

**Gesteigerte Polysialylierung bei der  
Idiopathischen Pulmonalen Fibrose  
und  
Chronisch Obstruktiven Pulmonalen Krankheit**

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

vorgelegt von  
Sandra Edith Müller  
aus Hadamar

Gießen 2013

Aus dem Biochemischen Institut des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter: Prof. Dr. Lienhardt Schmitz

Gutachter: Prof. Dr. G. Lochnit

Gutachter: Prof. Dr. S. Bellusci

Tag der Disputation: 31.03.2014

*„Eine intakte Lunge ist nicht alles,  
aber bei einer nicht intakten Lunge ist Alles nichts.“*

(Modifiziert nach Arthur Schopenhauer)

INHALTSVERZEICHNIS.....	I - III
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Idiopathische Pulmonale Fibrose (IPF) .....	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Geschichte.....	1
1.1.3 Pathogenese und Pathologie .....	3
1.1.4 Epidemiologie .....	4
1.1.5 Ätiologie .....	5
1.1.6 Klinik .....	6
1.1.7 Diagnose.....	6
1.1.8 Therapie.....	8
1.1.9 Prognose.....	9
1.2 Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung (COPD).....	10
1.2.1 Definition.....	10
1.2.2 Geschichte.....	10
1.2.3 Pathogenese und Pathologie .....	11
1.2.4 Epidemiologie .....	12
1.2.5 Ätiologie .....	13
1.2.6 Klinik .....	13
1.2.7 Diagnose.....	14
1.2.8 Therapie.....	14
1.2.9 Prognose.....	16
1.3 Bleomycin-Mausmodell .....	17
1.4 Mono-, Oligo- und Polysialinsäure .....	18
1.4.1 Sialylierung von Glykokonjugaten .....	18
1.4.2 Synthese von PolySia .....	19
1.4.3 Vorkommen und Funktion von Oligo- und PolySia .....	19
1.5 Polysialylierung von NCAM.....	21
1.5.1 Struktur und Isoformen von NCAM.....	21
1.5.2 Biologische Funktionen von polysialyliertem NCAM .....	22
1.6 Die Polysialyltransferasen ST8SialII und ST8SialIV.....	24
<b>2 Zielsetzung.....</b>	<b>26</b>
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>27</b>
3.1 Biologisches Material: Lungengewebe .....	27
3.2 Antikörper .....	27

3.3	Enzyme.....	28
3.4	Primer (alle von „metabion“).....	28
3.5	Geräte.....	29
3.6	Verbrauchsmaterialien .....	29
3.7	Chemikalien .....	30
3.8	Aufarbeitung von Lungengewebe.....	33
3.9	Proteinbestimmung .....	33
3.10	SDS-Gelelektrophorese .....	34
3.11	Western Blot (Semi Dry) .....	37
3.12	Immunfärbung und Entwicklung im Fotolabor .....	38
3.13	Proteinsignal-Quantifizierung .....	38
3.14	Immunhistologie.....	38
3.14.1	Durchführung .....	39
3.14.2	Färbemethoden.....	40
3.14.2.1	Fast Red Zytochem Plus AP Kit (Streptavidin-Biotin-Methode) .....	40
3.14.2.2	EnVision® +, HRP (DAKO).....	41
3.14.2.3	AEC-Staining Kit (Sigma).....	41
3.14.3	Herstellung von Dauerpräparaten .....	42
3.15	Quantifizierung der mRNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	43
3.15.1	Überblick.....	43
3.15.2	Durchführung .....	44
3.15.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	46
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
4.1	Proteinbestimmung .....	48
4.2	PolySia im Lungengewebe von unbehandelten und mit Bleomycin-behandelten Mäusen .....	49
4.2.1	Western Blot Analysen von murinen Lungengewebe .....	49
4.2.2	PCR-Analysen von murinen Lungengewebe .....	53
4.2.3	Immunhistologie von Mäuselungen .....	54
4.3	Analyse der PolySia in humanen Lungengewebe .....	58
4.3.1	Humanes Lungengewebe von Donoren .....	58
4.3.2	Immunhistologie von Donoren.....	59
4.3.3	Lungengewebe von IPF-Patienten .....	60
4.3.4	Immunhistologie von IPF-Patienten.....	62
4.3.5	Lungengewebe von COPD-Patienten.....	64
4.3.6	Immunhistologie von COPD-Patienten .....	66

<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>69</b>
5.1	PolySia-Nachweis in adultem Lungengewebe.....	69
5.2	Polysialylierung bei BleoMäusen, IPF- und COPD-Patienten.....	70
5.2.1	Detektion von PolySia im Mausmodell .....	70
5.2.2	Detektion von PolySia bei IPF-Patienten.....	72
5.2.3	Detektion von PolySia bei COPD-Patienten .....	74
5.3	Mögliche Bedeutung von PolySia in adultem Lungengewebe .....	76
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>81</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>84</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>86</b>
<b>11</b>	<b>Publikationsverzeichnis</b> .....	<b>103</b>
<b>12</b>	<b>Erklärung zur Dissertation</b> .....	<b>105</b>
<b>13</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>106</b>

# 1 Einleitung

Die Lunge ist ein lebenswichtiges Organ, ohne das ein Überleben nicht möglich wäre. Die Zahl der an Lungenkrankheiten leidenden Menschen nimmt jährlich zu und zählt zu den führenden Todesursachen weltweit. Das Jahr 2010 wurde sogar zum „Year of the Lung“ ernannt, um auf die steigende Anzahl von Neuerkrankungen aufmerksam zu machen. Die Erforschung von Lungenkrankheiten ist eine wichtige Aufgabe, um die Therapiemöglichkeiten zu verbessern und Patienten eine bessere Prognose zu ermöglichen. Bei der Entstehung von Lungenkrankheiten spielen insbesondere zelluläre Interaktionen eine wichtige Rolle. Dabei basieren die Prozesse auf Protein- Protein-Wechselwirkungen, Signaltransduktionsprozessen sowie Gewebsdifferenzierungen.

In der vorliegenden Dissertation wurden sowohl murines als auch humanes Lungengewebe auf den Polysialylierungsstatus hin untersucht.

## 1.1 Idiopathische Pulmonale Fibrose (IPF)

### 1.1.1 Definition

IPF ist die häufigste Form der idiopathisch interstitiellen Pneumonien und hat die schlechteste Prognose unter den fibrotischen Lungenerkrankungen [1]. Bei der Erkrankung handelt es sich um einen chronisch entzündlichen Lungenprozess mit narbigem Umbau des Lungengerüsts. Dabei kommt es zu einer restriktiven Ventilationsstörung sowie Verteilungsstörung und Abnahme des Sauerstoffpartialdrucks bis hin zu der Entstehung eines chronischen Cor pulmonale [2]. Im Gegensatz zu den anderen interstitiell pulmonalen Erkrankungen zeigt die IPF keinen inflammatorischen Prozess.

### 1.1.2 Geschichte

Die Diagnose Fibrose wurde zum ersten Mal im Jahr 1944 von Hamman und Rich in einer Publikation erwähnt, als sie vier Patienten mit ähnlichen Symptomen untersuchten, die zunächst einer Pneumonie später der pulmonalen Tuberkulose ähnelten. Diese klinischen Bilder beinhalteten allerdings nicht alle Symptome, sodass Hamman und Rich zunächst die folgenden Beobachtungen festhielten: pulmonale Inflammation, Gewebsproliferation, Dyspnoe und Verdickung der Alveolarwand. Die vier untersuchten Patienten starben kurz nach ihrer Beobachtung in einem Zeitrahmen

von vier Wochen bis sechs Monaten, sodass auf eine akute interstitielle Pneumonie (AIP) geschlossen werden kann, die heute auch als „Hamman-Rich-Syndrom“ bezeichnet wird.

Im Jahr 1969 schafften die österreichischen Pathologen Liebow und Carrington die Grundlage für die histologische Klassifizierung der chronisch interstitiellen Pneumonie und drei Jahrzehnte später veröffentlichte Katzenstein eine überarbeitete Version, die den Schwerpunkt auf die Identifizierung und Definition von neuen histopathologischen Zuständen legte [3].

<b><u>Liebow und Carrington</u></b> <b>1969</b>	<b><u>Katzenstein</u></b> <b>1998</b>
gewöhnliche interstitielle Pneumonie (UIP)	UIP
Desquamative interstitielle Pneumonie (DIP)	DIP/respiratorische Bronchiolitis mit interstitieller Lungenerkrankung (RBILD)
Bronchiolitis mit interstitieller Pneumonie (BIP)	Bronchiolitis obliterans mit organisierender Pneumonie (BOOP)
lymphozytäre interstitielle Pneumonie (LIP)	lymphoproliferative Erkrankung assoziiert mit AIDS (LPD)
Riesenzellige interstitielle Pneumonie (GIP)	Hartmetallfibrose
	Akute interstitielle Pneumonie (AIP) <sup>a</sup>
	Nicht-spezifische interstitielle Pneumonie (NSIP)

<sup>a</sup>Synonym mit Hamman-Rich-Syndrom

Tabelle 1: **bisherige Klassifikation der idiopathischen interstitiellen Pneumonie (IIP)**

Die aktuelle Klassifikation der idiopathischen interstitiellen Pneumonien (IIPs) basiert auf einer Richtlinie, die gemeinsam von der American Thoracic Society (ATS) und der European Respiratory Society (ERS) im Jahr 2013 veröffentlicht wurde [4]. Hier werden vier Krankheitsformen unterschieden, die jeweils durch unterschiedliche klinische, radiologische und pathologische Kriterien definiert werden (Abb. 1).

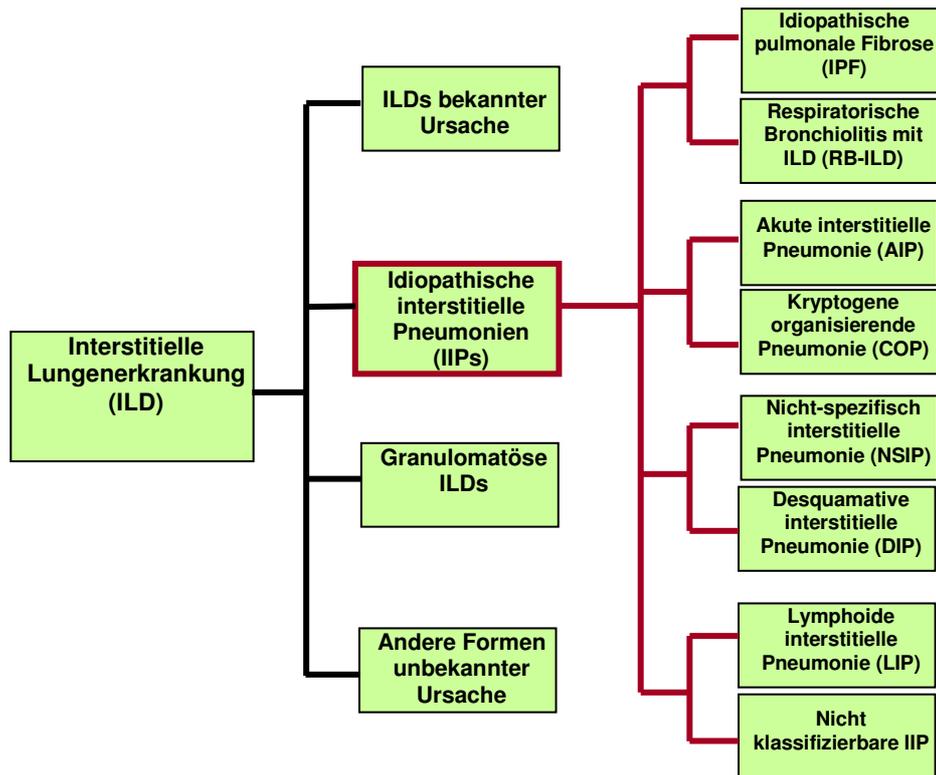


Abbildung 1: Einteilung der interstitiellen Lungenerkrankungen aus [4]

### 1.1.3 Pathogenese und Pathologie

Die IPF wird heute als progressive, tödlich verlaufende Lungenerkrankung aufgefasst, die sich primär durch Fibroblastenproliferation und Umbau der extrazellulären Matrix auszeichnet, was schließlich zu einer irreversiblen Zerstörung der Lungenarchitektur führt [5]. Ein besonderes histopathologisches Kennzeichen ist die Bildung von multiplen, herdförmigen, fibroblastären Foki, welche wahrscheinlich den Stellen entsprechen, an denen eine aktive Kollagensynthese stattfindet. Der Vorgang beginnt durch eine Epithelschädigung mit einer Störung der normalen Wundheilung, sodass das physiologische Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau von Kollagen gestört ist [5, 6]. Entzündliche Veränderungen sind vermutlich eine Folge sowie Begleiterscheinung der Fibrose. Somit wird deutlich, dass die IPF eine Sonderstellung bei den interstitiellen Lungenerkrankungen einnimmt. Die neue Hypothese besagt, dass die IPF eine „epithelial-fibroblastäre Erkrankung“ ist [7, 8]. Das bedeutet, dass die bisherige Therapie für inflammatorische Fibrosen hier nicht erfolgsversprechend ist. Mit immunsuppressiver Therapie sind nur die sekundären entzündlichen Läsionen zu beeinflussen; für die Hemmung der Fibroblastenaktivität, das Primärereignis, steht hingegen der Thrombininhibitor Dabigatran zur Verfügung. Das Medikament ist eine Serinprotease und wirkt antifibrotisch [9]. Die histologisch nachweisbaren

Entzündungszellen (Makrophagen, eosinophile und neutrophile Granulozyten sowie Lymphozyten) treten vermutlich eher begleitend auf. Im Vordergrund steht eine gestörte Interaktion zwischen Epithel und Mesenchym [3, 6, 10]. In einer gesunden Lunge befinden sich überwiegend Alveolarzellen Typ I, die sich um die Alveolen anlagern. Die geringe Zahl an Alveolarzellen Typ II kann proliferieren und sich zu Alveolarzellen Typ I differenzieren. Auf diese Art sind diese für die Reepithelialisierung der Alveolen nach einer Schädigung verantwortlich. Wichtig für diesen Prozess ist eine intakte Basalmembran, die allerdings bei einer idiopathischen Lungenfibrose geschädigt ist. Die gestörte Barriere zwischen Bindegewebe und Alveolarlumen führt zu einer Einwanderung von undifferenzierten Zellen in die Alveolen initiiert durch Botenstoffe wie Zytokine, Chemokine sowie Wachstumsfaktoren. Dabei wird verstärkt Exsudat und fibrotisches Gewebe gebildet. Eine besondere Bedeutung hat TGF- $\beta$  („transforming growth factor  $\beta$ “), das bei der idiopathischen Lungenfibrose von aktivierten Epithelzellen und Makrophagen vermehrt gebildet wird. Es stimuliert die Apoptose epithelialer Lungenzellen und fördert die Bildung der extrazellulären Matrix [6, 11, 12]. Ein Antagonist der TGF- $\beta$ -Aktivität ist Interferon  $\gamma$ . Die Bildung von Kollagenfasern und anderen Matrixsubstanzen ist ein natürlicher Vorgang, der physiologisch dem Abbau unter Beteiligung von Matrixmetalloproteinasen und ihrer Inhibitoren entgegenwirkt. Bei der idiopathischen Lungenfibrose ist dieses Gleichgewicht zwischen Produktion und Abbau von Kollagenfasern gestört [12].

#### **1.1.4 Epidemiologie**

Bisher gibt es nur wenige Studien hinsichtlich der Prävalenz von IPF in der Bevölkerung. Das hängt insbesondere damit zusammen, dass die Klassifikation nach ATS/ERS erst seit dem Jahr 2002 existiert und zum anderen damit, dass die diagnostischen Kriterien seit diesem Zeitpunkt nicht richtig angewandt wurden. Daraus ergibt sich das Problem, dass viele Studien allgemeine Zahlen der interstitiellen Lungenfibrose enthalten, sich aber nicht nur auf eine Form beschränken, was die Aussagen zu der Prävalenz von IPF erschwert [13]. Einige Daten von verschiedenen Quellen lassen vermuten, dass Prävalenz und Inzidenz bei 3 bis 30 Fällen pro 100.000 Populationen beziehungsweise bei 5 bis 11 Fällen pro 100.000 Populationen pro Jahr liegen und die Fälle mit zunehmendem Alter steigen [13-17]. Es gibt auch wenige Informationen über IPF was die Bevölkerungsstatistik betrifft. Die Mortalitätsrate liegt bei 1,5 – 3,3 bei Männern und 1 – 2,5 bei Frauen bezogen auf 100.000 Einwohner [8]. Die Sterbeziffer nimmt stark mit dem Alter (7,8 Mal höher > 75 Jahre als bei 45-64 Jährigen), beim männlichen Geschlecht (Odds Ratio 2,24) und in Industriegebieten

(Odds Ratio 1,25) zu [14]. Die altersbezogene Mortalität liegt bei weißen höher als bei farbigen Menschen. Der Grund hierfür ist noch unklar, hängt aber wahrscheinlicher von fehlerhaften Berichten als von wirklichen Unterschieden ab [8]. Insgesamt ist aber bekannt, dass die IPF trotz eingeschränkter Daten die häufigste Form der interstitiellen Lungenerkrankungen darstellt, die in der Klinik auftritt [18]. Außerdem wurde beobachtet, dass die IPF eine weltweite Krankheit ist, die weder rassen- noch personenspezifisch gehäuft auftritt. Vielmehr sind Individuen im mittleren bis letzten Lebensabschnitt betroffen. Das Verhältnis Frauen zu Männern liegt bei 1:1 bis 1:2, was in erster Linie von dem Zigarettenkonsum abhängt. 70% der Patienten rauchen oder waren Raucher. Die Inhalation von Stäuben, Chemikalien, insbesondere organische Lösungsmittel, oder der Umgang mit Metallen werden ebenfalls mit der Entwicklung einer Lungenfibrose in Zusammenhang gebracht [19].

### 1.1.5 Ätiologie

Die idiopathische pulmonale Fibrose ist eine Folge verschiedener Faktoren. Einige Studien, die die Ursachen näher bestimmen sollten, können nach Lungenbiopsien oder HRCT (*High Resolution Computed Tomography*) nur eingeschränkt Informationen geben [8, 20]. Ursprünglich bestand die Vermutung, dass eine Beziehung zwischen Asbest und IPF vorliegt und damit die Ursache in der Inhalation von Umweltpartikeln zu suchen ist. Allerdings wurde bei Untersuchungen mit Metall (insbesondere Stahl, Messing und Blei) und organischen Substanzen (Kiefernholz, Schimmelpilze) herausgefunden, dass keine Verbindung zwischen dem Arbeitsplatz bzw. Umweltfaktoren und der Entstehung von IPF herrscht [21-24]. Auch Viren wurden bereits mit IPF in Zusammenhang gebracht. Dies wird jedoch kontrovers diskutiert [8]. Aktuelle Beweise zeigen, dass Hepatitis C und Adenoviren weniger involviert sind. Stattdessen könnte das Epstein-Barr-Virus (EBV) Auslöser sein [25-29]. Demgegenüber wurde eine Studie veröffentlicht, bei der eine Forschungsgruppe diese Hypothese anhand der PCR-Amplifizierung nicht bestätigen konnte [30].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der genaue Faktor für die Ausbildung und Erhaltung der Fibrose bei IPF unbekannt ist. Zigarettenrauch, Erreger, die in der Umwelt vorkommen und eingeatmet werden, virale Infektionen und chronische Aspiration müssen in Betracht gezogen werden. Es ist wahrscheinlich, dass die Erkrankung durch eine Serie von rezidivierenden Verletzungen des Epithels entsteht.

### 1.1.6 Klinik

Zu den Symptomen zählen neben dem trockenen Husten auch die zunehmende Luftnot [8, 31]. Die Beschwerden treten zunächst bei Belastung, später auch in Ruhe auf. Bei der körperlichen Untersuchung fallen endinspiratorische, ohrnahe Nebengeräusche im Sinne einer Sklerosiphonie auf. Bei der Auskultation lässt sich beidseits ein basales Knisterrasseln während der Inspiration nachweisen, bei einer fortgeschrittenen Fibrose geht das Rasseln in ein Korkenreiben über [8, 10]. Zeichen der Rechtsherzbelastung oder -insuffizienz finden sich lediglich im fortgeschrittenen Stadium [32]. Bei 25 – 50 % der Patienten können Trommelschlegelfinger und Uhrglasnägel auftreten [31, 33]. Die Verschlechterung der Lungenfunktion führt häufig zu einer Kachexie und durch die Abnahme der Compliance kommt es zu einer Hypoxämie, was sich anhand einer Zyanose der Schleimhäute zeigt [10].

### 1.1.7 Diagnose

#### *Klinische Diagnosekriterien*

Die Hauptkriterien bestehen aus dem Ausschluss bekannter Ursachen einer interstitiellen Lungenerkrankung, der pathologischen Lungenfunktion mit Restriktion und Gasaustauschstörung, der beidseitig basalen retikulären Verdichtung mit minimalen Milchglasmuster im *HR-CT* sowie der transbronchialen Lungenbiopsie oder bronchoalveolären Lavage ohne Hinweise für andere Diagnosen. Als Nebenkriterien zählen das Alter des Patienten (über 50 Jahre), eine allmählich eintretende Atemnot bei Belastung, für die sich keine andere Erklärung findet, die Erkrankungsdauer über 3 Monate und beidseitig basal inspiratorisches Knisterrasseln. Die Diagnose ist positiv, wenn alle vier Hauptkriterien und drei der vier Nebenkriterien erfüllt sind [4, 34].

#### *Labor*

Es können nur unspezifische Befunde erhoben werden. Zeitweise ist der BSG- oder der LDH-Wert erhöht und Rheumafaktoren (RF) sowie Autoantikörper (ANA = *antinuclear antibodies*) weisen einen niedrigen Titer auf [8].

#### *Lungenfunktionsuntersuchung*

Bei der Lungenfunktionsuntersuchung zeigt sich eine restriktive Ventilationsstörung mit erniedrigter Vitalkapazität [8]. Die Messung der Diffusionskapazität ist besonders sensitiv für die Erfassung interstitieller Veränderungen. So werden der Verlust des Alveolargewebes, eine verlängerte Diffusionsstrecke sowie eine Rarifizierung der

Gefäße gemessen. Allerdings kann nicht zwischen entzündlichen und fibrotischen Veränderungen der Lunge mit Hilfe dieser Untersuchung differenziert werden [35].

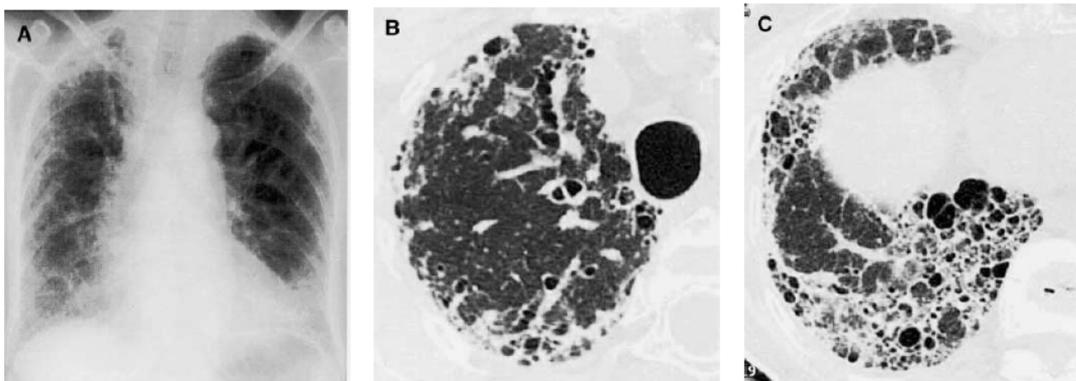
### *Belastungsuntersuchungen*

Im Anfangsstadium ist in Ruhe eine ausreichende Sauerstoffaufnahme möglich. Mit zunehmender Atemarbeit wird noch ein normaler oder gering erniedrigter  $pO_2$ -Wert bei gleichzeitiger Hypokapnie erzielt. Unter Belastung steigt die Atemnot, da sie vom Ausmaß der Diffusionsstörung und damit der Compliance abhängt und zu einem Abfall der Sauerstoffsättigung führt [8]. Der 6-Minuten-Gehtest eignet sich am besten, um die interstitielle Lungenerkrankung bei Belastung des Patienten analysieren zu können.

### *Röntgendiagnostik*

Das Röntgenthoraxbild (Abb. 2) zeigt eine basal betonte, retikuläre Vermehrung der Bindegewebssepten mit Verminderung der Lungenvolumina [36, 37]. Die Veränderungen sind meistens peripher und symmetrisch. Im Verlauf der Erkrankung erstrecken sie sich zunehmend nach apikal.

Das hoch auflösende Computertomogramm (*HR-CT*) gibt entscheidende diagnostische Hinweise. Charakteristisch ist die subpleural gelegene Verdickung des intralobulären Gewebes mit retikulärem Muster insbesondere im Bereich der basalen Lungenabschnitte ein Hinweis für fibrotische Umwandlungen des Lungengewebes. Im weiteren Verlauf bilden sich zunehmend Honigwabenstrukturen („honeycombing“) [38]. Durch die Kollagenablagerungen entlang der Gefäße und Bronchiolen erscheinen ihre Wände verdickt [39-41].



**Abbildung 2: idiopathische Fibrose aus [42]**

- (A) Honigwabenstruktur bei einer Röntgenübersichtsaufnahme vom Thorax
- (B) und (C) CT-Aufnahme mit Honigwabenstruktur

### *Bronchoalveoläre Lavage*

Sie ermöglicht keine Sicherung der Diagnose. Eine Vermehrung von neutrophilen und gering auch der eosinophilen Granulozyten kann die Vermutung einer idiopathischen Lungenfibrose unterstützen. Sie ist jedoch nicht beweisend [8].

### *Chirurgische Lungenbiopsie*

Die chirurgische Lungenbiopsie ist für die histologische Diagnose wichtig. Dabei wird im Rahmen einer videoassistierten Thorakoskopie Lungengewebe möglichst aus narbenfreien Bereichen entnommen [8, 43].

## **1.1.8 Therapie**

Die chronische Entzündung als Ursache der Lungenfibrose hat zu Therapieversuchen mit antiinflammatorischen und immunsuppressiven Substanzen geführt. Kortikosteroide und immunsuppressive Substanzen haben sich am effizientesten bei Fibrose durchgesetzt. Dazu zählen Glukokortikoide, Azathioprin oder Cyclophosphamide [8, 35, 44-47]. Die Erfolge sind allerdings ziemlich gering, da der Verlauf der Fibrose nicht wesentlich beeinflusst werden kann [6, 8, 10, 35]. Die ATS zeigte, dass es keine Beweise von Studien über den Zusammenhang zwischen Behandlungen von Kortikosteroiden und immunsuppressiven Mitteln gibt, die die Überlebenschance oder Lebensqualität von IPF-Patienten verbessern [8]. Das konnte auch unter anderem auf die geringe Patientenzahl und dem Mangel an Placebokontrollen aber auch der Ungleichmäßigkeit der Studienteilnehmer sowie auf die Schwierigkeiten hinsichtlich ungenauer Kriterien zurückgeführt werden. Daher muss die Entscheidung für eine immunsuppressive Therapie individuell unter Berücksichtigung der Nebenwirkungen und des Persönlichkeitsprofils erfolgen [8]. Lebensalter über 70, starkes Übergewicht, Osteoporose, Diabetes mellitus oder andere ernste Begleiterkrankungen sind mögliche Gründe für einen Therapieverzicht.

Eine Empfehlung der ATS sieht eine Therapie mit täglich 0,5 mg/kg Prednison oral über 4 Wochen, dann 0,25 mg/kg Prednison oral über 8 Wochen und reduzierend auf 0,125 mg/kg Prednison oral vor [8]. Nach der ATS ist eine Kombination z.B. mit Azathioprin 2-3 mg/kg (bis 150 mg) täglich vorgesehen [48]. Alternativ wird Cyclophosphamid (2 mg/kg täglich, Beginn mit 25 mg bis max. 150 mg täglich) eingesetzt. Bei zunehmenden Symptomen, Verminderung der Sauerstoffsättigung in Ruhe oder unter Belastung, zunehmende Narbenbildung im HR-CT oder Abnahme der Lungenfunktionsparameter ( $\geq 10\%$  TLC oder VC oder  $\geq 15\%$  DLCO) sollte die Behandlung beendet oder umgestellt werden.

Eine aktuelle Studie (*idiopathic pulmonary fibrosis international group exploring NAC 1 annual* = IFIGENIA), die bei 155 Patienten durchgeführt wurde, hat nach einer Therapiedauer von 12 Monaten eine Verbesserung der Vitalkapazität und der Diffusionskapazität ergeben, wenn anstelle von Kortison und Azathioprin zusätzlich mit N-Acetylcystein (3 Mal 600 mg täglich, einschleichend dosiert) behandelt wurde.

Bei Hypoxämie wird eine Langzeitsauerstofftherapie empfohlen. Die Indikation ist bei einem  $\text{PaO}_2 \leq 55$  mmHg in Ruhe oder unter Belastung oder bei einem  $\text{PaO}_2 \leq 59$  mmHg gegeben, wenn Zeichen einer Rechtsherzbelastung bestehen.

Durch die neuen Erkenntnisse in der Pathogenese von IPF sollen andere Therapeutika die Funktion von Fibroblasten sowie Myofibroblasten und AECs (*alveolar epithelial cells*) beeinflussen. Das Ziel ist die Blockierung der Produktion von ECM (*extracellular Matrix*) durch Fibroblasten. Einer dieser Medikamente ist Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ ), ein Zytokin, das die Bildung von profibrotischen Zytokinen und Kollagen herunterreguliert [49]. Ein weiteres Medikament ist Pirfenidon, das die Fibroblastenproliferation sowie die Kollagensynthese unterbindet [50]. In einem Versuch mit IPF-Patienten wurde ein Rückgang trotz konventioneller Therapie gezeigt. Pirfenidon stabilisiert sowohl die respiratorische Funktion als auch die Symptome [51]. Zusammenfassend ist es wichtig zu betonen, dass kein einziges Medikament derzeit existiert, das IPF effektiv bekämpfen kann, sondern eine Kombination aus Substanzen notwendig ist, die die Fibroblasten- und Myofibroblastenaktivität blocken und die Apoptose reduzieren.

In den letzten 20 Jahren hat sich die Lungentransplantation als Option für die Behandlung von IPF-Patienten durchgesetzt [8, 35]. Das Standardverfahren besteht in einer Einzellungentransplantation. Die Indikation ist bei schwerer Luftnot, Sauerstoffabhängigkeit und progressivem Verlauf gegeben.

### **1.1.9 Prognose**

Die Prognose der IPF stellt sich schwierig dar, weil sie zum einen von vielen unterschiedlichen Faktoren wie Alter [45], Geschlecht (Männer haben ein höheres Risiko) [45, 52], Atemfunktionstest [45, 53], Zigarettenverbrauch [52, 53] sowie Intensität der Kollagenneubildung abhängt und zum anderen durch ihre Irreversibilität gekennzeichnet ist [54]. Die allgemeine Überlebensprognose von Patienten mit IPF liegt zu 50% bei 5 Jahren. Die mittlere Überlebensdauer zum Zeitpunkt der Diagnosestellung beträgt ungefähr 3 Jahre und der Durchschnitt der Patienten verliert 7 Jahre seines Lebens [13].

## 1.2 Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

### 1.2.1 Definition

COPD entsteht aufgrund einer chronischen Bronchitis (chronischer Husten und Auswurf von Sputum) und einem Emphysem (permanente abnormale Vergrößerung der respiratorischen Atemräume begleitet von zerstörten Wänden ohne erkennbare Fibrose mit Überblähung der Lufträume) und ist eine nicht oder nur wenig reversible Verengung der Atemwege [55-57]. Daraus resultiert die Atemnot, das wichtigste Symptom der COPD. Sie wird durch eine Verkrampfung der Bronchialmuskulatur (Bronchospasmus), ein Anschwellen der Schleimhaut in den Bronchien (Ödem) und eine krankhaft erhöhte Schleimproduktion (Hyperkrinie) aufgrund einer dauerhaften Entzündung der Atemwege (chronische Bronchitis) ausgelöst. Ohne eine konsequente Behandlung können im weiteren Verlauf auch die Lungenbläschen angegriffen und schließlich zerstört werden. Es kommt zu einer krankhaften Überblähung der Lunge, die zu einem Lungenemphysem führen kann.

