Charakterisierung von enzymatischen Antioxidantien und Proteasomuntereinheiten als mögliche Biomarker bei der idiopathischen pulmonalen Fibrose (IPF)

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus - Liebig - Universität Gießen

> vorgelegt von Bach, Anna Crescentia aus Simmern/Hunsrück

> > Gießen 2018

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II Direktor: Prof. Dr. med. Werner Seeger Klinische Forschungsgruppe "Lungenfibrose" Leitung: Prof. Dr. med. Andreas Günther des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Günther Gutachter: PD Dr. med. Dursun Gündüz

Tag der Disputation: 31. Oktober 2019

Inhaltsverzeichnis

1.Einleitung	1
1.1. Interstitielle Lungenerkrankungen	1
1.1.1. Idiopathische Interstitielle Pneumonie (IIP)	2
1.1.1.1. Idiopathische pulmonale Fibrose (IPF)	3
1.1.1.2. Nicht-spezifische interstitielle Pneumonie (NSIP)	17
1.1.1.3. Desquamative interstitielle Pneumonie (DIP)	24
1.1.2. Eine Auswahl anderer diffuser parenchymatöser Lungenerkrankungen	26
1.1.2.1. Exogen allergische Alveolitis (EAA)	26
1.1.2.2. Kollagenosen (collagen vascular disease [CVD])	36
Sklerodermie	38
Dermatomyositis/Polymyositis (DM/PM)	40
Sjögren-Syndrom	42
Systemischer Lupus Erythematodes (SLE)	43
1.1.2.3. Rheumatoide Arthritis	44
1.1.2.4. Sarkoidose	48
1.2. oxidativer Stress	57
1.3. Ziel der Arbeit	70
2. Material und Methoden	73
2.1. Labortechnische Geräte	73
2.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	74
2.3. Antikörper	76
2.3.1. Primärantikörper	76
2.3.2. Sekundärantikörper	77
2.4. verwendete Kits	77
2.5. verwendete Proben	78

2.5.1. Bronchoalveoläre Lavage	78
2.5.2. Lungengewebe	79
2.6. Proteinbestimmung	80
2.7. Vorbereitung der Proben	82
2.8. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	84
2.9. Immunologischer Nachweis von Proteinen in humanen Lavagen mittels Western Blot Methodik	87
2.10. Proteinnachweis mittels Immunhistochemie (IHC)	92
2.11. Immunologischer Nachweis von Lipiden und Proteinen mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)/EIA (enzymatische Immunoabsorbation)	97
2.11.1. 8-Isoprostan	97
2.11.2. Peroxiredoxin 6 (PRDX6)-ELISA	102
2.12. Densitometrische Auswertung der Immunoblots und statistische Methoden	105
3. Ergebnisse	107
3.1. Peroxiredoxin 6	107
3.1.1. Allgemeines	107
3.1.2. Bestimmung des PRDX6 Gehalt in humanen Lavager von verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten und von gesund Spendern (HV) mittels Western Blot-Methodik und ELISA	n den 107
3.1.3. Bestimmung des PRDX6-Gehaltes in humanen Serur Proben von verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten und von gesunden Spendern (HV) mittels Western Blot-Methodik un ELISA	n- n nd 110
3.1.4. Immunhistochemie (IHC) für PRDX6 in Lungengewebsschnitten von normalen Spenderlungen und Patienten mit verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten	112
3.1.5. Korrelation von PRDX6 mit 8-Isoprostan und DLCO	116
3.2. Peroxiredoxin 2 (PRDX2)	116

2 2	1 1 1	· ·
3.2.	L.AL	lgemeines

	3.2.2. Bestimmung des PRDX2-Gehaltes in humanen Lava von verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten und von gesum Spendern mittels Western Blot-Methodik	gen den 117
	3.2.3. Bestimmung des PRDX2-Gehaltes in humanem Seru von verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten und von gesun Spendern mittels Western Blot-Methodik	m den 118
	3.2.4. Immunhistochemie (IHC) für PRDX2 in Lungengewebsschnitten von normalen Spenderlungen und Patienten mit verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten	120
3.	3. Peroxiredoxin 1 (PRDX1)	123
	3.3.1. Allgemeines	123
	3.3.2. Immunhistochemie (IHC) für PRDX1 in Lungengewebsschnitten von normalen Spenderlungen und Patienten mit verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten	124
3.4. Glutathion-Peroxidase 1 (GPX1)		126
	3.4.1. Allgemeines	126
	3.4.2. Bestimmung des GPx1-Gehalt in humanen Lavagen verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten und von gesunden Spendern mittels Western Blot-Methodik	von 127
	3.4.3. Immunhistochemie (IHC) für GPx1 in Lungengewebsschnitten von normalen Spenderlungen und Patienten mit verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten	129
3.	5. Katalase	131
	3.5.1 Allgemeines	131
	3.5.2. Bestimmung des Katalase-Gehalt in humanen Lavag von verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten und von gesum Spendern mittels Western Blot-Methodik	en den 132
	3.5.3. Immunhistochemie (IHC) für Katalase in Lungengewebsschnitten von normalen Spenderlungen und Patienten mit verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten	134

3.6. Superoxiddismutase 3 (SOD3)	136
3.6.1 Allgemeines	136
3.6.2. Immunhistochemie (IHC) für SOD3 in Lungengewebsschnitten von normalen Spenderlungen um Patienten mit verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten	d 137
3.7. N-(Carboxymethyl-Lysin) [CML]-oxidativ modifizierte Proteine als Marker für oxidativen Stress	138
3.7.1. Allgemeines	138
3.7.2. Immunhistochemie (IHC) für N-(Carboxymethyl-) [CML] in Lungengewebsschnitten von normalen Spenderlungen und Patienten mit verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten	Lysin 139
3.8. Serum Amyloid P-component (SAP)	140
3.8.1. Allgemeines	140
3.8.2. SAP Gehalt in humanen Lavagen von verschiedene Lungenfibrose-Entitäten und von gesunden Spendern mit Western Blot Methodik	n tels 141
4. Diskussion	143
4.1. Peroxiredoxin 6	147
4.1.1. Lavage-Ergebnisse	149
4.1.2. Serum-Ergebnisse	154
4.1.3. Immunhistochemie-Ergebnisse	156
4.2. Peroxiredoxin 2	158
4.2.1. Lavage-Ergebnisse	159
4.2.2. Serum-Ergebnisse	161
4.2.3. Immunhistochemie-Ergebnisse	162
4.3. Peroxiredoxin 1	164
4.3.1. Immunhistochemie-Ergebnisse	165
4.4. Glutathion-Peroxidase 1	166

4.4.1. Lavage-Ergebnisse	168
4.4.2. Immunhistochemie-Ergebnisse	170
4.5. Katalase	171
4.5.1. Lavage-Ergebnisse	172
4.5.2. Immunhistochemie-Ergebnisse	173
4.6. Superoxiddismutase 3	175
4.6.1. Immunhistochemie-Ergebnisse	176
4.7. N- (Carboxymethyl-Lysin)-oxidativ modifizierte Protein	e
	178
4.7.1. Immunhistochemie-Ergebnisse	178
4.8. Serum Amyloid P	180
4.8.1. Lavage-Ergebnisse	181
4.9. Zusammenfassung	183
Zusammenfassung	186
Abstract	188
Abkürzungsverzeichnis	190
Abbildungsverzeichnis	192
Literaturverzeichnis	193
Ehrenwörtliche Erklärung	216
Danksagung	218

1.Einleitung

1.1. Interstitielle Lungenerkrankungen

Interstitielle Lungenerkrankungen (interstitial lung disease - ILD) umfassen eine Vielzahl von unterschiedlichen, nicht-tumorösen Erkrankungen, denen eins gemeinsam ist: die Erkrankung des Interstitiums, das als Raum zwischen der epithelialen und endothelialen Basalmembran definiert ist¹. Die Erkrankung beruht auf einer Schädigung des Interstitiums durch Fibrosierung, ausgelöst durch eine Verletzung des Lungenepithels oder durch eine Entzündung (z.B. bei der Exogenen Allergischen Alveolitis -EAA), wobei zwischen Erkrankungen mit bekannter Ursache (z.B. Erkrankungen aus dem Formenkreis der Kollagenosen und Vaskulitiden [collagen vascular disease - CVD]) und unbekannter (idiopathische Ursache interstitielle Pneumonien [IIP]) unterschieden werden kann. Eine Übersicht zeigt Abbildung 1.1.

¹ American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001 2002



Interstitielle Lungenerkrankungen

1.1.1. Idiopathische Interstitielle Pneumonien (IIP)

Die idiopathischen interstitiellen Pneumonien umfassen folgende Entitäten: idiopathische pulmonale Fibrose (IPF), nicht-spezifische interstitielle Pneumonie (NSIP), desquamative interstitielle Pneumonie (DIP), kryptogen organisierende Pneumonie (COP), akute interstitielle Pneumonie (AIP), Bronchiolitis assoziierte interstitielle Pneumonie (RB-ILD), lymphozytische interstitielle Pneumonie (LIP) und pleuroparenchymatöse Fibroelastose (PPFE), wobei der Fokus auf die IPF, NSIP und DIP gelegt wird, da aus diesem Patientenkollektiv die untersuchten Proben stammten.

Die klinische Herangehensweise bei Patienten mit Verdacht auf eine ILD sollte immer eine ausführliche Anamnese und körperliche Untersuchung beinhalten. Bei der Anamneseerhebung ist vor allem auf die Exposition gegenüber Hartmetall-/Holzstäuben oder anderen Umwelteinflüssen, dem Raucherstatus und den möglichen Hinweisen auf eine Erkrankung aus dem rheumatoiden Formenkreis zu achten, sowie auch die Symptome und deren zeitlichen Verlauf zu eruieren. Bei der körperlichen Untersuchung sollte auf basales Knisterrasseln ("Sklerosiphonie"), aber auch auf Trommelschlegelfinger geachtet werden. Im Anschluss sollte eine Röntgenuntersuchung eine des Thorax als auch Lungenfunktionsuntersuchung erfolgen¹.

1.1.1.1. idiopathische pulmonale Fibrose (IPF)

Die idiopathische pulmonale Fibrose wird als eine spezifische Form einer chronischen interstitiellen Pneumonie mit fortschreitender Fibrose definiert², die primär bei älteren Individuen auftritt und auf die Lunge beschränkt ist, wobei die Ursache

² Raghu et al. 2011

unbekannt ist. Das mit dieser Erkrankung assoziierte histopathologische Muster ist das sogenannte "Usual Interstitial Pneumonia"-Pattern (UIP)³, welches dazu genutzt wird, die IPF von anderen Entitäten der IIP zu unterscheiden, da sich aus dieser Unterscheidung sowohl prognostische als auch therapeutische Differenzen ergeben¹.

Bezüglich der Inzidenz und Prävalenz lassen sich in der Literatur sehr unterschiedliche Daten finden. Eine gute Übersicht liefert eine japanische Publikation⁴, die die Inzidenzen und Prävalenzen abhängig von der Geographie (USA, Europa, Japan) und den eingeschlossenen Kriterien darstellt. Als Kriterien für eine eher eingeengte (narrow) Definition einer IPF müssen alle Hautpt- und Neben- ATS/ERS Kriterien der UIP im HRCT erfüllt werden, wohingegen bei einer breiter gefassten (broad) Definition bereits ein mögliches UIP Muster nach ATS/ERS Kriterien im HRCT genügt. Für die USA kann man die Daten von Raghu und Mitarbeitern⁵ heranziehen, die eine Inzidenz von 6,8 (narrow) bzw. 16,3 (broad) pro 100.000 Einwohnern angeben. Für die Prävalenz-Daten wurde ein Review⁶ der bisher veröffentlichen Daten verwendet, wobei sich hier eine Spanne von 14 – 27,9 Fällen

³ American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) 2000

⁴ Nakamura und Aoshiba Kazutetsu 2015

⁵ Raghu et al. 2006

⁶ Nalysnyk et al. 2012

(narrow) pro 100.000 Einwohnern bzw. 42.7 - 63 Fällen (broad) pro 100.000 Einwohner für die USA ergibt. Für Europa werden länderabhängige Daten (Griechenland, Norwegen, Tschechische Republik) dargestellt, die der ursprünglichen Publikation⁴ zu entnehmen sind. Eine gepoolte Prävalenz von 1,6 – 1,7 Fällen pro 100.000 Einwohnern für Europa kann man einem Review von Günther et al.⁷ entnehmen. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Inzidenz und Prävalenz mit zunehmendem Alter steigt und vor allem Menschen mit über 60 Jahren davon betroffen sind (Altersmedian von 66 Jahren bei Diagnose, Spanne von 55 – 75 Jahren⁸). Die Erkrankung scheint bei Männern häufiger zu sein⁵.

Die Ätiologie der IPF ist noch ungeklärt; allerdings werden inhalative Noxen als Risikofaktoren für die chronische Schädigung des Alveolarepithels angesehen⁴. Sowohl Rauchen als auch die Inhalation von Stäuben (landwirtschaftlichen Ursprungs, Metall, Holz, Sand) haben sich als beständige Risikofaktoren für die Entwicklung einer IPF gezeigt⁹. Weitere mögliche Risikofaktoren sind virale Infektionen (DNA von Herpesviren [z.B. EBV, CMV HHV-7/8] wurden in über 90% der untersuchten IPF-Lungen nachgewiesen¹⁰), gastroösophagealer Reflux (chronische

⁷ Günther et al. 2012

⁸ King et al. 2011

⁹ Taskar VS

¹⁰ Borchers et al. 2011

Mikroaspiration als Ursache für die wiederholten Verletzungen/Beschädigungen der Lunge¹¹) und Diabetes Mellitus (über Hyperinsulinismus verstärkte Ausschüttung von IGF-1, die zur reduzierten Autophagie und somit zur beschleunigten Alterung der Zellen führt¹²), wobei nicht geklärt ist, ob diese Risikofaktoren eine IPF über Triggerfaktoren auslösen können oder lediglich eine bestehende IPF verschlechtern⁴. Als prognostisch relevante Risikokonstellation ist noch das Vorliegen/Entwickeln einer pulmonalen Hypertonie zu erwähnen, da der pulmonale arterielle Druck invers zur DL_{co}¹³ korreliert, sowie das Vorliegen einer pulmonalen Hypertonie insgesamt ein negativer Prognosefaktor ist, der mit einer höheren Mortalität assoziiert ist¹⁴. Als weiterer Risikofaktor sind noch genetische Faktoren zu nennen, die zunächst bei Untersuchungen von familiären interstitiellen Pneumonien aufgefallen waren, darunter allen voran die Gen-Mutationen in den Surfactant-Proteinen (SP)- A und -C [SFTPA, SFTPC], die zu missgefalteten Proteinprodukten und dadurch zu ER-Stress und Apoptose der alveolären Typ-II-Zellen führen¹⁵, und die Mutationen in den Telomerase-Genen und anderen Telomerassoziierten Proteinen. die beschleunigten einer zu

¹¹ Lee et al. 2010

¹² Takasaka et al. 2014

¹³ Nadrous et al. 2005

¹⁴ Caminati et al. 2013

¹⁵ Korfei et al. 2008

Telomerverkürzung führen und somit zur vorzeitigen Seneszenz oder Apoptose der alveolären Typ-II-Zellen (AECII), welche Progenitorzellen des Alveolarepithels darstellen^{16,17,18}.



Abbildung 1.2. Schematische Darstellung der wichtigsten Zellen in einer gesunden Lunge

Die genaue Pathogenese der IPF ist noch nicht vollständig geklärt. Die lange Jahre geltende Hypothese, dass eine chronische Inflammation die Ursache der Lungenfibrose sei, ist Anfang der 90er Jahre verworfen worden, da sich in ultrastrukturellen Untersuchungen mehrerer Wissenschaftler herausstellte, dass eine Entzündung nicht das vorherrschende histopathologische Korrelat in der UIP ist, und dass eine Entzündung nicht substantiell für die Entwicklung einer Fibrose ist, und vor allem auch deswegen, da eine anti-inflammatorische Therapie in keinster Weise die Prognose

¹⁶ Tsakiri et al. 2007

¹⁷ Diaz de Leon et al. 2010

¹⁸ Stuart et al. 2015

und das Überleben der IPF-Patienten verbesserte¹⁹. In derselben Publikation ist daraufhin die Hypothese postuliert worden, dass die Lungenfibrose durch eine Schädigung des Alveolarepithels, mit konsekutiver aberranter Wundheilung, ausgelöst wird. Dies führt zu Zerstörung zarten Alveolargerüstes einer des und der Lungenarchitektur (eine Schemazeichnung der wichtigsten Zellen und deren Verhältnis in der gesunden Lunge zeigt Abbildung 1.2.). Inzwischen besteht ein Konsensus darüber, dass der Auslöser für die Fibrose die chronische, wiederholte Schädigung der alveolären Typ-II-Zellen (AECII) ist. Hinweise auf den mechanistischen Zusammenhang zwischen AECII-Beschädigung und daraus resultierender Fibrose beobachteten Sisson et al.20 in einer tierexperimentellen Studie. Dennoch konnte die Ursache der wiederholten Schädigung der AECII, vor allem in den sporadischen Formen der IPF, bisher nicht eindeutig identifiziert werden²¹. Allerdings ist mit der ER-Stress-induzierten Apoptose der AECII ein generelles Phänomen bei familiärer und sporadischer IPF²² identifiziert worden. Dabei ergibt sich wiederum eine Vielzahl von Möglichkeiten, die zu ER-Stress führen: Glukose-Mangelzustände, erhöhte Glykosylierung von Proteinen, Veränderungen der Redoxbzw. Ionenbalance im ER-Lumen, erhöhte Proteinsynthese

¹⁹ Selman 2001

²⁰ Sisson et al. 2010

²¹ Blackwell et al. 2014

²² Tanjore et al. 2012

(beispielsweise durch eine Virus-Infektion), unzureichende lysosomale Degradierung, Genmutationen, die zu missgefalteten Proteinen führen und oxidativer Stress²³, sodass abschließend nicht geklärt werden kann, warum die AECII von sporadischen IPF-Patienten eine apoptotische ER-Stress-Antwort und die damit verbundenen phänotypischen Veränderungen aufweisen²⁴. Auch ist der genaue Ablauf der gestörten Wundheilung nur unzureichend verstanden, denn es scheinen mehrere involvierte Mechanismen fehlreguliert zu sein. Es gibt Hinweise darauf, dass bei der IPF bereits die epitheliale Integrität gestört ist, da in Cd151-(basolaterales Oberflächenprotein, das die Bindung des Alveolarepithels an die Basalmembran unterstützt) Knockout-Mäusen sich altersabhängig Fibrose entwickelt und CD151-positive alveoläre Typ-II-Zellen in IPF-Patienten signifikant herunter reguliert sind²⁵, wobei abschließend nicht die Bedeutung dieser Ergebnisse eruiert werden konnte. Auch wird vermutet, dass die aberranten epithelialen Reparaturmechanismen (infolge der AECII-Apoptose) auf der übermäßigen und fehlregulierten Reaktivierung von embryonalen Signalwegen beruhen könnte⁸. Außerdem scheinen AECII selbst über ihre Zytokin-Produktion ein profibrotisches Milieu zu schaffen durch die vermehrte Expression

²³ Korfei 2016

²⁴ Sakai und Tager 2013

²⁵ Tsujino et al. 2012

von transforming growth factor β (TGF- β), connective tissue growth factor (CTGF), tissue factor (TF) sowie Faktor VII und X der Gerinnungskaskade^{7,10}. Interessant ist auch, dass Prostaglandin E₂ (PGE₂), ein essentieller Faktor in der Kontrolle der Fibroblasten-Proliferation/Aktivität und Myofibroblasten-Differenzierung, in Epithelzellen und Fibroblasten von IPF-Patienten stark herunter reguliert ist, und auch die Rezeptoren für dieses Zytokin in den Myofibroblasten signifikant herunter reguliert sind²⁶. Hieraus leitet sich die Hypothese ab, dass die AECII durch die chronische Beschädigung und erhöhte Apoptoserate die Kontrolle über die Fibroblasten verlieren, was zu einer unkontrollierten Fibroblasten/ Myofibroblasten-Proliferation und damit zu einer abnormal gesteigerten Produktion von extrazellulärer Matrix (ECM) führt⁷.

Zur Rolle der Myofibroblasten für die exzessive Produktion von ECM-Komponenten und deren Ablagerung herrscht ebenfalls ein Konsens²⁷, allerdings nicht über den Ursprung dieser Zellen. Die lange favorisierte Hypothese der epithelial-mesenchymalen Transformation (EMT), die auf Beobachtungen von epithelialen Zellen mit ko-exprimierenden mesenchymalen Zellenmarkern beruht²⁸, hat an Bedeutung verloren, da Rock et al.²⁹ in einem tierexperimentellen Setting zeigen konnten, dass die EMT nicht zur

²⁶ Bozyk und Moore 2011

²⁷ Scotton und Chambers 2007

²⁸ Brigham C. Willis, Janice M. Liebler

²⁹ Rock et al. 2011

Myofibroblastenpopulation beiträgt. Dennoch kann die Hypothese nicht vollständig verworfen werden, da eine EMT in der Pathogenese der IPF beim Menschen nicht ausgeschlossen werden kann und die eventuell unvollständig differenzierten AECII mögliche Produzenten von zumindest Zytokinen, wenn nicht sogar von ECM-Komponenten sein könnten⁴. Pleuromesotheliale Zellen als hauptsächlicher Ursprung der Myofibroblasten scheinen auch unwahrscheinlich zu sein³⁰. Als mögliche Ursprungszellen der Myofibroblasten werden momentan auch zirkulierende Fibrozyten³¹ Knochenmark produzierte Vorläuferzellen) diskutiert. (im angelockt von sterbenden AECII, oder aberrant produzierten Zytokinen, oder von bereits vorhandenen Mesenchymzellen, über welche die AECII die Kontrolle verloren haben⁷. Außerdem werden Perizyten, spezialisierte Mesenchymzellen, die eine gemeinsame Basalmembran mit Endothelien teilen³², in Betracht gezogen. Inzwischen geht man aber bei den zirkulierenden Fibrozyten mehr von einer unterstützenden Funktion für die vorhandenen Fibroblasten aus, durch zum Beispiel die Produktion von Wachstumshormonen⁴. In Bezug auf die Myofibroblasten ist noch zu erwähnen, dass sie nicht nur die Produzenten der zur Destruktion führenden extrazellulären Matrix sind, sondern auch

³⁰ Mubarak et al. 2012

³¹ Phillips et al. 2004

³² Hung et al. 2013

den ursprünglichen Prozess, nämlich die Beschädigung und Apoptose der AECII, weiterhin aufrecht erhalten, indem sie beispielsweise Wasserstoffperoxid produzieren³³. Des Weiteren ist noch zu bemerken, dass IPF-Myofibroblasten, im Gegensatz zu den Alveolarepithelzellen, weniger anfällig gegenüber Apoptose zu sein scheinen (Apoptoseparadox)³⁴, was eventuell über die bereits oben erwähnte Minderung des PGE₂-Signals vermittelt sein könnte²⁶.

Zusammenfassend beruht die Pathogenese der IPF auf folgenden Faktoren: die chronische Schädigung der alveolären Typ-II-Zellen, die zur Apoptose dieser Zellen führt, ruft eine gestörte, aberrante Wundheilung hervor, die durch eine unkontrollierte Aktivierung von Fibroblasten und deren Differenzierung zu Myofibroblasten, sowie durch deren Organisation zu den sogenannten "Fibroblasten Foci" (=Fibroblasten-Nester) charakterisiert ist, wodurch eine ungehemmte Produktion und Ablagerung von ECM-Komponenten erfolgt, die konsekutiv die Lungenarchitektur zerstören. Diese Vorgänge, reduziert auf die wichtigsten Fakten, sind in Abbildung 1.3. nochmals graphisch dargestellt.

Klinisch manifestiert sich die IPF durch die vorherrschende Symptomatik einer zunehmenden Dyspnoe und einem anhaltenden, unproduktiven Husten, der in der Regel nicht auf Antitussiva anspricht. Die Symptome bestehen meist etwa 6 Monate, bevor ein

³³ Waghray et al. 2005

³⁴ Thannickal und Horowitz 2006

Arzt konsultiert wird. In der körperlichen Untersuchung findet sich in etwa 80% der Fälle ein basal betontes Knisterrasseln und in 25-50% Trommelschlegelfinger³. In der Lungenfunktionsuntersuchung zeigt sich ein restriktives Muster, ein herabgesetzter Diffusionskoeffizient für Kohlenmonoxid (DL_{co}) und eine Hypoxie, die sich bei Anstrengung verschlechtert¹.

Der klinische Verlauf ist heterogen, mit einem medianen Überleben nach Diagnosestellung von 2,5 - 3,5 Jahren⁸. Es existieren auch andere Daten zum medianen Überleben (2 - 5 Jahre⁷), allerdings zeigt sich auch hier deutlich die schlechte Prognose der IPF im Vergleich zu den anderen Entitäten. Hinzu kommt, dass der klinische Verlauf außer der langsamen, aber stetig progressiven Form noch eine beschleunigte Variante, die vor allem männliche Raucher betrifft⁸, sowie die akute Exazerbation, die eine Inzidenz von 6-16% aufweist³⁵, beinhaltet.

Die akute Exazerbation ist definiert als akute, klinisch signifikante Verschlechterung unbekannter Ursache bei einer zugrundeliegenden IPF. Als diagnostische Kriterien werden die subjektive Verschlechterung innerhalb von 30 Tagen und neue bilaterale Verschattungen in der radiologischen Bildgebung, ein reduzierter Pa₀₂ als Hinweis auf einen gestörten Gasaustausch, und der Ausschluss von Herzinsuffizienz, Lungenembolie, Infektionen

³⁵ Luppi et al. 2015

und anderen bekannten Ursachen herangezogen³⁶. Die Mortalität ist hoch (90%; medianes Überleben: zwei Monate nach Beginn der akuten Exazerbation, sodass die Exazerbation ein unabhängiger Prognosefaktor ist), und es existiert keine effiziente Therapie³⁵.

Um die Diagnose einer IPF zu stellen, müssen folgende Kriterien erfüllt sein: Ausschluss anderer Ursachen, die zu einer interstitiellen Lungenerkrankung führen (z.B. Kontakt mit Holzstaub, Metallstäuben etc., Medikamentennebenwirkung, Kollagenosen usw.), Vorliegen des UIP-Musters im HRCT bzw. die Kombination eines möglichen UIP-Musters in der radiologischen Bildgebung und einer chirurgisch gewonnen Lungenbiopsie³⁷, sodass hier ein multidiszipilinärer Ansatz mit Kooperation von Pulmonologen, Radiologen und Pathologen notwendig ist¹.

Das radiologische Korrelat des UIP-Musters sind retikuläre Zeichnungsvermehrung in Kombination mit Traktionsbronchiektasen und Honigwaben (honeycombing), die vor allem basal und peripher lokalisiert, aber dort meist uneinheitlich verteilt sind¹. Vor allem das sogenannte honeycombing ist essentiell bei differentialdiagnostischen Überlegungen. Honeycombing ist definiert als das Auftreten von traubenförmigen, mehrreihigen zystischen Lufträumen, die durchschnittlich 3-10 mm im Durchmesser aufweisen und vor allem subpleural und paraseptal

³⁶ Collard et al. 2007

³⁷ Travis et al. 2013

gelegen sind².



 \rightarrow progressive Fibrose

Abbildung 1.3. Pathogenese der idiopathischen interstitiellen Fibrose (schematische Übersicht)

Beim Vorliegen eines atypischen Musters in der radiologischen Bildgebung ist eine chirurgisch gewonnene Lungenbiopsie notwendig¹. Das histopathologische Korrelat einer UIP stellt sich pathognomonisch ist die Zerstörung der wie folgt dar: Lungenarchitektur mit einer heterogenen Verteilung, bei der sich sowohl fibrotische Areale mit Gewebenarben und Honigwaben-Veränderungen (zystisch fibrotische Lufträume, umgeben von Bronchialepithel und gefüllt mit Schleim und Immunzellen) mit gesunden Arealen ohne Zeichen einer Fibrose abwechseln, und diese Veränderungen alle zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt entstanden sind. Entzündungszeichen sind meist nur mild vorhanden (Entzündungszellen können in fibrotischen Arealen beobachtet werden, aber diese Zellen sind nicht in jeder IPF-Lunge zu finden). Die fibrotischen Zonen zeichnen sich durch dicht gepackte Kollagenfasern aus, in denen Nester aus proliferierenden Fibroblasten und Myofibroblasten, die sogenannten "Fibroblasten Foci", die ein wessentielles Merkmal des UIP-Musters darstellen, zu finden sind².

Trotz dessen, dass die bildgebenden Verfahren sehr wichtig und essentiell für die Diagnosefindung der IPF geworden sind, hat die Lungenbiopsie weiterhin ihren Stellenwert, denn nur durch sie kann eine definitive Diagnose erfolgen¹. Dies ist gerade im Hinblick auf die möglichen Differentialdiagnosen wie die fibrotische nicht-spezifische interstitielle Pneumonie (fNSIP) entscheidend, da sich daraus prognostische und therapeutische Konsequenzen ergeben. Bis heute gibt es keine kausal ausgerichtete bzw. hinreichend wirksame Therapie für die IPF³⁷. Momentan wird Nintedanib, ein Tyrosin-Kinase-Inhibitor, oder Pirfenidon eingesetzt. Die bisherigen Therapieformen, unter anderem die Kombination von Cortison mit Azathioprin und N-Acetylcystein, sowie Ambrisentan, ein selektiver Endothelin-Rezeptor Antagonist, oder Imatinib werden nicht mehr empfohlen³⁸.

1.1.1.2. nicht-spezifische interstitielle Pneumonie (NSIP)

Der Begriff "nicht-spezifische interstitielle Pneumonie" (NSIP), wie er heute verwendet wird, ist erstmals 1994 definiert worden als histopathologisches Muster, dass keinem der bekannten. klassischen idiopathischen interstitiellen Pneumonien (IIP) wie der UIP, DIP etc. entspricht. Dabei zeigt sich histologisch eine auffallende Homogenität, im Gegensatz zu der bemerkenswerten Heterogenität bei der UIP, welche mit in die Definition dieser Entität einfließt. Die unter diesem histologischen Bild zusammengefassten Patienten zeigen ein breites Spektrum an klinischen Krankheitsbildern, wie z.B. Kollagenosen (connective tissue disease - CTD) oder exogene allergische Alveolitis (EAA =

³⁸ Raghu et al. 2015

hypersensitvity pneumonitis [HP]), und weisen ein gutes Ansprechen auf Kortikosteroide³⁹ auf. Die NSIP als eigenständige Entität mit idiopathischer Genese wird im Verlauf näher erläutert werden.

Die 1994³⁹ vorgenommene Unterteilung der NSIP in 3 Gruppen anhand dem Vorherrschen von Inflammation oder Fibrose wurde zugunsten einer Unterteilung in lediglich 2 Gruppen (zelluläres [cNSIP] vs. fibrotisches Muster [fNSIP]) geändert, da sich in einer Untersuchung von Travis et al. zeigte⁴⁰, dass bei der Unterscheidung dieser beiden Muster sich unterschiedliche klinische Charakteristika als auch Überlebenswahrscheinlichkeiten ergaben, wobei das zelluläre Muster die bessere Prognose aufwies. Im Verlauf zeigte sich, dass das histopathologische Muster der fNSIP sowohl als eigenständige Entität im Rahmen der IIP als auch im Rahmen verschiedener Grunderkrankungen wie der exogen allergischen Alveolitis (EAA) oder den Kollagenosen auftrat, wobei sich die NSIP als häufigstes histopathologisches Muster einer CTD zeigte⁴¹.

Kinder et al.⁴² führten eine Studie durch, in der sie zeigen konnten, dass etwa 80% der NSIP-Patienten die Kriterien für die Diagnose einer UCTD (undifferentiated connective tissue disease; definiert

³⁹ Katzenstein AL 1994

⁴⁰ William D. Travis, M.D., Kazuhiro Matsui, M.D., Joel Moss, M.D., Ph.D.,

⁴¹ Hauber et al. 2011

⁴² Kinder et al. 2007

als eigenständige Erkrankung, bei der die allgemeinen Kriterien für eine bereits definierte CTD nicht zutreffen, aber Anzeichen und Symptome für eine CTD sprechen, sowie positive serologische Marker über ein Jahr lang vorhanden sind43) erfüllen, sodass die Hypothese, dass die NSIP eine Form einer Autoimmun-Pneumonitis und weniger die einer idiopathischen interstitiellen Pneumonie sei, aufgestellt worden ist. Im Gegensatz dazu zeigten Corte et al.⁴⁴ dass bei einer enger gefassten Definition der UCTD-Kriterien etwa noch 31% der NSIP-Patienten eine UCTD aufweisen würden - bei der weit gefassten Definition von Kinder und Mitarbeitern wären es 71% -, sodass sie diese weit gefassten Kriterien ablehnten. Des Weiteren konnten sie feststellen, dass sich kein prognostischer Unterschied ergibt, wenn die Patienten als UCTD, selbst in Anwendung der enger gefassten Kriterien, oder als NSIP klassifiziert worden sind. Die Studie von Kinder et al. ist auch weiterhin kontrovers diskutiert worden⁴⁵ mit dem Vorschlag eine andere Bezeichnung für ein ähnliches Patientenkollektiv, nämlich "lung dominant CTD", zu wählen. Eine weitere Publikation schlägt als Terminus für diese Patienten die "autoimmune featured ILD" vor⁴⁶. Diese unterschiedlichen

⁴³ Mosca et al. 2006

⁴⁴ Corte et al. 2012

⁴⁵ Fischer et al. 2010

⁴⁶ Vij et al. 2011

Publikationen werden in einem Review von Fischer und du Bois⁴⁷ näher beleuchtet und in den Kontext gesetzt, dass eine Unterscheidung, ob eine ILD idiopathisch oder mit einer CTD assoziiert ist, insofern wichtig ist, dass sich daraus unterschiedliche Prognosen (mit der bedeutend schlechteren Prognose der idiopathischen Formen) und Therapien ergeben, wobei kein abschließendes Ergebnis aufgrund der unzureichenden Datenlage formuliert werden konnte.

Ein kürzlich erschienenes gemeinsames Statement der ERS (European Respiratory Society) und ATS (American Thoracic Society)48 fasst die verschiedenen postulierten Ansätze zu dem Terminus "interstitial pneumonia with autoimmune features" (IPAF) zusammen und trägt damit der Kontroverse Rechnung, dass es viele Patienten mit einer IIP gibt, die klinische Anzeichen eines zugrundeliegenden Autoimmunprozesses zeigen, der aber nicht die Kriterien der bisher definierten CTD, wie rheumatoide Arthritis, Sklerodermie etc., erfüllt. Es wird noch einmal kurz zusammengefasst, dass die Identifizierung einer zugrundeliegenden Ätiologie entscheidend für den klinischen Verlauf ist, da sich hieraus unterschiedliche Therapien als auch Prognosen ergeben, aber sich dieser Prozess als schwierig gestaltet, da in den Leitlinien einerseits eine IIP eigentlich durch den Ausschluss bekannter

⁴⁷ Fischer und Du Bois 2012

⁴⁸ Fischer et al. 2015

Ursachen (somit auch der CTD) definiert ist, andererseits aber eine interstitielle Pneumonie manchmal die einzige Manifestation einer okkulten CTD sein kann und die Grenzen von IIP zu CTD-ILD nicht klar definiert sind. Hieraus ergibt sich jetzt die Gruppierung der IPAF mit ihren Klassifikationskriterien (diese sind bitte der Originalpublikation zu entnehmen⁴⁸), die allerdings nicht als klinische Leitlinien herangezogen werden sollten, sondern eher die Plattform für neue prospektive Studien bilden soll.

Mit diesen Informationen im Hintergrund ist es bei der heterogenen Entität der NSIP verständlich, dass die Daten zur Epidemiologie⁴⁹ und auch zur Effektivität von verschiedenen Behandlungsoptionen sehr begrenzt sind⁵⁰.

Die Pathogenese der NSIP kann aufgrund ihrer Heterogenität unterschiedlich ausfallen. Bei dazu erfolgten Studien zeigte sich zum einen, dass bei der NSIP eher eine Th1-vermittelte Immunantwort, die ein Hinweis auf eine autoimmune Komponente ist, vorherrscht⁴¹, und zum anderen, dass die epitheliale Apoptose im Vergleich zur IPF geringer zu sein scheint⁵⁰.

Mit der Publikation von Travis et al.⁵¹ wird die NSIP erstmals als eine eigenständige Entität im Rahmen der IIP wahrgenommen. Die

⁴⁹ Flaherty und Martinez 2006

⁵⁰ Poletti et al. 2012

⁵¹ Travis et al. 2008

klinischen Symptome mit Dyspnoe (96%) und Husten (87%), ähnlich der IPF, zeigen sich vor allem bei fNSIP-Patienten in der fünften bis sechsten Lebensdekade, also etwa 10 Jahre früher im Vergleich zu IPF-Patienten. Außerdem sind die Patienten vornehmlich weiblich und Nichtraucher. In der körperlichen Untersuchung lassen sich, ebenfalls ähnlich der IPF, ein basales Knisterrasseln feststellen. Allerdings scheint das Auftreten von Trommelschlegelfingern geringer zu sein im Vergleich zur IPF. In der Lungenfunktion zeigt sich, ähnlich zur IPF, ein restriktives Ventilationsmuster, allerdings in etwas milderer Ausprägung¹. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 82,3% bzw. 73,2% nach 10 Jahren⁵⁰, somit eine bedeutend bessere Prognose als die der IPF, sodass eine Differenzierung zwischen diesen beiden Entitäten für den Patienten essentiell ist⁵². Diese Differenzierung erfolgt über Biopsie. Therapeutisch HRCT und/oder kommen antiinflammatorische und/oder immunsuppressive Agenzien zum Einsatz, Besonders Kortikosteroide haben sich bewährt. Diese werden teilweise noch mit Cyclophosphamid oder Azathioprin kombiniert. Randomisierte oder Placebo-kontrollierte Studien sind bisher allerdings nicht erfolgt^{41,50}.

Im HRCT stellt sich die NSIP wie folgt dar: das häufigste und mit unter charakteristischste Merkmal ist die beidseitige symmetrische,

⁵² Du Bois und King 2007

basale Milchglastrübung (ground-glass opacity) mit peripherer Lokalisation unter subpleuraler Aussparung in Kombination mit retikulären Zeichnungsvermehrung, einer sowie Traktionsbronchiektasen. Honeycombing und Verdichtungen sind allem das Vorhandensein der selten. Vor ausgeprägten Milchglastrübung als auch die subpleurale Aussparung, sowie das Fehlen von Fibroblast Foci und Honeycombing sind wichtige Charakteristika, um die NSIP gegenüber dem UIP-Muster abzugrenzen⁵³. Die bisherige Genauigkeit in der Unterscheidung von NSIP zum UIP-Muster via HRCT hat sich zwar gebessert (einige Studien geben eine Sensitivität ~70% und eine Spezifität von 63% an⁵⁴); dennoch muss beachtet werden, dass die Diagnose einer NSIP ohne Lungenbiopsie ungenau ist, und in etwa ~50% der Fälle nicht erkannt wird⁴⁹, sodass eigentlich bei dem Verdacht einer NSIP in der radiologischen Bildgebung, vor allem als Differentialdiagnose einer möglichen IPF, eine Lungenbiopsie erfolgen sollte⁴⁷⁻⁴⁹.

Das histopathologische fNSIP Muster zeigt eine uniforme Ausprägung einer Fibrose im Interstitium der Alveolarwände, wobei die alveoläre Lungenarchitektur weitestgehend erhalten ist. "Fibroblast Foci", das histopathologische Kennzeichen der IPF, sind nicht bzw. nur ausgesprochen selten zu finden. Wichtig ist

⁵³ Glaspole und Goh 2010

⁵⁴ Johkoh 2014

außerdem noch, dass das Erscheinungsbild zu keinem der anderen histologischen Muster einer IIP (UIP, DIP, COP [cryptogenic organizing pneumonia], DAD [diffuse alveolar damage], LIP [lymphiod interstitial pneumonia]) passt¹.

Entzündungszeichen sind bei der fNSIP nur in geringer Ausprägung vorhanden und sind eher im cNSIP-Pattern in den Alveolarwänden zu beobachten^{1,46}.

1.1.1.3. desquamative interstitielle Pneumonie (DIP)

Der Begriff der desquamativen Pneumonie ist zunächst etwas irreführend, denn bei dem markantesten histologischen Charakteristikum handelt es sich nicht, wie zunächst angenommen, um von der Basalmembran abgelöste Epithelzellen, sondern um intraalveolär akkumulierte Makrophagen, sodass der Terminus der "alveolar marcophages pneumonia" erwogen wurde, aber aufgrund der Rarität der Erkrankung verworfen wurde¹.

Die grundlegende Ätiologie für diese Erkrankung ist das Rauchen¹, aber auch die Inhalation von anorganischen Partikeln aus der Umwelt und Medikamente können in einer Minderheit der Fälle zu dieser Erkrankung führen^{37,55}.

Klinisch manifestiert sich die DIP vor allem bei Rauchern (60-87% der betroffenen Patienten⁵⁶) in ihrer vierten bis fünften

⁵⁵ Nair und Hansell 2014

⁵⁶ Tazelaar et al. 2011

Lebensdekade, bevorzugt bei Männern⁵⁷, mit Dyspnoe und teils unproduktivem Husten, welche sich über Wochen bis Monate verschlechtern. Trommelschlegelfinger in der körperlichen Untersuchung lassen sich etwa bei der Hälfte der Patienten feststellen. In der Lungenfunktion zeigen sich eher normale Lungenvolumina bis hin zu einem milden restriktiven Ventilationsmuster bei eingeschränktem DL_{co}^{1} . Die Mortalitätsrate liegt zwischen 6-30%⁵⁵, bei einer Zehn-Jahresüberlebensrate von 70%¹. Somit ergibt sich eine bedeutend bessere Prognose als die der IPF⁵⁸, und zudem auch noch eine bessere Prognose im Vergleich zur fibrotischen NSIP⁵⁶.

Das beständigste Erscheinungsbild einer DIP im HRCT sind bilaterale, eher symmetrische Milchglastrübungen, die sich vor allem in den unteren Lungenabschnitten mit einem eher peripheren Verteilungsmuster zeigen und mit der Akkumulation von Makrophagen zu korrelieren scheinen⁵⁹. Irreguläre lineare und retikuläre Zeichnungsvermehrung als Hinweis auf eine Fibrose sind eher selten zu beobachten, genauso wie Honigwabenbildung (honeycombing)^{1,55,57}. Es werden allerdings zystische Strukturen beschrieben, die aber die Architektur der Lunge nicht zerstören⁵⁵.

