

Die Rolle des C1-Esterase-Inhibitors in der Progression der idiopathischen pulmonalen Fibrose

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Weiß, Benjamin Stefan

aus

Offenbach am Main

Gießen 2016

Aus der Klinik für Innere Medizin

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. Werner Seeger

Gutachter: Prof. Dr. M. Wygrecka-Markart

Gutachter: Prof. Dr. L. Fink

Tag der Disputation: 02.05.2017

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	I
II.	Abbildungsverzeichnis.....	IV
III.	Tabellenverzeichnis	V
IV.	Abkürzungsverzeichnis	VI
V.	Zusammenfassung.....	IX
VI.	Summary.....	XI
1.	Einleitung	1
1.1.	Diffus parenchymatöse Lungenerkrankungen	1
1.2.	Idiopathisch interstitielle Pneumonien	2
1.3.	Idiopathische pulmonale Fibrose	2
1.3.1.	Definition und klinische Bedeutung.....	2
1.3.2.	Klinische Symptome.....	3
1.3.3.	Risikofaktoren und Genetik	3
1.3.4.	Diagnostik	4
1.3.5.	Pathogenese.....	5
1.3.6.	Therapie der IPF	7
1.3.6.1.	Medikamentöse Therapie.....	7
1.3.6.2.	Nichtmedikamentöse Therapie.....	7
1.4.	Die nicht spezifische interstitielle Pneumonie	8
1.5.	Das Gerinnungssystem	8
1.6.	Die pathophysiologische Rolle der Gerinnungsfaktoren im Rahmen der IPF	9
1.7.	Das Komplementsystem	11
1.7.1.	Der klassische Weg	11
1.7.2.	Der alternative Weg	11
1.7.3.	Der Lektin-Weg	12
1.7.4.	Aktivierung mittels C-reaktivem Protein.....	12
1.8.	Das Kontaktsystem	12
1.9.	Aufbau und pathogenetische Beteiligung des Komplementproteins C1	13
1.10.	Serin-Protease-Inhibitoren	13
1.11.	C1-Esterase-Inhibitor	14
1.11.1.	Aufbau und Eigenschaften des C1-Inhibitors.....	14
1.11.2.	Interaktion des C1-Inhibitors und des Ziel-Proteins	15
1.11.3.	Substrate des C1-Inhibitors	15
1.11.4.	Physiologische Aktivitäten des C1-Inhibitors	16

1.11.4.1.	Pathophysiologische Eigenschaften von C1-Inhibitor in Hereditärem Angioödem.....	16
1.11.4.2.	Pathophysiologische Eigenschaften von C1-Inhibitor in Sepsis.....	17
1.11.4.3.	Pathophysiologische Eigenschaften von C1-Inhibitor in anderen Erkrankungen	18
2.	Fragestellung	19
3.	Materialien, Geräte und Methoden	20
3.1.	Materialien und Geräte.....	20
3.1.1.	Geräte.....	20
3.1.2.	Reagenzien.....	21
3.2.	Methoden	23
3.2.1.	Probenmaterial.....	23
3.2.1.1.	Humanes Lungengewebe	23
3.2.1.2.	Humane Zitrat-Blutproben	24
3.2.1.3.	Humane bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit.....	25
3.2.2.	Western-Blot	25
3.2.2.1.	Proteinquantifizierung und Aufbereitung der Proben für die Gelelektrophorese	26
3.2.2.2.	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese.....	26
3.2.2.3.	Immunoblott	27
3.2.3.	Enzym linked Immunsorbent Assay.....	28
3.2.3.1.	C1-Inhibitor-Konzentration in Lungenhomogenaten, Blutplasma-Proben und BALF-Proben	28
3.2.3.2.	C1-Inhibitor-Aktivität in Blutplasma-Proben	29
3.2.3.3.	ELISA zur Bestimmung der C1-Inhibitor-Histon-Komplexe	31
3.2.4.	Immunhistochemie	31
3.2.5.	Humane Lungengewebe Homogenisierung und RNA-Isolierung.....	32
3.2.6.	Aufbereitung von humanen Blutzellen und RNA-Isolierung	33
3.2.7.	Isolierung von Alveolarepithel-Typ II-Zellen und RNA-Isolierung	33
3.2.8.	Reverse Transkription	34
3.2.9.	Real time Polymerasekettenreaktion	35
3.2.10.	Statistik	36
4.	Ergebnisse	37
4.1.	C1-Inhibitor-Expression zeigt keine Unterschiede zwischen IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Spendern in humanen Lungenhomogenaten	37
4.2.	Erniedrigung der C1-Inhibitor-Ausprägung von IPF-Patienten in der bronchoalveolären Lavage	40

4.3.	Keine Unterschiede der C1-Inhibitor-Ausprägung und Aktivität in humanen Blutplasma-Proben	42
4.4.	Molekulargenetischer Nachweis von C1-Inhibitor	46
4.5.	Lokalisation des C1-Inhibitors in der Lunge	48
4.6.	Analyse verschiedener klinischer Parameter im Zusammenhang mit der C1-Inhibitor-Konzentration in IPF-BALF	50
4.6.1.	Korrelation von Entzündungsparametern und der C1-Inhibitor-Konzentration in IPF-BALF	50
4.6.2.	Korrelation zwischen der C1-Inhibitor-Konzentration in BALF von IPF-Patienten und der forcierten Vitalkapazität	51
4.7.	Erhöhte C1-Inhibitor-Histon-Komplexverbindungen bei IPF-Patienten	52
5.	Diskussion	55
6.	Schlussfolgerung	61
7.	Literaturverzeichnis	63
8.	Erklärung zur Dissertation	71
9.	Curriculum vitae	72
10.	Danksagung	73

II. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 4.1. Keine Unterschiede in der C1-INH-Expression in humanen Lungenhomogenaten von IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Spendern
- Abbildung 4.2. Densitometrischen Auswertung der Western-Blot-Ergebnisse der humanen Lungenhomogenaten von IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Spendern
- Abbildung 4.3. Keine C1-INH-Konzentrationsunterschiede in humanen Lungenhomogenaten von IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Spendern
- Abbildung 4.4. Erniedrigte C1-INH-Expression in IPF-BALF
- Abbildung 4.5. Signifikant erniedrigte C1-INH-Konzentration in IPF-BALF
- Abbildung 4.6. Keine Unterschiede in der C1-INH-Expression im Blutplasma von IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Gesunden
- Abbildung 4.7. Keine C1-INH-Konzentrationsunterschiede in humanem Blutplasma von IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Gesunden
- Abbildung 4.8. qPCR der C1-INH-mRNA-Expression in humanen Lungenhomogenaten von IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Spendern
- Abbildung 4.9. qPCR der C1-INH-mRNA-Expression in Alveolarepithel-Typ II-Zellen von IPF-Patienten und Spendern
- Abbildung 4.10. qPCR der C1-INH-mRNA-Expression in Blutzellen von IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Spendern
- Abbildung 4.11. Immunhistochemische Färbung von C1-INH in IPF-Lungen und Spenderlungen
- Abbildung 4.12. Keine Korrelation zwischen C1-INH-Konzentration in BALF und Blutleukozytenzahl von IPF-Patienten
- Abbildung 4.13. Negative Korrelation zwischen C1-INH-Konzentration in BALF und CRP im Blut von IPF-Patienten
- Abbildung 4.14. Positive Korrelation zwischen C1-INH-Konzentration in BALF und forcierter Vitalkapazität (FVC) von IPF-Patienten
- Abbildung 4.15. Nachweis von C1-INH-His in IPF-BALF
- Abbildung 4.16. Negative Korrelation zwischen C1-INH-His-Komplexen und C1-INH-Konzentration in IPF-BALF
- Abbildung 4.17. Negative Korrelation zwischen Anzahl C1-INH-His-Komplexen und der FVC von IPF-Patienten

III. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 3.1. Demographische und klinische Daten von IPF-Erkrankten und NSIP-Erkrankten (Lungenhomogenate)
- Tabelle 3.2. Demographische und klinische Daten von IPF-Erkrankten und NSIP-Erkrankten (Blutplasma)
- Tabelle 3.3. Demographische und klinische Daten von IPF-Erkrankten und NSIP-Erkrankten (BALF)
- Tabelle 3.4. Zusammensetzung des Master Mix für die reverse Transkription
- Tabelle 3.5. Reaktionszyklen der reversen Transkription
- Tabelle 3.6. Zusammensetzung des Master Mix für die qPCR
- Tabelle 3.7. Reaktionszyklen der qPCR
- Tabelle 4.8. C1-INH-Aktivität im Blutplasma

IV. Abkürzungsverzeichnis

AE	arbiträre Einheiten
AE-IPF	Akute Exazerbationen der IPF
AIP	Akut interstitielle Pneumonie
ALI	Akutes Lungenversagen
AM	Alveolarmakrophagen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrom
AT I	Alveolarepithel-Typ I-Zellen
AT II	Alveolarepithel-Typ II-Zellen
ATS	American Thoracic Society
BALF	bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BK	Bradykinin
BP	Blutplasma
BSA	bovines Serumalbumin
C1-INH	C1-Inhibitor
C1-INH-His	C1-Inhibitor-Histon-Komplexe
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO	Kohlenstoffmonoxid
COP	kryptogen organisierende Pneumonie
CRP	C-reaktive Protein
CTGF	Connective tissue growth factor
DAMPs	damage-associated molecular patterns
DIP	desquamativ interstitielle Pneumonie
DL _{CO}	Diffusionskapazität für Kohlenstoffmonoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EC	Gefäßendothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym linked Immunsorbent Assay
ELMOD2	ELMO domain containing 2
ERS	European Respiratory Society
FGF	Fibroblast growth factor
FVC	forcierte Vitalkapazität
HAE	hereditäres Angioödem
HCl	Chlorwasserstoffsäure

HMWK	High molecular weight Kininogen
HRCT	hochauflösende Computertomographie
HRP	Meerrettich-Peroxidas
IFN- α	Interferon-alpha
IFN- γ	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IIP	idiopathisch interstitielle Pneumonie
ILD	interstitielle Lungenerkrankung
IPF	idiopathische pulmonale Fibrose
KLK	Kallikrein
LH	Lungenhomogenat
LIP	lymphoid interstitielle Pneumonie
LPS	Lipopolysaccharide
MAC	Membrane Attack Komplex
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MEM	Minimum Essential Medium
MUC5B	Mucin 5B
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NSIP	nicht spezifische interstitielle Pneumonie
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PAR	Protease-activated receptor
PBS	Phosphate buffered saline
PBS-T	Phosphate buffered saline + 0,1% Tween 20
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	real time PCR
RB-ILD	respiratorische Bronchiolitis mit interstitielle Lungenerkrankung
RIPA	Radio Immuno Precipitation Assay
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger RNA
ProSPC	Pro-Surfactant-Protein C
RT	reverse Transkription

SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
SPC	Surfactant-Protein C
TBS	Tris-buffered saline Puffer
TBS-T	Tris-buffered saline Puffer + 0,1% Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Tissue Factor
TGF- β 1	Transforming growth factor-beta 1
TLC	totale Lungenkapazität
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor-alpha
t-PA	tissue-Plasminogen Aktivator
UIP	usual interstitial pneumonia
u-PA	Urokinase
VATS	video-assistierte-Thorakoskopie
VC	Vitalkapazität
VEGF	vascular endothelial growth factor

V. Zusammenfassung

Die idiopathische Lungenfibrose (IPF) ist eine progredient verlaufende, chronische fibroproliferative interstitielle Lungenerkrankung mit ungünstiger Prognose. In der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) von IPF-Patienten findet sich häufig ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antikoagulatorischen Faktoren, das eine veränderte alveoläre Homöostase mit vermehrter intraalveolärer Ablagerung von Fibrin begünstigt. Neben der Rolle in der Bildung von Fibrin scheinen die prokoagulatorischen Faktoren auch zelluläre Aktivitäten zu regulieren, die zur Proliferation von Fibroblasten, zur Produktion von Zytokinen und zur vermehrten Expression von extrazellulären Matrixkomponenten führen. Bislang wurde hauptsächlich die Rolle von Faktoren der extrinsischen Gerinnungskaskade in der Pathogenese der IPF untersucht. Jüngere Untersuchungen zeigten aber auch eine Beteiligung von Proteinen des Kontaktsystems und des Kallikrein-Kinin-Systems an der Ausbildung der vorgenannten Erkrankung. So zeigte sich insbesondere Faktor XII, über seine Fähigkeit das Verhalten von Fibroblasten- und Alveolarepithelzellen zu regulieren, als neuer Faktor zur Pathobiologie der IPF beizutragen. Zusätzlich zeigte sich, dass eine pharmakologische Inhibierung von Faktor XII zu einer Abschwächung der bleomycin-induzierten Lungenfibrose führt. Dennoch gibt es bislang noch keine Studien, die den Einfluss von C1-Inhibitor (C1-INH), dem endogenen Inhibitor von Faktor XII und Kallikrein, auf den Verlauf der IPF bemessen. Daher war es Ziel dieser Arbeit die Bedeutung des C1-INH im Rahmen der IPF zu evaluieren.

