

# Auswirkungen von Hypoxie auf das Immunsystem der Lunge

---

**Vanessa Frank**

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



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Auswirkungen von Hypoxie  
auf das Immunsystem der Lunge**

**INAUGURALDISSERTATION**

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

vorgelegt von

**Vanessa Frank**, geb. Krüger  
aus Remscheid

Gießen 2015

Aus dem Medizinischen Zentrum  
für Innere Medizin des Universitätsklinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. Werner Seeger

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Lohmeyer

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Euler

Tag der Disputation: 21.10.2015

*„Das hat also gefallen dir,  
Die Wahrheit anzuzeigen mir:  
Wie aller Welt Macht Ehr und Gut  
Vor dir nichts gilt, nichts hilft noch tut.“*

*Martin Luther*

## I Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Respirationstrakt und Immunabwehr.....	1
1.2	Definition der Hypoxie.....	2
1.3	Kompartimentspezifische Veränderungen unter Hypoxie.....	2
1.4	Proteinregulation durch Hypoxie.....	4
1.4.1	MHCII.....	5
1.4.2	CD74.....	7
1.4.3	Cathepsin S.....	9
1.4.4	TLR2.....	9
1.4.5	CCL5 (Chemokine ligand 5).....	11
1.5	Fragestellung der Arbeit.....	12
2	Material und Methoden.....	13
2.1	Material.....	13
2.1.1	Verwendete Geräte.....	13
2.1.2	Verwendete Lösungen.....	13
2.1.3	Primersequenzen.....	15
2.1.4	Sonstiges.....	15
2.2	Methoden.....	19
2.2.1	Isolierung der Mäuselungen.....	19
2.2.1.1	Isolierung der normoxischen und hypoxischen Mäuselungen für LCM und Immunhistochemie.....	19
2.2.1.2	Isolierung der Mäuselungen für das Western-Blot- Verfahren.....	20
2.2.2	Lasergesteuerte Mikrodisektion.....	20
2.2.2.1	Anfertigung der Gefrierschnitte.....	20
2.2.2.2	Färbung der Gefrierschnitte.....	21
2.2.2.3	Mikrodisektionsverfahren.....	21
2.2.3	RNA-Isolierung.....	22
2.2.3.1	RNA-Isolierung mit dem Roti-Quick-Kit.....	22
2.2.3.2	RNA-Isolierung mit dem E.Z.N.A.® Total RNA Kit.....	24
2.2.3.3	RNA-Isolierung mit dem GTC-Protokoll nach Chomczynski und Sacchi.....	25
2.2.4	RNA-Messung mittels NanoDrop®.....	26
2.2.5	cDNA-Synthese.....	27
2.2.6	„Real-Time“ PCR mit SYBR®-Green.....	28

2.2.7	Nachweis von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese .....	30
2.2.8	Immunhistochemie an Gefrierschnitten von Mäuselungen .....	31
2.2.9	Western-Blot-Verfahren.....	34
2.2.9.1	Isolierung von Protein aus Mäuselungen .....	34
2.2.9.2	Quantifizierung des isolierten Proteins.....	35
2.2.9.3	Prinzip und Herstellung der diskontinuierlichen SDS-PAGE .....	35
2.2.9.4	Vorbereitung der Proben.....	37
2.2.9.5	SDS-Gelelektrophorese .....	38
2.2.9.6	Blotting-Verfahren.....	38
2.2.9.7	Proteindetektion und Densitometrie .....	39
2.2.10	Datenauswertung .....	41
3	Ergebnisse .....	43
3.1	Vergleich der Methoden zur RNA-Isolierung .....	43
3.2	Hypoxiebedingte Veränderung der Genexpression in Lungenhomogenat: 1 Tag versus 7 Tage Hypoxie .....	44
3.2.1	Regressionsanalyse nach 1 Tag Normoxie und 1 Tag Hypoxie.....	47
3.2.1.1	MHCII und CD74 .....	47
3.2.1.2	MHCII und CtsS.....	48
3.2.1.3	MHCII und TLR2.....	49
3.2.1.4	MHCII und CCL5 .....	50
3.2.1.5	CD74 und CtsS.....	50
3.2.1.6	CD74 und TLR2.....	51
3.2.1.7	CD74 und CCL5 .....	52
3.2.1.8	CtsS und TLR2 .....	52
3.2.1.9	CtsS und CCL5.....	53
3.2.1.10	TLR2 und CCL5.....	54
3.3	Kompartimentspezifische hypoxiebedingte Veränderung der Genexpression nach 1 Tag Hypoxie .....	54
3.3.1	MHCII.....	54
3.3.1.1	Ergebnisse der PCR .....	54
3.3.1.2	Ergebnisse der Immunhistochemie.....	56
3.3.1.3	Ergebnisse des Western Blot.....	58
3.3.2	CD74.....	60
3.3.2.1	Ergebnisse der PCR .....	60
3.3.2.2	Ergebnisse der Immunhistochemie.....	61
3.3.2.3	Ergebnisse des Western Blot.....	63

3.3.3	Cathepsin S .....	65
3.3.3.1	Ergebnisse der PCR .....	65
3.3.3.2	Ergebnisse der Immunhistochemie .....	66
3.3.3.3	Ergebnisse des Western Blot.....	68
3.3.4	TLR2 .....	69
3.3.4.1	Ergebnisse der PCR .....	69
3.3.4.2	Ergebnisse der Immunhistochemie .....	70
3.3.4.3	Ergebnisse des Western Blot.....	72
3.3.5	CCL5.....	73
3.3.5.1	Ergebnisse der PCR .....	73
3.3.5.2	Immunhistochemie und Western Blot.....	74
4	Diskussion .....	75
4.1	Ziel der Arbeit .....	75
4.2	MHCII .....	76
4.3	CD74 .....	81
4.4	Cathepsin S .....	83
4.5	TLR2.....	85
4.6	CCL5 .....	87
5	Zusammenfassung .....	89
6	Summary .....	91
II	Abkürzungsverzeichnis .....	92
III	Abbildungsverzeichnis .....	96
IV	Tabellenverzeichnis .....	97
V	Literaturverzeichnis.....	99
VI	Erklärung zur Dissertation.....	111
VII	Danksagung .....	112

# 1 Einleitung

## 1.1 Respirationstrakt und Immunabwehr

Der menschliche Organismus ist von seiner Geburt an bis zu seinem Tod ständig einer Vielzahl von außen auf ihn eindringenden Fremdsubstanzen ausgesetzt. Dazu gehören zahlreiche Bakterien und Viren, aber auch chemische und physikalische Noxen und andere körperfremde Stoffe. Diese können über viele verschiedene Wege mit dem Körper in Verbindung kommen. Vor allem der Weg über den Respirationstrakt ermöglicht es pathogenen Noxen direkt in den Körper zu gelangen. Die Lunge, die mit einer Vielzahl von Alveolen dem Gasaustausch dient, wird dabei mit jedem Atemzug mit solchen pathogenen Noxen konfrontiert. Um einer Krankheitsentstehung vorzubeugen, ist das Abwehrsystem der Lunge daher von entscheidender Bedeutung. Dabei kann zwischen Abwehrmechanismen unterschieden werden, die im oberen Respirationstrakt stattfinden und solchen, die im unteren Atemtrakt zum Tragen kommen.

Bevor die eingeatmete Luft in die Lunge gelangt, wird diese zunächst durch die Schleimhäute in Nase und Rachen von Staubpartikeln befreit. Die oberen Abschnitte der Lunge haben zudem auf ihrer Oberfläche ein Zilien-tragendes Epithel mit serösen Drüsen. Körperfremde Stoffe oder kleinere Fremdkörper werden in das Sekret dieser Drüsen eingebettet, mit dem Zilienschlag des Flimmerepithels nach proximal transportiert und beizeiten abgehustet.

Im Bereich der Alveolen ist dieses Flimmerepithel nicht mehr vorhanden. Hier treten unspezifische und spezifische sowie zelluläre und humorale Abwehrmechanismen in Kraft. Für die unspezifische zelluläre Abwehr sind vor allem die Alveolarmakrophagen, aber auch neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten zuständig. Für die spezifische pulmonale Abwehr sind wiederum Lymphozyten verantwortlich.

Dieses komplexe Abwehrsystem kann durch pulmonale oder kardiale Erkrankungen, aber auch durch veränderte Umweltbedingungen beeinflusst und gestört werden. Vor allem die Veränderungen der Immunabwehr der Lunge unter respiratorischer Hypoxie sind noch nicht genau geklärt.

## 1.2 Definition der Hypoxie

Hypoxie ist definiert als ein lokaler oder generalisierter Sauerstoffmangel, wobei diesbezüglich zwischen ischämischer, anämischer, respiratorischer und hypoxämischer Hypoxie zu unterscheiden ist. Alle Formen der akuten oder chronischen Hypoxie können dabei zu irreversiblen Gewebeschäden führen. Im Folgenden soll im Besonderen die respiratorische Hypoxie näher erläutert werden.

Eine respiratorische Hypoxie bedeutet einen Abfall des alveolären  $O_2$ -Partialdrucks und kann verschiedene Ursachen haben. Es kann z. B. ein im Vergleich zum normalen  $O_2$ -Gehalt der Umgebungsluft (ca. 20 %) verminderter  $O_2$ -Anteil vorliegen (z. B. durch starke Luftverschmutzung, Smog in Großstädten etc.). Zudem können auch hereditäre, kongenitale oder erworbene pulmonale Erkrankungen, wie z. B. Mukoviszidose, chronische Bronchitis, Pneumonien, Tumoren und Lungenfibrosen den Gasaustausch in den Alveolen empfindlich stören, eine alveoläre Minderbelüftung verursachen und somit zur respiratorischen Hypoxie führen (1).

## 1.3 Kompartimentspezifische Veränderungen unter Hypoxie

Die Lunge setzt sich aus verschiedenen Kompartimenten zusammen. Zu diesen gehören zum einen die Gefäße (Venen und Arterien) und Bronchien, zum anderen die Alveolen. Zwischen dem Epithel zweier benachbarter Alveolen liegt ein dünnes Bindegewebsseptum, welches die Alveolarwand darstellt (2).

Eine respiratorische Hypoxie führt in der Lunge zunächst zur sog. Hypoxischen Vasokonstriktion (HPV). Dieser Mechanismus wurde zum ersten Mal 1946 von Euler und Liljestrand beschrieben (3). Dabei kommt es durch die Kontraktion der Gefäße zu einer Umverteilung des Blutes in besser belüftete Lungenareale, um weiterhin die Oxygenierung des sauerstoffarmen Blutes aufrecht zu erhalten. Durch die Vasokonstriktion nimmt aber auch der Widerstand in der Lungenstrombahn zu. Dadurch kann eine akute oder chronische pulmonale Hypertonie eintreten, welche durch einen mittleren pulmonalarteriellen Druck über 30 mmHg definiert ist (4).

Auf Gefäßebene führt eine anhaltende Hypoxie zu Veränderungen in allen drei Gefäßschichten (5). Im Bereich der Tunica media kommt es dabei zunächst zur Proliferation

und Hypertrophie von „smooth muscle cells (SMC)“, also glatten Gefäßmuskelzellen. Durch diesen Prozess entwickelt sich langsam eine Verdickung der Tunica media in den pulmonalen Gefäßen. Einige SMC der Tunica media verändern sich insofern, dass sie in die Intima einwandern und dort proliferieren. Dies hat wiederum die Bildung einer sog. Neointima zur Folge (6, 7). Im Bereich der Adventitia führt die vermehrte Bildung von Kollagenfasern, Fibroblasten und deren Hypertrophie zur Verdickung der Gefäßwand (5). Für den Erhalt der Funktion der Gefäße spielen daher die Endothelzellen und SMC eine wichtige Rolle. So sind sie unter anderem beteiligt an der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus und der Kontrolle der Blutgerinnung. Hypoxie führt jedoch dazu, dass das Endothel eine gesteigerte Permeabilität aufweist und es zu einer vermehrten Zytokin- und Wachstumsfaktorfreisetzung kommt (siehe Tab. 1).

**Tab. 1: Gefäßwachstum und -tonusregulierende Substanzen des Endothels, die durch Hypoxie reguliert werden (8)**

Wachstumsfaktoren und Zytokine	Vasoaktive Substanzen
Platelet-derived growth factor AA, BB und AB	Angiotensin II
Basic fibroblast growth factor	Endothelin
Insulin-like growth factor 1	Bradykinin
Transforming growth factor-beta	Stickstoffmonoxid
Endothelium-derived-growth factor	Prostazyklin
Interleukin-1, -6, -8	Thromboxan A2
Tissue factor	Prostaglandin
	Platelet activating factor (PAF)
	Leukotriene

In der Alveolarwand sind mobile Zellen wie z. B. Fibrozyten, Makrophagen und Mastzellen eingelagert. Das Epithel der Alveolen besteht dabei aus zwei verschiedenen Zelltypen. Dies sind einerseits Alveolarepithelzellen (AEC) oder Pneumozyten Typ I (lange flache Zellen), welche auch als Deckzellen bezeichnet werden. Andererseits handelt es sich um Pneumozyten Typ II, die sich oft in den Ecken zwischen den Alveolarsepten

befinden. Letztere produzieren das sog. Surfactant, welches die Oberfläche der Alveolen überzieht und zur Herabsetzung der Oberflächenspannung beiträgt. Hierdurch wird einer Atelektasenbildung vorgebeugt. Das Surfactant wird intrazellulär in den sog. Lamellarkörperchen gespeichert.

Bei Sauerstoffmangel sind die Zellen des Alveolarepithels einem verminderten Sauerstoffangebot direkt ausgesetzt. Durch diese Hypoxie wird eine Kaskade in Bewegung gesetzt, die zunächst die Atmungskette und damit die Synthese von ATP behindert. Dadurch kommt es nachfolgend zum Verlust der Funktion von verschiedenen Ionenpumpen, was wiederum zu Veränderungen der Elektrolytkonzentration in den einzelnen Zellen führt. Die Akkumulation von Natrium führt dabei zu einem vermehrten Wassereinstrom in die Zellen mit nachfolgender Ödementwicklung (9). Der Anstieg von Kalzium bewirkt hingegen eine Aktivierung von Enzymsystemen, die Zerstörung von Zellstrukturen und Membranen zur Folge haben. Da durch den Mangel an ATP ein akutes Defizit an Energie auftritt, beginnen die Zellen mit der anaeroben Glykolyse, was jedoch zum Abbau der Glykogenreserven führt und einen Laktatanstieg mit konsekutiver Azidose zur Folge hat (10). Weiterhin kommt es zum Verlust von Lamellarkörperchen und somit zu einer verminderten Freisetzung von Surfactant. Hierdurch steigt die Oberflächenspannung der Alveolen, was eine gesteigerte Atelektasenbildung und Ausbildung eines alveolaren Ödems bewirkt (11). Im weiteren Verlauf kann es zunächst zum Verlust der Typ-II-Pneumozyten und später zur Entwicklung einer Lungenfibrose kommen (12).

Für die unspezifische zelluläre Abwehr sind Alveolarmakrophagen zuständig. Sie gehören zum retikuloendothelialen System (RES) und sind vor allem in den Alveolarepten oder in den Alveolen selbst ansässig. Ihre Funktion besteht darin, in die Lunge eingedrungene Fremdstoffe (z. B. Ruß- oder Staubpartikel) zu phagozytieren und abzutransportieren.

#### 1.4 Proteinregulation durch Hypoxie

Der Einfluss von Hypoxie auf die Regulation von Proteinen oder Genen, die an Umbauvorgängen in der Lunge beteiligt sind, ist bisher nur wenig untersucht worden. Untersuchungen des Institutes für Pathologie der Universität Gießen ergaben jedoch, dass

vermutlich viel mehr Gene/Proteine hieran beteiligt sind, als bisher angenommen wurde (13-15). Ebenso wenig erforscht wurde bisher die Frage, ob und inwiefern Hypoxie Einfluss auf das Immunsystem oder auf die Immunantwort der Lunge hat. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Lungen von Mäusen, die unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen gehalten wurden, hinsichtlich ihrer Expression bestimmter Gene und Proteine, die in Zusammenhang mit dem angeborenen und erworbenen Immunsystem stehen, untersucht und miteinander verglichen. Dazu wurden die Mäuse für 24 Stunden oder sieben Tage jeweils normoxischen (20 % Luftsauerstoff) sowie hypoxischen (10 % Luftsauerstoff) Bedingungen ausgesetzt.

Durch das Verfahren der lasergesteuerten Mikrodisktion wurden den Lungen dann Gefäße und Alveolarsepten entnommen. Diese wurden mittels PCR auf verschiedene für das Immunsystem relevante Gene untersucht. Um die Veränderungen im bronchialen Kompartiment zu erforschen, wurde zudem eine bronchoalveoläre Lavage aufgearbeitet und ebenfalls mittels PCR überprüft. Für die Untersuchung auf Proteinebene wurde Lungenhomogenat hergestellt und sowohl mit PCR als auch mit dem Western-Blot-Verfahren analysiert. Zusätzlich wurden Gefrierschnitte der Mäuselungen angefertigt, mittels Immunhistochemie bearbeitet und hinsichtlich verschiedener Proteine untersucht.

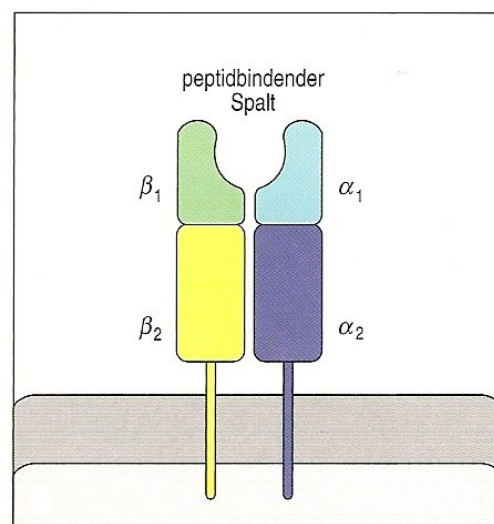
Der Einfluss von Hypoxie auf das erworbene Immunsystem der Lunge wurde anhand der Marker MHCII, CD74 und Cathepsin S ermittelt. Als Marker für das angeborene Immunsystem wurden TLR2 und CCL5 herangezogen. Um zu zeigen, warum gerade diese Marker verwendet wurden, werden sie in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

#### 1.4.1 MHCII

Die Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexe (Major Histocompatibility Complex = MHC) spielen neben ihrer Relevanz bei Organtransplantationen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort. Bei diesen sog. MHC-Antigenen handelt es sich hauptsächlich um Glykoproteine, die auf der Oberfläche von unterschiedlichen Zellen zu finden sind. Sie werden durch Gene des HLA-Genkomplexes codiert. Dieser befindet sich bei Menschen

auf dem Chromosom 6 und ist vor allem durch seinen Polymorphismus charakterisiert (16).

Strukturell betrachtet bestehen MHC-Klasse-II-Moleküle aus den zwei Transmembranglykoproteinketten  $\alpha$  und  $\beta$ . Diese enthalten jeweils zwei Domänen ( $\alpha_1$  und  $\alpha_2$ , sowie  $\beta_1$  und  $\beta_2$ ; siehe Abb. 1). Die Domänen  $\alpha_1$  und  $\beta_1$  sind so angeordnet, dass sich zwischen ihnen eine Aussparung befindet, welche als peptidbindender Spalt bezeichnet wird. Die in dieser Arbeit für die kompartimentspezifische Untersuchung mittels PCR verwendeten Gene des MHCII-Komplex Aa, Ab1 und Eb1 kodieren für bestimmte Domänen des MHCII-Moleküls. Aa (= class II antigen A) repräsentiert die  $\alpha$ -Kette, Ab1 und Eb1 (= class II antigen beta 1 und class II antigen E beta) repräsentieren die  $\beta$ -Kette. Die nachfolgende Abbildung verdeutlicht den Aufbau des MHCII-Moleküls.



**Abb. 1: MHC-Klasse-II-Molekül.** Das Molekül besteht aus einem Komplex der zwei Transmembranglykoproteinketten  $\alpha$  und  $\beta$ . Jede Kette hat zwei Domänen ( $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  sowie  $\beta_1$  und  $\beta_2$ ). Die beiden Domänen, die den peptidbindenden Spalt bilden, gehören zu verschiedenen Ketten ( $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Domäne) (17).

MHCII-Antigene werden vor allem auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APC) exprimiert. Zu diesen Zellen gehören z. B. Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und B-Lymphozyten (18-23). Alle diese Zellen haben die Fähigkeit exogene Antigene, d. h. körperfremde Proteine, per Endozytose aus dem Extrazellularraum aufzunehmen. Die Antigene werden danach zunächst in Endosomen eingeschlossen. Je weiter sich die Endosomen dann in das Zellinnere bewegen, desto saurer wird ihr pH-

Wert. Irgendwann fusionieren sie mit Lysosomen. Saure Proteasen, wie z. B. Cathepsin S, werden dann durch einen niedrigen pH-Wert aktiviert. Sie bauen nun die körperfremden Proteine zu Peptiden ab, so dass diese jetzt an MHCII-Moleküle gekoppelt und so auf der Zelloberfläche präsentiert werden können (24). Das körperfremde Peptid kann nur in Kombination mit einem autologen MHCII-Molekül von einem CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten erkannt und mit dessen T-Zell-Rezeptor (TCR) gebunden werden, was auch als MHC-Restriktion bezeichnet wird (25). Anschließend sezerniert der T-Lymphozyt Interleukine, die wiederum Makrophagen und andere Lymphozyten stimulieren und zu Proliferation und Wachstum anregen (26). Durch diese Mechanismen werden letztlich körperfremde Antigene beseitigt.

Untersuchungen ergaben, dass neben den o. g. Zellen auch Typ-II-Pneumozyten in der Lage sind MHCII-Moleküle zu exprimieren (22, 27). Weitere Studien zeigten, dass die Abwesenheit oder eine Dysfunktion der MHCII-Moleküle zu schweren Immunschwächen führt (21).

#### 1.4.2 CD74

Ii (CD74), auch bekannt unter dem Synonym invariante Kette (bei Mäusen) (28) oder p33 (bei Menschen) (29), ist wesentlich beteiligt an der Präsentation von körperfremden Peptiden durch MHCII-Moleküle. Nach der Synthese von MHCII-Molekülen werden diese zunächst im endoplasmatischen Retikulum gesammelt, wobei verhindert werden muss, dass diese vorzeitig an neusynthetisierte körpereigene Peptide binden. Dies wird durch die invariante Kette gewährleistet. Es handelt sich dabei um ein Typ-II-Membranglykoprotein mit einem Molekulargewicht von 31 – 45 kDa, welches Trimere bildet (30-32). Diese Trimere sind in der Lage drei MHCII-Moleküle zu binden. Dabei liegt ein Teil der Ii-Polypeptidkette in der Peptidbindungstasche der MHCII-Moleküle, wodurch verhindert wird, dass sich andere Peptide aus dem ER an die MHCII-Moleküle anlagern (33, 34).

Des Weiteren hat Ii die Funktion MHCII-Moleküle aus dem ER heraus zu den mit Antigenen beladenen Endosomen zu manövrieren (35, 36). In diesem endosomalen Kompartiment wird die invariante Kette durch die Protease Cathepsin S gespalten, sodass nur noch ein kleines Fragment der invarianten Kette mit dem MHCII-Molekül verbun-

den bleibt. Dieses Ii-Stück nennt man auch CLIP-Fragment (class-II-associated invariant-chain peptide). Um an die Zelloberfläche zu gelangen, muss jedoch auch dieser Teil vom MHCII-Molekül entfernt werden. Geuze et al. entdeckten, dass die Spaltung von Ii und die Bindung von körperfremden Peptiden im MHC-Klasse-II-Kompartiment stattfinden (37). In diesem Kompartiment, so fanden Martin et al. und Miyazaki et al. heraus, befindet sich ebenfalls das HLA-DM-Molekül, welches an MHCII-Moleküle bindet und diese im leeren Zustand stabilisiert. Durch die Bindung an den MHCII-CLIP-Komplex kann das CLIP-Fragment abdissoziieren und die Bindung von antigenen Peptiden ermöglichen, woraufhin der Transport und die Präsentation des Antigens auf der Zelloberfläche erfolgen (38, 39).

Untersuchungen von Viville et al. mit APC von Mäusen mit einem Ii-Mangel zeigten, dass es durch vermindert vorhandenes Ii zu einer Abnahme der MHCII-vermittelten Präsentation exogener Antigene kommt (40). Weitere Studien konnten Hinweise darauf geben, dass CD74 mit unterschiedlichsten bösartigen Neubildungen assoziiert ist, wie beispielsweise dem multiplen Myelom (41). Interessant ist weiterhin eine Untersuchung von Leng et. Al, durch die CD74 als ein Protein mit hoher Affinität zur Bindung an den extrazellulären Anteil des „Macrophage migration inhibitory factor (MIF)“ identifiziert werden konnte (42). MIF ist eines der Zytokine, die im Fall einer Infektion oder anderweitigen Beschädigung von Lungengewebe zuerst produziert und sezerniert werden. Es wird von einer Vielzahl verschiedener Zellen exprimiert, so auch von T-Zellen, dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (43-45).

Shi et al. konnten weiterhin nachweisen, dass die Signaltransduktion von MIF an die Kommunikation zwischen CD74 und CD44 gekoppelt ist (46). Ein pro-proliferativer Effekt von MIF gebunden an CD74 wurde hingegen unter anderem von Takahashi et. Al untersucht. In ihrer Studie konnten sie nachweisen, dass die Akkumulation von Neutrophilen im Alveolarraum auf der Interaktion von MIF mit auf der Oberfläche von Alveolarmakrophagen exprimiertem CD74 beruht (47). Im Zusammenhang des aus der Bindung von MIF und CD74 resultierenden pro-proliferativen Effektes wurde schließlich in einer Studie von Marsh et. Al. die Expression von CD74 durch Typ-II-Pneumozyten untersucht und nachgewiesen und damit die Möglichkeit für einen mit MIF assoziierten Reparaturmechanismus des Alveolarepithels aufgezeigt (48).

### 1.4.3 Cathepsin S

Bei Cathepsin S (CtsS) handelt es sich um eine Cystein-Protease die zur Papain-Familie gehört und eine starke Elastase-Aktivität aufweist (49, 50). Das Gen, das für CtsS kodiert, liegt auf Chromosom 1q21 (51). Es wird in erster Linie von APCs, Fibroblasten, B-Lymphozyten, aber auch von Epithelzellen der Lunge produziert (50, 52). Studien haben ergeben, dass CtsS neben Cathepsin L vor allem in der Lunge durch dortige Alveolarmakrophagen exprimiert wird (52). Auch das verstärkte Auftreten von CtsS in der Milz deutet darauf hin, dass Cathepsin S eine besondere Rolle für das menschliche Immunsystem spielt (51).

Die Degradation von Antigenen erfolgt in den Endolysosomen durch dort vorhandene Proteasen, die bei niedrigem pH-Wert aktiviert werden. Riese et al. konnten in ihren Untersuchungen nachweisen, dass der Abbau der invarianten Kette in humanen B-Lymphozyten vor allem durch die Protease Cathepsin S erfolgt (53). Hierdurch wird letztlich die Bindung von antigenem Peptid an das MHCII-Molekül, dessen Präsentation an der Zelloberfläche und schließlich eine Reaktion des Immunsystems möglich. Daher liegt die Vermutung nahe, dass Mangel oder Inhibierung von CtsS zu einer verminderten MHCII-Expression auf der Zelloberfläche führen, woraus sich die Konsequenz einer abgeschwächten Immunantwort ergibt (54). Erhöhte Konzentrationen von CtsS konnten hingegen bei allergisch bedingter Entzündung der Atemwege gefunden werden, was für eine Beteiligung bei der Antigenpräsentation spricht und Anlass zu weiteren Untersuchungen hinsichtlich eines therapeutischen Ansatzes gibt (55).

Apoptose und alveoläres Remodeling stehen in direktem Zusammenhang mit Krankheitsbildern wie dem Lungenemphysem und Entzündungen im Bereich der Atemwege. Zheng et al. fanden diesbezüglich heraus, dass  $\text{IFN}\gamma$  über einen CtsS-abhängigen Weg Verletzung und Apoptose von Alveolarepithelzellen induzieren und somit geschlussfolgert werden kann, dass CtsS an einem Fortschreiten dieser Erkrankungen beteiligt ist (56).

### 1.4.4 TLR2

Um die angeborene Immunabwehr zu aktivieren stehen verschiedene Rezeptoren und Signalwege zur Verfügung. Mikroorganismen tragen dafür auf ihrer Oberfläche mole-

kulare Strukturen, die sich häufig wiederholen. Diese Strukturen, sog. Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), werden von bestimmten Rezeptoren erkannt, weshalb sie auch als Mustererkennungsmoleküle (engl. PRR = pattern recognition receptors) bezeichnet werden. Zu den PRR gehört unter anderem der Toll-Rezeptor, der zuerst bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* gefunden wurde (57). Medzhitov et al. konnten 1997 den ersten sog. Toll-like-Rezeptor (TLR4) beim Menschen nachweisen (58). TLRs gehören zu den Typ-I-Transmembranproteinen und sind gekennzeichnet durch einen extrazellulär liegenden leucinreichen N-Terminus und eine carboxyterminale Toll-Interleukin-1-Rezeptor-(TIR)-Domäne (57).

Rock et al. und Takeuchi et al. fanden heraus, dass die humanen TLRs in fünf Unterfamilien eingeteilt werden können. Demnach gehören zur TLR2-Unterfamilie die Toll-like-Rezeptoren 1, 2, 6 und 10, wobei die Gene für TLR2 auf dem Chromosom 4q32 lokalisiert sind (59, 60). Schwandner und Yoshimura et al. fanden 1999 unabhängig voneinander heraus, dass TLR2 eine Vielzahl verschiedener Antigene erkennt, z. B. Viren, Parasiten, sowie Bestandteile der Zellwände grampositiver Bakterien (z. B. Peptidoglykan) (61, 62). Treten sie miteinander in Kontakt, so kommt es über das Adapterprotein MyD88 zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B, durch den es wiederum im Zellkern zur Aktivierung von Genen kommt, welche zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$  und MIP-2 beitragen (63, 64).

Zu den TLR2 exprimierenden Zellen gehören neben Monozyten und Makrophagen auch T-Lymphozyten und die Epithelzellen der Lunge (65-68). Voneinander unabhängige Studien haben gezeigt, dass auch auf Typ-II-Pneumozyten TLRs nachgewiesen werden können (69-71). Die Folgen einer verminderten oder nicht vorhandenen TLR2-Expression konnten anhand verschiedener Untersuchungen verdeutlicht werden. So zeigte sich bei Mäusen mit einem fehlerhaften oder mangelnden TLR2 eine hohe Anfälligkeit gegenüber Infektionen mit *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *Borrelia burgdorferi* (72-74).

Obwohl zunächst vermutet wurde, dass LPS als Bestandteil der Zellwand von gramnegativen Bakterien seine Signale lediglich über TLR4 sendet, konnte in weiteren Untersuchungen ebenfalls ein Anstieg von TLR2 unter LPS-Stimulation beschrieben werden. Dies wurde von Armstrong et al. im Jahr 2004 untersucht und konnte in Typ-II-Pneumozyten nachgewiesen werden (70, 75). Ob unter hypoxischen Bedingungen eine

erhöhte oder verminderte Expression von TLR2 stattfindet und welche Konsequenzen sich daraus ergeben, wurde bisher allerdings nicht hinreichend untersucht.

#### 1.4.5 CCL5 (Chemokine ligand 5)

Chemokine sind eine bestimmte Gruppe von Zytokinen, die eine chemotaktische Wirkung auf verschiedenste Zellen haben, aber auch selbst durch die Wirkung anderer (pro-inflammatorischer) Zytokine freigesetzt werden. So führen sie z. B. zur Einwanderung von Leukozyten in entzündlich veränderte Gebiete des Körpers, beeinflussen die Angiogenese (8) (siehe Tab. 1) und stimulieren die Hämatopoese (76-79). Studien zeigen, dass bei inflammatorischen Prozessen in der Lunge die Expression von Chemokinen deutlich erhöht ist (76, 80-82).

Die Einteilung der Chemokine in vier Untergruppen (CXC, CC, C und CX3C) erfolgt anhand der Position der ersten beiden Cysteinreste. Die CC-Chemokine sind durch zwei am N-terminalen Ende befindliche Cysteine gekennzeichnet, während sich bei der Familie der CXC-Chemokine eine beliebige Aminosäure X zwischen den Cysteinen findet. Ihre Wirkung entfalten Chemokine über die Bindung an bestimmte Rezeptoren, welche sich auf der Oberfläche von verschiedenen Zellen befinden und CC-Chemokinrezeptoren genannt werden (CCR) (83). Es handelt sich hierbei um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wobei das G-Protein an einen heptahelikalen Rezeptor gebunden ist und die Signalweiterleitung von extra- nach intrazellulär über einen „second messenger“ erfolgt.

CCL5, früher RANTES, gehört zur Familie der CC-Chemokine und ist ein ca. 8 kDa großes Protein, dessen Gen auf Chromosom 17q11.2-q12 des Menschen lokalisiert ist und das mit vielen verschiedenen Zelltypen interagiert (84). So hat es eine starke chemotaktische Wirkung auf Monozyten, Lymphozyten (85-93), eosinophile (85-101) und basophile Granulozyten (85, 86, 88, 102, 103). CCL5 kann von den unterschiedlichsten Zellen produziert und sezerniert werden. Zu diesen Zellen gehören die alveolären glatten Gefäßmuskelzellen (ASM) (104), Alveolarepithelzellen Typ II (92), Thrombozyten, Monozyten, B-Lymphozyten, Fibroblasten, Bronchialepithelzellen und Endothelzellen (105, 106). Die Hauptrezeptoren für CCL5 sind CCR1 (107-109), CCR3 (109, 110) und CCR5 (111-113). Die Expression von CCL5 konnte bisher bei vielen

Lungenerkrankungen, welche mit einer Inflammation einhergehen, nachgewiesen werden. Dazu gehören allergisches Asthma (114), Respiratory-Syncytial-Virus-Infektion (115-118), Acute lung injury in Folge einer Endotoxinämie (119), Rhinovirus-Infektion (120), CMV-Infektion (121), Influenza-Virus-Infektion (99), aber auch interstitielle Lungenerkrankungen wie die Sarkoidose (93) und idiopathische Lungenfibrose (122). Die Expression und Freisetzung von CCL5 durch o. g. Zellen kann zudem durch andere pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$  hervorgerufen werden (123).

