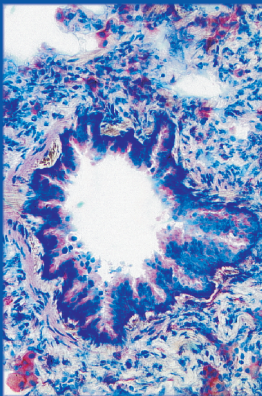
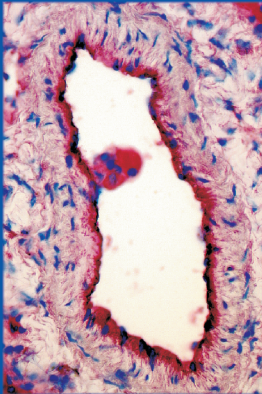
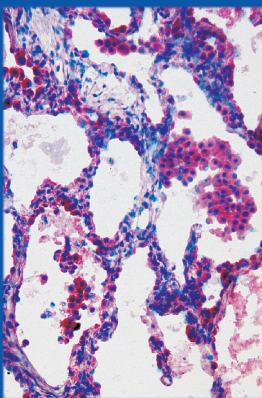


**KOMPARTIMENT-SPEZIFISCHE ANALYSE HYPOXIE-
REGULIERTER PROTEINE BEI CHRONISCHEN
HYPOXISCHEN, INTERSTITIELLEN UND VASKULÄREN
LUNGENERKRANKUNGEN DES MENSCHEN**

WALBURGA M. STÄRK



INAUGURALDISSERTATION

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

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2007

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

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Kompartiment-spezifische Analyse Hypoxie-regulierter Proteine
bei chronischen hypoxischen, interstitiellen und vaskulären
Lungenerkrankungen des Menschen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus–Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Walburga Monika Stärk

aus Bösel / Overlahe

Gießen 2006

Aus dem Institut für Pathologie

Leiter: Prof. Dr. Schulz

des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. med. R. M. Bohle

2. Gutachter: PD Dr. med. A. C. Langheinrich

Tag der Disputation: 29.05.2007

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

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung	1
1.1 Hypoxie in der Lunge	1
1.2 COPD und Hypoxie.....	2
1.3 Pulmonale Hypertonie und Hypoxie	3
1.3.1 Klassifikation der pulmonalen Hypertonie.....	3
1.3.2 Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie	4
1.3.3 Hypoxiebedingter Gefäßumbau.....	5
1.4 Idiopathische Lungenfibrose und Hypoxie.....	6
1.5 Hypoxie-bedingte Proteinregulation.....	8
1.5.1 Vimentin	8
1.5.2 Catalase.....	9
1.5.3 CD36.....	10
1.5.4 HMGB-1	11
1.5.5 FHL-1	12
2 Ziele der Studie	14
3 Material und Methoden	15
3.1 Ausgangsmaterial	15
3.2 Kleinmaterial	16
3.3 Geräte.....	17
3.4 Reagenzien.....	17
3.5 Fotodokumentation	18
3.6 Software	18
3.7 Immunhistochemie	19
3.7.1 Gewebepräparation für Gefrierschnitte	19
3.7.2 Anfertigung von Gefrierschnitten.....	19
3.7.3 Anfertigung von Paraffinschnitten	19
3.7.4 Mikrowellenvorbehandlung	20
3.7.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	20
3.7.6 APAAP-Methode	20
3.7.7 LSAB-Methode	21

3.7.8	Antikörper.....	22
3.7.9	Primärantikörper der Immunreaktivität.....	22
3.7.10	Kontrollen.....	23
3.7.11	Vorversuche.....	23
3.7.12	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	24
3.7.13	Gebrauchslösungen und Entwicklungslösung.....	24
3.8	Auswertung.....	26
3.9	Statistik.....	27
4	Ergebnisse.....	28
4.1	Differentielle Immunreaktivität humanen Lungengewebes bei nicht-neoplastischen Lungenerkrankungen.....	28
4.1.1	Vimentin.....	28
4.1.2	Catalase.....	37
4.1.3	CD36.....	47
4.1.4	HMGB-1.....	52
4.1.5	FHL-1.....	61
5	Diskussion.....	69
5.1	Ziele der Studie.....	69
5.2	Kritische Betrachtung der Methode.....	70
5.3	Vimentin-Immunreaktivität.....	70
5.4	Catalase-Immunreaktivität.....	73
5.5	CD36-Immunreaktivität.....	76
5.6	HMGB-1-Immunreaktivität.....	78
5.7	FHL-1-Immunreaktivität.....	80
6	Zusammenfassung.....	83
6.1	Abstract.....	84
7	Literaturangaben.....	85
8	Anhang.....	99
8.1	FI-Score-Einteilung.....	99
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	100
8.3	Tabellenverzeichnis.....	102
	Danksagung.....	104
	Lebenslauf.....	105

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AGE	“advanced glycation end-products”
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
art.	arteriell(en)
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	“basic fibroblast growth factor”
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	“cluster of differentiation”
COPD	“chronic obstructive pulmonary disease”
CTEPH	chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELM	Euler-Liljestrand-Mechanismus
et al.	lat. et alia, und andere
FHL-1	“four-and-a-half LIM Domains 1”
g	Gramm
h	Stunde(n)
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HMGB-1	“high-mobility-group-box 1”

H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPV	Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
HZV	Herzzeitvolumen
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IPAH	Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
KAM	Kaninchen-Anti-Maus
L	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
LSAB	“labelled”(Strept)Avidin-Biotin-Methode
μ	mikro (10 ⁻⁶)
MAK	Maus-Anti-Kaninchen
MAPK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
min.	Minute(n)
n	Anzahl
nuc	nukleär
ns	nicht signifikant
o. g.	oben genannt(en)
OV	Originalvergrößerung
PDGF	“platelet-derived growth factor”
PMN	polymorphkernige Neutrophile
RAGE	“receptor of glycation end-products”
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
RT	Raumtemperatur
s.	siehe

sek.	Sekunde(n)
SOD	Superoxiddismutase
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TBS	Tris/ Borat/ Saline
TGF	“transforming growth factor”
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris(hydromethyl)aminomethan
TSP	Thrombospondin
u. a.	unter anderem
UIP	“usual interstitial pneumonia”
ven.	venös(e)
Vim.	Vimentin
VEGF	“vascular endothelial growth factor”
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel
zyt	zytoplasmatisch

1 Einleitung

1.1 Hypoxie in der Lunge

Die ausreichende Sauerstoffversorgung ist für den Organismus notwendig zur Oxydation von Nährstoffen und die Energiegewinnung in Form von ATP.

Ist die Sauerstoffversorgung des Körpers vermindert (Hypoxie), treten Anpassungsreaktionen von Zellen und Geweben auf (3). Diese Anpassung hilft dem Organismus, sich an das verminderte ATP-Angebot zu adaptieren und die normale Zellfunktion aufrechtzuerhalten (67). In der Hypoxie ist die Aktivität von Enzymen der anaeroben Glykolyse erhöht. Nicht alle Organe reagieren einheitlich auf die Hypoxie. Sie exprimieren verschiedene Gene, die für die jeweiligen Organfunktionen spezifisch sind. Die Lunge reagiert auf Hypoxie mit einer Vasokonstriktion. Diese sog. hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) wurde erstmalig im Jahr 1946 von Euler u. Liljestrand beschrieben. Daher wird die HPV synonym als Euler-Liljestrand-Mechanismus (ELM) bezeichnet.

Der ELM führt durch Vasokonstriktion zu einer Blutumverteilung in besser ventilerten Lungenarealen. Dadurch ist eine optimale Oxygenierung des sauerstoffarmen Blutes während der Lungenpassage gewährleistet.

In schlecht oder nicht ventilerten Lungenarealen sinkt der Sauerstoffpartialdruck, so dass diese Abschnitte nur in geringem Maße zur Sauerstoffanreicherung beitragen. Blut aus diesen Lungenabschnitten verlässt die Lunge mit unzureichender Sauerstoffbeladung (110). Die Existenz von gering und nicht ventilerten Lungenarealen ist physiologisch (26). Ungeklärt ist heute, wie der Mechanismus der Signaltransduktion und der Zelladhäsion von bestimmten Proteinen im hypoxischem Lungengewebe reguliert ist. Störung oder Überaktivierung dieser Mechanismen können zu schweren klinischen Symptomen führen, wie z. B. der pulmonalen Hypertonie. Daher ist eine genaue Kenntnis der Regulationsvorgänge von großer Bedeutung.

Bei vielen chronischen Lungenerkrankungen tritt eine in der Regel langfristige Hypoxie auf. Sie führt zu Umbauvorgängen im Lungenparenchym („remodelling“).

1.2 COPD und Hypoxie

Die chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) gehört weltweit zu den häufigsten chronischen Erkrankungen. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzte im Jahre 1996 die Anzahl der Raucher (Rauchen: größter COPD-Risikofaktor) unter der Bevölkerung weltweit auf ca. 1,1 Mrd. Menschen. Trotz zunehmender Inzidenz der COPD liegen keine verlässlichen Zahlen für die Prävalenz der COPD vor. Die WHO schätzt ihre Prävalenz weltweit auf 0,8 %. Halbert et al. (46) untersuchten im Rahmen einer Metaanalyse 32 wissenschaftliche Artikel aus 17 verschiedenen Ländern. Dabei lag die Prävalenz der COPD zwischen 0,23 bis 18,3 %, wobei insgesamt die Rate bei Männern höher lag als bei Frauen.

Als häufigste Manifestationsform gilt die chronische Bronchitis, die bei 90 % der Patienten nachzuweisen ist. Die fortgeschrittene COPD ist gekennzeichnet durch den begleitenden Fibrosierungsprozess, der zunächst zur Obstruktion und zur chronischen Entzündung der Bronchien führt und später zum zentrolobulären Emphysem überleitet (95).

Die pulmonale Hypertonie ist eine bekannte Komplikation bei Patienten mit einer COPD. Die Schwierigkeit besteht allerdings darin, eine genaue Prognose über den Krankheitsverlauf zu liefern (7). Bei der COPD lassen sich außerdem unterschiedlich schwer ausgeprägte Stadien, die von Stadien 0 bis III reichen, unterscheiden.

Bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung trägt der übermäßig aktivierte Euler-Liljestrand-Mechanismus wesentlich zur Pathologie bei. Die beim Gesunden adaptative Vasokonstriktion im Bereich hypoxischer Alveolen führt bei Patienten mit einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung zu einer erheblichen Verringerung des Gesamtquerschnittes der pulmonalen Strombahn. Das nicht in gleichem Maße abnehmende Herzzeitvolumen bedingt einen Anstieg des pulmonalarteriellen Widerstandes mit konsekutiver Druckerhöhung im Lungenkreislauf und schließlich eine pulmonale Hypertonie. Im Rahmen der COPD kommt es zu einem Umbau der Lungengefäße, der beim Menschen meist durch eine Hypertrophie und Hyperplasie der Gefäßmuskulatur gekennzeichnet ist (33). Auch der rechte Herzventrikel hält der Druckbelastung nicht ohne Veränderungen stand, sondern hypertrophiert aufgrund chronischer Belastung: es entwickelt sich ein Cor pulmonale (95).

Auch bei in großer Höhe Lebenden tritt über eine globale alveoläre Hypoxie eine Rechtsherzbelastung und -hypertrophie auf. Sie zeigt pathophysiologische Gemeinsamkeiten mit dem akut auftretenden Höhenödem bei Nicht-Adaptierten (76).

1.3 Pulmonale Hypertonie und Hypoxie

Physiologisch wird der Blutdruck im Lungenkreislauf auf 16 - 20 mmHg begrenzt - Autoregulation. Sobald der alveoläre Sauerstoffpartialdruck unter 70 mmHg fällt, ist mit einer Fähigkeit zur lokalen Vasokonstriktion der Lunge zu rechnen.

Von einer pulmonalen Hypertonie geht man aus, wenn eine Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes in Ruhe über 25 mmHg und unter Belastung über 30 mmHg gemessen wird. Ein zunehmender Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstandes führt schließlich zu einer Abnahme des Herzzeitvolumens (HZV) und zur Ausbildung eines Cor pulmonale (77). Die pulmonale Hypertonie kann entweder auf dem Boden von Lungenerkrankungen (sekundär) oder als primäre Form (z. B. IPAH) vorliegen. Sie zeichnet sich durch histologische Veränderungen der präkapillären Lungengefäße wie Mediahypertrophie, Intimafibrose, Endothelzellenproliferat und sog. plexiformen Läsionen aus (13). Dieser pulmonale Gefäßumbau führt zu einer in der Regel schweren pulmonalen Hypertonie, die oft progredient ist.

Bei der IPAH wird die Häufigkeit in der Gesamtbevölkerung auf 1 - 2 Fälle pro 1 Million geschätzt. Die Erkrankung tritt üblicherweise bei Frauen in jungem bis mittlerem Alter auf. Ungefähr 10 % der Fälle tritt familiär gehäuft auf (41). Sie ist außerdem gehäuft bei unterschiedlichen Krankheitsbildern zu diagnostizieren, z. B. bei Kollagenose, angeborenen Shuntvitien und im Rahmen einer HIV-Infektion.

1.3.1 Klassifikation der pulmonalen Hypertonie

Seit dem Weltkongress für pulmonale Hypertonie in Venedig 2003 gilt folgende Einteilung der pulmonalen Hypertonie (<http://www.kup.at/kardiologie>) (60):

Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH):

1. Idiopathische (IPAH) (früher: primäre pulmonale Hypertonie [PPH]) oder familiär.
2. Pulmonale Hypertonie bei (linksventrikulärer) Herzerkrankung

- Atriale bzw. ventrikuläre Herzerkrankung
 - Herzklappenerkrankungen
3. Pulmonale Hypertonie bei Erkrankungen des respiratorischen Systems und/ oder Hypoxämie:
 - COPD
 - interstitiellen Lungenerkrankungen
 - Schlaf-Apnoe-Syndrom
 - Zentrale alveoläre Hypoventilation
 - Chronische Höhenexposition
 - Entwicklungsbedingte Erkrankungen
 4. Pulmonale Hypertonie in Folge chronischer thrombotischer und/ oder embolischer Prozesse.
 5. Pulmonale Hypertonie durch Erkrankungen mit Beteiligung der Lungengefäße
z. B. Sarkoidose oder pulmonalkapilläre Hämangiomasen (40;102).

1.3.2 Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie

Für die Manifestation der pulmonalen Hypertonie ist das Gleichgewicht vasodilatativer Mediatoren und Vasokonstriktoren bedeutsam (s. **Abb. 1**, S. 5). Klinische Daten von Patienten mit chronischer Hypertonie zeigen ein Ungleichgewicht zu Gunsten vasokonstriktorischer Mediatoren, die vor allem auf die glatte Gefäßmuskulatur wirken (22).

Charakteristisch sind auch Veränderungen in der Adventitia mit Fibroblastenproliferation und Zunahme extrazellulärer Matrixkomponenten, wie Kollagen und Elastin (102).

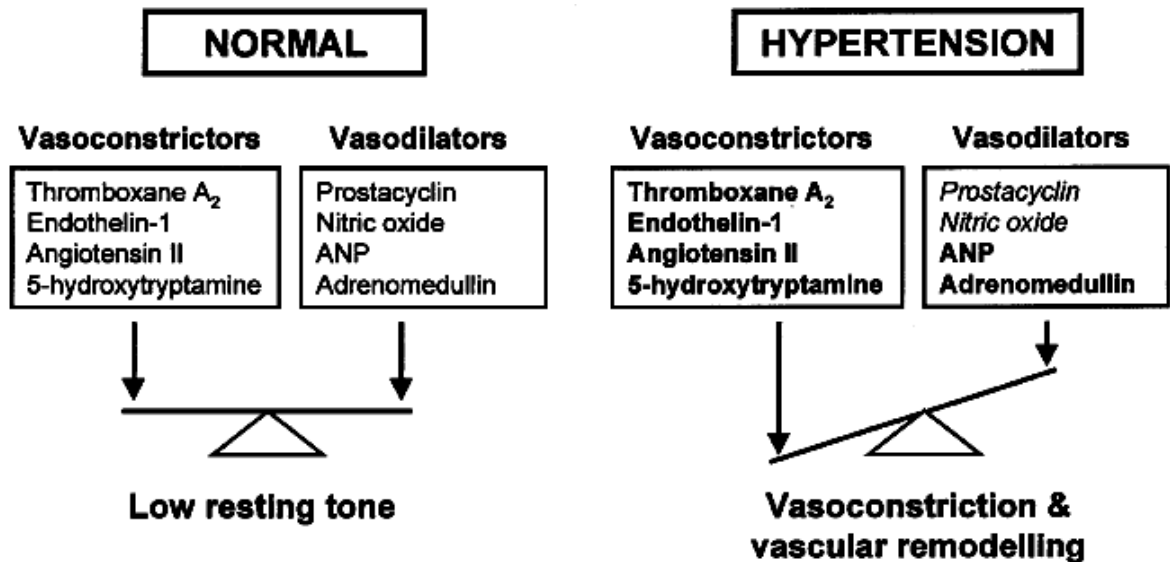


Abb. 1 Gleichgewicht und Ungleichgewicht zwischen Vasokonstriktoren und Vasodilatoren.

Die gezeigten Effektoren beeinflussen die pulmonalarterielle Gefäßstruktur und -neubildung (entnommen aus STRANGE et al. (102)).

1.3.3 Hypoxiebedingter Gefäßumbau

Die Endothelzellen und glatte Muskelzellen spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Gefäßfunktion. Zu deren Funktion gehören die Erhaltung des physiologischen Gefäßtonus, die Kontrolle des Gerinnungssystems und das Wachstum der glatten Muskelzellen. Eine Fehlregulierung der Mechanismen kann als die auslösenden Faktoren pulmonaler Hypertonie betrachtet werden. Eine Änderung der Endothelfunktion in pulmonalen Arterien zeigt sich offenbar schon frühzeitig in der Entwicklung der COPD. Potentielle Ursachen der Endotheldysfunktion sind Komponenten des Zigarettenrauches und entzündliche Veränderungen (7). Hypoxie beeinflusst die Endothelfunktion durch Steigerung der Permeabilität, Begünstigung der Zytokin-Abgabe, sowie der Abgabe von Wachstumsfaktoren (s. **Tab. 1**, S. 6). Es können autokrine Stimulationen auftreten.

Tab. 1 Wachstumsfaktoren, Zytokine und vasoaktive Substanzen.

Gefäßwachstum und Gefäßtonus regulierende Substanzen, synthetisiert durch Endothel, welche durch Hypoxie beeinflusst werden (aus Durmowicz et al. (31)).

Wachstumsfaktoren und Zytokine	vasoaktive Substanzen
Platelet-derived growth factor	Angiotensin II
Basic fibroblast growth factor	Endothelin
Insulin-like growth factor-I	Bradykinin
Transforming growth factor-beta	Stickstoffmonoxid (NO)
Endothelium-derived growth factor	Prostacyclin
Interleukin-1, -6, -8	Thromboxane A2
Gewebefaktor	Prostaglandine
	Platelet activating factor (PAF)
	Leukotriene

1.4 Idiopathische Lungenfibrose und Hypoxie

Die idiopathische Lungenfibrose wird zu den interstitiellen Lungenerkrankungen gerechnet. Sie können sehr variable klinische Verläufe aufweisen. In der gegenwärtig gültigen Klassifikation werden folgende Lungenerkrankungen voneinander abgegrenzt (53) und nach der American Thoracic Society/ European Respiratory Society (1) sieben Entitäten definiert:

- IPF („idiopathic pulmonary fibrosis“) = UIP („usual interstitial pneumonia“)
- NSIP („nonspecific interstitial pneumonia“)
- COP („cryptogenic organizing pneumonitis“)
- BOOP („bronchiolitis obliterans organizing pneumonia“)
- AIP („acute interstitial pneumonia“)
- RB-ILD („respiratory bronchiolitis interstitial lung disease“) und DIP („desquamative interstitial pneumonia“)
- LIP („lymphoid interstitial pneumonia“)

Von diesen Entitäten ist die idiopathische Lungenfibrose (IPF) die Erkrankung mit der zumeist aggressivsten Verlaufsform. Ihre Ätiologie ist bislang unbekannt. Sie manifestiert sich in der Regel in 5. - 7. Dezennium und führt oft rasch progredient zur respiratorischen Insuffizienz. Sie nimmt eine Sonderstellung ein, da sie eine sehr schlechte Prognose hat. Die Inzidenz liegt bei ca. 7 – 10 Fällen pro 100.000 (24). Der Nikotinabusus stellt einen Risikofaktor der Erkrankung dar. In Bezug auf Mutationen in Proteinen oder dem Vorliegen von defekten Proteinregulationen gibt es jedoch bisher keine sicheren Erkenntnisse. Diskutiert werden jedoch z. B. Punktmutationen in Surfactant Protein C (106).

Die radiologische Diagnostik der IPF ist folgendermaßen charakterisiert: „Im konventionellen Röntgenbild des Thorax fällt ein basal betontes, oft auch pleurarandständiges retikuläres Zeichnungsmuster auf. Meistens sind diese Veränderungen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits evident, keinesfalls schließt ein Normbefund im Thoraxbild das Vorliegen einer IPF aus. Hier haben die technischen Verbesserungen des hochauflösenden CT geholfen, auch Patienten in einem früheren Krankheitsstadium sicher zu identifizieren. Es finden sich in der Regel ebenfalls beidseits symmetrische, basale und subpleural betonte, retikuläre Zeichnungsvermehrungen mit variablen, in der Regel aber diskreten, milchglasartigen Trübungen. Diese milchglasartigen Trübungen können im Zeitverlauf verschwinden oder in Fibrosezonen mit Honigwabemuster übergehen. Oft finden sich vor allem in den betroffenen Bezirken Traktionsbronchiektasen und pleuraständig bereits frühzeitig ein Honigwabemuster. Nicht oder nur selten finden sich noduläre Veränderungen, Verdickungen der bronchovaskulären Bündel und eine mediastinale Lymphadenopathie. Die Spezifität des HRCT ist relativ hoch, die Sensitivität dagegen niedrig. Allerdings werden nur zwei Drittel aller Patienten mit bioptisch nachgewiesener UIP von radiologischer Seite aus sicher identifiziert“.

Die UIP ist klinisch durch progressive Dyspnoe und eine verringerte Compliance gekennzeichnet. Keine Therapie konnte zur Zeit ein längeres Überleben zeigen (45). Es wird ein initialer infektiöser Vorgang (z. B. virale Infektion) vermutet. Außerdem gibt es Fälle von familiär auftretenden Lungenerkrankungen (American Thoracic Society/ European Respiratory Society) (1).

Der fibrotische Umbau des Alveolargerüsts in ein verdicktes, bindegewebiges Gerüst, welches den Anforderungen des Gasaustausches und der Lungenmechanik nur unzureichend genügt. Es tritt regelmäßig bei den interstitiellen Lungenerkrankungen auf.

Die Lungenfibrose ist die Endstrecke verschiedener interstitieller Lungenerkrankungen, bei denen es durch Einlagerungen von Kollagen und fibrotischem Umbau der Lunge zu charakteristischen strukturellen und funktionellen Veränderungen kommt. Durch die Fibrosierung wird die Lunge unelastisch (verringerte Compliance), wodurch die Atemarbeit ansteigt. Die resultierende Hypoxie in der Lunge hat eine Vasokonstriktion zur Folge. Umgekehrt kann auch eine länger bestehende HPV als ursprünglicher Prozess zum „remodelling“ der Lungengefäße führen und daraus eine sekundäre Lungenfibrose entstehen.

1.5 Hypoxie-bedingte Proteinregulation

Bisher wurden nur wenige Gene bzw. Proteine, die an Hypoxie-induzierten Regulationen und Umbauvorgängen in der humanen Lunge beteiligt sind, genauer charakterisiert. Laborinterne Untersuchungen ließen jedoch vermuten, dass zahlreiche Gene bzw. Proteine in der Lunge Hypoxie-bedingt reguliert werden. In einer vorangegangenen Studie wurde an Mäuselungen der Einfluss der Hypoxie auf die Gen- und Proteinexpression untersucht (57). Hierbei sollten die Gene bzw. Proteine verschiedener Lungen-Kompartimente identifiziert werden, die einer Hypoxie-induzierten Regulation unterliegen und bzw. oder an einer pulmonalen Hypertonie beteiligt sind. Um den zeitlichen Verlauf von Regulationsvorgängen im Tiermodell zu verfolgen, wurden Mäuse unter einer arteriellen Sauerstoff-Sättigung von 0,1 (FiO₂) über mehrere Tage gehalten. Die Mäuse wurden für 24 Stunden und für 7 Tage der Hypoxie ausgesetzt, welche die akute Phase der Hypoxie-induzierten Regulation repräsentierte. Zur Untersuchung der frühen chronischen Phase wurden sie für 21 Tage der Hypoxie ausgesetzt.

Nach Laser-Mikrodissektion von Pulmonalarterien und Alveolarsepten wurden relevante Gene (u. a. das Gen von CD36) mittels Real time PCR untersucht. Für die Protein-Analyse wurden Lungen-Homogenate mit 2D-Gelen in Kombination mit MALDI-TOF eingesetzt. Es wurden dabei verschiedene Proteine mittels Immunhistochemie und PCR nachgewiesen (CD36, FHL-1 etc.), die an Hypoxie bedingten Regulationsvorgängen beteiligt zu sein scheinen (57).

1.5.1 Vimentin

Das Molekül Vimentin ist seit langem als Intermediär-Filament der 3. Klasse der Zytoskelett-Elemente bekannt. Die Intermediär-Filamente sind äußerst stabil. Einige von

ihnen sind charakteristisch für bestimmte Gewebe. So ist Vimentin in Normalgewebe nahezu ausschließlich in mesenchymalen Zellen anzutreffen, wie Fibroblasten, Endothelien und Makrophagen.

Aufgrund der hohen Stabilität werden Vimentin Antikörper in der Immunhistochemie als „Haushaltsproteine“ zur Überprüfung der Immunreaktivität eingesetzt (8). Falls das Protein in Endothelzellen, Fibroblasten und anderen mesenchymalen Elementen nicht detektierbar ist, so deutet dies darauf hin, dass die Antigenität des Gewebes möglicherweise schlecht erhalten ist und somit die Auswertung weiterer immunhistochemischer Reaktionen nicht verlässlich ist.

Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass Vimentin unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen im Normalgewebe aber auch reguliert werden kann, z. B. in Alveolarmakrophagen und Endothelien (10).

1.5.2 Catalase

Die Catalase zählt zu den wichtigen enzymatischen Antioxidantien der Zelle. Unter Antioxidantien versteht man Substanzen, die in niedrigen Konzentrationen den menschlichen Organismus vor unerwünschten oxidativen Schäden (Gewebeschädigung) schützen. Man unterscheidet zwischen enzymatischen und nicht-enzymatischen antioxidativen Abwehrsystemen. Zu den enzymatischen Antioxidantien gehören vor allem die Superoxiddismutase (SOD), die Glutathionperoxidase und die Catalase (97).

Das intrazelluläre Vorkommen von H_2O_2 wird vor allem durch die Catalase und die Peroxidase reguliert. Daher ist die biologische Halbwertszeit von Wasserstoffperoxid abhängig von diesen abbauenden Enzymen, welche für ein Gleichgewicht zwischen Entstehung und Abbau sorgen. Als Reaktion auf Hypoxie, Anoxie und Reoxigenierung bilden verschiedenste Zellen des Körpers neben den klassischen Sauerstoffradikalen auch die sogenannten „Reaktive Sauerstoff-Spezies“ (ROS), zu denen Wasserstoffperoxid als nichtradikales ROS gehört. H_2O_2 entsteht unter anderem auch durch den „oxidative burst“ der neutrophilen Granulozyten. Diese reaktiven Sauerstoff-Spezies schädigen Lipide, Membranproteine und Nukleinsäuren. Die Catalase zählt neben einer Reihe anderer Enzyme zu den Gewebsenzymen, welche antioxidative Funktion besitzen. Sie ist an der „Entgiftung“ von gewebeschädigenden Wasserstoffperoxidmolekülen zu Sauerstoff und Wasser beteiligt und hat somit protektiven Charakter im Rahmen von Hypoxie induziertem oxidativen Stress (14). Der oxidative Stress entsteht, wenn das Gleichgewicht zwischen

antioxidativen und prooxidativen Faktoren gestört ist. Es werden schließlich mehr reaktive Sauerstoffverbindungen gebildet als durch die Antioxidantien abgefangen werden können. Durch dieses Ungleichgewicht werden Pathomechanismen in Gang gesetzt, die in Zusammenhang mit einigen Erkrankungen gebracht werden.

Freie Radikale spielen auch eine wichtige Rolle in der Pathogenese von interstitiellen Lungenerkrankungen, wie der UIP und DIP. Lakari et al. (58) beschrieben die Proteinexpression, allerdings keine erhöhte Expression, von Catalase in Alveolarzellen Typ II und Alveolarmakrophagen bei UIP und DIP. Weiterhin zeigte sich auch eine Expression in gut erhaltenen Bereichen der Lunge und in akuten fibrotischen Läsionen von UIP. Sie vermuteten, dass Catalase in der Alveolarregion eine protektive Rolle im Bezug auf die Progression von Lungenerkrankungen ausübt.

1.5.3 CD36

Das Zellmembranoberflächenmolekül, CD36, ist ein 88 kDa großes Glykoprotein (alternative Namen sind Thrombospondin-Rezeptor und Glykoprotein IV) und wird auf Thrombozyten, Monozyten und Endothelzellen identifiziert und isoliert gefunden (6). Asch et al. vermuteten, dass CD36 die Funktion als zellulären TSP-Rezeptor besitzt.

Monozyten und Makrophagen spielen eine Hauptrolle in der Aufrechterhaltung und Auslösung einer Immunantwort des menschlichen Körpers und zählen damit auch zu den wichtigsten Effektorzellen dieses Systems. Während einer Entzündungsreaktion kommt es zur Aktivierung, Differenzierung, Migration, Phagozytose und Antigenpräsentation sowie zum programmierten Zelltod der Makrophagen (38). Monozyten und Makrophagen exprimieren an ihrer Oberfläche Moleküle, denen unterschiedliche Funktionen zugeschrieben werden. Sie dienen als Rezeptoren für Immunglobuline, Komplementfaktoren, Wachstumsfaktoren, Zytokine und für andere Mediatoren, wie z. B. Thrombospondin.

Das Makrophagenoberflächenmolekül, CD36, dient als Adhäsionsstelle für Thrombospondin und Kollagen I und IV. Es gibt auf der Membranoberfläche von Monozyten und Makrophagen eine Vielzahl von gut charakterisierten Rezeptoren, die eine direkte Erkennung für das zu phagozytierende Material ermöglichen (93). Thrombospondin bindet zwischen der Oberflächenstruktur der apoptotischen Zellen und dem CD36-Rezeptor oder einem Integrin-Rezeptor. Die Expression von TSP-1 wird durch Hitzeschock und Hypoxie und durch die Wachstumsfaktoren PDGF, TGF- β und bFGF

reguliert. Untersuchungen in Endothelzellen zeigten, dass eine Interaktion von TSP-1 und dem Zellrezeptor CD36 eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung anti-angiogener und pro-apoptotischer Aktivität zugeschrieben wird (107). Auf Endothelzellen ist CD36 speziell für die Bindung von TSP-1 zuständig, wodurch es zur Hemmung der Proliferation, der Einleitung der Apoptose und zur Hemmung der Angiogenese kommt. Proteine, die an CD36 binden, wie Kollagen und intakte CD36-spezifische Antikörper, induzieren einen „oxidative burst“ in Monozyten und Thrombozyten (43). Weitere Studien zeigten, dass oxidative Schädigung während einer Entzündung oder der Apoptose die Integrität und Funktion der Zellmembranen verändern kann, welche als Ligand für CD36 dient (119).

1.5.4 HMGB-1

HMGB-1 („high mobility group box 1“) wurde vor ca. 30 Jahren isoliert und stellt ein chromosomales Protein mit einer wichtigen strukturellen Funktion in Chromosomen dar (42). Der Name rührt von seiner charakteristischen elektrophoretischen Beweglichkeit in Polyacrylamid-Gelen her. Physiologisch konnten HMGB-Proteine (HMGB-1, -2, -3) als nukleäre Faktoren nachgewiesen werden, die Nukleosomen stabilisieren, DNA-Bindungen ermöglichen und die Transkription fördert (4;12).

Neueste Studien identifizierten extrazelluläres HMGB-1 als einen wirksamen, Makrophagen-aktivierenden Faktor (Zytokin), der eine inflammatorische Antwort durch die Signalwirkung von RAGE („receptor of advanced glycation end-products“) induzierte (2;5;112). RAGE ist ein Transmembranrezeptor der Immunglobulinfamilie, an den u. a. die sog. „advanced glycation end-products“ (AGE) binden können (75). RAGE wird in Endothelzellen, glatte Gefäßmuskulatur, Neuronen und Monozyten/ Makrophagen exprimiert (99). HMGB-1 wird in der Funktion als extrazellulärer Ligand von RAGE synonym auch als Amphoterin bezeichnet. Es kann von bestimmten Zellen wie z. B. stimulierten Monozyten und Makrophagen sezerniert werden und von nekrotischen oder beschädigten Zellen passiv abgegeben werden (28;112).

HMGB-1 kann durch Zytokine wie (IL-1 β , IFN- γ , TNF, LPS) aus dem Zellkern ins Zytosol befördert werden und von dort via Vesikel die Zellen verlassen (s. **Abb. 2**) (117). Anderson et al. zeigten eine derartige Zytokinsezernierung in kultivierten menschlichen Makrophagen und Monozyten (5).