Histologisch zeichnet sich die DIP pathognomonisch durch die

⁵⁷ Godbert et al. 2013

⁵⁸ Hansell und Nicholson 2003

⁵⁹ Ryu et al. 2005

Akkumulation von Alveolarmakrophagen in den distalen Luftwegen aus und durch die Verdickung der Alveolarsepten¹. Diese Makrophagen weisen ein eosinophiles Zytoplasma mit braunen Pigmenten auf (smoker macrophages). Fibroblasten Foci und Honeycombing lassen sich nicht finden⁵⁸.

Die Unterscheidung zur ansonsten identisch getriggerten RB-ILD erfolgt vor allem darüber, dass die Lokalisation der Alveolarmakrophagen mehr im bronchiolären anstatt im alveolären Kompartiment stattfindet⁵⁵.

Therapeutisch kommen vor allem Kortikosteroide erfolgreich zum Einsatz, die meist zur Verbesserung oder zumindest zu einer Stabilisierung der Symptome und radiologischen Befunde führen⁵⁷⁻ ⁵⁹. Ein weiterer wichtiger Therapiebaustein ist der Rauchverzicht⁵⁸.

1.1.2. Eine Auswahl anderer diffuser parenchymatöser Lungenerkrankungen

1.1.2.1. exogene allergische Alveolitis (EAA)

Eine einheitliche Definition der exogenen allergischen Alveolitis, auch hypersensitivity pneumonitis (HP), existiert nicht. Im Rahmen einer Arbeitsgemeinschaft des National Heart, Lung and Blood Institute ist die EAA als ein komplexes Krankheitsbild mit variierender Ausprägung, klinischer Präsentation und Verlauf charakterisiert worden, welches das Ergebnis einer immunologisch ausgelösten Entzündungsreaktion als Folgereaktion auf die Inhalation einer breiten Palette von Antigenen ist⁶⁰. Die HP Studien Gruppe⁶¹ definiert die EAA als eine Erkrankung der Lunge, die sich über Dyspnoe und Husten äußert, welche durch die Inhalation von Antigenen, auf die der Patient zuvor eine Sensibilität entwickelt hat, ausgelöst wird. Folgender Konsens besteht aber: Die EAA ist eine Erkrankung der Lunge, die systemische Manifestation aufweisen kann, aber nicht muss; sie wird durch die Inhalation von Antigenen, auf die der Patient zuvor sensibilisiert worden ist oder hyperreaktiv reagiert, ausgelöst. Dabei liegt als Pathomechanismus eine Typ III/IV-Immunreaktion zugrunde. Zudem wird die EAA definiert über das Vorhandensein einer Exposition mit dem betreffenden Antigen, eine IgG-Sensibilisierung auf das Antigen und vor allem die Ausprägung klinischer Symptome^{62,63}.

Bezüglich der Prävalenz ist es schwierig, genaue Daten zu erheben, da dies von der Definition der Erkrankung, der diagnostischen Herangehensweise, der Art und Intensität der Antigenexposition, der Geographie, den verschiedenen Industrie- und Agrarwirtschaften und den individuellen Risikofaktoren abhängt.

⁶⁰ Fink et al. 2005

⁶¹ Lacasse et al. 2003

⁶² Lacasse et al. 2012

⁶³ Spagnolo P, Rossi G, Cavazza A, Bonifazi M, Paladini I, Bonella F, Sverzellati N, Costabel U. 2015

Auch muss beachtet werden, dass viele Fälle gar nicht oder falsch diagnostiziert werden⁶⁴. Allerdings scheint die EAA etwa 4-15% aller interstitiellen Lungenerkrankungen auszumachen und etwa 0,9 von 100 000 Bewohnern zu betreffen⁶².

Die Pathogenese an sich ist nur unzureichend verstanden, wobei von einer Kombination aus einer Typ III und IV Immunreaktion ausgegangen wird⁶⁵. Wie bereits erwähnt, ist die Ursache für die Erkrankung die Inhalation von Antigenen, auf die der Patient zuvor in irgendeiner Weise sensibilisiert worden ist, wobei sich die Frage stellt, warum eigentlich nur wenige Patienten diese Erkrankung entwickeln, viele Antigene aber eigentlich allgegenwärtig sind, sodass eine two-hit Hypothese aufgestellt worden ist: eine zuvor bestehende genetische Anfälligkeit oder Umweltfaktoren erhöhen das Risiko, nach einer Antigenexposition eine EAA zu entwickeln, sodass die Exposition gegenüber dem Antigen als induzierender Faktor und die genetische Anfälligkeit als unterstützender Risikofaktor wirkt⁶⁴, sodass dies zu einer überschießenden Immunantwort mit einer deutlichen Entzündungsreaktion in der Lunge führt⁶³. Bezüglich der genetischen Anfälligkeit konnten bisher keine eindeutigen Mechanismen und Zusammenhänge herausgearbeitet werden. Was allerdings festgestellt worden ist, ist, dass in der EAA, im Vergleich zur IPF, Gene, die in die

⁶⁴ Selman et al. 2012

⁶⁵ Grunes und Beasley 2013

Entzündungsreaktion, die T-Zell-Antwort sowie generell in die Immunantwort involviert sind, vermehrt exprimiert werden⁶⁶. Es besteht auch die Vermutung, dass ein Polymorphismus im Major Histocompatibility Complex (MHC = HLA [human leukocyte antigen]) II bzw. in den dafür kodierenden Genen das Risiko, an einer EAA zu erkranken, erhöht67. Dennoch bleiben die Immunprozesse, die zur Persistenz der Erkrankung und zum Ausbreiten/zum Fortschreiten einer Fibrose führen, unklar⁵⁹, wobei mögliche Hinweise auf einen Shift der eigentlich es vorherrschenden Th1-Antwort hin zu einer mehr Th₂ dominierenden Immunantwort bei der chronischen Form der EAA gibt⁶⁸. Des Weiteren zeigt sich eine eingeschränkte Funktion von T_{reg}-Zellen, welche eine Population von T-Zellen darstellen, die eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Balance zwischen den Gewebe zerstörenden und protektiven Effekten des Immunsystems spielen, indem sie Effektor-T-Zellen supprimieren können. Es konnte gezeigt werden, dass T_{reg}-Zellen aus Lavage von EAA-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern nicht in der Lage waren, die Th-Zell-Aktivierung zu unterdrücken, sodass dies zu einer überschießenden Immunantwort mit klinisch bedeutender Entzündungsreaktion in der Lunge führte. Dadurch könnte auch die

⁶⁶ Selman et al. 2006

⁶⁷ Camarena et al. 2001

⁶⁸ Barrera et al. 2008
hohe Anzahl an akkumulierten Lymphozyten in den Lungen von betroffenen Patienten erklärt werden⁶⁹.

Die auslösenden Antigene sind etwa 5µm im Durchmesser und im wesentlichen organische Partikel, aber auch anorganische niedermolekulare Verbindungen (wie bspw. das Isocyanat), die Haptene formen können⁶⁴. Diese Antigene lassen sich grob in fünf Kategorien aufteilen: Bakterien, Pilze/Hefen, Mykobakterien, Tierproteine und Chemikalien⁶³, wobei die häufigsten Auslöser für eine EAA weltweit das Vogel-Protein (Vogelhalterlunge) und Bakterien (Saccharopolyspora rectivirgula als Auslöser der Farmerlunge) sind⁷⁰.

Der Einfluss des Rauchens auf die EAA ist ambivalent – zum einen tritt die EAA in Rauchern im Vergleich zu gesunden Nichtrauchern seltener auf⁶³ und weist auch geringere Level der spezifischen Antikörper auf⁷¹; zum anderen zeigt sich aber, wenn die Erkrankung bei Rauchern auftritt, dass sich ein eher chronischer, schwerer Verlauf mit schlechterem Outcome ergibt⁷¹.

Im Allgemeinen wird die EAA als "akut", "subakut" und "chronisch" klassifiziert, wobei es keine allgemein anerkannten Kriterien gibt, um diese verschiedenen Stadien zu unterscheiden,

⁶⁹ Girard et al. 2011

⁷⁰ Selman et al. 2010

⁷¹ Ohtsuka et al. 1995

sodass eine alternative Klassifikation in nur 2 Clustern – Cluster 1 für Patienten mit wiederkehrenden systemischen Symptomen (entspricht in etwa der akuten Form) und Cluster 2 für Patienten, die vermehrt Trommelschlägelfinger, Hypoxämie, eine restriktive Ventilationsstörung und Fibrose aufweisen (entspricht in etwa der subaktuen und chronischen Form) – vorgeschlagen worden ist, wobei die Autoren selbst darauf hinweisen, dass dieses Klassifikationssystem noch prospektiv validiert werden müsste⁷².

Das diagnostische Curiculum umfasst neben einer ausführlichen Anamnese mit besonderen Hinblick auf die Exposition gegenüber Antigenen, die Suche nach spezifischen, präzipitierten Antikörpern (Präzipitine – diese beweisen allerdings lediglich eine Sensibilisierung, sodass diese nur als Marker für eine Exposition verwendet werden sollten⁶²), die umfassende körperliche Untersuchung, eine Lungenfunktionsprüfung mit eventuellem Provokationstest, eine bronchoalveoläre Lavage (Nachweis der markanten Lymphozyten-reichen [CD8-dominant] Alveolitis mit einer Lymphozytenzahl >30% als wichtiges Kriterium zur Abgrenzung gegenüber der IPF⁶³) und die radiologische Evaluation mittels HRCT, sowie eventuell eine chirurgische Lungenbiopsie⁶³. Es gibt aber auch Vorschläge, die EAA vor allem über klinische Prädiktoren (Exposition gegenüber dem Antigen, positive

⁷² Lacasse et al. 2009

Präzipitine, wiederkehrende Episoden der Symptome, inspiratorisches Knisterrasseln, Auftreten der Symptome 4-8h nach Exposition und Gewichtsverlust) zu diagnostizieren und daher auf eine Lavage oder Biopsie zu verzichten; allerdings gelten diese Kriterien nicht für die chronische Form⁷³, auf die im Rahmen dieser Einleitung ein Schwerpunkt gelegt wird.

Die chronische Form der EAA, die sich wahrscheinlich aus einer wiederkehrenden oder ständig vorhandenen Exposition gegenüber auslösenden Antigen entwickelt und durch Fibrose dem gekennzeichnet ist⁷⁴, äußert sich klinisch vor allem in allgemeines fortschreitender Dyspnoe, Husten, Fatigue, Gewichtsverlust. Unwohlsein und In der körperlichen Untersuchung finden sich teilweise Trommelschlegelfinger⁶⁴. In der Lungenfunktion zeigt sich ein restriktives Ventilationsmuster mit verminderten Volumina und mit einem erniedrigtem DL_{co}. Dies sind Veränderungen, die nicht spezifisch für die EAA sind, sondern auch auf andere ILD, wie z.B. die fNSIP oder IPF, zutreffen, sodass der Lungenfunktion die Rolle zukommt, die Schwere der Einschränkung zum Zeitpunkt der Diagnose, aber auch im Verlauf der Erkrankung zu dokumentieren^{62,64}.

Das radiologische Bild der EAA ist gekennzeichnet vor allem

⁷³ Lacasse et al. 2003

⁷⁴ Churg et al. 2006

durch das Vorhandensein von Milchglastrübung, einer retikulären sowie zentrilobulären, nodulären Zeichnungsvermehrung in Kombination mit Zeichen der Fibrose, wie z.B. verdickte Interlobularsepten, Volumenverlust, Traktionsbronchiektasien und Honeycombing, und dies in einer Verteilung, die vor allem die mittleren und unteren Lungenfelder betrifft⁶⁴. Auch hier ist es möglich, dass diese Ausprägungen eine IPF oder NSIP imitieren⁶⁰. Des Weiteren sind in HRCT-Bildern von EAA -Patienten noch Rundherde zu beachten, die nicht glatt begrenzt sind, vor allem perilobulär auftreten und weniger als 5mm im Durchmesser aufweisen⁶⁰.

Eine Studie von Silva und Mitarbeitern⁷⁵ hat untersucht, welche HRCT-Merkmale sich eignen, um eine EAA von einer IPF oder NSIP abzugrenzen. Als Kriterien, um eine EAA sowohl von der IPF als der NSIP abzugrenzen sind: eine Transparenzminderung in läppchenförmiger Ausbreitung, das Vorhandensein von zentrilobulären Noduli sowie die Abwesenheit einer vorherrschenden Verteilung der Abnormalitäten im unteren Lungenlappen. Die Abgrenzung der NSIP gegenüber der EAA erfolgt über die relative Aussparung des subpleuralen Raumes, die Abwesenheit Transparenzminderung der und dem Nichtvorhandensein von Honeycombing. Die IPF wurde durch das

⁷⁵ Silva et al. 2008

Vorherrschen Honeycombing in den von unteren Lungenabschnitten, die Abwesenheit der subpleuralen Aussparung und das Fehlen der zentrilobulären Noduli abgegrenzt. Mittels dieser Charakteristika ließen sich in etwa 50% der Fälle EAA, NSIP IPF definitiv voneinander unterscheiden. und Im Umkehrschluss bedeutet dies aber auch, dass in der anderen Hälfte der Fälle eine eindeutige Unterscheidung nicht möglich war/ist.

Das histologische Muster unterscheidet sich innerhalb der verschiedenen Formen der EAA, wobei der Nachweis einer Fibrose mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert ist gegenüber den Formen ohne Fibrose⁷⁴. Die EAA zeichnet sich vor allem durch eine chronische interstitielle Entzündungsreaktion aus, welche ein gutes Differenzierungskriterium gegenüber der IPF und fNSIP ist. Diese Entzündungsreaktion besteht vor allem aus Lymphozyten und ist um die Bronchiolen herum zentriert. Des Weiteren findet man unregelmäßig geformte, nichtnekrotisierende Granulome, die im Interstitium verteilt sind. Diese Zentrierung der Auffälligkeiten um die Bronchiolen herum bleibt auch bei einer Ausbreitung der Erkrankung in das umgebende Parenchym bestehen⁶⁰.

Wie bereits zuvor erwähnt, wird im Rahmen dieser Einleitung vor allem die chronische, fibrosierende Form beschrieben werden. Diese weist drei verschiedene Muster auf: zum einen ein uneinheitliches Muster einer ausschließlich peripheren Fibrose mit

34

Zerstörung der Lungenarchitektur und dem Vorkommen von Fibroblasten-Foci (UIP-ähnlich), zum anderen eine homogene Fibrose, die dem fNSIP-Muster ähnelt und wiederum eine irreguläre Fibrose, die vor allem um die Bronchien zu finden ist⁷⁶. Diese Muster sind auch mit einer jeweils unterschiedlichen Prognose assoziiert: Patienten mit einem UIP-ähnlichem Muster wiesen ein medianes Überleben von 2,8 Jahren, solche mit einem fNSIP-ähnlichem Muster von etwa 2,1 Jahren, und Patienten mit dem bronchienzentrierten Typus überlebten im Durchschnitt etwa 11,3 Jahre (zum Vergleich: EAA-Patienten ohne Fibrose wiesen ein medianes Überleben von 22,4 Jahren auf)⁷⁷. Hinweise, dass die zugrundeliegende Erkrankung am wahrscheinlichsten eine EAA und nicht eine IPF ist, welches teilweise nur schwer zu unterscheiden ist bei einem Vorherrschen des UIP-Musters in EAA-Patienten⁷⁵, sind vor allem isolierte Riesenzellen, die unregelmäßig geformten Granulome, Schaumann Körper und die peribronchiale Verteilung der Fibrose, welche Hinweise auf die chronische Entzündung sind⁷⁴.

Die wichtigste therapeutische Maßnahme ist das Vermeiden des auslösenden Agens⁶²⁻⁶⁴, wobei die Identifikation des Agens entscheidend ist, da ein unbekanntes Agens mit einem schlechteren Überleben assoziiert ist⁷⁶. Medikamentös werden vor allem

⁷⁶ Fernández Pérez et al. 2013

⁷⁷ Churg et al. 2009

systemische Kortikosteroide eingesetzt, welche zwar die Rekonvaleszenz fördern, aber anscheinend keine nachgewiesenen Langezeiteffekte aufweisen⁶²⁻⁶⁴. Bezüglich der Prognose der EAA gegenüber anderen ILD werden unterschiedliche Auffassungen vertreten: EAA-Patienten mit UIP-Muster scheinen eine ähnliche Prognose wie die IPF aufzuweisen⁷⁷, wohingegen andere Studien zeigten, dass auch fibrotische EAA-Patienten noch ein besseres Outcome als IPF-Patienten aufweisen⁷⁶.

1.1.2.2. Kollagenosen (collagen vascular disease [CVD])

Der Begriff der Kollagenosen umfasst eine Gruppe von Erkrankungen unklarer Ätiologie, systemischen die das Bindegewebe betrifft und zu einer autoimmun-vermittelten Organdysfunktion führt^{47,78}. Im deutschsprachigen Raum zählen zu den Kollagenosen: der systemische Lupus erythematodes (SLE), Sklerodermie (progressive systemic sclerosis – PSS), die Dermatomyositis/Polymyositis (DM/PM), Mischkollagenosen (mixed connective tissue disease - MCTD) und das Sjögren-Syndrom⁷⁸. Im angloamerikanischen Raum werden die Begriffe connective vascular disease (CVD) und connective tissue disease (CTD) synonym verwendet, welche noch die rheumatoide Arthritis

⁷⁸ Rehbock 2015

(RA) und das Antisynthetase-Syndrom, sowie die "undifferentiated connective tissue diseases" (UCTD) beinhalten⁴⁷.

Die Lunge ist im Rahmen von Kollagenosen häufig betroffen, alle Kompartimente (Pleura, Alveolen, Interstitium, wobei Gefäßstrukturen etc.) involviert sein können, das Ausmaß der jeweils betroffenen Strukturen aber abhängig von der zugrundeliegenden Erkrankung ist⁷⁹. Zudem ist zu beachten, dass sich aufgrund der Lungenbeteiligung eine erhöhte Morbidität und ergibt^{78,79}. Dennoch weisen Mortalität die interstitiellen Pneumonien im Rahmen einer CVD (CVD-ILD) eine bessere Prognose als die idiopathischen Formen (IIP) auf⁸⁰, weswegen bei jedem Verdacht auf eine IIP gezielt nach Hinweisen auf eine CTD gesucht werden sollte⁴⁷. Außerdem konnten feine Unterschiede zwischen einen UIP-Muster in einer CVD und in einer IPF festgestellt werden: in der histologischen Aufarbeitung zeigten sich beispielsweise im UIP-Muster einer CVD (CVD-UIP) weniger "Fibroblasten-Foci" und Honeycombing im Vergleich zu IPF-UIP, und in der radiologischen Bildgebung präsentiert sich die CVD-UIP als atypisches UIP-Muster mit weniger honeycombing im Vergleich zur IPF-UIP⁸¹. Eine diagnostisch entscheidende Relevanz wurde dabei nicht bewertet und erlaubt im Zweifelsfall auch keine

⁷⁹ Lynch 2009

⁸⁰ Park et al. 2007

⁸¹ Song et al. 2009

sichere Differenzierung. Der Antikörperstatus bei einer UIP-IPF zeigte hingegen keinen Einfluss auf das Überleben⁸¹.

Im Rahmen dieser Einleitung wird die rheumatoide Arthritis in einem gesonderten Punkt besprochen, da sich gezeigt hat, dass das vorherrschende histo-radiologische Muster die UIP ist⁸². Des Weiteren wird in dieser Einleitung davon abgesehen, die Erkrankungen MCTD und UCTD auszuführen.

Sklerodermie (PSS)

Die Sklerodermie zeichnet sich durch eine exzessive Ablagerung von Kollagen aus⁸³, die zu einer Verdickung der Haut, und zur Fibrosierung mit Beteiligung der inneren Organe führt⁸⁴. Die Erkrankung betrifft vor allem Frauen (3:1)⁸² zwischen dem 45. und 64. Lebensjahr⁸⁵. Die pulmonale Beteiligung ist die zweithäufigste Manifestation der Erkrankung, wovon die interstielle Pneumonie (ILD) und die pulmonale Hypertonie (PH) die häufigsten Formen dieser Manifestation sind⁸⁴. Das mediane Überleben eines Sklerodermie-Patienten mit einer ILD liegt bei 5-8 Jahren⁸⁶, wobei die beiden häufigsten Todesursachen das Vorliegen einer ILD als auch einer PH sind⁸⁴.

⁸² Kim et al. 2009

⁸³ Kim et al. 2002

⁸⁴ Gómez Carrera und Bonilla Hernan 2013

⁸⁵ Capobianco et al. 2012

⁸⁶ Vij und Strek 2013

Von allen CTD-Erkrankungen sind Patienten mit Sklerodermie am häufigsten von einer ILD betroffen (40-80%)⁸⁷.

Die Häufigkeit der ILD ist abhängig von der ethnischen Zugehörigkeit, dem Ausmaß der Hautbeteiligung und dem Vorliegen von Autoantikörpern, wobei Antikörper gegen Topoisomerase (anti-Scl70) stark mit einer ILD assoziiert sind⁸⁷. Klinisch äußert sich die pulmonale Beteiligung über Dyspnoe, die bei Anstrengung zunimmt, und unproduktiven Husten, sowie durch Fatigue^{84,85}. Brustschmerzen atypische und In der Lungenfunktionsuntersuchung zeigt sich ein restriktives Ventilationsmuster, mit DL_{CO} als sensitivsten Parameter⁸⁴.

Das vorherrschende histopathologisch-radiologische Muster ist die fibrotische NSIP, wobei das UIP-Muster in 5-10% der Fälle⁷⁷ auch kann^{84,85,87}. Im HRCT finden vorkommen sich bilateral symmetrische, netzartige retikuläre Zeichnungsmuster mit mehr weniger stark ausgeprägter Milchglastrübung oder und Traktionsbronchiektasen, vor allem in den basalen Abschnitten mit der für die NSIP-charakteristischen subpleuralen Aussparung⁷⁸. Aus einer Kombination von HRCT-Befunden und FVC (funktionelle Vitalkapazität) ist ein einfacher Score entstanden, um die Erkrankung in extensiv oder eingeschränkt zu unterteilen, sodass daraus eine prognostische Einschätzung bezüglich der Mortalität

⁸⁷ Gutsche et al. 2012

erfolgen kann⁸⁸. Das histologische NSIP-Muster zeigt sich ähnlich wie bereits im Abschnitt 1.1.1.2. definiert: homogene, uniforme Veränderung mit vorherrschenden entzündlichen Infiltraten ohne Destruktion der Lungenarchitektur und mit eher wenig Fibrose⁸⁹.

Therapeutisch werden neben supportiven Maßnahmen wie Sauerstofftherapie, pulmonaler Rehabilitation und Therapie des gastroösophagealen Refluxes vor allem Kortikosteroide und Immunsuppressiva eingesetzt⁸⁹. Hierbei gibt es bisher aber nur zwei randomisierte Studien, die den Einsatz von Cyclophosphamid beschreiben, welche zu einer verzögerten Verschlechterung der FVC führten⁸⁷. Es gibt zudem auch Berichte über positive Effekte von Mycophenolat-Mofetil⁸⁶.

Dermatomyositis/Polymyositis (DM/PM)

Beide Entitäten gehören zum Formenkreis der idiopathischen inflammatorischen Myopathien und zeichnen sich durch eine Muskelschwäche aus, die auf einer entzündlichen, autoimmunen Schädigung beruht⁹⁰. Die Dermatomyositis zeichnet sich zusätzlich noch durch verschiedenste Hautmanifestationen wie einem lilafarbenen Erythem des oberen Augenliedes und den Gottron-Papeln z.B. über den Knöcheln aus^{85,86}. Etwa 35-40% der Patienten

⁸⁸ Goh et al. 2008

⁸⁹ Bussone und Mouthon 2011

⁹⁰ Connors et al. 2010

bekommen eine ILD, die die Mortalität um bis zu 40% erhöht, und die mit dem Vorliegen von Anti-Jo-1 Antikörpern (histidyl tRNA-Synthetase) korreliert⁹⁰. Des Weiteren scheint es außerdem eine erhöhte Rate von Malignomen im Rahmen der ILD zu geben^{78,86}.

Die Symptome sind vergleichbar mit denen der idiopathischen Form und äußern sich in Husten, Dyspnoe bei Anstrengung und Fatigue⁹⁰. Es gibt drei klinische Verlaufsformen: akuter Beginn der Symptome mit respiratorischem Versagen, dessen histopathologisches Muster eine DAD (diffuse alveolar damage) aufweist; progressiver Verlauf, der mit dem histopathologischen Muster der fNSIP korreliert, und einer Minorform ohne Symptome⁸⁴.

Die radiologische Bildgebung zeigt auch in dieser Entität wieder die NSIP als häufigstes Muster. Aber auch das Muster der OP (organizing pneumonia), das sich durch bilaterale, vor allem basale, dreieckige bis polygonale Konsolidierungen auszeichnet, die expandieren und wandern können, ist oft vorhanden, teilweise zusammen mit dem fNSIP-Muster^{78,84}. Histologisch ist ebenfalls das fNSIP-Muster das häufigste, gefolgt von UIP und OP⁹⁰.

Es gibt keine eindeutige Empfehlung für die Therapie einer ILD in Patienten mit Dermato-/Polymyositis, wobei oft hochdosierte Kortikosteroide zum Einsatz kommen⁸⁷.

41

Sjögren-Syndrom

Das Sjögren-Syndrom ist durch die Tria Keratokonjunktivitis sicca, Xerostomie und Arthritis gekennzeichnet. Es ist relativ häufig, da es etwa 0,1% der Bevölkerung betrifft⁷⁸. Es sind bedeutend häufiger Frauen betroffen (9:1), vor allem in der 4. und 5. Lebensdekade⁸⁵. Ursächlich für die Symptomatik ist eine lymphozytäre Infiltration der exokrinen Drüsen, vor allem der Tränen- und Speicheldrüsen⁸⁷. Die Lungenbeteiligung liegt zwischen 9-75% abhängig von der Definition, wobei eine ILD dabei die häufigste Manifestation ist⁸⁴. Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit ILD wird mit 84% angegeben⁸⁶.

Die histologischen Muster sind vielfältig und umfassen LIP (lymphozytisch interstitielle Pneumonie), fNSIP, UIP und OP⁸⁶, wobei auch hier die NSIP wieder das häufigste Muster ist⁸⁷. Fast pathognomonisch scheint aber das Vorliegen des LIP-Musters (lymphocytic interstitial pneumonia) zu sein, das durch eine diffuse pulmonale follikuläre Hyperplasie mit Betonung des Interstitiums gekennzeichnet ist⁷⁸. Im HRCT präsentiert es sich durch Milchglastrübungen, dünnwandige Zysten (als wichtiges differentialdiagnostisches Merkmal NSIP⁷⁸ zur und zu Lymphomen⁷⁹), Noduli verschiedenster Größe und Verdickung der Septen⁸⁴.

Therapeutisch kommen verschiedene Regime zum Einsatz, die

42

unter anderem Kortison, Azathioprin, Hydroxychloroquin etc. umfassen⁸⁶.

Systemischer Lupus Erythematodes (SLE)

Der systemische Lupus erythematodes ist eine systemische Autoimmunerkrankung, die prinzipiell jedes Organ betreffen kann und sich somit vielgestaltig in seiner klinischen Ausprägung präsentiert^{84,85}. Die Inzidenz wird mit 1-10 pro 100 000 Einwohner pro Jahr, und die Prävalenz mit 20-70 pro 100 000 pro Jahr angegeben⁸⁵. Es sind vor allem Frauen betroffen (9:1), und der Beginn der Erkrankung ist meist um das 30. Lebensjahr⁸⁴. Die Überlebensrate des SLE ingesamt nach 5 Jahren liegt bei über 90%⁹¹. Im Gegensatz zu den anderen Entitäten ist eine ILD bei SLE-Patienten selten (etwa 3%)⁸⁵. Bei einem Vorliegen einer ILD ist die fNSIP das häufigste Muster, aber auch die UIP, LIP und OP sind beschrieben worden⁸⁷. Im Gegensatz dazu ist die Pleuritis die häufigste Lungenmanifestation des SLE, von der 40-60% der Patienten betroffen sind⁷⁹. Als schwerwiegende Komplikation ist die Lupuspneumonitis mit einer DAD als histologisches Korrelat zu nennen⁷⁸

⁹¹ Pons-Estel et al. 2010

1.1.2.3. Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis ist eine chronische Entzündung, die zu schmerzhaft geschwollenen Gelenken mit Zerstörung der Gelenksynovia führt, welche sich dann in Funktionseinschränkungen äußert⁹². Die genauen Klassifikationskriterien sind bitte der aktuellen Publikation des American College of Rheumatology⁹¹ zu entnehmen. Die Prävalenz beträgt etwa 0,5-2% der Gesamtbevölkerung und betrifft vor allem Frauen (3:1). Eine extraartikuläre Manifestation der Erkrankung, die die Mortalität insgesamt erhöht, tritt in etwa 50% der Fälle auf, wobei die Lunge sehr häufig betroffen ist⁹³. Prinzipiell können alle Strukturen der Lunge betroffen sein⁹⁴. Davon ist die ILD die häufigste Lungenmanifestation und tritt in etwa 4-7,9 % der Fälle von Patienten mit RA auf, wobei sich das Lebenszeitrisiko, eine ILD als RA-Patient zu entwickeln, auf etwa 10% beläuft⁹⁵. Zu den Risikofaktoren, eine ILD zu entwickeln, zählen Rauchen, hohe Autoantikörper-Titer (anti-Rheumafaktor [RF] und anti-cyclic citrullinated peptide [anti-CCP]), eine familiäre Vorbelastung; und in einigen Studien ist das männliche Geschlecht als Risikofaktor beschrieben worden⁹³.

Wie bereits zuvor erwähnt, ist, im Gegensatz zu den anderen CTD-

⁹² Aletaha et al. 2010

⁹³ Yunt und Solomon 2015

⁹⁴ Lake und Proudman 2014

⁹⁵ O'Dwyer et al. 2013

Entitäten bei denen die NSIP das häufigste Muster ist, bei der RA das häufigste zugrunde liegende Muster eine UIP, woraus sich prognostische Konsequenzen ergeben können⁸². Bezüglich der Prognose gibt es allerdings unterschiedliche Ergebnisse. Eine Studie von Park et al.⁸⁰ zeigt, dass eine RA-ILD ein besseres Outcome hat als eine IPF, wobei es keinen Unterschied im Überleben zwischen einer RA-ILD und den anderen CTD-ILD gibt, obwohl eine RA-UIP nach einer Anpassung von Alter, Geschlecht und FVC eine schlechtere Überlebensrate hatte als eine non-RA-CTD-UIP. Des Weiteren wies eine RA-UIP keine signifikanten Unterschiede im Überleben zu einer IPF-UIP auf. Kim et al.⁹⁶ untersuchten im HRCT das Vorliegen einer RA-ILD und wiesen auch hier das UIP-Muster als häufigstes nach. Auch hier zeigte sich ein schlechteres medianes Überleben von RA-UIP im Gegensatz zu RA-non-UIP (3,2 vs 6.6 Jahre), sowie wiederum kein Unterschied im medianen Überleben zwischen RA-UIP und IPF. Des Weiteren konnten sie im Allgemeinen darstellen, dass das Vorliegen von Traktionsbronchiektasen und Honeycombing mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Dass das Vorliegen, vor allem von Traktionsbronchiektasen, mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist, konnten Walsh et al. ebenfalls für die CTD-

⁹⁶ Kim et al. 2010

ILD nachweisen⁹⁷. Tsuchiya et al.⁹⁸ untersuchten das Vorliegen der histologischen Muster bei RA-Patienten (UIP, NSIP, DAD, OP, Bronchiektasen und Bronchiolitis) und die daraus resultierenden signifikant unterschiedlichen Überlebensraten. Das schlechteste Überleben insgesamt wiesen Patienten mit einem DAD-Muster auf (5-Jahres-Überlebensrate 20%), das längste Überleben zeigten Patienten mit einem NSIP-Muster (5-Jahres-Überlebensrate 93,8%). Die RA-UIP zeigte im Vergleich zur RA-NSIP eine Prognose (5-Jahres-Überlebensrate schlechtere 36,6%). Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die RA-ILD insgesamt wohl eine bessere Prognose hat als eine IPF⁹⁴, obwohl das vorherrschende UIP-Muster eine ähnlich schlechte Prognosen aufweist wie die IPF selbst^{80,96}, wenn man von gewissen Unterschieden absieht95.

Klinisch präsentiert sich die ILD im Rahmen einer RA mit Belastungsdyspnoe, unproduktiven Husten und Fatigue. Knisterrasseln kann in der körperlichen Untersuchung vorkommen. Der sensitivste und sich zuerst verändernde Parameter in der Lungenfunktion ist der DL_{co} , der bei 40% der Patienten verändert ist und bei Werten unter 54% das Fortschreiten der Erkrankung anzeigen kann. Ein restriktives Ventilationsmuster mit reduzierter Total- und Vitalkapazität trifft erst im Verlauf ein⁸⁴.

⁹⁷ Walsh et al. 2014

⁹⁸ Tsuchiya et al. 2011

Die beiden häufigsten zugrundeliegenden Muster einer ILD sind das UIP- und fNSIP-Muster, mit dem UIP-Muster als häufigstes Pattern. Es zeichnet sich radiologisch, wie bei der IPF, im HRCT durch Traktionsbronchiektasen, honeycombing, vor allem subpleural und basal, sowie dem Fehlen einer Milchglastrübung aus. Histologisch zeigen sich Areale normalen Lungengewebes neben Arealen, die durch Umbauzonen mit Zerstörung der Lungenarchitektur und Narbenbildung gekennzeichnet sind. Die RA-fNSIP hingegen zeichnet sich im HRCT vor allem durch Milchglastrübungen und nur geringes honeycombing aus. Histologisch ist die RA-fNSIP durch das Vorliegen uniformer Entzündung und Fibrose ohne honeycombing charakterisiert⁹⁵.

Für die Therapie einer RA-ILD existieren keine Ergebnisse von randomisierten, placebo-kontrollierten Studien, und auch kein Konsensus über die Therapiemöglichkeiten. Momentan wird Kortison, teilweise in Kombination mit zytotoxischen Substanzen wie Azathioprin, Cyclophosphamid und Mycophenolat-Mofetil, eingesetzt. Zudem scheint das zugrundeliegende pathologische Muster Einfluss auf das Therapieansprechen zu nehmen, denn RA-fNSIP-Patienten zeigen ein besseres Ansprechen und somit auch eine besseres Prognose als RA-UIP⁹³.

47

1.1.2.4. Sarkoidose

Die Sarkoidose ist eine Multisystemerkrankung unbekannter Ursache, die vor allem die Lunge und das Lymphsystem betrifft. Für die Diagnose ist es notwendig, dass das klinisch-radiologische Bild durch den histologischen Nachweis von nicht-verkäsenden Granulomen bestätigt wird, sowie der Ausschluss anderer granulomatöser Erkrankungen (z.B. Berryliose) erfolgt⁹⁹.

Die Sarkoidose tritt weltweit auf und betrifft alle Geschlechter. Rassen und Personen jeglichen Alters, wobei allerdings vor allem Personen unter 40 Jahren, insbesondere zwischen dem 20. und 29. Lebensalter, betroffen sind. Die Epidemiologie genau zu erfassen, gestaltet sich schwierig aufgrund einer mangelnden präzisen Falldefinition, einer unterschiedlichen Methodik zur Fallerfassung, einer variablen Ausgestaltung der klinischen Präsentation und dem Fehlen sensitiver und spezifischer Tests, sodass es zu Fehldiagnosen und/oder nicht erfassten Fällen kommen kann⁹⁹. Die Unterschiede in Prävalenz und Inzidenz resultieren aus den geographischen Faktoren der Herkunft (z.B. höchste Erkrankungsrate Europas ist in Schweden im Vergleich zur niedrigsten Erkrankungsrate in Spanien – ["Nord-Süd-Gefälle"]¹⁰⁰),

 ⁹⁹ Statement on sarcoidosis. Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS), the European Respiratory Society (ERS) and the World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG) adopted by the ATS Board of Directors and by the ERS Executive Committee, February 1999 1999

¹⁰⁰ Pabst et al. 2012

der ethnischen Zugehörigkeit (Afroamerikaner weisen neben den Schweden und Dänen die höchste Prävalenz auf¹⁰¹; außerdem zeigen Afroamerikaner häufiger einen schweren Verlauf im Vergleich zu Kaukasiern⁹⁹), des Geschlechtes (Frauen sind etwas häufiger betroffen⁹⁹) und des Alters (70% der Patienten sind 25-45 Jahre¹⁰²), sodass sich Prävalenzen von 4,7-64 pro 100 000 Einwohnern und eine Inzidenz von 1,0-35,5 pro 100 000 Einwohnern ergeben¹⁰².

Wie bereits erwähnt, ist die Ätiologie der Sarkoidose unbekannt. Die momentane Hypothese ist, dass die Sarkoidose ein Resultat einer chronischen immunologischen Antwort ist, die mit einer genetische Empfänglichkeit sowie mit spezifischen infektiösen und/oder Umweltfaktoren assoziiert ist¹⁰³. Die Immunopathogenese ist nicht vollständig verstanden, aber es wird vermutet, dass sie ähnlich den bei anderen granulomatösen Erkrankungen bekannter Ursache verläuft: die in den Körper eindringenden Antigene antigenpräsentierenden Zellen werden phagozytiert, von prozessiert, und den Effektor-T-Zellen, vor allem CD4+-Zellen, via MHC-Klasse II Molekül präsentiert, die daraufhin aktiviert werden, wodurch eine Th1-vermittelte Immunantwort in Gang gesetzt wird und schließlich zur Formierung der sarkoidösen Granulome durch

¹⁰¹ James DG 1994

¹⁰² Valeyre et al. 2014

¹⁰³ Nunes et al. 2007

Rekrutierung, Proliferation und Differenzierung weiterer Immunzellen führt¹⁰⁴.

Bezüglich der möglichen Antigene werden momentan pathogenassoziierte Molekularmuster (PAMPs - pathogen-associated molecular pattern; hier vor allem der "Cord" Faktor der Zellwand) von getöteten bzw. teilweise schon abgebauten Mykobakterien und Proprionibakterien favorisiert, da sich Hinweise auf diese Organismen bei Sarkoidose-Patienten finden lassen und diese durch ihren zellulären Aufbau mit einem hohen Fettanteil in ihrer Zellmembran schlecht in Makrophagen abgebaut werden können und dort persistieren. Hieraus ergibt sich die Hypothese, dass durch die Mikroorganismen ausgelöste Immunantwort von die Aggregation und Persistenz von nicht abbaubaren Antigenen gefördert wird und diese wiederum einen Ausgangspunkt für die eines Granuloms bilden, Formierung durch eine was überschießende Immunantwort mit sich gegenseitig bedingender Stimulation von Makrophagen und T-Zellen verursacht wird¹⁰².

Diese überschießende Immunantwort wird durch verschiedene Faktoren bedingt, die wahrscheinlich aufgrund einer genetischen Anfälligkeit bestehen. Hierbei ist sich vor allem auf das Zusammenspiel von Antigen, MHC-Komplex und T-Zell-Rezeptor konzentriert worden⁸¹, wobei festgestellt worden ist, dass Gen-

¹⁰⁴ Baughman et al. 2011

Mutationen/Genvarianten, die für den MHC-Komplex codieren, den Phänotyp und auch das Outcome positiv oder negativ beeinflussen¹⁰⁵. In einer Genom-weiten Studie sind außerdem *BTNL2* (Butyrophilin–like 2) und *Annexin A11* als mögliche "Sarkoidose-Empfänglichkeitsgene" identifiziert worden¹⁰⁵. Es gibt aber auch Hinweise auf ein ganzes Genexpressions-Netzwerk, das von *STAT1* (signal transducer and activator of transcription-1) reguliert wird, was insofern interessant ist, da es ein Signal-Ziel von Interferon- γ (IFN- γ) ist, welches wiederum entscheidend für die Th1-Immunantwort ist¹⁰⁴.

Die Th1-Antwort wird durch antigenpräsentierende Zellen und Makrophagen vermittelt. Diese weisen bei Sarkoidose-Patienten eine sehr große Kapazität zur Antigenpräsentation aufgrund einer gesteigerten Expression von MHC-Molekülen im Vergleich zu Gesunden auf¹⁰², was zu einer effektiven Stimulation der T-Zell-Aktivierung führt, wohingegen Alveolarmakrophagen gesunder Patienten die T-Zell-Aktivierung nicht unterstützen oder sogar hemmen¹⁰⁵. Die hierbei vermittelte Th1-Antwort führt zu einer verstärkten Produktion von IFN- γ , IL-2 (Interleukin-2) und TNF- α (tumor necrosis factor α), auf das die Makrophagen bei Sarkoidoseverstärkt reagieren, sodass Patienten sich hieraus eine wechselseitige Verstärkung der Immunanwort ergibt¹⁰², zumal die

¹⁰⁵ Müller-Quernheim et al. 2009

 T_{reg} -Zellen bei Sarkoidose-Patienten zwar zahlreich vorhanden, aber funktionell eingeschränkt oder "erschöpft" sind ^{100,104}.

Die klinische Präsentation der Multisystemerkrankung Sarkoidose ist abhängig von Ethnizität, der Dauer der Erkrankung, dem/n betroffenen Organ/en und dem Ausmaß des Befalls sowie der Aktivität des granulomatösen Prozesses⁹⁹. Die häufigsten klinischen Manifestationen umfassen: respiratorische Symptome (mit chronischem, trockenem Husten als häufigste Ausprägung), extrathorakale Lokalisationen (vor allem Lymphknoten, Haut und Augen sind betroffen), Allgemeinsymptome (Fieber, Fatigue, Gewichtsverlust) und das Erythema nodosum¹⁰⁶. Eine spezielle, benigne Form der Sarkoidose ist das Löfgren-Syndrom, das durch einen akuten Beginn mit Erythema nodosum, bihiliärer Lymphadenopathie, Polyarthritis und Fieber definiert ist⁹⁹.

Der Verlauf der Sarkoidose ist sehr variabel. Spontane Remissionen werden bei etwa zwei Drittel der Patienten beobachtet, wohingegen die Chronifizierungsrate bei etwa 10-30% liegt. Insgesamt entwickeln 20% der Patienten eine Lungenfibrose¹⁰⁷. Die Gesamtmortalität liegt bei 1-5%⁹⁹, wobei dies meist aus der Beteiligung des Herzens, des Nervensystems oder des

¹⁰⁶ Nunes et al. 2005

¹⁰⁷ Criado et al. 2010

respiratorischen Versagens aufgrund einer Lungenfibrose resultiert¹⁰⁸. Im Rahmen dieser Einleitung wird allein auf die Sarkoidose mit Lungenbeteiligung, insbesonders auf die Ausprägung einer Lungenfibrose eingegangen.