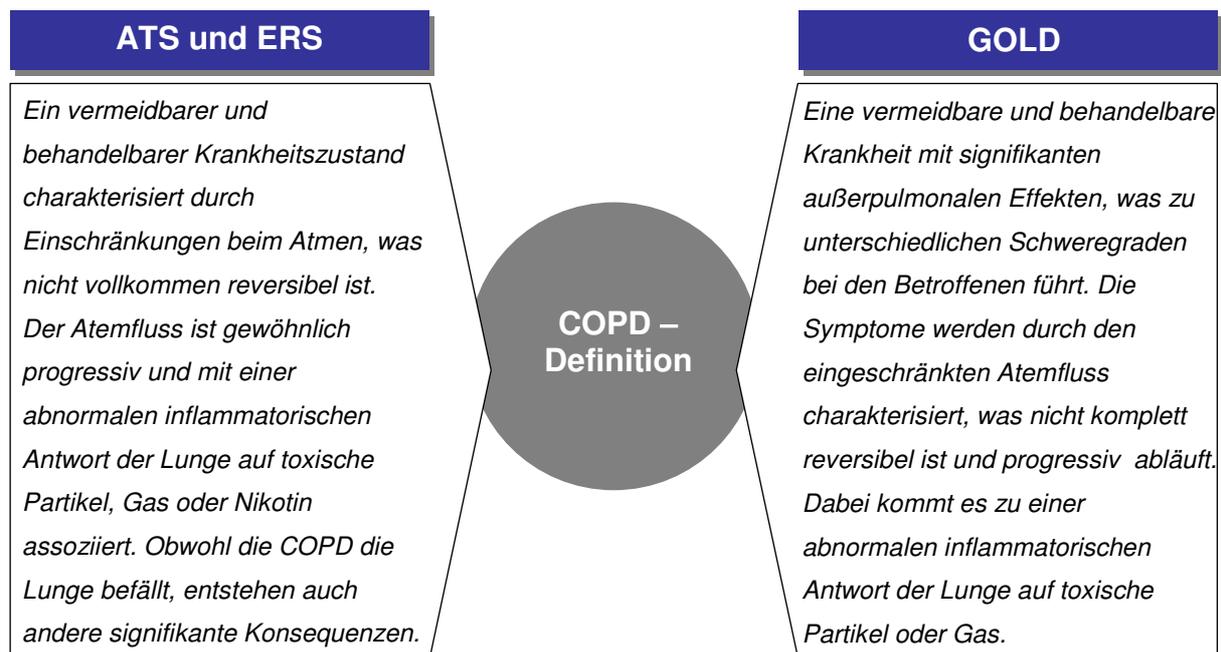


Abbildung 3: COPD-Definition aus [58]

### 1.2.2 Geschichte

COPD ist eine der wichtigsten Gründe für die weltweite Morbiditäts- und Mortalitätsrate [59], die den größten Teil für die Mortalität von respiratorischen Krankheiten darstellt. Außerdem ist sie die dritthäufigste Todesursache der EU und eine kontinuierliche

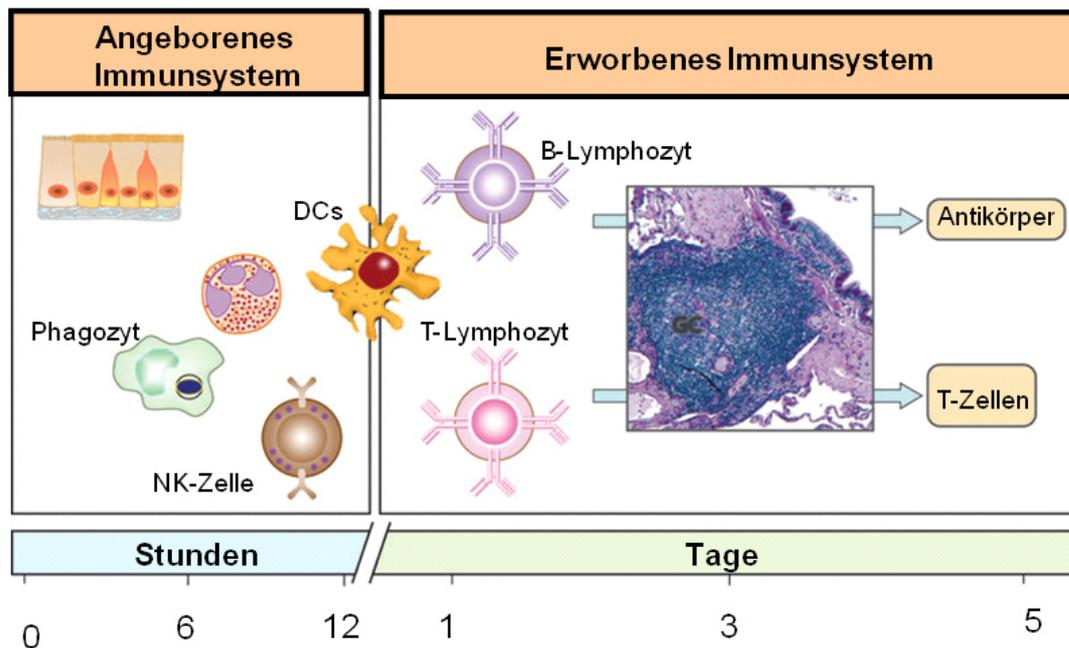
Steigerung der Prävalenz für COPD und der Mortalität werden für die kommenden Jahrzehnte vorausgesehen [60].

### **1.2.3 Pathogenese und Pathologie**

Risikofaktoren stellen der Zigarettenkonsum [61], Umweltverschmutzung [62] sowie berufsbegleitende Belastungen [63] dar. Die ständige Überflutung der Lunge mit Schadstoffen aus dem Zigarettenrauch führt zu einer chronischen Entzündung der Atemwege, dauernden Verkrampfung der Bronchialmuskulatur und Verengung der Bronchien. Bei COPD-Patienten kommt es zu einem Luftstau und in Folge dessen zur Atemnot. Durch die Verengung der Bronchien können sie nicht mehr vollständig ausatmen, sodass zuviel Luft in der Lunge zurückbleibt. Die Folgen der Atemnot (Dyspnoe) sind schwerwiegend. Zunächst tritt das Gefühl mangelnden Sauerstoffs unter Belastung auf, später kann es auch schon in Ruhe dazu kommen. Als Folge meiden Patienten körperliche Aktivitäten. Das führt zu einem Abbau von Muskulatur und zur Beeinträchtigung des Herz-Kreislauf-Systems, was wiederum die Beschwerden der COPD verstärkt und zu einer Reduzierung der Lebensqualität führt [64].

Akute Krankheitsschübe werden als Exazerbationen bezeichnet [65]. Sie zeigen sich in einer vermehrten Atemnot und Husten, Enge im Brustraum, verfärbten Auswurf, selten auch begleitet von Fieber. Exazerbationen sind jahreszeitabhängig und treten vorwiegend im Herbst und Winter auf. Ursachen für diese Verschlechterung des Krankheitszustands können Erkältungen oder andere Infekte der Atemwege, extreme Wetterlagen wie Hitze, Kälte und hohe Luftfeuchtigkeit, Rauch und Staub sein. Jede COPD-Exazerbation verschlechtert auch nach ihrem Abklingen die Lungenfunktion und den weiteren Verlauf, sodass das Auftreten von Beginn an mit geeigneten Medikamenten, Impfungen gegen Pneumokokken und Grippe sowie Meiden der auslösenden Faktoren behandelt werden muss [66].

Das Immunsystem spielt bei dem Pathomechanismus der COPD eine wichtige Rolle, da die Krankheit inflammatorisch begleitet wird (Abb. 4). In den zentralen Atemwegen infiltrieren Makrophagen und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Das führt zu der eigentlichen Inflammation zusammen mit den Eosinophilen und den Neutrophilen. Die peripheren Atemwege zeigen eine Hypertrophie der glatten Muskulatur sowie eine Zerstörung der Alveolen. Die Zahl der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten ist auch hier sowie in den peripheren Atemwegen erhöht [67].



**Abbildung 4 von [66]: Zusammenfassung des angeborenen und erworbenen Immunsystems**

Die Phagozyten und NK-Zellen (*natural killer cells*) sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems und die DCs (*dendritic cells*) verbinden das angeborene mit dem erworbenen System. Antigene werden dann den B- und T-Lymphozyten von den DCs präsentiert.

Sobald der inflammatorische Prozess begonnen hat, kommt es zu einer Zerstörung der Alveolarwände, vermehrter Schleimsekretion sowie einer vermehrten Kollagensynthese in den Bronchien. Das vaskuläre System der Lunge ist auch von der Inflammation betroffen. Dabei kommt es zur Zerstörung des Kapillarbetts, Verengung des Lumens sowie erhöhtem Druck im Gefäß [67].

### 1.2.4 Epidemiologie

Die COPD kann als eine Volkskrankheit bezeichnet werden. Man schätzt, dass es weltweit etwa 600 Millionen COPD-Patienten gibt [64]. Ungefähr 14 Prozent der über 40-Jährigen leiden an dieser Krankheit, bei den über 70-Jährigen sind es sogar 27 Prozent [68]. Der Anteil aktiver Raucher in der gesamten Stichprobe lag bei 20,6%. Auffällig war der erheblich höhere Anteil von Raucherinnen bei den jüngeren Studienteilnehmern. In Anbetracht der steigenden Lebenserwartung und Änderung des Zigarettenkonsums ist für die kommenden Jahre eine weitere Zunahme der Erkrankungshäufigkeit insbesondere bei Frauen zu erwarten [68].

### 1.2.5 Ätiologie

Hauptursache für die Entstehung einer COPD ist das Zigarettenrauchen. Die WHO fand heraus, dass 35% der COPD-Erkrankten durch Rauchen im Haus erkrankten und dieser Wert mit niedrigem bis mittlerem Einkommen kollidiert [69]. Wichtig ist dabei vor allem, wie viel und seit wann der Einzelne raucht: Je länger und je mehr Zigaretten pro Tag geraucht wurden, desto höher war das Risiko, an einer COPD zu erkranken [67]. Des Weiteren ist eine Zunahme bei Frauen erkennbar. Die Zahl der Raucherinnen übersteigt fast die der männlichen Raucher [68, 70]. Weitere Ursachen als Auslöser dieser Erkrankung sind Bakterien. Zu erwähnen sind hier insbesondere der *Hämophilus influenza*, der *Hämophilus parainfluenza* und der *Moraxella Catarrhalis* [71]. Zu den viralen Erregern zählen der Rhinovirus, Picornavirus, RSV (*respiratory syncytial virus*), Influenza A und B sowie Coronavirus [71]. Auch länger andauernde Reizungen der Lunge mit Schadstoffen, wie starke Belastungen mit Staub (Bergbau) oder gefährliche Gase am Arbeitsplatz, können die Krankheit begünstigen. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit dafür um einiges geringer als bei Zigaretten. Auch erblich bedingte Einflüsse können Risikofaktoren und mögliche Auslöser einer COPD darstellen. Hierzu gibt es allerdings erst wenige Studien [68, 71].

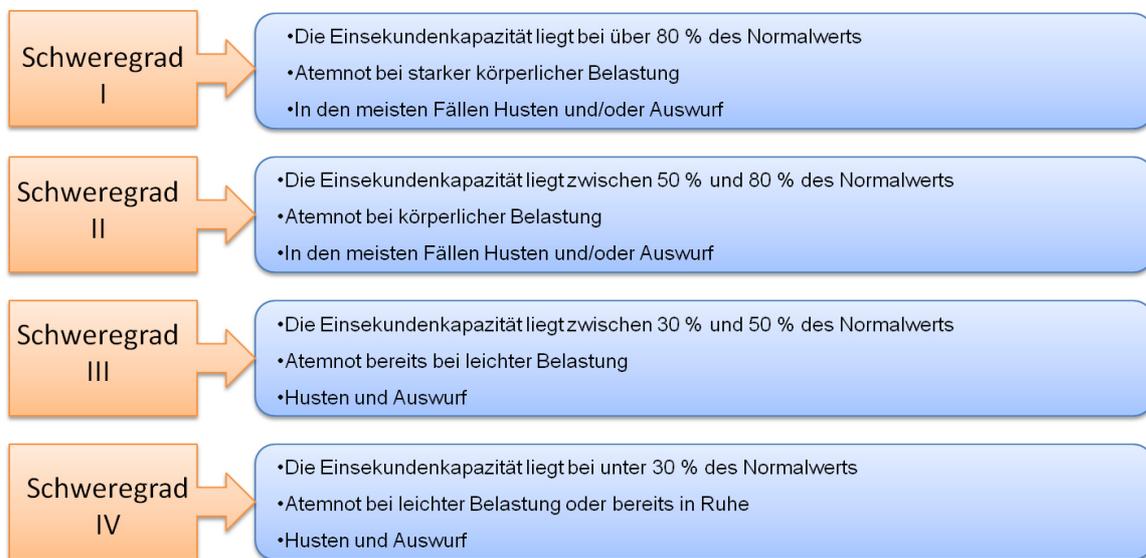
### 1.2.6 Klinik

Die klinischen Symptome von COPD-Patienten äußern sich zum einen in der vermehrten Bildung von Auswurf (Sputum) sowie Husten, die sowohl von der Tages- als auch der Jahreszeit abhängen. Während der Husten mit Sputum überwiegend am Morgen abgehustet wird, nimmt das Auftreten bis zum Abend hin ab. Der Husten ist in den kalten Jahreszeiten stärker ausgeprägt als in den warmen Monaten [68, 72]. Ein weiteres wichtiges Symptom ist die Atemnot (Dyspnoe). Diese entsteht, indem sich die Bronchien verengen, sodass Erkrankte Schwierigkeiten bei der Ausatmung (Expiration) haben. Man kann sie in verschiedene Stadien einteilen. Im Anfangsstadium tritt diese Atemnot nur unter Belastung auf, später schon in Ruhe und am Ende kann es in einen immobilen Zustand übergehen [72]. Zusammenfassend ergibt sich das charakteristische "AHA"-Symptom bei COPD-Patienten. Die Beschwerden treten protrahierend auf und erschweren dem Patienten das alltägliche Leben [73].

Im Spätstadium werden noch einmal zwei klinische Typen unterschieden. Dabei überwiegen bei dem sog. *Pink Puffer* der trockene Reizhusten sowie die Dyspnoe, wohingegen bei dem *Blue Bloater* die Zyanose sowie der produktive Husten dominieren [74].

### 1.2.7 Diagnose

Die COPD wird oft erst relativ spät erkannt [64]. Je früher die Diagnose gestellt wird, desto wahrscheinlicher kann der Verlauf positiv beeinflusst werden. Die Lungenfunktionsprüfung ist dafür das wichtigste medizinische Diagnoseverfahren, um eine COPD festzustellen [72]. Dabei wird ein Spirometer eingesetzt, das aus einem Mundstück besteht, in den der Patient reinatmet [75]. Dabei spielt die Vitalkapazität (Luftmenge, die maximal ausgeatmet werden kann, nachdem man vorher so tief wie möglich eingeatmet hat) und die Einsekundenkapazität (FEV<sub>1</sub>) (Luftmenge, die man nach tiefster Einatmung innerhalb von einer Sekunde wieder ausatmen kann) eine wichtige Rolle.



**Abbildung 5: Stufeneinteilung gemäß den Werten von der Spirometrieauswertung und der subjektiven Empfindung des Patienten**

### 1.2.8 Therapie

Voraussetzung für eine effiziente Behandlung ist, dass schädigende Einflüsse ausgeschaltet werden. Dazu muss der Patient das Rauchen aufgeben und auch das Passivrauchen meiden. Die Beendigung des Rauchens ist die einzige Möglichkeit, die Prognose der Erkrankung zu verbessern [76].

Die medikamentöse Therapie besteht aus inhalierbaren Medikamenten in Form von Dosieraerosole oder Pulverinhalatoren [76-78]. Dazu werden Bronchodilatoren sowie Glukokortikoide eingesetzt. Bronchodilatoren erweitern die Atemwege, indem sie den Bronchialmuskeltonus reduzieren und es damit zu einer Abnahme des Atemwegswiderstands sowie der Lungenüberblähung kommt. Die in der Therapie der

COPD eingesetzten Bronchodilatoren lassen sich in drei Gruppen einteilen: Beta-2-Agonisten, Anticholinergika und Methylxanthine (Theophyllin). Die Wirkstoffe unterscheiden sich hinsichtlich des Mechanismus, durch den die Atemwegsmuskulatur beeinflusst wird, sowie hinsichtlich der Effektivität und der unerwünschten Wirkungen, die auftreten können. Die häufigste unerwünschte Wirkung der Anticholinergika ist die Mundtrockenheit (bei etwa 16% der Patienten). Häufigere Nebenwirkungen von Beta-2-Agonisten sind Zittern und Kopfschmerzen. Neben den Bronchodilatoren werden auch Glukokortikoide eingesetzt, die sowohl inhalativ als auch oral verabreicht werden. In der Dauertherapie setzt man inhalative Glukokortikoide zusammen mit langwirksamen Beta-2-Agonisten ein [78]. Orale Glukokortikoide werden kurzzeitig bei der Exazerbation der COPD eingesetzt. Eine Dauertherapie mit oralen Glukokortikoiden ist nicht in den Leitlinien festgelegt [76]. Kombinationspräparate sind stattdessen vorzuziehen, da sie bei COPD-Patienten in fortgeschrittenem Erkrankungsstadium (Schweregrad III und IV) vor allem zu einer Verringerung der Exazerbationsrate (um etwa 25%) sowie einer Reduktion des jährlichen FEV<sub>1</sub>-Abfalls führen. Weiterhin kann es zu einer Verbesserung von Symptomen und der Lebensqualität führen. Insgesamt sprechen aber nur wenige COPD-Patienten auf inhalative Glukokortikoide wie Budesonid oder Flutikason an [76, 78].

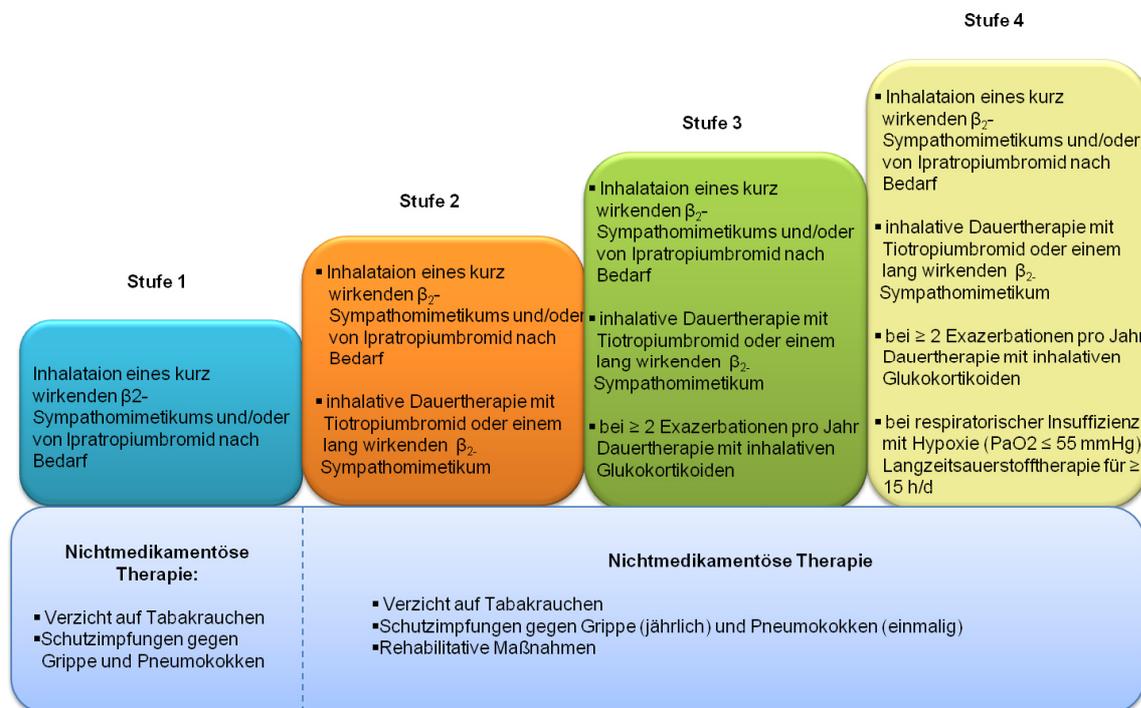


Abbildung 6: medikamentöse Stufentherapie der COPD aus Duale Reihe Pharmakologie [79]

Bei Verdacht auf einen bakteriellen Auslöser sollen Antibiotika verabreicht werden. Mukopharmaka wie Acetylcystein können in einzelnen Fällen gute Ergebnisse erzielen [80]. Der Einsatz von Antitussiva hingegen sollte nur bei trockenem Husten erfolgen, solange zusätzlich keine Gefahr einer Atemdepression besteht. Eine weitere Form der Therapie besteht darin, Atemhilfen für eine Sauerstofflangzeittherapie einzusetzen [81]. Dadurch wird die Belüftung der Lunge verbessert und durch den „Kutscher-Sitz“ (Oberkörper aufrecht, beide Arme auf den Knien abgestützt und tief ein- und ausatmen) sowie durch das Ausatmen gegen einen Widerstand, zum Beispiel Lippenbremse (gegen den Druck der aufeinander liegenden Lippen stoßweise ausatmen) können zusätzlich die Symptome minimiert werden [76]. Liegen bei der Blutgasanalyse die Werte des Sauerstoffpartialdrucks ( $pO_2$ ) dauerhaft unter 60 mmHg (schwere Hypoxämie) und sind die  $pCO_2$ -Werte nicht stärker erhöht, spricht man von einer oxygenatorischen respiratorischen Insuffizienz (Partialinsuffizienz). Dann kann eine langfristige Zufuhr von Sauerstoff (Sauerstofflangzeittherapie) das Befinden erheblich bessern und Komplikationen wie Lungenhochdruck (pulmonale Hypertonie) und Rechtsherzinsuffizienz und zunehmende Verschlechterung des Trainingszustands verhindern [82].

Eine weitere Form der Behandlung ist die Sauerstoffbehandlung mit geeigneten Geräten zu Hause, sobald die  $pCO_2$ -Werte dauerhaft erhöht sind (Globalinsuffizienz). Um sich vor der vollständigen Erschöpfung zu schützen, wird der Atemantrieb gesenkt, was eine Sollwertverstellung für den  $pCO_2$  bedeutet. Die Heimbeatmungstherapie soll die Belastung der Lunge reduzieren, damit sie in der beatmungsfreien Zeit leistungsfähiger wird.

Die effektivste Behandlung der COPD ist die Lungentransplantation (LTX), da der konservative Weg lediglich zu einer Milderung der Krankheit führt [83]. Bei der LTX werden entweder eine Lungenhälfte oder beide Lungenhälften transplantiert.

### **1.2.9 Prognose**

COPD-Patienten haben gegenüber den Patienten mit normaler Lungenfunktion eine geringere Lebenserwartung [55, 57]. Neben der Krankheit selbst sind kardiovaskuläre Erkrankungen und Lungenkrebs die häufigsten Todesursachen bei an COPD erkrankten Menschen [84]. In einer Population von fast 10.000 Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung war das Risiko innerhalb von 6 bis 10 Jahren zu versterben im Vergleich der erwarteten Sterberate für die gesunde Bevölkerung für Männer 2,6-fach und für Frauen 2,9-fach erhöht [85].

### 1.3 Bleomycin-Mausmodell

Als experimentelles Tiermodell steht das Bleomycin-Mausmodell zur Verfügung. Dieses ist hilfreich, um sowohl die molekularen als auch zellulären Pathomechanismen der Lungenfibrose untersuchen zu können [86].

Bleomycin ist ein Antibiotikum, das auch als Zytostatikum eingesetzt wird [87]. Es hat allerdings auch starke Nebenwirkungen, die jedoch für experimentelle Zwecke hilfreich sind. Im Verlauf der Bleomycinbehandlung werden Entzündungsreaktionen als Folge oxidativen Stresses ausgelöst, die dann schließlich zu einer Lungenfibrose führen [88, 89]. Dabei steigt die Zahl proinflammatorischer Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) und TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) an und erreichen zwischen Tag 4 und Tag 7 nach Anwendung von Bleomycin ihre maximale Konzentration [90, 91].

Der Effekt von Bleomycin im Mausmodell stellt somit eine Möglichkeit dar, um Therapieansätze zu erforschen.

## 1.4 Mono-, Oligo- und Polysialinsäure

### 1.4.1 Sialylierung von Glykokonjugaten

Die Familie der Sialinsäuren zählen zu den N- und O-Derivaten der Neuraminsäuren und besteht aus mehr als 50 verschiedenen Komponenten [92-94]. Die häufigsten Vertreter *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), *N*-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc) sowie die Deaminoneuraminsäure (KDN) sind in Abbildung 7 dargestellt. Nur Neu5Ac kommt ubiquitär vor, während die anderen nicht in allen Wirbeltieren zu finden sind [95].

Sialinsäuren sind Kohlenhydrate, deren Grundgerüst aus neun Kohlenstoffatomen besteht, wobei die C1-Position carboxyliert ist. Dadurch ist das Molekül unter physiologischen Bedingungen negativ geladen [92]. An der C2-Position von Neu5Ac befindet sich eine Ketogruppe, C5 besitzt eine Aminofunktion und die Positionen C4, C6, C7, C8 und C9 sind hydroxyliert [95].

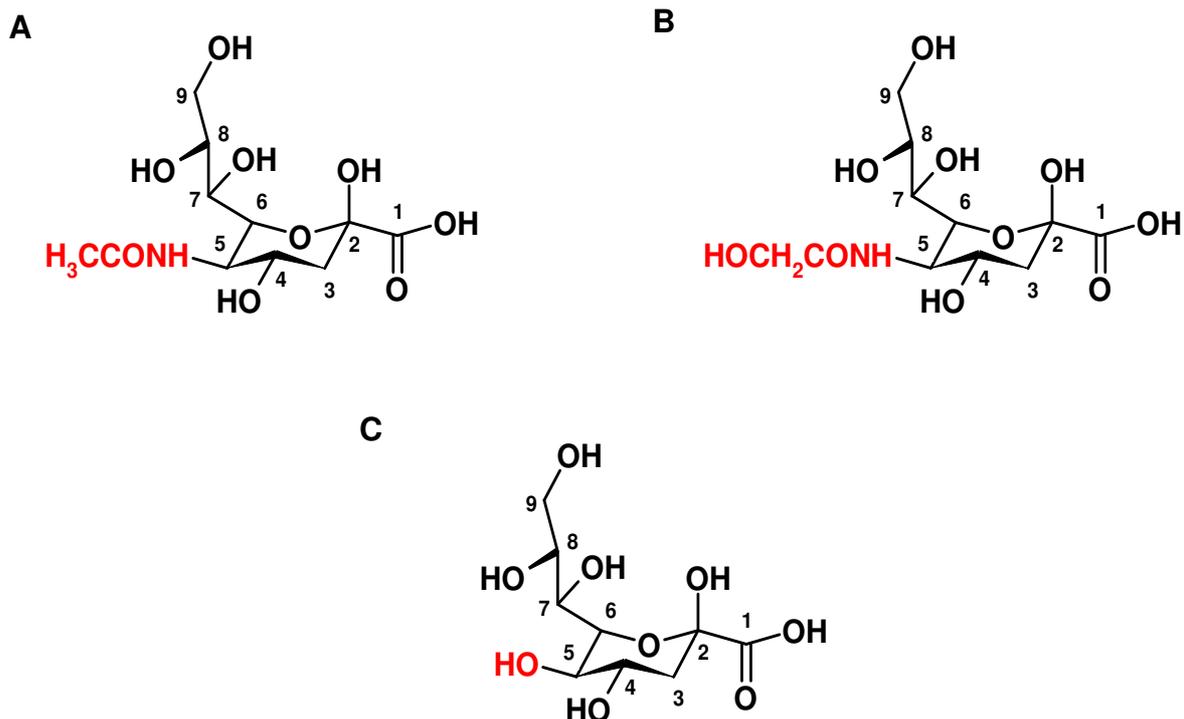


Abbildung 7: Strukturen der drei häufigsten Sialinsäuren  
 (A) *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac)  
 (B) *N*-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc)  
 (C) Deaminoneuraminsäure (KDN)

Entnommen aus der Dissertation: *Charakterisierung der Glykosylierungseigenschaften der Polysialyltransferasen ST8SialI und St8SialIV in vivo* von Galuska, S.P., Gießen 2008

Sialinsäuren befinden sich meist als terminale Monosialylreste am nicht reduzierenden Ende von Glykoproteinen und Glykosphingolipiden [96]. Damit bestimmen sie die biologische Funktion von Glykokonjugaten im Hinblick auf Stabilisierung von Proteinen, die Halbwertszeit von zirkulierenden Glykoproteinen und Zellen sowie die Kontrolle bei der Zelladhäsion, Zellinteraktion sowie Signalübertragung [97-104].

### 1.4.2 Synthese von PolySia

Als Ausgangssubstanz wird *UDP-N-Acetyl-D-Glukosamin* (UDP-GlcNAc) für die Synthese von *N-Acetylneuraminsäure* (Neu5Ac) aus dem Kohlenhydratstoffwechsel der Zelle für die Biosynthese bereitgestellt. Danach findet die Epimerisierung von UDP-GlcNAc zu *N-Acetyl-D-Mannosamin* (ManNAc) statt, das in 6-Position phosphoryliert wird [105]. Die Umbauprozesse werden von dem Enzym *UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase* (GNE) katalysiert und unter Verbrauch von Phosphoenolpyruvat durch die *Neu5Ac-9-Phosphat-Synthase* in *Neu5Ac-9-Phosphat* umgewandelt. Dabei kommt es durch Abspaltung der Phosphatgruppe zu Neu5Ac [106]. Die Aktivierung der Neu5Ac findet im Kern statt, wohingegen die anderen Monosaccharide im Zytosol aktiviert werden [107]. Sialyltransferasen übertragen Glykokonjugate, nachdem aktiviertes *CMP-Neu5Ac* in den Golgi-Apparat transportiert wurde [108]. Gleichzeitig reguliert das Endprodukt *CMP-Neu5Ac* in einem Feedback-Mechanismus die Aktivität der GNE und damit auch den Ablauf der Sialinsäurebiosynthese [109]. Am Ende werden die Sialinsäuren beispielsweise an *N-Glykanen* über eine glykosidische Bindung ( $\alpha$ 2-6,  $\alpha$ 2-3) zumeist mit Galaktose und an *O-Glykanen* vorwiegend mit *N-Acetylgalaktosamin* verknüpft. Bei Glykosphingolipiden erfolgt die Bindung über die C-1-Hydroxylgruppe an das Ceramidgrundgerüst [97].

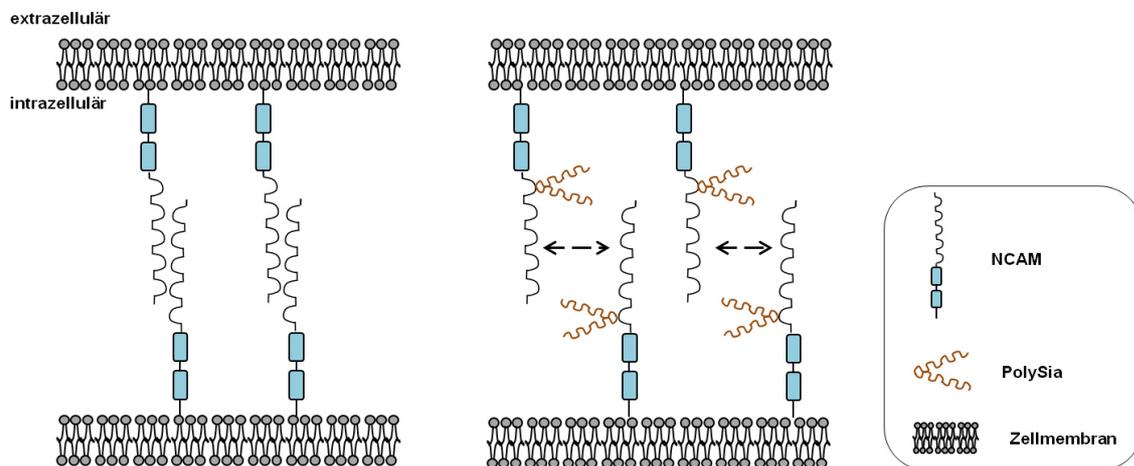
Neben der Monosialylierung kann es auch zu einer Di- (2 Sialinsäuren), Oligo- (3-7 Sialinsäuren) oder Polysialylierung ( $\geq$  8 Sialinsäuren) von Glykokonjugaten kommen, die sich in der Länge der Sialinsäureketten, in der Art der Verknüpfung zwischen den einzelnen Sialinsäuren und den enthaltenden Sialinsäurespezien unterscheiden [110, 111].

### 1.4.3 Vorkommen und Funktion von Oligo- und PolySia

Polysialinsäuren spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Zell-Zell Interaktionen, für die ihre hohe Anzahl an Carboxylgruppen verantwortlich ist, was zu ihrem polyanionischen Charakter führt [112-114]. Die negative Gesamtladung des Moleküls führt zu einer elektrostatischen Abstoßung polysialylierter Proteine, sodass

PolySia als Negativregulator von Zelladhäsionen bezeichnet werden kann und so Zell-Zell-Interaktionen beeinflusst [115, 116] (Abbildung 8).

Für viele verschiedene Spezies ist diese Interaktion von großer Bedeutung. Zum Beispiel erkennen Phagen eine  $\alpha$ 2,8-verknüpfte PolySia von *Escherichia coli* (E. coli) K1, einem neuroinvasivem Bakterium, mittels einer EndoN. Das Enzym hat sowohl ein katalytisches Zentrum, das den Abbau der schützenden Glykokalyx durchführt, als auch eine PolySia-Bindungsdomäne [117]. Bei *Neisseria meningitidis* befindet sich auch eine  $\alpha$ 2,8-verknüpfte PolySia in der Glykokalyx. Da im Nervengewebe von Säugetieren Polymere aus  $\alpha$ 2,8-verknüpfte Neu5Ac synthetisiert werden, können beide Erreger sich zu Nutze machen, dass das Immunsystem die Bakterien folglich nicht als „fremd“ erkennt [114, 118]. PolySia reguliert nicht nur Interaktionen sondern beeinflusst auch die Membranfluidität [119, 120]. Das bekannteste Beispiel für Neu5Ac-polysialylierte Proteine in Säugetieren ist das neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM), das zu der Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie gehört. Es ist über N-Glykane polysialyliert [94]. Aufgrund der Polysialylierung wird die Zelladhäsion beeinflusst und es kann auch zu einer Inhibierung der homophilen NCAM-NCAM-Bindung kommen, was eine wichtige Rolle bei der Axonbildung während der Neurogenese im Gehirn von Säugetieren spielt (Abb. 8) [121].



**Abbildung 8: Einfluss von PolySia auf Zelladhäsionsprozesse (modifiziert nach Rutishauser und Bruses) [122, 123]**

Einfluss von PolySia auf die NCAM-NCAM-Interaktion und folgende Inhibition der Zelladhäsion

Auch auf der Oberfläche von einigen Tumorzellen wie Neuroblastome, Medulloblastome und Gliome befindet sich eine größere Menge von PolySia und korreliert mit dem Metastasierungsverhalten von Karzinomen [122, 124-132].