HMGB-1 ist ein später Entzündungs-Mediator und beteiligt sich in der Pathogenese von systemischen Inflammationen erst, nachdem die Immunantwort der frühen Mediatoren

beendet ist (116). Es wird durch aktivierte Makrophagen und Monozyten freigesetzt sowie passiv durch nekrotische und zerstörte Zellen freigegeben (72).

Lutz et al. vermuteten, dass das Protein HMGB-1 in die Entwicklung und in der Progression von Lungenerkrankungen involviert ist. Weiterhin können HMGB-1 Proteine selbst der Grund für eine starke inflammatorische Antwort sein, und zwar durch die wachsende Produktion von Zytokinen und die Anhäufung von neutrophilen Granulozyten. Es wird angenommen, dass HMGB-1 einer der ersten Mediatoren einer inflammatorischen Antwort auf Lungenzellschädigung ist, die durch giftige Umweltchemikalien verursacht werden (65). Erhöhte HMGB-1 Level wurden auch im Plasma und im Lungenepithel von Patienten mit einer akuten Lungenerkrankung und in angezüchteten Mäusen mit LPS gefunden (108).

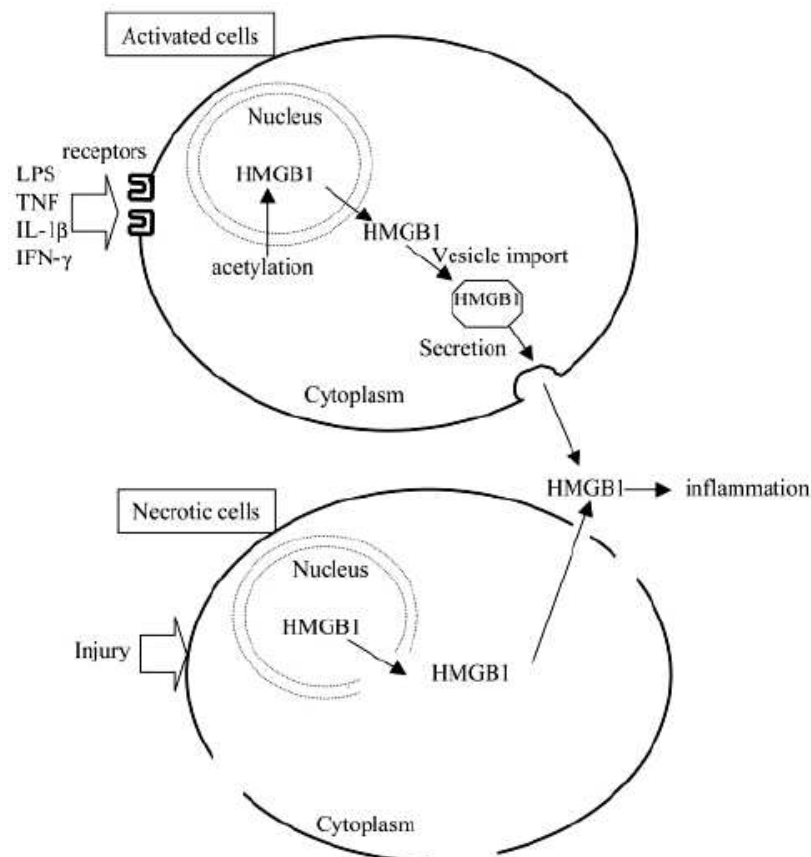


Abb. 2 Die Zytokinaktivität von HMGB-1 (entnommen aus Yang et al. 2005 (117)).

1.5.5 FHL-1

Four and a Half LIM Domain Proteine (**FHL**) sind eine Gruppe von LIM Proteinen, die im Skelettmuskel, aber auch in anderen Geweben identifiziert wurden. Charakteristisch

sind 4 aufeinanderfolgende LIM Domänen und eine neuartige Einzel-Zinkfinger Domäne, lokalisiert an der N-terminalen Region. Bis jetzt wurden vier Isoformen beschrieben (FHL 1-4) (71).

LIM Proteine, wie LIN-11, ISL-1 und MEC-3 tragen ein Motiv, das aus zwei Zink-Fingern besteht, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln können und an der Transkriptionskontrolle beteiligt sind. Des weiteren regulieren sie die Zellentwicklung, zelluläre Differenzierung und das Zytoskelett. Neben den klassischen Transkriptionsfaktoren werden zunehmend Zink-Finger-Proteine isoliert, die sowohl Signaltransduktions- als auch Transkriptionsfaktor-Funktionen übernehmen. Trotzdem gibt es keinen Beweis, dass LIM Domänen direkt an DNA binden (16). Ein Beispiel für solche Proteine ist das im Skelettmuskel und in der Herzmuskulatur hoch exprimierte LIM Protein FHL-1 (auch „SLIMMER“ genannt) (62). Eine starke Expression des Gens ist im Skelettmuskel, in den Genitalorganen und in der Lunge, eine geringe Expression ist im Thymus, den Lymphknoten und der Leber zu beobachten.

Brown et al. konnten demonstrieren, dass im Skelettmuskel LIM Proteine-1 (SLIM-1, auch FHL-1 genannt) in den Kernen von Myoblasten und im Zytoplasma von Myotubuli lokalisiert sind (16). Sie nahmen an, dass FHL-1 sich möglicherweise zwischen Kern und Zytoplasma hin und her bewegt. Weiterhin vermuteten sie, dass FHL-1 aufgrund von LIM Domänen als Verbindungsprotein in einem größeren Funktionskomplex innerhalb der „focal adhesions“-Bereiche auftritt (16). Extrazelluläre Reize, wie extrazelluläre Matrix, Zytokine, Antikörper und Wachstumsfaktoren, können auf Zellen einwirken. Sie reagieren an der Zellmembran spezifisch mit Rezeptoren und aktivieren Signalkaskaden. In Abhängigkeit von externen Stimuli bilden Zellen konzentrierte Ansammlungen von Signalmolekülen, die sog. „focal adhesions“, über die an der Membran oder im Zytosol eine oder mehrere Signalkaskaden in Gang gesetzt werden (79).

FHL-1 induziert außerdem eine alpha5-beta1-Integrin-abhängige Muskeldehnung. Eine Überexpression von FHL-1 begünstigt die Myoblastenausbreitung und die Zellmigration. Robinson et al. konnten zeigen, dass FHL-1 Integrin-vermittelte zelluläre Funktionen reguliert. Bei einer Inhibition von Integrinsignalen war FHL-1 diffus im Zytosol lokalisiert und im Nukleus herunterreguliert. Sie nehmen außerdem an, dass eine Überexpression von FHL-1 möglicherweise die normale Myoblastenadhäsion stört (89). Boettiger et al. zeigten, dass eine Überexpression von aktivierten alpha5-beta1-Integrin die Myoblastenadhäsion erhöht, aber die Zellmigration inhibiert (15).

2 Ziele der Studie

Das Ziel dieser Studie ist mittels immunhistochemischen Techniken an humanem Lungen-Normalgewebe wie auch bei einer Reihe nicht-neoplastischer Lungenerkrankungen zu überprüfen, ob Proteine des „remodellings“, wie sie bei der experimentellen chronische Hypoxie der Maus beobachtet werden, auch bei Lungenerkrankungen des Menschen eine Rolle spielen.

Kompartiment-spezifisch wurden folgende Fragen untersucht:

1. Gibt es Unterschiede im Verteilungsmuster der Proteine Vimentin, Catalase, CD36, HMGB-1 und FHL-1 bei idiopathischer Lungenfibrose, idiopathischer pulmonaler Hypertonie, chronisch thromboembolischer pulmonaler Hypertonie und bei der chronisch obstruktive Lungenerkrankung in Relation zu „Normalgewebe“ von Lungenspendern.
2. Existieren Unterschiede in der Proteinexpression in humanem Lungengewebe mit chronischer Hypoxie gegenüber dem Tiermodell?
3. Welche Unterschiede in der Proteinexpression innerhalb der verschiedenen Kompartimente der humanen Lunge (Bronchien / Bronchioli, art. und ven. Gefäße und Alveolarraum) ergeben sich?

3 Material und Methoden

3.1 Ausgangsmaterial

In der Studie wurde Lungengewebe explantierter humaner Lungen untersucht. Die pathohistologische Beurteilung war zuvor im Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Gießen erfolgt. Das Gewebe stammte von 70 Patienten, die alle der wissenschaftlichen Untersuchung „diagnostischen Überschussmaterials“ schriftlich zugestimmt hatten. Insgesamt wurde Lungengewebe von 8 Patienten mit IPAH, 11 Patienten mit CTEPH, 15 Patienten mit UIP-Fibrose und 21 Patienten COPD untersucht (s. **Abb. 3**). Als Kontrolle diente nicht-transplantiertes Lungengewebe von 15 Lungenspendern. Die Untersuchungen wurden an kryo-asserviertem Lungengewebe wie auch an standardisiert formalin-fixierten und Paraffin-eingebettetem Lungengewebe durchgeführt. Das durchschnittliche Alter der Patienten der Untersuchungsgruppen ist in **Abb. 4** dargestellt.

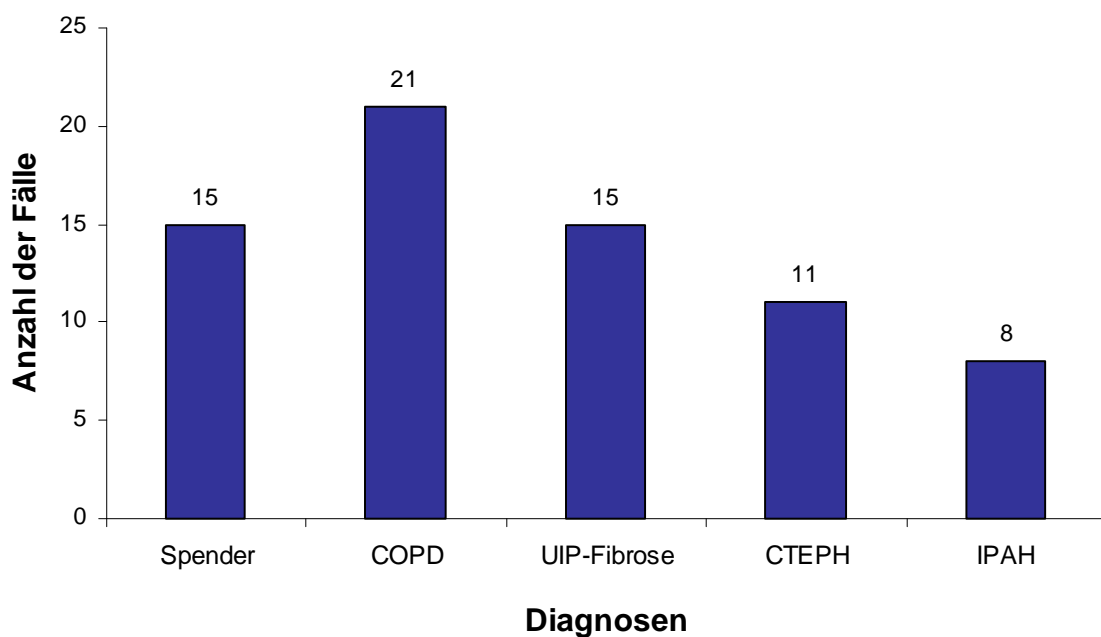


Abb. 3 Relevante Gruppen: Referenzlungen und Erkrankungsgruppen (n=70).

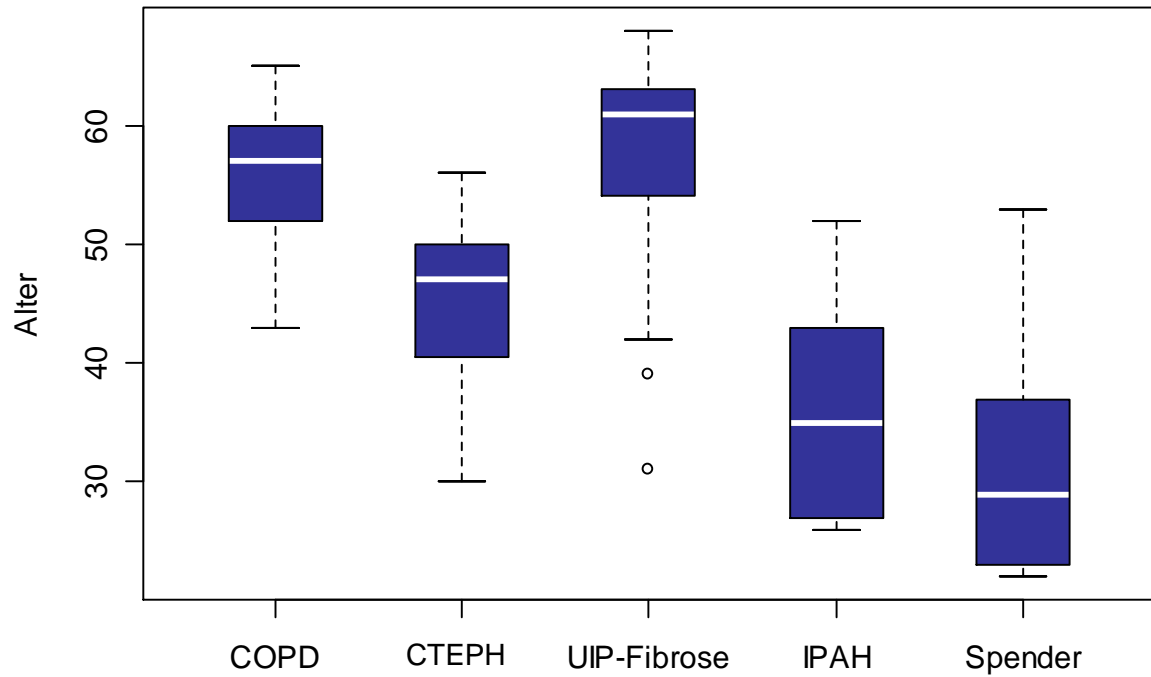


Abb. 4 Alter der Patienten, Median und 25 % bzw. 75 % Quartilen

3.2 Kleinmaterial

Bechergläser (20 - 2000 ml)

Schott (Mainz)

ChemMat™ Detection Kit

Dako Cytomation (Dänemark)

Deckgläser

Langenbrinck (Emmerdingen)

(26 x 76 mm, Glasdicke 0,13 -0,17 mm)

Deckgläser (24 x 36 mm)

Menzel-Gläser (Braunschweig)

Glycergel

DAKO A/S (Dänemark)

Küvetten

Schott (Mainz)

Kryoröhrchen („cryogenic vials“) 1,5 ml

Nalgene® (U.S.A.)

Mikrotom-Messer

Feather (Köln)

Objektträger (25 x 75 x 0,1 mm)

Menzel-Gläser (Braunschweig)

Objektträger

Langenbrinck (Emmerdingen)

(25 x 75 x 0,1 mm) SuperFrost® Plus

Parafilm® M

Fisher Scientific (Schwerte)

Pipetten (1 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl)	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen (steril, 10 – 1000 µl)	Fisher Scientific (Schwerte)
Reaktionsgefäße (0,2 – 2,0 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Tissue-Tek [®]	Sakura Finetek (Zoeterwoude, NL)
Kryoboxen für 50 x Schnittpräparate (170 x 83 x 30 mm)	neo-Lab [®] (U.S.A.)

3.3 Geräte

Brutschrank	Memmert (Schwabach)
Cryotom Jung CM 3000	Leica (Bensheim)
Lichtmikroskop mit Diskussionsbrücke	Olympus BH2 (Tokio)
Mikroskop	Olympus (Hamburg)
Mischer REAX 2000 („Vortexer“)	Heidolph (Schwabach)
pH-Meter CG 820	Schott (Mainz)
Rotationsmischer	Eppendorf (Hamburg)
Waage PM 480 DeltaRange [®]	Mettler (Gießen)
Wasserbad MEDAX	Nagel GmbH (Kiel)
Schlittenmikrotom Jung SM 2000R	Leica (Bensheim)
Mikrowelle 600Watt	Bosch (Gießen)
Digitalkamera JVC KY-F75 U	JVC (Hitachi, Tokio, Japan)
Lichtmikroskop (Axioskop)	Zeiss (Oberkochen)

3.4 Reagenzien

Aceton (100 %)	Roth (Karlsruhe)
Dimethylformamid	Merck (Darmstadt)
Eosin	Merck (Darmstadt)
Ethylendiamintetraacetat (1 m EDTA) gebrauchsfertig pH 8,0 (0,372 g/l)	Sigma (Taufkirchen)

Äthanol (100 %)	Baker (Deventer, NL)
Hämalaun	Merck (Darmstadt)
HCl-Alkohol (0,5 % HCl in 70 % Äthanol)	Merck (Darmstadt)
Isopropanol (100 %)	Sigma (Taufkirchen)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Laevamisol	Sigma (Taufkirchen)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Naphtol	Sigma (Taufkirchen)
Na ₂ CO ₃ (25 %)	Sigma (Taufkirchen)
Pertex	Melite (Burgdorf)
Propandiol	Merck (Darmstadt)
Xylol	Sigma (Taufkirchen)

3.5 Fotodokumentation

Die immunhistochemischen Präparate wurden mit einem Lichtmikroskop (Axioskop, Zeiss, Oberkochen) und mit einer Digitalkamera (JVC KY-F75 U, Hitachi, Tokio, Japan) mit Hilfe des Programms „Diskus“ (Version 4.50.1003, Hilgers, Königswinter) fotografiert und in einem PC (HP Workstation XW 4100) gespeichert.

3.6 Software

Für die Textverarbeitung wurde Microsoft Word XP verwendet.

Zur weiteren Bearbeitung der Fotos wurde mit IrfanView Version 3.98 für Windows gearbeitet. Die Bilder wurden bei Bedarf maßstabgetreu elektronisch angepasst.

Im Anschluss an die statistischen Berechnungen mittels des Programmes PC-Statistik (Version 2.05, Top Soft, Hannover 1990) wurden die Diagramme mit Microsoft Excel erstellt.

3.7 Immunhistochemie

In histologischen Schnittpräparaten lassen sich Proteine mit Hilfe von Antikörpern nachweisen. Die Beurteilung der Immunreaktivität wird mit Hilfe eines Lichtmikroskopes vorgenommen. Seit etwa Ende der 70iger Jahre des 20. Jahrhunderts steht diese Methodik zur Proteinlokalisierung auch für formalin-fixiertes in Paraffin eingebettetes Gewebe zur Verfügung (29;100). Eine Vorauswahl des Materials für die Immunhistochemie erfolgte mittels histologischer Beurteilung nach einer Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung der Schnittpräparate (HE-Färbung; s.Kap.3.7.12).

3.7.1 Gewebepreparation für Gefrierschnitte

Natives Lungengewebe wurde nach makroskopischer Präparation in Probenröhrchen eingebracht und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert. Dieser Teil der Präparation erfolgte überwiegend direkt am Explantationsort. Den mir persönlich nicht bekannten Kolleginnen und Kollegen danke ich herzlich. Die kryoasservierten Gewebeanteile wurden in 1.5 ml Kryoröhrchen („cryogenic vials“) gelagert und mit „Tissue-Tek“-Gel eingebettet.

3.7.2 Anfertigung von Gefrierschnitten

Die Gefrierschnitte wurden auf SuperFrost[®] Plus-Objekträger aufgezogen.. Zur Herstellung wurde der Tissue-Tek-Gewebeblock in ein Kryostaten eingespannt. Jeweils 7 - 10 μm dicke Serienschnitte wurden angefertigt. Nach dem Trocknen bei RT für 12 - 24 Stunden wurden die Schnitte bei -20 °C in Kryoboxen gelagert oder sofort weiterverarbeitet (vgl. Absatz 3.7.6 und 3.7.7).

3.7.3 Anfertigung von Paraffinschnitten

Paraffinschnitte wurden mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms angefertigt. Der einzelne Schnitt wurde in ein erhitztes Wasserbad (40 °C) überführt, wo er sich aufgrund der Oberflächenspannung spreitete. Nach Aufnahme des Schnittes mit einem Standard-Objekträger wurden die Schnittpräparate über Nacht bei 37 °C im Brutschrank getrocknet. Die Entparaffinierung erfolgte für 10 Minuten in Xylol. Danach wurden die Präparate für 10 Minuten in Aceton und anschließend 10 Minuten in einem Aceton-TBS-Gemisch (1:1) inkubiert.

3.7.4 Mikrowellenvorbehandlung

Zur „Demaskierung“ der Epitope wurden die Schnitte in der Mikrowelle 3 x für je 5 Minuten in EDTA (gebrauchsfertig, pH 8.0) bei 600 Watt erhitzt und anschließend bei Raumtemperatur 20 min. abgekühlt (96). Es folgte die Immunfärbung.

3.7.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Mit diesen Methoden lässt sich die Expression von Epitopen in Gewebeschnitten durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion darstellen. Bei der immunhistochemischen Färbung an Gefrierschnitten wurde die APAAP-Methode verwendet. Bei der immunhistochemischen Färbung an Paraffinschnitten wurde die LSAB-Methode verwendet.

3.7.6 APAAP-Methode

Der APAAP-Komplex besteht aus einer intestinalen alkalischen Phosphatase und einem monoklonalen Maus-Anti-Alkalischen-Phosphatase-Antikörper und wurde in der Verdünnung von 1 : 100 (bei der Untersuchung der Vimentin-Immunreaktivität mit einer Verdünnung von 1 : 50) eingesetzt. Die APAAP-Methode wurde mit folgenden 4 - 5 Schritten (abhängig vom Primärantikörper) durchgeführt.

1. Primärantikörper (monoklonal bzw. polyklonal), 2. Brückenantikörper (falls Primär-AK polyklonal, dann folgt ein zweiter Brücken-AK), 3. APAAP-Komplex, 4. Substrat-Chromogenlösung (Farbreaktion). Der Brückenantikörper muss gegen Immunglobuline derjenigen Spezies gerichtet sein, von der sowohl der Primärantikörper als auch der APAAP-Komplex stammt. Es ist daher je nach Primärantikörper notwendig, dass ein oder zwei Brückenantikörper hintereinander geschaltet werden.

Kryostatschnitte wurden vor der Immunhistochemie aufgetaut und für 10 Minuten in Aceton fixiert. Nach dem Trocknen wurde das Gewebe immungefärbt.

Die Schnittpräparate wurden in einer feuchten Kammer mit 100 µl des Erstantikörpers für eine vorher festgelegte Inkubationszeit bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte das dreimalige Waschen der Schnitte mit TBS. Dann folgte eine 30-minütige Inkubation mit 100 µl des Brückenantikörpers und eine erneute dreimalige Waschung mit TBS. Zuletzt wurde für 30 Minuten mit 100 µl des APAAP-Komplexes inkubiert. Für die anschließende Entwicklung (Färbereaktion) wurde je nach der Menge der Objekte die Entwicklerlösung angesetzt. Die Küvetten wurden für die nun folgende Färbereaktion mit Entwicklerlösung

gefüllt und für 30 Minuten mittels Mischer inkubiert. Nach erneuter 3-maliger TBS-Waschung schloss sich eine Hämatoxylin-Gegenfärbung der Präparate an. Die Präparate wurden für 45 Sekunden in ein Hämatoxylin-Färbebad getaucht und anschließend 2 - 3 mal in Leitungswasser gebläut. Zuletzt wurden die Schnitte mit Glyceringel (wasserlöslich) und handelsüblichen Deckgläsern zur Erhaltung der Färbung eingedeckt.

3.7.7 LSAB-Methode

Bei der immunhistochemischen Färbung an Paraffinschnitten mit HMGB1 kam das ChemMate™ Detection Kit der Firma DakoCytomation zum Einsatz.

Die LSAB (markiertes Streptavidin-Biotin)-Methode beruht auf einem dreistufigen Verfahren. Zuerst wurde ein spezifischer Primärantikörper an das nachzuweisende Epitop gebunden. Dann wurde mit ChemMate™ Link, biotinylierter Sekundärantikörper inkubiert und zuletzt mit ChemMate™ Streptavidin-Peroxidase. Letztere setzt in der Nachweisreaktion ein Substrat in einen Farbstoff um. Die Reaktion wird mit Hilfe von DAB+Chromogen (3,3'-Diaminobenzidine-Tetrahydrochlorid) visualisiert.

Die Paraffinschnitte wurden zunächst entparaffiniert und nach dem Abkühlen der Mikrowellenvorbehandlung (s. Absatz 3.7.4) und wie unter der APAAP-Methode beschrieben, mit dem 1. Antikörper inkubiert und mit TBS gewaschen.

Es folgte eine 30-minütige Inkubation mit 100 µl des Sekundärantikörpers und eine erneute TBS-Waschung. Dann wurde für 30 Minuten mit 100 µl Avidin und Biotin-gekoppelter Peroxidase (LSAB) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit TBS wurde die endogene Peroxidase geblockt, indem das Präparat für 10 Minuten mit 30 % H₂O₂ in Methanol bei RT inkubiert wurde. Nach erneuter TBS-Waschung wurde für 10 min mit 100 µl DAB+Chromogen-Lösung entwickelt. Auch hier schloss sich die Hämatoxylin-Gegenfärbung für 45 Sekunden an sowie das Bläuen 2 - 3-mal in Leitungswasser. Abschließend wurden die Schnitte mit Glyceringelatine (wasserlöslich) und handelsüblichen Deckgläsern eingedeckt.

3.7.8 Antikörper

In dieser Arbeit eingesetzte Antikörper:

Tab. 2 Antikörper und Konzentration

Antikörper ¹	Firma/Nr.	Tier	Spezifität ²	Arbeitskonz.
Vimentin-IgG1 MK	Dako Nr. M0725	Maus	h, r, c	1 : 1000
CD 36 PK	St.Cruz 9154	Kaninchen	h, r, m	1 : 200
Catalase PK	Abcam ab1877	Kaninchen	h, r, m, c, co	1 : 2500
HMBG-1 IgG PK	Upstate	Kaninchen	h	1 : 100
FHL-1 PK	St.Cruz 13403	Ziege	h, r, m	1 : 10
MAK	Dako	Maus	-	1 : 500
KAM	Dako	Kaninchen	-	1 : 500/ 1 : 40
APAAP	Dako	Maus	-	1 : 100/ 1 : 50
LSAB	Dako	Maus	-	gebrauchsfertig
Goat-konjugiert-AP	Dako	Kaninchen	-	1 : 100

¹ PK= Polyklonal; MK= Monoklonal

² h= human; r= Ratte; m= Maus; co= Kuh; c=Huhn

3.7.9 Primärantikörper der Immunreaktivität

Anti-V9: Vimentin wird von allen mesenchymalen Zellen exprimiert und kommt im Gewebe ubiquitär vor. Der monoklonale Maus-Anti-human-Antikörper erkennt ein Intermediärfilament (Vimentin-Typ) von 57 kDa und mit einem Durchmesser von 8 - 10 nm, das von mesenchymalen Zellen wie Endothelien, Fibrozyten und glatter Gefäßmuskulatur exprimiert wird (78). Weiterhin wird die Auswahl der Gewebebereiche für die immunhistochemische Diagnostik erleichtert und erlaubt eine bessere Interpretation der Ergebnisse.

Anti-Catalase: Der polyklonale Kaninchen-Anti-humane Catalase-Antikörper (der Klasse IgG) ist ein klassischer Marker für Peroxisomen. Radi et al. (86) beschrieben unter anderem die Immunreaktivität von Anti-Catalase.

Anti-CD36: Der polyklonale Kaninchen-Anti-humane CD36-Antikörper (Subklasse IgG1) erkennt ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 88 kDa, das u. a. in Thrombozyten exprimiert wird. CD36 wird von Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen, Endothel und multiplen humanen Tumorzelllinien gebildet (6). Das Leukozytendifferenzierungs-Antigen CD36 wurde unter anderem als Membranprotein von Mammaepithelzellen charakterisiert (44).

Anti-HMGB-1: Der polyklonale Kaninchen-Anti-humane HMGB1-Antikörper erkennt das HMGB1-Protein mit einem Molekulargewicht von 32 kDa, das sowohl intrazellulär als auch extrazellulär vorkommt (11).

Anti-FHL-1: Der polyklonale Ziege-Anti-humane FHL1-Antikörper (SLIM1) richtet sich gegen ein Peptid am aminoterminalen Ende von FHL-1, welches im Zytosol von Myoblasten und differenzierten Myozyten zu finden ist (16).

3.7.10 Kontrollen

Positiv-Kontrollen. Als Positivkontrolle wurde Vimentin an allen Gewebepräparaten gefärbt und ausgewertet. Battifora et al. beschrieben die interne Kontrolle mit Vimentin zur Qualitätssicherung der Antigene (8).

Positiv-Kontrollen und Etablierung der immunhistochemischen Färbung bei FHL-1:

Als Positivkontrolle wurde FHL-1 an Herzmuskulaturgewebe (rechter Ventrikel) der Maus gefärbt. Die Positivkontrolle diente zur Kontrolle des FHL-1-Antikörpers. FHL-1 wurde lokalisiert in Myoblasten, Myotubuli und differenzierten Myozyten.

Negativ-Kontrollen. Bei jedem immunhistochemischen Färbeprozess wurden ein bis zwei Schnitte als Negativkontrolle mitgeführt. Die Proben, die als solche dienten, wurden genau wie die zu untersuchenden Schnittpräparate behandelt (fixiert, eingebettet), jedoch anstelle des Primärantikörpers mit einem unspezifischen Immunglobulin oder Diluent inkubiert.

3.7.11 Vorversuche

Zur Etablierung der immunhistochemischen Protokolle wurden ein Reihe von Vorversuchen durchgeführt. Für die Färbereihe von Vimentin wurde der Brückenantikörper KAM in einer Verdünnung von 1 : 40 und APAAP von 1 : 50 eingesetzt. Diese Verdünnungen bezogen sich auf vorangegangene Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe. Für den Vimentin-Primärantikörper ließ sich nach Titration eine optimale Verdünnung für die Färbung an Gefrierschnitten von 1 : 1000 festlegen (s. **Tab. 2**, Abs. 3.7.8.). Des Weiteren erfolgte die Optimierung der Negativkontrollen durch Titrations der Brückenantikörper MAK, KAM und APAAP, damit unspezifische Färbereaktionen ausgeschlossen werden konnten. Das Ergebnis der Titrations ergab folgende optimierte AK-Konzentration: MAK: 1 : 500, KAM: 1 : 500, APAAP: 1 : 100.

Für die Primärantikörper wurden schließlich auch nach Titration folgende optimierte AK-Konzentration ermittelt: Anti-Catalase: 1 : 2500, Anti-CD36: 1 : 200, Anti-HMGB-1: 1 : 100, Anti-FHL-1: 1 : 10.

Da Anti-FHL-1 von der Ziege abstammt, wurde ein Brückenantikörper „Anit-Goat“, der mit AP konjugiert ist, eingesetzt. Dieser Antikörper wurde ebenfalls nach Titration in einer Verdünnung von 1 : 100 eingesetzt. Die Inkubationszeiten der einzelnen Antikörper wurden in dieser Studie aus vorangegangenen Studien und Erfahrungswerten übernommen.

3.7.12 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Paraffinschnitte wurden zur Entparaffinierung zuerst 2 x für 10 min. in Xylol gegeben und anschließend erfolgte eine absteigende Alkoholreihe (2 x 100%iges Ethanol, 2 x 96%iges Ethanol, 2 x 70%iges Ethanol; für je 1 min.). Die Paraffinschnitte wurden für 3 - 4 min. in Hämalaun und die Gefrierschnitte für 45 s in Hämalaun gegeben; danach erfolgte eine zweimalige Spülung mit Leitungswasser. Nach der Eosin-Färbung und Spülen mit Aqua dest. folgte ein Wasserentzug in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2 x 70%iges Ethanol, 2 x 96%iges Ethanol, 2 x 100%iges Ethanol; für je 1 min.). Anschließend wurden die Schnitte in Xylol gegeben und mit Pertex eingedeckt; nach kurzem Trocknen konnten sie zur Qualitätskontrolle und Eignungskontrolle unter dem Mikroskop betrachtet werden. Das Färbeergebnis zeigte die Zellkerne blau gefärbt, Plasma und Interzellulärsubstanzen wurden in unterschiedlichen Rottönen gefärbt.

3.7.13 Gebrauchslösungen und Entwicklungslösung

Ansätze der Gebrauchslösungen:

Tab. 3 Gebrauchslösungen

Entwicklungspuffer	Waschpuffer	Neufuchsin	Propandiolansatz
87 g NaCl 15 g Tris-HCl 49 g Tris Base 1750 ml Aqua dest.	18 g NaCl 137 g Tris-HCl 175.5 g Tris Base ad 20 l Aqua dest.	5 g Neufuchsin 100 ml 2M HCl	5 g Propandiol 1000 ml Aqua dest.
Die Aufbewahrung erfolgt in einer dunklen Flasche bei RT	Der pH-Wert sollte zwischen 7.4 und 7.6 liegen. Lagerung bei RT.	Die Aufbewahrung erfolgt in einer dunklen Flasche bei 4 °C	Die Aufbewahrung erfolgt in einer dunklen Flasche bei 4 °C

Zusammensetzung der Entwicklerlösung pro Küvette:

Tab. 4 Entwicklungslösung

Lösungen	Küvettenzahl	1
A	Entwicklungspuffer	35 ml
	Propandiol-Stammlösung	12.5 ml
	Levamisol	20 mg
B	Natriumnitrit	10 mg
	Aqua dest.	250 µl
	Neufuchsin	100 µl
C	Naphtol-AS-BI-Phosphat	25 mg
	Dimethylforamid	300 µl

Lösung B wurde in Lösung A gemischt und anschließend wurde der Inhalt der Lösung C in Lösung A hinzugegeben und der pH-Wert 8,7 - 8,8 eingestellt. Nach Filtration war die Entwicklerlösung gebrauchsfertig. (Die Entwicklerlösung sollte immer kurz vorher angesetzt werden).

