

**Charakterisierung einer ungewöhnlichen  
Zellpopulation in der arteriellen Tunica media  
experimenteller Lungentransplantate**

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

vorgelegt von  
Dorothee Kopf, geb. Vock  
aus Heidelberg

Gießen 2015

Aus der Klinik für  
Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie  
Fachbereich Medizin  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Sektion Experimentelle Chirurgie  
Leitung: Frau Prof. Dr. rer. nat. Veronika Grau

Gutachter: Prof. Dr. Grau  
Gutachter: Prof. Dr. Weißmann  
Tag der Disputation: 06.06.2016

Meinen Eltern.

Meinem Freund.

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung .....	1
1.1 Lungentransplantation und Transplantatabstoßung .....	1
1.1.1 Klinische Lungentransplantation .....	1
1.1.2 Hyperakute und akute Abstoßung von Lungentransplantaten.....	3
1.1.3 Chronische Abstoßung von Lungentransplantaten .....	6
1.1.4 Die Rolle der Makrophagen bei der chronischen Abstoßung von Lungentransplantaten.....	6
1.2 Bronchiolitis obliterans Syndrom (BOS) .....	7
1.2.1 Klinik des humanen BOS und klinische Stadien .....	7
1.2.2 Risikofaktoren für BOS .....	9
1.2.3 Histologische Manifestation des BOS .....	11
1.3 Zielsetzung der Arbeit .....	13
1.3.1 Relevante Antigene und Markerproteine und zu deren Nachweis verwendete Reagenzien .....	13
2 Material und Methoden .....	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Reagenzien .....	15
2.1.2 Puffer und Lösungen .....	18
2.1.3 Geräte und Materialien .....	22
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Transplantation.....	23
2.2.2 Immunhistochemie .....	25
3 Ergebnisse .....	35
3.1 Histopathologische Veränderungen in den Transplantaten .....	35
3.2 Charakterisierung von Zellen der Tunica media von Transplantatarterien.....	37
3.2.1 Aktin und CD68-artiges Antigen.....	37
3.2.2 Plasmamembranantigene von Leukozyten .....	42
3.2.3 Saure Phosphatase .....	44

3.2.4 Nestin und CD68-artiges Antigen .....	46
4 Diskussion.....	48
4.1 Diskussion technischer Aspekte.....	48
4.1.1 Transplantation.....	48
4.1.2 Entnahme und Fixierung der Lungen.....	49
4.1.3 Immunhistochemische und enzymhistochemische Verfahren.....	49
4.2 Diskussion der Ergebnisse.....	50
4.2.1 Strukturelle Veränderungen des Lungengewebes .....	50
4.2.2 Charakterisierung der ED1-positiven Zellen in der arteriellen Tunica media	51
4.3 Schlussfolgerungen und Ausblick .....	55
5 Zusammenfassung.....	58
6 Summary.....	59
7 Abkürzungsverzeichnis.....	60
8 Abbildungen und Tabellen .....	64
8.1 Abbildungen.....	64
8.2 Tabellen.....	65
9 Literatur.....	66
10 Erklärung zur Dissertation .....	75
11 Danksagung .....	76

# 1 Einleitung

## 1.1 Lungentransplantation und Transplantatabstoßung

### 1.1.1 Klinische Lungentransplantation

Die Lungentransplantation hat sich als Behandlungsmöglichkeit für Patienten mit Lungenerkrankungen im Endstadium bewährt. [10, 12, 26, 46, 47, 51, 52, 70, 89] Die Zahl der Lungentransplantationen ist seit der ersten an einem Menschen durchgeführten Lungentransplantation 1963 [51] stetig gestiegen. Im Jahr 2009 wurden 3272 Lungentransplantationen von der International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) registriert. [21] Die häufigsten Indikationen sind mit 35 % die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), die idiopathische Lungenfibrose (IPF) mit 23 % und die Cystische Fibrose (CF) mit 17 %. [21], [51] Tabelle (Tab.) 1 zeigt die häufigsten Indikationen für Lungentransplantationen im Zeitraum Januar 1995 bis Juni 2010. [21]

Diagnose	Lungentransplantationen in % bezogen auf alle durchgeführten Lungentransplantationen
COPD/Emphysem	34,6 %
IPF	22,6 %
CF	16,8 %
$\alpha$ 1-Antitrypsin-Mangel	6,4 %
IPAH	3,2 %

**Tabelle 1: Häufige Indikationen für Lungentransplantationen (Zeitraum Januar 1995 bis Juni 2010) [21]**

CF = Cystische Fibrose; COPD = chronisch obstruktive Lungenerkrankung;  
IPAH = idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie; IPF = idiopathische Lungenfibrose.

Für alle Indikationen hat die zweiseitige (bilaterale) Lungentransplantation an Bedeutung gewonnen, [51] bei CF werden nahezu nur bilaterale Lungentransplantationen durchgeführt. [21, 51] Obwohl die immunsuppressiven Behandlungsmöglichkeiten nach Lungentransplantationen in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht haben, [14, 28, 49] treten akute und chronische Abstoßungen häufiger auf als bei anderen Organtransplantationen. [14, 49, 51, 52, 70] Die Überlebensraten liegen 1 Jahr nach Transplantation bei 79 %, 3 Jahre nach Transplantation bei 64 %, 5 Jahre nach Transplantation leben noch 53 % und 10 Jahre danach nur noch 30 % der Organempfänger. [21, 51] Damit ist das Kurz- und Langzeitüberleben nach Lungentransplantationen schlechter als nach anderen Organtransplantationen. [52] Die Überlebensrate nach Lungentransplantationen wird

unter anderem vom Alter des Organempfängers beeinflusst. Die US-amerikanische Organisation UNOS (United Network for Organ Sharing) gibt eine 10-jahres-Überlebensrate von 13 % für Patienten an, die 65 Jahre und älter sind. Für Patienten zwischen 50 und 64 Jahren beträgt die 10-Jahres-Überlebensrate 23 % und für Patienten, die 50 Jahre und jünger sind 38 %. Für das Überleben nach 1 und 3 Jahren werden keine Unterschiede zwischen jüngeren und älteren Patienten verzeichnet. [51, 58, 90, 102] Auch Patienten, die vor der Lungentransplantation maschinell beatmet wurden oder mit extrakorporaler Membranoxygenierung (ECMO) behandelt wurden, haben eine schlechtere Prognose (1-Jahres-Überlebensrate nach Beatmungstherapie 62 %, nach ECMO-Therapie 50 % und 2-Jahres-Überlebensrate nach Beatmungstherapie 57 %, nach ECMO-Therapie 45 %). [51, 63] Chronische Infektionen der Luftwege, z. B. durch multiresistente *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme verschlechtern das Überleben nach Lungentransplantation und spielen v. a. für Patienten mit CF eine große Rolle. [40, 51] Auch Infektionen des Empfängers mit *Burkholderia cepacia* können die Überlebenszeit nach Lungentransplantation einschränken. [5, 18, 51] Die mediane Überlebenszeit (der Zeitpunkt, an dem die Hälfte aller zu einem Zeitpunkt transplantierten Patienten noch lebt) beträgt 5,5 Jahre. [21]

Die Todesursachen nach Lungentransplantationen sind abhängig von der Grunderkrankung des Empfängers, der durchgeführten Transplantation (unilateral oder bilateral), der Cytomegalievirus (CMV)-Serologie des Spenders und Empfängers und anderen Faktoren. [21] In der frühen postoperativen Phase (0-30 Tage) dominieren das primäre Transplantatversagen (PGD) (27,1 %) und Infektionen (nicht-CMV-Infektionen) (20,1 %). Ab dem ersten Jahr nach der Transplantation spielt neben diesen Faktoren auch das Bronchiolitis obliterans Syndrom (BOS) eine große Rolle. [21, 51, 84] Auch Malignome machen einen bedeutenden Teil der Todesursache nach Lungentransplantation aus. Es wird berichtet, dass Todesfälle aufgrund von Malignomen mit der Zeit nach Transplantation zunehmen und nach mehr als 10 Jahren nach Lungentransplantation fast 16 % der Todesursachen ausmachen. [21] Dieser Trend wird darauf zurückgeführt, dass das Entstehungsrisiko von Malignomen bei andauernder Immunsuppression erhöht ist. [72, 91, 92] Während Lymphome in der früheren Phase nach Lungentransplantation noch eine größere Rolle spielen, treten in den späteren Phasen vermehrt Haut- und andere Malignome auf. [21] Einen Überblick über die vorherrschenden Todesursachen zu verschiedenen Zeitpunkten verschafft Tab. 2. [21] BOS [14, 28, 49] stellt neben Infektionen das größte Problem für das langfristige Patientenüberleben dar. [10, 14, 28, 49, 51, 52]

Todesursache	0-30 Tage	31 Tage - 1 Jahr	> 1-3 Jahre	> 3-5 Jahre	> 5-10 Jahre	> 10 Jahre
<b>BOS</b>	0,3 %	4,8 %	25,4 %	28,8 %	24,5 %	19,0 %
<b>Akute Abstoßung</b>	3,7 %	1,9 %	1,6 %	0,6 %	0,8 %	0,7 %
<b>Malignome</b>	0,1 %	4,5 %	8,6 %	11,0 %	14,9 %	15,6 %
<b>Infektionen CMV nicht-CMV</b>	0,0 % 20,1 %	2,6 % 35,3 %	0,9 % 22,9 %	0,3 % 19,1 %	0,2 % 17,9 %	0,1 % 17,8 %
<b>Transplantat- versagen</b>	27,1 %	17,3 %	19,3 %	18,6 %	18,3 %	16,4 %
<b>Technische Probleme</b>	9,4 %	2,5 %	0,6 %	0,6 %	0,7 %	1,3 %

**Tabelle 2: Häufige Todesursachen bei Transplantatempfängern (Zeitraum Januar 1992 bis Juni 2010) [21]**

BOS = Bronchiolitis obliterans Syndrom; CMV = Cytomegalievirus; PGD = primäres Transplantatversagen.

### 1.1.2 Hyperakute und akute Abstoßung von Lungentransplantaten

Die hyperakute Abstoßung erfolgt bereits während der Operation oder wenige Minuten danach. Die Ursache liegt in präformierten Antikörpern, [22, 39, 97] die bereits vor der Transplantation im Organismus des Empfängers bestehen. [11, 22] Diese Antikörper sind z. B. gegen humane Leukozytenantigene (HLA) [34, 39, 54, 97] oder Blutgruppenantigene (ABO) gerichtet. [23, 99] Diese gegen donorspezifische Antigene gerichteten Antikörper binden u. a. an Endothelzellen und können dann den klassischen Weg der Komplementkaskade aktivieren. [17, 39] Das Komplementsystem besteht aus verschiedenen Serumproteinen, die im Zusammenspiel über verschiedene Spalt- und Zwischenprodukte [44] einen Proteinkomplex (Membranangriffskomplex, MAC) bilden, welcher die Zielzelle schädigt. [39, 67] Die abgespalteten Zwischenprodukte dienen u. a. als Lockstoffe und Stimulatoren für Makrophagen, neutrophile Granulozyten und andere Immunzellen [67] und unterstützen somit die Immunreaktion. [39] Das Spaltprodukt C4d kann an Endothelzellen binden und dient vor allem im Rahmen von Nierentransplantatbiopsien als Marker für die antikörpervermittelte Abstoßung. [17, 45]

Durch die entstandenen Defekte im Endothel werden mithilfe verschiedener Faktoren Thrombozyten gebunden und aktiviert. [64] Die somit in Gang gesetzte Gerinnungskaskade [39] führt zunächst über die Aktivierung weiterer Thrombozyten und deren Quervernetzung („Blutstillung“ oder „primäre Hämostase“) zur Bildung eines Thrombozytenthrombus. [57] Dieser wird im Rahmen der weiteren Blutgerinnung durch verschiedene Gerinnungsfaktoren zu einem stabilen Fibringerinnsel, bestehend aus Thrombozyten und Fibrin, umgewandelt. [57] Die so entstandenen Thromben, die die



Wunde verschließen und die Blutung zum Stillstand bringen sollen, können nun auch die Gefäße obliterieren. Im Rahmen der hyperakuten Transplantatabstoßung kann es also zu Gefäßverschlüssen kommen, welche über eine Minderperfusion und letztlich Infarzierung des Gewebes [2, 23, 39, 85] zu einem Transplantatversagen führen können. [10, 14, 49, 69] Da vor jeder Transplantation im sogenannten Kreuztest nach donorspezifischen Antikörpern gesucht wird, [2, 39, 41, 74] spielt die hyperakute Abstoßung aufgrund von HLA-Inkompatibilität und ABO-Antikörpern bei Lungentransplantationen keine große Rolle, [54] obwohl hauptsächlich HLA-inkompatible Lungen transplantiert werden. [10, 14, 49]

ABO-inkompatible Transplantationen werden v. a. bei Lebendnierentransplantationen durchgeführt. Die Empfänger werden in speziellen Verfahren auf die Transplantation vorbereitet, um die ABO-Antikörperspiegel zu senken [74] und das Risiko einer Organabstoßung möglichst gering zu halten. [85] Diese Vorbereitung beinhaltet u. a. Plasmapherese oder Immunadsorptionsverfahren, um im Blut zirkulierende ABO-Antikörper zu entfernen, intravenöse Immunglobuline (Ig), sowie Rituximab, ein gegen B-Lymphozyten gerichteter monoklonaler Antikörper (mAb), der die Neubildung von Antikörpern unterdrücken soll. [61, 85] Nach der Transplantation muss eine konsequente Immunsuppression durchgeführt werden. [85] Auch nach Transplantation sind ggf. weitere Plasmapheresen oder Immunadsorptionen nötig. ABO-inkompatible Lungentransplantationen wurden nach einem ähnlichen Vorbereitungsverfahren erfolgreich durchgeführt, [83, 85] wenn auch deutlich seltener als ABO-inkompatible Nierentransplantationen. Bisher gibt es nur wenige beschriebene Fälle von geplant durchgeführten ABO-inkompatiblen Lungentransplantationen. [79, 85] Einige unabsichtlich durch Fehler beim Kreuztest durchgeführte ABO-inkompatible Lungentransplantationen ohne entsprechende Empfängerkonditionierung [8, 79, 83] bieten jedoch vielversprechende Transplantationsergebnisse. [8, 79, 83]

Die akute Abstoßung kann prinzipiell zu jedem Zeitpunkt nach der Transplantation auftreten. Ein möglicher Grund für die Reaktion sind vom Immunsystem des Empfängers neu gebildete Antikörper gegen HLA, [49, 51, 54, 74] aber auch gegen andere Oberflächenantigene des Spenderorganismus. [34, 45, 54, 74] Der HLA-Komplex spielt hier eine wesentliche Rolle. Man unterscheidet HLA-I, das auf der Oberfläche fast aller kernhaltigen Zellen exprimiert wird [44, 61] von HLA-II, das auf Antigenpräsentierenden Zellen (APC) exprimiert wird, um die Fragmente prozessierter Antigene zu präsentieren. [61, 80] Zu APC zählen u. a. Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (DC) und B-Lymphozyten. [61] Unter inflammatorischen

Bedingungen kann HLA-II auch auf anderen Zellen, z. B. Endothelzellen exprimiert werden. [44] Körperfremdes HLA kann von CD(cluster of differentiation)<sup>4+</sup>-T-Zellen auf zwei Wegen erkannt werden. Auf dem direkten Weg erkennen die CD<sup>4+</sup>-T-Zellen des Empfängers intaktes HLA auf der Zelloberfläche von spendereigenen Zellen [7, 42, 61] oder Peptidfragmente, die auf spendereigenem HLA präsentiert werden. [11, 45, 80] Auf dem indirekten Weg erkennen CD<sup>4+</sup>-T-Zellen prozessiertes HLA auf dem HLA-II der körpereigenen APC. [7, 45], [61, 80] Die so aktivierten CD<sup>4+</sup>-T-Zellen des Empfängers differenzieren sich nun in CD<sup>4+</sup>-Typ1-T-Helferzellen (TH1-Zellen) und CD<sup>4+</sup>-Typ2-T-Helferzellen (TH2-Zellen). [45] Sie sezernieren verschiedene Zytokine und Chemokine, die weitere Immunzellen, z. B. Makrophagen, neutrophile Granulozyten und B-Lymphozyten anlocken und aktivieren, [45] sowie Leukozyten den Übertritt aus den Blutgefäßen in das umliegende Gewebe erleichtern. [44] B-Zellen werden außerdem stimuliert, alloreaktive Antikörper zu produzieren, [44] die das Transplantat schädigen. Es werden auch zytotoxische CD<sup>8+</sup>-T-Zellen aktiviert. [11, 42, 45] Sie erkennen Antigene auf weiteren Zellen im Kontext von HLA-I und zerstören diese. [44]

Histologisch präsentiert sich die akute zelluläre Abstoßung (ACR) mit perivaskulären Lymphozyteninfiltraten, die in manchen Fällen auf das Interstitium und den Alveolarraum übergreifen und von lymphozytärer Bronchitis/Bronchiolitis (LB) begleitet sein können. [49, 51] Bei der akuten humoralen Abstoßung finden sich Mikrothromben, interstitielle Blutungen und letztlich infarziertes Gewebe. [49] Akute Abstoßungs-episoden können meist mit Immunsuppressiva verhindert und/oder therapiert werden, [21, 49] dennoch treten sie in den ersten Monaten nach Lungentransplantationen häufig auf. [21, 49, 51] Bei 35 % der erwachsenen Lungentransplantatempfänger wurden im ersten Jahr nach Transplantation akute Abstoßungsepisoden festgestellt. [21, 49] Akute Abstoßungsepisoden sind ein Hauptrisiko- faktor für BOS. [10, 14, 49, 51]

### **1.1.3 Chronische Abstoßung von Lungentransplantaten**

Die chronische Abstoßung von Lungentransplantaten stellt ein großes Problem im Langzeitverlauf nach Lungentransplantation dar. Bronchiolitis obliterans (BO) wird als eine Form der chronischen Lungentransplantatabstoßung angesehen. [49] BO ist eine histologische Diagnose, welche nur schwer zu stellen ist. Häufig kann eine eindeutige Diagnose erst post mortem oder nach Retransplantation gestellt werden, da kleine transbronchiale Biopsien zur Diagnosesicherung nicht ausreichen. [49, 62, 93] Deshalb wurde 1993 der Begriff des BOS eingeführt. [52] Er beschreibt ein klinisches Syndrom, welches sich v. a. in einem Abfall der Lungenfunktion präsentiert. [10, 14, 28, 49, 51, 74] BOS ist die größte Einschränkung im Langzeitüberleben nach Lungentransplantationen [10, 14, 51, 52] und betrifft 5 Jahre nach Transplantation bereits 49 % der Transplantatempfänger. 10 Jahre nach Transplantation sind 75 % betroffen. [21, 51, 52]

### **1.1.4 Die Rolle der Makrophagen bei der chronischen Abstoßung von Lungentransplantaten**

Makrophagen sind Zellen der myeloiden Zellreihe. Im Knochenmark entwickeln sich aus hämatopoetischen Vorläuferzellen Monoblasten und später Monozyten, welche im Blut zirkulieren. [37, 43, 73] Durch Chemokine angelockt, wandern Monozyten in verschiedene Gewebe ein, [60] wo sie sich zu Makrophagen und DC differenzieren. [37, 44, 73] Makrophagen können unspezifisch Zellmaterial, z. B. Zelltrümmer zugrundegegangener körpereigener Zellen, aber auch Bakterien und andere Krankheitserreger durch Phagozytose aufnehmen und in Phagolysosomen vernichten. [33, 44] Einzelne Strukturen des aufgenommenen Materials können auf der Oberfläche der Makrophagen durch den HLA-II-Komplex präsentiert und von T-Helferzellen erkannt werden. T-Helferzellen wiederum locken weitere Makrophagen an und aktivieren diese. Makrophagen, die über TH1-Zellen aktiviert wurden („klassisch“ aktivierte Makrophagen), [36, 59] sezernieren u. a. proinflammatorische Zytokine, Sauerstoffradikale und Stickstoffmonoxid [15, 37, 59, 60] und sind somit maßgeblich an Entzündungsreaktionen beteiligt. Sauerstoffradikale können in der Lunge die Alveolar- und Bronchialepithelien schädigen [3, 15] und hohe Stickstoffmonoxidkonzentrationen können eine schädigende Wirkung auf vasculäres Endothel ausüben. [12, 13] Makrophagen, die über TH2-Zellen aktiviert wurden („alternativ“ aktivierte Makrophagen), [36, 59] wird dagegen eine immunregulierende, [59] anti-inflammatorische [36] und angiogenetische [59] Wirkung

zugeschrieben. Durch die angiogenetische Wirkung, die Rekrutierung von Fibroblasten und die Beseitigung von totem Gewebe, spielen die alternativ aktivierten Makrophagen auch eine Rolle bei der Wundheilung und Fibrosierung. [36]

Gewebsmakrophagen der Lunge sind Alveolarmakrophagen [9, 30, 36] und interstitielle Makrophagen. [9, 30] Alveolarmakrophagen befinden sich im Alveolarraum an der Oberfläche der Alveolarepithelzellen [9] und dienen dazu, in die Alveolen gelangte Krankheitserreger und anderes körperfremdes Material unschädlich zu machen. [9, 30, 37] Alveolarmakrophagen sind auch in der Lage profibrotische [28] und proinflammatorische [36] Zytokine, aber auch immunmodulierende Mediatoren [36] zu sezernieren. Interstitielle Makrophagen sind sowohl zur Erregereliminierung durch Phagozytose als auch zur Antigenpräsentation und Sezernierung von proinflammatorischen Zytokinen fähig. [9, 30] Makrophagen spielen als antigenpräsentierende Zellen und im Rahmen der Beseitigung von nekrotischen Zellen eine zentrale Rolle bei der Transplantatabstoßung. [38] Durch die von ihnen produzierten Sauerstoffradikale und Stickstoffmonoxid können Bronchial- und Gefäßepithel angegriffen und zerstört werden, was auch in Lungentransplantaten zu überschießender Gewebeproliferation und Bildung von Narbengewebe führen kann. [14] Profibrotische Zytokine von Makrophagen regen die Proliferation von Fibroblasten und Glattmuskelzellen an. Dies führt zu vermehrter Ablagerung von Extrazellulärmatrix, [14, 28] wodurch das Lumen der kleineren Atemwege eingeengt werden kann. [14] Auch DC als spezialisierte antigen-präsentierende Zellen [43] kommen in der Lunge vor. [73] Es wird beschrieben, dass vermehrt DC bei Patienten mit BOS gefunden werden. Durch ihre Beteiligung an der Aktivierung der lokalen und systemischen Immunantwort könnten sie an der Entstehung einer chronischen Transplantatabstoßung beteiligt sein. [14, 56, 101]

## **1.2 Bronchiolitis obliterans Syndrom (BOS)**

### **1.2.1 Klinik des humanen BOS und klinische Stadien**

Die klinische Manifestation des BOS in Form einer Abnahme der Lungenfunktion, gemessen an der Einsekundenkapazität ( $FEV_1$ , das Volumen das nach maximaler Inspiration innerhalb einer Sekunde bei forcierter Expiration ausgeatmet wird), [10, 14, 28, 49, 51, 68] variiert zwischen wenigen Monaten bis mehreren Jahren nach der Transplantation. [49] Dabei kann es sich um einen akuten Beginn handeln, der einer Infektion ähneln und mit abruptem Abfall der Lungenfunktion einhergehen kann („rapid

onset BOS“). BOS kann auch einen langsameren Verlauf nehmen, der von einem allmählichen aber stetigen Verlust in der Lungenfunktion gekennzeichnet ist („gradual onset BOS“). [10, 49] Akute Abstoßungsepisoden gehen mit einem akuten Beginn von BOS und einer schlechteren Prognose einher. [49, 51] Außerdem beeinflussen Infektionen des Respirationstraktes den Beginn und den Verlauf von BOS. [49] Klinische Symptome sind vor allem zunehmende Luftnot und persistierender Husten. [10]

Klinische Stadien des BOS: BOS wird in fünf klinische Stadien unterteilt. Für die Einteilung wichtige Kriterien sind die FEV<sub>1</sub> und die FEF<sub>25-75</sub> (forced expiratory flow; die mittlere Atemstromstärke in der Phase der forcierten Expiration, in der noch 75 % bzw. 25 % des Volumens, das maximal ein- und ausgeatmet werden kann, in der Lunge verbleiben). [10, 14, 28, 49, 51] Das Stadium BOS 0 beschreibt den Zustand, bei dem die FEV<sub>1</sub> im Zeitverlauf stabil bleibt und dem Ausgangswert direkt nach Transplantation entspricht. Die gemessenen Lungenfunktionswerte für die anderen Stadien beziehen sich auf den Ausgangswert. [14, 28] BOS 0-p (potentielle BOS) beschreibt ein Stadium mit frühen Veränderungen in der Lungenfunktion, die auf ein mögliches Entstehen eines BOS hinweisen können. [10, 14, 28, 49] BOS 1 bis BOS 3 beschreiben die unterschiedlichen Schweregrade von BOS gemessen an einer Abnahme der Lungenfunktionsparameter bezogen auf den Ausgangswert. Tab. 3 veranschaulicht diesen Zusammenhang. [10, 14, 28, 49]

	Lungenfunktionsparameter FEV <sub>1</sub> bezogen auf die baseline (bei BOS 0 und BOS 0-p FEV <sub>1</sub> und/oder FEF <sub>25-75</sub> )
BOS 0	FEV <sub>1</sub> > 90 % und/oder FEF <sub>25-75%</sub> > 75 %
BOS 0-p	FEV <sub>1</sub> 81-90 % und/oder FEF <sub>25-75%</sub> ≤ 75 %
BOS 1	FEV <sub>1</sub> 66-80 %
BOS 2	FEV <sub>1</sub> 51-65 %
BOS 3	FEV <sub>1</sub> ≤ 50 %

**Tabelle 3: BOS Klassifikation [10, 14, 28, 49]**

BOS = Bronchiolitis obliterans Syndrom; FEF<sub>25-75%</sub> = forced expiratory flow; FEV<sub>1</sub> = Einsekundenkapazität.