Die Lunge ist in 90% aller Fälle bei Sarkoidose betroffen^{99,109}. Die klinische Symptomatik umfasst Husten, Pfeifen, Dyspnoe, Stridor, Hämoptysen, Fatigue und Ödeme⁸⁶, wobei nicht-produktiver Husten, Dyspnoe und Brustschmerzen bei 30-50% der Patienten auftreten¹¹⁰. Dennoch können 50% der Fälle asymptomatisch verlaufen, obwohl sich Hinweise auf Sarkoidose im Röntgen-Thorax ergeben¹⁰⁷. Die klinische Untersuchung ist eher unauffällig, denn Trommelschlegelfinger sind selten und Knisterrasseln findet 20% der Patienten¹¹⁰. sich bei etwa In der nur Lungenfunktionsuntersuchung zeigt sich ein restriktives Ventilationsmuster mit verminderten Volumina sowie verminderter Diffusionskapazität, wobei diese Veränderungen mit der Schwere der Erkrankung zunehmen. Ein obstruktives Ventilationsmuster lässt sich in 5.7% der Fälle beobachten und ist assoziiert mit einer schlechteren Prognose, die eine erhöhte Morbidität, eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für respiratorische Symptome als auch das Stadium IV in der radiologischen Bildgebung bedeutet^{103,107}.

¹⁰⁸ Iannuzzi 2011

¹⁰⁹ Baughman et al. 2012

¹¹⁰ J.P. Lynch 3rd, E.S. White 2005

Die Röntgen-Thorax-Untersuchung ist in 80% der Fälle auffällig, wobei die bihiliäre Lymphadenopathie die häufigste (vorhanden in 50-85% der Fälle) charakteristische Normabweichung darstellt. Das Lungenparenchym ist in 25-50% der Fälle betroffen, und zwar vor allem die zentralen Regionen und die oberen Lungenflügel¹¹⁰. Anhand des Musters von Lymphadenopathie und Lungeninfiltraten ist in den 1960er Jahren ein Staging-System von Scadding et al. vorgeschlagen worden, dass in seiner modifizierten Form heute noch in Gebrauch ist¹⁰⁴: Stadium 0 zeigt keine Lymphadenopathie, Stadium I weist die alleinige Lymphadenopathie auf, Stadium II zeigt sowohl die Lymphadenopathie als auch pulmonale Infiltrate, Stadium III ist durch pulmonale Infiltrate in Abwesenheit einer Lymphadenopathie definiert, und Stadium IV umfasst die Fibrose¹⁰⁹. Dieses System hat insofern prognostische Relevanz, da eine spontane Remissionsrate bei Stadium I etwa 60-90% beträgt, hingegen in Stadium IV 0%^{109,110}. Dennoch sollte beachtet werden, dass eine hohe Diskrepanz zwischen einzelnen Untersuchern vorliegen kann und die radiologischen Befunde nur schwach mit der Ausprägung der Dyspnoe korrelieren^{104,109}. Im HRCT sind die weitläufig, vor allem entlang der Lymphgefäße verteilten Mikronoduli mit einer vorherrschenden Präsentation im oberen und mittleren Lungenfeld charakteristisch für eine Sarkoidose^{103,107}. Hinweise auf eine Fibrose sind beispielsweise eine lineare

Zeichnungsvermehrung, honeycomb-ähnliche Zysten, Traktionsbronchiektasien und die Zerstörung der Architektur in einer fleckförmigen Ausbreitung vor allem in den oberen und mittleren Lungenabschnitten¹⁰⁷.

Wie zuvor erwähnt, wird für die Diagnose einer Sarkoidose der Nachweis der nicht-verkäsenden Granulome benötigt. Diese können mittels Biopsie aus dem betroffenen Organ gewonnen werden. Im Bereich der Lunge konnte die Trefferquote transbronchialer Biopsien durch die Ausdehnung der Ultraschallgestützten Biopsie mediastinaler Lymphknoten (EBUS) so erhöht werden, dass eine bis dato praktizierte Mediastinoskopie oder gar eine chirurgischen Lungenbiopsie nur noch selten notwendig ist¹⁰⁷. Pathognomonisch sind die histologisch nachweisbaren nichtverkäsenden Epitheloidzell-Granulome⁹⁹. Diese bestehen im Kern aus Makrophagen, Epitheloidzellen und Riesenzellen, und sind unmittelbar von CD4+-T-Zellen umgeben, wohingegen sich CD8+T-Zellen am Rand des Granuloms befinden, umlagert von Fibroblasten, Mastzellen und Kollagen¹⁰⁷. Die Verteilung der Granulome ist charakteristisch entlang der Lymphgefäße vor allem im Interstitium der Bronchien und Gefäße^{99,107}.

Weitere Hinweise auf die Erkrankung kann man mittels bronchoalveolärer Lavage gewinnen, denn es liegt in 80% der Patienten eine Lymphozytose mit einer CD4:CD8 Ratio von >3,5 in

55

50% der Fälle vor¹⁰². Auch sind verschiedene Serum-Marker in Verwendung – der bekannteste ist ACE (angiotensin converting enzyme), wobei dieser aber nicht ausreichend für die Diagnose ist¹⁰² und auch nicht mit der Erkrankungsschwere korreliert⁸¹. Als neue Marker werden der lösliche Interleukin-2-Rezeptor, Neopterin und Chitotripsidase diskutiert¹⁰².

Bei einer Erkrankung mit recht hoher Spontanremission fällt die Entscheidung, wann eine Therapie wirklich notwendig ist, schwer. Eine Therapie sollte bei einer schweren Dysfunktion oder Gefahr von bleibenden Schäden des Organs mit eventueller Lebensgefahr und bei Fortbestehen von beeinträchtigenden Allgemeinsymptomen erwogen werden. Zwingend therapiert werden sollte bei Befall des Herzens, des Nervensystems und der Niere, sowie bei einer refraktären, topischen Therapie des Auges und dem Vorliegen einer Hyperkalziämie. Medikamentös werden vor allem systemische Glukokortikoide eingesetzt, die zwar auf kurze Zeit Vorteile bringen, aber für deren Benefit bei längerer Einnahme keine Evidenz besteht¹⁰². Auch konnte nie bewiesen werden, dass die Therapie mit Glukokortikoiden tatsächlich die Manifestation einer Fibrose verhindert¹⁰⁴. Um Kortison einzusparen, werden unter anderen Methotrexat und Azathioprin verwendet. Des Weiteren gibt es vielversprechende Ansätze mit TNFα-Blockern¹⁰².

1.2. oxidativer Stress

Oxidativer Stress ist definiert als ein Ungleichgewicht, bei dem die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS - reactive oxygen species) die Kapazität, diese zu neutralisieren, übersteigt¹¹¹. Diese können sowohl exogen (z.B. Zigarettenrauch) als auch endogen (Atmungskette in den Mitochondrien oder aktivierte Phagozyten) wobei die wichtigsten produziert werden. **ROS-Moleküle** Superoxidanionen $(O_2^{-}),$ Hydroxylradikale (OH⁻), Stickstoffmonoxid (NO) Wasserstoffperoxid und (H_2O_2) umfassen¹¹². Ihre biologische Reaktivität beruht auf der Instabilität des ungepaarten freien Elektrons, welches zur Oxidation führt¹¹², wobei beispielsweise DNA-Schäden, Lipidund Proteinperoxidation die Folge sein können¹¹³. Eine Übersicht über die Metabolisierung von ROS zeigt Abbildung 1.4.



Abbildung 1.4. Produktion und Metabolisierung der Reaktiven Sauerstoffspezies

- 111 Wuyts et al. 2013
- 112 Rahman et al. 2006
- 113 Kuwano et al. 2003

Die Pathogenese der IPF und anderer IIP ist bislang nur unzureichend verstanden, wobei die momentane Hypothese ist, dass die Fibrose aus einem komplexen Mechanismus der wiederholten Schädigung von alveolären Typ-II-Zellen mit daraus resultierender Apoptose sowie durch fehl-regulierte Interaktion von Fibroblasten Epithelzellen mit mit konsekutiv gestörter Wundheilung resultiert¹¹¹. Dabei existiert bereits lange die Hypothese, dass ein oxidatives/antioxidatives Ungleichgewicht ein möglicher Mechanismus der Lungenschädigung sein könnte¹¹⁴. Für die erhöhte oxidative Belastung gibt es verschiedenste Hinweise. Cantin et al.¹¹⁵ zeigten bereits 1987, dass Entzündungszellen von IPF-Patienten spontan große Mengen von Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid freisetzen, und dass sich eine erhöhte Konzentration von Myeloperoxidase in ELF (epithelial lining fluid) von IPF-Patienten detektieren ließ. Dieselbe Arbeitsgruppe wies auch signifikant erniedrigte Glutathion (GSH)-Spiegel bei IPF-Patienten nach (hier in ELF - um das vierfache erniedrigt im Vergleich zu gesunden Probanden)¹¹⁶, was auch durch andere Arbeitsgruppen reproduziert werden konnte (beispielsweise zeigten Beeh und Mitarbeiter¹¹⁷ über das vierfach erniedrigte GSH-Spiegel in Sputum und Serum von IPF-Patienten im Vergleich zu gesunden

¹¹⁴ W MacNee 1995

¹¹⁵ Cantin et al. 1987

¹¹⁶ Cantin et al. 1989

¹¹⁷ Beeh et al. 2002

Probanden). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass 8-Isoprostan, welches bei der Lipidperoxidation entsteht, und einen zuverlässigen Marker für oxidativen Stress/oxidierte Biomoleküle darstellt, in IPF-Patienten erhöht ist^{118,119}. Daniil et al.¹²⁰ konnten sogar eine Korrelation zwischen erhöhtem oxidativem Stress im Serum von IPF-Patienten mit klinischen Parametern (FVC, DLCO, MRC- [medical research council] Dyspnoe-Score) feststellen.

Oxidativer Stress resultiert, wie bereits erwähnt, aus dem Ungleichgewicht zwischen der Produktion von ROS und den antioxidativen Defensivmechanismen, die dann nicht mehr in der Lage sind, die Konzentration von ROS unterhalb eines toxischen Niveaus zu senken. Die Ursache dieses Ungleichgewichts ist entweder die erhöhte Produktion von ROS und/oder der Verlust der antioxidativen Verteidigungsmechanismen¹²¹. Eine Übersicht zeigt Abbildung 1.4.

Biologische Systeme produzieren im physiologischen Bereich bereits ROS, vor allem um sich gegen Mikroorganismen zu verteidigen, und setzen sich dabei auch den schädlichen Effekten dieser Verbindungen aus¹¹². Die Generation der freien Radikale erfolgt in der Atmungskette der Mitochondrien, bei enzymatischen Reaktionen und bei der Aktivierung von Leukozyten über die

¹¹⁸ Montuschi et al. 1998

¹¹⁹ Rahman et al. 1999

¹²⁰ Daniil et al. 2008

¹²¹ Bargagli et al. 2009

NADPH-Oxidase (NOX)¹²². Mitochondrien sind dabei eine der größten Quellen der intrazellulären ROS-Produktion, da 1-2% ihres verbrauchten Sauerstoffes in ROS umgewandelt werden^{113,123}. Trotzdem sind sie Angriffspunkte für hohe ROS-Level, welche z.B. zu einer oxidativen Schädigung der mitochondrialen DNA mit führen kann¹²³. Diese resultierender Apoptose oxidative Beschädigung der mitochondriellen DNA ist auch in IPF-Patienten beschrieben¹¹³. Auch interagieren ROS mit Proteinen, die für die Membranpermeabilität der Mitochondrien zuständig sind, und können so zur Aktivierung der intrinsischen Apoptosekaskade (z.B. über die Translokation von Cytochrom C ins Zytosol) führen¹²³. Dabei ist zu beachten, dass es Hinweise darauf gibt, dass eine Assoziation zwischen der erhöhten Production von mitochondrialem ROS und der Apoptose von Alveolarepithelien in IIP-Patienten vorhanden ist¹¹³, da die Expression von mitochondrial freigesetzter Caspase-3, -8, -9 und Cytochrom C bei IIP-Patienten im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht war¹²⁴.

Aber auch das endoplasmatische Retikulum (ER) und Peroxisomen produzieren freie Radikale¹²¹. Hierbei ist interessant, dass missgefaltete Proteine, die auch durch oxidativen Stress bedingt sein können (z.B. durch die Bildung von Protein-Carbonylen²³), die

¹²² Kliment und Oury 2010

¹²³ Circu und Aw 2010

¹²⁴ Kuwano et al. 2002

unfolded protein response (UPR), als Antwort auf den ER-Stress, auslösen, die wiederum über die oxidative Faltungsmaschinerie ROS-Produktion und oxidativen Stress hochreguliert, was zur Induktion von Apoptose führt²³. Die Verknüpfung von oxidativen und ER-Stress wird auch dadurch deutlich. Stress dass Antioxidantien wie GSH und NAC (N-Acetylcystein) imstande sind, ER-Stress zu verhindern und die Proteinfaltung zu fördern¹²⁵. Des Weiteren sind oxidativer Stress und ER-Stress über den PERK/ NRF2-Signalweg verknüpft, welcher Gene, die zytoprotektiv wirken und für die antioxidativen Defensivmechanismen (z.B. Peroxiredoxin-Gene, Glutathion Peroxidase, Katalase etc.) verantwortlich sind, in Reaktion auf erhöhte ROS-Spiegel und oxidativen Stress induziert²³. Eine Erhöhung der Expression des antioxidativen Transkriptionsfaktors NRF2 ist zudem in AECII von IPF-Lungen nachgewiesen worden¹²⁶. Daraus ergibt sich der Gedankengang, dass eine Hochregulation der antioxidativen Defensive chanismen unter schwerem ER- und oxidativem Stress bei der IPF stattfindet, aber offensichtlich nicht mehr in der Lage ist, den oxidativen Stress aufzulösen oder einzudämmen²³.

Eine weitere wichtige Quelle reaktiver Sauerstoffspezies sind aktivierte Leukozyten, die durch Enzyme wie NADPH-Oxidase, Myeloperoxidase und Eosinophilen-Peroxidase generiert werden.

¹²⁵ Malhotra und Kaufman 2007

¹²⁶ Markart et al. 2009

Dabei kommt den NADPH-Oxidasen (NOX) eine bedeutendere Rolle in der Pathogenese der IPF zu¹²²; wobei weniger die NOX-2, die für die Generierung von ROS in Immunzellen verantwortlich ist¹²⁷, sondern vielmehr eine andere Isoform, nämlich NOX-4, aktuell interessant ist. Diese konnte in hyperplastischen alveolären IPF-Patienten nachgewiesen Typ-II-Zellen von werden¹²⁸. Außerdem zeigte sich in Tierversuchen, dass bei Nox-4depletierten primären Alveolarepithelien die von TGF-ß ausgelöste ROS-Produktion geringer war und dies vor Apoptose schützte¹²⁸. Aber nicht nur in Alveolarepithelzellen ist NOX-4 nachgewiesen worden, sondern auch in Fibroblasten von IPF-Patienten¹²⁹. Auch konnte demonstriert werden, dass die Expression von NOX-4 mRNA als einzige Isoform von TGF-ß hoch-reguliert wird, und dass die ROS-Produktion durch NOX-4 für die TGF-ß induzierte Myofibroblasten-Differenzierung und **ECM-Generierung** notwendig ist¹²⁹. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass es ein Wechselspiel zwischen Mitochondrien und NADPH Oxidasen gibt, da die mitochondrial erzeugten ROS zur gesteigerten NOX-Expression, ausgelöst durch TGF- β , beitragen und wiederum die durch NOX erzeugten ROS eine Mitochondriendysfunktion mit erhöhter mitochondrialer ROS-Produktion hervorrufen¹³⁰.

¹²⁷ Lambeth 2007

¹²⁸ Hecker et al. 2012

¹²⁹ Hecker et al. 2009

¹³⁰ Liu und Desai 2015

Transforming growth factor- β (TGF- β) ist wohl das stärkste profibrotische Zytokin und somit in der Pathogenese einer Fibrose entscheidend. Es ist für die Aktivierung von bereits vorhandenen Fibroblasten, für die Apoptose von epithelialen und endothelialen einer epithelialen-mesenchymalen Zellen. der Induktion Transformation, der Produktion von Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) und für die Unterdrückung der Auflösung der ECM verantwortlich¹³⁰. Mit den ROS herrscht ein wechselseitiges, aktivierendes Interagieren, da TGF-ß die Produktion von ROS erhöht und gleichzeitig die Produktion von antioxidativen Enzymen unterdrückt, was zu einem oxidativen Ungleichgewicht führt. Im Gegenzug aktiviert ROS wiederum TGF-β und viele der fibrogenen Effekte, welches dieses Zytokin herbeiführt¹³⁰. TGF-β wird entweder direkt über die oxidative Modifikation seines Bindeproteins (latency associated protein - LAP) aktiviert, indirekt über die Spaltung LAP durch von Matrixmetalloproteinasen (MMPs). Matrixmetalloproteinasen wiederum können durch ROS aktiviert werden, bzw. die Inhibitoren der MMPs werden durch ROS inaktiviert¹³¹.

Des Weiteren haben ROS, wie kurz angedeutet, einen Einfluss auf die extrazelluläre Matrix. Diese kann entweder über enzymatische

¹³¹ Kinnula et al. 2005

(MMPs, Hyaluronidasen etc.) oder oxidative Wege abgebaut werden¹²². Dabei können Spaltprodukte entstehen, die wiederum proinflammatorisch und profibrotisch wirken können¹²². Auch ist dabei zu beachten, dass ROS über den sogenannten "cysteine switch" MMPs aktivieren, wobei in IPF-Lungen erhöhte Level von MMP2 und -9 in Arealen mit apoptotischen Alveolarepithelzellen und beschädigten Basalmembranen beobachtet wurden¹²².

Aus diesen Betrachtungen ergeben sich somit verschiedene mögliche Ansatzpunkte, dass oxidativer Stress an der Pathogenese der IPF beteiligt ist: zum einen induziert oxidativer Stress eine Schädigung und Apoptose des Alveolarepithels, zum anderen beeinflusst oxidativer Stress über ein Ungleichgewicht zwischen Proteasen/Antiproteasen Aktivierung (z.B. von Matrixmetalloproteinasen) die Degradation der extrazellulären Matrix. Außerdem erhöht oxidativer Stress die Freisetzung und inflammatorischen Cvtokinen Aktivierung von und Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- β)¹²⁶.

Um sich gegen Schäden durch oxidativen Stress zu schützen, gibt es verschiedene Mechanismen zur Abwehr: niedermolekulare Antioxidantien wie Glutathion und Vitamine, Muzine, metallbindende Proteine wie z.B. Transferrin und Superoxiddismutase, H₂O₂-reduzierende Enzyme, darunter z.B. Katalase und PRDX1, redoxregulierende Thiolproteine wie

64

Glutathion-Peroxidase und Glutaredoxin, sowie Enzyme zur Herstellung von niedermolekularen Antioxidantien (z.B. GSH durch die Glutathion-S-Transferase)¹³¹.

Eines der wichtigsten enzymatischen Antioxidantien ist die Superoxiddismutase (SOD), da es das einzige enzymatische System ist, dass Superoxidanionen in Wasserstoffperoxid überführen kann¹³². Bei Säugetieren gibt es drei verschiedene Formen der Superoxiddismutase: eine intrazelluläre Form (CuZnSOD), eine mitochondriale Form (MnSOD) und eine extrazelluläre Form $(ECSOD = SOD3)^{132}$. Diese extrazelluläre Form ist insofern interessant, da sie sich besonders stark exprimiert in der Lunge findet, vor allem im Interstitium der Luftwege, sowie in Blutgefäßen, aber auch in den Alveolarsepten¹³³. Da einer der Charakteristika der pulmonalen Fibrose der erhöhte Umsatz der extrazellulären Matrix ist, ist es möglich, dass der primäre vor der Fibrose schützende Effekt von SOD3 darin liegt, die oxidative Modifizierung und den Abbau der Komponenten der ECM zu verhindern, da beispielsweise Kollagen Typ I und IV anfällig gegenüber dem Abbau durch ROS sind¹³³. Die daraus entstehenden Spaltprodukte sind insofern proinflammatorisch, da sie Immunzellen anlocken und diese aktivieren. Um bereits die Spaltung des Kollagens zu verhindern, weist SOD3 eine

¹³² Kinnula und Crapo 2003

¹³³ Fei Gao, Vuokko L. Kinnula, Marjukka Myllärniemi, and Tim D. Oury 2008
spezifische Bindungsstelle für Kollagen auf und scheint durch diese die Kollagene vor dem oxidativen Abbau zu schützen, sodass erst gar nicht die proinflammatorischen Spaltprodukte entstehen¹³³. Durch den die ECM schützenden Effekt wird auch die oxidative Aktivierung von TGF-β unterdrückt¹³³. Interessanterweise ist die SOD3-Expression gerade in den fibrotischen Arealen und den "Fibroblasten Foci" bei IPF-Patienten niedrig bis nicht vorhanden, im Vergleich zu den weniger beschädigten, nicht-fibrotischen Arealen¹³⁴. Des Weiteren hat man festgestellt, dass die Serum-Konzentration der CuZnSOD in IPF-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht waren. Ebenso wurde beobachtet, dass die Expression von MnSOD in alveolären Typ-II-Zellen und Makrophagen von IPF-Patienten erhöht war¹²¹.

Das aus der Reaktion mit SOD entstehende Wasserstoffperoxid wird anschließend mittels Katalase und Glutathion-Peroxidase in Wasser umgewandelt¹¹². Hierbei ist zu erwähnen, dass sich ein Regelkreis ergibt, da CuZnSOD durch erhöhte Wasserstoffperoxidspiegel inaktiviert wird, sodass Katalase und Glutathion-Peroxidase durch den Abbau des Wasserstoffperoxides die Inaktivierung von SOD verhindert, sowie SOD durch den Abbau der Superoxidanionen die Inaktivierung von Katalase und Glutathion-Peroxidase verhindert¹¹². Des Weiteren ist zu beachten,

¹³⁴ Kinnula et al. 2006

dass Fibroblasten aus IPF-Lungen Wasserstoffperoxid produzieren können, welches zum Tod der in der Nähe befindlichen alveolären Typ-II-Zellen führt, was aber durch Katalase verhindert werden kann³³. Glutathion-Peroxidase hingegen katalysiert nicht nur die Umwandlung von Wasserstoffperoxid in Wasser, sondern auch die Reduzierung von Hydroperoxiden wie Lipidperoxiden¹³⁵. Im Rattenmodell der Hyperoxie-induzierten Lungenschädigung konnte die extrazelluläre Glutathion-Peroxidase Alveolarepithelzellen beschützen¹¹².

Peroxiredoxine (PRDX), von denen es bei Säugetieren sechs Isoformen gibt, wobei PRDX6 durch seine 1-Cys-Konfiguration eine Sonderstellung inne hat¹³⁶, sind ebenfalls in der Lage, Lipidperoxide und Wasserstoffperoxid zu reduzieren¹¹². Diese Fähigkeit, Phospholipidhydroperoxide umzusetzen, ist ein entscheidender antioxidativer Defensivmechanismus von PRDX6¹³⁷. In Tierversuchen konnte außerdem gezeigt werden, dass Prdx-1-knockout Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen sensitiver auf eine Bleomycin-induzierte Lungenfibrose reagieren mit verkürzter Überlebenszeit und signifikant erhöhten Level an 8-Isoprostan als Marker für oxidativen Stress¹³⁸. Bei Mäusen hingegen, die Prdx6 überexprimieren, konnte gezeigt werden, dass

¹³⁵ Ross Vlahos 2013

¹³⁶ Manevich und Fisher 2005

¹³⁷ Yan Wang, Sheldon I. Feinstein, and Aron B. Fisher 2008

¹³⁸ Kikuchi et al. 2011

sie weniger anfällig für Hyperoxie-induzierte Lungenschäden sind, was die bedeutende Funktion von PRDX6/Prdx6 als antioxidatives Enzym in der Lunge hervorhebt¹³⁹.

In einer komparativen Proteomanalyse von IPF- und fNSIP-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden von Korfei et al.¹⁴⁰ konnte gezeigt werden, dass bestimmte Antioxidantien wie PRDX1 und PRDX6 in beiden Entitäten herauf reguliert waren. Dabei konnte in immunhistochemischen Färbungen demonstriert werden, dass eine PRXD1-Expression in hyperplastischen alveolären Typ-II-Zellen in fibrotischen Alveolarsepten von fNSIP-Patienten vorlag, wohingegen sich ein solches Verhalten bei gesunden Spendern als auch IPF-Patienten nicht nachweisen ließ. Dies kann so ausgelegt werden, dass die vermehrte Expression von PRDX1 ein Versuch ist, das Mikromilieu so zu beeinflussen, dass ein Überleben der Zelle wahrscheinlicher wird. Bezüglich des PRDX6 konnte gezeigt werden, dass es Unterschiede in dessen Gehalt abhängig von der Entität gibt: die gesunden Probanden wiesen die höchsten Level und die IPF-Patienten die niedrigsten Level an PRDX6 auf, wobei bei fNSIP-Patienten der PRDX6-Gehalt im Vergleich zu den gesunden Spendern zwar reduziert war, aber immer noch höher als der von IPF-Patienten. Daraus ergeben sich Hinweise, dass diese Antioxidantien auch im Menschen von

¹³⁹ Wang et al. 2006b

¹⁴⁰ Korfei et al. 2013

Bedeutung sind.

Eine graphische Übersicht – reduziert auf die wichtigsten Punkte – zeigt Abbildung 1.5.



Abbildung 1.5. oxidativer Stress in der Pathogenese der IPF

3. Ziel der Arbeit

Wie bereits zuvor erwähnt, ist für die endgültige Sicherung einer Diagnose der IPF eine offene Lungenbiopsie notwendig. Zwar haben sich große Fortschritte im Bereich des HRCT entwickelt, sodass hier bereits teilweise eine Differenzierung zwischen einer IPF und den anderen ILDs getroffen werden kann. Dennoch ist es gerade bei einem atypischen UIP-Muster im HRCT eine Lungenbiopsie notwendig, da sich aus den histologischen Befunden therapeutische und prognostische Konsequenzen ergeben. Da die IPF aber vor allem ältere Individuen betrifft, liegt hier bereits oft eine Konstellation an Komorbiditäten vor, die der Durchführung einer Lungenbiospie entgegen stehen. Aus diesem Grund wäre ein einer möglichst leicht gewinnenden Biomarker in zu Körperflüssigkeit wünschenswert.

Der Grundstein für die Arbeit ist durch die komparative Proteomanalyse von Korfei et al.¹⁴⁰ gelegt worden, denen es möglich war, in einer begrenzten Probenzahl von IPF- und fNSIP-Patienten sowie gesunden Spendern erhöhte Proteinspiegel von enzymatischen Antioxidantien und speziellen Proteasom-Untereinheiten (mit der Funktion der Degradierung von oxidativ modifizierten und somit missgefalteten Proteinen) in fNSIP-Patienten im Vergleich zu IPF-Patienten darzustellen, welche auch positiv mit den Lungenfunktionsparametern DL_{co} und FVC

70

korrelierten. Hieraus ergibt sich eine mögliche Erklärung für die bessere Prognose der fNSIP-Patienten im Vergleich zu den IPF-Patienten und eine mögliche Nutzung dieser Antioxidantien als Biomarker.

Daher sind in der abgegebenen Dissertation die folgenden enzymatischen Antioxidantien und Proteasom-Untereinheiten ausgewählt worden, um diese in Lavage und Serum von verschiedenen ILD-Entitäten (IPF, NSIP, CTD, DIP, EAA, RA und Sarkoidose) im Vergleich zu gesunden Spendern zu charakterisieren:

- enzymatische Antioxidantien:
 - ≻ Katalase
 - ➢ Glutaredoxin 1
 - ➢ Glutathion Peroxidase 1 (GPX1)
 - ➢ Peroxiredoxine 1, -2, -6 (PRDX1/2/6)
 - Superoxiddismutase 3 (SOD3)
- Proteasom-Untereinheiten (welche speziell oxidativ modifizierte Proteine degradieren)
 - Proteasom Aktivator Komplex Untereinheit 1 (PSME1) = PA28α
 - Proteasom Untereinheit beta Typ-9 (Psmb9) = low molecular

mass protein 2 (LMP2)

• antifibrotische Moleküle

Serum Amyloid Komponente P (SAP)

In der vorgelegten Arbeit konnten mittels Western-Blot und ELISA verschiedene Antioxidantien in unterschiedlichen Körperflüssigkeiten charakterisiert werden, wobei sich vielversprechende Ergebnisse für PRDX6 und PRDX2 darstellen ließen. Zudem konnten die untersuchten Antioxidantien mittels IHC in Lungenschnitten ausgesuchter Entitäten im Vergleich zu gesunden Spendern dargestellt werden.

Die dargestellten Ergebnisse stützen die Theorie eines Ungleichgewichtes zwischen Oxidantien und Antioxidantien (zugunsten der Oxidantien) als einer der Schlüssel-Mechanismen in der Pathogenese der IPF und könnten den Grundstein für einen möglichen Biomarker bilden.

2. Material und Methoden

2.1. Labortechnische Geräte

96-well-Mikrotiterplatte	Sarstedt			
Chemilumineszenz-Imager Intas Chemostar	Intas			
Electrophoresis Power Supply EV231	Consort			
Gelelektrophorese Laufkammer Mini Protean Tetra System	BIO-RAD			
Glasplatten Gelelektrophorese Mini Protean 3 System	BIO-RAD			
Short Plates				
• Spacer Plates mit 1,5 mm Spacer				
Heizblock	HLC; Ditabis			
Inkubator:				
Function Line UT6	Heraeus			
• Heracell 150i	Instruments Thermo Scientific			
Magnetrührer:				
IKA RH basic 2MR 2002	IKA Werke Heidolph			
MAXI M1	IKA Werke			
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss			
Mikrotestplatten Reader	Tecan; infinite M200 pro			
Mikrowelle 900 & Grill	Severin			
Nano Zoomer	Hamamatsu			
Perfection 1660 Photo	Epson			
pH Meter Seven Compact	Mettler Toledo			
Pipetten 1000 - 200 - 100 - 10	Eppendorf			
RM5 (Schüttler)	RM5 (Schüttler)			

Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell Univapo 150H (Speed Vac) Versiegelungsfolie für Mikrotitertplatte Vortexer:

- IKA Vibrax VXR
- Vortex Genie 2

Waagen:

- AB54
- PB801

Zentrifugen:

- Heraeus PICO 21
- Mini Star

BIO-RAD UniEquip Thermo Scientific

IKA Werke Scientific Industries

Mettler Toledo Mettler Toledo

Thermo Scientific VWR

2.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

2-Propanol	Sigma Aldrich
Albumin Fraktion V	Roth
APS (Ammoniumperoxidisulfat)	Roth
Blot-Papier:	
• "Extra thick blot paper"	BIO-RAD
Whatman Blotpapier GB005	Schleicher &
	Schuell
Whatman 3mm	GE Healthcare
Bromphenolblau	Merck
Zitronensäure Monohydrat	Roth
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva
D(+)Saccharose	Roth
Di-natrium-hydrogenphosphat Dihydrat	Merck
Eisessig/Essigsäure 100%	Merck
Ethanol:	
• 100% (v/v)	Otto Fischer

 96% (v/v) 70 % (v/v) 	Otto Fischer SAV LP GmbH
Glycergel Mounting Medium	Dako
Glycin	Roth
Haemalaun, sauer, nach Mayer	Waldeck GmbH & Co.KG
Immobilon (Chemoluminescent HRP Substrat)	Millipore
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Methanol	Roth
Milchpulver	Roth
Natriumchlorid	Sigma Aldrich
Natriumzitrat tribasisch, Dihydrat	Sigma Aldrich
Natriumhydroxid	Merck
Nitrocellulose Membran:	
Bio Trace NT	Pall
• Roti-NC	Roth
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Pipettenspitzen 1000 – 100 – 10	Sarstedt
PVDF-Membran: Immobilon P Western Blot	Millipore
Membran	
Rotiphorese Gel 30	Roth
Salzsäure 37%	Roth
SDS-Pellets	Roth
TEMED	Roth
Tinte Königsblau (4001)	Pelikan
Tris	Roth
Tween 20	Sigma Aldrich
Xylol	VWR

Sigma

2.3. Antikörper

2.3.1. Primärantikörper

pro-Kaspase-3 + aktivierte Kaspase 3 (anti-	cell signalling
numan; rabbit polycional)	(#9002)
Katalase (anti human; rabbit polyclonal)	abcam(ab1877)
Forkhead Box Protein J1	
• FOXJ1	abcam (ab40869)
• FOXJ1	Millipore (05-837)
Glutaredoxin 1 (anti-human; mouse monoclonal)	abcam (ab55059- 100)
Glutathion Peroxidase 1 – GP1 (anti-human; rabbit monoclonal)	abcam (ab108427)
Low molecular mass protein – LMP2 =	abcam (ab3328-
Proteasome subunit beta type-9 (PSMB9) (anti-human; rabbit polyclonal)	100)
N-epsilon-carboxymethyl-Lysin (anti-human; rabbit polyclonal)	abcam (ab30922- 50)
Peroxiredoxin 1 - PRDX1 (anti-human; rabbit polyclonal)	abcam (ab59538- 100) für IHC
Peroxiredoxin 1 - PRDX1 (anti-human; rabbit polyclonal)	abcam (ab59538) für WB
Peroxiredoxin 2 – PRDX2 (anti-human; mouse monoclonal)	abcam (ab140936) für IHC
Peroxiredoxin 2 – PRDX2 (anti-human; mouse monoclonal)	abcam (ab50862) für WB
Peroxiredoxin 6 - PRDX6 (anti-human; mouse monoclonal)	abcam (ab16947)
proSP-C (anti-human; rabbit polyclonal)	Millipore

Proteasom activator subunit 1: PSME 1 (anti-human; rabbit Thermo Scientific polyclonal) (PA1-1961) PA28alpha (anti-human; rabbit Santa Cruz (sc-٠ 135512) polyclonal) Serum Amyloid P - SAP (anti human; rabbit abcam (ab45151) monoclonal) CD68 (anti human; mouse monoclonal) abcam (ab955-500) Superoxiddismutase 2 – SOD2 (anti-human; abcam (ab13533) rabbit polyclonal) Superoxiddismutase 3 - SOD3 (anti-human; abcam (ab21974rabbit polyclonal) 200)Uteroglobin - CC10 = Clara cells 10kDaabcam (ab40873) secretory protein (anti-human; rabbit polyclonal)

2.3.2. Sekundärantikörper

Schwein anti-Kaninchen-IgG, HRP-gekoppeltDako (P0217)Kaninchen anti-Maus-IgG, HRP-gekoppeltDako (P0260)

2.4. Verwendete Kits

8-Isoprostan EIA Kit
Human Peroxiredoxin 6 ELISA
Pierce BCA Protein Assay Kit
TBARS Assay Kit
TBARS Assay Kit
Cayman (10009055)
Zytochem-Plus HRP-AP Kit
Cayman Systems

(AB3786)

Zytochem-Plus HRP-DRB Kit

(HRP-S-008RED) Zytomed Systems (HRP-008DRB)

2.5. Verwendete Proben

2.5.1. Bronchoalveoläre Lavage

Die untersuchten humanen Lavagen sind mittels Bronchoskopie im Rahmen der Diagnostik gewonnen worden, wobei nicht zur Diagnostik verwendetes Material für die Forschung verwendet werden durfte (siehe Ethikvoten Nr. 84/93 "Biochemische, pharmakologische morphologische und Studien an bronchoalveolären Lavagen"). Die Gewinnung der Proben bei den gesunden Spendern (healthy volunteers [HV] genannt) verlief nach dem gleichen Prozedere, nur dass dies ausschließlich für wissenschaftliche Zwecke erfolgt ist. Detaillierte Daten zu den eingeschlossenen Patientenkollektiven finden sich in der nachfolgenden Tabelle 2.1.

Untersuchungskollektive	Healthy volunteers (HV, n=18)	IPF/UIP (n=23)	NSIP (n=6)	CVD (n=13)	DIP (n=5)	EAA (n=11)	RA (n=8)	Sarkoidose (n=13)
Alter (mean years ± SD)	26.53 ± 6.12*	63.39 ± 8.89	52.16 ± 17.1	55.69 ± 15.19	47.5 ± 9.78	54.18 ± 12.54	68.5 ± 11.74	51.08 ± 13.03
Geschlecht (m/f)	ੋ6 / ⊋7*	∛18 / ⊋5	ੇ4 / ⊋2	ੈ3 / ⊋10	∂ 3 / ⊋2	∛5/♀6	∛1/⊋7	∛5 / ⊋8
A 1.1 . 11								

* nicht vollständig verfügbar

Tabelle 2.1. eingeschlossene Patientenkollektive für die verwendeten BALF- und Serumproben

Zur Gewinnung der Lavage wurde ein flexibles Fiberbronchoskop (Firma Olympus) genutzt. Dieses wurde nach Lokalanästhesie des Mund-Rachenraums mittels Oxybuprocainhydrochlorid über den Mund oder eines endotracheal gelegenen Beatmungstubus so weit eingeführt, um eines der beiden Lingulasegmente oder den Mittellappen zu erreichen. In wedge position (Okklusionsstellung) wurde anschließend eine bronchoalveoläre Lavage mit 10× 20ml steriler physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) durchgeführt. Nach jeder verabreichten "NaCl-Portion" wurde diese durch schnelle Aspiration wieder entfernt, die Materialgewinnung der Ausgangsmenge in % (recovery) ermittelt und bei +4°C gepoolt. Um den Mukus aus der so erhaltenen Lavageflüssigkeit abzutrennen, wurde diese durch sterile Gaze gefiltert und anschließend bei 300× g und +4°C für 10 min zentrifugiert, um zelluläre Bestandteile zu entfernen. Der entstandene Überstand sorgfältigem Rühren aliquotiert, mittels wurde unter Flüssigstickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Teile der Lavageflüssigkeit wurden mit 0,01% Butylhydroxytoluol (BHT) als Antioxidans versetzt.

2.5.2. Lungengewebe

Für die Analyse der Proteinexpression durch Immunhistochemie stehen dem UGMLC explantierte Lungen von Patienten mit unterschiedlichen IIP (IPF, fNSIP, EAA, DIP, RA-ILD, Sarkoidose)

79

durch die Kooperation mit dem Klinikum der Stadt Wien (Thoraxchirurgie, Prof. Dr. med. Walter Klepetko) zur Verfügung.

Die Diagnosen werden zusätzlich nochmals in Gießen klinisch wie histopathologisch bestätigt (Prof. A. Günther, Prof. L. Fink). Als gesunde Kontrollen dienen nicht-utilisierte Spenderlappen oder (selten) ganze Lungen, die aufgrund von Größeninkompatibilität zwischen Spender und Empfänger oder akuter Infektion des möglichen Empfängers nicht eingesetzt wurden. Zusätzlich wurde auch histologisch "gesundes" Lungengewebe in die Kontroll-Kollektive inkludiert, welches im Rahmen einer Tumorresektion aufgrund eines Lungentumors entnommen worden war. Die hier durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen an IIP-Patienten und Spenderlungen sind durch das entsprechende Votum der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität Gießen abgedeckt (Nr. 111/08 "Europäisches IPF-Register" [eurIPFreg]). Detaillierte Patientendaten finden sich in der Tabelle 2.2.

Untersuchungskollektive	Healthy volunteers (HV, n=4)	IPF/UIP (n=11)	NSIP (n=5)	CVD (n=3)	EAA (n=4)	Sarkoidose (n=1)	Transbronchial- biopsie Sarkoidose (n=4)
Alter (mean years ± SD)	42 ± 11.98	54.09 ± 8.65	54.4 ± 2.5	47.33 ± 5.79	47.25 ± 7.98	35	39.25 ± 5.08
Geschlecht (m/f)	∛2/ ⊋2	ੈ9 / ⊋2	∛2/⊋3	∛1/⊋2	⊈4	ੰ	∛2/ ⊋2

Tabelle 2.2. Patientenkollektive der zur Verfügung stehenden Lungengewebeproben

2.6. Proteinbestimmung

Da die gewonnen Proben von einzelnen Individuen stammten und somit interindividuelle Unterschiede bestehen als auch methodische Fehler bei der Gewinnung (unterschiedliche Untersucher und Techniken etc.) unterlaufen sein könnten, musste zunächst die Proteinkonzentration der einzelnen Lavage-Proben bestimmt werden, um nachher die einzelnen Entitäten quantitativ vergleichen zu können. Dafür wurde das kommerziell erhältliche Pierce[™] BCA Protein Assay Kit von Thermo Scientific verwendet. Die zugrunde gelegte Detektionsmethode beruht auf der Biuret-Methode, wobei in einem alkalischen Medium Cu²⁺ durch die in der Lösung vorhandenen Proteine zu Cu⁺ reduziert wird und daraufhin einen Komplex mit Bicinochinsäure (BCA) formt, welche hochspezifisch Cu+ bindet. Der Komplex aus zwei Molekülen BCA und einem Molekül Cu⁺ bildet ein violettes Reaktionsprodukt, welches ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 562nm zeigt, wobei die Absorption sich nahezu linear zu der Proteinkonzentration Standardreihe verhält. Anhand einer bekannter aus Proteinkonzentration (verwendet wurde Rinderserum-Albumin), kann dann die Proteinkonzentration der einzelnen Proben bestimmt werden.

Diese Art der Proteinbestimmung mittels Bicinochinsäure ist 1985 von P. K. Smith veröffentlicht worden¹⁴¹.

Die Standardreihe wird mit 2% (w/v) BSA (bovine serum albumine

¹⁴¹ Smith et al. 1985

Rinderserum-Albumin) mit der Ausgangskonzentration von 2000µg/ml hergestellt, wobei 1500µg/ml, 1000µg/m, 750µg/ml, 500µg/ml, 250µg/ml, 125µg/ml, 62,5µg/ml, 31,25µg/ml, 15,625µg/ml und 7,81µg/ml die absteigende Standardkurve bilden, und die ersten 3 Reihen der 96-Well-Platte mit 50µl/Well im Sinne einer Doppelbestimmung pro Konzentration beladen werden.

Von den zu untersuchenden Lavage-Probe wurden pro Well jeweils 50 µl in Doppelbestimmung pipettiert. Die Serum-Proben wurden 1:200 mit destillierten Wasser verdünnt und von dieser Verdünnung ebenfalls 50 µl pro Well eingesetzt. Danach wurde jeweils 200µl Arbeitslösung des Kits bestehend aus 20 ml Reagenz A, welches die Bicinochinsäure enthält, und 400µl Reagenz B, bestehend aus einer Kupferionenlösung, dazu pipettiert. Die Platte wurde mit einer Folie verschlossen und für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Absorptionsmessung mittels einem Mikrotiter-Platten-Reader (TECAN infinitepro200M) durchgeführt.

2.7. Vorbereitung der Proben

Um die Lavage-Proben für den Western-Blot einsetzen zu können, mussten diese erst durch einen Speed-Vakuum-Konzentrator eingeengt werden. Dazu wurde das Volumen, das 5µg (für PRDX6, Catalase, SAP) bzw. 10µg (PRDX2, Glutathion Peroxidase 1) Gesamtprotein entsprach, in ein frisches Eppendorf-Cup pipettiert und mittels der "Speed Vac" über 2-3 Stunden eingeengt.