3.8 Auswertung

Vor Beginn der immunhistochemischen Färbung wurde die Vimentin-Immunreaktivität geprüft (s. Abs. 3.7.10). Zur weiteren Auswertung wurden nur die Präparate herangezogen, die eine gut erhaltene Vimentin-Immunreaktivität zeigten. Die Vimentin-Färbung wurde aber nicht nur zur Überprüfung des Lungengewebes eingesetzt, sondern auch im immunhistologischen Vergleich der Erkrankungsgruppen ausgewertet.

Um Kreuzreaktionen einzelner Antikörper und dadurch entstandene falsch positive Ergebnisse ausschließen zu können, wurde bei jeder immunhistochemischen Färbung eine Negativkontrolle durchgeführt.

Um die ermittelten Daten aus der immunhistochemischen Untersuchung einer statistischen Analyse zugänglich zu machen, wurde der Immunreaktive Score (IRS) in Anlehnung an Remmele und Stegner modifiziert (87). Ursprünglich war diese Methode für den immunhistochemischen Nachweis von Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Mammakarzinomgewebe entwickelt worden. Anhand dieser Methode untersuchte man die Färbeintensität im Gewebepräparat.

Wir haben diese Methode in einer abgewandelten Form übernommen und daher wurde folgender Score ermittelt (s. **Abb. 38**; S. 99) (56).

Der Färbeintensitäts-Score:

„keine Färbung“	entsprach einer Score von	0
„schwache Färbeintensität“	entsprach einer Score von	0.5 - 1.0
„mittlere Färbeintensität“	entsprach einer Score von	1.5 - 2.0
„starke Färbeintensität“	entsprach einer Score von	2.5 - 3.0

Die Auswertung jedes einzelnen Präparates erfolgte an einem Lichtmikroskop mit Diskussionsbrücke zusammen mit Prof. Bohle, wobei unter verschiedenen Vergrößerungen die Färbeintensität ermittelt wurde.

3.9 Statistik

Zur Darstellung der einzelnen Ergebnisse wurden die immunhistologischen Befunde mit Hilfe der Tabellenkalkulationssoftware „Microsoft Excel 2000“ für Windows archiviert und nach Klassierung einer statistischen Auswertung (Tests mit direkter Dateneingabe; Analyse von „Kontingenztafeln“) zugänglich gemacht (s. Kap.3.6). Es wurde der „Exakte Test von R. A. Fisher“ (90) benutzt, um Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen zu validieren. Zum Vergleich der Gruppen untereinander wurden die Ergebnisse des Fisher-Tests tabellarisch dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Differentielle Immunreaktivität humanen Lungengewebes bei nicht-neoplastischen Lungenerkrankungen

Die Erkrankungsgruppen, die Basis dieser Studie sind, wurden in **Abb. 3** (s. Kap.3.1) zusammen mit der Gruppe der Spender dargestellt und zur Auswertung herangezogen. Insgesamt wurden im Lungengewebe 13 verschiedene morphologische Strukturen untersucht:

- Bronchien / Bronchioli: Epithel (Tunica mucosa), glatte Muskulatur (Tunica musculairs), Bindegewebe (Tunica adventitia)
- Art. und ven. Gefäße: jeweils Endothel (Tunica intima), glatte Muskulatur (Tunica media), Bindegewebe (Tunica adventitia)
- Alveolarraum: Alveolarmakrophagen, Alveolarepithel, interstitielles Bindegewebe, interstitielle glatte Muskulatur (sofern vorhanden)

Die Immunreaktivität folgender Proteine wurde untersucht:

- Vimentin
- Catalase
- CD36
- HMGB-1
- FHL-1

Die Ergebnisse der Immunreaktivität der vorgenannten histologischen Kompartimenten werden im Folgenden graphisch und tabellarisch dargestellt.

4.1.1 Vimentin

Bronchien / Bronchioli:

Das Epithel der Bronchien / Bronchioli zeigte bei der Färbung mit anti-Vimentin keine Immunreaktivität, weder in den verschiedenen Erkrankungsgruppen noch in den Referenz-(Spender)-Lungen. Die Muskulatur der Bronchien / Bronchioli war in 20 - 60% der Fälle der verschiedenen Erkrankungsgruppen Vimentin-positiv, bei vorwiegend schwacher

Färbeintensität. Die Referenz-(Spender)-Lungen zeigten in der Bronchialmuskulatur eine Immunreaktivität von 30 % mit einem Färbeintensitätsgrad von 0.5 - 1.0. Die Adventitia der Bronchien / Bronchioli zeigte in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und in den Referenz-(Spender)-Lungen einen Färbeintensitätsgrad von 0.5 - 1.0, wobei der Prozentsatz der Fälle zwischen 20 - 100% schwankte.

Signifikante Unterschiede bei der Vimentin-Immunreaktivität der glatten Muskulatur der Bronchien lagen zwischen den Untersuchungsgruppen nicht vor.

Arterielle Gefäße:

Das Endothel in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und in den Referenz-(Spender)-Lungen wurde mit den Färbeintensitätsgraden von 0.5 - 1.0 bis 2.5 - 3.0 angefärbt. Es waren jeweils 100 % der arteriellen Endothelien Vimentin-positiv (s. **Abb. 7**, S. 32). In der glatten Muskulatur waren 15 - 75% der Fälle der verschiedenen Erkrankungsgruppen schwach Vimentin-positiv. Die COPD-Lungen zeigten in der glatten Muskulatur in 15 % der Fälle eine schwache Immunreaktivität. Dagegen war in 73 % der Spenderlungen eine Vimentin-Immunreaktivität nachweisbar. Die glatte Muskulatur der UIP-Fibrose-Lungen war in 7 von 15 Fällen (46 %) Vimentin-positiv (s. **Abb. 8**; S. 33). Die arterielle Adventitia wurde mit den Färbeintensitätsgraden von 0.5 - 1.0 und 1.5 - 2.0 angefärbt, wobei bis zu 75 % der untersuchten Lungen eine Immunreaktivität zeigten.

Die Vimentin-Immunreaktivität im arteriellen Endothel ergab keinen deutlichen Unterschied, weder in den verschiedenen Erkrankungsgruppen noch im Vergleich zu den Referenz-(Spender)-Lungen (s. **Tab. 5**; S. 32). Statistisch hochsignifikante Unterschiede der Vimentin-Immunreaktivität arterieller Muskulatur bestand zwischen den COPD-Lungen und den Referenz-(Spender)-Lungen ($p=0,0007$; Fisher's Exakter Test) (s. **Abb. 5**, S. 30). Weiterhin zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den COPD-Lungen und den UIP-Fibrose-Lungen ($p=0,047$; Fisher's Exakter Test) (s. **Tab. 6**; S.33).

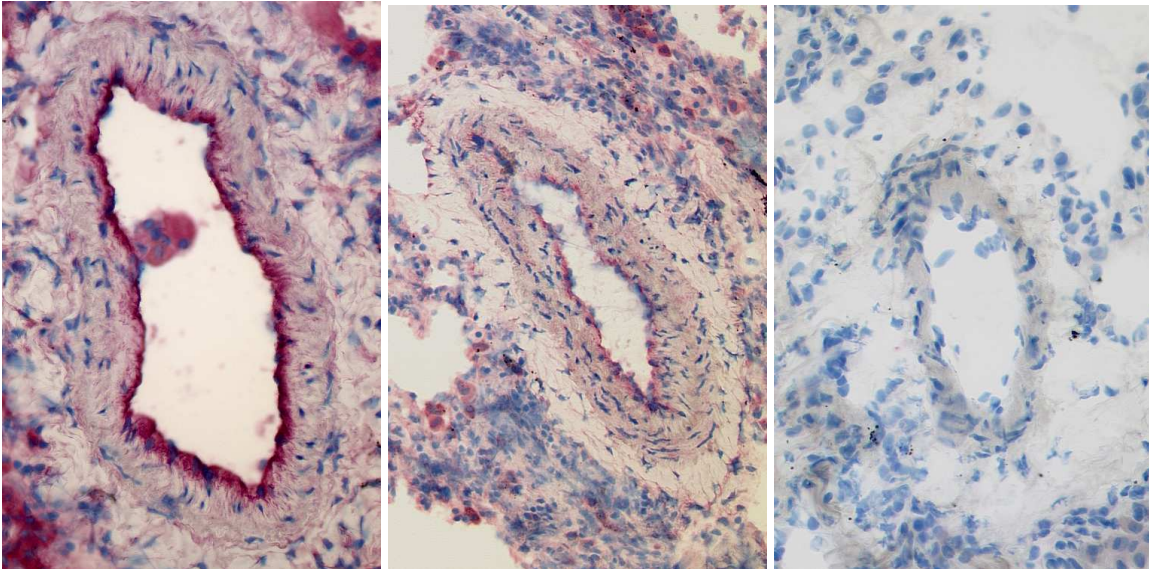


Abb. 5 Vimentin-Färbung in humanen Arterien. **Links:** Spenderlunge (OV x 20), **Mitte:** COPD-Lunge (OV x 10), **Rechts:** Negativ-Kontrolle (COPD-Lunge) (OV x 20).

Venöse Gefäße:

Das Endothel in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und in den Referenz-(Spender)-Lungen war in 95 – 100 % der Lungen immunreaktiv, wobei es eine schwache, mittlere bis starke Färbeintensität aufzeigte (s. **Abb. 9**; S. 34). Die glatte Muskulatur zeigte eine schwache Vimentin-Immunreaktivität bei 20 - 64 % der Lungen in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und den Referenz-(Spender)-Lungen. Die Proteinexpression der glatten Muskulatur in den COPD-Lungen zeigte hier nur 20 % mit einer schwachen Färbeintensität. Die der Referenz-(Spender)-Lungen wurde mit 57 % schwach angefärbt (s. **Abb. 6**; S. 31 und **Abb. 10**; S. 35). Die venöse Adventitia zeigte einen Färbeintensitätsgrad von 0.5 - 1.0, wobei zwischen 40 – 90 % der untersuchten Lungen eine Immunreaktivität zeigten.

Die Vimentin-Immunreaktivität im venösen Endothel ergab keinen deutlichen Unterschied, weder in den verschiedenen Erkrankungsgruppen noch im Vergleich zu den Referenz-(Spender)-Lungen (s. **Tab. 7**; S. 34). Unterschiede der Vimentin-Immunreaktivität venöser Muskulatur bestanden jedoch zwischen den COPD-Lungen und den Referenz-(Spender)-Lungen ($p=0,027$; Fisher's Exakter Test) (s. **Tab. 8**; S. 35).

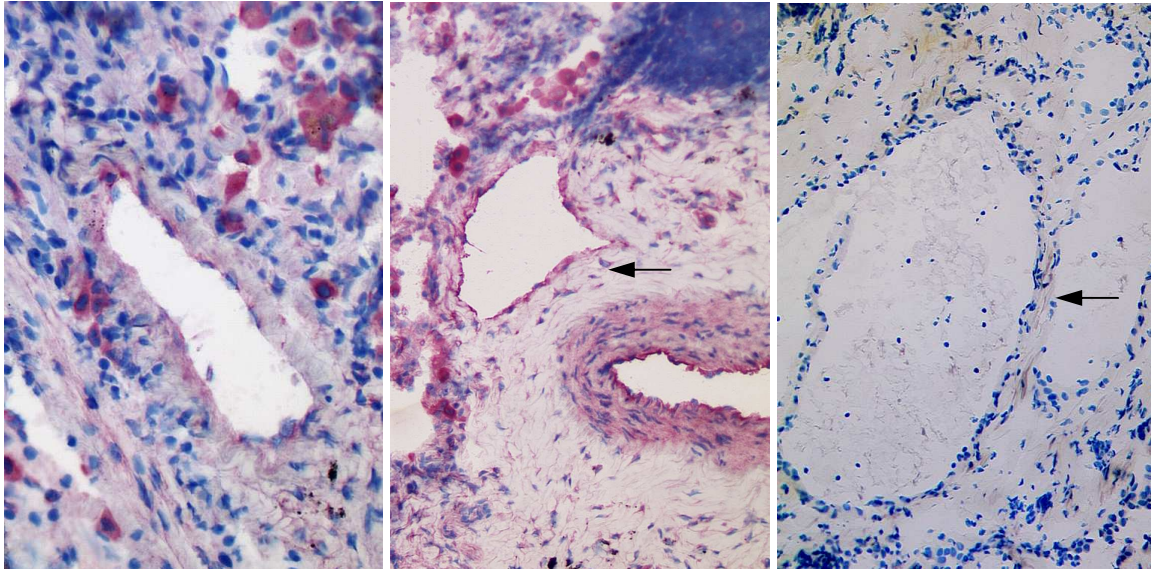


Abb. 6 Vimentin-Färbung in humanen Venen. **Links:** COPD-Lunge (OV x 20), **Mitte:** Spenderlunge (OV x 10), **Rechts:** Negativ-Kontrolle (COPD-Lunge) (OV x 10).

Alveolarmakrophagen und Alveolarepithel:

Die Alveolarmakrophagen in der verschiedenen Erkrankungsgruppen und in den Referenz-(Spender)-Lungen wurden zu 100 % angefärbt, wobei eine schwache, mittlere bis starke Färbeintensität aufgezeigt wurde (s. **Abb. 11**; S. 36). Die Alveolarepithelzellen wurden nur bei 10 % der CTEPH-Lungen mit einer mittleren Immunreaktivität (1.5 - 2.0) nachweisbar. Die anderen Erkrankungsgruppen und die Referenz-(Spender)-Lungen waren nicht Vimentin-positiv.

Die Vimentin-Immunreaktivität in den Alveolarmakrophagen und im Alveolarepithel zeigte keine deutlichen Unterschiede bei den untersuchten Lungen (s. **Tab. 9**; S. 36).

Interstitielles Bindegewebe und interstitielle glatte Muskulatur:

Das Bindegewebe der verschiedenen Erkrankungsgruppen und der Referenz-(Spender)-Lungen war in 100 % der Lungen immunreaktiv, wobei es eine schwache, mittlere bis starke Färbeintensität aufzeigte. Die interstitielle glatte Muskulatur zeigte lediglich in den Erkrankungsgruppen der UIP-Fibrose-Lungen, der CTEPH-Lungen und der IPAH-Lungen eine schwache Vimentin-Immunreaktivität auf.

Die Vimentin-Immunreaktivität im interstitiellen Bindegewebe und in der interstitiellen glatten Muskulatur zeigten keine Unterschiede bei den untersuchten Lungen.

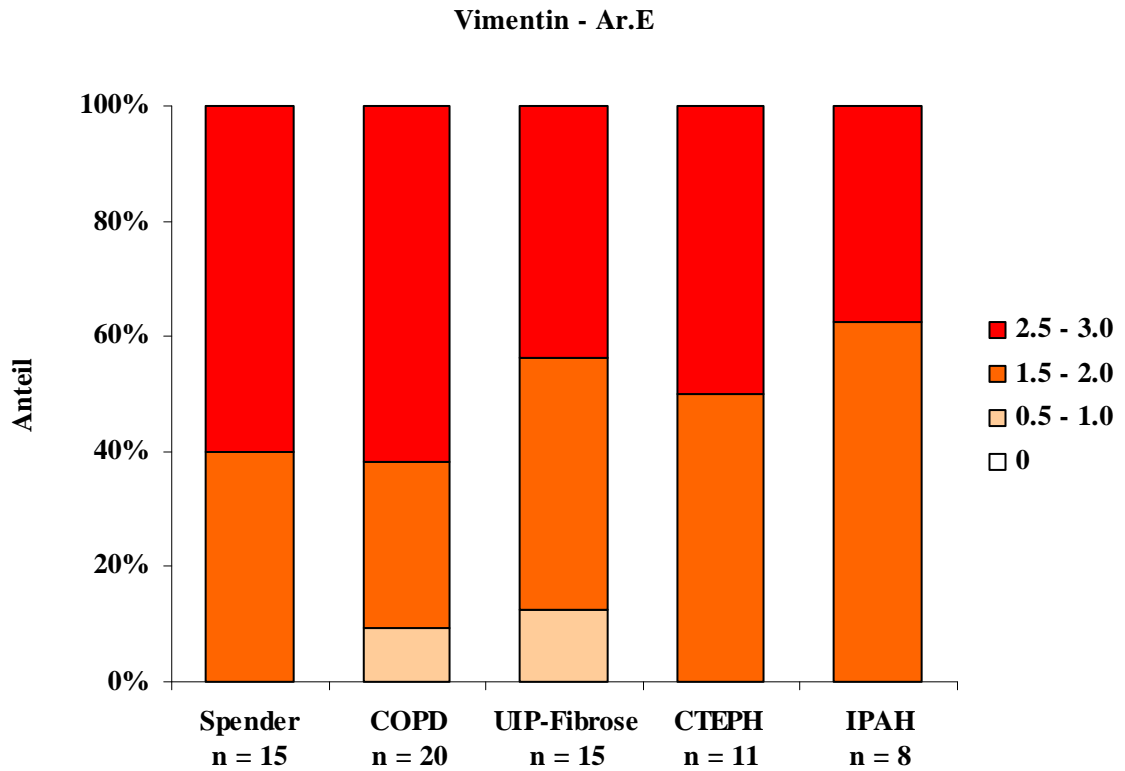


Abb. 7 Vimentin-Immunreaktivität (0 - 3.0) im Endothel der arteriellen Gefäße (Ar.E)

Tab. 5 Vim.-Ar.E: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).

	n	Spender	COPD	UIP	CTEPH
Spender	15				
COPD	20	ns			
UIP	15	ns	ns		
CTEPH	11	ns	ns	ns	
IPAH	8	ns	ns	ns	ns

Vimentin - Ar.M

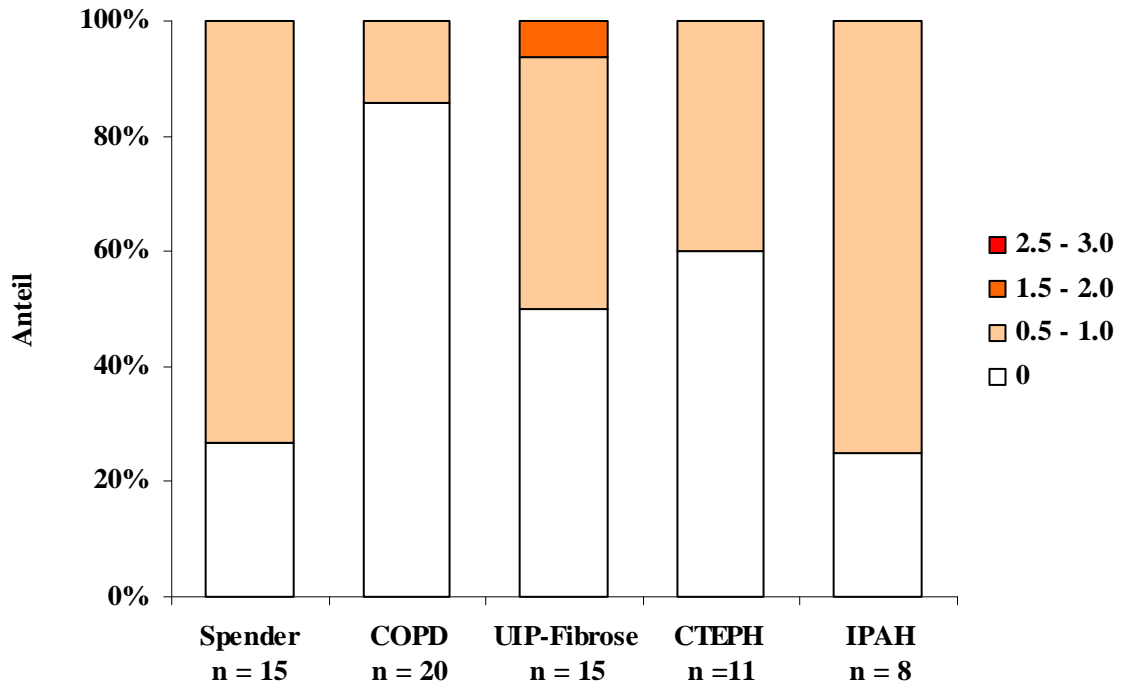


Abb. 8 Vimentin-Immunreaktivität (0 - 3.0) der glatten Muskulatur arterieller Gefäße (Ar.M).

Tab. 6 Vim.-Ar.M: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).

	n	Spender	COPD	UIP	CTEPH
Spender	15				
COPD	20	0.0007			
UIP	15	ns	0.047		
CTEPH	11	ns	ns	ns	
IPAH	8	ns	ns	ns	ns

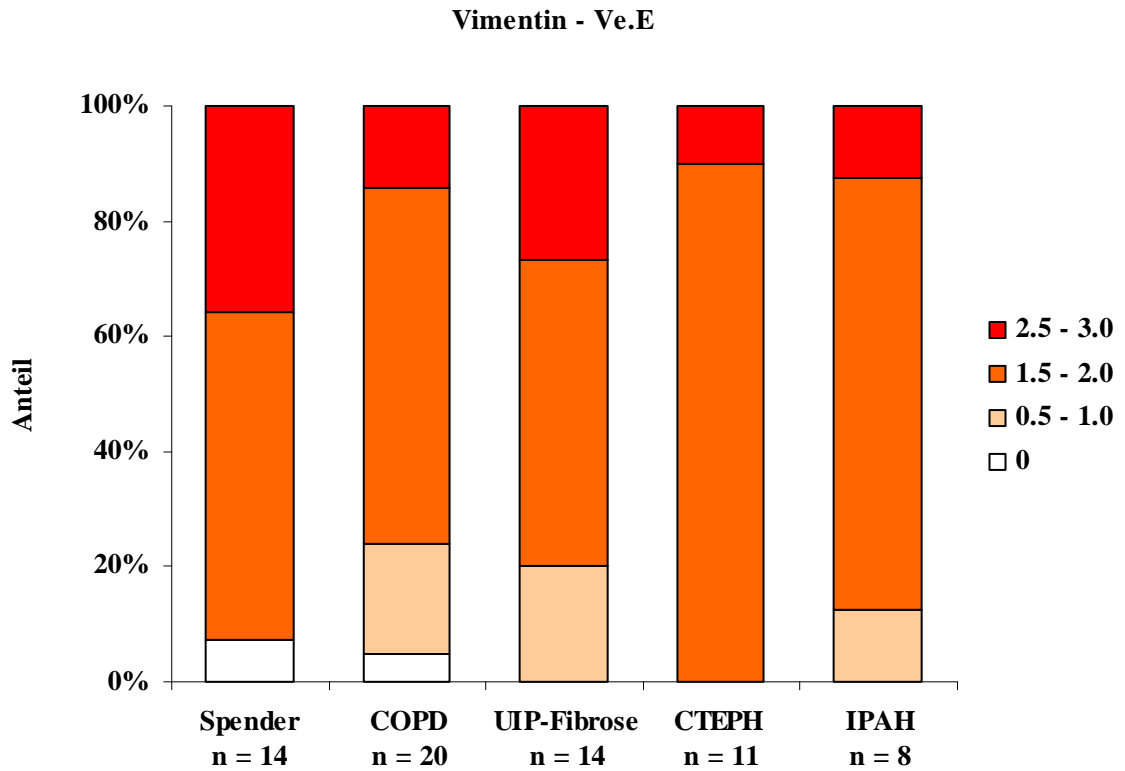


Abb. 9 Vimentin-Immunreaktivität (0 - 3.0) im Endothel der venösen Gefäße (Ve.E).

Tab. 7 Vim.-Ve.E: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).

	n	Spender	COPD	UIP	CTEPH
Spender	14				
COPD	20	ns			
UIP	14	ns	ns		
CTEPH	11	ns	ns	ns	
IPAH	8	ns	ns	ns	ns

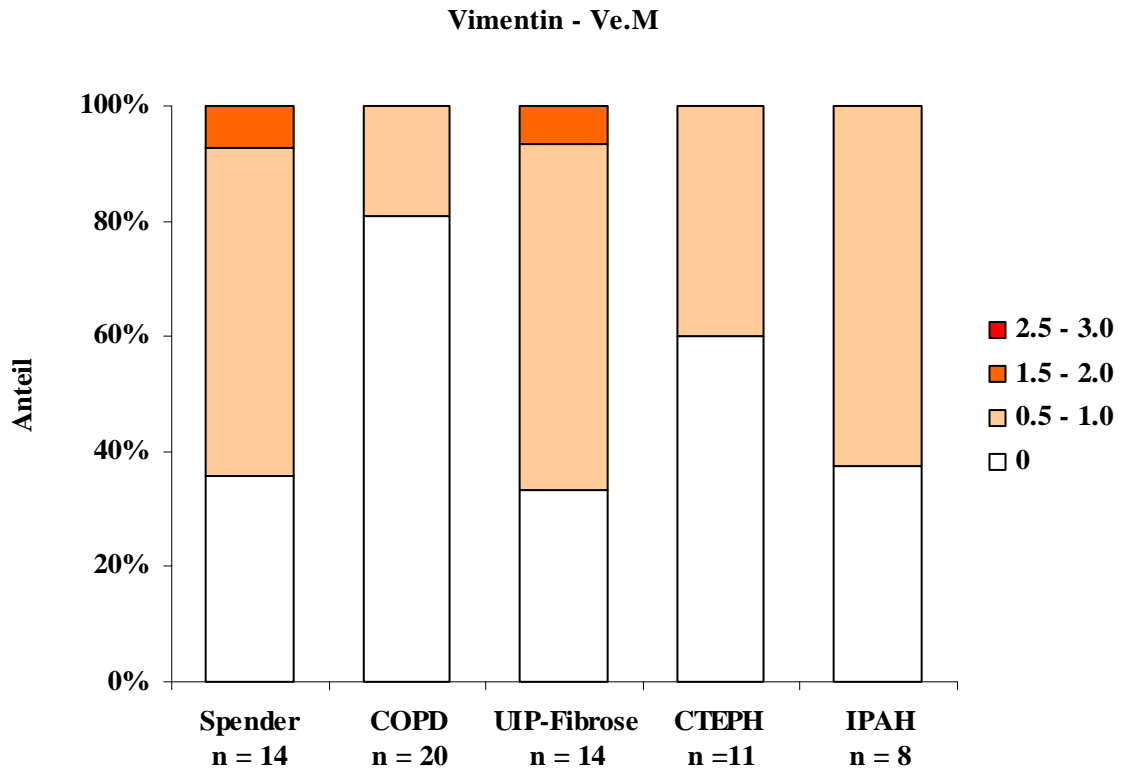


Abb. 10 Vimentin-Immunität (0 - 3.0) der glatten Muskulatur venöser Gefäße (Ve.M).

Tab. 8 Vim.-Ve.M: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).

	n	Spender	COPD	UIP	CTEPH
Spender	14				
COPD	20	0.027			
UIP	14	ns	ns		
CTEPH	11	ns	ns	ns	
IPAH	8	ns	ns	ns	ns

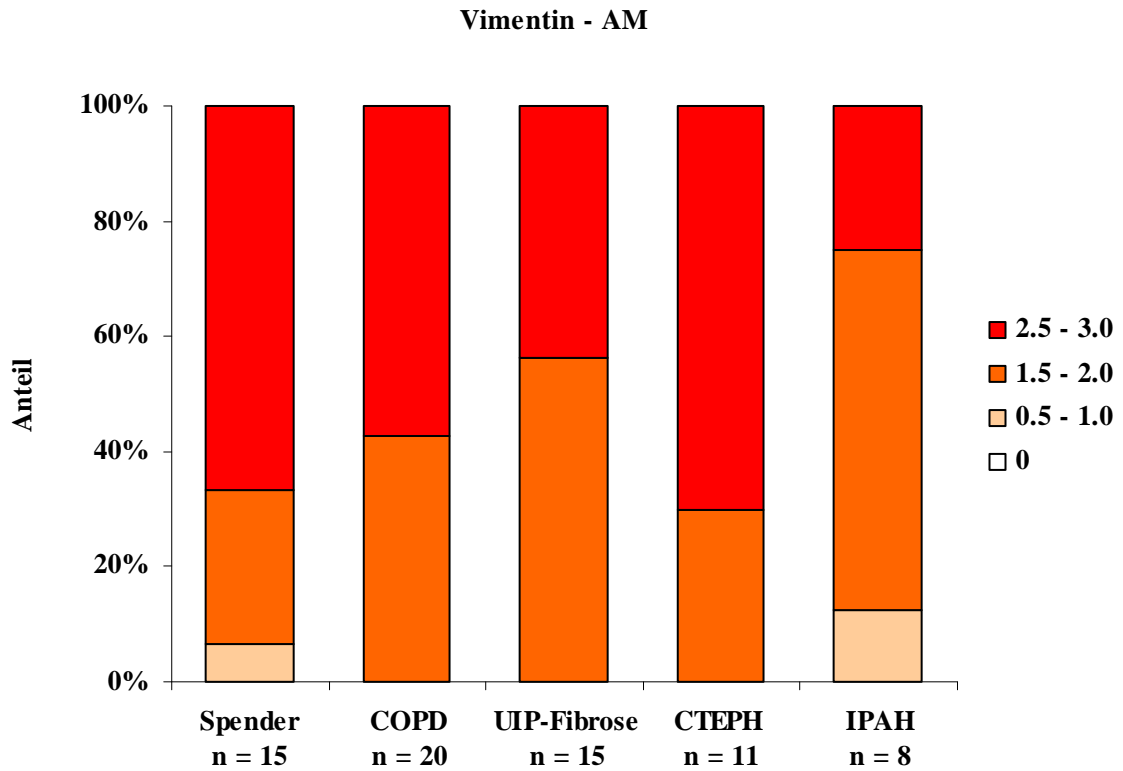


Abb. 11 Vimentin-Immunreaktivität (0 - 3.0) der Alveolarmakrophagen (AM).

Tab. 9 Vim.-AM: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).

	n	Spender	COPD	UIP	CTEPH
Spender	15				
COPD	20	ns			
UIP	15	ns	ns		
CTEPH	11	ns	ns	ns	
IPAHA	8	ns	ns	ns	ns

4.1.2 Catalase

Bronchien / Bronchioli:

Das Epithel der Bronchien / Bronchioli war in 80 – 100 % der Fälle in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und in den Referenz-(Spender)-Lungen Catalase-positiv, wobei eine schwache und mittlere Färbeintensität aufgezeigt wurde (s. **Abb. 15**; S. 41). Die glatte Muskulatur der Bronchien / Bronchioli zeigte eine schwache Catalase-Immunreaktivität bei 13 – 42 % der Lungen in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und den Referenz-(Spender)-Lungen. Die Adventitia der Bronchien / Bronchioli zeigte bei der Färbung mit anti-Catalase keine Immunreaktivität, weder in den verschiedenen Erkrankungsgruppen noch in den Referenz-(Spender)-Lungen.

Signifikante Unterschiede bei der Catalase-Immunreaktivität im Epithel der Bronchien / Bronchioli lagen zwischen den verschiedenen Untersuchungsgruppen nicht vor (s. **Tab. 10**; S. 41).

Arterielle Gefäße:

Das Endothel in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und in den Referenz-(Spender)-Lungen zeigte eine schwache und mittlere Immunreaktivität, wobei 7 – 52 % in den Untersuchungsgruppen Catalase-positiv waren. Dabei zeigten nur 7 % (1 von 15 Fällen) der Referenz-(Spender)-Lungen im arteriellen Endothel eine schwache Immunreaktivität (0 - 0.5). Dagegen war in circa 52 % der COPD- und UIP-Fibrose-Lungen eine schwache bis mittlere Catalase-Immunreaktivität (0 - 2.0) nachweisbar (s. **Abb. 16**; S. 42). In der glatten Muskulatur waren 10 – 26 % der Fälle der verschiedenen Untersuchungsgruppen schwach Catalase-positiv (s. **Abb. 17**; S. 43). Die arterielle Adventitia zeigte einen Färbeintensitätsgrad von 0.5 - 1.0, wobei ausschließlich 1 von 15 Fällen (ca. 7 %) in den UIP-Fibrose-Lungen und 1 von 11 Fällen (ca. 9 %) in den CTEPH-Lungen eine Immunreaktivität zeigten.

In der Catalase-Immunreaktivität im arteriellen Endothel bestanden deutliche Unterschiede zwischen den COPD-Lungen und den Referenz-(Spender)-Lungen ($p=0,024$; Fisher's Exakter Test) (s. **Abb. 12**, S. 38). Weiterhin zeigte sich im arteriellen Endothel ein beachtlicher Unterschied zwischen den UIP-Fibrose-Lungen und den Referenz-(Spender)-Lungen ($p=0,020$; Fisher's Exakter Test). (s. **Tab. 11**; S. 42). Die Catalase-

Immunreaktivität in der glatten Muskulatur und der Adventitia zeigten keine deutlichen Unterschiede bei den untersuchten Lungen (s. **Tab. 12**; S. 43).