Das mediane Überleben beträgt ab Diagnosestellung 1,5 Jahre für die Patienten mit einem „rapid onset BOS“ und 2,5 Jahre bei einem „gradual onset BOS“. [51] Eine kausale Therapie für das BOS gibt es bislang nicht. Als einzige Therapiemöglichkeit bleibt die Retransplantation. [51]

## 1.2.2 Risikofaktoren für BOS

Es wird angenommen, dass Verletzungen und Entzündungen von Epithelzellen und subepithelialelem Gewebe der kleinen Atemwege durch ineffektive Heilungsprozesse eine exzessive Gewebeproliferation zur Folge haben, welche in BO enden. [14, 28, 49] Risikofaktoren für diesen Mechanismus werden unterteilt in alloimmunabhängige und alloimmununabhängige Risikofaktoren. Diese Faktoren und die durch sie ausgelösten Prozesse können alleine oder in Kombination auftreten. [10, 14, 49]

Alloimmunabhängige Risikofaktoren: Im Empfängerorganismus vorbestehende Anti-HLA-Antikörper oder aufgrund von HLA-Unverträglichkeit zwischen Spenderorgan und Empfängerorganismus neugebildete Anti-HLA-Antikörper stehen in Zusammenhang mit BOS und bedingen eine schlechtere Prognose für den Patienten. [10, 14, 49, 51, 74] Diese Antikörper gegen HLA-Klasse I- und II-Antigene können an Epithelzellen der transplantierten Lunge binden und so Epithelschäden und Epithelzellproliferationen herbeiführen. [49] Allerdings wird dieser Zusammenhang kontrovers diskutiert [10, 14, 49] und nicht einstimmig als eigenständiger Risikofaktor für BOS anerkannt. [14] Akute Abstoßungsepisoden, die durch präformierte oder neugebildete Anti-HLA-Antikörper ausgelöst werden können, werden direkt mit der Entwicklung von BOS in Zusammenhang gebracht und gelten als Hauptrisikofaktor. [10, 14, 46, 49, 51, 76] Es wird vermutet, dass immunologische Epithel- und Endothelverletzungen, wie sie bei der akuten Transplantatabstoßung vorkommen, zu perivaskulären und peribronchialen Ansammlungen von aktivierten Lymphozyten führen. [10, 14]

Alloimmununabhängige Risikofaktoren: Hier spielt der Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS) und das darauf folgende PGD eine große Rolle. Der IRS entsteht aufgrund der Ischämie des zu transplantierenden Organs und der Reperfusion in der Phase nach Implantation. Aufgrund der Schädigung von Endothelzellen durch Ischämie und Reperfusion werden u. a. Interleukine (IL), reaktive Sauerstoffverbindungen [46, 71] und proteolytische Enzyme [71] freigesetzt, welche die Gefäßbarriere angreifen. Es wird angenommen, dass bei diesen Prozessen zirkulierende Leukozyten (v. a. neutrophile Granulozyten) und lungenständige Makrophagen eine Rolle spielen. [12, 32] Durch die erhöhte vaskuläre Permeabilität kommt es zu interstitiellen und alveolären Lungeninfiltraten, [12, 31, 46, 71] welche sich klinisch als Hypoxie präsentieren. [12, 46] Ein klinisch relevanter IRS betrifft ca. 20 % der lungentransplantierten Patienten. [12, 47, 71] Es wird diskutiert, ob längere Ischämiezeiten der transplantierten Organe mit einem erhöhten Risiko eines IRS einhergehen. [19, 46, 71, 78] Der IRS wird als Hauptursache für PGD angegeben, [12,

22, 26, 47, 51, 84] aber auch andere Faktoren, z. B. Operationstraumata und die Qualität der Spenderlunge, besonders bezüglich Entzündungen und Verletzungen werden diskutiert. [51, 84]. PGD ist mit ca. 27 % eine der führenden Todesursachen in der frühen postoperativen Phase. [12, 20, 21, 55, 70] Charakteristisch für die Klinik des PGD ist ein nicht-kardiogenes Lungenödem, das innerhalb der ersten 72 Stunden nach Transplantation auftritt [84] und dem keine anderen Gründe zugeordnet werden können. [22, 51] Die Ausprägung des PGD ist oft mild, in 10 - 20 % der Fälle tritt jedoch eine schwere Form auf, die mit einer schweren Hypoxämie einhergeht und einem akuten Atemnotsyndrom (ARDS) ähnelt. [20, 22, 51] Die Mortalität des schweren PGD ist mit 30 - 40 % sehr hoch. [22, 51, 70] Allgemein verlängern sich durch IRS und PGD die mechanischen Beatmungszeiträume und Aufenthalte auf Intensivstationen, [12, 46, 47, 71] was zu erhöhten Mortalitäts- und Morbiditätsraten im Rahmen von Lungentransplantationen führt. [12, 47, 71] Die Therapiemöglichkeiten der PGD sind beschränkt und belaufen sich meist auf den Versuch, mit möglichst kleinen Tidalvolumen, optimalem PEEP (positiver endexpiratorischer Druck) und möglichst niedrigen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen die Oxygenierung und Hämodynamik zu optimieren, um beatmungsinduzierte Gewebeschäden der Lunge zu vermeiden. [84] In besonders schweren Fällen kann eine ECMO-Therapie oder gar eine Retransplantation nötig werden. [84] Es wird ein direkter Zusammenhang zwischen PGD und BOS beschrieben: Die Schwere der PGD erhöht das Risiko für BOS. [10], [55]

Infektionen wie bakterielle oder virale Pneumonien, aber auch lokale Entzündungen der Luftwege z. B. durch inhalative Noxen führen zu Gewebeschädigungen und der Schaffung eines proinflammatorischen Milieus und spielen so eine Rolle bei der Entwicklung von BOS. [10, 14, 49] Auch LB gilt als Risikofaktor für BOS. [10, 14, 51] Oft gehen der Entstehung der LB akute Abstoßungsepisoden voraus. Es wird jedoch auch beschrieben, dass LB unabhängig von akuten Abstoßungsepisoden einen wichtigen Risikofaktor für BOS darstellt. Glanville et al. beschreiben ein steigendes Risiko für BOS mit zunehmender Schwere der LB. [35] Auch die gastroösophageale Refluxkrankheit (GERD) gilt als Risikofaktor für BOS. [10, 14, 49, 51] Der genaue Mechanismus ist nicht eindeutig geklärt, es wird jedoch angenommen, dass durch die Transplantation der Hustenreflex gemindert und die mukoziliäre Clearance gestört wird. Auch eine verzögerte Magenentleerung könnte eine Rolle spielen. So kann der saure Reflux Epithelschäden in der Lunge induzieren, welche wiederum zu chronischen Schäden führen können. [10] Studien haben gezeigt, dass frühe Fundoplikationen bei

Patienten mit GERD mit besseren Prognosen bezüglich des Auftretens und Schweregrades von BOS einhergehen. [10, 51]

In dem von Grau et al. etablierten Modell der chronischen Lungentransplantatabstoßung kann gezeigt werden, dass mehrere Faktoren zur Entstehung von BOS beitragen. In diesem Modell erhalten die Ratten zur Immunsuppression nach Transplantation für 10 Tage Ciclosporin, um eine Zerstörung des Transplantats durch akute Abstoßung zu verhindern. Am Tag 28 nach Transplantation wird intratracheal eine Lipopolysaccharid (LPS)-Lösung instilliert, welche eine Entzündungsreaktion hervorruft und die chronisch Abstoßung triggert. In allogenen transplantierten Lungen werden chronische Gewebeveränderungen und BOS beobachtet, welche auf ein Zusammenspiel von alloimmunabhängigen und alloimmununabhängigen Faktoren zurückzuführen sind. Der Stellenwert der alloimmunabhängigen Faktoren im Rahmen der chronischen Transplantatabstoßung und Entwicklung von BOS wird durch die Tatsache unterstrichen, dass in isogen transplantierten Lungen, welche auch mit LPS behandelt wurden, die Entzündungsreaktion rasch rückläufig ist und nur zu minimalen chronischen Schäden führt. [6]

### **1.2.3 Histologische Manifestation des BOS**

BOS wird als entzündlicher [10] und fibrosierender Prozess in den kleinen Atemwegen beschrieben. [10, 52] Ausgelöst wird er vermutlich durch Lymphozyteninfiltrate in der Submukosa der Bronchiolen. [10, 29, 52] Es können Epithelzellschäden und -nekrosen, Ulzerationen in der Mukosa [10, 14, 51] und Narbengewebe in der Submukosa entstehen, sowie Granulationsgewebe, welches intraluminal wächst [10, 14] und die kleinen Atemwege ganz oder teilweise verschließt (obliteriert). [10, 14, 49, 51, 52] Das kann eine fortschreitende, nicht reversible Atemwegsobstruktion verursachen. [14, 51] Wenn von dem Lumen des Bronchiolus nichts als Narbengewebe übrig ist, spricht man von „vanishing airway disease“. [10, 29] Der Verschluss der Bronchiolen kann eine Mukostase, sowie eine Anreicherung von Schaumzellen verursachen. [10, 81] Außerdem kann es in diesem Zusammenhang zu Entzündungsreaktionen im Lumen des Bronchiolus kommen, welche zur Einwanderung und Proliferation von Fibroblasten und Myofibroblasten führen können. [10]

In der bronchoalveolären Lavage (BAL) und im Sputum von BOS-Patienten finden sich vermehrt neutrophile und eosinophile Granulozyten. [14] Ob dieser Zustand spezifisch



für BOS ist oder lediglich die Atemwegsentzündung widerspiegelt, wird noch diskutiert. [14] Bei der Anlockung von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten spielen Zytokine, u. a. IL-8 eine große Rolle. Auch Endothelin-1 (ET-1) könnte im Zusammenhang mit BOS ein wichtiger Faktor sein, welcher durch seine profibrotischen Eigenschaften am remodeling von Atemwegen, z. B. im Rahmen von entzündlichen Erkrankungen, beteiligt ist. Es wurden auch weitere Zytokine und Wachstumsfaktoren (z. B. platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), insulin-like growth factor-1 (IGF-1)) beschrieben, die beim humanen BOS die Proliferation von Fibroblasten steigern und ein profibrotisches Milieu erzeugen. Außerdem können aktivierte Neutrophile reaktive Sauerstoffspezies und Proteasen freisetzen. [14] Diese können das Lungengewebe schädigen, indem sie im Rahmen von Verletzungen und Entzündungen von Epithelzellen und subepithelialen Strukturen zu exzessiver Fibroproliferation in den kleinen Atemwegen führen. [14, 28, 49] Darüber hinaus wird beschrieben, dass sich in endobronchialen Biopsien von Patienten mit BOS vermehrt DC finden. [56], [101] DC sind beteiligt an der Stimulation von T-Zellen und an der Aktivierung der lokalen und systemischen Immunantwort, was zur Entstehung einer chronischen Transplantatabstoßung beitragen könnte. [14]

Fibrotische Veränderungen der Intima von Pulmonalarterien und -venen werden auch beobachtet. [10, 76, 81] Saggat et al. beschreiben in einer Studie, dass die meisten Patienten mit BOS und histopathologisch diagnostizierter BO schwere Arteriopathien in der transplantierten Lunge entwickelt hatten, die ca. ein Drittel der Pulmonalarterien betreffen. [76] Die beschriebenen Veränderungen in den Pulmonalarterien umfassen exzentrische und konzentrische Proliferation und Fibrosierung der Intima, erhöhte Ablagerungen von Extrazellulärmatrix, sowie Glattmuskelzellatrophie in der Media. Außerdem fanden sich bei den meisten Patienten Venopathien mit diffuser obliterierender Fibrosierung der Intima, perivenösen mononukleären Infiltraten und sekundärem Blutstau in den Kapillaren. [76]

Eine histologisch eindeutige Diagnose einer BO zu stellen bleibt schwierig. Oft reichen transbronchiale Biopsien dafür nicht aus [49, 62, 93] oder es lassen sich nur einzelne Merkmale der BO, wie z. B. LB oder intraluminales Granulationsgewebe, nachweisen. [10] Außerdem ist es sehr schwierig, über das histologische Erscheinungsbild Rückschlüsse auf die Klinik zu schließen und umgekehrt. Viele Patienten weisen die klinischen Symptome eines BOS mit persistierendem Husten, Luftnot und einem Abfall der FEV<sub>1</sub> auf, es kann aber histologisch keine BO

nachgewiesen werden. Genauso können histologische Merkmale einer BO auch ohne klinische Symptomatik eines BOS auftreten. [29, 62]

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Bei der chronischen Lungentransplantatabstoßung werden neben der BO auch Veränderungen in der Intima von Gefäßwänden beobachtet. [10] Grau et al. haben in ihrem Modell der chronischen Lungentransplantatabstoßung einen Hinweis auf auffällige, spindelförmige Zellen in der Tunica media größerer Lungenarterien beobachtet (unveröffentlicht). Sie ähneln morphologisch glatten Muskelzellen und tragen Markerproteine von Makrophagen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, diese Zellen zu beschreiben und auf ihre Herkunft zu untersuchen.

Folgende Fragen sollen im Rahmen einer Pilotstudie beantwortet werden:

1. Zeigen die Zellen Merkmale von glatten Muskelzellen und/oder Makrophagen?
2. Welcher Zellreihe sind diese Zellen zuzuordnen?

#### 1.3.1 Relevante Antigene und Markerproteine und zu deren Nachweis verwendete Reagenzien

$\alpha$ -Glattmuskelaktin: Da die zu untersuchenden Zellen morphologische Ähnlichkeit mit glatten Muskelzellen aufweisen, ist ein interessantes Antigen das  $\alpha$ -Glattmuskelaktin. Aktin ist ein sehr wichtiges Strukturprotein des Zytoskeletts und Bestandteil der meisten Zelltypen. Es wurden 6 Isoformen identifiziert, 4 davon als Bestandteil von Muskelzellen. Die Isoformen  $\alpha$ -1 und  $\alpha$ -2 finden sich in Skelettmuskel ( $\alpha$ -1) und in glatter Muskulatur ( $\alpha$ -2). Der in dieser Studie verwendete mAb anti- $\alpha$ -Glattmuskelaktin (im Folgenden mAb anti-Aktin) bindet spezifisch an die Isoform  $\alpha$ -2-Aktin u. a. in menschlichem Gewebe und Rattengewebe. [77]

CD68-artiges lysosomales Membranprotein: Ein weiterer für diese Arbeit wichtiger Antikörper ist der mAb ED1. Er bindet an das CD68-artige lysosomale Membranprotein, das vorwiegend auf lysosomalen Membranen von Zellen der myeloiden Zellreihe exprimiert wird. [24] Es wird in der Ratte von den meisten Makrophagensubpopulationen, von Monozyten und dendritischen Zellen, [27] aber nur schwach von peripheren Granulozyten exprimiert. [24]

CD45 auch leukocyte common antigen (LCA) genannt: CD45 besteht aus einer Familie von Glykoproteinen, die auf der Zelloberfläche von allen Zellen der lymphoiden und der myeloiden Zellreihe exprimiert werden, [82, 88, 98] nicht jedoch auf Erythrozyten und Thrombozyten. [88] Alle Isoformen von CD45 werden vom mAb OX-1 erkannt. [88] Um einzelne Isoformen des LCA zu erkennen, müssen entsprechende, gegen spezifische Epitope gerichtete Antikörper verwendet werden. [82]

Nestin: Nestin ist ein Intermediärfilament-Protein der Klasse VI, welches in Progenitorzellen des zentralen Nervensystems (ZNS) exprimiert wird. [48, 87, 94] Während der Embryogenese spielt Nestin eine wichtige Rolle und wird in vielen migrierenden und proliferierenden Zellen auch außerhalb des ZNS gefunden. [96] Desweiteren wird Nestin in verschiedenen Tumorzellen, vor allem ZNS-Tumorzellen exprimiert. [87] Auch verschiedene andere Zelltypen exprimieren Nestin, unter anderem proliferierende vaskuläre Endothelzellen [87] und Myofibroblasten. [48] Nestin kann im Zusammenhang mit pathologischen Prozessen, z. B. Neoplasien, Entzündungen, Ischämien [94] und Regenerationsprozessen [48] erneut exprimiert werden. In der Ratte wird Nestin vom mAb Rat-401 erkannt.

CD169: Der mAb ED3 erkennt das Antigen CD169, das auf der Zelloberfläche von Makrophagen, v. a. in lymphatischen Organen, exprimiert wird. Andere Zellen, auch Monozyten und Granulozyten werden vom mAb ED3 nicht erkannt. Makrophagen in Gewebe außerhalb der lymphatischen Organe exprimieren das Antigen CD169 für gewöhnlich nicht, können es jedoch in speziellen Situationen, z. B. im Rahmen von Autoimmunerkrankungen exprimieren. [25, 27]

CD11b: Das membranständige Antigen CD11b wird vom mAb ED7 erkannt. CD11b wird auf Makrophagen, Monozyten, Granulozyten und dendritischen Zellen der Ratte exprimiert. Der mAb ED7 erkennt außerdem Kinozilien auf Bronchialepithelzellen und Mikrogliazellen des ZNS. [25]

CD172a, auch signal regulatory protein (SIRP) genannt: Der mAb ED9 bindet an das membranständige Antigen CD172a, das v. a. auf Makrophagen, Monozyten, Granulozyten und dendritischen Zellen der Ratte exprimiert wird. Der mAb ED9 erkennt u. a. auch Mesangiumzellen der Niere. [25]

Saure Phosphatase: Die saure Phosphatase ist ein Leitenzym der Lysosomen. Phosphatasen sind Phosphorsäureester-spaltende Hydrolasen, [44] deren pH-Optimum im sauren Bereich liegt. [66] Die saure Phosphatase kann auf histologischen Präparaten mit Hilfe enzymhistochemischer Methoden nachgewiesen werden. [53]

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Reagenzien

Aceton 99,7 % (Roth, Karlsruhe; CP40.1)

Agarose UltraPure™ (Invitrogen, Barcelona, Spanien; 15510-019)

Ampicillin-Natrium (Ampicillin-ratiopharm®) (Ratiopharm, Ulm)

Aqua destillata (Aqua dest.) (B. Braun Melsungen AG, Melsungen; 8483A101)

Atipamezolhydrochlorid 5 mg/ml (Antisedan®) (Pfizer, Karlsruhe; PZN7575554)

Bovines Serumalbumin (BSA), Albumin bovine fraction V (Serva, Heidelberg; 11930)

Chloralhydrat (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) (Merck, Darmstadt; 1.02425.1000)

Chlorbleiche (Natriumhypochloritlösung 12 %, NaClO) (Roth, Karlsruhe; 9062.3)

Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat (CrK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 12 H<sub>2</sub>O) (Merck, Darmstadt; 1.01036)

Ciclosporin 50 mg/ml (Sandimmune®) (Novartis Pharma, Nürnberg)

Citronensäure-Monohydrat (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> · H<sub>2</sub>O) (Merck, Darmstadt; 1.0024.0500)

3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) (Sigma-Aldrich, Steinheim; D5905)

Dimethylformamid (Merck, Darmstadt; 1.030.34)

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O) (Merck, Darmstadt; 1.06580.1000)

Eosin G (C<sub>20</sub>H<sub>6</sub>Br<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) (Merck, Darmstadt; 1.15935)

Essigsäure 96% p. a. (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>) (Sigma-Aldrich, Steinheim; 33206)

Fast-Blue BB Salt (Sigma-Aldrich, Steinheim; F-3378-1G)

Gelatine weiß, gemahlen (RUF, Quakenbrück)

Glycergel Mounting Medium (Dako Cytomation, Carpinteria, California, USA; C0563)

Hämatoxylin ( $C_{16}H_{14}O_6 \cdot H_2O$ ) (Merck, Darmstadt; 15938)

Isofluran, Forene® (Baxter, Unterschleisheim; HDG9623)

Isopropanol (Sigma-Aldrich, Steinheim; 33539-2.5L-R)

Kalialaun, Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat ( $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ ) (Merck, Darmstadt; 1042)

Kaliumchlorid (KCl) (Merck, Darmstadt; 1.04936.1000)

Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ ) (Merck, Darmstadt; 1.04873.0250)

Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml (Ketavet®) (Pfizer, Karlsruhe; PZN3151811)

Levamisol, Tetramisolhydrochlorid ( $C_{11}H_{12}N_2S \cdot HCl$ ) (Sigma-Aldrich, Steinheim; L-9756)

Lipopolysaccharid (LPS) Escherichia coli, 026:B6 (Sigma-Aldrich, Steinheim; L2654)

Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ) (Merck, Darmstadt; 5927)

Medetomidinhydrochlorid 1 mg/ml (Domitor®) (Pfizer, Karlsruhe; PZN7575896)

Naphthol-AS-MX-Phosphat (Sigma-Aldrich, Steinheim; N-4875)

Natriumacetat ( $C_2H_3NaO_2$ ) (Roth, Karlsruhe; 6733.1)

Natriumazid ( $NaN_3$ ) (Merck, Darmstadt; 1.06688.0100)

Natriumchlorid (NaCl) (Sigma-Aldrich, Steinheim; 31434-1KG-R)

Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ( $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ) (Merck, Darmstadt; 1.06345.1000)

Natriumjodat ( $NaJO_3$ ) (Merck, Darmstadt; 1.06525.0100)

Natronlauge (Natriumhydroxid, NaOH) 1 mol/l (Merck, Darmstadt; 1.09137.1000)

Normalrattenserum (NRS) (Harlan-Winkelmann, Borcheln; HW040817)