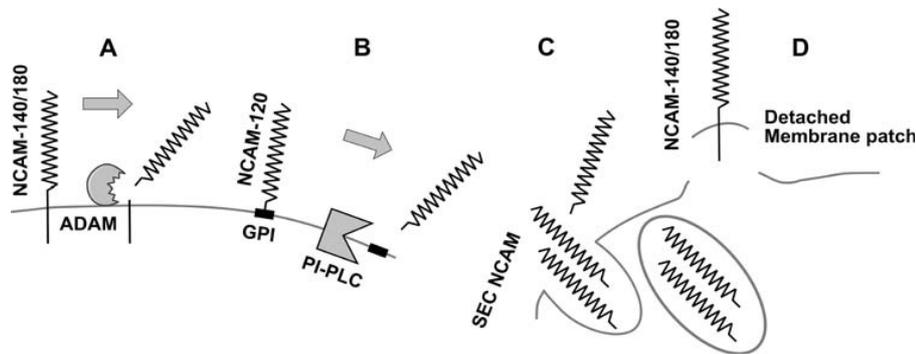
Bisher sind insgesamt fünf polysialylierte Proteine bekannt. Dazu gehören das NCAM, ein membran-assoziiertes Glykoprotein, das auf der Oberfläche von Nervenzellen exprimiert wird. Außerdem zählt das Membranprotein CD36 aus der Familie der Scavenger-Rezeptoren, das beim Menschen in der Muttermilch vorkommt und im Vergleich zu NCAM an O-Glykanen polysialyliert wird, dazu [133]. Weiterhin findet sich PolySia am Rezeptor Neuropilin-2, der auf dendritischen Zellen zu finden ist und wahrscheinlich für das menschliche Immunsystem eine wichtige Rolle spielt. Allerdings ist noch nicht bekannt, an welcher Stelle das Molekül polysialyliert wird [134]. Die  $\alpha$ -Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals ist auch als Träger von PolySia bekannt. Es findet sich in murinen Gehirnen [135]. Das synaptische Zelladhäsionsmolekül SynCAM wurde in unserem Labor als PolySia-Träger nachgewiesen [136]. Die biologische Funktion konnte allerdings noch nicht erklärt werden. Es besteht jedoch die Vermutung, dass das Zusammenspiel zwischen Neuronen und Gliazellen auf der Ebene von Synapsen durch die Polysialylierung verändert wird [136].

## 1.5 Polysialylierung von NCAM

### 1.5.1 Struktur und Isoformen von NCAM

NCAM gehört zur Immunglobulin(Ig)-Superfamilie (IgSF) und ist ein Zell-Zell-Adhäsionsmolekül [115, 137-139]. Es handelt sich hierbei um das  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige neurale Zelladhäsionsmolekül, welches zu den CAMs (*cell adhesion molecules*) zählt. Die größte Familie der strukturell verwandten Zelladhäsionsmoleküle stellt die IgSF mit mehr als 100 Mitgliedern dar [140]. Cadherine, Selektine und Integrine zählen als drei weitere große Familien zu den IgSF. Dabei zeigen alle Vertreter der IgSF mindestens eine Immunglobulin-ähnliche Domäne im extrazellulären Raum. Der extrazelluläre Teil besteht aus fünf Ig-ähnlichen und zwei Fibronectin Typ III-homologen Domänen [141]. Auf Chromosom 11 des Menschen sitzt das einzige Gen, welches NCAM codiert [142]. Durch alternatives Spleißen werden hauptsächlich drei Isoformen exprimiert und zwar die zwei Transmembranproteine NCAM-140 und NCAM-180 sowie das mit einem Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) in der Membran verankerte NCAM-120 [141, 143].

Darüberhinaus gibt es NCAM in löslicher Form (*soluble NCAM*), das z.B. durch Exzisionsenzyme, die NCAM von seinem GPI-Anker trennen [144], oder durch proteolytische Spaltung durch Metalloproteasen der ADAMS-Familie im Rahmen von Entzündungsreaktionen von bronchialen Epithelzellen induziert wird [145, 146] (Abb. 9).



**Abbildung 9: Lösliches NCAM aus [147]**

- (A) Proteolytische Spaltung des extrazellulären Anteils
- (B) NCAM wird durch ein Exzisionsenzym von seinem GPI-Anker getrennt
- (C) Aufnahme des löslichen NCAMs über die Membran
- (D) Lösliches NCAM wird an die Membran gebunden

### 1.5.2 Biologische Funktionen von polysialyliertem NCAM

NCAM kann mit anderen NCAM-Molekülen sowohl in einer *cis*-Konfiguration, also zwischen NCAM-Molekülen derselben Zelle als auch in *trans*-Konfiguration, dementsprechend zwischen NCAM-Molekülen benachbarter Zellen, eine homophile Bindung herstellen [148]. Außerdem kann NCAM heterophile Wechselwirkungen eingehen, die unterschiedliche Interaktionen aufweisen. NCAM stellt unter anderem einen Signalrezeptor für Mitglieder der GDNF-Familie (*glial derived neurotrophic factor*) dar. Dabei wird die Migration von Schwannzellen und Axonwachstum von primären Neuronen im Hippocampus von GDNF durch NCAM-GFR $\alpha$  (*GDNF family receptor-alpha*) stimuliert [149]. Die Regulierungsart hängt dabei von dem Polysialierungsgrad ab. Allgemein wird vermutet, dass unpolysialyliertes NCAM vor allem als Zelladhäsionsmolekül vorkommt, wohingegen polysialyliertes NCAM mehr ein Signal- und Regulationsmolekül darstellt. So besteht eine Wechselwirkung zwischen NCAM und verschiedenen Elementen der Extrazellulärmatrix inbegriffen das Glykosaminoglykan Heparin [150], Chondroitinsulfat [151, 152] und Heparansulfat aus der Gruppe der Proteoglykane [153].

NCAM ist auch als Aktivator des MAP-Kinase-Wegs (*mitogen-activated-protein*) bekannt [154, 155]. Eine besonders wichtige Funktion von NCAM ist die

Wechselwirkung mit dem FGFR (*fibroblast growth-factor-rezeptor*). Doherty und Walsh zeigten, dass NCAM nicht nur mit diesem Rezeptor interagiert sondern ihn auch aktiviert [156]. Infolgedessen kommt es zur Phosphorylierung des Rezeptors und damit zu einer Aktivierung der Signaltransduktionskaskade im Inneren der Zelle [157]. Außerdem werden intrazelluläre Signalkaskaden in neuronalen Zellen durch die Bindung von NCAM aktiviert und damit das Neuritenwachstum gefördert [158]. Im Hinblick auf biologische Prozesse ist NCAM bei der Zelladhäsion, synaptischen Plastizität sowie Neuronenwachstum beteiligt [159-162]. Im Hinblick auf die Gehirnplastizität reguliert polysialyliertes NCAM das Wachstum von Axonen, die Verlängerung der Dendriten sowie ihre Verzweigung [163]. Sobald PolySia von NCAM entfernt wird, kommt es zu Projektionsfehlern von Ganglien in der Retina [164], Verminderung der Zahl neu entstandener Neurone [165] und Veränderungen von axonalen Verzweigungen [166]. Adhäsion und Stabilisierung von Membrankontakten werden mit polysialyliertem NCAM assoziiert, wohingegen nicht polysialyliertes NCAM zum Verlust von Kontakten und der Plastizität führt. Dementsprechend wird PolySia bei Axonen und Dendriten vor Herstellung von Kontakten exprimiert und sobald die Synapsen Verbindungen untereinander aufgebaut haben, wird PolySia wieder herunterreguliert [167].

Ein weiterer interessanter Aspekt ist der Einfluss auf das Erinnerungsvermögen und auf Lernprozesse [168, 169]. Im adulten Hirn findet man PolySia nur in begrenzten Arealen und zwar insbesondere in denen, wo auch noch im adulten Stadium neuronale Regeneration stattfindet. Zudem kommt es bei Lern- und Gedächtnisprozessen zu einer Erhöhung der Konzentration an polysialyliertem NCAM in den vom Lernprozess betroffenen Arealen. Eine weitere pathologische Bedeutung hat polysialyliertes NCAM bei hoch malignen neuroendokrinen Tumoren. Hier geht nämlich die Menge an polysialyliertem NCAM mit dem Metastasierungspotential einher. Durch die polyanionische Oberfläche der Tumorzellen wird der Zell-Zellkontakt gestört und maligne Zellen können sich leichter aus dem Primärtumor lösen [170]. Eine erste Studie von Urs Rutishauser und Mitarbeitern zeigte, dass induzierte PolySia-Expression auch die Gewebsheilung fördert, indem beschädigte Zellen besser ausgetauscht werden können und die Ausbildung neuer neuronaler Verbindungen gefördert wird [125].

Auch die Aufgaben der löslichen NCAM-Formen sind vielfältig. Unter anderem wurde es bei Patienten mit kleinzelligem Lungenkarzinom nachgewiesen [171]. Aber auch bei Patienten mit Alzheimer wurde eine signifikante Abnahme der löslichen PolySia-NCAM-Form im Hippocampus mit Desorganisation dieser Region gefunden [172].

Dahingegen ist die Menge bei schizophrenen Patienten im Gyrus des Hippocampus immens erhöht [173]. Bei letztgenannter Krankheit sowie bei an altersbedingter Demenz erkrankten Patienten konnte lösliches NCAM-110 nachgewiesen werden [171].

## 1.6 Die Polysialyltransferasen ST8SialI und ST8SialIV

Die Polysialylierung von NCAM erfolgt durch die beiden Polysialyltransferasen ST8SialI und ST8SialIV, die unabhängig voneinander reguliert und exprimiert werden [174, 175]. Beide Enzyme zählen zu der Sialyltransferase-Familie der Vertebraten, die im Golgi-Apparat der Zelle lokalisiert sind und Typ II-Transmembranproteine darstellen [108, 176]. Sie weisen eine kurze zytoplasmatische und eine lange in das Lumen reichende Domäne auf. Außerdem haben sie eine Transmembrandomäne und sind an einigen Stellen *N*-glykosyliert [177]. ST8SialI und ST8SialIV gehören zu den  $\alpha$ 2,8-Sialyltransferasen, die auf einen terminalen Sialinsäurerest als Akzeptormolekül für die aktivierte Sialinsäure angewiesen sind. Daneben gibt es aber auch  $\alpha$ 2,3-Sialyltransferasen und  $\alpha$ 2,6-Sialyltransferasen, die Galaktose, *N*-Acetylglukosamin und *N*-Acetylgalaktosamin als Akzeptormolekül benötigen.

Während der Entwicklungsphase des Gehirns wird besonders viel ST8SialI im Vergleich zu ST8SialIV produziert. ST8SialIV ist hingegen im adulten Gehirn vorwiegend zu finden. Bereits in der embryonalen und postnatalen Phase ist auch ST8SialIV vorhanden. Die Konzentration nimmt danach nicht so intensiv ab wie es bei ST8SialI der Fall ist. Die Unabhängigkeit der Expression beider Polysialyltransferasen hängt damit zusammen, dass sie auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind und unterschiedliche Sequenzen der Promotorregion besitzen [178-181].

Beide Polysialyltransferasen ST8SialI und ST8SialIV zeigen eine Polysialyltransferasendomäne (PSTD) [182]. Dort befinden sich mehrere basische Aminosäuren, die die Wechselwirkung mit PolySia fördern. Diese Eigenschaft ist bei den genannten Enzymen besonders hervorzuheben, da alle anderen  $\alpha$ 2,8-Sialyltransferasen nur di- (ST8Sial, ST8SialV und ST8SialVI) bzw. oligosialylierte (ST8SialIII und ST8SialV) Glykokonjugate synthetisieren können [183, 184]. Wichtig für die Aktivität von ST8SialI und ST8SialIV sind die *N*-Glykane der Polysialyltransferasen sowie deren *N*-Glykosylierungsstellen [177]. Die Autopolysialylierung wurde dann eingestellt, wenn *N*-Glykane an bestimmten *N*-Glykosylierungsstellen der gerade erwähnten Enzyme keine terminalen Sialinsäure- und Galaktosereste besaßen oder die *N*-Glykane sogar komplett abwesend waren. Außerdem waren ST8SialI und

ST8SialIV für NCAM nicht mehr aktiv. Andere Studien haben hingegen gezeigt, dass die Enzymaktivität nach Aufhebung der Autopolysialylierungskapazität durch Deletion der N-Glykosylierungsstellen noch gering vorhanden blieb [185, 186]. Die Kettenlänge und die Anzahl der PolySia-Ketten pro N-Glykan hängen von den enzymatischen Eigenschaften der beiden Enzyme ab. *In vitro* wurde gezeigt, dass ST8SialIV Kettenlängen mit bis zu ~60 Sialinsäureresten und ST8SialII PolySia-Ketten mit bis zu ~40 Sialinsäuren herstellen kann. Dabei waren die Gesamtanzahl der synthetisierten PolySia-Ketten sowie die Anzahl der langen Ketten bei ST8SialIV eindeutig höher [187]. Die Anwesenheit beider Enzyme erhöht den Polysialylierungsgrad und erklärt damit, warum ST8SialII und ST8SialIV in der embryonalen und perinatalen Phase stärker exprimiert vorkommt [187, 188].

## 2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Forschungsarbeit bestand darin, zunächst das Vorliegen der PolySia bei murinen aber auch adulten Lungengewebe nachzuweisen. Zusätzlich sollte eine mögliche Zunahme der Polysialylierung bei den Lungenkrankheiten IPF und COPD analysiert werden. Aufbauend darauf wurde auf die nähere Lokalisierung eingegangen. Dabei waren die folgenden Aspekte von besonderem Interesse:

- Gibt es einen Zusammenhang zwischen PolySia und Lungenkrankheiten?
- Wie verändert sich die Polysialylierung bei BleoMäusen, IPF und COPD?
- Kann man mit Hilfe von Gewebeschnitten PolySia im Lungengewebe nachweisen?
- Ist eine genaue Lokalisierung der PolySia mit Hilfe von Färbemethoden möglich?
- Welche Veränderungen zeigen die beiden Polysialyltransferasen ST8SialII und ST8SialIV in BleoMäusen?

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Biologisches Material: Lungengewebe

Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt und eine sachkundige Einwilligung von allen Fachgebieten der Studie erhalten. Die in den Versuchen verwendeten menschlichen Lungenproben entstammen dem Department of Thoracic Surgery in Wien, Österreich, und wurden für die Fragestellung dieser Dissertation verwendet.

Als biologisches Material wurden außerdem Lungen von Mäusen verwendet, die mit Bleomycin behandelt wurden. Diese Proben stammen aus der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Günther, Medizinische Klinik II des Universitätsklinikums Giessen-Marburg. Die erkrankten Lungen wurden entweder bei Transplantationen durch eine Spenderlunge ersetzt oder entstammen von Donoren, bei denen eine Transplantation nicht möglich war. Die notwendigen Voten der Ethik-Kommission sind Nr. 31/93 die „Weitergabe von OP-Präparaten“, Nr. 84/93 „Biochemische, pharmakologische und morphologische Studien an bronchoalveolären Lavagen“, 29/01 „Restmengen von Blut und Gewebeproben zu Forschungszwecken“. Dabei liegen dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität die Anträge in Zweitkopie vor. Die Lungenproben wurden entweder tiefgefroren oder paraffiniert bzw. geschnitten und auf Objektträger aufgezogen gelagert. Das betraf auch das Lungengewebe von Mäusen. Die Kopie des Tierversuchsantrags nach § 8 Absatz 1 liegt dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität in Kopie vor. Die Medizinische Klinik II führte die Bleomycin-Behandlung sowie die Kontrollbehandlung durch.

### 3.2 Antikörper

#### Primärantikörper

Anti-PolySia (735)	monoklonaler Antikörper, der $\alpha$ 2,8-verknüpfte PolySia ab einer Kettenlänge von 8 Sialinsäureresten erkennt [189].
Anti-NCAM (H-28)	monoklonaler Antikörper gegen NCAM

## Sekundärantikörper

Polyklonaler Kaninchen Anti-Maus Ig HRP konjugiert (Produkt-Nr. Z02590-2)	Dako, Hamburg
Polyklonaler Kaninchen Anti-Ratte ig HRP konjugiert (Produkt-Nr. P045001-8)	Dako, Hamburg
Biotin-assoziiertes polyklonales Sekundärantikörper (Produkt-Nr. ZUCO33-008)	ZYTOMED, Berlin

## 3.3 Enzyme

EndoN

Die Endoneuraminidase N (EndoN) stammt aus einem E.coli K1 Phagen und spaltet PolySia, sodass Degradierungsprodukte mit maximal sieben Sialinsäureresten entstehen [190]. EndoN wurde uns von unserer Kooperationspartnerin Frau Prof. Rita Gerardy-Schahn von der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.

## 3.4 Primer (alle von „metabion“)

b-Micro-RT-FORW (5'-GCT ATC CAG AAA ACC CCT ,CAA-3')

b-Micro-RT-REV (5'-CAT GTC TCG ATC CCA GTA GAC GGT-3')

PBGD-RT-FORW (5'-CAA GAG TAT TCG GGG AAA CCT CAA C-3')

PBGD-RT-REV (5'-CAG GAT CGT GCA ACA CAC TCA CTA G-3')

ST8SialI A (5'-GGC TGT GGC CAG GAG ATT G-3')

ST8SialI B (5'-GGC ATA CTC CTG AAC TGG AGC C-3')

ST8SialIV A (5'-GCA CCA AGA GAC GCA ACT CAT C-3')

ST8SialIV B (5'-CAg AGC TGT TGA CAA GTG ATC TGC-3')

### 3.5 Geräte

Analysenwaage	Mettler Toledo
Blockthermostat	HLC
Blotkammer	Kreutz Labortechnik
Eismaschine AF 200	Scotsman
Elektrophoresekammern	Bio-Rad
Fluor Chem™ 8900 (UV-Gerät)	Alpha Innotech
Gefrierschränke:	
-20°C	Bosch, Liebherr
-80°C	Sanyo
HPLC	Knauer
Kühlschrank	Bosch
Magnetrührer	Hartenstein
Microplate Reader	BIO-Tek
MyiQ™ Single Color Real-Time PCR	Bio-Rad
ph-Meter	Knick
Reinstwasseranlage	Millipore
Scanner	Brother
Schüttelinkubator „Belly Dancer“	Stovall
Spannungsquelle „Power Supply“	PHARMACIA
Speedvac RC 10.22	Jouan
Spektrometer UVIKON 922	Kontron
Thermomixer	Eppendorf
Ultraschallbad	Bandelin SONOREX
Ultraschallstab „Sonifier“	Branson
Vortexer	IKA
Zentrifugen:	
-Kühlzentrifuge „Universal“	Hettich
-Tischzentrifuge	Eppendorf

### 3.6 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen (20 x 20 mm; 22 x 22 mm)	Roth
Filme	Kodak Biomax XAR

Filterpapier „Whatman-Paper“	Schleicher & Schuell
Microseal® 'B' Film	Bio-Rad
Mikrotiterplatten	Roth
Petrischalen	Greiner
Pipettenspitzen	Eppendorf
Polypropylenröhrchen	Sarstedt
Tücher (brozell; Universal Boxen «extra saugstark»)	Brod
PCR Plates, 96 wells	Bio-Rad
PVDF-Membran	GE Healthcare
Reaktionsgefäße (1,5 mL; 0,5 mL)	Eppendorf
Eindeckeln	
Dako Glycergel Mounting Medium	Dako
Immunfärbung	
ZytoChem Plus AP-Fast Red Kit Broad Spectrum	ZYTOMED
Molekulargewichtsmarker	
<i>Precision Plus Protein Standard Dual Color</i> [191] 250; 150; 100; 75; 50; 37; 25	Bio-Rad
<i>Precision Plus Protein Standard All Blue</i> [191] 250; 150; 100; 75; 50; 37; 25	Bio-Rad

### 3.7 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Sigma
Acrylamid „Rotiphorese“	Roth
Agarose	Roth
Aprotinin	Bayer
APS	Serva

Avidin	Fluka
BCA assay kit	Pierce
Blockpuffer "Roti®-Block"	Roth
BSA (bovine serum albumin)	Sigma
Chemiluminesce „SuperSignal“	Thermo
Chloroform	Promochem
Colominic Acid sodium salt ( <i>E.coli</i> )	Sigma
Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth
Dynabeads Protein A	Invitrogen
EndoN beads	Invitrogen
Eisessig	Roth
Ethanol	Merck
Glycin	Roth
Hämalaun	Roth
Iodacetamid	Fluka
Isopropanol	Merck
Kalium	Merck
Lämmli	Bio-Rad
Leupeptin	Sigma
Methanol	Merck
Natriumazid	Sigma

Natrium-Deoxycholat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriummethyldiamintetraessigsäure	Roth
Natrium-Metaperjodat	Sigma
Phenylmethylsulfonylflurid (PMSF)	Sigma
Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat	Sigma
Roticlear®	Roth
Salzsäure (HCl)	Merck
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Bio-Rad
TEMED	Roth
Trifluoressigsäure (TFA)	Pierce
Tris	Roth
Triton X-100	Sigma
Tween-20	Sigma

### 3.8 Aufarbeitung von Lungengewebe

#### Lysepuffer:

50 mM Tris/HCl; pH 8,0

150 mM NaCl

5 mM EDTA

1 % (w/v) Triton X-100

0,5 % (w/v) Natriumdeoxycholat

2 mM PMSF (Lagerung bei 4°C)

1 mM Aprotinin (Lagerung bei -20°C)

1 mM Leupeptin (Lagerung bei -20°C)

Das Lungengewebe wurde bei -80 °C bis zu seiner Verwendung gelagert. Anschließend wurde die fünffache Menge Lysepuffer an Lungengewicht bezogen auf das Gewebe gegeben und gepottert. Um alle Proteine aus dem Gewebe zu lösen, wurden die Proben bei 700 – 800 rpm zwei Stunden im Thermomixer bei 8°C und anschließend für eine Stunde in der Zentrifuge (14 000 x g; 8°C) behandelt.

Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und nun für die Proteinbestimmung, die Immunpräzipitation sowie den Enzymverdau mit anschließender SDS-Gelelektrophorese eingesetzt. Die restliche Probe wurde bei -20°C eingefroren.

### 3.9 Proteinbestimmung

BCA-Reagenz A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , Bicinchoninsäure und Natriumtartrat in 0,1 M NaOH gelöst

BCA-Reagenz B: 4% Kupfersulfat

Um alle Proben vergleichen zu können, wurde eine Proteinbestimmung mit Hilfe des BCA Protein assay kit durchgeführt. Die Standards wurden gemäß folgender Tabelle und den daraus resultierenden Konzentrationen angesetzt.

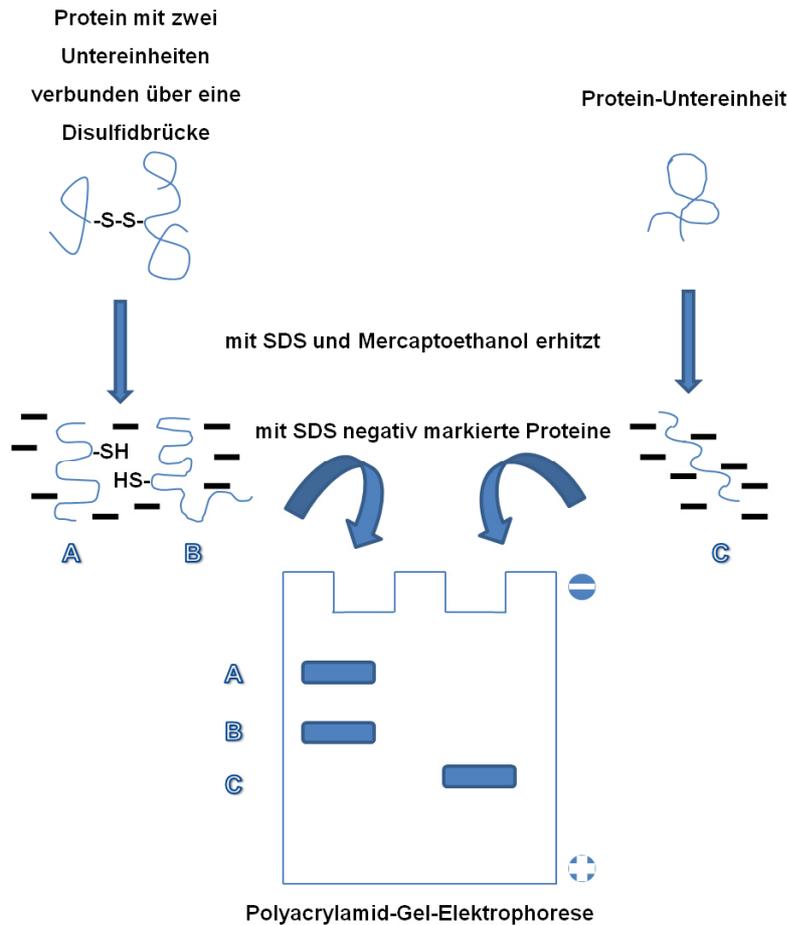
Standard	Lysepuffer [ $\mu\text{l}$ ]	BSA [ $\mu\text{l}$ ]	BSA-Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]
A	0	300	2,000
B	125	375	1,500
C	325	325	1,000
D	175	175 von B	750
E	325	325 von C	500
F	325	325 von E	250
G	325	325 von F	125
H	400	100 von G	25
I	400	0	0

**Tabelle 2: Proteinbestimmung**

Die Standardreihe von BSA wurde in verschiedenen BSA-Konzentrationen mit Lysepuffer versetzt hergestellt. Anschließend wurde ein Gemisch der Reagenzien A und B im Verhältnis 1:50 angesetzt. Pro Standard wurden zweimal 10  $\mu\text{l}$  als Doppelbestimmung in eine 96well ELISA-Platte von Roth pipettiert. In die anderen Wells wurden die Proben in unterschiedlicher Verdünnung (1:10; 1:50; 1:100) als Doppelbestimmung hinzugegeben (je 10  $\mu\text{l}$ ) und am Ende gab man zu jeder Probe 150  $\mu\text{l}$  des Protein Assay Reagenz hinzu. Die Inkubationszeit betrug fünf Minuten. Die Proteinbestimmung erfolgte dann über einen Mikrotiterplatten-Reader (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) und wurde bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen.

### 3.10 SDS-Gelelektrophorese

Ziel der Gelelektrophorese ist die Trennung von Proteinen mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Dafür wurde Polyacrylamid mit der Konzentration 7% für das Trenngel und 4% für das Sammelgel eingesetzt. Auf diese Art erreichte man, dass große Moleküle im Acrylamidnetzwerk langsamer wanderten als kleine, wenn beide die gleiche Ladung besaßen. Durch Zugabe des negativen Detergenzes SDS bekommen alle Proben die gleiche negative Ladung und wandern so im elektrischen Feld zur Anode.



**Abbildung 10: Wanderung der Proteine in der Gel-Elektrophorese**

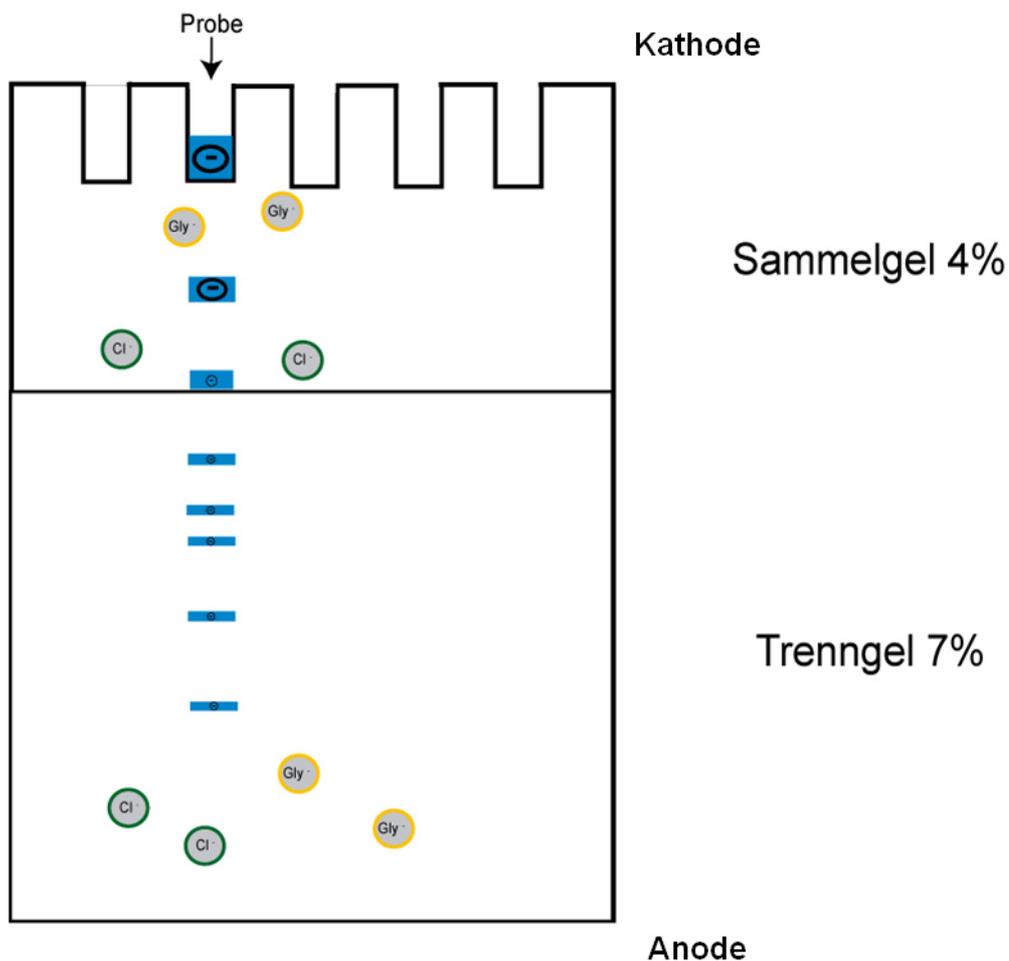
Die Proben erhalten durch Hinzufügen des negativen Detergenzes SDS die gleiche negative Ladung und wandern dann im elektrischen Feld zu der Anode.

Für die Gele wurden folgende Substanzen in den angegebenen Mengen verwendet:

	Trenngel	Sammelgel
	Volumina in ml	
H <sub>2</sub> O	5,0	3,0
30 % Acrylamidlösung	2,3	0,667
Puffer	2,5 (pH 8,8)	1,250 (pH 6,8)
10 % SDS	0,100	0,050
Ammoniumpersulfat 1:10 in Aqua dest.(APS)	0,100	0,050
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (Temed)	0,005	0,005
<b>Volumen insgesamt</b>	<b>10</b>	<b>5,0</b>

**Abbildung 11: Angleichung der Proben für die Wanderung im Gel**

Die Proben wurden entsprechend ihrer Proteinkonzentration auf den niedrigsten Wert angepasst und mit zweifach SDS-Probenpuffer (950  $\mu$ l Probenpuffer + 50  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol) versetzt. Dann wurden die Proben im Wasserbad bei 95°C für fünf Minuten gekocht und 10 Minuten lang bei 14 000 rpm zentrifugiert. Pro Geltasche wurden 10  $\mu$ l der Probe sowie 7  $\mu$ l eines Markers für die spätere Proteingrößenbestimmung aufgetragen. Die Glasplatten mit den sich darin befindlichen Gelen standen im sogenannten Laufpuffer (100mM Tris; 750 mM Glycin; 40% (v/v) SDS-Lösung). Nun wurden zwei Programme nacheinander gestartet, um die Proteine zunächst im Sammelgel zu sammeln und später im Trenngel zu separieren (Abb. 12). Programm eins zeigte 50V, 400mA und 100W an und dauerte fünfzehn Minuten. Das zweite Programm lief eine Stunde und hatte 120V, 400mA und 100W, d.h. hier wurde lediglich die Spannung erhöht, um die Proben nach der Größe aufzutrennen.



**Abbildung 12: Wanderung der Proteine im Gel**

Die Wanderung der Proteine im Gel erfolgt von der Kathode zu der Anode. Dabei werden die Proteine zunächst im Sammelgel gesammelt und die Separation erfolgt schließlich im Trenngel.

### 3.11 Western Blot (Semi Dry)

Transferpuffer:      39 mM Glycin  
                             48 mM Tris  
                             20% (v/v) Methanol

Auf dem Gel befanden sich nun die separierten Proteine und wurden im Rahmen des *semi dry* Blottens auf eine proteinbindende Membran transferiert. Dabei handelte es sich um ein Polyvinylidenfluorid (PVDF), das eine hohe Proteinbindekapazität, Reißfestigkeit sowie gutes Signal-/Hintergrundverhältnis mit Chemilumineszenz-Detektionssystem besitzt. Die Apparatur, bestehend aus zwei parallel liegenden Kohlenstoffelektroden, wurde mit Transferpuffer äquilibriert. Das gleiche wurde mit der PVDF-Membran durchgeführt, die jedoch zuvor noch in 100% Methanol und anschließend in Transferpuffer gegeben wurde. Durch Anlegen einer Spannung erfolgte der Transfer senkrecht zur Trennrichtung, sodass die separierten Proteine des Gels genau dem Muster der Membran entsprachen. Die Proteine wanderten beim Blotten von der Kathode zur Anode.

Die Schichtung sah dann folgendermaßen aus (Abb. 13): Zunächst wurden drei *Whatman*-Filterpapiere auf die mit Transferpuffer äquilibrierte Apparatur gelegt, darauf kam dann die PVDF-Membran, hierauf legte man das Gel und ganz oben schließlich nochmals drei *Whatman*-Filterpapiere. Das Programm, was jetzt für 90 Minuten luftblasenfrei lief, zeigte 50mA pro Gel, 600V und 100W. Nach dem Blotten wurde die Membran in Roti®-Block überführt und bei 4°C über Nacht blockiert.