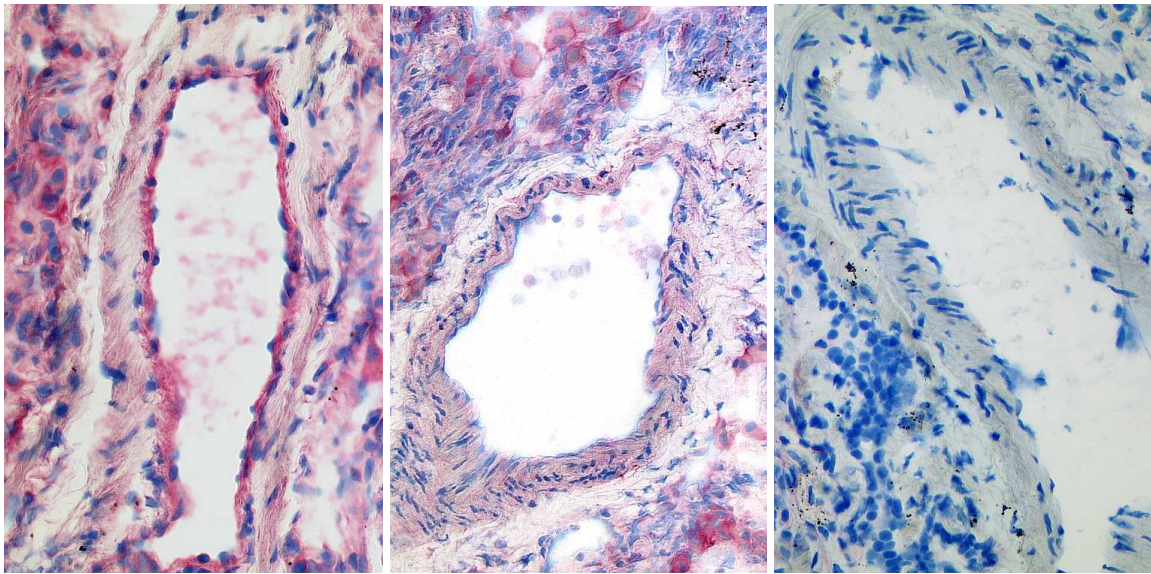


Abb. 12 Catalase-Färbung in humanen Arterien. **Links:** COPD-Lunge (OV x 20), **Mitte:** Spenderlunge (OV x 20), **Rechts:** Negativ-Kontrolle (COPD-Lunge) (OV x 10).

Venöse Gefäße:

Das Endothel in den COPD-Lungen, in den UIP-Fibrose-Lungen und in den CTEPH-Lungen war in ca. 15 – 25 % der Lungen immunreaktiv, wobei es eine schwache Farbeintensität aufzeigte (s. **Abb. 18**; S. 44). In der glatten Muskulatur waren 18 – 36 % der Fälle der verschiedenen Untersuchungsgruppen schwach Catalase-positiv. Die venöse Adventitia nur der CTEPH-Lungen zeigte in 1 von 11 Fällen (9 %) eine schwache Immunreaktivität.

Die Catalase-Immunreaktivität im venösen Endothel zeigte keine deutlichen Unterschiede bei den untersuchten Lungen (s. **Tab. 13**; S. 44).

Alveolarmakrophagen und Alveolarepithel:

Die Alveolarmakrophagen in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und in den Referenz-(Spender)Lungen wurden mit einer schwachen, mittleren und starken Farbeintensität angefärbt. Es waren jeweils 90 – 100 % der Alveolarmakrophagen Catalase-positiv. Die COPD-Lungen zeigten in den Alveolarmakrophagen in 80 % (17 von 21 Fällen) eine mittlere Farbeintensität (1.5 - 2.0). Dagegen war in den CTEPH-Lungen in

27 % der Fälle und in den IPAH-Lungen in 38 % der Fälle eine mittlere Catalase-Immunreaktivität (1.5 - 2.0) nachweisbar (s. **Abb. 19**; S. 45). Die Alveolarepithelzellen in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und in den Referenz-(Spender)-Lungen wurden mit den Färbeintensitätsgraden von 0.5 - 1.0 und 1.5 - 2.0 angefärbt. Es waren 40 – 86 % der Alveolarepithelzellen Catalase-positiv. Die Alveolarepithelzellen der UIP-Fibrose-Lungen zeigten eine Immunreaktivität von 47 % der Fälle mit einer mittleren Färbeintensität (1.5 - 2.0) (s. **Abb. 20**; S. 46).

Statistisch signifikante Unterschiede der Catalase-Immunreaktivität bestand zwischen den COPD-Lungen und den CTEPH-Lungen in den Alveolarmakrophagen ($p=0,006$; Fisher's Exakter Test) (s. **Abb. 13**; unten). Weiterhin zeigte sich ein Unterschied zwischen den COPD-Lungen und den IPAH-Lungen ($p=0,045$; Fisher's Exakter Test) (s. **Tab. 14**; S. 45).

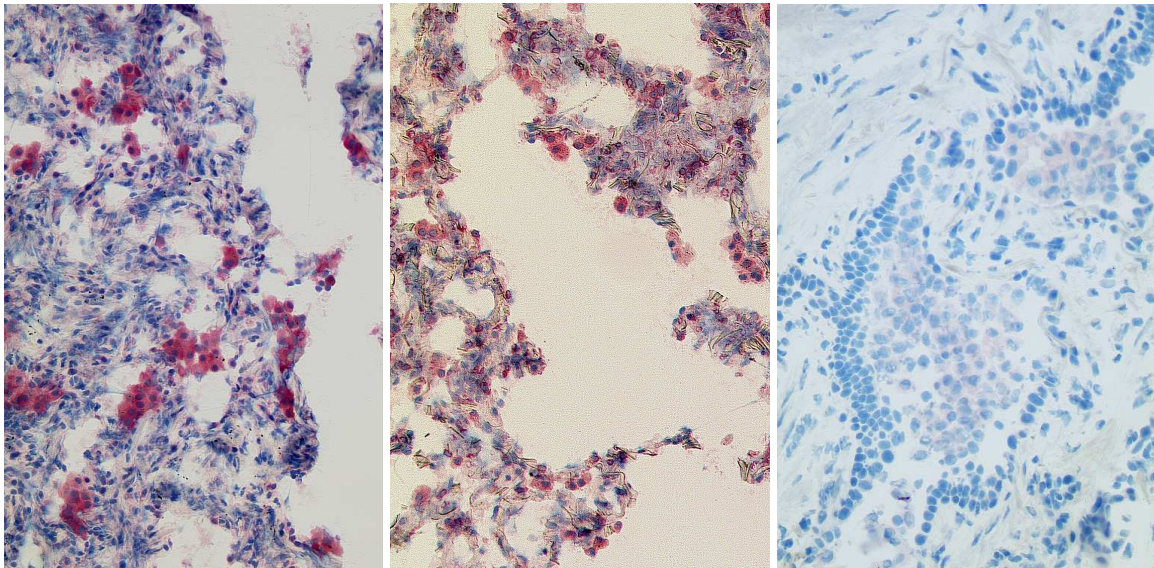


Abb. 13 Catalase-Färbung der Alveolarmakrophagen. **Links:** COPD-Lunge (OV x 10), **Mitte:** CTEPH-Lunge (OV x 10), **Rechts:** Negativ-Kontrolle (UIP-Fibrose-Lunge) (OV x 10).

Statistische Unterschiede ergaben sich bei der Catalase-Immunreaktivität in den Alveolarepithelzellen zwischen den UIP-Fibrose-Lungen und den Referenz-(Spender)-Lungen ($p=0,0033$; Fisher's Exakter Test). Außerdem gab es beachtliche Unterschiede zwischen den UIP-Fibrose-Lungen und den COPD-Lungen ($p=0,0079$; Fisher's Exakter Test). Weiterhin wurden Unterschiede zwischen den UIP-Fibrose-Lungen und den CTEPH-Lungen festgestellt ($p=0,008$; Fisher's Exakter Test), (s. **Abb. 14**, S. 40) und (s. **Tab. 15**; S. 46).

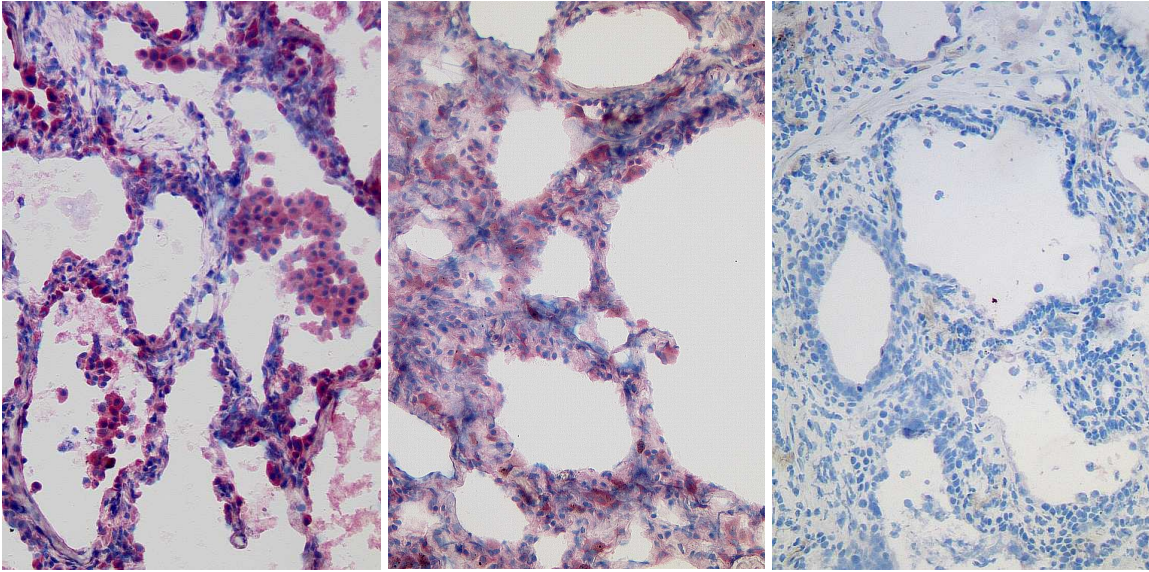


Abb. 14 Catalase-Färbung der Alveolarepithelzellen. **Links:** UIP-Fibrose-Lunge (OV x 10), **Mitte:** CTEPH-Lunge (OV x 10), **Rechts:** Negativ-Kontrolle (UIP-Fibrose-Lunge) (OV x 10).

Interstitielles Bindegewebe und interstitielle glatte Muskulatur:

Bindegewebe wurde nur in wenigen COPD-Lungen, UIP-Fibrose-Lungen, IPAH-Lungen und Referenz-(Spender)-Lungen gefunden und war in 20 – 40 % der Fälle immunreaktiv, wobei es eine schwache und mittlere Färbeintensität aufzeigte. Die interstitielle glatte Muskulatur zeigte in den Erkrankungsgruppen eine schwache Catalase-Immunreaktivität.

Die Catalase-Immunreaktivität im Bindegewebe und der interstitiellen glatten Muskulatur zeigte keine deutlichen Unterschiede bei den untersuchten Lungen.

Catalase - Br.E

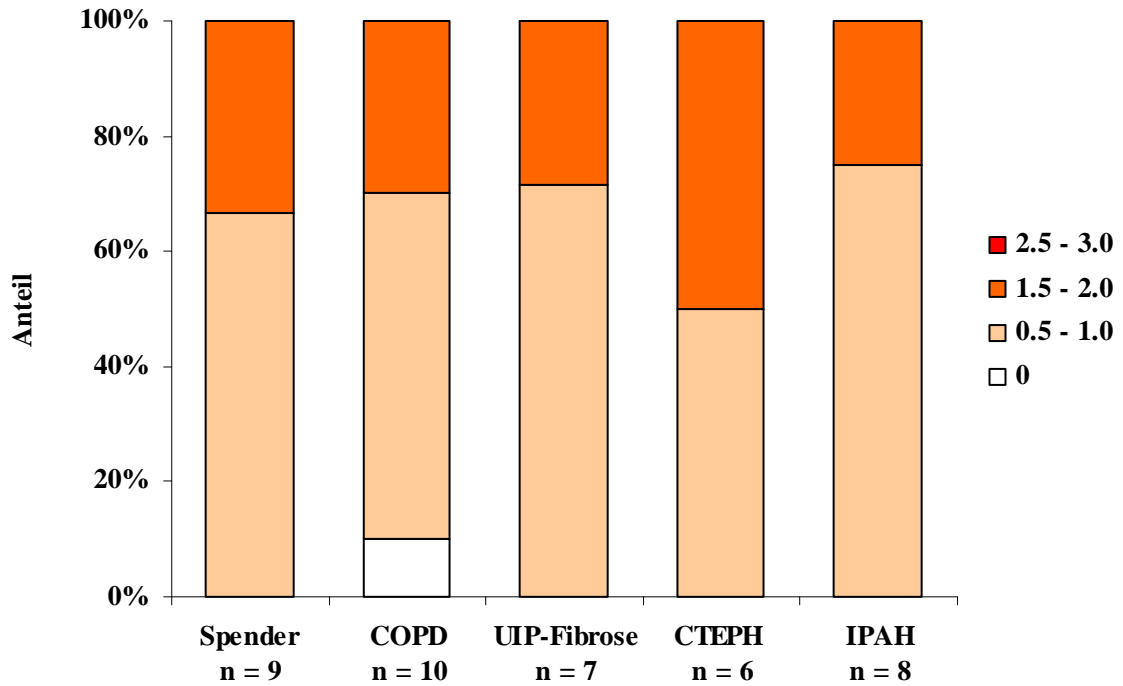


Abb. 15 Catalase-Immunität (0 - 3.0) im Epithel der Bronchien / Bronchioli (Br.E).

Tab. 10 Catalase-Br.E: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant)

	n	Spender	COPD	UIP	CTEPH
Spender	9				
COPD	10	ns			
UIP	7	ns	ns		
CTEPH	6	ns	ns	ns	
IPAH	8	ns	ns	ns	ns

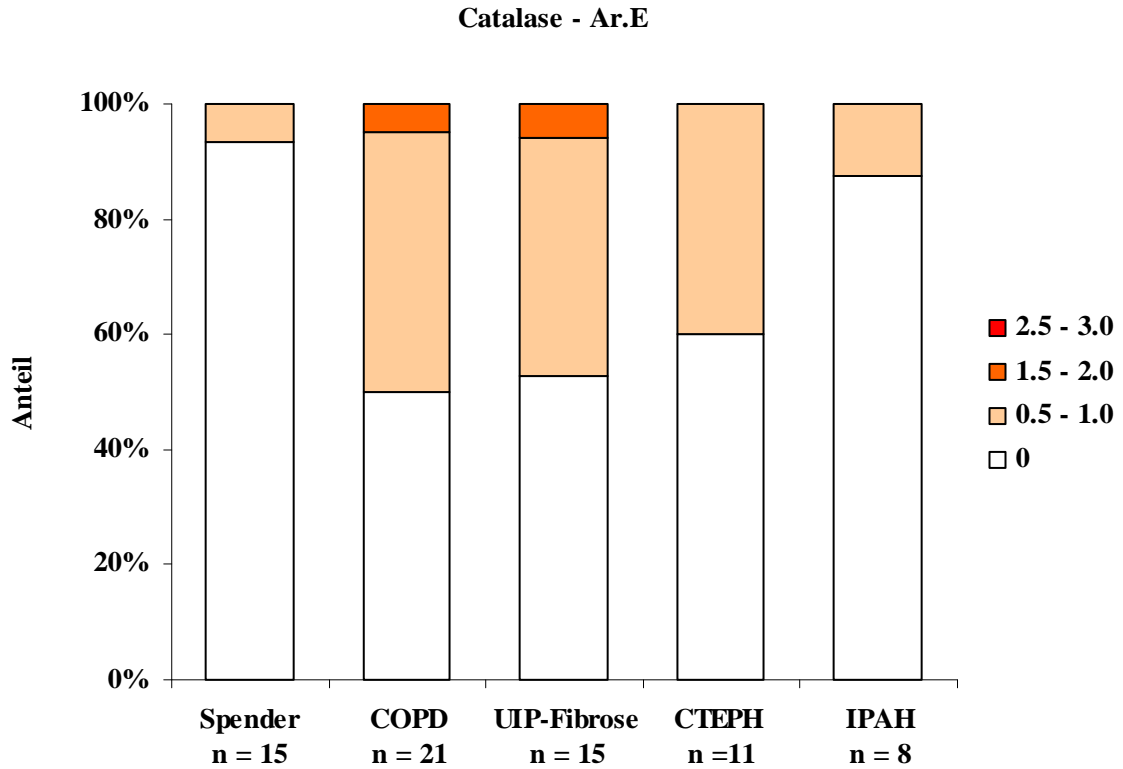


Abb. 16 Catalase-Immunität (0 - 3.0) im Endothel der arteriellen Gefäße (Ar.E)

Tab. 11 Catalase-Ar.E: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).

	n	Spender	COPD	UIP	CTEPH
Spender	15				
COPD	21	0.024			
UIP	15	0.020	ns		
CTEPH	11	ns	ns	ns	
IPAH	8	ns	ns	ns	ns

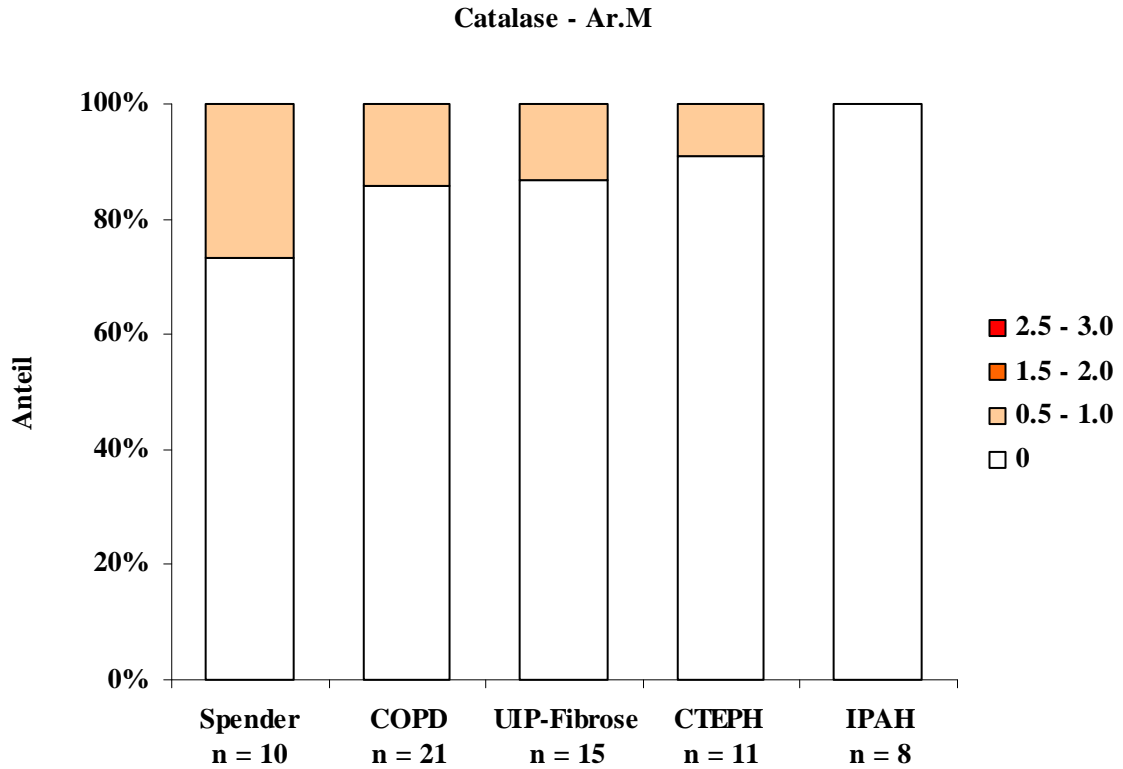


Abb. 17 Catalase-Immunität (0 - 3.0) der Muskulatur arterieller Gefäße (Ar.M).

Tab. 12 Catalase-Ar.M: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).

	n	Spender	COPD	UIP	CTEPH
Spender	15				
COPD	21	ns			
UIP	15	ns	ns		
CTEPH	11	ns	ns	ns	
IPAH	8	ns	ns	ns	ns

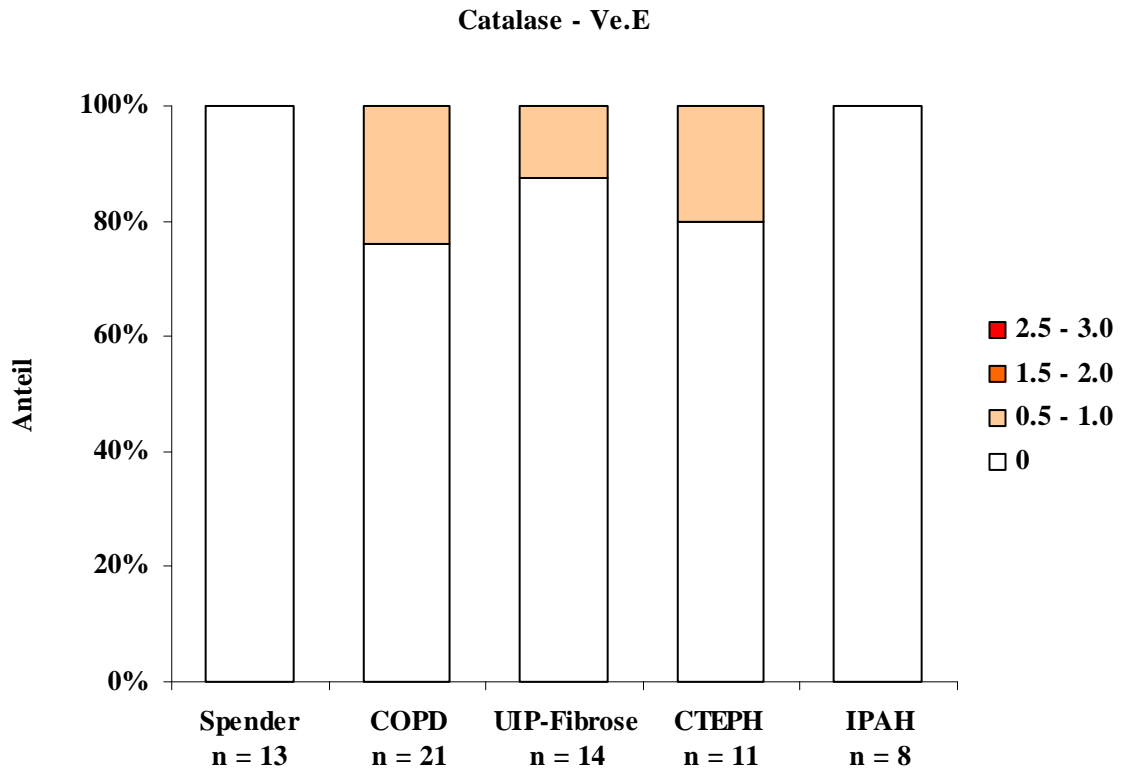


Abb. 18 Catalase-Immunität (0 - 3.0) im Endothel der venösen Gefäße (Ve.E).

Tab. 13 Catalase-Ve.E: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).

	n	Spender	COPD	UIP	CTEPH
Spender	13				
COPD	21	ns			
UIP	14	ns	ns		
CTEPH	11	ns	ns	ns	
IPAH	8	ns	ns	ns	ns

Catalase - AM

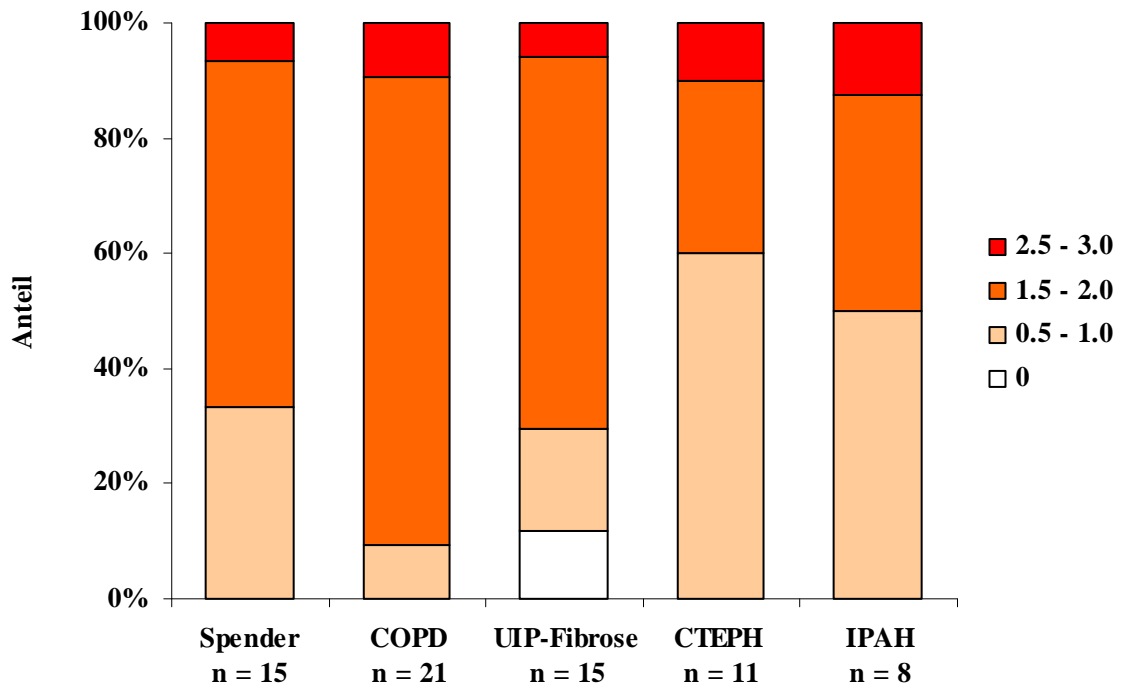


Abb. 19 Catalase-Immunität (0 - 3.0) der Alveolarmakrophagen (AM).

Tab. 14 Catalase-AM: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).

	n	Spender	COPD	UIP	CTEPH
Spender	15				
COPD	21	ns			
UIP	15	ns	ns		
CTEPH	11	ns	0.006	ns	
IPAH	8	ns	0.045	ns	ns

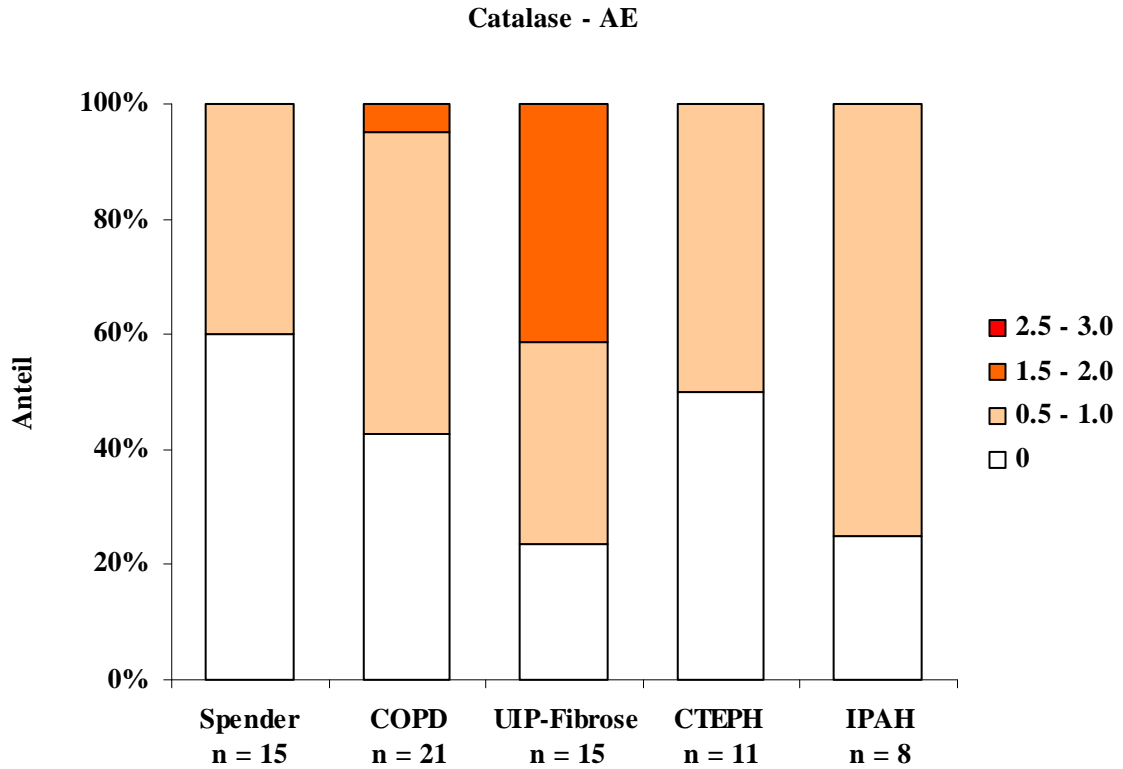


Abb. 20 Catalase-Immunität (0 - 3.0) der Alveolarepithelzellen (AE).

Tab. 15 Catalase-AE: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).

	n	Spender	COPD	UIP	CTEPH
Spender	15				
COPD	21	ns			
UIP	15	0.003	0.007		
CTEPH	11	ns	ns	0.008	
IPAH	8	ns	ns	ns	ns

4.1.3 CD36

Bronchien / Bronchioli:

Das Epithel der Bronchien / Bronchioli in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und in den Referenz-(Spender)-Lungen zeigte bei der Färbung mit anti-CD36 eine schwache Immunreaktivität. Es waren 14 – 55 % der Fälle CD36-positiv (s. **Abb. 23**; S. 50). Das Epithel der Bronchien / Bronchioli in den UIP-Fibrose-Lungen zeigte keine Immunreaktivität. Die glatte Muskulatur und die Adventitia der Bronchien / Bronchioli zeigten bei der Färbung mit anti-CD36 keine Immunreaktivität, weder in den verschiedenen Erkrankungsgruppen noch in den Referenz-(Spender)-Lungen.

Statistisch signifikante Unterschiede der CD36-Immunreaktivität im Epithel der Bronchien / Bronchioli bestand zwischen den Referenz-(Spender)-Lungen und den UIP-Fibrose-Lungen ($p=0,029$; Fisher's Exakter Test) (s. **Tab. 16**; S. 50 und **Abb. 21**; unten).

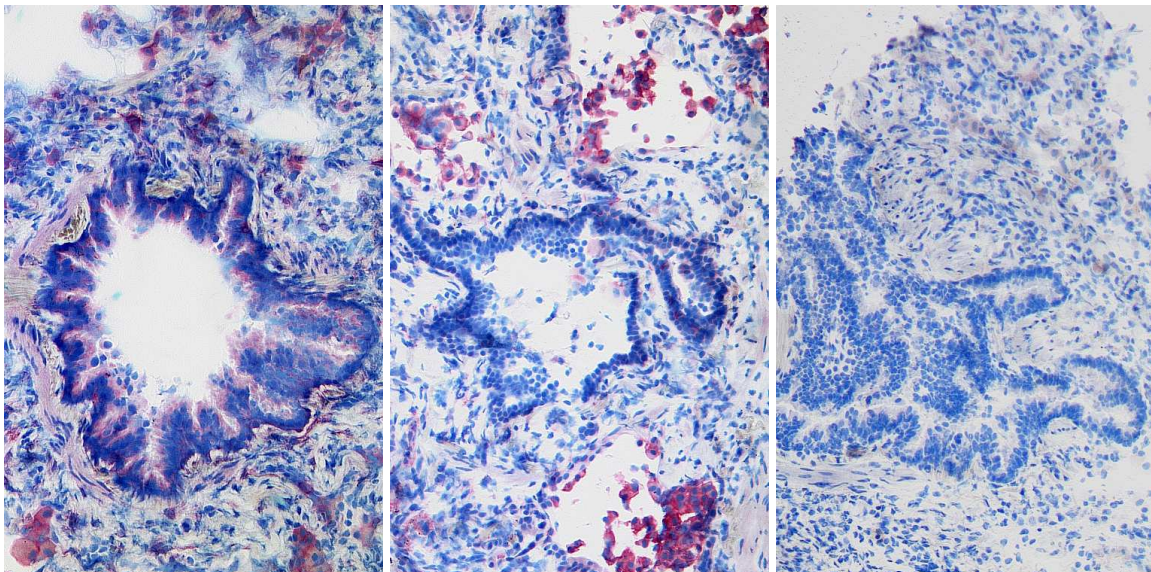


Abb. 21 CD36-Färbung in humanen Bronchien / Bronchioli. **Links:** Spenderlunge (OV x 10), **Mitte:** UIP-Fibrose-Lunge (OV x 10), **Rechts:** Negativ-Kontrolle (Spenderlunge) (OV x 10).

Arterielle Gefäße:

Das Endothel zeigte bei der Färbung mit anti-CD36 keine Immunreaktivität, weder in den verschiedenen Erkrankungsgruppen noch in den Referenz-(Spender)-Lungen. In der glatten Muskulatur waren 7 % der Fälle in den UIP-Fibrose-Lungen und 10 % der Fälle in

den CTEPH-Lungen schwach CD36-positiv. Die Adventitia zeigte nur in 10 % der Fälle der CTEPH-Lungen einen Färbeintensitätsgrad von 0.5 - 1.0.

Signifikante Unterschiede bei der CD36-Immunreaktivität lagen zwischen den Untersuchungsgruppen nicht vor.

Venöse Gefäße:

Das Endothel zeigte keine Immunreaktivität in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und in den Referenz-(Spender)-Lungen. Die glatte Muskulatur und Adventitia war jeweils in 10 % der Fälle der CTEPH-Lungen CD36-positiv, bei schwacher Färbeintensität.

Signifikante Unterschiede bei der CD36-Immunreaktivität lagen zwischen den Untersuchungsgruppen nicht vor.

Alveolarmakrophagen und Alveolarepithel:

Die Alveolarmakrophagen in den verschiedenen Erkrankungsgruppen wurden mit einer schwachen, mittleren und starken Färbeintensität angefärbt. Es waren 66 – 86 % der Fälle in den verschiedenen Erkrankungsgruppen CD36-positiv. Die Alveolarmakrophagen in den Referenz-(Spender)-Lungen waren in 100 % der Fälle CD36-positiv, wobei eine schwache und mittlere Färbeintensität aufgezeigt wurde (s. **Abb. 24**; S. 51). Die Alveolarepithelzellen waren in 1 von 15 Fällen (7 %) der UIP-Fibrose-Lungen mit einer schwachen Färbeintensität (0.5 - 1.0) nachweisbar. Die Alveolarepithelzellen der anderen Untersuchungsgruppen zeigten keine CD36-Immunreaktivität.