Es zeigt sich in dieser Arbeit eine deutliche Erniedrigung der C1-INH-Konzentration in der BALF von IPF-Patienten im Vergleich zu Gesunden und NSIP-Patienten. Durch den Nachweis von C1-INH-mRNA in AT II konnte die Lunge zwar als mögliche extrahepatische Quelle von C1-INH gesehen werden, eine verminderte lokale Synthese als Ursache für die Konzentrationserniedrigung des C1-INH in der BALF von IPF-Patienten war jedoch nicht nachweisbar. Ebenfalls ließ sich die Bildung von C1-INH-Protease-Komplexen als weitere Ursache für einen erhöhten Verbrauch von C1-INH nicht bestätigen. Jedoch ließen sich Komplexe zwischen C1-INH und Histon-Proteinen in IPF-BALF-Proben nachweisen, die möglicherweise eine verminderte lokale C1-INH-Konzentration begünstigen. Zusätzlich zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der C1-INH-Konzentration in der BALF von IPF-Proben und der forcierten Vitalkapazität, sowie eine negative Korrelation zwischen der C1-INH-Konzentration und der Anzahl der C1-INH-Histon-Komplexen in der IPF-BALF sowie des C1-INH BALF-Levels.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass der Verbrauch von C1-INH nicht nur eine erhöhte Aktivität von Proteinen des Kontaktsystems begünstigen könnte, sondern

auch proinflammatorische und zytotoxische Effekte von extrazellulären Histon-Proteinen verstärken könnte. Somit könnte C1-INH, auf der einen Seite über die Inhibierung von Faktor XII und auf der anderen Seite über die Neutralisation von extrazellulären Histon-Proteinen, einen doppelt positiven Effekt auf den Progress der IPF haben.

VI. Summary

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic progressive fibroproliferative interstitial lung disease with a unfavorable prognosis. An imbalance of procoagulant and anticoagulant factors has frequently been observed in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from IPF patients, promoting an altered alveolar homeostasis with an increased intraalveolar deposition of fibrin. Besides their role in fibrin formation, the procoagulant factors may also regulate numerous cellular activities leading to fibroblast proliferation, cytokine production and exaggerated expression of extracellular matrix components. To date, research has primarily been focused on the role of the extrinsic coagulation cascade in the pathogenesis of IPF. However, recent studies revealed an involvement of proteins belonging to the contact and the kallikrein-kinin system in the development of aforementioned disease. Accordingly, factor XII was distinctly identified as a new player, contributing *via* its ability to regulate fibroblast and alveolar epithelial cell behaviour to the pathobiology of IPF. In addition, it has been shown that the pharmacological blockage of factor XII leads to attenuation of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. However, there are no studies assessing the influence of C1-inhibitor (C1-INH), the endogenous inhibitor of factor XII and kallikrein on the course of IPF. Therefore, the aim of this study was to evaluate the role of C1-INH in the pathogenesis of IPF.

This study demonstrates marked decrease of C1-INH-concentration in BALF of IPF patients as compared to healthy subjects and NSIP patients. With detection of C1-INH-mRNA in AT II, the lung was shown to be a possible extrahepatic origin of C1-INH, but an attenuated local synthesis as the source of a diminished local concentration of C1-INH in BALF of IPF patients could not be verified. Similarly, the formation of C1-INH-protease-complexes as the further cause of elevated C1-INH consumption has not been observed. However, complexes between C1-INH and histones have been detected in IPF BALF samples, possibly causing a reduced local concentration of C1-INH protein. In addition the positive correlation between the C1-INH concentration in IPF BALF and forced vital capacity as well as the negative correlation between the amount of C1-INH-Histon-complexes in IPF BALF and C1-INH BALF levels have been seen.

In conclusion, these results reveal that consumption of C1-INH may not only propagate increased activity of contact system proteins but also enhance proinflammatory and cytotoxic effect of extracellular histones. Thus, C1-INH could have double positive effect on the one hand via inhibition of factor XII and on the other hand via neutralisation of extracellular histones.

1. Einleitung

1.1. Diffus parenchymatöse Lungenerkrankungen

Der Begriff der diffus parenchymatösen Lungenerkrankungen, auch synonym verwendet als interstitielle Lungenerkrankungen (ILD), umfasst eine Gruppe heterogener Krankheitsbilder, bei deren gemeinsamen Merkmal es sich um krankhafte Veränderungen im Interstitium der alveolo-kapillären Membran der Lunge handelt (1). Im Vordergrund steht dabei die Infiltration des Lungenparenchyms durch zelluläres oder nicht-zelluläres Material mit einer entzündlichen, granulomatösen oder fibroproliferativen Gewebereaktion. Insgesamt können über einhundert Differentialdiagnosen aus ätiologischer, klinischer, radiologischer und pathologischer Sicht voneinander abgegrenzt werden, was insbesondere einen großen Einfluss auf die Abschätzung des Krankheitsverlaufes, der damit verbundenen Prognose und der adäquaten Therapieentscheidung hat (2). In Anlehnung an die aktuell gültige American Thoracic Society (ATS) und European Respiratory Society (ERS) Konsensusklassifikation der diffus parenchymatösen Lungenerkrankungen lassen sich vier große Hauptgruppen unterscheiden: Zum einen die der ILD bekannter Ursache, wie z.B. medikamenteninduziert oder in Assoziation mit Kollagenosen und Vasculitiden, zum anderen die der granulomatösen Erkrankungen, wie z.B. Sarkoidose. Als Drittes die Gruppe der seltenen Entitäten oder anderen Formen diffus parenchymatöser Lungenerkrankungen, die unter anderem die Langerhans-Zell-Histiozytose betrifft und zuletzt die Gruppe der idiopathisch interstitiellen Pneumonien (IIP). Der diagnostische Algorithmus bei Patienten mit einer ILD bzw. deren Zuordnung zu einer Subklassifikation umfasst unter anderem ein sorgfältiges Anamnesegespräch mit Erhebung sowohl demographischer Daten (Alter, Geschlecht, Rasse), Familien- und Berufsanamnese zur Abschätzung von relevanten umwelt- oder arbeitsbedingten Schadstoffexpositionen, spezieller Lebensgewohnheiten wie z.B. Nikotin-, Medikamenten- oder Drogenkonsum als auch eine genaue Befragung zu Ursprung und Fortschreiten erster Symptome (z.B. Husten, Dyspnoe etc.) und Komorbiditäten (z.B. maligne Erkrankungen oder Systemerkrankungen). Der Anamneseerhebung sollte eine ausführliche körperliche Untersuchung folgen, die den Fokus auf das Vorliegen von Hinweisen auf eine Lungenerkrankung (z.B. Rasselgeräusche, Trommelschlegelfinger) legt. Im Anschluss kann eine nichtinvasive (z.B. bildgebende Verfahren, Lungenfunktionstest) und falls erforderlich invasive Diagnostik (z.B. Lungenbiopsie) zur Bestätigung oder genaueren Evaluation durchgeführt werden (3).

1.2. Idiopathisch interstitielle Pneumonien

Die IIPs sind definiert als eine heterogene Gruppe von Erkrankungen mit je nach Ausprägung und Entität entzündlichen und fibrotischen Affektionen des Lungeninterstitiums. Idiopathisch impliziert dabei, dass die Ursache der Schädigung unbekannt ist (3). Die IIPs lassen sich in sieben klinisch-radiologisch-pathologisch unterschiedliche Kategorien einteilen: Die idiopathische pulmonale Fibrose (IPF), die mit ca. 60% die größte Entität darstellt, gefolgt von der nicht spezifisch interstitiellen Pneumonie (NSIP), der kryptogen organisierenden Pneumonie (COP), der akut interstitiellen Pneumonie (AIP), der respiratorischen Bronchiolitis mit interstitieller Lungenerkrankung (RB-ILD), der desquamativ interstitiellen Pneumonie (DIP) und der lymphoid interstitiellen Pneumonie (LIP) (1,3). Auf Grund des mangelnden Ansprechens auf eine medikamentöse Therapie und die besonders ungünstige Prognose der IPF ist insbesondere deren Differenzierung von den anderen IIP-Subtypen von Bedeutung (2). Obwohl inzwischen eine Assoziation zwischen Nikotinkonsum und den Krankheitsbildern RB-ILD und DIP nachgewiesen werden konnte, sind diese der Gruppe der IIPs zugeordnet (4). Die Diagnosefindung innerhalb der IIPs bleibt multidisziplinär, dynamisch und fokussiert auf die Identifizierung von Patienten mit einer IPF. Dabei hat vor allem die radiologische Evaluation mittels der im Vergleich zur normalen Röntgen-Thoraxübersichtsaufnahme sensitiveren hochauflösenden Computertomographie (HRCT) an Bedeutung gewonnen. Durch typische Befunde in der Computertomographie können oftmals Rückschlüsse auf das Vorliegen einer IPF oder einer anderen Form der IIP gemacht und eine spezifischere Festlegung des weiteren diagnostischen Prozedere erreicht werden. Dies spiegelt sich insbesondere bei der Frage wieder, ob invasivere Maßnahmen wie z.B. eine chirurgische Lungenbiopsie zur endgültigen Klärung der vorliegenden Diagnose notwendig sind (2,3,5).

1.3. Idiopathische pulmonale Fibrose

1.3.1. Definition und klinische Bedeutung

Die IPF, auch synonym mit kryptogen fibrosierender Alveolitis bezeichnet, ist definiert als eine bestimmte Form einer chronisch progredient verlaufenden, fibrosierenden interstitiellen Pneumonie unbekannter Ursache. Sie ist eine sehr schwere und regelhaft zum Tode führende Erkrankung, die definitionsgemäß den Ausschluss aller anderen Formen einer ILD, einschließlich anderer IIPs, sowie den positiven Nachweis eines usual interstitial pneumonia (UIP)-Musters erfordert (1,6). Die Inzidenz der Erkrankung, die mit drei bis sieben pro 100.000 Personen pro Jahr angegeben wird, steigt mit höherem Lebensalter. Schätzungen gehen davon aus, dass die Prävalenz der IPF bei ca. 20 pro

100.000 in der Allgemeinbevölkerung liegt, wobei eine große Streubreite besteht. Die Hauptmanifestation der IPF liegt im sechsten bis siebten Lebensdezenium (1,6). Selten sind IPF-Fälle unter 50 Jahren. Oftmals liegt in diesen Fällen den Symptomen eine andere Erkrankung zu Grunde, die zum Diagnosezeitpunkt noch subklinisch war. Insgesamt ist das männliche Geschlecht häufiger von der Erkrankung betroffen und bei der Mehrzahl der Betroffenen handelt es sich um Raucher (6).

1.3.2. Klinische Symptome

Anzeichen einer IPF können chronische Belastungs- oder Ruhedyspnoe sowie trockener Husten sein. Typisch für die Symptome sind ein schleichender Beginn meist über drei bis sechs Monate und ein progredienter Verlauf. Weiterhin imponieren klinisch oft beidseits basal betontes inspiratorisches Knisterrasseln und Trommelschlegelfinger (1,7).

