypen waren Cav-1-negativ (siehe oben). In den oberen Abschnitten der Trachea zeigten sich nur wenige SP-D-positiven Zellen, ihre Häufigkeit nahm in den großen Bronchien zu. Die meisten SP-D-positiven sekretorischen Zellen in der Trachea und in den großen Bronchien waren Cav-1-negativ. Auf Grund der Auflösung und die engen Zell-Zell-Kontakte konnte bei lichtmikroskopischer Auflösung letztlich nicht geklärt werden, ob einige SP-D-positiven sekretorischen Zellen nicht doch ebenfalls Cav-1-positiv waren (Abbildung IV-14C).

Bürstenzellen

Als Marker für die Bürstenzellen wurde ein polyklonaler Antikörper gegen Villin verwendet (Drenckhahn et al. 1983, Kasper et al 1994). Wenige Zellen im Epithel

waren Villin-markiert. Im Gegensatz zu den Flimmerepithelzellen waren die Villin-immunreaktiven Zellen Cav-2-negativ (Abbildung IV-14B).

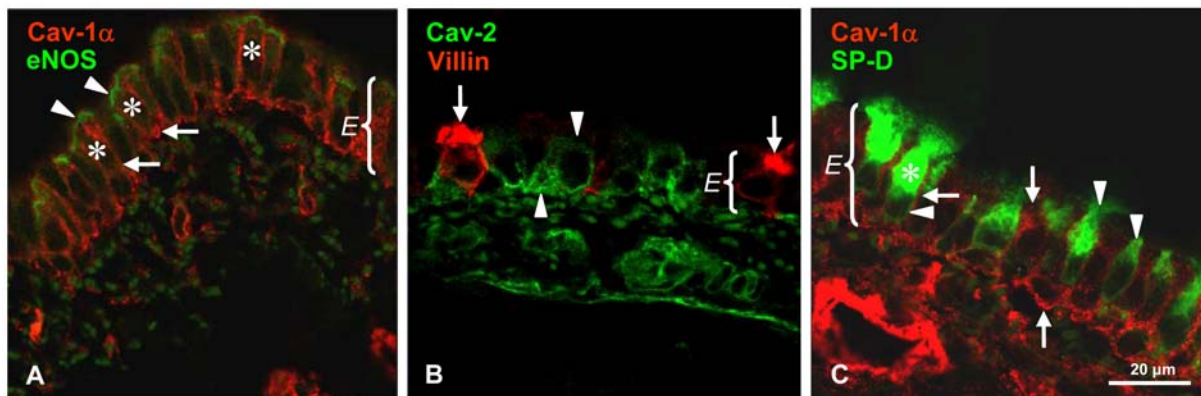


Abbildung IV-14. Cav-immunreaktive Epithelzelltypen, Ratte. (A) Cav-1 α - und eNOS-Doppelimmunfluoreszenz. Cav-1 α -Immunreaktivität (rot, Pfeile) findet sich in den Flimmerepithelzellen (Sterne), markiert mit anti-eNOS-Antikörper (grün, Pfeilköpfe). Die eNOS-Immunreaktivität ist apikal in einem schmalen Band lokalisiert. In diesem Bereich befindet sich keine Cav-1-Immunfluoreszenz. Basal der Epithelzellen befinden sich autofluoreszente elastische Fasern. (B) Die Bürstenzellen, markiert mit einem Anti-Villin-Antikörper (rot, Pfeile), sind nicht Cav-2-immunreaktiv (grün, Pfeilköpfe). Cav-2-Immunreaktivität findet sich in der darunter liegenden glatten Muskulatur und im Endothel der dort liegenden Gefäße der großen Bronchien. (C) Cav-1 α -Immunreaktivität in prismatischen Epithelzellen und Basalzellen (rot, Pfeile). Die sekretorischen Zellen sind mit einem anti-SP-D-Antikörper markiert (grün, Pfeilköpfe). Die Mehrheit der SP-D-immunreaktiven sekretorischen Zellen besitzt keine Cav-1 α -Immunreaktivität. Da Cav-1 α -Immunreaktivität in der Membran, SP-D-Immunreaktivität hingegen im Zytoplasma lokalisiert sind, ist es in wenigen sekretorischen Zellen (Sterne) nicht eindeutig möglich zu bestimmen, ob diese auch Cav-1 α enthalten. Cav-1 α -Immunfluoreszenz findet sich auch in den darunter liegenden Gefäßen der Schleimhaut der großen Bronchien. Epithel=E

Mensch

In humanen Bronchien waren die Flimmerepithelzellen und die Basalzellen immunreaktiv für Cav-1 α (Abbildung IV-15A-C). Diese Zelltypen wurden auf Grund ihrer eindeutigen Morphologie mit Hilfe des Normarski-Kontrastverfahrens identifiziert. Die punktförmige Cav-1 α -Markierung war in der basolateralen Membran der Basal- und Flimmerepithelzellen und in dem apikalen Bereich der Flimmerepithelzellen unterhalb der luminalen Plasmamembran lokalisiert. Mit dem anti-

Cav-2- und dem anti-Cav-1 $\alpha\beta$ -Antikörper konnte keine Immunmarkierung in paraffineingebettetem Gewebe detektiert werden.

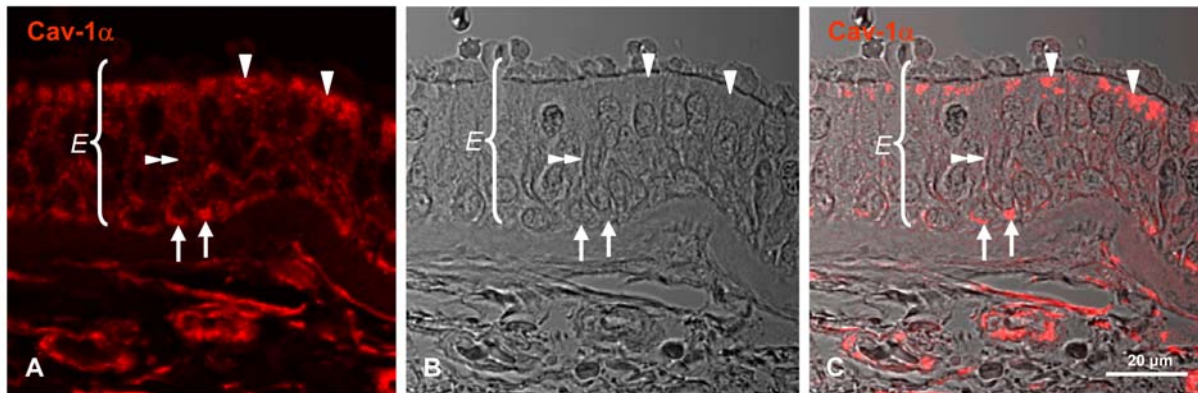


Abbildung IV-15. (A-C) Bronchus, Mensch. Zilientragende Zellen (Pfeilspitzen) und Basalzellen (Pfeile) sind Cav-1 α -immunreaktiv. Die Identifizierung der Zelltypen erfolgte im CLSM-Durchlicht-Modus (B) an Hand der eindeutigen Morphologie der Zellen. Die punktförmige Markierung für Cav-1 α ist in der basolateralen Plasmamembran (doppelte Pfeilköpfe) und in dem apikalen Bereich der Flimmerzellen unterhalb der luminalen Plasmamembran (Pfeilköpfe) aufzufinden. Cav-1 α -Immunreaktivität findet sich in der glatten Muskulatur und in dem Endothel der Gefäße der Lamina propria. Epithel=E

Maus

In dem respiratorischen Epithel der Maus fand sich die Cav-1 α -Immunreaktivität nur in den Basalzellen (Abbildung IV-16D). Die Spezifität der Cav-1-Immunfluoreszenz wurde durch das Fehlen einer Cav-1-Immunmarkierung in Gewebeschnitten von Cav-1-defizienten Mäusen bestätigt (Abbildung IV-16G).

IV.2.2 Elektronenmikroskopie

Im Einklang mit den lichtmikroskopischen immunhistochemischen Ergebnissen wurden Caveolae in der basolateralen Plasmamembran der zilientragenden Zellen sowie in der Zellmembran der Basalzellen in der Trachea der Ratte gefunden (Abbildung IV-16A-C). In den Basalzellen war die Anzahl der Caveolae höher als in der Membran der zilientragenden Zellen. Ebenfalls im Einklang mit den immunhistochemischen Befunden an der Trachea der Maus wiesen dort nur die

Basalzellen Caveolae auf (Abbildung IV-16D-F). In Tracheen der Cav-1-defizienten Mäuse wurden keine Caveolae in den Basalzellen gefunden (Abbildung IV-16G-I).

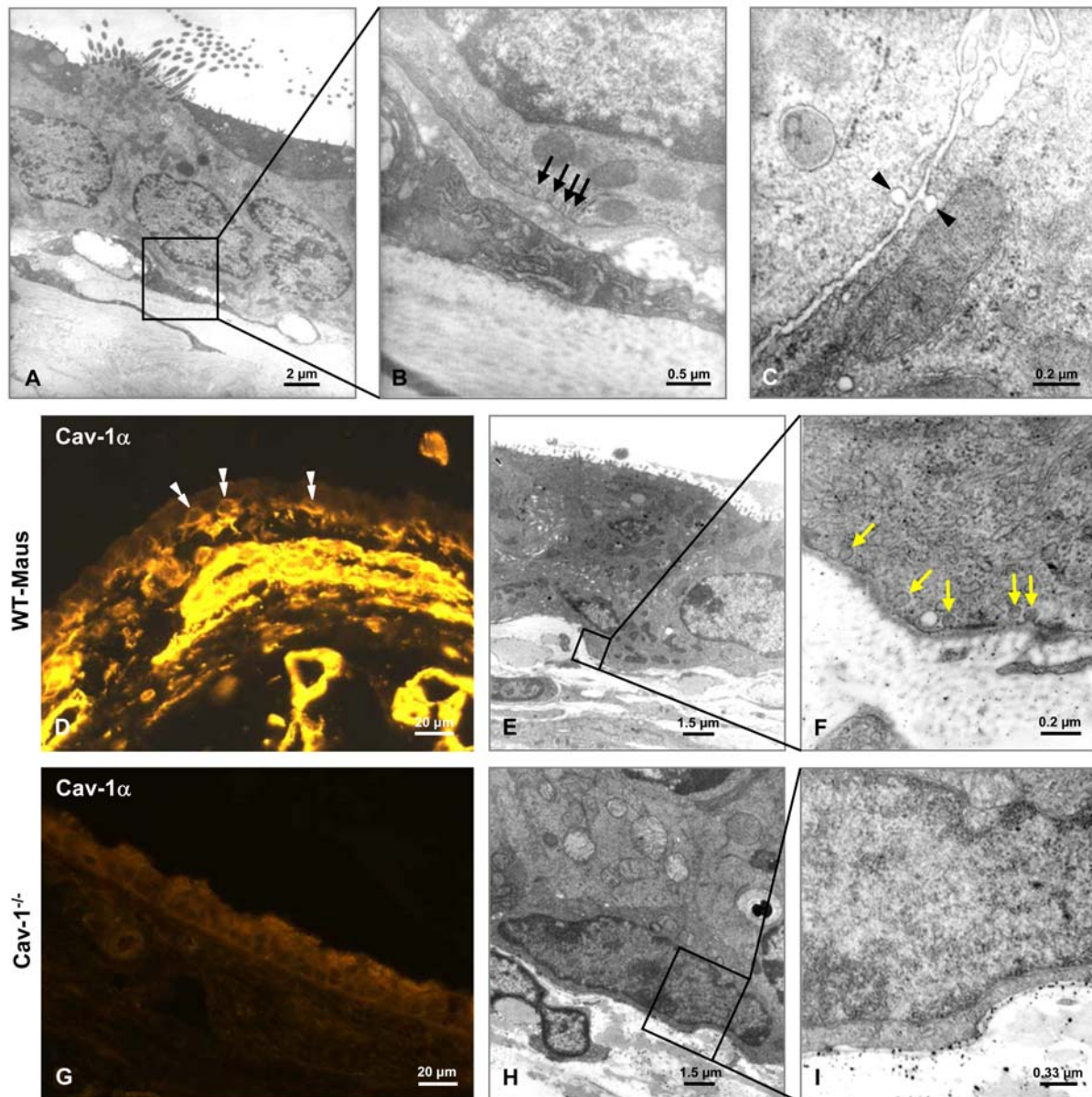


Abbildung IV-16: (A-C) Elektronenmikroskopie, Trachea, Ratte. Caveolae sind in den Basalzellen (A und B, Pfeile) sowie in der lateralen Membran der zilienträgenden Zellen (C, Pfeilköpfe) zu sehen. (D-F) Immunhistochemie und Ultrastruktur, Trachea, Wild-Typ-Maus. Caveolae sind nur in den Basalzellen präsent (E und F, Pfeile) und auch nur dieser Zelltyp ist innerhalb des Epithels immunreaktiv für Cav-1 α (D, doppelte Pfeilköpfe). Cav-1 α -Immunreaktivität findet sich in der darunter liegenden Muskulatur und dem Endothel der Gefäße der Lamina propria. (G-I) Immunhistochemie und Elektronenmikroskopie, Trachea, Cav-1-defiziente Mäuse. Es zeigen sich weder Cav-1 α -Immunreaktivität (G) noch Caveolae in den Basalzellen (H und I).

IV.2.3 RT-PCR

Sowohl in der gesamten Lunge als auch in abgeschabten Trachealepithelzellen der Ratte konnte in der RT-PCR mit Primern gegen Cav-1, Cav-2 und β -MG jeweils ein Produkt in der erwarteten Größe (für Cav-1: 123 bp und 121 bp, für Cav-2: 106 bp und 127 bp, für β -MG: 191 bp) nachgewiesen werden. Die Sequenzierung der PCR-Produkte ergab jeweils eine hundertprozentige Übereinstimmung mit der erwarteten Sequenz. In Ansätzen ohne Zugabe von Reverser Transkriptase konnte kein Produkt amplifiziert werden. In den Proben mit Zugabe von Wasser anstatt von cDNA, die zur Kontrolle auf eine Verunreinigung mit genomischer DNA durchgeführt wurden, wurden keine Produkte amplifiziert (Abbildung IV-17A).

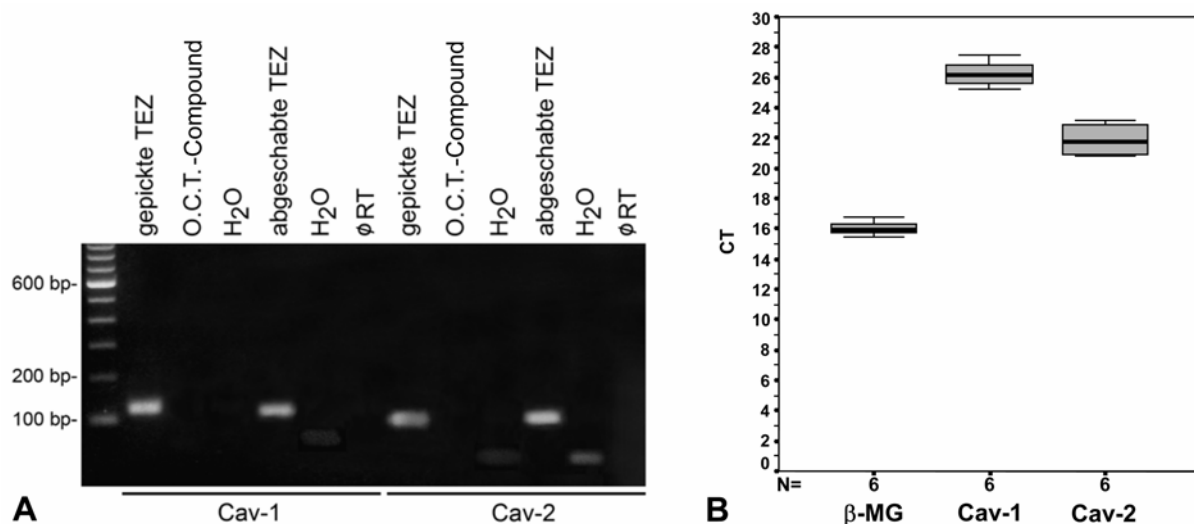


Abbildung IV-17. RT-PCR, Ratte. (A) Cav-1- und Cav-2-mRNAs sind in abgeschabten Trachealepithelzellen (TEZ) und in mikrodisszezierten („gepickten“) TEZ mit intronspannenden Primerpaaren, die die Regionen 25-147 bp und 392-497 innerhalb der kodierenden Sequenz umfassen, nachweisbar. Die Kontrollreaktionen für jedes Primerpaar schließen eine Reaktion ohne Reverse Transkription (\emptyset RT) sowie eine PCR-Reaktion mit Wasser anstelle von Template (H₂O) ein. Weiterhin wurden aus den Gefrierschnitten unmittelbar luminal der Epithelzellen Proben des Einbettungsmediums (O.C.T.-Compound) disseziiert und auch mit diesen eine Kontrollreaktion durchgeführt. Die niedermolekularen Produkte in der H₂O-Kontrolle sind Primerdimere. (B) Ergebnisse der Real-time RT-PCR. Dargestellt sind die CT-Werte für β -MG, Cav-1 und Cav-2 unter Einsatz von abgeschabten Trachealepithelzellen von unter SPF-Bedingungen gehaltenen Ratten. Die Boxplots zeigen die Quartile von 0 bis 100; n=Zahl der durchgeführten Experimente.

Die relative Expression von Cav-1 und Cav-2 wurde in Trachealepithelzellen von unter SPF-Bedingungen gehaltenen Ratten (Abbildung IV-18) sowie von unter Standardbedingungen gehaltenen Ratten quantifiziert. Die Reinheit der amplifizierten PCR-Produkte wurde anhand der Schmelzkurven bestätigt. Es lagen keine Differenzen in der Schmelztemperatur der Produkte vor (Abbildung IV-19). In beiden Tiergruppen war die Cav-2-Expression höher als die Cav-1-Expression. In konventionell gehaltenen Ratten war die Cav-2-Expression 22-mal höher als die von Cav-1, in unter SPF-Bedingungen gehaltenen Ratten war sie 25,8-mal höher (Abbildung IV-19B).

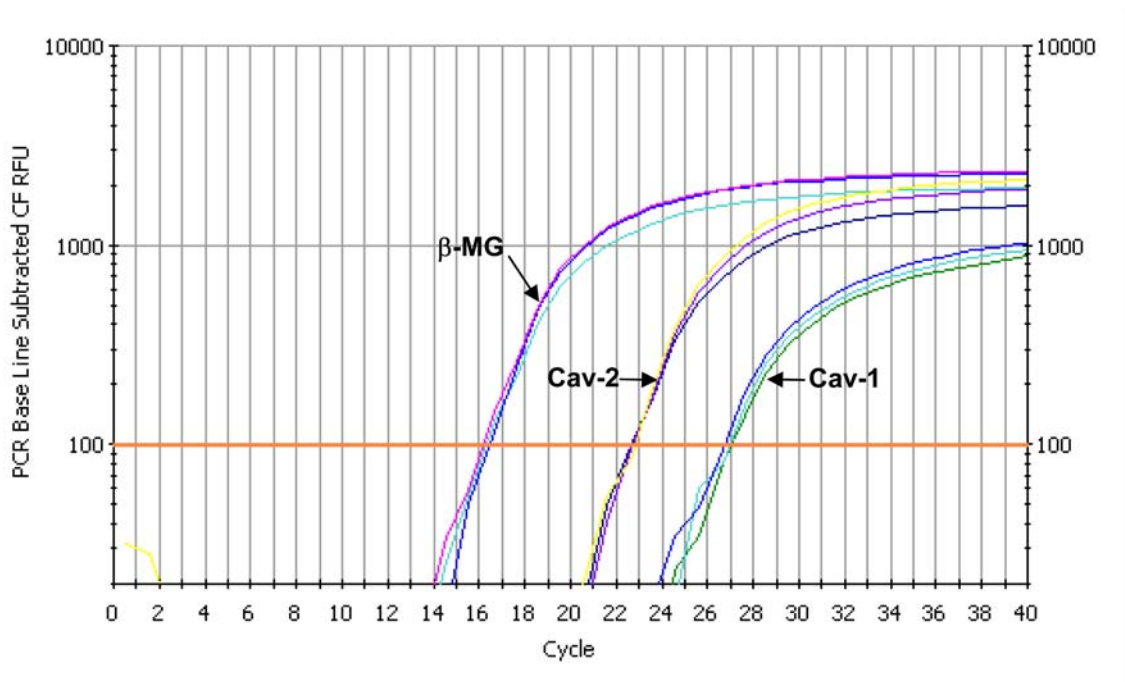


Abbildung IV-18. Echtzeitdarstellung der PCR-Amplifikation von β -MG, Cav-1 und Cav-2 in abgeschabten Trachealepithelzellen einer SPF-Ratte. In der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion ist der Schwellenwert in orange abgebildet. RFU=Relative Fluoreszenzeinheiten.