Paraffin RotiPlast (Roth, Karlsruhe; 6642.5)

Paraformaldehyd (PFA) (Sigma-Aldrich, Steinheim; P6148)

Pertex Mounting Medium (Medite, Burgdorf; 41-4012-00)

Phosphate buffered saline (PBS) (1 x), steril, Dulbecco's ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  (Life technologies, Paisley, UK; 14190-094)

Protease Typ XIV aus *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich, Steinheim; P-5147-1G)

RotiHistol (Roth, Karlsruhe; 66401)

Saccharose (D(+)) 99,5% p. a. (Roth, Karlsruhe; 4621.1)

Salzsäure (Chlorwasserstoff, HCl) 1 mol/l (Merck, Darmstadt; 1.09057.1000)

Silan, 3-Aminopropyltriethoxysilan 98 % (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan ( $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ ) Base 99,9 % (Roth, Karlsruhe; 4855.2)

Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 30 % (Merck, Darmstadt; 1.07209.1000)

Xylol (Merck, Darmstadt; 28975.325)

### Primärantikörper:

anti-Aktin: Monoklonaler anti- $\alpha$ -Glattmuskelaktin-Antikörper aus der Maus, Klon: 1A4 (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA; A5228)

anti-Nestin: Monoklonaler anti-Nestin-Antikörper aus der Maus, Klon: rat-401 (Millipore, Temecula, USA; MAB353)

ED1: Monoklonaler Antikörper gegen ein CD68-artiges Antigen aus der Maus, Klon: ED1 (Serotec, Oxford, UK; MCA341R)

ED3: Monoklonaler anti-CD196-Antikörper aus der Maus, Klon: ED3 (Serotec, Oxford, UK; MCA343GA)

ED7: Monoklonaler anti-CD11b-Antikörper aus der Maus, Klon: ED7 (Serotec, Oxford, UK; MCA618R)

ED9: Monoklonaler anti-CD172a-Antikörper aus der Maus, Klon: ED9 (Serotec, Oxford, UK; MCA620R)

OX-1: Monoklonaler anti-CD45-Antikörper aus der Maus, leukocyte common antigen (LCA), Klon: OX-1 (Serotec, Oxford, UK; MCA43GA)

### Reagenzien zum Nachweis primärer Antikörper:

EnVision: EnVision+ System HRP (Meerrettichperoxidase) labelled Polymer, anti-Maus-Ig (Dako North America, Carpinteria USA; K4001)

KaM: Polyklonale Kaninchen-anti-Maus-Ig-Antikörper (Dako Denmark, Glostrup, Dänemark; Z0259)

KaM-HRP: Polyklonale Kaninchen-anti-Maus-Ig-Antikörper HRP (Dako Denmark, Glostrup, Dänemark; P0161)

PAP: Peroxidase-anti-Peroxidase aus der Maus (Rockland Inc., Gilbertsville, Pennsylvania, USA: P200-0025)

APAAP: alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase aus der Maus, monoklonal (Dako Denmark, Glostrup, Dänemark; D0651)

### 2.1.2 Puffer und Lösungen

<b>Agar 2 %</b>	1.) 2 g Agarose 2.) 100 ml Leitungswasser  Unter Rühren kochen bis eine klare Lösung entsteht.
<b>Citrat-Puffer (pH 6,0; 0,3 mol/l)</b>	1.) 8,4 g Citronensäure-Monohydrat 2.) 100 ml Natronlauge (1 mol/l) 3.) 3,9 l Aqua dest.
<b>Eosinlösung</b>	1.) 1 g Eosin G 2.) 100 ml Aqua dest.  1.) in 2.) lösen und filtrieren Unmittelbar vor Gebrauch erneut filtrieren Essigsäure (ein Tropfen pro 100 ml) zugeben.

<b>Hämalaunlösung (Mayers Hämalaun)</b> Stammlösung (10 x)	1.) 1 g Hämatoxylin 2.) 0,2 g Natriumjodat 3.) 50 g Kalialaun 4.) 1 l Aqua dest. 5.) 50 g Chloralhydrat 6.) 1 g Citronensäure-Monohydrat  1.) – 3.) in 4.) lösen Nach 24 h 5.) und 6.) zugeben, unter ständigem Rühren 5 min erhitzen und anschließend filtrieren.
Gebrauchslösung (1 x)	Stammlösung 1:10 verdünnt mit Aqua dest.
<b>LPS-Lösung</b>	0,5 mg/kg Körpergewicht (KG) LPS in 0,6 ml 1 x phosphate buffered saline (PBS)
<b>Mangan(II)-chlorid-Lösung 2 %</b>	1.) 0,2 g Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat 2.) 10 ml Aqua dest.
<b>Naphthol-AS-MX-Phosphat-Puffer</b>	1.) 2 mg Naphthol AS-MX-Phosphat 2.) 200 µl Dimethylformamid 3.) 4,8 mg Levamisol
<b>Natriumacetatpuffer 0,1 mol/l</b>	1.) 1,64 g Natriumacetat 2.) 200 ml Aqua dest.
<b>Phosphate buffered saline (PBS) (pH 7; 0,15 mol/l)</b> Stammlösung (10 x)	1.) 80 g Natriumchlorid 2.) 2 g Kaliumchlorid 3.) 14,24 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat 4.) 2 g Kaliumdihydrogenphosphat 5.) 8 ml Salzsäure (1 mol/l) auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen.
Gebrauchslösung (1 x)	Stammlösung 1:10 verdünnt mit Aqua dest.



<p><b>PBS mit Zusatz von BSA und Natriumazid (PBS/BSA/Azid) (pH 7,2)</b></p>	<p>1.) 0,2 g Bovines Serumalbumin (BSA)                  2.) 0,02 g Natriumazid                  3.) 20 ml PBS</p> <p>1.) und 2.) in 3.) lösen.</p>
<p><b>PFA/Sørensenpuffer 4 % (1 x) (pH 7,3)</b></p>	<p>1.) 4 g Paraformaldehyd (PFA)                  2.) 50 ml Aqua dest.                  3.) 75 µl Natronlauge (1 mol/l)                  4.) 50 ml Sørensen-Phosphatpuffer 2 x</p> <p>1.) in 2.) lösen und 3.) zugeben, unter Rühren erhitzen bis eine Lösung entsteht, 4.) zugeben und abkühlen lassen.</p>
<p><b>Proteaselösung</b></p>	<p>1.) 1 mg Protease Typ XIV                  2.) 2 ml tris buffered saline (TBS)</p> <p>Unmittelbar vor Gebrauch 1.) in 2.) lösen.</p>
<p><b>Salzsäurelösung (0,1 mol/l)</b></p>	<p>1) 225 ml Aqua dest.                  2) 25 ml Salzsäure (1 mol/l),                  3) 2,25 g Natriumchlorid</p>
<p><b>Sørensen-Phosphatpuffer (2 x)</b></p>	<p>1.) 3,08 g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat                  2.) 14,3 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat                  3.) 500 ml Aqua dest.</p> <p>1.) und 2.) in 3.) lösen.</p>
<p><b>Substratlösung für alkalische Phosphatase</b></p>	<p>1.) 1 mg Fast Blue                  2.) 1 ml Naphthol-AS-MX-Phosphat-Puffer</p> <p>Unmittelbar vor Gebrauch 1.) in 2.) lösen und 2 min zentrifugieren.</p>

<p><b>Substratlösung für Peroxidase</b></p>	<p>1.) 1 mg 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)                  2.) 20 ml TBS</p> <p>1.) in 2.) lösen und zu je 1 ml bei -20 °C einfrieren                  Unmittelbar vor Gebrauch 10 µl 1,2 %ige Wasserstoffperoxidlösung zugeben                  (Endkonzentration Wasserstoffperoxid: 0,012 %).</p>
<p><b>Substratlösung für saure Phosphatase</b></p>	<p>1.) 2 mg Naphthol-AS-Mx-Phosphat                  2.) 100 µl Dimethylformamid                  3.) 10 mg Fast Blue                  4.) 10 ml Natriumacetatpuffer 0,1 mol/l                  5.) 200 µl Mangan(II)Chlorid-Lösung 2 %</p> <p>1.) in 2.) lösen, 3.) in 4.) lösen, beide Lösungen zusammengeben und 5.) hinzufügen.</p>
<p><b>Tris buffered saline (TBS)                  (pH 7,6; 0,3 mol/l)</b>                  Stammlösung (10 x)</p> <p>Gebrauchslösung (1 x)</p>	<p>1.) 60,5 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan                  2.) 90 g Natriumchlorid                  3.) 800 ml Aqua dest.                  4.) 50 ml 25 % Salzsäure</p> <p>1.) – 4.) zusammenfügen und mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen.</p> <p>Stammlösung 1:10 verdünnt mit Aqua dest.</p>

<b>Tris-HCl (pH 8,2; 0,1 mol/l)</b>	1.) 12,1 g Tris(hydroxymethyl)amino- methan 2.) 800 ml Aqua dest. 3.) 50 ml Salzsäure (1 mol/l)  1.) – 3.) zusammenfügen und mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen.
---	--

**Tabelle 4: Puffer und Lösungen**

### **2.1.3 Geräte und Materialien**

Analysenwaage, AE 100 (Mettler/Toledo, Gießen)

Digitalkamera Olympus C-4000 Zoom (Olympus, Tokio, Japan)

Durchlichtmikroskop Olympus BX511F (Olympus, Tokio, Japan)

Einbettautomat Tissue-Tek (Sakura Finetek GmbH, Heppenheim)

Gefriermikrotom HM560 M (Microm GmbH, Walldorf)

Mikrotom, Microm Cool Cut HM355S (Microm GmbH, Walldorf)

Streckplatte (Leica, Nussloch)

Zentrifuge Mikro 200R (Hettich, Tuttlingen)

analySIS Software (Olympus, Tokyo, Japan)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Transplantation

#### 2.2.1.1 Versuchstiere

Die Empfängertiere sind sowohl bei allogenen als auch bei isogenen Transplantationen männliche Tiere des Stammes Lewis mit einem Gewicht von 200 – 250 g. Bei isogenen Transplantationen, welche als Kontrolle dienen, werden Lewis-Ratten auch als Spendertiere eingesetzt. Bei allogenen Transplantationen dienen Tiere des Stammes Fischer-344 als Spender. Als unabhängige Kontrollgruppe werden untransplantierte Lungen von Lewis-Ratten verwendet. Die Ratten werden von Elevage Janvier, Le Genest St. Isle, Frankreich (Lewis) und von Charles River, Sulzfeld, Deutschland (Fischer-344) bezogen. Die Tierexperimente werden von Prof. Dr. V. Grau und K. Petri durchgeführt und entsprechen, wie auch die Tierhaltung, dem Deutschen Tierschutzgesetz und den Richtlinien des National Institute of Health (NIH). Eine Genehmigung zur Durchführung von Tierversuchen lag vom Regierungspräsidium Gießen vor (V54-19c20-15(1)GI20/27 Nr49/2007).

#### 2.2.1.2 Das experimentelle Modell der chronischen Lungentransplantatabstoßung

Die Anästhesie der Tiere (Spender und Empfänger) erfolgt als kurze Inhalationsnarkose mit Isofluran und anschließender intraperitonealer (i. p.) Injektion von Ketaminhydrochlorid 90 mg/kg KG und Medetomidinhydrochlorid 0,1 mg/kg KG. Die Tiere werden nach orotrachealer Intubation mit einem Atemzugvolumen von 1 ml/100 g KG, einer Atemfrequenz von 100 Atemzügen pro min und einem PEEP von 5 cm H<sub>2</sub>O (Zentimeter Wassersäule) mit Raumluft beatmet. Die Transplantationen werden durch Prof. Dr. V. Grau nach der Methode von Mizuta durchgeführt. [65] Die Assistenz dabei übernimmt K. Petri. Es werden linksseitige orthotope Transplantationen durchgeführt, wobei die rechte native Lunge im Empfänger verbleibt. Die Eröffnung des Thorax erfolgt durch eine seitliche Thorakotomie. Die Spenderlunge wird in einer Schale mit 0,9 % NaCl-Lösung auf Eis präpariert. Im Thorax des Empfängertiers wird der Bronchus durch Einzelknopfnähte anastomosiert, bei der Anastomosierung der Arterien und Venen wird eine cuff-Technik eingesetzt. Die warme Ischämiezeit überschritt in keinem Fall 25 min. Nach der Operation wird die Anästhesie mit Atipamezolhydrochlorid 0,5 mg/kg KG antagonisiert und den Tieren wird einmalig 30 µg Ampicillin i. p. verabreicht. Ab dem Operationstag erhalten die Tiere zur

Immunsuppression für 10 Tage Ciclosporin 5 mg/kg KG subkutan (s. c.), um akute Abstoßungsepisoden in der frühen Phase nach Transplantation zu vermeiden. Am Tag 28 nach der Operation werden die Empfängertiere mit LPS stimuliert. Die LPS-Lösung wird intratracheal instilliert und dient als Stimulus, der eine akute Infektion simulieren und die chronische Abstoßung induzieren soll.

### **2.2.1.3 Organentnahme, Fixierung und Einbettung in Paraffin**

Die Organentnahme erfolgt an den Tagen 33, 35, 40 und 90 nach der Transplantation. Die Tiere werden mit einer Überdosis Isofluran getötet. Im Thorax wird die Lunge mit 4 % PFA/Sørensenpuffer instilliert bis das Inspirationsvolumen erreicht ist, die Trachea wird abgebunden und das Herz-/ Lungenpaket im Stück entnommen. Das Organpaket wird in 4 % PFA/Sørensenpuffer überführt und bei 4 °C über Nacht (ü. N.) belassen. Herz, Trachea und Thymus werden von der Lunge getrennt und der linke und rechte Lungenflügel werden freipräpariert. Die Lungenflügel werden nun einzeln in Agar 2 % eingebettet. Im Kühlschrank wird die Agarmasse in ca. 2 h fest. Nun werden die Lungen transversal in ca. 3 mm große Stücke geschnitten. Die Lungenstücke werden in Einbettungskassetten gelegt und in Sørensenpuffer 1 x (für die spätere Einbettung in Paraffin) bzw. Saccharose 18 % in Sørensenpuffer 1 x (für die Aufbewahrung als Cryogewebe) überführt. Nun werden sie für ca. 2 bis 3 h im Exsikkator entgast bis keine Luftblasen mehr aufsteigen. Die entgasten Lungenstücke werden ü. N. im Kühlschrank aufbewahrt. Die Lungenstücke, die in Paraffin eingebettet werden sollen, müssen vor der Einbettung in Paraffin zunächst entwässert werden. Die einzelnen Schritte der Entwässerung zeigt Tabelle 5 Der Einbettvorgang in Paraffin erfolgt daraufhin wie in Tabelle 6 veranschaulicht.

<b>Lösungsmittel</b>	<b>Dauer</b>	<b>Temperatur</b>
50 % Isopropanol	1 h	RT
70 % Isopropanol	2 h	RT
70 % Isopropanol	Bis zur Einbettung in Paraffin	4 °C

**Tabelle 5: Entwässerung der Gewebestücke**

h = Stunde, RT = Raumtemperatur.

<b>Lösungsmittel/Paraffin</b>	<b>Dauer</b>	<b>Temperatur</b>
96 % Isopropanol	1 h	RT
100 % Isopropanol	1 h	RT
100 % Isopropanol	1 h	RT
25 % Rotihistol, 75 % Isopropanol	1 h	RT
50 % Rotihistol, 50 % Isopropanol	1 h	RT
75 % Rotihistol, 25 % Isopropanol	1 h	RT
100 % Rotihistol	1 h	RT
Paraffin I	2 h	ca. 60 °C
Paraffin II	ü. N.	ca. 60 °C

**Tabelle 6: Einbettung der Gewebestücke in Paraffin**

h = Stunde; RT = Raumtemperatur; ü. N. = über Nacht.

Die Lungenstücke, die als Cryopräparate verwendet werden sollen, werden direkt aus der Saccharoselösung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C aufbewahrt.

## **2.2.2 Immunhistochemie**

### **2.2.2.1 Beschichtung der Objektträger**

Die Beschichtung der Objektträger ermöglicht ein besseres Haften der Schnitte auf dem Objektträger. Paraffinschnitte werden auf silanisierte Objektträger aufgetragen, Gefrierschnitte werden auf Objektträger aufgetragen, welche vorher mit Gelatine beschichtet wurden. In Tabelle 7 sind die einzelnen Schritte der Silanisierung und in Tabelle 8 die Schritte der Gelatinebeschichtung aufgeführt.

Schritt	Dauer	Arbeitsschritt
1	12 h (ü. N.)	5 % Salzsäure
2	5 min	Aqua dest.
3	5 min	Isopropanol
4	1 h	trocknen bei RT
5	5 min	2 % Silan in Aceton
6	5 min	2 % Aceton in Aqua dest.
7	5 min	2 % Aceton in Aqua dest.
8	5 min	Aqua dest.
9	Kurz	trocknen bei RT
10	12 h (ü. N.)	trocknen bei 60 °C

**Tabelle 7: Silanisierung der Objektträger**

Aqua dest. = Aqua destillata; h = Stunde; RT = Raumtemperatur; ü. N. = über Nacht.

Schritt	Dauer	Arbeitsschritt
1		10 g Gelatine in 1 l Aqua dest. unter Rühren auf der Heizplatte lösen
2		Zugabe von 0,2 g Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat
3	5 min	rühren bei 60 °C
4		zwei Mal filtern
5		Objektträger 5 mal eintauchen, anschließend trocknen lassen
6	12 h (ü. N.)	trocknen bei 60 °C

**Tabelle 8: Gelatinebeschichtung der Objektträger**

Aqua dest. = Aqua destillata; g = Gramm; h = Stunde; min = Minuten; ü. N. = über Nacht.

### 2.2.2.2 Anfertigung der Schnitte

Für die Doppelfärbungen werden mit einem Mikrotom 3 µm dünne Schnitte von den in Paraffin eingebetteten Lungenstücken angefertigt. Die Schnitte werden im 40 °C warmen Wasserbad aufgefangen. Je Objektträger werden 2 Schnitte aufgetragen und

zum Glätten ca. 45 min auf eine 38 °C warme Streckplatte gelegt. Bis zum nächsten Tag trocknen die Schnitte im Wärmeschrank bei 60 °C.

Für die Gefrierschnitte werden mit einem Gefriermikrotom 7 µm dünne Schnitte von den Geweblöckchen angefertigt. Die Schnitte werden direkt nach dem Schneiden auf einen Objektträger aufgetragen und trocknen für bis zu 30 min an der Luft. Sie werden entweder noch am gleichen Tag gefärbt oder wenige Tage im Tiefkühlfach aufbewahrt.

### 2.2.2.3 Entparaffinierung

Vor der Färbung werden die Schnitte entparaffiniert. Anschließend werden sie in Aqua dest. gewaschen. Bei den Gefrierschnitten entfällt die Entparaffinierung. Die einzelnen Schritte der Entparaffinierung veranschaulicht Tabelle 9.

Schritt	Dauer	Lösungsmittel
1	10 min	Xylol 100 %
2	10 min	Xylol 100 %
3	3 min	Xylol 100 %
4	3 min	Isopropanol 100 %
5	3 min	Isopropanol 100 %
6	3 min	Isopropanol 90 %
7	3 min	Isopropanol 80 %
8	3 min	Isopropanol 70 %
9	3 min	Isopropanol 50 %
10	3 min	Aqua dest.

**Tabelle 9: Entparaffinierung der Schnitte**

Aqua dest. = Aqua destillata; min = Minuten.

### 2.2.2.4 Immunhistochemische und enzymhistochemische Methoden

#### Immunhistochemische Färbung der Paraffinschnitte:

Das hier beschriebene Vorgehen gilt sowohl für die Doppelfärbung mit anti- $\alpha$ -Glattmuskelaktin-Antikörpern (im Folgenden mAb anti-Aktin) und gegen ein CD68-artiges Antigen gerichteten Antikörpern (im Folgenden mAb ED1), als auch für die Doppelfärbung mit anti-Nestin-Antikörpern (im Folgenden mAb anti-Nestin) und



mAb ED1. Die einzelnen Schritte im Detail, sowie die Antikörper und anderen verwendeten Lösungen, deren Verdünnungen und Inkubationszeiten sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Um die Antigene für die Antikörper besser zugänglich zu machen, erfolgt durch Kochen unter Druck in saurem Citratpuffer oder durch ein Andauen des Gewebes mit Protease Typ XIV eine Antigendemaskierung. Danach werden die Schnitte in PBS überführt und drei Mal zwei min in PBS gewaschen. Eine Farbreaktion aufgrund der endogenen Peroxidaseaktivität wird verhindert, indem die Schnitte 30 min bei RT in verdünnter Wasserstoffperoxidlösung inkubiert werden. Danach wird drei Mal zwei min in PBS gewaschen. Um eine Bindung des Antikörpers an unspezifische Bindungsstellen zu verhindern, werden 50 µl PBS/BSA/Azid auf jedes Präparat pipettiert und 30 min bei RT inkubiert. PBS/BSA/Azid wird abgeschüttelt und je 50 µl verdünnte Primäantikörperlösung auf die Präparate pipettiert. Auf die Negativkontrollen wird PBS/BSA/Azid ohne Antikörper gegeben. Nach der Inkubationszeit werden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Abspülen mit PBS entfernt. Dann wird das Reagenz zum Nachweis des Primäantikörpers (Nachweisreagenz) aufpipettiert und inkubiert. Die Zugabe von 5 % Normalrattenserum (NRS) verhindert die Bindung der anti-Maus-Ig an gewebeeigene Rattenantikörper. Als Nachweisreagenz wird im ersten Färbeschritt bei der Doppelfärbung mit mAb anti-Aktin und mAb ED1 das mit HRP markierte EnVision+ System (EnVision) verwendet. Bei der Doppelfärbung mit mAb anti-Nestin und mAb ED1 werden polyklonale Kaninchen-anti-Maus-Ig-Antikörper HRP (KaM-HRP) verwendet. Die überschüssige Reagenzlösung wird drei Mal mit TBS abgespült und anschließend wird die Substratlösung aufgetragen.

Nach der Inkubationszeit werden die Schnitte drei Mal mit PBS abgespült. Es folgt der zweite Färbeschritt der Doppelfärbung. Um Umfärbungen zu vermeiden, werden die Antikörper entweder durch Kochen unter Druck in saurem Citratpuffer oder durch eine Inkubation in warmer Salzsäurelösung abgelöst und die Schnitte anschließend drei Mal zwei min in PBS gewaschen. Danach werden sie für drei min in eine Küvette mit TBS überführt. Es folgt eine erneute Antigendemaskierung mit Protease Typ XIV. Danach werden die Schnitte ein Mal mit PBS abgespült und drei Mal zwei min in PBS gewaschen. Dann erfolgt eine erneute Absättigung der unspezifischen Proteinbindungsstellen mit PBS/BSA/Azid. Es folgt die Behandlung mit einem weiteren Primäantikörper. Die überschüssige Antikörperlösung wird drei Mal mit PBS abgespült. Danach folgt das Nachweisreagenz und dreimaliges Spülen mit TBS nach

der Inkubation. Danach wird der lösliche Immunkomplex aufgetragen und inkubiert. Als Nachweisreagenz im zweiten Färbeschritt werden bei beiden Doppelfärbungen polyklonale Kaninchen-anti-Maus-Ig-Antikörper (KaM) und als löslicher Enzym-Immunkomplex alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase (APAAP) eingesetzt. Nach dreimaligem Abspülen der Schnitte mit Tris-HCl-Puffer, wird die Substratlösung aufgetragen. Die Farblösung wird durch dreimaliges Spülen mit PBS entfernt.