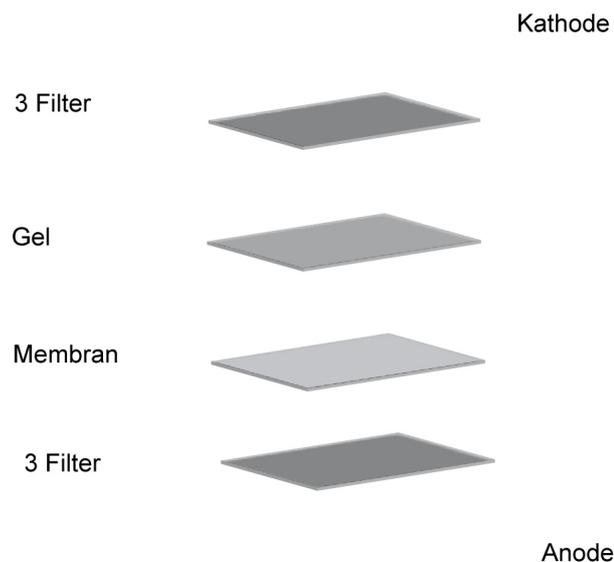


Abbildung 13: Darstellung der Schichtung für die Western Blot Apparatur

### **3.12 Immunfärbung und Entwicklung im Fotolabor**

Für die Bestimmung der Proteingröße und dem Nachweis des Proteins selbst wurde die Membran mit Antikörpern behandelt. Der Versuch begann mit drei Waschfolgen (Roti®-Block) für jeweils zehn Minuten, damit alle unspezifischen Bindungsstellen beseitigt wurden. Danach wurde der Erstantikörper (Anti-PolySia) mit einer Konzentration 1:4000 (in Blockpuffer verdünnt) bzw. Anti-NCAM (H-28) in 1:700 hinzugegeben und zwei Stunden lang bei Raumtemperatur und unter leichtem Schütteln inkubiert. Damit anschließend nur die gebundenen Antikörper an der Membran haften blieben, fanden wieder drei hintereinander folgende Waschschriffe über jeweils zehn Minuten mit Roti®-Block statt. Anschließend wurde eine Stunde lang mit dem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper (1:7500 Anti-Maus in Roti; 1:2000 anti-Ratte) inkubiert. Danach folgten noch drei Waschschriffe mit Blockpuffer von je zehn Minuten und dann zwei mit PBS-T von je zehn Minuten. Bevor die Membran entwickelt werden konnte, wurde im Verhältnis 1:1 Chemiluminescence hinzugegeben und fünf Minuten lang inkubiert. Die Entwicklung der Blots fand unter Rotlicht im Fotolabor statt. Die Membran wurde auf einen Chemiluminescence Detektions Film (Kodak) gelegt, für 5s, 10s, 30s und 1 Min belichtet und schließlich entwickelt.

### **3.13 Proteinsignal-Quantifizierung**

Die entwickelten Western Blots wurden eingescannt und die Signalintensität mit Hilfe des densitometrischen Programmes „Tina 2.0“ quantifiziert. Daraus ließ sich die Signifikanz des Proteinnachweises bestimmen.

### **3.14 Immunhistologie**

#### Verwendete Puffer:

10x PBS (8 g Di-Kaliumhydrogenphosphat; 1,3 g Kalium-Di-hydrogenphosphat; 36 g NaCl; in 500 ml Aqua Dest.)

PBS 0,1% BSA

PBS 2% BSA

### 3.14.1 Durchführung

Die Immunhistologie wurde mit bereits aufgezogenen Lungen-Paraffinschnitten von Mäuselungen aber auch IPF- und COPD-Patienten sowie Donoren durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden uns von dem Labor von Professor Andreas Günter (Medizinische Klinik II des Universitätsklinikums Giessen-Marburg) zur Verfügung gestellt. Das Gewebe wurde zunächst entparaffiniert, indem es drei Mal fünf Minuten lang in Roti®-Clear (Roth), dann für zwei Mal drei Minuten in 100% Ethanollösung, drei Minuten in 96% und noch mal drei Minuten in 70%ige Ethanollösung gegeben wurde. Der letzte Schritt des Entparaffinierens bestand aus einer Inkubationszeit von fünf Minuten in destilliertem Wasser. Zu beachten war, dass die Schnitte zwischendurch nicht austrockneten.

Für die Vorbehandlung wurden die histologischen Schnitte dreimal 10 Minuten in PBS 0,1% BSA gewaschen und anschließend eine Stunde lang in PBS 2% BSA-Pufferlösung geblockt, damit die später hinzugegebenen Antikörper nur an spezifische Stellen banden. Dazu fügte man wieder den PBS 0,1% BSA-Puffer hinzu und wusch die Schnitte für zehn Minuten. An dieser Stelle ist die Vorbehandlung abgeschlossen und die Bearbeitung der positiven und negativen Kontrollen mit Antikörpern findet getrennt statt.

Die Negativkontrollen wurden mit Colominsäure (=Col) behandelt. Diese Substanz ist Bestandteil von *E.coli* Bakterien und wird auch als *N*-Acetyl-Neuraminsäure-Polymer bezeichnet. Col interagiert zunächst mit dem Primärantikörper, sodass die Bindungsstelle für PolySia schon besetzt war und später kein Signal erscheinen konnte.

Zur Vorbereitung wurden 2 mg Colominsäure in 1990 µl PBS 0,1% BSA gelöst. Für diese Negativkontrollen wurde zu Col in PBS 0,1% BSA der Primärantikörper (735) mit einer Verdünnung von 5 µl hinzugegeben. Die Deckgläschen wurden mit Tüchern von Brod (Brozell; Universal Boxen «extra saugstark») leicht um die Probe herum abgetrocknet und auf jede Negativkontrolle wurden 80 µl von Col + AK aufgetragen. Alternativ wurde als Negativkontrolle eine spezifische Degradierung von PolySia durch Endoneuraminidase (EndoN) angewandt. Dabei wurden die PolySia-Ketten auf ein Maximum der Kettenlänge von 7 gekürzt, sodass der Primärantikörper 735, der für die Bindung an PolySia eine Mindestkettenlänge von 8 benötigt, keine Möglichkeiten mehr hatte, daran binden zu können [190]. Der Verdau von PolySia wurde bei 37°C für vier Stunden durchgeführt und man arbeitete mit einer EndoN-Konzentration von 50 µl/ml. EndoN wurde mit der Konzentration 1:10 in Tris/HCl; pH 8,0 verdünnt und davon wurde 1 µl zu der Probe gegeben.

Ab diesem Schritt beginnen die im Folgenden beschriebenen immunhistologischen Färbemethoden, denen die Behandlung mit einem Primärantikörper vorausging.

### 3.14.2 Färbemethoden

#### 3.14.2.1 Fast Red Zytochem Plus AP Kit (Streptavidin-Biotin-Methode)

##### PBS-BSA 0,1 % pH 7,4 (Waschpuffer)

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

1,4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

4,3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

0,1 % Bovines Serum Albumin (BSA) [Fraktion IV, Roth]

Die Streptavidin-Biotin-Methode wird insbesondere für die Färbung der Gewebe- und Zellantigene durch Antikörper verwendet. Dafür wird das ZytoChem-Plus AP Kit mit der Fast Red-Färbung (Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) eingesetzt.

Folgende Reagenzien sind im Kit enthalten:

Reagenz 1: Blockierlösung (gebrauchsfertig)

Reagenz 2: biotinylierter, polyvalenter Sekundärantikörper (gebrauchsfertig)

Reagenz 3: Streptavidin-Alkalische Phosphatase (AP)-Konjugat (gebrauchsfertig)

Die Lagerung der Reagenzien erfolgte bei 4°C und wurde vor Verwendung auf Raumtemperatur gebracht. Die Gewebeschnitte wurden zunächst entparaffiniert und dann rehydratisiert (3.14.2). Ein Proteinblock (Reagenz 1) über 5 min erfolgte, um eine mögliche Hintergrundfärbung durch unspezifische Antikörper-Bindung zu vermeiden. Danach wurden die Schnitte in Waschpuffer (PBS-BSA 0,1%) für 2 min unter Rotation gewaschen und anschließend mit dem Primärantikörper in PBS-BSA 2% für 30-60 min bei Raumtemperatur behandelt. Der Sekundärantikörper (Reagenz 2) wurde nach dreimaligem Waschen (jeweils über 2 min) dazugefügt und für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser nimmt eine Verbindungsfunktion zwischen dem Primärantikörper und dem Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Reagenz 3) wahr und wurde nach einem weiteren Waschschrift (PBS-BSA 0,1% Waschpuffer, 3 Mal 2 min) für 10 – 15 min bei Raumtemperatur dazugegeben. Bei diesem Schritt kommt es zu einer spezifischen Bindung zwischen Streptavidin sowie Biotin des

Sekundärantikörpers. Danach erfolgte erneut ein Waschschrift über 3 Mal 2 min, bevor die enzymatische Reaktion mit der alkalischen Phosphatase nach Zugabe einer frisch angesetzten Substrat/Chromogen-Lösung (1 FastRed-Tablette [Chromogen] wurde in einer Flasche Naphtol-Phosphat-Puffer [Substrat] aufgelöst) begann. Dort, wo zuvor die Bindung des Primärantikörpers stattgefunden hatte, zeigte sich ein leuchtend roter Farbniederschlag, der im Lichtmikroskop zu sehen war. Die Farbreaktion wurde durch Hinzugabe von destilliertem Wasser beendet. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun und der Gewebeschnitt konnte dann eingedeckt werden.

#### **3.14.2.2 EnVision<sup>®</sup> +, HRP (DAKO)**

Bei dem EnVision-System handelt es sich um eine zweistufige Färbemethode. Dabei liegt das HRP-markierte Polymer konjugiert an einen sekundären Antikörper vor. Da das markierte Polymer kein Avidin oder Biotin besitzt, kommt es zu keiner unspezifischen Färbung wegen endogener Avidin-Biotin-Aktivität.

Im Kit enthaltenes Reagenz:

Markiertes Polymer: Peroxidasemarkiertes Polymer konjugiert an Ziegen Anti-Kaninchen Immunglobuline in Tris-HCl-Puffer, das stabilisierendes Protein und eine antimikrobielle Substanz enthält

Zunächst wurden die Proben entparaffiniert (3.14.2) und dann mit dem Primärantikörper behandelt. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Peroxidase-markierten Polymer behandelt und 30 Minuten inkubiert. Danach folgte ein erneuter Waschschrift. Schließlich wurde das Substrat-Chromogen hinzugegeben, um die Probe zu bedecken. Dann folgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin und schließlich wurden die Schnitte kurz in Aqua dest. gewaschen und über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert, bevor die Gewebeschnitte permanent eingedeckt wurden.

#### **3.14.2.3 AEC-Staining Kit (Sigma)**

Diese Färbemethode basiert auf einer Peroxidasereaktion. Nach der Oxidation führt der AEC-Staining Kit zu einer rötlichen Färbung des Zielantigens bzw. der Nukleinsäuren.

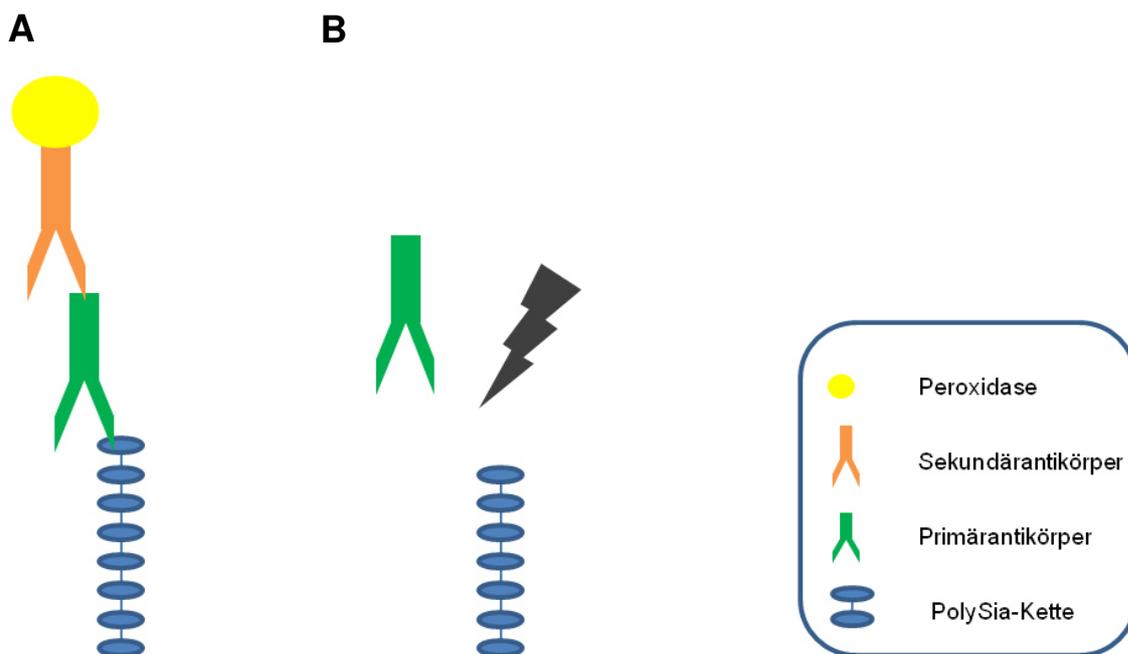
Folgende Reagenzien sind im Kit enthalten:

Reagenz 1: 0,05 mol/L Azetatpuffer bei pH 5,0

Reagenz 2: AEC Substratchromogen mit 0,75 mg/ml 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC)  
in 2,5 % N, N-Dimethylformamid

Reagenz 3: 3% Wasserstoffperoxid

Nachdem die Proben zuvor entparaffiniert und mit den Antikörpern bearbeitet wurden, kam die Färbemethode zum Einsatz. Dazu wurde die Probe zunächst in ein Pufferbad gegeben und der übriggebliebene Puffer vorsichtig von der Probe abgewischt. Anschließend wurde der Gewebeschnitt mit der gebrauchsfertigen AEC-Lösung für 5 – 30 Minuten bei Raumtemperatur bedeckt. Schließlich wurde die Substanz mit destilliertem Wasser abgespült und der Gewebeschnitt konnte eingedeckelt werden.



**Abbildung 14: Behandlung der Histoschnitte mit dem Primär- bzw. Sekundärantikörper**

(A) Antikörperbehandlung ohne EndoN-Verdau

(B) Antikörperbehandlung mit EndoN-Verdau, sodass die PolySia eine Länge von weniger 7 hat und der Primärantikörper nicht mehr daran binden kann.

### 3.14.3 Herstellung von Dauerpräparaten

Für das permanente Eindecken histologischer Gewebeschnitte gibt es die Möglichkeit, ein wässriges Eindecken, also mit wasserlöslichen Präparaten, vorzunehmen oder Intermedien wie Xylol oder Roti-Histol (Roth) einzusetzen. Ausschlaggebend hierfür ist

die Gewebeeigenschaft. Hydrophobes Gewebe wird mit dem gebrauchsfertigen Roti<sup>®</sup>-Histokit- und hydrophiles Gewebe mit Mowiol 4-88/DABCO (Roth) eingedeckt. Bei letzterem ist ein teilhydrolysiertes Polyvinylalkohol enthalten, der zusammen mit dem Antibleichmittel DABCO (1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)octan) verwendet wird. Dafür wurde ein Gemisch aus 2,4 g Mowiol und 6 g Glycerin unter Rühren für eine Stunde bei RT und nach Hinzufügen von 6 mL Aqua dest. für eine weitere Stunde bei RT hergestellt. Anschließend wurde dieser Lösung 12 mL 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5) zugegeben und für 2 h bei 50°C inkubiert. Alle 20 min wurde diese Mowiol-Lösung während der Inkubationszeit auf dem Magnetrührer gemischt und anschließend pro mL Lösung mit 25 mg DABCO versetzt. Nachdem durch mehrfaches Rühren eine klare Lösung entstand, wurde diese in Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei -20°C gelagert. Für die Benutzung eines Aliquots als Eindeckmedium wurde dieses zunächst aufgetaucht und unmittelbar auf Eis gestellt. Für die Verwendung konnte es jedoch nur 2 Mal nach dem Auftauen eingesetzt werden.

### **3.15 Quantifizierung der mRNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

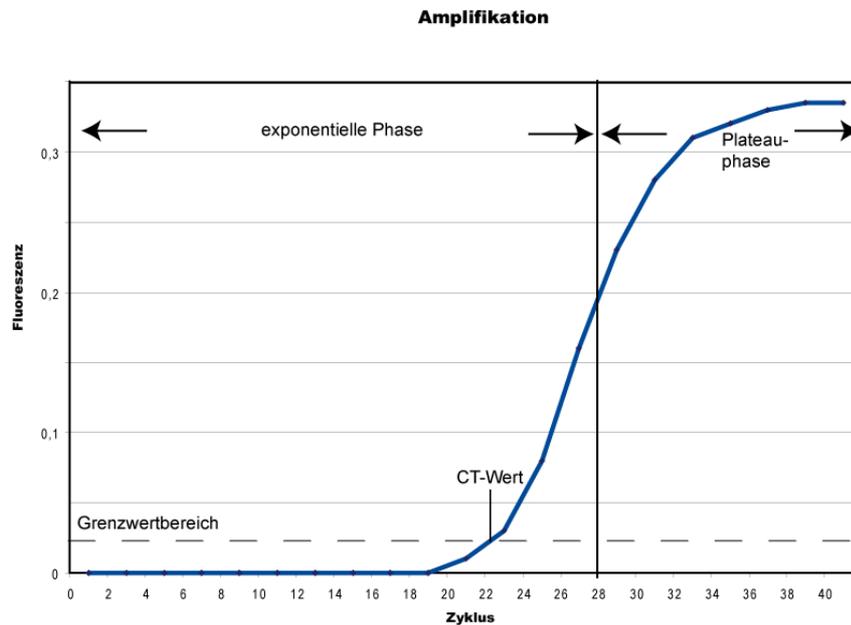
#### **3.15.1 Überblick**

Die Realtime PCR ermöglicht die Verfielfältigung des Produktes und dessen Messung während dieses Prozesses, also während der „realen Zeit“. Die Detektion der PCR-Produkte wird mit Hilfe von fluoreszierenden Molekülen durchgeführt, deren Signal proportional zu der Anzahl der DNA-Menge ist, sodass die Menge der amplifizierten Produkte pro Zyklus durch die Fluoreszenz widerspiegelt wird.

Die Realtime PCR kann sowohl qualitativ, bezogen auf die An- oder Abwesenheit von Sequenzen, sowie quantitativ, bezogen auf die Anzahl der DNA-Kopien, sein. Letztere wird auch qPCR genannt.

Für die Auswertung der PCR sind einige Details wichtig, die anhand von Abbildung 15 erläutert werden. Die Zyklusnummer wird durch die X-Achse dargestellt und die Fluoreszenzintensität durch den Y-Achsenabschnitt. In Abb. 15 sind zwei Phasen zu erkennen: eine exponentielle und eine nichtexponentielle Plateauphase. Während der exponentiellen Phase verdoppelt sich die Menge des PCR-Produktes annäherungsweise in jedem Zyklus. Sobald die Reaktion fortschreitet, werden einzelne Reaktionskomponenten verbraucht, sodass diese Substanzen als Limitierungsfaktoren

betrachtet werden. An dieser Stelle nimmt die Reaktion ab und die Plateauphase beginnt (Zyklus 28-40).



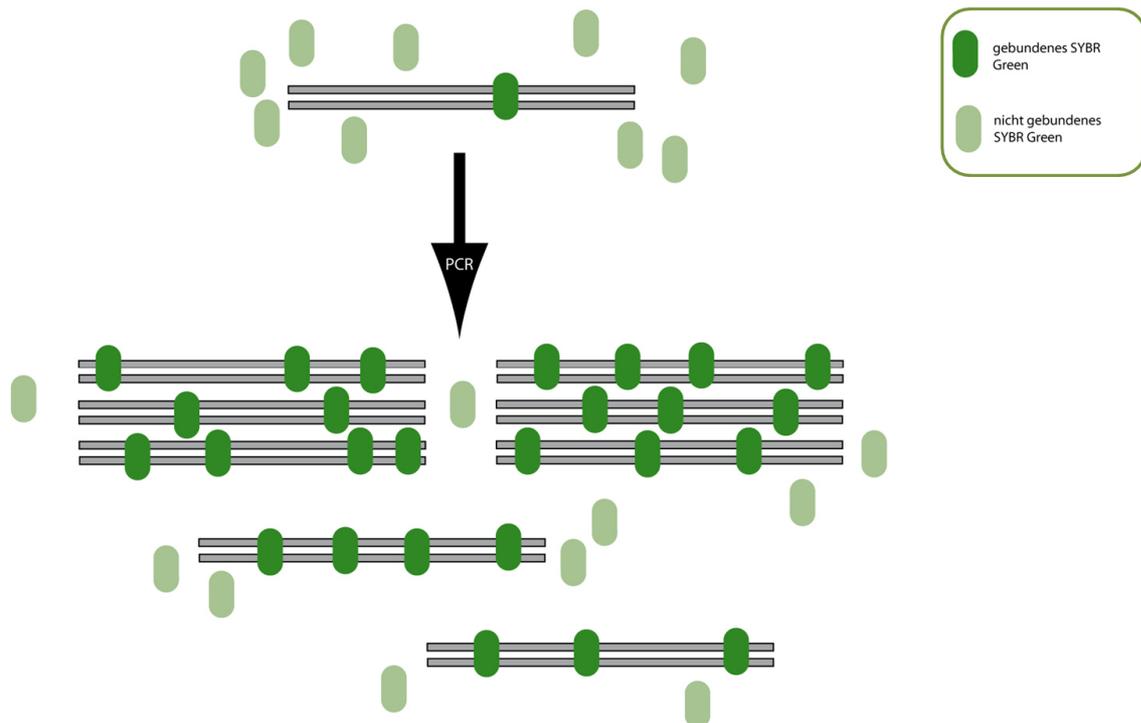
**Abbildung 15: Amplifikationskurve**

Um immer am Anfang der exponentiellen Phase messen zu können, wird häufig der CT-Wert (engl. *Cycle Threshold* für Schwellenwert-Zyklus) bzw. der Cp-Wert (engl. *Crossing Point*) verwendet, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Der CT-Wert hängt insbesondere von der Menge an Probe ab, die zur Verfügung steht. Wenn eine große Probe beim Reaktionsstart vorhanden ist, werden weniger Amplifikationszyklen benötigt, um ein fluoreszierendes Signal zu erhalten als bei einer kleinen Menge. Dementsprechend ist der CT-Wert geringer oder zeigt sich früher im Vergleich zu kleinen Probenumfängen.

### 3.15.2 Durchführung

Für die Quantifizierung der mRNA wurden die Proben mit dem Photometer auf 15 ng/μl angepasst, um vergleichbare Werte zu erhalten. Im nächsten Schritt wurden die Proben (1:10 verdünnt) mit einem Master-Mix in eine 96-Well-Platte pipettiert. Der Master-Mix setzte sich zusammen aus 240 μl BIORAD SYBR Green Mix (DNA-Polymerase; dNTPs, SYBR Green), 12 μl Forwardprimer 10 pmol/μl, 12 μl Reverseprimer sowie 192 μl Aqua dest. Das Besondere an SYBR Green ist, dass es

fluoresziert, sobald es an eine doppelsträngige DNA bindet. Wenn die DNA denaturiert, wird das SYBR Green freigesetzt und die Fluoreszenz nimmt dramatisch ab. Während der Vermehrung lagern sich die Primer an und das PCR-Produkt entsteht. Sobald die Polymerisation beendet ist, lagert sich SYBR Green an die doppelsträngigen Produkte, sodass die Fluoreszenz wieder zunimmt und detektiert werden kann.



**Abbildung 16: DNA-bindendes SYBR Green**

Als Primer wurden sogenannte Hausgene (*housekeeping gene*) verwendet. Darunter werden nicht-regulierte Gene verstanden, die unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert werden und eine Alternative zu den regulierten Genen darstellen. Als *Housekeeping* Gene werden zum einen Aktin,  $\beta$ -Micro sowie PBGD verwendet, die zur Kontrolle dienen. Die zu untersuchenden Gene ST8SialI und ST8SialIV wurden in jeweils einem neuen Master Mix hinzugegeben. In jedes *Well* wurden 19  $\mu$ l eines Master Mixes und 1  $\mu$ l der Probe pipettiert bevor die eigentliche *Realtime* PCR stattfinden konnte. Zusätzlich wurde noch einmal Aktin mit mRNA und jeweils ein Master Mix ohne Probe zur Überprüfung in ein *Well* gegeben. Die 96-Well-Platte wurde dann mit einem Aufkleber oben zugeklebt. Nun wurden die Proben zentrifugiert und die PCR konnte beginnen. Die Proben wurden dabei für 3 min bei 95°C erhitzt, dann 40 Zyklen in 15 s bei 95°C denaturiert und 30 s bei 58°C annealiert. Am Ende fand für 10 s die Schmelzkurvenanalyse statt. Mit dieser konnten die

Fragmentlänge (n) und die Spezifität bestimmt werden. Dabei wurde die DNA aufgeschmolzen, indem die Temperatur kontinuierlich erhöht wurde (50°C bis 95°C). Der Doppelstrang denaturiert bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur zu zwei einzelsträngigen Molekülen, sodass der Fluoreszenzfarbstoff (*SYBR Green*) freigesetzt und dies als Fluoreszenzabnahme registriert wurde. Die Unterscheidung ist dadurch möglich, dass die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere, sodass die Höhe des Peaks der Schmelzkurve Informationen über die Menge des gebildeten Fragments lieferte. Für die relative Quantifizierung wurde eine interne Kontrolle benötigt.

Nach der Realtime PCR konnten die Werte mit Excel in eine Grafik gebracht und anhand der Ergebnisse analysiert werden. Von besonderer Bedeutung waren hierbei die Werte der *Housekeeping* Gene, anhand derer der  $\Delta CT$  (Mittelwert der Hausgene minus Wert des gesuchten Gens) sowie der  $\Delta\Delta CT$  ( $\Delta CT$  minus Mittelwert der  $\Delta CT$ -Werte) bestimmt werden und in einem Diagramm (gesuchtes Enzym bezogen auf dessen Mittelwert der  $\Delta\Delta CT$ ) dargestellt werden konnten.

### 3.15.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die bei der PCR entstandenen Produkte können alternativ zur Computerauswertung mit einem 2%igen Agarose-Gel überprüft werden. Dabei gilt, dass je höher die Agarose konzentriert ist, desto kleiner sind die Poren im Gel. Hierzu wurden 4g Agarose in 200 ml 1 Mal TAE-Puffer gegeben, in der Mikrowelle aufgeköcht und solange gewartet bis es abgekühlt war. Dann wurden 5  $\mu$ l Ethidiumbromid (0,5 mg/ml) hinzugegeben, das sequenzunspezifisch zwischen die Basen der DNA (bis zu 3 Moleküle je 10 Basen) interkaliert, und die Agarose luftblasenfrei in die Gelkammer gegossen wurde. Zusätzlich wurden noch Kämme zum Pipettieren der Proben in die Apparatur gesteckt. Bevor die PCR-Proben auf das Gel aufgetragen werden konnten, mussten die Ladungen der Proben mit einem SDS-Puffer angeglichen werden. Zusätzlich wurde auf das Gel ein Längenstandard zur Kontrolle der Größe der DNA-Fragmente mitgeführt.

Beim Anlegen eines elektrischen Feldes wanderten die aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladenen DNA-Fragmente durch die Gelmatrix zur positiv geladenen Anode. Die Laufbedingung war 100V. Mit dem „Siebeffekt“, der Auftrennung nach der Größe, konnten kleinere DNA-Moleküle sich schneller durch die Poren des Gels bewegen.

Nach Beendigung des Gellaufs konnten DNA-Fragmente ab ca. 5 ng im Gel mittels eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht und abfotografiert werden. Stellen im

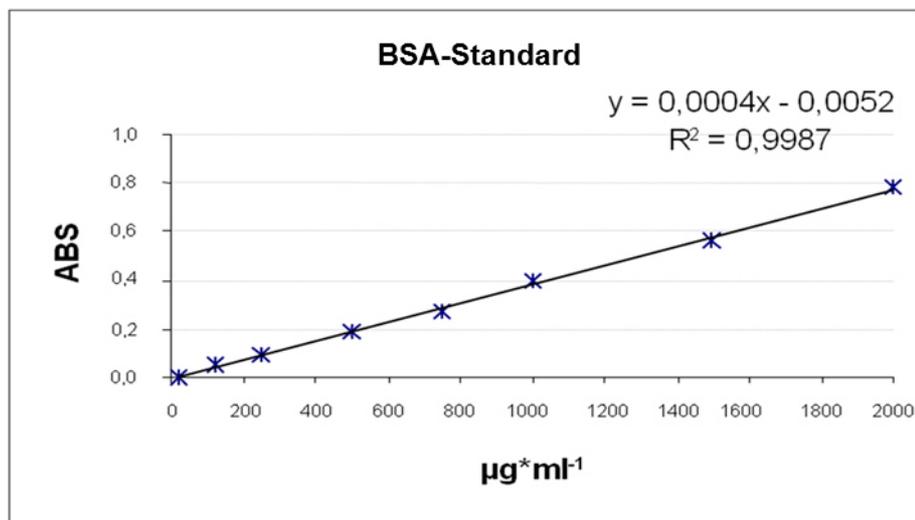
Agarose-Gel, an denen sich Nukleinsäuren befanden, leuchteten hell, wobei die Lichtintensität dabei proportional zur vorliegenden DNA-Konzentration (bei gleicher Fragmentlänge) und zur Länge der Nukleinsäure war.

## 4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit beschäftigte ich mich mit dem Vorliegen von PolySia in murinem sowie menschlichem Lungengewebe. Zunächst setzte ich mich mit der Frage auseinander, ob generell PolySia in adultem Lungengewebe vorkommt. Bisher wurde die Exprimierung von PolySia während der Lungenentwicklung beschrieben [192]. In der ausdifferenzierten Lunge hingegen bestand noch kein Nachweis von PolySia. Folglich ergab sich die Möglichkeit, eine Analyse hinsichtlich des Vorkommens der PolySia auch in ausdifferenziertem Lungengewebe vorzunehmen.

### 4.1 Proteinbestimmung

Für den Nachweis von PolySia wurde Lungengewebe mit Hilfe der Gelelektrophorese und dem Western Blot analysiert. Es kamen mehrere unterschiedliche Proben zum Einsatz, damit ein Vergleich sowohl bei dem pathologischen als auch gesunden Gewebe in Bezug auf die Menge an PolySia möglich war. Die Voraussetzung hierfür bestand darin, dass alle Proben die gleiche Proteinmenge beinhalteten, damit am Ende bei der Auswertung eine sinnvolle Größe zum Vergleichen der Menge an PolySia herauskommt.



**Abbildung 17: Kalibriergerade einer Proteinbestimmung**

Tiefgefrorene Lungenproben wurden mit Lysepuffer versetzt und mit der Ultraschallsonde homogenisiert. Unlösliche Bestandteile wurden anschließend abzentrifugiert. Für die Proteinbestimmung wurde der *BCA assay kit* verwendet. Dabei wurden die Konzentrationen des Standards und der Proben im *Micro Plate Reader* bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen und danach per Standardreihe ausgewertet.

Die Kalibriergerade zeigt die optische Dichte bezogen auf das Gewicht pro Volumen. Die gemessenen Punkte liegen auf der durch sie hindurchgehenden Gerade und der Korrelationskoeffizient zeigt, dass keine signifikante Abweichung vorliegt. Mit Hilfe dieser BCA-Methode wurde gewährleistet, dass bei allen Versuchen eine identische Proteinmenge vorhanden war. Erst danach wurden die Gelelektrophorese und der Western Blot für den Nachweis von PolySia durchgeführt.

## **4.2 PolySia im Lungengewebe von unbehandelten und mit Bleomycin-behandelten Mäusen**

Das Polysaccharid PolySia wurde als Regulator von Zell-Zell-Interaktionen bereits vielfältig im Hinblick auf die Entwicklung des Nervensystems und als Schlüsselement der synaptischen Plastizität beschrieben und erforscht. Dabei werden auch die beiden Polysialyltransferasen ST8SialI und ST8SialIV hochreguliert [193, 194]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte überprüft werden, ob PolySia generell in der ausdifferenzierten Lunge vorkommt und ob pathologische Bedingungen einen Einfluss auf die PolySia-Expression haben.

Als pathologisches Modell wurde das Bleomycin-Mausmodell eingesetzt, welches eine inflammatorisch getriggerte Fibrose in der Lunge auslöst. Das Zytostatikum Bleomycin beeinflusst verschiedene Phasen des Teilungszyklus und hat eine Halbwertszeit von ungefähr drei Stunden [195]. Eine der Hauptnebenwirkungen ist die Fibrosierung durch die Aktivierung des Inflammasoms, die insbesondere in der Lunge eine wichtige Rolle spielt. Da die Lunge nur wenig Hydrolase, welches ein Bleomycin inaktivierendes Enzym darstellt, produziert, ist dieses Organ besonders von dem Gewebeumbauprozess nach Bleomycin-Behandlung betroffen. Zunächst wandern vermehrt Leukozyten ein und führen zu einem ARDS (*acute respiratory distress syndrom*) und darüber zu fibroproliferativen Umbauprozessen. Die dadurch zunehmende Kollagenkonzentration zeigt zunächst eine Progression mit anschließendem Rücklauf der Fibrosierung, sodass es sich bei dem Bleomycin-Mausmodell um eine reversible Fibrosierung handelt [195].

### **4.2.1 Western Blot Analysen von murinen Lungengewebe**

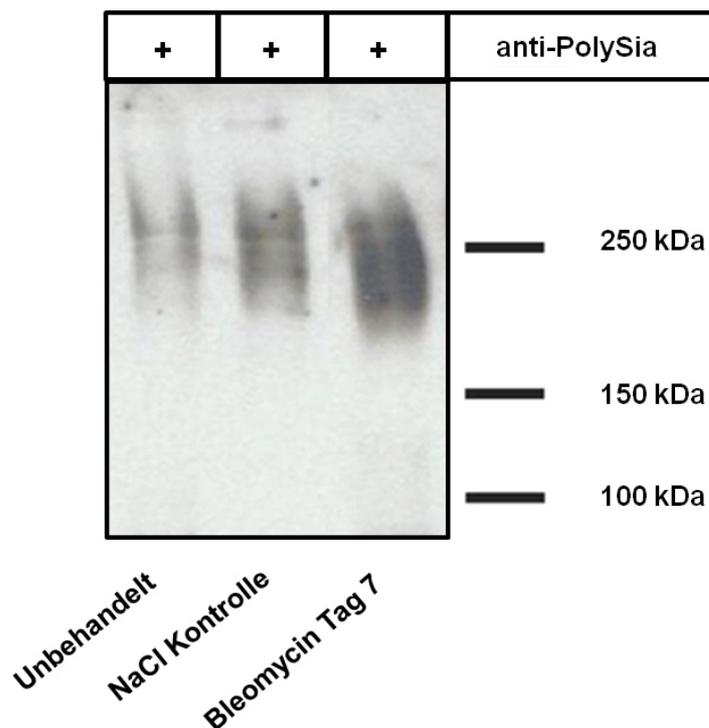
Für die Western Blot Analyse wurden unbehandelte Lungen sowie mit NaCl- oder Bleomycin-behandelte Mäuselungen eingesetzt. Dabei sollte zunächst untersucht werden, ob grundsätzlich PolySia in der unbehandelten Lunge vorkommt, nachdem

bereits während der Lungenentwicklung PolySia nachgewiesen werden konnte. In einem weiteren Schritt sollte dann analysiert werden, inwieweit fibrotische Veränderungen die PolySia-Expression beeinflussen.