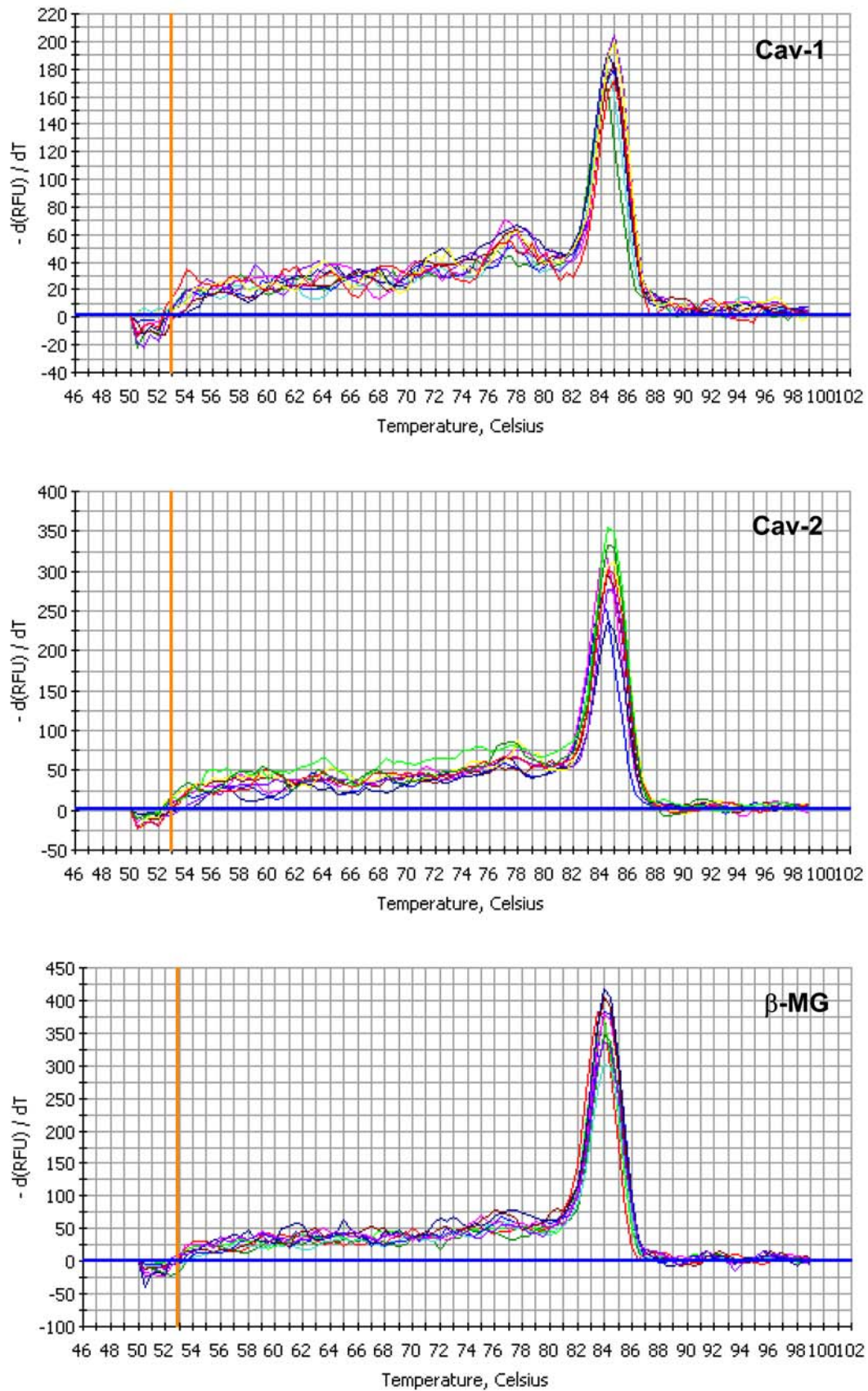


Abbildung IV-19. Schmelzkurven von Cav-1, Cav-2 und β -MG. Es liegen keine Unterschiede in der Schmelztemperatur der Amplifikate vor. Es sind mehrere Peaks für die Produkte

abgebildet, da in diesem Ansatz Amplifikate von 3 Ratten quantifiziert wurden. RFU=Relative Fluoreszenzeinheiten.

IV.2.4 Laser-assistierte Mikrodissektion

In Übereinstimmungen mit den Ergebnissen, die an abgeschabten Epithelzellen gewonnen wurden, ließ sich Cav-1-mRNA in 17 von 18 Proben mikrodisssezierter Trachealepithelzellen von 5 unter SPF-Bedingungen gehaltenen Ratten nachweisen. Cav-2-mRNA wurde in allen Proben detektiert (n=15, 4 SPF-Ratten). Die Identität der PCR-Produkte mit der Cav-1- und Cav-2-Sequenz der Ratte wurde durch Sequenzierung bestätigt. Keine mRNAs für Cav-1 und Cav-2 wurden in Kontrollproben nachgewiesen, die durch Mikrodissektion unmittelbar luminal der Epithelzellen gewonnen wurden und ausschließlich das Einbettungsmedium O.C.T.-Compound enthielten. Dieses Ergebnis zeigt, dass die nachgewiesenen Cav-1- und Cav-2-mRNA-Signale im Epithel nicht durch eine Kontamination hervorgerufen wurden, die durch die Verschleppung von mRNAs während des Schneidevorgangs aus benachbarten Zellen herrührte (Abbildung IV-17A).

IV.2.5. Western Blot

Mittels eines Antikörpers gegen Cav-1 α wurde eine Bande von ca. 22 kD in abgeschabten Trachealepithelzellen der Ratte nachgewiesen (Abbildung IV-20A). Mittels des Cav-1 $\alpha\beta$ -Antikörpers wurden eine Bande von ca. 22 kD sowie eine weitere Bande von ca. 18 kD, die in ihrer Größe mit der Cav-1 β -Isoform korrespondiert, detektiert (Abbildung IV-20B). Signale auf gleicher Molekulargewichtshöhe zeigten sich auch in Proteinextrakten vom Herzen und der Lunge. Ein Antikörper gegen Cav-2 markierte eine Bande von ca. 15 kD (γ -Isoform), deren Stärke an der Detektionsgrenze war, eine Bande von ca. 18 kD (α -Isoform) sowie eine Bande von ca. 21 kD (β -Isoform) (Abbildung IV-20C).

In Lungenhomogenaten von Wildtyp-Mäusen wurden Cav-1-immunreaktive Banden von ca. 22 kD, 37 kD und 48 kD detektiert. Diese Banden fehlten in Lungenhomogenaten von Cav-1-defizienten Mäusen (Abbildung IV-21A). In Proteinextrakten der gesamten Lunge von Cav-1-Wildtyp-Mäusen konnten mittels eines Antikörpers gegen Cav-2 im Western Blot eine 18 kD-Bande und eine 21 kD-

Bande nachgewiesen werden. Keine Cav-2-Banden fanden sich in Lungenextrakten von Cav-1-defizienten Mäusen (Abbildung IV-21B).

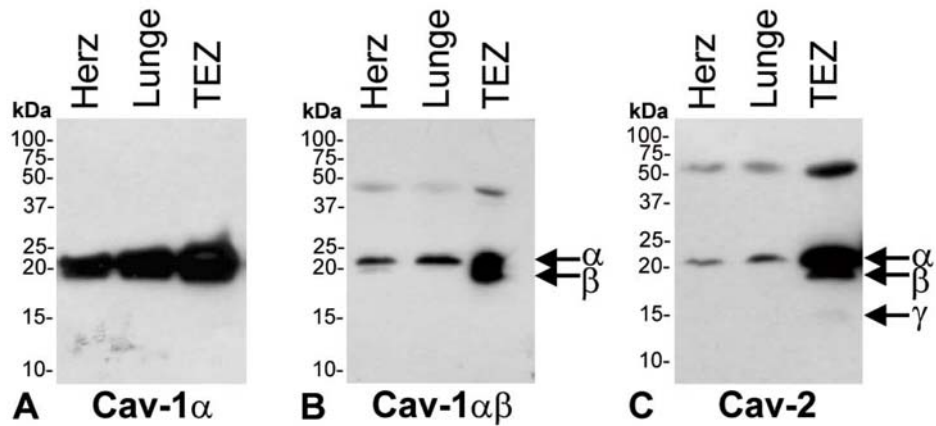


Abbildung IV-20. Western Blot, Ratte. (A) Eine Bande von ca. 22 kD lässt sich in abgeschabten Trachealepithelzellen (TEZ) mittels eines affinitätsgereinigten anti-Cav-1 α -Antikörpers nachweisen. (B) 22 kD (α) und 18 kD (β) Cav-1-Isoformen sind in abgeschabten Trachealepithelzellen (TEZ) mittels eines monoklonalen anti-Cav-1 $\alpha\beta$ -Antikörpers detektierbar. (C) 21 kD (α) und 18 kD (β) Banden sowie eine nahe des Detektionslimits liegende Bande von 15 kD (γ), die den drei Cav-2-Isoformen entsprechen, sind mittels eines monoklonalen anti-Cav-2-Antikörpers in abgeschabten Trachealepithelzellen (TEZ) nachzuweisen. (A-C) Herz- und Lungenhomogenate sind jeweils als Positivkontrolle mitgeführt. Die Banden in Höhe von 50 kD entsprechen der schweren Kette des Maus-IgG, die von den Sekundärantikörpern erkannt wurde.

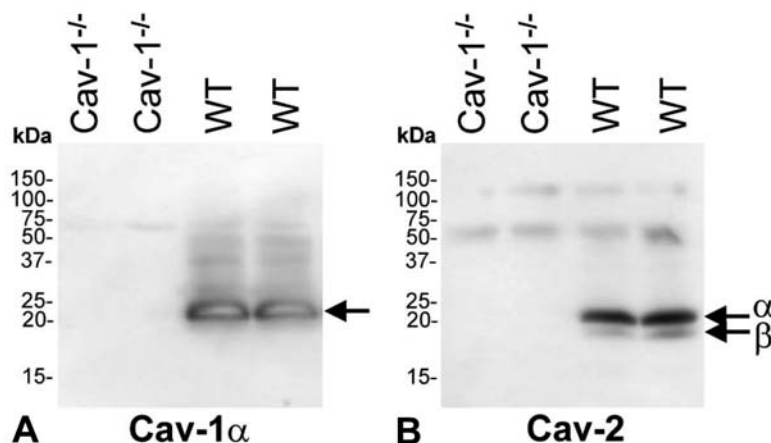


Abbildung IV-21. Western Blot, Maus. (A und B) Eine Cav-1-Bande von 22 kD und Cav-2-Banden von 18 kD und 21 kD sind in Extrakten aus dem Gesamthomogenat der Lunge nachweisbar. Die Banden von 50 kD in jeder Spur entsprechen der schweren Kette des Maus-IgG, welche durch die Sekundärantikörper erkannt wurde. (A) Im Unterschied zu den

Wild-Typ-Mäusen (WT) findet sich kein Cav-1 α in Lungenhomogenaten von Cav-1-defizienten Mäusen (Cav1^{-/-}). (B) Ebenfalls findet sich im Gegensatz zu dem Wild-Typ-Mäusen kein Cav-2-Protein in Lungenhomogenaten von Cav-1-defizienten Mäusen.

IV.2.6 Detektion einer engen räumlichen Assoziation von Cav-1 und Cav-2 in Trachealepithelzellen in Gewebeschnitten durch immunhistochemische Doppelmarkierung und FRET-CLSM-Analyse

Die zuvor an Endothelzellen etablierte Methodik der konventionellen indirekten Doppelimmunfluoreszenz mit anschließender FRET-CLSM-Analyse wurde angewandt, um zu überprüfen, ob Cav-1 und Cav-2 auch in Trachealepithelzellen assoziiert zueinander vorliegen. Es wurde ein Anstieg in der Donorfluoreszenz (ΔIF) im geblichenen Bereich mit einem Mittelwert von 2,72 (n=16 ROIs in den geblichenen Bereichen in Tracheen von 4 Ratten; Abbildung IV-22) detektiert. Ein falsch positives FRET-Signal, welches durch eine Kreuzreaktivität der sekundären Antikörper hätte entstehen können, wurde durch entsprechende Kontrollversuche, die die Applikation beider Sekundärantikörper nach alleiniger Erstinkubation mit dem Cav-1 α -Antikörper einschlossen, ausgeschlossen (Mittelwert $\Delta IF=0,287$). Da Caveoline Membranproteine sind, wurden separate Messungen von ΔIF in der Region der basolateralen Plasmamembran durchgeführt. In diesem Zellabschnitt war ΔIF höher (Mittelwert $\Delta IF=4,795$) als in dem gesamten geblichenen Bereich. In Kontrollmessungen in einer entsprechenden Zellregion war ΔIF sehr niedrig ($\Delta IF=0,55$). Die erzielten Differenzen waren statistisch hoch signifikant ($p<0,001$, Mann-Whitney-Test; Abbildung IV-22). In Atemwegsepithelzellen, die nur Cav-2-, nicht aber Cav-1 α -immunreaktiv waren, ließ sich kein Anstieg in der Donorfluoreszenz (ΔIF) nachweisen.

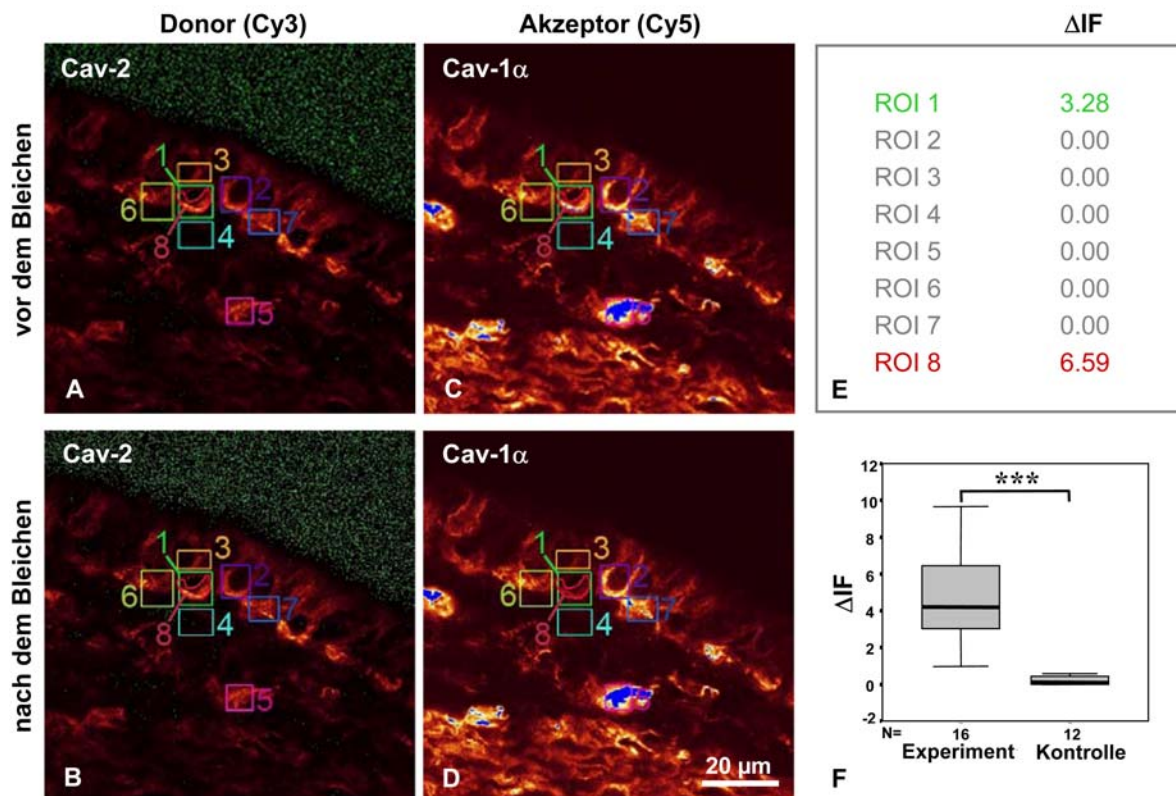


Abbildung IV-22. Detektieren von enger räumlicher Assoziation von Cav-1 und Cav-2 in Epithelzellen mittels indirekter Immunfluoreszenz kombiniert mit FRET-CLSM in Gewebeschnitten der großen Bronchien der Ratte. Aufnahmen der Donorfluoreszenz (Cav-2, markiert mit einem Cy-3-konjugierten Anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper, A-B) und Akzeptorfluoreszenz (Cav-1 α , markiert mit einem Cy-3-konjugierten Anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper, C-D). Cy-5 wurde in der ROI 1 geblichen (vergleiche ROI 1, C und D). E: Veränderungen in Δ IF für jede ROI. ROI 1: geblichener Bereich (vergleiche C und D). ROI 8: per Hand umkreiste Region, die die basolaterale Plasmamembran der Epithelzellen in dem geblichenen Bereich umfasst. ROI 3-8: Kontrollbereiche außerhalb der geblichenen Region. F: Datenanalyse. Dargestellt sind die Δ IF Werte für den Bereich der basolateralen Plasmamembran aus 16 FRET-Experimenten und 12 korrespondierenden Kontrollen, die Gewebeproben stammten von 4 verschiedenen Tieren. Boxplots: Minimum, Maximum und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile. *** $p < 0,001$, Mann-Whitney-Test.

IV.3 Cav-3

IV.3.1 Lichtmikroskopische Immunhistochemie

Cav-3-Immunreaktivität fand sich in den Kardiomyozyten im Herzen der Ratte. Eine Markierung wurde hauptsächlich an der Plasmamembran und im geringen Ausmaß im Zytoplasma detektiert (Abbildung IV-23A). Die Endothelzellen der Kapillaren, der Koronararterien und der Venen besaßen keine Cav-3-Immunreaktivität. Die Zellen des Endo- und Epikards waren ebenfalls Cav-3-negativ. Weiter zeigte sich eine sehr starke Cav-3-Immunreaktivität am Sarkolemm der Skelettmuskulatur des Oesophagus (Abbildung IV-23B). Die glatten Muskelzellen der Gefäße wiesen ebenfalls Cav-3-Immunmarkierung auf. Diese war am stärksten in der Aorta ausgeprägt (Abbildung IV-23C). Geringe Cav-3-Immunreaktivität fand sich in der Lunge (Abbildung IV-23D).

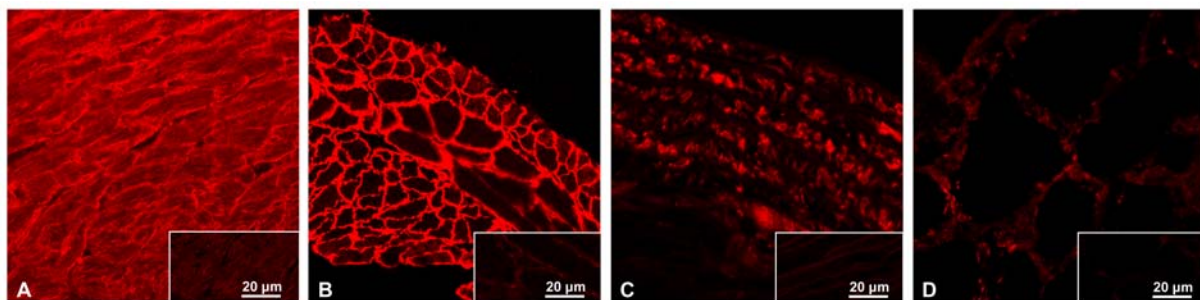


Abbildung IV-23. Immunmarkierung für Cav-3, Ratte. Cav-3-Immunreaktivität findet sich in den Herzmuskelzellen (A), in den Skelettmuskelzellen des Oesophagus (B), in der Aorta (C) und in der Lunge (D) der Ratte. Die Cav-3-Immunmarkierung ist nach Präabsorption des Antikörpers mit dem korrespondierenden Peptid nicht vorhanden (Insets).

Trachea und Bronchien

Die Verteilung von Cav-3 in den Atemwegen der Ratte wurde mit einem monoklonalen Antikörper aus der Maus gegen die Aminosäurereste 3-24 des Kaninchen-Cav-3 untersucht. Cav-3-Immunreaktivität wurde in den Epithelzellen der großen Atemwege detektiert (Abbildung IV-24). Als große Atemwege wurden hier die mit einer Knorpelspange versehenen Atemwege definiert, hierbei handelt es sich bei der Ratte um die großen Bronchien und die Trachea. Zusätzlich wurde eine Cav-3-

Markierung in den Epithelzellen der kleinen nicht-knorpeligen Atemwege der Ratte beobachtet (Abbildung IV-24, B). Unabhängig von der Fixierung ließ sich eine Cav-3-Markierung im apikalen Abschnitt der Epithelzellen detektieren (Abbildung IV-24, A und D). Cav-3-Immunreaktivität wurde auch in glatten Muskelzellen der Trachea und der Bronchi sowie in den Chondrozyten der Knorpelspangen gefunden.

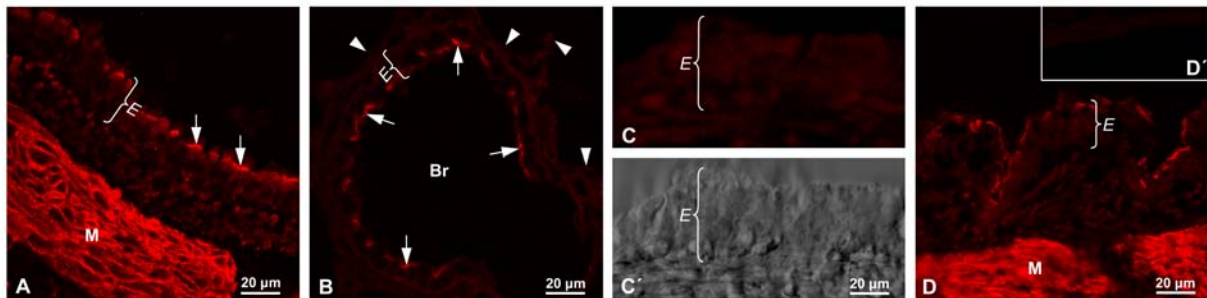


Abbildung IV-24. Immunmarkierung für Cav-3, Ratte. (A-C) Aceton-fixierte Gefrierschnitte. (A) Trachea. Die Epithelzellen (Pfeile) und die glatten Muskelzellen des Musculus trachealis (*M*) sind Cav-3-immunreaktiv. (B) Kleine Atemwege, Bronchiolus (*Br*). Cav-3-Immunreaktivität findet sich im Bronchiolarepithel (Pfeil), nicht hingegen in den umliegenden Alveoli (Pfeilkopf). (C) Trachea. Nach Präabsorption mit dem korrespondierenden Peptid zeigt der Cav-3-Antikörper keine Markierung des Epithels. (C') Derselbe Ausschnitt im Normarski-Kontrastverfahren zur besseren Darstellung des Epithels. (D) PFA-Fixierung, Hitzebehandelter Schnitt, Trachea. Cav-3-Immunreaktivität zeigt sich in den Epithelzellen (*E*) und in den glatten Muskelzellen des Musculus trachealis (*M*). (D') Diese Markierung läßt sich mit dem korrespondierenden Peptid präabsorbieren. Epithel=*E*.