Statistisch signifikante Unterschiede der CD36-Immunreaktivität der Alveolarmakrophagen bestand zwischen den Referenz-(Spender)-Lungen und den COPD-Lungen ($p=0,034$; Fisher's Exakter Test). Weiterhin zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen den UIP-Fibrose-Lungen und den COPD-Lungen ($p=0,031$; Fisher's Exakter Test) (s. **Tab. 17**; S. 51, sowie **Abb. 22**; S. 49). Signifikante Unterschiede bei der CD36-Immunreaktivität der Alveolarepithelzellen lagen zwischen den Untersuchungsgruppen nicht vor.

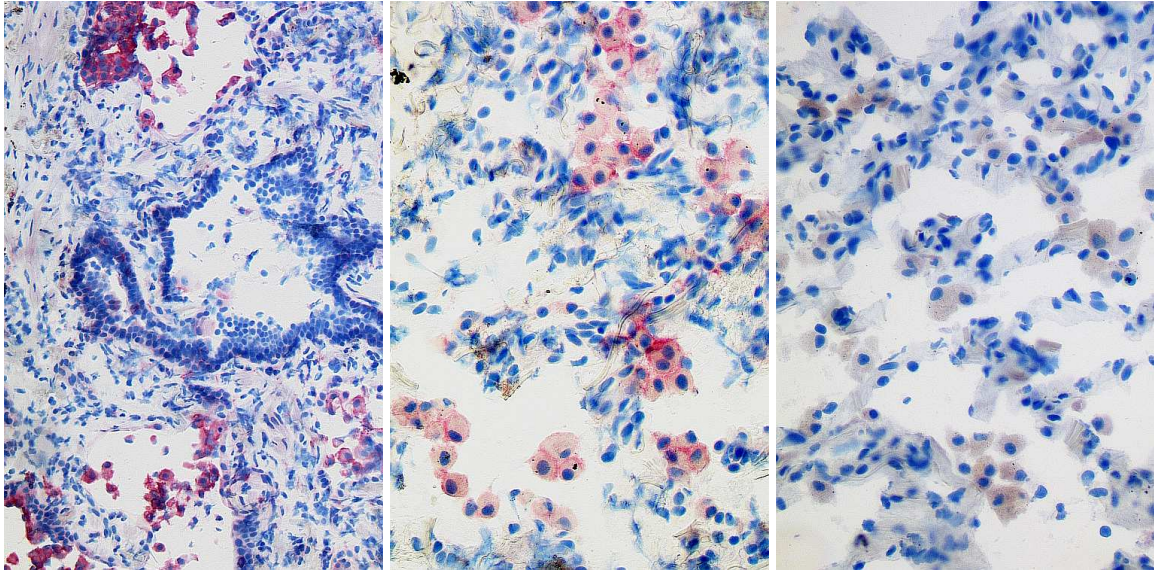


Abb. 22 CD36-Färbung der Alveolarmakrophagen. **Links:** UIP-Fibrose-Lunge, (OV x 10) **Mitte:** COPD-Lunge (OV x 20), **Rechts:** Negativ-Kontrolle (Spenderlunge) (OV x 20).

Interstitielles Bindegewebe und interstitielle glatte Muskulatur:

Bindegewebe wurde nur in den Referenz-(Spender)-Lungen gefunden und war in 1 von 4 Fällen (25 %) immunreaktiv, wobei es eine Färbeintensität von 0.5 - 1.0 aufzeigte. Die interstitielle glatte Muskulatur in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und den Referenz-(Spender)-Lungen wurde nicht nachweisbar.

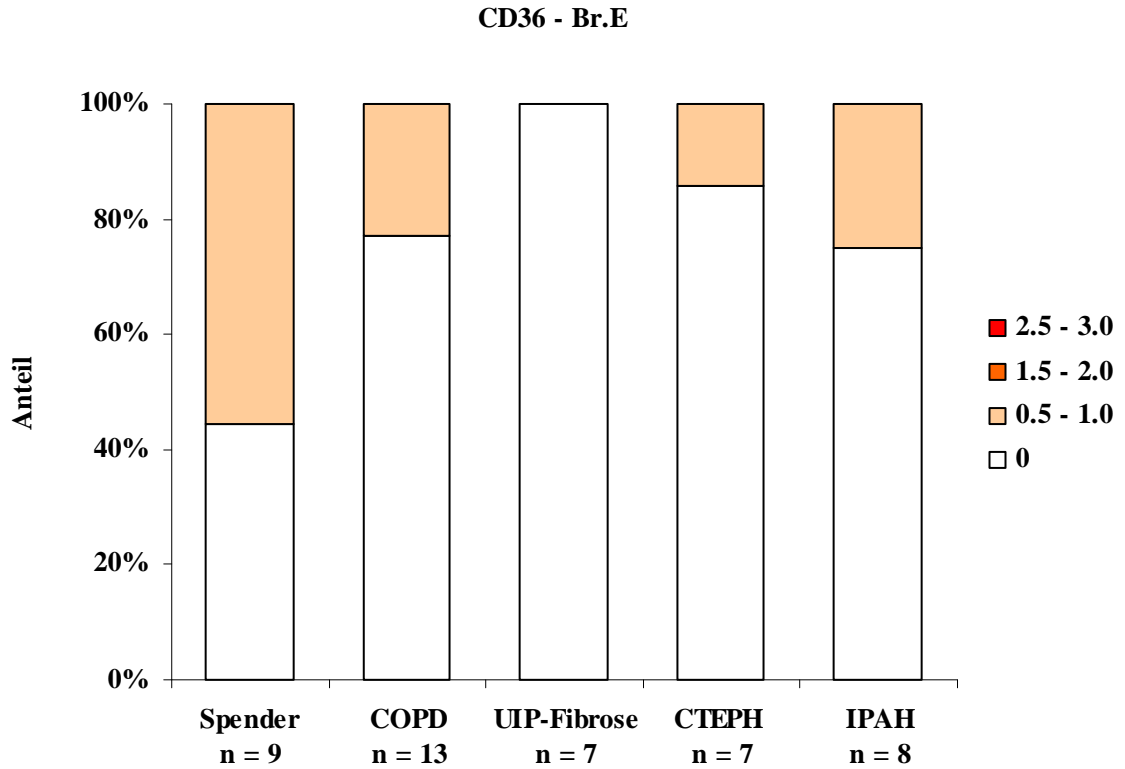


Abb. 23 CD36-Immunreaktivität (0 - 3.0) im Endothel der Bronchien / Bronchioli (Br.E).

Tab. 16 CD36-Br.E: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).

	n	Spender	COPD	UIP	CTEPH
Spender	9				
COPD	13	ns			
UIP	7	0.029	ns		
CTEPH	7	ns	ns	ns	
IPAH	8	ns	ns	ns	ns

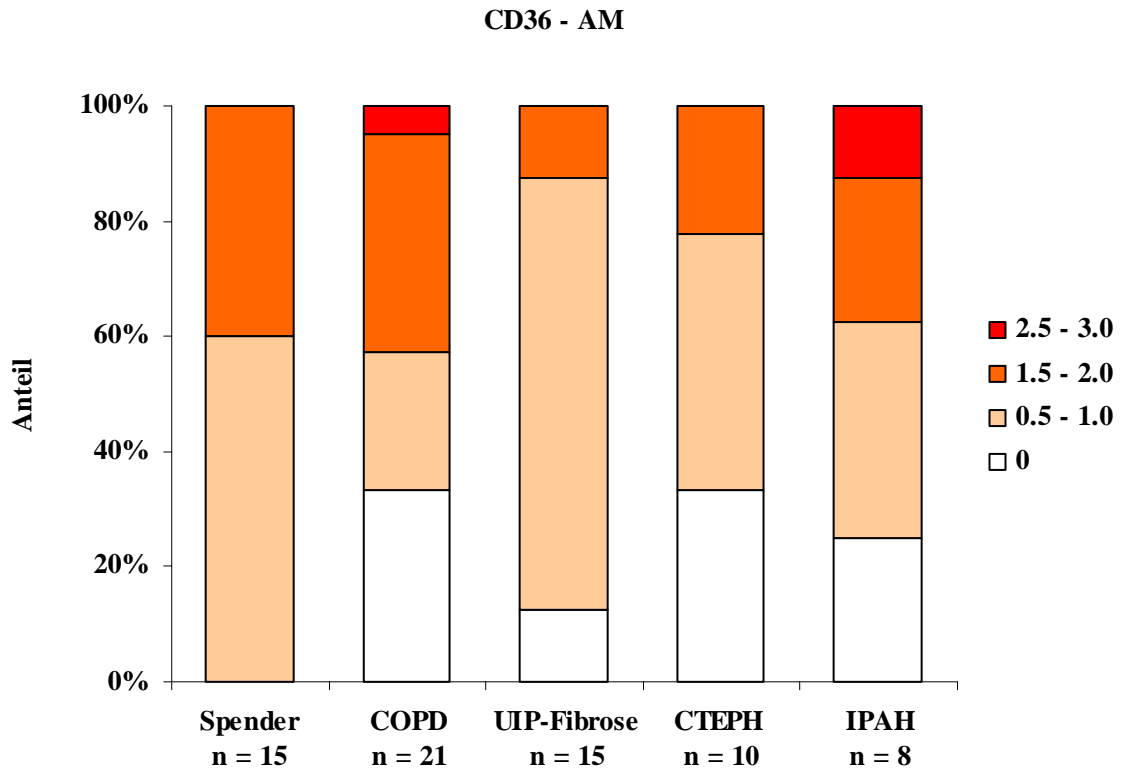


Abb. 24 CD36-Immunreaktivität (0 - 3.0) in den Alveolarmakrophagen (AM).

Tab. 17 CD-36-AM: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).

	n	Spender	COPD	UIP	CTEPH
Spender	15				
COPD	21	0.034			
UIP	15	ns	0.031		
CTEPH	10	ns	ns	ns	
IPAH	8	ns	ns	ns	ns

4.1.4 HMGB-1

Bei der Färbung mit anti-HMGB-1 wurde in der Auswertung zwischen einer zytoplasmatischen und nukleären Färbung im Gewebe unterschieden.

a) Zytoplasmatische Immunreaktivität

Bronchien / Bronchioli:

Das Epithel der Bronchien / Bronchioli war in 90 – 100 % der Fälle in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und in den Referenz-(Spender)-Lungen HMGB-1zyt positiv. Dabei zeigte sich vorwiegend eine schwache und mittlere Färbeintensität (s.**Abb. 26**; S.56). Die glatte Muskulatur der Bronchien / Bronchioli zeigte in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und in den Referenz-(Spender)-Lungen eine überwiegend schwache Färbeintensität (0.5 – 1.0), wobei 25 – 56 % der untersuchten Lungen eine Immunreaktivität zeigten. Die Adventitia der Bronchien / Bronchioli zeigten keine Immunreaktivität, weder in den verschiedenen Erkrankungsgruppen noch in den Referenz-(Spender)-Lungen.

Signifikante Unterschiede bei der HMGB-1zyt-Immunreaktivität lagen zwischen den Untersuchungsgruppen nicht vor (s.**Tab. 18**; S.56).

Arterielle Gefäße:

Das Endothel und die Muskulatur zeigten in 27 – 58 % der Fälle in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und in den Referenz-(Spender)-Lungen eine schwache Färbeintensität. Nur die UIP-Fibrose-Lungen und die Referenz-(Spender)-Lungen zeigten in der Adventitia eine Immunreaktivität von 10 % der Fälle mit einem Färbeintensitätsgrad von 0.5 - 1.0.

Signifikante Unterschiede bei der HMGB-1zyt-Immunreaktivität lagen zwischen den Untersuchungsgruppen nicht vor.

Venöse Gefäße:

Im Endothel und in der glatten Muskulatur war eine Immunreaktivität in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und in den Referenz-(Spender)Lungen mit einer schwachen Färbeintensität. Im Endothel zeigten 13 – 36 % der Fälle der untersuchten

Lungen und in der glatten Muskulatur zwischen 17 – 50 % der Fälle der untersuchten Lungen eine HMGB-1zyt-Immunreaktivität. In der Adventitia zeigten nur die IPAH-Lungen und die Referenz-(Spender)-Lungen eine schwache Immunreaktivität.

Signifikante Unterschiede bei der HMGB-1zyt-Immunreaktivität lagen zwischen den Untersuchungsgruppen nicht vor.

Alveolarmakrophagen und Alveolarepithel:

Die Alveolarmakrophagen waren in 83 – 100 % der Fälle in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und in den Referenz-(Spender)-Lungen HMGB-1zyt-positiv, bei schwacher und mittlerer Färbeintensität (s. **Abb. 27**; S.57). Die Alveolarepithelzellen in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und in den Referenz-(Spender)-Lungen zeigten eine schwache Immunreaktivität, wobei 25 – 45 % der untersuchten Lungen angefärbt wurden. Die Alveolarepithelzellen der UIP-Fibrose-Lungen zeigten eine Immunreaktivität von 66 % mit einem schwachen und mittleren Färbeintensitätsgrad (s. **Abb. 28**; S. 58).

Deutliche Unterschiede der HMGB-1zyt-Immunreaktivität bestanden zwischen den UIP-Fibrose-Lungen und den Referenz-(Spender)-Lungen ($p=0,041$; Fisher's Exakter Test) (**Abb. 25**, unten). Weiterhin zeigte sich ein beachtlicher Unterschied zwischen den UIP-Fibrose-Lungen und den COPD-Lungen ($p=0,018$; Fisher's Exakter Test) (s. **Tab. 20**; S. 58).

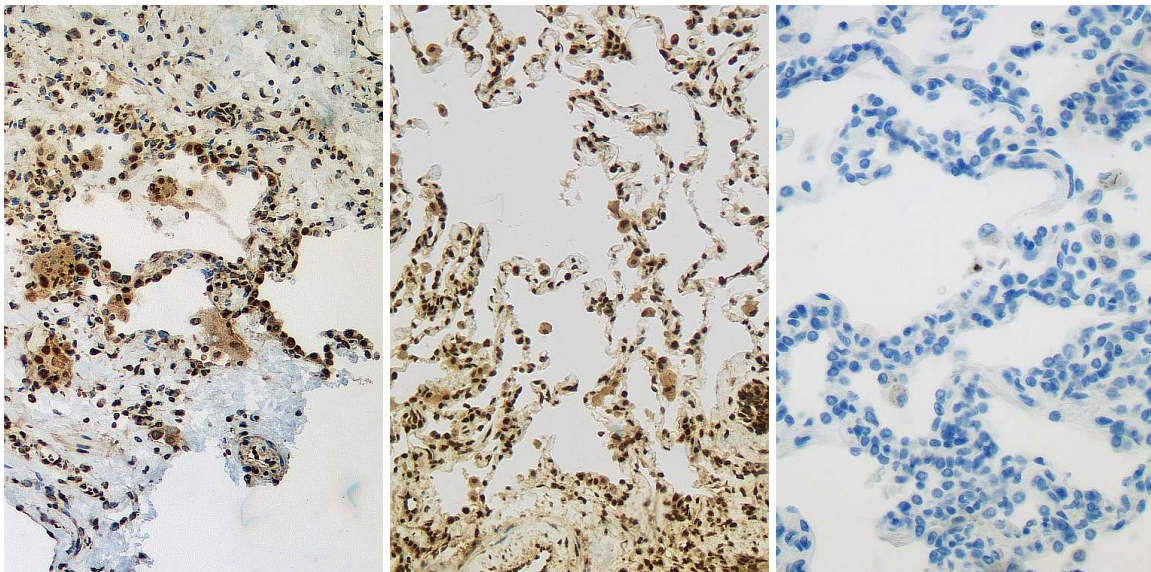


Abb. 25 HMGB-1zyt-Färbung der Alveolarepithelzellen. **Links:** UIP-Fibrose-Lunge (OV x 10), **Mitte:** Spenderlunge (OV x 10), **Rechts:** Negativ-Kontrolle (UIP-Fibrose-Lunge) (OV x 20).

Interstitielles Bindegewebe und interstitielle glatte Muskulatur:

Bindegewebe wurde nur in den COPD-, UIP-Fibrose- und CTEPH-Lungen gefunden und zeigte eine schwache Färbeintensität. Interstitielle glatte Muskulatur war nur in den UIP-Fibrose-Lungen, den CTEPH-Lungen und den IPAH-Lungen nachweisbar und zeigte eine Färbeintensität von 0.5 - 1.0.

Signifikante Unterschiede bei der HMGB-1zyt-Immunreaktivität lagen zwischen den Untersuchungsgruppen nicht vor.

b) Nukleäre Immunreaktivität**Bronchien / Bronchioli:**

Das Epithel der Bronchien / Bronchioli in der verschiedenen Erkrankungsgruppen und in den Referenz-(Spender)-Lungen zeigte in 100 % der Fälle eine schwache, mittlere und starke Färbeintensität. Die glatte Muskulatur der Bronchien / Bronchioli zeigte in den untersuchten Lungen einen Färbeintensität von 0.5 - 1.0 und 1.5 - 2.0, wobei 50 – 70 % der Fälle HMGB-1nuc positiv waren. Die Adventitia der Bronchien / Bronchioli in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und in den Referenz-(Spender)-Lungen war in 75 – 100 % der Fälle HMGB-1nuc positiv, bei schwacher und mittlerer Färbeintensität.

Signifikante Unterschiede bei der HMGB-1nuc-Immunreaktivität lagen zwischen den Untersuchungsgruppen nicht vor.

Arterielle Gefäße:

Das Endothel in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und in den Referenz-(Spender)-Lungen zeigte in 88 – 100 % der Fälle eine schwache, mittlere und starke Färbeintensität. Die glatte Muskulatur war in 40 – 65 % der untersuchten Lungen HMGB-1nuc-positiv, bei schwacher und mittlerer Immunreaktivität. Die Adventitia zeigte eine schwache und mittlere Immunreaktivität in 82 – 93 % der Fälle.

Signifikante Unterschiede bei der HMGB-1nuc-Immunreaktivität lagen zwischen den Untersuchungsgruppen nicht vor.

Venöse Gefäße:

Das Endothel in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und in den Referenz-(Spender)-Lungen zeigte in 83 – 100 % der Fälle eine schwache, mittlere und starke Immunreaktivität. In der glatten Muskulatur waren 35 – 75 % der Fälle in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und den Referenz-(Spender)-Lungen HMGB-1nuc positiv. Die Adventitia zeigte eine schwache und mittlere Färbeintensität, wobei der Prozentsatz der Fälle zwischen 72 – 90 % schwankte.

Signifikante Unterschiede bei der HMGB-1nuc-Immunreaktivität lagen zwischen den Untersuchungsgruppen nicht vor.

Alveolarmakrophagen und Alveolarepithel:

Die Alveolarmakrophagen waren in 50 – 85 % der untersuchten Lungen HMGB-1nuc positiv und zeigten eine schwache und mittlere Immunreaktivität (s. **Abb. 29**; S. 59). Die Alveolarepithelzellen in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und in den Referenz-(Spender)-Lungen wurden mit einer schwachen, mittleren und starken Färbeintensität angefärbt, wobei der Prozentsatz der Fälle zwischen 87 – 100 % schwankte (s. **Abb. 30**; S. 60).

Signifikante Unterschiede bei der HMGB-1nuc-Immunreaktivität lagen zwischen den Untersuchungsgruppen nicht vor (s. **Tab. 21**; S. 59 und **Tab. 22**; S. 60).

Interstitielles Bindegewebe und interstitielle glatte Muskulatur:

Bindegewebe wurde in 50 – 100 % der untersuchten Lungen gefunden und zeigte eine schwache und mittlere Färbeintensität. Interstitielle glatte Muskulatur war nur in den UIP-Fibrose-Lungen, den CTEPH-Lungen und den IPAH-Lungen nachweisbar und zeigte eine überwiegend schwache Färbeintensität.

Signifikante Unterschiede bei der HMGB-1nuc-Immunreaktivität lagen zwischen den Untersuchungsgruppen nicht vor.

HMGB-1zyt - Br.E

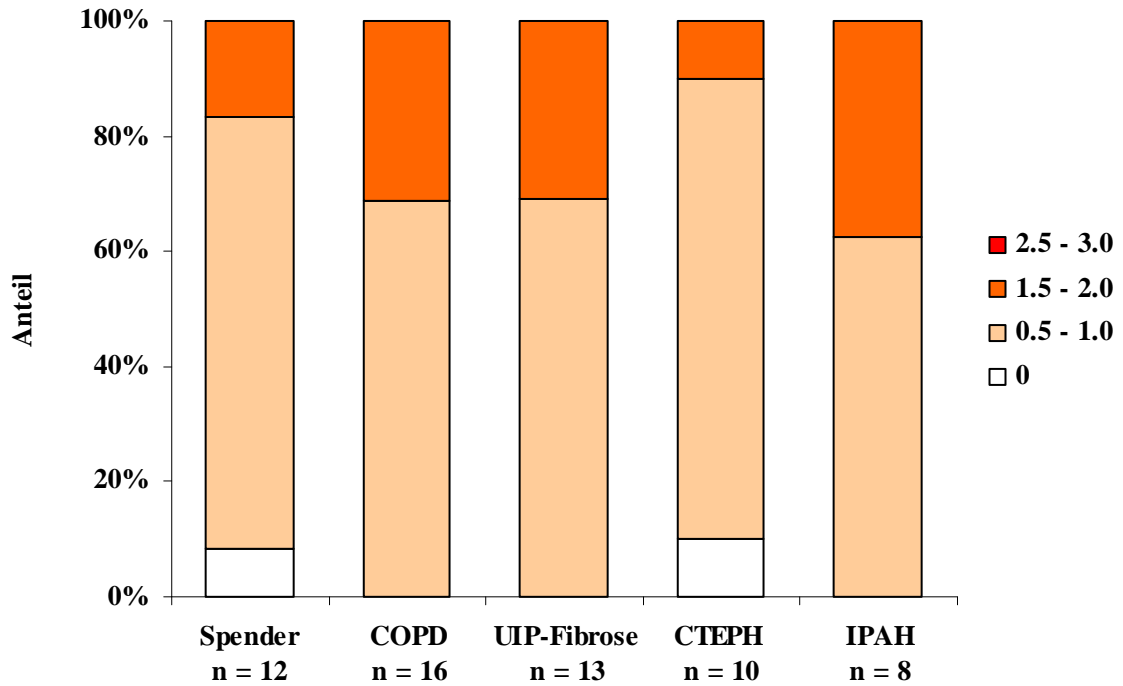


Abb. 26 HMGB-1zyt-Immunität (0 - 3.0) im Endothel der Bronchien / Bronchioli (Br.E).

Tab. 18 HMGB-1zyt-Br.E: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).

	n	Spender	COPD	UIP	CTEPH
Spender	12				
COPD	16	ns			
UIP	13	ns	ns		
CTEPH	10	ns	ns	ns	
IPAH	8	ns	ns	ns	ns

HMGB-1zyt - AM

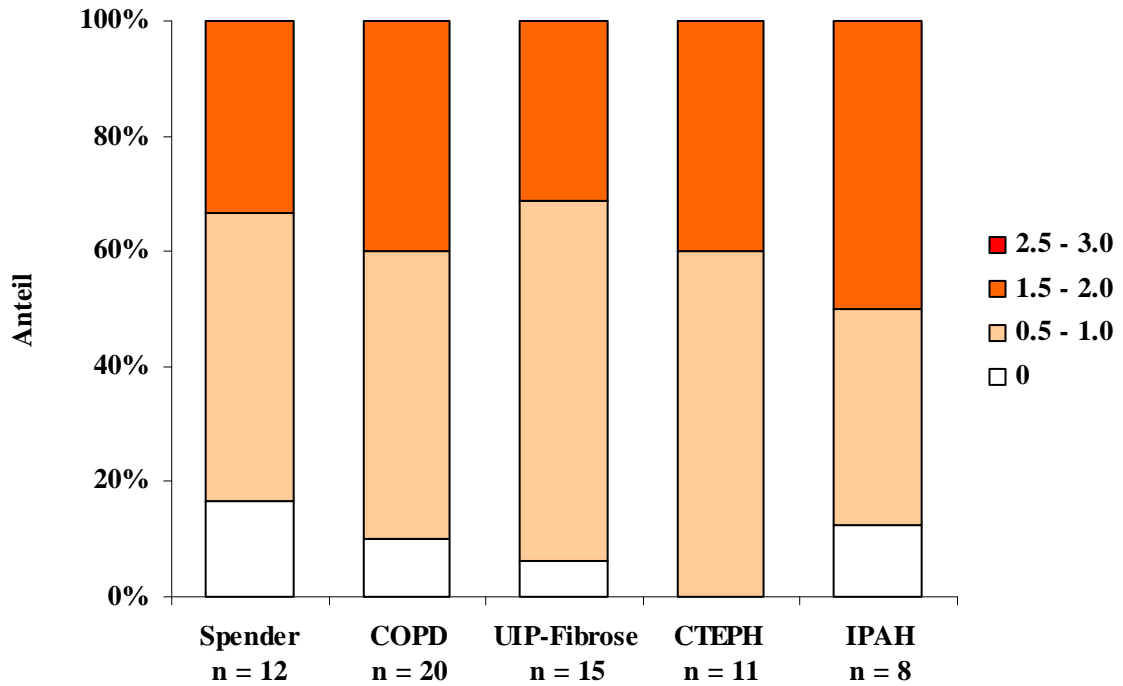


Abb. 27 HMGB-1zyt-Immunität (0 - 3.0) der Alveolarmakrophagen (AM).

Tab. 19 HMGB-1zyt-AM: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).

	n	Spender	COPD	UIP	CTEPH
Spender	12				
COPD	20	ns			
UIP	15	ns	ns		
CTEPH	11	ns	ns	ns	
IPAH	8	ns	ns	ns	ns

HMGB-1zyt - AE

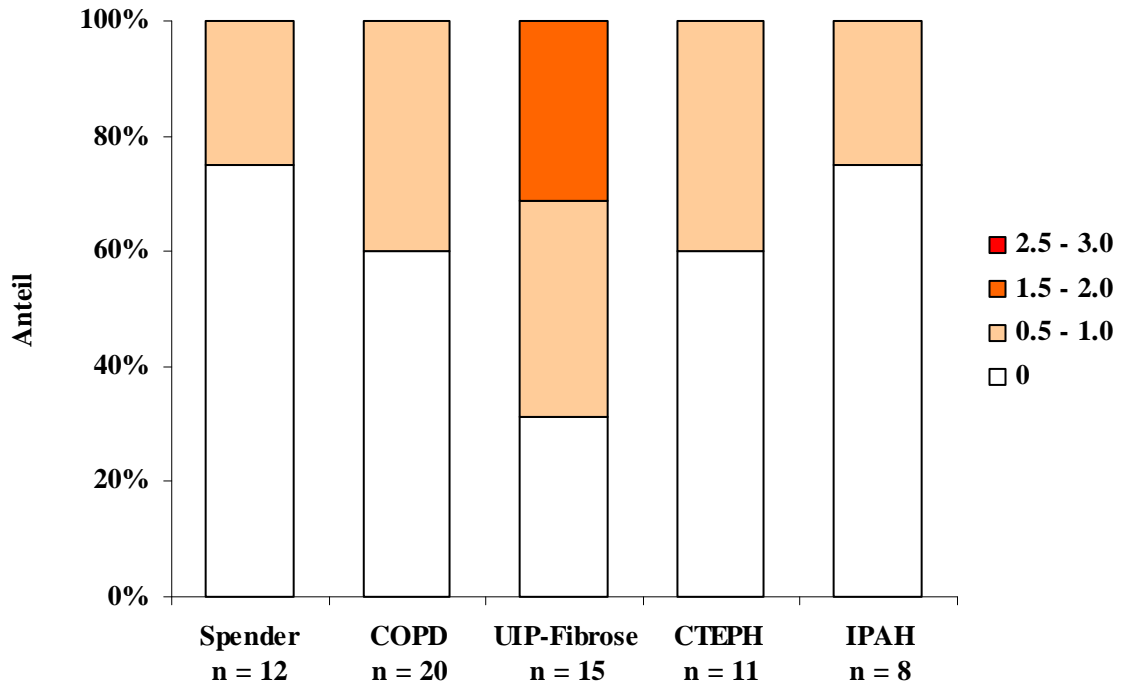


Abb. 28 HMGB-1zyt-Immunität (0 - 3.0) der Alveolarepithelzellen (AE).

Tab. 20 HMGB-1zyt-AE: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).

	n	Spender	COPD	UIP	CTEPH
Spender	12				
COPD	20	ns			
UIP	15	0.041	0.018		
CTEPH	11	ns	ns	ns	
IPAH	8	ns	ns	ns	ns

HMGB-1nuc - AM

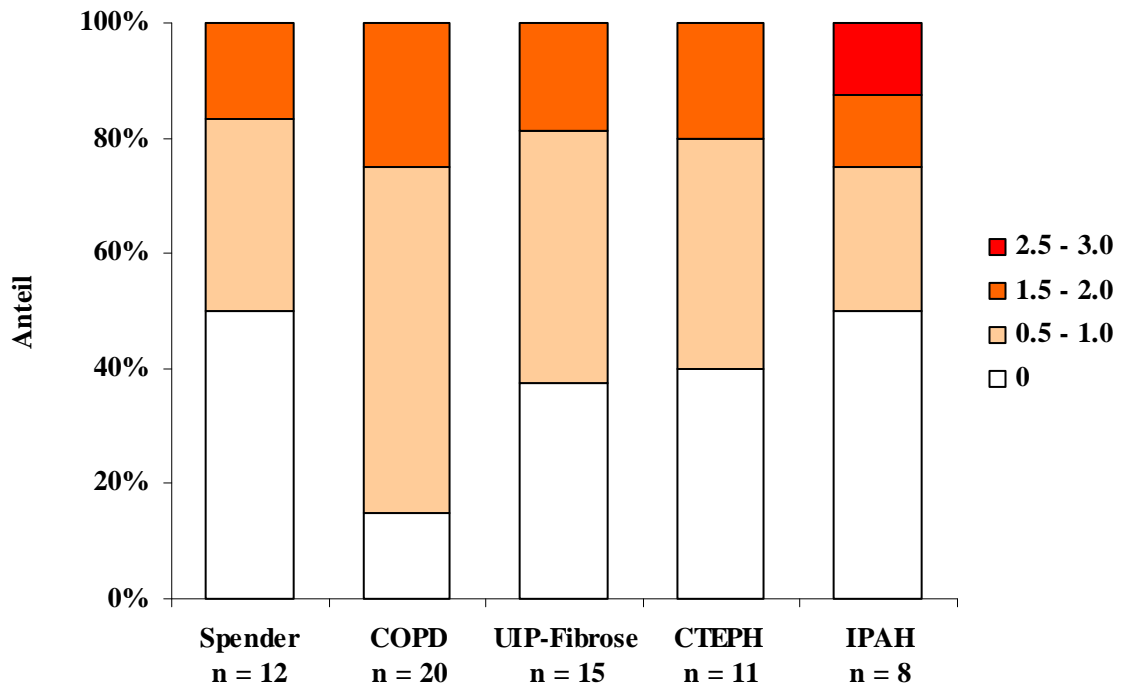


Abb. 29 HMGB-1nuc-Immunreaktivität (0 - 3.0) der Alveolarmakrophagen (AM).

Tab. 21 HMGB-1nuc-AM: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).

	n	Spender	COPD	UIP	CTEPH
Spender	12				
COPD	20	ns			
UIP	15	ns	ns		
CTEPH	11	ns	ns	ns	
IPAH	8	ns	ns	ns	ns

HMGB-1nuc - AE

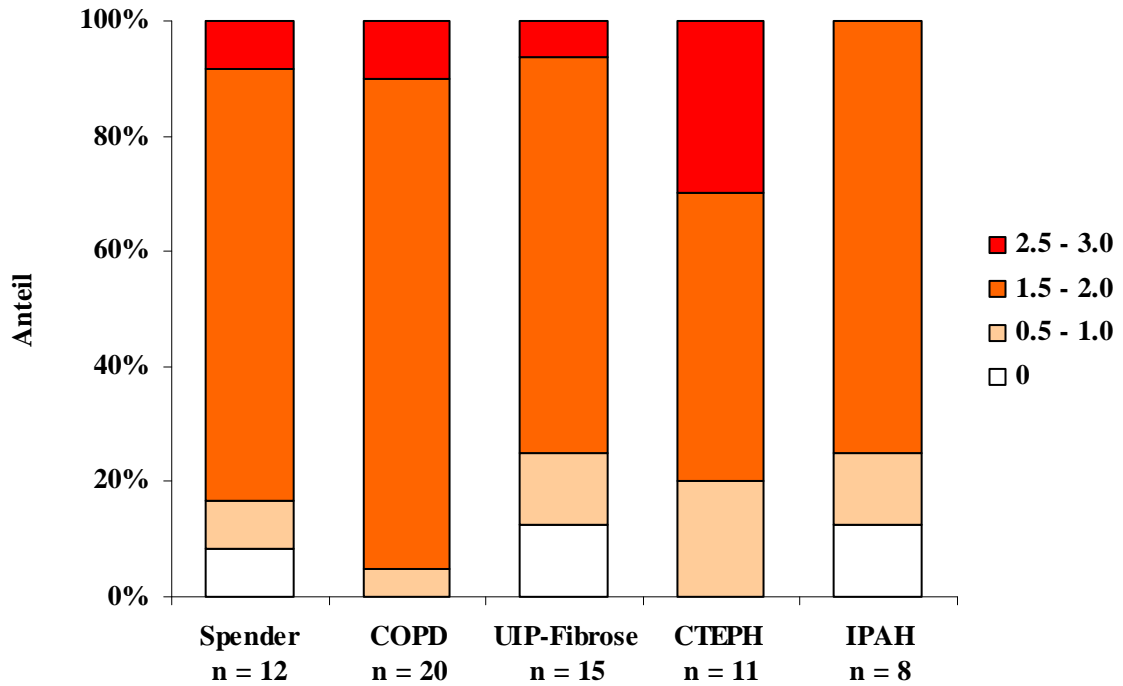


Abb. 30 HMGB-1nuc-Immunreaktivität (0 - 3.0) der Alveolarepithelzellen (AE).