Die mit NaCl-behandelten Lungenproben dienten zur Kontrolle, da es nach NaCl-Behandlung zu einer geringen Reizung der Lunge ohne fibrotische Umbauprozesse kommt.

Der Nachweis von PolySia in Mauslungen wurde mit Hilfe der Western Blot-Methode nach SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Proben wurden dafür einmal unbehandelt sowie nach NaCl-Bearbeitung und Bleomycin-Behandlung auf das SDS-Gel aufgetragen (Abb. 18). Dieses setzte sich zusammen aus Polyacrylamid mit der Konzentration von 7% für das Trenngel und 4% für das Sammelgel. In jede Geltasche wurden 10 µg Gesamtprotein des Gewebehomogenats aufgetragen.

Mit dem monoklonalen anti-PolySia-Antikörper (mAk) und einem Sekundärantikörper wurde die Färbung vorgenommen und anschließend mittels Chemilumineszenz entwickelt.

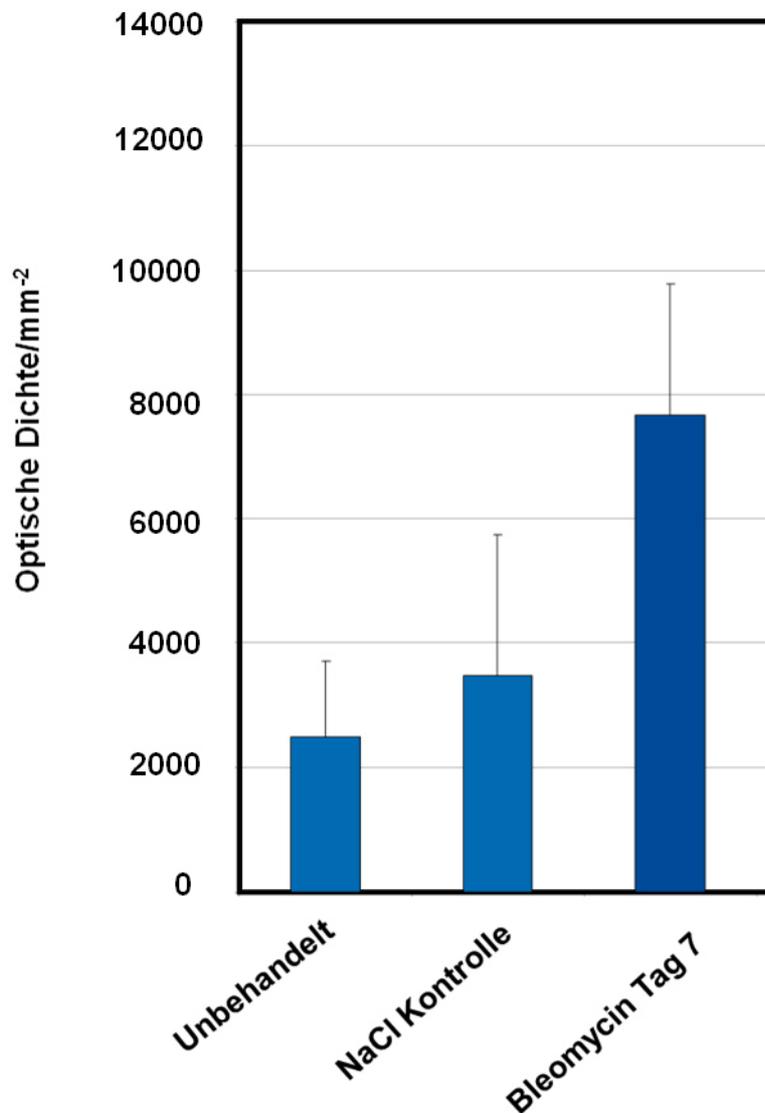


**Abbildung 18: Detektion von PolySia in murinem Lungengewebe**

Mäuselungen wurden nach Lysierung und Homogenisierung auf ein SDS-Gel (7% Trenngel, 4% Sammelgel) aufgetragen (je 10 µg) und für Western Blot Analysen gegen PolySia verwendet. Anschließend erfolgte die Behandlung mit dem anti-PolySia-mAk 735.

Abbildung 18 zeigt drei Lungenproben von Mäusen, die verschiedene Behandlungszustände aufweisen. Die unbehandelte Probe wies PolySia auf, obwohl man bisher davon ausging, dass PolySia in der ausdifferenzierten Lunge nicht mehr exprimiert wird. Dabei waren die Banden nicht fokussiert, sondern wiesen, typisch für PolySia-Träger, ein diffuses Immunsignal auf. Dieses Phänomen lässt sich so erklären, dass die unterschiedliche Größe der PolySia-Kette die elektrische Ladung beeinflusst und damit auch die Wanderungsgeschwindigkeit verändert. Bei der NaCl-Kontrolle wurde eine Steigerung des PolySia-Signals nachgewiesen. Die Mauslunge nach Bleomycin-Behandlung wies im Vergleich zu den NaCl-behandelten Tieren ein noch stärkeres Signal auf. Mit dieser Beobachtung wird deutlich, dass es zu einer Zunahme der PolySia in Bleo-Mäusen kam, sodass sich während des fibrotischen Umbauvorgangs in der Mauslunge der Polysialylierungsstatus verändert.

Der Pathomechanismus in der Lunge führte dementsprechend zu einer veränderten Menge an PolySia, welche im nächsten Schritt berechnet wurde. Bei der Analyse der Signalintensität ging es darum, die Zunahme des Polysialylierungsgrades im Vergleich zu unbehandelten Mauslungen vorzunehmen, um konkrete Aussagen zu der PolySia-Menge treffen zu können. Dafür wurde von insgesamt vier Western Blots die optische Dichte der Immunsignale bestimmt (Abb. 19). Auch die Menge an mit NaCl behandeltem Lungengewebe wurde ausgewertet und anhand des Wertes mit dem von unbehandelten sowie Bleomycin behandeltem Lungengewebe verglichen.



**Abbildung 19: Auswertung der Signalintensität mit dem Programm „Tina 2.0“**

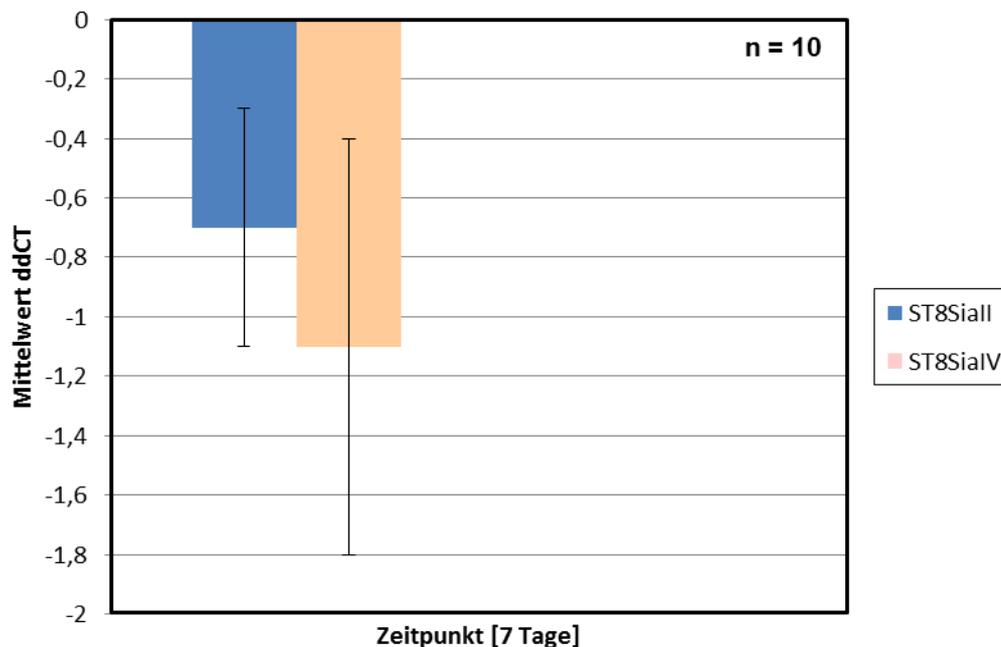
Die Signalintensität von PolySia wurde auf der Grundlage von vier Western Blots analysiert. Für die Analyse wurde die optische Dichte mit dem Programm „Tina 2.0“ ausgewertet.

Die Auswertung der Menge an PolySia mit Hilfe von Western Blots macht deutlich (Abb. 19), dass eine Veränderung des Polysialylierungsgrades je nach Vorbehandlung des Lungengewebes eintrat. Nach Behandlung mit NaCl kommt es zu einem Anstieg der Signalintensität vergleichend zu den anderen beiden Ergebnissen. Die optische Dichte bei mit Bleomycin behandelten Mäuselungen zeigte die stärkste Zunahme des Polysialylierungsgrades.

#### 4.2.2 PCR-Analysen von murinen Lungengewebe

Aufbauend auf den Western-Blot Analysen sollte nun untersucht werden, ob die Polysialyltransferasen in der Lunge generell exprimiert werden und ob im Rahmen der verstärkten Expression von PolySia in fibrotischem Gewebe die Exprimierung von ST8SialII und ST8SialIV beeinflusst wird. Beide Polysialyltransferasen werden während der Entwicklung des Nervensystems fast kontinuierlich exprimiert und sind Schlüsselemente bei der Neuronenausbildung sowie synaptischen Plastizität.

Die Genexpression der beiden Polysialyltransferasen wurde mit der *realtime* PCR-Methode an unbehandelten und BleoMäusen untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 20 dargestellt und bezieht sich auf unbehandelte Lungenproben, sodass der Referenzwert „0“ beträgt.



**Abbildung 20: Expressionsanalysen der PolySialyltransferasen ST8SialII und IV in unbehandelten sowie Bleomycin behandelten Mäuselungen**

Die Expressionsniveaus von ST8SialII und ST8SialIV wurden zwischen unbehandelten und Bleomycin-behandelten Tieren in Bezug gesetzt. Dabei steht der blaue Balken für die Polysialyltransferase ST8SialII und der cremefarbene Balken für ST8SialIV. Die mRNAs wurden von Lungengewebe bei unbehandelten Tieren und bei Mäusen entnommen, nachdem diese mit Bleomycin behandelt worden waren. Es wurden 10 Replikate erstellt.

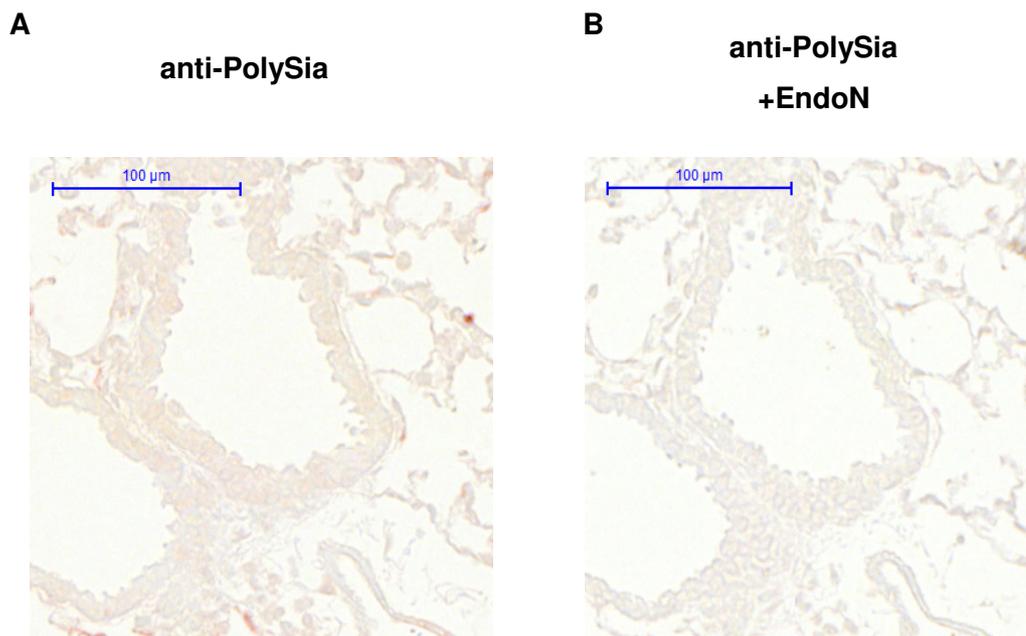
In Abbildung 20 wird die Exprimierung der beiden Polysialyltransferasen ST8SialII und ST8SialIV dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass beide Polysialyltransferasen grundsätzlich in Mäuselungen vorkommen. Nach einer Behandlung der Mäuselungen

mit Bleomycin über 7 Tage zeigte sich keine signifikante Veränderung der Regulierung beider Transferasen. Die Ergebnisse lassen aber vermuten, dass es tendenziell zu einer Abnahme der Exprimierung und damit einer Herunterregulierung kam. Die PCR-Analyse wurde durchgeführt, um eine Veränderung bei Transferasen in fibrotischem Gewebe zu überprüfen.

### **4.2.3 Immunhistologie von Mäuselungen**

Nachdem im Western Blot PolySia in unbehandelten Tieren nachgewiesen wurde und es zu einer Steigerung auf Glykoproteinebene nach Bleomycin-Behandlung kam, sollte im nächsten Schritt im Lungengewebe von Mäusen eine nähere Lokalisierung der PolySia vorgenommen werden. Dazu wurde die Immunhistologiemethode angewandt. Zunächst wurden serielle Lungenschnitte von Mäuselungen angefertigt. Anschließend erfolgte die Entparaffinisierung, bevor jeweils ein Serienschnitt vor der Behandlung mit dem mAk gegen PolySia inkubiert wurde, während der darauffolgende Schnitt mit EndoN behandelt wurde. EndoN wurde verwendet, um die Spezifität der Immunfärbung gegen PolySia zu überprüfen. EndoN degradiert PolySia in Ketten von maximal sieben Sialinsäuren, sodass der spezifische Antikörper mAk 735 nicht mehr an die Sialinsäureketten binden kann, da dieser eine minimale Kettenlänge von acht Sialinsäureresten für eine Interaktion benötigt [190]. Dementsprechend ist der mAk nicht mehr in der Lage, PolySia nach EndoN-Verdau zu detektieren.

Nach Zugabe eines Sekundärantikörpers sowie einer Peroxidase zur Visualisierung des gebundenen Antikörpers konnten die Schnitte unter dem Mikroskop ausgewertet werden (Abb. 21).

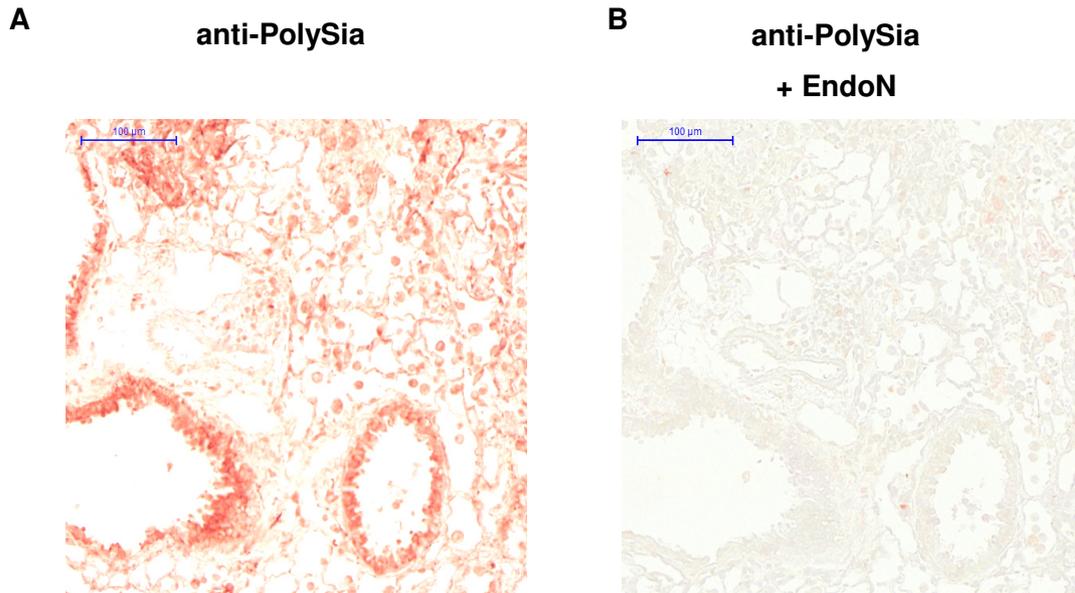


**Abbildung 21: Immunhistologische Lokalisierung von PolySia im unbehandelten Lungengewebe**  
**Färbemethode: AEC-Staining-Kit Sigma**

Parafinschnitte von unbehandeltem murinen Lungengewebe wurde zunächst entparaffiniert und dann mit einem Primärantikörper gegen PolySia behandelt. Dabei wurde Schnitt A ohne Enzymverdau und Histoschnitt B mit Enzymverdau durchgeführt. Der enzymatische Verdau mit dem Enzym EndoN diente zur Negativkontrolle und wurde im Rahmen dieser Arbeit immer als Negativkontrolle eingesetzt. Um den Immunkomplex sichtbar zu machen, wurde Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper eingesetzt.

Im unbehandelten Lungengewebe von Mäusen (Abb. 21) war nahezu kein Unterschied in der Signalintensität von PolySia zwischen Positiv- und Negativkontrolle nachweisbar. Weder der histologische Schnitt mit anti-PolySia-Behandlung (A) noch nach Enzymverdau (B) ließen sich spezielle Bereiche des Lungengewebes deutlich hervorheben.

Nachdem sich in unbehandelten Mauslungen keine Anfärbungen ergaben, wurden die mit Bleomycin behandelten Mäuselungen immunhistologisch aufgearbeitet. Dabei wurde nach dem Protokoll zur Aufarbeitung von Paraffinschnitten vorgegangen. In Abbildung 22 wurden die Schnitte in A mit Anti-PolySia (A) und in B als Negativkontrolle mit EndoN behandelt.



**Abbildung 22: Immunhistochemische Analyse einer Mauslunge nach Behandlung mit Bleomycin**

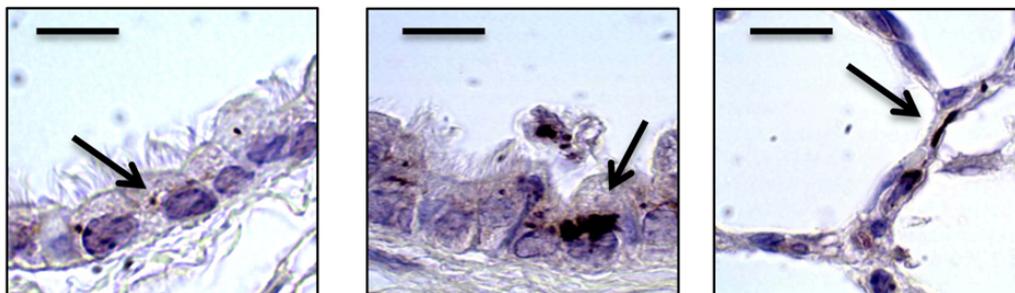
**Färbemethode: AEC Staining-Kit Sigma**

Die mit Bleomycin behandelten Mäuselungen wurden entparaffiniert. In A erfolgte kein Enzymverdau, in B hingegen wurde EndoN vor der Erstantikörperbehandlung hinzugegeben und stellt damit die Negativkontrolle dar.

Für die immunhistochemische Aufarbeitung wurde wiederum die AEC Staining Kit Färbemethode verwendet (Abb. 22). Die Histoschnitte zeigten ein deutliches PolySia-Signal nach Behandlung mit dem mAk 735 (A). Das bestätigt die Ergebnisse der Western Blot-Analyse und die Zunahme der PolySia-Menge gemessen anhand der optischen Dichte. Die Negativkontrolle (B) wies kein positives PolySia-Signal auf.

Nach zahlreichen Durchführungen der Immunhistochemie mit dem AEC-Staining Kit fiel auf, dass die Färbungen sehr unscharf ausfielen und genaue zelluläre Lokalisierungen nur schwer möglich waren. Aus diesem Grund wurde in den folgenden immunhistologischen Versuchen das EnVision-System eingesetzt.

**A Bronchialzellen    B Bronchialzellen    C Alveolarzellen**



**Abbildung 23: Immunhistochemie von Mauslungen vor und nach nach Bleomycin-Behandlung; Maßstab 10 µm  
Färbemethode: EnVision®**

Die Gewebeschnitte von Mäuselungen (A) vor und (B und C) nach Bleomycin-Behandlung wurden zunächst entparaffiniert und anschließend mit dem PolySia mAK behandelt. Im nächsten Schritt wurde der Sekundärantikörper hinzugegeben und die Bindungsstellen sichtbar gemacht. In A und B sind Vergrößerungen eines bronchialen Bereiches dargestellt, während in C eine Vergrößerung im alveolären Abschnitt einer mit Bleomycin behandelten Lunge abgebildet ist.

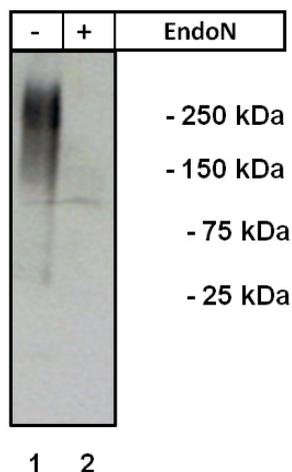
Die EnVision®-Färbemethode zeigte auch bei unbehandelten Tieren PolySia (Abb. 23). Diese Signale waren eindeutiger abgrenzbar gegenüber anderen Gewebebestandteilen. Das PolySia-Signal konzentriert sich in allen drei Darstellungen auf intrazelluläre Bereiche von Epithelregionen. Dabei konnte einmal ein deutliches Signal bei Bronchialzellen sowie bei behandelten Tieren auch in alveolären Bereichen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse beweisen damit, dass PolySia in ausdifferenzierten Lungen intrazellulär in bronchialen Epithelzellen vorkommt und nach Bleomycin-Behandlung auch in alveolaren Bereichen PolySia detektierbar war.

Nach diesem Nachweis stellte sich nun die Frage, ob Entzündungen oder fibrotische Prozesse auch im Menschen einen Einfluss auf die Polysialylierung haben bzw. bei Krankheiten mit diesen pathologischen Auswirkungen ebenfalls die Expression von PolySia beeinträchtigt wird. Deswegen wurden im nächsten Schritt Lungenproben von an IPF- und COPD-erkrankten Patienten analysiert und mit Lungen von Donoren verglichen, da beide Krankheiten je einen vergleichbaren Pathomechanismus des Bleomycin-Modells aufweisen. Dabei standen die Fibrosierung bei IPF-Patienten und inflammatorische Prozesse bei COPD-Patienten im Fokus meines Interesses.

### 4.3 Analyse der PolySia in humanen Lungengewebe

#### 4.3.1 Humanes Lungengewebe von Donoren

Beim Menschen sollte zunächst geklärt werden, ob PolySia grundsätzlich im adulten Lungengewebe vorkommt. Dabei stellte sich die Frage, ob PolySia auch in der ausgereiften Lunge vorliegt. Dazu wurde zunächst Donor-Lungengewebe aufgearbeitet und lysiert.



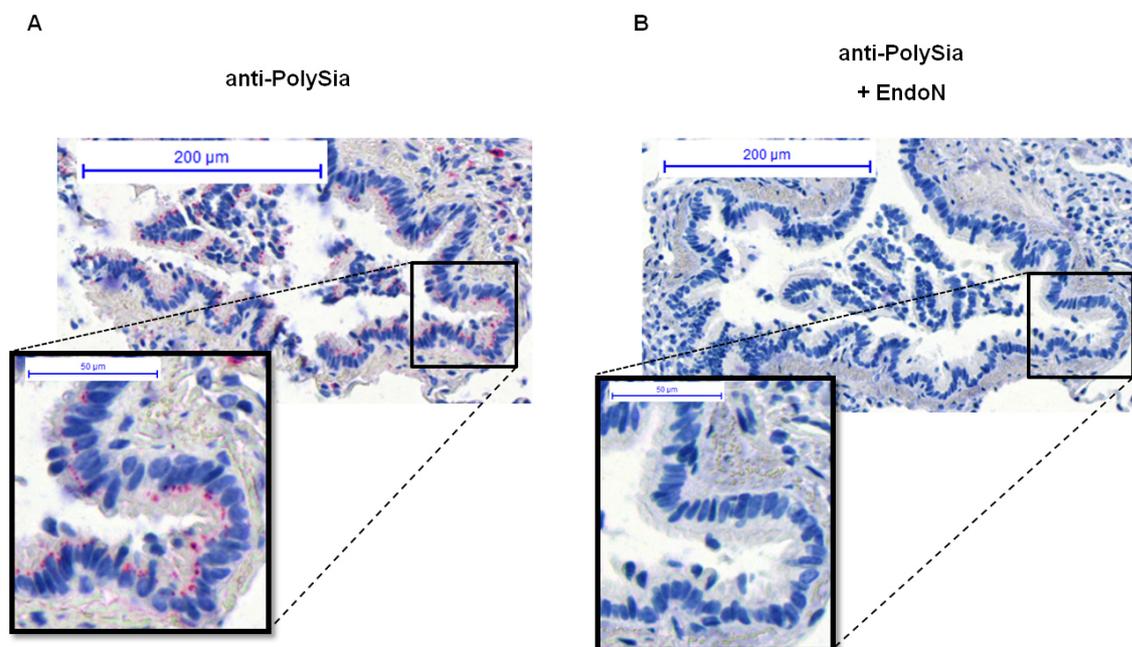
**Abbildung 24: Western Blot von humanem Lungengewebe**

Für die Detektion von polysialylierten Proteinen wurde nach einer SDS-Gelelektrophorese eine Western Blot-Analyse mit dem mAk 735 durchgeführt. Pro Spur wurden hierfür 10 µg Gesamtprotein von humanen Lungenlysaten aufgetragen. Der enzymatische Verdau mit dem Enzym EndoN diente zur Negativkontrolle.

Die aus dem Donor-Lungengewebe gewonnenen Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und danach mit der Western Blot-Analyse untersucht. Die Bande in Spur 1 der Abbildung 24 stellt einen für PolySia typischen, schmierigen Charakter [196] dar. Der Western Blot fiel dementsprechend positiv für den Nachweis von PolySia aus und beweist damit erstmalig das Vorkommen von PolySia in reifem humanem Lungengewebe. Die Negativkontrolle hingegen (Spur 2), die durch enzymatischen Verdau hergestellt wurde, zeigt keine Bande, sodass die Spezifität des monoklonalen Antikörpers für PolySia verifiziert ist. Damit ist nachgewiesen, dass PolySia grundsätzlich in reifem Lungengewebe vorliegt.

### 4.3.2 Immunhistologie von Donoren

Nach dem Nachweis von PolySia im adulten Lungengewebe mittels Western Blot Analysen stellte sich nun die Frage, wo PolySia im humanen Lungengewebe lokalisiert ist. Dafür wurde wiederum die Immunhistologie eingesetzt. Die seriellen Lungenschnitte wurden im Abstand von 3 – 5  $\mu\text{m}$  zueinander angefertigt, wobei jeweils ein Schnitt mit anti-PolySia und der andere mit EndoN behandelt wurden. Anschließend erfolgte nach Behandlung mit einem Sekundärantikörper die Färbung mit der Fast Red-Methode. Nach ersten Versuchen mit der EnVision-Färbetechnik fiel auf, dass die resultierende braune Farbe der Enzymreaktion nur schwer von Teerrückständen zu unterscheiden war. Deswegen wurde in den nachfolgenden immunhistologischen Analysen von humanen Lungen die Fast Red Färbemethode eingesetzt.



**Abbildung 25: Lokalisation von PolySia im gesunden Lungengewebe**  
**Färbemethode: ZyoChemPlus (AP) Anti-Rabbit (Fast Red) Kit**

Seriell-erstellte humane Lungenschnitte wurden einmal (A) ohne Enzym- und einmal (B) mit dem Enzym EndoN behandelt. Anschließend wurden die Lungenschnitte mit einem Primär-(anti-PolySia mAk) und Sekundärantikörper behandelt, bevor sie nach dem Fast Red-Verfahren angefärbt wurden.

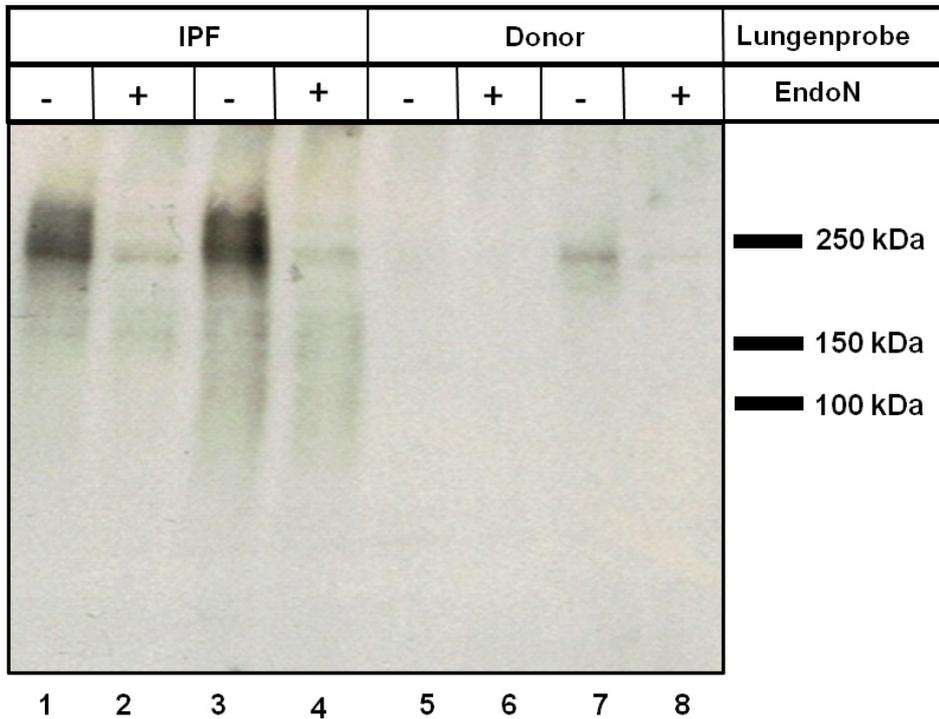
In Abbildung 25 werden gesunde Histoschnitte dargestellt. Dabei zielt die Färbung auf die Sichtbarkeit von PolySia mit Hilfe der Fast Red Färbemethode. Es wird deutlich, dass in A insbesondere bronchiale Epithelbereiche ein rötliches Signal zeigen, welches

in B nicht zum Vorschein tritt. Damit wurde nachgewiesen, dass die PolySia vor allem fokussiert intrazellulär im bronchialen Epithelbereich auftrat und somit in gesundem, ausgereiftem Lungengewebe vorkommt.

Nach den Untersuchungen von Donorlungen sollten anschließend mögliche Veränderungen bei der PolySia-Expression durch Pathomechanismen zusätzlich hinterfragt werden. Dafür wurde zum einen Lungengewebe von IPF-Patienten aber auch von COPD-Patienten aufgearbeitet und mittels Western Blot und immunhistologischen Verfahren analysiert, um konkretere Aussagen bezüglich der Rolle von PolySia bei unterschiedlichen pathologischen Veränderungen treffen zu können.

### **4.3.3 Lungengewebe von IPF-Patienten**

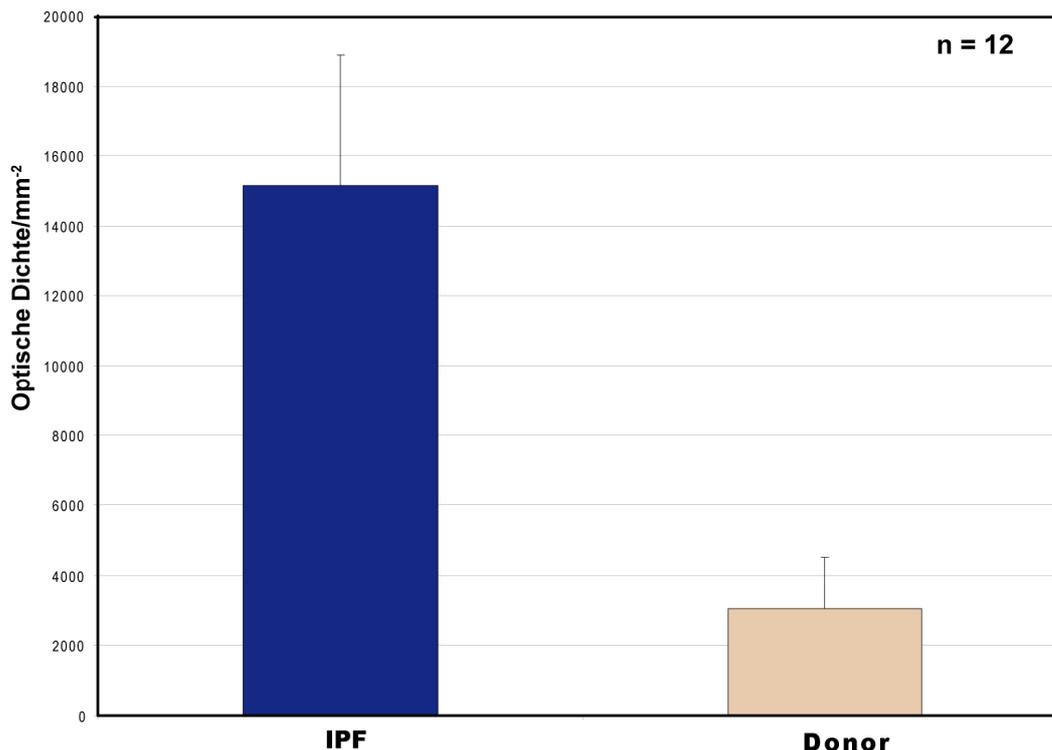
PolySia spielt wegen ihrer negativen Ladung eine wichtige Rolle bei Zell-Zell-Interaktionen und Signalübertragungen [115]. Insofern bestand die Überlegung, dass es durch die fibrotischen Umbauprozesse in der Lunge bei IPF-Patienten auch zu einer Änderung der PolySia-Expression kommen könnte, wie wir es auch bei Bleomycin behandelten Mäusen beobachtet haben. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde mit Hilfe der Western-Blot-Methode die PolySia-Menge analysiert und das detektierte PolySia Signal mit denen von Donoren verglichen (Abb. 26).