1.3.3. Risikofaktoren und Genetik

Obwohl die Definition der IPF und das Wort idiopathisch bereits implizieren, dass die Ursachen der Erkrankung unbekannt sind, konnten mehrere potentielle Risikofaktoren in Zusammenhang mit der Erkrankung gebracht werden. Es wurde beschrieben, dass vor allem eine Raucheranamnese von mehr als 20 Pack years eng mit dem Auftreten einer IPF korrelierte. Weiterhin scheinen umwelt- und beruflich bedingte Expositionen, wie z.B. der Kontakt mit Metall- und Holzstäuben oder die Tätigkeit als Steinmetz oder Friseur, mit IPF assoziiert zu sein (6,8–10). Ob Infektionskrankheiten ebenfalls in der Ätiologie der IPF eine Rolle spielen, bleibt weiterhin fraglich. Der Fokus lag in früheren Studien oft auf der Untersuchung einer viralen Genese, speziell auf einer Beteiligung des Epstein-Barr-Virus (EBV). Zwar wurden unter anderem sowohl Proteine als auch Desoxyribonukleinsäure (DNA) im Lungengewebe von IPF-Patienten gefunden, aber gerade auf Grund der hohen Prävalenz des EBV in der Bevölkerung und der Therapie mit Immunsuppressiva kann es sich bei der Infektion möglicherweise lediglich um eine therapiebedingte Komplikation handeln (6,11–13). In weiteren Studien konnten auch ein gastroösophagealer Reflux sowie ein Diabetes mellitus als Risikofaktoren für die IPF postuliert werden (14,15). Genetische Faktoren als Auslöser einer IPF lassen sich im Rahmen von vermehrtem Auftreten von IPF in einer Familie und der geographischen Häufung familiärer Fälle diskutieren. In einer Untersuchung zum familiären Auftreten konnte auf dem Chromosom vier das ELMO domain containing 2 (ELMOD2)-Gen gefunden werden, was eine Rolle in der familiären pulmonalen Fibrose spielen könnte (16). Ebenso scheinen Zusammenhänge zwischen Mutationen im Surfactant-Protein C

(SPC)-Gen mit Fällen familiärer IIP, sowie seltene Veränderungen des Surfactant-Protein-A2-Gens und dem Auftreten von familiärer Lungenfibrose zu bestehen (6,17,18). Im Rahmen der Pathogenese sporadischer Fälle von IPF scheinen die SPC-Gen-Abnormalitäten jedoch keine entscheidende Rolle zu spielen (19,20). Seltene genetische Mutationen im Bereich der Telomerase-Komplexe, die zu einer Verkürzung dieser Regionen und damit zur Apoptose führen, konnten mit familiärer Lungenfibrose und zum Teil auch mit Fällen sporadischer IPF in Verbindung gebracht werden (6,21–23). In aktuellen Untersuchungen wurden Veränderungen in der Promotorregion des Mucin 5B (MUC5B)-Gens gefunden. Dies könnte durch mehrere Effekte wie z.B. Verminderung der pulmonalen Abwehrmechanismen und Reduktion der mukoziliären Clearance auf die Entstehung sowohl der familiären als auch der sporadischen Form einwirken (6,24). Bei der sporadischen Form scheinen eine Vielfalt genetischer Faktoren die Pathogenese und den Verlauf der IPF zu beeinflussen. Dabei wurden Genvarianten in einer Reihe von Enzymen, unter anderem des Angiotensin-konvertierenden Enzyms und des Protease-Inhibitors α 1-Antitrypsin entdeckt. Auch Zytokine, die Zellwachstum und –differenzierung beeinflussen, zeigen Genpolymorphismen. Dies scheint ebenso auf weitere immunmodulatorische Gene, Gene im Surfactant-System sowie auf profibrotische Moleküle, auf Faktoren der Gerinnungskaskade und auf Matrixmetalloproteinasen zuzutreffen (6). Obwohl in diesem Feld große wissenschaftliche Fortschritte gemacht wurden sind genetische Untersuchungen als Früherkennung einer späteren IPF noch nicht in den klinischen Alltag etabliert und derzeit lediglich eher Gegenstand der Forschung (25).

1.3.4. Diagnostik

In der pulmonalen Funktionsdiagnostik ist das Bild einer restriktiven Ventilationsstörung mit reduzierter totaler Lungenkapazität (TLC) oder reduzierter Vitalkapazität (VC) bei normaler oder sogar erhöhtem Tiffeneau-Index führend. Die Diffusionskapazität für Kohlenstoffmonoxid (DL_{CO}) ist dabei ein sehr sensitiver Marker und typischerweise erniedrigt (3,26). Gemäß der Definition der IPF wird diese spezielle Form durch das Vorhandensein des Befundmusters einer UIP charakterisiert. Dabei handelt es sich histopathologisch um ein heterogenes Bild, bei dem sich kaum verändertes bis hin zu normalem Lungengewebe und fibrotisch umgebautes Parenchym abwechseln. Die fibrotischen Areale sind gekennzeichnet durch narbig und honigwabeförmige Veränderungen mit Metaplasie von glatten Muskelzellen und finden sich häufig am stärksten in subpleuralen und para-septalen Lungenabschnitten (6). Die Entzündungsreaktion ist meist eher mild ausgeprägt und präsentiert sich in einer fleckförmigen Infiltration des interstitiellen Bindegewebes mit Lymphozyten und Plasmazellen. Zusätzlich dazu findet sich eine Hyperplasie

der Typ II-Pneumozyten. Vermehrtes Vorkommen von dichtem Kollagen und einer Proliferation von Fibroblasten und Myofibroblasten kennzeichnen die fibrotischen Umbauzonen (6). Die Merkmale des UIP-Musters eignen sich auch zur Diagnostik des Krankheitsbildes in der HRCT, die der konventionellen Röntgen-Thoraxaufnahme überlegen ist. Dabei stellen sich die typischen retikulären Zeichnungen und Traktionsbronchiektasien, wie auch bereits oben erwähnt, vorwiegend in den subpleuralen und basalen Lungenbezirken dar. Das charakteristische Honigwabemuster beschreibt radiologisch zystisch, fibrotisch veränderte Lufträume mit variablem Durchmesser, in seltenen Fällen bis zu einer Größe von 2,5 cm. Histologisch sind diese Areale mit Epithelzellen der Bronchiolen ausgekleidet und mit Schleim und Entzündungszellen gefüllt. Neben den typischen Merkmalen, die für die radiologische Diagnostik einer IPF unerlässlich sind, wurden auch Vergrößerungen der mediastinalen Lymphknotenstrukturen beschrieben. Andere pleurale Veränderungen wären eher uncharakteristisch und machen die Diagnose einer IPF unwahrscheinlich (6). Falls sich radiologisch die typischen Charakteristika der IPF zeigen, ist zur Sicherung der Diagnose eine Lungenbiopsie nicht unbedingt nötig, kann aber bei nicht eindeutigen Ergebnissen die Diagnosefindung unterstützen. Falls eine Lungenbiopsie nach Abwägen des Nutzen-Risiko-Profiles unumgänglich ist, kann diese als video-assistierte-Thorakoskopie (VATS) durchgeführt werden. Biopsisch sollte dabei Material aus mehreren unterschiedlichen Regionen gesichert werden. Bereiche mit fortgeschrittener Fibrose sind zu meiden, da dadurch kein Zugewinn an differentialdiagnostischer Kenntnis zu erwarten wäre. Anschließend sollte die Diagnose in der Zusammenschau aller gewonnenen Ergebnisse durch Expertenmeinung verifiziert und gestellt werden (2,6).

1.3.5. Pathogenese

Der Entstehungsprozess der IPF ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Dabei wären fundierte Kenntnisse gerade für die Entwicklung neuer medikamentöser Therapien von enormer Wichtigkeit. Dennoch haben sich bereits Fortschritte im Verständnis der Pathogenese gezeigt und bleiben weiterhin Fokus der wissenschaftlichen Arbeiten zur IPF. Ursprünglich wurde angenommen, dass ein unbekannter Stimulus chronische Entzündungsreaktionen hervorruft. Die sich entwickelnde Fibrose sei dann direkt Folge dieser Inflammation und Gewebsschädigung. Daher ging man davon aus, durch Therapien mit Kortikosteroiden und zytotoxischen Medikamenten in diese Kaskaden eingreifen und den fibrotischen Umbauprozessen entgegenwirken zu können (27). Ein durchschlagender Erfolg zeigte sich mit diesem medikamentösen Ansatz jedoch nicht, weswegen keine grundsätzliche Empfehlung für den Einsatz dieser Medikamentengruppen besteht (6). In

neueren Hypothesen führen wiederkehrende unbekannte Reize über progrediente Gewebsschädigung und einer abnormalen Wundheilung zur Fibrose (27). Dabei rücken vorwiegend die so genannten Fibroblasten-Herde in den Fokus, während die chronische Entzündungsreaktion nicht als ursächliches, sondern als modulierendes Agens angesehen wird. Der Prozess der normalen Abwehr pathogener Faktoren und Wundheilung der Lunge ist ein komplexes Zusammenspiel von humoralen, zellulären und extrazellulären Komponenten (28). Bei der Entstehung der IPF scheint dieses Netzwerk in mehreren Bereichen gestört zu sein. Der Untergang der Typ I-Epithel-Zellen, Störungen der alveolo-kapillären Membran mit Kollaps von Alveolarstrukturen, Proliferation und gleichzeitig erhöhte Apoptoseraten von Typ II-Pneumozyten sowie der Proliferation von Endothelzellen und von Fibro- und Myofibroblasten mit Bildung und Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen führen letztlich zur pulmonalen Fibrose. Diese Prozesse werden durch das Vorhandensein verschiedener Mediatoren moduliert. Eine entscheidende Rolle spielt dabei der transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1). Er wird im Rahmen der Erkrankung in Alveolarmakrophagen (AM), Bronchialepithel und Alveolarepithel-Typ II-Zellen (AT II) produziert und ist ein zentraler und potenter Mediator bei der Proliferation von Fibroblasten, der Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten und der Produktion extrazellulärer Matrixkomponenten wie Kollagen (28,29). Ebenso scheinen weitere Zytokine wie z.B. der Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- α) eine Rolle in der Pathogenese pulmonaler Erkrankungen zu spielen, obwohl dabei genauere Zusammenhänge bislang noch nicht ganz verstanden sind. *In vitro* Untersuchungen zeigten seinen Effekt auf die Aktivierung von Leukozyten und die Expression von Adhäsionsmolekülen, wodurch ihm auch eine potentielle proinflammatorische Komponente *in vivo* zugeschrieben wird. Zusätzlich scheint TNF- α die vermehrte Synthese von TGF- β zu begünstigen (30). Neben vermehrt proinflammatorisch und profibroblastisch ausgeprägten Faktoren scheinen auch bei antifibrotischen und antiinfektiven Faktoren, wie z.B. Interferon-gamma (IFN- γ), Defizite zu bestehen (31). Dennoch konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit IFN- γ -1b keine wirkungsvolle Therapiealternative darstellt und somit der Einfluss von IFN- γ -1b auf die Pathogenese nicht vollständig zu klären ist (31). Insgesamt lässt sich aus den erwähnten Punkten schlussfolgern, dass mögliche pathophysiologische Vorgänge in einem Ungleichgewicht pro- und antifibrotischer Faktoren liegen könnten, jedoch auf Grund der Komplexität des Zusammenspiels der einzelnen Faktoren nur Vermutungen und keine eindeutige kausale Erklärung möglich sind.

1.3.6. Therapie der IPF

1.3.6.1. Medikamentöse Therapie

Wie oben bereits angedeutet spielt die Pathogenese der IPF eine bedeutende Rolle bei der Etablierung eines wirksamen medikamentösen Therapieregimes. So wurden anfänglich große Hoffnungen in Kortikosteroid-Therapien und die Behandlung mit Immunsuppressiva bzw. die Kombination aus beidem gesetzt. Gemäß der aktuellen Leitlinie konnte jedoch keine allgemeine Empfehlung für eines dieser Therapieregime gegeben werden. Auch eine Behandlung mittels Colchicin, das *in vitro* eine Hemmung der Fibroblastenproliferation und der Kollagensynthese bewirkt, zeigte keinen größeren Nutzen. In Bezug auf die Pathogenese wurde eine Therapie mit IFN- γ -1b diskutiert, die jedoch auch in größeren Studien keinen Unterschied in der Gesamtmortalität zur Placebogruppe zeigen konnte. Weiterhin stellt nach aktueller Leitlinie der Arzneistoff Etanercept, ein rekombinanter löslicher humaner TNF-Rezeptor, der über die Bindung von TNF- α dessen Aktivität *in vitro* neutralisiert und somit wie oben beschrieben auf die Pathogenese der IPF einwirken könnte, ebenfalls keine Therapieoption dar (6). Nach neuesten Erkenntnissen konnte auch eine N-Acetylcystein-Therapie im Vergleich zur Placebogruppe keine signifikant bessere Erhaltung der forcierten Vitalkapazität (FVC) erreichen (32). Neue Hoffnung besteht in der Therapie mit Pirfenidon, einem Medikament mit entzündungshemmenden, antifibrotischen und antioxidativen Eigenschaften (6), indem es in den TGF- β vermittelten Signalweg eingreift (33) und bei milder bis moderater IPF den Krankheitsprozess zu verlangsamen scheint. Auch der neuere Multikinaseinhibitor Nintedanib, der verschiedene Signalwege, unter anderem die des vascular endothelial growth factor (VEGF)-Rezeptors, des fibroblast growth factor (FGF)-Rezeptors und des platelet-derived growth factor (PDGF)-Rezeptors, moduliert, scheint durch eine verminderte Abnahme der FVC positive Auswirkungen auf den Krankheitsprogress der IPF zu haben (1,34).

1.3.6.2. Nichtmedikamentöse Therapie

Grundlegende Maßnahmen der nicht-medikamentösen Therapie der IPF stellen Behandlungsansätze der chronischen Lungenerkrankungen dar (6). Dazu zählen unter anderem auch Präventionsmaßnahmen. So sollte z.B. auf eine strikte Nikotinkarenz geachtet werden, zumal Tabakrauchen das Auftreten einer IPF begünstigt. Weitere supportive Maßnahmen sind pulmonale Rehabilitationen, die gezielte Behandlung eines gastroösophagealen Reflux und bei Patienten mit Ruhe-Hypoxämie eine Langzeit-

Sauerstofftherapie (35). Im Extremfall sollten sich geeignete Patienten einer Lungentransplantation unterziehen (6,35).