Danach wurden die Proben mit 2× reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und bei 99°C für 12 min 30 sec denaturiert.

- 4× nicht-reduzierender SDS-Probenpuffer:
 - 25% (v/v) 0,625M Tris/HCl, pH6,8
 - 40% (v/v) Glycerin
 - 5 % (w/v) SDS
 - 0,002% (w/v) Bromphenolblau (Spatelspitze)
- 2× reduzierender SDS-Probenpuffer:
 - $45\% 4 \times (v/v)$ nicht-reduzierender Probenpuffer
 - 5% β-Mercaptoethanol
 - 50% aqua dest.

Die Serum-Proben mussten nicht eingeengt werden, da bei diesen Proben pro μ l bedeutend mehr Protein enthalten ist. Deswegen wurden die Serum-Proben 1:1 mit 4× reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt, sodass ein Ansatz aus jeweils 50 μ l Serum und 50 μ l Probenpuffer bestand. Dieses Mischungsverhältnis wurde verwendet, da bei einem Mischungsverhältnis Probenpuffer zu Probe von 1:3 (15 μ l+45 μ l) die Probe nach dem Kochen gestockt war und daher nicht mehr auf das SDS-Gel aufgetragen werden konnte. Nach dem Mischen von Serum mit Probenpuffer wurde der Ansatz bei 99°C für 15 min gekocht.

2.8. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels der Methode nach Lämmli¹⁴² in einer vertikalen Gelapperatur. Das zu verwendende Gel setzt sich aus 2 Komponenten zusammen: dem Sammelgel, um die Proteine zu fokussieren und dem Trenngel, wobei hier die Konzentration des Acrylamids an die Größe des zu untersuchenden Proteins angepasst wird – hochprozentige Gele für Proteine mit kleinem Molekulargewicht (bspw. ein 12%-Gel für Proteine bis ca. 25 kDa), bzw. niedriger prozentige Gele für Proteine mit größerem Molekulargewicht (bspw. ein 9%-Gel für Proteine um 60 kDa). Eine Übersicht, welches Gel für welches Molekulargewicht genutzt werden sollte, zeigt Abbildung 2.1.

Es folgt das Pipettierschema für die verschiedenen Gele:

¹⁴² Laemmli 1970

		Tre	Sammelgel			
						(10ml)
	8%	9%	10%	12%	15%	4%
30% Acrylamid	2,66	3,0 ml	3,33	4,0 ml	5,0 ml	1,33 ml
0,8 & N,N-	ml		ml			
Bisacrylamid						
H ₂ O dest.	3,87	3,53	3,2 ml	2,53	1,53	6,57 ml
	ml	ml		ml	ml	
10% (w/v) SDS	100	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
	μl					
Trenngelpuffer	3,33	3,33	3,33	3,33	3,33	/
	ml	ml	ml	ml	ml	
Sammelgelpuff	/	/	/	/	/	2 ml
er						
10% (w/v) APS	50	50 µl	50 µl	50 µ1	50 µl	100 µl
	μl					
TEMED	10	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
	μl					

- Trenngelpuffer:
 - 1,125 M Tris/HCl pH 8,8
 - 30% (w/v) D(+)Saccharose

- Sammelgelpuffer:
 - 0,625 M Tris/HCl pH6,8



Abbildung 2.1. SDS-Gel Konzentration in Abhängigkeit des Molekulargewichtes

Das auspolymerisierte Gel wurde anschließend in eine Laufkammer (BIORAD Mini Protean TetraCell) eingespannt, mit den Proben und einem Proteingrößenstandard beladen und die Kammer mit Elektrodenpuffer gefüllt. Im Sammelgel erfolgt die Konzentrierung der Proteine bei konstanten 12,5 mA pro Gel, im Trenngel erfolgt die Auftrennung der Proteine nach deren Größe bei konstanten 15 mA.

- Elektrodenpuffer:
 - 25 mM Tris
 - 192 mM Glycin

• 0,1% (w/v) SDS

Da bedeutend mehr Proben zu testen waren, als eine Gelplatte Lauftaschen hatte, wurden pro Gel 2 Proben eines Patienten oder Spenders in gleicher Beschaffenheit und Konzentration als interner Standard aufgetragen.

2.9. Immunologischer Nachweis von Proteinen in humanen Lavagen mittels Western Blot Methodik

Beim Western Blot - durchgeführt in Anlehnung an Kyhse-Andersen¹⁴³ – werden die im Gel aufgetrennten Proteine in einem Halbtrockenblotverfahren auf eine PVDF-Membran oder eine Nitrocellulose-Membran transferiert. die Dabei bleibt gelelektrophoretische Auftrennung erhalten und es ist möglich, das Antigen/Protein einem gewünschte mit spezifischen Primärantikörper zu detektieren und zu identifizieren. Für die wird ein HRP-konjugierter Sekundärantikörper Detektion verwendet, der dem Primärantikörper bindet und eine Brücke zwischen dem Primärantikörper und dem Rezeptorenzym bildet, welches Visualisierung mittels ECL (Enhancedzur Chemiluminescence) gebraucht wird. Es wurden ausschließlich Sekundärantikörper verwendet, die mit Meerrettichperoxidase

¹⁴³ Kyhse-Andersen 1984

(HRP-) gekoppelt sind. Dieses reagiert mit dem in der ECL-Entwicklerlösung (Immobilon/Millipore) vorhandenen Luminol, wobei dieses oxidiert wird. Wenn das oxidierte Luminol in seinen Grundzustand zurückkehrt, wird Licht emittiert, welches mittels hochsensitiver Kamera (Intas Imager) aufgenommen werden kann.

Die Durchführung gestaltete sich folgendermaßen: Die PVDF-Membran – zugeschnitten auf die Größe des Gels – wurde für ~1 Minute in 100 %-igem Methanol aktiviert und anschließend bis zur weiteren Verwendung in Transferpuffer wippend gelagert. Bei Verwendung einer Nitrocellulose-Membran musste diese nicht aktiviert werden, und konnte deshalb direkt in den Transferpuffer gegeben werden. Die Gele wurden ebenfalls für mind. 10 Minuten in Transferpuffer wippend equilibriert.

- Transferpuffer:
 - 20 mM TRIS
 - 150 mM Glycin
 - 20% (v/v) Methanol

Weiterhin wurde Blotpapier – ebenfalls in Größe des Geles zugeschnitten - mit Transferpuffer getränkt und anschließend auf die Graphitanode der Transferapperatur gelegt. Darauf wurde luftblasenfrei die Membran gelegt und ebenfalls luftblasenfrei das Gel aufgebracht. Dieses wurde dann wiederum mit einer weiteren Lage Blotpapier bedeckt und mit der Graphitkathode bedeckt und geschlossen. Der Transfer erfolgte bei konstanten 75 mA/pro 54 cm² Gel in der Blotapperatur für 1 Stunde 30 min. Anschließend wurden die Blots in einer Lösung aus 1× TBS/T mit 5% Milchpulveranteil inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für den Primärantikörper zu minimieren. Daraufhin konnte die Membran mit dem Primärantikörper, der in einer spezifischen Verdünnung in der Milchpulverlösung (die spezifische Verdünnung für den jeweiligen Antikörper ist Tabelle 2.3. zu entnehmen) angesetzt wurde, unter Schütteln bei 4°C über Nacht inkubiert werden.

Antikörper	PRDX6	PRDX2	GPx1	Katalase	SAP
Probe Lavage/Serum	5µg / 500µg	10µg / 500µg	10µg / 600µg	5 µg / 700µg	5 µg / 300µg
Gel Lavage/Serum	12% / 12%	12% / 12%	12% / 12%	9% / 8%	10% / 10%
Konzentration	1:1000	1:500	1:750	1:1000	1:10.000

Tabelle 2.3. eingesetzte Antikörper und ihre Verdünnungen für die BALF- und Serumproben

- TBS/T:
 - 20 mM Tris/HCl pH 7,5
 - 50 mM NaCl
 - 0,5% (w/v) Tween 20

Am darauffolgenden Tag wurden die Blots mit 1× TBS/T für 3× 10 Minuten gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem HRPgekoppelten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in der Milchpulverlösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur unter ständiger Bewegung mittels Schüttler. Abhängig vom verwendeten Primärantikörper wurden gegen Kaninchen-IgG (hergestellt im Schwein) bzw. gegen Maus-IgG (hergestellt im Kaninchen) gerichtete Sekundärantikörper verwendet. Anschließend wurden die Blots wieder 3× für 10 min mit 1× TBS/T gewaschen. Nun war es möglich, Zielproteine auf der Western-Blot Membran mittels ECL-Entwicklerreagenz und Chemilumineszenz-Imager zu visualisieren. Die ermittelten Signalintensitäten wurden als JPEG-Image aufgenommen.

Da die Proteinproben aus Lungen-Lavagen stammen und insgesamt eine sehr niedrige Protein-Konzentration aufwiesen, war das Strippen des Blots sowie die erneute Imkubation mit einem anderen Primärantikörper nicht möglich. Da es sich bei Lavage um extrazelluläre Flüssigkeit handelte, war es zudem nicht möglich, die Membran mit Antikörper gegen β -Aktin, GAPDH oder Tubulin anzufärben, da es sich bei diesen Ladungskontrollen um intrazelluläre Proteine handelt. Deswegen wurden die PVDF-Membranen mit Coomassie gegengefärbt bzw. wurden Nitrocellulose-Membranen mit Tinte gefärbt, um ein Bandenmuster mit gleicher Ladung zu demonstrieren. Im Anschluss wurden die gefärbten Western-Blots eingescannt.

- Coomassie-Färber:
 - 50% (v/v) Methanol
 - 5% (v/v) Eisessig
 - 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
- Coomassie-Entfärber:
 - 28% (v/v) 2-Propanol
 - 5% (v/v) Eisessig

Für die Coomassie-Färbung wurde die Membran etwa 5-10 min in der Färbelösung geschwenkt und im Anschluss mit Entfärber bis zur gewünschten Farbintensität entfärbt, und danach noch kurz in Aqua dest. geschwenkt.

Für Nitrocellulose-Membranen wurde eine Tintenfärbung verwendet. Dabei verblieb die Membran für 5 min in der Tintenlösung, um danach kurz mit Aqua dest. abgewaschen zu werden. Die Tintenlösung konnte max. 2 mal verwendet werden.

• Tintenlösung:

- 1-2% (v/v) Tinte Königsblau
- 1% (v/v) Eisessig

In den Abbildungen im Ergebnisteil ist bei den Serumproben auf

eine Coomassie- bzw. Tintenfärbung verzichtet wurden, da bei diesen das Bandenmuster quantitativ kaum

abgegrenzt werden kann (siehe repräsentatives mit



Abbildung 2.2. Coomassie-Färbung eines Gels mit aufgetrennten Serumproteinen

Coomassie gefärbtes Gel in Abbildung 2.2.)

2.10. Proteinnachweis mittels Immunhistochemie (IHC)

Die verwendeten Gewebeproben stammten aus Explantationen von ganzen Lungen oder Lungenlappen, die in der Thoraxchirurgie in Wien entnommen worden waren. In Wien selbst sind bereits peripher lokalisierte Gewebeproben aus einzelnen Lappen entnommen und sofort in 4% (w/v) Phosphat-gepuffertem para-Formaldehyd (PFA, pH 7,0) überführt worden.

Nach dem Transport nach Gießen an das UGMLC wurden durch den Lungendienst zusätzlich subpleural und hilär lokalisierte Gewebeproben nach einem bestimmten Schema entnommen und auch in 4% (w/v) PFA fixiert. Nach einer Fixationsdauer von in der Regel 12-24 Stunden wurden die fixierten Lungenproben in Einbettkassetten überführt, mit PBS gewaschen und über Nacht entwässert, um danach in Paraffin eingebettet zu werden.

Nach der Aushärtung des Paraffins war es möglich, mittels eines vollautomatischen Rotationsmikrotoms (RM 2165, Leica) 3 μ m dicke Schnitte in Serie (7 serielle Schnitte) anzufertigen. Diese werden nach kurzer Inkubation im 40°C warmen Paraffinstreckbad auf Objektträger (Super Frost Plus, Langenbrinck) aufgezogen, um danach auf einer 40°C erwärmten Heizplatte getrocknet zu werden.

Der Nachweis der Proteine erfolgte mit Hilfe der Streptavidin-Biotin-Technik. Dabei wurde das gewünschte Protein im Lungenschnitt mit einem spezifischen Primärantikörper markiert, an den ein biotinylierter Sekundärantikörper gebunden wird, um das gewünschte Protein zu detektieren. Das Biotin bindet mehrere Moleküle Konjugates Streptavidin eines mit aus Meerrettichperoxidase (HRP) oder Alkalischer Phosphatase (AP), welches mittels Enzym-Substrat-Reaktion in Gegenwart einer farbgebenden Komponente - in dieser Arbeit Fast Red, welches ein rotes Reaktionsprodukt bildet - sichtbar gemacht wird. Im Fall des HRP/DAP-Kits entsteht stattdessen ein braunes Reaktionsprodukt.

Nach Möglichkeit wurden 2-3 unterschiedliche Proben pro Entität bzw. gesundem Spender in seriellen Schnitten gefärbt. Dabei wurde darauf geachtet, die betreffenden Schnitte sowohl der Entitäten als auch der gesunden Spender jeweils parallel mit einem spezifischen Antikörper zu färben.

Zunächst wurden die Schnitte bei 60°C für etwa 90 min inkubiert, um eine bessere Entparaffinisierung zu ermöglichen. Darauf erfolgte die chemische Entparaffiniserung in einem 10 minütigen Xylolbad mit anschließender Rehydrierung in einer absteigenden Alkohlreihe (100% - 96% - 80% - 70% - 50%), wobei die Schnitte für jeweils 3 Minuten in der Alkohollösung verweilten, um daraufhin bis zur weiteren Verwendung in Aqua dest. zu ruhen.

Um den Primärantikörpern das Gewebe zugänglich zu machen (sog. Antigendemaskierung), wurden die Schnitte in 10 mM Zitratpuffer in der Mikrowelle bei 800 Watt zum Kochen gebracht, um danach noch weitere 5 min zu kochen. Anschließend erfolgte eine 25 minütige Abkühlphase bei Raumtemperatur. Dieser Kochund Abkühlvorgang wurde danach noch 2 Mal wiederholt.

- Zitratpuffer:
 - 18 ml Lösung A (100 mM Zitronensäure-Monohydrat)
 - 82 ml Lösung B (100 mM Natrium-Zitrat-

Dihydrat)

• Auffüllen mit Aqua dest auf 11

Anschließend wurden die Schnitte in $1 \times PBS$ für 2 min gewaschen und danach mit der Blockierlösung aus dem ZytoChem-Plus AP Kit (Zytomed Systems) für 5 min beschichtet, um unspezifische Bindungsstellen für den Primärantikörper zu maskieren. Im Fall des DAB/HRP-Kits musste zuvor noch ein 10 minütiges Abblocken mit 10% H₂O₂ ("Peroxidblock") erfolgen, und anschließend wurde wie beim AP Kit verfahren.

Nach 3 Waschschritten in 1× PBS á 2 min wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper, verdünnt in 2% BSA in 1× PBS, für 2 Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert.

- 10× PBS:
 - 160,2g NaCl
 - 4g KCl
 - 28,4g Na₂HPO₄ x 2 H₂O (Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat)
 - 5,4g KH₂PO₄ (Kaliumhydrogenphosphat)
 - mit 0.5 M NaOH auf pH7,4 einstellen und mit Aqua dest. auf 2 Liter auffüllen

Nach der Inkubation des Primärantikörpers (die jeweilige

Verdünnung des Primärantikörpers ist Tabelle 2.4. zu entnehmen) wurden die Schnitte in 0,1% (w/v) BSA in PBS 3 Mal für jeweils 2 Minuten gewaschen, um anschließend für 20 min in einer feuchten Kammer mit dem biotinylierten Sekundärantikörper des Kits inkubiert zu werden. Auch hier schlossen sich wieder 3 Waschschritte á 2 min mit 0,1% (w/v) BSA in 1× PBS an. Daraufhin wurden die Schnitte mit dem vom Kit bereitgestellten Streptavidin-Alkalische-Phophatase-Komplex beschichtet und für 20 min in einer feuchten Kammer gelagert. Hier schlossen sich wieder 3 Waschschritte á 2 min mit 1× PBS an.

Konzentration 1:500 1:100 1:200 1:100 1:100 1:100 1:40 1:750 1:200 1:1000	Antikörper	PRDX6	PRDX2	PRDX1	GPx1	Katalase	SOD3	CML	proSPC	CD68	FoxJ1
	Konzentration	1:500	1:100	1:200	1:100	1:100	1:100	1:40	1:750	1:200	1:1000

Tabelle 2.4 eingesetzte Antikörper und ihre Verdünnungen für die Immumhistochemie

Danach erfolgte die Farbreaktion, bei der die Schnitte parallel gefärbt wurden und die Enzymreaktion der AP (alkalische Phosphatase) mit Naphthol-AS-bisphosphat und dem Chromogen Fast Red zu einem roten Reaktionsprodukt führte. Abhängig vom Primärantikörper ergaben sich unterschiedliche Färbezeiten. Die Intensität wurde während des Färbevorgangs mittels Lichtmikroskop bestimmt, und bei gewünschter Intensität wurde die Reaktion abgestoppt, indem die Schnitte in Aqua dest. überführt wurden. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Haemalaun (sauer, nach Mayer) für 90 sec, und im Anschluss die Bläuung der Gegenfärbung in Leitungswasser über 4 min. Danach konnten die Schnitte mit auf ~90°C erwärmten Glycergel (Dako) eingedeckelt werden. Nachdem das Medium getrocknet war, wurden die Schnitte mit dem Nano Zoomer Scanner von Hamamatsu eingescannt.

Im Anschluss wurden die gescannten Lungenschnitte mit Hilfe der "NDP.viewer2-Software" ausgewertet und Fotos mit 10×, 20× und 40× Vergrößerung hergestellt.

2.11. Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

2.11.1. 8-Isoprostan

Mittels eines ELISA ist es möglich, eine quantitative Bestimmung des gewünschten Proteins in den unterschiedlichen Proben zu vollziehen. Das hierzu verwendete Kit war von Cayman Chemicals. Der diesem Kit zur Detektion zu Grunde liegende Mechanismus ist die Konkurrenz von freiem 8-Isoprostan und einem Konjugat aus 8-Isoprostan mit Acetylcholinesterase (=Tracer), um eine begrenzte Anzahl von 8-Isoprostan-spezifischen Bindungsstellen im Kaninchen-Antiserum. Da die Konzentration des Tracers konstant gehalten wird, die Konzentration in den Proben aber variiert, ist die Menge des gebundenen Tracers antiproportional zur der in der Probe vorhandenen Menge – d.h: bei einer höheren Konzentration von freiem 8-Isoprostan in der Probe bindet vor allem dieses freie Isoprostan an die Bindungsstelle im Kaninchen-Antiserum, sodass Tracer vermehrt nicht gebunden wird. Da die Menge an Tracer bekannt ist, kann anhand der (nicht) gebundenen Tracerkonzentration auf die freie Menge an 8-Isoprostan in der Probe geschlossen werden.

Diese Komplexe – entweder freies 8-Isoprostan gebunden an das Kaninchen-Antiserum oder Tracer gebunden an das Antiserum – binden an Maus anti-Kaninchen IgG, mit denen die Wells gecoated sind. Beim Waschen der Platte werden alle ungebundenen Reagenzien entfernt. Anschließend wird Ellmanns Reagenz hinzugefügt, welches mit der Acetylcholinesterase reagiert, woraufhin ein gelbes Reaktionsprodukt entsteht, was ein Absorptionsmaximum bei 412 nm hat. Die spektrophotometrische ermittelte Farbintensität ist proportional zur Menge an gebundenem Tracer, was wiederum antiproportional zu der in der Probe vorhandenen Menge an freiem 8-Iosprostan ist - folglich bedeutet eine geringe Absorption eine hohe Konzentration an freien 8-Isoprostan in der Probe.

Um die Lavageproben für den Kit verwenden zu können, mussten

98

diese eingeengt werden. Hierfür wurde das Volumen, welches $10\mu g$ entsprach, in ein frisches Eppendorf-Gefäß pipettiert und anschließend mittels Speed Vac-Konzentrator eingeengt. Abhängig von dem Volumen der Probe dauerte dies zwischen 1-2 Stunden, wobei maximal ~300µl Probe verwendet worden sind. Anschließend wurde das Pellet aus Protein und Salzen mit $120\mu l$ um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen - Reinstwasser (= ultra pure water) gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei 4°C gelagert.

Die weiteren Vorbereitungen für den Kit bestanden daraus, EIA Puffer anzusetzen. Vom Kit wird dafür ein 10× Konzentrat zur Verfügung gestellt,



Abbildung 2.3. Standard-Konzentration für den 8-Isoprostan ELISA

dass in 90ml Reinstwasser gelöst wird. Dieser Puffer wird benötigt, um sowohl Antiserum, Tracer als auch den mitgelieferten Standard zu lösen. Tracer und Antiserum wurden mit jeweils 6 ml Puffer gelöst und anschließend für bessere Sichtbarkeit mit einem bereitgestellten Farbstoff (orange für Tracer; blau für Antiserum), in einer Verdünnung von 1:100, eingefärbt.

Der im Kit enthaltene Standard hatte eine Konzentration von 50ng/ ml. Davon wurden 100µl benötigt und mit 900µl Reinstwasser versetzt. Von dieser Stocklösung (5ng/ml) wurden 100µl mit 900µl EIA Puffer gemischt, sodass eine Konzentration von 500pg/ml entstand, welche Standard 1 repräsentierte. Von Standard 1 wurden 500 µl in das nächste Gefäß überführt und mit 750µl EIA Puffer verdünnt, sodass in Standard 2 eine Konzentration von 200 pg/ml enthalten war. Aus Standard 2 wurden wiederum 500µl entnommen und mit 750µl EIA Puffer versetzt. Diese Verdünnungsreihe wurde bis Standard 8 fortgesetzt. Daraus ergaben sich die in Abbildung 2.3. gezeigten Konzentrationen für den Standard 1-8.

Nachdem alle Reagenzien und die Proben auf Raumtemperatur gebracht wurden, konnte die 96-Well Platte bestückt werden. Hierbei wurden 2 Blanks (Blk)



Abbildung 2.4. Auftrageschema des 8-Isoprostan ELISA

benötigt, die vollkommen leer blieben, 2 Non-Specific-Binding (NSB), die lediglich mit 100µl EIA Puffer und 50µl Tracer versetzt wurden, um unspezifische Bindungen zwischen Tracer und Puffer berücksichtigen zu können, und 3 Wells B₀, die jeweils 50µl Tracer, Puffer und Antiserum enthalten, um die maximale Bindung zwischen Tracer und Antiserum zu bestimmen. Das letzte Well Total Activity (TA), welches diente als erst beim Entwicklungsschritt mit 5µl Tracer bestückt wurde, um als Testkontrolle zu dienen. Weiterhin wurde die Standardreihe als Duplikat aufgetragen, als auch jede Probe zweimal in vertikaler Reihenfolge. Anschließend wurden jeweils 50µl Tracer sowie Antiserum hinzugefügt und die Platte mit einer Folie verschlossen. Dieser Ansatz inkubierte für etwa 18 Stunden bei 4°C. Das Auftrageschema ist in Abbildung 2.4. nochmals graphisch dargestellt.

Nach der Inkubation wurden die Wells geleert und $5 \times$ mit Waschpuffer gewaschen. Der Waschpuffer war als Konzentrat (400×) im Kit enthalten und musste nur noch mit 21 Reinstwasser und 1ml Polysorbat 20 (= Tween 20), welches aufgrund seiner Viskosität mit einer Spritze aufgezogen werden musste, gelöst werden. Dann wurden alle Wells mit 200µl Ellmanns Reagenz bestückt, welches aus dem im Kit bereitgestellten Konzentrat mit
20 ml Reinstwasser angesetzt wurde. Zu dem Well TA (total activity) wurden 5µl Tracer hinzugefügt und die Platte wieder mit einer Folie verschlossen. Zur Verbesserung der Entwicklung wurde die Platte bei Raumtemperatur mit Alufolie abgedeckt und auf einem Orbitalrüttler für 90-120 min inkubiert. Anschließend konnte der ELISA mit dem Mikrotiter-Platten Reader (TECAN) ausgelesen werden.

2.11.2. Peroxiredoxin 6 (PRDX6) ELISA

Der zur genaueren Quantifizierung des Peroxiredoxin 6 (PRDX6)-Gehaltes – im Vergleich zur Western Blot Methodik – verwendete ELISA Kit wird von Abfrontier hergestellt und von Hölzel vertrieben.

Dieser Assay basiert auf einem klassischen ELISA. Die zur Verfügung gestellte Mikrotiterplatte ist mit monoklonalen Antikörpern, spezifisch gegen humanes PRDX6, beschichtet. Nach dem Zugeben der Proben und anschließendem Waschen, um nicht gebundenes PRDX6 und andere unspezifische Komponenten zu entfernen, wird ein monoklonaler Sekundärantikörper, der gegen den auf der Mikrotiterplatte gebundenen PRDX6-Antikörper gerichtet ist, hinzugefügt. Dieser verfügt über eine Bindestelle für Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP), sodass der Gehalt von PRDX6 quantitativ erfasst werden kann. Nach dem Hinzufügen von Tetramethylbenzidin (TMB) entsteht ein blaues Reaktionsprodukt, das nach einer vorgeschriebenen Zeit mit 2N Schwefelsäure abgestoppt wird, sodass ein Farbumschlag auf Gelb erfolgt. Dieses Endprodukt kann bei 450 nm photometrisch ausgelesen werden. Die Absorption ist direkt proportional zur gebundenen Menge an PRDX6.

Das Assay wurde sowohl für Serum- als auch Lavage-Proben verwendet, wobei die Serum-Proben mit dem bereitgestellten Probenpuffer 1:100 verdünnt werden mussten, um eine optimale Absorption zu erreichen. Damit die generell schwach konzentrierten Lavageproben nicht unnötig verdünnt wurden, aber dennoch der Probenpuffer eingesetzt werden sollte, um den Matrixfehler klein zu halten, wurden 4 Volumenteile Lavage mit einem Volumenteil des Probenpuffers versetzt.

Der vom Assay bereitgestellte Standard enthält 20ng/ml und wird lyophilisert geliefert, sodass dieser zunächst mit 1 ml Standard/Probenpuffer unter sanften Schütteln für 5 min gelöst werden muss. Aus diesem Ansatz wird eine absteigende (30µl Verdünnungsreihe 600pg/ml von auf 970µl Standard/Probenpuffer) über 300pg/ml, 150pg/ml, 75pg/ml, 37,5pg/ml, 18,75pg/ml bis 9,375pg/ml hergestellt.

103

Der sekundäre Antikörper sowie der Streptavidin-HRP Komplex werden beide in einer 100-fachen Konzentration mitgeliefert, sodass 150µl des Konzentrates mit 14,85ml des Sekundär-Antikörper/Streptavidin HRP- Verdünnungspuffer gelöst werden müssen (sowohl der Sekundärantikörper als auch der Streptavidin-HRP Komplex werden mittels dieses Verdünnungspuffer gelöst!). Entweder kann das zu Beginn erfolgen und muss bei 4°C gelagert werden bis zur weiteren Verwendung, oder die Lösungen werden frisch kurz vor dem Einsatz angesetzt.

Der mitgelieferte Waschpuffer muss bei Raumtemperatur equilibriert werden, um alle Salze zu lösen, wobei mit einer kompletten Einheit Konzentrat 500ml Waschpuffer hergestellt werden können.

Nachdem die Mikrotiterplatte mit der absteigenden Standardreihe mit Probenpuffer als Blank sowie den Proben mit jeweils 100µl pro Well bestückt wurde, wobei in der letzten Reihe der 600er Standard aufgetragen wurde, um das korrekte Zeitintervall zu bestimmen, wurde diese mit Folie abgedeckt und bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Nach 3 Waschschritten wurden pro Well 100µl des Sekundärantikörpers hinzugefügt und wieder abgedeckt für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach erfolgten wieder 3 Waschschritte. Im Anschluss wurde die Platte mit 100µl pro Well mit der Streptavidin-HRP Lösung beladen und abgedeckt für 30min bei 37°C inkubiert. Hierauf erfolgten wieder 3 Waschschritte, wobei zunächst nur die letzte Reihe, die komplett mit dem 600er Standard bestückt war, vollständig gewaschen wurde. Nur in diese Reihe wurde jetzt das TMB-Subtrat pipettiert und dann jeweils nach 5, 8, 10 und 12 Minuten mit der Stopp-Lösung das blaue in das gelbe Reaktionsprodukt überführt. Jetzt erfolgte die Ausmessung. Abhängig von der Absorption wurde entschieden, welches Zeitintervall gewählt wird, wobei der Kit in seiner Anleitung über eine Tabelle für die optimale Absorption verfügte. Schließlich wurde auch die restliche Platte gewaschen und mit dem vorher bestimmten Zeitintervall bei Raumtemperatur inkubiert, wie zuvor die letzte Reihe, und im Anschluss mit einem Mikrotiter-Platten Reader (TECAN) ausgelesen.

2.12. Densitometrische Auswertung der Immunoblots und statistische Methoden

Zur Auswertung der Ergebnisse der Immunoblots wurde zunächst eine densitometrische Auswertung der Bandenintensität mit der Computer-Software ImageJ (Version 1.46r, Freeware vom NIH, USA) durchgeführt. Dabei wurden die Proben auf einen internen Standard, der auf jeden Gel doppelt mitlief, gesetzt, sodass mehrere Gele miteinander verglichen werden konnten. Anschließend wurden die erhaltenen Intensitäts-Werte in Form von Box-Plot/bzw. "Box- and Whisker"- Diagrammen dargestellt und im Anschluss statistisch ausgewertet; beides konnte mit dem Programm "GraphPad Prism", Version 5.02, durchgeführt werden. Die ELISA-Ergebnisse wurden analog analysiert und ausgewertet. Bei der Statistik wurde eine Normalverteilung der Ergebnisse nicht angenommen. Für den statistischen Vergleich von ≥ 3 Versuchsgruppen wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, um alle Gruppen untereinander vergleichen zu können. Für den statistischen Vergleich zweier Entitäten wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney Test verwendet. Statistisch signifikante Ergebnisse sind im Ergebnisteil folgendermaßen dargestellt: * p<0,05, ** p<0,01 und *** p<0,001.

3. Ergebnisse

3.1. Peroxiredoxin 6 (PRDX6)

3.1.1. Allgemeines

Peroxiredoxin 6 (PRDX6) ist ein bifunktionales, 25 kDa großes Protein und das einzige Mitglied der Gruppe der Peroxiredoxine bei Säugetieren, welche insgesamt die Peroxiredoxine 1-6 umfasst, das eine 1-Cys Formation aufweist, im Gegensatz zu den anderen Formen, die alle 2-Cys konfiguriert sind.

Außerdem verfügt es über eine Glutathionperoxidase- sowie eine Phospholipase A_2 -Aktivität, im Gegensatz zu den anderen Peroxiredoxinen, die Thioredoxin als Elektronendonor verwenden¹³⁶.

Es metabolisiert H_2O_2 und andere Hydroperoxide; darunter sind vor allem die Phospholipid-Hydroperoxide zu nennen, die eine zentrale Rolle im Kontext des oxidativen Stresses und Zellschadens spielen. Gerade diese Funktion der Reduktion von Phospholipid-Hydroperoxiden scheint ein zentraler Mechanismus für die Effektivität von PRDX6 als Antioxidans zu sein¹³⁷.

3.1.2. Bestimmung des PRDX6 Gehaltes in humanen Lavagen von verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten und von gesunden Spendern (HV) mittels Western Blot- Methodik und ELISA Die densitometrisch ausgewerteten Ergebnisse des PRDX6Gehaltes in humanen Lavagen von verschiedenen Entitäten und gesunden Spendern sind in Abbildung 3.1. dargestellt. Graphik A demonstriert die Western-Blot Ergebnisse mit exemplarischem und repräsentativem Immunoblot sowie dazugehöriger Coomassie-Färbung der Blot-Membran; in Graphik B sind die ELISA Ergebnisse dargestellt.

Unterschiede zwischen den Entitäten und den gesunden Spendern sind mittels Kruskal-Wallis-Test analysiert worden, wobei sich ein hochsignifikantes Ergebnis (p=0,0008) darstellt. Die gesunden Spender (HV, n=20) zeigten sich in ihrem Median als die Gruppe mit dem höchsten Gehalt an PRDX6, neben NSIP-Patienten (n=5). Den niedrigsten Gehalt an PRDX6 im Median wiesen IPF-Patienten (n=22) und Sarkoidose Patienten (n=9) auf. Die anderen Entitäten zeigten ein eher gleichförmiges Verhalten mit ähnlichen Medianen bei ca. 200 densitometrischen Einheiten auf.

Beim Vergleich zweier Gruppen untereinander wurde der Mann-Whitney-Test eingesetzt. Es zeigten sich v.a. beim Vergleich der gesunden Spender zu den Entitäten bis zu hoch signifikante Ergebnisse. Besonders hervorzuheben ist dabei das hoch signifikante Ergebnisse beim Vergleich gesunder Spender zu IPF-Patienten (p<0,0001).



Abbildung 3.1. PRDX6-Gehalt in humanen Lavagen von Patienten mit unterschiedlichen Lungenfibrose-Entitäten und von gesunden Spendern (HV) im Vergleich

In Graphik A wurden die Ergebnisse des Western-Blots mit einem repräsentativen Immunoblot sowie der dazugehörigen Coomassie-Färbung dargestellt, wobei sich im Kruskal Wallis Test ein hochsignifikantes Ergebnis (p = 0,0008) zeigte.

In Graphik B sind die mittels ELISA gewonnenen Ergebnisse aufgezeigt, bei denen der Kruskal Wallis Test ein hochsignifikantes Ergebnis (p<0,0001) ermittelte.

Zusätzlich wurden statistische Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen durch den Mann-Whitney-Test analysiert. Signifikante Ergebnisse sind mittels schwarzer Klammern dargestellt.

Aufgrund der Übersichtlichkeit sind folgende Ergebnisse des Mann-Whitney-Tests nicht graphisch dargestellt:

Western-Blot: IPF vs DIP *; DIP vs Sarc **

ELISA: IPF vs CVD **; NSIP vs RA *, NSIP vs Sarc *.

Da sich im Western Blot bereits Hinweise auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten, wurde ein ELISA durchgeführt, um eine eventuell sensitivere Testmethode zusätzlich zu bieten.

Auch hier zeigte sich mittels Kruskal-Wallis Test ein

hochsignifikantes Ergebnis. Die Tendenz, dass IPF-Patienten (n=22) offenbar die niedrigsten PRDX6-Spiegel aufweisen, zeigte sich hier deutlicher als im Western Blot. Die höchsten Spiegel fanden sich sowohl bei gesunden Spendern (n=18) als auch bei NSIP-Patienten (n=5), wie zuvor auch im Western Blot beobachtet. Die anderen Entitäten zeigten auch hier, wie im Western Blot, eine breitere Streuung des PRDX6 Gehaltes, allerdings mit geringeren Medianen.

Erneut konnten signifikante Unterschiede v.a. im Vergleich von gesunden Spendern zu den anderen Fibrose-Entitäten festgestellt werden. Zudem konnte das hochsignifikante Ergebnis beim Vergleich von gesunden Spendern zu IPF-Patienten reproduziert werden (p<0,0001). Außerdem ließ sich in dieser Untersuchung beim Vergleich von IPF- zu NSIP-Patienten ein sehr signifikanter Unterschied (p=0,0041) feststellen.

3.1.3. Bestimmung des PRDX6-Gehaltes in humanen Serum-Proben von verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten und von gesunden Spendern (HV) mittels ELISA

In einer Voruntersuchung mittels Western Blot (nicht gezeigt) ergaben sich Hinweise auf signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen, sodass auch die Serum-Proben mittels ELISA untersucht wurden. In Abbildung 3.2. sind die Ergebnisse dargestellt.



Abbildung 3.2. PRDX6-Gehalt in humanen Serum-Proben von Patienten mit unterschiedlichen Lungenfibrose-Entitäten und freiwilligen, gesunden Spendern (HV=healthy volunteer) im Vergleich

Beim Vergleich aller Gruppen untereinander mittels Kruskal-Wallis Test zeigte sich ein signifikantes Ergebnis (p=0,0151).

Beim Vergleich zweier Gruppen untereinander zeigte der Mann-Whitney Test mehrere signifikante Ergebnisse, die mittels schwarzer Klammer dargestellt wurden.

Alle Gruppen wurden untereinander wieder mit dem Kruskal-Wallis-Test verglichen, wobei sich ein signifikantes Ergebnis (p<0,0151) darstellte.

Erneut ließen sich signifikante Unterschiede, v.a. beim Vergleich der gesunden Spender zu den Entitäten darstellen, allerdings nicht so ausgeprägt, wie sie sich in der Lavage-Untersuchung darstellten. Leider ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen gesunden Spendern und IPF-Patienten feststellen.

3.1.4. Immunhistochemie (IHC) für PRDX6 in Lungengewebsschnitten von normalen Spenderlungen und Patienten mit verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten

Peroxiredoxin 6 ist in allen Organen vorhanden, aber besonders ausgeprägt ist es in der Lunge. Hier findet es sich in alveolären Typ-II-Zellen, Clara Zellen, im ziliierten Bronchialepithel und in Makrophagen^{136,137}. Dies konnten wir ebenfalls in der Immunhistochemie von gesunden Spenderlungen darstellen (siehe Abbildung 3.3.).

Es zeigten sich allerdings kleine Unterschiede in der Expression von PRDX6 in den verschiedenen Krankheitsentitäten untereinander als auch im Vergleich zu den gesunden Spendern (siehe Abbildung 3.4.). Zunächst zeigte sich bei allen Entitäten, dass Makrophagen weniger stark angefärbt wurden im Vergleich zu Makrophagen gesunder Spender. Besonders bei NSIP- und EAA-Patienten fiel auf, dass hier so gut wie keine Reaktion stattfand. Vor allem akkumulierte Makrophagen sind von diesem Färbeverhalten betroffen. Ein ähnliches Phänomen zeigte sich auch bei Sklerodermie und systemischen Lupus erythematodes (nicht gezeigt).



Abbildung 3.3. Lokalisation von Peroxiredoxin 6 (PRDX6) in gesunden Spenderlungen (Donor)

Repräsentative Immunhistochemie für proSP-C (Å,B) zur Kennzeichnung von alveolären Typ-II-Zellen (AECII), Forkhead Box Protein J1 (FoxJ1) zur Identifizierung von ziliierten Bronchialzellen (E,F) und CD68 als Oberflächenantigen von Makrophagen (I,J). Dazu im Vergleich gesetzt sind serielle Schnitte, die mit PRDX6 gefärbt sind (C,D,G,H,K,L). Die Pfeile indizieren die Kolokalisation im jeweiligen Zelltyp.

Es zeigte sich, dass PRDX6 in alveolären Typ II-Zellen, in Makrophagen und im Bronchialepithel exprimiert wird.

Des Weiteren zeigte sich eine stärkere Hintergrundreaktion, vor

allem im Bereich von fibrotischen und umgebauten Arealen. Diese

verstärkte Hintergrundreaktion ließ sich vor allem bei der NSIP und

EAA beobachten.

Beim Färbeverhalten von alveolären Typ-II-Zellen zeigte sich unter

den verschiedenen dargestellten Entitäten kein großer Unterschied.

Die Farbintensitäten variierten nur minimal. Auch die Häufigkeit

der Kolokalisation von PRDX6 in proSP-C-positiven alveolären

Typ-II-Zellen war bei den dargestellten Entitäten relativ ähnlich.

Allerdings war auffällig, dass bei der Sklerodermie die Kolokalisation doch seltener zur Darstellung kam (Abb.3.4. P, Q, R). Im Vergleich zu den gesunden Spendern ergaben sich insgesamt keine ausgeprägten Unterschiede.

Die bereits im gesunden Spender nachgewiesene Anfärbbarkeit von Bronchialepithel wurde in allen Entitäten gleichermaßen beobachtet und ist exemplarisch bei der IPF in Abb. 3.4. S, T gezeigt.



Abbildung 3.4. Lokalisation von Peroxiredoxin 6 im Lungengewebe verschiedener Entitäten im Vergleich zu gesunden Spendern

Repräsentative Immunhistochemie für gesunde Spender (A-C) im Vergleich zur IPF (D-I, S, T), NSIP (J-L), EAA (M-O) und Sklerodermie (P-R).

Die weniger häufige Kolokalisation von PRDX6 in Makrophagen bei den Entitäten ist in H (IPF), K (NSIP) und N (EAA) jeweils mit einem Doppelpfeil markiert.

Die gute Kolokalisation von PRDX6 in proSP-C positiven alveolären Typ-II-Zellen bei der IPF ist in E mit einem Pfeil markiert. Im Vergleich dazu ist die mangelnde Kolokalisation von PRDX6 und proSP-C bei der Sklerodermie in Q mit einem entsprechenden Pfeil markiert.

In den Bildern S und T ist exemplarisch die Lokalisation von PRDX6 in ziliiertem Bronchialepithel von IPF-Lungen (markiert mittels FoxJ1 – S) dargestellt, die sich bei allen Entitäten findet.

Von Sarkoidose-Patienten standen sowohl Transbronchialbiopsien als auch Proben von Explantat-Lungen zur Verfügung, sodass diese aufgrund ihrer Färbereaktion im Bereich der Granulome separat dargestellt werden.

Dabei zeigte sich eine sehr gute und anschauliche Kolokalisation von PRDX6 mit CD68-positiven Regionen. Vor allem in der Übersicht der Transbronchialbiopsien (Abb. 3.5. A-B) zeigte sich sehr eindeutig die PRDX6-Verteilung in den epitheloiden Granulomen. In der Detailansicht kann man erkennen, dass keine strenge Kolokalisation zu den CD68-positiven Zellen bestand, sondern das Granulom an sich gefärbt wurde, teilweise invers zu den CD68-positiven Zellen. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch in den Explantat-Lungen von Sarkoidose-Patienten (Abb. 3.5. E-H).



Abbildung 3.5. Lokalisation von PRDX6 in Transbronchialbiopsien als auch Explantaten von Sarkoidose-Patienten

In Abbildung A-D ist die Lokalisation von PRDX6 in Granulomen in einer Transbronchialbiopsie bei gesicherter Sarkoidose dargestellt.

Die Granulome enthielten viele CD68-positive Makrophagen, die wenig oder gar nicht PRDX6 exprimierten. PRDX6 färbte das Granulom an sich.

In Abbildung E-H ist ein Gewebsschnitt einer explantierten Lunge eines Sarkoidose-Patienten gefärbt. Auch hier ist eine ähnliche Lokalisation von PRDX6 zu erkennen.