**Abbildung 26: Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der PolySia-Menge in IPF- und Donor- Gewebe**

Lungenproben von IPF-Patienten sowie Donoren wurden sowohl unverdaut (Spuren 1,3,5 und 7) sowie nach enzymatischem Verdau mit EndoN (Spuren 2,4,6 und 8) mit Hilfe des Western Blots analysiert. Dabei wurden je 10 µg Protein jeder Probe in eine Geltasche aufgetragen und anschließend mit einem mAK gegen PolySia behandelt. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

In Abbildung 26 wurde das PolySia-Signal auch bei IPF-Patienten (Spuren 1 und 3) in einem Bereich von ~ 250kDa nachgewiesen. Die detektierte Menge an PolySia war bei IPF-Lungenproben im Vergleich zu den Donoren höher, da die Banden dort intensiver erschienen. Zusätzlich wurden Proben nach enzymatischem Verdau mittels EndoN gelelektrophoretisch getrennt und gefärbt. Hier (Spuren 2,4,6 und 8) ist kein Signal erkennbar, sodass die Testspezifität damit verifiziert ist. Um die Vermutung der gesteigerten Polysialylierung bei IPF-Patienten zusätzlich bestätigen zu können, wurde im nächsten Schritt die Menge an PolySia in Lungengewebe densitometrisch quantifiziert. Mit dem Programm „Tina 2.0“ wurde diese densitometrische Auswertung der Western Blots durchgeführt.

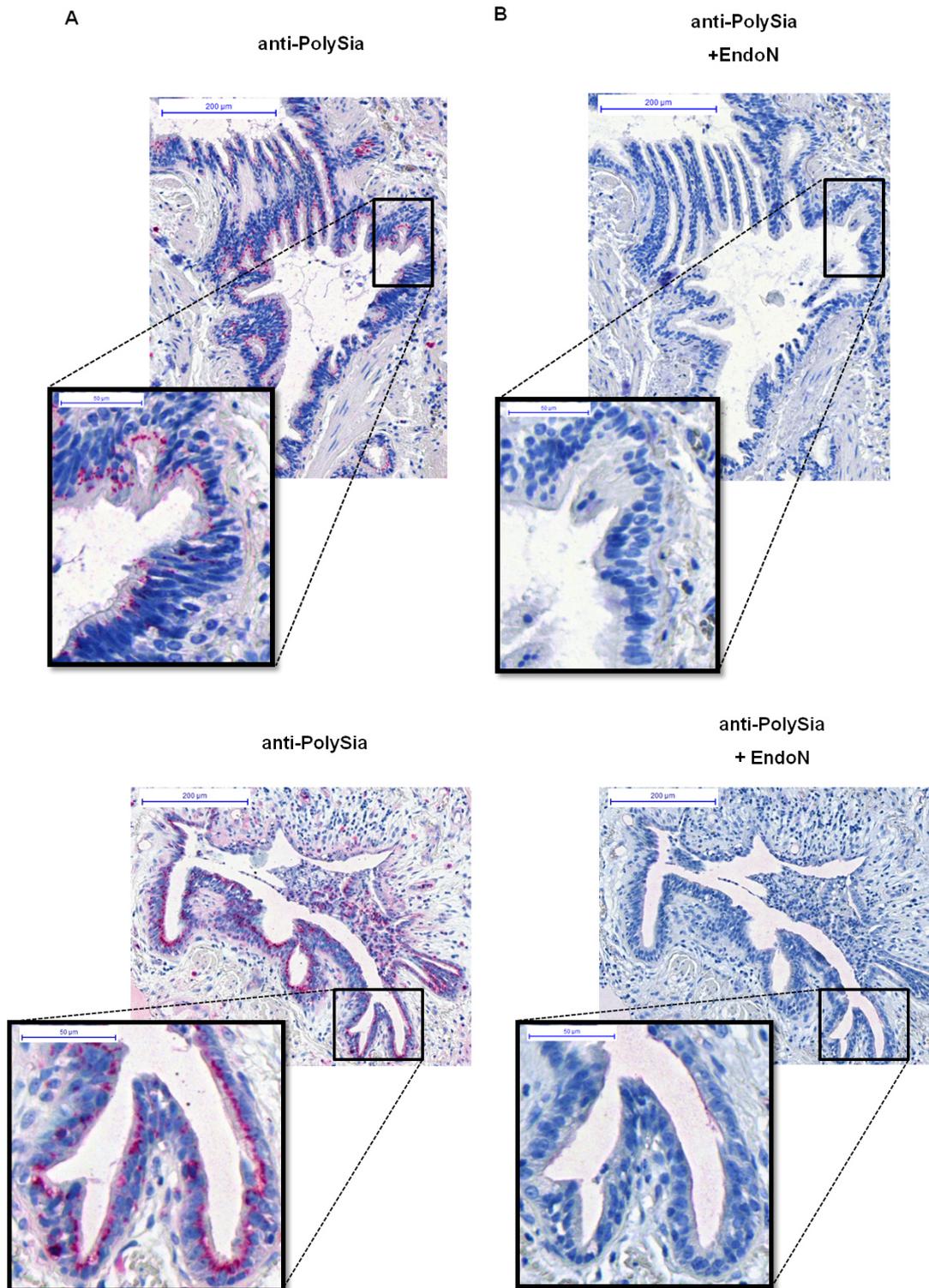


**Abbildung 27: Bestimmung der OD der Western Blots mit dem Programm „Tina 2.0“**  
Die Menge der PolySia wurde anhand der Intensität der Western Blots gemessen. Dafür wurden 12 Replikate verwendet.

Sowohl der Western Blot (Abb. 26) als auch die Bestimmung der Signalintensität der PolySia bei IPF-Patienten (Abb. 27) zeigten eine Zunahme der Expression von PolySia. Als Nächstes sollte nun auch noch eine genauere Lokalisation der PolySia in IPF-Lungengewebe mit Hilfe der Immunhistochemie vorgenommen werden.

#### 4.3.4 Immunhistologie von IPF-Patienten

Vergleichend zu den gesunden Lungenproben war es anschließend interessant, sich die PolySia-Signale im Lungengewebe von IPF-Patienten anzuschauen. Bei fibrotischen Umbauprozessen in der Lunge kommt es wie beim Bleomycin-Modell zu einer Veränderung der Zell-Zell-Interaktion und damit auch der Stabilität des Lungengerüsts. Polysialinsäuren, die hier involviert sind und an neuronalen Regenerationsprozessen teilhaben, konnten bereits im Western Blot mit einer Zunahme der PolySia-Menge nachgewiesen werden. Für eine genauere Lokalisierung der verstärkten Expression ist die Immunhistologie hilfreich. Aufgrund der Optimierung der Färbetechnik wurde, wie bereits erwähnt, die Fast Red Methode angewendet, um eine genauere Lokalisierung in histologisch aufgearbeitetem Lungengewebe vornehmen zu können.



**Abbildung 28: Immunhistochemie von IPF-Lungenproben**

**Färbemethode: ZytoChemPlus (AP) Anti-Rabbit (Fast Red) Kit**

Die histologischen Lungenschnitte von IPF-Patienten wurden gegen PolySia (A und B) mit dem mAk behandelt. Zur Visualisierung des Immunkomplexes wurde das Fast Red-Verfahren eingesetzt. (B) Als Negativkontrolle wurde EndoN verwendet.

Die zur Visualisierung von PolySia hergestellten seriellen Gewebeschnitte in Abbildung 28 wurden mit der Fast Red Methode angefärbt. Dabei wird deutlich, dass bei IPF-Patienten, ebenso wie zuvor bei Donoren, hauptsächlich intrazelluläre PolySia-Signale im bronchialen Epithelbereich aufwiesen. Die Degradierung von PolySia mit EndoN demonstrierte die Spezifität des Immunsignals gegen PolySia.

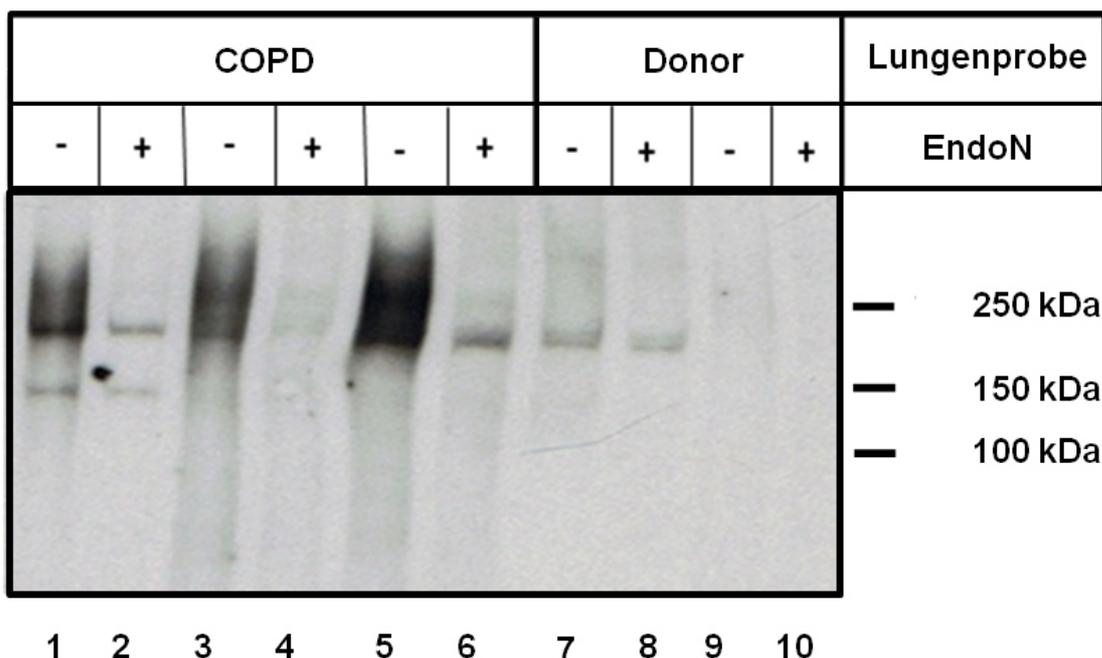
Zusammen genommen zeigten die Ergebnisse bei humanen Lungenproben, dass PolySia grundsätzlich in ausgereiftem Lungengewebe vorkommt. Zusätzlich konnte der Nachweis von erhöhten Mengen an PolySia in fibrotischem Lungengewebe bei Menschen nachgewiesen werden.

Der IPF sollte das inflammatorisch getriggerte Krankheitsbild, die COPD, gegenübergestellt werden. Ob PolySia auch dort verändert exprimiert wird, sollte in folgenden Analysen studiert werden.

### **4.3.5 Lungengewebe von COPD-Patienten**

Bei dem Pathomechanismus der COPD laufen immunpathologische Prozesse ab, die zu chronischen Entzündungsreaktionen in der Lunge [66] führen und es sollte überprüft werden, ob es auch hier zu einer Veränderung des Polysialylierungsgrades kommen kann.

Für die Analysen wurden Lungenproben von COPD-Patienten zunächst lysiert und der Überstand abzentrifugiert. Anschließend wurde die Proteinbestimmung vorgenommen und auf die Proben angepasst. Gelelektrophoretisch erfolgte die Auftrennung der Proben nach der Proteingröße auf einem SDS-Gel (7% Trenngel, 4% Sammelgel). Danach wurde das Western Blot Verfahren angewendet.

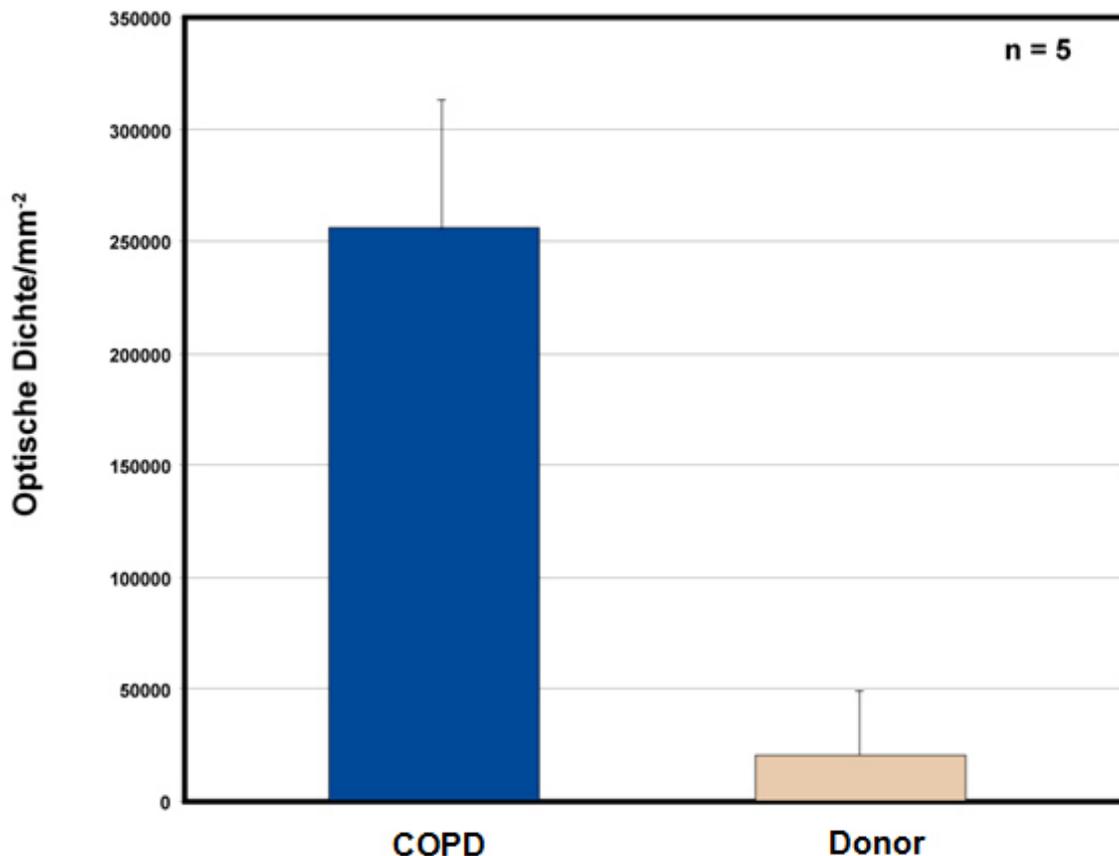


**Abbildung 29: Western Blot Analysen gegen PolySia von Donoren und COPD-Patienten**

Der Western Blot zeigt die Auftragung sowohl von COPD- als auch Donor-Proben. Ein Teil jeder Probe wurde unbehandelt bearbeitet (Spuren 1,3,5,7 und 9), der andere Teil der Probe wurde mit EndoN depolysialyliert (Spuren 2,4,6,8 und 10). Anschließend erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung im SDS-Gel sowie die Entwicklung des Western Blots mit Behandlung des mAk 735 für die Analyse der PolySia-Darstellung.

Bei den COPD-Lungenproben zeigte sich ein starkes Signal im Bereich von ~ 250 kDa (Spuren 1,3 und 5), welches sich im Vergleich dazu nach EndoN-Verdau nicht darstellen lässt (Spuren 2,4 und 6). Bei den Donoren war ein schwaches Signal nachweisbar, was bestätigt, dass PolySia grundsätzlich in ausgereiftem Lungengewebe vorkommt.

Die Signalstärke von PolySia im Western Blot bei COPD-Proben impliziert eine deutliche Zunahme der Polysialylierung im Rahmen der Pathogenese (Abb. 30). Mit dem Programm „Tina 2.0“ wurde ein Vergleich der Signalstärke zwischen pathologischem und physiologischem Lungengewebe vorgenommen. Abbildung 30 zeigt die Auswertung bei einem Stichprobenumfang von n=5.



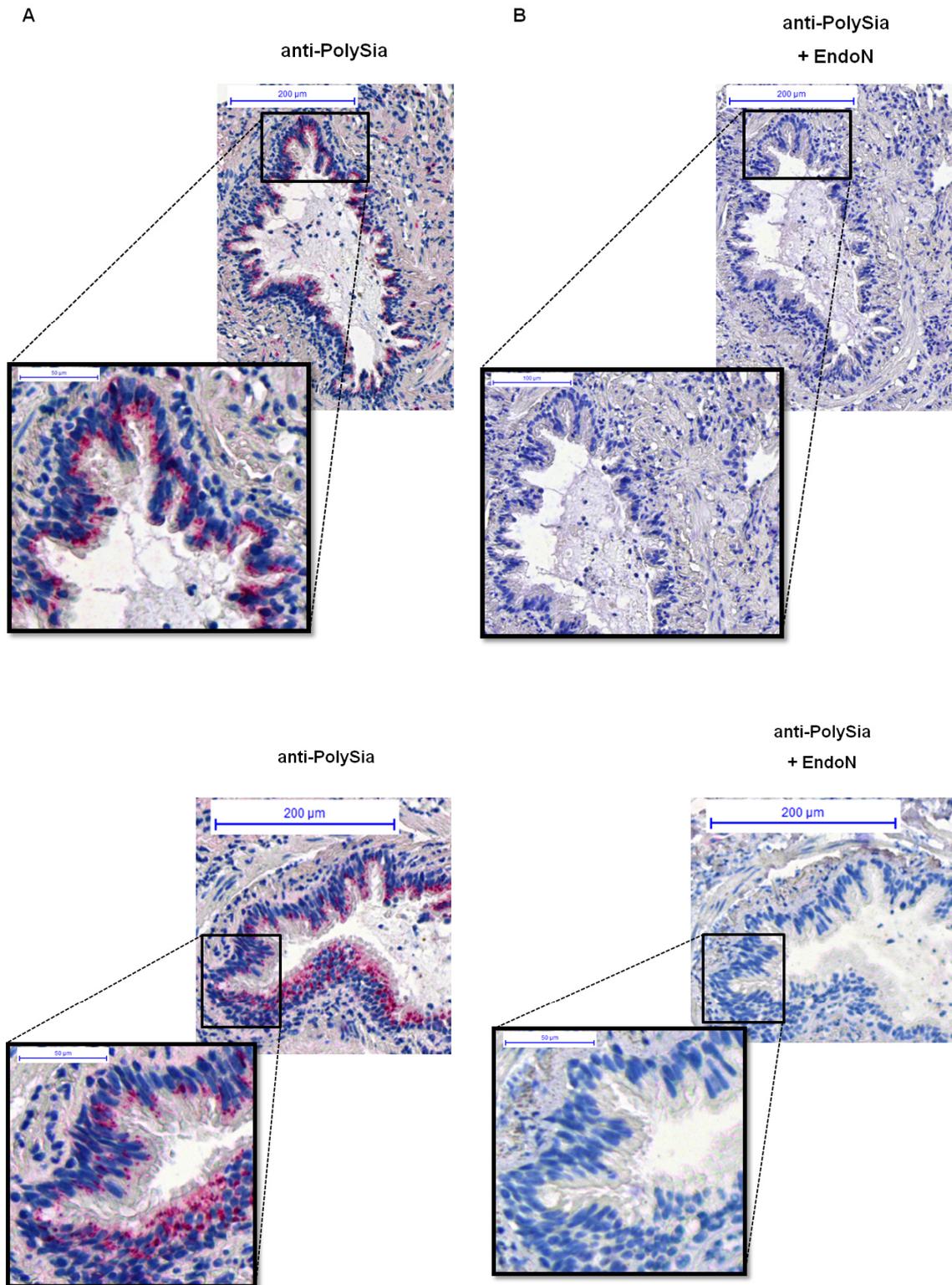
**Abbildung 30: Auswertung der COPD-Proben mit dem Programm „Tina 2.0“**  
Die Auswertung der Western Blots von COPD-Patienten sowie Donoren wurde vorgenommen, indem die Signalintensität densitometrisch gemessen wurde. Der Stichprobenumfang war n=5.

Die Auswertung der Western Blots von COPD-Patienten ergab einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Menge an PolySia, welche um das 12fache größer war als bei gesunden Lungenproben. Vergleichend zu der Auswertung der Western Blots von IPF-Patienten konnte damit sogar eine noch größere Zunahme der PolySia in Lungengewebe nachgewiesen werden.

Um PolySia auch bei COPD-Patienten zu lokalisieren, erfolgte die Aufarbeitung von COPD-Lungenschnitten.

#### 4.3.6 Immunhistologie von COPD-Patienten

Im nächsten Schritt sollte neben dem Nachweis von PolySia bei COPD-Lungenproben auch noch die Lokalisierung der verstärkten Expression von PolySia bestimmt werden. Deswegen wurde wiederum die Immunhistologie eingesetzt, bei der spezifisch über die Antigen-Antikörper-Reaktion PolySia sichtbar gemacht werden kann.



**Abbildung 31: Lungengewebe eines COPD-Patienten**

**Färbemethode: ZytoChemPlus (AP) Anti-Rabbit (Fest Red) Kit**

Die Färbung des Lungengewebes erfolgte einmal ausschließlich mit Behandlung von (A) Anti-PolySia mAb und (B) der folgende Serienschritt wurde zuvor mit EndoN behandelt.

In Abbildung 31 erfolgte die immunhistologische Aufarbeitung von COPD-Lungenschnitten. Hier wurde ebenfalls die Fast Red Methode angewandt, da diese Färbung eine gute Auflösung bei starker Vergrößerung aufweist. Die Abbildung verdeutlicht, dass an den Stellen, an denen der Primärantikörper an PolySia zuvor gebunden hatte, ein intensives Signal sichtbar wurde. Somit lässt sich die Lokalisierung der PolySia auch bei COPD-Patienten hauptsächlich intrazellulär auf den bronchialen Epithelbereich festlegen.

Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer Zunahme der PolySia während der COPD kommt (Western Blot Analysen) und PolySia im bronchialen Epithelbereich exprimiert wird. Das inflammatorische Krankheitsbild steht damit in Verbindung mit einer gesteigerten Polysialylierung. Neben der fibrotischen Komponente steht somit auch der inflammatorische Pathomechanismus mit einer Zunahme der PolySia-Expression in Zusammenhang.

## 5 Diskussion

### 5.1 PolySia-Nachweis in adultem Lungengewebe

In meiner Promotionsarbeit konnte ich nachweisen, dass die PolySia im reifen Lungengewebe bei Mäusen und auch bei Menschen vorkommt. Der Nachweis erfolgte hierbei mit Hilfe von Western Blot und Immunhistologie.

Bisher war bekannt, dass die Regulierung von Zell-Zell-Interaktionen durch PolySia vermittelt eine wichtige Funktion insbesondere im neuronalem System darstellt [115, 197]. Dabei wird die Gewebestabilität beeinflusst, die mit zunehmender Konzentration ansteigt [115]. Jedoch auch während der frühen embryonalen Lungenentwicklung wurde bereits PolySia nachgewiesen. Es zeigte sich hier eine verstärkte Exprimierung von PolySia bei der Lungendifferenzierung während der intrauterinen Entwicklung [198]. Dabei wurde in den beiden Keimblättern Mesoderm und Endoderm polysialyliertes NCAM nachgewiesen. Da im neuronalem Gewebe PolySia neben der Entwicklungs- auch bei Regenerationsprozessen eine Rolle spielt, bestand die Überlegung, zu überprüfen, ob auch nach Abschluss der Entwicklungsphase der Lunge PolySia wiederholt exprimiert wird. Unsere Analysen ergaben, dass PolySia grundsätzlich in der ausgereiften Lunge exprimiert wird (Abb. 18), da im Western Blot ein Signal gegen PolySia nachweisbar war. Mit Hilfe der Immunhistologie konnte dies auch bestätigt werden und eine nähere Lokalisation war möglich. Dabei wurden PolySia-Signale im Epithelbereich sichtbar. Sie werden auch in der embryonalen Lunge vorgefunden [192]. Es gibt jedoch einen gravierenden Unterschied in der zellulären Lokalisation von PolySia zwischen pränatalen und adulten Epithelzellen. Während in embryonalen Zellen PolySia an der äußeren Zellmembran zu finden ist, weisen adulte Epithelzellen eine intrazelluläre, vesikuläre PolySia-Färbung auf (Abb. 23). Aufbauend auf diesen Ergebnissen konnte in unserer Arbeitsgruppe (Dr. Christina Ulm, AG Geyer) gezeigt werden, dass das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM in polysialylierter Form in der humanen Lunge vorliegt und dieses im respiratorischen Epithel vor allem in zilierten Bronchialepithelzellen sowie in Clara-Zellen exprimiert wird. Dabei war PolySia im trans-Golgi-Apparat lokalisiert.

## 5.2 Polysialylierung bei BleoMäusen, IPF- und COPD-Patienten

Wie bereits mehrfach erwähnt, spielt PolySia eine entscheidende Rolle bei der Neurogenese aber auch bei Krankheiten wie Alzheimer, Schizophrenie und Tumor [172, 173, 199]. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob PolySia auch bei regenerativen Prozessen der Lunge involviert ist. Dies sollte sowohl in einem Tiermodell als auch in humanen pathologischen Lungenproben untersucht werden.

Im Rahmen meiner Doktorarbeit habe ich unbehandelte Mauslungen mit murinen Lungen nach Bleomycinverabreichung sowie humane Donorlungen mit Lungen von IPF- und COPD-Patienten auf ihren PolySia-Status hin verglichen.

### 5.2.1 Detektion von PolySia im Mausmodell

Für den Nachweis von PolySia und Vergleich des PolySia-Status vor und nach Bleomycin Behandlung wurden Mäuselungen zunächst lysiert. Mit dem Bleomycin-Modell lässt sich das Vorkommen von PolySia *in vivo* belegen. Bleomycin ist ein Antibiotikum, das auch als Zytostatikum eingesetzt wird [87, 200]. Der daraufhin ausgelöste oxidative Stress führt zu einer Entzündungsreaktion, was wiederum eine Epithelverletzung und eine Zunahme der Immunzellen innerhalb der ersten 7 Tage nach Bleomycinbehandlung fördert. Danach erfolgt eine Fibrosierung des Lungengewebes. 20 bis 30 Tage nach der einmaligen Verabreichung von PolySia kommt es zu einem Rückgang der Gewebefibrosierung [90].

Nach Bearbeitung des Lungengewebes erfolgte mittels Western Blot die Visualisierung von PolySia. Die genauere Lokalisierung der PolySia-positiven Lungenzellen wurde mit der Immunhistologie durchgeführt. Dabei konnte PolySia mit Färbemethoden dargestellt werden (Abb. 21 - 23). Das Ergebnis der unbehandelten Lungenprobe zeigte ein PolySia-Signal, obwohl, wie oben erwähnt, bisher davon ausgegangen wurde, dass PolySia in der ausgereiften Lunge nicht mehr exprimiert wird [201]. Neben unbehandelten und Mäuselungen, die mit Bleomycin behandelt wurden, untersuchten wir auch Lungen von Tieren mittels Western Blot Analysen, denen eine Kochsalzlösung verabreicht wurde. Sowohl die NaCl-Behandlung als auch die Bleomycin Verabreichung führte tendentiell zu einer Erhöhung der PolySia-Exprimierung. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt nach Bleomycin Kontakt, doch auch durch das Einbringen der Kochsalzlösung wird unseren Analysen nach der PolySia-Status beeinflusst.

Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass PolySia in unbehandelten adulten Mäuselungen vorkommt und die Menge an PolySia durch

Aktivierung des Inflammasoms und/oder der fibrotischen Umbauprozesse im Rahmen einer Bleomycingabe gesteigert ist.

Für die Zunahme der PolySia sind die Transferasen ST8SialII und ST8SialIV Schlüsselemente. Dementsprechend wurde die Expressionsregulierung der Polysialyltransferasen bei BleoMäusen analysiert. In Abbildung 20 wird das Ergebnis der Genexpression nach Bleomycinbehandlung am 7. Tag im Vergleich zu unbehandelten Mäusen dargestellt. Die Ergebnisse zeigten zunächst, dass generell beide Polysialyltransferasen im Lungengewebe exprimiert werden. Überraschenderweise kam es zu keiner signifikanten Veränderung der Expression beider Polysialyltransferasen im Rahmen des analysierten Zeitfensters des Fibrosierungsmodells (Abb. 20). Die Menge an ST8SialII und ST8SialIV mRNA sank sogar tendenziell im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Eine Schlussfolgerung ist hieraus schwierig zu treffen, da die Regulierung der Polysialyltransferasen im Mausmodell von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst wird.

Dabei ist das Ausmaß der Gewebeveränderung unter anderem von der Bleomycindosierung abhängig [202]. Außerdem beeinflusst das Zytostatikum eine unterschiedliche Genexprimierung. Dabei werden die Veränderungen auf molekularer Ebene in drei zeitlich begrenzte Phasen eingeteilt: Tag 1 – 2 werden als inflammatorische Phase betrachtet, dieser folgt die aktive fibrotische Phase (Tag 7 – 14), gefolgt von der späten fibrotischen Phase (Tag 21 - 35). Das Maximum der Genexprimierung erfolgt zwischen dem 7. – 14. Tag. Außerdem wurde in einer aktuellen Studie von Ruoqi Peng et al. nachgewiesen, dass Gene, die im Pathomechanismus von fibrotischen Umbauvorgängen eine Rolle spielen, erst während der aktiven fibrotischen Phase hochreguliert werden, sodass die PCR-Daten von BleoMäusen, die am 7. Tag herunterreguliert wurden (Abb. 20) keinen konkreten Vergleich im Hinblick auf die Genregulierung bei IPF-Patienten zulassen. Da es sich bei den BleoMäusen auch nicht um eine progressive Fibrosierung handelt, lässt sich dieses Modell nur eingeschränkt als Vergleich bei Ergebnissen von humanem Lungengewebe einsetzen. Weitreichend sollte die Genexprimierung auch in den anderen beiden Phasen, also während der aktiven und der späten Fibrosierungsphase, analysiert werden, um den Verlauf der Regulierung beider Polysialyltransferasen verfolgen zu können. Anhand unserer Daten ist zu vermuten, dass vielleicht lediglich während der inflammatorischen Phase es zu einer Steigerung der Polysialyltransferasenexpression kommt, was das beobachtete gesteigerte Ausmaß der PolySia-Menge an Tag 7 erklären würde.

Zusätzlich zum Western Blot konnte im Rahmen dieser Dissertation PolySia auch in histologischen Mäuseschnitten nachgewiesen werden. Dazu wurde die Immunhistochemie (Abb. 21) eingesetzt. Es wurde zunächst unbehandeltes Lungengewebe mit zwei unterschiedlichen immunhistochemischen Färbemethoden untersucht. Das Ergebnis mit dem AEC-Staining Kit löste ein deutliches Signal im respiratorischen Epithel (Abb. 22) aus. Diese Färbemethode zeigte allerdings Schwierigkeiten bei der Abgrenzung, da die Färbung diffus über die Zellen verteilt war. Deshalb wurde eine weitere Färbemethode, die EnVision-Methode, eingesetzt, mit der nachgewiesen werden konnte, dass sowohl in unbehandeltem als auch in Lungengewebe, das mit Bleomycin zuvor behandelt worden war, PolySia hauptsächlich an Bronchialzellen exprimiert wird (Abb. 23). Bei Bleomycin-Lungengewebe konnte auch ein Signal an den Alveolarzellen gezeigt werden. In beiden Lungenbereichen war das PolySia-Signal intrazellulär lokalisiert.

Insgesamt zeigten unsere Studien, dass der inflammatorisch getriggerte Prozess, der durch Bleomycin ausgelöst wird, die PolySia-Expression beeinflusst. Um genauer zu differenzieren, ob es bei fibrotischen oder inflammatorischen Veränderungen zu einer Zunahme der PolySia kommt und ob dies auch beim Menschen eine Rolle spielt, wurden anschließend die beiden Lungenkrankheiten IPF und COPD mit ihren unterschiedlichen Pathologien im Hinblick auf PolySia analysiert.

### **5.2.2 Detektion von PolySia bei IPF-Patienten**

Bei der Lungenkrankheit IPF kommt es zu fibrotischen Umbauvorgängen mit Zunahme der Kollagenbildung. Verantwortlich dafür sind Fibroblasten, die auch zu einer Anlockung von Chemokinen führen [203, 204]. PolySia-abhängig kommt es zu einer Differenzierung der Zell-Zell-Kontakte, was man auch bei immunologischen Prozessen bereits beobachten konnte. Leukozyten wandern ein und beeinflussen sowohl homöostatische als auch inflammatorische Abläufe [205]. Die nachgewiesene Rolle von PolySia bei der Beeinflussung der Zell-Adhäsion, Migration von Zytokinen sowie des Immunsystems haben dazu beigetragen, die Expression von PolySia im Lungengewebe und hier speziell bei der Lungenkrankheit IPF zu untersuchen. Bei der IPF ist es ganz besonders wichtig zu betonen, dass diese Erkrankung keinen inflammatorischen Prozess aufweist. Stattdessen zeigt sich bei der IPF eine Heterogenität der Lunge [206]. Dabei gibt es Bereiche, die physiologische Gewebsstrukturen aufweisen und wieder andere Regionen mit Zerstörung der interstitiellen Architektur. Innerhalb der fibrotischen Lungenerkrankungen gibt es

verschiedene Unterteilungen, wobei ich mich während meiner Promotionsarbeit auf die idiopathische Form beschränkt habe. Im Gegensatz zu der Pathologie bei der IPF spielt der inflammatorische Zustand bei der COPD eine wichtige Rolle.

Um PolySia bei IPF-Patienten nachweisen zu können, wurde zunächst wiederum mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese und des anschließenden Western Blots gegen PolySia die Lungenproben analysiert. In Abbildung 24 wird deutlich, dass auch bei Donoren generell PolySia in Lungengewebe vorliegt. Dies konnte mit Hilfe der Western Blot-Methode sowie immunhistochemischer Aufarbeitung erstmalig nachgewiesen werden. Bisher wurde, wie bereits erwähnt, vermutet, dass PolySia lediglich bei der Lungenreifung auftritt, was hiermit widerlegt werden konnte.