Zur genaueren **Identifikation der Cav-3-immunreaktiven Epithelzellen** wurden immunhistochemische Doppelmarkierungen mit Zelltypmarkern durchgeführt.

Zilientragende Zellen

Entlang der gesamten Trachea und der großen sowie kleinen Bronchien fand sich Cav-3-Immunreaktivität in den zilientragenden Epithelzellen. Diese Zellen wurden einerseits an Hand ihrer eindeutigen Morphologie identifiziert, zusätzlich wurden als Marker für diesen Zelltyp ein monoklonaler Antikörper gegen eNOS (Xue et al. 1996, König et al., 2005) und ein polyklonales Antiserum gegen CHT1 (Lips et al., 2003b) verwendet. Cav-3-Immunfluoreszenz wurde in den eNOS- und CHT1-immunreaktiven Flimmerepithelzellen der Trachea und der Bronchien gefunden

(Abbildung IV-26, A und B). Der eNOS-Antikörper markiert einen apikalen Saum im Bereich der Basalkörperchen (Vergleiche Xue et al., 1996). Subzellulär war Cav-3 sowohl mit eNOS als auch mit CHT1 kolokalisiert (Abbildung IV-26A und B).

Die Mikrotubuli der Flimmerhärchen wurden mit einem monoklonalen Antikörper aus der Maus gegen β -Tubulin markiert. Die Immunmarkierung der beiden Proteine war subzellulär nicht kolokalisiert. Die Cav-3-Immunreaktivität war in den zilientragenden Zellen basal der durch den β -Tubulin-Antikörper markierten Zilien lokalisiert. Zwischen beiden Markierungen war ein schmaler mit beiden Antikörpern nicht-markierter Bereich der Zelle gelegen (Abbildung IV-25).

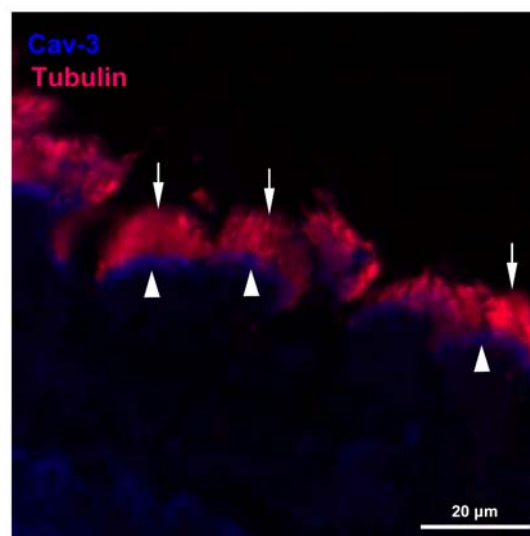


Abbildung IV-25. Cav-3- und β -Tubulin-Doppelimmunfluoreszenz. Der Cav-3-Antikörper ist direkt mit dem Fluorophor Alexa 647 markiert. Cav-3-Immunreaktivität (blau, Pfeilköpfe) findet sich im apikalen Abschnitt der Zellen basal der Flimmerhärchen, die mit einem anti- β -Tubulin-Antikörper markiert sind (rot, Pfeile). Zwischen den Zilien und der Cav-3-immunreaktiven Region verbleibt ein nicht-markierter Bereich.

Sekretorische Zellen und Clarazellen

Als Marker sekretorischer Zellen wurde ein monoklonaler Antikörper gegen Surfactant Protein D (SP-D) verwendet (Crouch et al. 1992, Kasper et al. 2002). Dieser Antikörper markiert die sekretorischen Zellen im Epithel der Trachea und der großen Bronchien. In den kleinen Atemwegen markiert er die Clarazellen und in Alveolen die Pneumozyten Typ II. Die SP-D-positiven Zellen waren entlang des gesamten Atemwegbaums bis hin in die Alveolen Cav-3-negativ (Abbildung IV-26C).

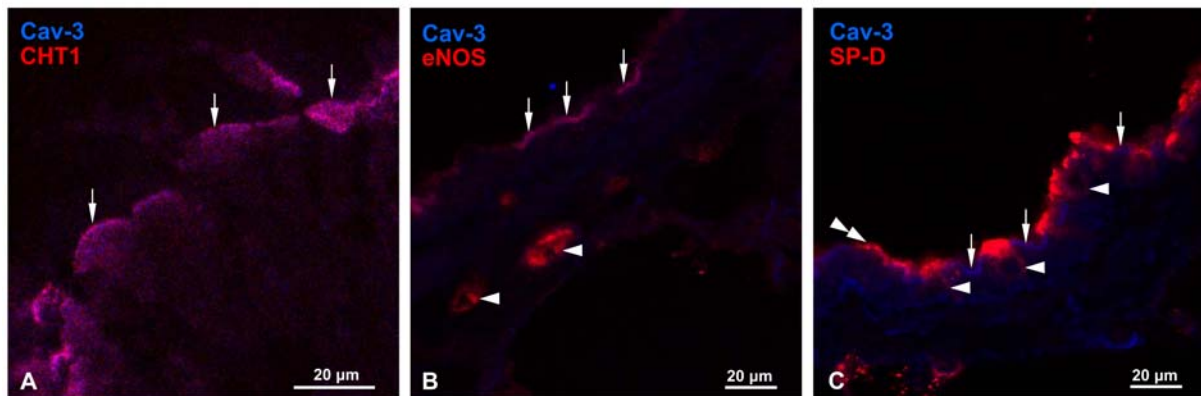


Abbildung IV-26. Cav-3-immunreaktive Epithelzelltypen der Atemwege, Ratte. (A) Cav-3- und CHT1-Doppelimmunfluoreszenz. Die zilientragenden Zellen, rot markiert mit einem anti-CHT1-Antikörper, sind Cav-3-immunreaktiv (blau). Beide Antikörper zeigen eine überlappende punktförmige Immunmarkierung im apikalen Bereich der Zellen (Pfeile). (B, C) Cav-3- und eNOS-Doppelimmunfluoreszenz. (B) Der Cav-3-Antikörper ist mit dem Fluorophor Alexa 647 direkt markiert. Cav-3- (blau) und eNOS-Immunreaktivität (rot) finden sich kolokalisiert in einem schmalen Band in der apikalen Region der zilientragenden Zellen (Pfeile). Endothelzellen in der Lamina propria zeigen weiterhin eNOS-Immunfluoreszenz (rot, Pfeilköpfe). (C) Sekretorische Zellen sind mit einem anti-SP-D-Antikörper markiert (rot, Pfeilköpfe), sie besitzen keine Cav-3-Immunreaktivität (blau, Pfeile). Die elastischen Fässern basal der Epithelzellen zeigen blaue Autofluoreszenz. Epithel=*E*

IV.3.2 RT-PCR

Aus von abgeschabten Trachealepithelzellen und dem Musculus trachealis der Ratte isolierter Gesamt-RNA konnte mit Primern gegen Cav-3, MhC, α -SMA und β -MG jeweils ein Produkt mit erwarteter Größe (für Cav-3 137 bp und 120 bp, für MhC 153 bp, für α -SMA 177 bp und für β -MG 191 bp) amplifiziert werden. Die Sequenzierung jedes PCR-Produktes ergab eine hundertprozentige Übereinstimmung mit der erwarteten Sequenz. In Ansätzen ohne Zugabe von Reverser Transkriptase konnte kein Produkt amplifiziert werden. In den Proben mit Zugabe von Wasser anstatt cDNA, die zur Kontrolle für eine Verunreinigung mit genomischer DNA durchgeführt wurden, wurden keine Produkte amplifiziert (Abbildung IV-27A).

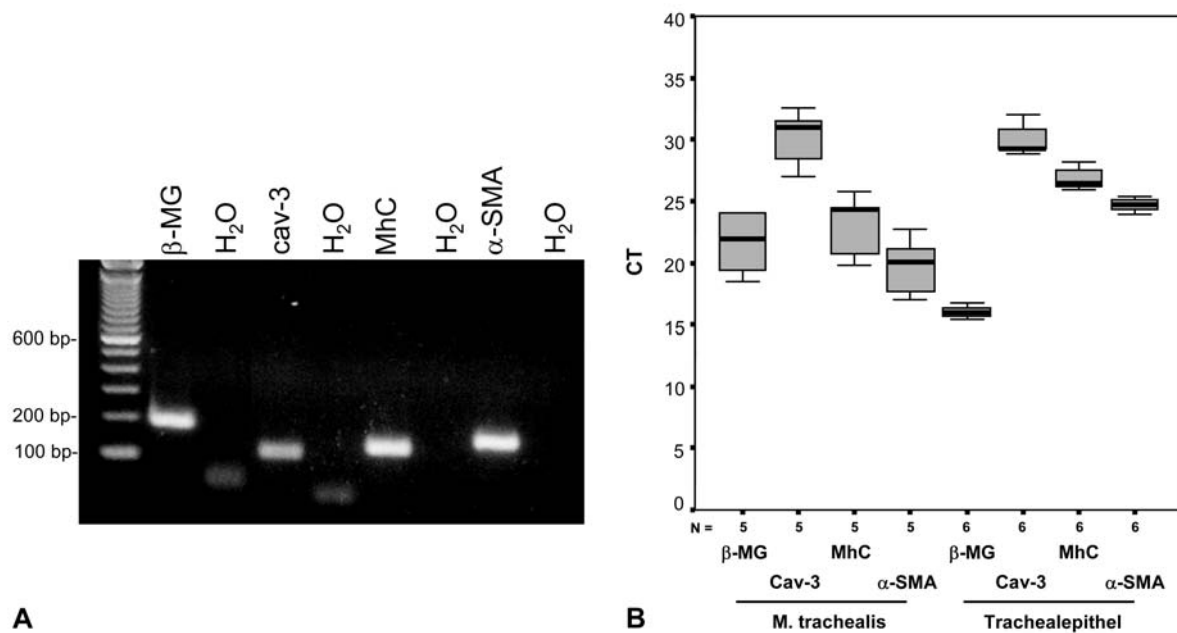


Abbildung IV-27. RT-PCR, Ratte. (A) Cav-3-, MhC-, α -SMA- und β -MG-mRNAs sind in abgeschabten Trachealepithelzellen mit intronspannenden, innerhalb der kodierenden Sequenz bindenden Primerpaaren, nachweisbar. In den jeweiligen Kontrollen ohne cDNA-Template (H_2O) wurden keine spezifischen Produkte amplifiziert. Die niedermolekularen Produkte in der H_2O -Kontrolle stellen Primerdimere dar. (B) Real-time RT-PCR. Dargestellt sind die reinen CT-Werte für β -MG, Cav-3, MhC und α -SMA. Der Musculus trachealis und die abgeschabten Trachealepithelzellen wurden von Tieren gewonnen, die unter SPF-Bedingungen gehalten wurden. Die Boxplots zeigen die Quartile von 0 bis 100. n=Zahl der durchgeführten Experimente.

Die relative Expressionen von Cav-3, MhC und α -SMA in Trachealepithelzellen und im Musculus trachealis wurden mittels real-time RT-PCR quantifiziert. Die hierfür herangezogenen Gewebe stammten von SPF-Ratten (Tabelle IV-1). In beiden Geweben war die Cav-3-Expression niedriger (höhere CT-Werte) als die von MhC und α -SMA. In Muskelzellen war die MhC- und die α -SMA-Expression erwartungsgemäß höher als im Trachealepithel (Abbildung IV-27, B). Die Expression von α -SMA war im Musculus trachealis höher als die von β -MG (Housekeeping Gen), im deutlichen Gegensatz zu den Verhältnissen im Trachealepithel (Abbildung IV-27, B; Abbildung IV-28).

In Trachealepithelzellen war die β -MG-Expression 1710-fach höher als die von MhC, 410-fach höher als die von α -SMA und 14868-fach höher als die von Cav-3. Im Musculus trachealis hingegen war die relative β -MG-Expression in Muskelzellen 2,7-

fach höher als die von MhC, betrug nur das 0,268-fache von der von α -SMA und lag 362-fach höher als die von Cav-3 (Tabelle IV-1, A und B).

Ein Vergleich der relativen Expression von Cav-3 zu MhC und α -SMA in der Muskulatur und im Epithel wurde als Hinweis darauf hinzugezogen, ob der Nachweis dieser mRNAs in Trachealepithelzellen auf einer Kontamination mit Muskelzellen beruhen könnte. In Epithelzellen betrug die Cav-3-Expression das 0,115-fache von MhC und das 0,027-fache von α -SMA (Tabelle IV-1, C). In Muskelzellen hingegen betrug die Cav-3-Expression das 0,0075-fache von MhC und das 0,00076-fache von α -SMA (Tabelle IV-1, D).

Zwischen SPF-Ratten und konventionell gehaltenen Tieren wurden keine signifikanten Unterschiede in der Expression von β -MG, Cav-3, MhC und α -SMA im Trachealepithel detektiert.

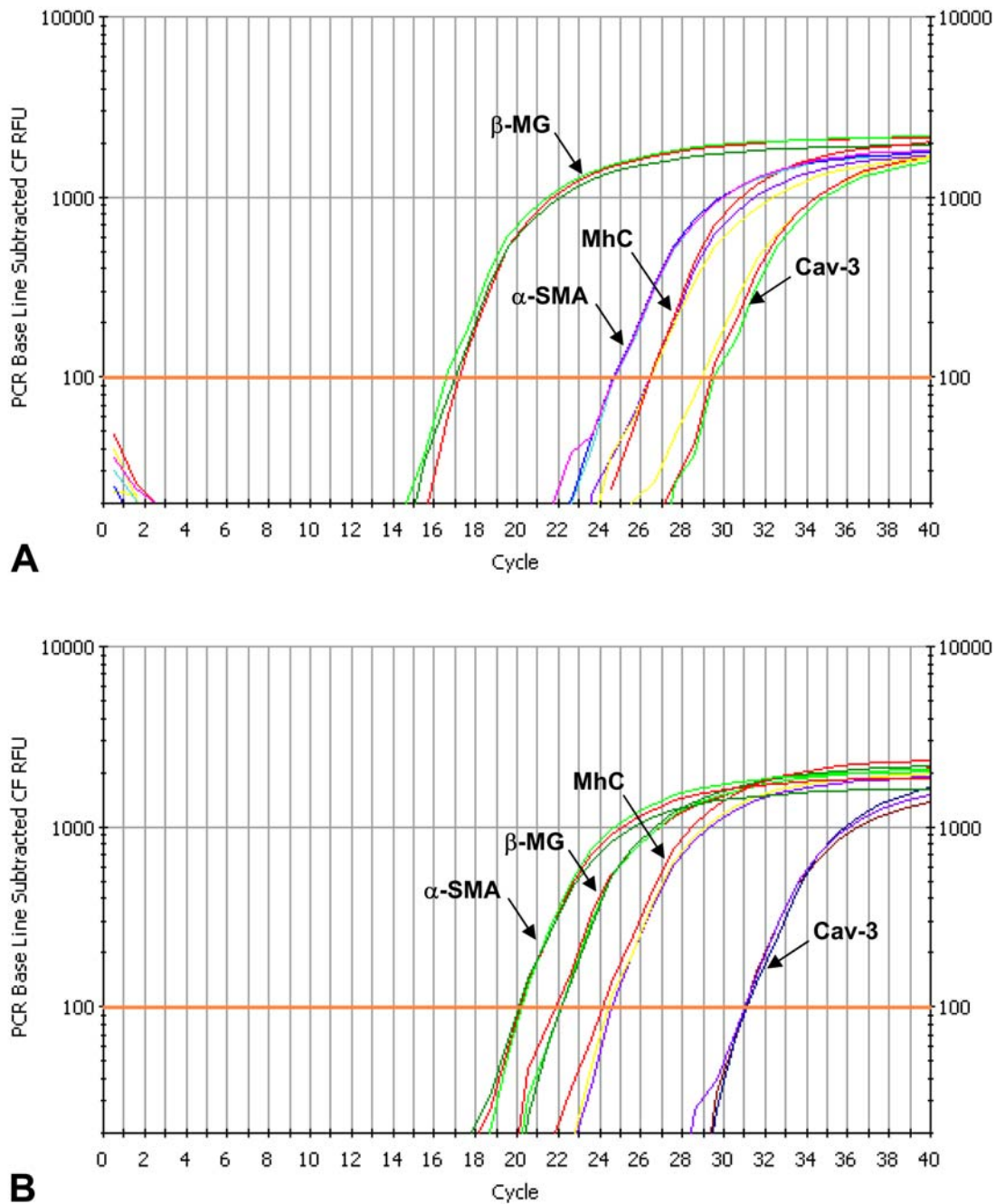


Abbildung IV-28. Echtzeitdarstellung der PCR-Amplifikation von β -MG, MhC, α -SMA und Cav-3 in abgeschabten Trachealepithelzellen (A) und im Musculus trachealis einer SPF-Ratte. (A und B) In der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion ist der Schwellenwert in orange abgebildet. RFU=Relative Fluoreszenzeinheiten

Die Reinheit der amplifizierten PCR-Produkte wurde anhand der Schmelzkurven bestätigt (Abbildung IV-29).

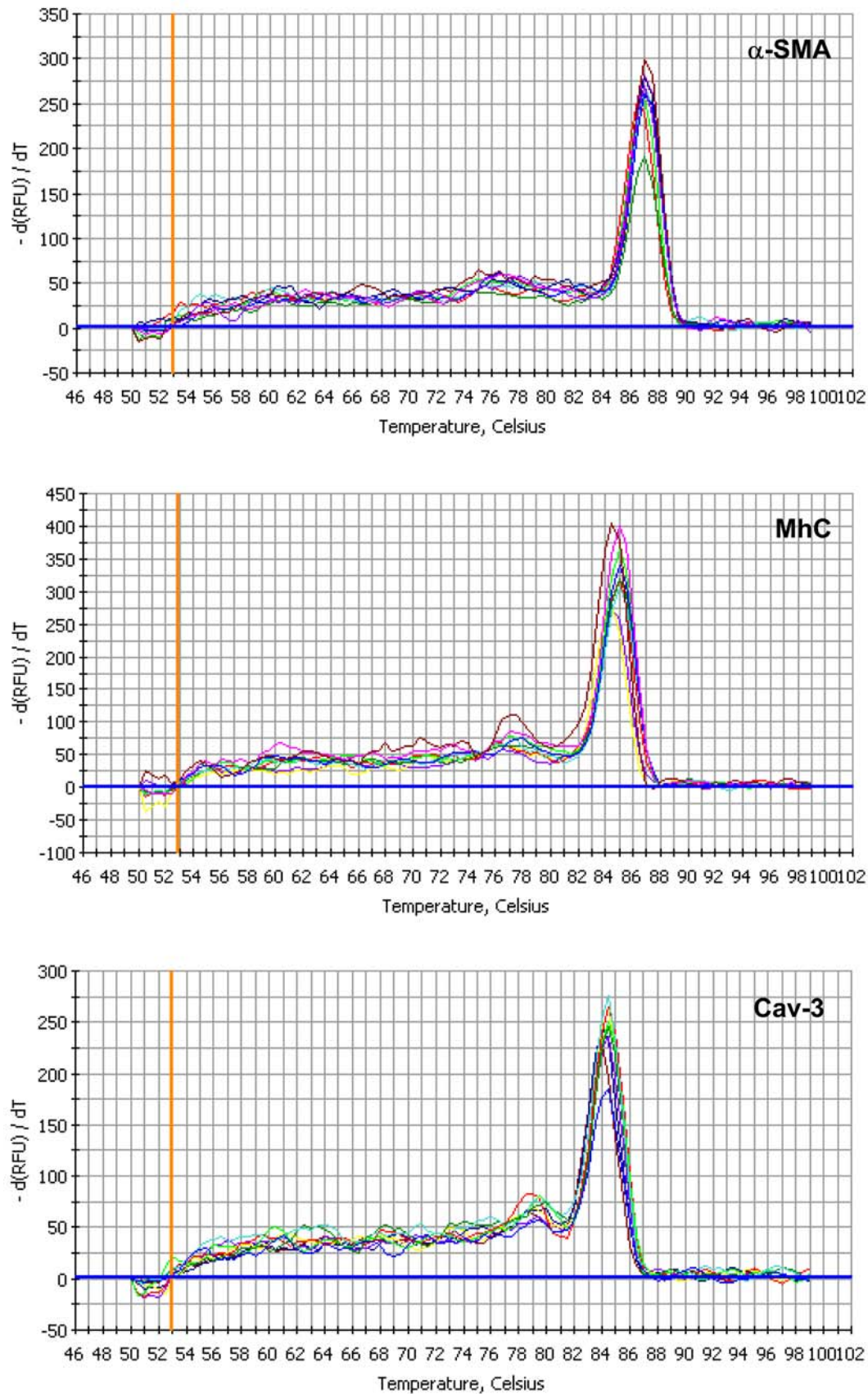


Abbildung IV-29. Schmelzkurven von α -SMA-, MhC- und Cav-3-Amplifikaten von Trachealepithelzellen. Es liegen keine Unterschiede in der Schmelztemperatur der Amplifikate vor. Die kleinen Peaks in den Schmelzkurven von MhC (Zyklus 77) und Cav-3

(Zyklus 80) entstehen durch das Schmelzen von Primerdimeren. Es sind mehrere Peaks für die Produkte abgebildet, da in diesem Ansatz Amplifikate von 3 Ratten quantifiziert wurden. RFU=Relative Fluoreszenzeinheiten.