Tab. 22 HMGB-1nuc-AE: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).

	n	Spender	COPD	UIP	CTEPH
Spender	12				
COPD	20	ns			
UIP	15	ns	ns		
CTEPH	11	ns	ns	ns	
IPAH	8	ns	ns	ns	ns

4.1.5 FHL-1

Bronchien / Bronchioli:

Das Epithel der Bronchien / Bronchioli wurde in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und in den Referenz-(Spender)-Lungen zwischen 83 – 100 % der Fälle FHL-1 positiv. Es war eine schwache bis mittlere Färbeintensität nachweisbar (s. **Abb. 33**; S. 64). Die glatte Muskulatur und die Adventitia der Bronchien / Bronchioli zeigten nur bei den COPD-Lungen und den CTEPH-Lungen eine Immunreaktivität zwischen 15 – 25 % mit einem Färbeintensitätsgrad von 0.5 - 1.0.

Signifikante Unterschiede bei der FHL-1-Immunreaktivität lagen zwischen den Untersuchungsgruppen nicht vor (s. **Tab. 23**; S. 64).

Arterielle Gefäße:

Das Endothel war in 60 – 90 % der Fälle in den verschiedenen Erkrankungsgruppen FHL-1 positiv, bei vorwiegend schwacher Färbeintensität. Dagegen war nur in 50 % der Spenderlungen eine FHL-1-Immunreaktivität nachweisbar (s. **Abb. 34**; S. 65). Die glatte Muskulatur zeigte in 10 – 25 % in den untersuchten Lungen eine schwache Färbeintensität. Die Adventitia zeigte nur in den CTEPH-Lungen, COPD-Lungen und UIP-Fibrose-Lungen eine Färbeintensität von 0.5 - 1.0, wobei der Prozentsatz der Fälle zwischen 5 – 20 % lag.

Statistisch signifikante Unterschiede lagen zwischen den COPD-Lungen und den Referenz-(Spender)-Lungen vor ($p=0,021$; Fisher's Exakter Test) (s. **Abb. 31**, S. 62). Weiterhin zeigten sich im Endothel Unterschiede zwischen den CTEPH-Lungen und den Referenz-(Spender)-Lungen ($p=0,022$; Fisher's Exakter Test) (s. **Tab. 24**; S. 65).

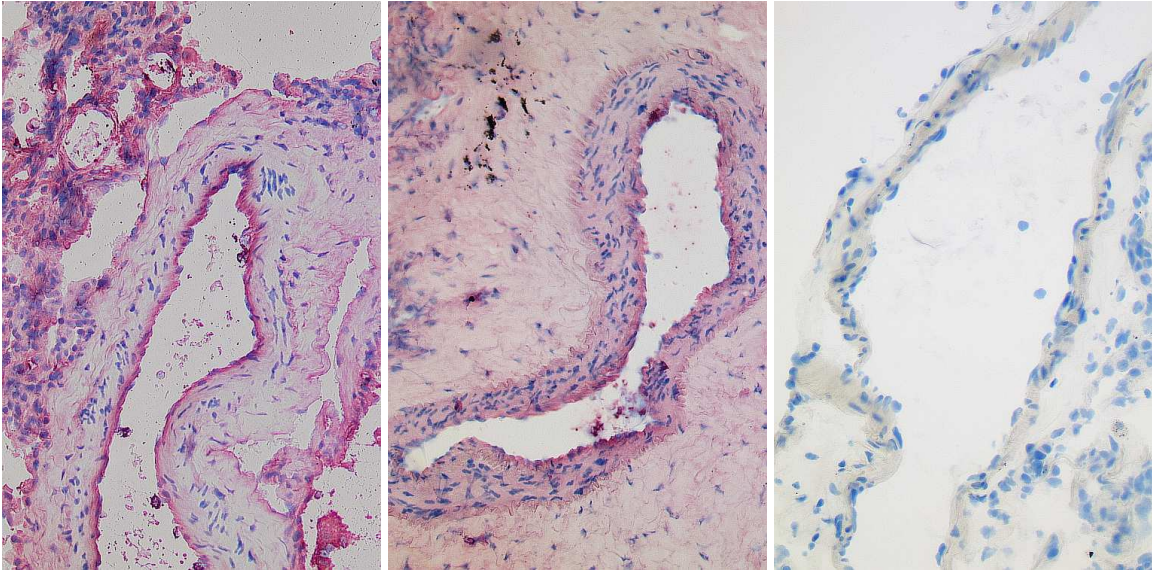


Abb. 31 FHL-1-Färbung in humanen Arterien. **Links:** COPD-Lunge (OV x 10), **Mitte:** Spenderlunge (OV x 10), **Rechts:** Negativ-Kontrolle (CTEPH-Lunge) (OV x 10).

Venöse Gefäße:

Das Endothel zeigte in 33 – 63 % der Fälle in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und in den Referenz-(Spender)-Lungen eine schwache Immunreaktivität (s. **Abb. 35**; S. 66). Die glatte Muskulatur war in 11 – 48 % der untersuchten Lungen schwach FHL-1-positiv. Die Adventitia zeigte in den COPD-Lungen, CTEPH-Lungen und UIP-Fibrose-Lungen eine schwache Immunreaktivität.

Signifikante Unterschiede bei der FHL-1-Immunreaktivität lagen zwischen den Untersuchungsgruppen nicht vor (s. **Tab. 25**; S. 66).

Alveolarmakrophagen und Alveolarepithel:

Die Alveolarmakrophagen zeigten in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und den Referenz-(Spender)-Lungen eine schwache, mittlere und starke Färbintensität, wobei der Prozentsatz der Fälle zwischen 70 % und 95 % schwankte (s. **Abb. 36**; S. 67). Die Alveolarepithelzellen wurden in 10 – 60 % der Fälle in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und in den Referenz-(Spender)Lungen mit einer überwiegend schwachen Immunreaktivität nachweisbar (s. **Abb. 37**; S. 68).

Die FHL-1-Immunreaktivität in den Alveolarmakrophagen zeigte keine Unterschiede bei den untersuchten Lungen (s. **Tab. 26**; S. 67). Allerdings bestand ein deutlicher Unterschied der FHL-1-Immunreaktivität zwischen den UIP-Fibrose-Lungen und den Referenz-(Spender)-Lungen ($p=0,043$; Fisher's Exakter Test) (s. **Tab. 27**; S. 68 und **Abb. 32**; unten).

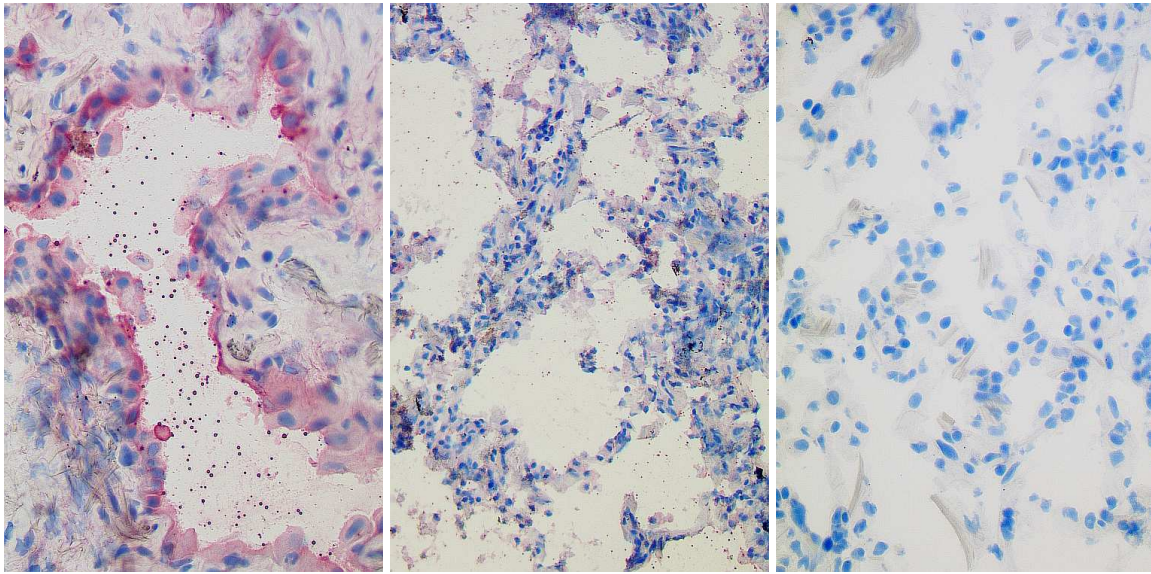


Abb. 32 FHL-1-Färbung der Alveolarepithelzellen. **Links:** UIP-Fibrose-Lunge (OV x 20), **Mitte:** Spenderlunge (OV x 10), **Rechts:** Negativ-Kontrolle (CTEPH-Lunge) (OV x 20).

Interstitielles Bindegewebe und interstitielle glatte Muskulatur:

Das Bindegewebe der verschiedenen Erkrankungsgruppen und der Referenz-(Spender)-Lungen war in 15 – 65 % der Fälle immunreaktiv, wobei es eine schwache und mittlere Färbeintensität aufzeigte. Die interstitielle glatte Muskulatur in den verschiedenen Erkrankungsgruppen und der Referenz-(Spender)-Lungen zeigte keine Immunreaktivität.

Signifikante Unterschiede bei der FHL-1-Immunreaktivität lagen zwischen den Untersuchungsgruppen nicht vor.

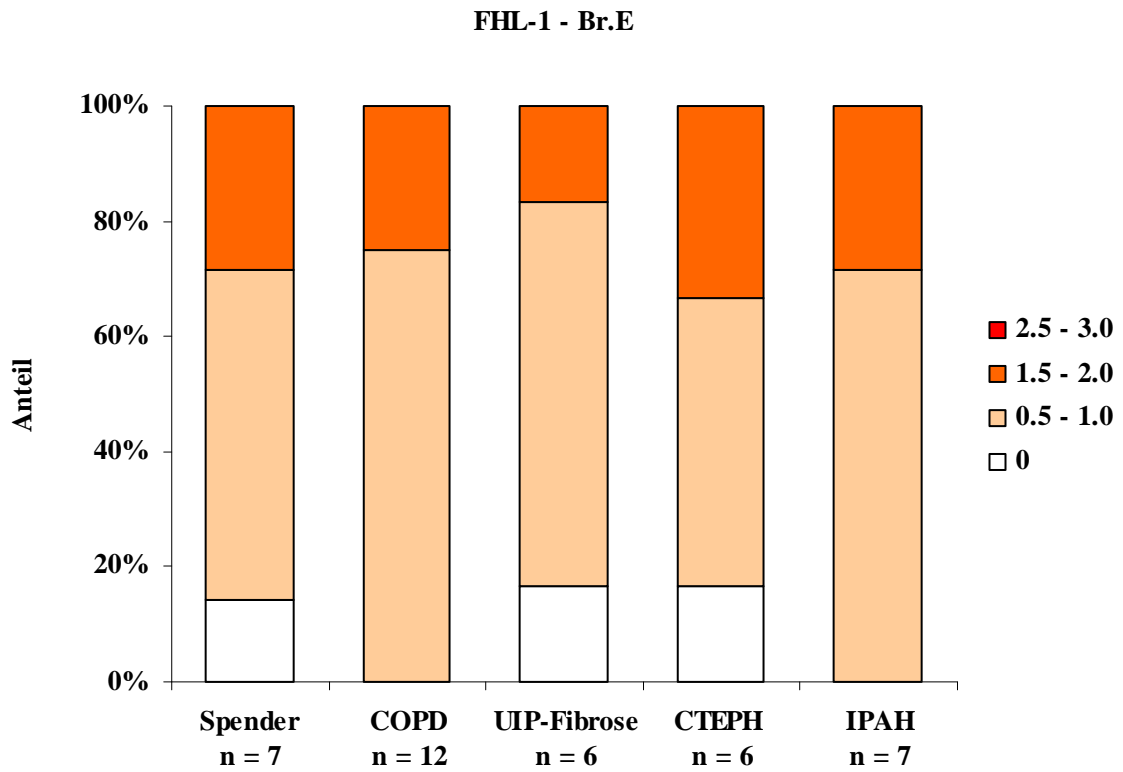


Abb. 33 FHL-1-Immunreaktivität (0 - 3.0) im Endothel der Bronchien / Bronchioli (Br.E).

Tab. 23 FHL-1-Br.E: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).

	n	Spender	COPD	UIP	CTEPH
Spender	7				
COPD	12	ns			
UIP	6	ns	ns		
CTEPH	6	ns	ns	ns	
IPAH	7	ns	ns	ns	ns

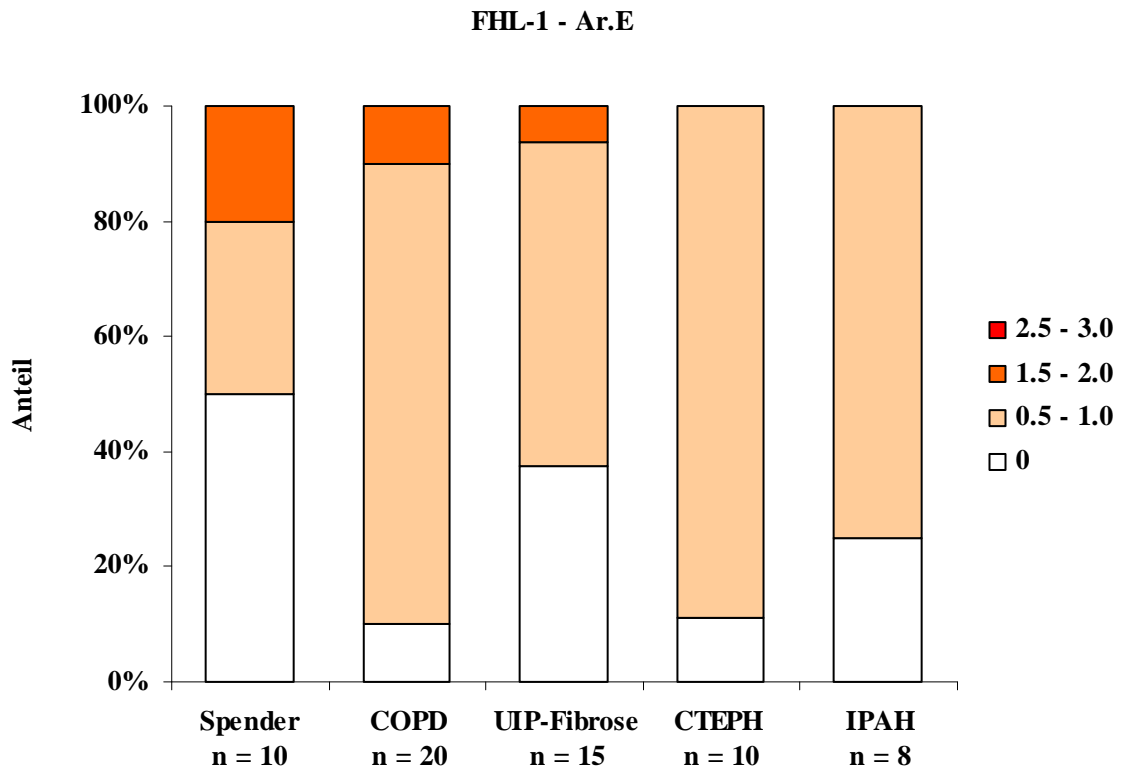


Abb. 34 FHL-1-Immunreaktivität (0 - 3.0) im Endothel der arteriellen Gefäße (Ar.E).

Tab. 24 FHL-1-Ar.E: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).

	n	Spender	COPD	UIP	CTEPH
Spender	10				
COPD	20	0.021			
UIP	15	ns	ns		
CTEPH	10	0.022	ns	ns	
IPAH	8	ns	ns	ns	ns

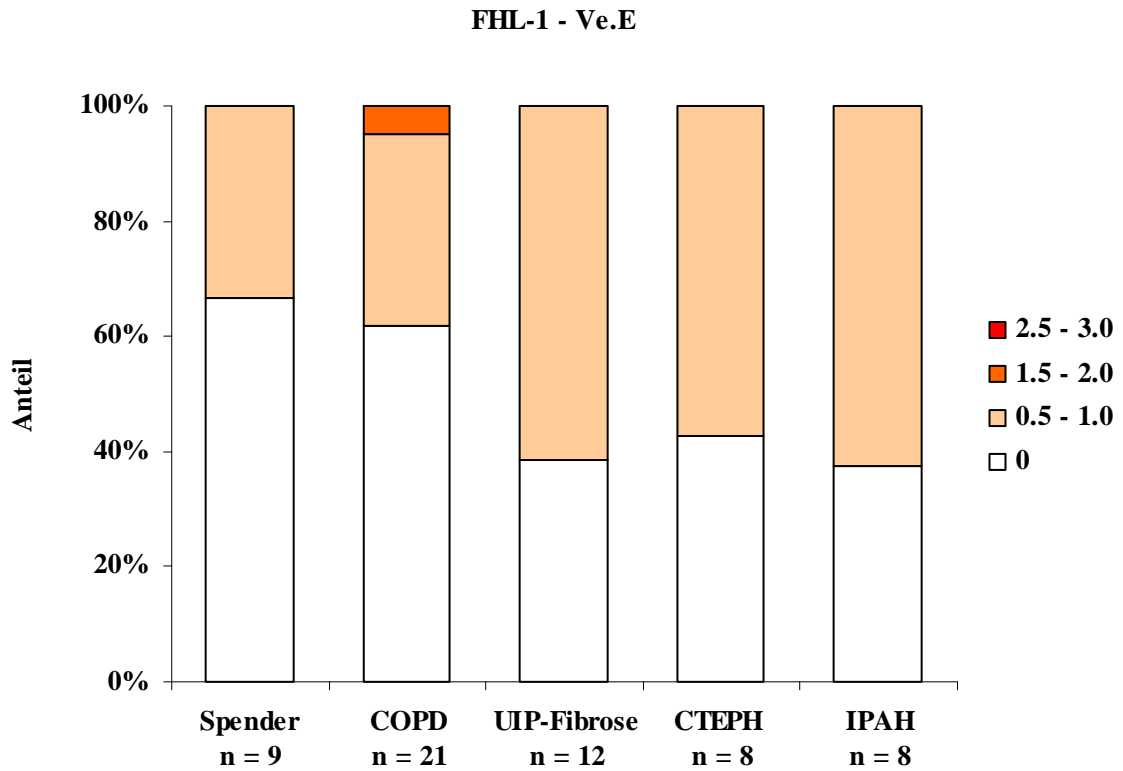


Abb. 35 FHL-1-Immunreaktivität (0 - 3.0) im Endothel der venösen Gefäße (Ve.E).

Tab. 25 FHL-1-Ve.E: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).

	n	Spender	COPD	UIP	CTEPH
Spender	9				
COPD	21	ns			
UIP	12	ns	ns		
CTEPH	8	ns	ns	ns	
IPAH	8	ns	ns	ns	ns

FHL-1 - AM

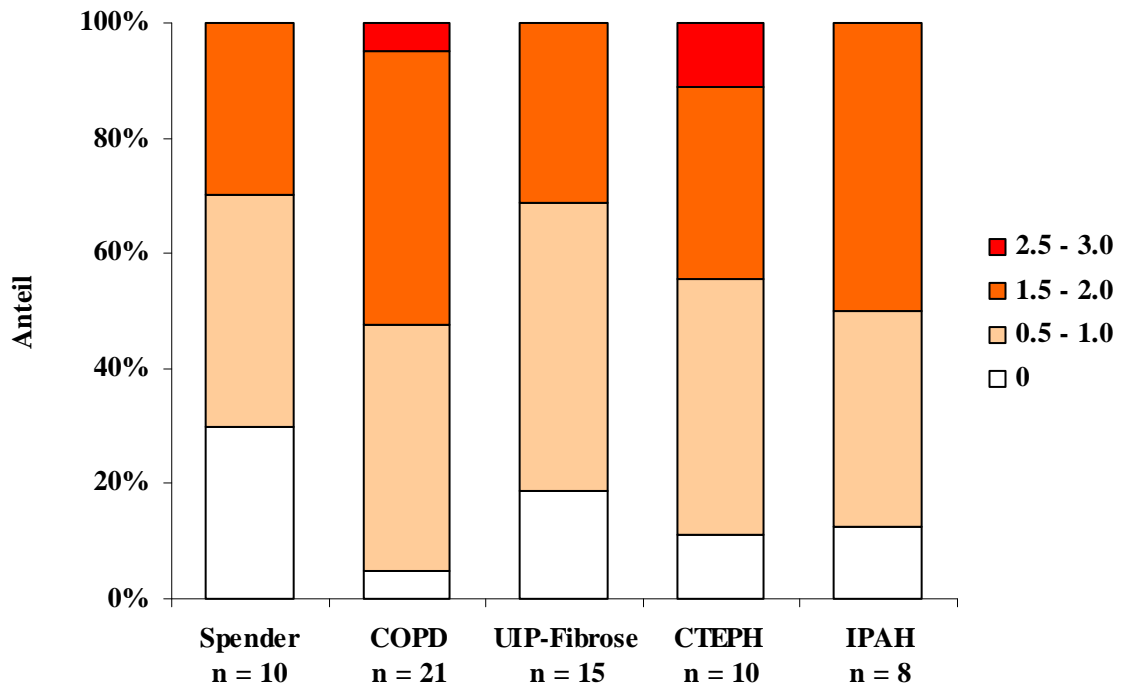


Abb. 36 FHL-1-Immunreaktivität (0 - 3.0) der Alveolarmakrophagen (AM).

Tab. 26 FHL-1-AM: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).

	n	Spender	COPD	UIP	CTEPH
Spender	10				
COPD	21	ns			
UIP	15	ns	ns		
CTEPH	10	ns	ns	ns	
IPAH	8	ns	ns	ns	ns

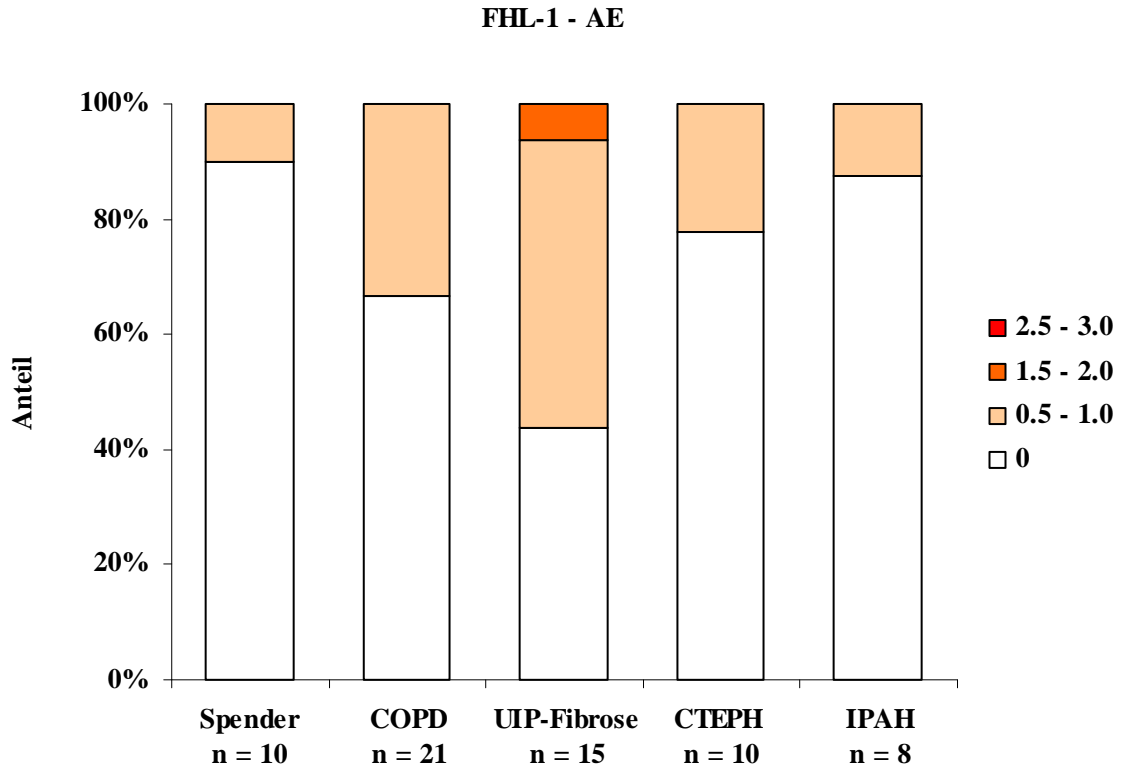


Abb. 37 FHL-1-Immunreaktivität (0 - 3.0) der Alveolarepithelzellen (AE).

Tab. 27 FHL-1-AE: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).

	n	Spender	COPD	UIP	CTEPH
Spender	10				
COPD	21	ns			
UIP	15	0.043	ns		
CTEPH	10	ns	ns	ns	
IPAH	8	ns	ns	ns	ns

5 Diskussion

5.1 Ziele der Studie

In der vorliegenden Studie wurde mittels immunhistochemischer Techniken untersucht, ob „Hypoxie-regulierte“ Proteine bei chronischen, nicht-neoplastischen Lungenerkrankungen des Menschen eine Rolle spielen. Hierzu wurde die Proteinexpression von Genen untersucht, die sich in experimentellen Erkrankungsmodellen als signifikant reguliert herausgestellt haben. Reguliert waren: Vimentin, Catalase, CD36, HMGB-1 und FHL-1. Im Tiermodell zeigten sich mögliche regulatorische Einflüsse der Proteine im Zusammenhang der Induktion einer pulmonal-arteriellen Hypertonie auf der Basis einer chronischen Hypoxie (57). Mit Hilfe der kompartiment-spezifischen Analyse der Proteine wurde versucht, die Verteilungsmuster der obengenannten Proteine in menschlichen Lungenpräparaten mit klinisch symptomatischer Hypoxie und / oder pulmonaler Hypertonie zu erkennen. Dadurch soll ermöglicht werden, erste Rückschlüsse auf ihre pathophysiologische Bedeutung im Rahmen dieser Erkrankungen ziehen zu können.

Die Grundlage aerober Stoffwechsellleistungen des menschlichen Organismus ist die ausreichende Oxygenierung der Erythrozyten in der Lungenstrombahn. Dieser Oxygenierung des Blutes unterliegen physiologische Regelkreisläufe. Bei einem verringerten Sauerstoffangebot (Hypoxie) besitzen Säugetierzellen die Fähigkeit, einen bestimmten Regulationsmechanismus in Gang zu setzen, um eine Adaptation zu erreichen (17). HIF (Hypoxie-induzierbarer Faktor) ist ein wesentlicher Transkriptionsfaktor pulmonaler Prozesse bei Hypoxie (101). Er aktiviert eine erhöhte Expression von Genen, die bei Hypoxie eine Rolle spielen. Folgende Proteine beteiligen sich an der adaptativen Zellantwort auf Hypoxie: VEGF, Erythropoetin, Glykogen u.a. (68). Der Subtyp HIF-2 α scheint insbesondere für das vaskuläre „remodelling“ wichtig zu sein (113). Es wird vermutet, dass die Hochregulation von Vasokonstriktoren durch HIF-2 α dazu beiträgt, die Entwicklung des Hypoxie-bedingten Gefäß-„remodellings“ zu fördern (18). Vorangegangene Studien berichteten, dass die chronische Hypoxie der Auslöser einer pulmonale Hypertonie sein kann, der über eine anhaltende Vasokonstriktion zu Gefäßumbau („remodelling“) der pulmonalen Widerstandsgefäße führt. Es kommt sowohl zum „remodelling“ muskulärer Gefäße, als auch zur Neo-Muskularisierung nicht-muskulärer kleiner präalveolärer Lungengefäße (39;84;85).

5.2 Kritische Betrachtung der Methode

Der Nachweis von Proteinen durch die Immunhistochemie erfolgt durch das Identifizieren und Markieren von Proteinen. Dieser Vorgang setzt voraus, dass die Proteine durch Konservierung und Fixierung nicht verändert, zerstört oder unzugänglich gemacht wurden, wie das z. B. durch die mit einer Formalin-Fixierung verbundene Denaturierung, durch Autolyse oder auch durch inadäquate Konservierung von Proteinen geschehen kann (109). Die Verwendung von kryo-asserviertem Gewebe, von dem Gefrierschnitte angefertigt werden, stellt auch heute noch das einfachste und effektivste Verfahren dar, Antigene in komplexen Geweben zu visualisieren. Gewisse Standards müssen aber auch bei der Gefrierschnitt-Immunhistochemie eingehalten werden, da es, z.B. bei zu langen Inkubationszeiten zur Quellung des Gewebes bzw. der Zellen kommen kann. Ein gewisser Nachteil der Gefrierschnitt-Immunhistochemie ist die eingeschränkte Detailbeurteilung der histologischen Strukturen, da die Schnittdicke der Kryopräparate in der Regel höher als die von Paraffin-eingebetteten Geweben ist. Dieser Nachteil wird meist durch gute Schnittqualität und durch die Auswertung leicht erkennbarer Zellstrukturen, wie z.B. zytoplasmatischer Immunreaktivitäten, kompensiert. Für die immunhistochemische Färbung nukleärer Proteine hat sich herausgestellt, dass genauere Resultate (z.B. für das streng nukleär lokalisierte Ki-67 Protein) zu erzielen sind, wenn auf die Kryoasservation verzichtet wird und Gewebe genutzt wird, das in gepuffertem Formalin fixiert wurde und anschließend einem sog. „Antigen-Retrieval“ unterzogen wurde. Falsch positive Reaktionen von primären und sekundären Antikörpern sowie durch die endogene alkalische Phosphatase können die Spezifität einer immunhistochemischen Untersuchung prinzipiell beeinträchtigen. Es besteht die Gefahr des Reagierens mit nicht erwünschten Epitopen. Daher wurden zur Identifizierung falsch positiver Reaktionen bei allen immunhistochemischen Färbungen Negativkontrollen mitgefärbt. Ausschließlich Färberesultate bei fehlender spezifischer Immunreaktivität der Negativkontrollen wurden in die Auswertung aufgenommen.

5.3 Vimentin-Immunreaktivität

Vimentin wird den Intermediärfilamenten der Zellen zugeordnet. Die Intermediärfilamente besitzen einen Durchmesser von 8 - 11 nm. Sie bilden ein intrazelluläres Netzwerk zur Plasmamembran mit sehr widerstandsfähiger Konsistenz. Das Molekulargewicht von Vimentin liegt bei 54 kDa. Die Anzahl, Länge und Position der Filamente innerhalb der

Zelle wird in der jeweiligen Zelle selbst reguliert (61). Vimentin ist bezüglich zytoplasmatischer Intermediärfilamente das am weitesten verbreitete Protein in Zellen mesenchymaler Herkunft, einschließlich Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen (10). Vimentinfibrillen errichten interzellulär ein trabekelartiges Netzwerk, das den Zellen gegenüber Zug- und Scherkräften eine optimale Standfestigkeit und Stabilität gibt (52). Bis vor kurzem galt Vimentin als ein zytoskelettales Strukturprotein, das wenig moduliert wird. Genauere Analysen der jüngsten Zeit zeigten allerdings, dass Vimentin z.B. aktiv im Rahmen der Differenzierung von Monozyten / Makrophagen heraufreguliert wird (9).

Alle in dieser Studie untersuchten Erkrankungsgruppen (UIP, COPD, CTEPH, IPAH) unterliegen gewissen inflammatorischen Prozessen, daher wäre eine starke immunhistochemische Proteinexpression in den Alveolarmakrophagen zu erwarten. Auch Mor-Vakin et al. zeigten, dass Vimentin von Makrophagen als Antwort auf proinflammatorische Reize sezerniert wird und möglicherweise in die Immunantwort involviert ist (70). Die Alveolarmakrophagen in den untersuchten Erkrankungsgruppen zeigten in allen Gruppen eine starke Vimentin-Immunreaktivität. Es konnte aber keine Heraufregulation beobachtet werden. Die Färbeintensität unterscheidet sich nicht signifikant vom Normalbefund (Spenderlunge), so dass auf Proteinebene keine Anhaltspunkte für eine signifikante Vimentin-Regulation gefunden wurden.

Das mehrreihige hochprismatische Epithel der Bronchien / Bronchioli und das Alveolarepithel zeigten aufgrund ihrer epithelialen Herkunft keine immunhistochemische Vimentin-Färbung.

Die Endothelzellantwort der Gefäße auf hypoxischen Stress kann sich, abhängig von der Dauer der Hypoxie, in zweierlei Weise manifestieren. Eine kurze Hypoxie-Wirkung ist der Grund für physiologische und reversible Anpassung des Gefäßtonus und einer Umverteilung des Blutes zugunsten besser ventilierter Lungenareale. Chronischer hypoxischer Stress resultiert in irreversiblen „remodelling“ des Gefäßsystems und des umliegenden Gewebes, mit Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur und mit Fibrosierung (35). Das arterielle und venöse Endothel zeigte bei allen untersuchten Erkrankungsgruppen eine starke Proteinexpression für Vimentin. Diese unterscheidet sich allerdings nicht deutlich von der der Spender. Im Wesentlichen enthält das Endothel und auch die Adventitia der Gefäße eine große Anzahl von Fibrozyten, die hier eine positive Färbereaktion für Vimentin zeigten. Obwohl bei den Erkrankungsgruppen kein deutlicher Unterschied gegenüber dem Normalbefund (Spender) gezeigt werden konnte, nehmen wir

an, dass das arterielle und venöse Endothel eine entscheidende Rolle bei chronisch hypoxischem Stress in der Regulation des Gefäßtonus und im Zellwachstum der Gefäßwände besitzt. Die Veränderung der Endothelfunktion in den pulmonalen Gefäßen, bis hin zur Endothelzerstörung resultiert in Gefäßrarefizierung, Hypoxie und späterer pulmonalen Hypertonie (7).