	<b>Doppelfärbung mit mAb anti-Aktin und mAb ED1</b>	<b>Doppelfärbung mit mAb anti-Nestin und mAb ED1</b>
<b>Antigendemaskierung</b>	kochen in Citratpuffer 30 min unter Druck	kochen in Citratpuffer 30 min unter Druck
<b>Blockieren der endogenen Peroxidaseaktivität</b>	1 % Wasserstoffperoxid 30 min bei RT	1 % Wasserstoffperoxid 30 min bei RT
<b>Absättigung der unspezifischen Proteinbindungsstellen</b>	PBS/BSA/Azid  30 min bei RT	PBS/BSA/Azid  30 min bei RT
<b>Primärantikörper</b>	mAb anti-Aktin 1:3000 in PBS/BSA/Azid ü. N. bei 4 °C	mAb anti-Nestin 1:100 in PBS/BSA/Azid ü. N. bei 4 °C
<b>Nachweisreagenz</b>	EnVision unverdünnt + 5 % NRS 30 min bei RT	KaM-HRP 1:70 in PBS + 5 %NRS 60 min bei RT
<b>Substratlösung</b>	1 ml Substratlösung für Peroxidase	1 ml Substratlösung für Peroxidase
<b>Antikörperablösung</b>	kochen in Citratpuffer  1 min unter Druck	Wasserbad in Salzsäurelösung 10 min bei 60 °C
<b>Antigendemaskierung</b>	Proteaselösung 15 min bei RT	Proteaselösung 15 min bei RT
<b>Absättigung der unspezifischen Proteinbindungsstellen</b>	PBS/BSA/Azid  30 min bei RT	PBS/BSA/Azid  30 min bei RT
<b>Primärantikörper</b>	mAb ED1 1:500 in PBS/BSA/Azid ü. N. bei 4 °C	mAb ED1 1:500 in PBS/BSA/Azid ü. N. bei 4 °C

<b>Nachweisreagenz</b>	KaM 1:25 in PBS + 5 % NRS 30 min bei RT	KaM 1:25 in PBS + 5 % NRS 30 min bei RT
<b>Löslicher Enzym- Immunkomplex</b>	APAAP 1:25 in TBS 30 min bei RT	APAAP 1:25 in TBS 30 min bei RT
<b>Substratlösung</b>	Substratlösung für alkalische Phosphatase 20 min bei RT an dunklem Ort	Substratlösung für alkalische Phosphatase 20 min bei RT an dunklem Ort
<b>Eindeckmedium</b>	eindecken mit Glycergel	eindecken mit Glycergel

**Tabelle 10: Immunhistochemische Doppelfärbungen der Paraffinschnitte mit mAb anti-Aktin und mAb ED1 sowie mAb anti-Nestin und mAb ED1**

APAAP = alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase; BSA = bovines Serumalbumin; DAB = 3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid; EnVision+ System HRP labelled Polymer, anti-Maus; HRP = Meerrettichperoxidase; KaM = Polyklonale Kaninchen-anti-Maus-Ig-Antikörper; KaM-HRP = Polyklonale Kaninchen-anti-Maus-Ig-Antikörper HRP; mAb = monoklonaler Antikörper; mg = Milligramm; min = Minuten; ml = Milliliter; NRS = Normalrattenserum; PBS = phosphate buffered saline; RT = Raumtemperatur; TBS = tris buffered saline; ü. N. = über Nacht; µl = Mikroliter.

#### Immunhistochemische Färbung der Gefrierschnitte:

Das hier beschriebene Vorgehen gilt für die Einzelfärbung mit dem mAb anti-Aktin und dem mAb ED1 auf Gefrierschnitten. Die einzelnen Schritte im Detail, sowie die Antikörper und anderen verwendeten Lösungen, deren Verdünnungen und Inkubationszeiten sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Das Vorgehen ist im Großen und Ganzen der Färbung der Paraffinschnitte sehr ähnlich. Bei den Gefrierschnitten entfällt die Entparaffinierung, dafür werden die Schnitte vor Beginn der Färbung in eiskühlem Alkohol inkubiert. Die Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität (bei Gefrierschnitten jedoch auf Eis), die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen und das Auftragen des Primärantikörpers erfolgen wie bei der Färbung der Paraffinschnitte. Der Primärantikörper inkubiert 60 min bei RT. Das Entfernen des Primärantikörpers, das Auftragen des Nachweisreagenz und des löslichen Enzym-Immunkomplexes sowie die Farbentwicklung sind gleich. Zwischen den einzelnen Schritten werden die Schnitte mit PBS bzw. TBS abgespült und drei Mal drei min in PBS bzw. TBS gewaschen. Die Schnitte werden entwässert und mit Pertex eingedeckt.

	<b>Färbung mit mAb anti-Aktin</b>	<b>Färbung mit mAb ED1</b>
<b>Fixierung</b>	Methanol eisgekühlt 10 min	Isopropanol eisgekühlt 10 min
<b>Blockieren der endogenen Peroxidaseaktivität</b>	1 % Wasserstoffperoxid 30 min im Eiswasserbad	1 % Wasserstoffperoxid 30 min im Eiswasserbad
<b>Absättigung der unspezifischen Proteinbindungsstellen</b>	PBS/BSA/Azid  30 min bei RT	PBS/BSA/Azid  30 min bei RT
<b>Primärantikörper</b>	mAb anti-Aktin 1:50000 in PBS/BSA/Azid 60 min bei RT	mAb ED1 1:500 in PBS/BSA/Azid 60 min bei RT
<b>Nachweisreagenz</b>	KaM-HRP 1:70 in PBS + 5 % NRS 60 min bei RT	KaM 1:25 in PBS + 5 % NRS 30 min bei RT
<b>Verstärkung/ Löslicher Enzym-Immunkomplex</b>		PAP 1:1000 in PBS + 10 % NRS 30 min bei RT
<b>Substratlösung</b>	1 ml Substratlösung für Peroxidase	1 ml Substratlösung für Peroxidase
<b>Entwässerung Eindeckmedium</b>	Entwässerung eindecken mit Pertex	Entwässerung eindecken mit Pertex

**Tabelle 11: Immunhistochemische Färbung der Gefrierschnitte mit mAb anti-Aktin und mAb ED1**

BSA = bovines Serumalbumin; DAB = 3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid;  
 HRP = Meerrettichperoxidase; KaM = Polyklonale Kaninchen-anti-Maus-Ig-Antikörper; KaM-  
 HRP = Polyklonale Kaninchen-anti-Maus-Ig-Antikörper HRP; mAb = monoklonaler Antikörper;  
 min = Minuten; ml = Milliliter; NRS = Normalrattenserum; PAP = Peroxidase-anti-Peroxidase;  
 PBS = phosphate buffered saline; RT = Raumtemperatur; µl = Mikroliter.

Immunhistochemische Färbung der Gefrierschnitte mit mAb OX-1 auf Milzgewebe:

In Tabelle 12 sind die Einzelfärbungen auf Milzgewebe beschrieben. Es wurden sowohl Gefrierschnitte von nativer Milz als auch von PFA-fixierter Milz gefärbt. Die einzelnen Färbungen unterscheiden sich im Nachweisreagenz. Für die erste Nachweismethode wird Kam-HRP verwendet. Bei der zweiten Nachweismethode wird KaM verwendet und als löslicher Enzym-Immunkomplex Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP) eingesetzt. In einem dritten Nachweisversuch wird KaM und PAP zwei Mal hintereinander angewendet (2 x PAP), um die Färbung zu verstärken.

	<b>Einzelfärbung mit mAb OX-1 Entwicklung KaM-HRP</b>	<b>Einzelfärbung mit mAb OX-1 Entwicklung PAP</b>	<b>Einzelfärbung mit mAb OX-1 Entwicklung 2x PAP</b>
<b>Fixierung</b>	Isopropanol eisgekühlt 10 min	Isopropanol eisgekühlt 10 min	Isopropanol eisgekühlt 10 min
<b>Blockieren der endogenen Peroxidase- aktivität</b>	1 % Wasserstoffperoxid 30 min im Eiswasserbad	1 % Wasserstoffperoxid 30 min im Eiswasserbad	1 % Wasserstoffperoxid 30 min im Eiswasserbad
<b>Absättigung der unspezifischen Protein- bindungs- stellen</b>	PBS/BSA/Azid  30 min bei RT	PBS/BSA/Azid  30 min bei RT	PBS/BSA/Azid  30 min bei RT
<b>Primärantikörper</b>	mAb OX-1 1:2000 in PBS/BSA/Azid 60 min bei RT	mAb OX-1 1:2000 in PBS/BSA/Azid 60 min bei RT	mAb OX-1 1:2000 in PBS/BSA/Azid 60 min bei RT
<b>Nachweis- reagenz</b>	KaM-HRP 1:70 in PBS + 5 %NRS 60 min bei RT	KaM 1:25 in PBS + 5 % NRS 30 min bei RT	KaM 1:25 in PBS + 5 % NRS 30 min bei RT
			PAP 1:1000 in PBS mit 5 % NRS 30 min bei RT
			KaM 1:25 in PBS + 5 % NRS 30 min bei RT
		PAP 1:1000 in PBS mit 5 % NRS 30 min bei RT	
<b>Substratlösung</b>	Substratlösung für Peroxidase	Substratlösung für Peroxidase	Substratlösung für Peroxidase

<b>Entwässerung</b>	Entwässerung	Entwässerung	Entwässerung
<b>Eindeck- medium</b>	eindecken mit Pertex	eindecken mit Pertex	eindecken mit Pertex

**Tabelle 12: Immunhistochemische Einzelfärbung der Gefrierschnitte von nativer und PFA-fixierter Milz**

BSA = bovines Serumalbumin; DAB = 3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid; HRP = Meerrettichperoxidase; KaM = Polyklonale Kaninchen-anti-Maus-Ig-Antikörper; KaM-HRP = polyklonale Kaninchen-anti-Maus-Ig-Antikörper HRP; mAb = monoklonaler Antikörper; min = Minuten; ml = Milliliter; NRS = Normalrattenserum; PAP = Peroxidase-anti-Peroxidase; PBS = phosphate buffered saline; RT = Raumtemperatur; µl = Mikroliter.

Enzymhistochemische Färbung der sauren Phosphatase auf Gefrierschnitten

Die Substratlösung für saure Phosphatase (siehe Kapitel 2.1.2) wird 5 min hochtourig zentrifugiert. Der Überstand wird auf die Gefrierschnitte pipettiert und 90 min im Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Substratlösung mit Aqua dest. abgespült.

**2.2.2.5 Standardfärbungen**

Hämalaun- und Eosin-Färbung (HE-Färbung):

Die Hämalaun- und Eosin-Färbungen (HE-Färbung) werden nach einem standardisierten Protokoll angefertigt, welches in Tabelle 13 beschrieben wird.

<b>Schritt</b>	<b>Dauer</b>	<b>Lösung/Lösungsmittel</b>
1	8 min	Hämalaunlösung
2	1 sec	Aqua reinst 100%
3	8 min	Leitungswasser
4	1 min	Eosinlösung
5	1 sec	Aqua dest.

**Tabelle 13: Hämalaun und Eosin-Färbung**

Aqua dest. = Aqua destillata; min = Minuten; sec = Sekunden.

### Kerngegenfärbung

Die Kerngegenfärbung erfolgt mit einer 1:10 verdünnten Hämalaun-Färbelösung. Tabelle 14 fasst die einzelnen Schritte zusammen.

Schritt	Dauer	Lösung
1	90 sec	Hämalaun 1:10
2	abspülen	Aqua dest.
3	5 min	Leitungswasser
4	abspülen	Aqua dest.

**Tabelle 14: Kerngegenfärbung**

Aqua dest. = Aqua destillata; min = Minuten; sec = Sekunden.

### **2.2.2.6 Eindecken der Präparate**

Einzel gefärbte Schnitte, bei denen als Chromogen DAB verwendet wurde, sowie die HE-gefärbten Paraffinschnitte werden vor dem Eindecken entwässert. Hierzu führt man die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe und anschließend in Xylol. Das Eindecken erfolgt mit dem Eindeckmedium Pertex. Die einzelnen Schritte der Entwässerung sind in Tabelle 15 beschrieben.

Schritt	Dauer	Lösungsmittel
1	3 min	Isopropanol 50 %
2	3 min	Isopropanol 70 %
3	3 min	Isopropanol 80 %
4	3 min	Isopropanol 90 %
5	3 min	Isopropanol 100 %
6	3 min	Isopropanol 100 %
7	3 min	Xylol 100 %
8	3 min	Xylol 100 %

**Tabelle 15: Entwässerung der Gefrierschnitte**

min = Minuten.

Die doppelt gefärbten Paraffinschnitte bei denen das Nachweisreagenz APAAP verwendet wurde und die Gefrierschnitte, auf denen das Enzym saure Phosphatase angefärbt wurde, können aufgrund des alkohollöslichen Produktes, welches bei der Farbreaktion mit dem Substrat Fast Blue entsteht, nicht entwässert werden. Sie werden mit Glycergel eingedeckt.

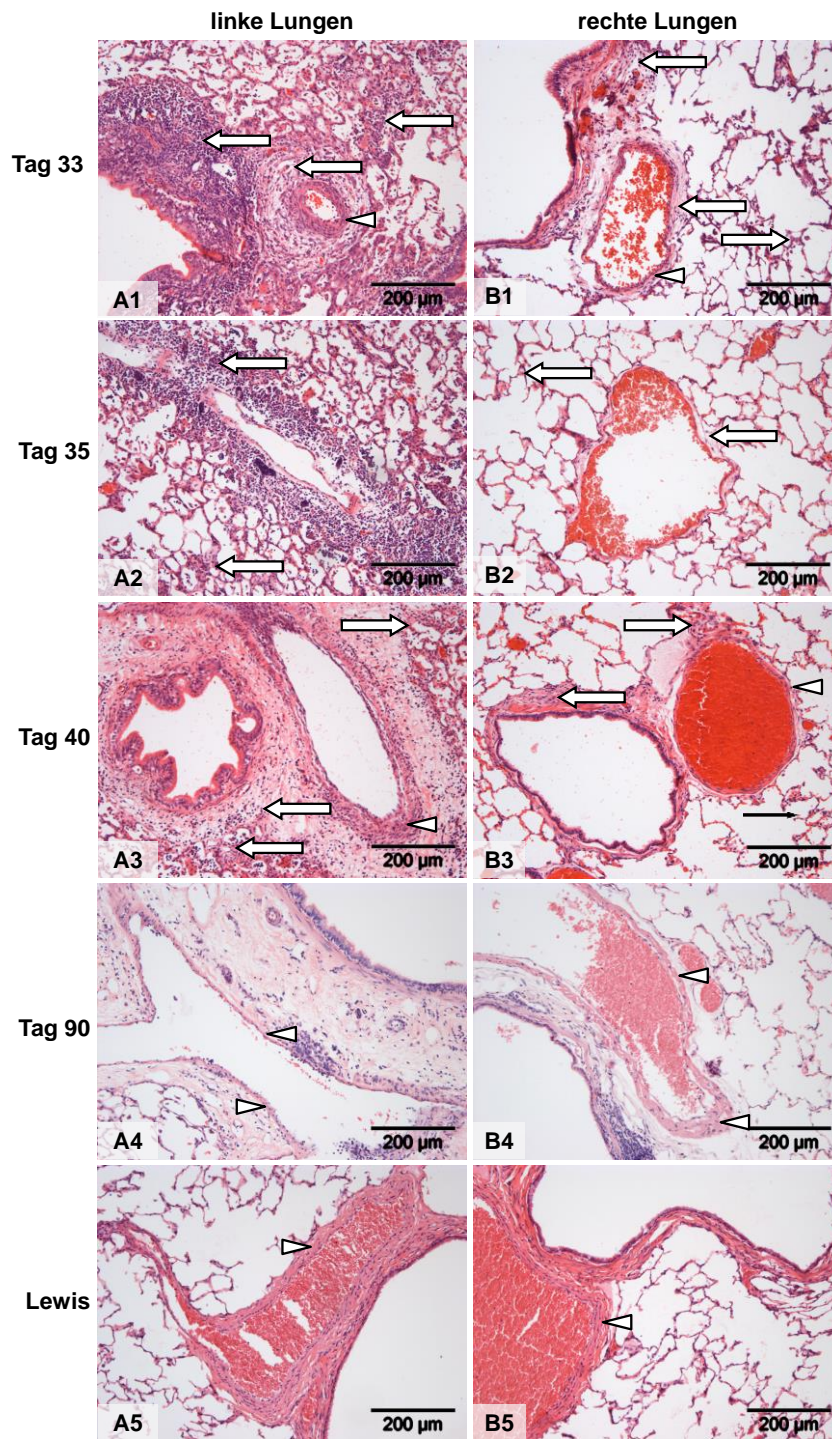
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Histopathologische Veränderungen in den Transplantaten

Von den an den Tagen 33, 35, 40 und 90 nach Transplantation entnommenen allogenen transplantierten linken Lungen, sowie untransplantierten rechten Empfängertieren wurden Paraffinschnitte angefertigt, welche mit Hämalaun und Eosin (HE-Färbung) gefärbt wurden. Im Vergleich zu den untransplantierten rechten Lungen sieht man in den transplantierten Lungen an den Tagen 33, 35 und 40 massive Infiltrate mononukleärer Leukozyten in der Adventitia der Lungenarterien und im peribronchialen Bindegewebe, sowie im Alveolarraum Abbildung (Abb.) 1, Pfeile in A1 – A3). Die Gefäßwände der Lungenarterien sind an diesen Tagen verglichen mit nativen Lungen verdickt (Abb. 1, Pfeilspitzen in A1 und A3). In den rechten Lungen der Empfängertiere finden sich an den gleichen Tagen wesentlich weniger Leukozyten (Abb. 1, Pfeile in B1 – B3) und eine schlanke, nicht verdickte Gefäßwand der Lungenarterien (Abb. 1, Pfeilspitzen in B1 und B3). An den Tagen 33, 35 und 40 erkennt man im histologischen Präparat ein subendotheliales Infiltrat (Tag 33 und 35) und eine Intimahyperplasie (Tag 40) sowie ein perivaskuläres Infiltrat mit beginnender perivaskulärer Fibrose (Tag 40). Am Tag 90 wirkt die Tunica media der linken Lungen im Vergleich zu untransplantierten rechten Lungen ausgedünnt (Abb. 1, Pfeilspitzen in A4) und das Leukozyteninfiltrat ist weitestgehend verschwunden. Native Lungen von Lewis-Ratten zeigen die normale Struktur der Gefäßwände (Abb. 1, Pfeilspitzen in A5 und B5) ohne Leukozyteninfiltrate und Fibrose und einen normalen Alveolarraum. Linke und rechte Lungen unterscheiden sich im Gegensatz zu den linken und rechten Lungen der Transplantatempfängertiere nicht.

Die Schnitte und HE-Färbungen wurden freundlicherweise von Gabriele Fuchs-Moll, Andrea Fischer und Renate Plaß angefertigt.





**Abbildung 1: Hämalaun- und Eosin-Färbungen von Paraffinschnitten transplantierte und nativer Lungen.** A1 – A4: allogene transplantierte Lungen an den Tagen 33, 35, 40 und 90 nach Transplantation; B1 – B4: untransplantierte rechte Lungen der gleichen Transplantatempfänger; A5: native linke Lewis-Lunge, B5: native rechte Lewis-Lunge. Auffällig sind die Infiltrate mononukleärer Leukozyten in den linken Lungen der Tage 33 – 40 (Pfeile in A1 – A3) verglichen mit den rechten Lungen, in denen die Leukozyteninfiltrate deutlich geringer ausgeprägt sind (Pfeile in B1 – B3). Zu beachten ist auch die Mediahypertrophie in den linken Lungen an den Tagen 33 – 40 (Pfeilspitzen in A1 – A3) verglichen mit den rechten Lungen (Pfeilspitzen in B1 – B3) sowie die Ausdünnung der Tunica media in der transplantierten Lunge an Tag 90 (Pfeilspitzen in A4) verglichen mit der rechten Lunge (Pfeilspitzen in B4). Zum Vergleich zeigen beide untransplantierten Lungen von Lewis-Ratten eine normal starke Tunica media (Pfeilspitzen in A5 und B5).

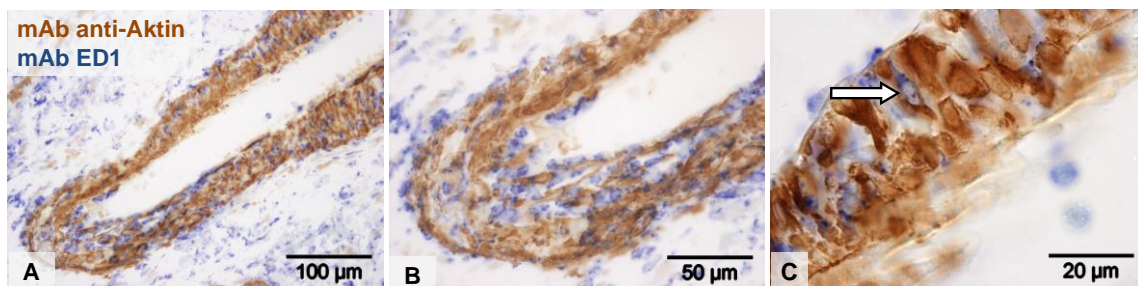
## 3.2 Charakterisierung von Zellen der Tunica media von Transplantatarterien

### 3.2.1 Aktin und CD68-artiges Antigen

Für jeden der Tage 33, 35, 40 und Tag 90 nach Transplantation wurden zwei allogene transplantierte linke Lungen und zwei untransplantierte rechte Empfängerlungen untersucht. Am Tag 90 wurde eine dritte Lunge gefärbt. Außerdem wurden zwei isogen transplantierte Lungen an den Tagen 33, 40 und 90 untersucht.

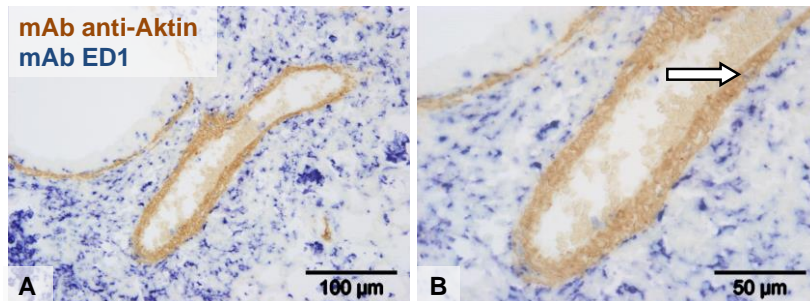
#### 3.2.1.1 Allogene Transplantate

Neben dem Makrophageninfiltrat in der Adventitia der Lungenarterien werden an den postoperativen Tagen 33, 35 und 40 Zellen in der Tunica media der Lungenarterien beobachtet, die sich mit dem mAb ED1 anfärben lassen (ED1-positive Zellen) und teilweise eine spindelförmige Struktur aufweisen. Die meisten dieser Zellen finden sich am Tag 35 und Tag 40. Einige der ED1-positiven Zellen sind zusätzlich mit dem mAb anti-Aktin angefärbt, sind also doppelpositiv. Diese Zellen treten am Tag 35 am häufigsten auf.