	C _{T TE1}	C _{T TE2}	C _{T TE3}	C _{T TE4}	C _{T TE5}	C _{T TE6}	MW ΔC _T (C _{T GOI} -C _{T HKG})	rel. Expr.
β-MG	15,73	15,76	15,47	16,8	16,13	16,33		
Cav-3	29,2	28,87	29,23	30,77	29,33	32	13,47 13,11 13,76 13,97 13,2 15,67 MW 13,86	14868,8
MhC	25,97	26,13	26,67	26,3	28,13	27,47	10,24 10,37 11,2 9,5 12,0 11,14 MW 10,74	1710,3
α-SMA	24,9	25,37	25,17	24,27	24,63	23,97	9,17 9,61 9,7 7,47 8,5 7,64 MW 8,68	410,1

A

	C _{T TM1}	C _{T TM2}	C _{T TM3}	C _{T TM4}	C _{T TM5}	MW ΔC _T (C _{T GOI} -C _{T HKG})	rel. Expr.
β-MG	18,43	24,03	21,87	24,07	19,43		
Cav-3	27,01	31,43	30,93	32,5	28,47	8,58 7,4 9,06 8,43 9,04 MW 8,5	362,0
MhC	19,8	24,47	24,27	25,83	20,7	1,37 0,44 2,4 1,76 1,27 MW 1,45	2,7
α-SMA	17	22,67	20,03	21,13	17,67	-1,43 -1,36 -1,84 -2,94 -1,76 MW -1,9	0,268

B

	C _{T TE1}	C _{T TE2}	C _{T TE3}	C _{T TE4}	C _{T TE5}	C _{T TE6}	MW ΔC _T C _{T GOI} -C _{T Cav-3}	rel. Expr.
Cav-3	29,2	28,87	29,23	30,77	29,33	32		
MhC	25,97	26,13	26,67	26,3	28,13	27,47	-3,23 -2,74 -2,56 -4,47 -1,2 -4,53 MW -3,12	0,115
α-SMA	24,9	25,37	25,17	24,27	24,63	23,97	-4,3 -3,5 -4,06 -6,5 -4,7 -8,03 MW -5,18	0,027

C

	C _{T TM1}	C _{T TM2}	C _{T TM3}	C _{T TM4}	C _{T TM5}	MW ΔC _T C _{T GOI} -C _{T Cav-3}	rel. Expr.
Cav-3	27,01	31,43	30,93	32,5	28,47		

MhC	19,8	24,47	24,27	25,83	20,7	-7,21 -6,96 -6,66 6,67 -7,77	0,0075
						MW -7,05	
α -SMA	17	22,67	20,03	21,13	17,67	-10,01 -8,76 -10,9 -11,37 -10,8	0,00076
						MW -10,37	

D

Tabelle IV-1. (A und B) Berechnung der relativen Expression von Cav-3, MhC und α -SMA bezogen auf die Expression von β -MG. (A) Abgeschabte Trachealepithelzellen. (B) M. trachealis. (C und D) Berechnung der relativen Expression Cav-3 verglichen mit der Expression von MhC und α -SMA in abgeschabten Trachealepithelzellen (C) und in Muskelzellen der M. trachealis (D). MW Mittelwert .

IV.3.3 RT-PCR an durch laser-assistierte Mikrodisektion gewonnenen Proben

Im Einklang mit den an den abgeschabten Epithelzellen gewonnenen Ergebnissen wurde mRNA für Cav-3, MhC und α SMA auch in durch laser-assistierte Mikrodisektion gewonnenen Trachealepithelzellen der Ratte nachgewiesen. Weiterhin wurde mRNA für eNOS in solchen Proben detektiert (Abbildung IV-30).

Es wurde die Möglichkeit berücksichtigt, dass bei der Herstellung der Gefrierschnitte, die zur laser-assistierten Mikrodisektion herangezogen werden, mRNA aus dem Trachealmuskel in Richtung des Epithels verschleppt werden könnte und dort zu einem falsch-positiven Nachweis führen könnte. Zur Kontrolle wurden daher Gewebeschnitte mit angeschnittenem Musculus trachealis sowie solche ohne derartige Muskelanschnitte zur laser-assistierten Mikrodisektion herangezogen (vgl. Abb. III-1). Alle Ziel-mRNAs ließen sich in beiden Fällen nachweisen. Weiterhin wurde von solchen Gewebeschnitten, in den der Musculus trachealis enthalten war, durch Laser-Mikrodisektion auch reines Einbettungsmedium (O.C.T.-Compound) unmittelbar luminal der Epithelzellen entnommen, welches ebenfalls mRNA enthalten müßte, sofern dieses während des Schneidevorganges in der Probe verschleppt wurde. In diesen Proben ließen sich jedoch weder Cav-3, noch MhC, α SMA und eNOS in der RT-PCR nachweisen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die im Epithel detektierten mRNAs nicht eine Kontamination aus den benachbarten Muskelzellen darstellen.

In den Kontrollen ohne Template (Wasser-Kontrollen) wurden keine Banden detektiert (Abbildung IV-30). Als Positivkontrollen dienten gepickte Muskelzellen aus dem Musculus trachealis (2 Tiere/2 Proben). Die Identität der PCR-Produkte mit der

Cav-3-, MhC-, α -SMA- und eNOS-Sequenz der Ratte wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Cav-3

Tierhaltung	Ratten n=	Proben n=	Präparation	n=	Cav-3- Expression n=	Erfolgs- quote
SPF	4	14	∅ Glattmuskulatur mit Glattmuskulatur	4	1	25 %
				10	3	30 %
Konventionell	2	6	∅ Glattmuskulatur mit Glattmuskulatur	4	3	75 %
				2	∅	0 %

eNOS

Tierhaltung	Ratten n=	Proben n=	Präparation	n=	eNOS- Expression n=	Erfolgs- quote
SPF	4	13	∅ Glattmuskulatur mit Glattmuskulatur	4	1	25 %
				9	3	33 %
Konventionell	2	6	∅ Glattmuskulatur mit Glattmuskulatur	4	1	25 %
				2	2	100 %

α -SMA

Tierhaltung	Ratten n=	Proben n=	Präparation	n=	α -SMA- Expression n=	Erfolgs- quote
SPF	2	6	∅ Glattmuskulatur mit Glattmuskulatur	4	1	25 %
				2	1	50 %
Konventionell	2	6	∅ Glattmuskulatur mit Glattmuskulatur	4	4	100 %
				2	1	50 %

MhC

Tierhaltung	Ratten n=	Proben n=	Präparation	n=	MhC- Expression n=	Erfolgs- quote
SPF	4	13	∅ Glattmuskulatur	4	4	100 %
			mit Glattmuskulatur	9	6	67 %
Konventionell	2	6	∅ Glattmuskulatur	4	4	100 %
			mit Glattmuskulatur	2	1	50 %

Tabelle IV-2. Prozentuale Erfolgsquote des mRNA-Nachweises in laser-mikrodissezierten Trachealepithelzellen der Ratte.

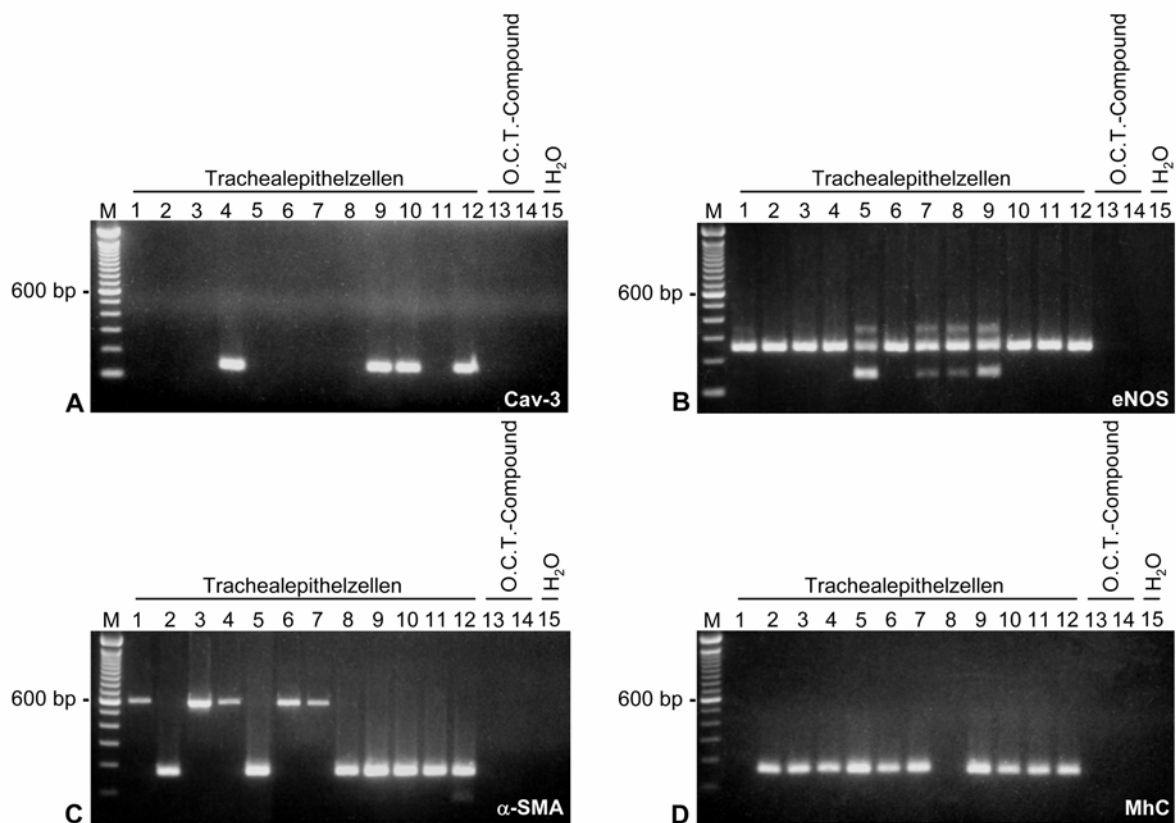


Abbildung IV-30. Laser-assistiertes Zellpicken von Trachealepithelzellen. Elektrophoresegele der PCR-Produkte von Cav-3, eNOS, α -SMA und MhC. 100 bp Marker. 1-12 Proben mit Trachealepithelzellen, 13-14 Proben mit O.C.T.-Compound, 15 Wasser-Kontrolle. Die PCR-Fragmente zeigen die erwartete Größe: Cav-3 137 bp, eNOS 151 bp, α -SMA 177 bp, MhC 153 bp. (A) In 4/12 Proben ist Cav-3 nachweisbar. (B) In 4/12 Proben ist eNOS nachweisbar. Die bei ca. 250 kD gelegenen Banden in jeder Spur sind genomische DNA, die auch detektiert wurde. (C) In 7/12 Proben ist α -SMA exprimiert. Genomische DNA (Banden in Höhe von 600 kD) ist in 4 Spuren, in den das spezifische Produkt fehlt, amplifiziert. (D) In 10/12 Proben ist MhC nachweisbar. M=Marker.

IV.3.4 Western Blot

Mittels des monoklonalen Antikörpers gegen Cav-3 wurde eine Bande von ca. 22 kD in abgeschabten Trachealepithelzellen der Ratte nachgewiesen. Als Positivkontrollen dienten Proteinextrakte von Herz und Lunge (Abbildung IV-31).

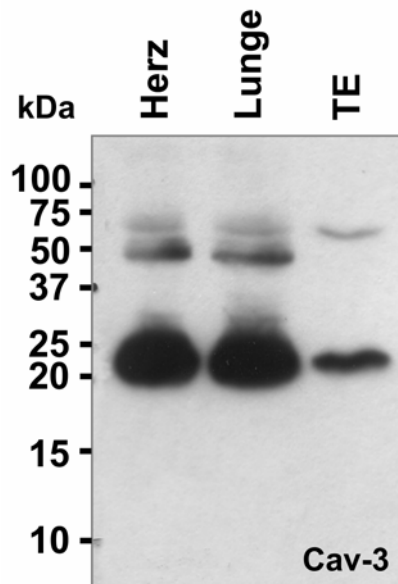


Abbildung IV-31. Western Blot, Ratte. Eine Bande von ca. 22 kD ist im abgeschabten Trachealepithel (TE) sowie in den Positivkontrollen Herz und Lunge mittels eines monoklonalen anti-Cav-3-Antikörpers detektierbar. Die bei 50 kD gelegenen Banden stellen die schwere Kette des Maus-IgG dar, welche vom Sekundärantikörper erkannt wird. Die bei gelegene 65 kD Bande ist auf Cav-3 Oligomere zurückzuführen.

IV.3.5 Elektronenmikroskopie

Die zilientragenden Zellen des Trachealepithels der Ratte waren mit den benachbarten Zellen damit für polarisierte Epithelzellen charakteristische Verbindungskomplexe verbunden, die von apikal nach basal aus Tight-Junctions, Zona adherens und Macula adherens bestanden. Typische Kinozilien und Mikrovilli ragten von der apikalen Membran in das Lumen der Zellen hinein. In der apikalen Membran fehlten Caveolae (Abbildung IV-32). Die basolaterale Membran zeigte ausgedehnte Verzahnungen mit den benachbarten sekretorischen oder zilientragenden Zellen. Die geraden Teile der basolateralen Membran zwischen den Ausdehnungen wiesen gelegentlich Caveolae auf (Abbildung IV-16A-C).

Der Kern war überwiegend im basalen Drittel der Zelle lokalisiert und die meisten Organellen waren in der supranukleären Region konzentriert. In der apikalen subplasmalemalen Region fanden sich die Basalkörperchen der Kinozilien. Zwischen diesen waren auch vereinzelt *Coated vesicles*, *Multivesicular bodies* und einige andere Vesikel zu beobachten. Unmittelbar unter den Basalkörperchen und zum Teil sogar in Berührung mit diesen streckte sich ein tubulovesikuläres Netzwerk von glattem ER aus (Abbildung IV-32). In dieser Zellregion fanden sich ebenfalls reichlich Mitochondrien, deren Längsachse vorwiegend parallel zu der apikalen Membran verlief. Zwischen dieser subapikalen Region und dem Kern befanden sich der Golgi-Apparat, vorwiegend längs orientierte Mitochondrien und wenige Zisternen des glatten und rauhen ER.

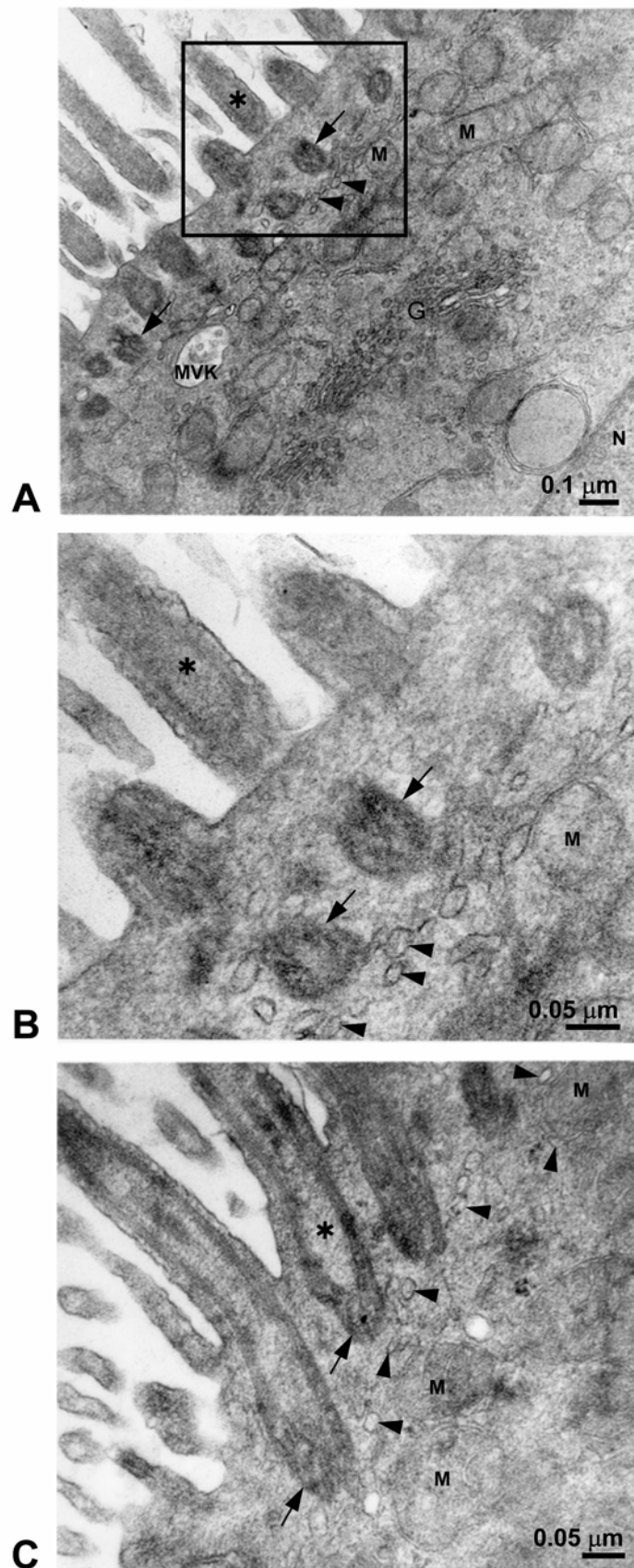


Abbildung IV-32: (A-C) Elektronenmikroskopie, Trachea, Ratte. Ein tubulovesikuläres Netzwerk (Pfeilköpfe) ist im apikalen Bereich direkt unter und neben den Basalkörperchen (Pfeile) der Zilien (Asterisk) zu sehen. Unmittelbar darunter befinden sich Mitochondrien mit

wenigen Cristae (M). B. Vergrößerung der Region im Viereck in A. N=Nucleus, MVB=multivesicular Body, GA=Golgi-Apparat.

V. Diskussion

V.1 Indirekte Immunfluoreszenz kombiniert mit FRET-CLSM-Analyse

In dieser Arbeit konnte FRET in Endothelzellen in Gewebeschnitten von der Ratte und vom Menschen in Präparaten, die mittels indirekter Immunfluoreszenz für Cav-1 und Cav-2 doppelmarkiert waren, detektiert werden. Eine Interaktion zwischen beiden Proteinen wurde auf Grund der Daten von biochemischen Untersuchungen angenommen. Biochemische Methoden lieferten Hinweise, dass Cav-1 und Cav-2 Heterooligomere bilden (Das et al, 1999; Scherer et al., 1997) und dass Cav-2 für seinen Transport vom Golgi-Apparat zu der Plasmamembran Cav-1 benötigt (Capozza et al., 2005; Drab et al., 2001). Obwohl die biochemischen Daten eine enge räumliche Assoziation von beiden Proteinen in situ voraussagen, zeigt die vorliegende Arbeit zum ersten Mal diese Assoziation in einem bestimmten Zelltyp mittels Lichtmikroskopie im Gewebe und liefert die Erstbeschreibung der Cav-1- und Cav-2-Assoziation in Endothelzellen in humanem Gewebe.