## 1.5 Fragestellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, welche Auswirkungen respiratorische Hypoxie in vivo auf das angeborene und erworbene Immunsystem in der Lunge hat. Die Analysen sollen anhand ausgewählter Marker an Mäuselungen ex vivo mittels Lungenhomogenat erfolgen. Daneben sollen weitere Analysen in definierten Lungenkompartimenten durchgeführt werden. Hierbei soll der kurz- und längerfristige Einfluss von Hypoxie (1d vs. 7d Hypoxieexposition) untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verwendete Geräte

ABI PRISM 7700 Sequence Detection System	Perkin Elmer, Weiterstadt
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Digital Imaging Software	Leica, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Leica DM 2000	Leica, Deutschland
GeneAmp™ 2400 PCR cycler	Perkin Elmer, Weiterstadt
High Voltage Power Pack	Biometra, Göttingen
Kryostat (Cryocut 3000)	Leica, Bensheim
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Mikroskop	Leitz, Wetzlar
NanoDrop ND-1000	Peqlab, Erlangen
Röntgenanlage	Agfa, Köln
Rüttler	Lab4You, Berlin
Test Tube Thermostat TCR 100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Transilluminator	Peqlab, Erlangen
UV max kinetic microplate reader	Bender&Hobein, Heidelberg
UV-Laser Microbeam System	P.A.L.M., Bernried
Waage	Gottl. Kern & Sohn GmbH, Albstadt
Vortexer REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH, München
Zentrifugen	Heraeus, Hanau

#### 2.1.2 Verwendete Lösungen

Elektrophorese-Puffer (10 x)	30,3 g	Tris
	144 g	Glycin
	10 g	SDS
	ad 1000 ml	Aqua dest.

Milch 5 %	5 g	Difco™ Skim Milk
	100 ml	PBS (1 x)
N(onidet)P40-Puffer	20 mM	Tris HCL pH 8
	137 mM	NaCl
	2 mM	EDTA
	10 %	Glycerol
	1 %	nonidet p40
PBS	0,20 g/L	KCL
	0,20 g/L	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	8,00 g/L	NaCl
	2,16 g/L	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O
Stripping- Puffer	10 ml	Glycin (1 Molar)
	90 ml	Aqua dest.
	1 ml	HCL 37 %
TAE-Puffer	40 mM	Tris Puffer
	20 mM	Acetat
	2 mM	EDTA
TBS-Puffer	100 ml	TBS
	ad 1000 ml	Aqua dest
Transfer-Puffer	3,02 g	Tris 25 mM
	14,4 g	Glycin 192 mM
	200 ml	Methanol 20 %
	ad 1000 ml	Aqua dest
Waschpuffer (PBS)	1 ml	Tween 20
	100 ml	PBS (10 x)
	900 ml	Aqua dest.

### 2.1.3 Primersequenzen

In der nachfolgenden Tabelle sind alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten PCR-Primer aufgelistet.

**Tab. 2: Verwendete PCR-Primer**

Gen (Accession Nr.)	Primer-Paare	Produktlänge
H2-Aa (NM010378.2)	CACCATGCTCAGCCTCTGTG TACTGGCCAATGTCTCCAGGA	101 bp
H2-Ab1 (NM207105.2)	TGGACACGGTGTGCAGACA CCAGAGTGTTGTGGTGGTTGA	125 bp
H2-Eb1 (NM010382.2)	CCTCCAGTGGCTTTGGTCA TCGAAGCGCAGGTTCTCCT	139 bp
CD74 (NM010545.3)	CATGGATGACCAACGCGAC TGTACAGAGCTCCACGGCTG	100 bp
Cathepsin S (NM021281)	GCCATTCCTCCTTCTTCTTCTACA CAAGAACACCATGATTCACATTGC	80 bp
TLR2 (NM011905)	CACCGGTCAGAAAACAACCTTACC CAGAACAGCGTTTGCTGAAGAG	156 bp
CCL5 (BC033508.1)	CTGCTTTGCCTACCTCTCCCT CGGTTCTTCGAGTGACAAAC	159 bp
PBGD (NM013551)	GGTACAAGGCTTTCAGCATCG ATGTCCGGTAACGGCGGC	138 bp

### 2.1.4 Sonstiges

A549-Zellen

LGC Promochem, Wesel

Acetat

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Steinheim

Aceton

Merck, Darmstadt

---

Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agarose	Life Technologies, Scotland
Antikörper-Diluent	DakoCytomation, Hamburg
APS 25 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Aqua destillata	Braun, Melsungen
Balb/c-Mäuse	Charles River, Sulzfeld
Bio-Rad Dc Protein Assay	Bio-Rad, München
Biotin Blocking System	DakoCytomation, Hamburg
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Complete (Proteaseinhibitor)	Roche, Mannheim
Deckgläser (26 mm x 76 mm) (Glasdicke 0,13 mm – 0,17 mm)	Langenbrinck, Emmendingen
Deckgläser (24 mm x 36 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig
Difco™ Skim Milk	Becton Dickinson, Heidelberg
Dithiotreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Marker 25 step ladder	Promega, Mannheim
dNTP	Perkin Elmer, Norwalk, CA, USA
ECL plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare, München
EDTA	Merck, Darmstadt
Einmalspritzen Injekt-F 1 ml	Braun, Melsungen
Elektrophoresekammer	Keutz, Reiskirchen
Ethanol 100 %	Riedel-deHaen, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Falcon Tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Fast Red Substrate System	DakoCytomation, Hamburg
Fettstift	DakoCytomation, Hamburg
First strand buffer, 1 x	Abgene, Hamburg
Flow	Heraeus, Hanau
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Gelelektrophoresekammern und Kämme	Bio-Rad, München
Gel loading solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Glycin für Elektrophorese	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
GTC- Puffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ham's	PAA, Österreich
Hämalaun	Merck, Darmstadt
Hyperfilm™ ECL	Amersham Biosciences UK Ltd.
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kanülen (Sterican)	Braun, Melsungen
Ketavet® (Ketaminhydrochlorid)	Pharmacia GmbH, Karlsruhe
Kochsalzlösung, isotonisch (0,9 %)	Delta Select GmbH, Pfullingen
Krebs-Henseleit-Puffer, modifiziert	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Küvette	Schott, Mainz
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mikrotom-Messer	Feather, Köln
Mikropräparierbesteck	Hammacher, Solingen Aesculap, Tuttlingen
Natriumacetat (NaOAc)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NP-40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Objektträger (25 mm x 75 mm x 1 mm)	Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm® M (Verschlußfolie)	Fisher Scientific, Schwerte
PBS	PAA, Österreich
Phenol	Biometra, Göttingen
Pipetten (1 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg Gilson, France
Pipettenspitzen (steril, 10 – 1000 µl)	Fisher Scientific, Schwerte
Polaroid 667 Film	Polaroid, Offenbach
Random Hexanukleotide	Boehringer, Mannheim
Reaktionsgefäße (0,2 ml – 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg

Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Rompun® 2 % (Xylazinhydrochlorid)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Roti-Quick-Kit®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Röntgenfilm	Kodak, Pforzheim
Röntgenkassette Cronex® 18 cm x 24 cm	Dupont, Vaihingen
Rnase inhibitor	Serva, Heidelberg
Salzsäure rauchend 37 %	Merck, Darmstadt
SDS 10 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
TBS	PAA, Österreich
Tissue Culture Flask	Greiner, Labortechnik
TissueTek®	Sakura Finetek Zoeterwoude, NL
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Transfermembran (PVDF-Plus)	Micron Separation Inc., Westboro, MA, USA
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trypanblau 0,4 %	Gibco™, Scotland
Trypsin	PAA, Österreich
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
E.Z.N.A.® Total RNA Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Ultramount Eindeckmedium	DakoCytomation, Hamburg
VECTASHIELD®	Vector laboratories, Inc. Grünberg, Deutschland
Wasser, molecular biology grade (dH <sub>2</sub> O)	Eppendorf, Hamburg
Zählkammer 0,0025 mm <sup>2</sup>	Neubauer, Friedrichsdorf

Alle hier nicht erwähnten Reagenzien sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolierung der Mäuselungen

#### 2.2.1.1 Isolierung der normoxischen und hypoxischen Mäuselungen für LCM und Immunhistochemie

Für alle nachfolgenden Experimente wurden männliche und weibliche Balb/c-Mäuse mit einem Durchschnittsgewicht von 20 g verwendet. Alle Tierexperimente wurden mit Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen durchgeführt (Nr. II 25.3 – 19 c 20-15 (1) GI 20/10 - Nr. 22/2000 sowie VI 63 – 19 c 20-15 (1) GI 20/10 – Nr. 22/2000).

Zunächst wurden die Mäuse in eine ventilierte Kammer gegeben, die mit einem Kontrollsystem ausgestattet war, welches automatisch die Sauerstoffzufuhr regelte. Die hypoxischen Mäusegruppen wurden dabei jeweils 24 Stunden bzw. sieben Tage mit Luft versorgt, die einen prozentualen Anteil von 10 % Sauerstoff enthielt. Die normoxischen Mäuse hingegen wurden in einer äquivalenten Kammer mit Frischluft versorgt, die 20 % Sauerstoff enthielt. Nach 24 Stunden bzw. sieben Tagen wurden sowohl die normals auch die hypoxischen Mäuse aus den Kammern entfernt und nacheinander mit einer intraperitoneal verabreichten Injektionsnarkose (12 mg/kg KGW Xylazin und 100 mg/kg KGW Ketaminhydrochlorid in steriler Kochsalzlösung 0,9 % verdünnt; Applikationsvolumen  $\leq 10$  ml/kg KGW; Verdünnung Xylazin:Ketamin = 1:2; Verdünnung Ketamin-Xylazin-Gemisch:NaCl 0,9 % = 1:4) betäubt. Zur Antikoagulation wurden unter Narkose 1000 IE Heparin/kg KGW intraperitoneal appliziert. Im nächsten Schritt wurde ein medianer Hautschnitt vom Kinn des Tieres bis zum Bauch vorgenommen und die Haut zügig seitlich wegpräpariert. Dann wurde die Trachea freigelegt und zwischen zwei Knorpelspangen mit einer 23G Kanüle durch Stichinzision eröffnet. Die Kanüle wurde schließlich vorsichtig von kranial über die Inzision in die Trachea eingeführt und mit einer Ligatur befestigt. Anschließend konnten mittels Skalpell und Pinzette die Bauchhöhle eröffnet und das Zwerchfell wegpräpariert werden. Im nächsten Schritt wurden der Thorax parasternal eröffnet und die Lungen freipräpariert. Die Arteria pulmonalis wurde katheterisiert, im Anschluss wurde ein artifizielles Perfusionsmedium (modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer) infundiert. Direkt nach Infusionsbeginn wurde die linke Herzkammer eröffnet und die Aorta ligiert, was in diesem Moment zum Kreislaufstillstand und somit zum Tod des Tieres führte. Das geschilderte Vorgehen stellt für das Tier einen absolut schmerzfreien Zustand bis zur Tötung sicher.

Im nächsten Schritt wurde über die intratracheale Kanüle mit einer Spritze isotonische Kochsalzlösung appliziert, um damit die Lungen zu waschen. Bei dieser Prozedur färbten sich die Lungen weiß, da durch das Waschen das gesamte Blut im Gefäßsystem der Lungen entfernt wurde. Danach wurde ebenfalls über die intratracheale Kanüle TissueTek® mit Leitungswasser im Verhältnis 1:1 appliziert. Dieser Schritt führte zu einer Ausdehnung der Lunge und zur Fixierung der Lungenstrukturen von innen. Dies war für die Anfertigung von Kryoschnitten und deren Qualität von Bedeutung.

Im letzten Schritt wurden die Lungen vollständig herauspräpariert und in TissueTek® gelegt. Danach wurden die Lungen in flüssigem Stickstoff langsam von unten nach oben eingefroren und entweder direkt verwendet oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Bearbeitung tiefgefroren.

#### 2.2.1.2 Isolierung der Mäuselungen für das Western-Blot-Verfahren

Die Isolierung der normoxischen und hypoxischen Mäuselungen für die Untersuchung mit dem Western-Blot-Verfahren wurde weitestgehend wie oben beschrieben vorgenommen. Für dieses Verfahren war es allerdings nicht von Bedeutung, die Lungen wie oben mit TissueTek® und Leitungswasser aufzubereiten. Daher wurde dieser Schritt bei diesen Lungen unterlassen.

### 2.2.2 Lasergesteuerte Mikrodissektion

#### 2.2.2.1 Anfertigung der Gefrierschnitte

Zur Anfertigung der Gefrierschnitte wurden zunächst die im Gefrierschrank bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Mäuselungen auf  $-20^{\circ}\text{C}$  temperiert. Dann wurde jeweils eine Lunge auf einen Stempel aufgetragen und in TissueTek® eingebettet und fixiert. Im Anschluss konnten der Stempel mit der Lunge in den Kryostaten eingespannt und Schnitte von  $10\ \mu\text{m}$  Dicke angefertigt werden. Die Schnitte wurden zuletzt auf Deckgläser aufgenommen und in Hämalaun gefärbt. Das restliche Lungengewebe wurde schließlich wieder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren.

### 2.2.2.2 Färbung der Gefrierschnitte

Für die Färbung der Gefrierschnitte wurden die Objektträger mit den Gefrierschnitten anschließend für 30 Sekunden in Hämalaun gefärbt. Die Schnitte mussten danach zweimal kurz in Wasser gewaschen und dann mit der aufsteigenden Alkoholreihe (2 x 70 %, 2 x 96 % und 2 x 100 %) fixiert werden. Dieser Schritt war wichtig für die Entfernung von Wasser und damit notwendig für die Haltbarkeit der Lungenschnitte. Damit die Schnitte nicht austrockneten, wurden sie bis zum weiteren Gebrauch in einer Küvette mit Alkohol (100 %) aufbewahrt.

### 2.2.2.3 Mikrodissektionsverfahren

Beim Mikrodissektionsverfahren wurde das UV-Laser MICROBEAM System (P.A.L.M., Bernried) benutzt, bei welchem ein PC und eine Computermouse mit einem Mikroskop verbunden sind. Durch diese Verbindung konnte der Ausschnitt des Lungengewebes unter dem Mikroskop auf einem PC-Monitor wiedergegeben werden, so dass die folgenden Schritte unter visueller Kontrolle erfolgen konnten. Des Weiteren konnten über die Computermouse ein Mikromanipulator und der Objektträger sehr präzise bewegt werden. Mithilfe eines Laserstrahls ermöglichte dieses System zudem das gewünschte Gewebe vom Nachbargewebe sauber abzutrennen. Das isolierte Gewebe konnte schließlich vom Objektträger entfernt werden, indem eine 23G Kanüle auf den Mikromanipulator aufgesetzt und damit vorsichtig das entsprechende Gewebestück unter kontinuierlicher visueller Kontrolle über den Monitor aufgenommen wurde.

Die Nadelspitzen mit dem daran hängenden Gewebe wurden dann in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 350 µl RLT Puffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol überführt. Von jeder einzelnen Lunge wurden so jeweils 40 Nadeln mit Lungengefäßen (Arterien und Venen) und 40 Nadeln mit Septumgewebe (Okulargröße) aufgenommen. Damit die Schnitte nicht austrockneten wurden sie zwischendurch mit Alkohol (100 %) benetzt. Außerdem wurden die Schnitte längstens für zwei Stunden verwendet, um die Qualität der RNA kontinuierlich sicher zu stellen. Der RLT-Puffer diente hierbei zur Zell-Lyse und β-Mercaptoethanol als Reduktionsmittel, um das Material vor endogenen und exogenen RNAsen zu schützen und damit einer RNA-Degradation vorzubeugen. Zuletzt konnte entweder direkt im Anschluss die RNA-Extraktion erfolgen, oder die Eppendorf-Gefäße

konnten mit dem Material zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### 2.2.3 RNA-Isolierung

Bevor die RNA aus dem mikrodisezierten Material isoliert werden konnte, sollte die am besten geeignete Methode zur RNA-Isolierung gefunden werden. Es wurden dabei drei unterschiedliche Methoden überprüft.

- RNA-Isolierung mit dem Roti-Quick-Kit
- RNA-Isolierung mit dem E.Z.N.A.® Total RNA Kit
- RNA-Isolierung mit dem GTC-Protokoll nach Chomczynski und Sacchi (124)

Bei der ersten und dritten o. g. Methode wurden Typ II alveoläre Epithelzellen (A549-Zellen) verwendet. Da in einigen Versuchen auch Lungenhomogenat verwendet werden sollte, wurde mit dem E.Z.N.A.® Total RNA Kit die RNA-Isolierung aus Homogenat von Normoxie-Lungen durchgeführt. Mit jeder Methode wurde jeweils dreimal RNA isoliert und gemessen, um im Anschluss die Ergebnisse miteinander zu vergleichen.

#### 2.2.3.1 RNA-Isolierung mit dem Roti-Quick-Kit

Zur RNA-Isolierung mit dem Roti-Quick-Kit wurden die Zellen zunächst zweimal mit 10 ml Hanks-Puffer und danach mit 2 ml Trypsin versetzt. Im Anschluss wurden sie fünf Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Dann wurde diese Suspension auf 10 ml mit Wachstumsmedium (Ham's) aufgefüllt und zehn Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Die Zellen, die sich nun sichtbar als Pellet am Boden des Falcon Tubes abgesetzt hatten, wurden danach in dem überstehenden Wachstumsmedium resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen gezählt, wozu 10  $\mu\text{l}$  Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit 10  $\mu\text{l}$  Trypanblau gemischt wurden. Von diesem Gemisch wurden schließlich 10  $\mu\text{l}$  auf eine Zählkammer gegeben. Danach konnten die Zellen

unter einem Lichtmikroskop gezählt und damit das gewünschte Volumen für die weiteren Schritte errechnet werden. Dabei wurden immer die folgenden Zellzahlen ermittelt.

$$1e^6 = 1.000.000 \text{ Zellen}$$

$$1e^5 = 100.00 \text{ Zellen}$$

$$1e^4 = 10.000 \text{ Zellen}$$

Das errechnete Volumen der Zellsuspension wurde dann in jeweils ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. Diese Schritte erfolgten ebenso bei der Isolierungsmethode mit dem GTC-Protokoll nach Chomczynski und Sacchi und werden bei der Beschreibung dieser Methode daher nicht mehr zusätzlich erwähnt.

Zu den Zellen wurden als nächstes je 150 µl der Lösungen 1 (GTC) und 2 (Phenol/Chloroform) des Kits hinzugefügt. Die Mischung konnte dann zwei bis fünf Minuten mit dem Vortex-Rüttler gemischt, zehn Minuten auf Eis inkubiert und schließlich 15 Minuten bei 4°C und 12.000 rpm zentrifugiert werden.

Nach diesem Schritt kam am Boden des Eppendorf-Gefäßes ein Pellet zur Darstellung. Über dem Pellet hatte sich eine wässrige Phase gebildet, aus der die RNA extrahiert werden konnte. Dieser Überstand musste dafür vorsichtig mit einer Pipette entfernt und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt werden. In das Gefäß wurden ebenfalls 150 µl der Lösung 3 (Isopropanol) des Roti-Quick-Kits gegeben. Beide Reagenzien wurden mit einem Vortexer gut vermischt und über Nacht bei -80°C tiefgefroren.

Am nächsten Tag wurden die Lösungen einer fünfzehnminütigen Zentrifugierung bei 4°C unterzogen. Danach zeigte sich am Boden des Eppendorf-Gefäßes erneut ein Pellet, in dem sich nun die RNA befand. Der Überstand wurde mit einer Pipette entfernt. Das Pellet wurde dann zweimal vorsichtig mit 100 µl Ethanol (80 %) gewaschen, um letzte Verunreinigungen zu beseitigen. Zur Entfernung eventueller Ethanolrückstände, wurde das Pellet luftgetrocknet und danach in 15 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Die RNA konnte dann zur weiteren Untersuchung direkt verwendet oder bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert werden.

### 2.2.3.2 RNA-Isolierung mit dem E.Z.N.A.® Total RNA Kit

Der erste Schritt bei der RNA-Isolierung mit dem E.Z.N.A.® Total RNA Kit bestand darin ein Homogenat herzustellen. Dazu wurden zunächst ca. 40 mg eines bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Lungengewebes in flüssigen Stickstoff gelegt und in einem Mörser pulverisiert. Das Pulver wurde dann in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 400  $\mu\text{l}$  TRK-Lyse-Puffer und 8  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt. Im Anschluss wurde das Gemisch auf Shredder Säulen geladen und anschließend für fünf Minuten bei 12.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Sinn in diesem Schritt lag darin, dass hierbei alle vorhandenen RNAsen und sonstigen Enzyme, die eine RNA-Degradation hervorrufen könnten, inhibiert wurden.

Im zweiten Schritt wurde dem Lysat ein dem Lysat identisches Volumen Ethanol (70 %) hinzugefügt und durch Vortexen gut gemischt. Eine HiBind®-Zentrifugensäule wurde in ein 2 ml Sammel-Tube (E.Z.N.A.®) gesteckt und die Probe darauf geladen. Die Säule im Tube wurde dann 15 Sekunden bei 10.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Dabei banden die RNA-Moleküle an die in der HiBind®-Zentrifugensäule enthaltene Silikamembran. Der Säulendurchfluss wurde daraufhin verworfen. Bei diesem Schritt war es zudem wichtig darauf zu achten, dass das Fassungsvermögen der Säule nur 650  $\mu\text{l}$  betrug. Durch Wiederholung von Befüllen und Zentrifugieren konnten aber auch größere Volumina verarbeitet werden. Dabei war wiederum darauf zu achten, dass die Säule maximal 100  $\mu\text{g}$  RNA binden konnte.

Als nächstes wurden 600  $\mu\text{l}$  RNA-Waschpuffer I auf die Säule pipettiert und für 15 Sekunden bei 10.000 rpm durch die Säule zentrifugiert. Danach wurde die Säule auf ein frisches Sammel-Tube gesteckt. Der Säulendurchfluss und das alte Sammel-Tube wurden entsorgt. Anschließend wurden 500  $\mu\text{l}$  eines komplettierten Waschpuffers II auf die Säule pipettiert. Komplettiert bedeutete hier, dass dem Pufferkonzentrat eine bestimmte Menge Ethanol (100 %) hinzugefügt war. Dieser Waschpuffer wurde dann für 15 Sekunden bei 10.000 rpm und Raumtemperatur durch die Säule zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, wobei der Säulendurchfluss verworfen wurde. Durch diese beiden Waschungen sollten zelluläre Reste und andere Kontaminationen effizient entfernt werden.

Nachdem der Säulendurchfluss verworfen wurde, konnte die Zentrifugensäule wieder auf das Sammel-Tube gesteckt und eine Minute bei 14.000 rpm zentrifugiert und dabei

vollständig getrocknet werden. Um die gewonnene RNA zu eluieren, wurde die Zentrifugensäule im Anschluss auf ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesteckt. Dann wurden 15 µl DEPC-dH<sub>2</sub>O direkt auf die Membran pipettiert und eine Minute bei 10.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Zuletzt wurde das Eluat mittels Nano-Drop® untersucht.

### 2.2.3.3 RNA-Isolierung mit dem GTC-Protokoll nach Chomczynski und Sacchi

Für die RNA-Isolierung mit dem GTC-Protokoll nach Chomczynski und Sacchi wurde den Zellsuspensionen zunächst 3 µl β-Mercaptoethanol und 300 µl GTC-Puffer zugefügt, um RNAsen und andere Enzyme, die eine RNA-Degradation hervorrufen können, zu inhibieren. Es folgte eine Inkubationsphase von zehn Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden die Proben mit dem Vortexer durchmischt. Anschließend wurden je 30 µl 2M NaAc, 330 µl Phenol (pH 4,3) und 90 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugefügt, gut vermischt und dann 15 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Dadurch kam es zur Denaturierung von Proteinen und DNA, was an einer dreischichtigen Phasenbildung erkannt werden konnte, wobei sich die Proteine und DNA in der unteren und mittleren, der sog. organischen Phase bzw. Interphase, gesammelt hatten. In der oberen wässrigen Phase hingegen befand sich die RNA.

Hintergrund hierbei war, dass sich DNA und RNA bei saurem pH-Wert des Phenols separieren. Wenn man Phenol bei einem pH-Wert von 7,0 hinzugeben hätte, dann hätten sich sowohl die RNA als auch die DNA in der wässrigen Phase befunden. Die wässrige Phase wurde anschließend vorsichtig abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Um die RNA-Ausbeute zu erhöhen, wurden zu der Phenol-Lösung nochmals 150 µl GTC und 15 µl NaAc zugefügt, gevortext und 15 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde dann der bereits gewonnenen zugefügt.

Im Anschluss folgte ein Fällungsschritt, indem der wässrigen Phase eine äquivalente Menge von -20°C kalten Isopropanols zugefügt und die Proben bei -20°C für eine Stunde tiefgefroren wurden. Das Prinzip in diesem Schritt beruhte darauf, dass die Fällungsreaktion mit Isopropanol suffizienter ist als mit Ethanol. Nukleinsäuren fallen zudem in hoher Konzentration (250 ng/µl) sehr schnell aus. Da man davon ausgehen musste, dass

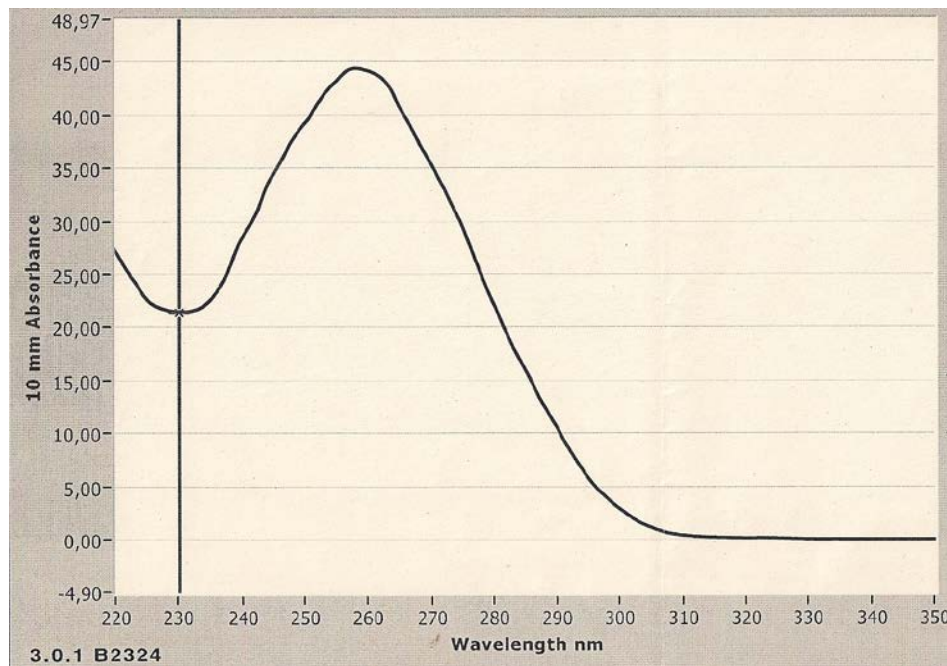
die RNA-Menge in den vorliegenden Proben geringer war, wurden die Proben daher noch mal tiefgefroren, da die Ausbeute damit erhöht werden konnte.

Nach einer Stunde wurden die Proben 15 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert, wobei sich am Boden des Gefäßes ein Pellet gebildet hatte. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig abpipettiert. Zur Reinigung des Pellets von Isopropanolresten und anderen Kontaminationen wurden dann 300 µl -20°C kalten Ethanol (75 %) dazugegeben und nochmals 15 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand entfernt und das Pellet unter laminar flow luftgetrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in 15 µl RNase-freiem Wasser gelöst, die RNA mittels NanoDrop® gemessen und dann bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

#### 2.2.4 RNA-Messung mittels NanoDrop®

Um sicher zu gehen, dass tatsächlich RNA gewonnen wurde und da drei Methoden zur RNA-Isolierung bezüglich der Ausbeute und Reinheit des Produktes verglichen werden sollten, wurde im Anschluss an die Isolierung eine Untersuchung mit dem NanoDrop® durchgeführt. Dieses Gerät ermöglichte unter anderem eine quantitative und qualitative Aussage über die gewonnene RNA zu machen und wurde bei allen drei Isolierungsmethoden zur Bestimmung der RNA angewendet.

Das Prinzip beruht laut Herstellerangaben auf der photometrischen Konzentrationsbestimmung der RNA, welche ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm besitzt. Eine optische Dichte (OD) von 1,0 bei 260 nm entspricht per definitionem einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Die meisten Proteine hingegen haben ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm. Als Maß für die Reinheit des Produktes wird dabei der Extinktions-Quotient  $E_{260}:E_{280}$  benutzt. Dieser liegt bei 1,6 bis 2,0. Werte über 2,0 deuten hierbei auf einen hohen RNA-Anteil hin, wohingegen Werte unter 1,8 für einen erhöhten Proteinanteil sprechen. In der nachfolgenden Abbildung ist beispielhaft ein Ergebnis der RNA-Messung mittels NanoDrop® dargestellt.



**Abb. 2: Beispiel für die graphische Darstellung eines Ergebnisses der RNA-Messung mittels NanoDrop®.** Diese Untersuchung ermöglicht eine quantitative und qualitative Aussage bezüglich der gewonnenen RNA. Das Prinzip beruht auf der photometrischen Konzentrationsbestimmung der RNA, deren Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm liegt. Die optische Dichte (= Absorbance, y-Achse) wurde gegen die Wellenlänge (x-Achse) aufgetragen. Das Absorptionsmaximum liegt in diesem Beispiel bei einer Wellenlänge von 260 nm und zeigt damit, dass in der Probe ein hoher RNA-Anteil vorliegt.

### 2.2.5 cDNA-Synthese

Da RNA im Allgemeinen als sehr empfindlich und instabil gegenüber äußerlichen Einflüssen gilt, wurde für die nächsten Arbeitsschritte aus der gewonnenen RNA die dazu komplementäre und stabilere Complementary DNA (cDNA) hergestellt. Diese cDNA ist eine einzelsträngige DNA, deren Basensequenz komplementär zur RNA ist. Die Basensequenz entspricht also einem Strang der DNA.

Das Prinzip der cDNA-Synthese ist, dass eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die sog. Reverse Transkriptase, die RNA in DNA umschreibt. Damit dieses Enzym an die RNA binden kann, benötigt es spezifische Ansatzstellen. Diese wurden in Form von Primern, die komplementär zum RNA-Strang sind, hinzugefügt. In der vorliegenden Arbeit wurde dabei die Random-Priming-Technik verwendet, wofür eine Mischung aus verschiedenen Hexanukleotiden (random hexamers) als Primer genutzt wurde. Die reverse Transkription konnte dabei an mehreren verschiedenen Stellen gleichzeitig erfolgen, was auch die Ausbeute der cDNA erheblich steigerte.

Von jeder einzelnen RNA-Probe wurden ca. 100 ng zunächst in ein Eppendorf-Gefäß überführt, in einem PE GeneAmp PCR System 2400 fünf Minuten bei 70°C erhitzt und danach sofort in Eis gelegt. Die so denaturierte RNA bekam dadurch eine glattere Struktur, so dass das Enzym Reverse Transkriptase besser daran binden konnte. Insgesamt sollte das Reaktionsvolumen 25 µl betragen, daher wurde im nächsten Schritt eine eventuelle Differenz ausgeglichen, indem RNase-freies, steriles Wasser (molecular and biology grade) zur RNA dazugegeben wurde. Danach wurden der RNA die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Reagenzien hinzugefügt.

**Tab. 3: Reagenzien zur cDNA-Synthese**

1st strand buffer	5,0 µl
DTT	2,5 µl
RNase inhibitor	0,5 µl
dNTPs	1,0 µl
Random Hexamers	1,5 µl
dH <sub>2</sub> O	entsprechend der Differenz
Reverse Transkriptase	1,0 µl
RNA	100 ng

Das Reaktionsgemisch wurde im Anschluss im PE GeneAmp PCR System 2400 einem definierten Programm zur cDNA-Synthese (50 Minuten bei 37°C, danach fünf Minuten bei 94°C und schließlich Abkühlen auf 4°C) unterzogen. Die so hergestellte cDNA wurde dann für die rt-PCR verwendet oder bis zu ihrer weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

### 2.2.6 „Real-Time“ PCR mit SYBR®-Green

Um aussagekräftige Ergebnisse bei den Experimenten zu erhalten, wurden DNA-Fragmente in großen Mengen benötigt. Mit der rt-PCR war es diesbezüglich möglich, DNA sehr effektiv zu kopieren oder zu amplifizieren. In dieser Arbeit wurde für die rt-

PCR der fluoreszierende Farbstoff SYBR®-Green verwendet. Hierbei handelte es sich um einen spezifisch an doppelsträngige DNA bindenden Farbstoff, der jeder Probe mit einem Mastermix zugeführt wurde. Sobald während des Reaktionszyklus neue DNA-Doppelstränge gebildet wurden, lagerte sich der Farbstoff an jede neue Kopie von doppelsträngiger DNA an. Das Ergebnis war eine verstärkte Intensität des Fluoreszenzsignals, welches zu der steigenden Kopienzahl proportional war.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Gene Aa, Ab1 und Eb1 als Bestandteile des MHCII-Komplexes, CD74, Cathepsin S, TLR2 und CCL5 hinsichtlich ihrer Expression in zwei verschiedenen Lungenkompartimenten, zum Einen im Lungenseptum und zum Anderen in Lungengefäßen untersucht. Zusätzlich wurde zu jedem Primer-Paar eine Negativkontrolle ohne Zusatz von cDNA analysiert, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen. Des Weiteren wurde bei jedem PCR-Lauf das Haushaltsgen PBGD (Porphobilinogen-Deaminase) als Standard amplifiziert. Dafür musste zunächst ein Mastermix, bestehend aus zweimal Puffer (enthält Taq-Polymerase), MgCl<sub>2</sub>-Lösung und Aqua dest., zubereitet werden. Jeweils 19 µl dieses Mastermix wurden auf acht Reaktionsgefäße verteilt und mit jeweils 0,5 µl des Forward- und Reverse-Primers bestückt. Zu diesem Gemisch wurden dann 5 µl cDNA dazu pipettiert, wobei die cDNA eine Konzentration von 2 ng/µl hatte. Die rt-PCR wurde schließlich mit dem ABI PRISM 7700 Sequence Detector System durchgeführt. In der nachfolgenden Tabelle sind die Reaktionszyklen der rt-PCR aufgeführt.