1.4. Die nicht spezifische interstitielle Pneumonie

Die NSIP stellt nach der IPF die zweithäufigste Entität der IIPs dar (3). Trotz der Tatsache, dass sich NSIP und IPF in Bezug auf klinische Aspekte ähneln, stellt die NSIP ein eigenes Krankheitsbild in der Gruppe der IIP dar (36). Unterschiede zwischen den beiden Gruppen lassen sich dennoch finden. Es zeigt sich, dass sich die NSIP im Gegensatz zur IPF circa zehn Jahre früher manifestiert und häufiger Frauen als Männer betrifft. Zusätzlich scheint die NSIP eine deutlich bessere Prognose zu besitzen (36). Die NSIP lässt sich wiederum in einen zellulären (cNSIP) und in einen fibrotischen (fNSIP) Typ untergliedern. Diese unterscheiden sich in Prognose, Histopathologie und Ansprechen auf eine medikamentöse Therapie (36). So kennzeichnet sich die cNSIP durch einen langsamen Krankheitsprozess, ein gutes Ansprechen auf eine steroidale Therapie und nur eine geringe Einschränkung der Lebenserwartung sowie einer scheinbar günstigeren Prognose als beim fibrotischen Subtyp (36,37). Histopathologisch zeigt sich, im Gegensatz zur IPF, das NSIP Muster eher homogen über die gesamte Lunge verteilt, ohne dabei bestimmte Lungenregionen zu bevorzugen (36). Bei der cNSIP steht eher eine Infiltration mit inflammatorischer Komponente im Vordergrund, während bei der fNSIP die Ablagerung und Akkumulation von Kollagen zur septalen Wandverdickung mit Bildung fibrotischer Areale prädominiert (36,37). Im Gegensatz zu IPF-Patienten profitieren jedoch gerade Patienten mit einer fNSIP von einer immunsuppressiven Kombinationstherapie aus Kortikosteroiden und zusätzlichen Immunsuppressiva wie Cyclophosphamid (38). Trotz der gezeigten Unterschiede ist es klinisch dennoch teilweise schwierig, insbesondere beim Fehlen typischer Muster, die beiden Krankheitsentitäten IPF und NSIP zu unterscheiden (36).

1.5. Das Gerinnungssystem

Die Hämostase bezeichnet einen lebenswichtigen Vorgang im menschlichen Körper, der bei Verletzung des Blutgefäßsystems eine entstandene Blutung zügig zum Stehen bringt. Dabei unterscheidet man ein zelluläres und ein plasmatisches Gerinnungssystem. Das zelluläre besteht aus Thrombozyten, die im Bedarfsfall nach Aktivierung in Zusammenarbeit mit der plasmatischen Gerinnungskaskade einen stabilen Clot bilden und die Verletzungsstelle verschließen. Das plasmatische Gerinnungssystem ist eine Kaskade aus mehreren einzelnen Faktoren, deren gemeinsame Endstrecke aus der Bildung eines stabilen Fibrinnetzwerkes besteht. Dabei lassen sich ein extrinsisches und ein

intrinsisches System unterscheiden. Bei der Aktivierung der Blutgerinnung durch das extrinsische System spielt vor allem das weit verbreitete Membranprotein Gewebe-Thromboplastin, auch als Tissue Factor (TF) bezeichnet, eine entscheidende Rolle. Kommt es in Folge einer Verletzung zum Kontakt plasmatischer Gerinnungsfaktoren mit subendothelialen und perivaskulären Zellen, die TF exprimieren, wird die Kaskade des extrinsischen Gerinnungssystems aktiviert. Faktor VII, ein im Blutplasma lösliches Protein, bildet einen Reaktionskomplex mit TF und ist dann durch Serin-Protease-Aktivität in der Lage Faktor X der Blutgerinnung in den aktiven Zustand zu überführen. Dies wiederum führt schließlich zur Prozessierung von Prothrombin zu Thrombin und in Folge dessen zur Bildung von Fibrin (39,40). Die Reaktionskaskade des intrinsischen Systems wird durch Kontakt mit einer aktivierenden Oberfläche getriggert. *In vitro* zeigt sich dies bei Interaktion von Faktor XII mit negativ geladenen Oberflächen wie Kaolin oder Glas (41). Diese Bindung führt zur Autoaktivierung mit Bildung einer kleinen Menge aktiviertem Faktor XII (42), zur Bildung von Kallikrein (KLK) aus Präkallikrein und wiederum als positive Rückkopplung zur stärkeren Aktivierung von Faktor XII durch KLK (43). High molecular weight Kininogen (HMWK) beschleunigt dabei den Aktivierungsprozess von Faktor XII (44). Im Rahmen der weiteren Kaskade triggert aktivierter Faktor XII die Bildung von aktiviertem Faktor XI und in der Folge aktiviertem Faktor IX, der wiederum die Aktivität von Faktor X und letztlich analog dem extrinsischem System die Bildung von Fibrin initiiert (42).

1.6. Die pathophysiologische Rolle der Gerinnungsfaktoren im Rahmen der IPF

Verschiedene Studienergebnisse führten zu der Annahme, dass das Gerinnungssystem und ein Ungleichgewicht pro- und antikoagulatorische Faktoren eine mögliche Beteiligung in der Pathogenese der IPF spielen könnten. Es ließ sich nachweisen, dass die durch bronchoalveoläre Lavage gewonnenen Proben von IPF-Erkrankten eine erhöhte Aktivität koagulatorisch wirkender Faktoren zeigen. Diese stammen dabei direkt aus der Lunge oder können auch aus dem Plasma in den Alveolarraum übertreten. Ebenso wurde in Lungenbiopsien an IPF erkrankter Personen eine erhöhte Akkumulation von Fibrin gefunden, was in Zusammenhang mit den Faktoren der Gerinnungskaskade unter anderem von TF, aktiviertem Faktor VII und Thrombin zu stehen scheint (45–47). Abgelagertes Fibrin beeinflusst dabei in mehrerlei Hinsicht die Entzündungsreaktion. Zum einen werden inflammatorische Prozesse durch Erhöhung der Kapillardurchlässigkeit und erhöhte Produktion proinflammatorischer Mediatoren getriggert, zum anderen scheint auch eine negative Wirkung auf die Surfactant-Funktion, ein Lipoprotein zur Senkung

der alveolären Oberflächenspannung, zu bestehen (45,48). Zusätzlich stimuliert Fibrin und dessen Spaltprodukte die Proliferation und Migration von Fibroblasten (45,49,50). Wie oben erwähnt scheinen Thrombin, TF/Faktor VIIa-Komplex und andere Faktoren über die Aktivierung von protease-activated receptors (PAR) weitere pathogenetische Folgen zu begünstigen. Insgesamt sind bislang vier PARs bekannt, von denen PAR-1 eine bedeutende Rolle in Bezug auf die Entwicklung einer pulmonalen Fibrose zu spielen scheint (46). Diese These kann durch mehrere Argumente gestützt werden. So konnte gezeigt werden, dass Thrombin durch PAR-1 ebenso wie TGF- β den connective tissue growth factor (CTGF) induziert, der Umbauprozesse nach Gewebeerletzungen und profibrotische Effekte vermittelt (51,52). Weiterhin scheint Thrombin über PAR-1 die Differenzierung von normalen Fibroblasten in Myofibroblasten zu stimulieren (53). Zusätzlich waren Mäuse, die PAR-1 nicht ausbilden konnten, vor einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose geschützt (45,54). Durch die Verabreichung eines direkten Thrombin-Inhibitors konnte die Akkumulation von Kollagen und das Level der CTGF-mRNA reduziert werden (52). In weiteren Studien wurde auch die Rolle von PAR-2, der von TF/Faktor VIIa- und TF/Faktor VIIa/Faktor Xa-Komplexen aktiviert wird, auf die pathogenetischen Vorgänge der IPF untersucht (46). Es konnte dabei unter anderem gezeigt werden, dass PAR-2 auch eine Rolle in der Faktor VIIa induzierten Proliferation von humanen Lungenfibroblasten spielt (46). Diese Ergebnisse zeigen, dass Faktoren der extrinsischen Gerinnungskaskade eine pathophysiologische Bedeutung im Rahmen der IPF haben können. Inwieweit neben den gut erforschten extrinsischen Signalwegen aber auch die intrinsische Kaskade der Blutgerinnung und das Kontaktsystem mit Faktor XII, Faktor XI und HMWK Einfluss auf die Entwicklung einer IPF nehmen kann, war Gegenstand einer Inauguraldissertation von E. Jablonska (55). Dabei konnte sie zeigen, dass sowohl eine erhöhte Expression von Faktor XII, Faktor XI und HMWK als auch eine gesteigerte Aktivität von Faktor XIIa in Lungen von Patienten mit IPF und Bleomycin-behandelter Mäuse vorlag (55). Zusätzlich war es bei Mäusen, die Faktor XII nicht bilden konnten, auch nicht möglich eine Fibrose durch Bleomycin auszulösen (55). Ein weiteres Ergebnis von E. Jablonska stellte heraus, dass selbst bei Bleomycin-behandelten Mäusen durch intratracheale Applikation von einem Faktor XIIa-Inhibitor eine fibrotische Reaktion signifikant reduziert werden konnte (55). Zusätzlich wurde in gleicher Arbeit erforscht, dass humane Lungenfibroblasten Faktor XII exprimieren und durch Stimulation der Zellen mittels TGF- β 1 eine Steigerung der Expression von Faktor XII erreicht werden konnte (55). Diese Punkte lassen insgesamt auch im Hinblick auf die Pathogenese der IPF eine Bedeutung der intrinsischen Kaskade erkennen.

1.7. Das Komplementsystem

Das Komplementsystem, bestehend aus ca. 30 in der Leber synthetisierten Glykoproteinen, zählt zum angeborenen Immunsystem und dient der Erkennung und Abwehr von Mikroorganismen. Die Proteine des Komplementsystems werden von ihrem Synthesort der Leber in das Blut abgegeben und sind dort ständig präsent. Es sind unterschiedliche Arten der Aktivierung des Komplementsystems bekannt. Dazu zählen der klassische antikörper-abhängige Weg, der alternative Weg, der Lektin-Weg und die Aktivierung durch das C-reaktive Protein (CRP) (39).

1.7.1. Der klassische Weg

Voraussetzung für die Aktivierung des klassischen Weges ist die Bindung eines Antikörpers an ein Antigen. Die Art des Antikörpers ist dabei vom bereits vorherrschenden Stadium abhängig. In frühen Stadien werden Antigene über den Fab-Teil der Immunglobulin M (IgM)-Antikörper gebunden, während dies in späteren Stadien über den Fab-Teil von Antikörpern vom Typ Immunglobulin G (IgG) erfolgt. Der daraufhin präsentierte freie Fc-Teil des Antikörpers dient anschließend der Bindung des C1-Proteins (C1) (39). Im Rahmen dessen werden durch C1 die weiteren Komplement-Proteine C2, C3, C4 und C5 aktiviert. Nach Formationsänderungen und Spaltungen wird schließlich durch die C5b-Untereinheit eine weitere Reaktionskaskade in Gang gesetzt, die über die Komplementfaktoren C6, C7, C8 und C9 zur Entstehung eines Membrane Attack Komplex (MAC) führt. Mit Hilfe dessen kann durch Porenbildung in der Membran des Mikroorganismus letztendlich die Lyse erzielt werden (39).

1.7.2. Der alternative Weg

Oberflächen von Mikroorganismen und Fremdkörpern können direkt über Bindung von C3b, einer Untereinheit von C3, zur Aktivierung der Reaktionskaskade des alternativen Weges führen. Diese Reaktion ist dabei im Gegensatz zum klassischen Weg nicht von vorheriger Antikörperbindung abhängig. Bei Kontakt von C3b mit einem pathogenen Agens wird durch kovalente Esterbindung der normalerweise recht schnell stattfindende Abbau von C3b verhindert. C3b kann nun über zwei unterschiedliche Wege eine Abwehrreaktion begünstigen. Zum einen kann über die Rekrutierung von C5 und nachfolgende Reaktionen, ähnlich dem klassischen Weg, die Bildung des MAC und anschließende Lyse erfolgen. Zum anderen kann über Opsonierung und Aktivierung von Makrophagen eine Phagozytose ausgelöst werden (39).