Ein wichtiger Punkt, bei dem die FRET-Methode mittels indirekter Immunfluoreszenz potenziell auf Kritik stoßen kann, ist die Größe des Antikörper-Antikörper-Komplexes, der für die Detektion angewandt wurde. Eine Überlegung ist, ob die Größe des Antikörper-Antikörper-Komplexes in einem FRET-Signal resultieren kann, obwohl die Proteine, deren Interaktion untersucht wird, mehr als 10 nm von einander entfernt sind. Aus der FRET-Effizienz und der Förster-Konstante kann die Distanz zwischen zwei Proteinen ausgerechnet werden, wenn beide Proteine ihrerseits an ein fluoreszierendes Protein (FP) gekoppelt sind, zum Beispiel an GFP, CFP und YFP (Gu et al., 2004; Ruiz-Velasco und Ikeda, 2001). Dies wird durch Transfektion mit Konstrukten, die für ein FP-Protein kodieren, erreicht. Diese Untersuchungen werden in Zellkulturen durchgeführt und die Ergebnisse geben eine detaillierte Information für ein System, das in seiner Komplexität sehr reduziert ist. Ferner verändert die direkte Markierung von zwei Proteinen, direkt oder mittels genetischer Methoden, die Proteine selbst und/oder ihren endogenen Spiegel in der Zelle. Zusammengefasst liefern diese Methoden eine eingeschränkte Information über die Situation in situ. Mit diesen Überlegungen wurde in dieser Arbeit eine FRET-Methode entwickelt, die auf

indirekter Doppelimmunhistochemie an Gewebekryoschnitten basiert. Gewebeschnitte spiegeln die Situation in situ wider und die indirekte Doppelimmunhistochemie ist eine Methode, die relativ günstig und unaufwändig ist. Cy-3- und Cy-5-gekoppelte Sekundärantikörper werden häufig in Kollokalisationsstudien von Proteinen angewandt. Das Cy3/Cy5-Fluorophorpaar eignet sich auf Grund ihrer Fluoreszenzstabilität sehr gut für FRET-Untersuchungen (Kenworthy, 2001). Die FRET-Effizienz, die in dieser Arbeit gemessen wurde, lag im Bereich von 4-15 %, was einen Abstand von etwa 9,2 bis 7,2 nm zwischen dem Cy-3-Fluorophor und dem Cy-5-Fluorophor entspricht. Die Förster-Konstante für Cy-3 und Cy-5 ist $R_0=5,4$ (Sabanayagam et al., 2005). Wenn wir in Betracht ziehen, dass die Länge eines Antikörpers etwa 10 nm beträgt (Harris et al., 1998), wird die maximale Größe eines Komplexes aus Primär- und Sekundärantikörper etwa 20 nm sein, wenn die Antikörper geradlinig ausgerichtet sind. Die maximale Distanz zwischen zwei Antikörper-Antikörper-Komplexen, die an Cav-1 und Cav-2 gebunden sind, könnte in diesem Fall auf etwa 40 nm geschätzt werden. Bei entsprechender gegenläufiger Ausrichtung der beiden Antikörper-Antikörper-Komplexe könnten sie damit eine Distanz von ca. 40 nm zwischen Antigenen im Schnitt überbrücken. Treffen diese Überlegungen zu, wäre ein FRET-Signal selbst dann noch zu erwarten, wenn Cav-1 und Cav-2 etwa 50 nm von einander entfernt wären, was wesentlich mehr ist als die oben angenommenen ca. 10 nm. Dagegen sprechen jedoch sowohl mehrere theoretische Überlegungen als auch die praktisch erzielten Ergebnisse. 1.) Die Konjugation der Fluorophore an den Sekundärantikörper erfolgt weder ausschließlich noch bevorzugt an dem äußersten Abschnitt des Fc-Fragmentes. 2.) Ebenso binden die Sekundärantikörper weder ausschließlich noch bevorzugt an dem distalen Abschnitt des Fc-Fragmentes der Primärantikörper. 3.) Das oben angenommene geometrische Szenario, dass die Antikörper-Antikörper-Komplexe flach in der Plasmamembran in den Caveolae liegen, ist höchst unwahrscheinlich. 4.) Auch wenn die Antikörper-Komplexe in der Tat flach liegen würden, müssten sie dann so zueinander lokalisiert sein, dass sich die zwei Fc-Fragmente der Sekundärantikörper direkt einander gegenüber stehen. 5.) Das wichtigste Argument gegen die Annahme, die gemessenen FRET-Signale könnten durch die obengenannte geometrische Anordnung bei relativ großer (ca. 50 nm) räumliche Distanz der Primärantigene entstehen, sind die Daten dieser Arbeit. Die Ergebnisse zeigen, dass bei der Anwendung eines $F(ab')_2$ -Fragmentes anstatt von

Gesamtmolekülen als Sekundärantikörper das FRET-Signal nicht reduziert wird, wie es anzunehmen wäre, wenn die Antikörper eine weite Distanz zwischen Primärantigenen zu überbrücken hätten. Aus diesem Grund ist es sehr unwahrscheinlich, dass die FRET-Signale, die mittels indirekter Immunhistochemie und CLSM-Analyse detektiert worden, durch Antigene verursacht wurden, die sich nicht in enger räumlicher Assoziation befinden und somit als falsch-positiv zu interpretieren sind. Ganz im Gegenteil, es ist sogar eher anzunehmen, dass falsch-negative Ergebnisse auftreten können, also dass mittels dieser Methodik kein FRET-Signal detektiert wird, obwohl in situ eine Interaktion der Proteine vorliegt, wenn die Orientierung der Antikörper-Antikörper-Komplexe ungünstig ist und die Fluorophore dadurch weiter voneinander entfernt vorliegen als die im Gewebeschnitt befindlichen Antigene.

Weil eine große Anzahl von Cav-1- und Cav-2-Molekülen pro Caveola präsent ist, können sterische Hinderungen die Bindung der Sekundärantikörper reduzieren und somit zu geringeren FRET-Effizienzen führen.

Mischen oder getrennte Applikation hatte allein keinen signifikanten Einfluss auf ΔIF . Unsere Ergebnisse zeigen eindeutig, dass alle Kombinationen von Bedingungen (getrenntes und gemischtes Applizieren von $F(ab')_2$ -Fragmenten und Gesamtantikörper), die in diesen Experimenten getestet wurden, immer in einem sehr robusten FRET-Signal resultierten. In der Tat wurde eine höhere FRET-Effizienz betrachtet, wenn der Cy-5-konjugierte Sekundärantikörper vor dem Cy-3-konjugierten Antikörper auf den Gewebeschnitten eingesetzt wurde, verglichen mit einer Inkubation, in der der Cy-3-markierte Sekundärantikörper zuerst eingesetzt wurde. Dies deutet darauf hin, dass die Sekundärantikörper sich in ihrer Bindung gegenseitig hindern. Weiterhin wird auf diese Weise zuerst die Bindung des mit dem Akzeptor (Cy-5) konjugierten Sekundärantikörpers ermöglicht. Hieraus könnte im Vergleich zum Donor (Cy-3) ein leichter Akzeptorüberschuss resultieren, woraus eine höhere FRET-Effizienz resultiert.

Im Prinzip können weder die Wahl des Sekundärreagenzes noch des Applikationsmodus allein als methodisch überlegen betrachtet werden. Entscheidend für das FRET-Ergebnis sind die Spezifität der Antikörper und eine kontrollierte physikalische Stabilität des Messsystems. Die Versuche legen aber nahe, dass eine Applikation der Akzeptor-gekoppelten Antikörper vor dem Donor-gekoppelten Antikörper vorzuziehen ist.

Die Methode des Akzeptorbleichens ist sehr gut für die Detektion von FRET mittels indirekter Immunhistochemie und CLSM-Analyse geeignet. Das wird durch die Experimente untermauert, in denen sehr geringe Mengen von Cy-3-konjugierten Antikörpern, die nicht ausreichend sind, um in einer mikroskopisch sichtbaren Markierung zu resultieren, immer noch zu einem messbaren FRET führten, wenn der Cy-5-konjugierten Antikörper in großen Mengen gebunden wurde.

Überraschenderweise wurde ein FRET-Signal in Kontrollversuche gemessen, in denen der primäre Antikörper für den Donor, der in unseren Versuchsreihen normalerweise mit Cy-3 markiert wurde, weggelassen wurde und beide Sekundärantikörper appliziert wurden. Beide Sekundärantikörper waren gegen die Serumproteine derjenigen Spezies, aus der der andere Primärantikörper stammt, präabsorbiert, um eine Kreuzreaktivität zwischen Primärantikörper für Donor und Sekundärantikörper für Akzeptor und umgekehrt zu verhindern. Trotzdem ist die Erklärung für dieses Phänomen höchst wahrscheinlich eine minimale, aber dennoch messbare Kreuzreaktivität des Cy-3-konjugierten Antikörpers mit dem Primärantikörper aus der nicht-korrespondierenden Spezies. Demzufolge muss das FRET-Signal, das unter experimentellen Bedingungen gemessen wurde, als eine Mischung aus zwei Ursachen interpretiert werden: erstens, die FRET-Effizienz, die durch die Markierung von Cav-1 und Cav-2 entsteht, und zweitens, die FRET-Effizienz, die durch die Kreuzreaktivität der beiden Sekundärantikörper entsteht.

Bereits auf Grund theoretischer Überlegungen sollte nicht die FRET-Effizienz, sondern ΔIF als verlässlicher Parameter für die Detektion einer Assoziation von zwei Proteinen mittels indirekter Immunhistochemie und CLSM-FRET-Analyse betrachtet werden. Da die FRET-Effizienz den Anstieg der Donorfluoreszenz in Prozent berechnet darstellt, resultieren sehr kleine Änderungen der ΔIF in einer sehr hohen FRET-Effizienz, wenn die Intensität der Cy-3-Ausgangsfluoreszenz sehr gering ist. Dies erklärt die relativ hohen FRET-Effizienzen in Kontrollversuchen im Unterschied zu dem geringen Anstieg der ΔIF in den gleichen Kontrollversuchen.

In der Tat zeigt der statistische Vergleich der Fähigkeit, zwischen Versuchs- und Kontrollbedingungen mittels $FRET_{eff}$ und ΔIF zu unterscheiden, deutlich, dass ΔIF viel sensitiver und spezifischer zwischen Versuchs- und Kontrollbedingungen diskriminiert. Deshalb ist ΔIF der verlässlichere Parameter für die Messung von FRET in dem in dieser Arbeit entwickelten Versuchsaufbau.

Dies zeigt sich auch in der Versuchsreihe, in der beide sekundären Antikörper (ein Cy-3- und ein Cy-5-markierter) gegen Ig der gleichen Spezies gerichtet waren und so an den gleichen primären Antikörper banden. In diesen Versuchen wurde ein FRET-Signal auch in so hohen Verdünnungen des Cy-3-konjugierten Sekundärantikörpers detektiert, in denen bei bloßer Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop keine Cy-3-Markierung mehr sichtbar war. Bei einem verlässlichen Meßparameter ist eine der Verdünnung des Akzeptor-Antikörpers proportionale Abnahme zu erwarten. Diese Korrelation war nur für ΔIF , nicht aber für $FRET_{eff}$ zu erkennen.

Zusätzlich zu der Kreuzreaktivität der Sekundärseren konnte noch eine weitere mögliche Quelle, die die FRET-Messungen beeinflussen kann, identifiziert werden. Es wurde festgestellt, dass in manchen Experimenten Veränderungen der ΔIF nicht nur in dem geblichenen Bereich detektiert werden, sondern auch in Regionen außerhalb des geblichenen ROI. Die Ursache hierfür ist eine Instabilität des Systems, die durch Luftbewegungen im Raum, die von der Klimaanlage oder durch ein wiederholtes Öffnen der Tür des Mikroskopieraums herrühren können, verursacht werden kann. Weil man unter diesen Umständen in einer Ebene bleicht, aber in einer anderen Ebene misst, können falsch positive oder negative Ergebnisse entstehen. Auf Grund der Empfindlichkeit des Geräts wird jede Veränderung der Messbedingungen detektiert. Deswegen ist es zwingend erforderlich, die Stabilität des Imagingsystems zu kontrollieren. Dies kann zuverlässig erfolgen, indem man die ΔIF -Veränderungen außerhalb der geblichen ROIs misst, um zu validieren, ob die detektierten Veränderungen der ΔIF in dem geblichen Bereich durch FRET entstanden sind, oder von einer Bewegung des Präparates in der Z-Richtung resultieren.

Ein wichtiger Faktor, der die Stärke der Fluoreszenz beeinflusst, ist die Temperatur (Jongsma et al., 1971). Je höher die Temperatur ist, desto geringer wird die Ausgangsfluoreszenz des Donors und des Akzeptors; dies beeinflusst die Ergebnisse der FRET-Messungen. Aus diesem Grund sollen Experiment- und Kontrollbedingungen für jedes Präparat als gebundene Proben angesehen und direkt nacheinander ausgewertet werden. Eine geringere Ausgangsfluoreszenz der Fluorophore für den Donor und für den Akzeptor kann zwar durch die Einstellungen des Gerätes kompensiert werden, dies verursacht aber ein hohes Rauschen des Signals und macht die standardisierte Auswertung unmöglich. Erstrebenswert sind Photomultipliereinstellungen unter 600 V. Diese Einstellungen müssen bei jedem

Versuch konstant gehalten werden. Um konstante Werte zu erhalten, müssen die Präparate vor den Messungen mindestens 30 min bei Raumtemperatur temperiert werden.

Kenworthy (2001) empfiehlt, die Präparate mit gepuffertem Glycerol einzudeckeln und danach mit Nagellack zu versiegeln, um Bewegungen des Deckgläschens in der Z-Richtung einzuschränken. In der vorliegenden Arbeit wurde Mowiol 4-88 als Eindeckelmedium eingesetzt. Dadurch, dass Mowiol 4-88 bei Raumtemperatur aushärtet, wird eine Schicht von konstanter Dicke zwischen Objektträger und Deckgläschen gebildet, die temperaturunabhängig ist. Auch dies trägt zur Konstanz der Bedingungen für die FRET-Untersuchung bei.

Zusammenfassend ist die Doppelimmunfluoreszenz und FRET-CLSM-Analyse ein viel versprechendes Werkzeug zur Untersuchung von Protein-Protein-Assoziationen in Gewebeschnitten, wenn die adäquaten Kontrollen durchgeführt werden. Diese Techniken können sehr erfolgreich in Untersuchungen von Interaktionen zwischen Proteinen auch im humanen Gewebe eingesetzt werden. Weil die Methode relativ günstig und schnell ist, und für die Durchführung nur ein Standard-CLSM bedürftigt wird, das in vielen Instituten zugänglich ist, bietet sie die Möglichkeit, Einblicke in Protein-Protein-Interaktionen in Gewebeschnitten zu gewinnen, im normalen, wie auch im pathologisch veränderten Gewebe.

Weiterhin eröffnet diese Methode die Möglichkeit der Untersuchung von humanen Proben, die durch chirurgische Eingriffe im Vorlauf mehrerer Jahre erlangt worden sind. Ein sehr wichtiger Vorteil der FRET-CLSM-Analyse gegenüber allen bekannten Methoden zur Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionen ist diese Möglichkeit, archiviertes Gewebe zu untersuchen. Ferner ist es möglich, in diesen Proben Protein-Protein-Interaktionen in den subzellulären Kompartimenten einer einzelnen Zelle zu untersuchen. Dadurch können in situ Signalwege, die unter pathologischen und normalen Bedingungen im humanen Gewebe beschriftet werden, untersucht werden.

V.2 Caveoline

Cav-1 und Cav-2

In der vorliegenden Arbeit wird zum ersten Mal die Expression von Cav-1 und Cav-2 in Epithelzellen der Trachea und in den großen Bronchien beschrieben. Mittels Elektronenmikroskopie konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die zillientragenden Zellen und die Basalzellen der großen Atemwege auch Caveolae besitzen. Cav-1 ist für die Ausbildung von Caveolae in der Plasmamembran essenziell (Drab et al., 2001; Razani et al., 2001a), kann aber auch im Golgi-Apparat nachgewiesen werden, wo es nicht zu einer Ausbildung von Caveolae kommt. Hier muss Cav-1 andere Aufgaben haben (Razani et al., 2001b). Die unterschiedlichen Funktionszustände des Cav-1 scheinen auch zu unterschiedlicher Detektierbarkeit durch Antikörper zu führen. Von vorhergehenden Untersuchungen ist es bereits bekannt, dass ein Antikörper in immunhistochemischen Untersuchungen in situ nicht notwendigerweise jede Modifikationsform des Proteins erkennt, gegen das er gerichtet ist. Govers und Mitarbeiter (2002) stellten fest, dass von zwei verwendeten Antikörpern gegen Cav-1 einer nur den Pool des Proteins im Golgi-Komplex von Endothelzellen erkannte, der zweite Antikörper hingegen band in den gleichen Zellen nur an Cav-1, das in der Plasmamembran lokalisiert war. Luetterforst und Mitarbeiter (1999) beschrieben in BHK-Zellen eine Cav-1-Plasmamembranmarkierung mit einem polyklonalen Antikörper (Anti-Cav-1 α), der gegen den NH₂-Terminus der Cav-1 gerichtet war, und eine Golgi-Markierung mit einem monoklonalen Antikörper (Anti-Cav-1 $\alpha\beta$), der gegen den COOH-Terminus von Cav-1 gerichtet war. Zusätzlich war auch der Golgi-Apparat mit dem NH₂-Terminus-gerichteten Anti-Cav-1-Antikörper immunreaktiv. Cav-1 und Caveolae wurden auch mittels des gegen den NH₂-Terminus-gerichteten Anti-Cav-1-Antikörpers in Epithelzellen der Niere detektiert (Verkade et al., 2000). Beide Anti-Cav-Antikörper wurden in der vorliegenden Untersuchung eingesetzt. Die Spezifität der Anti-Cav-1 α -Antikörper wurde in immunhistochemischen Untersuchungen auf Gewebeschnitten von Cav-1-defizienten Mäusen und in Western Blot-Untersuchungen mit Lungenhomogenaten bestätigt. Die Spezifität des Anti-Cav-1 $\alpha\beta$ - und des Cav-2-Antikörpers wurde von Drab und Mitarbeitern (2001) sowie Razani und Mitarbeitern (2002) in Experimenten mit gen-defizienten Mäusen bestätigt. Mittels dieser Antikörper konnte in der vorliegenden Arbeit die bisher bekannte Lokalisation der Caveoline im Herz und in der Lunge bestätigt werden.

Unter Anwendung der oben beschriebenen isoform-spezifischen Anti-Cav-1-Antikörper wurde die Verteilung der Cav-1 α - und - β -Isoform in der Trachea untersucht. Es wurden Unterschiede in der Intensität der Cav-1 α - und der Cav-1 $\alpha\beta$ -Immunmarkierung zwischen den Zelltypen beobachtet. Die Cav-1 α -Immunreaktivität war in Endothelzellen stärker als in Epithelzellen ausgeprägt. Dagegen war die Cav-1 $\alpha\beta$ -Immunreaktivität in den großen Atemwegen im Epithel stärker als im Endothel. Im Einklang mit den immunhistochemischen Befunden zeigten Western Blot-Untersuchungen eine sehr starke Cav-1 β -Proteinexpression im abgeschabten Trachealepithel, im Gegensatz zu einer sehr schwachen Cav-1 β -Proteinexpression in Lungen- und Herzhomogenaten. Die Cav-1 β -Isoform ist weniger effizient in der Bildung von Caveolae (Fujimoto et al., 2000), was eine Erklärung für die geringe gefundene Anzahl der Caveolae in Epithelzellen bietet. Im Vergleich ist die Anzahl der Caveolae im Endothel viel höher, dort ist die Cav-1 α -Isoform die überwiegend exprimierte Cav-1-Isoform (Kogo et al., 2004). Die β -Isoform von Cav-1 wird von einer alternativen Startstelle abgeleitet. Dem synthetisierten Protein fehlen die ersten 32 Aminosäuren des N-Terminus (Scherer et al., 1995). Somit fehlt der β -Isoform die Phosphorylierungsstelle Tyr14. Dieser Tyr-Rest wird in Pankreastumorzellen bei Stimulation mit epitheliale Wachstumfaktor ("epithelial growth factor"; EGF) phosphoryliert. Dies führt zu einer Neuformation von Caveolae (Orlichenko et al., 2006). EGF wird als Schlüsselfaktor für die Reparatur des Bronchialepithels angesehen (Holgate, 2000). Auf Grund dieser Befunde ist davon auszugehen, dass Caveolae, die Cav-1 α enthalten, in diesen Prozess involviert sein könnten. Es ist verlockend zu spekulieren, dass Caveolae existieren, die die β -Isoform überwiegend enthalten (Fujimoto et al., 2000). Diese Caveolae könnten in andere Signalkaskaden eingebunden sein als die Caveolae, die überwiegend Cav-1 α aufweisen. Wenn beide Isoformen in den Caveolae vorhanden sind, könnte Cav-1 β als negativer Regulator in Signalkaskaden dienen, die auf einer Phosphorylierung von Cav-1 α beruhen.

Caveolin-1 und -2 wurden nur in den großen Atemwegen der Maus und der Ratte gefunden, dadurch beschränkt sich die caveoläre Funktion nur auf die großen Atemwege dieser Spezies. Dabei ist zu bedenken, dass viele humane intrapulmonale Bronchien wesentlich größer sind als die Trachea der Ratte. Da in der vorliegenden Arbeit Cav-1 in humanen intrapulmonalen Bronchien gefunden wurde, ist es höchst

wahrscheinlich, dass die Caveoline durchwegs in einem erheblichen Teil des Bronchialbaums des Menschen präsent sind.

Raposo und Mitarbeiter (1987, 1989) konnten zeigen, dass muskarinische sowie auch β -adrenerge Rezeptoren nach einer Bindung von Agonisten zu den Caveolae transloziert werden können. Diese Rezeptoren sind in der Regulation der Zilienfunktion involviert (Hayashi et al., 2005; Salate, 2002). Einige Proteine, die in Ca^{2+} -abhängige Signalprozesse eingebunden sind, beispielsweise die Ca^{2+} -Pumpe und die Ca^{2+} -ATPase, sind in den Caveolae lokalisiert. Dies wurde für Nieren- und Darmepithelzellen gezeigt (Fujimoto, 1993). Daher ist eine mögliche Funktion der Caveolae in Epithelzellen der Atemwege die Feinregulation der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und dadurch die Regulation der Funktion der Zilien.

Einige pathogene Mikroorganismen nutzen selektiv die Caveolae, um ins Zellinnere einzudringen (Norkin, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Elektronenmikroskopie gezeigt werden, dass die Caveolae in den Flimmerzellen der Ratte in der basolateralen Plasmamembran lokalisiert sind. Darüber hinaus wurden auch Caveolae in den Basalzellen detektiert. Da die Caveolae auf der basolateralen Oberfläche des Epithels lokalisiert sind, ist es denkbar, dass diese an der Endozytose von infektiösen Erregern nach einer Schädigung des Epithels beteiligt sind. In der Tat benötigen Adenoviren eine Beeinträchtigung der Integrität der Epithelzellen oder der Tight-Junctions (Zell-Zell-Kontakte), um einen Zugang zur basolateralen Plasmamembran der Flimmerzellen zu erlangen und diese zu infizieren (Walters et al., 1999). Basalzellen sind anfälliger für Infektionen mit Adenoviren (Zabner et al., 1997; Pickles et al., 1996). Entsprechend wurden in dieser Arbeit Caveolae in Basalzellen zahlreicher als in Flimmerzellen beobachtet. Es ist gezeigt worden, dass der Adenovirus 2 durch seinen Rezeptor CAR in die Zellen eintritt. Dieser Rezeptor ist in der basolateralen Plasmamembran der zilientragenden Zellen und in den Basalzellen lokalisiert. Da Adenovirus 2-CAR mittels „Clathrin coated pits“ durch Endozytose in die Zellen internalisiert wird (Imelli et al., 2004; Meier und Greber, 2004), mag es auf den ersten Blick so erscheinen, als spielten die Caveolae keine wichtige Rolle in diesem Prozess. Dennoch gibt es mehrere Arbeiten, die das Gegenteil zeigen. Es ist ein weiterer Rezeptor für Adenovirus 2, MHC class 1, bekannt (Zabner et al., 1997). Dieser ist ebenfalls in der Plasmamembran der Flimmerzellen und in den Basalzellen lokalisiert. Weiterhin ist MHC class 1 der Rezeptor für Simian Virus 40, das durch Endozytose mittels Caveolae in die Zelle

internalisiert wird (Pelkmans et al., 2001). Dies deutet darauf hin, dass Caveolae eine Rolle in Infektionen des Atemwegsepithels mit diesen Adenoviren spielen. Darüber hinaus kann die Infektiosität des Humanen Adenovirus Typ C durch die Expression einer dominant negativen Cav-1-Mutante in Plasmazellen deutlich reduziert werden. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass Caveolae alternativ die Eintrittsstelle für diese Viren sein können (Colin et al., 2005).