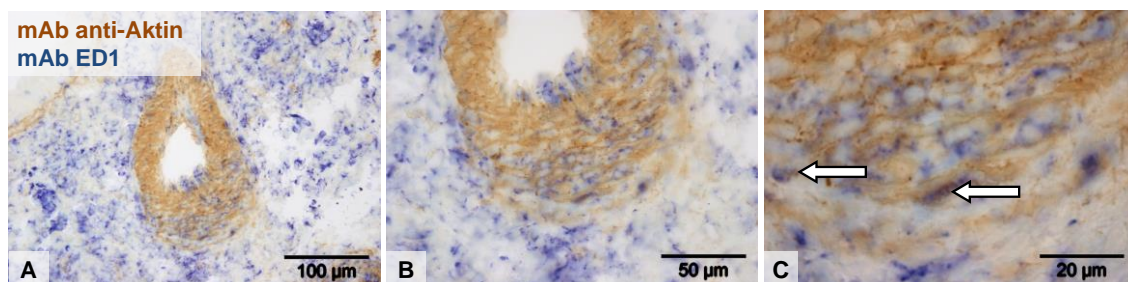


**Abbildung 2: Doppelfärbung von Paraffinschnitten einer allogenen transplantierten linken Lunge am Tag 33 mit mAb anti-Aktin (braun) und mAb ED1 (blau).** Zu beachten sind die Makrophageninfiltrate in der Tunica media des Blutgefäßes in A und B, sowie die doppelpositive Zelle in der Tunica media (Pfeil in C). B ist eine Vergrößerung der in A gezeigten Lungenarterie, C ist ein Ausschnitt aus einer anderen Lungenarterie. Gezeigt ist 1 Tier von 2 untersuchten Tieren. Das andere Tier zeigt ähnliche Ergebnisse. mAb = monoklonaler Antikörper.

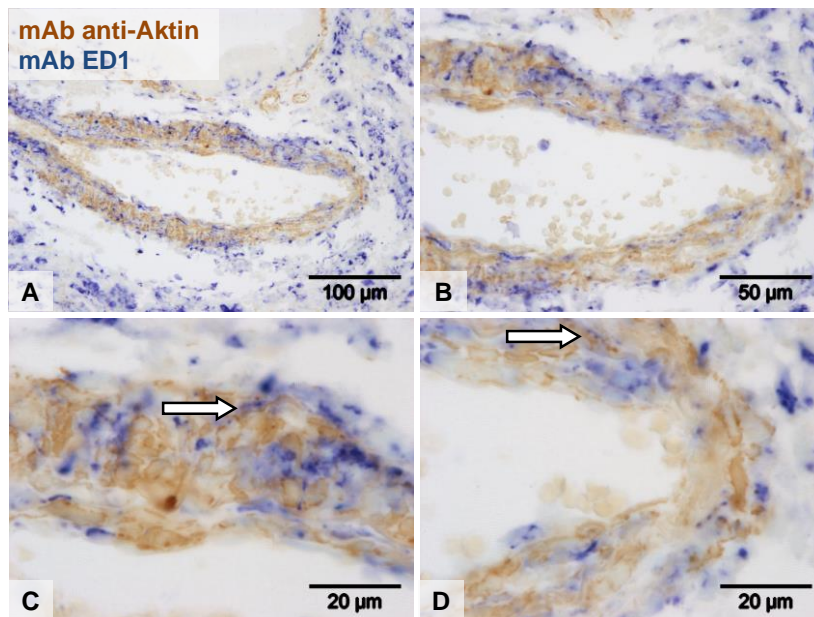
Am Tag 33 finden sich auch Lungenarterien, die kaum Leukozyten in der Tunica media aufweisen. Abb. 3 zeigt ein solches Gefäß, in dem man nur einzelne Leukozyten in der Tunica media (Pfeile in B) findet. Die Abb. veranschaulicht gut das Makrophageninfiltrat im perivaskulären und peribronchialen Bindegewebe.



**Abbildung 3: Doppelfärbung von Paraffinschnitten einer allogenen transplantierten linken Lunge am Tag 33 mit mAb anti-Aktin (braun) und mAb ED1 (blau).** Zu beachten sind die Makrophageninfiltrate in der Tunica adventitia des Blutgefäßes und im peribronchialen Bindegewebe in A und B. In der Tunica media befinden sich in diesem Gefäß sehr vereinzelt ED1-positive Zellen (Pfeil in B). B ist eine Vergrößerung der in A gezeigten Lungenarterie. Gezeigt ist 1 Tier von 2 untersuchten Tieren. Das andere Tier zeigt ähnliche Ergebnisse. mAb = monoklonaler Antikörper.

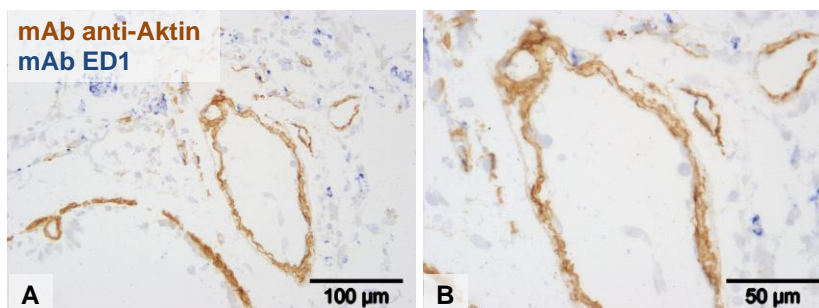


**Abbildung 4: Doppelfärbung von Paraffinschnitten einer allogenen transplantierten linken Lunge am Tag 35 mit mAb anti-Aktin (braun) und mAb ED1 (blau).** Zu beachten sind die Makrophageninfiltrate im perivaskulären Bindegewebe und die ED1-positiven Zellen in der Tunica media des Blutgefäßes in A und B, sowie die doppelpositiven Zellen in der Tunica media (Pfeile in C). B und C sind jeweils Vergrößerungen der in A gezeigten Lungenarterie. Gezeigt ist 1 Tier von 2 untersuchten Tieren. Das andere Tier zeigt ähnliche Ergebnisse. mAb = monoklonaler Antikörper.



**Abbildung 5: Doppelfärbung von Paraffinschnitten einer allogenen transplantierten linken Lunge am Tag 40 mit mAb anti-Aktin (braun) und mAb ED1 (blau).** Zu beachten sind die Makrophageninfiltrate im perivaskulären Bindegewebe und die ED1-positiven Zellen in der Tunica media des Blutgefäßes in A und B, sowie die doppelpositiven Zellen in der Tunica media (Pfeile in C und D). B, C und D sind jeweils Vergrößerungen der in A gezeigten Lungenarterie. Gezeigt ist 1 Tier von 2 untersuchten Tieren. Das andere Tier zeigt ähnliche Ergebnisse. mAb = monoklonaler Antikörper.

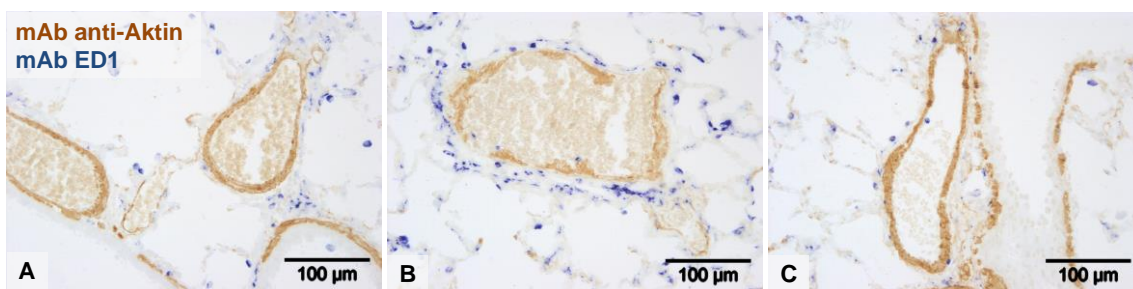
Am Tag 90 nach Transplantation werden in der ausgedünnten Tunica media keine ED1-positiven Zellen mehr beobachtet. Auch das perivaskuläre Infiltrat ED1-positiver Makrophagen ist abgeklungen.



**Abbildung 6: Doppelfärbung von Paraffinschnitten einer allogenen transplantierten linken Lunge am Tag 90 mit mAb anti-Aktin (braun) und mAb ED1 (blau).** Zu beachten sind die fehlenden Makrophageninfiltrate im perivaskulären Bindegewebe und die ausgedünnt wirkende Tunica media der Blutgefäße in (A) und (B). B ist die Vergrößerung der in A gezeigten Lungenarterie. Gezeigt ist 1 Tier von 3 untersuchten Tieren. Die anderen Tiere zeigen ähnliche Ergebnisse. mAb = monoklonaler Antikörper.

### 3.2.1.2 Isogene Transplantate

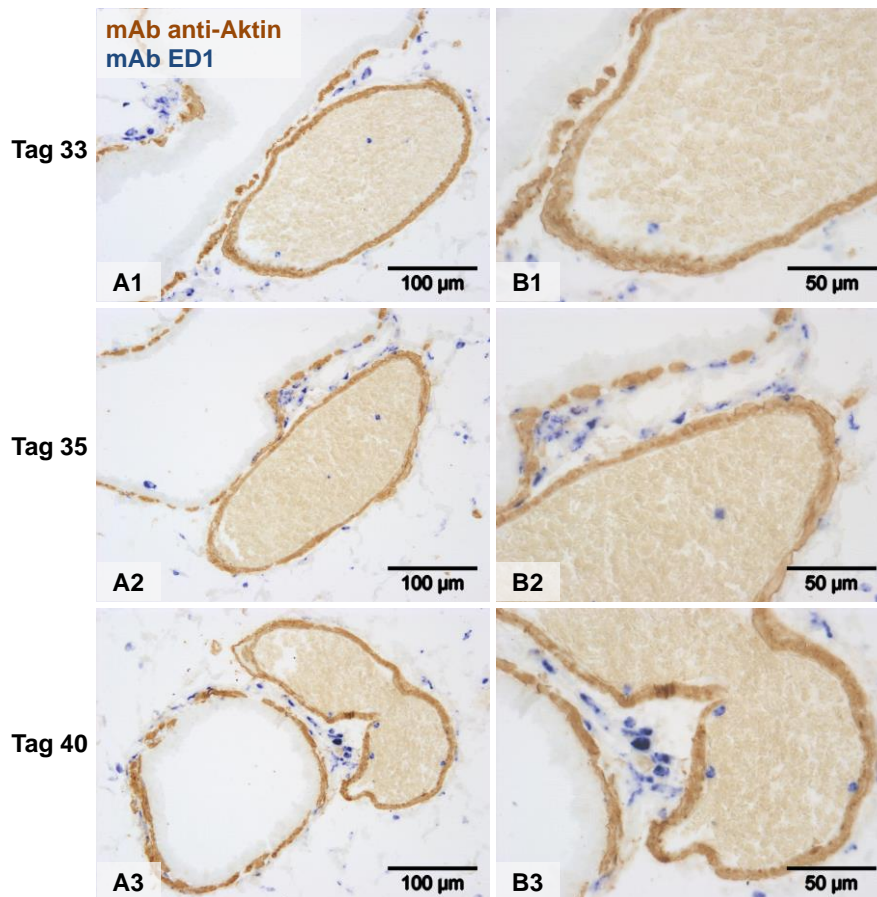
Die isogen transplantierten Lungen zeigen im Gegensatz zu den allogenen transplantierten Lungen keine wesentlichen Veränderungen der Gefäßwände und keine ED1-positiven Zellen in der Tunica media. Am Tag 90 ist keine Ausdünnung der Media zu sehen. Der Befund entspricht weitestgehend dem Befund der untransplantierten rechten Empfängerlungen und der untransplantierten nativen Lungen von Lewis-Ratten. Verglichen mit den nativen Lungen der Lewis-Ratten zeigen sich bei isogen transplantierten Lungen an den Tagen 33 und 40 mehr Makrophagen im perivaskulären und peribronchialen Bindegewebe. Die Makrophageninfiltrate sind verglichen mit allogenen transplantierten Lungen jedoch gering.



**Abbildung 7: Doppelfärbungen von Paraffinschnitten isogen transplanzierter linker Lungen am Tag 33 (A), Tag 40 (B) und Tag 90 (C) mit mAb anti-Aktin (braun) und mAb ED1 (blau).** Zu beachten sind die sehr dezente Makrophageninfiltrate im perivaskulären und peribronchialen Bindegewebe, sowie im Alveolarraum. Gezeigt ist jeweils 1 Tier von 2 untersuchten Tieren. Das andere Tier des jeweiligen Tages zeigt ähnliche Ergebnisse. mAb = monoklonaler Antikörper.

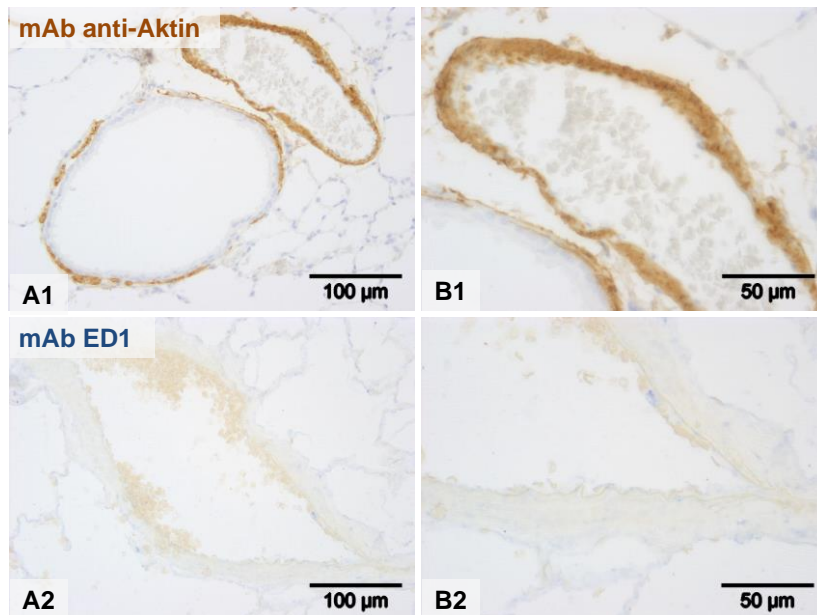
### 3.2.1.3 Untransplantierte Lungen

Die untransplantierten rechten Empfängerlungen zeigen keine Veränderungen der Gefäßwände und keine ED1-positiven Zellen in der Tunica media. Die Makrophageninfiltrate in der Tunica adventitia an den Tagen 33, 35 und 40 sind verglichen mit den linken Lungen minimal ausgeprägt. Die Stärke der Gefäßwand entspricht zu allen Zeitpunkten weitestgehend nativen Lungen von Lewis-Ratten. Abb. 8 zeigt die untransplantierten rechten Empfängerlungen.



**Abbildung 8: Doppelfärbungen von Paraffinschnitten untransplantierter rechter Empfängerlungen an den Tagen 33, 35 und 40 nach Transplantation mit mAb anti-Aktin (braun) und mAb ED1 (blau).** Gezeigt ist jeweils 1 Tier von 2 untersuchten Tieren. Das andere Tier des jeweiligen Tages zeigt ähnliche Ergebnisse. B ist jeweils die Vergrößerung der in A gezeigten Lungengefäße. mAb = monoklonaler Antikörper

Zum Vergleich der Ergebnisse mit Normalbefunden wurden 2 native Lungen von Lewis-Ratten herangezogen. Diese haben im Vorfeld keine spezielle Behandlung erfahren. In den nativen Lungen der Lewis-Ratten fällt in der Färbung mit dem mAb anti-Aktin (Abb. 9, A) die schlanke Tunica media des Lungengefäßes auf. In der Färbung mit mAb ED1 (Abb. 9, B) sind nur sehr vereinzelt ED1-positive Zellen zu erkennen.

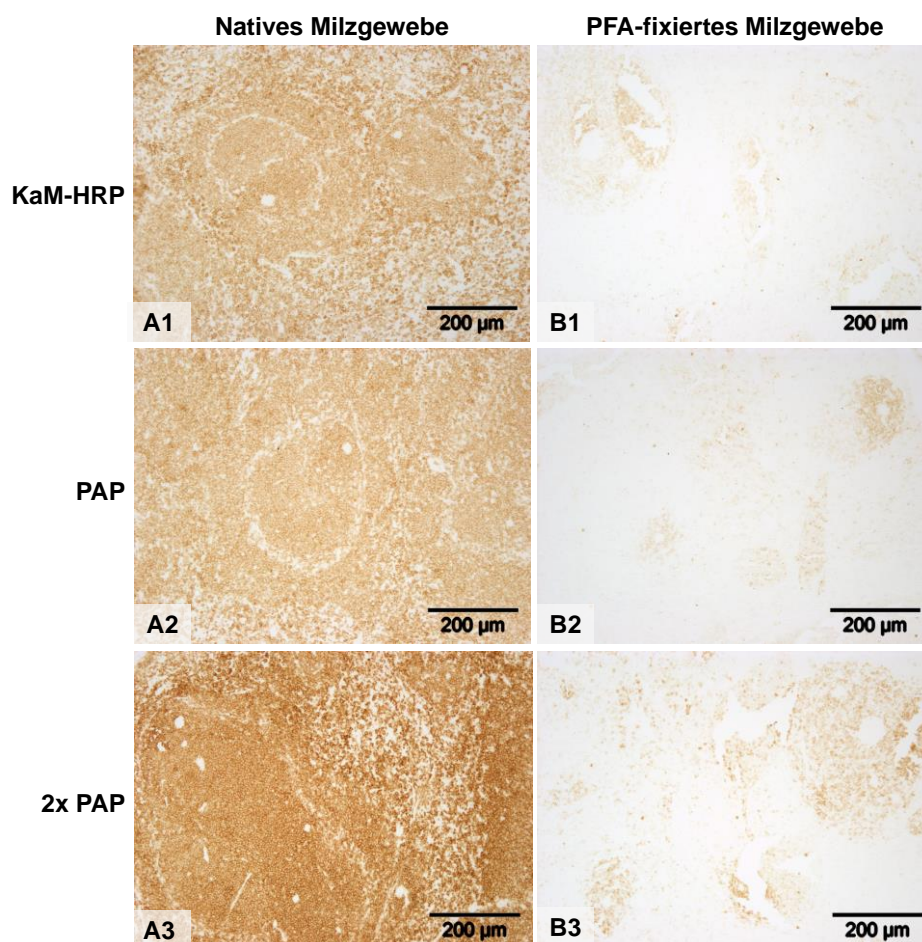


**Abbildung 9: Einzelfärbungen von Paraffinschnitten nativer Lungen von Lewis-Ratten mit mAb anti-Aktin (braun) und mAb ED1 (blau).** Gezeigt ist jeweils 1 Tier von 2 untersuchten Tieren. Das andere Tier zeigt ähnliche Ergebnisse. mAb = monoklonaler Antikörper.

### 3.2.2 Plasmamembranantigene von Leukozyten

Das LCA wird vom mAb OX-1 erkannt. OX-1 erkennt das membranständige Antigen CD45, das von den meisten Leukozyten exprimiert wird. Trotz verschiedener Vorbehandlungsmethoden und Färbeprotokolle war es nicht möglich, eine zufriedenstellende und sicher auswertbare Färbung auf Lungengewebe zu erzielen. Die in diesem Rahmen durchgeführten Vorbehandlungen der Paraffinschnitte sind Kochen im Dampfkochtopf, Inkubation in verdünnter Salzsäurelösung und Proteasevorbehandlung. Um zu untersuchen, ob die Färbung nur auf Lungengewebe nicht ausreichend zu erzielen ist oder ob die PFA-Fixierung der Organe die schlechte Anfärbbarkeit mit dem mAb OX-1 bedingt, wurden Milzen von gesunden Lewis-Ratten als Kontrollorgane mit dem gleichen Antikörper gefärbt. Da die Milz als lymphatisches Organ viele Leukozyten beherbergt, eignet sie sich gut als Kontrollorgan für Leukozytenfärbungen. Der Verdacht, dass die PFA-Fixierung der Lungen im Rahmen der Explantation die Proteinstrukturen der Antigene in einem Maße verändert, das eine Färbung mit bestimmten Antikörpern nicht mehr zulässt, erhärtete sich bei dem Versuch, das Milzgewebe zu färben. Hierzu wurden verschiedene Nachweismethoden auf Gefrierschnitten von nativem und PFA-fixiertem Milzgewebe getestet und verglichen. Bei der ersten Nachweismethode (Abb. 10, A1 – B1) wurden als Nachweisreagenz KaM-HRP verwendet. Bei den in Abb. 10, A2 – B2 gezeigten

Färbungen wurde zusätzlich zu KaM auch PAP verwendet. Beim dritten Nachweisversuch (Abb. 10, A3 - B3) wurde die Inkubation mit KaM und PAP zwei Mal hintereinander durchgeführt, um eine stärkere Färbung zu erzielen (im Folgenden genannt 2x PAP). Bei den Gefrierschnitten von Milzgewebe zeigte sich eine markante Färbung bei allen Färbemethoden auf nativem Milzgewebe, wobei auf PFA-fixiertem Milzgewebe keine ausreichende Färbung erzielt werden konnte. Es wurden jeweils 2 native und 2 PFA-fixierte Milzen mit den unterschiedlichen Nachweismethoden untersucht.



**Abbildung 10: Einzelfärbungen von Gefrierschnitten von nativem Milzgewebe und PFA-fixiertem Milzgewebe von gesunden Lewis-Ratten mit mAb OX-1 und verschiedenen Nachweismethoden.** In A1 und B1 wurde als Nachweisreagenz Kam-HRP verwendet, in A2 und B2 wurde KaM und PAP verwendet. In C1 und C2 wurde die Inkubation mit KaM und PAP zwei mal hintereinander durchgeführt. Gezeigt ist jeweils 1 Tier von 2 untersuchten Tieren. Das andere Tier des jeweiligen Tages zeigt ähnliche Ergebnisse. HRP = Meerrettichperoxidase; KaM = polyklonale Kaninchen-anti-Maus-Ig-Antikörper; KaM-HRP = polyklonale Kaninchen-anti-Maus-Ig-Antikörper HRP; PAP = Peroxidase-anti-Peroxidase; PFA = Paraformaldehyd.

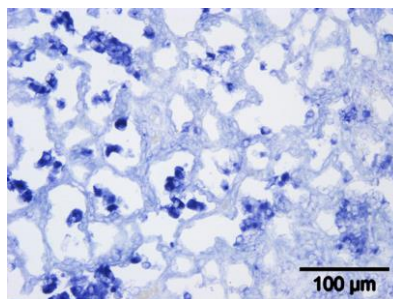
Weitere gegen Leukozyten gerichtete Antikörper (mAb ED3, mAb ED7, mAb ED9) verhielten sich ähnlich wie mAb OX-1 und ließen sich auf PFA-behandeltem



Lungengewebe nicht ausreichend anfärben. Die Färbungen mit diesen Antikörpern wurden auf Paraffinschnitten von PFA-fixiertem Milzgewebe einer Lewis-Ratte getestet. Mit dem mAb ED7 und dem mAb ED9 ließen sich keine ausreichenden Färbungen erzielen. Mit dem mAb ED3 zeigte sich auf dem Milzgewebe zwar eine zufriedenstellende Färbung, diese ließ sich allerdings nicht auf die Lunge übertragen (Ergebnisse nicht gezeigt).