Vimentin markiert weiterhin die arterielle und venöse Gefäßmuskulatur. Während sich bei den Spendern in den Gefäßstrukturen ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Fibrozyten und glatter Gefäßmuskulatur befindet, kommt es bei den COPD-Lungen zu einem Umbau der Lungengefäße mit Hypertrophie und Hyperplasie glatter Muskulatur. In der arteriellen und venösen Gefäßmuskulatur der COPD-Lungen wurde eine geringe Vimentin-Immunreaktivität nachweisbar. Es konnte gezeigt werden, dass in der arteriellen Gefäßmuskulatur der COPD-Lungen im Vergleich zu den Spendern ein hochsignifikanter Unterschied besteht. In der venösen Gefäßmuskulatur der COPD-Lungen war im Vergleich zu den Spendern ebenfalls ein signifikanter Unterschied bezüglich Vimentin zu erkennen. Diese Ergebnisse untermauern den Einfluss einer Vimentin-Regulation im Rahmen des pulmonal-vaskulären „remodellings“.

Ein weiterer signifikanter Unterschied der Vimentin-Immunreaktivität zeigte sich zwischen den UIP-Fibrose-Lungen und den COPD-Lungen im Bereich der arteriellen Gefäßmuskulatur. Die im Bereich der arteriellen Gefäße bei den UIP-Fibrose-Lungen beobachtete, stärkere Immunreaktivität lässt Zusammenhänge mit einem akzelerierten Gefäß-“remodelling“ vermuten. Es ist eine häufig gemachte pathomorphologische Beobachtung, dass gerade bei UIP-Fibrose-Lungen stenosierende Gefäßveränderungen arterieller pulmonaler Widerstandsgefäße auftreten, die das Maß der bei COPD-induzierten hypertensiven Vaskulopathie erheblich überschreiten. Diese Ergebnisse korrelieren mit Beobachtungen jüngster Zeit, die eine Heraufregulation von Vimentin im Rahmen der Arteriogenese in einem arterio-venösen Shunt-Modell beschreiben (32).

Zusammenfassend zeigten sich starke Vimentin-Immunreaktionen in den Alveolarmakrophagen und im art. und ven. Gefäßendothel, wie auch eine insgesamt verminderte Vimentin-Expression bei den COPD-Lungen gegenüber den Spendern in der art. und ven. Gefäßmuskulatur und gegenüber den UIP-Fibrose-Lungen in der art. Gefäßmuskulatur.

5.4 Catalase-Immunreaktivität

Im Rahmen von Hypoxie-induzierten Zellschädigungen spielen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) eine bedeutsame Rolle. Speziell neutrophile Granulozyten können über eine ROS-Synthese wichtige physiologische verschiedene Vorgänge, wie z. B. das Zellwachstum, die Apoptose und die Transkription beeinflussen (59;103;104;114). Unter pathologischen Bedingungen kann es dann zu einer gesteigerten ROS-Produktion kommen. Weil die Radikale rasch und in großen Mengen produziert und abgegeben werden, bezeichnet man diesen Vorgang als „oxidativen burst“ der neutrophilen Granulozyten. Die reaktiven Sauerstoffprodukte können von den Zellen nach außen abgegeben werden und dort größere, nicht sofort phagozytierbare Partikel oder Zellen schädigen. Verschiedene Zellen besitzen die Fähigkeit antioxidative Substanzen zu produzieren, um die gebildeten Radikale abzufangen. In der Lunge sind diese Zellen vor allem die Alveolarepithelzellen, die Bronchialepithelzellen und Alveolarmakrophagen (51;58). Die wichtigsten Antioxidantien sind die Catalase, die SOD und die Glutathionperoxidase (97). Aufgrund von einer unterschiedlichen Wasser- und Lipidlöslichkeit sind die endogenen Antioxidantien für bestimmte Kompartimente zuständig (Membran, Zytoplasma). Zelluläre Läsionen treten in der Regel dann auf, wenn es zu einem Ungleichgewicht zwischen Schutzsystemen und dem ROS kommt.

In der Lunge konnte gezeigt werden, dass z. B. bei Applikation von Bakterien oder Endotoxin eine ausgeprägte Bildung von ROS induziert wird (69). Cantin et al. beschrieben erstmals den Zusammenhang zwischen oxidativer Lungenbelastung und einer Lungenparenchymschädigung. Sie erbrachten den Nachweis, dass bei idiopathischer Lungenfibrose Entzündungszellen aus der Lunge von Patienten vermehrt Oxidantien produzierten (21). Kwapiszewska et al. zeigten im Tiermodell, dass Catalase in Alveolarepithelzellen, Bronchialepithelzellen und Alveolarmakrophagen exprimiert wird. Sie belegten die Hypothese, dass während der Hypoxie ein Anstieg der Antioxidantien (Catalase) sowie ein höherer Anteil von ROS vorliegt und vermuten, dass höhere Level an ROS durch Catalase neutralisiert werden (57). Auch Farioli-Vecchioli et al. zeigten im Tiermodell (Ratten), dass Catalase sich in den Alveolarepithelzellen befinden. Die Catalase stellte einen hochspezifischen Marker für Peroxisomen dar (36). Nakanishi et al. konnten nachweisen, dass die Catalase-Aktivität in der Leber und in der Niere von Mäusen deutlich herunterreguliert wurde, nachdem sie einen Tag hypobarer Hypoxie ausgesetzt wurden (73).

Bei den immunhistochemischen Untersuchungen dieser Studie mit Catalase stimmten die Ergebnisse aus den humanen Lungengeweben mit den Erkenntnissen aus dem Tiermodellen, der experimentellen chronischen Hypoxie der Maus, überein. Die Catalase-Immunreaktivität markierte hauptsächlich das Epithel der Bronchien, das Endothel der arteriellen Gefäße, die Alveolarepithelzellen und die Alveolarmakrophagen. Vor allem zeigte sich in den Alveolarepithelzellen der UIP-Fibrose-Lungen eine signifikant höhere Proteinexpression der Catalase gegenüber dem Normalbefund (Spender). Ebenfalls gegenüber den COPD- und CTEPH-Lungen zeigte sich in den Alveolarepithelzellen der UIP-Fibrose-Lungen eine signifikant höhere Catalase-Immunreaktivität.

Auch Coursin et al. (25) konnten eine Catalase-Reaktivität vor allem in den Alveolarepithelzellen nachweisen. Eine weitere Studie von Clerici et al. zeigte, dass Alveolarepithelzellen sehr gut Hypoxie tolerieren und trotz längerer Hypoxie-Einwirkung nicht zerstört werden. Sie sind in der Lage, ihre physiologische Funktion weiterhin auszuüben (23). Die verstärkte Immunreaktivität der Catalase in den Alveolarepithelzellen kann daher eine protektive Rolle gegen das Vorschreiten der Lungenfibrose spielen. Die Catalase fungiert als Abwehrmechanismus gegen den erhöhten intraparenchymatösen ROS-Spiegel.

Fibrosen sind meist die Folge chronisch verlaufender Entzündungen. Das morphologische Bild wird von einer interstitiellen Faservermehrung bestimmt. Die Entzündung führt zu einer Aktivierung von PMN, Makrophagen, eosinophilen Granulozyten, Mastzellen, Thrombozyten sowie epithelialen und endothelialen Zellen. Es kommt zur Freisetzung von Zytokinen wie Interleukin-1, Interleukin-6, Interleukin-8 und Wachstumsfaktoren wie TNF- α , PDGF. Die Interleukine stammen vor allem aus den Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und den Fibroblasten selbst. Diese Mediatoren wirken aktivierend und chemotaktisch auf die Fibroblasten, welche dann als Fibrozyten Kollagenfasern neu bilden. Kida et al. zeigten erst in einer jüngsten Studie, dass Interleukin-6 (IL-6) eine schützende Rolle auf die Alveolarepithelzellen ausübt. Sie nehmen an, dass IL-6 eine antioxidative Funktion hat und damit die Alveolarepithelzellen vor ROS schützt (55). Des Weiteren zeigten auch Wu et al., dass der Keratinozyten-Wachstumsfaktor die Lunge vor oxidativem Stress schützt, was teilweise durch eine Verstärkung der DNA-Reparaturmechanismen in den Alveolarepithelzellen erklärt werden kann (115).

Diese Studie unterstützt die Annahme, dass das Alveolarepithel aktiv am Pathomechanismus des Fibrosierungsprozesses teilnimmt und gibt Anlass zu weiteren Untersuchungen.

Der oxidative Stress steht in Verbindung mit der Pathologie weiterer Lungenerkrankungen, wie es z. B. auch bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung beobachtet wurde (54). Dieser Effekt ist nach den o. g. Ergebnissen offenbar unabhängig von der Catalase-Immunreaktivität der Alveolarepithelzellen. Bei den COPD-Lungen scheint vielmehr der Catalase-Gehalt der Alveolarmakrophagen eine Rolle zu spielen. Wir beobachteten signifikant erhöhte Catalase-Werte in den Alveolarmakrophagen bei den COPD-Lungen gegenüber den anderen Erkrankungsgruppen (IPAH und CTEPH). Die Stoffgemische, wie z. B. der Tabakrauch sind eine bedeutende Quelle für die Entstehung von ROS. Donaldson et al. zeigten, dass kleinste Partikel z. B. in Abgasen, die tief eingeatmet werden können und in der Lunge verbleiben, in der Lage sind, Radikale zu bilden (30). Ein ähnlicher Wirkungsmechanismus wurde für die Asbestfasern nachgewiesen, welche allerdings in unmittelbarem Zusammenhang mit der Lungenfibrose stehen (83). Da die aktivierten Alveolarmakrophagen ein Produktionsort von reaktiven Sauerstoffspezies sind, nehmen wir an, dass sie eine Schlüsselrolle in der Regulation von Entzündungs- und Reparaturmechanismen haben. Auch Henke et al. konnten diese Erkenntnisse in ihrer Studie nachweisen (47).

Im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchungen mit Catalase-Antikörpern zeigte sich bei den UIP-Fibrose- und COPD-Lungen im Endothel der arteriellen Gefäße eine signifikant höhere Proteinexpression von Catalase gegenüber den Spendern. Diese Resultate lassen darauf schließen, dass die Catalase der arteriellen Gefäßendothelien nicht über die Fibrogenese stimuliert wird, sondern dass die bei beiden Erkrankungen in der Regel vorliegende ausgeprägte Hypoxie eine Rolle spielt.

Die Hypoxie stört die Endothelfunktion durch Veränderung des Gefäßtonus, erhöht die Permeabilität und fördert die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (98). In der chronischen Hypertonie findet man ein Ungleichgewicht zu Gunsten der Vasokonstriktoren auf Grund der Hypoxie. Dies führt zu strukturellen Gefäßveränderungen. Dabei spielen die Vasokonstriktoren z. B. Angiotensin II (AT II), eine wichtige Rolle, da Hypoxie den AT II-Level erhöht. Der größte Stimulus auf die Gefäßwände ist die mechanische Dehnung, woraufhin AT II entsteht. Es resultiert

schließlich die Freisetzung von ROS, da sich wichtige Vorkommen von ROS in den Gefäßwänden befinden (48).

Nakazono et al. beobachteten im Tiermodell, dass bei hypertensiven Ratten durch die Gabe von Antioxidantien, welche ROS eliminieren, eine signifikante Blutdrucksenkung erzielt werden konnte. Im Gegensatz dazu hatte die Gabe von Antioxidantien bei normoxischen Ratten keinen Einfluss auf die Blutdruckregulation. Es wird daher angenommen, dass ROS zur Hypertonie beiträgt (74). Hirata et al. zeigten eine Erhöhung von ROS bei Hypertonie als Antwort auf eine Gefäßstimulation durch mechanische Dehnung der Gefäße oder durch AT II. Eine erhöhte Anzahl von Antioxidantien bewirkt möglicherweise eine Unterdrückung von Komplikationen der Hypertonie (48).

Zusammenfassend bedeutet eine Erhöhung von antioxidativen Substanzen (wie z. B. der Catalase), dass in den hier untersuchten Erkrankungsgruppen ein erhöhter oxidativer Stress im Lungengewebe vorliegt. Es lässt sich daher vermuten, dass die signifikant höhere Proteinexpression von Catalase bei den UIP-Fibrose- und COPD-Lungen gegenüber den Spenderlungen hier Hypoxie-bedingt ist. Außerdem zeigte sich eine erhöhte Catalase-Immunreaktivität in den Alveolarepithelzellen der UIP-Fibrose-Lungen, was mit Entzündungsreaktionen in den Fibroselungen zu erklären ist.

5.5 CD36-Immunreaktivität

CD36, auch Glykoprotein IV genannt, ist eines der Rezeptor-Moleküle, mit deren Hilfe Makrophagen apoptotische Zellen erkennen und phagozytieren können (91). Über den CD36-Rezeptor werden apoptotische Zellen erkannt (88), ähnlich wie mittels des Vitronectin-Rezeptors (92). Eines der wichtigsten Moleküle, das als „molekulare Brücke“ zwischen Makrophagen und apoptotischen Zellen funktioniert, ist das Glykoprotein TSP-1. CD36 steht in Verbindung mit sehr verschiedenen Funktionen des Organismus, wie Zelladhäsion und Zelldifferenzierung und auch mit diversen Erkrankungen (z. B. Atherosklerose, Myokardinfarkt) (43). Es wurde assoziiert mit Prozessen wie Oponierungsrezeptorfunktion, Fettmetabolismus und Gefäßneubildung (118). Das Protein konnte auf vielen Zellen (z. B. Endothelzellen) nachgewiesen werden und fungiert als Rezeptor für TSP-1 (27). TSP-1 scheint im Rahmen physiologischer und pathologischer Prozesse, die mit einer niedrigen Sauerstoff-Spannung einhergehen, eine Rolle zu spielen (80).

Das CD36-Rezeptormolekül wurde in den immunhistochemischen Untersuchungen dieser Arbeit nur in wenigen Zelltypen entdeckt. Erwartungsgemäß fanden wir in den Spenderlungen eine CD36-Immunreaktivität in den Alveolarmakrophagen und Bronchialepithelien. Eine vorangegangene Studie von Liang et al. zeigten eine erhöhte CD36 Proteinexpression als Antwort auf ein defektes Insulinsignal in Makrophagen (63). Huh et al. beschreiben, dass CD36 auf Monozyten, Thrombozyten und bestimmten mikrovaskulären Endothelien exprimiert wird. Unter anderem dient CD36 als Scavenger Rezeptoren für apoptotische neutrophile Zellen (50).

In diesen immunhistochemischen Untersuchungen war in den Alveolarmakrophagen der Spenderlungen eine signifikant höhere CD36-Immunreaktivität als bei den COPD-Lungen nachweisbar. Diese Regulation könnte mit einer lokal verringerten Immunfunktion der Alveolarmakrophagen bei den COPD-Lungen erklärt werden. Obwohl die Untersuchungen von Pons et al. keine Unterschiede bezüglich der CD36-Expression in den Alveolarmakrophagen bei Patienten mit einer COPD gegenüber gesunden Kontrollgruppen nachweisen konnten, zeigten sie eine geringe Expression von Humanen Leukozyten Antigenen (HLA) in den Alveolarmakrophagen bei Patienten mit einer COPD. Pons et al. vermuten daher eine eher lokal als systemisch verringerte Immunfunktion der Alveolarmakrophagen bei den COPD-Lungen (82).

Diese Untersuchungen zeigten weiterhin in den Alveolarmakrophagen der UIP-Fibrose-Lungen eine signifikant höhere CD36-Immunreaktivität als bei den COPD-Lungen. Wir nehmen an, dass CD36 einen regulatorischen Effekt bei der Erkennung von apoptotischen Zellen durch phagozytierende Makrophagen ausübt. Auch Yoshimi et al zeigten eine höhere CD36-Immunreaktivität in den Alveolarmakrophagen von Patienten mit einer DIP- oder UIP-Fibrose. Sie vermuten, dass der oxidative Stress und die Apoptose eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie von interstitiellen Lungenerkrankungen spielen (119).

Febbraio et al. beschrieben auch, dass CD36 die Makrophagen-assoziierte Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen fördert (37). Makrophagen-gebundenes CD36 fungiert auch als Klasse B Scavenger Rezeptor für oxidiertes Low Density-Lipoprotein (81). Fadok et al. bewerteten die potentielle Rolle der Scavenger Rezeptoren für die Anlockung von Makrophagen. Sie fanden heraus, dass CD36 mit unterschiedlichen Rezeptoren interagieren kann. Sie konnten aber nicht zeigen, dass diese Bindung zu einer Aufnahme von apoptotischen Zellen führte (34). Die Apoptose ist eine Reaktion auf viele

verschiedene Stimuli, zu denen der oxidative Stress, Schädigung durch Chemotherapeutika und ionisierender Strahlung gehören (19). Diese immunhistochemische Färbung zeigte die Proteinexpression von CD36 in den Alveolarmakrophagen der untersuchten Gruppen. Dabei war ein Unterschied bei den COPD-Lungen gegenüber den Spendern und den UIP-Fibrose-Lungen nachweisbar. Möglicherweise beeinflussen toxische Einflüsse die Proteinexpression von CD36 bei den COPD-Lungen.

Weiterhin zeigten sich in den immunhistochemischen Untersuchungen dieser Arbeit eine signifikant höhere CD36-Immunreaktivität im Epithel der Bronchien bei den Spenderlungen gegenüber den UIP-Fibrose-Lungen. Es lässt sich vermuten, dass CD36 im Bronchialepithel physiologisch ist. Walsh et al. konnten zeigen, dass auch kleine Bronchialepithelzellen in vitro die Fähigkeit besitzen, apoptotische Zellen zu erkennen und aufzunehmen (111). Es wird vermutet, dass dadurch das subepitheliale Gewebe vor potentiell gefährlichen toxischen Substanzen der apoptotischen Zellen geschützt wird (93).

Die Lokalisation von CD36 in den glatten Gefäßmuskelzellen, wie im Tiermodell in der frühen Phase der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie nachgewiesen werden konnte, war im erkrankten humanen Lungengewebe (chronische Erkrankungen/Endstadien-Lunge) nicht zu bestätigen (57). Diese Studie zeigte in den pulmonalen Gefäßen und in den Alveolarepithelzellen keine CD36-Regulation.

Es ist davon auszugehen, dass eine Reihe weiterer Gene bzw. Proteine am Hypoxie-regulierten Gefäßumbau beteiligt sind. Um detailliertere Kenntnisse dieser komplexen regulatorischen Abläufe zu erlangen, müssen weiterführende Studien auf diesem Gebiet etabliert werden.

5.6 HMGB-1-Immunreaktivität

HMGB-1 wurde als ein chromosomales Protein bekannt und später als Zytokin neu entdeckt (116). Das HMGB-1 Protein kann grundsätzlich zwei unterschiedliche Funktionen in der Zelle übernehmen, weshalb man auch von einem „Doppelleben“ dieses Proteins spricht (72). Zum einen hat es zelluläre Funktionen eines Transkriptionsfaktors, zum anderen kann HMGB-1 extrazellulär als Ligand an RAGE („receptor for advanced glycation end products“) binden (49). Extrazelluläres HMGB-1 löst Entzündungsprozesse aus, stimuliert die Zellbewegung glatter Muskelzellen und hat bei Entwicklungsprozessen im Gehirn eine wichtige Funktion beim Auswachsen von Neuriten und Endothelien (2;5;28;49;112). Intrazellulär kann HMGB-1 sowohl im Zellkern wie auch im Zytoplasma

neoplastischer wie auch nicht-neoplastischer humaner Zellen vorkommen. Der Nachweis von HMGB-1 im Zytoplasma ist ein später Mediator für akute Lungenerkrankungen. HMGB-1 agiert als proinflammatorisches Zytokin und erhöht wiederum den pulmonalen Zytokinlevel, einschließlich TNF, IL-1 β und MIP-2. Die Regulierung von HMGB-1 zeigte Dysfunktionen der Epithelbarriere, Fieber und Gewichtsverlust in Tierexperimenten (2;117). Im Zellkern hat HMGB-1 funktionelle Bedeutung. HMGB-1 bindet an die DNA und interagiert mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und reguliert die Transkription (72). Für zirkulierendes, extrazelluläres HMGB-1 Protein existieren in vivo zwei potentielle Quellen. Einmal wird HMGB-1 von geschädigten und nekrotischen Zellen (z. B. Endothelzellen) freigegeben und zum anderem wird es von aktivierten Makrophagen als Antwort auf z. B. Sauerstoffmangel, Endotoxin und Zytokine (TNF- α) freigegeben (2;112).

Aufgrund der möglicherweise pathophysiologisch unterschiedlichen Wertigkeit des immunhistologischen Nachweises einer erhöhten / verminderten HMGB-1 Immunreaktivität im Zytoplasma und in den Zellkernen wurde die Semiquantifizierung dieses Proteins sowohl für das Zytoplasma wie auch für die Zellkerne vorgenommen.

HMGB-1 wurde in der zytoplasmatischen Auswertung im Epithel der Bronchien und in den Alveolarmakrophagen sowohl in den Spenderlungen wie auch in den übrigen Lungen mit einer mittleren Proteinexpression gefunden. Im Alveolarepithel zeigte sich ebenfalls eine mittlere Proteinexpression. Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich nur bei den UIP-Fibrose-Lungen im Alveolarepithel gegenüber den Spendern und den COPD-Lungen. HMGB-1 spielt eine bedeutende Rolle bei Entzündungen und deren generalisierten Formen, wie z. B. der Sepsis. Die erhöhte Expression von HMGB-1 während einer Hypoxie werten Ueno et al. als Ausdruck einer milden Hypoxie-induzierten Entzündungsstimulation (108). Auch im Tiermodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie fanden sich ähnliche Regulationsvorgänge, die im Zusammenhang mit einer Entzündungsreaktion gewertet wurden (57). Ueno et al. nahmen an, dass HMGB-1 der erste Mediator einer inflammatorischen Antwort auf eine Toxin-vermittelten Lungenzellschädigung ist. Erhöhte HMGB-1-Level sind auch im Plasma und im Lungenepithel von Patienten mit einem ALI-Syndrom („acute lung injury“) und ARDS („acute respiratory distress syndrom“) und in Mäusen mit LPS-induzierten Sepsis gefunden worden (108). Schlueter et al. deckten auf, dass extrazelluläres HMGB-1 als strenger Makrophagen-Aktivierungs-Faktor fungiert, wenn es an den Rezeptor von AGE („advanced glycation end products“) bindet (94). Taguchi et al. zeigten, dass eine Bindung

von HMGB-1 und RAGE u. a. die MAP-Signalkaskade in der Zelle aktivieren kann. Diese Signalkaskaden spielen bei der Wachstumsregulierung, Beweglichkeit und invasivem Wachstum von Zellen eine Rolle. In diesem Zusammenhang konnten sie weiterhin zeigen, dass eine Blockierung der Wechselwirkung von HMGB-1 und RAGE das Wachstum, die Beweglichkeit, lokales invasives Wachstum und die Metastasierung von Ratten-Gliomzellen in erheblichem Maße einschränkt (105).

In keinen anderen zellulären Kompartimenten als in den Alveolarepithelzellen zeigte sich in der Auswertung der zytoplasmatischen HMGB-1-Färbung eine signifikante Modulation der Immunreaktivität, so dass sich HMGB-1 unter Umständen als Indikator einer UIP-Fibrose eignen könnte.

In der Auswertung der nucleären HMGB-1 Färbung wurde in allen untersuchten Zellkompartimenten der humanen Spenderlungen eine vorwiegend starke Proteinexpression gefunden. Zwischen den Spendern und Erkrankungsgruppen zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Daher nehmen wir an, dass diese Resultate dem ubiquitären Vorkommen von HMGB-1 im Nukleus der meisten pulmonalen Zellen entspricht. Müller et al. zeigten, dass die HMGB-1-Proteine sich jeweils aus unterschiedlichen Domänen zusammensetzten und ubiquitär vorkommen (72). Die funktionale Bedeutung von HMGB-1 als Regulator der Transkription wurde durch den Phänotyp von *Hmgb1* mit Knock-out Mäusen bestätigt. Die Mäuse starben kurz nach der Geburt aufgrund einer Hypoglykämie und zeigten einen Defekt in der transkriptionalen Erhöhung des Glykokortikoid-Rezeptors (20).

Zusammenfassend zeigte sich, dass das HMGB-1 Protein in der Pathogenese der verschiedenen Lungenerkrankungen eine große Bedeutung besitzt. In der Lunge zeigte sich eine konstitutive nucleäre Expression von HMGB-1, in den in dieser Studie untersuchten Lungen-Kompartimenten. Dem gegenüber induziert die erhöhte zytoplasmatische HMGB-1-Immunreaktivität eine offenbar bei der UIP-Fibrose auftretende Proteinanreicherung, deren funktionelle Bedeutung noch weiter erklärungsbedürftig ist.

5.7 FHL-1-Immunreaktivität

Four and a Half LIM Domain Proteine (auch SLIM1 genannt) ist ein weiteres Protein, das möglicherweise eine bedeutende Rolle im Hypoxie-bedingten Gefäßumbau spielt.

Zunächst war bekannt, dass FHL-1 in Herzmuskelzellen (Volumenbelastung, Druckbelastung) und Skelettmuskelzellen (Trainingsmodell) während der Entwicklung einer Hypertrophie verstärkt exprimiert wird (89). Zusätzlich bewirkt die Überexpression von FHL-1 eine Myozytenelongation und Myoblastenmigration im Skelettmuskel. McGrath et al. nahmen an, dass SLIM1 in der frühen Phase der Skelettmuskeldifferenzierung eine Rolle spielt und über einen $\alpha 5$ - $\beta 1$ -Integrin vermittelten Signalweg aktiviert wird (66). Lim et al. konnten zeigen, dass FHL-1 auf mRNA-Ebene bei der Mehrzahl der untersuchten Myokardproben von Patienten mit einer hypertrophen Kardiomyopathie im Vergleich zu Myokard von einem Spenderherz und zweier „Normalherzen“ hochreguliert war. Die Funktion von FHL-1 bei HCM war ihnen nicht bekannt (64). Das häufigste Merkmal des Lungengefäßumbaus ist die Verdickung der Gefäßmuskulatur. Unter diesen Aspekten betrachtet passt FHL-1 gut in die Gruppe der Hypoxie-regulierten Proteine hinein.

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass FHL-1 in der Lunge am Hypoxie-bedingten Gefäßumbau beteiligt ist. Kwapiszewska et al. zeigten mittels mRNA-Untersuchungen und Untersuchungen auf Proteinebene eine Gefäßmuskelzell-spezifische FHL-1-Expression in intrapulmonalen Arterien von Mäuselungen (57). In der Gefäßmuskulatur waren die Gen- bzw. Proteinexpressionen bei Hypoxie-induzierten Mäuselungen stärker exprimiert als bei Normoxie. In den Bronchien zeigte sich im Mausmodell eine konstitutive Expression innerhalb des Bronchialepithels.

Auch in der vorliegenden Studie zeigte das Epithel der Bronchien im humanen Lungengewebe sowohl bei den Erkrankungsgruppen und im Normalbefund (Spenderlunge) eine mittlere Proteinexpression von FHL-1. Zwischen den Spendern und Erkrankungsgruppen waren keine Unterschiede nachweisbar, so dass zumindest vorerst auch im humanen Bronchialepithel von einer konstitutiven Expression ausgegangen werden kann. Bisher sind noch keine weiteren Studien bekannt, die eine Regulation von FHL-1 im Epithel der Bronchien beschreibt.

FHL-1 zeigte in dieser immunhistochemischen Untersuchung im arteriellen Endothel bei den COPD- und CTEPH-Lungen eine erhöhte Immunreaktivität mit einem statistisch signifikanten Unterschied jeweils gegenüber den arteriellen Endothelien der Spender. Es lässt sich vermuten, dass das FHL-1-Protein im hypoxischen Lungengewebe möglicherweise eine Hypertrophie in der Gefäßmuskulatur induziert. Ob dies ein frühes oder spätes Ergebnis während des vaskulären „remodellings“ ist, kann aus dem humanen

Untersuchungsgut bislang noch nicht geklärt werden. Im Tiermodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie kam es jedenfalls bereits zur Hochregulation auf Proteinebene.

Auch in den Alveolarepithelien der humanen UIP-Fibrose-Lungen konnte eine differenzielle Immunreaktivität für FHL-1 beobachtet werden. Bisher sind noch keine weiteren Studien bekannt, die eine Regulation von FHL-1 in den Alveolarepithelzellen beschreiben. Möglicherweise eignet sich auch FHL-1 als Indikator einer UIP-Fibrose.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden immunhistologische Untersuchungen an Lungengewebe explantierter humaner Lungen durchgeführt und zelltypspezifische Kompartimente ausgewertet. Insgesamt wurde Lungengewebe von 8 Patienten mit IPAH, 11 Patienten mit CTEPH, 15 Patienten mit UIP-Fibrose und 21 COPD-Patienten untersucht. Als Kontrolle diente nicht-transplantiertes Lungengewebe von 15 Lungenspendern.

Fünf Proteine (Vimentin, Catalase, CD36, HMGB-1, FHL-1) wurden untersucht. Von besonderem Interesse waren der Nachweis und die Analyse der Verteilungsmuster der oben genannten Proteine. Die Resultate wurden mit Befunden aus tierexperimentellen Erkrankungsmodellen verglichen.

Vimentin der Gefäßmuskulatur war ausschließlich bei den COPD-Lungen vermindert immunhistologisch nachweisbar. Eine erhöhte Immunreaktivität für Catalase im arteriellen Endothel der UIP-Fibrose-Lungen und COPD-Lungen lässt unter Berücksichtigung der tierexperimentellen Daten und der Literatur eine Hypoxie-bedingte Regulation vermuten. Die FHL-1-Proteinexpression im arteriellen Endothel der COPD-Lungen und CTEPH-Lungen indiziert die Hypertrophie/ Hyperplasie der Gefäßmuskulatur. Von besonderem Interesse ist jeweils eine erhöhte Immunreaktivität der Proteine Catalase, HMGB-1zyt und FHL-1 in den Alveolarepithelzellen der UIP-Fibrose-Lungen. Sie lässt einen Bezug zu dem topographisch sehr nahe gelegenen alvolären Interstitien vermuten, das schon früh in den Pathomechanismus einbezogen ist. Die Expression von Catalase und von CD36 in den Alveolarmakrophagen war bei COPD-Lungen modifiziert und ließ auf Zusammenhänge an Immunfunktion und an Reparaturmechanismen schließen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie korrelierten in vielen Zellkompartimenten mit tierexperimentellen Befunden bei chronischer Hypoxie. Diese Studie gibt Hinweise darauf, welche unterschiedlichen pathophysiologischen Prozesse den verschiedenen chronischen Lungenerkrankungen zu Grunde liegen und erlaubt ihre funktionelle wie auch diagnostische Visualisierung. Auf diesen Grundlagen müssen nun weiterführende Untersuchungen zur weiteren Entschlüsselung der jeweiligen Pathomechanismen und Regulationen folgen.

6.1 Abstract

The aim of the study is the analysis of hypoxia-dependent gene products in the human lung. Therefore human lung tissue specimens from patients with IPAH (n = 8), CTEPH (n = 11), UIP-fibrosis (n = 15), COPD (n = 21) and 15 lung specimens from healthy organ donors were investigated on the protein level. The compartment-specific distribution of 5 different proteins (Vimentin, Catalase, CD36, HMGB-1, and FHL-1) was examined. These results were compared with pre-existent findings from animal tests with similar study designs.

Significant differences of semi-quantitatively evaluated protein expression levels were found in specific compartments for the following molecules:

Vimentin was downregulated at the protein level only in vascular smooth muscle cells of COPD lungs. Increased levels of catalase immunoreactivity were observed in arterial endothelium of UIP-fibrosis and COPD lungs. FHL-1 protein expression in arterial endothelium of COPD and CTEPH lungs were associated with hypertrophy and hyperplasia of media smooth muscle cells. Catalase, FHL-1 and HMGB-1 proteins were found to be upregulated in alveolar epithelium of UIP fibrosis lungs. In many compartments analysed no changes of protein expression occurred. Expression of CD 36 in alveolar macrophages was modified in COPD lungs as compared to healthy donor lungs and UIP lungs. Furthermore expression of Catalase in alveolar macrophages was modified in COPD lungs as compared to CTEPH lungs and IPAH lungs.

Correlations between hypoxia induced pathohistological changes in animal lung specimen and human lung specimen could be found in different cell compartments.

This study gives a deeper insight in the basic pathophysiological process of chronic hypoxic vascular and interstitial lung disease and provides their functional and diagnostically visualization.

Based on these findings, further studies concerning regulatory pathomechanisms of chronic lung disease should be established.