Da PolySia bei neuronalen Regenerationsprozessen involviert ist, sollte im nächsten Schritt das Ausmaß der Polysialylierung bei humanem Lungengewebe von IPF-Patienten untersucht werden. Dabei wurde nach Auswertung der Signalintensität der unterschiedlichen Lungenproben deutlich, dass die Immunfärbung gegen PolySia bei IPF-Patienten (Abb. 27) um das fünffache stärker ist als bei Donoren. Somit ist die Vermutung bestätigt, dass PolySia in adultem Lungengewebe vorkommt und eine Zunahme bei fibrotischen Umbauvorgängen erfolgt.

Im Anschluss daran wurde der Überlegung nachgegangen, wo PolySia in der Lunge exprimiert wird bzw. ob im pathologischen Gewebe PolySia in anderen Bereichen vorkommt als unter normalen Bedingungen. Um diese Frage zu beantworten, wurde die Immunhistochemie durchgeführt, bei der das Lungengewebe und hier speziell PolySia nach Optimierung der Färbemethode mit der Fast Red Methode angefärbt wurde. Nachdem sich bei der EnVision-Technik die Unterscheidung zwischen brauner Färbung durch den Immunkomplex und Teerrückständen als schwierig erwies, wurde somit die Streptavidin-Biotin-Methode eingesetzt.

Zunächst wurden Lungenschnitte von Donoren bearbeitet (Abb. 25). Das Lungengewebe wurde mit anti-PolySia mAk behandelt und anschließend angefärbt. Dabei wurde deutlich, dass ein positives Signal an den Stellen vorlag, an denen zuvor der Primärantikörper gebunden hatte. Das Resultat bestätigte das Vorkommen von PolySia in ausgereiftem Lungengewebe, wie es auch bei murinen Lungen der Fall war. Im nächsten Schritt wurden seriell-erstellte IPF-Histoschnitte auf PolySia untersucht (Abb. 28). Die Vergrößerung zeigt deutlich eine rötliche Färbung im Epithelbereich (A), die nach Enzymverdau mit EndoN (B) fehlt und damit spezifisch PolySia darstellt. Der Vergleich macht deutlich, dass sowohl in Donoren als auch in IPF-Patienten PolySia vor allem im bronchialen Epithelzellen vorhanden ist. Da es während einer IPF unter

anderem zu einer Bronchialisierung der Lunge kommt, ist wohl die gesteigerte Menge an PolySia lediglich auf die erhöhte Menge an Bronchialepithelzellen in IPF-Patienten zurückzuführen.

Inwieweit PolySia während Entzündungen in Form von kontinuierlich, inflammatorischen Vorgängen involviert ist, wurde anhand der Lungenkrankheit COPD analysiert.

### **5.2.3 Detektion von PolySia bei COPD-Patienten**

Bei der COPD handelt es sich um eine chronisch progressive inflammatorische Krankheit, die zunächst die kleinen Atemwege und Alveolen angreift und sich dann auf die großen Atemwege ausbreitet. Dabei spielen insbesondere zwei Pathomechanismen eine wichtige Rolle. Die andauernde Entzündungsreaktion und das Ungleichgewicht von Oxidantien und Antioxidantien führen zu oxidativem Stress. Die vorherrschenden Zellen sind neutrophile Granulozyten, Makrophagen sowie Lymphozyten, die wiederum eine Aktivierung von Zytokinen und Chemokinen auslösen. Außerdem führen Neutrophile zu einer Freisetzung proteolytischer Enzyme wie Elastase, Proteinase-3, Cathepsin G und B sowie Metalloproteinasen, die zu Schäden des elastischen Lungengewebes verursachen [207].

Bei der COPD ist im Hinblick auf den Pathomechanismus der oxidative Stress eine wichtige Komponente. Dabei kommt es zu einer Inaktivierung von Antiproteasen mit der Folge einer Hypersekretion von Mukus, Verletzung des Alveolarepithels sowie Umbauprozesse der extrazellulären Matrix [208]. Die Konsequenz der COPD und insbesondere der chronischen Entzündungsreaktion führen zu einer Abnahme der Lebensqualität des Patienten. Durch die Beschädigung des elastischen Lungengewebes, insbesondere von Elastin, kommt es zu einer Verengung der Atemwege mit Abnahme des Atemflusses in die Bronchien sowie Luft, die wegen der Enge nicht mehr entweichen kann. Bei COPD-Patienten ließ sich außerdem in einigen Studien nachweisen, dass das akute-Phase-Protein-C (CRP) und Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-6 im Blut erhöht waren [209, 210]. Darüber hinaus kommt es zu irreversiblen Effekten, die bei COPD-Patienten am häufigsten durch Noxen aus der Umwelt oder Zigarettenrauch ausgelöst werden [211].

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit habe ich den Grad der Polysialylierung in COPD-Lungenproben im Vergleich zu Donoren untersucht. Deswegen wurde ein Western Blot (Abb. 29) mit gesunden sowie pathologischen Lungenproben angefertigt. Bei den gesunden Proben (Spuren 7 – 10) zeigte sich, wie bereits bestätigt, das Vorkommen

von PolySia. Bei den COPD-Lungenproben wurden deutlich stärkere Immunsignale gegen PolySia nachgewiesen (Spuren 1,3 und 5). Die Proben nach EndoN-Verdau (Spuren 2,4 und 6) zeigten kein Signal und dienten als Negativkontrollen. Der inflammatorische Prozess, der bei COPD-Patienten stattfindet, führt demnach auch zu einer Zunahme der Polysialylierung. Um den optischen Eindruck bekräftigen zu können, wurde eine densitometrische Auswertung der PolySia-Menge in COPD-Proben im Vergleich zu Donoren vorgenommen (Abb. 30). Hier zeigte sich, dass bei einem Stichprobenumfang von fünf die Expression von PolySia signifikant zugenommen hatte und auf das 12fache vergleichend zu den Donoren angestiegen war.

Damit wurde im Hinblick auf den inflammatorischen Prozess deutlich, dass die Expression von PolySia signifikant verändert ist und dabei sogar eine stärkere Zunahme erfährt als in Lungengewebe von IPF-Patienten.

Bei COPD-Lungenproben wurde anschließend wiederum eine nähere Lokalisierung von PolySia vorgenommen, um konkrete Aussagen hinsichtlich der Verteilung in humanem Lungengewebe treffen zu können. Dies erfolgte mit Hilfe der Immunhistologie. In Abbildung 31 wurden COPD-Proben verwendet. Es erfolgte einmal die Gewebebehandlung mit Anti-PolySia (A) und zur Kontrolle die Behandlung mit dem Enzym EndoN (B). Man erkennt deutlich, dass das Signal in A positiv ausfällt und vergleichend mit B und den gesunden Lungenproben (Abb. 31) signifikant erhöht war. Die rötlichen Signale zeigen das Vorliegen der PolySia, welches in der Vergrößerung noch besser beurteilt werden kann. Dabei konzentriert sich das PolySia-Signal wie bei Donoren auf die Epithelregion, in der es zu Umbauprozessen der Lunge mit Einwanderung von Entzündungszellen kommt. Im Gegensatz zur IPF kommt es in der COPD aber nicht zu einer Bronchialisierung der Lunge.

Zudem war die Anti-PolySia Signalverstärkung bei COPD-Patienten um mehr als das doppelte höher als bei fibrotischen Vorgängen, sodass die Aussage getroffen werden kann, dass PolySia insbesondere in immunologischen Prozessen eine wichtige Funktion einnehmen könnte.

Eine Erklärung für die Entstehung der stärkeren Zunahme von PolySia und COPD könnte anhand des Pathomechanismus der COPD im Folgenden erklärt werden.

### 5.3 Mögliche Bedeutung von PolySia in adultem Lungengewebe

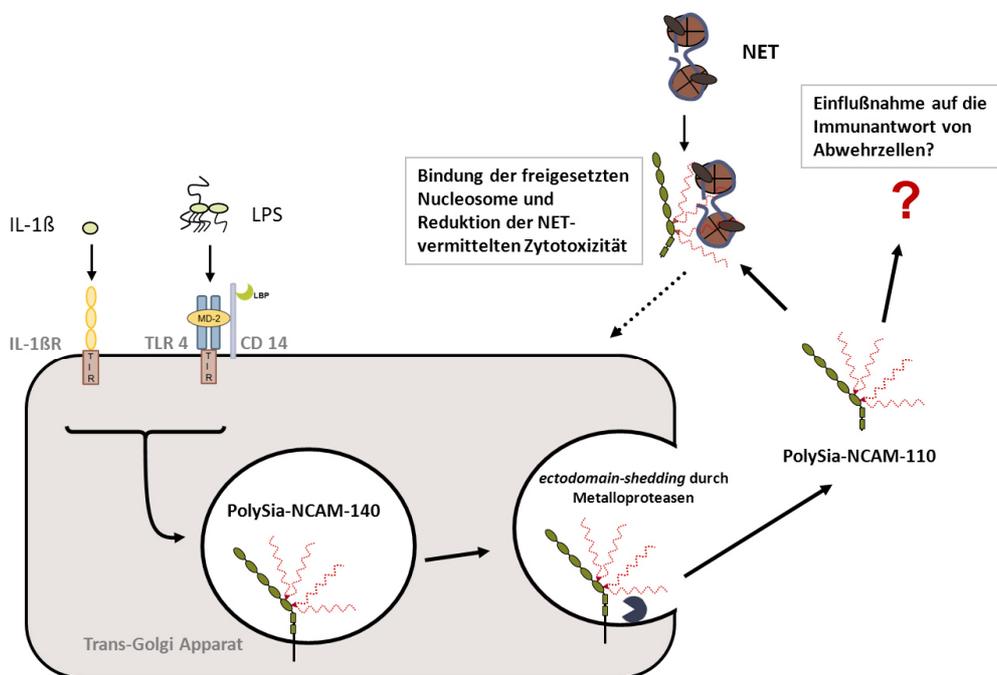
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte das generelle Vorkommen von PolySia in Lungenepithelzellen von adulten Mäusen und erwachsenen Menschen beschrieben werden. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass unter pathologischen Bedingungen der PolySia-Status beeinflusst werden kann.

Basierend auf den von mir erbrachten Daten konnte in unserer Arbeitsgruppe (Dr. Christina Ulm, AG Geyer) NCAM als PolySia-Träger mittels massenspektrometrischer Techniken identifiziert werden. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass es im Rahmen der COPD zu einem NCAM-*ectodomain-shedding* wohl ausgelöst durch einen Metalloprotease-Vertreter aus der ADAMs Familie kommt. Bei fibrotischem, nicht-entzündlichem Lungengewebe wie der IPF hingegen wurde gezeigt, dass es nicht zu einem *ectodomain-shedding* kommt. Dabei wird eine Ektodomäne durch bestimmte Metalloproteasen, die auch als Sheddasen bezeichnet werden, abgespalten. Als Folge dessen findet man frei gelöste Regulatorproteine im extrazellulären Raum vor. Zu den Sheddasen zählen unter anderem die ADAMs (*A Disintegrin And Metalloprotease*), die Membranproteine wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Rezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle (NCAM) abspalten. Dadurch kommt es zu Änderungen bei der Zell-Zell-Interaktion. Bisher wurde *ectodomain-shedding* schon bei pathologischen Vorgängen wie der Zelldegeneration, Entzündungen sowie in der Onkogenese nachgewiesen [212, 213]. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das proteolytische *ectodomain-shedding* von PolySia-NCAM wohl durch einen Vertreter der ADAMs-Familie explizit bei Entzündungsreaktionen von bronchialen Epithelzellen stattfindet. Dies kann sowohl durch IL-1 $\beta$  als auch durch Lipopolysaccharide induziert werden [146]. Zuvor konnte durch eine andere Arbeitsgruppe bereits nachgewiesen werden, dass eine etwaige Verbindung zwischen der COPD und der Metalloprotease ADAM17/Tace besteht [214]. Neuere Arbeiten sind von der Vermutung geprägt, dass die Polysialyltransferase ST8SialIV eine wichtige Funktion bei immunmodulatorischen Prozessen einnimmt und dementsprechend auch im Thymus zu finden ist. Außerdem existiert die Hypothese, dass es das körpereigene Immunsystem regulieren kann [134, 205, 215]. Auch in COPD-Patienten war die Expressionsrate von ST8SialIV signifikant erhöht. Somit kann vermutet werden, dass PolySia hauptsächlich durch die Polysialyltransferase ST8SialIV während immunmodulatorischer Prozesse in der Lunge generiert wird [146].

Bei Entzündungen finden grundsätzlich vielfältige Interaktionen zwischen Zellen und löslichen Bestandteilen statt. Dabei steht insbesondere die Regeneration des Gewebes

im Mittelpunkt. Da die Lunge aufgrund des direkten Zugangs von äußeren Noxen besonders anfällig für inflammatorische Prozesse ist, greifen hier die ersten Verteidigungsmechanismen des Körpers als Antwort auf exogene Noxen. Dabei erfolgt im Rahmen von Entzündungsvorgängen in der Lunge die Sekretion proinflammatorischer Proteine wie IL-1 $\beta$ , welches ausgelöst durch LPS gram-negativer Bakterien, die über TLR-4 gebunden werden, freigesetzt werden. Die freigesetzten Zytokine wiederum locken Immunzellen wie neutrophile Granulozyten an [216, 217]. Hier besteht der Abwehrmechanismus in Form der Bildung von NET (*neutrophil extracellular traps*). DNA und Histone bilden zusammen mit einer freigesetzten fibrillären Matrix aus Granula-Proteinen ein antimikrobielles Netz. Dadurch werden Bakterien und andere Noxen abgefangen und direkt zerstört [218]. Der Nachteil solcher NET-Formationen ist allerdings auch, dass sich ihre Zytotoxizität nicht spezifisch gegen invasive Mikroorganismen richtet sondern sich auch auf körpereigene Epithelzellen richten kann [219, 220]. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Preissner (Biochemisches Institut, Justus-Liebig-Universität Gießen) konnte gezeigt werden, dass PolySia mit den Histonen, die bei der NET-Formation freigesetzt werden, interagieren kann und damit die Zytotoxizität der Histone im Hinblick auf körpereigene Zellen reduziert wird. Aufbauend auf dieses Ergebnis wurde in unserer Arbeitsgruppe (Dr. Christia Ulm, AG Geyer) nachgewiesen, dass durch eine vorherige IL-1 $\beta$  sowie durch eine LPS-Stimulation die Zytotoxizität herabgesetzt wird und die Inhibition der Zytotoxizität durch lösliches PolySia-NCAM-110 nicht nur für Histone sondern auch auf die NET-Formation zutrifft. Dementsprechend kann vermutet werden, dass die NET-Inaktivierung durch PolySia-Ketten auf Glykoproteinen die inflammatorische Immunantwort beeinflusst und die Zelle somit vor einer überschießenden Reaktion des angeborenen Immunsystems schützt. Die Wechselwirkung zwischen löslichem PolySia-NCAM-110 mit Immunzellen kann so eventuell einen Therapieansatz bei von zytotoxischen Nebeneffekten bei neutrophiler NET-Antwort geprägten Erkrankungen (Systemischer Lupus Erythematosus, Zystische Fibrose) aufzeigen [221, 222]. Als Folge dessen konnte die Vermutung angestellt werden, dass PolySia-NCAM nach Zugabe von Entzündungsstimulatoren wie IL-1 $\beta$  oder LPS in bronchialen Epithelzellen hochreguliert wird. Außerdem ist es möglich, dass nach proteolytischer Spaltung von Metalloproteasen der Familie ADAMs PolySia-NCAM verstärkt einem *ectodomain-shedding* ausgesetzt wird. Die daraufhin lösliche NCAM-110 Isoform kann daraufhin wiederum mit exogenen und/oder endogenen Noxen wie Histonen oder NET eine Wechselwirkung eingehen und damit den zytotoxischen Effekt auf die eigene Zelle reduzieren [146]. Eine andere Vermutung im Hinblick auf die Regulierung der

Immunantwort liegt darin, dass die lösliche PolySia-NCAM Isoform mit verschiedenen Zellen des angeborenen Immunsystems innerhalb der Lunge interagieren kann. Dabei spielen vor allem die *sialic acid binding Ig-like lectins* (Siglecs), die auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen zu finden sind, eine Rolle. Mit Siglecs werden transmembranständige Proteine bezeichnet, die Sialinsäuren binden können und zu der Immunglobulin Superfamilie gehören [100, 223]. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine Siglec-11 Variante auf neuronalen Mikroglia vorkommt, über die PolySia-NCAM die Transkription des IL-1 $\beta$  codierenden Genabschnittes Einfluss nehmen kann [224]. Dies erfolgt in einem *cross-linking*-Prozess mit dem TLR 4-Rezeptor und daran gebundenem LPS (Abb. 32).



**Abbildung 32:** Arbeitsmodell in Bezug auf die Freisetzung von PolySia-NCAM-110 aus [146], entnommen aus der Dissertation: *Identifizierung und Charakterisierung der biologischen Funktion von PolySia-NCAM in humanem Lungengewebe*, Dr. Christina Ulm, Gießen 2012

## 6 Zusammenfassung

Polysialinsäuren (PolySia) bestehen in Wirbeltieren aus  $\alpha$ 2,8-verknüpften *N*-Acetylneuraminsäuren und spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei Zell-Zell-Interaktionen. Die hohe Zahl an negativ geladenen Carboxylgruppen inhibiert die Zelladhäsion und reguliert damit den Kontakt zwischen Zellen. In knock-out Mäusen konnte bei Abwesenheit des Moleküls gezeigt werden, wie wichtig die PolySia ist. Das Fehlen von PolySia führte zu einem letalen Phänotyp im Mausmodell. Im Nervensystem wurden bereits die vielfachen Aufgaben von PolySia analysiert, allerdings ist dessen Funktion in anderen Organen bislang weitgehend unerforscht.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte das Vorliegen von PolySia in humanem Lungengewebe nachgewiesen werden. Zunächst wurde der Nachweis von PolySia im Maus-Modell erbracht und damit bewiesen, dass sie in der ausdifferenzierter Lunge generell vorkommt. Der Nachweis in Bleomycin behandelten Mauslungen erfolgte mittels Western Blot-Methode sowie Immunhistologie und ergab, dass PolySia nach Bleomycin Verabreichung in erhöhten Mengen vorlag. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Polysialyltransferasen ST8Siall und IV bei Bleomycin-Mäusen tendentiell herunterreguliert werden. Auch bei IPF und COPD kommt es zu einer Zunahme von PolySia. Mit Hilfe der Western Blot-Methode sowie der Immunhistologie gelang es, die verstärkte Expression der PolySia bei fibrotischen Umbauprozessen sowie inflammatorischen Veränderungen in der Lunge nachzuweisen und näher zu lokalisieren. Es konnte gezeigt werden, dass die PolySia sowohl bei Donoren als auch bei IPF-Patienten und COPD-Lungenproben im Epithelbereich konzentriert vorkommt. Wichtig ist auch zu erwähnen, dass bei der Auswertung über die optische Dichte der Western Blots die Menge bei COPD um das zwölffache hingegen bei IPF lediglich um das fünffache vergleichend zu den Donoren anstieg.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die PolySia verstärkt in pathologischen Lungengewebe wie z.B. bei BleoMäusen, COPD- und IPF-Patienten exprimiert wird jedoch auch unter normalen physiologischen Bedingungen PolySia in der adulten Lunge vorkommt. Dabei ließen sich die PolySia-Signale auf den Epithelbereich zurückführen. Daraus lässt sich folgern, dass die Polysialylierung wahrscheinlich in Pathomechanismen von Lungenkrankheiten involviert ist und eine mögliche Zielstruktur für zukünftige Medikamente darstellen.

## 7 Summary

Polysialic acid (polySia) consists of  $\alpha$ 2,8-linked *N*-Acetyl neuraminic acid residues and plays an important role in cell-cell interactions among other processes. The high number of negatively charged carboxyl groups inhibits cell-cell adhesion regulating the contact between cells. The lethal phenotype in the absence of polySia demonstrated the importance of this carbohydrate polymer. In the nervous system numerous functions of polySia have already been studied. However its function in other organs remains largely unexplored.

In this thesis, the presence of polySia was detected in human lung tissue. First, the detection of polySia was performed in the mouse model and proved that it generally occurs in the adult lung. The analysis of the polySia-status after bleomycin-treatment demonstrated that during the induced pathology the polySia level increased. Moreover, it was shown that the expression of both polysialyltransferases (ST8SialI and IV) was not significantly influenced.

In addition we observed an increase of polySia in IPF and COPD patients in comparison to donor samples using Western blot analysis. It is also important to mention that the calculation of the optical density of the immune signal against polySia exposed 12 times higher values in IPF patients in comparison to donor samples. Besides this, the obtained immunohistochemistry staining against polySia revealed that the main expression of this sialic acid polymer occurs in the epithelial zone.

In summary it could be shown that polySia is present in the adult lung and pathological processes e.g. activation of the immflammasom by bleomycin or a COPD and IPF leads to an increase of polySia expression. Thus polysialylated proteins might be involved in pathogenic mechanism of pulmonary diseases and represent a possible target for future drug development.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

AMPA	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-Methylisoxazol-Propionsäure Rezeptor
ADAM	<i>a disintegrin and a metalloprotease</i>
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	vom Hirn abstammender neurotropher Faktor ( <i>brain-derived neurotrophic factor</i> )
BSA	Rinderserumalbumin
CAM	<i>cell adhesion molecule</i>
CD	Oberflächenantigen ( <i>cluster of differentiation</i> )
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
Da	Dalton
DHB	2,5 Dihydroxybenzoesäure
DMB	1,2-Diamino-4,5-Methylenedioxybenzol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EndoN	Endoneuraminidase
ESI	Elektrospray-Ionisation
FGFR	Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptor ( <i>fibroblast growth factor receptor</i> )
Gal	Galaktose
GDNF	von Gliazellen abstammender neurotropher Faktor ( <i>glial cellline-derived neurotrophic factor</i> )
Glc	Glukose
GlcNAc	N-Acetyl-Glukosamin
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol

## Abkürzungsverzeichnis

---

h	Stunde
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
IL	Interleukin
IPF	<i>idiopathic pulmonary fibrosis</i>
kDa	kilo Dalton
KDN	Deaminoneuraminsäure
KRT	Zytokeratin
LBP	LPS-Bindeprotein
LPS	Lipopolysaccharid
mAk	monoklonaler Antikörper
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte-Laserdesorptions-Ionisation- <i>time of flight</i> Massenspektrometrie
ManNAc	N-Acetyl-D-mannosamine
min	Minute
NCAM	neurales Zelladhäsionsmolekül
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	<i>N</i> -Glykolyneuraminsäure
<i>Nm</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-Aspartat Rezeptor
NMR	Kernmagnetische Resonanz Spektroskopie
NRP-2	Neuropilin-2
OT	Objektträger
OligoSia	Oligosialinsäure
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PolySia	Polysialinsäure
PolySia-NCAM	polysialyliertes NCAM
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PSPG	Polysialoglykoprotein
PST-Domäne	Polysialyltransferasen-Domäne
RT	Raumtemperatur
<i>rt</i> -PCR	<i>real-time</i> PCR
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-Page	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SiaM	Sialylierungsmotiv
TACE	<i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math>-converting enzyme</i>
TAPI	<i>TNF-<math>\alpha</math> Protease Inhibitor</i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-beta</i>
TM	Transmembrandomäne
TNF- $\alpha$	<i>tumor-necrose-factor-alpha</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung der interstitiellen Lungenerkrankungen aus [4] .....	3
Abbildung 2: idiopathische Fibrose aus [42] .....	7
Abbildung 3: COPD-Definition aus [58] .....	10
Abbildung 4: von [66]: Zusammenfassung des angeborenen und erworbenen Immunsystems .....	12
Abbildung 5: Stufeneinteilung gemäß den Werten von der Spirometrieauswertung und der subjektiven Empfindung des Patienten .....	14
Abbildung 6: medikamentöse Stufentherapie der COPD aus Duale Reihe Pharmakologie [79].....	15
Abbildung 7: Strukturen der drei häufigsten Sialinsäuren	18
Abbildung 8: Einfluss von PolySia auf Zelladhäsionsprozesse (modifiziert nach Rutishauser und Bruses) [122, 123].....	20
Abbildung 9: Lösliches NCAM aus [147].....	22
Abbildung 10: Wanderung der Proteine in der Gel-Elektrophorese .....	35
Abbildung 11: Angleichung der Proben für die Wanderung im Gel .....	35
Abbildung 12: Wanderung der Proteine im Gel .....	36
Abbildung 13: Darstellung der Schichtung für die Western Blot Apparatur .....	37
Abbildung 14: Behandlung der Histoschnitte mit dem Primär- bzw. Sekundärantikörper .....	42
Abbildung 15: Amplifikationskurve.....	44
Abbildung 16: DNA-bindendes SYBR Green.....	45
Abbildung 17: Kalibriergerade einer Proteinbestimmung.....	48
Abbildung 18: Detektion von PolySia in murinem Lungengewebe .....	50
Abbildung 19: Auswertung der Signalintensität mit dem Programm „Tina 2.0“ .....	52
Abbildung 20: Expressionsanalysen der PolySialyltransferasen ST8SialII und IV .....	53
Abbildung 21: Immunhistologische Lokalisierung von PolySia im unbehandelten Lungengewebe .....	55
Abbildung 22: Immunhistochemische Analyse einer Mauslunge nach Behandlung mit Bleomycin; Färbemethode: AEC-Staining-Kit Sigma.....	56
Abbildung 23: Immunhistochemie von Mauslungen vor und nach nach Bleomycin- Behandlung; Maßstab 10 µm.....	57
Abbildung 24: Western Blot von humanem Lungengewebe .....	58
Abbildung 25: Lokalisation von PolySia im gesunden Lungengewebe Färbemethode: Fast Red.....	59

Abbildung 26: Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der PolySia-Menge in IPF- und Donor- Gewebe .....	61
Abbildung 27: Bestimmung der OD der Western Blots mit dem Programm „Tina 2.0“ .....	62
Abbildung 28: Immunhistochemie von IPF-Lungenproben .....	63
Abbildung 29: Western Blot Analysen gegen PolySia von Donoren und COPD- Patienten .....	65
Abbildung 30: Auswertung der COPD-Proben mit dem Programm „Tina 2.0“ .....	66
Abbildung 31: Lungengewebe eines COPD-Patienten .....	67
Abbildung 32: Arbeitsmodell in Bezug auf die Freisetzung von PolySia-NCAM-110 aus [146].....	78
Tabelle 1: bisherige Klassifikation der idiopathischen interstitiellen Pneumonie (IIP) .....	2
Tabelle 2: Proteinbestimmung .....	34

## 10 Literaturverzeichnis

1. Ley, B., H.R. Collard, and T.E. King, Jr., *Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(4): p. 431-40.
2. Pschyrembel, W., *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. 2007. **261**.
3. Katzenstein, A.L. and J.L. Myers, *Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(4 Pt 1): p. 1301-15.
4. Wells, A.U., *Managing diagnostic procedures in idiopathic pulmonary fibrosis*. Eur Respir Rev, 2013. **22**(128): p. 158-62.
5. Pardo, A. and M. Selman, *Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(12): p. 1534-8.
6. Selman, M., T.E. King, and A. Pardo, *Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy*. Ann Intern Med, 2001. **134**(2): p. 136-51.
7. Selman, M. and A. Pardo, *Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder*. Respir Res, 2002. **3**: p. 3.
8. *American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS)*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(2 Pt 1): p. 646-64.
9. Bogatkevich, G.S., A. Ludwicka-Bradley, and R.M. Silver, *Dabigatran, a direct thrombin inhibitor, demonstrates antifibrotic effects on lung fibroblasts*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(11): p. 3455-64.
10. Gross, T.J. and G.W. Hunninghake, *Idiopathic pulmonary fibrosis*. N Engl J Med, 2001. **345**(7): p. 517-25.
11. Marshall, R.P., R.J. McAnulty, and G.J. Laurent, *Angiotensin II is mitogenic for human lung fibroblasts via activation of the type 1 receptor*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(6): p. 1999-2004.
12. Zhang, H.Y. and S.H. Phan, *Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor beta(1)*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **21**(6): p. 658-65.
13. Demedts, M., et al., *Interstitial lung diseases: an epidemiological overview*. Eur Respir J Suppl, 2001. **32**: p. 2s-16s.

14. Johnston, I., et al., *Rising mortality from cryptogenic fibrosing alveolitis*. BMJ, 1990. **301**(6759): p. 1017-21.
15. Coultas, D.B., et al., *The epidemiology of interstitial lung diseases*. Am J Respir Crit Care Med, 1994. **150**(4): p. 967-72.
16. Schweisfurth, H., *[Report by the Scientific Working Group for Therapy of Lung Diseases: German Fibrosis Register with initial results]*. Pneumologie, 1996. **50**(12): p. 899-901.
17. Hubbard, R., I. Johnston, and J. Britton, *Survival in patients with cryptogenic fibrosing alveolitis: a population-based cohort study*. Chest, 1998. **113**(2): p. 396-400.
18. Thomeer, M.J., et al., *Comparison of registries of interstitial lung diseases in three European countries*. Eur Respir J Suppl, 2001. **32**: p. 114s-118s.
19. Bewig, B., *Idiopathische Lungenfibrose*. Pneumologie, 2005.
20. Verleden, G.M., et al., *Genetic predisposition and pathogenetic mechanisms of interstitial lung diseases of unknown origin*. Eur Respir J Suppl, 2001. **32**: p. 17s-29s.
21. Scott, J., I. Johnston, and J. Britton, *What causes cryptogenic fibrosing alveolitis? A case-control study of environmental exposure to dust*. BMJ, 1990. **301**(6759): p. 1015-7.
22. Baumgartner, K.B., et al., *Occupational and environmental risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis: a multicenter case-control study. Collaborating Centers*. Am J Epidemiol, 2000. **152**(4): p. 307-15.
23. Hubbard, R., *Occupational dust exposure and the aetiology of cryptogenic fibrosing alveolitis*. Eur Respir J Suppl, 2001. **32**: p. 119s-121s.
24. Jacobs, R.L., C.P. Andrews, and J. Coalson, *Organic antigen-induced interstitial lung disease: diagnosis and management*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2002. **88**(1): p. 30-41.
25. Vergnon, J.M., et al., *Cryptogenic fibrosing alveolitis and Epstein-Barr virus: an association?* Lancet, 1984. **2**(8406): p. 768-71.
26. Egan, J.J., et al., *Epstein-Barr virus replication within pulmonary epithelial cells in cryptogenic fibrosing alveolitis*. Thorax, 1995. **50**(12): p. 1234-9.
27. Stewart, J.P., et al., *The detection of Epstein-Barr virus DNA in lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **159**(4 Pt 1): p. 1336-41.

28. Tsukamoto, K., et al., *Involvement of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 in disease progression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis*. Thorax, 2000. **55**(11): p. 958-61.
29. Kelly, B.G., et al., *A rearranged form of Epstein-Barr virus DNA is associated with idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(4): p. 510-3.
30. Wangoo, A., et al., *Cryptogenic fibrosing alveolitis: lack of association with Epstein-Barr virus infection*. Thorax, 1997. **52**(10): p. 888-91.
31. Turner-Warwick, M., B. Burrows, and A. Johnson, *Cryptogenic fibrosing alveolitis: clinical features and their influence on survival*. Thorax, 1980. **35**(3): p. 171-80.
32. Epler, G.R., et al., *Normal chest roentgenograms in chronic diffuse infiltrative lung disease*. N Engl J Med, 1978. **298**(17): p. 934-9.
33. Johnston, I.D., et al., *British Thoracic Society study of cryptogenic fibrosing alveolitis: current presentation and initial management*. Fibrosing Alveolitis Subcommittee of the Research Committee of the British Thoracic Society. Thorax, 1997. **52**(1): p. 38-44.
34. Fellrath, J.M. and R.M. du Bois, *Idiopathic pulmonary fibrosis/cryptogenic fibrosing alveolitis*. Clin Exp Med, 2003. **3**(2): p. 65-83.
35. du Bois, R.M. and A.U. Wells, *Cryptogenic fibrosing alveolitis/idiopathic pulmonary fibrosis*. Eur Respir J Suppl, 2001. **32**: p. 43s-55s.
36. Muller, N.L., et al., *Differential diagnosis of bronchiolitis obliterans with organizing pneumonia and usual interstitial pneumonia: clinical, functional, and radiologic findings*. Radiology, 1987. **162**(1 Pt 1): p. 151-6.
37. Staples, C.A., et al., *Usual interstitial pneumonia: correlation of CT with clinical, functional, and radiologic findings*. Radiology, 1987. **162**(2): p. 377-81.
38. Akira, M., M. Sakatani, and E. Ueda, *Idiopathic pulmonary fibrosis: progression of honeycombing at thin-section CT*. Radiology, 1993. **189**(3): p. 687-91.
39. Muller, N.L., et al., *Fibrosing alveolitis: CT-pathologic correlation*. Radiology, 1986. **160**(3): p. 585-8.
40. Tung, K.T., et al., *Accuracy of the typical computed tomographic appearances of fibrosing alveolitis*. Thorax, 1993. **48**(4): p. 334-8.
41. Chan, T.Y., et al., *Cryptogenic fibrosing alveolitis and the fibrosing alveolitis of systemic sclerosis: morphological differences on computed tomographic scans*. Thorax, 1997. **52**(3): p. 265-70.