### 3.2.3 Saure Phosphatase

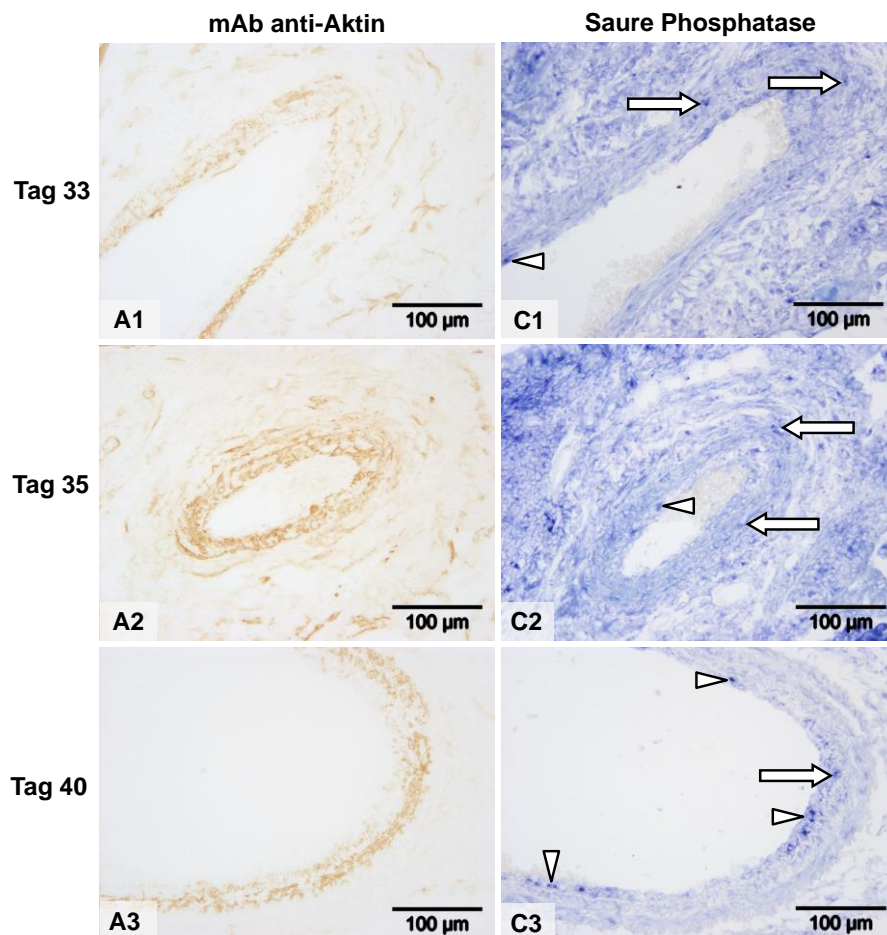
Auf seriell angefertigten Gefrierschnitten wurden in Einzelfärbungen  $\alpha$ -Glattmuskelaktin (mit dem mAb anti-Aktin), ein CD68-artiges Antigen (mit dem mAb ED1) und das Enzym saure Phosphatase nachgewiesen. Es wurden an den Tagen 33, 35 und 40 die allogen transplantierten Lungen von zwei Tieren untersucht. Die Färbung der sauren Phosphatase zeigt eine einheitliche Hintergrundfärbung, sodass die Auswertung eingeschränkt ist. Dennoch erkennt man einen großen Unterschied zwischen stark gefärbten Zellen im Alveolarraum, am ehesten Makrophagen, und der Hintergrundfärbung. Exemplarisch wird in Abb. 11 ein Ausschnitt eines gefärbten Schnittes einer allogen transplantierten Lunge am Tag 35 gezeigt.



**Abbildung 11: Einzelfärbung eines Gefrierschnittes einer allogen transplantierten Lunge am Tag 35 nach Transplantation zum Nachweis der sauren Phosphatase.** Ausschnitt eines gefärbten Schnittes mit Hintergrundfärbung und markanter Färbung der sauren Phosphatase. Gezeigt ist 1 Tier von 2 untersuchten Tieren. Das andere Tier zeigt ähnliche Ergebnisse.

So lässt sich zeigen, dass Zellen, die das Enzym in ausreichender Menge enthalten, mit der markanten Blaufärbung der sauren Phosphatase dargestellt werden können. In den angefertigten Serienschnitten werden Einzelfärbungen mit dem mAb anti-Aktin, dem mAb ED1 und der sauren Phosphatase-Färbung an den Tagen 33, 35 und 40 gezeigt. Die Färbung mit dem mAb anti-Aktin zeigt die glatten Muskelfasern des Gefäßes. Die Färbung mit dem mAb ED1 zeigt die Lage der Makrophagen in der Adventitia und ggf. der Tunica media der Lungengefäße.

Man erkennt zu allen Zeitpunkten ED1-positive Zellen in der Tunica media der gezeigten Blutgefäße. Die Färbung der ED1-positiven Zellen ist auf den Gefrierschnitten allerdings deutlich schwächer ausgeprägt, als auf den Paraffinschnitten, die in Kapitel 3.2.1 beschrieben wurden. Es lassen sich nur sehr vereinzelt Zellen mit einem starken Nachweis des Enzyms saure Phosphatase erfassen. Am Tag 33 (Abb. 12, A1 – C1) und am Tag 35 (Abb. 12, A2 – C2) erkennt man in der Färbung der sauren Phosphatase wenige im Vergleich zur Hintergrundfärbung deutlich angefärbte Zellen in der Tunica media (Pfeile in C1 und C2) und der Tunica intima (Pfeilspitzen in C1 und C2) des Gefäßes. Am Tag 40 (Abb. 12, A3 – C3) erkennt man mehrere Zellen mit einem starken Nachweis des Enzyms saure Phosphatase, diese befinden sich jedoch in der Tunica intima des Blutgefäßes (Pfeilspitzen in C3). In der Tunica media sind im Vergleich zur Hintergrundfärbung nur schwach angefärbte Zellen zu erkennen (Pfeile in C3).

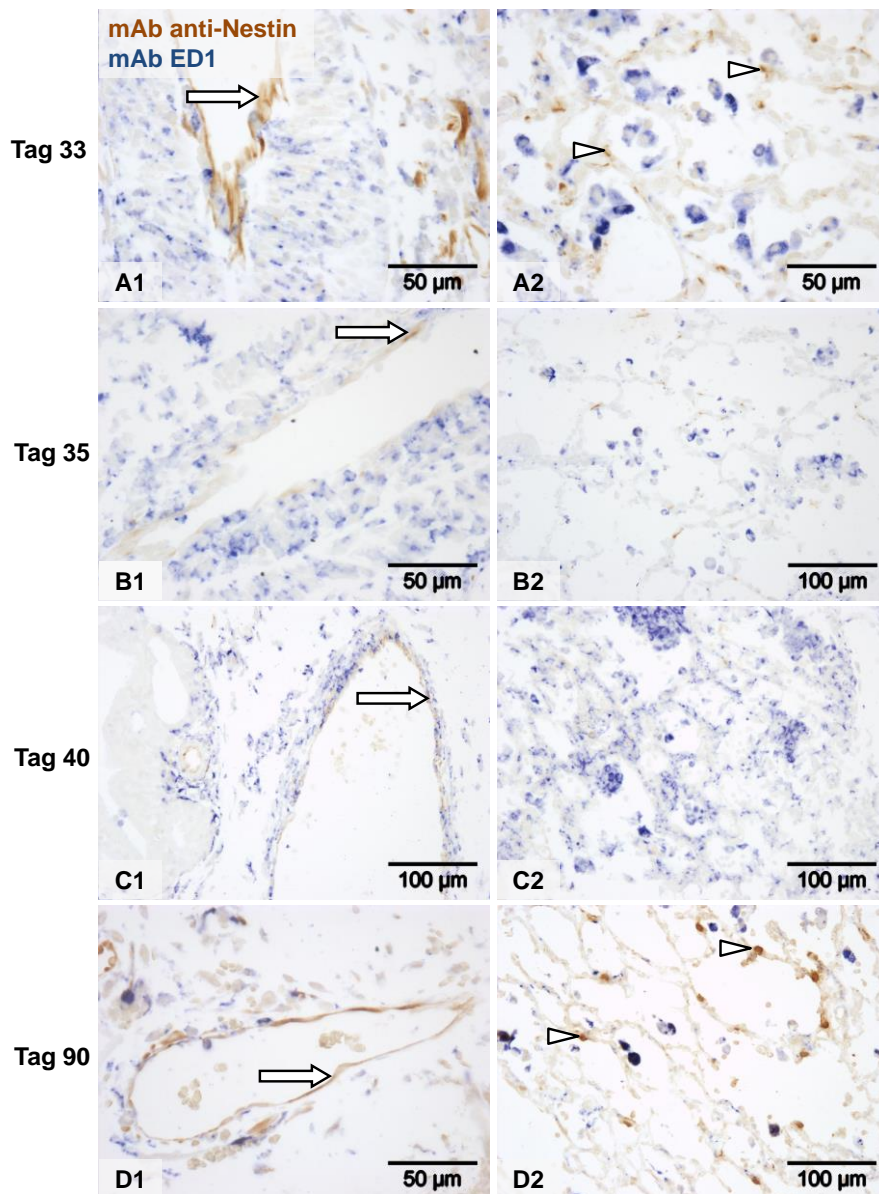


**Abbildung 12: Einzelfärbungen von Gefrierschnitten von allogenen transplantierten Lungen an den Tagen 33, 35 und 40 nach Transplantation mit mAb anti-Aktin (braun) und Nachweis der sauren Phosphatase (blau).** Zu beachten sind in (C1) und (C2) die deutlich angefärbten Zellen in der Tunica media (Pfeile) und der Tunica intima (Pfeilspitzen) der Lungenarterie. Auffällig sind in (C3) die schwach angefärbten Zellen in der Tunica media (Pfeile) und stark angefärbte Zellen in der Tunica intima (Pfeilspitzen) des Gefäßes. Gezeigt ist

jeweils 1 Tier von 2 untersuchten Tieren. Das andere Tier des jeweiligen Tages zeigt ähnliche Ergebnisse. mAb = monoklonaler Antikörper.

### 3.2.4 Nestin und CD68-artiges Antigen

Bei der Doppelfärbung mit dem mAb anti-Nestin und mAb ED1 kann gezeigt werden, dass sich die ED1-positiven Zellen in den allogenen transplantierten Lungen nicht mit dem mAb anti-Nestin anfärben lassen. In den Präparaten lassen sich Endothelzellen nachweisen, die durch den mAb anti-Nestin anfärbbar sind (Nestin-positive Zellen) (Abb. 13, Pfeile in A1, B1, C1 und D1). Außerdem finden sich Nestin-positive Zellen in den Alveolarwänden. Sie entsprechen am ehesten Perizyten (Abb. 13, Pfeilspitzen in A2). Am Tag 90 fallen viele kleine rundliche Nestin-positive Zellen in den Alveolarwänden auf (Abb. 13, Pfeilspitzen in D2). Diese Zellen werden in dieser Arbeit nicht näher untersucht. Es wurden jeweils zwei allogene transplantierte Lungen an den Tagen 33, 35, 40 und 90 nach Transplantation gefärbt.



**Abbildung 13: Doppelfärbung von Paraffinschnitten allogren transplanteder linker Lungen an den Tagen 33, 35, 40 und 90 mit mAb anti-Nestin (braun) und mAb ED1 (blau).** Zu beachten sind die Nestin-positiven Endothelzellen (Pfeile in A1, B1, C1 und D1) sowie die Nestin-positiven Zellen in den Alveolarwänden (Pfeilspitzen in A2 und D2). Gezeigt ist jeweils 1 Tier von 2 untersuchten Tieren. Das andere Tier des jeweiligen Tages zeigt ähnliche Ergebnisse. mAb = monoklonaler Antikörper.

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion technischer Aspekte

#### 4.1.1 Transplantation

Um die Auswirkung technischer Aspekte bei der Transplantation, wie z. B. IRS sowie Schädigungen der Lungen im Rahmen der Operation zu erkennen, werden die transplantierten linken Lungen (sowohl allogenen als auch isogen transplantiert) mit den untransplantierten rechten Empfängerlungen und nativen Lungen von unbehandelten Lewis-Ratten verglichen. Auch allogenen und isogen transplantierte Lungen werden miteinander verglichen. Der Vergleich von untransplantierten rechten Empfängerlungen mit Lungen gesunder unbehandelter Lewis-Ratten zeigt nur milde ausgeprägte Leukozyteninfiltrate in den untransplantierten Empfängerlungen. Diese milden Leukozyteninfiltrate sind am ehesten auf eine systemische Entzündungsreaktion der Empfängertiere zurückzuführen. Auch Beatmungsschäden im Rahmen der Operation sind eine mögliche Erklärung. Rechte untransplantierte Lungen von isogen transplantierten Ratten und unbehandelte Lewis-Lungen unterscheiden sich histologisch kaum. Somit kann davon ausgegangen werden, dass Beatmungsschäden im verwendeten Modell der chronischen Abstoßung keine große Rolle spielen.

Der Vergleich von allogenen transplantierten Lungen mit isogen transplantierten Lungen erlaubt Rückschlüsse zu ziehen, welche Veränderungen der Lungen im Rahmen von Abstoßungsreaktionen nach der Transplantation entstehen. Um akute Abstoßungsepisoden abzuschwächen, werden die Ratten zur Immunsuppression nach Transplantation für 10 Tage mit Ciclosporin behandelt. Am Tag 28 nach Transplantation wird intratracheal eine LPS-Lösung instilliert, welche Entzündungsreaktionen hervorruft, die wiederum die chronische Abstoßung triggern. [6] Auch in isogen transplantierten Lungen ist nach der LPS-Instillation eine Entzündungsreaktion zu beobachten, welche jedoch rasch regredient ist und keine chronischen Schäden nach sich zieht. In allogenen transplantierten Lungen dagegen finden sich im Langzeitverlauf die klassischen Zeichen der chronischen Transplantatabstoßung. Es ist somit davon auszugehen, dass die chronische Abstoßung der Lungentransplantate durch die LPS-Instillation am Tag 28 getriggert wird. Der deutliche Unterschied zwischen allogenen und isogen transplantierten Lungen und der fehlende chronische Schaden in isogenen Transplantaten deutet darauf hin, dass Gewebeschäden im Rahmen des IRS und andere operationsbedingte Traumata

eine eher untergeordnete Rolle spielen und die abgeschwächten akuten Abstoßungsreaktionen zusammen mit dem LPS-Stimulus wesentlich zur chronischen Transplantatschädigung beitragen. [6]

### 4.1.2 Entnahme und Fixierung der Lungen

Um einen Kollaps der Lunge zu verhindern, wird die Lunge vor der Organentnahme im Thorax mit PFA/Sørensenpuffer instilliert und nach der Organentnahme in PFA/Sørensenpuffer überführt. Es folgt der Prozess der Fixierung und Einbettung in Paraffin bzw. der Cryokonservierung wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben. PFA ist eine Substanz, die Gewebe fixiert, aber auch dessen Proteinstrukturen verändern kann. [1, 16] In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die Proteinstruktur in einer Weise verändert werden kann, die bestimmte Epitope für den entsprechenden Antikörper unzugänglich macht. Dieses Phänomen zeigt sich bei dem Versuch, LCA auf Lungengewebe nachzuweisen. Die Ergebnisse zu dieser Versuchsreihe werden in Kapitel 3.3.1 beschrieben und in Kapitel 4.2.3 diskutiert. Bei weiteren Versuchen mit gegen Leukozyten gerichteten Antikörpern (mAb ED3, mAb ED7, mAb ED9) treten ähnliche Probleme wie beim Nachweis des LCA auf.

### 4.1.3 Immunhistochemische und enzymhistochemische Verfahren

Durch immunhistochemische und enzymhistochemische Verfahren sollen die ED1-positiven Zellen in der Tunica media der Lungenarterien näher charakterisiert werden. Es werden immunhistochemische Doppelfärbungen mit dem mAb anti-Aktin und dem mAb ED1 durchgeführt. Der mAb anti-Aktin erkennt  $\alpha$ -Glattmuskelaktin, [77] der mAb ED1 bindet an ein CD68-artiges lysosomales Membranprotein. [24] Außerdem werden immunhistochemische Doppelfärbungen mit dem mAb anti-Nestin und dem mAb ED1 durchgeführt. Der mAb anti-Nestin bindet an das Intermediärfilament Nestin, welches in vielen migrierenden und proliferierenden Zellen und bei pathologischen Prozessen exprimiert wird. [96] Zur weiteren Charakterisierung werden Färbungen mit gegen Makrophagen gerichteten Antikörpern durchgeführt. Hier werden die mAb ED3 (gegen CD169 gerichtet), ED7 (gegen CD11b gerichtet), ED9 (gegen CD172a gerichtet) [25, 27] und OX-1 (gegen LCA gerichtet) [88] verwendet. Des Weiteren wird auf seriell angefertigten Gefrierschnitten  $\alpha$ -Glattmuskelaktin, ein CD68-artiges Antigen und das Enzym saure Phosphatase nachgewiesen.

Bei allen Färbungen (bis auf die Färbung der sauren Phosphatase) werden zur Beurteilbarkeit der Spezifität des Antikörpers Negativkontrollen angefertigt. Die Negativkontrollen durchlaufen alle Schritte des Färbeprozesses wie die zu färbenden Schnitte, werden jedoch nicht mit der Antikörperlösung behandelt, sondern lediglich mit PBS/BSA/Azid ohne Zusatz von Antikörpern. Sie zeigen keine Färbereaktion. Es ist damit gezeigt, dass die Färbung auf der Detektion des Primärantikörpers beruht und nicht durch eine andere Komponente des Nachweissystems verursacht wird. Als Primärantikörper werden mAb aus der Maus verwendet. Das Nachweisreagenz enthält Antikörper, welche mit gewebeeigenem Ratten-Ig kreuzreagieren können. Um eine solche unspezifische Bindung der anti-Maus-Ig an Ratten-Ig zu verhindern, wird sowohl den Primärantikörperlösungen als auch den Sekundärantikörperlösungen NRS zugegeben.

Bei den verwendeten Primärantikörpern handelt es sich um bereits von anderen Arbeitsgruppen gut etablierte und als spezifisch anerkannte Antikörper. [24, 25, 27, 48, 82, 87, 88, 96, 98]

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1 Strukturelle Veränderungen des Lungengewebes

Atanasova et al [6] haben gezeigt, dass sich in den allogenen transplantierten linken Lungen an den Tagen 33, 35 und 40 massive Infiltrate mononukleärer Leukozyten in der Tunica adventitia der Lungenarterien und im peribronchialen Bindegewebe sowie im Alveolarraum finden. In den rechten Lungen der Empfängertiere finden sich an den Tagen 33, 35 und 40 wesentlich weniger Leukozyten. Die Leukozyteninfiltrate in den transplantierten linken Lungen sind auf entzündliche Prozesse im Rahmen der Abstoßungsreaktionen zurückzuführen. Die wesentlich geringer ausgeprägten Leukozyteninfiltrate in den untransplantierten rechten Lungen entstehen am ehesten im Rahmen einer systemischen Entzündungsreaktion der Empfängertiere. An den Tagen 33, 35 und 40 wird außerdem eine Mediahypertrophie der Lungenarterien beobachtet. In den rechten Lungen der Empfängertiere findet sich an den Tagen 33, 35 und 40 keine Mediahypertrophie, sondern eine schlanke und nicht verdickte Gefäßwand der Lungenarterien. An den Tagen 33 und 35 wird ein subendotheliales Infiltrat und am Tag 40 zusätzlich eine Intimahyperplasie sowie perivaskuläre Infiltrate mit beginnender perivaskulärer Fibrose beobachtet [6]. Am Tag 90 sind die

Leukozyteninfiltrate weitestgehend verschwunden, die Tunica media der Lungenarterien ist ausgedünnt. Am Tag 90 ist in den rechten Lungen keine Ausdünnung der Tunica media zu erkennen. [6]

Ein vaskuläres remodeling im Rahmen der chronischen Abstoßung ist bekannt. Saggari et al. beschreiben bei Patienten mit BOS und histopathologisch diagnostizierter BOS schwere Arteriopathien in den transplantierten Lungen, die exzentrische und konzentrische Proliferation und Fibrosierung der Intima, vermehrte Ablagerungen von Extrazellulärmatrix, sowie Glattmuskelzellatrophie in der Tunica media umfassen [76]. Es wird außerdem die Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie (PH) als Folge der Gefäßveränderungen beschrieben [68, 76]. Saggari et al. beschreiben PH als Folge von entzündlichen Lungenerkrankungen und BOS als chronisch entzündliche Lungenerkrankung mit vaskulärem remodeling. Bei Patienten mit BOS fanden sie im Rahmen der vaskulären Veränderungen jedoch eine Atrophie der Glattmuskelzellen in der Tunica media und nicht wie bei anderen Untersuchungen zur PH eine Hypertrophie der Tunica media [76]. Diese Beschreibung passt auch zu den Ergebnissen aus dieser Arbeit. Auch hier findet sich im längeren Zeitverlauf (Tag 90) eine Ausdünnung der Tunica media der Lungenarterien, nachdem zunächst eine Hypertrophie der Tunica media beobachtet wird (Tag 33 - 40).

### **4.2.2 Charakterisierung der ED1-positiven Zellen in der arteriellen Tunica media**

Im Modell der chronischen Lungentransplantatabstoßung werden spindelförmige Zellen in der Tunica media größerer Lungenarterien beobachtet, die morphologisch glatten Muskelzellen ähneln und Antigenstrukturen von Makrophagen aufweisen (ED1-positive Zellen). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen diese ungewöhnlichen Zellen charakterisiert werden. Dazu wurden immunhistochemische Doppelfärbungen mit dem mAb anti-Aktin und dem mAb ED1 durchgeführt. Die zu untersuchenden spindelförmigen Zellen in der Tunica media der Lungenarterien lassen sich an den Tagen 33 – 40 sowohl mit dem mAb anti-Aktin als auch mit dem mAb ED1 anfärben. Sie werden deshalb als doppelt-positive Zellen bezeichnet. Es stellt sich die Frage, ob es sich tatsächlich um doppelt-positive Zellen handelt, oder ob es sich um Anschnitte von Makrophagen und Muskelzellen handelt, die übereinander liegen. Diese Frage lässt sich im Rahmen der reinen Immunhistochemie zwar nicht abschließend klären, jedoch ist ein sehr häufiger Anschnitt von zwei übereinander liegenden Zellen bei einer Schnittdicke von 3 µm und der durchschnittlichen Größe von Makrophagen



(Durchmesser ca. 21  $\mu\text{m}$ ) und Glattmuskelzellen (Länge ca. 15-20  $\mu\text{m}$ , Durchmesser ca. 5-8  $\mu\text{m}$ ) eher unwahrscheinlich. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass es sich tatsächlich um doppelt-positive Zellen handelt. Um abschließend zu beweisen, dass es sich um doppelt-positive Zellen handelt, könnten in zukünftigen Arbeiten konfokale Fluoreszenzmikroskopie und Elektronenmikroskopie eingesetzt werden. In der konfokalen Mikroskopie lassen sich einzelne, sehr dünne optische Schnitte eines histologischen Schnittes abbilden. So können Zellen einer Ebene überlagerungsfrei dargestellt werden. In der Elektronenmikroskopie werden deutlich höhere Vergrößerungen und Auflösungen erreicht als in der Lichtmikroskopie, und einzelne Zellorganellen können beurteilt werden. So könnte bewiesen werden, dass die ED1-Expression in den doppelt-positiven Zellen mit dem Vorhandensein von Lysosomen einhergeht. Die Herkunft der Zellen könnte genauer beurteilt werden, indem die neben den Lysosomen enthaltenen Zellorganellen beurteilt werden.

In dieser Arbeit sollte die Frage geklärt werden, zu welcher Zellreihe die doppelt-positiven Zellen zugeordnet werden können. Eine Hypothese ist, dass die Aktin- und ED1-positiven Zellen von Makrophagen abstammen. Ein denkbarer Mechanismus ist hier die Einwanderung von Makrophagen. Um herauszufinden, ob die ED1-positiven Zellen von Makrophagen abstammen, wurden Färbungen unternommen, die Markerproteine von Makrophagen aber auch generelle Leukozytenmarker nachweisen. Die einzelnen Versuche umfassten den Nachweis von LCA (wird erkannt vom mAb OX-1), das auf der Zelloberfläche von allen Zellen der lymphoiden und der myeloiden Zellreihe, ausgenommen Erythrozyten und Thrombozyten, exprimiert wird. [82, 88, 98] Sie umfassten auch den Nachweis von CD169 (wird erkannt vom mAb ED3), das auf der Zelloberfläche von Makrophagen v. a. in lymphatischen Organen exprimiert wird. Makrophagen in Gewebe außerhalb der lymphatischen Organe exprimieren das Antigen CD169 für gewöhnlich nicht, können es jedoch in speziellen Situationen, z. B. im Rahmen von Autoimmunerkrankungen exprimieren. [25, 27] Weiterhin wurde der Nachweis von CD11b (wird erkannt vom mAb ED7) angestrebt, welches auf Makrophagen, Monozyten, Granulozyten und dendritischen Zellen der Ratte exprimiert wird. [25] Ein weiteres Antigen, das nachgewiesen werden sollte, ist das Antigen CD172a (wird erkannt vom mAb ED9) das v. a. auf Makrophagen, Monozyten, Granulozyten und dendritischen Zellen der Ratte exprimiert wird. [25] All diesen Antikörpern ist gemein, dass sie sich auf in Paraffin eingebettetem Lungengewebe trotz verschiedener Vorbehandlungsmethoden sehr schlecht anfärben lassen. Die durchgeführten Vorbehandlungen der Paraffinschnitte, die den Nachweis der untersuchten Antigene ermöglichen sollten, umfassten Kochen

im Dampfkochtopf, Inkubation in verdünnter Salzsäurelösung und Proteasevorbehandlung. Diese gängigen „Antigendemaskierungsmethoden“ waren jedoch erfolglos. Auch auf Gefrierschnitten lässt sich keine ausreichende Färbung erzielen.