3.1.5. Korrelation von PRDX6 mit DLCO

Mit dem grundlegenden Ziel, einen möglichen Biomarker zur Differenzierung der unterschiedlichen Fibrose-Entitäten durch die Charakterisierung von antioxidativen Enzymen zu finden, ist auch die Überlegung eingeflossen, die ermittelten Ergebnisse mit dem klinischen gut bewertbaren Parameter der DLCO_{SB} zu korrelieren, mit dem gewünschten Ergebnis, dass geringe PRDX6-Level mit einem schlechten Gasaustausch korrelieren.

Hier ließ sich leider keine Korrelation zwischen dem Gehalt an PRDX6 und der Lungenfunktion feststellen (nicht gezeigt).

3.2. Peroxiredoxin 2 (PRDX2)

3.2.1. Allgemeines

Peroxiredoxin 2 (PRDX2) ist ein 22kDa großes, 2-Cyskonfiguriertes Mitglied der Peroxiredoxin-Familie, das Thioredoxin als Elektronendonor verwendet, wobei das Haupttarget Wasserstoffperoxid zu sein scheint. Über die Regulation der H₂O₂-Konzentration ist PRDX2 auch in intrazelluläre Signalwege vor allem von spezifischen Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF¹⁴⁴ beteiligt.

¹⁴⁴ Choi et al. 2005

3.2.2. Bestimmung von PRDX2-Gehalt in humanen Lavagen von verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten und von gesunden Spendern mittels Western Blot Methodik

Die densitometrisch ermittelten Ergebnisse des PRDX2-Immunoblots sind graphisch in Abbildung 3.6. dargestellt. Desweiteren ist dort ein repräsentativer Immunoblot sowie der dazugehörige Tintenstain abgebildet.

Es zeigte sich, dass die gesunden Spender (n=13) den höchsten Gehalt an PRDX2 aufwiesen, gefolgt von NSIP-Patienten (n=5) (ähnlich wie bei Peroxiredoxin 6 – siehe dort). IPF-Patienten (n=14) wiesen mit den niedrigsten Gehalt an PRDX2 auf. Weitere Entitäten mit geringen PRDX2-Leveln waren CVD-(n=10), RA-(n=7) und Sarkoidose-Patienten (n=9). EAA-Patienten (n=9) zeigten ein ähnliches Muster wie NSIP-Patienten.

Alle Gruppen wurden mittels Kruskal-Wallis Test untereinander verglichen, wobei sich ein hoch-signifikantes Ergebnis zeigte (p<0,0001).

Beim Vergleich zweier Gruppen untereinander mittels Mann-Whitney Test zeigten sich mehrere, teilweise hoch signifikante Ergebnisse, v.a. beim Vergleich gesunder Spender zu den Entitäten. Lediglich im Vergleich gesunder Spender zu NSIP- bzw. EAA-Patienten ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen.



Abbildung 3.6. PRDX2-Gehalt in humanen Lavagen von Patienten mit verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten und von gesunden Spendern (HV) Graphisch dargestellt sind die densitometrisch ermittelten Ergebnisse, sowie ein exemplarischer Immunoblot mit dazugehöriger, repräsentativer Tintenanfärbung. Es zeigte sich im Kruskal Wallis Test ein hochsignifikantes Ergebnis (p=<0.0001).

Mittels Mann-Whitney-Test ließen sich mehrere, teils hoch signfikante Unterschiede v.a. zwischen gesunden Spendern und den Entitäten darstellen. Diese sind mittels schwarzer Klammer markiert.

Um eine gewisse Übersichtlichkeit zu gewährleisten, sind folgende Ergebnisse nicht graphisch dargestellt:

ĤV vs DIP *; ÑSIP vs CVD *, NSIP vs RA *, NSIP vs Sarc *; EAA vs CVD*, EAA vs RA *, EAA vs Sarc *.

3.2.3. Bestimmung von PRDX2-Gehalt in humanem Serum von

verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten und von gesunden

Spendern mittels Western Blot Methodik

Die densitometrisch ermittelten Ergebnisse für Serum-PRDX2 sind

graphisch in Abbildung 3.7. mit einem repräsentativen Immunoblot dargestellt.

Den annähernd höchsten Gehalt zeigten hier NSIP-Patienten (n=3), den niedrigsten Gehalt wiesen gesunde Spender (n=11) und Sarkoidose-Patienten (n=5) auf. Die IPF-Patienten (n=7) wiesen sogar höhere PRDX2-Spiegel auf im Gegensatz zu den gesunden Spendern. DIP- (n=6), EAA- (n=6) und RA-Patienten (n=3) zeigten ein ähnliches Verteilungsmuster.

Auch hier zeigt sich im Kruskal-Wallis-Test ein signifikantes (p=0,0163) Ergebnis bei Vergleich aller Gruppen untereinander.

Unter Anwendung des Mann-Whitney-Testes zeigten sich mehrere signifikante Unterschiede, dieses Mal v.a. im Vergleich der Entitäten untereinander. Es ließ sich aber auch ein signifikanter Unterschied (p=0,0297) zwischen gesunden Spendern und IPF-Patienten feststellen.



Abbildung 3.7. PRDX2-Gehalt in humanem Serum verschiedener Lungenfibrose-Entitäten und gesunder Spender (HV)

Graphisch dargestellt sind die densitometrisch ermittelten Ergebnisse sowie ein exemplarischer Immunoblot. Beim Vergleich der Gruppen untereinander ergab sich mittels Kruskal Wallis-Test ein signifikantes Ergebnis (p=0,0163).

Beim Vergleich zweier Gruppen untereinander wurde der Mann-Whitney Test eingesetzt. Hierbei zeigten sich einige signifikante Unterschiede, welche mittels schwarzer Klammer dargestellt wurden.

Um eine gewisse Übersichtlichkeit zu gewährleisten, sind folgende Ergebnisse nicht graphisch dargestellt:

Sarc vs NSIP*, Sarc vs CVD *.

3.2.4. Immunhistochemie (IHC) für PRDX2 in

Lungengewebsschnitten von normalen Spenderlungen und

Patienten mit verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten

Für PRDX2 ist beschrieben, dass es in der Lunge sowohl im Bronchial- als auch im Alveolarepithel sowie in Makrophagen exprimiert wird¹⁴⁵, wobei sich in der vorgelegten Untersuchung Unterschiede zwischen den gesunden Spendern und den einzelnen Fibrose-Entitäten feststellen ließen.

Zur Kennzeichnung von alveolären Typ-II-Zellen ist wie zuvor proSP-C und zur Kennzeichnung von Makrophagen CD68 eingesetzt worden.

In der gesunden Spenderlunge wurde kaum eine Kolokalisation von PRDX2 mit proSP-C-positiven Typ-II-Zellen beobachtet. Auch Makrophagen in Spender-Lungen zeigten keine PRDX2-Expression. Dagegen fand sich bei IPF-Patienten eine außerordentlich starke Kolokalisation von PRDX2 mit proSP-Cpositiven Typ-II-Zellen mit starker Färbeintensität (siehe Abbildung 3.8. C, D mit einem Pfeil markiert), die sich teilweise auch bei Sklerodermie-Patienten zeigte (Abb. 3.8. L, M). Auch ließ sich bei IPF-Patienten eine gute Kolokalisation von PRDX2 mit CD68-positiven Makrophagen beobachten.

Eine Hintergrundreaktion war im Interstitium von IPF-Patienten vorhanden, aber nicht so stark ausgeprägt, wie es bei NSIP- bzw. EAA-Patienten der Fall war. Hier zeigte sich regelrecht eine starke Anfärbung des Interstitiums/von interstitiellen Zellen, wodurch die vorhandene Kolokalisation von PRDX2 mit proSP-C-positiven Zellen (Abb. 3.8. NSIP F,G; EAA I, J mit Pfeilen markiert)

¹⁴⁵ Vuorinen et al. 2008

schwerer zu erkennen war. Sowohl in NSIP- als auch EAA-Patienten wurde ebenfalls eine Kolokalisation der PRDX2-Expression mit CD68 positiven Makrophagen beobachtet.



Abbildung 3.8. Immunhistochemie – Lokalisation von PRDX2 in Lungen von gesunden Spendern und von Patienten mit verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten

Dargestellt sind immunohistochemische Färbungen für PRDX2 in Lungengewebsschnitten von gesunden Spendern (A, B) und von Patienten mit IPF (C-E), NSIP (F-H), EAA (I-K) und Sklerodermie (L-N). In Parallelschnitten sind mittels proSP-C-Antikörper alveoläre Typ-II-Zellen und mittels CD68-Antikörper Makrophagen gefärbt und dadurch gekennzeichnet. In Donoren wurde keine Kolokalisation der PRDX2-Expression mit proSP-C-positiven Typ-II-Zellen beobachtet (A, B). Es zeigte sich aber bei IPF-Patienten eine eindeutige Kolokalisation der PRDX2-Expression mit proSP-C-positiven Typ-II-Zellen mit starker Färbeintensität (C, D; mit Pfeilen markiert.) Eine ähnliche Kolokalisation fand sich auch bei Sklerodermie-Patienten. Bei NSIP- und EAA-Patienten zeigt sich ebenfalls eine Kolokalisation von PRDX2 mit proSP-C positiven Zellen, allerdings zeigten auch interstitielle Zelle eine starke Anfärbung in der PRDX2-Immunohistochemie.

PRDX2-Expression wurde zudem in allen Fibrose-Entitäten regelrecht im Bronchialepithel beobachtet (nicht dargestellt).

Bei der Untersuchung sowohl von Transbronchialbiopsien als auch

von Explantaten von Sarkoidose-Patienten zeigte sich deutlich die

Lokalisation von PRDX2 in den Granulomen (dargestellt in Abb. 3.9.). Das Granulom an sich zeigte eine recht homogene Expression von PRDX2.



Abbildung 3.9. Lokalisation von PRDX2 in Transbronchialbiopsien und Explantaten von Sarkoidose-Patienten

In Abbildung A-D ist die Kolokalisation von PRDX2 zu CD68-positiven Zellen in einer Transbronchialbiopsie bei gesicherter Sarkoidose dargestellt.

In Abbildung E-H ist ein Gewebsschnitt einer explantierten Lunge eines Sarkoidose-Patienten gefärbt. Auch hier ist die Kolokalisation von PRDX2 mit CD68-positiven Zellen erkennbar.

3.3. Peroxiredoxin 1 (PRDX1)

3.3.1. Allgemeines

Peroxiredoxin 1 (PRDX1) ist ein 22kDa großes Protein und gehört zur Familie der Peroxiredoxine, die in der Lage sind, Lipidhydroperoxide und Wasserstoffperoxid abzubauen und zu neutralisieren, wobei hierfür Thioredoxin als Elektronendonor genutzt wird – zumindest in den PRDX-Isoformen I-V¹¹².

In der Lunge findet sich PRDX1 vor allem im Bronchialepithel und in Alveolarmakrophagen. Aber auch in Alveolarepithel und Gefäßepithel lässt es sich nachweisen¹¹².

3.3.2. Immunhistochemie (IHC) für PRDX1 in

Lungengewebsschnitten von normalen Spenderlungen und Patienten mit verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten

In Parallelschnittserien wurden gesunde Spenderlungen (A-C), Lungen-Explantate von IPF- (D-G), NSIP- (H-K), EAA- (L-O) und Sklerodermie-Patienten (P-S) untersucht. Um alveoläre Typ-II-Zellen darzustellen, wurde proSP-C-Antikörper verwendet; Makrophagen wurden mit CD68-Antikörper gekennzeichnet. In Abbildung 3.10. sind repräsentative Ausschnitte dargestellt, und die exemplarische Lokalisation der PRDX1-Expression ist mit Pfeilen markiert.

Es zeigte sich, dass alle untersuchten Patientenkollektive eine deutliche und auch sehr häufige Kolokalisation von PRDX1 mit CD68-positiven Makrophagen aufwiesen. Es gab keine nennenswerten Unterschiede in der Farbintensität der PRDX1-IHC beim Vergleich der verschiedenen Entitäten mit den gesunden Spender-Lungen.

Auch zeigte sich in allen Kollektiven eine deutliche Expression von PRDX1 im Bronchialepithel – vorzugsweise in zilliierten Bronchialzellen. Exemplarisch ist dies für die einzelnen Entitäten in Abb. 3.10., G, K, O, S dargestellt.



Abbildung 3.10. Lokalisation von PRDX1 in gesunden Spenderlungen und Lungen-Explantaten von Patienten verschiedener Fibrose-Entitäten

Es sind repräsentative Ausschnitte aus Parallelschnitten von gesunden Spendern (A-C), IPF- (D-G), NSIP- (H-K), EAA- (L-O) und Sklerodermie Patienten (P-S) dargestellt. Zur Kennzeichnung von alveolären Typ-II-Zellen wurde eine proSP-C-IHC durchgeführt; Makrophagen wurden durch eine CD68-IHC markiert.

Es zeigte sich in allen untersuchten Gruppen, dass es eine deutliche und sehr häufige Kolokalisation der PRDX1-Expression mit CD68-positiven Makrophagen gab (mit Pfeilen markiert). Auch ließ sich in allen Gruppen PRDX1 im Bronchialepithel nachweisen (Abb. 3.9., G, K, O, S).

Eine Kolokalisation von PRDX1 mit proSP-C-positiven Typ-II-Zellen wurde in dieser Arbeit in keiner der Untersuchungsgruppen beobachtet.

Eine Kolokalisation von PRDX1 mit proSP-C-positiven Typ-II-Zellen und damit eine Expression von PRDX1 in diesem Zelltyp wurde generell nicht beobachtet.

Die PRDX1-Expression ist ebenfalls in Transbronchialbiopsien (Abb. 3.11. A-D) und Explantaten (Abb. 3.11. E-H) von Sarkoidose-Patienten untersucht worden. Dabei zeigte sich eine sehr deutliche Lokalisation von PRDX1 in den Granulomen, auch wenn eine etwas stärkere Reaktion mit dem umgebenden Interstitium auffällig war. Hierbei schien die Kolokalisation von PRDX1 mit den CD68-positiven Zellen stärker zu sein als im Vergleich zu der Untersuchung der PRDX6-Expression in Sarkoidose-Patienten.



Abbildung 3.11. Lokalisation von PRDX1 in Transbronchialbiopsien als auch Explantaten von Sarkoidose-Patienten

In Abbildung A-D ist die Kolokalisation von PRDX1 zu CD68-positiven Zellen in einer Transbronchialbiopsie bei gesicherter Sarkoidose dargestellt.

In Abbildung E-H ist ein Gewebsschnitt einer explantierten Lunge eines Sarkoidose-Patienten gefärbt. Auch hier ist die gute Kolokalisation von PRDX1 mit CD68-positiven Zellen erkennbar.

3.4. Glutathion Peroxidase 1 (GPX1)

3.4.1. Allgemeines

Glutathion-Peroxidase 1 (GPX1) gehört zur Glutathion-Peroxidase-Familie, bestehend aus sechs Subformen bei Säugetieren, die Selen-abhängige und -unabhängige antioxidative Enzyme sind. Alle Subformen sind der Lage, Wasserstoffperoxide (H₂O₂) unter Verbrauch von Glutathion (GSH) in Wasser und Sauerstoff umzuwandeln. Außerdem können noch andere Hydroperoxide und auch Lipidperoxide, in Wasser und die dazugehörigen Alkohole umgewandelt werden, sodass Zellmembranen und andere Zellkomponenten effektiv gegen oxidativen Stress geschützt werden können¹⁴⁶.

In der Lunge finden sich klassische zelluläre, als auch extrazelluläre Glutathion-Peroxidasen, wobei GPX1 die vorherrschende zytosolische Form ist. Sie findet sich in der Lunge unter anderem im Bronchialepithel und in Alveolarmakrophagen¹⁴⁷.

3.4.2. Bestimmung des GPX1-Gehaltes in humanen Lavagen von verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten und von gesunden Spendern mittels Western Blot Methodik

In Abbildung 3.12. sind die densitometrisch ermittelten Ergebnisse der GPX1-Immunoblots graphisch dargestellt mit einer Abbildung eines repräsentativen Immunoblot und der dazugehörigen Tintenfärbung der Membran.

Es zeigte sich, dass RA- und DIP-Patienten den niedrigsten Gehalt an GPX1 aufwiesen. Den höchsten Gehalt an GPX1 zeigten gesunde Spender; aber auch Patienten mit EAA wiesen beträchtliche GPX1-Proteinspiegel in ihren Lavagen auf.

Alle Gruppen wurden untereinander mit dem Kruskal-Wallis Test verglichen, wobei sich ein sehr signifikantes Ergebnis zeigte (p=0,0115).

¹⁴⁶ Toppo et al. 2009

¹⁴⁷ Ross Vlahos 2013



Abbildung 3.12. GPX1-Gehalt in humanen Lavagen von gesunden Spendern (HV) und Patienten mit unterschiedlichen Lungenfibrose-Entitäten.

Dargestellt sind die densitometrisch ermittelten Ergebnisse mit einem repräsentativen Immunoblot und dazugehöriger Tintenfärbung.

Mittels Kruskal-Wallis Test ergibt sich ein sehr signifikantes Ergebnis (p=0,0115) für den Vergleich der 8 Gruppen untereinander.

Bei Vergleich mehrerer Gruppen untereinander zeigte der Mann-Whitney-Test mehrere signfikante Ergebnisse, die in der Graphik mittels schwarzer Klammern verdeutlicht werden.

Bei Vergleich zweier Gruppen untereinander zeigte der Mann-Whitney Test mehrere signifikante Ergebnisse, vor allem der Vergleich gesunder Spender zu den Entitäten: gegenüber RA-Patienten zeigte sich ein sehr signifikantes Ergebnis (p=0,0085); aber auch der Vergleich zu DIP-Patienten (p=0,03) oder Sarkoidose-Patienten (p=0,0416) ergab ein signifikantes Ergebnis. Der Vergleich von gesunden Spendern zu IPF-Patienten ergab ein nahezu fast signifikantes Ergebnis (p=0,06), weswegen es ebenfalls graphisch dargestellt wurde.

Zudem zeigte sich ein signifikantes Ergebnis beim Vergleich von IPF-Patienten zu EAA-Patienten (p=0,0287).

3.4.3. Immunhistochemie (IHC) für GPX1 in Lungengewebsschnitten von normalen Spenderlungen und Patienten mit verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten

Wie bereits erwähnt, ist GPX1 ein Antioxidans, das sich in Makrophagen und im Bronchialepithel (nicht dargestellt) finden lässt. Dies zeigte sich auch in unseren immunhistochemischen Färbungen. In Abbildung 3.13. sind repräsentative Ausschnitte von gesunden Spendern und verschiedenen Entitäten dargestellt.

Sowohl in allen Lungenfibrose-Entitäten als auch in normalen Spenderlungen konnte eine sehr gute Kolokalisation von GPX1 mit CD68-positiven Makrophagen beobachtet werden, wobei sich bei den Spenderlungen eine eher geringere Farbintensität zeigte. Die Entitäten untereinander unterschieden sich nicht in der Kolokalisation von GPX1 mit CD68-positiven Makrophagen. Lediglich bei Sklerodermie-Explantaten erschien die Farbintensität in den Makrophagen geringer auszufallen.



Abbildung 3.13. Zelluläre Lokalisation von GPX1 in Lungengewebsschnitten von gesunden Spendern und Patienten mit unterschiedlichen Lungenfibrose-Entitäten

Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte aus Lungenexplantaten von gesunden Spendern (A-D), IPF- (E-H), NSIP- (I-L), EAA- (M-P) und Sklerodermie Patienten (Q-T), die als Parallelschnitte konfiguriert sind, wobei mit proSP-C (A, E, I, M, Q) alveoläre Typ-II-Zellen und mit CD68 (D, H, L, P, T) Makrophagen markiert wurden.

Sowohl in allen Entitäten als auch im gesunden Spenderlungen ließ sich eine sehr gute Kolokalisation von GPX1 mit CD68 positiven Zellen darstellen, wenn auch beim Spender in etwas geringerer Farbintensität.

Eine Expression von GPX1 in proSP-C-positiven Typ-II-Zellen ließ sich gleichermaßen in allen Entitäten beobachten, nicht jedoch nur in geringem Umfang in normalen Typ-II-Zellen gesunder Spenderlungen.

In gesunden Spenderlungen (A-D) ließ sich nur wenig Kolokalisation von GPX1 mit proSP-C-positiven Typ-II-Zellen beobachten. Bei IPF-Patienten (E-H) fand sich allerdings eine eindeutige Kolokalisation von GPX1 mit proSP-C-positiven Typ-II-Zellen, allerdings war die Farbintensität meistens eher gering. Ähnlich verhielt es sich in NSIP-Lungen (I-L), auch wenn hier zwischenzeitlich stärkere Farbintensitäten in den Typ-II-Zellen beobachtet werden konnten. In EAA-Lungen (M-P) zeigte sich ebenfalls eine Kolokalisation von GPX1 mit proSP-C positiven Typ-II-Zellen, marginal seltener als bei IPF- oder NSIP-Lungen, wobei hier die Farbintensität am geringsten ausfiel. Auch in Sklerodermie-Patienten (Q-T) zeigte sich eine sehr geringe Farbintensität der GPX1-IHC in Makrophagen, ähnlich der in IPF-Patienten.

3.5. Katalase

3.5.1 Allgemeines

Die Katalase ist ein 60kDa großes antioxidatives Enzym, das Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff umwandeln kann und sich in allen aeroben Zellen, gehäuft aber in der Leber und in Erythrozyten, findet, wobei es vor allem in Peroxisomen und im Zytoplasma lokalisiert ist. In der Lunge wird es vor allem in alveolären Typ-II-Zellen und Makrophagen exprimiert. Durch Hyperoxie, Oxidantien und Zytokine lässt es sich induzieren¹¹².

Auch für Katalase wurden Voruntersuchungen mit Serum-Proben durchgeführt. Die Detektion von Katalase-Protein in Serum-Proben gestaltete sich allerdings schwierig, da trotz Einsatz von 700µg Gesamtprotein und einem 8%-igem SDS-Gel, das bis zum Herauslaufen der 25kDa-Bande gefahren wurde, es immer noch zu einer starken Überlagerung von Katalase mit etwa 70kDa großen Proteinen (wahrscheinlich Serumalbumin) gekommen war und die Banden nur schlecht zu detektieren waren, sodass auf die Darstellung der Ergebnisse verzichtet wurde.

3.5.2. Bestimmung des Katalase-Gehalt in humanen Lavagen von verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten und von gesunden Spendern mittels Western Blot Methodik

In Abbildung 3.14. sind die densitometrisch ermittelten Ergebnisse des Katalase-Gehaltes in humanen Lavagen von gesunden Spendern und von Patienten mit verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten mit einem repräsentativen Immunoblot sowie der dazugehörigen Coomasie-Färbung der Membran dargestellt.

Es zeigte sich, mit Ausnahme der DIP-Patienten, die den niedrigsten Gehalt an Katalase aufwiesen, ein recht uniformes Bild mit ähnlich gelagerten Medianen, wobei Lavagen von IPF-Patienten nahezu den höchsten Gehalt an Katalase zeigten. Es ließ sich im Kruskal-Wallis Test zudem ein signifikantes (p=0,0388) Ergebnis ermitteln.



Abbildung 3.14. Katalase-Gehalt in humanen Lavagen von Patienten mit verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten und von gesunden Spendern (HV) Es sind die densitometrisch ermittelten Ergebnisse graphisch dargestellt sowie ein exemplarischer Immunoblot mit dazugehöriger Coomassie-Färbung. Es ergibt sich im Kruskal Wallis Test ein signifikantes Ergebnis (p=0,0388).

Mittels Mann-Whitney-Test sind erneut 2 Gruppen untereinander verglichen worden. Die Ergebnisse sind mittels schwarzer Klammer gekennzeichnet worden.

Im Mann-Whitney Test ergaben sich sehr signifikante Ergebnisse, wenn DIP-Patienten mit gesunden Spendern (p=0,0024), IPF-Patienten (p=0,0034) bzw. mit NSIP-Patienten (p=0,0095) verglichen wurden. Beim Vergleich von gesunden Spendern zu IPF- oder NSIP-Patienten ergab sich leider kein signifikantes Ergebnis; auch beim Vergleich der beiden Entitäten IPF und NSIP nicht.

3.5.3. Immunhistochemie (IHC) für Katalase in Lungengewebsschnitten von normalen Spenderlungen und Patienten mit verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten

In Abbildung 3.15. sind repräsentative IHC-Färbungen aus Explantaten von gesunden Spendern (A-C), IPF- (D-F), NSIP- (G-I) und EAA-Patienten (J-L) gezeigt. Alveoläre Typ-II-Zellen wurden wieder durch proSP-C-IHC markiert. Zur Darstellung von Makrophagen wurde eine CD68-IHC durchgeführt.

In allen untersuchten Lungengewebsschnitten wurde immer eine Hintergrundreaktion des Katalase-Antikörpers mit dem Interstitium beobachtet, wobei diese Reaktion in fibrotischen Arealen ausgeprägter zu sein schien (nicht explizit dargestellt).

In gesunden Spenderlungen ließ sich keine Kolokalisation von Katalase mit proSP-C-positiven Typ-II-Zellen oder mit CD68positiven Makrophagen feststellen. Lediglich wurde eine Expression von Katalase in Bronchialepithel (Abb. 3.15., M) festgestellt. Dies wurde auch in den anderen untersuchten Lungenfibrose-Entitäten beobachtet und ist exemplarisch bei einem IPF-Patienten gezeigt (Abb. 3.15., N).



Abbildung 3.15. Lokalisation von Katalase in Lungengewebsschnitten von gesunden Spendern und von Patienten verschiedener Lungenfibrose-Entitäten

Dargestellt sind immunohistochemische Färbungen für Katalase in gesunden Spenderlungen (A-C) und den Entitäten IPF (D-F), NSIP (G-I) und EAA (J-L). In Parallelschnitten sind mittels proSP-C alveoläre Typ-II-Zellen und via CD68 Makrophagen markiert.

Im Donor lässt sich keine Kolokalisation von Katalase mit proSP-C-positiven Typ-II-Zellen darstellen. Dafür zeigte sich in den untersuchten Entitäten eine gute Kolokalisation von Katalase mit proSP-C-positiven Typ-II-Zellen, wobei sich hierin die Entitäten untereinander kaum unterschieden.

Eine Kolokalisation von CD68-positiven Makrophagen mit Katalase ließ sich in allen Entitäten mit ähnlicher Häufigkeit und Farbintensität beobachten.

In allen untersuchten Schnitten ließ sich Katalase in Bronchialepithel finden, wobei es exemplarisch bei einem gesunden Spendern (M) und einem IPF-Patienten (N) gezeigt ist.

Im Gegensatz zu den gesunden Spendern wiesen die Lungenfibrose-Entitäten eine recht häufige Kolokalisation von Katalase mit proSP-C-positiven Typ-II-Zellen auf, wobei kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Entitäten auszumachen waren. Interessanterweise schien lediglich in IPF-Patienten die Farbintensität der Katalase-Expression in Typ-II-Zellen etwas geringer zu sein als im Vergleich zu NSIP- und EAA-Patienten.

Eine Kolokalisation mit CD68-positiven Makrophagen wurde ebenfalls in den verschiedenen Entitäten beobachtet, wobei sich die Färbeintensität kaum innerhalb der untersuchten Patientenkollektive, die allseits eher schwach war, unterschied.

3.6. Superoxiddismutase 3 (SOD3)

3.6.1 Allgemeines

Superoxiddismutase 3 (SOD3) repräsentiert eine extrazelluläre Form der Superoxiddismutase und ist am stärksten vor allem in Säugetierlungen vertreten. Es ist ein tetrameres Glykoprotein, das für seine Redoxfunktion Zink und Kupfer benötigt. Dieses Enzym ist in der Lage, das freie Radikal Superoxid-Anion (O_2^{-}) in das weniger pathogene Wasserstoffperoxid umzuwandeln, denn freie Sauerstoffradikale führen über Oxidation von Lipiden und Proteinen zur Inaktivierung vieler proteomer Enzyme. SOD3 findet sich vor allem in der extrazellulären Matrix (ECM), in Alveolarmakrophagen, im Bronchialepithel und Gefäßendothel, sowie alveolären Typ-II-Zellen¹¹².

3.6.2. Immunhistochemie (IHC) für SOD3 in Lungengewebsschnitten von normalen Spenderlungen und Patienten mit verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten

In Abbildung 3.16. sind repräsentative Ausschnitte von gefärbten Lungengewebsschnitten von Explantaten von gesunden Spendern und IPF-, NSIP-, und EAA Patienten gezeigt. Alveoläre Typ-II-Zellen sind durch proSP-C-IHC gekennzeichnet, Makrophagen durch CD68-IHC.

In gesunden Spenderlungen (A-C) ließ sich weder eine Kolokalisation von SOD3 mit proSP-C-positiven Typ-II-Zellen noch mit CD68-positiven Makrophagen feststellen. IPF-Patienten (D-F) zeigten eine Expression von SOD3 in proSP-C-positiven Typ-II-Zellen, aber mit eher geringer Farbintensität, die in den apikalen Zellanteilen etwas verstärkt schien. In Makrophagen fand sich nur eine sehr geringe Expression von SOD3. Ähnlich sah es bei NSIP- (G-I) und EAA-Patienten (J-L) aus. Auch hier zeigte sich eher nur eine moderate Expression von SOD3 in Typ-II-Zellen, die in der EAA unter allen Entitäten am schwächsten ausgeprägt war. Makrophagen von EAA- und NSIP-Lungen wiesen keine oder nur eine geringe SOD3-Expression auf.

In allen untersuchten Entitäten konnte SOD3-Expression im Bronchialepithel detektiert werden (nicht dargestellt).


Donor IPF NSIP EAA

Abbildung 3.16. Immunhistochemie Lokalisation von SOD3 in Explantaten von gesunden Spendern und von Patienten mit verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten

Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte aus immunhistochemischen Färbungen von Lungenexplantaten von gesunden Spendern (A-C) und IPF- (D-F), NSIP- (G-I) und EAA-Patienten (J-L). Es sind Parallelschnitte gefärbt worden, wobei mittels proSP-C-IHC alveoläre Typ-II-Zellen und mittels CD68-IHC Makrophagen gekennzeichnet wurden. In gesunden Spendern ließ sich keine Kolokalisation von SOD3 mit proSP-C- oder CD68-positiven Zellen darstellen. In IPF-Patienten zeigte sich eine mäßig häufige Kolokalisation von SOD3 in proSP-C-positiven Typ-II-Zellen, wohingegen die Kolokalisation mit CD68-positiven Makrophagen noch seltener war und wenn, dann nur mit sehr geringer Farbintensität. In NSIP- und EAA-Lungen wurden ähnliche Beobachtungen gemacht.

3.7. N-(Carboxymethyl-Lysin) [CML]-oxidativ

modifizierte Proteine

3.7.1. Allgemeines

N-(Carboxymethyl)-Lysin (=CML) stellt eine oxidative Proteinmodifikation dar, die nur unter oxidativem Stress beobachtet wird. Die Akkumulation von CML-modifizierten Proteinen stellt ein Maß für oxidative Proteinschädigung dar, und kann leicht immunologisch mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen CML durch Western Blot, ELISA oder IHC detektiert werden. CML-Protein-Addukten wird eine Beteiligung an unterschiedlichen Alterserkrankungen zugeschrieben, wie z. B. Diabetes mellitus Typ II¹⁴⁸.

3.7.2. Immunhistochemie (IHC) für N-(Carboxymethyl-) Lysin [CML] in Lungengewebsschnitten von normalen Spenderlungen und Patienten mit verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten

Alveoläre Typ-II-Zellen wurden durch proSP-C-IHC markiert. Repräsentative Ausschnitte dieser IHC-Färbungen an gesunden Spenderlungen und explantierten Lungen von IPF-, NSIP-, EAAund Sklerodermie-Patienten sind in Abbildung 3.17. dargestellt.

Es zeigte sich deutlich, dass im Donor (A, B) so gut wie gar keine CML- modifizierten Proteine in proSP-C-positiven Typ-II-Zellen detektierbar waren. Dagegen zeigten Typ-II-Zellen von IPF-Lungen (C, D) eine deutliche Akkumulation von CML-modifizierten Proteinen. Interessanterweise wurden in alveolären Typ-II-Zellen von Patienten mit den Fibrose-Entitäten NSIP, EAA und Sklerodermie kaum CML-Protein-Addukte detektiert, was

¹⁴⁸ Onorato et al. 1998

eindeutig zeigt, dass offensichtlich nur IPF-Typ-II-Zellen diese oxidative Proteinschädigung aufweisen.



Abbildung 3.17. Expression und Lokalisation von N-(Carboxymethyl)-Lysin [CML]- oxidativ modifizierten Proteinen in normalen Spenderlungen und Lungen von Patienten mit IPF, NSIP, EAA und Sklerodermie

ProSP-C exprimierende Typ-II-Zellen von normalen Donorlungen (A, B) zeigten keine signifikante Anfärbung mit dem CML-Antikörper. Dagegen wiesen Typ-II-Zellen von IPF-Lungen (C, D) eine signifikante Akkumulation von CML-Protein-Addukten auf (siehe rote IHC-Anfärbung von proSP-C-positiven Typ-II-Zellen in D).

Dagegen zeigten Typ-II-Zellen von Patienten anderer Fibrose-Entitäten (NSIP [E, F], EAA [G, H] und Sklerodermie [I, J]) nur eine sehr geringe Immunreaktivität und Anfärbung duch CML-Antikörper, die nahezu oft undetektierbar erschien und sich eigentlich kaum von den Donor-Typ-II-Zellen unterschied. Sklerodermie-Patienten zeigten dabei im Vergleich zu NSIP- und EAA-Patienten eine stärkere Häufung von CML-modifizierten Proteinen in ihren Typ-II-Zellen.

Die Kolokalisation von CML-modifizierten Proteinen mit proSP-C-positiven Typ-II-Zellen ist durch Pfeile dargestellt.

3.8. Serum Amyloid P-component (SAP)

3.8.1. Allgemeines

Serum Amyloid P-component (SAP) ist ein 25kDa großes Protein und Mitglied der Pentraxin Familie, zu der auch C-reaktives Protein (CrP) gehört. Es wird in der Leber synthetisiert und zirkuliert als wesentlicher Bestandteil im Plasma als Pentamer¹⁴⁹. SAP hat großen Einfluss auf das angeborene Immunsystem: SAP verringert die Neutrophilenadhäsion, reguliert Makrophagen-Aktivität, erhöht die Phagozytose von Zelltrümmern, aktiviert das Komplementsystem¹⁴⁹ und inhibiert die Fibrozytendifferenzierung¹⁵⁰, sodass viele pathogene Auslöser, die zu Entzündung und Fibrosierung führen können, gedämpft werden; somit kann SAP als anti-fibrotisch agierendes Molekül angesehen werden¹⁵⁰.

3.8.2. SAP Gehalt in humanen Lavagen von verschiedenen Lungenfibrose-Entitäten und von gesunden Spendern mittels Western Blot Methodik

In Abbildung 3.18. sind die densitometrischen Ergebnisse graphisch dargestellt sowie ein repräsentativer Immunoblot mit der dazugehörigen Tintenfärbung.

Den höchsten Gehalt an SAP wiesen gesunde Spender und Patienten mit exogen-allergischer Alveolitis auf, gefolgt von IPF-Patienten. Den niedrigsten Gehalt an SAP zeigten DIP-Patienten.

Wurden alle Gruppen untereinander mit dem Kruskal Wallis Test verglichen, ergab sich ein signifikantes Ergebnis (p=0,0306).

Mittels Mann-Whitney Test ließen sich leider keine signifikanten

¹⁴⁹ Cox et al. 2014

¹⁵⁰ Pilling et al. 2003

Ergebnisse beim Vergleich gesunder Spender versus IPF- oder NSIP-Patienten darstellen. Es zeigte sich allerdings ein signifikantes Ergebnis beim Vergleich von DIP-Patienten mit gesunden Spendern (p=0,0169) bzw. mit IPF-Patienten (p=0,0138).



Abbildung 3.18. SAP-Gehalt in humanen Lavagen von Patienten mit verschiedene Lungenfibrose-Entitäten und von gesunden Spendern (HV)

Es sind die densitometrisch ermittelten Ergebnisse graphisch dargestellt sowie ein exemplarischer Immunoblot mit der dazugehörigen Tintenfärbung.

Im Vergleich aller Gruppen untereinander ermittelte der Kruskal-Wallis- Test ein signifikantes Ergebnis (p=0,0306).

Die Ergebnisse eines Mann-Whitney-Tests sind mittels schwarzer Klammer dargestellt.

4. Diskussion

Die Grundlage für diese Arbeit ist die komparative Proteomanalyse von Korfei et al.¹⁴⁰, in der gezeigt werden konnte, dass zwar die IPF und die fNSIP auf Proteomebene nahezu gleichartig sind, was auf eine ähnliche Pathogenese und Erkrankungsverlauf schließen lässt, es aber dennoch Unterschiede, vor allem im Bereich der allgemeinen Stress-Abwehr, gibt. So konnte gezeigt werden, dass bestimmte Antioxidantien wie PRDX1 und PRDX6 in der NSIP versus IPF herauf reguliert waren.

In immunhistochemischen Färbungen konnte eine PRXD1 Expression in hyperplastischen AECII in verdickten Alveolarsepten außerhalb der fibrotischen Zone von fNSIP-Patienten demonstriert werden, wohingegen sich ein solches Verhalten bei gesunden Spendern als auch bei IPF-Patienten nicht nachweisen ließ. Dies wurde so ausgelegt, dass die vermehrte Expression von PRDX1 ein Versuch der Beeinflussung des Mikromilieus hin zu einer gesteigerten Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen sein könnte. In der damaligen Arbeit zeigten sich Unterschiede im PRDX6-Gehalt in BALF-Proben abhängig von der Entität: die gesunden Probanden wiesen die höchsten Level und die IPF-Patienten die niedrigsten Level an PRDX6 auf, wobei bei NSIP-Patienten der PRDX6-Gehalt im Vergleich zu den gesunden Spendern zwar reduziert war, aber immer noch höher als der von IPF-Patienten. Daraus ist folgende Hypothese postuliert worden: die erhöhte antioxidative Kapazität korreliert positiv mit einem verlängertem Überleben sowie einer besseren Prognose, wohingegen ein Verlust der antioxidativen Kapazität mit einem Fortschreiten der Erkrankung zusammenhängt (siehe Abbildung 4.1.).



Überleben der ACEII

Apoptose der ACEII

Abbildung 4.1 Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und antioxidativen Defensivmechanismen in fNSIP und IPF

Da sich bereits bei der Untersuchung des PRDX6-Gehaltes in der BALF von IPF, fNSIP und gesunden Spendern ein Unterschied zwischen diesen Gruppen abzeichnete, die Probenzahl aber eventuell zu gering war, um ein signifikantes Ergebnis zu erzielen, wurde beschlossen, den Gehalt verschiedener Antioxidantien und Proteasom-Untereinheiten, die bei der Degradierung von oxidativ modifizierten Proteinen involviert sind, in Lavage- und SerumProben von Patienten mit verschiedenen ILD-Entitäten (IPF, fNSIP, CVD, EAA, RA, Sarkoidose) im Vergleich zu gesunden Spendern zu untersuchen und zu eruieren, ob der Gehalt dieser Antioxidantien/Proteosom-Untereinheiten sich zur Differenzierung der verschiedenen Entitäten (mit dem Schwerpunkt auf der Differenzierung zwischen IPF und NSIP) eignet, was den Grundstein für einen möglichen Biomarker legen könnte.

Von den zunächst ausgewählten Antioxidantien/Proteasom-Untereinheiten erwiesen sich leider nicht alle als praktikabel, da sie entweder mit den verwendeten Antikörpern gar nicht/unzureichend oder mit einem falschen Bandenmuster detektiert wurden, sodass in BALF-Proben schließlich PRDX2, -6, Glutathion Peroxidase 1, Katalase und SAP charakterisiert worden sind. In den Serum-Proben ließen sich nur PRDX6 und PRDX2 in großen Proben reproduzierbar darstellen. Die detaillierte Untersuchung von GPX1, Katalase und SAP wurde nach unzureichenden Voruntersuchungen unterlassen.

Dennoch ließen sich zumindest noch PRDX1 und SOD3 mittels IHC darstellen. Des Weiteren ist noch die oxidative Proteinmodifikation N-(Carboxymethyl)-Lysin (=CML), als Marker für oxidativen Stress in immunhistochemischen Färbungen dargestellt worden. Ein Nachweis mittels Western Blot gelang trotz mehrerer Versuche leider nicht. Auch ein ELISA mit 8-Isoprostan als Marker für oxidativen Stress ist in BALF- und Serum-Proben ausgetestet worden, allerdings war dieser ungemein störanfällig, sodass auf die Darstellung dieser Ergebnisse verzichtet worden ist.

Auf Grundlage der postulierten Arbeitshypothese, dass eine durch oxidativen Stress ausgelöste Schädigung und eine Abnahme der antioxidativen Kapazität Schlüsselelemente in der Pathogenese der fNSIP und IPF sind und die Prognose beeinflussen können¹⁴⁰, und den bereits vorausgegangenen Beobachtungen, liegt die Erwartung nahe, dass gesunde Spender die höchsten Antioxidans-Spiegel (Ausnahme sind natürlich induzierbare Antioxidantien) und IPF-Patienten die niedrigsten aufweisen sollten. fNSIP-Patienten sollten laut der Arbeitshypothese zumindest höhere Level an Antioxidans im Vergleich zu IPF-Patienten aufweisen. Exakt dies konnte in der Untersuchung der Lavageproben gesunder Spender im Vergleich zu Patienten verschiedener ILD-Entitäten für PRDX6 und PRDX2, als auch in eingeschränktem Umfang für GPx1, beobachtet werden. In der Untersuchung der Serumproben ließ sich dieses Phänomen leider nicht nachvollziehen.

Bei der Diskussion dieser Ergebnisse ist zu beachten, dass aufgrund der angewandten Methodik zwar signifikante Unterschiede bezüglich der Expression der untersuchten Proteine dargelegt werden können, diese aber keine Aussage bezüglich eines kausalen Zusammenhanges erlauben. Für die Ursache der Veränderungen können auf Basis der publizierten Daten lediglich Hypothesen und Vermutungen aufgestellt werden.

Im folgenden sollen die einzelnen, untersuchten Proteine getrennt voneinander diskutiert werden.