42. *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**(2): p. 277-304.
43. Hunninghake, G.W., et al., *Utility of a lung biopsy for the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(2): p. 193-6.
44. Bourke, S.C. and H. Clague, *Review of cryptogenic fibrosing alveolitis, including current treatment guidelines.* Postgrad Med J, 2000. **76**(900): p. 618-24.
45. Douglas, W.W., J.H. Ryu, and D.R. Schroeder, *Idiopathic pulmonary fibrosis: Impact of oxygen and colchicine, prednisone, or no therapy on survival.* Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(4 Pt 1): p. 1172-8.
46. Flaherty, K.R., et al., *Steroids in idiopathic pulmonary fibrosis: a prospective assessment of adverse reactions, response to therapy, and survival.* Am J Med, 2001. **110**(4): p. 278-82.
47. Zisman, D.A., et al., *Cyclophosphamide in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a prospective study in patients who failed to respond to corticosteroids.* Chest, 2000. **117**(6): p. 1619-26.
48. Davies, H.R., L. Richeldi, and E.H. Walters, *Immunomodulatory agents for idiopathic pulmonary fibrosis.* Cochrane Database Syst Rev, 2003(3): p. CD003134.
49. Tan, A., et al., *Lovastatin induces fibroblast apoptosis in vitro and in vivo. A possible therapy for fibroproliferative disorders.* Am J Respir Crit Care Med, 1999. **159**(1): p. 220-7.
50. Li, J.W., et al., *[The study of effects of pirfenidone on the pulmonary fibrosis induced by paraquat in mice].* Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi, 2011. **29**(2): p. 87-93.
51. Raghu, G., et al., *Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with a new antifibrotic agent, pirfenidone: results of a prospective, open-label Phase II study.* Am J Respir Crit Care Med, 1999. **159**(4 Pt 1): p. 1061-9.
52. Flaherty, K.R., et al., *Clinical significance of histological classification of idiopathic interstitial pneumonia.* Eur Respir J, 2002. **19**(2): p. 275-83.
53. King, T.E., Jr., et al., *Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(6): p. 1025-32.

54. Gay, S.E., et al., *Idiopathic pulmonary fibrosis: predicting response to therapy and survival*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(4 Pt 1): p. 1063-72.
55. Gomez, F.P. and R. Rodriguez-Roisin, *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) guidelines for chronic obstructive pulmonary disease*. Curr Opin Pulm Med, 2002. **8**(2): p. 81-6.
56. Nonoyama, M.L., et al., *Oxygen therapy during exercise training in chronic obstructive pulmonary disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2007(2): p. CD005372.
57. Worth, H., et al., [*Guidelines for the diagnosis and treatment chronic obstructive bronchitis and pulmonary emphysema issued by Deutsche Atemwegsliga and Deutsche Gesellschaft für Pneumologie*]. Pneumologie, 2002. **56**(11): p. 704-38.
58. Viegi, G., et al., *Definition, epidemiology and natural history of COPD*. Eur Respir J, 2007. **30**(5): p. 993-1013.
59. Lopez, A.D., et al., *Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data*. Lancet, 2006. **367**(9524): p. 1747-57.
60. Murray, C.J. and A.D. Lopez, *Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study*. Lancet, 1997. **349**(9064): p. 1498-504.
61. *The 2004 United States Surgeon General's Report: The Health Consequences of Smoking*. N S W Public Health Bull, 2004. **15**(5-6): p. 107.
62. Bernstein, J.A., et al., *Health effects of air pollution*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(5): p. 1116-23.
63. Balmes, J., et al., *American Thoracic Society Statement: Occupational contribution to the burden of airway disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(5): p. 787-97.
64. Weiss, S.T., D.L. DeMeo, and D.S. Postma, *COPD: problems in diagnosis and measurement*. Eur Respir J Suppl, 2003. **41**: p. 4s-12s.
65. Niewoehner, D.E., et al., *Prevention of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease with tiotropium, a once-daily inhaled anticholinergic bronchodilator: a randomized trial*. Ann Intern Med, 2005. **143**(5): p. 317-26.
66. Hogg, J.C. and W. Timens, *The pathology of chronic obstructive pulmonary disease*. Annu Rev Pathol, 2009. **4**: p. 435-59.
67. Turato, G., R. Zuin, and M. Saetta, *Pathogenesis and pathology of COPD*. Respiration, 2001. **68**(2): p. 117-28.

68. Geldmacher, H., et al., [*The prevalence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in Germany. Results of the BOLD study*]. Dtsch Med Wochenschr, 2008. **133**(50): p. 2609-14.
69. Mannino, D.M., *Looking beyond the cigarette in COPD*. Chest, 2008. **133**(2): p. 333-4.
70. Prasad, B.K., A.P. Sahay, and A.K. Singh, *Smoking women and their lung function tests*. Kathmandu Univ Med J (KUMJ), 2004. **2**(2): p. 142-4.
71. Tsoumakidou, M. and N.M. Siafakas, *Novel insights into the aetiology and pathophysiology of increased airway inflammation during COPD exacerbations*. Respir Res, 2006. **7**: p. 80.
72. Celli, B.R. and W. MacNee, *Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper*. Eur Respir J, 2004. **23**(6): p. 932-46.
73. Voll-Aanerud, M., et al., *Respiratory symptoms, COPD severity, and health related quality of life in a general population sample*. Respir Med, 2008. **102**(3): p. 399-406.
74. Flenley, D.C., *Diagnosis and follow-up of emphysema*. Eur Respir J Suppl, 1990. **9**: p. 5s-8s.
75. Jenkins, C. and R. Rodriguez-Roisin, *Quality of life, stage severity and COPD*. Eur Respir J, 2009. **33**(5): p. 953-5.
76. Vogelmeier, C., et al., [*Guidelines for the diagnosis and therapy of COPD issued by Deutsche Atemwegsliga and Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin*]. Pneumologie, 2007. **61**(5): p. e1-40.
77. Jarvis, S., P.W. Ind, and R.J. Shiner, *Inhaled therapy in elderly COPD patients; time for re-evaluation?* Age Ageing, 2007. **36**(2): p. 213-8.
78. van Schayck, C.P. and J. Reid, *Effective management of COPD in primary care - the role of long-acting beta agonist/inhaled corticosteroid combination therapy*. Prim Care Respir J, 2006. **15**(3): p. 143-51.
79. Graefe, L., Bönisch, *Duale Reihe Pharmakologie*. Thieme, 2011.
80. Simoons, S., M. Decramer, and G. Laekeman, *Economic aspects of antimicrobial therapy of acute exacerbations of COPD*. Respir Med, 2007. **101**(1): p. 15-26.
81. Dheda, K., et al., *Assessments for oxygen therapy in COPD: are we under correcting arterial oxygen tensions?* Eur Respir J, 2004. **24**(6): p. 954-7.
82. Nasilowski, J., et al., *Comparing supplementary oxygen benefits from a portable oxygen concentrator and a liquid oxygen portable device during a walk test in*

- COPD patients on long-term oxygen therapy.* Respir Med, 2008. **102**(7): p. 1021-5.
83. Van Overveld, F.J., et al., *Differences in responses upon corticosteroid therapy between smoking and non-smoking patients with COPD.* J Physiol Pharmacol, 2006. **57 Suppl 4**: p. 273-82.
84. Nishimura, K. and M. Tsukino, *Clinical course and prognosis of patients with chronic obstructive pulmonary disease.* Curr Opin Pulm Med, 2000. **6**(2): p. 127-32.
85. Sunyer, J., et al., *Sex differences in mortality of people who visited emergency rooms for asthma and chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(3): p. 851-6.
86. Mouratis, M.A. and V. Aidinis, *Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin.* Curr Opin Pulm Med, 2011. **17**(5): p. 355-61.
87. Advani, R., *Optimal therapy of advanced Hodgkin lymphoma.* Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2011. **2011**: p. 310-6.
88. Chandler, D.B., *Possible mechanisms of bleomycin-induced fibrosis.* Clin Chest Med, 1990. **11**(1): p. 21-30.
89. Jules-Elysee, K. and D.A. White, *Bleomycin-induced pulmonary toxicity.* Clin Chest Med, 1990. **11**(1): p. 1-20.
90. Nagano, J., et al., *Use of tacrolimus, a potent antifibrotic agent, in bleomycin-induced lung fibrosis.* Eur Respir J, 2006. **27**(3): p. 460-9.
91. Saito, F., et al., *Role of interleukin-6 in bleomycin-induced lung inflammatory changes in mice.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2008. **38**(5): p. 566-71.
92. Varki, A., *Diversity in the sialic acids.* Glycobiology, 1992. **2**(1): p. 25-40.
93. Finne, J., *Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain.* J Biol Chem, 1982. **257**(20): p. 11966-70.
94. Galuska, S.P., et al., *Polysialic acid profiles of mice expressing variant allelic combinations of the polysialyltransferases ST8SialI and ST8SiaIV.* J Biol Chem, 2006. **281**(42): p. 31605-15.
95. Schauer, R., *Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man.* Zoology (Jena), 2004. **107**(1): p. 49-64.
96. Muhlenhoff, M., M. Eckhardt, and R. Gerardy-Schahn, *Polysialic acid: three-dimensional structure, biosynthesis and function.* Curr Opin Struct Biol, 1998. **8**(5): p. 558-64.
97. Kelm, S. and R. Schauer, *Sialic acids in molecular and cellular interactions.* Int Rev Cytol, 1997. **175**: p. 137-240.

98. Varki, A. and T. Angata, *Siglecs--the major subfamily of I-type lectins*. *Glycobiology*, 2006. **16**(1): p. 1R-27R.
99. Green, P.J., et al., *Further studies of the binding specificity of the leukocyte adhesion molecule, L-selectin, towards sulphated oligosaccharides--suggestion of a link between the selectin- and the integrin-mediated lymphocyte adhesion systems*. *Glycobiology*, 1995. **5**(1): p. 29-38.
100. Crocker, P.R., J.C. Paulson, and A. Varki, *Siglecs and their roles in the immune system*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(4): p. 255-66.
101. Ohtsubo, K. and J.D. Marth, *Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease*. *Cell*, 2006. **126**(5): p. 855-67.
102. Varki, A., *Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins*. *Nature*, 2007. **446**(7139): p. 1023-9.
103. Schauer, R., *Achievements and challenges of sialic acid research*. *Glycoconj J*, 2000. **17**(7-9): p. 485-99.
104. Varki, N.M. and A. Varki, *Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease*. *Lab Invest*, 2007. **87**(9): p. 851-7.
105. Corfield, A.P., et al., *The specificity of viral sialidases. The use of oligosaccharide substrates to probe enzymic characteristics and strain-specific differences*. *Eur J Biochem*, 1982. **124**(3): p. 521-5.
106. Hinderlich, S., et al., *A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(39): p. 24313-8.
107. Kean, E.L., *Sialic acid activation*. *Glycobiology*, 1991. **1**(5): p. 441-7.
108. Harduin-Lepers, A., et al., *The human sialyltransferase family*. *Biochimie*, 2001. **83**(8): p. 727-37.
109. Kornfeld, S., et al., *The Feedback Control of Sugar Nucleotide Biosynthesis in Liver*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1964. **52**: p. 371-9.
110. Miyata, S., et al., *A major flagellum sialoglycoprotein in sea urchin sperm contains a novel polysialic acid, an alpha2,9-linked poly-N-acetylneuraminic acid chain, capped by an 8-O-sulfated sialic acid residue*. *Glycobiology*, 2004. **14**(9): p. 827-40.
111. Ijuin, T., et al., *Isolation and identification of novel sulfated and nonsulfated oligosialyl glycosphingolipids from sea urchin sperm*. *Glycoconj J*, 1996. **13**(3): p. 401-13.

112. Troy, F.A., 2nd, *Polysialylation: from bacteria to brains*. Glycobiology, 1992. **2**(1): p. 5-23.
113. Kleene, R. and M. Schachner, *Glycans and neural cell interactions*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(3): p. 195-208.
114. Comstock, L.E. and D.L. Kasper, *Bacterial glycans: key mediators of diverse host immune responses*. Cell, 2006. **126**(5): p. 847-50.
115. Rutishauser, U., et al., *The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions*. Science, 1988. **240**(4848): p. 53-7.
116. Fujimoto, I., J.L. Bruses, and U. Rutishauser, *Regulation of cell adhesion by polysialic acid. Effects on cadherin, immunoglobulin cell adhesion molecule, and integrin function and independence from neural cell adhesion molecule binding or signaling activity*. J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 31745-51.
117. Hallenbeck, P.C., et al., *Purification and properties of a bacteriophage-induced endo-N-acetylneuraminidase specific for poly-alpha-2,8-sialosyl carbohydrate units*. J Biol Chem, 1987. **262**(8): p. 3553-61.
118. Vimr, E. and C. Lichtensteiger, *To sialylate, or not to sialylate: that is the question*. Trends Microbiol, 2002. **10**(6): p. 254-7.
119. Timoszyk, A., Z. Gdaniec, and L. Latanowicz, *The effect of polysialic acid on molecular dynamics of model membranes studied by 31P NMR spectroscopy*. Solid State Nucl Magn Reson, 2004. **25**(1-3): p. 142-5.
120. Janas, T., H. Krajinski, and A. Timoszyk, *Translocation of polysialic acid across model membranes: kinetic analysis and dynamic studies*. Acta Biochim Pol, 2001. **48**(1): p. 163-73.
121. Bonfanti, L., *PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis*. Prog Neurobiol, 2006. **80**(3): p. 129-64.
122. Rutishauser, U., *Polysialic acid and the regulation of cell interactions*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(5): p. 679-84.
123. Bruses, J.L. and U. Rutishauser, *Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development*. Biochimie, 2001. **83**(7): p. 635-43.
124. Kiss, J.Z., et al., *The role of neural cell adhesion molecules in plasticity and repair*. Brain Res Brain Res Rev, 2001. **36**(2-3): p. 175-84.
125. El Maarouf, A., A.K. Petridis, and U. Rutishauser, *Use of polysialic acid in repair of the central nervous system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(45): p. 16989-94.
126. Michalides, R., et al., *NCAM and lung cancer*. Int J Cancer Suppl, 1994. **8**: p. 34-7.

127. Hildebrandt, H., et al., *Polysialic acid on the neural cell adhesion molecule correlates with expression of polysialyltransferases and promotes neuroblastoma cell growth*. Cancer Res, 1998. **58**(4): p. 779-84.
128. Tanaka, F., et al., *Expression of polysialic acid and STX, a human polysialyltransferase, is correlated with tumor progression in non-small cell lung cancer*. Cancer Res, 2000. **60**(11): p. 3072-80.
129. Komminoth, P., et al., *Polysialic acid of the neural cell adhesion molecule distinguishes small cell lung carcinoma from carcinoids*. Am J Pathol, 1991. **139**(2): p. 297-304.
130. Livingston, B.D., et al., *Extended polysialic acid chains (n greater than 55) in glycoproteins from human neuroblastoma cells*. J Biol Chem, 1988. **263**(19): p. 9443-8.
131. Roth, J., et al., *Reexpression of poly(sialic acid) units of the neural cell adhesion molecule in Wilms tumor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(9): p. 2999-3003.
132. Suzuki, M., et al., *Polysialic acid facilitates tumor invasion by glioma cells*. Glycobiology, 2005. **15**(9): p. 887-94.
133. Yabe, U., et al., *Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 13875-80.
134. Curreli, S., et al., *Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions*. J Biol Chem, 2007. **282**(42): p. 30346-56.
135. Zuber, C., et al., *Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain*. J Biol Chem, 1992. **267**(14): p. 9965-71.
136. Galuska, S.P., et al., *Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(22): p. 10250-5.
137. Thiery, J.P., et al., *Adhesion among neural cells of the chick embryo*. Prog Clin Biol Res, 1977. **15**: p. 199-206.
138. Brackenbury, R., et al., *Adhesion among neural cells of the chick embryo. I. An immunological assay for molecules involved in cell-cell binding*. J Biol Chem, 1977. **252**(19): p. 6835-40.

139. Walsh, F.S. and P. Doherty, *Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1997. **13**: p. 425-56.
140. Brummendorf, T. and F.G. Rathjen, *Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily*. Protein Profile, 1995. **2**(9): p. 963-1108.
141. Cunningham, B.A., et al., *Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing*. Science, 1987. **236**(4803): p. 799-806.
142. Nguyen, C., et al., *Localization of the human NCAM gene to band q23 of chromosome 11: the third gene coding for a cell interaction molecule mapped to the distal portion of the long arm of chromosome 11*. J Cell Biol, 1986. **102**(3): p. 711-5.
143. Goridis, C. and J.F. Brunet, *NCAM: structural diversity, function and regulation of expression*. Semin Cell Biol, 1992. **3**(3): p. 189-97.
144. He, H.T., et al., *Phosphatidylinositol is involved in the membrane attachment of NCAM-120, the smallest component of the neural cell adhesion molecule*. EMBO J, 1986. **5**(10): p. 2489-94.
145. Hinkle, C.L., et al., *Metalloprotease-induced ectodomain shedding of neural cell adhesion molecule (NCAM)*. J Neurobiol, 2006. **66**(12): p. 1378-95.
146. Ulm, C., et al., *Soluble polysialylated NCAM: a novel player of the innate immune system in the lung*. Cell Mol Life Sci, 2013.
147. Olsen, M., et al., *Intact transmembrane isoforms of the neural cell adhesion molecule are released from the plasma membrane*. Biochem J, 1993. **295 ( Pt 3)**: p. 833-40.
148. Rutishauser, U., S. Hoffman, and G.M. Edelman, *Binding properties of a cell adhesion molecule from neural tissue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(2): p. 685-9.
149. Paratcha, G., F. Ledda, and C.F. Ibanez, *The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands*. Cell, 2003. **113**(7): p. 867-79.
150. Cole, G.J. and L. Glaser, *A heparin-binding domain from N-CAM is involved in neural cell-substratum adhesion*. J Cell Biol, 1986. **102**(2): p. 403-12.
151. Milev, P., et al., *Complex-type asparagine-linked oligosaccharides on phosphacan and protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta mediate their binding to neural cell adhesion molecules and tenascin*. J Biol Chem, 1995. **270**(42): p. 24650-3.

152. Retzler, C., W. Gohring, and U. Rauch, *Analysis of neurocan structures interacting with the neural cell adhesion molecule N-CAM*. J Biol Chem, 1996. **271**(44): p. 27304-10.
153. Storms, S.D., et al., *NCAM-mediated adhesion of transfected cells to agrin*. Cell Adhes Commun, 1996. **3**(6): p. 497-509.
154. Kolkova, K., et al., *Neural cell adhesion molecule-stimulated neurite outgrowth depends on activation of protein kinase C and the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway*. J Neurosci, 2000. **20**(6): p. 2238-46.
155. Schmid, R.S., et al., *NCAM stimulates the Ras-MAPK pathway and CREB phosphorylation in neuronal cells*. J Neurobiol, 1999. **38**(4): p. 542-58.
156. Doherty, P. and F.S. Walsh, *CAM-FGF Receptor Interactions: A Model for Axonal Growth*. Mol Cell Neurosci, 1996. **8**(2/3): p. 99-111.
157. Williams, E.J., F.S. Walsh, and P. Doherty, *Tyrosine kinase inhibitors can differentially inhibit integrin-dependent and CAM-stimulated neurite outgrowth*. J Cell Biol, 1994. **124**(6): p. 1029-37.
158. Kristiansen, L.V., et al., *Homophilic NCAM interactions interfere with L1 stimulated neurite outgrowth*. FEBS Lett, 1999. **464**(1-2): p. 30-4.
159. Kiryushko, D., et al., *A synthetic peptide ligand of neural cell adhesion molecule (NCAM), C3d, promotes neuritogenesis and synaptogenesis and modulates presynaptic function in primary cultures of rat hippocampal neurons*. J Biol Chem, 2003. **278**(14): p. 12325-34.
160. Muller, D., et al., *PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity*. Neuron, 1996. **17**(3): p. 413-22.
161. Rutishauser, U., et al., *Mechanisms of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(2): p. 577-81.
162. Zhang, H., et al., *A role for the polysialic acid-neural cell adhesion molecule in PDGF-induced chemotaxis of oligodendrocyte precursor cells*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 1): p. 93-103.
163. Florence, S.L., H.B. Taub, and J.H. Kaas, *Large-scale sprouting of cortical connections after peripheral injury in adult macaque monkeys*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1117-21.
164. Monnier, P.P., et al., *The polysialic acid moiety of the neural cell adhesion molecule is involved in intraretinal guidance of retinal ganglion cell axons*. Dev Biol, 2001. **229**(1): p. 1-14.
165. Vutskits, L., et al., *The polysialylated neural cell adhesion molecule promotes neurogenesis in vitro*. Neurochem Res, 2006. **31**(2): p. 215-25.

166. Yamamoto, N., et al., *Inhibitory mechanism by polysialic acid for lamina-specific branch formation of thalamocortical axons*. J Neurosci, 2000. **20**(24): p. 9145-51.
167. Bruses, J.L., et al., *Polysialic acid and the formation of oculomotor synapses on chick ciliary neurons*. J Comp Neurol, 2002. **446**(3): p. 244-56.
168. Aimone, J.B., J. Wiles, and F.H. Gage, *Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories*. Nat Neurosci, 2006. **9**(6): p. 723-7.
169. Ming, G.L. and H. Song, *Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system*. Annu Rev Neurosci, 2005. **28**: p. 223-50.
170. Prescher, J.A., D.H. Dube, and C.R. Bertozzi, *Chemical remodelling of cell surfaces in living animals*. Nature, 2004. **430**(7002): p. 873-7.
171. Poltorak, M., et al., *Disturbances in cell recognition molecules (N-CAM and L1 antigen) in the CSF of patients with schizophrenia*. Exp Neurol, 1995. **131**(2): p. 266-72.
172. Mikkonen, M., et al., *Hippocampal plasticity in Alzheimer's disease: changes in highly polysialylated NCAM immunoreactivity in the hippocampal formation*. Eur J Neurosci, 1999. **11**(5): p. 1754-64.
173. Barbeau, D., et al., *Decreased expression of the embryonic form of the neural cell adhesion molecule in schizophrenic brains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(7): p. 2785-9.
174. Ong, E., et al., *Developmental regulation of polysialic acid synthesis in mouse directed by two polysialyltransferases, PST and STX*. Glycobiology, 1998. **8**(4): p. 415-24.
175. Angata, K., et al., *Human STX polysialyltransferase forms the embryonic form of the neural cell adhesion molecule. Tissue-specific expression, neurite outgrowth, and chromosomal localization in comparison with another polysialyltransferase, PST*. J Biol Chem, 1997. **272**(11): p. 7182-90.
176. Angata, T. and A. Varki, *Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective*. Chem Rev, 2002. **102**(2): p. 439-69.
177. Muhlenhoff, M., et al., *The impact of N-glycosylation on the functions of polysialyltransferases*. J Biol Chem, 2001. **276**(36): p. 34066-73.
178. Yoshida, Y., et al., *Genomic structure and promoter activity of the mouse polysialic acid synthase gene (mST8Sia II). Brain-specific expression from a TATA-less GC-rich sequence*. J Biol Chem, 1996. **271**(47): p. 30167-73.

179. Takashima, S., et al., *Genomic structure and promoter activity of the mouse polysialic acid synthase (mST8Sia IV/PST) gene*. J Biol Chem, 1998. **273**(13): p. 7675-83.
180. Eckhardt, M. and R. Gerardy-Schahn, *Genomic organization of the murine polysialyltransferase gene ST8SiaIV (PST-1)*. Glycobiology, 1998. **8**(12): p. 1165-72.
181. Seidenfaden, R., R. Gerardy-Schahn, and H. Hildebrandt, *Control of NCAM polysialylation by the differential expression of polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV*. Eur J Cell Biol, 2000. **79**(10): p. 680-8.
182. Nakata, D., L. Zhang, and F.A. Troy, 2nd, *Molecular basis for polysialylation: a novel polybasic polysialyltransferase domain (PSTD) of 32 amino acids unique to the alpha 2,8-polysialyltransferases is essential for polysialylation*. Glycoconj J, 2006. **23**(5-6): p. 423-36.
183. Angata, K., et al., *Differential biosynthesis of polysialic acid on neural cell adhesion molecule (NCAM) and oligosaccharide acceptors by three distinct alpha 2,8-sialyltransferases, ST8Sia IV (PST), ST8Sia II (STX), and ST8Sia III*. J Biol Chem, 2000. **275**(24): p. 18594-601.
184. Sato, C., et al., *Frequent occurrence of pre-existing alpha 2-->8-linked disialic and oligosialic acids with chain lengths up to 7 Sia residues in mammalian brain glycoproteins. Prevalence revealed by highly sensitive chemical methods and anti-di-, oligo-, and poly-Sia antibodies specific for defined chain lengths*. J Biol Chem, 2000. **275**(20): p. 15422-31.
185. Close, B.E., K. Tao, and K.J. Colley, *Polysialyltransferase-1 autopolysialylation is not requisite for polysialylation of neural cell adhesion molecule*. J Biol Chem, 2000. **275**(6): p. 4484-91.
186. Close, B.E., et al., *The polysialyltransferase ST8Sia II/STX: posttranslational processing and role of autopolysialylation in the polysialylation of neural cell adhesion molecule*. Glycobiology, 2001. **11**(11): p. 997-1008.
187. Angata, K., M. Suzuki, and M. Fukuda, *Differential and cooperative polysialylation of the neural cell adhesion molecule by two polysialyltransferases, PST and STX*. J Biol Chem, 1998. **273**(43): p. 28524-32.
188. Angata, K. and M. Fukuda, *Polysialyltransferases: major players in polysialic acid synthesis on the neural cell adhesion molecule*. Biochimie, 2003. **85**(1-2): p. 195-206.
189. Frosch, M., et al., *NZB mouse system for production of monoclonal antibodies to weak bacterial antigens: isolation of an IgG antibody to the polysaccharide*

- capsules of Escherichia coli K1 and group B meningococci*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(4): p. 1194-8.
190. Stummeyer, K., et al., *Crystal structure of the polysialic acid-degrading endosialidase of bacteriophage K1F*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(1): p. 90-6.
191. Maynard, L.M., et al., *Secular trends in desired weight of adults*. Int J Obes (Lond), 2006. **30**(9): p. 1375-81.
192. Lackie, P.M., C. Zuber, and J. Roth, *Polysialic acid of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) is widely expressed during organogenesis in mesodermal and endodermal derivatives*. Differentiation, 1994. **57**(2): p. 119-31.
193. Muhlenhoff, M., et al., *Brain development needs sugar: the role of polysialic acid in controlling NCAM functions*. Biol Chem, 2009. **390**(7): p. 567-74.
194. Hildebrandt, H., et al., *Imbalance of neural cell adhesion molecule and polysialyltransferase alleles causes defective brain connectivity*. Brain, 2009. **132**(Pt 10): p. 2831-8.
195. Lazo, J.S. and S.M. Sebti, *Bleomycin*. Cancer Chemother Biol Response Modif, 1994. **15**: p. 44-50.
196. Hoffman, S., et al., *Chemical characterization of a neural cell adhesion molecule purified from embryonic brain membranes*. J Biol Chem, 1982. **257**(13): p. 7720-9.
197. Tanaka, F., et al., *Prognostic significance of polysialic acid expression in resected non-small cell lung cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(4): p. 1666-70.
198. Cerna, A., et al., *Changes in sialic acid expression in the lung during intrauterine development of the human fetus*. Acta Histochem, 2002. **104**(4): p. 339-42.
199. Scheidegger, E.P., et al., *In vitro and in vivo growth of clonal sublines of human small cell lung carcinoma is modulated by polysialic acid of the neural cell adhesion molecule*. Lab Invest, 1994. **70**(1): p. 95-106.
200. Moeller, A., et al., *The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis?* Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(3): p. 362-82.
201. Seldeslagh, K.A. and J.M. Lauweryns, *NCAM expression in the pulmonary neural and diffuse neuroendocrine cell system*. Microsc Res Tech, 1997. **37**(1): p. 69-76.
202. Peng, R., et al., *Bleomycin induces molecular changes directly relevant to idiopathic pulmonary fibrosis: a model for "active" disease*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e59348.

203. Huaux, F., et al., *Dysregulated proinflammatory and fibrogenic phenotype of fibroblasts in cystic fibrosis*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64341.
204. van Eeden, S.F., et al., *Systemic response to ambient particulate matter: relevance to chronic obstructive pulmonary disease*. Proc Am Thorac Soc, 2005. **2**(1): p. 61-7.
205. Drake, P.M., et al., *Polysialic acid, a glycan with highly restricted expression, is found on human and murine leukocytes and modulates immune responses*. J Immunol, 2008. **181**(10): p. 6850-8.
206. Strieter, R.M., *Con: Inflammatory mechanisms are not a minor component of the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **165**(9): p. 1206-7; discussion 1207-8.
207. Stockley, R.A., *Neutrophils and the pathogenesis of COPD*. Chest, 2002. **121**(5 Suppl): p. 151S-155S.
208. Brashier, B.B. and R. Kodgule, *Risk factors and pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD)*. J Assoc Physicians India, 2012. **60 Suppl**: p. 17-21.
209. Pinto-Plata, V.M., et al., *C-reactive protein in patients with COPD, control smokers and non-smokers*. Thorax, 2006. **61**(1): p. 23-8.
210. Fabbri, L.M. and K.F. Rabe, *From COPD to chronic systemic inflammatory syndrome? Lancet*, 2007. **370**(9589): p. 797-9.
211. Rose, C., *Commentary on "COPD causation and workplace exposures: an assessment of agreement among expert clinical raters"*. COPD, 2013. **10**(2): p. 123-4.
212. Dello Sbarba, P. and E. Rovida, *Transmodulation of cell surface regulatory molecules via ectodomain shedding*. Biol Chem, 2002. **383**(1): p. 69-83.
213. Secher, T., *Soluble NCAM*. Adv Exp Med Biol, 2010. **663**: p. 227-42.
214. Heijink, I.H., et al., *Role of aberrant metalloproteinase activity in the pro-inflammatory phenotype of bronchial epithelium in COPD*. Respir Res, 2011. **12**: p. 110.
215. Drake, P.M., et al., *Polysialic acid governs T-cell development by regulating progenitor access to the thymus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(29): p. 11995-2000.
216. Nathan, C., *Neutrophils and immunity: challenges and opportunities*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(3): p. 173-82.
217. Hickey, M.J. and P. Kubes, *Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 364-75.

218. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
219. Fuchs, T.A., A.A. Bhandari, and D.D. Wagner, *Histones induce rapid and profound thrombocytopenia in mice*. Blood, 2011. **118**(13): p. 3708-14.
220. Saffarzadeh, M., et al., *Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e32366.
221. Marcos, V., et al., *CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation*. Nat Med, 2010. **16**(9): p. 1018-23.
222. Villanueva, E., et al., *Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 2011. **187**(1): p. 538-52.
223. Crocker, P.R., *Siglecs in innate immunity*. Curr Opin Pharmacol, 2005. **5**(4): p. 431-7.
224. Wang, Y. and H. Neumann, *Alleviation of neurotoxicity by microglial human Siglec-11*. J Neurosci, 2010. **30**(9): p. 3482-8.

## 11 Publikationsverzeichnis

### Vortrag

Sebastian P. Galuska, Martina Korfei, Sandra Mueller, Susanne Rinné, Rita Gerardy Schahn, Martina Mühlenhoff, Hildegard Geyer, Andreas Guenther and Rudolf Geyer  
*“Increased polysialylation during idiopathic pulmonary fibrosis”*  
08 – 10.11.2009 Joint Meeting Glycobiology in Köln, Deutschland

### Publikation

Christina Ulm, Mona Saffarzadeh, Poornima Mahavadi, Hildegard Geyer, Sandra Müller, Nils Bayer, Farhan Sabor, Ralf Middendorff, Thomas Lütteke, Susanne Rinné, Eva Böttcher-Friebertshäuser, Rita Gerardy-Schahn, Martina Mühlenhoff, Klaus T. Preissner, Andreas Günther, Rudolf Geyer and Sebastian P. Galuska  
*“Soluble polysialylated NCAM-110: A Novel Player of the Innate Immune system in the lung Generated by Lung Epithelial Cells”*,  
in Cellular and Molecular Life Sciences April 2013

### Poster

Sebastian P. Galuska, Martina Korfei, Sandra Müller, Susanne Rinné, Rita Gerardy-Schahn, Martina Mühlenhoff, Hildegard Geyer, Andreas Günther und Rudolf Geyer  
*“Increasing Polysialylation during Idiopathic Pulmonary Fibrosis”*  
ECCPS-Minisympodium Bad Nauheim vom 3. – 4. Juli 2009

Ulm, C.; Mahavadi, P.; Müller, S.; Rinné, S.; Geyer, H.; Gerardy-Schahn, R.; Mühlenhoff, M.; Günther, A.; Geyer, R. and Galuska, SP.  
*“Increased polysialylation in lung tissue of patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)”* 22nd Joint Meeting of the Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie, the Groupe Lillois de Glycobiologie, and the Belgian Working Group for Glycosciences  
27. - 29.11.2011 in Lille, Frankreich

Ulm, C.; Mahavadi, P.; Müller, S.; Rinné, S.; Geyer, H.; Gerardy-Schahn, R.; Mühlenhoff, M.; Günther, A.; Geyer, R. and Galuska, SP.  
*“Increased polysialylation in lung tissue of patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)”*

European Respiratory Society, Amsterdam 2011, Annual Congress

24. - 28.09.2011 in Amsterdam, Niederlande

Ulm, C.; Müller, S.; Korfei, M.; Rinné, S.; Geyer, H.; Gerardy-Schahn, R.; Mühlenhoff, M.; Günther, A.; Geyer, R. and Galuska, SP.

*“Increased polysialylation in lung tissue of patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)”*

11th European Training Course on Carbohydrates. European Science Foundation and Carbohydrate Competence Centre

17. - 20.05.2010 in Wageningen, Niederlande

## 12 Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert.

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

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich im Rahmen dieser Dissertationsarbeit in jeglicher Form unterstützt haben.

Ich danke Herrn Prof. Rudolf Geyer, der es mir ermöglicht hat, meine Promotion mit diesem interessanten Thema anzufertigen.

Bei meinem Betreuer Dr. Sebastian Galuska bedanke ich mich für seine Einarbeitung, Anregungen und Unterstützung. Seine Hilfsbereitschaft und Förderung während meiner Promotionsarbeit schätze ich sehr.

Ich danke Herrn Prof. Günter Lochnit für seine Anregungen und Ratschläge, die diese Promotionsarbeit bereichert haben.

Ein herzlicher Dank geht auch an Martina Mühlenhoff und Herrn Prof. Günther für die Bereitstellung der histologischen Schnitte und Bearbeitung der BleoMäuse.

Der Arbeitsgruppe Geyer danke ich für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern, weil sie mir das Studium ermöglicht haben und mich in allen Situationen immer unterstützten und aufmunterten. Ich konnte immer auf meine Familie zurückgreifen, der ich auch für ihre Geduld, Rücksicht und Förderung danke.