**Tab. 4: Reaktionszyklen der rt-PCR**

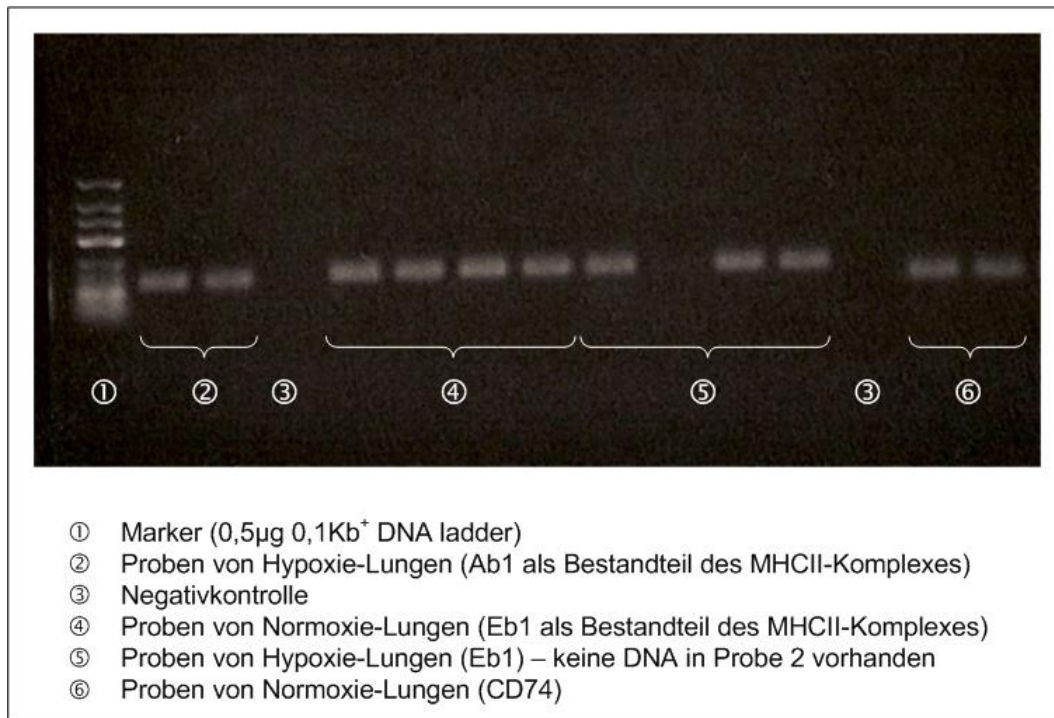
Die Schritte 2 bis 4 werden ca. 30 bis 45 mal wiederholt

<b>1. Vorlauf (optional)</b>	95°C	Strang-Denaturierung
<b>2. Denaturierung</b>	95°C	DNA-Doppelstränge werden getrennt
<b>3. Annealing</b>	55°- 65°C (primerabhängig)	Anlagerung der Primer an die Einzelstränge
<b>4. Elongation</b>	72°C	Durch die Polymerase wird ein neuer Strang erzeugt  (Amplifikationsgeschwindigkeit ca. 15 Basenpaare/sec.)

Um die Validität der Ergebnisse zu prüfen wurde jede cDNA-Probe dreimal mittels rt-PCR untersucht. Im Anschluss wurde zur bildlichen Darstellung der Amplifikationsprodukte eine Agarose-Gelelektrophorese vorgenommen.

### 2.2.7 Nachweis von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Um das in der PCR entstandene Produkt sichtbar zu machen, wurde anschließend eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde zunächst ein elektrisches Feld an ein Träger-Gel angelegt, wobei jedes Molekül eine spezifische Wanderungsgeschwindigkeit entwickelte. Diese Wanderungsgeschwindigkeit war abhängig von Größe, Form und Ladung des Moleküls, sowie der angelegten Spannung. Da im vorliegenden Experiment DNA untersucht werden sollte, wurde zur Auftrennung ein grobporiges Agarose-Gel verwendet. Dies ist ein Polysaccharid und wird aus Algen gewonnen. Dem noch flüssigen Gel wurde anschließend Ethidiumbromid zugeführt, welches mit der DNA einen Komplex bildete, der unter UV-Licht fluoreszierte. Dabei war die Intensität, mit der der Ethidiumbromid-DNA-Komplex fluoreszierte, zusätzlich abhängig von der Menge der vorhandenen Ethidiumbromid-DNA-Komplexe. Um eine Aussage über die Größe der DNA zu machen, wurde zum Vergleich ein Marker mit aufgetrennt, welcher DNA in bekannter Größe enthielt. Es wurde ein grobporiges Agarose-Gel gewählt, da bei einem feinporigen Gel die Gefahr bestanden hätte, dass sich die DNA-Moleküle in dem Maschennetz verfangen und nicht mehr weiter wandern. Die Porengröße war dabei maßgeblich abhängig von der Konzentration der zugeführten Agarose. Je höher dessen Konzentration war, desto kleiner und feiner wurden die Poren. Da die DNA und deren Nukleotide negativ geladen waren, wanderten sie im Gel zur positiven Elektrode (Anode). In der nachfolgenden Abbildung ist beispielhaft der Nachweis von DNA mit der Agarose-Gelelektrophorese dargestellt.



**Abb. 3: Beispiel für den Nachweis von DNA mit der Agarose-Gelelektrophorese.** Links unter 1 wurde zunächst ein Marker aufgetragen, anhand dessen die Größe der DNA bestimmt werden konnte. Unter 2 wurden zwei Proben von Hypoxie-Lungen aufgetragen, bei denen Ab1 als Bestandteil des MHCII-Komplex nachgewiesen werden sollte. In der vierten und dreizehnten Aussparung, also unter 3, wurde jeweils eine Kontrolle ohne Protein aufgetragen. In den in der Abbildung als 4 und 5 benannten Punkten wurden Proben von Normoxie- (4) und Hypoxie-Lungen (5) hinsichtlich der Expression von Eb1 (ebenfalls Bestandteil des MHCII-Komplex) aufgetrennt. Hier ist gut sichtbar, dass in der Probe, die in die zweite Aussparung unter 5 injiziert wurde, offensichtlich keine DNA enthalten war. Unter 6 sind Proben von Normoxie-Lungen dargestellt, die auf CD74 untersucht wurden.

### 2.2.8 Immunhistochemie an Gefrierschnitten von Mäuselungen

Die wie zuvor beschrieben präparierten normoxischen und hypoxischen Mäuselungen (siehe Abschnitt 2.2.1.1) mussten bis zu zwei Stunden vor dem Schneiden im Kryotomen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden, um eine Immunhistochemie an den Gefrierschnitten durchzuführen. Dadurch konnte eine bessere Qualität der Schnitte erreicht werden. Gefrierschnitte, die von  $-80^{\circ}\text{C}$  kalten Lungen gemacht wurden, erschienen sehr vulnerabel und mussten daher im Verlauf des weiteren Prozedere verworfen werden, da die Strukturen der Lungen nach mehrfachem Spülen nicht mehr gut zu erkennen waren. Nach dem Auftauen wurden Schnitte von  $10\ \mu\text{m}$  Dicke gemacht und diese auf Objektträger aufgenommen. Die Schnitte mussten anschließend 24 Stunden bei Zimmertemperatur trocknen.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte zur Fixierung zehn Minuten in  $-20^{\circ}\text{C}$  kaltem Aceton gebadet und dann bei Zimmertemperatur vollständig getrocknet (mind. 30 Minuten). Damit bei Applikation der Antikörper-Verdünnungen diese nicht auf dem Objektträger verliefen, wurden die Schnitte zunächst mit einem Fettstift (DAKO®) umrandet. Dann mussten die Schnitte in TBS-Puffer für fünf Minuten gewaschen werden. Die Schnitte wurden danach aus der Lösung entnommen und vorsichtig auf Papier abgeklopft.

Im nächsten Schritt wurde das DAKO® Biotin Blocking System eingesetzt. Hierbei wurden die Präparate zuerst mit je zwei bis drei Tropfen Avidin Solution bedeckt, nach zehn Minuten kurz mit TBS-Puffer gewaschen und dann mit je zwei bis drei Tropfen Biotin Solution inkubiert. Es folgte eine fünfminütige Waschung in TBS-Puffer. In der Zwischenzeit wurden die Antikörper auf die entsprechende Verdünnung in DAKO® Antibody Diluent eingestellt. Jedes Präparat wurde dann mit  $200\ \mu\text{l} - 300\ \mu\text{l}$  Antikörperlösung bedeckt und über Nacht in einer feuchten Kammer bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte zunächst wieder eine fünfminütige Waschung mit TBS-Puffer. Zwischenzeitlich wurde der biotinylierte Sekundärantikörper auf die gewünschte Verdünnung in DAKO® Antibody Diluent gebracht. Dann wurden die Präparate erneut mit  $200\ \mu\text{l} - 300\ \mu\text{l}$  Antikörperlösung bedeckt. Es folgte eine Inkubationsphase von 45 Minuten bei Zimmertemperatur und danach eine kurze Waschung in TBS-Puffer. Währenddessen wurde der Tertiärantikörper (Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat = SA-AP) in DAKO® Antibody Diluent verdünnt, auf die Schnitte pipettiert und eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Es folgte ein fünfminütiger Waschschrift.

Parallel wurde die Lösung zur Färbung der Präparate angefertigt. Hierzu wurde das DAKO® Fast Red Substrate System benutzt und die Lösung entsprechend der Herstellerangaben zubereitet. Mit der Lösung wurden die Schnitte 20 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte zunächst zweimal mit TBS-Puffer gewaschen und dann 30 Sekunden in filtriertem Hämalaun gegengefärbt. Nun wurden die Schnitte nochmals für zehn Minuten in Leitungswasser gestellt, bevor sie dann mit DAKO® Ultramount Eindeckmedium eingedeckt und dann im Trockenschrank bei  $70^{\circ}\text{C}$  getrocknet werden konnten.

In der vorliegenden Arbeit wurden Kryoschnitte sowohl von norm- als auch hypoxischen Mäuselungen immunhistochemisch behandelt und bezüglich der Unterschiede in

den einzelnen Kompartimenten (Lungenseptum, Bronchus und Gefäße) untersucht. Zur mikroskopischen Analyse wurde das Axioskop® der Firma Zeiss (Wetzlar) verwendet. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm „Discus“ (Büro Hilgers, Königswinter) in zwanzigfacher Vergrößerung. In den nachfolgenden Tabellen sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sowie deren Verdünnungen und Hersteller aufgeführt.

**Tab. 5: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie**

Primär-Antikörper	Sekundär-Antikörper	Tertiär-Antikörper
MHCII Ratte $\alpha$ Maus	Kaninchen $\alpha$ Ratte, biotinyliert	SA-AP (Streptavidin-alkalische Phosphatase)
CD74 Ratte $\alpha$ li	Kaninchen $\alpha$ Ratte, biotinyliert	SA-AP (Streptavidin-alkalische Phosphatase)
TLR2 Kaninchen $\alpha$ Maus	Ziege $\alpha$ Kaninchen	$\alpha$ Ziege-alkalische Phosphatase
CtsS Ziege $\alpha$ Maus	$\alpha$ -Ziege-APAAP	-
IgG2b Ratte $\alpha$ Maus	Kaninchen $\alpha$ Ratte, biotinyliert	SA-AP (Streptavidin-alkalische Phosphatase)

**Tab. 6: Verwendete Primär-Antikörper mit Angabe von Verdünnung und Hersteller**

Primär-Antikörper	Verdünnung	Hersteller
MHCII (I-A/I-E)	1:350	BD Pharmingen™, Hamburg
CD74	1:500	BD Pharmingen™, Hamburg
TLR2	1:200	eBiosciences, SanDiego, USA
CtsS	1:10, 1:100	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
IgG2b	1:350	BD Pharmingen™, Hamburg

**Tab. 7: Verwendete Sekundär-Antikörper mit Angabe von Verdünnung und Hersteller**

<b>Sekundär-Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Kaninchen $\alpha$ Ratte, biotinyliert	1:100	BD Pharmingen™, Hamburg
Ziege $\alpha$ Kaninchen	1:150	BD Pharmingen™, Hamburg

**Tab. 8: Verwendete Tertiär-Antikörper mit Angabe von Verdünnung und Hersteller**

<b>Tertiär-Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Streptavidin-alkalische Phosphatase	1:200	DakoCytomation, Hamburg
$\alpha$ Ziege-alkalische Phosphatase	1:200	Rockland Inc., Gilbertsville, USA

### 2.2.9 Western-Blot-Verfahren

Mit dem Western-Blot-Verfahren ist es möglich, verschiedene Proteine aus Proteingemischen zu identifizieren und zu quantifizieren. Dazu wurden spezifische Antikörper verwendet, die an antigene Epitope des zu untersuchenden Proteins binden, welches wiederum auf einer Membran fixiert ist. Dieses Verfahren lässt sich dabei in drei Versuchsabschnitte unterteilen. An erster Stelle steht die Gelelektrophorese, mit welcher die Auftrennung des Proteingemischs erfolgt. Im Anschluss werden die Proteine auf eine Membran übertragen. Zuletzt erfolgt die Detektion der Proteine. Der genaue Ablauf des Verfahrens wird in den nächsten Abschnitten erklärt.

#### 2.2.9.1 Isolierung von Protein aus Mäuselungen

Zur Isolierung von Protein aus den Mäuselungen wurde zuerst eine spezielle Pufferlösung zubereitet. Diese bestand aus 1 ml NP40-Puffer der mit 20  $\mu$ l Complete (Proteas-

inhibitor) und 10  $\mu\text{l}$  Vanadate (Phosphataseinhibitor) vermischt wurde. Davon wurden dann 250  $\mu\text{l}$  in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben.

Im nächsten Schritt wurden die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Normoxie- und Hypoxie-Lungen einzeln mit flüssigem Stickstoff in einen vorher mit Ethanol (70 %) desinfizierten Mörser gegeben und darin zerkleinert. Das dabei entstandene feine Pulver wurde zu der Pufferlösung hinzugefügt und danach bei Raumtemperatur und 13.000 rpm zehn Minuten zentrifugiert. Dabei bildeten sich eine feste untere und eine flüssige obere Phase. Die obere Phase, in der sich das Protein befand, wurde vorsichtig mit einer Pipette entfernt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die feste Phase mit zellulären Resten und anderen Kontaminationen wurde verworfen. Der nächste Schritt bestand darin, das gewonnene Protein hinsichtlich seiner Quantität zu untersuchen.

#### 2.2.9.2 Quantifizierung des isolierten Proteins

Zur Quantifizierung des isolierten Proteins erfolgte eine Proteinmessung in den Verdünnungen 1:10 und 1:5, wodurch eine genauere Aussage bezüglich des tatsächlichen Proteingehaltes der Proben gemacht werden konnte. Bei der 1:10-Verdünnung wurden 1,2  $\mu\text{l}$  der Proteinlösung mit 10,8  $\mu\text{l}$  Aqua dest. vermischt. Bei der 1:5-Verdünnung wurden zu 2,4  $\mu\text{l}$  Proteinlösung 9,6  $\mu\text{l}$  Aqua dest. hinzugefügt. Für die Messung wurde das Reaktionssystem Dc Protein Assay der Firma Bio-Rad verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde nach dem dazu gelieferten Protokoll angefertigt und schließlich mit dem UV max kinetic microplate reader® von Bender&Hobein und dem PC-Programm MicroWin® von Microsoft bei einer Wellenlänge von 650 nm analysiert. Damit konnte schließlich die Proteinkonzentration in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  bestimmt werden.

#### 2.2.9.3 Prinzip und Herstellung der diskontinuierlichen SDS-PAGE

Das Prinzip der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese ist, dass das Protein zwei verschiedene Gele durchlaufen muss. Dafür wurde zwischen einem Sammelgel (geringerer Acrylamidanteil), welches das Protein zuerst passieren musste, sowie einem Trenngel (höherer Acrylamidanteil) unterschieden. Das Sammelgel führte eine Agglomeration der Proteine herbei, wodurch diese dann fast gleichzeitig in das Trenngel ein-

treten konnten. Im Sammelgelpuffer waren Chloridionen enthalten, welche im Vergleich zum Protein eine hohe Wanderungsgeschwindigkeit besaßen, weshalb hier auch von sog. Leitionen gesprochen wird. Bestandteil des Laufpuffers war Glycin, welches bei einem pH-Wert des Sammelgels von 6,8 in ungeladener Form vorlag, weshalb die Glycinionen eine langsame Wanderungsgeschwindigkeit hatten und daher auch als Folgeionen bezeichnet werden. Zwischen den schnellen Leitionen und den langsamen Folgeionen entstand schließlich ein Bereich mit hoher elektrischer Spannung, da zu wenig Ladungsträger vorhanden waren. In diesem Bereich befanden sich die Proteine, die dadurch wiederum schneller wandern konnten. Als Ergebnis entstanden gut abgrenzbare, scharfe Banden.

Weiterhin bestimmte der Anteil des Acrylamids die Porengröße. Je mehr Acrylamid das Gel enthielt, desto kleiner waren die Poren. Das Trenngel enthielt daher zum Einen prozentual gesehen viel mehr Acrylamid, zum Anderen lag auch der pH-Wert mit 8,8 über dem des Sammelgels. Dadurch bekamen die Glycinionen eine negative Ladung und konnten damit die Proteine überholen, weshalb schließlich die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht erfolgen konnte. In der nachfolgenden Tabelle sind alle Materialien zur Herstellung des Trenngels aufgeführt.

**Tab. 9: Materialien zur Herstellung des Trenngels**

8,8 Tris	3 ml
Acryl 30 %	4 ml
SDS 10 %	120 µl
APS 25 %	24 µl
TEMED	12 µl
Aqua dest.	4,8 ml

Da Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED die Vernetzung von Polyacrylamidmonomeren starten, wurden diese erst zum Schluss hinzugefügt. Anschließend wurde ein Gelrahmen zu zwei Drittel mit dieser Flüssigkeit gefüllt. Der verbliebene Platz, der für das Sammelgel bestimmt war, wurde zunächst mit Aqua dest. vorsichtig aufgefüllt, was

ein Austrocknen des Gels verhinderte. Nach ca. 30 bis 45 Minuten war die Polymerisation abgeschlossen. Das überstehende Wasser konnte dann verworfen und das Sammelgel über das Trenngel aufgetragen werden. In der nachfolgenden Tabelle sind alle Materialien zur Herstellung des Sammelgels aufgeführt.

**Tab. 10: Materialien zur Herstellung des Sammelgels**

6,8 Tris	1,25 ml
Acryl 30 %	1 ml
SDS 10 %	50 $\mu$ l
APS 25 %	10 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l
Aqua dest.	2,68 ml

Nach dem Einfüllen dieser Mixtur wurden sofort Gelkämme in das Sammelgel eingesetzt, wodurch kleine Kammern zur Applikation der Proben geschaffen wurden. Zur Feststellung der Polymerisation der Gele wurde ein übriggebliebener Rest nach Befüllen der Gele in einem Falcon-Tube aufbewahrt, um bezüglich der Festigkeit der Gele eine Orientierung zu haben. Die Gele wurden entweder sofort verwendet oder über Nacht in feuchten Zellstoff und herkömmlicher Frischhaltefolie eingewickelt bei 4°C gelagert.

#### 2.2.9.4 Vorbereitung der Proben

Durch die Proteinmessung wurde die Proteinkonzentration in  $\mu$ g/ $\mu$ l bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.9.2). Für ein Gel wurden dabei von jeder Probe 10  $\mu$ g Protein untersucht. Über die bekannte Proteinkonzentration konnte schließlich die Menge an Protein errechnet werden. Diese Menge wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, mit 3  $\mu$ l Ladungspuffer (verdünnt aus 10 x Stock: 60 % Glycerol, 100 mM Tris pH 7.5, 1  $\mu$ M EDTA, 0,5 mg/ml Bromphenolblau, 0,5 mg/ml Xylene Cyanol) versetzt und auf 10  $\mu$ l mit Aqua dest. aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben fünf Minuten bei 95°C in-

kubiert und damit denaturiert, wodurch das Protein eine glattere Struktur erhielt, was wiederum für einen besseren Lauf durch das Gel sorgte. Anschließend wurden die Proben direkt in Eis gelegt und konnten nach einer kurzen Kühlungsphase auf das Gel appliziert werden. Bei den Proben für den MHCII-Nachweis wurde auf die Inkubation verzichtet, da es sich bei diesem Protein um ein Dimer handelt und es durch die Inkubation zur Dissoziation kommen könnte und dadurch wiederum der Antikörper nicht binden würde.

#### 2.2.9.5 SDS-Gelelektrophorese

Für die SDS-Gelelektrophorese mussten zunächst die Gele (maximal zwei) in die Elektrophoresekammer (BIO-RAD) eingesetzt werden. Dann wurden 100 ml Elektrophoresepuffer (siehe Abschnitt 2.1.1) mit 900 ml Aqua dest. vermischt. Diese Pufferlösung wurde anschließend in die Kammer gefüllt. Die Kämme wurden entfernt, sodass die Aussparungen für die Proben freigelegt waren. In die erste Aussparung wurde zunächst ein Standard aufgetragen (Precision Plus Protein™ Standards, BIO-RAD), anhand dessen später das Molekulargewicht der Proteine bestimmt werden konnte. Danach wurden die Proben aufgetragen. Zusätzlich wurde bei jedem Gel als Negativkontrolle eine Probe appliziert, die nur Aqua dest. und Ladepuffer enthielt, der aber kein Protein zugefügt war. Die Elektrophorese wurde dann zwei Stunden bei 40 mA und 88 Volt mit dem High Voltage Power Pack (Biometra) durchgeführt.

#### 2.2.9.6 Blotting-Verfahren

Im nächsten Schritt erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Membran. Hierbei handelte es sich um einen elektrophoretischen Proteintransfer, den sog. „Wet Blot“. Der Vorteil des Wet Blots ist, dass nur eine geringe Erwärmung aufkommt und somit das Protein geschont wird. Der Wet Blot wurde dabei wie ein Sandwich aufgebaut, wofür zunächst eine Gelkassette, die aus zwei miteinander verbundenen Kunststoffgittern bestand, benötigt wurde. Ein dünner Schwamm aus Schaumstoff wurde in Transferpuffer (siehe Abschnitt 2.1.1) gewälzt und dann auf eine Hälfte des Kunststoffgitters gelegt. Darauf wurde im Anschluss eine Lage mit Transferpuffer getränktes Filterpapier (Gel-

Blotting-Papier) gelegt, worauf schließlich das aus dem Gelrahmen entnommene Gel vorsichtig aufgetragen wurde. Darauf folgte die kurz in Methanol getränkte Polyvinylidendifluorid-(PVDF)-Membran, die durch eine hohe Bindungskapazität für Proteine ausgezeichnet ist. Eine weitere Lage Filterpapier und ein zweiter Schaumstoffschwamm wurden wieder mit Transferpuffer getränkt und auf die Membran gelegt, sodass mit dem zweiten Kunststoffgitter die Gelkassette verschlossen werden konnte.

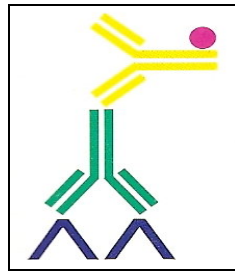
Insgesamt war bei dem Aufbau von Schwämmen, Filterpapier, Gel und Membran darauf zu achten, dass sich zwischen den einzelnen Lagen keine Luftblasen befanden, da dadurch der Transfer hätte gestört werden können. Die Gelkassette und ein Behälter mit Eis wurden anschließend in den Elektrophorese-Tank (BIO-RAD) eingesetzt und der Tank mit Transferpuffer gefüllt. Um eine gleichmäßige Kühlung zu erzielen wurde ein Rührfisch mit in den Tank gegeben und der Tank auf einen Magnetrührer gestellt. Der Transfer erfolgte mittels Anschluss an eine Stromquelle (High Voltage Power Pack, Biometra) über eine Stunde bei 100 Volt und 265 mA.

#### 2.2.9.7 Proteindetektion und Densitometrie

Um auch tatsächlich nur die gewünschten Proteine auf der Membran sichtbar zu machen, mussten zunächst sog. unspezifische Proteinbindungsstellen, an die häufig die Nachweisantikörper binden, geblockt werden. Dafür wurde die Membran aus der Gelkassette entfernt und kurz mit PBS (Waschpuffer, siehe Abschnitt 2.1.1) gewaschen. Anschließend wurde die Membran in eine Küvette überführt und zwei Stunden mit fünfprozentiger Milch (siehe Abschnitt 2.1.1) geblockt.

Im nächsten Schritt folgte die Antikörpermarkierung. Dazu wurde die sog. indirekte Methode verwendet, bei der nach dem Blocken ein antigenspezifischer Primärantikörper und anschließend ein speziesspezifischer Sekundärantikörper auf die Membran aufgetragen wurden. Diese Methode ist sehr sensitiv, da anzunehmen ist, dass mehrere Sekundärantikörper an verschiedene Epitope des Primärantikörpers binden, wodurch es wiederum zu einer Signalverstärkung kommt. Zunächst musste daher ein antigenspezifischer Primärantikörper adäquat in 6 ml fünfprozentiger Milch verdünnt und auf die Membran gegeben werden. Die Küvette mit der Membran wurde danach mit Parafilm bedeckt und die Membran über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die

Milch mit dem Primärantikörper entfernt und die Membran dreimal zehn Minuten mit PBS gewaschen. Der speziesspezifische Sekundärantikörper wurde in 6 ml fünfprozentiger Milch verdünnt, auf die Membran aufgetragen und eine Stunde inkubiert. Zuletzt wurde die Membran dreimal 15 Minuten mit PBS gewaschen. In der nachfolgenden Abbildung ist beispielhaft die Anlagerung eines enzymmarkierten Sekundärantikörpers an den Primärantikörper dargestellt.



**Abb. 4: Indirekte Methode.** Zuerst bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen. Im nächsten Schritt wird ein zweiter enzymmarkierter Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, aufgetragen. Danach erfolgt die Substrat-Chromogenreaktion (125).

Für die Visualisierung der Antikörperbindung an das Protein wurde ein chemilumineszenz Reaktionssystem, das ECL plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare, München) verwendet. Hierbei wurde durch eine chemische Reaktion Licht ausgesendet, ohne dass es dabei zu einer Temperaturerhöhung kam. Die Membran wurde fünf Minuten mit der Lumineszenz-Flüssigkeit inkubiert und anschließend in Frischhaltefolie eingepackt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Folie ganz glatt auf der Membran lag, da andernfalls eine verminderte Bildqualität zu erwarten gewesen wäre. Die Membran wurde anschließend in eine Röntgenkassette geklebt. In einer Dunkelkammer konnten dann der Röntgenfilm eingelegt und die Bilder in einer entsprechenden Röntgenanlage (Agfa, Köln) entwickelt werden.

Mit dem Western Blot sollten Proteine, welche aus Normoxie- und Hypoxielungen gewonnen wurden, hinsichtlich ihrer Expression von MHCII, Cathepsin S, CD74 und TLR2 untersucht werden. Als interner Standard wurde hierbei  $\beta$ -Actin verwendet, welches nicht unter Hypoxie reguliert ist. In den nachfolgenden Tabellen sind die in der vorliegenden Arbeit für den Western Blot verwendeten Antikörper sowie deren Verdünnung und Hersteller aufgeführt.

**Tab. 11: Verwendete Primär-Antikörper mit Angabe von Verdünnung und Hersteller**

Primär-Antikörper	Verdünnung	Hersteller
MHCII	1:5000	BD Pharmingen™, Hamburg
CD74	1:1000	BD Pharmingen™, Hamburg
Cathepsin S	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
TLR2	1:2000	eBiosciences, San Diego, USA

**Tab. 12: Verwendete Sekundär-Antikörper mit Angabe von Verdünnung und Hersteller**

Sekundär-Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen HRP	1:3000	BD Pharmingen™, Hamburg
Anti-Ratte HRP	1:3000	BD Pharmingen™, Hamburg

Die Densitometrie wurde mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ durchgeführt. Hierbei wurde zunächst die Dichte der einzelnen Banden (norm- und hypoxische Probe) desjenigen Gens gemessen, bei dem eine veränderte Expression erwartet wurde (z. B. CD74) und diese durch die Dichte der entsprechenden Bande des Housekeeping-Gens ( $\beta$ -Actin) dividiert. Aus den Ergebnissen dieser Quotienten wurden wiederum jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung für die normoxischen und hypoxischen Proben ermittelt. Im Anschluss daran wurde ein t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt.

### 2.2.10 Datenauswertung

Die statistischen Auswertungen wurden unter Zuhilfenahme des Computerprogramms Microsoft® Excel vorgenommen. Die Signifikanz der p-Werte wurde über den t-Test für ungepaarte Stichproben ermittelt. Als statistisch signifikant wurden dabei Werte von  $p < 0,05$  angesehen. Die Dichtemessungen des Western Blots wurden wiederum mit

dem Programm ImageJ durchgeführt. Zuletzt wurde für die Regressionsanalyse das Programm GraphPad Prism 5 verwendet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Vergleich der Methoden zur RNA-Isolierung

Um eine möglichst große Ausbeute von RNA zu erzielen, wurden zunächst drei verschiedene Methoden zur RNA-Isolierung durchgeführt und hinsichtlich der extrahierten RNA-Menge miteinander verglichen. Es handelte sich hierbei um die RNA-Extraktion nach dem Protokoll von Chomczynski und Sacchi, um ein Kit der Firma Roth und ein Kit der Firma PEQLAB (E.Z.N.A.® Total RNA Kit).(124) Die quantitative Messung der RNA erfolgte im Anschluss an die Isolierung mittels NanoDrop® (siehe Abschnitt 2.2.4). In der nachfolgenden Tabelle werden die Ergebnisse der RNA-Isolierung je nach verwendeter Methode dargestellt.

**Tab. 13: Ergebnisse der RNA-Isolierung.** Es wurden drei Methoden zur RNA-Isolierung, aufgeführt in der linken Spalte, miteinander verglichen (RNA-Isolierung mit dem GTC-Protokoll von Chomczynski und Sacchi, mit einem Kit der Firma Roth namentlich Rothi Kit sowie mit einem Kit der Firma PEQLAB bekannt unter dem Namen E.Z.N.A.® Total RNA Kit). Mit den unter 1) und 2) aufgeführten Methoden wurden insgesamt je dreimal  $1e^4$ ,  $1e^5$  und  $1e^6$  Typ II alveoläre Epithelzellen (A549-Zellen) verwendet und in die Versuchsreihen eingesetzt. Da das unter 3) aufgeführte E.Z.N.A.® Total RNA Kit zur RNA-Isolierung aus Lungengewebe bestimmt ist, wurden in dieser Versuchsreihe jeweils drei Proben à 40 mg Lungengewebe verwendet. In der dritten Spalte sind die Mittelwerte der gewonnenen RNA-Mengen in ng/ $\mu$ l mit dem entsprechenden SEM (standard error of mean) aufgeführt. n = Anzahl.

Methode	Zellzahl bzw. Proben*	Mittelwert RNA in ng/ $\mu$ l $\pm$ SEM
1) GTC-Protokoll	$1e^4$ } $1e^5$ } je n = 3 $1e^6$ }	$37,56 \pm 18,01$ $133,82 \pm 49,82$ $307,83 \pm 168,03$
2) Rothi Kit	$1e^4$ } $1e^5$ } je n = 3 $1e^6$ }	$208,10 \pm 146,80$ $337,15 \pm 52,63$ $407,07 \pm 124,76$
3) E.Z.N.A.® Total RNA Kit	3 Proben à 40 mg Lungengewebe	$92,57 \pm 7,35$

Obwohl mit den ersten beiden Methoden insgesamt mehr RNA aus den Proben gewonnen werden konnte, zeigt sich bei den Messungen mittels NanoDrop®, dass im Vergleich zu der dritten Methode bei der ersten und zweiten Methode häufiger Verunreinigungen mit Phenol auftreten. Dies beeinträchtigt die Qualität der RNA und damit die Aussagekraft der nachfolgenden Untersuchungen. Daher wurden die weiteren Proben mit dem E.Z.N.A® Total RNA Kit aufgearbeitet.

### 3.2 Hypoxiebedingte Veränderung der Genexpression in Lungenhomogenat: 1 Tag versus 7 Tage Hypoxie

Für den Vergleich der hypoxiebedingten Veränderung der Genexpression wurde zunächst Lungenhomogenat aus Lungen von Mäusen, die 24 Stunden oder sieben Tage hypoxisch gehalten wurden, hergestellt und daraus RNA extrahiert. Die gewonnene RNA wurde revers transkribiert und dann in die PCR eingesetzt. Dabei wurde jedes Gen in mindestens vier verschiedenen von einander unabhängigen Experimenten untersucht. Die Standardisierung erfolgte mit dem „Housekeeping“-Gen PBGD, für das bisher keine Regulation unter Hypoxie nachgewiesen werden konnte, weshalb es als interne Kontrolle geeignet erschien. Der sog. Ct-Wert („threshold cycle“) wurde als Grundlage der Auswertung verwendet. Dieser beschreibt den Zyklus im Verlauf der real-time-PCR, in dem die Intensität der Fluoreszenz einer Probe den Punkt erreicht, an dem die Fluoreszenz der Probe größer wird als die Intensität der Hintergrundstrahlung. Hierbei geht die Kurve in einen exponentiellen Verlauf über.