4.1. Peroxiredoxin 6

Dass PRDX6 ein wichtiges Antioxidans ist, haben bereits mehrere tierexperimentelle Studien und Versuche mit Zelllinien belegt. Experimente in einer humanen Zelllinie zeigten, dass PRDX6 Zellen gegen oxidativ induzierte Membranschäden schützen kann, da die PRDX6 überexprimierenden Zellen H_2O_2 schneller metabolisieren konnten, als auch eine geringere TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) -Konzentration bei Exposition gegenüber OH⁻-induzierenden Systemen zeigten¹⁵¹. Zudem konnte beobachtet werden, dass es bei einer Antisense-Mutation im *PRDX6*-Gen mit erniedrigter Expression des Antioxidans zu spontaner Lipidperoxidation, Membranschäden und Apoptose kommt¹⁵². Auch im Mausmodell konnte die signifikante Bedeutung von PRDX6 nachgewiesen werden: *Prdx6*(-/-)-Mäuse entwickeln sich zwar normal, weisen aber eine erhöhte Anfälligkeit

¹⁵¹ Manevich et al. 2002

¹⁵² Pak et al. 2002

gegenüber oxidativen Stress auf, denn sie zeigten bereits bei gleichen Verhältnissen ohne Hyperoxie geringere Überlebensraten, schwerere Gewebeschädigungen und erhöhte Konzentrationen oxidierter Proteine im Vergleich zum Wildtyp¹⁵³. Bei einer Überexpression von Prdx6, vermittelt durch ein adenovirales Plasmid, zeigte sich ein protektiver Effekt bei einer Exposition gegenüber 100 % Sauerstoff mit einem längeren Überleben und niedrigeren Konzentrationen an TBARS und Proteincarbonylen gegenüber dem Wildtyp¹⁵⁴. Dagegen weisen Prdx6 Knockout-Mäuse bei Hyperoxie eine verringerte Überlebenszeit mit schwereren Gewebeschädigungen (vermehrtes alveoläres Ödem, Zellnekrosen etc.) auf¹⁵⁵. Diese Prdx6 (-/-)-Mäuse zeigten auch eine erhöhte Sensibilität gegenüber Paraquat¹⁵⁶. Der positive Effekt einer Prdx6 Überexpression ist hingegen auch noch einmal in transgenen Mäusen nachgewiesen worden¹⁵⁷.

In einer Studie von Wang et al.¹⁵⁸ ist der direkte Vergleich von Wildtyp-Mäusen gegenüber Prdx6(-/-)-Mäusen, sowie transgenen, Prdx6 überexprimierenden Mäusen unter gleichen Verhältnissen erfolgt. Hierbei zeigten die Prdx6(-/-)-Mäuse das schlechteste Überleben mit signifikant erhöhter Lipidperoxidation im Vergleich

¹⁵³ Wang et al. 2003

¹⁵⁴ Wang et al. 2004b

¹⁵⁵ Wang et al. 2004a

¹⁵⁶ Wang et al. 2006a

¹⁵⁷ Wang et al. 2006b

¹⁵⁸ Wang et al. 2008

zu Wildtyp-Mäusen und Tg-Prdx6-Mäusen, wobei letztere die geringsten oxidativ ausgelösten Schäden in AECII zeigten und das längste Überleben aufwiesen. Hierbei konnte außerdem beobachtet werden, dass Prdx6 eher eine untergeordnete Rolle im H2O2-Metabolismus der AECII spielt und somit dieser Mechanismus eher unwahrscheinlich für die Bedeutung von Prdx6 als Antioxidans ist. Vielmehr scheint die Fähigkeit von Prdx6, Zellmembranschäden, ausgelöst durch Lipidperoxide, welche zu einer erhöhten Zellpermeabilität und einer konsekutiven Apoptose führen, zu reparieren, entscheidend zu sein¹⁵⁸. Denn außer Prdx6 weist lediglich GPx4 (Glutathion Peroxidase 4) die Fähigkeit zur Reduzierung von Lipidperoxiden (-PLOOH) auf¹⁵⁹. Dies scheint aber eher weniger bedeutend zu sein, da die Peroxidase-Aktivität mit PLOOH als Substrat insgesamt in Prdx6 Knockout-Mäusen um bis zu 96 % reduziert war¹⁵⁵, sodass Prdx6/PRDX6 eine bedeutende Rolle in der Verteidigung der Zelle gegenüber oxidativen Stress zu haben scheint.

4.1.1. Lavage-Ergebnisse

In der durchgeführten Untersuchung der Lavageproben von gesunden Spendern und Patienten mit verschiedenen ILD-Erkrankungen auf den Gehalt von PRDX6 zeigte sich, dass

¹⁵⁹ Maiorino et al. 1995

gesunde Spender mit die höchste Konzentration an diesem Antioxidans aufwiesen, im Gegensatz zu IPF-Patienten, die die niedrigsten Level aufwiesen, was sich besonders deutlich in der ELISA-Untersuchung (Abbildung 3.1. Graphik B) darstellte, sodass diese Ergebnisse die Arbeitshypothese stützen. Dieser Unterschied zwischen gesunden Spendern und IPF-Patienten ließ sich als hoch signifikant (p<0,0001) mittels Mann-Whitney-Test darstellen. Die fNSIP-Patienten wiesen, wie aufgrund der Arbeitshypothese erwartet, höhere Level an PRDX6 im Vergleich zu IPF-Patienten auf. Der Unterschied erwies sich allerdings als nicht signifikant im Mann-Whitney Test.

Aber auch bei den anderen ILD-Entitäten verhielt sich der PRDX6-Gehalt in Übereinstimmung mit unserer Hypothese, dass eine hohe Kapazität antioxidative mit einer besseren Überlebenswahrscheinlichkeit einher geht: CVD-Patienten wiesen ähnlich hohe PRDX6-Konzentrationen auf wie fNSIP-Patienten. Dieses Kollektiv weist allgemein eine bessere Prognose als eine IPF⁷⁹ auf, was eventuell damit zusammenhängen könnte, dass das NSIP-Muster das vorherrschende histopathologische Muster bei CVD-Patienten ist, wenn auch gelegentlich das prognostisch schlechtere UIP Muster vorkommen kann⁸⁵. Aufgrund des ähnlichen histopathologischen Musters ist es auch nicht ungewöhnlich, dass NSIP- und CVD-Patienten ähnliche

Antioxidans-Konzentrationen aufwiesen.

Das prognostisch eher ungünstige UIP-Muster ist das vorherrschende histologische Muster bei RA-Patienten mit Lungenfibrose⁸⁵, welche in dieser Arbeit ebenfalls signifikant erniedrigte PRDX6-Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Spendern aufwiesen. Der Gehalt an PRDX6 war dem der IPF-Patienten ähnlich, aber dennoch etwas höher, wahrscheinlich da auch hier die UIP zwar das vorherrschende, aber nicht das alleinige Muster ist⁸⁵. Dennoch sollte beachtet werden, dass eine RA-ILD eine ähnlich schlechte Prognose aufweisen kann wie eine IPF⁹⁶.

EAA-Patienten wiesen hingegen nur mäßig erniedrigte Level an PRDX6 im Vergleich zu gesunden Spendern auf. Da an sich das Patientenkollektiv der EAA insgesamt eher heterogen war und auch nur bei einem Patienten eine Histologie gewonnen worden ist, lässt sich für diese Gruppe der untersuchten EAA-Patienten keine eindeutige, zu erwartende Prognosetendenz abschätzen und somit auch nur unzureichend mit dem PRDX6-Gehalt vergleichen, da das Vorliegen einer Fibrose sowie das histologische Muster die Überlebenswahrscheinlichkeit beeinflussen⁷⁴, wobei bei Patienten mit der chronischen Verlaufsform am häufigsten ein UIP-Muster gefunden werden kann⁷⁴. Diese Überlegung gilt auch für alle anderen untersuchten Antioxidantien. Trotzdem schienen EAA-Patienten zumindest im durchgeführten Rahmen der

151

Untersuchungen keine stark eingeschränkte antioxidative Kapazität aufzuweisen, welche mit einer besseren Prognose gegenüber der IPF assoziiert sein könnte.

Bei Sarkoidose-Patienten müssen ähnliche Überlegungen angestellt werden, da auch hier ein heterogenes Patientenkollektiv vorlag, woraus sich erneut Schwierigkeiten bei einer Abschätzung der zu erwartenden Prognose im Vergleich zu IPF-Patienten ergaben. Dennoch sollte beachtet werden, dass in der Literatur die häufigste Todesursache von Sarkoidose-Patienten das respiratorische Versagen ist¹⁶⁰, wobei gezeigt werden konnte, dass bei verstorbenen Sarkoidose Patienten in etwa 1-9 % der Fälle die Lungenfibrose eine dem Tod beitragende Ursache war161. In der hier durchgeführten Untersuchung zeigten die Sarkoidose-Patienten im direkten Vergleich mit gesunden Spendern einen erniedrigten Gehalt an PRDX6 (sehr signifikantes Ergebnis im Mann-Whitney-Test, sowohl mittels Western Blot als auch ELISA). Hieraus würde sich die Überlegung, laut der Arbeitshypothese, ergeben, dass Sarkoidose-Patienten nur eine unwesentlich bessere Prognose aufweisen würden als IPF-Patienten. Wie aber bereits zuvor erwähnt, lässt sich dies in der untersuchten, heterogenen Gruppe schlecht abschätzen, zumal in Erwägung zu ziehen ist, dass EAA und Sarkoidose sich ätiologisch deutlich von einer IPF

¹⁶⁰ Kouranos et al. 2015

¹⁶¹ Swigris et al. 2011

unterscheiden (detaillierte Ausführungen bezüglich Ätiologie und Therapie sind bitte den Abschnitten 1.1.1.1. sowie 1.1.2.1. und 1.1.2.4. zu entnehmen).

DIP-Patienten wiesen bei einem kleinen Patientenkollektiv ein breites Spektrum des PRDX6-Gehaltes auf. Dies hängt eventuell damit zusammen, dass der Faktor Rauchen, welcher der entscheidende Faktor in der Pathogenese der DIP ist⁵⁷, in das antioxidative Defensivsystem eingreift¹⁶² und dies interindividuell unterschiedliche Ausmaße annehmen kann. Zudem schienen, bis auf eine Person, alle eingeschlossenen Patienten zum Zeitpunkt der Diagnostik noch aktive Raucher gewesen zu sein.

Gerade die Ergebnisse der gesunden Spender im Vergleich zu den IPF-Patienten als auch der Vergleich von fNSIP-Patienten zu IPF-Patienten unterstützten unsere Hypothese, dass ein höheres Maß an Antioxidantien auch mit einer besseren Prognose assoziiert sein könnte. Auch die erhobenen Ergebnisse bei CVD- und RA-Patienten gaben weitere Hinweise in diese Richtung. Lediglich die Ergebnisse bei den EAA- und Sarkoidose-Patienten waren aufgrund der Heterogenität der Kollektive und des grundsätzlich anderen Pathomechanismus schwerer zu bewerten. Ebenfalls nicht eindeutig zuzuordnen, waren die Ergebnisse bei DIP-Patienten aufgrund ihrer geringen Anzahl.

¹⁶² Sundar et al. 2010

Eine Korrelation des PRDX6-Gehaltes in Lavagen von gesunden Spendern und Patienten verschiedener ILD-Entitäten mit dem klinischen Parameter DL_{CO} ist vorgenommen worden, wobei sich hier keinerlei Signifikanz darstellen ließ (nicht gezeigt). Allerdings waren die zugänglichen DL_{CO} -Werte reine Momentaufnahmen ohne einen Verlauf, welcher sich als wichtiger Prognosefaktor erwiesen hat², sodass auf eine Darstellung sowie eine weitere Untersuchung der Korrelation der klinischen Parameter mit dem Antioxidantien-Gehalt verzichtet worden ist.

4.1.2. Serum-Ergebnisse

In Voruntersuchungen mittels Western Blot ergaben sich viel versprechende Ergebnisse, sodass auch die Serum-Proben mittels ELISA untersucht worden sind. Die in dieser Untersuchung beobachteten Unterschiede waren allerdings nicht so stark ausgeprägt wie in der Lavageuntersuchung von PRDX6. Es zeigte sich zwar auch hier ein signifikantes Ergebnis beim Vergleich aller Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Test, dennoch ergaben sich nicht so eindeutig signifikante Unterschiede beim Vergleich zweier Gruppen mittels Mann-Whitney-Test, wie dies bei der Lavageuntersuchung der Fall war. Bei dem Vergleich von gesunden Spendern und IPF-Patienten, sowie beim Vergleich von IPF-Patienten zu NSIP-Patienten zeigten sich signifikante Ergebnisse (p<0,05). Hierbei war allerdings interessant, dass zwar die gesunden Spender wieder mit die höchsten Antioxidans-Konzentrationen im Serum aufwiesen, aber die NSIP-Patienten mit die geringsten (entgegengesetzt zu unserer Hypothese, wofür sich leider keine Erklärung eruieren ließ). Dabei sollte allerdings beachtet werden, dass die Serum-Proben mutmaßlich alle Kompartimente des Organismus abbilden, wodurch das Ergebnis durch eine Vielzahl von unbekannten Variabeln beeinflusst werden kann. Im Gegensatz dazu dürften die Lavageuntersuchungen, lediglich das bronchoalveoläe Kompartiment widerspiegeln¹⁶³. Dennoch konnte auch bei der Serumanalyse eine reduzierte antioxidative Kapazität der IPF-Patienten gegenüber gesunden Spendern gezeigt werden, welches die Hypothese der oxidativen/antioxidativen Imbalance bei IPF-Patienten (mit einer Verminderung der antioxidativen Kapazität aufgrund einer erhöhten oxidativen Belastung¹¹⁹) bestärkt.

Für die anderen ILD-Entitäten zeigte sich mittels Mann-Whitney noch ein signifikanter (p<0,05) Unterschied zwischen gesunden Spendern und RA-ILD-Patienten, sowie zwischen gesunden Spendern und Sarkoidose-Patienten. Als mögliche Erklärung für die erniedrigten Antioxidans-Spiegel der RA-ILD-Patienten wird wieder auf das UIP-Muster als häufigstes histologisches Muster mit

¹⁶³ Walters und Gardiner 1991

seiner schlechteren Prognose verwiesen. Die niedrige PRDX6-Sarkoidose-Patienten könnte durch das Konzentration der vorliegende heterogene Patientenkollektiv erklärt werden. Dennoch stimmten die geringeren PRDX6-Konzentrationen im Serum der Sarkoidose-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern mit den zuvor beobachteten geringeren PRDX6-Konzentrationen in der Lavage überein. Des Weiteren sollte beachtet werden, dass auch bei Sarkoidose-Patienten ein erhöhter Level an oxidativen Stress zu bestehen scheint, da diese u.a. vermehrt carbonylierte Proteine aufwiesen, ähnlich der IPF, im Vergleich zu gesunden Proben¹⁶⁴. Bei den EAA-Patienten zeigte sich, in Analogie zu den Lavageergebnissen, nur ein gering erniedrigter Gehalt an PRDX6 im Vergleich zu den gesunden Spendern. Der Serum-PRDX6-Gehalt war bei DIP-Patienten nur sehr eingeschränkt zu beurteilen, aufgrund der geringen Stichprobe.

4.1.3. Immunhistochemie-Ergebnisse

Das bisher publizierte Expressionprofil von PRDX6, dargestellt mittels IHC, in AECII, Alveolarmakrophagen und Bronchialepithel bei gesunden Probanden¹⁶⁵, sowie IPF- und fNSIP-Patienten¹⁴⁰ lässt sich in der hier ausführlicher angestellten IHC-Untersuchung ebenfalls beobachten. Zudem konnten in weiteren ILD-Entitäten

¹⁶⁴ Rottoli et al. 2005

¹⁶⁵ Kinnula 2002

ebenfalls ähnlich geartete Expressionsmuster beobachtet werden.

Dennoch war ein kleiner Unterschied zwischen den gesunden Spenderlungen und den Lungen der ILD-Entitäten beobachtet worden: die Alveolarmakrophagen waren nicht so oft und nicht so stark angefärbt worden. Eine kausale Ursache kann anhand der hier rein deskriptiven Analyse nicht ermittelt werden. Als mögliche Erklärung des Phänomens kann in Analogie eine Untersuchung von Ye et al.¹⁶⁶ herangezogen werden, in der eine reduzierte Expression von Hämoxygenase-1 in Alveolarmakrophagen von IPF-Patienten beobachtet werden konnte.

Interessant ist noch die geringere Färbereaktion von PRDX6 in AECII von Sklerodermie-ILD-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern. Dass oxidativer Stress in der Pathogenese dieser Erkrankung eine wichtige Rolle zu spielen scheint, konnte bereits mehrfach demonstriert werden^{121,167,168}. Hierbei kann allerdings nur spekuliert werden, warum ausgerechnet in AECII von Sklerodermie-Patienten als einzige der untersuchten Entitäten die PRDX6 Expression vermindert ist. Eine Untersuchung von Iwata und Mitarbeitern¹⁶⁹ hat allerdings Auto-Antikörper gegen PRDX1 bei Sklerodermie-Patienten identifizieren können, welche die enzymatische Aktivität von PRDX1 inhibieren könnten. Des

¹⁶⁶ Ye et al. 2008

¹⁶⁷ Gabrielli et al. 2008

¹⁶⁸ Gabrielli 2012

¹⁶⁹ Iwata et al. 2007

Weiteren korrelierten die gebildeten anti-PRDX1-Antikörper mit der Schwere der Erkrankung. Eventuell könnten auch inhibierenden Antikörper gegen PRDX6 gebildet werden, da PRDX1 und PRDX6 ähnliche quartäre Strukturen aufweisen können¹⁷⁰, sodass über die inhibierenden Antikörper der geringere Nachweis von PRDX6 erklärt werden könnte.

Die Untersuchung von PRDX6 in Sarkoidose-Patienten zeigte ähnliche Ergebnisse wie bereits von Kinnula et al.¹⁶⁵ dargestellt: die Granulome wurden sowohl mit PRDX1 als auch PRDX6 angefärbt. Zudem zeigte diese Analyse erstmals, dass auch PRDX2 in Granulomen exprimiert wird.

4.2. Peroxiredoxin 2

Peroxiredoxin 2 (PRDX2) gehört in der Familie der Peroxiredoxine zur Subgruppe der "klassischen" 2-Cys Peroxiredoxine, wie auch PRDX1, und findet sich abundant im Zytosol¹⁷¹. Mit PRDX1 zusammen macht es dabei etwa 0,1-0,8 % der löslichen Proteine aus¹⁷¹. In seiner Funktion, der Reduzierung von Peroxiden, hat PRDX2 eine ähnliche Effizienz wie Katalase und Glutathion-Peroxidase¹⁷², sowie eine höhere Affinität zu $H_2O_2^{171}$. Bei dem

¹⁷⁰ Poole et al. 2011

¹⁷¹ Rhee et al. 2005

¹⁷² Hall et al. 2010

Vergleich von kinetischen Analysen konnte sogar gezeigt werden, dass PRDX2 sogar prinzipiell fast 100% des zytoplasmatischen H₂O₂ umsetzen könnte¹⁷³. Dennoch scheint die Aufgabe von 2-Cys Peroxiredoxinen nicht nur im Bereich der Abwehr von oxidativen Stress zu liegen, sondern auch darin, H₂O₂, als wichtiges Signalmolekül z.B. in der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren, zu regulieren¹⁷⁴. Im Besonderen ist dies für PRDX2 und PDGF (platelet-derived growth factor) von Choi et al.¹⁴⁴ gezeigt worden. Des Weiteren scheinen Peroxiredoxine aber auch als H₂O₂-Sensor zu fungieren¹⁷⁵. Interessant ist auch die mögliche Chaperon-Funktion von Peroxiredoxinen, wie sie bereits in Hefe nachgewiesen ist¹⁷⁶. Inwiefern dies allerdings für höhere Organismen relevant ist, konnte bisher nicht abschließend eruiert werden^{177,178}.

4.2.1. Lavage-Ergebnisse

Der Arbeitshypothese entsprechend zeigten die gesunden Spender die höchste Konzentration an PRDX2, und IPF-Patienten wiesen, neben den CVD-ILD-Patienten, den niedrigsten Gehalt an PRDX2 auf. Es ließen sich beim Vergleich gesunder Spender zu IPF-

¹⁷³ Winterbourn 2008

¹⁷⁴ Kang et al. 2005

¹⁷⁵ Rhee et al. 2012

¹⁷⁶ Jang et al. 2004

¹⁷⁷ Perkins et al. 2015

¹⁷⁸ Sue Goo Rhee 2016

Patienten dabei sogar sehr signifikante Unterschiede mittels Mann-Whitney-Test ermitteln. Etwas ähnliches, nämlich einen geringeren Gehalt von PRDX2 bei IPF-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden, konnten bereits Vuorinen und Mitarbeiter¹⁴⁵ beobachten, allerdings ohne signifikante Unterschiede.

Der PRDX2-Gehalt in NSIP-Patienten war höher als der von IPF-Patienten, dennoch etwas niedriger als bei gesunden Spendern, in Einklang mit der Arbeitshypothese. Leider ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen NSIP-Patienten und gesunden Spendern sowie zwischen NSIP- und IPF-Patienten ermitteln.

In dieser Untersuchung zeigten RA-ILD-Patienten, wie zuvor auch in der Untersuchung von PRDX6, einen erniedrigten Gehalt an pRDX2. Im Vergleich zu den gesunden Spendern ergab sich dabei ein hoch signifikanter Unterschied. Hierbei wird erneut darauf verwiesen, dass der RA-ILD oft ein UIP-Muster zugrunde liegt⁸⁵. Auch die EAA- und Sarkoidose-Patienten wiesen ein ähnliches PRDX2-Konzentrationsmuster wie zuvor schon bei PRDX6 auf: die EAA-Patienten zeigten kaum erniedrigte Antioxidans-Spiegel im Vergleich zu gesunden Spendern, hingegen ließen sich bei Sarkoidose-Patienten deutlich erniedrigte Level an PRDX2 beobachten (der Unterschied zu gesunden Spendern stellte sich als sehr signifikant dar). Hierbei wird auf die Überlegungen zu den Patientenkollektiven, wie sie bereits bei PRDX6 gemacht worden sind (siehe Abschnitt 4.1.1.), verwiesen.

Warum ausgerechnet die CVD-ILD-Patienten einen erniedrigten Gehalt von PRDX2 aufwiesen, konnte nicht erklärt werden. Erwartet worden ist, dass die CVD-ILD-Patienten zumindest einen ähnlich hohen Gehalt wie fNSIP-Patienten aufweisen würden, da ja das vorherrschende Muster bei CVD-Patienten eine NSIP ist⁷⁹. Das wieder recht breit gefächterte Ergebnis der DIP-Patienten, bei einer kleinen Probenanzahl, lässt sich nur schlecht einordnen, da der Störfaktor Rauchen auch hier möglich ist.

4.2.2. Serum-Ergebnisse

Leider ließ sich im Serum der PRDX2-Gehalt nur eingeschränkt in recht kleinen Probenzahlen darstellen. Hier zeigte sich für einige Entitäten ein inverses Bild: die gesunden Spender wiesen mitunter den niedrigsten Gehalt an PRDX2 auf, wohingegen die CVD-ILD-Patienten, die in der Lavageuntersuchung mit die niedrigsten PRDX2-Konzentrationen aufwiesen, sich hier mit nahezu den höchsten Spiegen darstellten. Die IPF-Patienten wiesen sogar einen höheren Gehalt an PRDX2 auf im Vergleich zu den gesunden Spendern, welcher sich im Mann-Whitney-Test als signifikant präsentierte. Eine zufriedenstellende Erklärung ließ sich leider nicht ermitteln.

Die Kohorte der NSIP-, DIP-, und RA-Patienten ließ sich aufgrund

der geringen Probenanzahl (n=3) nur sehr eingeschränkt beurteilen, wobei hier eine ähnliche Tendenz wie zuvor in den Lavageuntersuchungen beobachtet werden kann. Die Sarkoidose-Patienten wiesen ebenfalls, wie zuvor in der Lavageuntersuchung, einen niedrigen Gehalt an PRDX2 auf. Allerdings gab es keine Unterschiede zu den gesunden Probanden, die ebenfalls durch recht niedrige PRDX2-Spiegel gekennzeichnet waren. Die EAA-Patienten wiesen ähnliche Spiegel an PRDX2 auf wie die gesunden Probanden.

4.2.3. Immunhistochemie-Ergebnisse

In unserer Untersuchung zeigte sich nur eine sehr schwache, bis kaum vorhandene PRDX2-Expression in Alveolarmakrophagen und im Alveolarepithel von Lungen gesunder Spender. Ähnliches konnten Kinnula und Mitarbeitern¹⁶⁵ beobachten, wobei sie die beobachtete Reaktion in Makrophagen und Epithelzellen als schwach positiv beschreiben. Dammeyer et al.¹⁷⁹ hingegen beobachteten allerdings eine starke Expression von PRDX2 in Makrophagen und Pneumonzyten von humanen Lungen, wobei in dieser Untersuchung die zugrunde gelegten Patientenkollektive nicht detailliert dargestellt wurden.

Die angestellte Untersuchung in verschiedenen Fibrose-Entitäten

¹⁷⁹ Dammeyer und Arnér 2011

zeigte eine starke Expression von PRDX2 in AECII, vor allem in IPF-Patienten, was auch Vuorinen und Mitarbeiter¹⁴⁵ insbesondere in hyperplastischen AECII beobachteten konnten. Aber auch in NSIP- und EAA-Patienten ließ sich eine PRDX2-Expression in AECII feststellen, wenn auch nicht ganz so intensiv wie in den IPF-Lungen. Das Bronchialepithel wurde hingegen in allen Fibrose-Entitäten gleichmäßig vom PRDX2-Antikörper angefärbt. Aber auch in Alveolarmakrophagen fand sich in der angestellten Untersuchung eine PRDX2-Expression.

Im Gegensatz zu Kinnula et al.¹⁶⁵ konnten wir eine PRDX2-Expression in den Granulomen von Sarkoidose-Patienten detektieren. Die PRDX2-Expression ist hier nahezu ausschließlich auf die Granulome beschränkt, wobei die dort beobachtete, homogene Expression das Granulom an sich betrifft. Auch zeigte sich eine ausgesprochen gute Kolokalisation von PRDX2 mit CD68-positiven Zellen. Da Kinnula und Mitarbeiter¹⁶⁵ vor allem Parenchymbiopsie von Sarkoidose-Patienten verwendet haben und auch die Detektionsmethoden vor gut 10 Jahren eventuell nicht sensitiv genug waren, lässt sich daraus möglicherweise der Unterschied zwischen den beiden Untersuchungen erklären.

4.3. Peroxiredoxin 1

PRDX1 gehört ebenfalls zur klassischen 2-Cys Peroxiredoxin Subgruppe¹⁷¹. Auch für dieses Peroxiredoxin ist neben seiner antioxidativen Funktion eine Chaperon-Funktion prinzipiell möglich¹⁷⁶. Des Weiteren konnte von Ha und Mitarbeitern¹⁸⁰ eine Beteiligung von humanem PRDX1 in der Regulation von TGF- β 1 induzierter EMT (epithelial-mesenchymaler Transformation) dargestellt werden, wobei eine PRDX1 Überexpression zu einer verstärkten TGF- β 1 induzierten EMT führte.

Prdx1 Knockout-Mäuse zeigten zudem eine verkürzte Überlebenszeit im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, wobei als Haupttodesursachen eine hämolytische Anämie und maligne Tumoren ermittelt worden sind¹⁸¹. Des Weiteren konnten erhöhte Basalraten von ROS sowie erhöhte ROS-Spiegel in Reaktion auf Wasserstoffperoxid in den Erythrozyten der anämischen Knockout-Mäuse beobachtet werden. Außerdem war die Anfälligkeit von Geweben gegenüber einer Entwicklung von Krebs erhöht, aufgrund einer erhöhten Sensitivität gegenüber Oxidantien und erhöhten Level an ROS, sowie oxidativen DNA-Schäden¹⁸¹.

Im Bleomycin-Maus-Modell der Lungenfibrose konnte gezeigt werden, dass *Prdx1* Knockout-Mäuse ebenfalls eine verkürzte Überlebensrate gegenüber Wildtyp-Mäusen aufwiesen sowie

¹⁸⁰ Ha et al. 2012

¹⁸¹ Neumann et al. 2003

erhöhte Spiegel von 8-Isoprostan¹⁸². Die erhöhte Anfälligkeit von *Prdx1* Knockout-Mäusen gegenüber der durch Bleomycin induzierten Entzündung und Fibrose der Lunge konnte durch die erhöhte Last an Oxidantien sowie erhöhter Aktivität von macrophage migration inhibitery factor (Mif) erklärt werden¹⁸². Leider war es auch nach mehrmaligen Versuchen und der

Benutzung zweier verschiedener Antikörper nicht möglich, den Gehalt von PRDX1 zuverlässig in BALF- und Serum-Proben zu detektieren. Eine immunhistochemische Detektion in Lungen von verschiedenen Fibrose-Entitäten und gesunden Spendern ist dennoch gelungen.

4.3.1. Immunhistochemie-Ergebnisse

Die von Kinnula et al.¹⁶⁵ beobachtete starke Expression von PRDX1 vor allem in Alveolarmakrophagen und im Bronchialepithel bei gesunden Probanden konnte in dieser Untersuchung ebenfalls reproduziert werden, und auch in den Fibrose-Entitäten. Die ebenfalls bereits bei den gesunden Probanden beobachtete schwache, bis fehlende Reaktion von PRDX1 im Alveolarepithel¹⁶⁵ zeigte sich ebenfalls in dieser Untersuchung. Diese Beobachtungen ließen sich auch bei den Fibrose-Entitäten anstellen, wobei es keinen merklichen

¹⁸² Kikuchi et al. 2011

Unterschied zwischen den Fibrose-Entitäten untereinander, als auch im Vergleich der Fibrose-Entitäten zu den gesunden Spendern, gab. Die Untersuchung in Sarkoidose-Patienten zeigte, analog der Untersuchung von Kinnula und Mitarbeitern¹⁶⁵, eine starke Anreicherung in den Granulomen mit einem homogenen Verteilungsmuster und einer mäßig guten Kolokalisation mit CD68-positiven Zellen.

4.4. Glutathion Peroxidase 1

Glutathion Peroxidase 1 (GPx1), auch zytosolische Glutathion-Peroxidase, ist eine von 6 Isoformen, die im Menschen nachgewiesen sind¹⁸³. Aufgrund ihrer Fähigkeit, Hydroperoxide unter Glutathion- (GSH) Umsatz in den korrespondierenden Alkohol umzuwandeln, gehören sie zu den antioxidativen Enzymen¹⁸³. Dabei scheint vor allem GPx1 in die Metabolisierung von H_2O_2 involviert zu sein¹⁴⁶.

Allerdings zeigten Studien mit Knockout-Mäusen, dass Gpx1 nicht essentiell für die Entwicklung von Mäusen unter physiologischen Bedingungen ist, da die Knockout-Mäuse weder Auffälligkeiten, noch eine verkürzte Überlebenszeit oder eine erhöhte Belastung durch oxidativen Stress (ähnliche Level von Proteincarbonylen und

¹⁸³ Brigelius-Flohé 2006

Lipidperoxiden von *Gpx1* Knockout-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp) aufwiesen¹⁸⁴. Auch zeigten diese Knockout-Mäuse keine erhöhte Sensitivität gegenüber Hyperoxie¹⁸⁴. Dennoch konnte bei *Gpx1* Knockout-Mäusen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Paraquat demonstriert werden¹⁸⁵.

Eine Studie von Liu und Mitarbeitern¹⁸⁶ hat das Verhalten von Gpx1- und Prdx6 Knockout-Mäusen unter oxidativen Stress verglichen und dabei festgestellt, dass Gpx1-Knockout-Mäuse kaum signifikante Unterschiede zum Wildtyp zeigten (somit ähnliche Ergebnisse, wie bereits von Ho et al.¹⁸⁴ demonstriert), wohingegen Prdx6-Knockout-Mäuse z. B. in der Überlebensrate einen signifikanten Unterschied zu den Gpx1-Knockout-Mäusen zeigten. Es zeigte sich auch ein signifikant erhöhter Gehalt von TBARS in Lungenhomogenaten der Prdx6-Knockout-Mäuse im Vergleich zu den Gpx1-Knockout-Mäusen. Dennoch konnte in dieser Studie demonstriert werden, dass die Aktivität mit dem Substrat H₂O₂ in *Gpx1*-Knockout-Mäusen um 90% erniedrigt war. Dies zeigt, dass Gpx1 für etwa 90% der GSH-abhängigen Reduktion von H₂O₂ zuständig ist, dies aber anscheinend nicht entscheidend ist bei erhöhtem oxidativen Stress

¹⁸⁴ Ho et al. 1997

¹⁸⁵ Haan et al. 1998

¹⁸⁶ Liu et al. 2010

4.4.1. Lavage-Ergebnisse

In der Untersuchung der Lavage-Proben von gesunden Spendern und verschiedenen Fibrose-Entitäten zeigte sich im Kruskal-Wallis-Test ein signifikantes Ergebnis beim Vergleich aller Gruppen untereinander.

Gemäß unserer Hypothese zeigten auch bei diesem Antioxidans die gesunden Spender den höchsten Gehalt an GPx1. Allerdings waren die zuvor bei PRDX6 oder PRDX2 beobachteten Unterschiede zwischen den Entitäten nicht mehr so deutlich. Es zeigte sich aber dennoch, dass IPF- und RA-Patienten wieder ähnlich niedrige GPx1-Konzentrationen aufwiesen. Reduzierte GPx1-Spiegel waren bereits ebenfalls im Bleomycin-Fibrose-Modell in der Maus nachgewiesen worden¹⁸⁷. Im Vergleich von gesunden Spendern mit IPF- und RA-Patienten zeigte sich bei IPF-Patienten ein nahezu signifikantes Ergebnis (p=0,06) und bei den RA-Patienten sogar ein hoch-signifikantes Ergebnis (p=0,0085) (siehe Abbildung 3.10.). Dieses ähnliche Verhalten könnte sich wieder aufgrund des oft gemeinsamen UIP-Musters ergeben haben.

NSIP- und CVD-ILD-Patienten zeigten in dieser Untersuchung wieder ähnliche Antioxidans-Konzentrationen, jedoch ergab sich dabei bei diesen Entitäten im Vergleich mit gesunden Probanden kein signifikanter Unterschied.

¹⁸⁷ Santos-Silva et al. 2012

EAA-Patienten wiesen, wie zuvor schon bei PRDX6 und PRDX2, kaum erniedrigte Antioxidans-Konzentrationen auf. Unter der Berücksichtigung der Ergebnisse von Liu et. al¹⁸⁶ ist dies zu erwarten gewesen.

Die Sarkoidose-Patienten zeigten ebenfalls erneut erniedrigte Level an Antioxidans im Vergleich zu den gesunden Spendern. Generell erniedrigte anti-oxidative Schutzmechanismen konnten bereits für Sarkoidose-Patienten demonstriert werden¹⁸⁸. Lenz et al¹⁸⁹ konnten zudem eine erniedrigte mRNA-Expression von GPx1 bei Sarkoidose-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern darstellen.

Dass DIP-Patienten mit den niedrigsten Gehalt von GPx1 aufwiesen, ist insofern interessant, da bei Patienten mit COPD, deren Pathogenese fest mit dem Rauchen verknüpft ist¹⁴⁷, sich allerdings eine hochregulierte Expression von GPx zeigt¹⁹⁰. Ob diese beiden Erkrankungen vergleichbar sind, ist allerdings fraglich.

Zusammenfassend zeigten sich zwar kleine Unterschiede zwischen den verschiedenen Entitäten im Vergleich zu den gesunden Probanden, allerdings sind diese Unterschiede nicht so bedeutend im Vergleich zu den Peroxiredoxinen.

¹⁸⁸ Jasmina Ivanišević et al.

¹⁸⁹ Lenz 2004

¹⁹⁰ Bentley et al. 2008

4.4.3. Immunhistochemie-Ergebnisse

Expression Die bereits bekannte von GPx1 in Alveolarmakrophagen¹⁹¹ ist in dieser Untersuchung sowohl in den gesunden Spendern als auch in allen Fibrose-Entitäten reproduziert worden. Dabei zeigten sich nur marginale Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Hingegen zeigte sich eine gute Kolokalisation von GPx1 mit proSP-C-positiven Zellen in allen Fibrose-Entitäten, nicht jedoch bei den gesunden Spender-Lungen. Zwischen den verschiedenen Fibrose-Entitäten zeigte sich allerdings kein Unterschied in der GPx1-Expression.

Aus dieser Beobachtung ließ sich zumindest ableiten, dass GPx1 in AECII von Fibrose-Entitäten exprimiert wird, was bei gesunden Probanden wohl nicht der Fall zu sein scheint. Somit scheint GPx1 zumindest in irgendeiner Form an einer Lungenfibrose bzw. dem Schutz davor beteiligt zu sein, da es vermutlich als Defensivmechanismus aufgrund von oxidativen Stress in den AECII von ILD-Patienten induziert wird. Ein weiterer Hinweis für diese Beteiligung zeigte eine Studie, bei der in einem Mausmodell der Serum GPx-Gehalt invers mit dem Auftreten einer Lungenfibrose nach Bestrahlung korreliert¹⁹². Die genauen Mechanismen der GPx-Beteiligung an der Fibroseentstehung/entwicklung sind allerdings unbekannt.

¹⁹¹ Avissar N, Finkelstein JN, Horowitz S, Willey JC, Coy E

¹⁹² Kunwar und Haston 2014

4.5. Katalase

Katalase findet sich in nahezu allen Zellen von Säugetieren¹⁹³, vor allem in Peroxisomen¹¹² und katalysiert die Reaktion von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser¹⁹³. In der Lunge findet es sich vor allem in alveolären Typ II-Zellen und Makrophagen¹⁹⁴.

Die Bedeutung seiner antioxidativen Funktion ist noch nicht vollständig dargelegt. Zwar erwies sich eine Überexpression von Katalase als protektiv gegenüber durch oxidativen Stress ausgelösten Gewebeschäden¹⁹⁵, dennoch zeigten Katalase Knockout-Mäuse keine Auffälligkeiten in der Entwicklung oder erwiesen sich als anfälliger für eine Hyperoxie-induzierte Lungenschädigung im Vergleich zum Wildtyp¹⁹⁶. Dennoch konnte demonstriert werden, dass AECII aus Rattenlungen, die in ihren Mitochondrien Katalase überexprimieren, eine signifikant erhöhte Überlebensrate aufwiesen, verglichen mit dem Wildtyp¹⁹⁷. Auch konnte demonstriert werden, dass Katalase, durch das Senken des steady-state Levels von H₂O₂, welches von TGF- β 1 stimulierten IPF-Myofibroblasten produziert wurde, Alveolarepithelien schützen kann³³.

¹⁹³ Deisseroth A 1970

¹⁹⁴ Kinnula, V. L., J. D. Crapo, and K. O. Raivio 1995

¹⁹⁵ Ye-Shih Ho, Jean-Luc Magnenat, Mary Gargano 1998

¹⁹⁶ Ho et al. 2004

¹⁹⁷ Arita 2006

4.5.1. Lavage-Ergebnisse

Katalase ist von den untersuchten Antioxidantien das einzige, bei dem der Gehalt in den Lavagen von gesunden Spendern nicht mit zu den höchsten, sondern eher zu den niedrigeren gehört. Den höchsten Gehalt zeigten IPF-Patienten, wie auch NSIP- und CVD-ILD-Patienten.

Eine bereits veröffentlichte Studie¹⁹⁸ hat den Katalase-Gehalt in Lungenhomogenaten von Fibrose-Entitäten und gesunden Spendern untersucht und dabei einen erniedrigten Spiegel an Katalase bei der Fibrosegruppe im Vergleich zu den Gesunden festgestellt – im Gegensatz zu der hier vorgestellten Untersuchung, bei dem die Fibrose-Entitäten eher einen erhöhten Katalase-Gehalt aufwiesen. In der angesprochenen Studie war allerdings nicht zwischen den eingeschlossenen Fibrose-Gruppen (UIP, NSIP und CVD) unterschieden worden, im Gegensatz zu der hier dargelegten Untersuchung. Auch waren Lungenhomogenate und keine Lavageproben untersucht worden, woraus sich der dargestellte Unterschied ergeben könnte. Allerdings kann auch eine Induktion von Katalase in den Alveolarepithelien als Reaktion auf oxidativen Stress unter fibrotischen Bedingungen nicht ausgeschlossen werden, wodurch die erhöhten Antidoxidans-Spiegel in der vorgelegten Untersuchung erklärt werden könnten.

¹⁹⁸ Odajima et al. 2010

Wiederum wiesen auch in dieser Untersuchung RA-ILD-Patienten eine ähnliche Konzentration an Katalase auf wie die IPF-Patienten. Dabei wird auch hier wieder das zugrundeliegende UIP-Muster für die Ähnlichkeit der beiden Entitäten herangezogen.

Die EAA-Patienten wiesen einen nur marginal erniedrigten Gehalt an Katalase im Vergleich zu den gesunden Spendern auf.

Sarkoidose-Patienten wiesen bei Katalase einen ähnlichen Gehalt wie gesunde Spender auf. Eine mögliche Erklärung für diesen höheren Gehalt an Katalase lässt sich eventuell dadurch erklären, dass auch die Katalase-Produktion durch *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (mKatG) mitbestimmt wurde. Etwa 50% der Sarkoidose-Patienten weisen Antikörper gegen diese *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (mKatG) auf¹⁹⁹. Inzwischen geht man davon aus, dass mKatG ein pathogenes Antigen in der Ätiologie der Sarkoidose ist²⁰⁰. Möglicherweise resultierten daraus die im Vergleich mit den anderen Antioxidantien "erhöhten" Katalase-Konzentrationen.

DIP-Patienten wiesen die niedrigsten Werte an Katalase auf, wofür aber keine Erklärung eruriert werden konnte.

4.5.3. Immunhistochemie-Ergebnisse

Die Expression von Katalase in AECII und Alveolarmakrophagen

¹⁹⁹ Song et al. 2005

²⁰⁰ Morgenthau und Iannuzzi 2011
ist schon länger bekannt¹⁹⁴. Eine neuere Untersuchung demonstriert die Expression von Katalase in gesunden Spendern und einigen Fibrose-Entitäten²⁰¹. Die dort demonstrierten Ergebnisse konnten in der angestellten Untersuchung nur teilweise nachvollzogen werden. In der dargelegten Untersuchung zeigte sich bei den gesunden Spendern keine Expression von Katalase in AECII, wohingegen Lakari et al.²⁰¹ eine solche Expression demonstrieren konnten. Die schwache Reaktion in Alveolarmakrophagen bei gesunden Spendern konnte in der hier durchgeführten Untersuchung ebenfalls nicht beobachtet werden. Bei der Expression von Katalase in Bronchialepithel stimmen die Ergebnisse der beiden Untersuchungen aber überein. Diese Expression von Katalase im Bronchialepithel konnten Lakari und Mitarbeiter²⁰¹ auch bei UIP-, EAA-Patienten beobachten, was Sarkoidoseund in der angestellten Untersuchung auch für fNSIP-Patienten ebenfalls demonstriert werden konnte. Ebenfalls übereinstimmend ist die gute Expression von Katalase in AECII-Zellen von UIP-, Sarkoidose- und EAA-Lungen. In der dargestellten Untersuchung ist dies auch noch für fNSIP-Patienten dargestellt. Auch in der moderaten Expression von Katalase in Alveolarmakrophagen stimmen beide Untersuchungen überein. Diese moderate Expression in Alveolarmakrophagen konnte in der vorgelegten

²⁰¹ Lakari et al. 2000

Untersuchung auch für NSIP-Patienten gezeigt werden.