1.7.3. Der Lektin-Weg

Das Funktionsprinzip des Lektin-Weges ist ähnlich dem des klassischen Weges. Lediglich werden die Reaktionen nicht durch die antikörper-abhängige Bindung von C1q, einer Untereinheit von C1, initiiert, sondern durch das dem C1q-ähnlichen Mannose-bindende Lektin (MBL). Dieses Protein erkennt die an Bakterienoberflächen vorkommenden mannosehaltigen Kohlenhydrate und kann schließlich auf Grund der engen Strukturähnlichkeiten zum C1q-Protein über die MBL-assoziierten Serin Proteinasen 1 und -2 die Reaktionskaskaden des klassischen Weges katalysieren (39,56).

1.7.4. Aktivierung mittels C-reaktivem Protein

Das Akute-Phase-Protein CRP wird im Rahmen inflammatorischer Prozesse vermehrt gebildet. Es kann Verbindungen aus fettähnlichen Bestandteilen und Zuckern, den Lipopolysacchariden (LPS), die auf den Oberflächen von Bakterien vorkommen, erkennen, binden und darüber C1q vermittelt den klassischen Weg auslösen (39,57).

1.8. Das Kontaktsystem

Als Kontaktsystem werden Faktor XII, Faktor XI, HMWK und Präkallikrein zusammengefasst. Diese Einteilung resultiert aus der Tatsache, dass die inaktiven Vorstufen dieser Proteine durch Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen aktiviert werden können. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass neben der Selbst-Aktivierung von Faktor XII auch eine gegenseitige Aktivierung von Faktor XII und Präkallikrein bei Kontakt mit z.B. Kaolin oder Glas möglich ist (56). HMWK dient dabei als Verstärker. Die aktive Form von Faktor XII bilden zwei Fragmente, die als α Faktor XIIa und β Faktor XIIa bezeichnet werden und unterschiedliche Funktionen erfüllen. α Faktor XIIa überführt Faktor XI in seine aktive Form Faktor XIa, während β Faktor XIIa sowohl Präkallikrein als auch C1 aus dem Komplementsystem aktiviert. KLK wirkt profibrinolytisch, indem es Urokinase (u-PA) und Plasminogen aktiviert (56). Die Hauptaufgabe von KLK ist die Spaltung von HMWK und dadurch die Freisetzung von Bradykinin (BK). BK erfüllt im Organismus verschiedene Aufgaben. Es besitzt vasodilatative und proinflammatorische Eigenschaften und hat starken Einfluss auf die Thrombozytenfunktion. Dies wird vermittelt, indem BK die Prostacyclin-Produktion der Endothelzellen stimuliert und zusätzlich zusammen mit HMWK selektiv die α -Thrombin vermittelte Thrombozytenaktivierung hemmt (56). Die vasodilatatorische Eigenschaft erklärt sich über die Stimulation der endothelialen Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion. BK setzt weiterhin Superoxide und tissue-Plasminogen Aktivator (t-

PA) frei. Bei Gefäßverletzungen und Endothelzelldefekten stimuliert es die Proliferation glatter Muskelzellen und führt zur Intimahypertrophie (56).

1.9. Aufbau und pathogenetische Beteiligung des Komplementproteins C1

C1 ist ein circa 790kDa großes Protein, bestehend aus drei Untereinheiten, C1q, C1r und C1s, im Verhältnis 1:2:2. Die größte Untereinheit C1q mit einer molekularen Masse von 460kDa vermittelt dabei, wie oben beschrieben, die Bindung an den Fc-Teil der Antikörper. C1r mit einer Größe von 90kDa und C1s mit 80kDa Masse dagegen besitzen Serin-Protease-Aktivität und liegen inaktiv als so genannte Zymogene vor (57). Die Bindung von C1q an einen Antikörper oder z.B. an das CRP führt über Konformitätsänderungen zu einer schrittweisen Aktivierung der Serin-Protease-Untereinheiten. Dabei wird die C1r-Untereinheit zunächst autoaktiviert. C1r aktiviert schließlich durch Spaltung die zweite Untereinheit C1s, die anschließend selbst in Reaktion mit C4 tritt. Als Folge wird über weitere Interaktionen der Faktoren, unter Beteiligung von C1s, die C3-Convertase und letztendlich der MAC gebildet (57,58). Reguliert wird der C1-Komplex über den C1-Inhibitor (C1-INH) aus der Familie der Serpine. Dabei fungiert C1-INH als „suicide“-Substrat, indem er an das aktive Zentrum von C1 bindet und über Spaltungsprozesse zur Konformitätsänderung von C1 und damit zur Inaktivierung führt (58). Ein Mangel oder sogar das komplette Fehlen von Faktoren des Komplementsystems kann zur Pathogenese von schweren Infektionen beitragen. Zudem wird ein Mangel an C1 in Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen, insbesondere Lupus erythematodes, aber auch auf Grund von mangelhafter „Clearance“ von Immunkomplexen und untergegangenen Zellbestandteilen mit Glomerulonephritiden gebracht. Eine Beteiligung bei Krankheiten mit Amyloidablagerungen, wie z.B. der Alzheimer-Erkrankung wird ebenfalls diskutiert. Auch Reperfusionsschäden nach Ischämien, z.B. von Herz und Niere werden in Verbindung mit Faktoren des Komplementsystems gebracht, was dessen medizinische und biologische Bedeutung nochmals deutlich unterstreicht (58–61).

1.10. Serin-Protease-Inhibitoren

Zur Familie der Serin-Protease-Inhibitoren, die auch als Serpine bezeichnet werden, gehören funktionell wichtige Proteine des Organismus. Dazu zählen neben C1-INH unter anderem Proteine wie z.B. α 1-Antitrypsin, Antithrombin III und Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI) Typ-I (56,62). Die Familie der Proteinase-Inhibitoren stellt einen Großteil

der Proteinfraction im Blutplasma dar (62). Sie erfüllen mannigfaltige Aufgaben im Zusammenhang mit bedeutenden Kaskaden und Systemen im menschlichen Organismus (62).

1.11. C1-Esterase-Inhibitor

C1-INH ist funktionell ein wichtiger Inaktivator sowohl des Komplement- als auch des Kontaktsystems. Ein Mangel oder auch eine nicht ausreichende Aktivität kann schwerwiegende pathologische Konsequenzen zur Folge haben. In der Literatur werden C1-Esterase-Inhibitor, C1-Inhibitor und C1-Inaktivator synonym gebraucht.

1.11.1. Aufbau und Eigenschaften des C1-Inhibitors

C1-INH, ist ein stark glykosiliertes, einkettiges Polypeptid, bestehend aus 478 Aminosäuren, wobei die Proteinfraction mit ungefähr 52,8kDa nur circa 51 Prozent des Molekulargewichtes von knapp 104kDa beträgt (56,63). Die Aminosäuresequenz zeigt am aminoterminalen Ende eine stark glykosilierte Region, die sich deutlich von anderen Serpin-Proteinen unterscheidet (64). Am Carboxyl-Ende befindet sich hingegen das „reactive center loop“ (64), also der Bereich, der das aktive Zentrum darstellt und die Proteasen-Erkennungsregion bildet (64). Genlocus ist der lange Arm des Chromosoms elf im menschlichen Genom (56,65). Es umfasst 17 kilo-Basenpaare, die acht Exons und sieben Introns codieren (56,65). Das erste Intron beschreibt eine IFN- γ abhängige Region, die die Synthese von C1-INH initiieren und regulieren kann. Neben IFN- γ scheinen aber auch andere Faktoren wie TNF- α , Interferon-alpha (IFN- α), Monozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor und Interleukin-6 (IL-6) einen Einfluss auf die Syntheserate zu besitzen. Die Bildung erfolgt in verschiedenen Zellen wie Hepatozyten, Fibroblasten, Endothelzellen aber auch in Zellen des Immunsystems, wie Monozyten und Makrophagen. Beschrieben wurde auch eine Speicherung des C1-INH in den thrombozytären α -Granula sowie die Möglichkeit diesen an der Oberfläche aktivierter Thrombozyten zu prozessieren. Im Erwachsenenalter beträgt die physiologische Plasmakonzentration zwischen 180 μ g/ml und 340 μ g/ml mit durchschnittlich 240 μ g/ml. Als Akut-Phase-Protein können die Plasmaspiegel aber auch im Rahmen einer unkomplizierten Infektion bis auf das Zweifache ansteigen. Dies scheint vorwiegend IL-6, aber auch zu kleinerem Teil Interleukin-1 (IL-1) vermittelt zu sein. Die normale Halbwertszeit des C1-INH im Blutplasma liegt im Bereich von 28 Stunden (56). An der Inaktivierung des C1-INH können mehrere Enzyme beteiligt sein. Hauptsächlich scheint aber Elastase, ein Enzym, das aus aktivierten neutrophilen Granulozyten stammt, die Inaktivierungsfunktion durch proteolytische Spaltung zu erfüllen. Ebenfalls wird im Rahmen lokal inflammatorischer Prozesse diese

Funktion aber auch Plasmin zugeschrieben. Folglich findet durch die Inaktivierung des C1-INH in entzündlich verändertem Gewebe eine vermehrte Aktivierung der Komplementfaktoren statt (56).

1.11.2. Interaktion des C1-Inhibitors und des Ziel-Proteins

Die Inaktivierung eines Ziel-Proteins erfolgt bei C1-INH, wie auch bei anderen Mitgliedern der Serpin-Familie, in zwei Schritten. Zunächst soll die zu inaktivierende Protease das „reactive center loop“ des Serpins erkennen. Dieser Bereich imitiert gleichzeitig das Substrat bzw. die Angriffsregion der Protease. Anschließend wird durch das Ziel-Protein eine spezielle Arginin (444)-Threonin (445)-Aminosäuresequenz des Inhibitors gespalten. Daraus resultiert eine irreversible Konformitätsänderung mit kovalenter Bindung des Inhibitors und der Protease. Durch die Bindung im Bereich des aktiven Zentrums der Serin-Protease wird diese inaktiviert (64).

1.11.3. Substrate des C1-Inhibitors

Wie oben bereits erwähnt zählt zur Hauptaufgabe des C1-INH die Serin-Proteasen des Komplement- und Faktoren des Gerinnungssystems zu regulieren. Insbesondere im klassischen Weg der Komplementaktivierung ist C1-INH als einzig bekannter Inhibitor von C1s und C1r bedeutend an der Kontrolle dieser Kaskade beteiligt. C1-INH bindet entweder reversibel an die Proenzyme C1r und C1s im inaktiven C1-Komplex und blockiert dadurch deren Selbstaktivierung oder erkennt C1r und C1s im aktiven Zustand und löst sie aus dem Verband mit C1q. Dies erfolgt dann über Bildung eines C1-INH-C1r-C1s-C1-INH-Tetramers (56). Der Inhibitor-Protein-Komplex, wird schließlich über spezielle Rezeptoren aus der Blutzirkulation entfernt. (56). C1-INH scheint auch über reversible Bindung von C3b modulatorisch den alternativen Weg des Komplementsystems zu beeinflussen (64). Im Lektin-Weg kontrolliert C1-INH die MBL-assoziierte Serin-Proteinase-1 und -2 und verhindert dadurch die Aktivierung des Lektin-Weges bzw. der klassischen Komplementkaskade (56). Einige Proteine bzw. Faktoren des Gerinnungs- und Kontaktsystems sind ebenfalls Substrate des C1-INH. Unter anderem zählen dazu Plasmakallikrein und Faktor XIIa. Dies hat verschieden pathogenetische Einflüsse und spielt vorwiegend bei dem Auftreten des Hereditären Angioödems (HAE) eine entscheidende Rolle. Neben den erwähnten Proteasen interagiert C1-INH auch mit zellulären Bestandteilen wie neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Endothelzellen. Dabei sind die Funktionen noch nicht hinreichend geklärt, zum Teil jedoch wohl unabhängig von seiner Aktivität als Protease-Inhibitor. Womöglich scheinen diese Interaktionen im Zusammenhang mit C1-INH vermittelten chemotaktischen Prozessen zur Abwehr von

Bakterien im Rahmen des angeborenen Immunsystems zu stehen (64). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass C1-INH durch Bindung an P- und E-Selektine die Leukozyten-Adhäsion an der Oberfläche von Endothelzellen verhindert. Dies könnte eine Erklärung für die protektiven Eigenschaften im Rahmen entzündlicher Erkrankungen sein (64).