Webley und Mitarbeiter (2004) berichteten, dass *Chlamydia pneumoniae* nach dem Eintritt in HeLa-Zellen mit Cav-1 und Cav-2 im Zytoplasma kolokalisiert ist, was auf die Rolle von Caveolinen in infektiösen Prozessen nach dem Eintritt von pathogenen Mikroorganismen hindeutet.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigten, dass das Fehlen von Cav-1 in Trachealepithelzellen der Cav-defizienten Mäuse von einem Verlust von Caveolae begleitet ist. Dieser Befund zeigt eindeutig, dass Cav-1 für die Bildung von Caveolae in Epithelzellen der Atemwege erforderlich ist. Weiter sind der Transport von Cav-2 zur Plasmamembran und die Stabilisierung des Proteins von der Expression von Cav-1 abhängig (Parolini et al., 1999; Mora et al., 1999). Unsere Befunde aus den FRET-Untersuchungen belegen ebenfalls, dass Cav-1 α und Cav-2 in zilientragenden Zellen und in Basalzellen sehr eng miteinander assoziiert sind, und weisen darauf hin, dass beide Proteine in der Formation von Caveolae involviert sind. Interessanterweise fanden wir in Trachealepithelzellen eine wesentlich höhere Expression von Cav-2-mRNA im Vergleich zu Cav-1-mRNA. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Cav-2 in Epithelzellen eine Cav-1-unabhängige Rolle spielen kann, wenn Cav-2 die Plasmamembran erreicht hat. Diese Überlegungen werden auch von den Daten anderer Arbeitsgruppen unterstützt. Webley und Mitarbeiter (2004) konnten zeigen, dass Cav-2 unabhängig von Cav-1 mit *Chlamydia*-Inklusionen assoziiert ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die zilientragenden Zellen und die Basalzellen der Trachea und der großen Bronchien Caveolae besitzen, die aus einer Assoziation zwischen Cav-1 α und Cav-2 resultieren. Caveolae sind in anderen Zelltypen in einer Reihe von Funktionen einbezogen. Die genaue Funktion im Epithel wird in weiteren Arbeiten geklärt. Die Grundlagen für eine weitere physiologische Charakterisierung von Cav-1 und Cav-2 im Atemwegsepithel konnten durch die hier vorliegende Arbeit geschaffen werden.

Cav-3

In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl Cav-3-mRNA als auch -Protein in den zilienträgenden Zellen der Atemwege der Ratte nachgewiesen werden. Die subzelluläre Lokalisation der Cav-3 beschränkte sich gemeinsam mit anderen membranassoziierten Proteinen auf ein apikales subplasmalemmales Kompartiment. Der Nachweis in den zilienträgenden Zellen der mRNA zweier anderer Proteine, α -SMA und MhC, die als spezifisch für Glattmuskelzellen gelten, war unerwartet. Diese Befunde erregten Verdacht auf eine mögliche Kontamination mit mRNA der Glattmuskelzellen. Es sprechen jedoch mehrere Befunde dieser Arbeit dafür, dass diese mRNAs tatsächlich in den Trachealepithelzellen der Ratte exprimiert werden. Die quantitative RT-PCR-Analyse zeigt, dass die relative Expression von Cav-3-, α -SMA- und MhC-mRNA im Musculus trachealis sich von der im abgeschabten Trachealepithel wesentlich unterscheidet. Wäre die Detektion dieser mRNAs in den abgeschabten Trachealepithelzellen auf eine Kontamination zurückzuführen, würde man die gleiche Relation in der relativen Expression erwarten. Darüber hinaus wurden die Befunde durch laser-assistierte Mikrodisektion des Trachealepithels bestätigt. Hierbei zeigen die Befunde aus den Kontrollexperimenten, dass bei der Anwendung der laser-assistierten Mikrodisektion die Wahrscheinlichkeit der Verschleppung von mRNAs aus Zellen der umliegenden Gewebe (in diesem Fall aus den Muskelzellen), wodurch falsch positive Ergebnisse in benachbarten Zellen (in diesem Fall im Epithel) resultieren würden, sehr unwahrscheinlich ist: 1.) Cav-3-, α -SMA- und MhC-mRNA wurden selbst in Epithelzellen detektiert, die aus Gewebeschnitten mikrodiseziert wurden, die keinen Musculus trachealis enthielten. 2.) Aus den Regionen mit O.C.T.-Compound, die aus dem Lumen der Trachea nahe des Epithels gewonnen wurden, konnten keine mRNAs amplifiziert werden. Beruhte die mRNA-Detektion im Epithel auf einer Translokation von mRNAs, wären alle mRNAs auch in den Kontrollproben zu detektieren gewesen. Ob α -SMA- und MhC-mRNA im Trachealepithel in das entsprechende Protein umgeschrieben werden, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Angesichts der Rolle von Cav-3 bei der Bildung von Caveolae in Muskelzellen (Woodman et al., 2002; Razani et al., 2002) ist es auf den ersten Blick sehr außergewöhnlich, dass in der apikalen Plasmamembran der zilienträgenden Zellen keine Caveolae präsent sind. Jüngst wurde Cav-3 jedoch in Verbindung mit der

Bildung von Mikrodomänen im sarkoplasmatischen Retikulum gebracht, die unabhängig von der Formierung der Caveolae stattfindet (Li et al., 2006). Cav-3 ist in adulten Kardiomyozyten am Sarkolemm lokalisiert, findet sich aber auch in T-Tubulus-assoziierten Vesikeln (Voldstedlund et al., 2001; Head et al., 2002).

Unterschiedliche Daten aus der Literatur deuten darauf hin, dass es ein besonderes tubulovesikuläres Zellkompartiment in den zilientragenden Zellen gibt, in dessen Organisation Cav-3 involviert sein könnte. Der Inositol-1,4,5,-Trisphosphat-Rezeptor (IP3-R) Typ 1 ist in Epithelzellen der Bauchspeicheldrüse und der Leber in der Membran des endoplasmatischen Retikulums, das als Ca^{2+} -Speicher dient, lokalisiert (Sharp et al., 1992). Funktionelle Daten vom Epithel der Glandula submandibularis zeigen, dass IP3-R in apikalen Vesikeln lokalisiert ist. Zusätzlich wurde in der apikalen Region dieser Zellen eine Carbachol-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung gefunden (Yamamoto-Hino et al., 1998). In den zilientragenden Zellen ist der IP3-R Typ 1 im Zytoplasma in der apikalen Region der Zelle in einem schmalen Band lokalisiert (Sugiyama et al., 1996) und an der Regulation der Zilienschlagfrequenz beteiligt (Barrera et al., 2006). Zusätzlich wurden IP3-Rezeptoren in Epithelzellen der Niere (MDCK-Zellen) und Endothelzellen der Lungengefäße in Caveolin-enthaltenden Zellkompartimenten nachgewiesen (Bush et al., 1994; Schnitzer et al., 1995). Ferner wurde von Rizzuto und Mitarbeitern (2006) gezeigt, dass Ca^{2+} -Signale im apikalen Bereich der Epithelzellen voneinander räumlich abgetrennt sind. Die unterschiedliche Verteilung der IP3-Rezeptoren in der Zelle führt zur Entstehung unterschiedlicher Ca^{2+} -Mikrodomänen (Vermassen et al., 2004).

Mittels Scanningelektronenmikroskopie an Gefrierbruch-Präparaten wurde gezeigt, dass das ER in den zilientragenden Epithelzellen der Trachea der Ratte mit den nahe darunter liegenden Mitochondrien engen Kontakt aufnimmt (Hanamoto und Inoue; 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Befunde mittels konventioneller Elektronmikroskopie in den zilientragenden Epithelzellen der Trachea der Ratte bestätigt. Auf eine Rolle des apikalen tubulovesikulären Kompartimentes, die sich von der des sonstigen glatten ER in der Zelle unterscheidet, wurde auch von Graf und Stockinger (1966) hingewiesen. Sie stellten Cholinesterase-Aktivität fest, die sich auf ein tubulovesikuläres Kompartiment im apikalen Bereich der zilientragenden Zellen beschränkt. Die am weitesten apikal lokalisierten Zisternen dieses Kompartimentes waren in sehr engem Kontakt mit den Basalkörperchen der Zilien. Gemeinsam mit der bekannten stimulierenden Rolle von ACh auf der

Zilienschlagfrequenz führten diese Befunde Graf und Stockinger zu der Hypothese, dass das apikale tubulovesikuläre Kompartiment in der Synchronisierung des Zilienschlags involviert sein könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde im apikalen Bereich der zilientragenden Zellen Immunreaktivität für CHT1 nachgewiesen. Der hochaffine Cholintransporter 1 vermittelt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der ACh-Synthese. Weiter konnte CHT1 mit Cav-3 und eNOS kolokalisiert werden, was auf eine gemeinsame Lokalisation im tubulovesikulären Kompartiment oder in einem Subkompartiment von diesem hinweist. CHT1 wurde bereits in der apikalen Plasmamembran der zilientragenden Epithelzellen der Trachea der Ratte beschrieben (Pfeil et al., 2003). Es wird angenommen, dass CHT1 hier in die Aufnahme von Cholin in die Zelle involviert ist. In der vorliegenden Arbeit wurde bei Verwendung eines affinitätsgereinigten Antikörper gegen CHT1 (Lips et al., 2003b) eine Markierung in einem schmalen Band unterhalb der β -Tubulin IV-reaktiven Zilien der zilientragenden Epithelzellen der Trachea der Ratte detektiert. Diese Lokalisation der CHT1 ist intrazellulär und weicht von der bisherigen Beschreibung ab (Pfeil et al., 2003). Dies deutet darauf hin, dass unter unterschiedlichen Fixationsbedingungen nur ein Teil des gesamten vorhandenen CHT1-Proteins nachweisbar ist. Eine Aceton-Fixierung des Gewebes führte zu einer intrazellulären Detektion des Proteins. Bei der früher publizierten immunelektronmikroskopischen Untersuchung der CHT1-Lokalisation wurde eine PFA-Fixierung des Gewebes durchgeführt (Pfeil et al., 2003). Die sowohl membranständige als auch intrazelluläre Lokalisation der CHT1 ist im Einklang mit Daten aus neuronalen Zellen. In Synapsen wird CHT1 mittels Endozytose von der Plasmamembran ins Zellinnere transportiert und ist vorwiegend in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert (Ribeiro et al., 2006). Somit könnte ein Teil des apikalen Kompartimentes ein Reservepool für Cholinesterase und CHT1 sein. Die Befunde legen nahe, dass die Cholinesterase und CHT1 für den ACh-Abbau und die Cholin-Aufnahme in die Epithelzelle zur Plasmamembran translokalisiert werden.

Es ist aus der Literatur bekannt, dass NO die Zilienschlagfrequenz erhöht und endogen in den zilientragenden Zellen synthetisiert wird (Jain et al., 1993; Sisson 1995; Runer et al., 1999; Li et al., 2000). Da eNOS im apikalen Bereich dieser Zellen unmittelbar an den Basalkörperchen lokalisiert ist (Xue et al., 1996; König et al., 2005), ist eNOS vermutlich diejenige NOS-Isoform, die eine essenzielle Rolle in der Regulation der Zilienschlagfrequenz spielt. Die Mechanismen, die sich hinter dieser

Lokalisation und der Retention der eNOS im apikalen Bereich der zilientragenden Zellen verbergen, sind unbekannt. Cav-3 interagiert direkt mit eNOS in Muskelzellen (Garcia-Cardena G et al., 1997; Williams and Lisanti, 2004). In Kardiomyozyten ist der Cav-3/eNOS-Komplex funktionell aktiv (Feron et al., 1998; Barouch et al., 2002). Diese Daten und unsere Befunde, dass beide Proteine in der gleichen apikalen Region in zilientragenden Zellen kolokalisiert sind, deuten auf eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen in zilientragenden Zellen des Atemwegsepithels hin. Eine Interaktion zwischen Cav-3 und eNOS könnte der Grund für die apikale Lokalisation von eNOS sein. Weiterhin könnte eine weitere Rolle von Cav-3 in der Organisation der Signalkaskaden, die die eNOS-Funktion regulieren, vermutet werden.

Die Existenz eines speziellen Subkompartiments des ER, das räumlich eng mit den Basalkörperchen der Zilien verbunden ist, unterstützt die These, dass dieses Subkompartiment eine entscheidende Rolle in der Regulation der Aktivität unterschiedlicher Signalmoleküle ausübt. NO und ACh sind bekannt für ihre stimulierende Wirkung auf die Zilienschlagfrequenz. Weiterhin ist das glatte ER ein Depot für Ca^{2+} , welches seinerseits Bestandteil einiger Signalkaskaden, die in der Regulation der Zilienschlagfrequenz involviert sind, ist (Salathe, 2002; Zagoory et al., 2002; Zhang und Sanderson, 2003). Es ist davon auszugehen, dass dieses spezielle Kompartiment, in dem in einem sehr engen Raum im Bereich nahe der Kinozilien Ca^{2+} -Freisetzung stattfindet und Proteine verschiedener Signalwege verbunden werden, die sich in geeigneter Position befindet, die Zilienschlagfrequenz reguliert und synchronisiert.

Ob IP3-R, CHT1 und eNOS in dem gleichen tubulovesikulären Subkompartiment lokalisiert sind oder in verschiedenen Subkompartimenten innerhalb des gleichen Kompartimentes gelegen sind, bleibt in weiteren Untersuchungen abzuklären. Eine direkte Interaktion zwischen IP3-R, CHT1 und eNOS mit Cav-3 wäre denkbar, allerdings steht der direkte Nachweis aus. Die Lokalisation einiger membranassoziierter Proteine in der apikalen subplasmalemalen Region der zilientragenden Zellen gemeinsam mit dem Vorkommen eines tubulovesikulären Membrankompartimentes ist aber ein starker Hinweis auf die Existenz eines speziellen Kompartimentes, das als Depot für diese Proteine fungieren könnte. Diese Proteine könnten zwischen der Plasmamembran und dem Kompartiment pendeln und auf diese Weise die Funktion der zilientragenden Epithelzellen beeinflussen.

VI. Zusammenfassung

Caveolae sind einerseits in den Prozess der Transzytose und in verschiedene Signaltransduktionswege involviert, können aber auch als Eintrittspforte für Krankheitserreger dienen. Caveolin (Cav)-1 und -2 sowie die als muskelspezifisch geltende Isoform Cav-3 sind die Strukturproteine von Caveolae, wobei biochemische Untersuchungen eine direkte Interaktion von Cav-1 und Cav-2 nahe legen. Obwohl im Atemwegsepithel viele Signalproteine vorkommen, wie IP3-Rezeptoren und eNOS, die in ihrer Funktion durch Caveoline reguliert werden können, ist das Vorkommen von Cav-Isoformen und von Caveolae im Atemwegsepithel bisher nicht bekannt.

Daher haben wir die Expression der mRNA und der Proteine aller drei Cav-Isoformen mittels RT-PCR und Western Blot untersucht und deren Lokalisation im Tracheal- und Bronchialepithel mittels Immunhistochemie bestimmt. Das Vorkommen von Caveolae wurde auch ultrastrukturell untersucht. Um eine enge räumliche Assoziation zwischen Cav-1 α und Cav-2 in einzelnen Zellen in Gewebeschnitten nachzuweisen, wurde eine neue Technik etabliert. Diese basiert auf indirekter Doppelimmunfluoreszenz mit nachfolgender Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Analyse im CLSM. Diese Methode wurde zunächst am Endothel etabliert und nachfolgend zur Detektion der Assoziation von Cav-1 und -2 im Epithel eingesetzt. Der statistische Vergleich von FRET_{eff} und Δ IF zeigte deutlich, dass Δ IF viel sensitiver und spezifischer zwischen Versuchs- und Kontrollbedingungen diskriminiert. Im Prinzip sind weder die Wahl des sekundären Reagenzes noch der Applikationsmodus entscheidend für das FRET-Ergebnis. Entscheidend sind die Spezifität der Antikörper und eine kontrollierte Stabilität des Messsystems. Diese Technik bietet die Möglichkeit, Einblicke in Protein-Protein-Interaktionen in Gewebeschnitten von normalem sowie auch pathologisch verändertem Gewebe zu gewinnen, einschließlich der Untersuchung von humanen Proben, die durch chirurgische Eingriffe erlangt und über Jahre archiviert wurden.

Protein und mRNA für alle drei Cav-Isoformen wurden im abgeschabtem Trachealepithel und in der Lunge detektiert. Immunhistochemisch wurden Cav-1 und Cav-2 in den Basalzellen und alle drei Cav-Isoformen in den zilientragenden Zellen der großen Atemwege nachgewiesen. Cav-1 α - und Cav-2-Immunreaktivität waren in

den zilientragenden Zellen an der basolateralen Plasmamembran kolokalisiert, wo auch ultrastrukturell Caveolae gefunden wurden. Cav-3-Immunreaktivität fand sich in diesen Zellen dagegen apikal, kolokalisiert mit eNOS und CHT1. Diese Proteine sind in der Regulation der Zilienschlagfrequenz beteiligt. Hier waren ultrastrukturell keine Caveolae nachweisbar, hingegen fand sich unter den Basalkörperchen der Zilien ein tubulovesikuläres Netzwerk, das sich in engem Kontakt mit den Mitochondrien befand. In Cav-1-defizienten Mäusen fanden sich im Epithel weder Cav-1 α -Immunreaktivität noch Caveolae, wobei in Wildtyp-Mäusen Cav-1 α und Caveolae in den Basalzellen vorhanden waren. Im Gegensatz zur Ratte besaßen die zilientragenden Zellen der Maus weder Cav-1 α -Immunreaktivität noch Caveolae. Mittels FRET-CLSM-Analyse konnten wir auf Einzelzellebene im Atemwegsepithel der Ratte eine Assoziation von Cav-1 α und Cav-2 nachweisen.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Caveolae und alle Cav-Isoformen in Bronchial- und Trachealepithel vorhanden sind, wobei eine direkte Interaktion von Cav-1 α und Cav-2 angenommen werden kann. Die Ergebnisse weisen auf Funktionen aller drei Cav-Isoformen in Signaltransduktionswegen des Atemwegsepithels hin. Im apikalen Bereich der zilientragenden Zellen befindet sich ein tubulovesikuläres Kompartiment, das durch Cav-3 organisiert und in der Regulation der Zilienschlagfrequenz involviert sein könnte. Cav-1 und Cav-2 führen zur Bildung von Caveolae in Basalzellen und zilientragenden Zellen.

Eine weitere Aufklärung der Funktion von Cav-1, -2 und -3 im Atemwegsepithel *in situ* ist besonders im Hinblick auf die in dieser Arbeit gefundene neue Lokalisation der Caveoline wichtig. Die Grundlagen hierfür konnten durch die hier vorliegende Arbeit geschaffen werden.

VII. Summary

Caveolae are involved in diverse cellular functions such as transcytosis and signal transduction, and on the other hand they also may serve as entry sites for microorganisms. Caveolin (cav)-1 and -2 as well as the cav-3 isoform that is generally believed to be muscle specific are structure proteins of caveolae. Biochemical studies suggest a direct interaction between cav-1 and cav-2. Several proteins involved in signal transduction such as IP3 receptors and eNOS that are regulated in their function by caveolins are present in the airway epithelium. Hence, their occurrence in the epithelium of the airways might be expected but, nonetheless, has not yet been examined.

Western blotting, real-time quantitative PCR analysis of abraded tracheal epithelium and laser-assisted microdetection combined with subsequent mRNA analysis were used to examine the expression of the cav isoforms in rat tracheal epithelium. Fluorescence immunohistochemistry was performed to locate cav-1, -2 and -3 in the airway epithelium. Electron-microscopic analyses were used for identification of caveolae. To identify the association of cav-1 and cav-2 in single cells in tissue, we established a new method. It is based on indirect double-labeling immunofluorescence combined with conventional confocal laser scanning microscopy (CLSM) to measure fluorescence resonance energy transfer (FRET). The interaction of cav-1 and cav-2 was at first examined in vascular endothelial cell in fixed tissue of rats and human glomus tumors. Subsequently, this technique was applied for detection of the interaction of both proteins in the epithelium. Several methodological aspects were examined. Statistical comparison of $FRET_{eff}$ and ΔIF clearly shows that ΔIF is more sensitive and more specific to discriminate control from experimental conditions. In principle, neither the choice of the secondary reagents nor the mode of application is a major determinant of success. Determining factors are the specificity of the antibodies and the stability of the imaging system. The method opens up the possibility to gain insight into protein-protein interactions in tissue sections in normal as well as in human material derived from surgical procedures and stored for extended times.