Um die relative Genexpression darzustellen, musste für jede Probe der sog. delta-Ct-Wert ( $\Delta Ct$ ) berechnet werden, welcher sich aus der Differenz zwischen den Ct-Werten des Kontroll-Gens (PBGD) und denen der einzelnen normoxischen und hypoxischen Proben ermittelte.

$$\Delta Ct = Ct (\text{reference gene}) - Ct (\text{gene of interest})$$

Im zweiten Schritt wurde der arithmetische Mittelwert der  $\Delta Ct$ -Werte für die normoxischen und hypoxischen Proben nach folgender Formel gebildet.

$$\bar{X} (\Delta Ct_{Nox}) = \Delta Ct (Nox1 + Nox2 + Nox3 + Nox4) / 4$$

Im Anschluss daran konnte aus den  $\Delta Ct$ -Mittelwerten der delta-delta-Ct-Wert ( $\Delta\Delta Ct$ ) ermittelt werden.

$$\Delta\Delta Ct = \bar{X} (\Delta Ct_{Hox}) - \bar{X} (\Delta Ct_{Nox})$$

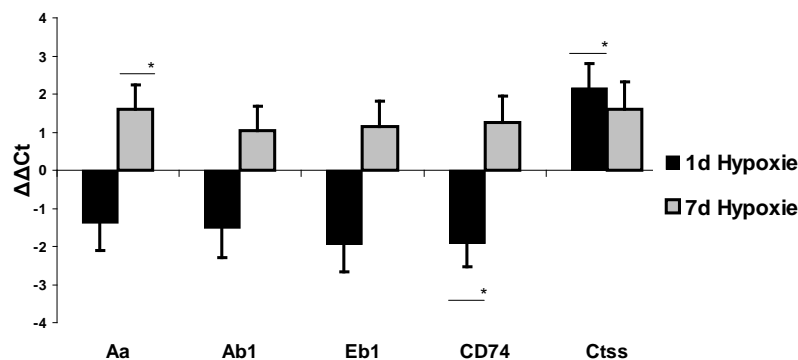
Mit diesem Wert konnte letztlich eine Aussage bezüglich der Unterschiede in der Genexpression zwischen Lungen unter normoxischen sowie hypoxischen Bedingungen getroffen werden (siehe Tab. 14). Die aus den  $\Delta Ct$ -Werten berechneten  $\Delta\Delta Ct$ -Werte ergaben die im Folgenden dargestellten Ergebnisse.

**Tab. 14: Differenz ( $\Delta$ ) der  $\Delta Ct$ -Mittelwerte zwischen normoxischen und hypoxischen Lungenhomogenat-Proben, nach 1 d und 7 d Hyp- sowie Normoxie. Ct = Threshold cycle; SEM = Standardfehler des Mittelwertes; Bestimmung der p-Werte nach dem Zweistichproben-T-Test; \* =  $p < 0,05$ .**

Gen	1 d			7 d		
	$\Delta\Delta Ct$	SEM	p	$\Delta\Delta Ct$	SEM	p
<b>Aa</b>	-1,39	-0,71	0,15	1,61	0,62	0,02*
<b>Ab1</b>	-1,52	-0,76	0,22	1,04	0,64	0,15
<b>Eb1</b>	-1,95	-0,72	0,07	1,14	0,67	0,15
<b>CD74</b>	-1,91	-0,62	0,01*	1,25	0,69	0,11
<b>CtsS</b>	2,15	0,64	0,02*	1,61	0,72	0,11
<b>TLR2</b>	-1,47	-0,73	0,18	2,12	0,75	0,08
<b>CCL5</b>	-1,71	-0,65	0,10	-1,94	-0,74	0,08

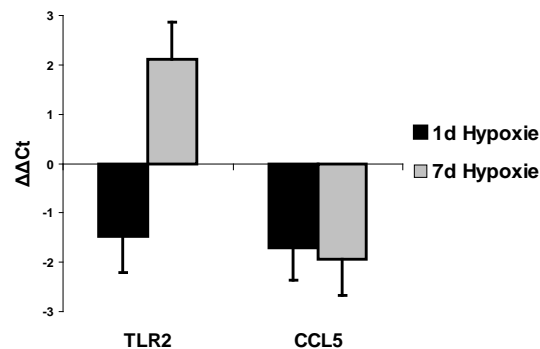
Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression der untersuchten Gene des erworbenen Immunsystems bis auf eine Ausnahme nach einem Tag Hypoxie herabgesetzt ist. Als statistisch signifikant ist hier das Ergebnis für CD74 mit  $p = 0,01$  zu bewerten. Auch Cathepsin S zeigt nach einem Tag Hypoxie eine mit  $p = 0,02$  signifikant erhöhte Expression.

Nach sieben Tagen Hypoxie ist bei allen genannten Genen eine verstärkte Expression zu beobachten. Ein signifikanter Unterschied besteht hierbei für das MHCII-kodierende Gen Aa ( $p = 0,02$ ). Bei Cathepsin S kann nach sieben Tagen Hypoxie ebenso eine erhöhte Expression festgestellt werden. Diese ist aber im Vergleich zum Ergebnis nach einem Tag Hypoxie reduziert und als statistisch nicht signifikant anzusehen. Die folgende Abbildung verdeutlicht die Veränderungen der Gene der adaptiven Immunabwehr nach den jeweiligen Zeiträumen.



**Abb. 5: Veränderung der Expression der ausgewählten Gene der adaptiven Immunabwehr, nach 1 d und 7 d Hypoxieexposition.** Zum Vergleich der hypoxiebedingten Veränderung der Genexpression wurde Lungenhomogenat aus Lungen von Mäusen nach einem Tag und sieben Tagen Hypoxieexposition hergestellt und daraus RNA extrahiert. Die gewonnene RNA wurde reverse transkribiert und dann in die PCR eingesetzt. Der Ct-Wert wurde als Grundlage der Auswertung verwendet. Um die relative Genexpression darzustellen, musste für jede Probe der sog. delta-Ct-Wert ( $\Delta Ct$ ) berechnet werden, welcher sich aus der Differenz zwischen den Ct-Werten des Kontroll-Gens (PBGD) und denen der einzelnen normoxischen und hypoxischen Proben ermittelte. Daraufhin wurden die  $\Delta\Delta Ct$ -Werte ermittelt, die sich aus den  $\Delta Ct$ -Mittelwerten ( $\Delta Ct_{Hox} - \Delta Ct_{Nox}$ ) ergaben. In der vorliegenden Abbildung sind die Veränderungen der Expression der ausgewählten Gene der adaptiven Immunabwehr (Aa, Ab1, Eb1, CD74 und Ctss) anhand der  $\Delta\Delta Ct$ -Werte nach 1 Tag und 7 Tagen Hypoxie aufgeführt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für vier unabhängige Untersuchungen. Ct = threshold cycle; d = Tag,  $\Delta$  = delta; \* =  $p < 0,05$ .

Ähnlich stellt sich das Ergebnis bei den Genen des angeborenen Immunsystems dar. Nach 24 Stunden Hypoxie kann sowohl bei TLR2 als auch bei CCL5 eine verminderte Expression beobachtet werden. Nach sieben Tagen Hypoxie zeigt sich allerdings ein Unterschied. Während die CCL5-Expression weiter abnimmt ( $p = 0,08$ ) ist sie bei TLR2 nach sieben Tagen Hypoxie zwar nicht statistisch signifikant, aber deutlich erhöht (siehe Tab. 14). Die folgende Abbildung verdeutlicht die Veränderungen der Gene der angeborenen Immunabwehr nach den jeweiligen Zeiträumen.



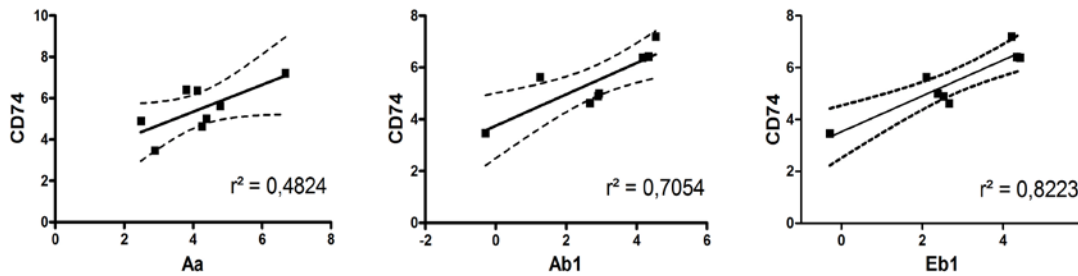
**Abb. 6: Veränderung der Expression der Gene der angeborenen Immunabwehr, nach 1 d und 7 d Hypoxieexposition.** Wie bereits in der vorherigen Abbildung erläutert, erfolgte nach gleichem Schema eine Untersuchung zu Markern der angeborenen Immunabwehr. In der vorliegenden Abbildung sind die Veränderungen der Expression der ausgewählten Gene der angeborenen Immunabwehr (TLR2 und CCL5) anhand der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte nach 1 Tag und 7 Tagen Hypoxie aufgeführt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für vier unabhängige Untersuchungen. Ct = threshold cycle; d = Tag;  $\Delta$  = delta.

### 3.2.1 Regressionsanalyse nach 1 Tag Normoxie und 1 Tag Hypoxie

Zur Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen der Expression der einzelnen Gene bietet sich die Regressionsanalyse an. Um eine Aussage zur Stärke und Richtung eines linearen Zusammenhangs zu machen, benötigt man hierbei das Bestimmtheitsmaß  $r^2$ . Je näher das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  an 1 liegt, desto wahrscheinlicher ist hierbei ein linearer Zusammenhang. Ist  $r^2 = 0$  so liegt kein Zusammenhang vor. Das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  stellt also eine Maßzahl für die Güte der Anpassung dar. Im Folgenden wurde eine Regressionsanalyse der einzelnen Gene untereinander durchgeführt.

#### 3.2.1.1 MHCII und CD74

Die vorliegenden Ergebnisse lassen auf eine Korrelation zwischen der Expression von CD74 und MHCII schließen. Um eine Aussage über Art und Grad des Zusammenhangs machen zu können, wurde eine Regressionsanalyse auf Grundlage der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte der MHCII-Untereinheiten und der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte von CD74 in Lungenhomogenat nach 1 d Norm- und Hypoxie vorgenommen. Die folgenden Abbildungen repräsentieren die Ergebnisse der Regressionsanalyse von CD74 gegen MHCII.

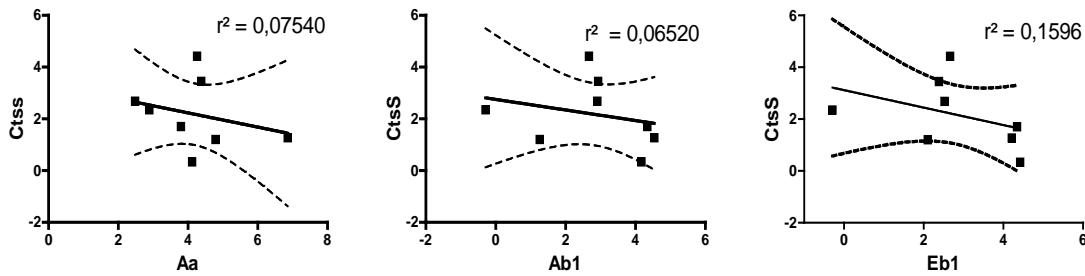


**Abb. 7: Ergebnis der Regressionsanalyse CD74 vs. Aa, Ab1 und Eb1.** Um den Zusammenhang zwischen der Expression der einzelnen Gene zu evaluieren, wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt. Hierzu wurde das Programm GraphPad Prism 5 verwendet. Um eine Aussage zum Ausmaß des Zusammenhangs zu machen, bedient man sich des Bestimmtheitsmaßes  $r^2$ . Je näher  $r^2$  an 1 liegt, desto wahrscheinlicher ist ein positiver linearer Zusammenhang. Ist  $r^2$  gleich null, so liegt kein Zusammenhang zwischen den untersuchten Gruppen vor. Die Abbildung präsentiert das Ergebnis der Regressionsanalyse auf Grundlage der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte der MHCII-Untereinheiten und der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte von CD74 in Lungenhomogenat nach 1 d Norm- und Hypoxie. Die gestrichelten Linien begrenzen das 95 %-Konfidenzintervall. Die durchgezogene Linie stellt die am besten passende Regressionsgerade dar, also die Linie, welche die Summe der Quadrate der vertikalen Distanzen der Punkte der Geraden minimiert. Die gestrichelten Linien sind gebogen, da sie die Grenzen aller möglichen und nicht nur einer Regressionsgeraden bilden.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse der Regressionsanalyse lässt sich die oben geäußerte Vermutung bestätigen, dass die Expression von MHCII mit der Expression von CD74 mit einem durchschnittlichen Bestimmtheitsmaß von  $r^2 = 0,7$  in einem positiven linearen Zusammenhang steht.

### 3.2.1.2 MHCII und CtsS

Die Regressionsanalyse auf Grundlage der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte der MHCII-Untereinheiten und der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte von Cathepsin S in Lungenhomogenat nach 1 d Norm- und Hypoxie ergab folgende Resultate.

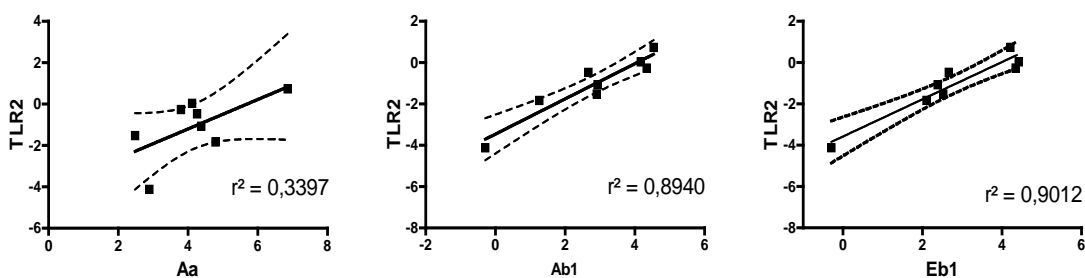


**Abb. 8: Ergebnis der Regressionsanalyse CtsS vs. Aa, Ab1 und Eb1.** Die Analyse wurde wie unter der vorherigen Abbildung beschrieben vorgenommen. Die vorliegende Abbildung präsentiert die Regressionsanalyse auf Grundlage der  $\Delta$ Ct-Werte der MHCII-Untereinheiten und der  $\Delta$ Ct-Werte von Cathepsin S in Lungenhomogenat nach 1 d Norm- und Hypoxie. Die gestrichelten Linien begrenzen das 95 %-Konfidenzintervall. Die durchgezogene Linie stellt die am besten passende Regressionsgerade dar, also die Linie, welche die Summe der Quadrate der vertikalen Distanzen der Punkte der Geraden minimiert. Die gestrichelten Linien sind gebogen, da sie die Grenzen aller möglichen und nicht nur einer Regressionsgeraden bilden.

Das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  geht gegen 0, womit ein positiver linearer Zusammenhang zwischen der Expression von MHCII und CtsS unwahrscheinlich ist.

### 3.2.1.3 MHCII und TLR2

Die Regressionsanalyse auf Grundlage der  $\Delta$ Ct-Werte der MHCII-Untereinheiten und der  $\Delta$ Ct-Werte von TLR2 in Lungenhomogenat nach 1 d Norm- und Hypoxie ergab folgende Resultate.

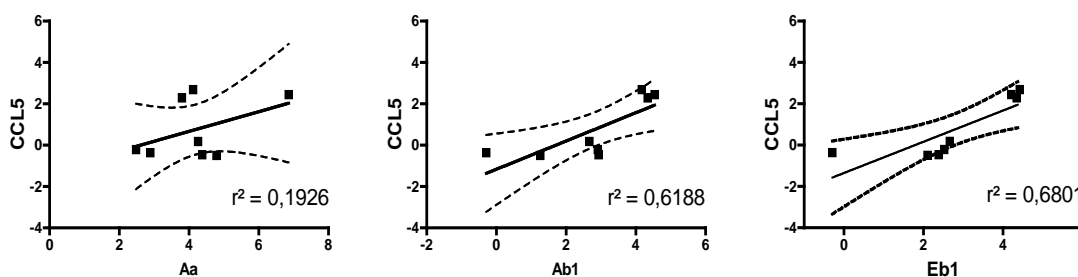


**Abb. 9: Ergebnis der Regressionsanalyse TLR2 vs. Aa, Ab1 und Eb1.** Die Analyse wurde wie unter Abb. 7 beschrieben vorgenommen. Die vorliegende Abbildung präsentiert die Regressionsanalyse auf Grundlage der  $\Delta$ Ct-Werte der MHCII-Untereinheiten und der  $\Delta$ Ct-Werte von TLR2 in Lungenhomogenat nach 1 d Norm- und Hypoxie. Die gestrichelten Linien begrenzen das 95 %-Konfidenzintervall. Die durchgezogene Linie stellt die am besten passende Regressionsgerade dar, also die Linie, welche die Summe der Quadrate der vertikalen Distanzen der Punkte der Geraden minimiert. Die gestrichelten Linien sind gebogen, da sie die Grenzen aller möglichen und nicht nur einer Regressionsgeraden bilden.

Das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  geht durchschnittlich gegen 1, womit ein positiver linearer Zusammenhang zwischen der Expression von MHCII und TLR2 wahrscheinlich ist.

### 3.2.1.4 MHCII und CCL5

Die Regressionsanalyse auf Grundlage der  $\Delta$ Ct-Werte der MHCII-Untereinheiten und der  $\Delta$ Ct-Werte von CCL5 in Lungenhomogenat nach 1 d Norm- und Hypoxie ergab folgende Resultate.

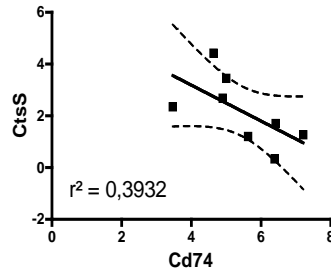


**Abb. 10: Ergebnis der Regressionsanalyse CCL5 vs. Aa, Ab1 und Eb1.** Die Analyse wurde wie unter Abb. 7 beschrieben vorgenommen. Die vorliegende Abbildung präsentiert die Regressionsanalyse auf Grundlage der  $\Delta$ Ct-Werte der MHCII-Untereinheiten und der  $\Delta$ Ct-Werte von CCL5 in Lungenhomogenat nach 1 d Norm- und Hypoxie. Die gestrichelten Linien begrenzen das 95 %-Konfidenzintervall. Die durchgezogene Linie stellt die am besten passende Regressionsgerade dar, also die Linie, welche die Summe der Quadrate der vertikalen Distanzen der Punkte der Geraden minimiert. Die gestrichelten Linien sind gebogen, da sie die Grenzen aller möglichen und nicht nur einer Regressionsgeraden bilden.

Da das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  durchschnittlich bei 0,5 liegt, ist ein positiver linearer Zusammenhang zwischen der Expression von MHCII und TLR2 möglich. Anhand der hier vorliegenden Ergebnisse kann jedoch diesbezüglich keine sichere Aussage getroffen werden.

### 3.2.1.5 CD74 und CtsS

Die Regressionsanalyse auf Grundlage der  $\Delta$ Ct-Werte von CD74 und der  $\Delta$ Ct-Werte von Cathespine S in Lungenhomogenat nach 1 d Norm- und Hypoxie ergab folgendes Resultat.

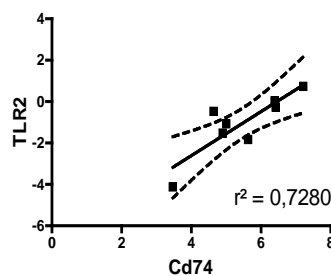


**Abb. 11: Ergebnis der Regressionsanalyse CD74 vs. CtsS.** Die Analyse wurde wie unter Abb. 7 beschrieben vorgenommen. Die vorliegende Abbildung präsentiert die Regressionsanalyse auf Grundlage der  $\Delta$ Ct-Werte von Cd74 und der  $\Delta$ Ct-Werte von CtsS in Lungenhomogenat nach 1 d Norm- und Hypoxie. Die gestrichelten Linien begrenzen das 95 %-Konfidenzintervall. Die durchgezogene Linie stellt die am besten passende Regressionsgerade dar, also die Linie, welche die Summe der Quadrate der vertikalen Distanzen der Punkte der Geraden minimiert. Die gestrichelten Linien sind gebogen, da sie die Grenzen aller möglichen und nicht nur einer Regressionsgeraden bilden.

Das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  geht eher gegen 0, womit ein positiver linearer Zusammenhang zwischen der Expression von CD74 und CtsS unwahrscheinlich ist.

### 3.2.1.6 CD74 und TLR2

Die Regressionsanalyse auf Grundlage der  $\Delta$ Ct-Werte von CD74 und der  $\Delta$ Ct-Werte von TLR2 in Lungenhomogenat nach 1 d Norm- und Hypoxie ergab folgendes Resultat.

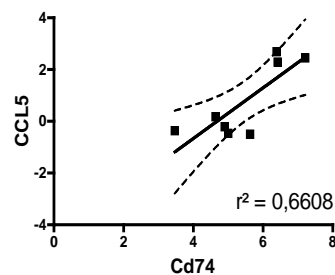


**Abb. 12: Ergebnis der Regressionsanalyse CD74 vs. TLR2.** Die Analyse wurde wie unter Abb. 7 beschrieben vorgenommen. Die vorliegende Abbildung präsentiert die Regressionsanalyse auf Grundlage der  $\Delta$ Ct-Werte von Cd74 und der  $\Delta$ Ct-Werte von TLR2 in Lungenhomogenat nach 1 d Norm- und Hypoxie. Die gestrichelten Linien begrenzen das 95 %-Konfidenzintervall. Die durchgezogene Linie stellt die am besten passende Regressionsgerade dar, also die Linie, welche die Summe der Quadrate der vertikalen Distanzen der Punkte der Geraden minimiert. Die gestrichelten Linien sind gebogen, da sie die Grenzen aller möglichen und nicht nur einer Regressionsgeraden bilden.

Das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  geht eher gegen 1, womit ein positiver linearer Zusammenhang zwischen der Expression von CD74 und TLR2 wahrscheinlich ist.

### 3.2.1.7 CD74 und CCL5

Die Regressionsanalyse auf Grundlage der  $\Delta$ Ct-Werte von CD74 und der  $\Delta$ Ct-Werte von CCL5 in Lungenhomogenat nach 1 d Norm- und Hypoxie ergab folgendes Resultat.

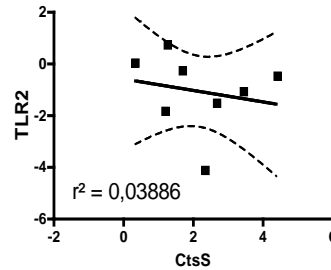


**Abb. 13: Ergebnis der Regressionsanalyse CD74 vs. CCL5.** Die Analyse wurde wie unter Abb. 7 beschrieben vorgenommen. Die vorliegende Abbildung präsentiert die Regressionsanalyse auf Grundlage der  $\Delta$ Ct-Werte von Cd74 und der  $\Delta$ Ct-Werte von CCL5 in Lungenhomogenat nach 1 d Norm- und Hypoxie. Die gestrichelten Linien begrenzen das 95 %-Konfidenzintervall. Die durchgezogene Linie stellt die am besten passende Regressionsgerade dar, also die Linie, welche die Summe der Quadrate der vertikalen Distanzen der Punkte der Geraden minimiert. Die gestrichelten Linien sind gebogen, da sie die Grenzen aller möglichen und nicht nur einer Regressionsgeraden bilden.

Das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  geht eher gegen 1, womit ein positiver linearer Zusammenhang zwischen der Expression von CD74 und CCL5 wahrscheinlich ist.

### 3.2.1.8 CtsS und TLR2

Die Regressionsanalyse auf Grundlage der  $\Delta$ Ct-Werte von Cathespin S und der  $\Delta$ Ct-Werte von TLR2 in Lungenhomogenat nach 1 d Norm- und Hypoxie ergab folgendes Resultat.

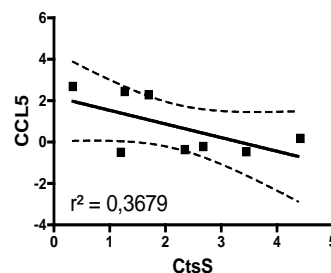


**Abb. 14: Ergebnis der Regressionsanalyse CtsS vs. TLR2.** Die Analyse wurde wie unter Abb. 7 beschrieben vorgenommen. Die vorliegende Abbildung präsentiert die Regressionsanalyse auf Grundlage der  $\Delta$ Ct-Werte von CtsS und der  $\Delta$ Ct-Werte von TLR2 in Lungenhomogenat nach 1 d Norm- und Hypoxie. Die gestrichelten Linien begrenzen das 95 %-Konfidenzintervall. Die durchgezogene Linie stellt die am besten passende Regressionsgerade dar, also die Linie, welche die Summe der Quadrate der vertikalen Distanzen der Punkte der Geraden minimiert. Die gestrichelten Linien sind gebogen, da sie die Grenzen aller möglichen und nicht nur einer Regressionsgeraden bilden.

Das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  geht gegen 0, womit ein positiver linearer Zusammenhang zwischen der Expression von Cathespin S und TLR2 unwahrscheinlich ist.

### 3.2.1.9 CtsS und CCL5

Die Regressionsanalyse auf Grundlage der  $\Delta$ Ct-Werte von Cathespin S und der  $\Delta$ Ct-Werte von CCL5 in Lungenhomogenat nach 1 d Norm- und Hypoxie ergab folgendes Resultat.

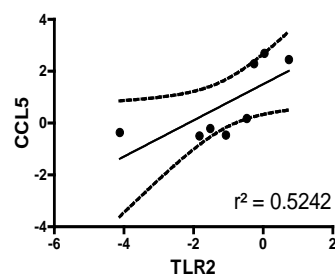


**Abb. 15: Ergebnis der Regressionsanalyse CtsS vs. CCL5.** Die Analyse wurde wie unter Abb. 7 beschrieben vorgenommen. Die vorliegende Abbildung präsentiert die Regressionsanalyse auf Grundlage der  $\Delta$ Ct-Werte von CtsS und der  $\Delta$ Ct-Werte von CCL5 in Lungenhomogenat nach 1 d Norm- und Hypoxie. Die gestrichelten Linien begrenzen das 95 %-Konfidenzintervall. Die durchgezogene Linie stellt die am besten passende Regressionsgerade dar, also die Linie, welche die Summe der Quadrate der vertikalen Distanzen der Punkte der Geraden minimiert. Die gestrichelten Linien sind gebogen, da sie die Grenzen aller möglichen und nicht nur einer Regressionsgeraden bilden.

Das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  geht gegen 0, womit ein positiver linearer Zusammenhang zwischen der Expression von Cathespin S und CCL5 unwahrscheinlich ist.

### 3.2.1.10 TLR2 und CCL5

Die Regressionsanalyse auf Grundlage der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte von TLR2 und der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte von CCL5 in Lungenhomogenat nach 1 d Norm- und Hypoxie ergab folgendes Resultat.



**Abb. 16: Ergebnis der Regressionsanalyse TLR2 vs. CCL5.** Die Analyse wurde wie unter Abb. 7 beschrieben vorgenommen. Die vorliegende Abbildung präsentiert die Regressionsanalyse auf Grundlage der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte von TLR2 und der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte von CCL5 in Lungenhomogenat nach 1 d Norm- und Hypoxie. Die gestrichelten Linien begrenzen das 95 %-Konfidenzintervall. Die durchgezogene Linie stellt die am besten passende Regressionsgerade dar, also die Linie, welche die Summe der Quadrate der vertikalen Distanzen der Punkte der Geraden minimiert. Die gestrichelten Linien sind gebogen, da sie die Grenzen aller möglichen und nicht nur einer Regressionsgeraden bilden.

Das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  liegt bei 0,5, womit ein positiver linearer Zusammenhang zwischen der Expression von TLR2 und CCL5 möglich ist. Anhand der hier vorliegenden Ergebnisse kann jedoch diesbezüglich keine sichere Aussage getroffen werden.

## 3.3 Kompartimentspezifische hypoxiebedingte Veränderung der Genexpression nach 1 Tag Hypoxie

### 3.3.1 MHCII

#### 3.3.1.1 Ergebnisse der PCR

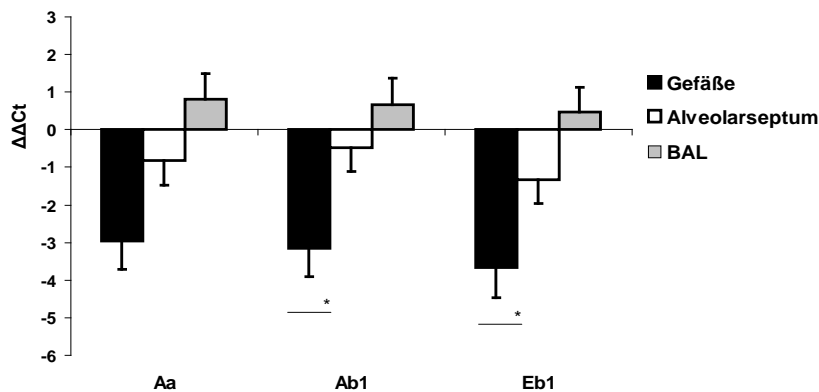
Um herauszufinden in welchen Kompartimenten der Lunge eine hypoxiebedingte Veränderung der Genexpression nach einem Tag Hypoxie stattfindet, wurde eine kompartimentspezifische Untersuchung mittels PCR durchgeführt. Dazu wurden zunächst mit-

tels lasergesteuerter Mikrodissektion Lungengefäße und Alveolarsepten von norm- und hypoxischen Lungen isoliert. Veränderungen im Bereich der Bronchien wurden anhand von Alveolarmakrophagen ermittelt, welche mit einer bronchoalveolären Lavage gewonnenen wurden. Aus den auf diese Weise gewonnen Proben wurde RNA isoliert. Anschließend erfolgte eine reverse Transkription und schließlich die Analyse durch die PCR. Auch hierbei wurde die Untersuchung anhand von jeweils vier unabhängigen norm- und hypoxischen Mäuselungen durchgeführt. Die Auswertung wurde wie unter Punkt 3.2 beschrieben vorgenommen. Die aus den  $\Delta\text{Ct}$ -Werten berechneten  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte ergaben die im Folgenden dargestellten Ergebnisse.

**Tab. 15: Expression der MHCII-kodierenden Gene in mikrodissezierten Gefäßen und Alveolarsepten, sowie in durch bronchoalveoläre Lavage gewonnenen Alveolarmakrophagen.** 1 d Hypoxie vs. 1 d Normoxie; SEM = standard error of mean; Ct = threshold cycle; \* =  $p < 0,05$ ;  $n = 4$ .

Gen	Gefäße			Septum			BAL		
	$\Delta\Delta\text{Ct}$	SEM	p	$\Delta\Delta\text{Ct}$	SEM	p	$\Delta\Delta\text{Ct}$	SEM	p
<b>Aa</b>	-2,96	-0,76	0,06	-0,83	-0,64	0,23	0,81	0,68	0,33
<b>Ab1</b>	-3,16	-0,75	0,02*	-0,50	-0,63	0,40	0,67	0,71	0,41
<b>Eb1</b>	-3,67	-0,79	0,03*	-1,32	-0,63	0,06	0,48	0,65	0,40

Bei der Betrachtung der einzelnen Kompartimente fällt zunächst auf, dass in Lungengefäßen und Alveolarsepten die Gene vermindert, in den Zellen der Lavage allerdings vermehrt exprimiert werden, wenngleich sich bei letzteren keine statistische Signifikanz ergab. Des Weiteren ist festzustellen, dass die verminderte Expression auf Gefäßebene deutlich stärker ausgeprägt ist, als in den Alveolarsepten. Mit Werten von  $p = 0,02$  bei Ab1 und  $p = 0,03$  bei Eb1 sind auf Gefäßebene statistisch signifikante Unterschiede zu beobachten. In der nachfolgenden Abbildung wird diese kompartimentspezifische Veränderung der Genexpression bei MHCII-kodierenden Genen dargestellt.