Die Vermutung, dass die Färbungen aufgrund der PFA-Fixierung der Lungen und einer dadurch bedingten Veränderung der Epitope verhindert werden, wird durch die in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Versuche mit dem mAb OX-1 (Nachweis des LCA) auf Milzgewebe gestützt. Milzgewebe eignet sich gut als Kontrollorgan für Leukozytenfärbungen, da die Milz als lymphatisches Organ viele Leukozyten beherbergt. Hier wurden Gefrierschnitte von nativen und PFA-fixierten Milzen von gesunden Lewis-Ratten mit drei verschiedenen Nachweismethoden, welche sich im Nachweisreagenz unterscheiden, gefärbt und miteinander verglichen. Bei der ersten Nachweismethode wurde als Nachweisreagenz KaM-HRP verwendet. Bei der zweiten wurde zusätzlich zu KaM auch PAP verwendet. Beim dritten Nachweisversuch wurde die Inkubation mit KaM und PAP zwei Mal hintereinander durchgeführt, um eine stärkere Färbung zu erzielen (2x PAP). Es zeigten sich bei allen drei Nachweismethoden deutlich angefärbte Schnitte der nativen Milzen. Auf den Schnitten von PFA-fixierten Milzen ließ sich bei allen drei Nachweismethoden keine ausreichende Färbung erzielen. Dies erhärtet den Verdacht, dass die Veränderung der Proteinstrukturen im Rahmen der PFA-Fixierung das Gewebe für die Antikörper unzugänglich macht. [1, 16] Das Problem könnte umgangen werden, indem man für die Fixierung der Lungen die PFA-Lösung durch andere Substanzen ersetzt. Hier kommen z. B. eine PFA-Lösungen mit geringeren Formaldehyd-Konzentrationen oder auch andere Fixiermedien wie z. B. eine Tris-Zink-Fixierung in Frage, was im Rahmen anderer Studien bereits erfolgreich eingesetzt wurde. [1]

Der mAb ED1 bindet an ein CD68-artiges lysosomales Membranprotein, welches in der Ratte von den meisten Makrophagensubpopulationen exprimiert wird. [27] Ein Leitenzym der Lysosomen, welche sich in großer Anzahl in Makrophagen finden, ist die saure Phosphatase. [44] Sowohl die Färbung mit dem mAb ED1 als auch der enzymhistochemische Nachweis der sauren Phosphatase sind spezifisch für Lysosomen. Die ED1-positiven Zellen in der Tunica media müssten also auch bei der Färbung der sauren Phosphatase angefärbt werden. Um das zu zeigen, wurden auf seriell angefertigten Gefrierschnitten in Einzelfärbungen  $\alpha$ -Glattmuskelaktin (mit dem mAb anti-Aktin), ein CD68-artiges Antigen (mit dem mAb ED1) und das Enzym saure Phosphatase nachgewiesen. In Kapitel 3.3.3 wird gezeigt, dass sich nur wenige der

ED1-positiven Zellen in der Tunica media der Lungenarterien mit saurer Phosphatase nachweisen lassen. Durch die einheitliche Hintergrundfärbung auf den Schnitten ist die Auswertung eingeschränkt. Dennoch erkennt man einen großen Unterschied zwischen stark gefärbten Zellen im Alveolarraum und der Hintergrundfärbung. Dass nicht alle ED1-positiven Zellen durch die Färbung der sauren Phosphatase dargestellt werden, lässt die Frage aufkommen, ob die Färbung der sauren Phosphatase nicht einwandfrei funktioniert hat. Diese Überlegung steht jedoch im Widerspruch zu den reichlich angefärbten Zellen im Alveolarraum, die aufgrund ihrer Morphologie vermutlich den Alveolarmakrophagen zuzuordnen sind.

Die Aktin- und ED1-positiven Zellen zeigen durch die Expression von  $\alpha$ -Glattmuskelaktin Merkmale von Glattmuskelzellen und durch das Vorhandensein von Lysosomen Merkmale von Makrophagen. Neben der Überlegung, dass es sich dabei um in die Tunica media eingewanderte Makrophagen handeln könnte, ist auch vorstellbar, dass sich unter pathologischen Bedingungen der Phänotyp der Glattmuskelzellen ändert. Im Zusammenhang der Arteriosklerose beim Menschen wurden Glattmuskelzellen beschrieben, die Lysosomen enthielten und zur Phagozytose fähig waren. [4] Andreeva et al. beschreiben, dass die Aktin- und ED1-positiven Zellen vor allem in den Arealen mit Fetteinlagerungen in der Intima der Aorta vorkommen und sich ihre Zahl durch Faktoren, die die Phagozytose stimulieren, erhöht. Im Falle der Arteriosklerose ist ein stimulierender Faktor die Akkumulation von Lipiden. [4] Andreeva et al. beschreiben in ihrer Arbeit auch, dass verschiedene andere Zellen, z. B. Perizyten und Fibroblasten das CD68-artige Antigen exprimieren. Sie definieren die Expression des Antigens weniger als das Vorhandensein von Makrophagen, sondern vielmehr als eine zelluläre Aktivität durch Phagozytose. [4] Ebenfalls im Rahmen der Arteriosklerose beschreiben Koga und Aikawa eine Interaktion zwischen Makrophagen und Glattmuskelzellen, die das Wachstum und die Proliferation von Glattmuskelzellen beschleunigt. Sie beschreiben auch eine mögliche dynamische Umwandlung von Makrophagen in Glattmuskelzellen und umgekehrt. [50] Diese Vermutung wird durch Arbeiten von Rong et al. und Sugiyama et al. gestützt, die eine Differenzierung von Glattmuskelzellen zu makrophagenähnlichen Zellen [75] bzw. eine Differenzierung von mononukleären Zellen in  $\alpha$ -Glattmuskelaktin-exprimierende Zellen beschreiben. [86]

Außerdem sollte die Hypothese überprüft werden, dass es sich um Zellen mit der Fähigkeit zur Proliferation und Migration handelt. Zellen mit diesen Eigenschaften werden bei Regenerationsprozessen aber auch bei pathologischen Prozessen, z. B.

Entzündungen und Ischämien erwartet. Diese sind Situationen in denen typischerweise Nestin exprimiert wird. [96] Auch Myofibroblasten exprimieren Nestin. [48] Sie spielen eine Rolle bei der Wundheilung und Narbenbildung [100] und können aus verschiedenen Zellen entstehen, z. B. durch Differenzierung aus mesenchymalen Progenitorzellen und aus Fibroblasten, sie können sich aber auch aus glatten Muskelzellen, Epithel- und Endothelzellen, sowie aus Perizyten entwickeln. [100] Es liegt nicht fern, dass im Rahmen der entzündlichen Prozesse bei der chronischen Transplantatabstoßung Myofibroblasten in den Gefäßwänden ihr regeneratives Potential nutzen. In immunhistochemischen Doppelfärbungen mit dem mAb anti-Nestin und dem mAb ED1 sollte deshalb untersucht werden, ob die Aktin- und ED1-positiven Zellen auch Nestin exprimieren. In dieser Arbeit konnten keine Nestin-positiven Zellen in der Tunica media nachgewiesen werden, die Aktin- und ED1-positiven Zellen sind also nicht Nestin-positiv. Diese Erkenntnis, könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass die Aktin- und ED1-positiven Zellen von Makrophagen abstammen.

Es könnten weitere Versuche mit Antikörpern folgen, die einen Hinweis darauf geben könnten, ob Differenzierungsprozesse ausgehend von Progenitorzellen stattfinden. Hier könnte beispielsweise ein Antikörper gegen stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) zum Einsatz kommen. SDF-1 steuert die Rekrutierung und Mobilisierung von Progenitorzellen und spielt eine wichtige Rolle bei der Organogenese, aber auch bei Regenerations- und Wundheilungsprozessen. SDF-1 wird auch unter hypoxischen und ischämischen Bedingungen vermehrt exprimiert. [95]

### **4.3 Schlussfolgerungen und Ausblick**

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die ED1-positiven Zellen in der Tunica media der Lungenarterien auch Aktin-positiv sind (doppelt-positive Zellen), also Merkmale von Makrophagen und Glattmuskelzellen aufweisen. Weiterhin kann gezeigt werden, dass diese Zellen nicht Nestin-positiv sind. Es konnte jedoch nicht eindeutig gezeigt werden, dass die Zellen spezifische Makrophagenmarker exprimieren. Die doppelt-positiven Zellen konnten deshalb nicht eindeutig einer Zelllinie zugeordnet werden.

Möglicherweise sind die doppelt-positiven Zellen in der Tunica media der Lungenarterien an entzündlichen und regenerativen Prozessen in den Lungenarterien beteiligt, die zu einem remodeling der Lungenarterien und in der Folge zu BOS führen und somit auch die Entstehung von PH begünstigen können. [68, 76] Da diese Zellen

an der Entwicklung von BOS beteiligt sein können, sind sie auch im Hinblick auf die humane Lungentransplantation interessant. Da BOS als Form der chronischen Abstoßung von Lungentransplantaten allgemein als limitierender Faktor der Lungentransplantation bekannt ist und ein großes Problem im Langzeitüberleben nach Lungentransplantationen darstellt, ist es von großem Interesse, die Mechanismen zu verstehen, die zu BOS führen. In dieser Arbeit werden Hinweise darauf gefunden, dass die untersuchten Zellen von Makrophagen abstammen oder Glattmuskelzellen darstellen, die Lysosomen enthalten. Diese Hinweise könnten eine Grundlage für weitere, umfassendere Untersuchungen bieten. Es sollten sich Versuche mit gegen Makrophagenmarker gerichteten Antikörpern anschließen, um dem Verdacht, dass die doppelt-positiven Zellen von Makrophagen abstammen, weiter nachzugehen. Hier wäre denkbar, alternative Fixiermedien zu verwenden, um die durch die PFA-Lösung hervorgerufenen Veränderungen in der Proteinstruktur zu vermeiden. So könnten Färbungen mit den in dieser Arbeit verwendeten Antikörpern, die Makrophagen erkennen, ermöglicht werden, und es könnte die Frage geklärt werden, ob die Aktin- und ED1-positiven Zellen aus der myeloiden Zellreihe stammen. Um den Verdacht zu untermauern, dass es sich möglicherweise um Zellen mit der Fähigkeit zu proliferieren handelt, könnten neben dem in dieser Arbeit verwendeten mAb anti-Nestin weitere Untersuchungen mit gegen Progenitorzellen gerichteten Antikörpern durchgeführt werden, bzw. die Proliferation direkt nachgewiesen werden.

Da es sich in dieser Arbeit um eine Pilotstudie mit sehr geringen n-Zahlen handelt, sind die Ergebnisse mit Vorsicht zu beurteilen. Es sollten weitere Untersuchungen folgen, die eine größere Anzahl an Tieren zu jedem Zeitpunkt nach Transplantation untersuchen, um die Ergebnisse objektiver beurteilen zu können.

Die zu Anfang der Arbeit gestellten Fragen nach der Herkunft der ED1-positiven Zellen in der Tunica media der Lungenarterien und ihrer Zuordnung zu einer bestimmten Zelllinie lassen sich leider nicht abschließend beantworten. Hierzu sind weitere umfangreiche Untersuchungen nötig. Dennoch kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die zu untersuchenden ED1-positiven Zellen auch Aktin-positiv sind, also charakteristische Merkmale sowohl von Makrophagen als auch von Glattmuskelzellen aufzeigen. Dies ist eine sehr interessante Erkenntnis. Vor allem der Verdacht, dass es sich um Glattmuskelzellen handeln könnte, die Lysosomen enthalten und Phagozytose betreiben, wie sie auch im Rahmen der Arteriosklerose beim Menschen beschrieben wurde [4] ist ein sehr interessanter Ansatz, der eine vielversprechende Grundlage für weitere Forschung auf dem Gebiet der chronischen Abstoßung von Lungen-

transplantaten und BOS bietet. Da das von Grau et al. etablierte Modell der chronischen Lungentransplantatabstoßung neben den häufigsten Risikofaktoren für BOS auch die Histopathologie der humanen BO mit Obliterierung der Atemwege, Transplantatfibrose und Gefäßveränderungen widerspiegelt, [6] eignet es sich gut, um Rückschlüsse auf die Pathogenese der BO beim Menschen zu ziehen, und es sollte für weitere Untersuchungen auf dem Gebiet der chronischen Lungentransplantatabstoßung genutzt werden. Die vorliegende Arbeit kann als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen zu Gefäßveränderungen bei der chronischen Abstoßung von Lungentransplantaten dienen, und somit helfen, die Pathogenese der BO zu verstehen.

## 5 Zusammenfassung

Bronchiolitis obliterans Syndrom (BOS) ist die wesentliche Ursache für das Versagen von Lungentransplantaten im Langzeitverlauf und geht mit einem fibrotischen Umbau von Atemwegen und Blutgefäßen des Transplantats einher. In der vorliegenden Arbeit sollen Zellen charakterisiert werden, die während der Pathogenese von BOS in der arteriellen Tunica media von allogenen transplantierten Lungen auftreten. Sie ähneln morphologisch Glattmuskelzellen und weisen Antigenstrukturen von Makrophagen auf.

Es wurden experimentelle Lungentransplantationen an Ratten durchgeführt. Allogene transplantierte Lungen (Fischer-344 → Lewis) wurden mit isogen transplantierten Lungen (Lewis → Lewis) und mit nativen Lewis-Lungen verglichen. Nach Transplantation erhielten die Ratten 10 Tage lang Ciclosporin zur Immunsuppression. Am Tag 28 nach der Operation wurde eine Lipopolysaccharidlösung intratracheal instilliert, die Entzündungsreaktionen hervorrufen und die chronische Abstoßung induzieren soll. Die transplantierten Lungen wurden an den Tagen 33, 35, 40 und 90 nach Transplantation entnommen und immunhistochemischen Färbungen unterzogen. Es wurden Doppelfärbungen zum Nachweis von  $\alpha$ -Glattmuskelaktin und einem CD68-artigen Antigen angefertigt, durch die gezeigt werden konnte, dass die zu untersuchenden Zellen Merkmale von Glattmuskelzellen und von Makrophagen besitzen. Färbungen mit weiteren gegen Leukozytenmarker gerichteten Antikörpern ließen sich nicht realisieren, da die Proteinstruktur der Antigene durch die Fixierung des Lungengewebes stark verändert ist. Es konnten jedoch bei Färbungen zum Nachweis von  $\alpha$ -Glattmuskelaktin, einem CD68-artigen Antigen und saurer Phosphatase, dem Leitenzym der Lysosomen, in einigen Zellen der Tunica media alle drei Proteine nachgewiesen werden. Bei Färbungen zum Nachweis von Nestin und einem CD68-artigen Antigen konnte gezeigt werden, dass die Zellen das Intermediärfilament Nestin nicht exprimieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Zellen, die Antigenstrukturen von Glattmuskelzellen und Makrophagen aufweisen, im Rahmen des BOS in der arteriellen Tunica media von allogenen Lungentransplantaten nachweisbar sind, während sie in isogenen Transplantaten und nativen Lungen fehlen. Es bleibt unklar, ob diese Zellen von Glattmuskelzellen oder von Leukozyten abstammen. Diese Arbeit bietet jedoch einen Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen, welche die Herkunft der beschriebenen Zellen und ihre Rolle bei der Pathogenese von BOS genauer beschreiben könnten.

## 6 Summary

Bronchiolitis obliterans syndrome is a leading cause for pulmonary allograft failure in the long-run. This devastating disease is characterized by fibrotic remodeling of airways and blood vessels. The purpose of this study is to characterize cells resembling smooth muscle cells, which are present in the arterial Tunica media of experimental pulmonary allografts during the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome. These cells unexpectedly express a lysosomal membrane CD68-like antigen characteristic for monocytes/macrophages. The purpose of this study is to characterize this peculiar cell type.

Experimental pulmonary transplantation was performed in isogeneic (Lewis → Lewis) and allogeneic (Fischer-344 → Lewis) rat strain combinations. The immunosuppressant ciclosporin was applied for 10 days post-transplantation. On day 28 after surgery, lipopolysaccharide was instilled intratracheally to provoke inflammation and to induce the development of bronchiolitis obliterans syndrome. Grafts were harvested and fixed on days 33, 35, 40, and 90 for immunohistochemistry. Allografts were compared to isografts as well as to native lungs of healthy Lewis rats.

Tissue sections were stained with antibodies to smooth muscle actin and to a CD68-like lysosomal membrane antigen typical for macrophages. These experiments revealed that numerous cells residing in the arterial Tunica media of pulmonary allografts were double-positive. These cells were absent from isografts and native lungs. Several attempts to further characterize the cell lineage of these cells failed due to the modification of protein structures after paraformaldehyde-fixation of the lungs. It was, however, possible to demonstrate that at least a subpopulation of the double-positive cells co-expressed acidic phosphatase, an enzyme typically located in lysosomes. Furthermore, double-staining with antibodies to the CD68-like antigen and to nestin revealed that they do not express this intermediate filament protein.

In conclusion, cells resembling smooth muscles cells, which express lysosomal proteins, are present in the arterial Tunica media of pulmonary allografts during the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome. It is still unknown if these cells derive from leukocytes or from smooth muscle cells. More studies are needed to elucidate the origin of this cell type and to define their role in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome.



## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACR	akute zelluläre Abstoßung
APAAP	alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase
ARDS	akutes Atemnotsyndrom
Aqua dest.	Aqua destillata
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BO	Bronchiolitis obliterans
BOS	Bronchiolitis obliterans Syndrom
BSA	bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
CF	Cystische Fibrose
cm H <sub>2</sub> O	Zentimeter Wassersäule
CMV	Cytomegalievirus
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DAB	3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DC	dendritische Zelle
ECMO	extrakorporale Membranoxygenierung
ET-1	Endothelin-1
FEF <sub>25-75</sub>	forced expiratory flow
FEV <sub>1</sub>	Einsekundenkapazität
GERD	gastroösophageale Refluxkrankheit
HCl	Salzsäure

HLA	humanes Leukozytenantigen
HRP	Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IL	Interleukin
i. p.	intraperitoneal
IPAH	idiopathische pulmonalerterielle Hypertonie
IPF	idiopathische Lungenfibrose
IRS	Ischämie-Reperfusionsschaden
ISHLT	International Society for Heart and Lung Transplantation
KaM	polyklonale Kaninchen-anti-Maus-Ig-Antikörper
KaM-HRP	polyklonale Kaninchen-anti-Maus-Ig-Antikörper HRP
KG	Körpergewicht
LB	lymphozytäre Bronchitis/Bronchiolitis
LCA	leukocyte common antigen
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	monoklonaler Antikörper
NIH	National Institute of Health
NRS	Normalrattenserum
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase
PBS	phosphate buffered saline
PBS/BSA/Azid	PBS mit Zusatz von BSA und Natriumazid
PDGF	platelet-derived growth factor
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck

PFA	Paraformaldehyd
PGD	primäres Transplantatversagen
PH	pulmonale Hypertonie
RT	Raumtemperatur
s. c.	subkutan
SDF-1	stromal cell-derived factor 1
TBS	tris buffered saline
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$
UNOS	United Network for Organ Sharing
ü. N.	über Nacht
ZNS	zentrales Nervensystem

### Einheiten

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
d	Tag
g	Gramm
h	Stunden
l	Liter
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter

sec	Sekunden
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

## 8 Abbildungen und Tabellen

### 8.1 Abbildungen

Abbildung 1: Hämalau- und Eosin-Färbungen von Paraffinschnitten transplantiert und nativer Lungen.....	36
Abbildung 2: Doppelfärbung von Paraffinschnitten einer allogenen transplantierten linken Lunge am Tag 33 mit mAb anti-Aktin (braun) und mAb ED1 (blau). ....	37
Abbildung 3: Doppelfärbung von Paraffinschnitten einer allogenen transplantierten linken Lunge am Tag 33 mit mAb anti-Aktin (braun) und mAb ED1 (blau). ....	38
Abbildung 4: Doppelfärbung von Paraffinschnitten einer allogenen transplantierten linken Lunge am Tag 35 mit mAb anti-Aktin (braun) und mAb ED1 (blau). ....	38
Abbildung 5: Doppelfärbung von Paraffinschnitten einer allogenen transplantierten linken Lunge am Tag 40 mit mAb anti-Aktin (braun) und mAb ED1 (blau). ....	39
Abbildung 6: Doppelfärbung von Paraffinschnitten einer allogenen transplantierten linken Lunge am Tag 90 mit mAb anti-Aktin (braun) und mAb ED1 (blau). ....	39
Abbildung 7: Doppelfärbungen von Paraffinschnitten isogen transplantiert linker Lungen am Tag 33 (A), Tag 40 (B) und Tag 90 (C) mit mAb anti-Aktin (braun) und mAb ED1 (blau).....	40
Abbildung 8: Doppelfärbungen von Paraffinschnitten untransplantiert rechter Empfängerlungen an den Tagen 33, 35 und 40 nach Transplantation mit mAb anti- Aktin (braun) und mAb ED1 (blau).....	41
Abbildung 9: Einzelfärbungen von Paraffinschnitten nativer Lungen von Lewis-Ratten mit mAb anti-Aktin (braun) und mAb ED1 (blau). ....	42
Abbildung 10: Einzelfärbungen von Gefrierschnitten von nativem Milzgewebe und PFA- fixiertem Milzgewebe von gesunden Lewis-Ratten mit mAb OX-1 und verschiedenen Nachweismethoden.....	43
Abbildung 11: Einzelfärbung eines Gefrierschnittes einer allogenen transplantierten Lunge am Tag 35 nach Transplantation zum Nachweis der sauren Phosphatase. ....	44
Abbildung 12: Einzelfärbungen von Gefrierschnitten von allogenen transplantierten Lungen an den Tagen 33, 35 und 40 nach Transplantation mit mAb anti-Aktin (braun) und Nachweis der sauren Phosphatase (blau). ....	45
Abbildung 13: Doppelfärbung von Paraffinschnitten allogenen transplantiert linker Lungen an den Tagen 33, 35, 40 und 90 mit mAb anti-Nestin (braun) und mAb ED1 (blau).....	47

## 8.2 Tabellen

Tabelle 1: Häufige Indikationen für Lungentransplantationen (Zeitraum Januar 1995 bis Juni 2010) [21] .....	1
Tabelle 2: Häufige Todesursachen bei Transplantatempfängern (Zeitraum Januar 1992 bis Juni 2010) [21] .....	3
Tabelle 3: BOS Klassifikation [10, 14, 28, 49] .....	8
Tabelle 4: Puffer und Lösungen .....	22
Tabelle 5: Entwässerung der Gewebestücke .....	24
Tabelle 6: Einbettung der Gewebestücke in Paraffin .....	25
Tabelle 7: Silanisierung der Objektträger .....	26
Tabelle 8: Gelatinebeschichtung der Objektträger .....	26
Tabelle 9: Entparaffinierung der Schnitte .....	27
Tabelle 10: Immunhistochemische Doppelfärbungen der Paraffinschnitte mit mAb anti-Aktin und mAb ED1 sowie mAb anti-Nestin und mAb ED1 .....	30
Tabelle 11: Immunhistochemische Färbung der Gefrierschnitte mit mAb anti-Aktin und mAb ED1 .....	31
Tabelle 12: Immunhistochemische Einzelfärbung der Gefrierschnitte von nativer und PFA-fixierter Milz .....	33
Tabelle 13: Hämalaun und Eosin-Färbung .....	33
Tabelle 14: Kerngegenfärbung .....	34
Tabelle 15: Entwässerung der Gefrierschnitte .....	34

## 9 Literatur

- [1] Accart N, Sergi F, and Rooke R. 2014. Revisiting fixation and embedding techniques for optimal detection of dendritic cell subsets in tissues. *J Histochem Cytochem.* 62, 661–671.
- [2] Akalin E and Watschinger B. 2007. Antibody-mediated rejection. *Semin Nephrol.* 27, 393–407.
- [3] Al-Mehdi AB, Shuman H, and Fisher AB. 1997. Intracellular generation of reactive oxygen species during nonhypoxic lung ischemia. *Am J Physiol.* 272, 294–300.
- [4] Andreeva ER, Pugach IM, and Orekhov AN. 1997. Subendothelial smooth muscle cells of human aorta express macrophage antigen in situ and in vitro. *Atherosclerosis.* 135, 19–27.
- [5] Aris RM, Routh JC, LiPuma JJ, Heath DG, and Gilligan PH. 2001. Lung transplantation for cystic fibrosis patients with Burkholderia cepacia complex. Survival linked to genomovar type. *Am J Respir Crit Care Med.* 164, 2102–2106.
- [6] Atanasova S, Hirschburger M, Jonigk D, Obert M, Petri K, Evers A, Hecker A, Schmitz J, Kaufmann A, Wilhelm J, Chakraborty T, Warnecke G, Gottlieb J, Padberg W, and Grau V. 2013. A relevant experimental model for human bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant.* 32, 1131–1139.
- [7] Baker RJ, Hernandez-Fuentes MP, Brookes PA, Chaudhry AN, Cook HT, and Lechler RI. 2001. Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy. *J Immunol.* 167, 7199–7206.
- [8] Banner NR, Rose ML, Cummins D, de Silva M, Pottle A, Lyster H, Doyle P, Carby M, and Khaghani A. 2004. Management of an ABO-incompatible lung transplant. *Am J Transplant.* 4, 1192–1196.
- [9] Barnes PJ. 2004. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *COPD.* 1, 59–70.
- [10] Belperio JA, Weigt SS, Fishbein MC, and Lynch JP. 2009. Chronic lung allograft rejection: mechanisms and therapy. *Proc Am Thorac Soc.* 6, 108–121.
- [11] Benichou G, Valujskikh A, and Heeger PS. 1999. Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice. *J Immunol.* 162, 352–358.
- [12] Bittner HB, Richter M, Kuntze T, Rahmel A, Dahlberg P, Hertz M, and Mohr FW. 2006. Aprotinin decreases reperfusion injury and allograft dysfunction in clinical lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg.* 29, 210–215.