Protein and mRNA for all three cav isoforms were detected in abraded tracheal epithelial cells and in the lung. Immunoreactivities for cav-1 and -2 were observed in

the basal cells, and for all three cav isoforms in the ciliated cells of the large airways. Cav-1 and cav-2 were colocalized in the basal cells and at the baso-lateral plasma membrane of the ciliated cells, where ultrastructurally caveolae were found. Cav-3-immunolabeling was confined to the apical region of the ciliated cells and was colocalized with eNOS- and CHT-1-immunoreactivity. These proteins are involved in the regulation of the ciliary beat frequency. No caveolae were found in the apical plasma membrane of ciliated cells by electron microscopy but a tubulovesicular network was present in the apical region that reached up to the basal bodies of the cilia and was in contact with mitochondria. In contrast to human and rat, cav-1-immunoreactivity and caveolae were confined to basal cells in mice. Epithelial caveolae were absent in cav-1-deficient mice, implicating a requirement of this caveolar protein in epithelial caveolae formation. The ciliated cells of mice were devoid of cav-1-immunoreactivity and caveolae. Using conventional double-labeling immunofluorescence combined with CLSM-FRET analysis, we detected an association of cav-1 α and cav-2 in epithelial cells.

These results show that caveolae and all three cav isoforms are present in the bronchial and tracheal epithelium where a direct interaction between cav-1 and cav-2 can be assumed. The findings of this work point towards a role of all three cav isoforms in signal transduction pathways in airway epithelium. A specialized subplasmalemmal tubulovesicular compartment was found to be localized in the apical region of the ciliated cells that might be organized from cav-3 and be involved in the regulation of the ciliary beat frequency. Cav-1 and cav-2 lead to formation of caveolae in basal and in ciliated cells.

In the face of this newly recognized localisation of caveolins further investigations for defining the function of cav-1, -2 and -3 in airway epithelium *in situ* will be required. The present work provides the basic knowledge and a starting point for this line of research.

VIII. Literaturverzeichnis

1. Anderson RG, Chen Y, Norkin LC. Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol Biol Cell* 1996; 7: 1825-1834.
2. Andries LJ, Brutsaert DL, Sys SU. Nonuniformity of endothelial constitutive nitric oxide synthase distribution in cardiac endothelium. *Circ Res* 1998; 82: 195-203.
3. Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JA, Berkowitz DE, Hare JM. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* 2002; 416: 337-339.
4. Barrera NP, Morales B, Villalon M. Plasma and intracellular membrane inositol 1,4,5-trisphosphate receptors mediate the Ca(2+) increase associated with the ATP-induced increase in ciliary beat frequency. *Am J Physiol - Cell Physiol* 2004; 287: C1114-1124.
5. Bastiaens PI, Majoul IV, Verveer PJ, Söling HD, Jovin TM. Imaging the intracellular trafficking and state of the AB₅ quaternary structure of cholera toxin. *EMBO J* 1996; 15: 4246-4253.
6. Bloch W, Fleischmann BK, Lorke DE, Anderssen C, Hops B, Hescheler J, Addicks K. Nitric oxide synthase expression and role during cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 675-684.
7. Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res* 1999; 31: 577-596.
8. Brown D, Rose JK. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 1992; 68: 533-544.
9. Brown DA, London E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998; 14: 111-136.
10. Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, Acevedo L, Roviezzo F, Cirino G, Sessa WC. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med* 2000; 6:1362-1367.

11. Bush KT, Stuart RO, Li SH, Moura LS, Sharp AH, Ross CA, Nigam SK. Epithelial inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. Multiplicity of localization, solubility, and isophorms. *J Biol Chem* 1996; 269: 23694-23699.
12. Cameron PL, Ruffin JW, Bollag R, Rasmussen H, Cameron RS. Identification of caveolin and caveolin-related proteins in the brain. *J Neurosci* 1997; 17: 9520-9535.
13. Capozza F, Cohen AW, Cheung MW-C, Sotgia F, Schubert W, Battista M, Lee H, Frank PG, Lisanti MP. Muscle-specific interaction of caveolin isoforms: differential complex formation between caveolins in fibroblastic vs. muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: C677-C691.
14. Chambliss KL, Shaul PW. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev* 2002; 23: 665-86.
15. Chen Y, Norkin LC. Extracellular simian virus 40 transmits a signal that promotes virus enclosure within caveolae. *Exp Cell Res* 1999; 246: 83-90.
16. Clegg RM. Fluorescence resonance energy transfer. In Fluorescence imaging spectroscopy and microscopy. *Wiley, New York* 1996; 179-252.
17. Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP. Role of caveolins in health and disease. *Physiol Rev* 2004; 84: 1341-1379.
18. Colin M, Maily L, Rogee S, D'Halluin JC. Efficient species C HAdV infectivity in plasmocytic cell lines using a clathrin-independent lipid raft/caveola endocytic route. *Mol Ther* 2005;11: 224-236.
19. Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem* 1997a; 272: 6525-6533.
20. Couet J, Sargiacomo M, Lisanti MP. Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J Biol Chem* 1997b; 272: 30429-30438.
21. Crouch E, Parghi D, Kuan SF, Persson A. Surfactant protein D: subcellular localization in nonciliated bronchiolar epithelial cells. *Am J Physiol* 1992; 263: L60-66.
22. Darby PJ, Kwan CY, Daniel EE. Caveolae from canine airway smooth muscle contain the necessary components for a role in Ca(2+) handling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: L1226-L1235.

23. Das K, Lewis RY, Scherer PE, Lisanti MP. The membrane-spanning domains of caveolins-1 and -2 mediate the formation of caveolin hetero-oligomers. Implications for the assembly of caveolae membranes in vivo. *J Biol Chem* 1999; 274: 18721-18728.
24. Di Benedetto G, Manara-Sheridiac FS, Mehta A. Effect of cyclic AMP on ciliary activity of human respiratory epithelium. *Eur Respir J* 1991; 4: 789-795.
25. Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM. Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem* 1995; 270: 6838-6842.
26. Drab M, Verlade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Meine J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia TV. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 2001; 293:2449-2452.
27. Drenckhahn D, Hofmann HD, Mannherz HG. Evidence for the association of villin with core filaments and rootlets of intestinal epithelial microvilli. *Cell Tissue Res* 1983; 228: 409-414.
28. Dupree P, Parton RG, Raposo G, Kurzchalia TV, Simons K. Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *EMBO J* 1993; 12: 1597-1605.
29. Ehrhardt C, Collnot E-M, Baldes C, Becker U, Laue M, Kim K-J, Lehr C-M. Towards an in vitro model of cystic fibrosis small airway epithelium: characterisation of the human bronchial epithelial cell line CFBE410^o. *Cell Tissue Res* 2006; 323: 405-415.
30. Engelman JA, Wykoff CC, Yasuhara S, Song KS, Okamoto T, Lisanti MP. Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *J Biol Chem* 1997; 272: 16374-16381.
31. Feng Y, Venema VJ, Venema RC, Tsai N, Behzadian MA, Caldwell RB. VEGF-induced permeability increase is mediated by caveolae. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 157-167.
32. Feron O, Dessy C, Opel DJ, Arstall MA, Kelly RA, Michel T. Modulation of the endothelial nitric-oxide synthase-caveolin interaction in cardiac myocytes. Implications for the autonomic regulation of heart rate. *J Biol Chem* 1998; 273: 30249-30254.

33. Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 22810-22814.
34. Feron O, Smith TW, Michel JB, Kelly RA. Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in the cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1997; 272: 17744-17748.
35. Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG. Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. *J Biol Chem* 1994; 269: 30745-30748.
36. Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG. De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8655-8659.
37. Fujimoto T. Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J Cell Biol* 1993; 120: 1147-1157.
38. Fujimoto T, Kogo H, Nomura R, Une T. Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *J Cell Biol* 2000; 113: 3509-3517.
39. Fulton D, Fontana J, Sowa G, Gratton JP, Lin M, Li KX, Michell B, Kemp BE, Rodman D, Sessa WC. Localization of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylated on serine 1179 and nitric oxide in Golgi and plasma membrane defines the existence of two pools of active enzyme. *J Biol Chem* 2002; 277: 4277-4284.
40. Furchgott RF. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Biosci Rep* 1999; 19: 235-251.
41. Gabella G. Quantitative morphological study of smooth muscle cells of the guinea-pig taenia coli. *Cell Tissue Res* 1976; 170: 161-186.
42. Galbiati F, Engelman JA, Volonte D, Zhang XL, Minetti C, Li M, Hou H, Kneitz B, Edelmann W, Lisanti MP. Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex and T-tubule abnormalities. *J Biol Chem* 2001; 276: 21425-21433.
43. Galbiati F, Volonte D, Engelman JA, Watanabe G, Burk R, Pestell RG, Lisanti MP. Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. *EMBO J* 1998; 17: 6633-6648.

44. Garard PG, Kennedy JR. Calcium regulation of ciliary activity in rabbit tracheal epithelial explants and outgrowth. *Eur J Cell Biol* 1986; 40: 203-209.
45. Garcia-Cardena G, Fan R, Stern DF, Liu J, Sessa WC. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J Biol Chem* 1996; 271: 27237-27240.
46. Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, Sessa WC. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem* 1997; 272: 25437-25440.
47. Garini Y, Vermolen BJ, Young IT. From micro to nano: recent advances in high-resolution microscopy. *Curr Opin Biotechnol* 2005; 16: 3-12.
48. Geary CA, Davis CW, Paradiso AM, Boucher RC. Role of CNP in human airways: cGMP-mediated stimulation of ciliary beat frequency. *Am J Physiol* 1995; 268: L1021-L1028.
49. Ghosh S, Gachhui R, Crooks C, Wu C, Lisanti MP, Stuehr DJ. Interaction between caveolin-1 and the reductase domain of endothelial nitric-oxide synthase. Consequences for catalysis. *J Biol Chem* 1998; 273: 22267-22271.
50. Gil J. Number and distribution of plasmalemmal vesicles in the lung. *Fed Proc* 1983; 42: 2414-2418.
51. Girard PR, Kennedy JR. Calcium regulation of ciliary activity in rabbit tracheal epithelial explants and outgrowth. *Eur J Cell Biol* 1986; 40: 203-209.
52. Glenney JR Jr. The sequence of human caveolin reveals identity with VIP21, a component of transport vesicles. *FEBS Lett* 1992; 314: 45-48.
53. Glenney JR Jr, Soppet D. Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10517-10521.
54. Gödeke A, Heinicke T, Kamkin A, Kiseleva I, Strasser RH, Decking UK, Stumpe T, Isenberg G, Schrader J. Inotropic response to beta-adrenergic receptor stimulation and anti-adrenergic effect of Ach in endothelial NO synthase-deficient mouse hearts. *J Physiol* 2001; 532: 195-204.
55. Gordon GW, Berry G, Liang XH, Levine B, Herman B. Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophys J* 1998; 74: 2702-2713.

56. Govers R, van der Sluijs P, van Donselaar E, Slot JW, Rabelink TJ. Endothelial nitric oxide synthase and its negative regulator caveolin-1 localize to distinct perinuclear organelles. *J Histochem Cytochem* 2002; 50: 779-788.
57. Graf J, Stockinger L. Endoplasmatisches Retikulum und Reizleitung im Flimmerepithel. Darstellung der Cholinesterase. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 1966; 72: 184-192.
58. Grassmé H, Jendrossek V, Riehle A, von Kürthy G, Berger J, Schwarz H, Weller M, Kolesnick R, Gulbins E. Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat Med* 2003; 9: 322-330.
59. Gu Y, Di WL, Kellsell DP, Zicha D. Quantitative fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurement with acceptor photobleaching and spectral unmixing. *J Microsc* 2004; 215: 162-173.
60. Gumbleton M. Caveolae are potential macromolecule trafficking compartments within alveolar epithelium. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 49: 281-300.
61. Haasemann M, Cartaud J, Müller-Esterl W, Dunia I. Agonist-induced redistribution of bradykinin B2 receptor in caveolae. *J Cell Sci* 1998; 111: 917-928.
62. Hailstones D, Slier LS, Parton RG, Stanley KK. Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells. *J Lipid Res* 1998; 39: 369-379.
63. Hanamoto M, Inoue T. Scanning electron microscopic observations on the intracellular structures of the ciliated tracheal epithelium - especially on the morphological differences between conventional rats and specific pathogen-free rats. *Yonago Acta Medica* 2000; 43: 19-25.
64. Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 1982; 143: 29-36.
65. Harris LJ, Skaletsky E, McPherson A. Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *J Mol Biol* 1998; 275: 861-872.
66. Hayashi T, Kawakami M, Sasaki S, Katsumata T, Mori H, Yoshida H, Nakahari T. ATP regulation of ciliary beat frequency in rat tracheal and distal airway epithelium. *Exp Physiol* 2005; 90: 535-544.
67. Head BP, Patel HH, Roth DM, Lai NC, Niesman IR, Farquhar MG, Insel PA. G-protein-coupled receptor signaling components localize in both sarcolemmal

- and intracellular caveolin-3-associated microdomains in adult cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2005; 280: 31036-31044.
68. Holgate ST. Epithelial damage and response. *Clin Exp Allergy* 2000; Suppl 1: 37-41.
69. Igarashi J, Michel T. Agonist-modulated targeting of the EDG-1 receptor to plasmalemmal caveolae. eNOS activation by sphingosine 1-phosphate and the role of caveolin-1 in sphingolipid signal transduction. *J Biol Chem* 2000; 275: 32363-32370.
70. Ignarro LJ. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci Rep* 1999; 19: 51-71.
71. Imelli N, Meier O, Boucke K, Hemmi S, Greber UF. Cholesterol is required for endocytosis and endosomal escape of adenovirus type 2. *J Virol* 2004; 78: 3089-3098.
72. Jagannadham MV, Sharadadevi A, Nagaraj R. Effects of deleting a tripeptide sequence observed in muscular dystrophy patients on the conformation of synthetic peptides corresponding to the scaffolding domain of caveolin-3. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298: 203-206.
73. Jain B, Rubinstein I, Robbins RA, Leise KL, Sisson JH. Modulation of airway epithelial cell ciliary beat frequency by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191: 83-88.
74. Jares-Erijman EA, Jovin TM. FRET imaging. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 1387-1395.
75. Jongsma AP, Hijmans W, Ploem JS. Quantitative immunofluorescence. Standardization and calibration in microfluorometry. *Histochemie* 1971; 25: 329-343.
76. Kasper M, Hofer D, Woodcock-Mitchell J, Migheli A, Attanasio A, Rudolf T, Muller M, Drenckhahn D. Colocalization of cytokeratin 18 and villin in type III alveolar cells (brush cells) of the rat lung. *Histochemistry* 1994; 101: 57-62.
77. Kasper M, Sims G, Koslowski R, Kuss H, Thuemmler M, Fehrenbach H, Auten RL. Increased surfactant protein D in rat airway goblet and Clara cells during ovalbumin-induced allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 1251-1258.
78. Kenworthy A. Peering inside lipid rafts and caveolae. *Trends Biochem Sci* 2002; 27: 435-437.

79. Kenworthy AK. Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods* 2001; 24: 289-296.
80. Kenworthy AK, Petranova N, Edidin M. High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes. *Mol Biol Cell* 2000; 11: 1645-1655.
81. Kobayashi K, Salathé M, Pratt M, Cartagena NJ, Soloni F, Seybold ZV, Wanner A. Mechanism of hydrogen peroxide-induced inhibition of sheep airway cilia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 6: 667-673.
82. Kogo H, Aiba T, Fujimoto T. Cell type-specific occurrence of caveolin-1 alpha and -1 beta in the lung caused by expression of distinct mRNAs. *J Biol Chem* 2004; 279: 25574-25581.
83. Kogo H, Ishiguro K, Kuwaki S, Fujimoto T. Identification of a splice variant of mouse caveolin-2 mRNA encoding an isoform lacking the C-terminal domain. *Arch Biochem Biophys* 2002; 401: 108-114.
84. Kogo H, Fujimoto T. Caveolin-1 isoforms are encoded by distinct mRNAs. Identification of mouse caveolin-1 mRNA variants caused by alternative transcription initiation and splicing. *FEBS Lett* 2000; 465: 119-123.
85. König P, Dedio J, Oess S, Papadakis T, Fischer A, Müller-Esterl W, Kummer W. NOSIP and its interacting protein, eNOS, in the rat trachea and lung. *J Histochem Cytochem* 2005; 53: 155-164.
86. Kurzchalia TV, Dupree P, Parton RG, Kellner R, Virta H, Lehnert M, Simons K. VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *J Cell Biol* 1992; 118: 1003-1014.
87. Lack EE. Pathology of adrenal and extra-adrenal paraganglia. W. B. Sanders; Philadelphia, USA, 1994.
88. Lansley AB, Sanderson MJ, Dirksen ER. Control of the beat cycle of respiratory tract cilia by Ca^{2+} and cAMP. *Am J Physiol* 1992; 263: L232-L242.
89. Lassinig C, Sanchez CM, Egerbacher M, Walter I, Majer S, Kolbe T, Pallares P, Enjuanes L, Müller M. Development of a transgenic mouse model susceptible to human coronavirus 229E. *PNAS* 2005; 102: 8275-8280.
90. Li C, Duan W, Yang F, Zhang X. Caveolin-3-anchored microdomains at the rabbit sarcoplasmic reticulum membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 344: 1135-1140.

91. Li D, Shirakami G, Zhan X, Johns RA. Regulation of ciliary beat frequency by the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate signaling pathway in rat airway epithelial cells. *Am J Resp Cell Mol Biol* 2000; 23: 175-181.
92. Li S, Couet J, Lisanti MP. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1996; 271: 29182-29190.
93. Li S, Galbiati F, Volonte D, Sargiacomo M, Engelman JA, Das K, Scherer PE, Lisanti MP. Mutational analysis of caveolin-induced vesicle formation. Expression of caveolin-1 recruits caveolin-2 to caveolae membranes. *FEBS Lett* 1998; 434: 127-134.
94. Lips KS, Pfeil U, Becker A-D, Eberling L, Grau V, Haberberger RV, Schmidt BM, Arndt P, Koepsell H, Kummer W. Komponenten des Acetylcholinsynthese und -freisetzungsmechanismus im Trachealepithel der Ratte. *Ann Anat* 2003a; (Suppl) 185.
95. Lips KS, Pfeil U, Haberberger RV, Kummer W. Localisation of the high-affinity choline transporter-1 in the rat skeletal motor unit. *Cell Tissue Res* 2002; 307: 275-280.
96. Lips KS, Pfeil U, Reiners K, Rimasch C, Kuchelmeister K, Braun-Dullaeus RC, Haberberger RV, Schmidt R, Kummer W. Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in rat and human arteries. *J Histochem Cytochem.* 2003b; 51: 1645-1654.
97. Lips KS, Volk C, Schmidt BM, Pfeil U, Arndt P, Miska D, Kummer W, Koepsell H. Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33:79-88.
98. Lisanti MP, Scherer PE, Tang Z, Sargiacomo M. Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends Cell Biol* 1994a; 4: 231-235.
99. Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z-L, Hermanoski-Vosatka A, Tu Y-H, Cook RF, Sargiacomo M. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: Implications for human disease. *J Cell Biol* 1994b; 126: 111-126.

100. Liu J, Lee P, Galbiati F, Kitsis RN, Lisanti MP. Caveolin-1 expression sensitizes fibroblastic and epithelial cells to apoptotic stimulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: C823-835.
101. Liu J, Oh P, Horner T, Rogers RA, Schnitzer JE. Organized endothelial cell surface signal transduction in caveolae distinct from glycosylphosphatidylinositol-anchored protein microdomains. *J Biol Chem* 1997; 272: 7211-7222.
102. Luetterforst R, Stang E, Zorzi N, Carozzi A, Way M, Parton RG. Molecular characterization of caveolin association with the Golgi complex: identification of a cis-Golgi targeting domain in the caveolin molecule. *J Cell Biol* 1999; 145:1443-1459.
103. Maurer WHL, Lehmacher W. Multiple comparisons in drug clinical trials and preclinical assays: a priori ordered hypothesis. In: Vollmar J (ed). *Biometrie in der Chemisch-Pharmazeutischen Industrie*. Fischer: Stuttgart, 1995; 3-18.
104. Meier O, Greber UF. Adenovirus endocytosis. *J Gene Med* 2004; 6 (Suppl. 1): S152-S163.
105. Melville GN, Irvani J. Factors affecting ciliary beat frequency in the intrapulmonary airways of rat. *J Physiol Pharmacol* 1975; 53: 1122-1128.
106. Michel JB, Feron O, Sase K, Prabhakar P, Michel T. Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1997; 272: 25907-25912.
107. Mills JD, Stone JR, Rubin DG, Melon DE, Okonkwo DO, Periasamy A, Helm GA. Illuminating protein interactions in tissue using confocal and two-photon excitation fluorescent resonance energy transfer microscopy. *J Biomed Opt* 2003; 8: 347-356.
108. Mineo C, Anderson RG. A vacuolar-type proton ATPase mediates acidification of plasmalemmal vesicles during potocytosis. *Exp Cell Res* 1996; 224: 237-242.
109. Mineo C, Gill GN, Anderson RG. Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae. *J Biol Chem* 1999; 274: 30636-30643.
110. Mobley BA, Eisenberg BR. Sizes of components in frog skeletal muscle measured by methods of stereology. *J Gen Physiol* 1975; 66: 31-45.

111. Monier S, Parton RG, Vogel F, Behlke J, Henske A, Kurzchalia TV. VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell* 1995; 6: 911-927.
112. Mora R, Bonilha VL, Marmorstein PE, Scherer PE, Brown D, Lisanti MP, Rodriguez-Boulan E. Caveolin-2 lokalizes to the Golgi complex but redistributes to plasma membrane, caveolae and rafts when coexpressed with caveolin-1. *J Biol Chem* 1999; 274: 25708-25717.
113. Napolitano LM. The differentiation of white adipose cells. An electron microscope study. *J Cell Biol* 1963; 18: 663-679.
114. Ng T, Squire A, Hansra G, Bornancin F, Prevostel C, Hanby A, Harris W, Barnes D, Schmidt S, Mellor H, Bastiaens PI, Parker PJ. *Science* 1999; 283: 2085-2089.
115. Nomura R, Kiyota A, Suzaki E, Kataoka K, Miyamoto K, Senda T, Fujimoto T. Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae. *J Virol* 2004; 78: 8701-8708.
116. Norkin LC, Caveolae in the uptake and targeting of infectious agents and secreted toxins. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 49: 301-315.
117. Norkin LC, Anderson HA, Wolfrom SA, Oppenheim A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 is followed by brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmatic reticulum, where the virus disassembles. *J Virol* 2002; 76: 5156-5166.
118. Oh P, McIntosh DP, Schitzer JE. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fussion from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol* 1998; 141: 101-114.
119. Okuda T, Haga T. Functional charakterization of the human high-affinity choline transporter. *FEBS Lett* 2000a; 484: 92-97.
120. Okuda T, Haga T, Kanai Y, Endou H, Ishihara T, Katsura I. Identification and characterisation of the high-affinity choline transporter. *Nat Neurosci* 2000b; 3: 120-125.
121. Okuda T, Okamura M, Kaitsuka C, Haga T, Gurwitz D. Single nucleotide polymorphism of the human high affinity choline transporter alters transport rate. *J Biol Chem* 2002; 277: 45315-45322.