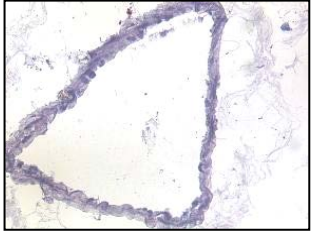
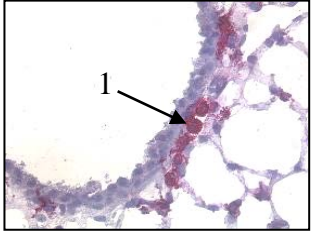
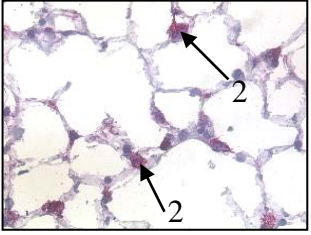
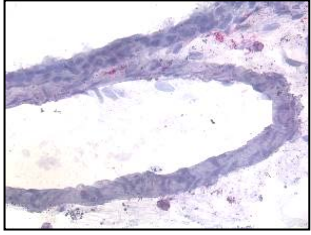
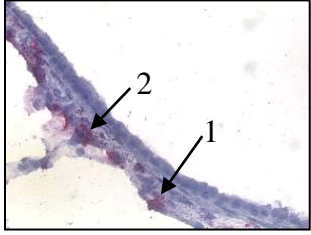
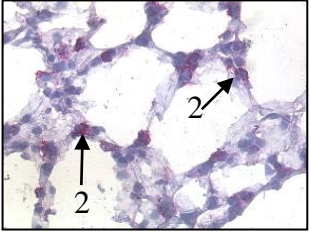
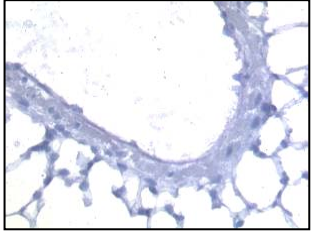
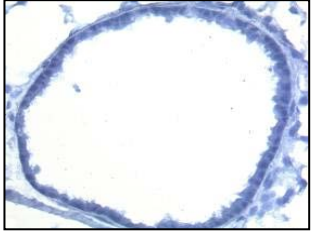
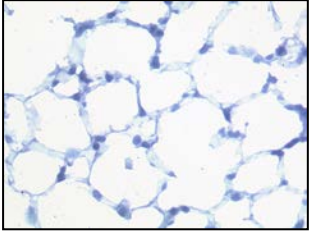


**Abb. 17: Kompartimentspezifische Veränderung der Genexpression bei MHCII-kodierenden Genen nach 1 d Hypoxie.** Zum Vergleich der kompartimentspezifischen hypoxiebedingten Veränderung der Genexpression nach einem Tag Hypoxie wurde eine entsprechende Analyse der verschiedenen Kompartimente durchgeführt. Mittels lasergesteuerter Mikrodisektion wurden Lungengefäße und Alveolaresepten von norm- und hypoxischen Lungen isoliert. Die Untersuchung im Bereich der Bronchien erfolgte anhand von Alveolarmakrophagen, die mit einer bronchoalveolären Lavage gewonnen wurden. Aus den Proben wurde RNA extrahiert. Die gewonnene RNA wurde reverse transkribiert und dann in die PCR eingesetzt. Der Ct-Wert wurde als Grundlage der Auswertung verwendet. Um die relative Genexpression darzustellen, musste für jede Probe der sog. delta-Ct-Wert ( $\Delta\text{Ct}$ ) berechnet werden, welcher sich aus der Differenz zwischen den Ct-Werten des Kontroll-Gens (PBGD) und denen der einzelnen normoxischen und hypoxischen Proben ermittelte. Daraufhin wurden die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte ermittelt, die sich aus den  $\Delta\text{Ct}$ -Mittelwerten ( $\Delta\text{Ct}_{\text{Hox}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Nox}}$ ) ergaben. In der vorliegenden Abbildung sind die Veränderungen der Expression von MHCII, repräsentiert durch Aa, Ab1 und Eb1, in den verschiedenen Kompartimenten (Gefäße, Alveolareseptum, BAL) anhand der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte nach einem Tag Hypoxie aufgeführt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für vier unabhängige Untersuchungen. BAL = bronchoalveoläre Lavage; Ct = threshold cycle; d = Tag; \*  $p < 0,05$ ; Aa = histocompatibility class II antigen A alpha; Ab1 = histocompatibility class II antigen A beta 1; Eb1 = histocompatibility class II antigen E beta; Aa, Ab1 und Eb1 kodieren jeweils bestimmte Domänen des MHCII-Moleküls.

### 3.3.1.2 Ergebnisse der Immunhistochemie

Um festzustellen, ob sich die mittels PCR gewonnenen Ergebnisse auch Visualisieren lassen, wurden im nächsten Schritt histologische Schnitte von norm- und hypoxischen Lungen angefertigt und einer immunhistochemischen Untersuchung unterzogen. Hierbei lag der Focus auf der Betrachtung der verschiedenen Lungenskompartimente. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf den Alveolarraum (inklusive Makrophagen, Pneumozyten und Alveolarepithel), venöse und arterielle Gefäße und die Bronchien gelegt. Als Kontrollgen wurde IgG2b verwendet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle bildlich dargestellt.

**Tab. 16: MHCII-Färbung in Gefäßen, Bronchien und Alveolarsepten von normoxischen (Nox) und hypoxischen (Hox) Mäusen nach 1 d Norm- und Hypoxie. IgG2b = Kontrolle; Pfeil 1 = Alveolarmakrophagen; Pfeil 2 = Typ-II-Pneumozyten; zwanzigfache Vergrößerung.**

MHCII	Gefäße	Bronchien	Alveolarsepten
Nox			
Hox			
IgG2b			

#### Gefäße:

Bei Betrachtung der einzelnen Gefäßanteile zeigen sowohl Tunica intima, als auch Tunica media und adventitia nur eine schwach erhöhte Farbintensität gegenüber dem Kontrollgen. Beim Vergleich der Gefäße der norm- und hypoxischen Lungen ist auch hier nach einem Tag unter den jeweiligen Bedingungen in Endothel, glatter Muskulatur und Bindegewebe visuell kein merklicher Unterschied in der Farbintensität und damit in der Expression von MHCII festzustellen.

#### Bronchien:

Die Anteile der Bronchien erscheinen im Vergleich zum Kontrollgen stärker gefärbt. Jedoch besteht auch hier zwischen dem Epithel der Bronchien, der Tunica muscularis und der Tunica adventitia der norm- und hypoxischen Lungen kein visuell erkennbarer Unterschied. Angrenzend an die Adventitia können deutlich gefärbte Zellen festgestellt

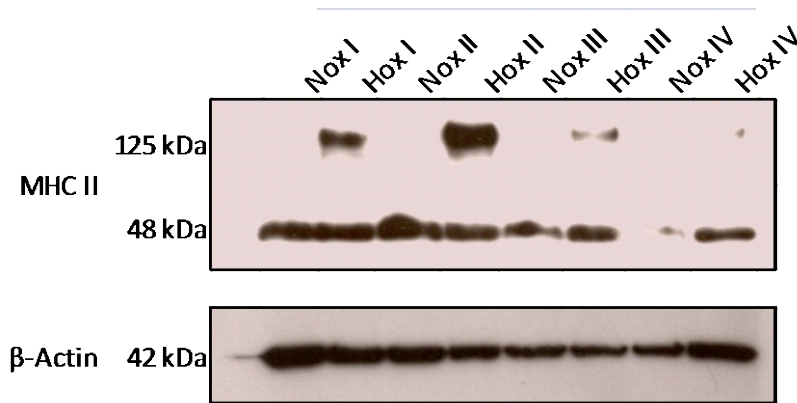
werden. Dazu gehören hier vereinzelte Alveolarmakrophagen (Pfeil 1, siehe Tab. 16) und in den Nischen des angrenzenden Alveolarseptums Pneumozyten Typ II (Pfeil 2, siehe Tab. 16). Dabei zeigen die Makrophagen der normoxischen Lunge eine größere Farbintensität, als die der hypoxischen Lunge.

#### Alveolarsepten:

Die Alveolarsepten erscheinen im direkten Vergleich mit der Kontrolle deutlich stärker gefärbt. Das histologische Bild der hypoxischen Lunge könnte vermuten lassen, dass hier die Bestandteile des Alveolarraums eine höhere Farbintensität aufweisen. Bei genauer Betrachtung wird jedoch deutlich, dass dies durch eine teilweise Überlagerung einzelner Alveolarsepten zustande kommt. Insgesamt liegt daher kein deutlich sichtbarer Unterschied in der Farbintensität im Bereich des Alveolarepithels und des interstitiellen Bindegewebes vor. Lediglich in den Nischen des Alveolarseptums können die deutlich gefärbten Typ-II-Pneumozyten auffindig gemacht werden (Pfeil 2, siehe Tab. 16), wobei sich keine Diskrepanz in der Farbintensität zwischen norm- und hypoxischen Lungen ausmachen lässt.

#### 3.3.1.3 Ergebnisse des Western Blot

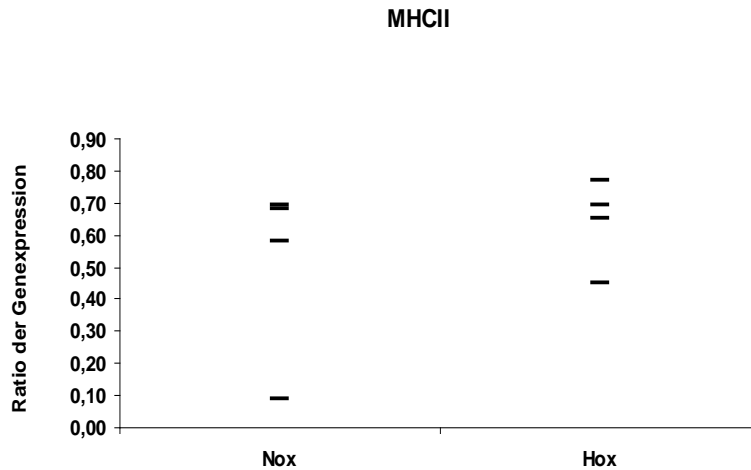
Da die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen die Resultate der PCR nicht eindeutig untermauern, wurden zusätzliche Tests mit dem Western-Blot-Verfahren vorgenommen, um die Unterschiede in der Expression von MHCII auf Proteinebene nachzuweisen. Dabei wurde Lungenhomogenat aus Mäuselungen, die 24 Stunden unter norm- und hypoxischen Bedingungen gehalten wurden, hinsichtlich der MHCII-Expression miteinander verglichen. Als Referenzgen wurde dafür  $\beta$ -Actin, ein Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kDa, welches keine Regulation unter Hypoxie zeigt, verwendet. Die folgende Abbildung verdeutlicht den Nachweis von MHCII mittels des Western-Blot-Verfahrens.



**Abb. 18: Nachweis von MHCII (48 kDa) mittels Western Blot (nicht-denaturiert).** Lungenhomogenate aus Mäuselungen, die 24 Stunden unter norm- und hypoxischen Bedingungen gehalten wurden, wurden hinsichtlich der MHCII-Expression miteinander verglichen. Als Referenzgen wurde  $\beta$ -Actin verwendet, ein Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kDa, das keine Regulation unter Hypoxie zeigt. Das MHCII-Molekül besteht aus zwei Untereinheiten ( $\alpha$ -Untereinheit mit einem Molekulargewicht von ca. 34 kDa,  $\beta$ -Untereinheit mit einem Molekulargewicht von ca. 29 kDa). Der verwendete Antikörper wurde so gewählt, dass er nur an das Dimer bindet und daher nur eine Proteinbande erwartet werden konnte. Die MHCII-Bande zeigte sich bei 48 kDa, des Weiteren stellt sich bei den Proben der hypoxischen Lungen ein Proteinnachweis bei ca. 125 kDa dar. Es wurden jeweils vier hypoxische und normoxische Proben untersucht. Nox = Normoxie; Hox = Hypoxie.

Das MHCII-Molekül ist ein Protein, welches aus zwei Untereinheiten besteht. Die  $\alpha$ -Untereinheit weist ein Molekulargewicht von ca. 34 kDa, die  $\beta$ -Untereinheit ein Molekulargewicht von ca. 29 kDa auf (126). Der verwendete Antikörper wurde daher so gewählt, dass er nur an das Dimer bindet und somit nicht zwei, sondern lediglich eine Proteinbande erwartet werden konnte. In den vorliegenden Untersuchungen stellt sich die MHCII-Bande bei 48 kDa dar. Auffällig ist weiterhin ein Proteinnachweis bei ca. 125 kDa, welcher sich lediglich bei den Proben der hypoxischen Lungen demaskiert.

Zur objektiven Darstellung der Ergebnisse wurde anschließend eine Densitometrie durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied bezüglich der MHCII-Expression zwischen norm- und hypoxischen Lungen kann hier nicht festgestellt werden. In der folgenden Abbildung ist die Densitometrie für MHCII graphisch dargestellt.



**Abb. 19: Densitometrie der Western-Blot-Analyse für MHCII.** Die Dichtemessung erfolgte mittels ImageJ. Um den Unterschied der Expression zu berechnen wurde die Dichte von MHCII durch die Dichte des Referenzgen ( $\beta$ -Actin) dividiert, wodurch sich die Ratio der Expression ergab. Es wurden jeweils vier Proben norm- und hypoxischer Lungen untersucht. Im Anschluss wurde für alle norm- und hypoxischen Proben der jeweilige Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und letztlich ein t-Test durchgeführt. Mit  $p = 0,44$  war an dieser Stelle keine statistisch signifikante Differenz nachweisbar.

### 3.3.2 CD74

#### 3.3.2.1 Ergebnisse der PCR

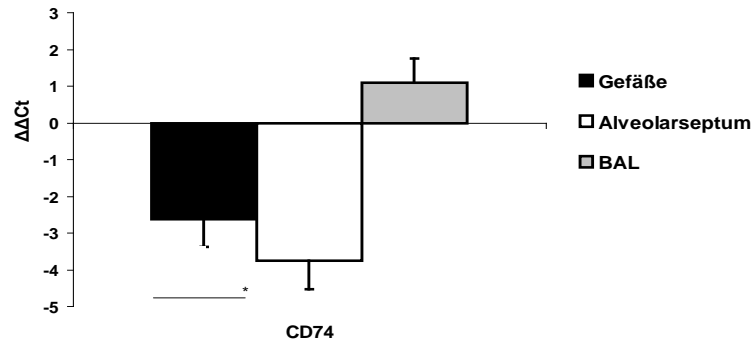
Die aus den  $\Delta$ Ct-Werten berechneten  $\Delta\Delta$ Ct-Werte ergaben die folgenden Resultate.

**Tab. 17: Expression von CD74 in mikrodissezierten Gefäßen und Alveolarsepten, sowie in durch bronchoalveoläre Lavage gewonnenen Alveolarmakrophagen.** 1 d Hypoxie vs. 1 d Normoxie; SEM = standard error of mean; Ct = threshold cycle; \* =  $p < 0,05$ ;  $n = 4$ .

Gen	Gefäße			Septum			BAL		
	$\Delta\Delta$ Ct	SEM	p	$\Delta\Delta$ Ct	SEM	p	$\Delta\Delta$ Ct	SEM	p
<b>CD74</b>	-2,63	-0,74	0,04*	-3,75	-0,79	0,16	1,09	0,67	0,16

Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen, dass die Expression von CD74 nach 24 Stunden Hypoxie auf Gefäßebene mit  $p = 0,04$  signifikant herabgesetzt ist. In Alveolarsepten findet ebenfalls eine verminderte Expression statt, welche allerdings mit  $p = 0,16$  nicht als statistisch signifikant zu deuten ist. In den Zellen der BAL ist hingegen eine

erhöhte Ausschüttung zu verzeichnen ( $p = 0,16$ ). Die folgende Abbildung verdeutlicht die kompartimentspezifische Veränderung von CD74.

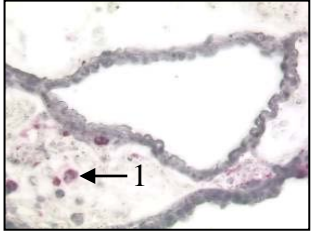

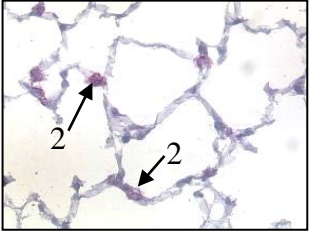
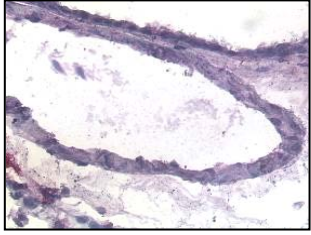
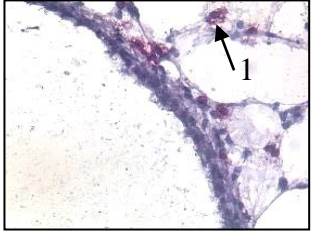
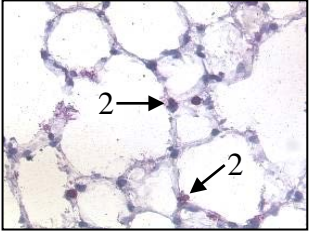
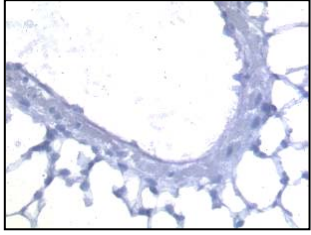
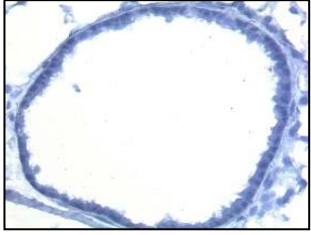
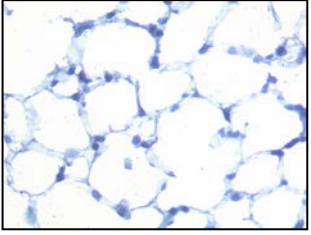


**Abb. 20: Kompartimentspezifische Veränderung der Genexpression von CD74 nach 1 d Hypoxie.** Zum Vergleich der kompartimentspezifischen hypoxiebedingten Veränderung der Genexpression nach einem Tag Hypoxie wurde eine entsprechende Analyse der verschiedenen Kompartimente durchgeführt. Mittels lasergesteuerter Mikrodisektion wurden Lungengefäße und Alveolarepten von norm- und hypoxischen Lungen isoliert. Die Untersuchung im Bereich der Bronchien erfolgte anhand von Alveolarmakrophagen, die mit einer bronchoalveolären Lavage gewonnen wurden. Aus den Proben wurde RNA extrahiert. Die gewonnene RNA wurde reverse transkribiert und dann in die PCR eingesetzt. Der Ct-Wert wurde als Grundlage der Auswertung verwendet. Um die relative Genexpression darzustellen, musste für jede Probe der sog. delta-Ct-Wert ( $\Delta Ct$ ) berechnet werden, welcher sich aus der Differenz zwischen den Ct-Werten des Kontroll-Gens (PBGD) und denen der einzelnen normoxischen und hypoxischen Proben ermittelte. Daraufhin wurden die  $\Delta\Delta Ct$ -Werte ermittelt, die sich aus den  $\Delta Ct$ -Mittelwerten ( $\Delta Ct_{Hox} - \Delta Ct_{Nox}$ ) ergaben. In der vorliegenden Abbildung sind die Veränderungen der Expression von CD74 in den verschiedenen Kompartimenten (Gefäße, Alveolareseptum, BAL) anhand der  $\Delta\Delta Ct$ -Werte nach einem Tag Hypoxie aufgeführt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für vier unabhängige Untersuchungen. BAL = bronchoalveoläre Lavage; Ct = threshold cycle; \* =  $p < 0,05$ .

### 3.3.2.2 Ergebnisse der Immunhistochemie

In der folgenden Tabelle werden die Resultate der Immunhistochemie von CD74 bildlich dargestellt.

**Tab. 18: CD74-Färbung in Gefäßen, Bronchien und Alveolarsepten von normoxischen (Nox) und hypoxischen (Hox) Mäusen nach 1 d Norm- und Hypoxie. IgG2b = Kontrolle; Pfeil 1 = Alveolarmakrophagen; Pfeil 2 = Typ-II-Pneumozyten; zwanzigfache Vergrößerung.**

CD 74	Gefäße	Bronchien	Alveolarsepten
Nox			
Hox			
IgG2b			

#### Gefäße:

In der Gegenüberstellung mit dem histologischen Bild der Kontrollschnitte fällt insgesamt eine intensivere Färbung der einzelnen Gefäßwandanteile auf, was darauf hinweist, dass CD74 sowohl in den norm- als auch in den hypoxischen Lungen, hier speziell durch Bestandteile der Gefäße, exprimiert wird. Nach dem Ergebnis der PCR sollte im Bereich der Gefäße der hypoxischen Lunge eine gegenüber der normoxischen Lunge verminderte Farbintensität vorliegen. Beim Vergleich der norm- und hypoxischen Gefäße, lässt sich allerdings eine dezent verminderte Farbintensität in der Gefäßwand der normoxischen Lunge ausmachen. Somit wird das Resultat der PCR mit dieser Untersuchung nicht gestützt.

### Bronchien:

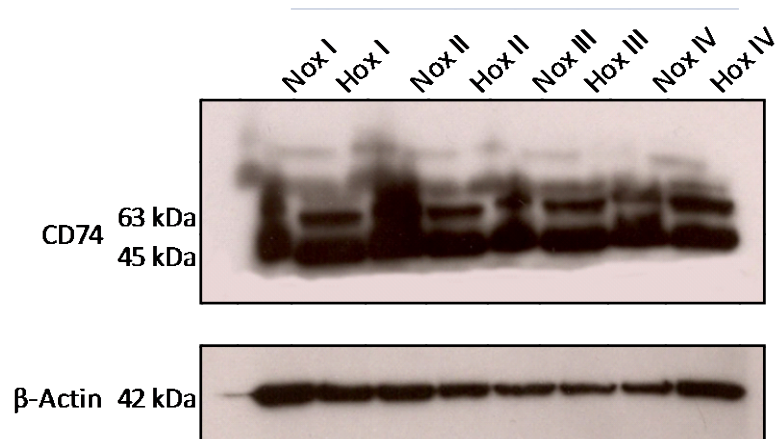
Die Wand der Bronchien erscheint im histologischen Bild der hypoxischen Lunge etwas kräftiger gefärbt, als bei der normoxischen Lunge. Eine eindeutige Differenz in der CD74-Immunreaktivität ist bei den untersuchten Lungen jedoch nicht festzustellen.

### Alveolarsepten:

Im Verhältnis zu den histologischen Schnitten mit IgG2b weist der Alveolarraum bei den norm- und hypoxischen Lungen eine höhere Farbintensität auf. Zwischen den normoxischen und hypoxischen Lungen ist jedoch kein signifikanter Unterschied festzustellen. In den Ecken der aneinander angrenzenden Alveolarsepten fallen allerdings kleine Zellen, Alveolarepithelzellen oder Typ-II-Pneumozyten auf, welche eine höhere Farbintensität als das übrige Gewebe aufweisen (siehe Tab. 18, Pfeil 2). Dies untermauert die Untersuchungen, die bereits gezeigt haben, dass Typ-II-Pneumozyten CD74 exprimieren.

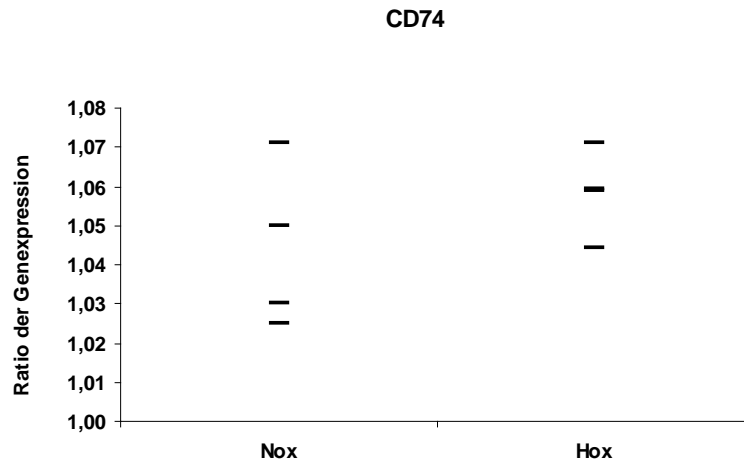
### 3.3.2.3 Ergebnisse des Western Blot

Der Sinn der abschließenden Untersuchung mittels Western Blot war, den Nachweis von CD74 auf Proteinebene zu erbringen und eine Differenz in der Expression von CD74 zwischen norm- und hypoxischen Lungen zu zeigen. Als Referenzgen wurde dabei  $\beta$ -Actin verwendet. Die folgende Abbildung verdeutlicht den Nachweis von CD74 mittels des Western-Blot-Verfahrens.



**Abb. 21: Nachweis von CD74 (45 kDa) mittels Western Blot.** Lungenhomogenate aus Mäusungen, die 24 Stunden unter norm- und hypoxischen Bedingungen gehalten wurden, wurde hinsichtlich der Expression von CD74 miteinander verglichen. Als Referenzgen wurde  $\beta$ -Actin verwendet, ein Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kDa, das keine Regulation unter Hypoxie zeigt. Das CD74-Molekül hat ein Molekulargewicht von ca. 45 kDa und konnte bei der Untersuchung an entsprechender Stelle nachgewiesen werden, des Weiteren zeigte sich sowohl bei den hypoxischen als auch bei den normoxischen Proben ein Proteinnachweis bei ca. 63 kDa. Es wurden jeweils vier hypoxische und normoxische Proben untersucht. Nox = Normoxie; Hox = Hypoxie.

Bei CD74 handelt es sich um ein Glykoprotein, das durch verschiedene Isoformen mit einem Molekulargewicht von ca. 31 - 45 kDa gekennzeichnet ist (siehe auch Abschnitt 1.4.2) (32). Das Resultat der vorliegenden Untersuchung zeigt zum einen eine Bande bei 45 kDa, zum anderen eine Bande bei 63 kDa, die daher dort nicht zu erwarten war und eventuell auf unspezifischer Antikörperbindung beruht. Ein signifikanter Unterschied in der CD74-Expression zwischen norm- und hypoxischen Lungen konnte anhand der Densitometrie bei den untersuchten Lungen nicht nachgewiesen werden. In der nachfolgenden Abbildung ist die Densitometrie für CD74 bildlich dargestellt.



**Abb. 22: Densitometrie der Western-Blot-Analyse für CD74.** Die Dichtemessung erfolgte mittels ImageJ. Um den Unterschied der Expression zu berechnen wurde die Dichte von CD74 durch die Dichte des Referenzgen ( $\beta$ -Actin) dividiert, wodurch sich die Ratio der Expression ergab. Es wurden jeweils vier Proben norm- und hypoxischer Lungen untersucht. Im Anschluss wurde für alle norm- und hypoxischen Proben der jeweilige Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und letztlich ein t-Test durchgeführt. Mit  $p = 0,28$  war an dieser Stelle keine statistisch signifikante Differenz nachweisbar.

### 3.3.3 Cathepsin S

#### 3.3.3.1 Ergebnisse der PCR

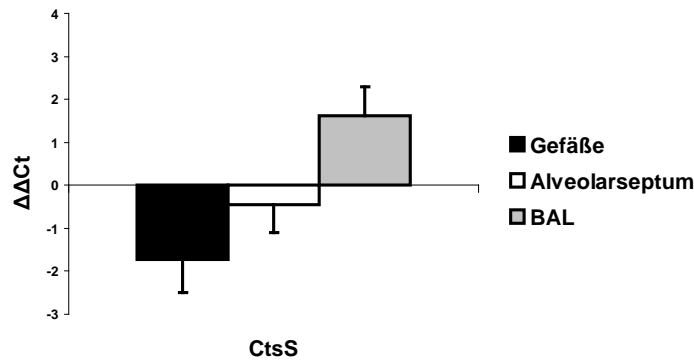
Die aus den  $\Delta$ Ct-Werten berechneten  $\Delta\Delta$ Ct-Werte ergaben die folgenden Resultate.

**Tab. 19: Expression von CtsS in mikrodissezierten Gefäßen und Alveolarsepten, sowie in durch bronchoalveoläre Lavage gewonnenen Alveolarmakrophagen.** 1 d Hypoxie vs. 1 d Normoxie; SEM = standard error of mean; \* =  $p < 0,05$ ;  $n = 4$ .

Gen	Gefäße			Septum			BAL		
	$\Delta\Delta$ Ct	SEM	p	$\Delta\Delta$ Ct	SEM	p	$\Delta\Delta$ Ct	SEM	p
<b>CtsS</b>	-1,72	-0,77	0,2	-0,44	-0,67	0,53	1,61	0,68	0,05*

Die vorliegende Untersuchung führt zu dem Ergebnis, dass sowohl in den untersuchten Gefäßen, als auch in den Alveolarsepten unter hypoxischen Bedingungen eine verminderte Cathepsin-S-Expression erfolgt. Ein signifikanter Unterschied liegt bei den untersuchten Lungenkompartimenten jedoch nicht vor. Hingegen ist die Expression von CtsS

in den mittels BAL aus hypoxischen Lungen gewonnenen Zellen zwar noch nicht signifikant, jedoch deutlich erhöht. Die folgende Abbildung verdeutlicht die kompartimentspezifische Veränderung von CtsS.


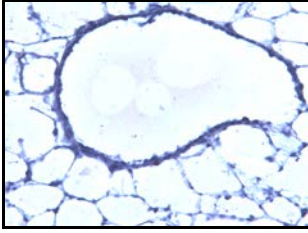
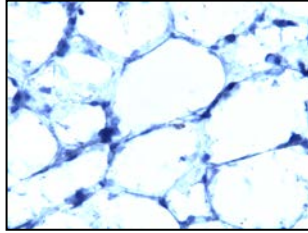
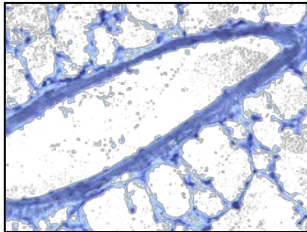
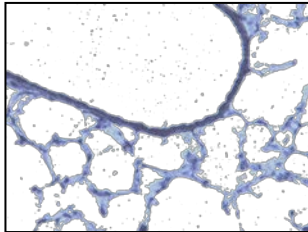
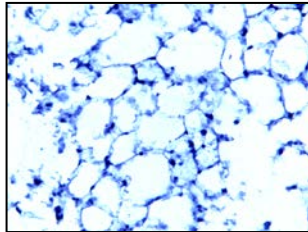
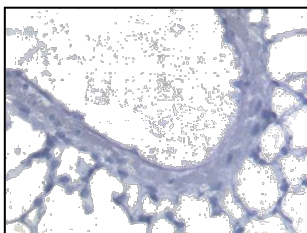
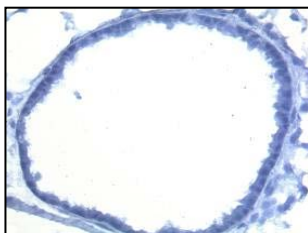
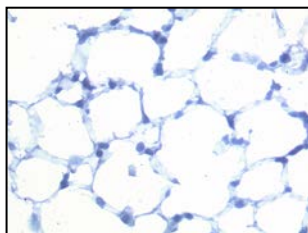


**Abb. 23: Kompartimentspezifische Veränderung der Genexpression von CtsS nach 1 d Hypoxie.** Zum Vergleich der kompartimentspezifischen hypoxiebedingten Veränderung der Genexpression nach einem Tag Hypoxie wurde eine entsprechende Analyse der verschiedenen Kompartimente durchgeführt. Mittels lasergesteuerter Mikrodisektion wurden Lungengefäße und Alveolaresepten von norm- und hypoxischen Lungen isoliert. Die Untersuchung im Bereich der Bronchien erfolgte anhand von Alveolarmakrophagen, die mit einer bronchoalveolären Lavage gewonnen wurden. Aus den Proben wurde RNA extrahiert. Die gewonnene RNA wurde reverse transkribiert und dann in die PCR eingesetzt. Der Ct-Wert wurde als Grundlage der Auswertung verwendet. Um die relative Genexpression darzustellen, musste für jede Probe der sog. delta-Ct-Wert ( $\Delta\text{Ct}$ ) berechnet werden, welcher sich aus der Differenz zwischen den Ct-Werten des Kontroll-Gens (PBGD) und denen der einzelnen normoxischen und hypoxischen Proben ermittelte. Daraufhin wurden die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte ermittelt, die sich aus den  $\Delta\text{Ct}$ -Mittelwerten ( $\Delta\text{Ct}_{\text{Hox}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Nox}}$ ) ergaben. In der vorliegenden Abbildung sind die Veränderungen der Expression von CtsS in den verschiedenen Kompartimenten (Gefäße, Alveolareseptum, BAL) anhand der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte nach einem Tag Hypoxie aufgeführt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für vier unabhängige Untersuchungen. BAL = bronchoalveoläre Lavage; Ct = threshold cycle.

### 3.3.3.2 Ergebnisse der Immunhistochemie

In der folgenden Tabelle werden die Resultate der Immunhistochemie von Cathepsin S bildlich dargestellt.

**Tab. 20: CtsS-Färbung in Gefäßen, Bronchien und Alveolarsepten von normoxischen (Nox) und hypoxischen (Hox) Mäusen nach 1 d Norm- und Hypoxie. IgG2b = Kontrolle; zwanzigfache Vergrößerung.**

CtsS	Gefäße	Bronchien	Alveolarsepten
Nox			
Hox			
IgG2b			

#### Gefäße:

Bei der Betrachtung der histologischen Schnitte fällt zunächst eine leicht bläuliche Färbung auf. Durch wiederholte Versuche war diesbezüglich jedoch weder ein besseres Ergebnis zu erzielen, noch konnte die Ursache dafür eruiert werden. Visuell kann schließlich bei Vergleich der untersuchten norm- und hypoxischen Gefäße, auch im Verhältnis zu den Referenzschnitten, kein Unterschied in der Immunreaktivität festgestellt werden.

#### Bronchien:

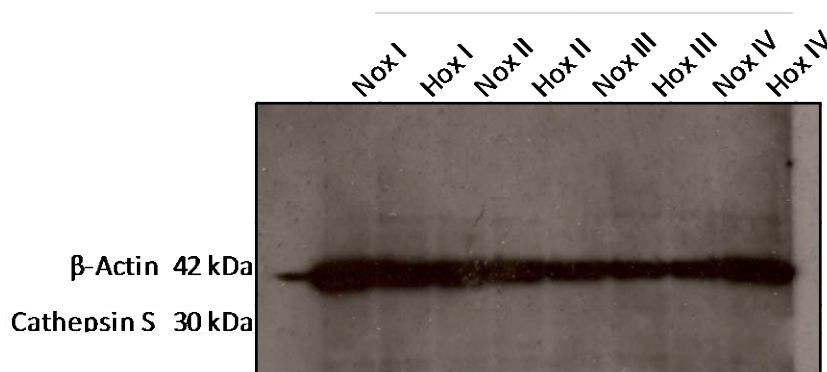
Bei Betrachtung der bronchialen Anteile weisen weder das Epithel, noch Tunica muscularis und Adventitia signifikante Unterschiede in der Farbintensität auf. Dies gilt sowohl für die histologischen Schnitte der untersuchten norm- als auch hypoxischen Lungen.

### Alveolarsepten:

Ein visuell signifikanter Unterschied in der Farbintensität ist weder im Bereich der Alveolarsepten, noch im Bereich der Typ-II-Pneumozyten und des Alveolarepithels der Untersuchungsgruppen festzustellen.