1.11.4. Physiologische Aktivitäten des C1-Inhibitors

1.11.4.1. Pathophysiologische Eigenschaften von C1-Inhibitor in Hereditärem Angioödem

Eine der wichtigsten und bekanntesten pathophysiologischen Bedeutungen des C1-INH wird im Zusammenhang mit dem HAE gesehen. Das früher auch als angioneurotisches Ödem bezeichnete Angioödem beschreibt eine bis zu sieben Tagen andauernde umschriebene Schwellung (Ödem), die in unregelmäßigen Abständen rezidiert und auf Grund unterschiedlicher pathologischer Mechanismen in Verbindung mit verschiedenen Krankheitsentitäten gesehen werden kann. Die Ödeme manifestieren sich an Haut, seltener an der Zunge, Glottis bzw. Larynx und Magen-Darm-Trakt und betreffen sehr selten auch andere Weichteilorgane (66). Im Weiteren wird hauptsächlich auf die kininvermittelten Angioödeme, im speziellen im Zusammenhang mit einem Mangel an C1-INH Bezug genommen. Die Inzidenz des HAE durch einen C1-INH Mangel liegt bei ca. 1:50000 ohne ethnische oder geschlechtliche Bevorzugung. Pathogenetisch lassen sich im engeren Sinne zwei Formen des HAE unterscheiden. Der Typ I ist mit 85% der häufigste und beschreibt einen quantitativen Defekt im Syntheseprozess, bei dem die Plasmakonzentration des C1-INH folglich stark vermindert ist. Der Typ II liegt in 15% der Fälle vor und kennzeichnet einen funktionellen Defekt mit Aktivitätsminderung bei normaler oder sogar erhöhter Plasmakonzentration (66). Die Vererbung der beiden Ausprägungsformen ist autosomal dominant. Patienten beider Typen sind heterozygot, d.h. sie besitzen ein unauffälliges und ein abnormales Gen für C1-INH. Dabei zeigen sich bezüglich der genetischen Ausprägung Unterschiede. Beim Typ I wird lediglich das normale Gen exprimiert, wohingegen das zweite Gen verändert oder deletiert ist. Im Gegensatz dazu werden beim HAE Typ II sowohl das normale als auch das mutierte Gen exprimiert. Ursächlich für die veränderten Genstrukturen sind Punktmutationen und bei ca. 20% Neumutation (66). Zur klinischen Ausprägung der Erkrankung führen Permeabilitätserhöhungen, die nach heutigen Erkenntnissen BK vermittelt sind. Durch den C1-INH-Mangel kommt es zur Dysregulation des Kontaktsystems und dadurch zur inadäquaten Inhibierung von KLK. Daraus resultiert schließlich eine vermehrte lokale BK-Wirkung, die über den BK-B2-Rezeptor eine Vasodilatation mit erhöhter Gefäßpermeabilität

und Kontraktion der glatten Muskulatur vermittelt und folglich die Ödementwicklung bewirkt (66,67). Prädilektionsstellen dafür sind Haut, Gastrointestinaltrakt und seltener das Atemwegssystem. Die rezidivierenden Ödemattacken werden am häufigsten in der ersten, oft auch im zweiten Lebensjahrzent manifest und unterscheiden sich in Ausprägung und Häufigkeit. Dabei lässt durch die Plasmakonzentrationen für C1-INH nicht auf die Frequenz der Attacken schließen. Direkte Auslöser sind bislang nicht bekannt, jedoch können Faktoren wie Traumen, psychische Stresssituationen oder Infekte den Beginn einer Attacke triggern. Diagnostisch relevant und beweisend für ein HAE Typ I ist eine Plasmakonzentration von weniger als 50% des Normalwertes und eine um 50% geringere Aktivität im Vergleich zu Gesunden, während beim HAE Typ II bei normaler oder sogar erhöhter Konzentration lediglich die Aktivität gemindert ist (66). Beim HAE Typ III, das fast ausschließlich Frauen betrifft, sind Aktivität und Plasmakonzentration des C1-INH normwertig. Bei diesem Typ liegt der Defekt nicht im C1-INH-Gen, sondern beruht entweder auf Mutationen im Faktor XII-Gen oder auf bislang noch unbekanntem Genveränderungen. Aktuell wird auch ein Einfluss von Östrogen auf die Ausprägung des HAE Typ III diskutiert, da erhöhte Östrogenspiegel mit einer erhöhten Faktor XII-Konzentration vergesellschaftet sein können (68,69). Neben den HAE Typ III muss in die differentialdiagnostischen Überlegungen auch ein C1-INH-Mangel auf Grund von Autoantikörpern miteinbezogen werden. Die Therapie richtet sich nach der Schwere einer Attacke und umfasst die Behandlung mittels eines C1-INH-Konzentrates oder mittels Icatibant, einem BK-B2-Rezeptorantagonisten (66).

1.11.4.2. Pathophysiologische Eigenschaften von C1-Inhibitor in Sepsis

Sepsis bezeichnet eine komplexe systemische inflammatorische Reaktion auf eine Infektion, die oft durch Bakterien verursacht wird und einen Großteil der Mortalität auf Intensivstationen ausmacht (56,70). Die Grundlage der Sepsis scheint eine massive Freisetzung inflammatorischer Mediatoren aus verschiedenen Systemen des Körpers, unter anderem mit Beteiligung der Komplement- und Kontaktsystemkaskaden, zu sein (56). Inwieweit die einzelnen Faktoren der jeweiligen Kaskade eine Rolle im Rahmen der Sepsis spielen, war Gegenstand verschiedener wissenschaftlicher Arbeiten. Es ließ sich zeigen, dass die Plasmaspiegel der Faktoren des Kontaktsystems durch einen erhöhten Verbrauch während des septischen Geschehens vermindert, gleichzeitig jedoch die Konzentrationen von Faktor XIIa-C1-INH-Komplexen und KLK-C1-INH-Komplexen erhöht waren (56,71,72). In einer Studie an Affen wurde mittels monoklonalem Antikörper die Aktivität von Faktor XII inhibiert und dadurch die Überlebensrate trotz letaler Dosis von *E. coli* verbessert sowie eine starke Hypotension verhindert (72). Womöglich könnte

dies im Zusammenhang mit der Verminderung der Aktivierung von KLK und der reduzierten Bildung von BK stehen. Daraus könnte eine verminderte Produktion von NO resultieren und die vasodilatatorischen Eigenschaften abschwächen (56). Auch im klinischen Einsatz in der Humanmedizin zeigte eine C1-INH-Substitution bei schwerer Sepsis eine geringere Aktivität des Kontakt- und Komplementsystems (71). Die Auswirkungen des Komplementsystems bei Sepsis haben sowohl positive als auch negative Aspekte. Eine Aktivität ist notwendig um Bakterien oder deren Produkte aus dem Organismus zu entfernen. Daneben scheinen Komplementfaktoren wie C5a und MAC proinflammatorisch zu wirken und dadurch eher Komplikationen der Sepsis hervorzurufen bzw. zu verstärken (56). Diese werden über Stimulation von neutrophilen Granulozyten, erhöhte Endothelzellpermeabilität und Gerinnungsaktivierung durch Expression von TF getriggert. In Studien zeigte sich bei Patienten im septischen Schock eine verminderte Aktivität von C1-INH und gleichzeitig erhöhte Plasmakonzentrationen von inaktiviertem, proteolytisch abgebautem C1-INH, wobei eine positive Korrelation zwischen Mortalität und C1-INH Abbau bestand (71,73).

1.11.4.3. Pathophysiologische Eigenschaften von C1-Inhibitor in anderen Erkrankungen

Neben den oben erwähnten Erkrankungen scheint C1-INH auch noch bei weiteren Krankheiten eine pathophysiologische Bedeutung zu haben. So zeigte sich ein positiver Einfluss auf Reperfusionsschäden besonders am Herzen. Während oder kurz vor Beginn der Reperfusion konnte intravenöser C1-INH die Freisetzung von Troponin und Creatinkinase vermindern, die Infarktgröße minimieren und vor Infiltration von neutrophilen Granulozyten schützen (64). Auch im Rahmen der aortokoronaren Bypasschirurgie konnten positive Effekte verzeichnet werden. So war es möglich *in vitro* durch eine erhöhte C1-INH-Blutkonzentration die perfusionsassoziierten Endothelschäden von Venenbypassmaterial und die Ablagerung von Komplementfaktoren in der Venenwand zu reduzieren (74). Auch im Rahmen von Transplantationsreaktionen konnte im Tiermodell durch Applikation von C1-INH eine längere Toleranz nach Nierentransplantation und die Downregulierung von Komplementfaktoren, neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten erreicht werden. Im Modell zur Lungentransplantation zeigten sich durch C1-INH positive Effekte auf Prävention frühzeitiger Organschäden und -dysfunktionen sowie bei Herztransplantation eine Verbesserung der rechtsventrikulären Pumpfunktion. Auch in Bereichen wie Pankreatitis oder Traumen durch Wärmeeinwirkung konnte C1-INH als prognostisch günstig bewertet werden (64). Oft fehlen klinische Erfahrungen und die positiven Eigenschaften waren auf wissenschaftliche Experimente beschränkt. Inwieweit

die Behandlung mittels C1-INH, neben der klassischen Indikation des HAE, Einzug in den klinischen Alltag finden wird, bleibt abzuwarten.

2. Fragestellung

Nachdem die Proteine und Faktoren des intrinsischen Gerinnungs- bzw. Kontaktsystems als neue profibrotische Komponente in wissenschaftlichen Arbeiten gezeigt werden konnten, war Gegenstand der vorliegenden Arbeit das Verhalten des physiologischen Inhibitors dieser Kaskaden, C1-INH, zu untersuchen.

Im Detail wurden folgende Fragen untersucht:

- Wie hoch ist die Konzentration des C1-INH in den Lungenkompartimenten von IPF-Patienten
- Gibt es bezüglich der C1-INH-Konzentration in der Lunge krankheitsspezifische Unterschiede
- Gibt es Unterschiede in der Aktivität des C1-INH zwischen IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Spendern
- Wo findet sich C1-INH in der Lunge von IPF-Patienten und welche Zellen können C1-INH in der Lunge exprimieren
- Bildet C1-INH auch in der Lunge von IPF-Patienten Komplexe mit Zielproteinen und haben diese eine klinische Relevanz
- Korreliert die C1-INH-Konzentration mit klinischen Lungenfunktionsparametern bei IPF-Patienten
- Korreliert die C1-INH-Konzentration mit Entzündungswerten bei IPF-Patienten

3. Materialien, Geräte und Methoden

3.1. Materialien und Geräte

3.1.1. Geräte

<i>Gerätename</i>	<i>Firma</i>
Butterfly-Blutentnahmesystem	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Blutröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Elektrophoreseapparatur	<ul style="list-style-type: none">• Power Pac 1000, Bio-Rad, München, Deutschland• Power Suply, Biometra, Göttingen, Deutschland
Filmkassette	Kodak, Rochester, New York, NY
Mikroskop	Leica, Wetzlar, Deutschland
Photometer	<ul style="list-style-type: none">• SpectraMax 190, Molecular Devices, Silicon Valley, CA• BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetboy	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Polyvinylidenfluorid (PVDF)- Membran	Amersham Bioscience, Little Chalfont, England
Röntgenfilm	Amersham Bioscience, Little Chalfont, England
Schüttler	<ul style="list-style-type: none">• VWR, Darmstadt, Deutschland• Thriller Thermoshaker-Incubator, peQlab, Erlangen, Deutschland
StepOne Real time PCR-System	Life Technologie, Carlsbad, CA
PCR Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Western-Blot-Apparatur	Biometra, Göttingen, Deutschland

Zentrifugen	<ul style="list-style-type: none"> • Mikro20, Hettich, Tuttlingen, Deutschland • Mikro 22R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland • Heraeus Labofuge 400, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

3.1.2. Reagenzien

<i>Reagenz</i>	<i>Firma</i>
Acrylamid-Lösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Fluka, Buchs, Schweiz
Albumin, Rinderserum (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Biocoll	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Chlorwasserstoffsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
DNase	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
ECL Prime Western Blotting Detection System	Amersham Bioscience, Little Chalfont, England
Entfettetes Milch-Pulver	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Glycerol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA

Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Kollagenose I	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Kollagenose IA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
2-Mercapto-Ethanol (β -Mercaptoethanol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-Methyl-1-Propanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MicroVue Complement C1-INH Plus EIA	Quidel Corporation, San Diego, CA
Milch-Pulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Minimum Essential Medium (MEM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Natriumchlorid-Lösung	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
PeqGOLD Total RNA Kit	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Real time PCR-Kit	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA
Roti Histokit II	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

Trypsin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Ultra pure Water	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Xylene	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ZytoChem Plus AP Polymer Kit	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland

3.2. Methoden

3.2.1. Probenmaterial

Die Gewinnung und Verwendung des jeweiligen Probenmaterials war durch das Einverständnis der Spender und Patienten oder deren Angehörigen sowie durch entsprechendes Ethikkommissionsvotum legitimiert. Die Diagnosen der IPF und der NSIP orientieren sich an den von der ATS und der ERS festgelegten Kriterien zur Klassifikation einer idiopathischen interstitiellen Pneumonie (3) und der aktuell gültigen S2K-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der idiopathischen Lungenfibrose (6). Als Probenmaterial wurden humane Lungenhomogenate (LH), bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeiten (BALF) und Blutplasmaproben (BP) von Spendern, an IPF- und NSIP-Erkrankten verwendet. Bei den NSIP-Proben wurde nicht zwischen der Diagnose einer cNSIP und einer fNSIP unterschieden. Zusätzlich wurden Proben für immunhistochemische und molekulargenetische Nachweise aufbereitet. Die NSIP-Proben dienten, auf Grund der klinischen Ähnlichkeit des Krankheitsbildes zur IPF, als Vergleich und gleichzeitigen Abgrenzung der Ergebnisse der IPF zu anderen pulmonalen Fibrosen.