7 Literaturangaben

(Zitierweise entspricht den Richtlinien des "American Journal of Pathology")

1. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 165: 277-304
2. Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, Wang H, and Tracey KJ: HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. *J Immunol* 2000, 165: 2950-2954
3. Acker H: Mechanisms and meaning of cellular oxygen sensing in the organism. *Respir Physiol* 1994, 95: 1-10
4. Andersson U, Erlandsson-Harris H, Yang H, and Tracey KJ: HMGB1 as a DNA-binding cytokine. *J Leukoc Biol* 2002, 72: 1084-1091
5. Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, Janson A, Kokkola R, Zhang M, Yang H, and Tracey KJ: High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med* 2000, 192: 565-570
6. Asch AS, Barnwell J, Silverstein RL, and Nachman RL: Isolation of the thrombospondin membrane receptor. *J Clin Invest* 1987, 79: 1054-1061
7. Barbera JA, Peinado VI, and Santos S: Pulmonary hypertension in COPD: old and new concepts. *Monaldi Arch Chest Dis* 2000, 55: 445-449
8. Battifora H: Assessment of antigen damage in immunohistochemistry. The vimentin internal control. *Am J Clin Pathol* 1991, 96: 669-671
9. Benes P, Maceckova V, Zdrahal Z, Konecna H, Zahradnickova E, Muzik J, and Smarda J: Role of vimentin in regulation of monocyte/macrophage differentiation. *Differentiation* 2006, 74: 265-276

10. Beuttenmuller M, Chen M, Janetzko A, Kuhn S, and Traub P: Structural elements of the amino-terminal head domain of vimentin essential for intermediate filament formation in vivo and in vitro. *Exp Cell Res* 1994, 213: 128-142
11. Bianchi ME and Beltrame M: Flexing DNA: HMG-box proteins and their partners. *Am J Hum Genet* 1998, 63: 1573-1577
12. Bianchi ME and Beltrame M: Upwardly mobile proteins. Workshop: the role of HMG proteins in chromatin structure, gene expression and neoplasia. *EMBO Rep* 2000, 1: 109-114
13. Bjornsson J and Edwards WD: Primary pulmonary hypertension: a histopathologic study of 80 cases. *Mayo Clin Proc* 1985, 60: 16-25
14. Blokhina O, Virolainen E, and Fagerstedt KV: Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond)* 2003, 91 Spec No: 179-194
15. Boettiger D, Enomoto-Iwamoto M, Yoon HY, Hofer U, Menko AS, and Chiquet-Ehrismann R: Regulation of integrin alpha 5 beta 1 affinity during myogenic differentiation. *Dev Biol* 1995, 169: 261-272
16. Brown S, McGrath MJ, Ooms LM, Gurung R, Maimone MM, and Mitchell CA: Characterization of two isoforms of the skeletal muscle LIM protein 1, SLIM1. Localization of SLIM1 at focal adhesions and the isoform slimmer in the nucleus of myoblasts and cytoplasm of myotubes suggests distinct roles in the cytoskeleton and in nuclear-cytoplasmic communication. *J Biol Chem* 1999, 274: 27083-27091
17. Bruick RK and McKnight SL: Transcription. Oxygen sensing gets a second wind. *Science* 2002, 295: 807-808
18. Brusselmans K, Compernelle V, Tjwa M, Wiesener MS, Maxwell PH, Collen D, and Carmeliet P: Heterozygous deficiency of hypoxia-inducible factor-

2alpha protects mice against pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction during prolonged hypoxia. *J Clin Invest* 2003, 111: 1519-1527

19. Budinger GR and Chandel NS: The role of cell suicide or apoptosis in the pathophysiology of acute lung injury. *Intensive Care Med* 2001, 27: 1091-1093
20. Calogero S, Grassi F, Aguzzi A, Voigtlander T, Ferrier P, Ferrari S, and Bianchi ME: The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat Genet* 1999, 22: 276-280
21. Cantin AM, North SL, Fells GA, Hubbard RC, and Crystal RG: Oxidant-mediated epithelial cell injury in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1987, 79: 1665-1673
22. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, and Loyd JE: An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992, 327: 70-75
23. Clerici C and Matthay MA: Hypoxia regulates gene expression of alveolar epithelial transport proteins. *J Appl Physiol* 2000, 88: 1890-1896
24. Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, and Sobonya RE: The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, 150: 967-972
25. Coursin DB, Cihla HP, Sempf J, Oberley TD, and Oberley LW: An immunohistochemical analysis of antioxidant and glutathione S-transferase enzyme levels in normal and neoplastic human lung. *Histol Histopathol* 1996, 11: 851-860
26. Cutaia M and Rounds S: Hypoxic pulmonary vasoconstriction. Physiologic significance, mechanism, and clinical relevance. *Chest* 1990, 97: 706-718

27. Dawson DW, Pearce SF, Zhong R, Silverstein RL, Frazier WA, and Bouck NP: CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol* 1997, 138: 707-717
28. Degryse B, Bonaldi T, Scaffidi P, Muller S, Resnati M, Sanvito F, Arrigoni G, and Bianchi ME: The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *J Cell Biol* 2001, 152: 1197-1206
29. DeLellis RA, Sternberger LA, Mann RB, Banks PM, and Nakane PK: Immunoperoxidase technics in diagnostic pathology. Report of a workshop sponsored by the National Cancer Institute. *Am J Clin Pathol* 1979, 71: 483-488
30. Donaldson K, Brown DM, Mitchell C, Dineva M, Beswick PH, Gilmour P, and MacNee W: Free radical activity of PM10: iron-mediated generation of hydroxyl radicals. *Environ Health Perspect* 1997, 105 Suppl 5: 1285-1289
31. Durmowicz AG and Stenmark KR: Mechanisms of structural remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Pediatr Rev* 1999, 20: e91-e102
32. Eitenmuller I, Volger O, Kluge A, Troidl K, Barancik M, Cai WJ, Heil M, Pipp F, Fischer S, Horrevoets AJ, Schmitz-Rixen T, and Schaper W: The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion. *Circ Res* 2006, 99: 656-662
33. Emery CJ: Vascular remodelling in the lung. *Eur Respir J* 1994, 7: 217-219
34. Fadok VA, Warner ML, Bratton DL, and Henson PM: CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). *J Immunol* 1998, 161: 6250-6257
35. Faller DV: Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999, 26: 74-84

36. Farioli-Vecchioli S, Nardacci R, Falciatori I, and Stefanini S: Catalase immunocytochemistry allows automatic detection of lung type II alveolar cells. *Histochem Cell Biol* 2001, 115: 333-339
37. Febbraio M, Hajjar DP, and Silverstein RL: CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 2001, 108: 785-791
38. Flad HD, Grage-Griebenow E, Petersen F, Scheuerer B, Brandt E, Baran J, Pryjma J, and Ernst M: The role of cytokines in monocyte apoptosis. *Pathobiology* 1999, 67: 291-293
39. Frid MG, Aldashev AA, Dempsey EC, and Stenmark KR: Smooth muscle cells isolated from discrete compartments of the mature vascular media exhibit unique phenotypes and distinct growth capabilities. *Circ Res* 1997, 81: 940-952
40. Gaine S: Pulmonary hypertension. *JAMA* 2000, 284: 3160-3168
41. Gaine SP and Rubin LJ: Primary pulmonary hypertension. *Lancet* 1998, 352: 719-725
42. Goodwin GH, Sanders C, and Johns EW: A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem* 1973, 38: 14-19
43. Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN, and Jamieson GA: Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* 1992, 80: 1105-1115
44. Greenwalt DE, Watt KW, So OY, and Jiwani N: PAS IV, an integral membrane protein of mammary epithelial cells, is related to platelet and endothelial cell CD36 (GP IV). *Biochemistry* 1990, 29: 7054-7059
45. Gross TJ and Hunninghake GW: Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2001, 345: 517-525

46. Halbert RJ, Isonaka S, George D, and Iqbal A: Interpreting COPD prevalence estimates: what is the true burden of disease? *Chest* 2003, 123: 1684-1692
47. Henke C, Marineili W, Jessurun J, Fox J, Harms D, Peterson M, Chiang L, and Doran P: Macrophage production of basic fibroblast growth factor in the fibroproliferative disorder of alveolar fibrosis after lung injury. *Am J Pathol* 1993, 143: 1189-1199
48. Hirata Y and Satonaka H: Hypertension and Oxidative Stress. *Japan Medical Association Journal* 2001, 44, No. 12:
49. Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, Nagashima M, Lundh ER, Vijay S, Nitecki D, and .: The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system. *J Biol Chem* 1995, 270: 25752-25761
50. Huh HY, Pearce SF, Yesner LM, Schindler JL, and Silverstein RL: Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation. *Blood* 1996, 87: 2020-2028
51. Kaarteenaho-Wiik R and Kinnula VL: Distribution of antioxidant enzymes in developing human lung, respiratory distress syndrome, and bronchopulmonary dysplasia. *J Histochem Cytochem* 2004, 52: 1231-1240
52. Katsumoto T, Mitsushima A, and Kurimura T: The role of the vimentin intermediate filaments in rat 3Y1 cells elucidated by immunoelectron microscopy and computer-graphic reconstruction. *Biol Cell* 1990, 68: 139-146
53. Katzenstein AL and Myers JL: Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 157: 1301-1315
54. Kelly FJ: Gluthathione: in defence of the lung. *Food Chem Toxicol* 1999, 37: 963-966

55. Kida H, Yoshida M, Hoshino S, Inoue K, Yano Y, Yanagita M, Kumagai T, Osaki T, Tachibana I, Saeki Y, and Kawase I: Protective effect of IL-6 on alveolar epithelial cell death induced by hydrogen peroxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005, 288: L342-L349
56. Klöpffer, B. Antigen-Retrieval zur immunhistochemischen und zellulären Charakterisierung von Tumoren endothelialen Ursprungs. Dissertation / FB Vet. med. JLU Gießen 1998.
57. Kwapiszewska G, Wilhelm J, Wolff S, Laumanns I, Koenig IR, Ziegler A, Seeger W, Bohle RM, Weissmann N, and Fink L: Expression profiling of laser-microdissected intrapulmonary arteries in hypoxia-induced pulmonary hypertension. (ISBN 3-89687-081-5) *Respir Res* 2005, 6: 109
58. Lakari E, Paakko P, Pietarinen-Runtti P, and Kinnula VL: Manganese superoxide dismutase and catalase are coordinately expressed in the alveolar region in chronic interstitial pneumonias and granulomatous diseases of the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 161: 615-621
59. Lander HM: An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* 1997, 11: 118-124
60. Lang I: Neues über pulmonale Hypertension. *Journal für Kardiologie* 2004, 11:
61. Lazarides E: Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 1980, 283: 249-256
62. Lee SM, Tsui SK, Chan KK, Garcia-Barcelo M, Waye MM, Fung KP, Liew CC, and Lee CY: Chromosomal mapping, tissue distribution and cDNA sequence of four-and-a-half LIM domain protein 1 (FHL1). *Gene* 1998, 216: 163-170
63. Liang CP, Han S, Okamoto H, Carnemolla R, Tabas I, Accili D, and Tall AR: Increased CD36 protein as a response to defective insulin signaling in macrophages. *J Clin Invest* 2004, 113: 764-773

64. Lim DS, Roberts R, and Marian AJ: Expression profiling of cardiac genes in human hypertrophic cardiomyopathy: insight into the pathogenesis of phenotypes. *J Am Coll Cardiol* 2001, 38: 1175-1180
65. Lutz W and Stetkiewicz J: High mobility group box 1 protein as a late-acting mediator of acute lung inflammation. *Int J Occup Med Environ Health* 2004, 17: 245-254
66. McGrath MJ, Mitchell CA, Coghill ID, Robinson PA, and Brown S: Skeletal muscle LIM protein 1 (SLIM1/FHL1) induces alpha 5 beta 1-integrin-dependent myocyte elongation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003, 285: C1513-C1526
67. Michiels C: Physiological and pathological responses to hypoxia. *Am J Pathol* 2004, 164: 1875-1882
68. Michiels C, Minet E, Michel G, Mottet D, Piret JP, and Raes M: HIF-1 and AP-1 cooperate to increase gene expression in hypoxia: role of MAP kinases. *IUBMB Life* 2001, 52: 49-53
69. Minamiya Y, Abo S, Kitamura M, Izumi K, Kimura Y, Tozawa K, and Saito S: Endotoxin-induced hydrogen peroxide production in intact pulmonary circulation of rat. *Am J Respir Crit Care Med* 1995, 152: 348-354
70. Mor-Vaknin N, Punturieri A, Sitwala K, and Markovitz DM: Vimentin is secreted by activated macrophages. *Nat Cell Biol* 2003, 5: 59-63
71. Morgan MJ and Madgwick AJ: Slim defines a novel family of LIM-proteins expressed in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 225: 632-638
72. Muller S, Scaffidi P, Degryse B, Bonaldi T, Ronfani L, Agresti A, Beltrame M, and Bianchi ME: New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *EMBO J* 2001, 20: 4337-4340

73. Nakanishi K, Tajima F, Nakamura A, Yagura S, Ookawara T, Yamashita H, Suzuki K, Taniguchi N, and Ohno H: Effects of hypobaric hypoxia on antioxidant enzymes in rats. *J Physiol* 1995, 489 (Pt 3): 869-876
74. Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, and Inoue M: Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88: 10045-10048
75. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, and Shaw A: Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 1992, 267: 14998-15004
76. Oelz O, Maggiorini M, Ritter M, Noti C, Waber U, Vock P, and Bartsch P: [Pathophysiology, prevention and therapy of altitude pulmonary edema]. *Schweiz Med Wochenschr* 1992, 122: 1151-1158
77. Olschewski H and Seeger W: *Pulmonale Hypertonie*. Uni-Med, Bremen 2000
78. Osborn M, Debus E, and Weber K: Monoclonal antibodies specific for vimentin. *Eur J Cell Biol* 1984, 34: 137-143
79. Petit V and Thiery JP: Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol Cell* 2000, 92: 477-494
80. Phelan MW, Forman LW, Perrine SP, and Faller DV: Hypoxia increases thrombospondin-1 transcript and protein in cultured endothelial cells. *J Lab Clin Med* 1998, 132: 519-529
81. Platt N, da Silva RP, and Gordon S: Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol* 1998, 8: 365-372
82. Pons AR, Noguera A, Blanquer D, Sauleda J, Pons J, and Agusti AG: Phenotypic characterisation of alveolar macrophages and peripheral blood monocytes in COPD. *Eur Respir J* 2005, 25: 647-652

83. Quinlan TR, Marsh JP, Janssen YM, Borm PA, and Mossman BT: Oxygen radicals and asbestos-mediated disease. *Environ Health Perspect* 1994, 102 Suppl 10: 107-110
84. Rabinovitch M: Pathobiology of pulmonary hypertension. Extracellular matrix. *Clin Chest Med* 2001, 22: 433-49, viii
85. Rabinovitch M, Gamble W, Nadas AS, Miettinen OS, and Reid L: Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. *Am J Physiol* 1979, 236: H818-H827
86. Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, and Freeman BA: Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 1991, 266: 22028-22034
87. Remmele W and Stegner HE: [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* 1987, 8: 138-140
88. Ren Y, Silverstein RL, Allen J, and Savill J: CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J Exp Med* 1995, 181: 1857-1862
89. Robinson PA, Brown S, McGrath MJ, Coghill ID, Gurung R, and Mitchell CA: Skeletal muscle LIM protein 1 regulates integrin-mediated myoblast adhesion, spreading, and migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003, 284: C681-C695
90. Sachs L: *Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden.* Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo 1996
91. Savill J: Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull* 1997, 53: 491-508
92. Savill J, Dransfield I, Hogg N, and Haslett C: Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 1990, 343: 170-173

93. Savill J, Fadok V, Henson P, and Haslett C: Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 1993, 14: 131-136
94. Schlueter C, Weber H, Meyer B, Rogalla P, Roser K, Hauke S, and Bullerdiek J: Angiogenetic signaling through hypoxia: HMGB1: an angiogenetic switch molecule. *Am J Pathol* 2005, 166: 1259-1263
95. Schmidt RF & Thews G: *Physiologie des Menschen*. Springer Verlag Berlin. Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, 1990
96. Shi SR, Key ME, and Kalra KL: Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991, 39: 741-748
97. Sies H: Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997, 82: 291-295
98. Stenmark KR and Mecham RP: Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling. *Annu Rev Physiol* 1997, 59: 89-144
99. Stern D, Yan SD, Yan SF, and Schmidt AM: Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. *Adv Drug Deliv Rev* 2002, 54: 1615-1625
100. Sternberger LA: The unlabeled antibody (PAP) method, introduction. *J Histochem Cytochem* 1979, 27: 1657
101. Stolze IP, Tian YM, Appelhoff RJ, Turley H, Wykoff CC, Gleadle JM, and Ratcliffe PJ: Genetic analysis of the role of the asparaginyl hydroxylase factor inhibiting hypoxia-inducible factor (HIF) in regulating HIF transcriptional target genes. *J Biol Chem* 2004, 279: 42719-42725
102. Strange JW, Wharton J, Phillips PG, and Wilkins MR: Recent insights into the pathogenesis and therapeutics of pulmonary hypertension. *Clin Sci (Lond)* 2002, 102: 253-268

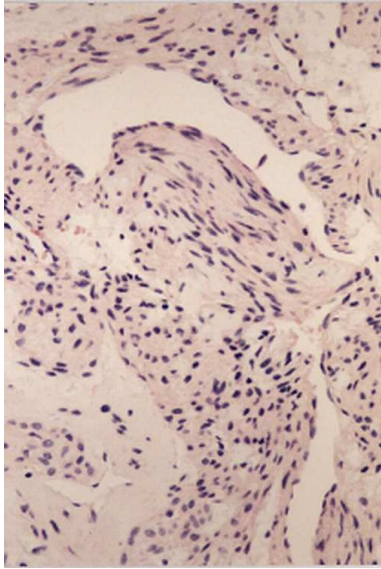
103. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, and Finkel T: Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 1995, 270: 296-299
104. Suzuki YJ, Forman HJ, and Sevanian A: Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* 1997, 22: 269-285
105. Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C, Hofmann MA, Kislinger T, Ingram M, Lu A, Tanaka H, Hori O, Ogawa S, Stern DM, and Schmidt AM: Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* 2000, 405: 354-360
106. Thomas AQ, Lane K, Phillips J, III, Prince M, Markin C, Speer M, Schwartz DA, Gaddipati R, Marney A, Johnson J, Roberts R, Haines J, Stahlman M, and Loyd JE: Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 165: 1322-1328
107. Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, Frazier WA, Polverini PJ, and Bouck N: Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol* 1993, 122: 497-511
108. Ueno H, Matsuda T, Hashimoto S, Amaya F, Kitamura Y, Tanaka M, Kobayashi A, Maruyama I, Yamada S, Hasegawa N, Soejima J, Koh H, and Ishizaka A: Contributions of high mobility group box protein in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2004, 170: 1310-1316
109. Valnes K, Brandtzaeg P, and Rognum TO: Sensitivity and efficiency of four immunohistochemical methods as defined by staining of artificial sections. *Histochemistry* 1984, 81: 313-319

110. Voelkel NF: Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am Rev Respir Dis* 1986, 133: 1186-1195
111. Walsh GM, Sexton DW, Blaylock MG, and Convery CM: Resting and cytokine-stimulated human small airway epithelial cells recognize and engulf apoptotic eosinophils. *Blood* 1999, 94: 2827-2835
112. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, and Tracey KJ: HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999, 285: 248-251
113. Wenger RH: Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J* 2002, 16: 1151-1162
114. Wolin MS: Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. *Microcirculation* 1996, 3: 1-17
115. Wu KI, Pollack N, Panos RJ, Sporn PH, and Kamp DW: Keratinocyte growth factor promotes alveolar epithelial cell DNA repair after H₂O₂ exposure. *Am J Physiol* 1998, 275: L780-L787
116. Yang H, Wang H, Czura CJ, and Tracey KJ: HMGB1 as a cytokine and therapeutic target. *J Endotoxin Res* 2002, 8: 469-472
117. Yang H, Wang H, Czura CJ, and Tracey KJ: The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol* 2005, 78: 1-8
118. Yehualaeshet T, O'Connor R, Green-Johnson J, Mai S, Silverstein R, Murphy-Ullrich JE, and Khalil N: Activation of rat alveolar macrophage-derived latent transforming growth factor beta-1 by plasmin requires interaction with thrombospondin-1 and its cell surface receptor, CD36. *Am J Pathol* 1999, 155: 841-851

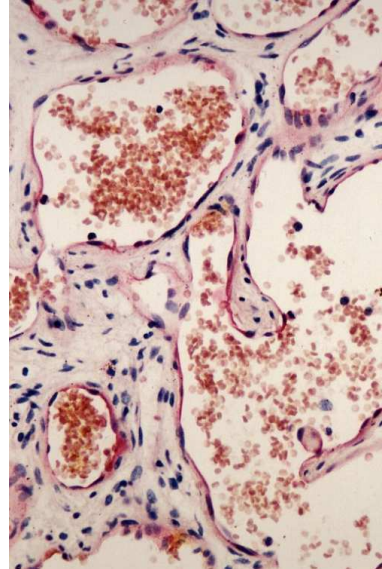
119. Yoshimi N, Ikura Y, Sugama Y, Kayo S, Ohsawa M, Yamamoto S, Inoue Y, Hirata K, Itabe H, Yoshikawa J, and Ueda M: Oxidized phosphatidylcholine in alveolar macrophages in idiopathic interstitial pneumonias. *Lung* 2005, 183: 109-121

8 Anhang

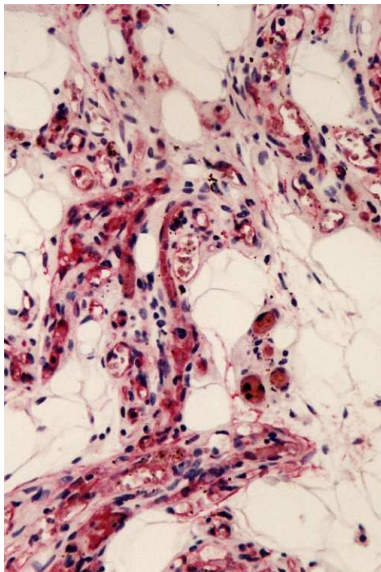
8.1 FI-Score-Einteilung



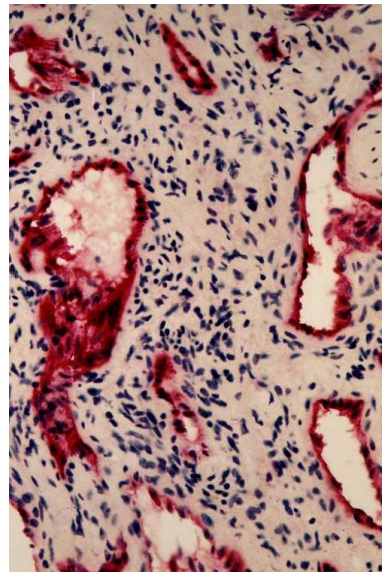
a) APAAP, IHC: FI-Score 0



b) APAAP, IHC: FI-Score 0.5-1.0



c) APAAP, ICH: FI-Score 1.5-2.0



d) APAAP, IHC: FI-Score 2.5-3.0

Abb. 38 Farbeintensitäts-Score (FI-Score) in Anlehnung an Klöpfer, Bernd. Inauguraldissertation, Fachbereich Veterinärmedizin der JLU Gießen 1998 (56).

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Gleichgewicht und Ungleichgewicht zwischen Vasokonstriktoren und Vasodilatoren.	5
Abb. 2	Die Zytokinaktivität von HMGB-1 (entnommen aus Yang et al. 2005 (117)).	12
Abb. 3	Relevante Gruppen: Referenzlungen und Erkrankungsgruppen (n=70).	15
Abb. 4	Alter der Patienten, Median und 25 % bzw. 75 % Quartilen.	16
Abb. 5	Vimentin-Färbung in humanen Arterien. Links: Spenderlunge (OV x 20), Mitte: COPD-Lunge (OV x 10), Rechts: Negativ-Kontrolle (COPD-Lunge) (OV x 20).	30
Abb. 6	Vimentin-Färbung in humanen Venen. Links: COPD-Lunge (OV x 20), Mitte: Spenderlunge (OV x 10), Rechts: Negativ-Kontrolle (COPD-Lunge) (OV x 10).	31
Abb. 7	Vimentin-Immunreaktivität (0 - 3.0) im Endothel der arteriellen Gefäße (Ar.E)	32
Abb. 8	Vimentin-Immunreaktivität (0 - 3.0) der glatten Muskulatur arterieller Gefäße (Ar.M).	33
Abb. 9	Vimentin-Immunreaktivität (0 - 3.0) im Endothel der venösen Gefäße (Ve.E).	34
Abb. 10	Vimentin-Immunreaktivität (0 - 3.0) der glatten Muskulatur venöser Gefäße (Ve.M).	35
Abb. 11	Vimentin-Immunreaktivität (0 - 3.0) der Alveolarmakrophagen (AM).	36
Abb. 12	Catalase-Färbung in humanen Arterien. Links: COPD-Lunge (OV x 20), Mitte: Spenderlunge (OV x 20), Rechts: Negativ-Kontrolle (COPD-Lunge) (OV x 10).	38
Abb. 13	Catalase-Färbung der Alveolarmakrophagen. Links: COPD-Lunge (OV x 10), Mitte: CTEPH-Lunge (OV x 10), Rechts: Negativ-Kontrolle (UIP-Fibrose-Lunge) (OV x 10).	39
Abb. 14	Catalase-Färbung der Alveolarepithelzellen. Links: UIP-Fibrose-Lunge (OV x 10), Mitte: CTEPH-Lunge (OV x 10), Rechts: Negativ-Kontrolle (UIP-Fibrose-Lunge) (OV x 10).	40
Abb. 15	Catalase-Immunreaktivität (0 - 3.0) im Epithel der Bronchien / Bronchioli (Br.E).	41

Abb. 16	Catalase-Immunreaktivität (0 - 3.0) im Endothel der arteriellen Gefäße (Ar.E).....	42
Abb. 17	Catalase-Immunreaktivität (0 - 3.0) der Muskulatur arterieller Gefäße (Ar.M).....	43
Abb. 18	Catalase-Immunreaktivität (0 - 3.0) im Endothel der venösen Gefäße (Ve.E).....	44
Abb. 19	Catalase-Immunreaktivität (0 - 3.0) der Alveolarmakrophagen (AM).....	45
Abb. 20	Catalase-Immunreaktivität (0 - 3.0) der Alveolarepithelzellen (AE).	46
Abb. 21	CD36-Färbung in humanen Bronchien / Bronchioli. Links: Spenderlunge (OV x 10), Mitte: UIP-Fibrose-Lunge (OV x 10), Rechts: Negativ-Kontrolle (Spenderlunge) (OV x 10).	47
Abb. 22	CD36-Färbung der Alveolarmakrophagen. Links: UIP-Fibrose-Lunge, (OV x 10) Mitte: COPD-Lunge (OV x 20), Rechts: Negativ-Kontrolle (Spenderlunge) (OV x 20).	49
Abb. 23	CD36-Immunreaktivität (0 - 3.0) im Endothel der Bronchien / Bronchioli (Br.E).	50
Abb. 24	CD36-Immunreaktivität (0 - 3.0) in den Alveolarmakrophagen (AM).....	51
Abb. 25	HMGB-1zyt-Färbung der Alveolarepithelzellen. Links: UIP-Fibrose-Lunge (OV x 10), Mitte: Spenderlunge (OV x 10), Rechts: Negativ-Kontrolle (UIP-Fibrose-Lunge) (OV x 20).	53
Abb. 26	HMGB-1zyt-Immunreaktivität (0 - 3.0) im Endothel der Bronchien / Bronchioli (Br.E).	56
Abb. 27	HMGB-1zyt-Immunreaktivität (0 - 3.0) der Alveolarmakrophagen (AM).	57
Abb. 28	HMGB-1zyt-Immunreaktivität (0 - 3.0) der Alveolarepithelzellen (AE).....	58
Abb. 29	HMGB-1nuc-Immunreaktivität (0 - 3.0) der Alveolarmakrophagen (AM).	59
Abb. 30	HMGB-1nuc-Immunreaktivität (0 - 3.0) der Alveolarepithelzellen (AE).....	60
Abb. 31	FHL-1-Färbung in humanen Arterien. Links: COPD-Lunge (OV x 10), Mitte: Spenderlunge (OV x 10), Rechts: Negativ-Kontrolle (CTEPH-Lunge) (OV x 10).	62
Abb. 32	FHL-1-Färbung der Alveolarepithelzellen. Links: UIP-Fibrose-Lunge (OV x 20), Mitte: Spenderlunge (OV x 10), Rechts: Negativ-Kontrolle (CTEPH-Lunge) (OV x 20).	63

Abb. 33	FHL-1-Immunreaktivität (0 - 3.0) im Endothel der Bronchien / Bronchioli (Br.E).....	64
Abb. 34	FHL-1-Immunreaktivität (0 - 3.0) im Endothel der arteriellen Gefäße (Ar.E).....	65
Abb. 35	FHL-1-Immunreaktivität (0 - 3.0) im Endothel der venösen Gefäße (Ve.E).....	66
Abb. 36	FHL-1-Immunreaktivität (0 - 3.0) der Alveolarmakrophagen (AM).....	67
Abb. 37	FHL-1-Immunreaktivität (0 - 3.0) der Alveolarepithelzellen (AE).....	68
Abb. 38	Färbeintensitäts-Score (FI-Score) in Anlehnung an Klöpfer, Bernd. Inauguraldissertation, Fachbereich Veterinärmedizin der JLU Gießen 1998 (56).....	99

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Wachstumsfaktoren, Zytokine und vasoaktive Substanzen.....	6
Tab. 2	Antikörper und Konzentration.....	22
Tab. 3	Gebrauchslösungen.....	24
Tab. 4	Entwicklungslösung.....	25
Tab. 5	Vim.-Ar.E: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).....	32
Tab. 6	Vim.-Ar.M: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).....	33
Tab. 7	Vim.-Ve.E: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).....	34
Tab. 8	Vim.-Ve.M: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).....	35
Tab. 9	Vim.-AM: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).....	36
Tab. 10	Catalase-Br.E: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).....	41
Tab. 11	Catalase-Ar.E: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).....	42
Tab. 12	Catalase-Ar.M: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).....	43
Tab. 13	Catalase-Ve.E: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).....	44

Tab. 14	Catalase-AM: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).....	45
Tab. 15	Catalase-AE: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).	46
Tab. 16	CD36-Br.E: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).....	50
Tab. 17	CD-36-AM: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).....	51
Tab. 18	HMGB-1zyt-Br.E: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).....	56
Tab. 19	HMGB-1zyt-AM: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).....	57
Tab. 20	HMGB-1zyt-AE: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).....	58
Tab. 21	HMGB-1nuc-AM: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).....	59
Tab. 22	HMGB-1nuc-AE: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).....	60
Tab. 23	FHL-1-Br.E: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).....	64
Tab. 24	FHL-1-Ar.E: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).	65
Tab. 25	FHL-1-Ve.E: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).....	66
Tab. 26	FHL-1-AM: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).....	67
Tab. 27	FHL-1-AE: Ergebnisse des Exakten Test nach Fisher (ns = nicht signifikant).....	68

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. med. Rainer M. Bohle für die Überlassung dieses Themas und die außerordentlich gute und wissenschaftlich hochkompetente Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit. Ohne Sein Fachwissen und Sein ausgesprochenes Engagement wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ferner danke ich für das zur Verfügung gestellte Untersuchungsgut und das reibungslose Arbeiten im Institut für Pathologie.

Dr. rer. nat. Jochen Wilhelm für die Unterstützung bei der graphischen Darstellung dieser Studie und die fachkundliche Beratung. Seine große Hilfsbereitschaft und Unterstützung in vielen computertechnischen Fragen haben mich tatkräftig unterstützt.

Dr. biol. hom. Grazyna Kwapiszewska für Ihre kollegiale Betreuung. Über diesen Zeitraum hat sich zwischen uns ein sehr freundschaftliches Verhältnis entwickelt.

den Med.-technischen Assistentinnen, Frau Maria M. Stein und Frau Esther Kuhlmann-Farahat, für die große Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung. Sie waren mir eine große Hilfe.

Prof. Dr. W. Seeger, sowie der Med.-technischen Assistentin Sabine Gräf-Höchst für die großzügige Bereitstellung des Untersuchungsgut.

meinen lieben Eltern. Ihr habt mich (Eurem siebten und jüngstem Kind) jederzeit mit Liebe und aller Kraft im Studium sowie dieser Arbeit unterstützt und habt mir immer zur Seite gestanden. Vielen Dank.

meinem Freund Dr. med. Marc Menzebach. Deine liebenswerte und fröhliche Art, Dein Verständnis und Deine Sicht der Dinge haben mir immer sehr geholfen, die Ziele zu verfolgen. Danke.

Gießen im Jahr 2006

Walburga Monika Stärk

Lebenslauf

Walburga Monika Stärk

Persönliche Daten

Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Alter:	30 Jahre
Geburtsort:	Friesoythe

Ausbildung

1983-1987	St. Martin – Grundschule Bösel
1987-1989	Orientierungsstufe Bösel
1989-1996	Albertus - Magnus Gymnasium Friesoythe
23.05.1996	Allgemeine Hochschulreife
14.10.1996-22.09.1999	Ausbildung zur Medizinisch-technischen Laboratoriumsassistentin (MTLA), Staatliche Lehranstalt für technische Assistenten in der Medizin an der Georg - August Universität Göttingen
22.09.1999	Staatliche Prüfung zur MTLA
WS 1999	Studium der Zahnmedizin, Justus – Liebig Universität Giessen
30.08.2000	naturwissenschaftliche Vorprüfung, Note „gut“
10.04.2002	zahnärztliche Vorprüfung, Note „gut“
Juli-Dezember 2004	zahnärztliches Staatsexamen, Note „sehr gut“
14.12.2004	Erteilung der Approbation als Zahnärztin

Beruf

seit 01.05.2005	Vorbereitungsassistentin in der Praxis Dr. A. Riebeling, Butzbach
-----------------	---

Tätigkeiten neben dem Studium

1999-2005	Studentische Laborkraft (MTLA) in der Abteilung für Immunologie und Transfusionsmedizin, Justus – Liebig - Universität, Giessen
-----------	---

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

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

ISBN 3-8359-5163-7