#### 3.3.3.3 Ergebnisse des Western Blot

Auch wenn die bisher durchgeführten Untersuchungen mit dem Western-Blot-Verfahren keine aussagekräftigen Ergebnisse erbrachten, wurde dennoch in diesem Versuch getestet, ob mit diesem Verfahren Cathepsin S nachzuweisen ist. Als Referenz wurde auch hier  $\beta$ -Actin eingesetzt. Die folgende Abbildung verdeutlicht den Nachweis von Cathepsin S mittels des Western-Blot-Verfahrens.



**Abb. 24: Nachweis von CtsS (30 kDa) mittels Western Blot.** Lungenhomogenate aus Mäuselnungen, die 24 Stunden unter norm- und hypoxischen Bedingungen gehalten wurden, wurde hinsichtlich der Expression von CtsS miteinander verglichen. Als Referenzgen wurde  $\beta$ -Actin verwendet, ein Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kDa, das keine Regulation unter Hypoxie zeigt. Das CtsS-Molekül hat ein Molekulargewicht von ca. 30 kDa und konnte bei der Untersuchung an entsprechender Stelle nicht nachgewiesen werden. Es wurden jeweils vier hypoxische und normoxische Proben untersucht. Nox = Normoxie; Hox = Hypoxie.

Bei den vorliegenden Untersuchungen gelang es nicht Cathepsin S im Western Blot nachzuweisen. Es wurden dafür mehrere Versuche unternommen, unter anderem wurde auch der Antikörper getauscht. Dennoch konnte auch nach längerer Inkubationszeit in der Röntgenkassette lediglich die Bande im Bereich von 42 kDa gefunden werden. Diese wird allerdings durch  $\beta$ -Actin hervorgerufen. Cathepsin S hätte jedoch bei 28-30 kDa auftreten müssen. Aufgrund des nicht gelungenen Nachweises entfiel die Densitometrie.

### 3.3.4 TLR2

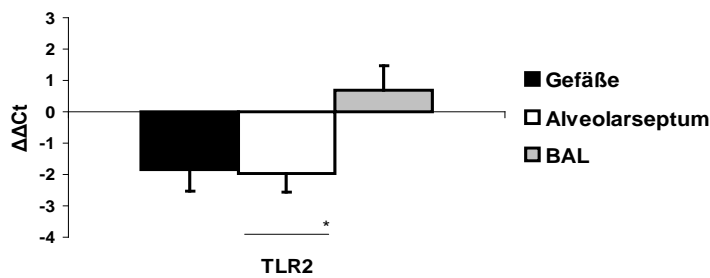
#### 3.3.4.1 Ergebnisse der PCR

Die aus den  $\Delta\text{Ct}$ -Werten berechneten  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte ergaben die folgenden Resultate.

**Tab. 21: Expression von TLR2 in mikrodissezierten Gefäßen und Alveolarsepten, sowie in durch bronchoalveoläre Lavage gewonnenen Alveolarmakrophagen.** 1 d Hypoxie vs. 1 d Normoxie; SEM = standard error of mean; \* =  $p < 0,05$ ;  $n = 4$ .

Gen	Gefäße			Septum			BAL		
	$\Delta\Delta\text{Ct}$	SEM	p	$\Delta\Delta\text{Ct}$	SEM	p	$\Delta\Delta\text{Ct}$	SEM	p
<b>TLR2</b>	-1,84	-0,69	0,11	-1,96	-0,61	0,006*	0,69	0,77	0,55

Wie in Abb. 25 graphisch dargestellt, wird TLR2 sowohl in Gefäßen als auch im Alveolarraum hypoxischer Lungen vermindert exprimiert. Mit  $p = 0,006$  stellt allerdings nur das Resultat für den Alveolarraum ein signifikantes Ergebnis dar. In den Zellen der BAL konnte unter Hypoxie hingegen eine leicht erhöhte Expression von TLR2 festgestellt werden. Die folgende Abbildung verdeutlicht die kompartimentspezifische Veränderung von TLR2.


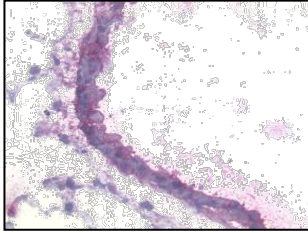
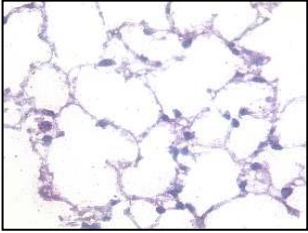

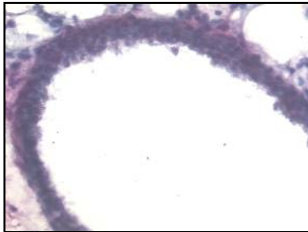
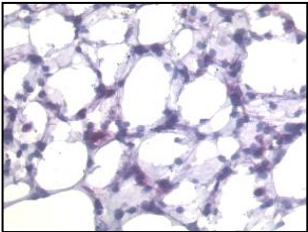
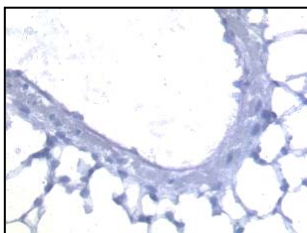
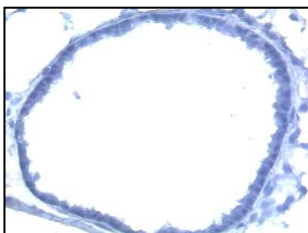
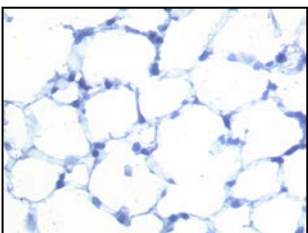


**Abb. 25: Kompartimentspezifische Veränderung der Genexpression von TLR2 nach 1 d Hypoxie.** Zum Vergleich der kompartimentspezifischen hypoxiebedingten Veränderung der Genexpression nach einem Tag Hypoxie wurde eine entsprechende Analyse der verschiedenen Kompartimente durchgeführt. Mittels lasergesteuerter Mikrodisektion wurden Lungengefäße und Alveolaresepten von norm- und hypoxischen Lungen isoliert. Die Untersuchung im Bereich der Bronchien erfolgte anhand von Alveolarmakrophagen, die mit einer bronchoalveolären Lavage gewonnen wurden. Aus den Proben wurde RNA extrahiert. Die gewonnene RNA wurde reverse transkribiert und dann in die PCR eingesetzt. Der Ct-Wert wurde als Grundlage der Auswertung verwendet. Um die relative Genexpression darzustellen, musste für jede Probe der sog. delta-Ct-Wert ( $\Delta Ct$ ) berechnet werden, welcher sich aus der Differenz zwischen den Ct-Werten des Kontroll-Gens (PBGD) und denen der einzelnen normoxischen und hypoxischen Proben ermittelte. Daraufhin wurden die  $\Delta\Delta Ct$ -Werte ermittelt, die sich aus den  $\Delta Ct$ -Mittelwerten ( $\Delta Ct_{Hox} - \Delta Ct_{Nox}$ ) ergaben. In der vorliegenden Abbildung sind die Veränderungen der Expression von TLR2 in den verschiedenen Kompartimenten (Gefäße, Alveolareseptum, BAL) anhand der  $\Delta\Delta Ct$ -Werte nach einem Tag Hypoxie aufgeführt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für vier unabhängige Untersuchungen. BAL = bronchoalveoläre Lavage; Ct = threshold cycle; \* =  $p < 0,05$ .

### 3.3.4.2 Ergebnisse der Immunhistochemie

In der folgenden Tabelle werden die Resultate der Immunhistochemie von TLR2 bildlich dargestellt.

**Tab. 22: TLR2-Färbung in Gefäßen, Bronchien und Alveolarsepten von normoxischen (Nox) und hypoxischen (Hox) Mäusen nach 1 d Norm- und Hypoxie. IgG2b = Kontrolle; zwanzigfache Vergrößerung.**

TLR2	Gefäße	Bronchien	Alveolarsepten
<b>Nox</b>			
<b>Hox</b>			
<b>IgG2b</b>			

#### Gefäße:

An den histologischen Schnitten in Tab. 22 wird deutlich, dass eine höhere Farbintensität der Gefäßwand der norm- und hypoxischen Lunge gegenüber der Referenzfärbung vorliegt. Sowohl Tunica intima, media als auch adventitia weisen eine deutliche Färbung auf. Beim Vergleich der Gefäße der norm- mit denen der hypoxischen Lunge ist jedoch kein signifikanter Unterschied in der Immunreaktivität zu verzeichnen.

#### Bronchien:

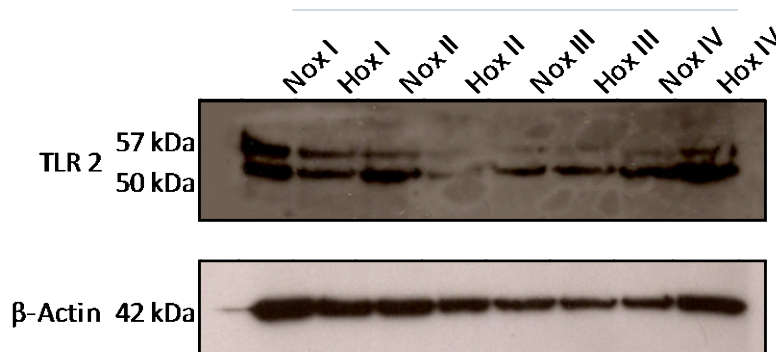
Auch in den Bronchien hebt sich die innere Schicht, das Epithel der Bronchien, bei der norm- und hypoxischen Lunge farblich deutlich vom Epithel in dem vorliegenden Kontrollschnitt ab. Ein signifikanter Unterschied in der Farbintensität und damit der Immunreaktivität liegt bei den Bronchien der untersuchten Lungen allerdings nicht vor.

### Alveolarsepten:

In der Gegenüberstellung mit der vorliegenden Kontrolle scheint der Alveolarraum sowohl der norm- als auch der hypoxischen Lunge eine höhere Farbintensität aufzuweisen. Bei Betrachtung des histologischen Schnitts der hypoxischen Lunge fällt jedoch eine deutliche Überlagerung von Alveolarsepten auf, wodurch die Färbung hier noch intensiver als bei dem vorliegenden normoxischen Schnittbild erscheint. Signifikante Differenzen in der Immunreaktivität sind in den untersuchten Lungenschnitten im Bereich der Alveolarsepten daher nicht festzustellen.

#### 3.3.4.3 Ergebnisse des Western Blot

Um TLR2 auf Proteinebene nachzuweisen, wurde im Anschluss an die vorangegangenen Tests eine Untersuchung mit dem Western-Blot-Verfahren vorgenommen. Als Referenzgen wurde  $\beta$ -Actin verwendet. Die folgende Abbildung verdeutlicht den Nachweis von TLR2 mittels des Western-Blot-Verfahrens.



**Abb. 26: Nachweis von TLR2 (ca. 90 - 100 kDa) mittels Western Blot.** Lungenhomogenate aus Mäuselungen, die 24 Stunden unter norm- und hypoxischen Bedingungen gehalten wurden, wurde hinsichtlich der Expression von TLR2 miteinander verglichen. Als Referenzgen wurde  $\beta$ -Actin verwendet, ein Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kDa, das keine Regulation unter Hypoxie zeigt. Das TLR2-Molekül hat ein Molekulargewicht von ca. 90-100 kDa und konnte bei der Untersuchung an entsprechender Stelle nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch ein Proteinnachweis bei 50 und 57 kDa. Es wurden jeweils vier hypoxische und normoxische Proben untersucht. Nox = Normoxie; Hox = Hypoxie.

Da TLR2 ein Molekulargewicht von 90 - 100 kDa aufweist, wurde erwartet, dass sich dementsprechend in diesem Bereich eine Proteinbande demaskiert. Es zeigen sich jedoch zwei Banden. Eine Bande liegt im Bereich von 50 kDa, die andere kann bei ca.

57 kDa detektiert werden. Auch nach wiederholten Versuchen gelang es nicht TLR2 mit diesem Verfahren so nachzuweisen, dass eine Aussage bezüglich einer unterschiedlichen Expression zwischen norm- und hypoxischen Lungen möglich ist. Aufgrund des nicht gelungenen Nachweises von TLR2 entfiel die Densitometrie.

### 3.3.5 CCL5

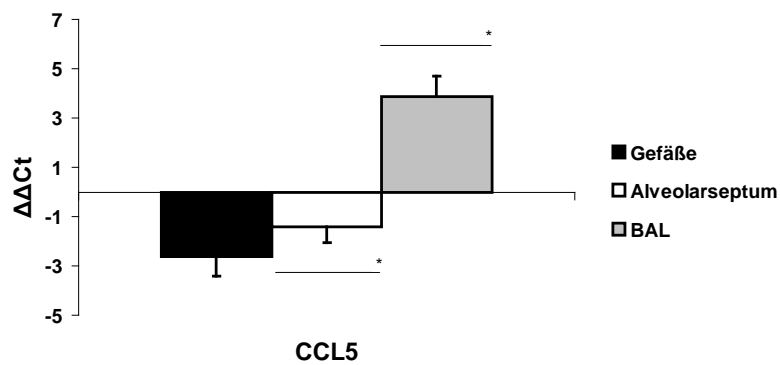
#### 3.3.5.1 Ergebnisse der PCR

Die aus den  $\Delta\text{Ct}$ -Werten berechneten  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte ergaben die folgenden Resultate.

**Tab. 23: Expression von CCL5 in mikrodissezierten Gefäßen und Alveolarsepten, sowie in durch bronchoalveoläre Lavage gewonnenen Alveolarmakrophagen. 1 d Hypoxie vs. 1 d Normoxie; SEM = standard error of mean; \* =  $p < 0,05$ ;  $n = 4$ .**

Gen	Gefäße			Septum			BAL		
	$\Delta\Delta\text{Ct}$	SEM	p	$\Delta\Delta\text{Ct}$	SEM	p	$\Delta\Delta\text{Ct}$	SEM	p
<b>CCL5</b>	-2,69	-0,80	0,08	-1,41	-0,63	0,02*	3,88	0,83	0,04*

Wie Tab. 23 und Abb. 27 verdeutlichen, kann in den untersuchten mikrodissezierten Gefäßen eine wenn auch nicht statistisch signifikante, jedoch deutlich verminderte Expression von CCL5 nachgewiesen werden. Die PCR-Untersuchung der Alveolarsepten ergibt mit  $p = 0,02$  eine signifikante Differenz in der CCL5-Expression zwischen norm- und hypoxischen Lungen. In den mittels BAL gewonnenen Zellen kann wiederum eine signifikant erhöhte Expression von CCL5 nachgewiesen werden ( $p = 0,04$ ). In der folgenden Abbildung ist die kompartimentspezifische Veränderung von CCL5 dargestellt.



**Abb. 27: Kompartimentspezifische Veränderung der Genexpression von CCL5 nach 1 d Hypoxie.** Zum Vergleich der kompartimentspezifischen hypoxiebedingten Veränderung der Genexpression nach einem Tag Hypoxie wurde eine entsprechende Analyse der verschiedenen Kompartimente durchgeführt. Mittels lasergesteuerter Mikrodisektion wurden Lungengefäße und Alveolaresepten von norm- und hypoxischen Lungen isoliert. Die Untersuchung im Bereich der Bronchien erfolgte anhand von Alveolarmakrophagen, die mit einer bronchoalveolären Lavage gewonnen wurden. Aus den Proben wurde RNA extrahiert. Die gewonnene RNA wurde reverse transkribiert und dann in die PCR eingesetzt. Der Ct-Wert wurde als Grundlage der Auswertung verwendet. Um die relative Genexpression darzustellen, musste für jede Probe der sog. delta-Ct-Wert ( $\Delta Ct$ ) berechnet werden, welcher sich aus der Differenz zwischen den Ct-Werten des Kontroll-Gens (PBGD) und denen der einzelnen normoxischen und hypoxischen Proben ermittelte. Daraufhin wurden die  $\Delta\Delta Ct$ -Werte ermittelt, die sich aus den  $\Delta Ct$ -Mittelwerten ( $\Delta Ct_{Hox} - \Delta Ct_{Nox}$ ) ergaben. In der vorliegenden Abbildung sind die Veränderungen der Expression von CCL5 in den verschiedenen Kompartimenten (Gefäße, Alveolareseptum, BAL) anhand der  $\Delta\Delta Ct$ -Werte nach einem Tag Hypoxie aufgeführt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für vier unabhängige Untersuchungen. BAL = bronchoalveoläre Lavage; Ct = threshold cycle; \* =  $p < 0,05$ .

### 3.3.5.2 Immunhistochemie und Western Blot

Aufgrund der nur wenig aussagekräftigen Ergebnisse der immunhistochemischen Aufarbeitung und des Western Blots in den vorangegangenen Untersuchungen, wurde auf den Einsatz von CCL5 in diese beiden Analysen verzichtet.

## 4 Diskussion

### 4.1 Ziel der Arbeit

In zahlreichen Studien konnte der Einfluss von Hypoxie auf verschiedene Organe und Organsysteme belegt werden. Vor allem die hypoxieinduzierten Veränderungen im Bereich der Lunge, z. B. Entzündung und Sekretion von proinflammatorischen Proteinen, werfen immer wieder neue Fragen auf und geben Anlass dazu, die den verschiedenen Lungenerkrankungen zugrunde liegenden Pathomechanismen zu erforschen (127, 128). Bisher wurden jedoch nur wenige Studien veröffentlicht, in denen die Auswirkungen von Hypoxie auf das angeborene und erworbene Immunsystem der Lunge untersucht wurden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, anhand ausgewählter Marker den Einfluss von Hypoxie auf die lungenspezifische Immunreaktivität zu erforschen, um neue Erkenntnisse für zukünftige Therapien von Lungenerkrankungen zu gewinnen. Als Marker für das angeborene Immunsystem wurden hier TLR2 und CCL5 verwendet. Der Einfluss auf das adaptive Immunsystem wurde anhand von MHCII, Cathepsin S und CD74 untersucht. Als Versuchsmethoden standen die PCR, Immunhistochemie und der Western Blot zur Verfügung.

Es wurde zunächst eine PCR-Untersuchung mit Lungenhomogenat nach 1 d und nach 7 d Hypoxie durchgeführt, womit Differenzen in der akuten und chronischen Phase der Hypoxie aufgedeckt werden sollten. Um festzustellen, ob und in welchen Kompartimenten der Lunge eine hypoxieinduzierte Genregulation in der akuten Hypoxie-Phase stattfindet, wurden mittels lasergesteuerter Mikrodissektion Lungengefäße (Venen und Arterien), Bronchien/Bronchiolen und Alveolarsepten aus Mäuselungen extrahiert, die 24h unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen gehalten wurden und deren Werte anschließend miteinander verglichen.

Im Anschluss daran sollten mittels immunhistochemischen Verfahren die Ergebnisse bestätigt und visuell dargestellt werden. Da dies nur wenig erfolgreich war, wurden zusätzliche Untersuchungen mittels Western Blot durchgeführt, um hiermit die hypoxieinduzierten Veränderungen der Genexpression auf Proteinebene nachzuweisen. Hierfür wurde erneut Lungenhomogenat eingesetzt, welches von Mäuselungen stammte, die 24 Stunden unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen gehalten wurden.

## 4.2 MHCII

Das Glykoprotein MHCII spielt nachweislich eine große Rolle bei der Immunantwort. Hauptsächlich auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und an körperfremde Moleküle gekoppelt hilft es, Antigene CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten zu präsentieren. Die folgenden Reaktionen in Form von Sezernierung von Interleukinen, Wachstum und Proliferation von Makrophagen und anderen immunaktiven Zellen, führen schließlich dazu, dass körperfremde Stoffe entfernt werden (26).

Verschiedene Untersuchungen haben einen Zusammenhang zwischen einer verminderten oder nicht vorhandenen MHCII-Expression und dem Auftreten schwerer Störungen der Immunabwehr belegen können (21). Dennoch wurden nur wenige Studien im Zusammenhang mit Hypoxie publiziert. Interessant ist diesbezüglich eine Studie von Kauer et. al, in der Veränderungen in der Retina unter Hypoxie untersucht wurden. Es konnte nicht nur ein HIF-1 $\alpha$  vermittelter Anstieg von VEGF, sondern auch eine De-Novo-Synthese von MHCII durch Zellen der Mikroglia festgestellt werden (129). Auch Al-Saleh et. al führten eine Studie über cerebrale Hypoxie und ihre Auswirkungen im Bereich der Area postrema durch. Insbesondere wurde dabei die initial verminderte, jedoch nach prolongierter Hypoxie erhöhte Freisetzung von MHCII dokumentiert (130). Des Weiteren konnte eine erhöhte MHCII-Expression bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen, wie z. B. der rheumatoiden Arthritis belegt werden. In diesem Kontext unternahm Sivakumar et. al eine Untersuchung bezüglich des Einflusses von Hypoxie auf Sehnenerkrankung im Rahmen der rheumatoiden Arthritis. Hierbei wurde eine durch Hypoxie hervorgerufene Herunterregulation von MCP-1 und verschiedenen Zytokinen (IL-10) in den erkrankten Geweben festgestellt (131). Cramer et. al publizierten eine Studie, anhand derer sie zeigen konnten, dass der hypoxieinduzierte Faktor (HIF) sowohl unter lokaler Hypoxie als auch durch gesteigerte Aktivität proinflammatorischer Zytokine hochreguliert wird. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die vermehrte Ausschüttung von HIF die Infiltration und das Überleben von Makrophagen unterstützt und folglich einen bisher unbekanntem Einfluss auf die Kaskade der Inflammation ausübt. Es ist demnach anzunehmen, dass Hypoxie eng mit verstärkten Inflammationsprozessen bei Erkrankungen mit verminderter Sauerstoffversorgung des Gewebes, wie z. B. rheumatoider Arthritis, Arteriosklerose oder Malignomen, verknüpft ist (132, 133).

Die Rolle der MHCII-Expression durch Tumorzellen wird hingegen kontrovers diskutiert. In der Literatur sind zahlreiche tumorassoziierte Mechanismen im Zusammenhang mit einer MHCII-Expression beschrieben. So ist beispielsweise die Aktivität von MAPK (mitogen activated protein kinase) beim malignen Melanom mit einer deutlich erhöhten MHCII-Expression vergesellschaftet (134). Auf der anderen Seite kamen Dername et. al bei ihrer Untersuchung von Patienten mit NSCLC (non small cell lung cancer) zu dem Ergebnis, dass sowohl die MHCI- als auch MHCII-Expression bei diesen Tumorzellen deutlich vermindert ist, was zu einer verminderten Erkennung durch CD8<sup>+</sup> bzw. CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt und damit eine effektive Immunantwort limitiert (135). Darüber hinaus gibt es Anhaltspunkte für ein positives Verhältnis zwischen der Anwesenheit von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) und einer besseren Prognose für Patienten mit kolorektalem Karzinom, Ovarialkarzinom und Non Hodgkin Lymphom (136, 137, 138). Zudem konnten Matsushita et al. und Rimsza et al. eine positive Korrelation zwischen diesen TILs und der Menge von MHCII auf Tumorzellen des Ovarialkarzinoms und Lymphomen demonstrieren (139, 140). Zusammenfassend kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass MHCII großen Einfluss auf Tumorzellen hat. Wie diese Tatsache in Bezug auf die Entwicklung neuer Therapieverfahren angewendet werden kann ist momentan Gegenstand zahlreicher Studien.

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass MHCII-Moleküle unter anderem auch von Typ-II-Pneumozyten produziert und sezerniert werden können (22, 27). Es existieren in der Literatur jedoch bisher keine Angaben über das Verhalten dieses für das Abwehrsystem so wichtigen Proteins unter Hypoxie in der Lunge. Daher erschien es wichtig, dies in die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit mit aufzunehmen.

Die Untersuchung des Lungenhomogenats mittels PCR zeigte, dass es in der akuten Hypoxie-Phase (nach 24 Stunden Hypoxie-Exposition) zu einer reduzierten Freisetzung von MHCII kam. Nach siebentägiger Hypoxie-Exposition war jedoch ein Anstieg der MHCII-Expression zu verzeichnen. Auch wenn bezüglich dieser Untersuchung keine einheitlich statistische Signifikanz (lediglich Aa nach 7 d Hypoxie mit  $p = 0,02$ ) gezeigt werden konnte, so stützt dieses Resultat dennoch das Konzept von Hirani et. al und Madjdpour et al., welches besagt, dass es allein durch Hypoxie zu einer vermehrten Sezernierung von proinflammatorischen Zytokinen und Inflammation in der Lunge kommen kann. In diesem Zusammenhang kann MHCII möglicherweise an der erhöhten Zytokinexpression beteiligt sein.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression von MHCII und den anderen untersuchten Genen darzustellen, erfolgte eine Regressionsanalyse. Hierbei konnte zum einen ein positiver Zusammenhang zwischen der Expression von MHCII und CD74 nachgewiesen werden. Dies lässt sich am ehesten durch das Zusammenspiel von MHCII und CD74 bei der Antigenpräsentation sowie durch gemeinsame Prozesse im Intrazellularraum, insbesondere im Bereich des endoplasmatischen Reticulum, erklären. Der Zusammenhang der Expression von MHCII und CD74 war zu erwarten, da die MHCII-Gene bekanntermaßen mit dem Gen für die invariante Kette koordiniert gesteuert werden, z. B. über Interferon- $\gamma$ , welches die Synthese eines Transkriptionsfaktors auslöst, des so genannten MHCII-Transaktivators (CIITA), welcher mit der Expression von MHCII und CD74 korreliert und im Falle eines Fehlens zu einem ausgeprägten Immundefekt führt, weil keine MHCII-Moleküle gebildet werden.

Zum anderen kam ein positiver Zusammenhang zwischen der Expression von MHCII und TLR2 zur Darstellung. Eine miteinander korrelierende Expression von MHCII und CCL5 konnte anhand der hier vorliegenden Ergebnisse hingegen nicht sicher bestimmt werden. Wie sich diese Zusammenhänge erklären lassen, ob sie auf gemeinsamen oder unterschiedlichen Rollen im Rahmen des Inflammationsprozess beruhen und welcher Gestalt diese sind, muss anhand weiterer Untersuchungen analysiert werden.

Das Resultat der kompartimentspezifischen Untersuchung in der akuten Hypoxie-Phase (24 Stunden), zeigte eine signifikant verminderte Expression von MHCII in den untersuchten Lungengefäßen. Auf der anderen Seite konnte eine vermehrte Expression von MHCII in den Zellen der Lavage festgestellt werden. Diese Ergebnisse lassen sich anhand weiterer Untersuchungen besser verstehen. Viele Studien haben diesbezüglich gezeigt, dass es durch eine akute pulmonale Inflammation zum Einstrom von neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und anderen antigenpräsentierenden Zellen aus Gefäßen der Lunge in den Alveolarraum kommt. Für diese Wanderung sind verschiedene Zytokine verantwortlich. Eines dieser Zytokine ist das Monozytenchemotaktische Protein 1 (MCP-1), welches wie CCL5 zu den CC-Chemokinen gehört (141, 142). Gunn et al. konnten in einer Untersuchung zeigen, dass es durch Expression von MCP-1 durch Typ-II-Pneumozyten zu einer Anreicherung von Monozyten im Alveolarraum kommt (143).

Die Resultate der vorliegenden Arbeit lassen die Annahme zu, dass es durch Hypoxie zu einer deutlichen Umverteilung von MHCII-exprimierenden Zellen kommt, nämlich

vom Gefäßbett in den Alveolarraum. Eine Erklärung hierfür könnten die unter Hypoxie beobachteten inflammatorischen Prozesse sein.

Die PCR-Analyse des Alveolareseptums ergab eine dezent verminderte MHCII-Expression unter Hypoxie. Im Bereich des Alveolareseptums können verschiedene Arten von Zellen vorliegen. Typ-II-Pneumozyten können MHCII exprimieren und sind Zellen, die typischerweise in den Nischen des Alveolareseptums anzutreffen sind. Außerdem können Alveolarmakrophagen gefunden werden. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass die beobachtete verminderte MHCII-Expression von Typ-II-Pneumozyten und Alveolarmakrophagen herrührt. Ein signifikantes Ergebnis konnte jedoch nicht erzielt werden, was am ehesten durch die nur verhältnismäßig kleine Probenmenge, die mit der lasergesteuerten Mikrodissektion gewonnen werden konnte, begründet ist.

Im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchung sollten die MHCII-Expression auf Proteinebene nachgewiesen und mögliche Unterschiede zwischen 24 Stunden Norm- und Hypoxie aufgezeigt werden. Bei Betrachtung der einzelnen Kompartimente konnte eine unterschiedliche Farbintensität und damit Immunreaktivität im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden. Beim Vergleich von Normoxie und Hypoxie wird hingegen ersichtlich, dass sowohl auf Gefäßebene, als auch im bronchialen Kompartiment und dem Alveolarraum mit diesem Versuchsaufbau kein signifikanter Unterschied in der MHCII-Expression nachgewiesen werden konnte. Auffällig allein waren im Bereich des Alveolareseptums Makrophagen und Typ-II-Pneumozyten, die sich farblich deutlich von der Umgebung abgrenzten, jedoch auch keinen Unterschied im Vergleich von Normoxie und Hypoxie zeigten. In der Literatur ist bis auf eine Ausnahme keine Studie beschrieben, in der versucht wurde, MHCII mit immunhistochemischen Verfahren nachzuweisen. Khong et al. versuchten in ihrer Untersuchung anhand der MHCII-Markierung Infektionen von Plazentazotten zu definieren. Aus ihrem Bericht wird ersichtlich, dass sowohl entzündete als auch nicht entzündete Zotten eine MHCII-Immunreaktivität zeigten. Ein möglicher Grund könnte eine unspezifische Bindung des MHCII-Antikörpers sein (144).

Da die immunhistochemischen Untersuchungen keinen signifikanten Nachweis einer differentiellen Immunreaktivität von MHCII in Mäuselungen erbrachten, wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich mittels Western Blot versucht, den Nachweis auf Proteinebene zu liefern. Der verwendete Antikörper wurde so gewählt, dass er gegen die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit gerichtet war. Beim Vergleich der in diesem Versuch gezeigten

MHCII-Expression zwischen den norm- und hypoxischen Proben und dem Referenzgen, ist jedoch kein Unterschied zwischen den Entitäten feststellbar.

Erwartungsgemäß sollte nur eine Bande sichtbar sein. Laut Angabe des Antikörper-Herstellers sollte MHCII zwischen 30 - 55 kDa detektiert werden. Im Versuch detektierte sich MHCII bei ca. 48 kDa. Weiterhin konnte eine Proteinbande bei ~125 kDa gefunden werden, die jedoch nur bei den Proben der hypoxischen Lungen auftauchte. Innerhalb der hier durchgeführten Versuchsreihen war diese Beobachtung interessanterweise kein Einzelfall, sondern reproduzierbar. Hierfür können verschiedene Ursachen in Frage kommen. Da die MHCII-Proben nicht denaturiert wurden ist es z. B. möglich, dass das MHCII-Dimer als Multimer vorlag oder andere Proteine an den Komplex gebunden haben. Darüberhinaus ist es möglich, dass unter Hypoxie MHCII-Isoformen posttranslationale Modifikationen durchlaufen, z. B. durch Glycosylierung. Glycosylierung als eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen führt dazu, dass die Stabilität von Proteinen gesteigert wird und schützt diese vor proteolytischem Abbau. Zudem trägt sie zur Zellinteraktion bei, was für die Immunabwehr von essentieller Bedeutung ist. Eine weitere Erklärung könnten unspezifische Antikörperbindungen sein. Da die Banden lediglich bei den Proben der hypoxischen und nie bei denen der normoxischen Lungen in Erscheinung traten, ist dies jedoch unwahrscheinlich sondern spricht am ehesten für eine Modifikation des Proteins, insbesondere hinsichtlich der Verwendung eines nicht-denaturierten Gels und nicht zuletzt aufgrund des in den Versuchsreihen verwendeten hoch-spezifischen Antikörpers, welcher nur das Dimer detektiert.

Das vorliegende Ergebnis lässt erstmals die Annahme zu, dass es unter dem Einfluss von Hypoxie zu einer strukturellen Veränderung des MHCII-Moleküls kommt, die wahrscheinlich dazu führt, die Funktion des MHCII-Moleküls, insbesondere die Antigenpräsentation, unter hypoxischen Verhältnissen aufrecht zu erhalten. Zukünftige Studien sind notwendig, um die Modifikation der Proteine unter Hypoxie und die daraus resultierenden Auswirkungen auf die Antigenpräsentation und die Aktivierung der T-Zellen zu prüfen.

Zusammenfassend kann überdies festgestellt werden, dass eine differentielle Immunreaktivität von MHCII in der akuten Phase der Hypoxie auf Genebene, vor allem in Lungengefäßen, nachgewiesen werden konnte. Um den Nachweis auf Proteinebene zu erbringen, müssen in Zukunft neue Versuchsmodelle etabliert werden. Diesbezüglich

muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass in der vorliegenden Arbeit mittels des Western-Blot-Verfahrens Lungenhomogenat aus ganzen Lungen untersucht wurde. Daher ist es wahrscheinlich, dass kompartimentspezifische Veränderungen mit dieser Analyse nicht erfasst werden.

### 4.3 CD74

Das Membranglykoprotein CD74 spielt eine wichtige Rolle für die Antigenpräsentation durch MHCII-Moleküle. Es verhindert zum einen die intrazelluläre Anlagerung von körpereigenen Peptiden an MHCII im ER, des Weiteren ist es für den Transport von MHCII aus dem ER heraus zum Golgi-Apparat zuständig (33, 34). Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Regressionsanalyse konnte diesbezüglich ein positiver Zusammenhang zwischen der Expression von CD74 und MHCII in Lungenhomogenat dokumentiert werden.