3.2.1.1. Humanes Lungengewebe

Das Lungengewebe der IPF-Patienten wurde im Rahmen jeweiliger Lungentransplantation gewonnen. Die Diagnose der IPF wurde in allen IPF-Lungen sowohl anhand der klinischen Kriterien als auch an der histologischen Sicherung eines UIP-Musters post explantationem gestellt. Die Lungen der NSIP-Patienten wurden ebenfalls im Rahmen von Lungentransplantationen gewonnen. Die demographischen und klinischen Daten dieser Population waren nicht mehr bei allen lungentransplantierten Patienten zu gewinnen. Auf Grund der Indikation zur Lungentransplantation sind die relevanten Lungenfunktionsparameter (FVC und DL_{CO}) jedoch als hochpathologisch zu sehen. Die Diagnose der Erkrankung erfolgte anhand der oben erwähnten Diagnosekriterien. Aus den

Lungenbereichen, die für die Transplantation nicht geeignet waren, wurden Proben entnommen, die als Spender (n=14) bezeichnet werden.

Das Gewebematerial wurde freundlicherweise bereitgestellt durch Prof. Dr. Walter Klepetko, Leiter der Abteilung für Thoraxchirurgie, Universität Wien und durch Prof. Dr. Winfried Padberg, Leiter der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Gießen.

Tabelle 3.1. Demographische und klinische Daten von IPF-Erkrankten und NSIP-Erkrankten (Lungenhomogenate)

	¹ IPF (² LH)	³ NSIP (LH)
Anzahl, n	13	10
Alter (in Jahren), ⁴ MW ± ⁵ SD	60,5 ± 18,3	-
Geschlecht (männlich/weiblich), n/n	10/3	-
Nikotinabusus (nie/beendet/persistierend), n/n/n	5/8/0	-
⁶ FVC% MW ± SD	59 ± 17,5	-
⁷ DL _{CO} % MW ± SD	28,1 ± 16,5	-
Gesicherte Diagnose eines ⁸ UIP-Musters, %	100	-

¹IPF, idiopathische pulmonale Fibrose; ²LH, Lungenhomogenate; ³NSIP, nicht spezifische interstitielle Pneumonie; ⁴MW, Mittelwert; ⁵SD, Standardabweichung; ⁶FVC, forcierte Vitalkapazität; ⁷DL_{CO}, Kohlenstoffmonoxid-Diffusionskapazität; ⁸UIP, Usual interstitial pneumonia

3.2.1.2. Humane Zitrat-Blutproben

Nach ausreichender Hautdesinfektion wurde mit Hilfe eines sterilen Butterfly-Infusionssystem und Zitrat-Blutröhrchen Blut abgenommen. Das gewonnene Vollblut wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 3939 x g für 20 Minuten zentrifugiert. Der plasmatische Überstand wurde nun erythrozytenfrei abpipettiert, aliquotiert und bei -80°C gefroren bzw. bis zur Verwendung gelagert.

Die Vergleichspopulation der Gesunden (n=22) war in Bezug auf verschiedene krankheitsrelevante Variablen (Alter, Geschlecht) mit den untersuchten Populationen vergleichbar. Die Gruppe der Gesunden zeigte dabei anamnestisch und klinisch keinen Hinweis auf das Vorliegen einer interstitiellen Lungenerkrankung.

Tabelle 3.2. Demographische und klinische Daten von IPF-Erkrankten und NSIP-Erkrankten (Blutplasma)

	¹ IPF (² BP)	³ NSIP (BP)
Anzahl, n	22	12
Alter (in Jahren), ⁴ MW ± ⁵ SD	67,5 ± 9,1	58,2 ± 18,6
Geschlecht (männlich/weiblich), n/n	17/5	6/6
Nikotinabusus (nie/beendet/persistierend), n/n/n	9/10/3	9/2/1
⁶ FVC% MW ± SD	65,5 ± 12,8	64,7 ± 15,4
⁷ DL _{CO} % MW ± SD	35,5 ± 0,5	46,9 ± 14,6
Histologische Diagnose eines ⁸ UIP-Musters %	40	-
Radiologische Diagnose eines UIP-Musters %	55	-

¹IPF, idiopathische pulmonale Fibrose; ²BP, Blutplasma; ³NSIP, nicht spezifische interstitielle Pneumonie; ⁴MW, Mittelwert; ⁵SD, Standardabweichung; ⁶FVC, forcierte Vitalkapazität; ⁷DL_{CO}, Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität; ⁸UIP, Usual interstitial pneumonia

3.2.1.3. Humane bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit

Die BALF wurden fiberoptisch durch flexible Bronchoskopie gewonnen. Die Untersuchung der gesunden Freiwilligen (n=19), der IPF-Patienten und NSIP-Patienten erfolgte in leichter Sedierung mittels Propofol 1% und Lokalanästhesie unter Spontanatmung. Die Lavagierung der Alveolen erfolgte mittels physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl). Die Lavageproben wurden zentrifugiert bei 400 x g, anschließend aliquotiert und bei -80°C gefroren und bis zur Verwendung gelagert.

Tabelle 3.3. Demographische und klinische Daten von IPF-Erkrankten und NSIP-Erkrankten (BALF)

	¹ IPF (² BALF)	³ NSIP (BALF)
Anzahl, n	20	10
Alter (in Jahren), ⁴ MW ± ⁵ SD	65,7 ± 10,6	60 ± 19,4
Geschlecht (männlich/weiblich), n/n	14/6	6/4
Nikotinabusus (nie/beendet/persistierend), n/n/n	10/8/2	6/3/1
⁶ FVC% MW ± SD	60,7 ± 15,1	66,3 ± 15,9
⁷ DL _{CO} % MW ± SD	43,1 ± 15,0	44,4 ± 15,0
Histologische Diagnose eines ⁸ UIP-Musters, %	25	-
Radiologische Diagnose eines UIP Musters, %	80	-

¹IPF, idiopathische pulmonale Fibrose; ²BALF, bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit; ³NSIP, nicht spezifische interstitielle Pneumonie; ⁴MW, Mittelwert; ⁵SD, Standardabweichung; ⁶FVC, forcierte Vitalkapazität; ⁷DL_{CO}, Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität; ⁸UIP, Usual interstitial pneumonia

3.2.2. Western-Blot

Zur Evaluation der pathogenetischen Bedeutung des Serin-Protease-Inhibitors, C1-INH, im Rahmen einer pulmonalen Fibrose wurden humane LH, humane BALF und humane BP-Proben gewonnen und mittels Western-Blot-Analyse untersucht.

3.2.2.1. Proteinquantifizierung und Aufbereitung der Proben für die Gelelektrophorese

Die Lagerung der Lungen erfolgte bis zur Bearbeitung bei -80°C . Zunächst erfolgte die Lyse der Proben in Radio Immuno Precipitation Assay (RIPA)-Puffer [50mM Tris-HCl, pH 7,4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton-X-100, 1% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS] unter Zusatz eines Protease-Inhibitors [1mM PMSF, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ complete protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Deutschland)]. Die Lysate wurden nun für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C für 10 min bei 12 290 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig in neue Eppendorfgefäße pipettiert und die Proteinkonzentration mit Hilfe des BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) gemessen. Die Proteinquantifizierung erfolgte mittels photometrischer Analyse. Die Proteinkonzentration in jeder Probe betrug 25 μg bei entsprechendem Volumen. Das Probenvolumen wurde bis auf 20 μl mit RIPA-Puffer ergänzt und mit zusätzlich 5 μl 5xLaemmli-Puffer [0,25M Tris-HCl, pH 6,8, 10% SDS, 50% Glycerol, 10% β -Mercaptoethanol] versetzt. Danach wurden die Proben für 10 min bei 98°C auf dem Thermoshaker erhitzt und abschließend erneut zentrifugiert.

Die Vorbereitung der BALF-Proben für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE) erfolgte wie folgend beschrieben. Die bei -80°C gelagerten BALF-Proben wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden je 20 μl BALF in jedes Eppendorfröhrchen pipettiert und mit 5xLaemmli-Puffer versetzt. Danach wurden die Proben wie oben beschrieben für 10 min bei 98°C erhitzt und abschließend erneut zentrifugiert.

Zur Vorbereitung der BP-Proben wurden diese ebenfalls auf Eis aufgetaut. Zunächst wurde in jedes Eppendorfröhrchen 19 μl RIPA-Puffer pipettiert und anschließend je 1 μl der zu untersuchenden BP-Probe hinzugegeben. Danach wurden die Proben mit 5xLaemmli-Puffer versetzt und analog obiger Beschreibung für 10 min bei 98°C erhitzt und abschließend zentrifugiert.

3.2.2.2. Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur weiteren Analyse der Proben wurde eine SDS PAGE durchgeführt, in der sich die Proteine nach Denaturierung und Reduktion ihrer Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur mittels SDS und β -Mercaptoethanol unter Einwirkung eines elektrischen Feldes entsprechend ihrer Molekülgröße auftrennen. Der unterschiedliche Acrylamidgehalt von

Sammel- und Trenngel bestimmt die Porengröße und beeinflusst daher, ähnlich einem Sieb, die Größenaufspaltung.

Zunächst wurde das Trenngel [10% Acrylamid: Bisacrylamid, 375mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,1% TEMED] eingefüllt und der obere Gelrand mit einigen Millilitern Übersichtungslösung (2-Methyl-1-Propanol) benetzt. Nach Entfernung der Übersichtungslösung und Auswaschen der Apparatur mit destilliertem Wasser wurde diese mit Sammelgel [Sammelgel 4%: Acrylamid: Bisacrylamid, 125mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,1% TEMED] aufgefüllt und ein Kamm eingesetzt. Nach Polymerisation wurden der Kamm entfernt sowie 5µl Protein Marker (Page Ruler, Prestained Protein Ladder, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) und die vorbereiteten Proben in die Kammtaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben in SDS-Laufpuffer [25mM Tris-HCl, 250mM Glycin, 0,1% SDS] erfolgte bei einer Spannung von 100 Volt für circa drei Stunden.

3.2.2.3. Immunoblot

Im Anschluss an die SDS PAGE wurden die aufgetrennten Proteine in Blotpuffer [25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol] und Eisbad bei einer Spannung von 100 Volt für 60 min auf eine PVDF-Membran, die zuvor mit 100%-igem Methanol aktiviert wurde, übertragen. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Aufspaltung erhalten. Die Membran wurde nun mit entfettetem Milchpulver [5% Skim Milk Powder, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO] in Tris-gepufferter Lösung mit Tween 20 (TBS-T) [25mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7,5, 0,1% Tween 20] für eine Stunde inkubiert und die freien Bindungsstellen somit blockiert, um unspezifisches Binden von Antikörpern zu verhindern. Die Detektion der spezifischen Proteinbanden wurde als indirekte Methode durchgeführt, bei der ein unkonjugierter proteinspezifischer primärer Antikörper mittels eines Enzym-konjugiertem Zweitantikörper nachgewiesen wurde. Dazu wurde die Membran zunächst dreimal für jeweils zehn Minuten mit TBS-T gewaschen und in einem Falcon-Röhrchen unter ständiger Rotation über Nacht bei 4°C mit einem der folgenden primären Antikörper inkubiert: polyklonaler Kaninchen-anti-C1-INH-Antikörper (Verdünnung 1:1000; Dako, Glostrup, Dänemark), der C1-INH alleine markiert; monoklonaler Maus-anti-C1-Inhibitor-Antikörper RII (Verdünnung 1:1000), der C1-INH alleine, als auch in Komplexen mit Proteasen markiert; monoklonaler Maus-anti-C1-INH-Antikörper KOK 12 (Verdünnung 1:1000), der spezifisch nur C1-INH in Komplexen mit Proteasen markiert (anti-C1-INH-Antikörper RII und anti-C1-INH-Antikörper KOK 12 wurden freundlicherweise bereitgestellt durch Dr. Sacha S. Zeerleder, Department of Immunopathology, Sanquin Research und Landsteiner Laboratory, Medical Center, Universität Amsterdam, Niederlande). Die Verdünnung

der primären Antikörper erfolgte in 1%-igem BSA in TBS-T. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran erneut dreimalig für jeweils zehn Minuten mit TBS-T gewaschen und anschließend mit dem Enzym-konjugiertem Zweitantikörper für eine Stunde unter ständiger Rotation bei Raumtemperatur inkubiert. Als Enzym-konjugierter Zweitantikörper wurde ein Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelter Antikörper (Dako, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1: 3000 in 5%-igem entfettetem Milchpulver und TBS-T genutzt. Anschließend erfolgte unter Verwendung des ECL Plus Kits (Amersham Bioscience, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) die chemilumineszente Detektion der Proteine in der Dunkelkammer. Nach der Detektion wurde die Membran für eine Stunde in Stripping-Puffer [100mM Glycin, 0,32% HCl] gestrippt, danach jeweils dreimal zehn Minuten mit TBS-T gewaschen, mit 5% entfettetem Milchpulver in TBS-T für zwei Stunden blockiert und erneut jeweils dreimal zehn Minuten mit TBS-T gewaschen. Um die Menge der Proteine, die auf die Membran geladen wurden, nachzuweisen erfolgte anschließend die Inkubation mit einem monoklonalem Maus-anti- β -Aktin-Antikörper (Verdünnung 1:5000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) für eine Stunde und der chemilumineszente Nachweis.