Zusammenfassend deuten die IHC-Untersuchungen an, dass die Katalase vermutlich durch oxidativen Stress unter fibrotischen Bedingungen erhöht wird.

4.6. Superoxiddismutase 3

Die Verteilung von Superoxiddismustase 3 (SOD3), auch extrazelluläre Superoxiddismustase, ist gewebespezifisch und findet sich vor allem in der Lunge²⁰² im extrazellulären Raum²⁰³. Durch die Katalyse der Reaktion von Superoxidanionen in Wasserstoffperoxid spielt SOD3 eine wichtige Rolle in der antioxidativen Verteidigung der Lunge¹³². Dies zeigt sich auch in *Sod3*-Knockout-Mäusen, die sich zwar normal entwickeln, aber bei Hyperoxie eine signifikant kürzere Überlebensrate mit einem früheren Auftreten eines schweren Lungenödems im Vergleich zum Wildtyp aufweisen²⁰⁴.

Die wichtige antioxidative Funktion von Sod3 konnte auch im Bleomycin-Lungenfibrose-Modell demonstriert werden: Mäuse, die Sod3 überexprimieren, zeigten signifikant weniger Fibrose mit kleineren Fibroblasten-Nestern im Vergleich zu den

²⁰² Marklund 1984a

²⁰³ Marklund 1984b

²⁰⁴ Carlsson LM, Jonsson J, Edlund T, Marklund SL 1995

Wildytypmäusen²⁰⁵, wohingegen *Sod3*-Knockout-Mäuse eine schwere Ausprägung der Fibrose zeigten im Vergleich mit dem Wildtyp²⁰⁶.

Der protektive Effekt von SOD3 beruht wahrscheinlich auf dem Schutz der ECM vor Degradierung, da SOD3 spezifisch an Bestandteile der ECM, wie zum Beispiel Kollagen I und IV, bindet, und diese vor oxidativen Abbau schützen kann, wodurch keine chemotaktischen Spaltprodukte entstehen, die wiederum Entzündungszellen anlocken und zu einer Entzündungsreaktion führen würden¹³³. Durch seinen die ECM stabilisierenden Effekt verhindert SOD3 des weiteren die Aktivierung von TGF-β1¹³³.

4.6.1. Immunhistochemie-Ergebnisse

Die bekannte Lokalisation von SOD3 in der extrazellulären Matrix²⁰⁷ ließ sich in allen untersuchten Lungen in mehr oder weniger ähnlicher Expression beobachten. Die mittels mRNA nachgewiesene Expression von SOD3 in AECII und Alveolarmakrophagen²⁰⁸, sowie auch die immunhistochemische Darstellung von SOD3 in diesen Zellen¹³⁴ konnte in der vorgestellten Untersuchung nicht nachvollzogen werden. Nur die Lokalisation von SOD3 im Bronchialepithel ließ sich eindeutig

²⁰⁵ Bowler et al. 2002

²⁰⁶ Fattman et al. 2003

²⁰⁷ Oury TD, Chang LY, Marklund SL, Day BJ, Crapo JD 1994

²⁰⁸ Su et al. 1997

beobachten.

In den verschiedenen Fibrose-Entitäten ließ sich hingegen teilweise eine Anfärbung von proSP-C positiven AECII-Zellen beobachten, wobei dies vor allem auf die apikalen Bereiche dieser Zellen beschränkt war, was wohl darauf zurückzuführen ist, dass SOD3 durch seine Heparin-bindene Domäne mit den Heparansulfaten auf Zelloberflächen interagieren kann²⁰⁹.

Bei IPF-Patienten zeigte sich in der dargestellten Untersuchung eine mäßig gute Kolokalisation von SOD3 mit proSP-C positiven AECII. Dies steht zumindest nicht in Widerspruch zu der von Kinnula und Mitarbeitern¹³⁴ durchgeführten Untersuchung, die ebenfalls eine Expression von SOD3 in AECII nachgewiesen haben. Die von Kinnula et al.¹³⁴ demonstrierte Expression von SOD3 in Alveolarmakrophagen und interstitiellen Mastzellen ist in der vorgestellten Untersuchung nicht beobachtet worden.

Die Expression von SOD3 ist bei den untersuchten EAA- und NSIP-Patienten recht schwach ausgeprägt und ähneln mehr den Beobachtungen in den gesunden Lungen als denen der IPF-Patienten, was Rahman und Mitarbeiter in ihrer Arbeit andeuten¹¹².

²⁰⁹ Fattman et al. 2001

4.7. N- (Carboxymethyl-Lysin)-oxidativ modifizierte Proteine

N-(carboxymethyl)-Lysin (CML)-Addukte gehören zu den sogenannten "advanced glycation end products" (AGE) und resultieren aus der nicht-enzymatischen Glykierung und Oxidation von Proteinen und Lipiden²¹⁰. Die Ausbildung von AGE spielen eine wichtige Rolle bei Pathophysiologien, die mit dem Altern und Diabetes assoziiert sind, wie Arthritis, Arteriosklerose, chronische Niereninsuffizienz, Morbus Alzheimer, Nephropathie, Neuropathie Katarakt²¹¹. Aufgrund dessen, dass und diese spezielle Proteinmodifikation wahrscheinlich vor allem in einem Glukoseunabhängigen Prozess unter oxidativen Stress entstehen können, beispielsweise durch aktivierte, H₂O₂-produzierende Phagozyten^{210,212}, können sie als Biomarker für oxidativen Stress eingesetzt werden¹⁴⁸.

4.7.1. Immunhistochemie-Ergebnisse

Die Lungen gesunder Spender wiesen in der dargelegten Untersuchung kaum eine Expression von CML-modifizierten Proteinen in proSP-C positiven Zellen auf. Dies konnten auch Morbini et al.²¹³ beobachten. Des Weiteren konnten sie eine

²¹⁰ Anderson et al. 1999

²¹¹ Muthenna et al. 2012

²¹² Anderson und Heinecke 2003

²¹³ Morbini P, Villa C, Campo I, Zorzetto M, Inghilleri S, Luisetti M 2006

moderate Expression in Alveolarmakrophagen und im Bronchialepithel demonstrieren. Dies ist auch in der vorgestellten Untersuchung aufgefallen (nicht dargestellt), allerdings sind keine korrespondierenden Schnitte mit CD68 zur Markierung von Makrophagen gefärbt worden, sodass diese Beobachtung nicht validiert werden konnte.

Morbini und Mitarbeiter²¹³ haben ebenfalls Lungen mit einem UIP-Muster untersucht und dabei eine verstärkte Expression von CMLmodifizierten Proteinen vor allem in hyperplastischen Epithelzellen in unmittelbarer Nähe der Fibroblasten Foci festgestellt. Diese hyperplastischen Epithelzellen sind in der vorgelegten Untersuchung als AECII identifiziert worden. Die Expression in den Fibroblasten Foci ist nicht explizit untersucht worden.

Interessant an der vorgestellten Untersuchung ist, dass bei den IPF-Patienten relativ deutlich eine erhöhte Expression von CMLmodifizierten Proteinen, als Marker für oxidativen Stress, beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigten die anderen Fibrose-Entitäten nur eine moderate Expression von CMLmodifizierten Proteinen, ähnlich dem Expressionmuster, das auch bei den gesunden Spenderlungen beobachtet werden konnte.

4.8. Serum Amyloid P

Serum Amyloid P (SAP, *APCS*) gehört zur Familie der Pentraxine und wird kontinuierlich von der Leber synthetisiert, wobei es vor allem eine Rolle in der Regulierung der Neutrophilen- und Makrophagenfunktion spielt¹⁴⁹. Besonders interessant ist hingegen, dass dem SAP eine antifibrotische Wirkung zugeschrieben wird. Dies konnte erstmals von Pilling et al.¹⁵⁰ demonstriert werden, die SAP als den Faktor isolierten, der eine Fibrozyten-Differenzierung im Plasma inhibierte. Außerdem beobachteten sie, dass Seren von Sklerodermie- und MCTD (mixed connective tissue disease) -Patienten weniger gut in der Lage waren, die Fibrozyten-Differenzierung zu inhibieren, und dass diese Seren auch einen geringeren SAP-Gehalt aufwiesen.

Die antifibrotische Wirksamkeit von SAP ist auch in dem Bleomycin-Lungenfibrose-Modell der Maus und der Ratte nachgewiesen worden²¹⁴. Die Injektion von SAP führte zu einer geringeren Ausprägung der Fibrose mit signifikant reduziertem Kollagengehalt, signifikant geringerer Level an α -SMA, und einer reduzierten Leukozyten-Infiltration im Vergleich zu Mäusen und Ratten, die nur eine Kochsalzinjektion nach der Bleomycin-Gabe erhalten hatten²¹⁴. Dagegen zeigten *Apcs*-Knockout-Mäuse eine ausgeprägtere Entzündungsantwort mit vermehrter Fibrose im

²¹⁴ Pilling et al. 2007

Vergleich zum Wildtyp²¹⁵.

Aufgrund dieser Eigenschaften wird SAP als eine Therapiemöglichkeit für IPF-Patienten in Betracht gezogen²¹⁶. Die Verträglichkeit von rekombinanten humanen SAP (PRM-151) scheint gegeben zu sein²¹⁷. Auch gibt es Hinweise auf eine Verbesserung klinischer Marker²¹⁷ sowie einer Reduktion der Fibrozytenanzahl²¹⁸. Die Effektivität dieses neuen Therapieansatzes muss nun in einer klinischen Studie beurteilt werden²¹⁷.

4.8.1. Lavage-Ergebnisse

Durch seine Eigenschaften als antifibrotisch wirksames Protein^{150,214,215} mit bereits beschriebenen Unterschieden im Serum von IPF-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern²¹⁹ und auch in Einklang mit der Arbeitshypothese sind hohe SAP-Spiegel für gesunde Probanden und signifikant erniedrigte SAP-Level für IPF-Patienten erwartet worden.

Dies ließ sich in der vorgelegten Untersuchung leider nicht reproduzieren. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen gesunden Spendern und IPF-Patienten. Überhaupt ließ sich mittels Mann-Whitney Test kaum ein signifikanter Unterschied zwischen

²¹⁵ Pilling et al. 2014

²¹⁶ Gomer 2013

²¹⁷ van den Blink et al. 2016

²¹⁸ Dillingh et al. 2013

²¹⁹ Murray et al. 2011

den gesunden Spendern und den Fibrose-Patienten ermitteln. Lediglich zwischen DIP-Patienten und gesunden Probanden gab es einen signifikanten Unterschied (p=0,0169), dieser ist aber aufgrund der geringen Probenanzahl der DIP-Patienten vorsichtig zu interpretieren.

Zwar deuten Pilling et al.¹⁵⁰ an, dass die Unterschiede im SAP-Gehalt im Serum zwischen gesunden und an einer Fibrose erkrankten Patienten nur gering zu sein scheinen, um Auswirkung auf die Fibroseentstehung zu nehmen. Dennoch ist fraglich, ob sich diese Annahme auf Lavage-Untersuchungen übertragen lassen, zumal in einer späteren Serum-Untersuchung signifikant geringere SAP-Konzentrationen bei IPF-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern beobachtet werden konnten²¹⁹.

4.9. Zusammenfassung

Die zuvor postulierte Arbeitshypothese, dass eine verringerte antioxidative Kapazität mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet ist, ließ sich gut mit den dargestellten Lavage-Ergebnissen der Antioxidantien PRDX2 und PRDX6 in Einklang bringen. Hier zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen gesunden Spendern, mit dem höchsten Gehalt an Antioxidans, und IPF-Patienten, mit einem der niedrigsten Antioxidans-Konzentrationen. NSIP-Patienten zeigten gegenüber IPF-Patienten in der Regel erhöhte Konzentrationen an Antioxidantien. Die anderen untersuchten Entitäten demonstrierten, dass auch auf sie die Arbeitshypothese angewendet werden kann. Die einzige Ausnahme ist das Ergebnis der CVD-Patienten in der PRDX2-Lavageuntersuchung, dessen Ursache aber nicht eruiert werden konnte

Bei den anderen untersuchten Antioxidantien (Glutathion Peroxidase 1, Katalase) sowie Serum Amyloid P ließen sich zwar Tendenzen erkennen, die für die Arbeitshypothese sprechen; allerdings konnte bei diesen oft kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

Interessant ist, dass zwar alle Antioxidantien eine Rolle in der Abwehr von oxidativen Stress haben, diese aber von unterschiedlicher Relevanz zu sein scheinen: Katalase-¹⁹⁶ und

183

Glutathion Peroxidase 1-Knockout Mäuse^{184,186} zeigten keine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Hyperoxie, wohingegen *Prdx6*-Knockout-Mäuse¹⁵³ bereits unter normoxämischen Bedingungen eine kürzere Überlebensrate aufwiesen im Vergleich zum Wildtyp. Aus diesen Beobachtungen lässt sich eventuell ein plausibler Grund konstruieren, warum sich gerade bei PRDX6 solche signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Fibrose-Entitäten und den gesunden Spendern beobachten ließen.

Das erhoffte Ziel der Charakterisierung dieser Antioxdantien in verschiedenen Körperflüssigkeiten von Fibrose-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden war, einen möglichen Biomarker zu finden, der vor allem bei der Differentialdiagnose von IPF und NSIP helfen würde. Wie bereits erwähnt, kann eine IPF eigentlich nur mittels chirurgischer Lungenbiopsie definitiv diagnostiziert werden¹. Da oft aber ältere und somit oft Patienten mit Ko- und Multimorbiditäten betroffen sind, wäre ein Biomarker aus einer leicht zu gewinnenden Körperflüssigkeit wünschenswert.

Dies ist in dieser Arbeit nur in einem kleinen Umfang gelungen. Zwar konnten wir zumindest für PRDX6 und PRDX2 signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen darstellen, allerdings konnte eine Korrelation mit klinischen Parametern (DL_{co} , FVC) nicht durchgeführt werden, da diese nicht vollständig zugänglich waren, und die erhobenen Lungenfunktionswerte lediglich eine Momentaufnahme darstellten, die zu einem unbekannten Zeitpunkt im Krankheitsverlauf erfolgt waren. Auch stellten sich die untersuchten Patientenkollektive für EAA- und Sarkoidose-Patienten eher heterogen dar. Leider ist auch eine Korrelation mit bekannten Markern für oxidativen Stress (8-Isoprostan, TBARS) nicht gelungen, da dies an der Durchführung verschiedener, nur bedingt zuverlässiger Testsysteme scheiterte, sodass hier leider keine Hinweise auf einen kausalen Zusammenhang zwischen erniedrigten Antioxidans-Spiegeln bei erhöhtem oxidativen Stress gegeben werden konnte.

Für einen validen Biomarker wäre eine prospektive Studie mit einem ähnlichen oder noch größeren Patientenkollektiv notwendig, bei dem standardisierten die unter Bedingungen einem definierten Körperflüssigkeiten zu Zeitpunkt im Erkrankungsverlauf gewonnen werden. Auch wäre eine weitere Probenentnahme im Verlaufe der Erkrankung als sinnvoll zu erachten. Des Weiteren sollten die klinischen Parameter, die für die Korrelation mit dem Biomarker herangezogen werden, im Krankheitsverlauf wiederholt standardisiert erfasst werden.

Nichtsdestotrotz gibt die vorgestellte Arbeit weitere Hinweise darauf, dass in der Pathogenese einer Lungenfibrose ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien (zugunsten der Oxidantien) zu beobachten ist.

185

Zusammenfassung

Die idiopathische pulmonale Fibrose (IPF) ist eine chronisch fortschreitende Erkrankung der Lunge, die innerhalb weniger Jahre zum Tode führt und für die momentan keine kausale Therapie zur Verfügung steht. Für eine definitive Diagnose dieser Erkrankung ist eine chirurgische Lungenbiopsie notwendig, um vor allem die IPF gegenüber der Differentialdiagnose einer nichtspezifischen interstitiellen Pneumonie (NSIP) abzugrenzen, welche eine bedeutend bessere Prognose aufweist und ein vielversprechendes Ansprechen auf Immunsuppressiva zeigt. Da vor allem aber ältere Patienten von dieser Erkrankung betroffen sind, liegen oft Ko- oder Multimorbiditäten vor, die einen solchen Eingriff verhindern. Deshalb wäre ein Biomarker aus einer möglichst leicht zu Körperflüssigkeit gewinnenden wünschenswert, um die Wahrscheinlichkeit der Diagnose einer IPF zu erhärten, ohne die Patienten einer rein diagnostischen Lungenbiopsie aussetzen zu müssen.

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Hypothese geht davon aus, dass eine erniedrigte antioxidative Kapazität mit dem Fortschreiten der Erkrankung und einer schlechteren Prognose vergesellschaftet ist, wohingegen Erkrankungen, die einen erhöhten bzw. im Vergleich zu gesunden Probanden nicht erniedrigten Gehalt an Antioxidantien aufweisen, eine bessere Prognose haben. Im Rahmen dieser Arbeit sind unterschiedliche Antioxidantien in BALF- und Serumproben verschiedener Lungenfibrose-Entitäten im Vergleich zu gesunden Spendern charakterisiert worden. Die eingeschlossenen Fibrose-Entitäten umfassten: IPF, NSIP, CVD (collagen vascular disease), DIP (desquamative interstitielle Pneumonie), EAA (exogene allergische Alveolitis), RA (rheumatoide Arthritis) und Sarkoidose.

Dabei zeigten sich vor allem in den BALF-Untersuchungen der Antioxidantien Peroxiredoxin 2 (PRDX2) und Peroxiredoxin 6 (PRDX6) teils sehr bis hoch signifikante Unterschiede zwischen gesunden Probanden und IPF-Patienten. Im Falle von PRDX6 liesen sich auch signifikante Unterschiede zwischen IPF- und NSIP-Patienten ermitteln. Aber auch die anderen eingeschlossenen Entitäten wiesen Antioxidans-Spiegel auf, die die Arbeitshypothese unterstützten.

Leider konnte keine Korrelation mit klinischen Parametern oder oxidativen Stress-Markern erfolgen.

Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic progressive lung disease, which leads to death within a few years without any casual therapy.

It is necessary to perform a surgical lung biopsy in order to confirm a definite diagnosis of IPF – especially then there is a possibility of the differential diagnosis fibrotic non-specific interstitial pneumonia (fNSIP), which has a better prognosis and often a good response to anti-inflammatory drugs. IPF often occurs in older adults, so there is a higher probability of co- and multimorbidities, which determines the possibility to perform a surgical lung biopsy. Because of these circumstances it would be preferable to have access to a biomarker, which can be extracted from an easily obtained body fluid.

The underlying hypothesis of this study is that a decline in antioxidative capacity is associated with progression of the fibrotic lung disease and worse prognosis - on the contrary, an increased or rather not reduced antioxidative capacity in comparison to healthy individuals is associated with a good prognosis.

In this study, several antioxidants were examined in BALF- and serum samples from patients with pulmonary fibrosis in comparison to healthy volunteers. Those pulmonary fibrosis entities were: IPF, NSIP, CVD (collagen vascular disease), DIP

188

(desquamative interstitial pneumonia), EAA (exogenic allergic alveolitis), RA (rheumatoid arthritis) and sarcoidosis.

Especially PRDX2 and PRDX6 showed significant (p<0,01 up to p<0,001) differences between healthy volunteers and IPF-patients in BALF-investigations. In case of PRDX6, there were also significant (p<0,05) differences between IPF- and fNSIP-patients. Even the other investigated entities revealed antioxidant levels, which supported the working hypothesis.

Unfortunately, no correlation between antioxidant levels and clinical features or oxidative stress markers could be detected.

Abkürzungsverzeichnis

ACE	angiotensin converting enzyme
AECII	alveoläre Typ-II-Zellen
AIP	akute interstitielle Pneumonie
AGE	advanced glycation end products
anti-CCP	anti-cyclic citrullinated peptide
ATS	American Thoracic Society
Blk	blank
BSA	bovine serum albumine
BTNL2	Butyrophilin-ähnliches 2-Gen
COP	kryptogen organisierende Pneumonie
CTD	connective tissue disease
CTGF	connective tissue growfh factor
CuZnSOD	intrazelluläre Form von Superoxiddismutase
CVD	collagen vascular disease
DAD	diffuse alveolar damage
DIP	desquamative interstielle Pneumonie
DL _{co}	Diffussionkoeffizient Kohlenmonoxid
DM	Dermatomysositis
EAA	exogene allergische Alveolitis
ECM	extrazelluläre Matrix
ECSOD	extrazelluläre Superoxiddismutase
ELF	epithelial lining fluid
EMT	epitheliale-mesenchymale Transformation
ERS	European Respiratory Society
FoxJ1	Forkhead Box Protein J1
FVC	funktionelle Vitalkapazität
GPx1	Glutathion Peroxidase 1
GSH	Glutathion
HLA	human leukocyte antigen
HP	hypersensitivity pneumonia
HRCT	high-resolution computer tomography
HRP	horseradisch peroxidase

HV	healthy volunteer
IGN-γ	Interferon γ
IHC	Immunhistochemie
IIP	idiopathische interstitielle Pneumonien
IL-	Interleukin
ILD	interstitial lung disease
IPAF	interstitial pneumonia with autoimmune features
IPF	idiopathische pulmonale Fibrose
LAP	latency associated protein
LIP	lymphozytische interstielle Pneumonie
MCTD	mixed connective tissue disease
MIF	Makrophagenmigrationsinhibtorfaktor
MHC	major histocompatibility complex
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MnSOD	mitochondriale Superoxiddismustase
NAC	N-Acetylcystein
NOX	NADPH-Oxidase
NSB	non-specific binding
NSIP	nicht-spezifische interstitielle Pneumonie
OP	organizing pneumonia
PAMP	pathigen-associated molecular pattern
Pa _{O2}	partial-aterieller Druck Sauerstoff
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PH	pulmonale Hypertonie
PM	Polymyositis
PPFE	pleuoparchenymatöse Fibroelastose
PRDX	Peroxiredoxin
PSS	progressive systemic sclerosis
RA	rheumatoide Arthritis
RB-ILD	Bronchiolitis assoziierte interstitielle Pneumonie
RF	Rheumafaktor
ROS	reactive oxygen species
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SOD	Superoxiddismutase
STAT	signal transducer and activator of transcription-1

TA	total activity
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TF	tissue factor
TGF-β	transforming growth factor β
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-α	tumor necrosis factor α
UCTD	undifferentiated connective tissue disease
UIP	usual interstitial pneumonia
UPR	unfolded protein response
WB	Western Blott

Abbildungsverzeichnis

- 1.1. modifiziert nach $[^{37}]$ und $[^{220}]$
- 1.2. modifiziert nach [221]
- 1.3. modifiziert nach $[4, 2^{2}, 221, 222]$
- 1.4. modifiziert nach [¹²¹] und [¹³²] 1.5. modifiziert nach [¹²², ¹³¹, ¹⁸⁶]
- 2.1. aus [²²³]
- 2.3. aus Cayman Chemical 8-Isoprostan EIA Kit (Item No. 516351)
- 2.4. aus Cayman Chemical 8-Isoprostan EIA Kit (Item No. 516351)
- 4.1. modifiziert nach [¹⁴⁰]

- 221 Loomis-King et al. 2013
- 222 Noble et al. 2012
- 223 Roche 2011

²²⁰ Kekevian et al. 2014

Literaturverzeichnis

Aletaha, Daniel; Neogi, Tuhina; Silman, Alan J.; Funovits, Julia; Felson, David T.; Bingham, Clifton O. et al. (2010): 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. In: *Arthritis and rheumatism* 62 (9), S. 2569–2581. DOI: 10.1002/art.27584.

American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) (2000). In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 161 (2 Pt 1), S. 646–664.

American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001 (2002). In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 165 (2), S. 277–304.

Anderson, M. M.; Heinecke, J. W. (2003): Production of N - (Carboxymethyl)Lysine Is Impaired in Mice Deficient in NADPH Oxidase. A Role for Phagocyte-Derived Oxidants in the Formation of Advanced Glycation End Products During Inflammation. In: *Diabetes* 52 (8), S. 2137–2143. DOI: 10.2337/diabetes.52.8.2137.

Anderson, Melissa M.; Requena, Jesús R.; Crowley, Jan R.; THORPE, SUZANNE R.; Heinecke, Jay W. (1999): The myeloperoxidase system of human phagocytes generates N ϵ -(carboxymethyl)lysine on proteins. A mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation. In: *J. Clin. Invest.* 104 (1), S. 103–113. DOI: 10.1172/JCI3042.

Arita, Y. (2006): Mitochondrial localization of catalase provides optimal protection from H2O2-induced cell death in lung epithelial cells. In: *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* 290 (5), S. L978-L986. DOI: 10.1152/ajplung.00296.2005.

Avissar N, Finkelstein JN, Horowitz S, Willey JC, Coy E: Extracellular glutathione peroxidase in human lung epithelial lining fluid and in lung cells. In: *Am J Physio* 270, S. 173–182, zuletzt geprüft am 08.03.2016.

Bargagli, E.; Olivieri, C.; Bennett, D.; Prasse, A.; Muller-Quernheim, J.; Rottoli, P. (2009): Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases: a review.

In: *Respiratory medicine* 103 (9), S. 1245–1256. DOI: 10.1016/j.rmed.2009.04.014.

Barrera, Lourdes; Mendoza, Felipe; Zuñiga, Joaquín; Estrada, Andrea; Zamora, Ana C.; Melendro, Emma I. et al. (2008): Functional diversity of T-cell subpopulations in subacute and chronic hypersensitivity pneumonitis. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 177 (1), S. 44–55. DOI: 10.1164/rccm.200701-093OC.

Baughman, Robert P.; Culver, Daniel A.; Judson, Marc A. (2011): A concise review of pulmonary sarcoidosis. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 183 (5), S. 573–581. DOI: 10.1164/rccm.201006-0865CI.

Baughman, Robert P.; Lower, Elyse E.; Gibson, Kevin (2012): Pulmonary manifestations of sarcoidosis. In: *Presse médicale (Paris, France : 1983)* 41 (6 Pt 2), S. e289-302. DOI: 10.1016/j.lpm.2012.03.019.

Beeh, K. M.; Beier, J.; Haas, I. C.; Kornmann, O.; Micke, P.; Buhl, R. (2002): Glutathione deficiency of the lower respiratory tract in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. In: *European Respiratory Journal* 19 (6), S. 1119–1123. DOI: 10.1183/09031936.02.00262402.

Bentley, A. R.; Emrani, P.; Cassano, P. A. (2008): Genetic variation and gene expression in antioxidant related enzymes and risk of COPD. A systematic review. In: *Thorax* 63 (11), S. 956–961. DOI: 10.1136/thx.2007.086199.

Blackwell, Timothy S.; Tager, Andrew M.; Borok, Zea; Moore, Bethany B.; Schwartz, David A.; Anstrom, Kevin J. et al. (2014): Future directions in idiopathic pulmonary fibrosis research. An NHLBI workshop report. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 189 (2), S. 214–222. DOI: 10.1164/rccm.201306-1141WS.

Borchers, Andrea T.; Chang, Christopher; Keen, Carl L.; Gershwin, M. Eric (2011): Idiopathic pulmonary fibrosis-an epidemiological and pathological review. In: *Clinical reviews in allergy & immunology* 40 (2), S. 117–134. DOI: 10.1007/s12016-010-8211-5.

Bowler, Russell P.; Nicks, Mike; Warnick, Karrie; Crapo, James D. (2002): Role of extracellular superoxide dismutase in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282 (4), S. L719-L726. DOI: 10.1152/ajplung.00058.2001.

Bozyk, Paul D.; Moore, Bethany B. (2011): Prostaglandin E2 and the pathogenesis of pulmonary fibrosis. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 45 (3), S. 445–452. DOI: 10.1165/rcmb.2011-0025RT.

Brigelius-Flohé, Regina (2006): Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. In: *Biological chemistry* 387 (10-11), S. 1329–1335. DOI: 10.1515/BC.2006.166.

Brigham C. Willis, Janice M. Liebler: Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition inAlveolar Epithelial Cells by Transforming GrowthFactor-1Potential Role in Idiopathic Pulmonary Fibrosis, zuletzt geprüft am 07.01.2016.

Bussone, Guillaume; Mouthon, Luc (2011): Interstitial lung disease in systemic sclerosis. In: *Autoimmunity reviews* 10 (5), S. 248–255. DOI: 10.1016/j.autrev.2010.09.012.

Camarena, A.; Juárez, A.; Mejía, M.; Estrada, A.; Carrillo, G.; Falfán, R. et al. (2001): Major histocompatibility complex and tumor necrosis factor-alpha polymorphisms in pigeon breeder's disease. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 163 (7), S. 1528–1533. DOI: 10.1164/ajrccm.163.7.2004023.

Caminati, Antonella; Cassandro, Roberto; Harari, Sergio (2013): Pulmonary hypertension in chronic interstitial lung diseases. In: *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 22 (129), S. 292–301. DOI: 10.1183/09059180.00002713.

Cantin, A. M.; Hubbard, R. C.; Crystal, R. G. (1989): Glutathione deficiency in the epithelial lining fluid of the lower respiratory tract in idiopathic pulmonary fibrosis. In: *The American review of respiratory disease* 139 (2), S. 370–372. DOI: 10.1164/ajrccm/139.2.370.

Cantin, A. M.; North, S. L.; Fells, G. A.; Hubbard, R. C.; Crystal, R. G. (1987): Oxidant-mediated epithelial cell injury in idiopathic pulmonary fibrosis. In: *The Journal of clinical investigation* 79 (6), S. 1665–1673. DOI: 10.1172/JCI113005.

Capobianco, Julia; Grimberg, Alexandre; Thompson, Bruna M.; Antunes, Viviane B.; Jasinowodolinski, Dany; Meirelles, Gustavo S. P. (2012): Thoracic manifestations of collagen vascular diseases. In: *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* 32 (1), S. 33–50. DOI: 10.1148/rg.321105058.

Carlsson LM, Jonsson J, Edlund T, Marklund SL (1995): Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. In: *Proc Natl Acad Sci* 92, S. 6264–6268, zuletzt geprüft am 10.03.2016.

Choi, Min Hee; Lee, In Kyung; Kim, Gyung Whan; Kim, Bang Ul; Han, Ying-Hao; Yu, Dae-Yeul et al. (2005): Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. In: *Nature* 435 (7040), S. 347–353. DOI: 10.1038/nature03587.

Churg, Andrew; Sin, Don D.; Everett, Douglas; Brown, Kevin; Cool, Carlyne (2009): Pathologic patterns and survival in chronic hypersensitivity pneumonitis. In: *The American journal of surgical pathology* 33 (12), S. 1765–1770. DOI: 10.1097/PAS.0b013e3181bb2538.

Churg, Andrew M. D.; Muller, Nestor L MD, PhD; Flint, Julia M. D.; Wright, Joanne L. MD (2006): Chronic Hypersensitivity Pneumonitis. In: *American Journal of Surgical Pathology* 30 (2), S. 201–208.

Circu, Magdalena L.; Aw, Tak Yee (2010): Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. In: *Free radical biology & medicine* 48 (6), S. 749–762. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022.

Collard, Harold R.; Moore, Bethany B.; Flaherty, Kevin R.; Brown, Kevin K.; Kaner, Robert J.; King, Talmadge E. et al. (2007): Acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 176 (7), S. 636–643. DOI: 10.1164/rccm.200703-463PP.

Connors, Geoffrey R.; Christopher-Stine, Lisa; Oddis, Chester V.; Danoff, Sonye K. (2010): Interstitial lung disease associated with the idiopathic inflammatory myopathies: what progress has been made in the past 35 years? In: *Chest* 138 (6), S. 1464–1474. DOI: 10.1378/chest.10-0180.

Corte, T. J.; Copley, S. J.; Desai, S. R.; Zappala, C. J.; Hansell, D. M.; Nicholson, A. G. et al. (2012): Significance of connective tissue disease features in idiopathic interstitial pneumonia. In: *The European respiratory journal* 39 (3), S. 661–668. DOI: 10.1183/09031936.00174910.

Cox, Nehemiah; Pilling, Darrell; Gomer, Richard H. (2014): Serum amyloid P: a systemic regulator of the innate immune response. In: *Journal of leukocyte biology* 96 (5), S. 739–743. DOI: 10.1189/jlb.1MR0114-068R.

Criado, Eva; Sánchez, Marcelo; Ramírez, José; Arguis, Pedro; Caralt, Teresa M. de; Perea, Rosario J.; Xaubet, Antonio (2010): Pulmonary sarcoidosis: typical and atypical manifestations at high-resolution CT with pathologic correlation. In: *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* 30 (6), S. 1567–1586. DOI: 10.1148/rg.306105512.

Dammeyer, Pascal; Arnér, Elias S. J. (2011): Human Protein Atlas of redox systems - what can be learnt? In: *Biochimica et biophysica acta* 1810 (1), S. 111–138. DOI: 10.1016/j.bbagen.2010.07.004.

Daniil, Zoe D.; Papageorgiou, Evangelia; Koutsokera, Agela; Kostikas, Konstantinos; Kiropoulos, Theodoros; Papaioannou, Andriana I.; Gourgoulianis, Konstantinos I. (2008): Serum levels of oxidative stress as a marker of disease severity in idiopathic pulmonary fibrosis. In: *Pulmonary pharmacology &*

therapeutics 21 (1), S. 26–31. DOI: 10.1016/j.pupt.2006.10.005.

Deisseroth A, Dounce A. L. (1970): Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. In: *Physiol Rev* 50, S. 319–375, zuletzt geprüft am 09.03.2016.

Diaz de Leon, Alberto; Cronkhite, Jennifer T.; Katzenstein, Anna-Luise A.; Godwin, J. David; Raghu, Ganesh; Glazer, Craig S. et al. (2010): Telomere lengths, pulmonary fibrosis and telomerase (TERT) mutations. In: *PloS one* 5 (5), S. e10680. DOI: 10.1371/journal.pone.0010680.

Dillingh, M. R.; van den Blink, B.; Moerland, M.; van Dongen, M.G.J.; Levi, M.; Kleinjan, A. et al. (2013): Recombinant human serum amyloid P in healthy volunteers and patients with pulmonary fibrosis. In: *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 26 (6), S. 672–676. DOI: 10.1016/j.pupt.2013.01.008.

Du Bois, Roland; King, Talmadge E. (2007): Challenges in pulmonary fibrosis x 5: the NSIP/UIP debate. In: *Thorax* 62 (11), S. 1008–1012. DOI: 10.1136/thx.2004.031039.

Fattman, Cheryl L.; Chang, Ling-Yi; Termin, Toni A.; Petersen, Louise; Enghild, Jan J.; Oury, Tim D. (2003): Enhanced bleomycin-induced pulmonary damage in mice lacking extracellular superoxide dismutase. In: *Free Radical Biology and Medicine* 35 (7), S. 763–771. DOI: 10.1016/S0891-5849(03)00402-7.

Fattman, Cheryl L.; Chu, Charleen T.; Kulich, Scott M.; Enghild, Jan J.; Oury, Tim D. (2001): Altered expression of extracellular superoxide dismutase in mouse lung after bleomycin treatment. In: *Free Radical Biology and Medicine* 31 (10), S. 1198–1207. DOI: 10.1016/S0891-5849(01)00699-2.

Fei Gao, Vuokko L. Kinnula, Marjukka Myllärniemi, and Tim D. Oury (2008): Extracellular Superoxide Dismutase in Pulmonary Fibrosis. In: *Antioxid Redox Signal* 10 (2), S. 343–354, zuletzt geprüft am 07.02.2016.

Fernández Pérez, Evans R.; Swigris, Jeffrey J.; Forssén, Anna V.; Tourin, Olga; Solomon, Joshua J.; Huie, Tristan J. et al. (2013): Identifying an inciting antigen is associated with improved survival in patients with chronic hypersensitivity pneumonitis. In: *Chest* 144 (5), S. 1644–1651. DOI: 10.1378/chest.12-2685.

Fink, Jordan N.; Ortega, Hector G.; Reynolds, Herbert Y.; Cormier, Yvon F.; Fan, Leland L.; Franks, Teri J. et al. (2005): Needs and opportunities for research in hypersensitivity pneumonitis. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 171 (7), S. 792–798. DOI: 10.1164/rccm.200409-1205WS.

Fischer, Aryeh; Antoniou, Katerina M.; Brown, Kevin K.; Cadranel, Jacques; Corte, Tamera J.; Du Bois, Roland M. et al. (2015): An official European

Respiratory Society/American Thoracic Society research statement: interstitial pneumonia with autoimmune features. In: *The European respiratory journal* 46 (4), S. 976–987. DOI: 10.1183/13993003.00150-2015.

Fischer, Aryeh; Du Bois, Roland (2012): Interstitial lung disease in connective tissue disorders. In: *The Lancet* 380 (9842), S. 689–698. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)61079-4.

Fischer, Aryeh; West, Sterling G.; Swigris, Jeffrey J.; Brown, Kevin K.; Du Bois, Roland M. (2010): Connective tissue disease-associated interstitial lung disease: a call for clarification. In: *Chest* 138 (2), S. 251–256. DOI: 10.1378/chest.10-0194.

Flaherty, Kevin R.; Martinez, Fernando J. (2006): Nonspecific interstitial pneumonia. In: *Seminars in respiratory and critical care medicine* 27 (6), S. 652–658. DOI: 10.1055/s-2006-957336.

Gabrielli, Armando (2012): New Insights into the Role of Oxidative Stress in Scleroderma Fibrosis. In: *TORJ* 6 (1), S. 87–95. DOI: 10.2174/1874312901206010087.

Gabrielli, Armando; Svegliati, Silvia; Moroncini, Gianluca; Pomponio, Giovanni; Santillo, Mariarosaria; Avvedimento, Enrico V. (2008): Oxidative stress and the pathogenesis of scleroderma: the Murrell's hypothesis revisited. In: *Seminars in immunopathology* 30 (3), S. 329–337. DOI: 10.1007/s00281-008-0125-4.

Girard, M.; Israël-Assayag, E.; Cormier, Y. (2011): Impaired function of regulatory T-cells in hypersensitivity pneumonitis. In: *The European respiratory journal* 37 (3), S. 632–639. DOI: 10.1183/09031936.00055210.

Glaspole, Ian; Goh, Nicole Soo Leng (2010): Differentiating between IPF and NSIP. In: *Chronic respiratory disease* 7 (3), S. 187–195. DOI: 10.1177/1479972310376205.

Godbert, Benoît; Wissler, Marie-Pierre; Vignaud, Jean-Michel (2013): Desquamative interstitial pneumonia: an analytic review with an emphasis on aetiology. In: *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 22 (128), S. 117–123. DOI: 10.1183/09059180.00005812.

Goh, Nicole S. L.; Desai, Sujal R.; Veeraraghavan, Srihari; Hansell, David M.; Copley, Susan J.; Maher, Toby M. et al. (2008): Interstitial lung disease in systemic sclerosis: a simple staging system. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 177 (11), S. 1248–1254. DOI: 10.1164/rccm.200706-877OC.

Gomer, Richard H. (2013): New Approaches to Modulating Idiopathic Pulmonary Fibrosis. In: *Curr Allergy Asthma Rep* 13 (6), S. 607–612. DOI: 10.1007/s11882-013-0377-5.

Gómez Carrera, Luis; Bonilla Hernan, Gema (2013): Pulmonary manifestations of collagen diseases. In: *Archivos de bronconeumología* 49 (6), S. 249–260. DOI: 10.1016/j.arbres.2012.11.005.

Grunes, Dianne; Beasley, Mary Beth (2013): Hypersensitivity pneumonitis: a review and update of histologic findings. In: *Journal of clinical pathology* 66 (10), S. 888–895. DOI: 10.1136/jclinpath-2012-201337.

Günther, Andreas; Korfei, Martina; Mahavadi, Poornima; Beck, Daniel von der; Ruppert, Clemens; Markart, Philipp (2012): Unravelling the progressive pathophysiology of idiopathic pulmonary fibrosis. In: *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 21 (124), S. 152–160. DOI: 10.1183/09059180.00001012.

Gutsche, Markus; Rosen, Glenn D.; Swigris, Jeffrey J. (2012): Connective Tissue Disease-associated Interstitial Lung Disease: A review. In: *Current respiratory care reports* 1, S. 224–232. DOI: 10.1007/s13665-012-0028-7.

Ha, Bin; Kim, Eun-Kyung; Kim, Ji-Hee; Lee, Hae Na; Lee, Kyun Oh; Lee, Sang Yeol; Jang, Ho Hee (2012): Human peroxiredoxin 1 modulates TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transition through its peroxidase activity. In: *Biochemical and biophysical research communications* 421 (1), S. 33–37. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.03.103.

Haan, J. B. de; Bladier, C.; Griffiths, P.; Kelner, M.; O'Shea, R. D.; Cheung, N. S. et al. (1998): Mice with a Homozygous Null Mutation for the Most Abundant Glutathione Peroxidase, Gpx1, Show Increased Susceptibility to the Oxidative Stress-inducing Agents Paraquat and Hydrogen Peroxide. In: *Journal of biological chemistry* 273 (35), S. 22528–22536. DOI: 10.1074/jbc.273.35.22528.

Hall, Andrea; Parsonage, Derek; Poole, Leslie B.; Karplus, P. Andrew (2010): Structural Evidence that Peroxiredoxin Catalytic Power Is Based on Transition-State Stabilization. In: *Journal of Molecular Biology* 402 (1), S. 194–209. DOI: 10.1016/j.jmb.2010.07.022.

Hansell, David M.; Nicholson, Andrew G. (2003): Smoking-related diffuse parenchymal lung disease: HRCT-pathologic correlation. In: *Seminars in respiratory and critical care medicine* 24 (4), S. 377–392. DOI: 10.1055/s-2003-42374.

Hauber, H-P; Bittmann, I.; Kirsten, D. (2011): Nicht spezifische interstitielle Pneumonie. In: *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 65 (8), S. 477–483. DOI: 10.1055/s-0030-1256284.

Hecker, Louise; Cheng, Jeff; Thannickal, Victor J. (2012): Targeting NOX enzymes in pulmonary fibrosis. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69 (14), S. 2365–2371. DOI: 10.1007/s00018-012-1012-7.

Hecker, Louise; Vittal, Ragini; Jones, Tamara; Jagirdar, Rajesh; Luckhardt, Tracy R.; Horowitz, Jeffrey C. et al. (2009): NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. In: *Nature medicine* 15 (9), S. 1077–1081. DOI: 10.1038/nm.2005.

Ho, Y.-S.; Magnenat, J.-L.; Bronson, R. T.; Cao, J.; Gargano, M.; Sugawara, M.; Funk, C. D. (1997): Mice Deficient in Cellular Glutathione Peroxidase Develop Normally and Show No Increased Sensitivity to Hyperoxia. In: *Journal of biological chemistry* 272 (26), S. 16644–16651. DOI: 10.1074/jbc.272.26.16644.