Andere Studien haben gezeigt, dass CD74 nicht nur intrazellulär vorhanden ist, sondern dass bis zu 5 % des intrazellulär vorliegenden CD74 auf der Zelloberfläche exprimiert werden (145, 146). Weitere Untersuchungen konnten eine mit einem CD74-Mangel assoziierte Abnahme der MHCII-vermittelten Antigenpräsentation belegen (40). Shachar et al. konnten anhand einer Studie mit CD74 knockout Mäusen zeigen, dass CD74 eine wichtige Rolle für die Entwicklung und Proliferation von B-Lymphozyten spielt (147). In einer Untersuchung von Attar et al. bezüglich einer bestimmten Kombination von Chemotherapeutika zur Therapie der AML wurde unter anderem ein Zusammenhang zwischen Patienten mit einer kompletten Remission und der darunter sechsfach erhöhten CD74-Expression im Knochenmark festgestellt (148). Auch andere Studien konnten zeigen, dass CD74 von den verschiedensten Tumoren exprimiert wird (41, 149). Außerdem wurde in einer Versuchsreihe von Leng et al. nachgewiesen, dass es sich bei CD74 um ein Protein mit einer hohen Affinität zum macrophage migration inhibitory factor (MIF) handelt (42). MIF gehört zur Gruppe der Zytokine, die im Rahmen einer akuten pulmonalen Inflammation frühzeitig sezerniert werden. Verschiedene Studien konnten zudem einen pro-proliferativen Effekt von MIF in Verbindung mit CD74 belegen (42, 150, 151).

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der PCR-Analyse in Lungenhomogenat eine signifikant verminderte Expression von CD74 in der akuten Hypoxie-Phase nachgewiesen werden ( $p = 0,01$ ), wohingegen nach 7 d Hypoxie eine erhöhte Expression zu verzeichnen war. Takashi et. al haben in einer ihrer Studien den Zusammenhang zwischen durch Makrophagen produziertem CD74 und der Akkumulation von Neutrophilen im Alveolarraum unter MIF-Stimulation untersucht. Die Ergebnisse ihrer Studie zeigen, dass mit einem Anti-CD74-Antikörper die MIF-induzierte Akkumulation von Neutrophilen im Alveolarraum signifikant vermindert wird (47). Für die Zukunft könnte dies für Patienten mit ARDS einen möglichen Therapieansatz bedeuten.

In dieser Studie wurde in der Phase der prolongierten Hypoxie eine erhöhte Expression von CD74 auffällig. Hinsichtlich der Ergebnisse von Takashi et. al kann im Umkehrschluss vermutet werden, dass es bei unter Hypoxie vermehrt sezerniertem CD74 zu einem Anstieg der MIF-induzierten Akkumulation von Neutrophilen im Alveolarraum kommt. Dies würde bedeuten, dass Hypoxie über diesen Mechanismus zu einer verstärkten Immunantwort führt und hierdurch das Ausmaß einer pulmonalen Inflammation direkt beeinflusst.

In diesem Zusammenhang ist ebenfalls eine Studie von Faure-André et al. interessant. Sie konnten in ihrer Untersuchung zeigen, dass CD74 einen negativen Einfluss auf die Migration von dendritischen Zellen in peripheres Gewebe hat. Sie verglichen das Verhalten von normalen dendritischen Zellen mit solchen, die fehlerhaftes oder unzureichend vorhandenes CD74 aufwiesen und fanden heraus, dass erstere zwischen langsamer und schneller Motilität wechselten, letztere sich jedoch eindeutig schneller und geordneter in peripheres Gewebe bewegten (152). Folglich kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass eine vermehrte CD74-Synthese durch ansässige Makrophagen die Migration dendritischer Zellen verlangsamt, was beispielsweise in der Lunge zu einer protrahierten Immunantwort führen könnte.

Anhand der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Regressionsanalyse ergab sich weiterhin eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Korrelation der Expression von CD74 mit TLR2 und CCL5, wobei ein Zusammenhang zwischen der Expression von TLR2 und CCL5 nicht sicher wahrscheinlich war. Um diese Zusammenhänge erklären zu können bedarf es daher weiterer Untersuchungen.

Auch die kompartimentspezifische Untersuchung ergab eine Korrelation zwischen MHCII und CD74. Der Versuch zeigte, wie bei MHCII auch, eine signifikant verminderte CD74-Expression auf Gefäßebene ( $p = 0,04$ ). Die Expression im Alveolarseptum war ebenfalls als vermindert einzustufen. In den mittels BAL gewonnenen Zellen konnte hingegen eine Hochregulation von CD74 beobachtet werden. Anhand der Regressionsanalyse sollte und konnte eine positive Korrelation zwischen der Expression der MHCII-Untereinheiten Ab1 und Eb1 sowie der Expression von CD74 bestätigt werden. Die Erkenntnisse im Hinblick auf das auch in anderen Studien belegte Zusammenspiel von MHCII und CD74 spiegeln sich demnach in den hier vorliegenden Ergebnissen wieder.

Im Rahmen der immunhistochemischen Versuchsreihe konnte keine differentielle Immunreaktivität von CD74 in den untersuchten Geweben von norm- und hypoxischen Lungen gezeigt werden. Auffällig war jedoch eine höhere Farbintensität in einzelnen Alveolarmakrophagen, vor allem aber in Typ-II-Pneumozyten. In einer Studie aus dem Labor für Infektiologie und Immunologie der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Gießen konnten Marsh et al. die Expression von CD74 durch Typ-II-Pneumozyten belegen (48). Marsh et al. konnten weiterhin nachweisen, dass einzig Typ-II-Pneumozyten, nicht etwa Typ-I-Pneumozyten, CD74 auf ihrer Oberfläche präsentieren. Außerdem zeigen die Ergebnisse ihrer Studie einen Zusammenhang zwischen der Proliferation von Typ-II-Pneumozyten und der vermehrten Expression von CD74 unter MIF-Stimulation (48).

Im Western Blot konnte zuletzt CD74 auf Proteinebene nachgewiesen werden. Dazu wurde Lungenhomogenat verwendet, das von Mäuselungen stammte, die 24 Stunden unter Normoxie und Hypoxie gehalten wurden. Durch die PCR-Ergebnisse wurde eine verminderte CD74-Anreicherung in den Hypoxie-Lungen erwartet. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit mittels Western Blot allerdings nicht bestätigt werden.

#### 4.4 Cathepsin S

In den letzten Jahren konnte durch viele Studien belegt werden, dass CtsS, eine Cystein-Protease mit starker Elastase-Aktivität, eine wichtige Rolle für das Immunsystem spielt (49, 50). Riese et al. konnten z. B. nachweisen, dass der Abbau der invarianten Kette in

humanen B-Lymphozyten durch CtsS erfolgt, wodurch schließlich die Bindung von Peptiden an das MHCII-Molekül ermöglicht wird (53). Des Weiteren konnte der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von CtsS und MHCII in einer Untersuchung von Bühling et al. bestätigt werden. In dieser Studie wurden die Stadien der fetalen Lungentwicklung hinsichtlich der Expression der verschiedenen Cathepsine untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass CtsS erst in der fortgeschrittenen Gestationsphase ab der 26. SSW in pulmonalem Gewebe exprimiert wird (153). Diese Ergebnisse korrelieren wiederum mit einer Studie von Stoltenber et al., in der gezeigt werden konnte, dass die MHCII-Expression in menschlichem fetalem Lungengewebe erst in der späten Gestationsphase oder auch erst postnatal auftritt (154). In einer weiteren Studie aus dem Jahr 2004 konnten Fajardo et al. eine erhöhte Expression von CtsS bei allergischen Entzündungen der Atemwege nachweisen. Interessant ist weiterhin eine Studie von Shi et al., in der schon 1992 die Expression von CtsS in der Lunge durch Alveolarmakrophagen beschrieben wurde (52). Eine Studie bezüglich einer möglichen Hypoxie-induzierten Regulation von CtsS wurde bisher noch nicht publiziert.

In der hier durchgeführten Untersuchung an Lungenhomogenat konnte eine signifikant erhöhte Expression von CtsS in der akuten Hypoxie-Phase festgestellt werden ( $p = 0,02$ ). Eine mögliche Erklärung wäre die im Zusammenhang mit akuter Hypoxie schon von Madjdpour et al. beschriebene pulmonale Entzündungsreaktion (128). Die CtsS-Expression nach prolongierter Hypoxie-Exposition über sieben Tage war gegenüber den Normoxie-Lungen ebenfalls erhöht. Jedoch war insgesamt eine dezente Abnahme in der CtsS-Expression gegenüber der akuten Hypoxie zu verzeichnen. Im Hinblick auf die verminderte Produktion von MHCII in der akuten Hypoxie-Phase unterstützt dieses Ergebnis die Hypothese einer CtsS-abhängigen Produktion von MHCII. Es bedarf jedoch zukünftig weiterer Untersuchungen, um die Regulationsmechanismen zwischen Cathepsin S und MHCII zu entschlüsseln.

Bei der kompartimentspezifischen PCR-Analyse zeigte sich eine nicht signifikante Herunterregulation von CtsS in mikrodissezierten Gefäßen und Alveolarepten. Die Untersuchung der BAL ergab jedoch eine nahezu signifikant gesteigerte CtsS-Expression. Da in einer BAL größtenteils Makrophagen zu finden sind, kann davon ausgegangen werden, dass die detektierte CtsS-Expression von Alveolarmakrophagen stammt. Dieses Ergebnis zeigt, dass CtsS nicht nur von Alveolarmakrophagen exprimiert wird, sondern dass akute Hypoxie eine gesteigerte CtsS-Expression in diesen Zellen hervorruft (52).

Obwohl in mehreren Studien Cathepsin S sowohl mit immunhistochemischen Techniken, als auch mit der Western-Blot-Analyse auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte, gelang dies in der vorliegenden Arbeit nicht (155-158). Als Ursache dafür könnte eine zu hohe Verdünnung des Antikörpers in Frage kommen. In dieser Versuchsreihe wurde zunächst mit einer Verdünnung von 1:100 begonnen. Weil sich keine Reaktion an den Gefrierschnitten zeigte, wurde nach mehreren Versuchen eine Verdünnung von 1:10 gewählt. Da hierdurch ebenfalls keine Änderung auftrat wurde zudem der Antikörper gewechselt. Auch dadurch konnte jedoch kein Nachweis erbracht werden.

#### 4.5 TLR2

Toll-like Rezeptoren gehören zu den den sog. pattern recognition receptors (PRR). Sie können bestimmte Strukturen auf der Oberfläche von Mikroorganismen erkennen, was zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden und letztlich zur Sekretion von z. B. proinflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$  und MIP-2 führen kann (63, 64). TLR stehen in Zusammenhang mit vielen verschiedenen Zellen der Immunabwehr. So werden sie z. B. neben Monozyten und Makrophagen auch von T- und B-Lymphozyten, Fibroblasten und Epithelzellen der Lunge exprimiert (65-68, 159). In einer Untersuchung von Akira et al. wurde festgestellt, dass einige Mitglieder der TLR-Familie hauptsächlich intrazellulär vorkommen, andere, wie z. B. TLR2 und TLR4, auf der Zelloberfläche exprimiert werden (159). Die Bedeutung von TLR2 für ein funktionierendes Immunsystem konnte anhand vieler Untersuchungen mit TLR2-knockout-Mäusen verdeutlicht werden. So konnten Takeuchi et al. und andere eine hohe Anfälligkeit von TLR2-knockout-Mäusen für Infektionen mit *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *Borrelia burgdorferi* beobachten (72-74, 160). Verschiedene Studien der letzten Jahre haben zudem gezeigt, dass TLR2 auch von Typ-II-Pneumozyten synthetisiert und exprimiert wird (69-71).

Bei der PCR-Untersuchung von TLR2 anhand des Lungenhomogenats, konnte nach 24 Stunden Hypoxie zunächst eine verminderte TLR2-Expression festgestellt werden. Nach siebentägiger Hypoxie-Exposition zeigte sich jedoch eine annähernd signifikant erhöhte Expression ( $p = 0,08$ ). Diese Beobachtung unterstützend haben Kuhlicke et al.

in einer ihrer Studien eine HIF-1-koodinierte und HIF-1-induzierte erhöhte TLR2-Expression unter Hypoxie nachgewiesen (161).

Die kompartimentspezifische Analyse nach 24 Stunden Hypoxie zeigt, wie auch bei dem untersuchten Lungenhomogenat, zunächst eine reduzierte TLR2-Expression, hier jedoch vor allem in den mikrodissenzierten Gefäßen und Alveolarsepten. Dabei konnte eine signifikant verminderte Expression in den untersuchten Alveolarsepten beobachtet werden ( $p = 0,006$ ). Die PCR-Analyse der BAL ergab eine leicht erhöhte Expression, brachte jedoch keine signifikanten Ergebnisse.

Mit immunhistochemischen Techniken sollte TLR2 zum einen auf Proteinebene nachgewiesen werden, zum anderen sollte eine differentielle Immunreaktivität der Lungenkompartimente an Gefrierschnitten von normoxischen und hypoxischen Mäuselungen visuell dargestellt werden. Immunreaktivität für TLR2 konnte in den untersuchten Gefäßwänden, Bronchiolen und auch im Alveolarraum beobachtet werden. Allerdings waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Normoxie und Hypoxie feststellbar. Auch die Untersuchung mittels Western Blot brachte keine aussagekräftigen Resultate auf Proteinebene.

Aus den vorgelegten Ergebnissen ergibt sich letztlich der Hinweis darauf, dass möglicherweise Typ-II-Pneumozyten, die neben Typ-I-Pneumozyten wesentlicher Bestandteil des Alveolarseptums sind, unter akuter Hypoxie weniger TLR2 exprimieren und es in dieser Phase somit zu einer weniger ausgeprägten pulmonalen Inflammation kommt. Die Untersuchung des Lungenhomogenats hat ergeben, dass unter chronischer Hypoxie mit einem Anstieg der TLR2-Expression zu rechnen ist und damit verbunden pulmonale Infektionsreaktionen initiiert werden. Kuhlicke et al. haben gezeigt, dass die unter Hypoxie beobachtete TLR2-Expression durch einen mit HIF-1 assoziierten Weg vermittelt wird (161). Weiterführende Studien müssen daher den zeitlichen Zusammenhang zwischen der Expression von HIF-1 und TLR2 untersuchen, um die Regulationsmechanismen im Rahmen akuter und chronischer Hypoxie weiter zu entschlüsseln. Außerdem müssen weitere Experimente erfolgen, um herauszufinden welche Bestandteile des Alveolarseptums die in diesen Versuchen beobachtete reduzierte TLR2-Expression aufweisen.

## 4.6 CCL5

Das Chemokin CCL5 gehört zu den Zytokinen. Diese zellregulatorischen Proteine haben vielfältige Wirkungen auf verschiedenste Zellpopulationen. Über spezifische Rezeptoren bewirken sie z. B. die Freisetzung von bestimmten Mediatoren, so auch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (123). Zytokine wirken häufig pleiotrop, was bedeutet, dass sie in verschiedenen Zellen unterschiedliche Effekte hervorrufen (162). Verschiedene Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass CCL5 (früher RANTES) chemotaktische Wirkungen auf Monozyten, Lymphozyten, eosinophile und basophile Granulozyten hat und so z. B. zur Einwanderung dieser Zellen in entzündlich veränderte Gebiete führen kann (85-103). Weitere Untersuchungen konnten belegen, dass CCL5 außerdem von verschiedenen Zellen produziert und sezerniert werden kann. Zu diesen Zellen gehören z. B. Thrombozyten, Monozyten, B-Lymphozyten, Fibroblasten, Bronchialepithelzellen und Endothelzellen (105, 106). Amrani et al. konnten des Weiteren eine CCL5-Sekretion durch alveoläre glatte Gefäßmuskelzellen beobachten (104). Dass CCL5 zudem von Typ-II-Pneumozyten exprimiert wird, wurde durch eine Studie von Casola et al. bekannt (92). Die Bedeutung von CCL5 für die Immunantwort wird zudem anhand mehrerer Untersuchungen verdeutlicht, in denen bei vielen unterschiedlichen pulmonalen Erkrankungen CCL5 nachgewiesen werden konnte (93, 99, 114-121). Bisher wurden jedoch keine Studien bezüglich des Zusammenhangs von Hypoxie und CCL5-Expression publiziert.

In dieser Studie konnte mittels PCR-Analyse in Lungenhomogenat eine verminderte CCL5-Expression sowohl in der akuten Hypoxie-Phase, als auch nach siebentägiger Hypoxie-Exposition festgestellt werden. Hierbei zeigte sich erst in der chronischen Hypoxie-Phase eine annähernd signifikant reduzierte Expression ( $p = 0,08$ ).

Die kompartimentspezifische PCR-Analyse zeigte hingegen schon nach 24 Stunden Hypoxie-Exposition eine nahezu signifikant verminderte CCL5-Expression in mikrodissezierten Gefäßen ( $p = 0,08$ ) sowie eine signifikant verminderte Expression in den untersuchten Alveolarsepten ( $p = 0,02$ ). Ob für diese Herunterregulation von CCL5 auf Gefäßebene alveoläre glatte Muskelzellen und Typ-II-Pneumozyten in Alveolarsepten verantwortlich sind, oder sogar andere Bestandteile des Gewebes, muss durch weitere Untersuchungen erforscht werden.

In den Zellen der BAL war unter akuter Hypoxie eine signifikant erhöhte CCL5-Expression zu beobachten. Hierbei kann jedoch keine klare Aussage darüber gemacht werden, durch welche Zellen die Heraufregulation hervorgerufen wurde, da sowohl für Monozyten und Lymphozyten, aber auch Bronchialepithelzellen eine CCL5-Expression beschrieben wurde (105, 106). Zur zellspezifischen Analyse müssen daher diesbezüglich weitere Versuche unternommen werden.

Diese Resultate zeigen, dass sowohl akute als auch chronische Hypoxie zu einer CCL5-Regulation führen, eine Hoch- oder Herunterregulation jedoch auf Kompartimentebene unterschiedlich ist. Weiterführende Studien müssen daher untersuchen, welche Bestandteile der einzelnen Lungenkompartimente letztlich eine CCL5-spezifische Regulation zeigen und wie die genauen Mechanismen und Signalwege aussehen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass immunhistochemische Techniken und Western Blot dafür nur bedingt geeignet sind. Daher müssen zukünftig diesbezüglich neue Methoden etabliert werden.

## 5 Zusammenfassung

Trotz vieler Studien zur Erforschung der Auswirkungen von Hypoxie auf die Genexpression in pulmonalem Gewebe sind die Effekte hinsichtlich Inflammation immer noch unklar. In dieser Arbeit wurden Lungen von Mäusen, die unter normoxischen ( $\text{FiO}_2 = 0,2$ ) oder hypoxischen ( $\text{FiO}_2 = 0,1$ ) Bedingungen gehalten wurden, hinsichtlich der Expression bestimmter Gene, die in Zusammenhang mit dem angeborenen und erworbenen Immunsystem stehen, untersucht.

Nach 24-stündiger Exposition unter hypoxischen Bedingungen ließ die Analyse von Lungenhomogenat eine verminderte Expression von mit dem erworbenen Immunsystem assoziierten Genen (MHCII, CD74 und CtsS) auf mRNA-Ebene erkennen. Demgegenüber konnte nach sieben Tagen Hypoxie, außer für CtsS, eine gesteigerte Expression beobachtet werden. Die untersuchten Gene der angeborenen Immunität (CCL5, TLR2) wurden nach 24 Stunden ebenfalls auf mRNA-Ebene weniger exprimiert. Während die CCL5-Expression nach sieben Tagen Hypoxie jedoch weiter abnahm, zeigte sich ein Anstieg der TLR2-Expression unter chronischer Hypoxie.

In der kompartimentspezifischen Analyse (Gefäße, Lungenparenchym, BAL) ließen sich signifikante Unterschiede in der Genexpression unter Hypoxie herausarbeiten. So zeigten TLR2 und CCL5 in der akuten Hypoxie-Phase eine signifikant verminderte Expression in Alveolarsepten. Die CCL5-Expression war in der BAL hingegen signifikant erhöht. Bei den Genen des erworbenen Immunsystems war vor allem auf Gefäßebene für MHCII und CD74 eine signifikant verminderte Expression erkennbar.

Obwohl mit Immunhistochemie und Western Blot zwei etablierte Verfahren zur semi-quantitativen Evaluation der Proteinexpression herangezogen wurden, war es in dieser Studie nicht möglich anhand dieser Verfahren statistisch signifikante Unterschiede in der Expression der o. g. Moleküle unter Hypoxie nachzuweisen.

Eine neue Erkenntnis dieser Studie war die Identifizierung einer unter Hypoxie aufgetretenen Form des MHCII-Proteins mit hohem Molekulargewicht. Dies deutet möglicherweise auf posttranslationale Modifikationen, z. B. Glycosylierung oder Interaktion mit anderen Proteinen, hin. Dies muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Die hier präsentierten Ergebnisse unterstützen und erweitern die bisherigen Kenntnisse über hypoxieinduzierte Veränderungen der Genexpression, sowohl unter akuter als auch

chronischer Hypoxie. Die Resultate zeigen außerdem, dass eine Hoch- und Herunterregulation der untersuchten Gene auf Ebene der Lungenkompartimente unterschiedlich ist und geben Einblicke in die verschiedenen Regulationsmechanismen der angeborenen und erworbenen Immunabwehr. Darauf aufbauend müssen nun weitere Untersuchungen zur Entschlüsselung dieser Mechanismen erfolgen.

## 6 Summary

Despite many reports investigating the effects of hypoxia on gene expression in pulmonary tissue, its effects on inflammation is still unclear. In this study, lungs from mice kept under normoxic or hypoxic ( $FiO_2 = 0,1$ ) conditions, were analysed for expression of genes associated with innate and adaptive immune system.

After 24 hours hypoxia exposure, analysis of lung homogenate samples revealed reduced expression of genes associated with the adaptive immune system (MHCII, CD74 and CtsS) at the level of mRNA, whereas after seven days hypoxia increased expression, except for CtsS, could be observed. Genes associated with the innate immune system (CCL5, TLR2) also showed a decreased expression at the level of mRNA after 24 hours hypoxia. While CCL5-expression continued to be decreased, TLR2 showed an increase under chronic hypoxia.

Compartmental-specific analysis (vessels, parenchyma and bronchioalveolar lavage) revealed significant differences in gene expression. Exemplary, TLR2 and CCL5 showed significant diminished expression in alveolar septum under acute hypoxia. On the other hand CCL5 expression in the BAL was significant elevated. Concerning genes of the adaptive immune system, mainly MHCII and CD74, showed significantly decreased expression in vessels.

Although immunohistochemistry and Western Blot analysis are two well established methods to detect protein levels, the present study was unable to give statistical significant evidence of protein regulation under hypoxia.

One novel finding of this study was the identification of a high molecular weight form of the MHC-II protein under hypoxia. This potentially indicates post-translation modification e.g. glycosylation or interaction with other proteins and thus alteration in its function, however, further analysis should be conducted.

The presented findings support and extend the hitherto existing knowledge concerning hypoxia-induced change in gene expression under acute and chronic hypoxia. Furthermore, these results show that up- and downregulation of genes determined in this study is different on the level of lung compartments and give insight in the different regulatory mechanisms of innate and adaptive immunity. Based on these findings further analysis to map these regulatory mechanisms have to be established.

## II Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Anti, gegen
AEC	Alveolarepithelzellen
Ak	Antikörper
Abb.	Abbildung
AML	Akute myeloische Leukämie
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
APC	Antigenpräsentierende Zellen
APS	Ammoniumpersulfat
ASM	Alveolar Smooth Muscle Cells
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALT	Bronchus Associated Lymphatic Tissue
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaardann
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCL5	C-C-Chemokinligand 5
CCR	C-C-Chemokinrezeptor
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementär-Desoxyribonukleinsäure
CLIP	class-II-associated invariant-chain peptide
CMV	Zytomegalie-Virus
Ct	Threshold cycle
CtsS	Cathepsin S
d	Tag
DAPI	4', 6'-Diamidino-2-phenylindol

---

d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	DNA spaltendes Enzym
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FW	Forward Primer
G	Gauge (Außendurchmesser von Kanülen)
GTC	Guanidium-Thiocyanat
h	Stunde(n)
HCL	Chlorwasserstoff-/Salzsäure
HIF-1	Hypoxia inducible factor-1
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
Hox	Hypoxie, hypoxisch
HPV	Hypoxische Vasokonstriktion
HRP	Horseradish Peroxidase, Meerrettichperoxidase
IFN $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
Ii	invariant chain / invariante Kette
Kap.	Kapitel
KCL	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LCM	Laser-gesteuerte Mikrodisektion
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar

---

mA	Milliampere
MHC	Major histocompatibility complex
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
MIP	Macrophage inflammatory protein
mind.	Mindestens
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
n	Anzahl der untersuchten Proben
NaAc	Natriumacetat
NFκB	Nuclear Factor kappa B
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nox	Normoxie, normoxisch
Nr.	Nummer
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
o. g.	oben genannt
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBGD	Porphobilinogendeaminase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PRR	Pattern recognition receptor
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RANTES	Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
RES	Retikuloendotheliales System
RNA	Ribonukleinsäure

---

RP	Reverse Primer
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
s, sek	Sekunden
s.	siehe
S.	Seite
SAAP	Streptavidin-Alkalische Phosphatase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standard Error of Mean
SMC	Smooth muscle cell, glatte Gefäßmuskelzelle
sog.	Sogenannt
SP-C	Surfactant Protein C
ss (DNA)	Einzelstrang (single stranded)-DNA
SSW	Schwangerschaftswoche
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
TLR2	Toll-like Receptor 2
TGF $\beta$	Tumor growth factor beta
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
z. B.	zum Beispiel
ZT	Zimmertemperatur
$\Delta$	Delta

### III Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: MHC-Klasse-II-Molekül .....	6
Abb. 2: NanoDrop®.....	27
Abb. 3: Beispiel für den Nachweis von DNA mit der Agarose-Gelelektrophorese....	31
Abb. 4: Anlagerung eines enzymmarkierten Sekundäntikörpers an den Primäntikörper .....	40
Abb. 5: Veränderung der Expression der ausgewählten Gene der adaptiven Immunabwehr, nach 1 d und 7 d Hypoxieexposition .....	46
Abb. 6: Veränderung der Expression der Gene der angeborenen Immunabwehr, nach 1 d und 7 d Hypoxieexposition .....	47
Abb. 7: Ergebnis der Regressionsanalyse CD74 vs. Aa, Ab1 und Eb1 .....	48
Abb. 8: Ergebnis der Regressionsanalyse CtsS vs. Aa, Ab1 und Eb1 .....	49
Abb. 9: Ergebnis der Regressionsanalyse TLR2 vs. Aa, Ab1 und Eb1 .....	49
Abb. 10: Ergebnis der Regressionsanalyse CCL5 vs. Aa, Ab1 und Eb1 .....	50
Abb. 11: Ergebnis der Regressionsanalyse CD74 vs. CtsS.....	51
Abb. 12: Ergebnis der Regressionsanalyse CD74 vs. TLR2.....	51
Abb. 13: Ergebnis der Regressionsanalyse CD74 vs. CCL5 .....	52
Abb. 14: Ergebnis der Regressionsanalyse CtsS vs. TLR2.....	53
Abb. 15: Ergebnis der Regressionsanalyse CtsS vs. CCL5.....	53
Abb. 16: Ergebnis der Regressionsanalyse TLR2 vs. CCL5.....	54
Abb. 17: Kompartimentspezifische Veränderung der Genexpression bei MHCII- kodierenden Genen nach 1 d Hypoxie .....	56
Abb. 18: Nachweis von MHCII (48 kDa) mittels Western Blot.....	59
Abb. 19: Densitometrie der Western-Blot-Analyse für MHCII .....	60
Abb. 20: Kompartimentspezifische Veränderung der Genexpression von CD74 nach 1 d Hypoxie .....	61
Abb. 21: Nachweis von CD74 (45 kDa) mittels Western Blot.....	64
Abb. 22: Densitometrie der Western-Blot-Analyse für CD74 .....	65
Abb. 23: Kompartimentspezifische Veränderung der Genexpression von CtsS nach 1 d Hypoxie .....	66
Abb. 24: Nachweis von CtsS (30 kDa) mittels Western Blot.....	68
Abb. 25: Kompartimentspezifische Veränderung der Genexpression von TLR2 nach 1 d Hypoxie .....	70
Abb. 26: Nachweis von TLR2 (ca. 90 - 100 kDa) mittels Western Blot .....	72
Abb. 27: Kompartimentspezifische Veränderung der Genexpression von CCL5 nach 1 d Hypoxie .....	74

## IV Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Gefäßwachstum und -tonusregulierende Substanzen des Endothels, die durch Hypoxie reguliert werden.....	3
Tab. 2: Verwendete PCR-Primer.....	15
Tab. 3: Reagenzien zur cDNA-Synthese.....	28
Tab. 4: Reaktionszyklen der rt-PCR.....	29
Tab. 5: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie .....	33
Tab. 6: Verwendete Primär-Antikörper mit Angabe von Verdünnung und Hersteller .....	33
Tab. 7: Verwendete Sekundär-Antikörper mit Angabe von Verdünnung und Hersteller .....	34
Tab. 8: Verwendete Tertiär-Antikörper mit Angabe von Verdünnung und Hersteller .....	34
Tab. 9: Materialien zur Herstellung des Trenngels .....	36
Tab. 10: Materialien zur Herstellung des Sammelgels .....	37
Tab. 11: Verwendete Primär-Antikörper mit Angabe von Verdünnung und Hersteller .....	41
Tab. 12: Verwendete Sekundär-Antikörper mit Angabe von Verdünnung und Hersteller .....	41
Tab. 13: Ergebnisse der RNA-Isolierung.....	43
Tab. 14: Differenz ( $\Delta$ ) der $\Delta$ Ct-Mittelwerte zwischen normoxischen und hypoxischen Lungenhomogenat-Proben, nach 1 d und 7 d Hyp- sowie Normoxie .....	45
Tab. 15: Expression der MHCII-kodierenden Gene in mikrodisssezierten Gefäßen und Alveolarsepten, sowie in durch bronchoalveoläre Lavage gewonnenen Alveolarmakrophagen.....	55
Tab. 16: MHCII-Färbung in Gefäßen, Bronchien und Alveolarsepten von normoxischen (Nox) und hypoxischen (Hox) Mäusen nach 1 d Norm- und Hypoxie.....	57
Tab. 17: Expression von CD74 in mikrodisssezierten Gefäßen und Alveolarsepten, sowie in durch bronchoalveoläre Lavage gewonnenen Alveolarmakrophagen.....	60
Tab. 18: CD74-Färbung in Gefäßen, Bronchien und Alveolarsepten von normoxischen (Nox) und hypoxischen (Hox) Mäusen nach 1 d Norm- und Hypoxie.....	62

---

Tab. 19: Expression von CtsS in mikrodissezierten Gefäßen und Alveolarsepten, sowie in durch bronchoalveoläre Lavage gewonnenen Alveolarmakrophagen .....	65
Tab. 20: CtsS-Färbung in Gefäßen, Bronchien und Alveolarsepten von normoxischen (Nox) und hypoxischen (Hox) Mäusen nach 1 d Norm- und Hypoxie.....	67
Tab. 21: Expression von TLR2 in mikrodissezierten Gefäßen und Alveolarsepten, sowie in durch bronchoalveoläre Lavage gewonnenen Alveolarmakrophagen .....	69
Tab. 22: TLR2-Färbung in Gefäßen, Bronchien und Alveolarsepten von normoxischen (Nox) und hypoxischen (Hox) Mäusen nach 1 d Norm- und Hypoxie.....	71
Tab. 23: Expression von CCL5 in mikrodissezierten Gefäßen und Alveolarsepten, sowie in durch bronchoalveoläre Lavage gewonnenen Alveolarmakrophagen .....	73

## V Literaturverzeichnis

1. Seeger, W., H. Olschewski, R. Schulz. 2004. Atmung. In *Pathophysiologie, Pathobiochemie, 2. Auflage*, 187.
2. Baumhoer, D., I. Steinbrück, W. Götz. 2003. Atemapparat. In *Kurzlehrbuch Histologie* 139.
3. Thews, G. 1997. Euler-Liljestrand-Mechanismus. In *Physiologie des Menschen* 588.
4. Machado, R. D., M. W. Pauciulo, J. R. Thomson, K. B. Lane, N. V. Morgan, L. Wheeler, J. A. Phillips, 3rd, J. Newman, D. Williams, N. Galie, A. Manes, K. McNeil, M. Yacoub, G. Mikhail, P. Rogers, P. Corris, M. Humbert, D. Donnai, G. Martensson, L. Tranebjaerg, J. E. Loyd, R. C. Trembath, and W. C. Nichols. 2001. BMPR2 haploinsufficiency as the inherited molecular mechanism for primary pulmonary hypertension. *Am J Hum Genet* 68:92.
5. Meyrick, B., and L. Reid. 1980. Hypoxia-induced structural changes in the media and adventitia of the rat hilar pulmonary artery and their regression. *Am J Pathol* 100:151.
6. Jeffery, T. K., and J. C. Wanstall. 2001. Comparison of pulmonary vascular function and structure in early and established hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 79:227.
7. Tanaka, Y., D. P. Schuster, E. C. Davis, G. A. Patterson, and M. D. Botney. 1996. The role of vascular injury and hemodynamics in rat pulmonary artery remodeling. *J Clin Invest* 98:434.
8. Durmowicz, A. G., and K. R. Stenmark. 1999. Mechanisms of structural remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Pediatr Rev* 20:e91.
9. Mairbaur, H., K. Mayer, K. J. Kim, Z. Borok, P. Bartsch, and E. D. Crandall. 2002. Hypoxia decreases active Na transport across primary rat alveolar epithelial cell monolayers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282:L659.
10. Lepenies, J. 2000. Exogene Noxen. In *Allgemeine und spezielle Pathologie* 25.
11. Sulkowska, M. 1997. Morphological studies of the lungs in chronic hypobaric hypoxia. *Pol J Pathol* 48:225.
12. Witt, K. 2000. Grundlagen zur Pathologie der Atmung. In *Allgemeine und spezielle Pathologie, 2. Auflage*, 151.
13. Kwapiszewska, G., J. Wilhelm, S. Wolff, I. Laumanns, I. R. Koenig, A. Ziegler, W. Seeger, R. M. Bohle, N. Weissmann, and L. Fink. 2005. Expression profiling of laser-microdissected intrapulmonary arteries in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Respir Res* 6:109.
14. Staerk, W. 2006. Kompartiment-spezifische Analyse Hypoxie-regulierter Proteine bei chronischen hypoxischen, interstitiellen und vaskulären Lungenerkrankungen des Menschen. *Justus-Liebig-Universität Gießen*, 118.
15. Wolff, S. 2005. Hypoxie-induzierte Genexpressionsveränderungen in Laser-mikrodissezierten Lungenkompartimenten. *Justus-Liebig-Universität Gießen*, 135.