122. Orlichenko L, Huang B, Krueger E, McNiven MA. EGF-induced phosphorylation of caveolin 1 at tyrosine 14 stimulates caveolae formation in epithelial cells. *J Biol Chem* 2006; 281: 4570-4579.
123. Palade GE. Fine structure of blood capillaries. *J Appl Physiol* 1953; 24: 1424-1436.
124. Parolini I, Sagiacomio M, Galbiati F, Rizzo G, Grignani F, Engelmann JA, Okamoto T, Ikezu T, Scherer PE, Mora R, Rodriguez-Boulan E, Peschle C, Lisanti MP. Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the Golgi complex. *J Biol Chem* 1999; 274: 25718-25725.
125. Parton RG. Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 542-548.
126. Parton RG, Joggerst B, Simons K. Regulated internalization of caveolae. *J Cell Biol* 1994; 127: 1199-1215.
127. Parton RG, Way M, Zorzi N, Stang E. Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. *J Cell Biol* 1997; 136: 137-154.
128. Pavelka M, Ronge HR, Stockinger G. Untersuchungen am Trachealepithel verschiedener Säuger. *Acta anat* 1976; 94: 262-282.
129. Pelkman L, Helenius A. Endocytosis via caveolae. *Traffic* 2002; 3: 311-320.
130. Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 473-483.
131. Pelkmans L, Puntener D, Helenius A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* 2002; 296: 535-539.
132. Pfeil U, Lips KS, Eberling L, Grau V, Haberberger RV, Kummer W. Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the rat trachea. *AM J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28: 473-477.
133. Pickles RJ, Barker PM, Ye H, Boucher RC. Efficient adenovirus-mediated gene transfer to basal but not columnar cells of cartilaginous airway epithelia. *Hum Gene Ther* 1996;7: 921-931.

134. Prabhakar P, Thatte HS, Goetz RM, Cho MR, Golan DE, Michel T. Receptor-regulated translocation of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 1998; 273: 27383-27388.
135. Raposo G, Dunia I, Delavier-Klutchko C, Kaveri S, Strosberg AD, Benedetti EL. Internalization of beta-adrenergic receptor in A431 cells involves non-coated vesicles. *Eur J Cell Biol* 1989; 50: 340-352.
136. Raposo G, Dunia I, Marullo S, Andre C, Guillet JG, Strosberg AD, Benedetti EL, Hoebeke J. Redistribution of muscarinic acetylcholine receptors on human fibroblasts induced by regulatory ligands. *Biol Cell* 1987; 60:117-123.
137. Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, Marks CB, Macaluso F, Russell RG, Li M, Pestell RG, Di Vizio D, Hou H Jr, Kneitz B, Lagaud G, Christ GJ, Edelmann W, Lisanti MP. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem* 2001a; 276:38121-38138.
138. Razani B, Wang XB, Engelman JA, Battista M, Lagaud G, Zhang XL, Kneitz B, Hou H Jr, Christ GJ, Edelmann W, Lisanti MP. Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 2329-2344.
139. Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 431-467.
140. Razani B, Zhang XL, Bitzer M, von Gersdorff G, Böttinger EP, Lisanti MP. Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF- β)/SMAD signaling through an interaction with the TGF- β /SMAD Type I receptor. *J Biol Chem* 2001b; 276: 6727-6738.
141. Reiner M, Bloch W, Addicks K. Functional interaction of caveolin-1 and eNOS in myocardial capillary endothelium revealed by immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 1605-1610.
142. Ribeiro FM, Black SA, Prado VF, Rylett RJ, Ferguson SS, Prado MA. (). The "ins" and "outs" of the high-affinity choline transporter CHT1. *J Neurochem* 2006; 97: 1-12.
143. Ricciardolo FL. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax* 2003; 58: 175-182.

144. Rizzo V, McIntosh DP, Oh P, Schnitzer JE. In situ flow activates endothelial nitric oxide synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid caveolin dissociation and calmodulin association. *J Biol Chem* 1998; 273: 34724-34729.
145. Rizzuto R, Pozzan T. Microdomains of intercellular Ca²⁺ molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev* 2006; 86: 369-408.
146. Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, Sandvig K. Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 961-974.
147. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 1992; 68: 673-682.
148. Ruiz-Velasco V, Ikeda SR. Functional expression and FRET analysis of green fluorescent proteins fused to G-protein subunits in rat sympathetic neurons. *J Physiol* 2001; 537 (Pt 3): 679-692.
149. Runer T, Lindberg S. Ciliostimulatory effects mediated by nitric oxide. *Acta Otolaryngol* 1999; 119: 821-815.
150. Rybin VO, Grabham PW, Elouardighi H, Steinberg SF. Caveolae-associated proteins in cardiomyocytes: caveolin-2 expression and interactions with caveolin-3. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H325-H332.
151. Rybin VO, Xu X, Lisanti MP, Steinberg SF. Differential targeting of beta-adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae. A mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway. *J Biol Chem* 2000; 275: 41447-41457.
152. Sabanayagam CR, Eid JS, Meller A. Using fluorescence resonance energy transfer to measure distances along individual DNA molecules: corrections due to nonideal transfer. *J Chem Phys* 2005; 122: 061103.
153. Salathe M. Effects of beta-agonists on airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110 (6 Suppl): S275-281.
154. Salathé M, Bookman RJ. Coupling of [Ca²⁺]_i and ciliary beating in cultured tracheal epithelial cells. *J Cell Sci* (1995) 108: 431-440.
155. Salathe M, Lipson EJ, Ivonnet PI, Bookman RJ. Muscarinic signalling in ciliated tracheal epithelial cells: dual effects on Ca²⁺ and ciliary beating. *Am J Physiol* 1997; 272: 301-310.

156. Sargiacomo M, Scherer PE, Tang Z, Kubler E, Song KS, Sanders MC, Lisanti MP. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9407-9411.
157. Scherer PE, Lewis RY, Volonte D, Engelman JA, Galbiati F, Couet J, Kohtz DS, van Donselaar E, Peters P, Lisanti MP. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem* 1997; 272: 29337-29346.
158. Scherer PE, Lisanti MP, Baldini G, Sargiacomo M, Mastick CC, Lodish HF. Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles. *J Cell Biol* 1994; 127: 1233-1243.
159. Scherer PE, Okamoto T, Chun M, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP. Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 131-135.
160. Scherer PE, Tang Z-L, Chun MC, Sargiacomo M, Lodish HF, Lisanti MP. Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution: Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J Biol Chem* 1995; 270: 16395-16401.
161. Schlegel A, Lisanti MP. A molecular dissection of caveolin-1 membrane attachment and oligomerization. Two separate regions of the caveolin-1 C-terminal domain mediate membrane binding and oligomer/oligomer interactions in vivo. *J Biol Chem* 2000; 275: 21605-21617.
162. Schnitzer JE, Oh P, Jacobson BS, Dvorak AM. Caveolae from luminal plasmalemma of rat lung endothelium: microdomains enriched in caveolin, Ca(2+)-ATPase, and inositol trisphosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1759-1763.
163. Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* 1994 ; 127: 1217-1232.
164. Schwab W, Galbiati F, Volonte D, Hempel U, Wenzel K-W, Funk RHW, Lisanti MP, Kasper M. Characterisation of caveolins from cartilage: expression of caveolin-1, -2 and -3 in chondrocytes and in alginate cell culture of the rat tibia. *Histochem Cell Biol* 1999; 112: 41-49.

165. Schwab W, Hempel U, Funk RH, Kasper M. Ultrastructural identification of caveolae and immunocytochemical as well as biochemical detection of caveolin in chondrocytes. *Histochem J*, 1999; 31:315-320.
166. Schwenke C, Okumura S, Yamamoto M, Geng YJ, Ishikawa Y. Colocalization of beta-adrenergic receptors and caveolin within the plasma membrane. *J Cell Biochem* 1999; 75: 64-72.
167. Schubert W, Frank PC, Razani B, Park DS, Chow CW, Lisanti MP. Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *J Biol Chem* 2001; 276: 48619-48622.
168. Sharma N, Hewett J, Ozelius LJ, Ramesh V, McLean PJ, Breakefield XO, Hyman BT. A close association of torsinA and alpha-synuclein in Lewy bodies: a fluorescence resonance energy transfer study. *Am J Pathol* 2001; 59: 339-344.
169. Sharp AH, Snyder SH, Nigam SK. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. Localization in epithelial tissue. *J Biol Chem* 1992; 267: 7444-7449.
170. Shin JS, Gao Z, Abraham SN. Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. *Science* 2000; 289: 785-788.
171. Simionescu N, Simionescu M, Palade GE. Permeability of muscle capillaries to small heme-peptides. Evidence for the existence of patent transendothelial channels. *J Cell Biol* 1975 ; 64: 586-607.
172. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 31-39.
173. Singer SJ, Nelson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Wash DC* 1972; 175: 720-731.
174. Sisson JH. Ethanol stimulates apparent nitric oxide-dependent ciliary beat frequency in bovine airway epithelial cells. *Am J Physiol* 1995; 268 (4 Pt 1): L596-600.
175. Smythe GM, Eby JC, Disatnik MH, Rando TA. A caveolin-3 mutant that causes limb girdle muscular dystrophy type 1C disrupts Src localization and activity and induces apoptosis in skeletal myotubes. *J Cell Sci* 2003; 116 (Pt 23): 4739-4749.
176. Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, Chu C, Kohtz DS, Lisanti MP. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-

- fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem* 1996; 271: 15160-15165.
177. Song KS, Tang Z, Li S, Lisanti MP. Mutational analysis of the properties of caveolin-1. A novel role for the C-terminal domain in mediating homo-typic caveolin-caveolin interactions. *J Biol Chem* 1997; 272: 4398-4403.
178. Sotgia F, Razani B, Bonuccelli G, Schubert W, Battista M, Lee H, Capozza F, Schubert AL, Minetti C, Buckley JT, Lisanti MP. Intracellular Retention of Glycosylphosphatidyl Inositol-Linked Proteins in Caveolin-Deficient Cells. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 3905-3926.
179. Sugiyama T, Yamamoto-Hino M, Wasano K, Mikoshiba K, Hasegawa M. Subtype-specific expression patterns of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors in rat airway epithelial cells. *J Histochem Cytochem* 1996; 44: 1237-1242.
180. Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* 1996; 271: 2255-2261.
181. Thiele C, Hannah MJ, Fahrenholz F, Huttner WB. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 42-49.
182. Verdugo P, Johnson NT, Tam PY. β -adrenergic stimulation of respiratory ciliary activity. *J Appl Physiol* 1980; 48: 868-871.
183. Verdugo P, Raess BV, Villalon M. The role of calmodulin in the regulation of ciliary movement in mammalian epithelial cilia. *J Submicrosc Cytol* 1983; 15: 95-96.
184. Verkade P, Harder T, Lafont F, Simons K. Induction of caveolae in the apical plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 2000; 148 (4): 727-739. Erratum in: *J Cell Biol* 2003; 163: 675.
185. Vermassen E, Parys JB, Mauger JP. Subcellular distribution of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: functional relevance and molecular determinants. *Biol Cell* 2004; 96: 3-17.
186. Voldstedlund M, Vinten J, Trandum-Jensen J. Cav-p60 expression in rat muscle tissues. Distribution of caveolar proteins. *Cell Tissue Res* 2001; 306: 265-276.

187. Walters RW, Freimuth P, Moninger TO, Ganske I, Zabner J, Welsh MJ. Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* 2002; 110: 789-799.
188. Wanner A, Salathé M, O'Riordan TG. Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1868-1902.
189. Way M, Parton RG. M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett* 1995; 376: 108-112.
190. Webley WC, Norkin LC, Stuart ES. Caveolin-2 associates with intracellular chlamydial inclusions independently of caveolin-1. *BMC Infect Dis* 2004; 22: 4-23.
191. Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Unger R, Kirkpatrick CJ. The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology. *Life Sci* 2003; 72: 2055-2061.
192. Williams TM, Lisanti MP. The Caveolin genes: from cell biology to medicine. *Ann Med* 2004; 36: 584-595.
193. Wong LB, Miller IF, Yeates DB. Pathway of substance P stimulation of canine tracheal ciliary beat frequency. *J Appl Physiol* 1991; 70: 267-273.
194. Woodman SE, Park DS, Cohen AW, Cheung MW, Chandra M, Shirani J, Tang B, Jelicks LA, Kitsis RN, Christ GJ, Factor SM, Tanowitz HB, Lisanti MP. Caveolin-3 knock-out mice develop a progressive cardiomyopathy and show hyperactivation of the p42/44 MAPK cascade. *J Biol Chem* 2002; 277: 38988-38997.
195. Woodman SE, Sotgia F, Galbiati F, Minetti C, Lisanti MP. Caveolinopathies: mutations in caveolin-3 cause four distinct autosomal dominant muscle diseases. *Neurology* 2004; 62: 538-543.
196. Wouters FS, Bastiaens PI. Fluorescence lifetime imaging of receptor tyrosine kinase activity in cells. *Curr Biol* 1999; 9: 1127-1130.
197. Wouters FS, Bastiaens PI, Wirtz KW, Jovin TM. FRET microscopy demonstrates molecular association of non-specific lipid transfer protein (nsLTP) with fatty acid oxidation enzymes in peroxisomes. *EMBO J* 1998; 17: 7179-7189.
198. Xue C, Botkin SJ, Johns RA. Localization of endothelial NOS at the basal microtubule membrane in ciliated epithelium of rat lung. *J Histochem Cytochem* 1996; 44: 463-471.

199. Yamada E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* 1955; 1: 445-458.
200. Yamamoto M, Toya Y, Jensen RA, Ishikawa Y. Caveolin is an inhibitor of platelet-derived growth factor receptor signaling. *Exp Cell Res* 1999; 247: 380-388.
201. Yamamoto-Hino M, Miyawaki A, Segawa A, Adachi E, Yamashina S, Fujimoto T, Sugiyama T, Furuichi T, Hasegawa M, Mikoshiba K. Apical vesicles bearing inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the Ca²⁺ initiation site of ductal epithelium of submandibular gland. *J Cell Biol* 1998; 141: 135-142.
202. Zabner J, Freimuth P, Puga A, Fabrega A, Welsh MJ. Lack of affinity fiber receptor activity explains the resistance of ciliated airway epithelia to adenovirus infection. *J Clin Invest* 1997; 100: 1144-1149.
203. Zagoory O, Braiman A, Priel Z. The mechanism of ciliary stimulation by acetylcholine: roles of calcium, PKA, and PKG. *J Gen Physiol* 2002; 119: 329-339.
204. Zhang L, Sanderson MJ. Oscillations in ciliary beat frequency and intracellular calcium concentration in rabbit tracheal epithelial cells induced by ATP. *J Physiol* 2003; 546 (Pt 3): 733-749.
205. Zhan X, Li D, Johns RA. Immunohistochemical evidence for the NO cGMP signaling pathway in respiratory ciliated epithelia of rat. *J Histochem Cytochem* 1999; 47: 1369-1374.

IX. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter Wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

X. Verzeichnis der eigenen Publikationen

X.1 Originalarbeiten

1. **G. Krasteva**, I. Ivanov, M. Dimitrov, J. Skidmore (2001). Über die Besonderheiten der Reproduktion bei Dromedaren. **Vet Med Neu**, Heft 9 (bulgarisch).
2. M. C. Dvoraková, U. Pfeil, J. Kunková, J. Šviglerová, G. Galvis, **G. Krasteva**, P. König, V. Grau, J. Slavíková, W. Kummer (2006). Down-regulation of vasoactive intestinal peptide and altered expression of its receptors in rat diabetic cardiomyopathy. **Cell Tissue Res**, 323 (3): 383-93.
3. A. Renigunta, **G. Krasteva**, P. König, F. Rose, W. Klepetko, F. Grimminger, W. Seger, J. Hänze (2006). DNA transfer into human lung cells is improved with Tat-RGD peptide by caveoli-mediated endocytosis. **Bioconjug Chem**, 17 (2): 327-334.
4. P. König*, **G. Krasteva***, C. Tag, IR König, C Arens, W. Kummer (2006). FRET-CLSM and double-labeling indirect immunofluorescence to detect close association of proteins in tissue sections. **Lab Invest**, 86 (8): 853-864.
* both authors contributed equally to the study
5. **G. Krasteva**, U. Pfeil, M. Drab, W. Kummer, P. König (2006). Caveolin-1 and caveolin-2 in airway epithelium: Expression and in situ association as detected by FRET-CLSM. **Respir res**, 7: 108 (highly accessed; 790 views in first month of publishing).
6. **G. Krasteva**, U. Pfeil, A-M. Filip, KS Lips, W. Kummer, P. König (2006). Confinement of caveolin-3 together with eNOS and CHT1 in an apical compartment in ciliated airway epithelial cells in the rat. In revision in **Int J Biochem Cell Biol**.
7. K.S. Lips, P. König, K. Schätzle, U. Pfeil, **G. Krasteva**, M. Spies, R.V. Haberberger, S.A. Grando, J.M. Miwa, N. Heintz, I. Ibanez-Tallon, W. Kummer (2006). Coexpression and spatial association of the modulator lynx1 with nicotinic acetylcholine receptor subunits $\alpha 7$ and $\alpha 10$ in rat sympathetic neurons. (Submitted).

X.2 Abstracts

1. P. Blagov, **G. Krasteva**, S. Vitanov (2002). Angiosarcoma et fibrosarcoma uteri et ovary bei der Katze. (bulgarisch).
2. **G. Krasteva**, W. Kummer, P. König (2005). Detection of spatial association of proteins in tissue sections by indirect immunofluorescence and FRET-CLSM. **Ann Anat (Suppl)** 187: 124-5.
3. **G. Krasteva**, W. Kummer, P. König (2005). Distribution of caveolins and interaction between caveolin-1 and -2 in rat airway epithelium detected by CLSM and fluorescence resonance energy transfer. **Ann Anat (Suppl)** 187: 217.
4. **G. Krasteva**, W. Kummer, P. König (2005). Untersuchung der Lokalisation von Caveolinen und der Interaktion von Caveolin-1 und -2 im Atemwegsepithel der Ratte mittels CLSM und Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer. **Pneumologie** 59: DOI: 10.1055/s-2005-862726.
5. K.S. Lips, P. König, K. Schätzle, U. Pfeil, **G. Krasteva**, M. Spies, R.V. Haberberger, S.A. Grando, W. Kummer (2005). Coexpression and spatial association of neuronal nicotinic acetylcholinereceptor subunit A10 with subunit A7 in rat sympathetic neurons. **Auton Neurosci** 119: 148.
6. **G. Krasteva**, W. Kummer, P. König (2005) Caveolins and their interaction in rat airway epithelium detected by CLSM and FRET. **ERJ (Suppl)** 49 (26): 232s.

XI. Danksagung

Bei der Anfertigung dieser Arbeit habe ich von vielen Menschen Unterstützung und Hilfe erhalten, für welche ich mich sehr herzlich bedanken möchte.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. Kummer und bei Herrn Dr. König für die Überlassung des Themas und für die intensive fachliche und persönliche Unterstützung über den gesamten Zeitraum hin danken. Bei Herrn Dr. König möchte ich mich auch neben der unermüdlichen fachlichen Unterstützung vor allem für das freundschaftliche Verhältnis bedanken.

Durch die DFG wurde ich über das Graduiertenkolleg 534, *Biologische Grundlagen der vaskulären Medizin*, finanziell unterstützt und weiter auf diesem Gebiet ausgebildet. Hier gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. M. Piper und Herrn PD. Dr. T. Noll für Betreuung, Anregung und Kritik und natürlich allen Mitkollegiaten für inhaltliche Diskussionen und für die schöne Zeit.

Mein besonderer Dank für die hilfreichen Diskussionen und Ideen gebührt Frau Dr. R. Paddenberg, Frau PD. Dr. L. S. Lips und Herrn Dr. U. Pfeil.

Bei Herrn Prof. Dr. R. Leiser und Herrn Prof. Dr. A. Wodenitcharov möchte ich mich für die Ermöglichung eines Sokrates-Erasmus-Stipendiums während meines Studiums bedanken.

Für die Hilfe bei dem Layout von Abbildungen und computertechnischen Problemen bedanke ich mich herzlich bei Frau Karola Michael.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Laboratorien der Anatomie I des Fachbereichs Humanmedizin der JLU Gießen danke ich für die hervorragende Einarbeitung im Labor und die vielen guten Ratschläge in einer sehr netten freundschaftlichen Atmosphäre.

Bei Herrn PD. Dr. Haberberger möchte ich mich für seine humorvolle Art bedanken, die mir die erste Zeit im Labor leichter gemacht hat und für den schönen Spitznamen (Marvin), der in der Tat sehr zutreffend ist.

Auch meinen Freunden, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, danke ich. Besonderer Dank gebührt hier Dr. P. Blagov.

Besonders möchte ich meinen Eltern und meinem Freund Clemens Strang für die Liebe und die seelische Unterstützung danken.