Ho, Y.-S.; Xiong, Y.; Ma, W.; Spector, A.; Ho, D. S. (2004): Mice Lacking Catalase Develop Normally but Show Differential Sensitivity to Oxidant Tissue Injury. In: *Journal of biological chemistry* 279 (31), S. 32804–32812. DOI: 10.1074/jbc.M404800200.

Hung, Chi; Linn, Geoffrey; Chow, Yu-Hua; Kobayashi, Akio; Mittelsteadt, Kristen; Altemeier, William A. et al. (2013): Role of lung pericytes and resident fibroblasts in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 188 (7), S. 820–830. DOI: 10.1164/rccm.201212-2297OC.

Iannuzzi, Michael C. (2011): Sarcoidosis. In: *JAMA* 305 (4), S. 391. DOI: 10.1001/jama.2011.10.

Iwata, Y.; Ogawa, F.; Komura, K.; Muroi, E.; Hara, T.; Shimizu, K. et al. (2007): Autoantibody against peroxiredoxin I, an antioxidant enzyme, in patients with systemic sclerosis. Possible association with oxidative stress. In: *Rheumatology* 46 (5), S. 790–795. DOI: 10.1093/rheumatology/kem010.

J.P. Lynch 3rd, E.S. White (2005): Pulmonary sarcoidosis: European Respiratory Monograph, zuletzt geprüft am 02.02.2016.

James DG (1994): Sarcoidosis and other granulomatous disorders: NY: Dekker.

Jang, Ho Hee; Lee, Kyun Oh; Chi, Yong Hun; Jung, Bae Gyo; Park, Soo Kwon; Park, Jin Ho et al. (2004): Two Enzymes in One. In: *Cell* 117 (5), S. 625–635. DOI: 10.1016/j.cell.2004.05.002.

Jasmina Ivanišević; Jelena Kotur-Stevuljević; Aleksandra Stefanović; Zorana Jelić-Ivanović; Slavica Spasić; Jelica Videnović-Ivanov et al.: Dyslipidemia and oxidative stress in sarcoidosis patients.

Johkoh, Takeshi (2014): Nonspecific interstitial pneumonia and usual interstitial pneumonia: is differentiation possible by high-resolution computed tomography? In: *Seminars in ultrasound, CT, and MR* 35 (1), S. 24–28. DOI: 10.1053/j.sult.2013.10.004.

Kang, Sang Won; Rhee, Sue Goo; Chang, Tong-Shin; Jeong, Woojin; Choi, Min Hee (2005): 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction. Therapeutic implications. In: *Trends in Molecular Medicine* 11 (12), S. 571–578. DOI: 10.1016/j.molmed.2005.10.006.

Katzenstein AL, Fiorelli RF. (1994): Nonspecific interstitial pneumonia/fibrosis. Histologic features and clinical significance. In: *Am J Surg Pathol* 18 (2), S. 136–147.

Kekevian, Alana; Gershwin, M. Eric; Chang, Christopher (2014): Diagnosis and classification of idiopathic pulmonary fibrosis. In: *Autoimmunity reviews* 13 (4-5), S. 508–512. DOI: 10.1016/j.autrev.2014.01.037.

Kikuchi, Norihiro; Ishii, Yukio; Morishima, Yuko; Yageta, Yuichi; Haraguchi, Norihiro; Yamadori, Tadahiro et al. (2011): Aggravation of bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice lacking peroxiredoxin I. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 45 (3), S. 600–609. DOI: 10.1165/rcmb.2010-0137OC.

Kim, E. J.; Elicker, B. M.; Maldonado, F.; Webb, W. R.; Ryu, J. H.; van Uden, J. H. et al. (2010): Usual interstitial pneumonia in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. In: *The European respiratory journal* 35 (6), S. 1322–1328. DOI: 10.1183/09031936.00092309.

Kim, Eun A.; Lee, Kyung Soo; Johkoh, Takeshi; Kim, Tae Sung; Suh, Gee Young; Kwon, O. Jung; Han, Joungho (2002): Interstitial lung diseases associated with collagen vascular diseases: radiologic and histopathologic findings. In: *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* 22 Spec No, S. S151-65. DOI: 10.1148/radiographics.22.suppl_1.g02oc04s151.

Kim, Eunice J.; Collard, Harold R.; King, Talmadge E. (2009): Rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: the relevance of histopathologic and radiographic pattern. In: *Chest* 136 (5), S. 1397–1405. DOI: 10.1378/chest.09-0444.

Kinder, Brent W.; Collard, Harold R.; Koth, Laura; Daikh, David I.; Wolters, Paul J.; Elicker, Brett et al. (2007): Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: lung manifestation of undifferentiated connective tissue disease? In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 176 (7), S. 691–697. DOI:

10.1164/rccm.200702-220OC.

King, Talmadge E.; Pardo, Annie; Selman, Moisés (2011): Idiopathic pulmonary fibrosis. In: *The Lancet* 378 (9807), S. 1949–1961. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)60052-4.

Kinnula, V. L. (2002): Cell specific expression of peroxiredoxins in human lung and pulmonary sarcoidosis. In: *Thorax* 57 (2), S. 157–164. DOI: 10.1136/thorax.57.2.157.

Kinnula, V. L.; Hodgson, U. A.; Lakari, E. K.; Tan, R. J.; Sormunen, R. T.; Soini, Y. M. et al. (2006): Extracellular superoxide dismutase has a highly specific localization in idiopathic pulmonary fibrosis/usual interstitial pneumonia. In: *Histopathology* 49 (1), S. 66–74. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2006.02470.x.

Kinnula, Vuokko L.; Crapo, James D. (2003): Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 167 (12), S. 1600–1619. DOI: 10.1164/rccm.200212-1479SO.

Kinnula, Vuokko L.; Fattman, Cheryl L.; Tan, Roderick J.; Oury, Tim D. (2005): Oxidative stress in pulmonary fibrosis: a possible role for redox modulatory therapy. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 172 (4), S. 417–422. DOI: 10.1164/rccm.200501-017PP.

Kinnula, V. L., J. D. Crapo, and K. O. Raivio (1995): Biology of disease: generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. In: *Lab. Invest* 73, S. 3–19.

Kliment, Corrine R.; Oury, Tim D. (2010): Oxidative stress, extracellular matrix targets, and idiopathic pulmonary fibrosis. In: *Free radical biology & medicine* 49 (5), S. 707–717. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.036.

Korfei, Martina (2016): The role of Endoplasmic Reticulum (ER) stress in pulmonary fibrosis. In: *Endoplasmic Reticulum Stress in Diseases* 1 (3), S. 16–49.

Korfei, Martina; Beck, Daniel von der; Henneke, Ingrid; Markart, Philipp; Ruppert, Clemens; Mahavadi, Poornima et al. (2013): Comparative proteome analysis of lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), non-specific interstitial pneumonia (NSIP) and organ donors. In: *Journal of proteomics* 85, S. 109–128. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.04.033.

Korfei, Martina; Ruppert, Clemens; Mahavadi, Poornima; Henneke, Ingrid; Markart, Philipp; Koch, Miriam et al. (2008): Epithelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 178 (8), S. 838–846. DOI:

10.1164/rccm.200802-313OC.

Kouranos, Vasileios; Jacob, Joe; Wells, Athol U. (2015): Severe Sarcoidosis. In: *Clinics in chest medicine* 36 (4), S. 715–726. DOI: 10.1016/j.ccm.2015.08.012.

Kunwar, A.; Haston, C. K. (2014): Basal levels of glutathione peroxidase correlate with onset of radiation induced lung disease in inbred mouse strains. In: *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* 307 (8), S. L597-L604. DOI: 10.1152/ajplung.00088.2014.

Kuwano, K.; Nakashima, N.; Inoshima, I.; Hagimoto, N.; Fujita, M.; Yoshimi, M. et al. (2003): Oxidative stress in lung epithelial cells from patients with idiopathic interstitial pneumonias. In: *European Respiratory Journal* 21 (2), S. 232–240. DOI: 10.1183/09031936.03.00063203.

Kuwano, Kazuyoshi; Hagimoto, Naoki; Maeyama, Takashige; Fujita, Masaki; Yoshimi, Michihiro; Inoshima, Ichiro et al. (2002): Mitochondria-Mediated Apoptosis of Lung Epithelial Cells in Idiopathic Interstitial Pneumonias. In: *Lab Invest* 82 (12), S. 1695–1706. DOI: 10.1097/01.LAB.0000045084.81853.76.

Kyhse-Andersen, Jan (1984): Electroblotting of multiple gels. A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polycrylamide to nitrocellulose. In: *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 10 (3-4), S. 203–209. DOI: 10.1016/0165-022X(84)90040-X.

Lacasse, Yves; Girard, Mélissa; Cormier, Yvon (2012): Recent advances in hypersensitivity pneumonitis. In: *Chest* 142 (1), S. 208–217. DOI: 10.1378/chest.11-2479.

Lacasse, Yves; Selman, Moises; Costabel, Ulrich; Dalphin, Jean-Charles; Ando, Masayuki; Morell, Ferran et al. (2003): Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 168 (8), S. 952–958. DOI: 10.1164/rccm.200301-137OC.

Lacasse, Yves; Selman, Moises; Costabel, Ulrich; Dalphin, Jean-Charles; Morell, Ferran; Erkinjuntti-Pekkanen, Riitta et al. (2009): Classification of hypersensitivity pneumonitis: a hypothesis. In: *International archives of allergy and immunology* 149 (2), S. 161–166. DOI: 10.1159/000189200.

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.

Lakari, Essi; Pääkkö, Paavo; Pietarinen-Runti Petra; Kinnula, Vuokko L. (2000): Manganese Superoxide Dismutase and Catalase Are Coordinately Expressed in the Alveolar Region in Chronic Interstitial Pneumonias and Granulomatous Diseases of the Lung. In: *Am J Respir Crit Care Med* 161 (2), S. 615–621. DOI: 10.1164/ajrccm.161.2.9904091.

Lake, Fiona; Proudman, Susanna (2014): Rheumatoid arthritis and lung disease: from mechanisms to a practical approach. In: *Seminars in respiratory and critical care medicine* 35 (2), S. 222–238. DOI: 10.1055/s-0034-1371542.

Lambeth, J. David (2007): Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. In: *Free radical biology & medicine* 43 (3), S. 332–347. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.027.

Lee, Joyce S.; Collard, Harold R.; Raghu, Ganesh; Sweet, Matthew P.; Hays, Steven R.; Campos, Guilherme M. et al. (2010): Does Chronic Microaspiration Cause Idiopathic Pulmonary Fibrosis? In: *The American Journal of Medicine* 123 (4), S. 304–311. DOI: 10.1016/j.amjmed.2009.07.033.

Lenz, Hinze-Heyn (2004): Influence of inflammatory mechanisms on the redox balance in interstitial lung diseases. In: *Respiratory medicine* 98, S. 737–745.

Liu, Geng; Feinstein, Sheldon I.; Wang, Yan; Dodia, Chandra; Fisher, Donald; Yu, Kevin et al. (2010): Comparison of glutathione peroxidase 1 and peroxiredoxin 6 in protection against oxidative stress in the mouse lung. In: *Free radical biology & medicine* 49 (7), S. 1172–1181. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.002.

Liu, Rui-Ming; Desai, Leena P. (2015): Reciprocal regulation of TGF- β and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis. In: *Redox biology* 6, S. 565–577. DOI: 10.1016/j.redox.2015.09.009.

Loomis-King, Hillary; Flaherty, Kevin R.; Moore, Bethany B. (2013): Pathogenesis, current treatments and future directions for idiopathic pulmonary fibrosis. In: *Current opinion in pharmacology* 13 (3), S. 377–385. DOI: 10.1016/ j.coph.2013.03.015.

Luppi, Fabrizio; Cerri, Stefania; Taddei, Sofia; Ferrara, Giovanni; Cottin, Vincent (2015): Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: a clinical review. In: *Internal and emergency medicine* 10 (4), S. 401–411. DOI: 10.1007/s11739-015-1204-x.

Lynch, David A. (2009): Lung disease related to collagen vascular disease. In: *Journal of thoracic imaging* 24 (4), S. 299–309. DOI: 10.1097/RTI.0b013e3181c1acec.

Maiorino, Fursini M.; Brigelius-Flohé, R.; Aumann, K. D.; Roveri, A.; Schomburg, D.; Flohé, L. (1995): [5] Diversity of glutathione peroxidases. In: Lester Packer (Hg.): Glutathione and thioredoxin: thiols in signal transduction

and gene regulation, Bd. 252. San Diego: Acad. Press (Methods in Enzymology, 252), S. 38–53.

Malhotra, Jyoti D.; Kaufman, Randal J. (2007): Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? In: *Antioxidants & redox signaling* 9 (12), S. 2277–2293. DOI: 10.1089/ars.2007.1782.

Manevich, Yefim; Fisher, Aron B. (2005): Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism. In: *Free radical biology & medicine* 38 (11), S. 1422–1432. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.011.

Manevich, Yefim; Sweitzer, Tom; Pak, Jhang Ho; Feinstein, Sheldon I.; Muzykantov, Vladimir; Fisher, Aron B. (2002): 1-Cys peroxiredoxin overexpression protects cells against phospholipid peroxidation-mediated membrane damage. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (18), S. 11599–11604. DOI: 10.1073/pnas.182384499.

Markart, Philipp; Luboeinski, Thomas; Korfei, Martina; Schmidt, Reinhold; Wygrecka, Malgorzata; Mahavadi, Poornima et al. (2009): Alveolar oxidative stress is associated with elevated levels of nonenzymatic low-molecular-weight antioxidants in patients with different forms of chronic fibrosing interstitial lung diseases. In: *Antioxidants & redox signaling* 11 (2), S. 227–240. DOI: 10.1089/ars.2008.2105.

Marklund, S. L. (1984a): Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. In: *J. Clin. Invest.* 74 (4), S. 1398–1403. DOI: 10.1172/JCI111550.

Marklund, S. L. (1984b): Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. In: *Biochem. J.* 220 (1), S. 269–272. DOI: 10.1042/bj2200269.

Montuschi, P.; Ciabattoni, G.; Paredi, P.; Pantelidis, P.; Du Bois, R. M.; Kharitonov, S. A.; Barnes, P. J. (1998): 8-Isoprostane as a biomarker of oxidative stress in interstitial lung diseases. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 158 (5 Pt 1), S. 1524–1527. DOI: 10.1164/ajrccm.158.5.9803102.

Morbini P, Villa C, Campo I, Zorzetto M, Inghilleri S, Luisetti M (2006): The receptor for advanced glycation end products and its ligands: a new inflammatory pathway in lung disease? In: *Mod Pathol* 19, S. 1437–1445, zuletzt geprüft am 10.03.2016.

Morgenthau, Adam S.; Iannuzzi, Michael C. (2011): Recent Advances in Sarcoidosis. In: *Chest* 139 (1), S. 174–182. DOI: 10.1378/chest.10-0188.

Mosca, M.; Tani, C.; Neri, C.; Baldini, C.; Bombardieri, S. (2006): Undifferentiated connective tissue diseases (UCTD). In: *Autoimmunity reviews* 6 (1), S. 1–4. DOI: 10.1016/j.autrev.2006.03.004.

Mubarak, K. K.; Montes-Worboys, A.; Regev, D.; Nasreen, N.; Mohammed, K. A.; Faruqi, I. et al. (2012): Parenchymal trafficking of pleural mesothelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. In: *The European respiratory journal* 39 (1), S. 133–140. DOI: 10.1183/09031936.00141010.

Müller-Quernheim, J.; Schürmann, M.; Hofmann, S.; Gaede, K.; Fischer, A.; Prasse, A. et al. (2009): Genetik der Sarkoidose. Ein Schlüssel zum Verständnis ihrer Pathogenese. In: *Pneumologie* 63 (03), S. 166–175. DOI: 10.1055/s-0028-1100825.

Murray, Lynne A.; Chen, Qingsheng; Kramer, Michael S.; Hesson, David P.; Argentieri, Rochelle L.; Peng, Xueyang et al. (2011): TGF-beta driven lung fibrosis is macrophage dependent and blocked by Serum amyloid P. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 43 (1), S. 154–162. DOI: 10.1016/j.biocel.2010.10.013.

Muthenna, Puppala; Akileshwari, Chandrasekhar; Reddy, G. Bhanuprakash (2012): Ellagic acid, a new antiglycating agent. Its inhibition of N ϵ - (carboxymethyl)lysine. In: *Biochem. J.* 442 (1), S. 221–230. DOI: 10.1042/BJ20110846.

Nadrous, Hassan F.; Pellikka, Patricia A.; Krowka, Michael J.; Swanson, Karen L.; Chaowalit, Nithima; Decker, Paul A.; Ryu, Jay H. (2005): Pulmonary hypertension in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. In: *Chest* 128 (4), S. 2393–2399. DOI: 10.1378/chest.128.4.2393.

Nair, Arjun; Hansell, David M. (2014): High-resolution computed tomography features of smoking-related interstitial lung disease. In: *Seminars in ultrasound, CT, and MR* 35 (1), S. 59–71. DOI: 10.1053/j.sult.2013.10.005.

Nakamura, Hiroyuki; Aoshiba Kazutetsu (2015): Idiopathic pulmonary Fibrosis, zuletzt geprüft am 08.01.2016.

Nalysnyk, Luba; Cid-Ruzafa, Javier; Rotella, Philip; Esser, Dirk (2012): Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature. In: *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 21 (126), S. 355–361. DOI: 10.1183/09059180.00002512.

Neumann, Carola A.; Krause, Daniela S.; Carman, Christopher V.; Das, Shampa; Dubey, Devendra P.; Abraham, Jennifer L. et al. (2003): Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. In: *Nature* 424 (6948), S. 561–565. DOI: 10.1038/nature01819.

Noble, Paul W.; Barkauskas, Christina E.; Jiang, Dianhua (2012): Pulmonary fibrosis: patterns and perpetrators. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (8), S. 2756–2762. DOI: 10.1172/JCI60323.

Nunes, H.; Soler, P.; Valeyre, D. (2005): Pulmonary sarcoidosis. In: *Allergy* 60 (5), S. 565–582. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2005.00778.x.

Nunes, Hilario; Bouvry, Diane; Soler, Paul; Valeyre, Dominique (2007): Sarcoidosis. In: Orphanet J Rare Dis 2 (1), S. 46. DOI: 10.1186/1750-1172-2-46.

Odajima, Nao; Betsuyaku, Tomoko; Nagai, Katsura; Moriyama, Chinatsu; Wang, Da-Hong; Takigawa, Tomoko et al. (2010): The Role of Catalase in Pulmonary Fibrosis. In: *Respir Res* 11 (1), S. 183. DOI: 10.1186/1465-9921-11-183.

O'Dwyer, David N.; Armstrong, Michelle E.; Cooke, Gordon; Dodd, Jonathan D.; Veale, Douglas J.; Donnelly, Seamas C. (2013): Rheumatoid Arthritis (RA) associated interstitial lung disease (ILD). In: *European journal of internal medicine* 24 (7), S. 597–603. DOI: 10.1016/j.ejim.2013.07.004.

Ohtsuka, Yoshinori; Munakata, Mitsuru; Tanimura, Kazunori; Ukita, Hideaki; Kusaka, Hirotaka; Masaki, Yoshitaka et al. (1995): Smoking Promotes Insidious and Chronic Farmer's Lung Disease, and Deteriorates the Clinical Outcome. In: *Intern. Med.* 34 (10), S. 966–971. DOI: 10.2169/internalmedicine.34.966.

Onorato, Joelle M.; Thorpe, Suzanne R.; Baynes, John W. (1998): Immunohistochemical and ELISA Assays for Biomarkers of Oxidative Stress in Aging and Diseasea. In: *Annals NY Acad Sci* 854 (1 TOWARDS PROLO), S. 277–290. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09909.x.

Oury TD, Chang LY, Marklund SL, Day BJ, Crapo JD (1994): Immunocytochemical localization of extracellular superoxide dismutase in human lung. In: *Lab Invest* 70, S. 889–898.

Pabst, S.; Skowasch, D.; Grohé, C. (2012): Sarkoidose. In: *Pneumologie* (*Stuttgart, Germany*) 66 (2), S. 96-109, quiz 110. DOI: 10.1055/s-0030-1257126.

Pak, Jhang Ho; Manevich, Yefim; Kim, Han Suk; Feinstein, Sheldon I.; Fisher, Aron B. (2002): An antisense oligonucleotide to 1-cys peroxiredoxin causes lipid peroxidation and apoptosis in lung epithelial cells. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (51), S. 49927–49934. DOI: 10.1074/jbc.M204222200.

Park, Joo Hun; Kim, Dong Soon; Park, I-Nae; Jang, Se Jin; Kitaichi, Masanori; Nicholson, Andrew G.; Colby, Thomas V. (2007): Prognosis of fibrotic interstitial pneumonia: idiopathic versus collagen vascular disease-related subtypes. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 175 (7), S. 705–711. DOI: 10.1164/rccm.200607-912OC.

Perkins, Arden; Nelson, Kimberly J.; Parsonage, Derek; Poole, Leslie B.; Karplus, P. Andrew (2015): Peroxiredoxins. Guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. In: *Trends in Biochemical Sciences* 40 (8), S. 435–445. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.05.001.

Phillips, Roderick J.; Burdick, Marie D.; Hong, Kurt; Lutz, Marin A.; Murray, Lynne A.; Xue, Ying Ying et al. (2004): Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. In: *J. Clin. Invest.* 114 (3), S. 438–446. DOI: 10.1172/JCI200420997.

Pilling, D.; Buckley, C. D.; Salmon, M.; Gomer, R. H. (2003): Inhibition of Fibrocyte Differentiation by Serum Amyloid P. In: *The Journal of Immunology* 171 (10), S. 5537–5546. DOI: 10.4049/jimmunol.171.10.5537.

Pilling, D.; Roife, D.; Wang, M.; Ronkainen, S. D.; Crawford, J. R.; Travis, E. L.; Gomer, R. H. (2007): Reduction of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis by Serum Amyloid P. In: *The Journal of Immunology* 179 (6), S. 4035–4044. DOI: 10.4049/jimmunol.179.6.4035.

Pilling, Darrell; Gomer, Richard H.; Zissel, Gernot (2014): Persistent Lung Inflammation and Fibrosis in Serum Amyloid P Component (Apcs-/-) Knockout Mice. In: *PloS one* 9 (4), S. e93730. DOI: 10.1371/journal.pone.0093730.

Poletti, Venerino; Romagnoli, Micaela; Piciucchi, Sara; Chilosi, Marco (2012): Current status of idiopathic nonspecific interstitial pneumonia. In: *Seminars in respiratory and critical care medicine* 33 (5), S. 440–449. DOI: 10.1055/s-0032-1325155.

Pons-Estel, Guillermo J.; Alarcón, Graciela S.; Scofield, Lacie; Reinlib, Leslie; Cooper, Glinda S. (2010): Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. In: *Seminars in arthritis and rheumatism* 39 (4), S. 257–268. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2008.10.007.

Poole, Leslie B.; Hall, Andrea; Nelson, Kimberly J. (2011): Overview of peroxiredoxins in oxidant defense and redox regulation. In: *Current protocols in toxicology / editorial board, Mahin D. Maines (editor-in-chief) ... [et al.]* Chapter 7, S. Unit7.9. DOI: 10.1002/0471140856.tx0709s49.

Raghu, Ganesh; Collard, Harold R.; Egan, Jim J.; Martinez, Fernando J.; Behr, Juergen; Brown, Kevin K. et al. (2011): An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 183 (6), S. 788–824. DOI: 10.1164/rccm.2009-040GL.

Raghu, Ganesh; Rochwerg, Bram; Zhang, Yuan; Garcia, Carlos A. Cuello; Azuma, Arata; Behr, Juergen et al. (2015): An Official ATS/ERS/JRS/ALAT

Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 192 (2), S. e3-19. DOI: 10.1164/rccm.201506-1063ST.

Raghu, Ganesh; Weycker, Derek; Edelsberg, John; Bradford, Williamson Z.; Oster, Gerry (2006): Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 174 (7), S. 810–816. DOI: 10.1164/rccm.200602-163OC.

Rahman, Irfan; Biswas, Saibal K.; Kode, Aruna (2006): Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. In: *European journal of pharmacology* 533 (1-3), S. 222–239. DOI: 10.1016/j.ejphar.2005.12.087.

Rahman, Irfan; Skwarska, Elzbieta; Henry, Michael; Davis, Margaret; O'Connor, Clare M.; FitzGerald, Muiris X. et al. (1999): Systemic and pulmonary oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. In: *Free Radical Biology and Medicine* 27 (1-2), S. 60–68. DOI: 10.1016/S0891-5849(99)00035-0.

Rehbock, B. (2015): Pulmonale Beteiligung bei Kollagenosen. In: *Der Radiologe* 55 (3), S. 241-54; quiz 255. DOI: 10.1007/s00117-014-2789-1.

Rhee, S. G.; Woo, H. A.; Kil, I. S.; Bae, S. H. (2012): Peroxiredoxin Functions as a Peroxidase and a Regulator and Sensor of Local Peroxides. In: *Journal of biological chemistry* 287 (7), S. 4403–4410. DOI: 10.1074/jbc.R111.283432.

Rhee, Sue Goo; Chae, Ho Zoon; Kim, Kanghwa (2005): Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. In: *Free radical biology & medicine* 38 (12), S. 1543–1552. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.026.

Roche (2011): Lab FAQs 4th edition, zuletzt geprüft am 16.03.2016.

Rock, Jason R.; Barkauskas, Christina E.; Cronce, Michael J.; Xue, Yan; Harris, Jeffrey R.; Liang, Jiurong et al. (2011): Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (52), S. E1475-83. DOI: 10.1073/pnas.1117988108.

Ross Vlahos, Steven Bozinovski (2013): Glutathione peroxidase-1 as a novel therapeutic target for COPD. In: *Redox Report* 18 (4), zuletzt geprüft am 12.02.2016.

Rottoli, Paola; Magi, Barbara; Cianti, Riccardo; Bargagli, Elena; Vagaggini, Cecilia; Nikiforakis, Nikolaos et al. (2005): Carbonylated proteins in bronchoalveolar lavage of patients with sarcoidosis, pulmonary fibrosis
associated with systemic sclerosis and idiopathic pulmonary fibrosis. In: *Proteomics* 5 (10), S. 2612–2618. DOI: 10.1002/pmic.200401206.

Ryu, Jay H.; Myers, Jeffrey L.; Capizzi, Stephen A.; Douglas, William W.; Vassallo, Robert; Decker, Paul A. (2005): Desquamative interstitial pneumonia and respiratory bronchiolitis-associated interstitial lung disease. In: *Chest* 127 (1), S. 178–184. DOI: 10.1378/chest.127.1.178.

Sakai, Norihiko; Tager, Andrew M. (2013): Fibrosis of two: Epithelial cell-fibroblast interactions in pulmonary fibrosis. In: *Biochimica et biophysica acta* 1832 (7), S. 911–921. DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.03.001.

Santos-Silva, M. A.; Pires, K. M. P.; Trajano, E. T. L.; Martins, V.; Nesi, R. T.; Benjamin, C. F. et al. (2012): Redox Imbalance and Pulmonary Function in Bleomycin-Induced Fibrosis in C57BL/6, DBA/2, and BALB/c Mice. In: *Toxicologic Pathology* 40 (5), S. 731–741. DOI: 10.1177/0192623312441404.

Scotton, Chris J.; Chambers, Rachel C. (2007): Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. In: *Chest* 132 (4), S. 1311–1321. DOI: 10.1378/chest.06-2568.

Selman, Moises; Pardo, Annie; Barrera, Lourdes; Estrada, Andrea; Watson, Susan R.; Wilson, Keith et al. (2006): Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 173 (2), S. 188–198. DOI: 10.1164/rccm.200504-644OC.

Selman, Moisés (2001): Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Prevailing and Evolving Hypotheses about Its Pathogenesis and Implications for Therapy. In: *Ann Intern Med* 134 (2), S. 136. DOI: 10.7326/0003-4819-134-2-200101160-00015.

Selman, Moisés; Lacasse, Yves; Pardo, Annie; Cormier, Yvon (2010): Hypersensitivity pneumonitis caused by fungi. In: *Proceedings of the American Thoracic Society* 7 (3), S. 229–236. DOI: 10.1513/pats.200906-041AL.

Selman, Moisés; Pardo, Annie; King, Talmadge E. (2012): Hypersensitivity pneumonitis: insights in diagnosis and pathobiology. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 186 (4), S. 314–324. DOI: 10.1164/rccm.201203-0513CI.

Silva, C. Isabela S.; Müller, Nestor L.; Lynch, David A.; Curran-Everett, Douglas; Brown, Kevin K.; Lee, Kyung Soo et al. (2008): Chronic hypersensitivity pneumonitis: differentiation from idiopathic pulmonary fibrosis and nonspecific interstitial pneumonia by using thin-section CT. In: *Radiology* 246 (1), S. 288–297. DOI: 10.1148/radiol.2453061881.

Sisson, Thomas H.; Mendez, Michael; Choi, Karen; Subbotina, Natalya; Courey, Anthony; Cunningham, Andrew et al. (2010): Targeted injury of type II alveolar epithelial cells induces pulmonary fibrosis. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 181 (3), S. 254–263. DOI: 10.1164/rccm.200810-1615OC.

Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D. et al. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Analytical Biochemistry* 150 (1), S. 76–85. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.

Song, Jin Woo; Do, Kyung-Hyun; Kim, Mi-Young; Jang, Se Jin; Colby, Thomas V.; Kim, Dong Soon (2009): Pathologic and radiologic differences between idiopathic and collagen vascular disease-related usual interstitial pneumonia. In: *Chest* 136 (1), S. 23–30. DOI: 10.1378/chest.08-2572.

Song, Zhimin; Marzilli, Lisa; Greenlee, Brian M.; Chen, Edward S.; Silver, Richard F.; Askin, Frederic B. et al. (2005): Mycobacterial catalase–peroxidase is a tissue antigen and target of the adaptive immune response in systemic sarcoidosis. In: *J Exp Med* 201 (5), S. 755–767. DOI: 10.1084/jem.20040429.

Spagnolo P, Rossi G, Cavazza A, Bonifazi M, Paladini I, Bonella F, Sverzellati N, Costabel U. (2015): Hypersensitivity Pneumonitis: A Comprehensive Review. In: *J Investig Allergol Clin Immunol.* 25 (4), S. 237–250.

Statement on sarcoidosis. Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS), the European Respiratory Society (ERS) and the World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG) adopted by the ATS Board of Directors and by the ERS Executive Committee, February 1999 (1999). In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 160 (2), S. 736–755.

Stuart, Bridget D.; Choi, Jungmin; Zaidi, Samir; Xing, Chao; Holohan, Brody; Chen, Rui et al. (2015): Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening. In: *Nature genetics* 47 (5), S. 512–517. DOI: 10.1038/ng.3278.

Su, W. Y.; Folz, R.; Chen, J. S.; Crapo, J. D.; Chang, L. Y. (1997): Extracellular superoxide dismutase mRNA expressions in the human lung by in situ hybridization. In: *Am J Respir Cell Mol Biol* 16 (2), S. 162–170. DOI: 10.1165/ajrcmb.16.2.9032123.

Sue Goo Rhee (2016): Overview on Peroxiredoxin. In: *Molecules and Cells* 39 (1), S. 1–5. DOI: 10.14348/molcells.2016.2368.

Sundar, Isaac K.; Chung, Sangwoon; Hwang, Jae-Woong; Arunachalam,

Gnanapragasam; Cook, Suzanne; Yao, Hongwei et al. (2010): Peroxiredoxin 6 differentially regulates acute and chronic cigarette smoke-mediated lung inflammatory response and injury. In: *Experimental lung research* 36 (8), S. 451–462. DOI: 10.3109/01902141003754128.

Swigris, Jeffrey J.; Olson, Amy L.; Huie, Tristan J.; Fernandez-Perez, Evans R.; Solomon, Joshua; Sprunger, David; Brown, Kevin K. (2011): Sarcoidosis-related mortality in the United States from 1988 to 2007. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 183 (11), S. 1524–1530. DOI: 10.1164/rccm.201010-1679OC.

Takasaka, Naoki; Araya, Jun; Hara, Hiromichi; Ito, Saburo; Kobayashi, Kenji; Kurita, Yusuke et al. (2014): Autophagy induction by SIRT6 through attenuation of insulin-like growth factor signaling is involved in the regulation of human bronchial epithelial cell senescence. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192 (3), S. 958–968. DOI: 10.4049/jimmunol.1302341.

Tanjore, Harikrishna; Blackwell, Timothy S.; Lawson, William E. (2012): Emerging evidence for endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 302 (8), S. L721-9. DOI: 10.1152/ajplung.00410.2011.

Taskar VS, Coultas D. B.: Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease? In: *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3(4):293–8.

Tazelaar, Henry D.; Wright, Joanne L.; Churg, Andrew (2011): Desquamative interstitial pneumonia. In: *Histopathology* 58 (4), S. 509–516. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2010.03649.x.

Thannickal, Victor J.; Horowitz, Jeffrey C. (2006): Evolving concepts of apoptosis in idiopathic pulmonary fibrosis. In: *Proceedings of the American Thoracic Society* 3 (4), S. 350–356. DOI: 10.1513/pats.200601-001TK.

Toppo, Stefano; Flohé, Leopold; Ursini, Fulvio; Vanin, Stefano; Maiorino, Matilde (2009): Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases. Variations of a basic scheme. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* - *General Subjects* 1790 (11), S. 1486–1500. DOI: 10.1016/j.bbagen.2009.04.007.

Travis, William D.; Costabel, Ulrich; Hansell, David M.; King, Talmadge E.; Lynch, David A.; Nicholson, Andrew G. et al. (2013): An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 188 (6), S. 733–748. DOI: 10.1164/rccm.201308-1483ST.

Travis, William D.; Hunninghake, Gary; King, Talmadge E.; Lynch, David A.; Colby, Thomas V.; Galvin, Jeffrey R. et al. (2008): Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: report of an American Thoracic Society project. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 177 (12), S. 1338–1347. DOI: 10.1164/rccm.200611-1685OC.

Tsakiri, Kalliopi D.; Cronkhite, Jennifer T.; Kuan, Phillip J.; Xing, Chao; Raghu, Ganesh; Weissler, Jonathan C. et al. (2007): Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (18), S. 7552–7557. DOI: 10.1073/pnas.0701009104.

Tsuchiya, Y.; Takayanagi, N.; Sugiura, H.; Miyahara, Y.; Tokunaga, D.; Kawabata, Y.; Sugita, Y. (2011): Lung diseases directly associated with rheumatoid arthritis and their relationship to outcome. In: *The European respiratory journal* 37 (6), S. 1411–1417. DOI: 10.1183/09031936.00019210.

Tsujino, Kazuyuki; Takeda, Yoshito; Arai, Toru; Shintani, Yasushi; Inagaki, Ryosaku; Saiga, Hiroyuki et al. (2012): Tetraspanin CD151 protects against pulmonary fibrosis by maintaining epithelial integrity. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 186 (2), S. 170–180. DOI: 10.1164/rccm.201201-0117OC.

Valeyre, Dominique; Prasse, Antje; Nunes, Hilario; Uzunhan, Yurdagul; Brillet, Pierre-Yves; Müller-Quernheim, Joachim (2014): Sarcoidosis. In: *The Lancet* 383 (9923), S. 1155–1167. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60680-7.

van den Blink, Bernt; Dillingh, Marlous R.; Ginns, Leo C.; Morrison, Lake D.; Moerland, Matthijs; Wijsenbeek, Marlies et al. (2016): Recombinant human pentraxin-2 therapy in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Safety, pharmacokinetics and exploratory efficacy. In: *Eur Respir J* 47 (3), S. 889–897. DOI: 10.1183/13993003.00850-2015.

Vij, Rekha; Noth, Imre; Strek, Mary E. (2011): Autoimmune-featured interstitial lung disease: a distinct entity. In: *Chest* 140 (5), S. 1292–1299. DOI: 10.1378/chest.10-2662.

Vij, Rekha; Strek, Mary E. (2013): Diagnosis and treatment of connective tissue disease-associated interstitial lung disease. In: *Chest* 143 (3), S. 814–824. DOI: 10.1378/chest.12-0741.

Vuorinen, Kirsi; Ohlmeier, Steffen; Leppäranta, Outi; Salmenkivi, Kaisa; Myllärniemi, Marjukka; Kinnula, Vuokko L. (2008): Peroxiredoxin II expression and its association with oxidative stress and cell proliferation in human idiopathic pulmonary fibrosis. In: *The journal of histochemistry and*

cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society 56 (10), S. 951–959. DOI: 10.1369/jhc.2008.951806.

W MacNee, I. Rahman (1995): Oxidantslantioxidants in idiopathicpulmonary fibrosis. In: *Thorax* 50, S. 53–58, zuletzt geprüft am 08.02.2016.

Waghray, Meghna; Cui, Zongbin; Horowitz, Jeffrey C.; Subramanian, Indhu M.; Martinez, Fernando J.; Toews, Galen B.; Thannickal, Victor J. (2005): Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by activated myofibroblasts. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (7), S. 854–856. DOI: 10.1096/fj.04-2882fje.

Walsh, Simon L. F.; Sverzellati, Nicola; Devaraj, Anand; Keir, Gregory J.; Wells, Athol U.; Hansell, David M. (2014): Connective tissue disease related fibrotic lung disease: high resolution computed tomographic and pulmonary function indices as prognostic determinants. In: *Thorax* 69 (3), S. 216–222. DOI: 10.1136/ thoraxjnl-2013-203843.

Walters, E. H.; Gardiner, P. V. (1991): Bronchoalveolar lavage as a research tool. In: *Thorax* 46 (9), S. 613–618. DOI: 10.1136/thx.46.9.613.

Wang, Xiaosong; Phelan, Shelley A.; Forsman-Semb, Kristina; Taylor, Eric F.; Petros, Christina; Brown, Aaron et al. (2003): Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (27), S. 25179–25190. DOI: 10.1074/jbc.M302706200.

Wang, Yan; Feinstein, Sheldon I.; Fisher, Aron B. (2008): Peroxiredoxin 6 as an antioxidant enzyme: protection of lung alveolar epithelial type II cells from H2O2-induced oxidative stress. In: *Journal of Cellular Biochemistry* 104 (4), S. 1274–1285. DOI: 10.1002/jcb.21703.

Wang, Yan; Feinstein, Sheldon I.; Manevich, Yefim; Ho, Ye-Shih; Fisher, Aron B. (2004a): Lung injury and mortality with hyperoxia are increased in peroxiredoxin 6 gene-targeted mice. In: *Free radical biology & medicine* 37 (11), S. 1736–1743. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.09.006.

Wang, Yan; Feinstein, Sheldon I.; Manevich, Yefim; Ho, Ye-Shih; Fisher, Aron B. (2006a): Peroxiredoxin 6 gene-targeted mice show increased lung injury with paraquat-induced oxidative stress. In: *Antioxidants & redox signaling* 8 (1-2), S. 229–237. DOI: 10.1089/ars.2006.8.229.

Wang, Yan; Manevich, Yefim; Feinstein, Sheldon I.; Fisher, Aron B. (2004b): Adenovirus-mediated transfer of the 1-cys peroxiredoxin gene to mouse lung protects against hyperoxic injury. In: *American journal of physiology. Lung*

cellular and molecular physiology 286 (6), S. L1188-93. DOI: 10.1152/ajplung.00288.2003.

Wang, Yan; Phelan, Shelley A.; Manevich, Yefim; Feinstein, Sheldon I.; Fisher, Aron B. (2006b): Transgenic mice overexpressing peroxiredoxin 6 show increased resistance to lung injury in hyperoxia. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 34 (4), S. 481–486. DOI: 10.1165/rcmb.2005-0333OC.

William D. Travis, M.D., Kazuhiro Matsui, M.D., Joel Moss, M.D., Ph.D., and: Idiopathic Nonspecific Interstitial Pneumonia:Prognostic Significance of Cellular andFibrosing Patterns, zuletzt geprüft am 18.01.2016.

Winterbourn, Christine C. (2008): Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. In: *Nat Chem Biol* 4 (5), S. 278–286. DOI: 10.1038/nchembio.85.

Wuyts, Wim A.; Agostini, Carlo; Antoniou, Katerina M.; Bouros, Demosthenes; Chambers, Rachel C.; Cottin, Vincent et al. (2013): The pathogenesis of pulmonary fibrosis: a moving target. In: *The European respiratory journal* 41 (5), S. 1207–1218. DOI: 10.1183/09031936.00073012.

Yan Wang, Sheldon I. Feinstein, and Aron B. Fisher (2008): Peroxiredoxin 6 as an antioxidant enzyme: Protection of lung alveolar epithelial type II cells from H2O2-induced oxidative stress. In: *Journal of Cellular Biochemistry* 104, S. 1274–1285, zuletzt geprüft am 12.02.2016.

Ye, Q.; Dalavanga, Y.; Poulakis, N.; Sixt, S. U.; Guzman, J.; Costabel, U. (2008): Decreased expression of haem oxygenase-1 by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. In: *The European respiratory journal* 31 (5), S. 1030–1036. DOI: 10.1183/09031936.00125407.

Ye-Shih Ho, Jean-Luc Magnenat, Mary Gargano (1998): The Nature of Antioxidant Defense Mechanisms: A Lesson from Transgenic Studies. In: *Environmental Health Perspectives* 106, S. 1219–1228, zuletzt geprüft am 09.03.2016.

Yunt, Zulma X.; Solomon, Joshua J. (2015): Lung disease in rheumatoid arthritis. In: *Rheumatic diseases clinics of North America* 41 (2), S. 225–236. DOI: 10.1016/j.rdc.2014.12.004.

Ehrenwörtliche Erklärung

"Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert.

Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden."

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Hiermit danke ich Professor Dr. med. Andreas Günther für die Bereitstellung des Themas und der Möglichkeit der Durchführung dieser Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin. Danken möchte ich auch der Deutschen Lungenstiftung e.V., die diese Arbeit durch ein Stipendium ermöglicht hat.

Ebenfalls herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Günther, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben – insbesondere bei Beate Schneider, Silke Händel, Stefanie Hezel, Moritz Wattenbach sowie Dr. Clemens Ruppert, Cornelia Scheld, Dr. Jasmin Wagner und Dr. Daniel von der Beck. Welchem Problem ich mich auch stellen musste, ihr habt mir bei der Lösung geholfen. Vielen Dank.

Meiner Familie mit meinen Eltern Irmgard Bach und Hermann-Josef Klein sowie meiner Schwester Katharina, meinem Lebensgefährten Steffen Klabunde und seinen Eltern Inge und Klaus möchte ich einfach für all das danken, was es mir ermöglicht hat, diese Arbeit zu bestreiten und zu beenden. Ohne eure Unterstützung wäre diese Arbeit und mein gesamtes Medizinstudium nicht möglich gewesen.

Ganz besonderer Dank geht an Dr. Martina Korfei, die mich während meiner gesamten Arbeit immer unterstützt und gefördert hat, sowie mir eine große, unersetzliche Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit war. Vielen lieben Dank, Martina.