16. Kreuzig, T. 2002. Immunchemie. In *Biochemie, 11. Auflage*, 359.
17. Janeway, C. A. 2002. Die Antigenerkennung durch T-Zellen. In *Immunologie, 5. Auflage*, 120.
18. Watts, C. 1997. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 15:821.
19. Benoist, C., and D. Mathis. 1990. Regulation of major histocompatibility complex class-II genes: X, Y and other letters of the alphabet. *Annu Rev Immunol* 8:681.
20. Glimcher, L. H., and C. J. Kara. 1992. Sequences and factors: a guide to MHC class-II transcription. *Annu Rev Immunol* 10:13.
21. Mach, B., V. Steimle, E. Martinez-Soria, and W. Reith. 1996. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu Rev Immunol* 14:301.
22. Cunningham, A. C., D. S. Milne, J. Wilkes, J. H. Dark, T. D. Tetley, and J. A. Kirby. 1994. Constitutive expression of MHC and adhesion molecules by alveolar epithelial cells (type II pneumocytes) isolated from human lung and comparison with immunocytochemical findings. *J Cell Sci* 107 (Pt 2):443.
23. Cunningham, A. C., J. G. Zhang, J. V. Moy, S. Ali, and J. A. Kirby. 1997. A comparison of the antigen-presenting capabilities of class II MHC-expressing human lung epithelial and endothelial cells. *Immunology* 91:458.
24. Janeway, C. A. 2002. Die Erkennung von Antigenen. In *Immunologie, 5. Auflage*, 175.
25. Türeci, Ö., M. Pfreundschuh. 2004. Leukozyten und Immunsystem. In *Pathophysiologie, Pathobiochemie* 83.
26. Madsen, L., N. Labrecque, J. Engberg, A. Dierich, A. Svejgaard, C. Benoist, D. Mathis, and L. Fugger. 1999. Mice lacking all conventional MHC class II genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10338.
27. Peters, U., T. Papadopoulos, and H. K. Muller-Hermelink. 1990. MHC class II antigens on lung epithelial of human fetuses and neonates. Ontogeny and expression in lungs with histologic evidence of infection. *Lab Invest* 63:38.
28. Jones, P. P., D. B. Murphy, D. Hewgill, and H. O. McDevitt. 1979. Detection of a common polypeptide chain in I--A and I--E sub-region immunoprecipitates. *Mol Immunol* 16:51.
29. Long, E. O., M. Strubin, C. T. Wake, N. Gross, S. Carrel, P. Goodfellow, R. S. Accolla, and B. Mach. 1983. Isolation of cDNA clones for the p33 invariant chain associated with HLA-DR antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:5714.
30. Claesson, L., D. Larhammar, L. Rask, and P. A. Peterson. 1983. cDNA clone for the human invariant gamma chain of class II histocompatibility antigens and its implications for the protein structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:7395.
31. Strubin, M., B. Mach, and E. O. Long. 1984. The complete sequence of the mRNA for the HLA-DR-associated invariant chain reveals a polypeptide with an unusual transmembrane polarity. *Embo J* 3:869.

32. Rebmann, V., K. Dornmair, and H. Grosse-Wilde. 1997. Biochemical analysis of plasma-soluble invariant chains and their complex formation with soluble HLA-DR. *Tissue Antigens* 49:438.
33. Cresswell, P. 1994. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* 12:259.
34. Cresswell, P. 1996. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84:505.
35. Bakke, O., and B. Dobberstein. 1990. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 63:707.
36. Bertolino, P., and C. Rabourdin-Combe. 1996. The MHC class II-associated invariant chain: a molecule with multiple roles in MHC class II biosynthesis and antigen presentation to CD4+ T cells. *Crit Rev Immunol* 16:359.
37. Geuze, H. J. 1998. The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol Today* 19:282.
38. Miyazaki, T., P. Wolf, S. Tourne, C. Waltzinger, A. Dierich, N. Barois, H. Ploegh, C. Benoist, and D. Mathis. 1996. Mice lacking H2-M complexes, enigmatic elements of the MHC class II peptide-loading pathway. *Cell* 84:531.
39. Martin, W. D., G. G. Hicks, S. K. Mendiratta, H. I. Leva, H. E. Ruley, and L. Van Kaer. 1996. H2-M mutant mice are defective in the peptide loading of class II molecules, antigen presentation, and T cell repertoire selection. *Cell* 84:543.
40. Viville, S., J. Neefjes, V. Lotteau, A. Dierich, M. Lemeur, H. Ploegh, C. Benoist, and D. Mathis. 1993. Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* 72:635.
41. Burton, J. D., S. Ely, P. K. Reddy, R. Stein, D. V. Gold, T. M. Cardillo, and D. M. Goldenberg. 2004. CD74 is expressed by multiple myeloma and is a promising target for therapy. *Clin Cancer Res* 10:6606.
42. Leng, L., C. N. Metz, Y. Fang, J. Xu, S. Donnelly, J. Baugh, T. Delohery, Y. Chen, R. A. Mitchell, and R. Bucala. 2003. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med* 197:1467.
43. Baugh, J. A., and R. Bucala. 2002. Macrophage migration inhibitory factor. *Crit Care Med* 30:S27.
44. Calandra, T., J. Bernhagen, R. A. Mitchell, and R. Bucala. 1994. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med* 179:1895.
45. Lue, H., R. Kleemann, T. Calandra, T. Roger, and J. Bernhagen. 2002. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect* 4:449.
46. Shi, X., L. Leng, T. Wang, W. Wang, X. Du, J. Li, C. McDonald, Z. Chen, J. W. Murphy, E. Lolis, P. Noble, W. Knudson, and R. Bucala. 2006. CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity* 25:595.
47. Takahashi, K., K. Koga, H. M. Linge, Y. Zhang, X. Lin, C. N. Metz, Y. Al-Abed, K. Ojamaa, and E. J. Miller. 2009. Macrophage CD74 contributes to MIF-induced pulmonary inflammation. *Respir Res* 10:33.

48. Marsh, L. M., L. Cakarova, G. Kwapiszewska, W. von Wulffen, S. Herold, W. Seeger, and J. Lohmeyer. 2009. Surface expression of CD74 by type II alveolar epithelial cells: a potential mechanism for macrophage migration inhibitory factor-induced epithelial repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296:L442.
49. Kirschke, H., and B. Wiederanders. 1987. Lysosomal proteinases. *Acta Histochem* 82:2.
50. Chapman, H. A., R. J. Riese, and G. P. Shi. 1997. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol* 59:63.
51. Shi, G. P., A. C. Webb, K. E. Foster, J. H. Knoll, C. A. Lemere, J. S. Munger, and H. A. Chapman. 1994. Human cathepsin S: chromosomal localization, gene structure, and tissue distribution. *J Biol Chem* 269:11530.
52. Shi, G. P., J. S. Munger, J. P. Meara, D. H. Rich, and H. A. Chapman. 1992. Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastinolytic cysteine protease. *J Biol Chem* 267:7258.
53. Riese, R. J., P. R. Wolf, D. Bromme, L. R. Natkin, J. A. Villadangos, H. L. Ploegh, and H. A. Chapman. 1996. Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 4:357.
54. Riese, R. J., R. N. Mitchell, J. A. Villadangos, G. P. Shi, J. T. Palmer, E. R. Karp, G. T. De Sanctis, H. L. Ploegh, and H. A. Chapman. 1998. Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity. *J Clin Invest* 101:2351.
55. Fajardo, I., L. Svensson, A. Bucht, and G. Pejler. 2004. Increased levels of hypoxia-sensitive proteins in allergic airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 170:477.
56. Zheng, T., M. J. Kang, K. Crothers, Z. Zhu, W. Liu, C. G. Lee, L. A. Rabach, H. A. Chapman, R. J. Homer, D. Aldous, G. T. De Sanctis, S. Underwood, M. Graupe, R. A. Flavell, J. A. Schmidt, and J. A. Elias. 2005. Role of cathepsin S-dependent epithelial cell apoptosis in IFN-gamma-induced alveolar remodeling and pulmonary emphysema. *J Immunol* 174:8106.
57. Sandor, F., and M. Buc. 2005. Toll-like receptors. I. Structure, function and their ligands. *Folia Biol (Praha)* 51:148.
58. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394.
59. Rock, F. L., G. Hardiman, J. C. Timans, R. A. Kastelein, and J. F. Bazan. 1998. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:588.
60. Takeuchi, O., T. Kawai, H. Sanjo, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, K. Takeda, and S. Akira. 1999. TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene* 231:59.
61. Schwandner, R., R. Dziarski, H. Wesche, M. Rothe, and C. J. Kirschning. 1999. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 274:17406.
62. Yoshimura, A., E. Lien, R. R. Ingalls, E. Tuomanen, R. Dziarski, and D. Golenbock. 1999. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall com-

- ponents by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 163:1.
63. Janeway, C. A., Jr., and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197.
  64. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2:675.
  65. Pons, J., J. Sauleda, V. Regueiro, C. Santos, M. Lopez, J. Ferrer, A. G. Agusti, and J. A. Bengoechea. 2006. Expression of Toll-like receptor 2 is up-regulated in monocytes from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 7:64.
  66. Sha, Q., A. Q. Truong-Tran, J. R. Plitt, L. A. Beck, and R. P. Schleimer. 2004. Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31:358.
  67. Nishimura, M., and S. Naito. 2005. Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes. *Biol Pharm Bull* 28:886.
  68. Xu, D., M. Komai-Koma, and F. Y. Liew. 2005. Expression and function of Toll-like receptor on T cells. *Cell Immunol* 233:85.
  69. Droemann, D., T. Goldmann, D. Branscheid, R. Clark, K. Dalhoff, P. Zabel, and E. Vollmer. 2003. Toll-like receptor 2 is expressed by alveolar epithelial cells type II and macrophages in the human lung. *Histochem Cell Biol* 119:103.
  70. Armstrong, L., A. R. Medford, K. M. Uppington, J. Robertson, I. R. Witherden, T. D. Tetley, and A. B. Millar. 2004. Expression of functional toll-like receptor-2 and -4 on alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31:241.
  71. Guillot, L., S. Medjane, K. Le-Barillec, V. Balloy, C. Danel, M. Chignard, and M. Si-Tahar. 2004. Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. *J Biol Chem* 279:2712.
  72. Takeuchi, O., K. Hoshino, and S. Akira. 2000. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* 165:5392.
  73. Wetzler, L. M. 2003. The role of Toll-like receptor 2 in microbial disease and immunity. *Vaccine* 21 Suppl 2:S55.
  74. Echchannaoui, H., K. Frei, C. Schnell, S. L. Leib, W. Zimmerli, and R. Landmann. 2002. Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J Infect Dis* 186:798.
  75. Flo, T. H., O. Halaas, S. Torp, L. Ryan, E. Lien, B. Dybdahl, A. Sundan, and T. Espevik. 2001. Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *J Leukoc Biol* 69:474.
  76. Gonzalo, J. A., C. M. Lloyd, D. Wen, J. P. Albar, T. N. Wells, A. Proudfoot, A. C. Martinez, M. Dorf, T. Bjerke, A. J. Coyle, and J. C. Gutierrez-Ramos. 1998. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J Exp Med* 188:157.

77. Miller, M. D., and M. S. Krangel. 1992. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev Immunol* 12:17.
78. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser. 1994. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 55:97.
79. Luster, A. D., and M. E. Rothenberg. 1997. Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *J Leukoc Biol* 62:620.
80. Gonzalo, J. A., C. M. Lloyd, L. Kremer, E. Finger, A. C. Martinez, M. H. Siegelman, M. Cybulsky, and J. C. Gutierrez-Ramos. 1996. Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation. The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors. *J Clin Invest* 98:2332.
81. Jia, G. Q., J. A. Gonzalo, C. Lloyd, L. Kremer, L. Lu, A. C. Martinez, B. K. Wershil, and J. C. Gutierrez-Ramos. 1996. Distinct expression and function of the novel mouse chemokine monocyte chemotactic protein-5 in lung allergic inflammation. *J Exp Med* 184:1939.
82. MacLean, J. A., R. Ownbey, and A. D. Luster. 1996. T cell-dependent regulation of eotaxin in antigen-induced pulmonary eosinophilia. *J Exp Med* 184:1461.
83. Janeway, C. A. T., Paul; Walport, Mark; Shlomchik, Mark. 2008. *Immunobiology 7th ed.* Taylor & Francis.
84. Donlon, T. A., A. M. Krensky, M. R. Wallace, F. S. Collins, M. Lovett, and C. Clayberger. 1990. Localization of a human T-cell-specific gene, RANTES (D17S136E), to chromosome 17q11.2-q12. *Genomics* 6:548.
85. Schall, T. J., K. Bacon, K. J. Toy, and D. V. Goeddel. 1990. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 347:669.
86. Alam, R., S. Stafford, P. Forsythe, R. Harrison, D. Faubion, M. A. Lett-Brown, and J. A. Grant. 1993. RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *J Immunol* 150:3442.
87. Hallsworth, M. P., C. H. Twort, T. H. Lee, and S. J. Hirst. 2001. beta(2)-adrenoceptor agonists inhibit release of eosinophil-activating cytokines from human airway smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 132:729.
88. Ayad, O., J. M. Stark, M. M. Fiedler, I. Y. Menendez, M. A. Ryan, and H. R. Wong. 1998. The heat shock response inhibits RANTES gene expression in cultured human lung epithelium. *J Immunol* 161:2594.
89. Belperio, J. A., M. D. Burdick, M. P. Keane, Y. Y. Xue, J. P. Lynch, 3rd, B. L. Daugherty, S. L. Kunkel, and R. M. Strieter. 2000. The role of the CC chemokine, RANTES, in acute lung allograft rejection. *J Immunol* 165:461.
90. Schwiebert, L. M., K. Estell, and S. M. Propst. 1999. Chemokine expression in CF epithelia: implications for the role of CFTR in RANTES expression. *Am J Physiol* 276:C700.
91. Pan, Z. Z., L. Parkyn, A. Ray, and P. Ray. 2000. Inducible lung-specific expression of RANTES: preferential recruitment of neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L658.

92. Casola, A., N. Burger, T. Liu, M. Jamaluddin, A. R. Brasier, and R. P. Garofalo. 2001. Oxidant tone regulates RANTES gene expression in airway epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. Role in viral-induced interferon regulatory factor activation. *J Biol Chem* 276:19715.
93. Petrek, M., P. Pantelidis, A. M. Southcott, P. Lympny, P. Safranek, C. M. Black, V. Kolek, E. Weigl, and R. M. du Bois. 1997. The source and role of RANTES in interstitial lung disease. *Eur Respir J* 10:1207.
94. Blease, K., B. Mehrad, T. J. Standiford, N. W. Lukacs, S. L. Kunkel, S. W. Chensue, B. Lu, C. J. Gerard, and C. M. Hogaboam. 2000. Airway remodeling is absent in CCR1<sup>-/-</sup> mice during chronic fungal allergic airway disease. *J Immunol* 165:1564.
95. Bless, N. M., M. Huber-Lang, R. F. Guo, R. L. Warner, H. Schmal, B. J. Czermak, T. P. Shanley, L. D. Crouch, A. B. Lentsch, V. Sarma, M. S. Mulligan, H. P. Friedl, and P. A. Ward. 2000. Role of CC chemokines (macrophage inflammatory protein-1 beta, monocyte chemoattractant protein-1, RANTES) in acute lung injury in rats. *J Immunol* 164:2650.
96. Kameyoshi, Y., A. Dorschner, A. I. Mallet, E. Christophers, and J. M. Schroder. 1992. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med* 176:587.
97. Lukacs, N. W., T. J. Standiford, S. W. Chensue, R. G. Kunkel, R. M. Strieter, and S. L. Kunkel. 1996. C-C chemokine-induced eosinophil chemotaxis during allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol* 60:573.
98. Cheng, G., T. Ueda, F. Eda, M. Arima, N. Yoshida, and T. Fukuda. 2001. A549 cells can express interleukin-16 and stimulate eosinophil chemotaxis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25:212.
99. Asai, Y., S. Hashimoto, K. Kujime, Y. Gon, K. Mizumura, K. Shimizu, and T. Horie. 2001. Amantadine inhibits RANTES production by influenzavirus-infected human bronchial epithelial cells. *Br J Pharmacol* 132:918.
100. Rot, A., M. Krieger, T. Brunner, S. C. Bischoff, T. J. Schall, and C. A. Dahinden. 1992. RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J Exp Med* 176:1489.
101. Ebisawa, M., T. Yamada, C. Bickel, D. Klunk, and R. P. Schleimer. 1994. Eosinophil transendothelial migration induced by cytokines. III. Effect of the chemokine RANTES. *J Immunol* 153:2153.
102. Bischoff, S. C., M. Krieger, T. Brunner, A. Rot, V. von Tscharner, M. Baggiolini, and C. A. Dahinden. 1993. RANTES and related chemokines activate human basophil granulocytes through different G protein-coupled receptors. *Eur J Immunol* 23:761.
103. Kuna, P., S. R. Reddigari, T. J. Schall, D. Rucinski, M. Y. Viksman, and A. P. Kaplan. 1992. RANTES, a monocyte and T lymphocyte chemotactic cytokine releases histamine from human basophils. *J Immunol* 149:636.
104. Amrani, Y., A. J. Ammit, and R. A. Panettieri, Jr. 2001. Tumor necrosis factor receptor (TNFR) 1, but not TNFR2, mediates tumor necrosis factor-alpha-

- induced interleukin-6 and RANTES in human airway smooth muscle cells: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *Mol Pharmacol* 60:646.
105. Sekerova, V., D. Subrtova, F. Mrazek, A. Gibejova, V. Kolek, R. M. du Bois, and M. Petrek. 2003. In vitro pharmacoregulation of CC chemokine ligand 5 and its receptor CCR5 in diffuse lung diseases. *Mediators Inflamm* 12:215.
106. Keane, M. P., T. J. Standiford, and R. M. Strieter. 1997. Chemokines are important cytokines in the pathogenesis of interstitial lung disease. *Eur Respir J* 10:1199.
107. Gao, J. L., D. B. Kuhns, H. L. Tiffany, D. McDermott, X. Li, U. Francke, and P. M. Murphy. 1993. Structure and functional expression of the human macrophage inflammatory protein 1 alpha/RANTES receptor. *J Exp Med* 177:1421.
108. Neote, K., D. DiGregorio, J. Y. Mak, R. Horuk, and T. J. Schall. 1993. Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor. *Cell* 72:415.
109. Post, T. W., C. R. Bozic, M. E. Rothenberg, A. D. Luster, N. Gerard, and C. Gerard. 1995. Molecular characterization of two murine eosinophil beta chemokine receptors. *J Immunol* 155:5299.
110. Daugherty, B. L., S. J. Siciliano, J. A. DeMartino, L. Malkowitz, A. Sirotina, and M. S. Springer. 1996. Cloning, expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. *J Exp Med* 183:2349.
111. Combadiere, C., S. K. Ahuja, H. L. Tiffany, and P. M. Murphy. 1996. Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1(alpha), MIP-1(beta), and RANTES. *J Leukoc Biol* 60:147.
112. Raport, C. J., J. Gosling, V. L. Schweickart, P. W. Gray, and I. F. Charo. 1996. Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha. *J Biol Chem* 271:17161.
113. Samson, M., O. Labbe, C. Mollereau, G. Vassart, and M. Parmentier. 1996. Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry* 35:3362.
114. Powell, N., M. Humbert, S. R. Durham, B. Assoufi, A. B. Kay, and C. J. Corrigan. 1996. Increased expression of mRNA encoding RANTES and MCP-3 in the bronchial mucosa in atopic asthma. *Eur Respir J* 9:2454.
115. Saito, T., R. W. Deskin, A. Casola, H. Haeberle, B. Olszewska, P. B. Ernst, R. Alam, P. L. Ogra, and R. Garofalo. 1997. Respiratory syncytial virus induces selective production of the chemokine RANTES by upper airway epithelial cells. *J Infect Dis* 175:497.
116. Becker, S., W. Reed, F. W. Henderson, and T. L. Noah. 1997. RSV infection of human airway epithelial cells causes production of the beta-chemokine RANTES. *Am J Physiol* 272:L512.
117. Olszewska-Pazdrak, B., A. Casola, T. Saito, R. Alam, S. E. Crowe, F. Mei, P. L. Ogra, and R. P. Garofalo. 1998. Cell-specific expression of RANTES, MCP-1, and MIP-1alpha by lower airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus. *J Virol* 72:4756.

118. Miller, A. L., T. L. Bowlin, and N. W. Lukacs. 2004. Respiratory syncytial virus-induced chemokine production: linking viral replication to chemokine production in vitro and in vivo. *J Infect Dis* 189:1419.
119. VanOtteren, G. M., R. M. Strieter, S. L. Kunkel, R. Paine, 3rd, M. J. Greenberger, J. M. Danforth, M. D. Burdick, and T. J. Standiford. 1995. Compartmentalized expression of RANTES in a murine model of endotoxemia. *J Immunol* 154:1900.
120. Schroth, M. K., E. Grimm, P. Frindt, D. M. Galagan, S. I. Konno, R. Love, and J. E. Gern. 1999. Rhinovirus replication causes RANTES production in primary bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:1220.
121. Monti, G., A. Magnan, M. Fattal, B. Rain, M. Humbert, J. L. Mege, M. Noirclerc, P. Dartevelle, J. Cerrina, G. Simonneau, P. Galanaud, and D. Emilie. 1996. Intrapulmonary production of RANTES during rejection and CMV pneumonia after lung transplantation. *Transplantation* 61:1757.
122. Kodama, N., E. Yamaguchi, N. Hizawa, K. Furuya, J. Kojima, M. Oguri, T. Takahashi, and Y. Kawakami. 1998. Expression of RANTES by bronchoalveolar lavage cells in nonsmoking patients with interstitial lung diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18:526.
123. Hillyer, P., E. Mordelet, G. Flynn, and D. Male. 2003. Chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules on different human endothelia: discriminating the tissue-specific functions that affect leucocyte migration. *Clin Exp Immunol* 134:431.
124. Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156.
125. Boenisch, T. 2003. Färbemethoden - Detektionssysteme. In *Handbuch Immunchemische Färbemethoden, 3. Auflage*, 35.
126. Little, A. M., and P. Parham. 1999. Polymorphism and evolution of HLA class I and II genes and molecules. *Rev Immunogenet* 1:105.
127. Hirani, N., F. Antonicelli, R. M. Strieter, M. S. Wiesener, P. J. Ratcliffe, C. Haslett, and S. C. Donnelly. 2001. The regulation of interleukin-8 by hypoxia in human macrophages--a potential role in the pathogenesis of the acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Mol Med* 7:685.
128. Madjdpour, C., U. R. Jewell, S. Kneller, U. Ziegler, R. Schwendener, C. Booy, L. Klausli, T. Pasch, R. C. Schimmer, and B. Beck-Schimmer. 2003. Decreased alveolar oxygen induces lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284:L360.
129. Kaur, C., V. Sivakumar, and W. S. Foulds. 2006. Early response of neurons and glial cells to hypoxia in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:1126.
130. Al-Saleh, S. S., C. Kaur, and E. A. Ling. 2003. Response of neurons and microglia/macrophages in the area postrema of adult rats following exposure to hyperbaric hypoxia. *Neurosci Lett* 346:77.
131. Sivakumar, B., M. A. Akhavan, C. P. Winlove, P. C. Taylor, E. M. Paleolog, and N. Kang. 2008. Synovial hypoxia as a cause of tendon rupture in rheumatoid arthritis. *J Hand Surg Am* 33:49.

132. Cramer, T., Y. Yamanishi, B. E. Clausen, I. Forster, R. Pawlinski, N. Mackman, V. H. Haase, R. Jaenisch, M. Corr, V. Nizet, G. S. Firestein, H. P. Gerber, N. Ferrara, and R. S. Johnson. 2003. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 112:645.
133. Paleolog, E. 2004. Hypoxia: not merely a regulator of angiogenesis? *Arthritis Res Ther* 6:75.
134. Martins, I., F. Deshayes, F. Baton, A. Forget, I. Ciechomska, K. Sylla, F. Aoudjit, D. Charron, R. Al-Daccak, and C. Alcaide-Loridan. 2007. Pathologic expression of MHC class II is driven by mitogen-activated protein kinases. *Eur J Immunol* 37:788.
135. Derniame, S., J. M. Vignaud, G. C. Faure, and M. C. Bene. 2008. Alteration of the immunological synapse in lung cancer: a microenvironmental approach. *Clin Exp Immunol* 154:48.
136. Pages, F., A. Berger, M. Camus, F. Sanchez-Cabo, A. Costes, R. Molidor, B. Mlecnik, A. Kirilovsky, M. Nilsson, D. Damotte, T. Meatchi, P. Bruneval, P. H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W. H. Fridman, and J. Galon. 2005. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 353:2654.
137. Sato, E., S. H. Olson, J. Ahn, B. Bundy, H. Nishikawa, F. Qian, A. A. Jungbluth, D. Frosina, S. Gnjjatic, C. Ambrosone, J. Kepner, T. Odunsi, G. Ritter, S. Lele, Y. T. Chen, H. Ohtani, L. J. Old, and K. Odunsi. 2005. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18538.
138. Ansell, S. M., M. Stenson, T. M. Habermann, D. F. Jelinek, and T. E. Witzig. 2001. Cd4+ T-cell immune response to large B-cell non-Hodgkin's lymphoma predicts patient outcome. *J Clin Oncol* 19:720.
139. Matsushita, N., M. Ghazizadeh, H. Konishi, and T. Araki. 2003. Association of ovarian tumor epithelium coexpressing HLA-DR and CA-125 antigens with tumor infiltrating cytotoxic T lymphocytes. *J Nippon Med Sch* 70:40.
140. Rimsza, L. M., R. A. Roberts, T. P. Miller, J. M. Unger, M. LeBlanc, R. M. Braziel, D. D. Weisenberger, W. C. Chan, H. K. Muller-Hermelink, E. S. Jaffe, R. D. Gascoyne, E. Campo, D. A. Fuchs, C. M. Spier, R. I. Fisher, J. Delabie, A. Rosenwald, L. M. Staudt, and T. M. Grogan. 2004. Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient survival regardless of other prognostic factors: a follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project. *Blood* 103:4251.
141. Rollins, B. J. 1996. Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol Med Today* 2:198.
142. Yoshimura, T., and E. J. Leonard. 1990. Identification of high affinity receptors for human monocyte chemoattractant protein-1 on human monocytes. *J Immunol* 145:292.
143. Gunn, M. D., N. A. Nelken, X. Liao, and L. T. Williams. 1997. Monocyte chemoattractant protein-1 is sufficient for the chemotaxis of monocytes and

- lymphocytes in transgenic mice but requires an additional stimulus for inflammatory activation. *J Immunol* 158:376.
144. Khong, T. Y. 1995. Expression of MHC class II antigens by placental villi: no relationship with villitis of unknown origin. *J Clin Pathol* 48:494.
145. Wraight, C. J., P. van Endert, P. Moller, J. Lipp, N. R. Ling, I. C. MacLennan, N. Koch, and G. Moldenhauer. 1990. Human major histocompatibility complex class II invariant chain is expressed on the cell surface. *J Biol Chem* 265:5787.
146. Sant, A. J., S. E. Cullen, and B. D. Schwartz. 1985. Biosynthetic relationships of the chondroitin sulfate proteoglycan with Ia and invariant chain glycoproteins. *J Immunol* 135:416.
147. Shachar, I., and R. A. Flavell. 1996. Requirement for invariant chain in B cell maturation and function. *Science* 274:106.
148. Attar, E. C., D. J. De Angelo, J. G. Supko, F. D'Amato, D. Zahrieh, A. Sirulnik, M. Wadleigh, K. K. Ballen, S. McAfee, K. B. Miller, J. Levine, I. Galinsky, E. G. Trehu, D. Schenkein, D. Neuberg, R. M. Stone, and P. C. Amrein. 2008. Phase I and pharmacokinetic study of bortezomib in combination with idarubicin and cytarabine in patients with acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 14:1446.
149. Stumptner-Cuvelette, P., and P. Benaroch. 2002. Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function. *Biochim Biophys Acta* 1542:1.
150. Starlets, D., Y. Gore, I. Binsky, M. Haran, N. Harpaz, L. Shvidel, S. Becker-Herman, A. Berrebi, and I. Shachar. 2006. Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival. *Blood* 107:4807.
151. Beswick, E. J., I. V. Pinchuk, G. Suarez, J. C. Sierra, and V. E. Reyes. 2006. Helicobacter pylori CagA-dependent macrophage migration inhibitory factor produced by gastric epithelial cells binds to CD74 and stimulates procarcinogenic events. *J Immunol* 176:6794.
152. Faure-Andre, G., P. Vargas, M. I. Yuseff, M. Heuze, J. Diaz, D. Lankar, V. Steri, J. Manry, S. Hugues, F. Vascotto, J. Boulanger, G. Raposo, M. R. Bono, M. Roseblatt, M. Piel, and A. M. Lennon-Dumenil. 2008. Regulation of dendritic cell migration by CD74, the MHC class II-associated invariant chain. *Science* 322:1705.
153. Buhling, F., N. Waldburg, S. Kruger, C. Rocken, O. Wiesner, E. Weber, and T. Welte. 2002. Expression of cathepsins B, H, K, L, and S during human fetal lung development. *Dev Dyn* 225:14.
154. Stoltenberg, L., P. S. Thrane, and T. O. Rognum. 1993. Development of immune response markers in the trachea in the fetal period and the first year of life. *Pediatr Allergy Immunol* 4:13.
155. Ovchinnikova, O., A. K. Robertson, D. Wagsater, E. J. Folco, M. Hyry, J. Myllyharju, P. Eriksson, P. Libby, and G. K. Hansson. 2009. T-cell activation leads to reduced collagen maturation in atherosclerotic plaques of Apoe(-/-) mice. *Am J Pathol* 174:693.
156. Cheng, X. W., M. Kuzuya, K. Nakamura, Q. Di, Z. Liu, T. Sasaki, S. Kanda, H. Jin, G. P. Shi, T. Murohara, M. Yokota, and A. Iguchi. 2006. Localization of

- cysteine protease, cathepsin S, to the surface of vascular smooth muscle cells by association with integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1. *Am J Pathol* 168:685.
157. Taleb, S., D. Lacasa, J. P. Bastard, C. Poitou, R. Canello, V. Pelloux, N. Viguier, A. Benis, J. D. Zucker, J. L. Bouillot, C. Coussieu, A. Basdevant, D. Langin, and K. Clement. 2005. Cathepsin S, a novel biomarker of adiposity: relevance to atherogenesis. *Faseb J* 19:1540.
158. Lindahl, C., M. Simonsson, A. Bergh, E. Thysell, H. Antti, M. Sund, and P. Wikstrom. 2009. Increased levels of macrophage-secreted cathepsin S during prostate cancer progression in TRAMP mice and patients. *Cancer Genomics Proteomics* 6:149.
159. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783.
160. Kopp, E., and R. Medzhitov. 2003. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15:396.
161. Kuhlicke, J., J. S. Frick, J. C. Morote-Garcia, P. Rosenberger, and H. K. Eltzschig. 2007. Hypoxia inducible factor (HIF)-1 coordinates induction of Toll-like receptors TLR2 and TLR6 during hypoxia. *PLoS One* 2:e1364.
162. Kishimoto, T., T. Taga, and S. Akira. 1994. Cytokine signal transduction. *Cell* 76:253.

## VI Erklärung zur Dissertation

„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 nichtveröffentlichten 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.“

## VII Danksagung

Mein Dank gilt all den Menschen die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Herzlich bedanken möchte ich mich daher zuerst bei Prof. Dr. med. Jürgen Lohmeyer für die Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten. Besonders hat mich diesbezüglich gefreut, dass er, obwohl die Fragestellung dieser Arbeit nur entfernt mit seinem Fachgebiet zu tun hat, mir dennoch ermöglicht hat das Thema unter der Betreuung seines Lehrstuhls zu erforschen.

Daneben bedanke ich mich insbesondere bei meinem Betreuer Leigh M. Marsh, der mir bei der Konzeption und Erstellung dieser Arbeit jederzeit beratend zur Seite stand. Die Idee für diese Dissertation stammt von ihm, weshalb diese Arbeit ohne seine Hilfe gar nicht erst entstanden wäre.

Weiterhin danke ich den lieben Menschen im Labor für Ihre freundliche Hilfe bei der Erarbeitung der Methoden. Mein herzlicher Dank gilt überdies Susanne Herold, Mirko Steinmüller und Werner von Wulffen für Ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft. Mein Dank gilt außerdem den Mitarbeiterinnen Petra Janssen, Dagmar Hensel, Marlene Stein und Grazyna Kwapiszewska für Ihre Hilfe und Kooperation im Labor. Insbesondere bedanke ich mich bei Grazyna Kwapiszewska und Norbert Weissman für die zur Verfügung gestellten Mäuse.

Des Weiteren danke ich Herrn Ludger Fink vom Institut für Pathologie für die Geduld bei der Einweisung in die Methode des Single-Cell-Pickings und die Möglichkeit der Nutzung der hierfür notwendigen Geräte.

Zuletzt danke ich meinem Ehemann Alexander Frank für seinen moralischen Beistand, seine stets offenen Ohren und die Unterstützung bei der Textverarbeitung.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6379-5



9 783835 196379 5