- [13] Blöcher S, Wilker S, Sucke J, Pfeil U, Dietrich H, Weimer R, Steger K, Kaufmann A, Hirschburger M, Plötz C, Padberg W, and Grau V. 2007. Acute rejection of experimental lung allografts: characterization of intravascular mononuclear leukocytes. *Clin Immunol.* 124, 98–108.
- [14] Boehler A and Estenne M. 2003. Post-transplant bronchiolitis obliterans. *Eur Respir J.* 22, 1007–1018.
- [15] Bogdan C, Röllinghoff M, and Diefenbach A. 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol.* 12, 64–76.
- [16] Bogen SA, Vani K, and Sompuram SR. 2009. Molecular mechanisms of antigen retrieval: antigen retrieval reverses steric interference caused by formalin-induced cross-links. *Biotech Histochem.* 84, 207–215.
- [17] Bröcker V, Pfaffenbach A, Habicht A, Chatzikyrkou C, Kreipe HH, Haller H, Scheffner I, Gwinner W, Zilian E, Immenschuh S, Schwarz A, Horn PA, Heinemann FM, and Becker JU. 2013. Beyond C4d: the ultrastructural appearances of endothelium in ABO-incompatible renal allografts. *Nephrol Dial Transplant.* 28, 3101–3109.
- [18] Chaparro C, Maurer J, Gutierrez C, Kraiden M, Chan C, Winton SK, Scavuzzo M, Tullis E, Hutcheon M, and Kesten S. 2001. Infection with *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: outcome following lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 163, 43–48.
- [19] Christie JD, Bavaria JE, Palevsky HL, Litzky L, Blumenthal NP, Kaiser LR, and Kotloff RM. 1998. Primary graft failure following lung transplantation. *Chest.* 114, 51–60.
- [20] Christie JD, Bellamy S, Ware LB, Lederer D, Hadjiliadis D, Lee J, Robinson N, Localio AR, Wille K, Lama V, Palmer S, Orens J, Weinacker A, Crespo M, Demissie E, Kimmel SE, and Kawut SM. 2010. Construct validity of the definition of primary graft dysfunction after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 29, 1231–1239.
- [21] Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Stehlik J, and Hertz MI. 2011. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-eighth adult lung and heart-lung transplant report - 2011. *J Heart Lung Transplant.* 30, 1104–1122.
- [22] Christie JD, Kotloff RM, Ahya VN, Tino G, Pochettino A, Gaughan C, Demissie E, and Kimmel SE. 2005. The effect of primary graft dysfunction on survival after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 171, 1312–1316.



- [23] Colvin RB and Smith RN. 2005. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol.* 5, 807–817.
- [24] Damoiseaux JG, Döpp EA, Calame W, Chao D, MacPherson GG, and Dijkstra CD. 1994. Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. *Immunology.* 83, 140–147.
- [25] Damoiseaux JG, Döpp EA, Neefjes JJ, Beelen RH, and Dijkstra CD. 1989. Heterogeneity of macrophages in the rat evidenced by variability in determinants: two new anti-rat macrophage antibodies against a heterodimer of 160 and 95 kd (CD11/CD18). *J Leukoc Biol.* 46, 556–564.
- [26] de Perrot M, Liu M, Waddell TK, and Keshavjee S. 2003. Ischemia–Reperfusion–induced Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 167, 490–511.
- [27] Dijkstra CD, Döpp EA, Joling P, and Kraal G. 1985. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology.* 54, 589–599.
- [28] Estenne M and Hertz MI. 2002. Bronchiolitis obliterans after human lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 166, 440–444.
- [29] Estenne M, Maurer JR, Boehler A, Egan JJ, Frost A, Hertz M, Mallory GB, Snell GI, and Yousem S. 2002. Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. *J Heart Lung Transplant.* 21, 297–310.
- [30] Fathi M, Johansson A, Lundborg M, Orre L, Sköld CM, and Camner P. 2001. Functional and morphological differences between human alveolar and interstitial Macrophages. *Exp Mol Pathol.* 70, 77–82.
- [31] Fischer S, Cassivi SD, Am Xavier, Cardella JA, Cutz E, Edwards V, Liu M, and Keshavjee S. 2000. Cell death in human lung transplantation: cell death in human lung transplantation: apoptosis induction in human lungs during ischemia and after transplantation. *Ann Surg.* 231, 424–431.
- [32] Fiser SM, Tribble CG, Long SM, Kaza AK, Cope JT, Laubach VE, Kern JA, and Kron IL. 2001. Lung transplant reperfusion injury involves pulmonary macrophages and circulating leukocytes in a biphasic response. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 121, 1069–1075.
- [33] Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Ande SR, Jangamreddy JR, Mehrpour M, Christofferson J, Chaabane W, Moghadam AR, Kashani HH, Hashemi M, Owji AA, and Łos MJ. 2014. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol.*, 112, 24–49.

- [34] Glanville AR. 2010. Antibody-mediated rejection in lung transplantation: Myth or reality? *J Heart Lung Transplant.* 29, 395–400.
- [35] Glanville AR, Aboyou CL, Havryk A, Plit M, Rainer S, and Malouf MA. 2008. Severity of Lymphocytic Bronchiolitis Predicts Long-Term Outcome after Lung Transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 177, 1033–1040.
- [36] Gordon S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 3, 23–35.
- [37] Gordon S and Taylor PR. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 5, 953–964.
- [38] Grau V, Stehling O, Garn H, and Steiniger B. 2001. Accumulating monocytes in the vasculature of rat renal allografts: phenotype, cytokine, inducible nitric oxide synthase, and tissue factor mRNA expression. *Transplantation.* 71, 37–46.
- [39] Hachem R. 2012. Antibody-mediated lung transplant rejection. *Curr Respir Care Rep.* 1, 157–161.
- [40] Hadjiliadis D, Steele MP, Chaparro C, Singer LG, Waddell TK, Hutcheon MA, Davis RD, Tullis DE, Palmer SM, and Keshavjee S. 2007. Survival of lung transplant patients with cystic fibrosis harboring panresistant bacteria other than *Burkholderia cepacia*, compared with patients harboring sensitive bacteria. *J Heart Lung Transplant.* 26, 834–838.
- [41] Hayes D Jr, DiPaola N, Baker PB, Kirkby S, Phillips AB, and Nicol KK. 2012. Antibody-mediated rejection in a lung transplant recipient after acute stroke. *Transpl Immunol.* 27, 171–174.
- [42] Heeger PS. 2003. T-Cell allorecognition and transplant rejection: a summary and update. *Am J Transplant.* 3, 525–533.
- [43] Hume DA. 2006. The mononuclear phagocyte system. *Curr Opin Immunol.* 18, 49–53.
- [44] Janeway CA, Travers P, Walport M, and Schlomchik MJ, Eds. 2001. *Immunobiology: the immune system in health and disease.* Garland Science.
- [45] Joosten SA, Sijpkens YW, van Kooten C, and Paul LC. 2005. Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations. *Kidney Int.* 68, 1–13.
- [46] Khan SU, Salloum J, O'Donovan PB, Mascha EJ, Mehta AC, Matthay MA, and Arroliga AC. 1999. Acute pulmonary edema after lung transplantation: the pulmonary reimplantation response. *Chest.* 116, 187–194.
- [47] King RC, Binns OA, Rodriguez F, Kanithanon RC, D. T. M., Spotnitz WD, Tribble CG, and Kron IL. 2000. Reperfusion injury significantly impacts clinical outcome after pulmonary transplantation. *Ann Thorac Surg.* 69, 1681–1685.

- [48] Kishaba Y, Matsubara D, and Niki T. 2010. Heterogeneous expression of nestin in myofibroblasts of various human tissues. *Pathol Int.* 60, 378–385.
- [49] Knoop C and Estenne M. 2006. Acute and chronic rejection after lung transplantation. *Semin Respir Crit Care Med.* 27, 521–533.
- [50] Koga J and Aikawa M. 2012. Crosstalk between macrophages and smooth muscle cells in atherosclerotic vascular diseases. *Vascul Pharmacol.* 57, 24–28.
- [51] Kotloff RM and Thabut G. 2011. Lung Transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 184, 159–171.
- [52] Krueger T, Berutto C, and Aubert JD. 2011. Challenges in lung transplantation. *Swiss Med Wkly.* 141, w13292.
- [53] Kühnel W, Ed. 2002. *Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie.* Thieme.
- [54] Lambeck A, Verschuuren EA, Bouwman I, Jongsma T, Roozendaal C, Bungener LB, van den Bij W, van den Berg AP, Erasmus ME, Timens W, Lems SP, and Hepkema BG. 2012. Successful lung transplantation in the presence of pre-existing donor-specific cytotoxic HLA Class II antibodies. *J Heart Lung Transplant.* 31, 1301–1306.
- [55] Lee JC and Christie JD. 2009. Primary graft dysfunction. *Proc Am Thorac Soc.* 6, 39–46.
- [56] Leonard CT, Soccia PM, Singer L, Berry GJ, Theodore J, Holt PG, Doyle RL, and Rosen GD. 2000. Dendritic cells and macrophages in lung allografts: a role in chronic rejection? *Am J Respir Crit Care Med.* 161, 1349–1354.
- [57] Luxembourg B, Krause M, and Lindhoff-Last E. 2007. Basiswissen Gerinnungslabor. *Deutsches Ärzteblatt* 104, 1489–1498.
- [58] Mahidhara R, Bastani S, Ross DJ, Saggari R, Lynch J 3rd, Schnickel GT, Gjertson D, Beygui R, and Ardehali A. 2008. Lung transplantation in older patients? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 135, 412–420.
- [59] Mantovani A, Sica A, and Locati A. 2007. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol.* 37, 14–16.
- [60] Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, and Locati M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686.
- [61] Martinu T, Chen DF, and Palmer SM. 2009. Acute rejection and humoral sensitization in lung transplant recipients. *Proc Am Thorac Soc.* 6, 54–65.

- [62] Martinu T, Howell DN, Davis RD, Steele MP, and Palmer SM. 2006. Pathologic correlates of bronchiolitis obliterans syndrome in pulmonary retransplant recipients. *Chest*. 129, 1016–1023.
- [63] Mason DP, Thuita L, Nowicki ER, Murthy SC, Pettersson GB, and Blackstone EH. 2010. Should lung transplantation be performed for patients on mechanical respiratory support? The US experience. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 139, 765–773.
- [64] McMichael M. 2012. New models of hemostasis. *Top Companion Anim Med*. 27, 40–45.
- [65] Mizuta T, Kawaguchi A, Nakahara K, and Kawashima Y. 1989. Simplified rat lung transplantation using a cuff technique. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 97, 578–581.
- [66] Murphy K, Ed. 2012. *Janeway's Immunobiology*. Garland Science.
- [67] Nakashima S, Qian Z, Rahimi S, Wasowska BA, and Baldwin WM 3rd. 2002. Membrane attack complex contributes to destruction of vascular integrity in acute lung allograft rejection. *J Immunol*. 169, 4620–4627.
- [68] Nathan SD, Shlobin OA, Ahmad S, Barnett SD, Burton NA, Gladwin MT, and Machado RF. 2008. Pulmonary Hypertension in Patients with Bronchiolitis Obliterans Syndrome Listed for Retransplantation. *Am J Transplant*. 8, 1506–1511.
- [69] Nydegger U, Mohacsi P, Koestner S, Kappeler A, Schaffner T, and Carrel T. 2005. ABO histo-blood group system-incompatible allografting. *Int. Immunopharmacol*. 5, 147–153.
- [70] Prekker ME, Nath DS, Walker AR, Johnson AC, Hertz MI, Herrington CS, Radosevich DM, and Dahlberg PS. 2006. Validation of the proposed International Society for Heart and Lung Transplantation grading system for primary graft dysfunction after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 25, 371–378.
- [71] Quadri SM, Segall L, de Perrot M, Han B, Edwards V, Jones N, Waddell TK, Liu M, and Keshavjee S. 2005. Caspase inhibition improves ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *Am J Transplant*. 5, 292–299.
- [72] Quinlan SC, Landgren O, Morton LM, and Engels EA. 2010. Hodgkin lymphoma among US solid organ transplant recipients. *Transplantation*. 90, 1011–1015.
- [73] Randolph GJ, Jakubzick C, and Qu C. 2008. Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Curr Opin Immunol*. 20, 52–60.
- [74] Reinsmoen NL, Nelson K, and Zeevi A. 2004. Anti-HLA antibody analysis and crossmatching in heart and lung transplantation. *Transpl Immunol*. 13, 63–71.

- [75] Rong JX, Shapiro M, Trogan E, and Fisher EA. 2003. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 13531–13536.
- [76] Saggar R, Ross DJ, Zisman DA, Gregson A, Lynch JP 3rd, Keane MP, Weigt SS, Ardehali A, Kubak B, Lai C, Elashoff D, Fishbein MC, Wallace WD, and Belperio JA. 2008. Pulmonary hypertension associated with lung transplantation obliterative bronchiolitis and vascular remodeling of the allograft. *Am J Transplant.* 8, 1921–1930.
- [77] Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillesen D, and Gabbiani G. 1986. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol.* 103, 2787–2796.
- [78] Sleiman C, Mal H, Fournier M, Duchatelle JP, Icard P, Groussard O, Jebrak G, Mollo JL, Raffy O, Roue C, Kitzis M, Andreassian B, and Pariente R. 1995. Pulmonary reimplantation response in single-lung transplantation. *Eur Respir J.* 8, 5–9.
- [79] Snell GI, Holmes M, Levvey BJ, Shipp A, Robertson C, Westall GP, and Cohney S. 2013. Lessons and insights from ABO-incompatible lung transplantation. *Am J Transplant.* 13, 1350–1353.
- [80] Snyder LD and Palmer SM. 2006. Immune mechanisms of lung allograft rejection. *Semin Respir Crit Care Med.* 27, 534–543.
- [81] Stewart S, Fishbein MC, Snell GI, Berry GJ, Boehler A, Burke MM, Glanville A, Gould FK, Magro C, Marboe CC, McNeil KD, Reed EF, Reinsmoen NL, Scott JP, Studer SM, Tazelaar HD, Wallwork JL, Westall G, Zamora MR, Zeevi A, and Yousem SA. 2007. Revision of the 1996 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection. *J Heart Lung Transplant.* 26, 1229–1242.
- [82] Streuli M, Morimoto C, Schrieber M, Schlossman SF, and Saito H. 1988. Characterization of CD45 and CD45R monoclonal antibodies using transfected mouse cell lines that express individual human leukocyte common antigens. *J Immunol.* 141, 3910–3914.
- [83] Strüber M, Warnecke G, Hafer C, Goudeva L, Fegbeutel C, Fischer S, Gottlieb J, Avsar M, Simon AR, and Haverich A. 2008. Intentional ABO-incompatible lung transplantation. *Am J Transplant.* 8, 2476–2478.
- [84] Suárez López VJ, Miñambres E, Robles Arista JC, and Ballesteros MA. 2012. Primary graft dysfunction after lung transplantation. *Med Intensiva.* 36, 506–512.

- [85] Subramanian V, Ramachandran S, Klein C, Wellen JR, Shenoy S, Chapman WC, and Mohanakumar T. 2012. ABO-incompatible organ transplantation. *Int J Immunogenet.* 39, 282–290.
- [86] Sugiyama S, Kugiyama K, Nakamura S, Kataoka K, Aikawa M, Shimizu K, Koide S, Mitchell RN, Ogawa H, and Libby P. 2006. Characterization of smooth muscle-like cells in circulating human peripheral blood. *Atherosclerosis.* 187, 351–362.
- [87] Suzuki S, Namiki J, Shibata S, Mastuzaki Y, and Okano H. 2010. The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature. *J Histochem Cytochem.* 58, 721–730.
- [88] Terry LA, Brown MH, and Beverley PC. 1988. The monoclonal antibody, UCHL1, recognizes a 180,000 MW component of the human leucocyte-common antigen, CD45. *Immunology.* 64, 331–336.
- [89] Thabut G, Vinatier I, Stern JB, Lesèche G, Loirat P, Fournier M, and Mal H. 2002. Primary graft failure following lung transplantation: predictive factors of mortality. *Chest.* 121, 1876–1882.
- [90] Vadnerkar A, Toyoda Y, Crespo M, Pilewski J, Mitsani D, Kwak EJ, Silveira FP, Bhamra J, Shields R, Bermudez C, Clancy CJ, and Nguyen MH. 2011. Age-specific complications among lung transplant recipients 60 years and older. *J Heart Lung Transplant.* 30, 273–281.
- [91] Vajdic CM and van Leeuwen MT. 2009. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int J Cancer.* 125, 1747–1754.
- [92] van Vrancken MJ, Keglovits L, and Krause J. 2013. Plasmablastic lymphoma following transplantation. *Proc (Bayl Univ Med Cent).* 26, 152–155.
- [93] Verleden GM, Dupont LJ, and van Raemdonck DE. 2005. Is it bronchiolitis obliterans syndrome or is it chronic rejection: a reappraisal? *Eur Respir J.* 25, 221–224.
- [94] Veselska R, Hermanova M, Loja T, Chlapek P, Zambo I, Vesely K, Zitterbart K, and Sterba J. 2008. Nestin expression in osteosarcomas and derivation of nestin/CD133 positive osteosarcoma cell lines. *BMC Cancer.* 8, 300.
- [95] Wan X, Xia W, Gendoo Y, Chen W, Sun W, Sun D, and Cao C. 2014. Upregulation of stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) is associated with macrophage infiltration in renal ischemia-reperfusion injury. *PLoS One.* 9, e114564.
- [96] Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, and Wobus AM. 2004. Nestin expression - a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci.* 61, 2510–2522.

- [97] Witt CA, Gaut JP, Yusen RD, Byers DE, Iuppa JA, Bennett Bain K, Alexander Patterson G, Mohanakumar T, Trulock EP, and Hachem RR. 2013. Acute antibody-mediated rejection after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 32, 1034–1040.
- [98] Woollett GR, Williams AF, and Shotton DM. 1985. Visualisation by low-angle shadowing of the leucocyte-common antigen. A major cell surface glycoprotein of lymphocytes. *EMBO J.* 4, 2827–2830.
- [99] Yaich S. 2013. ABO-Incompatible kidney transplantation. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 24, 463–472.
- [100] Yang X, Chen B, Liu T, and Chen X. 2014. Reversal of myofibroblast differentiation: a review. *Eur J Pharmacol.* 734, 83–90.
- [101] Yousem SA, Ray L, Paradis IL, Dauber JA, and Griffith BP. 1990. Potential role of dendritic cells in bronchiolitis obliterans in heart-lung transplantation. *Ann Thorac Surg.* 49, 424–428.
- [102] Yusen RD, Shearon TH, Qian Y, Kotloff R, Barr ML, Sweet S, Dyke DB, and Murray S. 2010. Lung transplantation in the United States, 1999-2008. *Am J Transplant.* 10, 1047–1068.

## 10 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.“

Ort, Datum

Unterschrift



## 11 Danksagung

Mein größter Dank gilt Frau Prof. Veronika Grau für dieses interessante Thema, für die uneingeschränkte Unterstützung bei meinem Promotionsvorhaben und für das in mich gesetzte Vertrauen. Ich möchte mich ganz besonders für die freundschaftliche Betreuung bedanken und dafür, dass sie auch über eine Distanz von 150 km immer ein offenes Ohr für mich hatte, sich sogar am Wochenende Zeit für mich genommen hat und ihre Korrekturen immer so schnell wieder in meinem Briefkasten lagen.

Ich danke dem gesamten Labor für experimentelle Chirurgie für die gute Arbeitsatmosphäre und die fortwährende Hilfsbereitschaft. Besonderer Dank gilt an dieser Stelle Srebrena Atanasova-Koch und Anna Zakrzewicz, Gabriele Fuchs-Moll, Sigrid Wilker, Andrea Fischer, Sabine Stumpf, Kathrin Petri, Alena Evers und Mira Küllmar.

Bei Kathrin, Alena, Mira und Jessi bedanke ich mich für die lustigen Stunden im Labor und darüber hinaus.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Freund Sebastian, der mir in jeder Lebenslage zur Seite steht, mich bei all meinen Vorhaben unterstützt und anspornt und mich immer zur richtigen Zeit ablenkt und aufmuntert.

Bei meiner Familie und ganz besonders meinen Eltern möchte ich mich für all das bedanken, was sie für mich tun und getan haben. Für ihre Liebe, Unterstützung und Vertrauen. Ohne sie wäre ich heute nicht das was ich bin und hätte vieles nicht geschafft.