3.2.3. Enzym linked Immunsorbent Assay

Die quantitative Analyse der C1-INH-Konzentration wurde mittels Enzyme linked Immunsorbent Assay (ELISA) in LH, BP-Proben und BALF-Proben von Spendern, IPF-Patienten und NSIP-Patienten durchgeführt und verglichen. Für die Aktivitätsbestimmung wurde das MicroVue C1-INH plus EIA-Kit (Quidel Corporation, San Diego, CA) verwendet. Jeder Assay wurde entsprechend der jeweilig gültigen Anleitung vorbereitet und durchgeführt sowie die Leistungsmerkmale und Genauigkeit der Versuchsergebnisse anhand der testspezifischen Eichkurve bemessen.

3.2.3.1. C1-Inhibitor-Konzentration in Lungenhomogenaten, Blutplasma-Proben und BALF-Proben

Zum Bestimmen der C1-INH-Konzentration in LH, BP-Proben und BALF-Proben wurde ein ELISA-Test entwickelt.

Zunächst erfolgte die Vorbereitung des zu untersuchenden Probenmaterials. Dazu wurden die gefrorenen Zitrat-BP-Proben und die BALF-Proben auf Eis aufgetaut. Die Zitrat-BP-Proben wurden im Verhältnis 1:5000 in 0,9% NaCl verdünnt. Die BALF-Proben wurden unverdünnt für den ELISA Test verwendet. Die Proteinkonzentration der LH betrug

50µg in insgesamt 20µl RIPA-Puffer. Um auf das Volumen für den ELISA zu kommen wurden noch 30µl 0,9% NaCl zugegeben.

Die Herstellung und Durchführung des ELISA erfolgte wie folgend beschrieben. Zunächst wurde der Kaninchen-anti-C1-INH-Antikörper (DAKO) in Beschichtungspuffer (50mM NaHCO₃, pH 9,6) im Verhältnis von 1:1000 angesetzt. Anschließend wurde in jedes Well einer 96-Well Platte 50µl des angesetzten Antikörpers gegeben und die Platte bei 4°C über Nacht gecoatet. Am 2. Tag wurden die Wells einmal mit PBS-T (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, 0,1% Tween 20, pH 7,4) gewaschen, um ungebundene Erstantikörper zu entfernen. In jedes Well wurden anschließend 50µl des Blockpuffers (1%BSA in TBS [25mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7,5]) pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Vertiefungen erneut einmal mit PBS-T gewaschen. Nun wurden je 50µl der zu untersuchenden und vorbereiteten Proben sowie die Standardproben mit bekannter absteigender Konzentrationsreihe in die entsprechenden Wells gegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen mit PBS-T. Nach diesem Waschzyklus wurden 50µl des Maus-anti-C1-INH Antikörpers RII (Verdünnung 1:1000 in 1% BSA in PBS-T) zugegeben. Die Wells wurden nun für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte erneut ein dreimaliger Waschzyklus mit PBS-T. Danach wurden je 50µl des anti-Maus-HRP-Antikörpers (Verdünnung 1:5000 in 0,1% BSA in PBS) in jedes Well pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Vertiefungen dreimal mit PBS-T gewaschen. Die Peroxidase-Reaktion wurde nun durch Zugabe einer nach der Empfehlung des Herstellers vorbereiteten Tetramethylbenzidin-Substrat-Lösung (TMB-Substrat-Lösung) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) getriggert. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Enzym-Substrat-Reaktion durch Hinzufügen von je 50µl Schwefelsäure (2M H₂SO₄) gestoppt und der Farbumschlag durch spektrometrische Analyse bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen. Die Standardkurve wurde anhand der Absorptionwerte der bekannten absteigenden Konzentrationsreihe von Plasma-gereinigtem C1-INH (Berinert, CSL Behring, Marburg, Deutschland) ermittelt.

3.2.3.2. C1-Inhibitor-Aktivität in Blutplasma-Proben

Die Untersuchung der Aktivität in den verschiedenen BP-Proben von Spendern, an IPF-Erkrankten und NSIP-Erkrankten erfolgte mit Hilfe des MicroVue Complement C1-INH Plus-EIA-Kits (Quidel Corporation, San Diego, CA). Die Materialien wurden vor Testbeginn auf Zimmertemperatur gebracht. Die zu untersuchenden BP-Proben wurden auf Eis vorsichtig aufgetaut und anschließend ebenfalls auf Zimmertemperatur gebracht. Das

Funktionsprinzip umfasst im Ganzen vier Schritte. Zunächst erfolgt die Inkubation der Standardlösungen, der Kontrollen und der zu untersuchenden Proben mit dem biotinyliertem und aktiviertem C1s, welches als Substrat des aktiven C1-INH fungiert. Dadurch kommt es zur C1-INH-C1s-Komplexbildung. Im zweiten Schritt werden diese Komplexe in Kontakt mit Avidin und im dritten mit HRP-konjugiertem anti-humanem C1-INH-Antikörper gebracht. Im vierten Schritt erfolgt der Nachweis mittels Inkubation eines chromogenen Substrates, darauffolgender Enzym-Substrat-Reaktion und anschließender spektrophotometrischer Analyse. Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der mitgelieferten Testanleitung unter Verwendung der Kit-Materialien. Die Verdünnung der BP-Proben wurde gemäß der vorgegebenen Verdünnung von 1:100 durchgeführt.

Im Detail wurden folgende Reaktionsschritte bearbeitet. Zunächst wurden je 100µl der Standardlösungen, der anormalen und normalen Kontrolle sowie der 1:100 verdünnten Proben in ein Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Jedes dieser Mikroreaktionsgefäße wurde nun mit 20µl des aktivierten C1s versetzt und kräftig gevortext. Danach wurden die Reaktionsansätze bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden je 50µl der Standardlösungen als Duplikate, die anormale und normale Kontrolle, die zu untersuchenden Proben und zwei Blank-Lösungen (Probenverdünnungspuffer) in die mit Avidin-beschichteten Mikroassay-Vertiefungen gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach diesem Schritt wurden aus den Mikroassay-Vertiefungen die jeweiligen Flüssigkeiten entfernt und die Teststreifen mehrfach mit der mitgelieferten Waschlösung, wie in der Anleitung beschrieben, gewaschen. Die Restflüssigkeiten konnten durch sorgfältiges Ausklopfen gründlich entfernt werden. Darauffolgend wurden mit einer Mehrfachpipette je 50µl eines an HRP-konjugierten anti-humanen C1-INH-Antikörpers in die Mikroassay-Vertiefungen gegeben und die Reaktion erneut für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei konnte der HRP-konjugierte anti-C1-INH-Antikörper an die C1s-C1-INH-Komplexe binden. Anschließend wurden die Teststreifen erneut mehrfach gewaschen und unmittelbar folgend mit 100µl TMB-Substrat versehen. Nach 15-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe 4%-iger Salzsäure (HCl) als Stopp-Lösung beendet und der Farbumschlag spektrophotometrisch bei 450nm-Wellenlänge gemessen. Nach Blindwertkorrektur konnten die ermittelten Werte in Beziehung zu den Standardwerten gesetzt werden. Die Ergebnisse werden als Prozentsatz des Mittelwerts einer normalen Probe angegeben. Gemäß den Testkriterien des EIA-Kits gelten Konzentrationen von $\geq 68\%$ des mittleren Normalwertes als normal. Der mittlere Normalwert wurde dabei aus der Untersuchung 100 gesunder Probanden, die durch drei verschiedene Laboratorien getestet und ausgewertet wurden, ermittelt.

3.2.3.3. ELISA zur Bestimmung der C1-Inhibitor-Histon-Komplexe

Zur Bestimmung der C1-INH-Histon-Komplexverbindungen wurde ein ELISA-Test durchgeführt. Dazu wurde aus dem Cell death Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) der Histon-Antikörper verwendet.

Die weitere Herstellung und Durchführung des Tests erfolgte wie folgend beschrieben. Zunächst wurden Histon-Antikörper und Beschichtungspuffer (Roche, Mannheim, Deutschland) im Verhältnis von 1:10 angesetzt. Anschließend wurden in jedes benötigte Well einer 96-Well Platte 50µl der angesetzten Antikörper-Beschichtungspuffer-Lösung (50mM NaHCO₃, pH 9,6) gegeben und die Platte bei 4°C über Nacht gecoatet. Zur Entfernung ungebundener Erstantikörper wurde die 96-Well Platte am nächsten Tag einmal mit PBS-T gewaschen. Anschließend wurden die Vertiefungen mit 50µl der Blocking-Lösung (1% BSA in PBS) für 1h bei Raumtemperatur inkubiert und danach erneut einmal mit PBS-T gewaschen. Im nächsten Schritt wurden je 50µl unverdünnte BALF von Spendern und IPF-Patienten in die Vertiefungen pipettiert und für 1h bei 37°C inkubiert. Nach 1h wurden die Proben entfernt und die Wells dreimal mit PBS-T gewaschen. Nach diesem Waschzyklus wurden 50µl des Kaninchen-anti-C1-INH (Dako, Glostrup, Dänemark) (Verdünnung 1:1000 in 1% BSA in PBS) zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurde der Antikörper entfernt und die Wells erneut dreimal mit PBS-T gewaschen. Danach wurden je 50µl des anti-Kaninchen-HRP-Antikörpers (Verdünnung 1:5000 in 0,1% BSA in PBS) in jedes Well pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte erneut dreimaliges Waschen mit PBS-T. Durch Zugabe von 50µl TMB-Substrat wurde die Peroxidase-Reaktion getriggert und die Enzym-Substrat-Reaktion nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur durch weitere Zugabe von je 50µl 2M H₂SO₄ gestoppt. Der Farbumschlag wurde durch spektrometrische Analyse bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen.

3.2.4. Immunhistochemie

Für immunhistochemische Versuche wurden in Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Lungengewebe verwendet. Die Lungengewebeblöcke wurden auf eine Dicke von 5µm zugeschnitten und anschließend auf einen Objektträger übertragen. Zur Immunfärbung wurde das ZytoChem Plus AP Polymer-Kit (Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) verwendet. Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydratisiert, indem sie kurz in Xylol inkubiert und in Ethanol in einer absteigenden Konzentrationsfolge (100%, 96%, 70%, 50%) unter ständiger Bewegung gebadet wurden. Anschließend wur-

den die Schnitte in PBS ebenfalls unter ständiger Bewegung gewaschen. Diese Waschprozedur wurde dreimal wiederholt. Die Permeabilisierung erfolgte mit Fast Enzyme (Zytomed Systems) für 10 Minuten auf dem Shaker. Danach wurden die Schnitte erneut dreimal mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 1-2 Tropfen der Blocking-Lösung für 5 Minuten geblockt. Durch dreimaliges Waschen mit PBS wurde diese wieder entfernt. Die Schnitte wurden dann mit dem in 0,1% BSA in PBS verdünnten Maus-anti-C1-INH-Antikörper RII (Verdünnung 1:1000) bei 4°C über Nacht inkubiert. Darauf folgte ein Wechsel aus dreimal PBS-Waschen, Zugabe von 1-2 Tropfen Postblock-Lösung für 20 Minuten, PBS-Waschen und Zugabe von 1-2 Tropfen AP-Polymer für 30 Minuten. Abschließend wurden die Schnitte nochmals mit PBS gewaschen. Zur Entwicklung wurde das Permanent AP Red-Kit (Zytomed Systems) verwendet. Dazu wurde 1 Tropfen des chromogenen Substrats in 2,5ml Permanent AP Red-Puffer gelöst und jedes Präparat mit 100µl dieser Substanz inkubiert. Die Färbung wurde unter Mikroskopkontrolle detektiert und durch destilliertes Wasser gestoppt. Die Gegenfärbung wurde mit unverdünnter Hämalun-Färbung nach Mayer für 2 Minuten durchgeführt und von einem weiteren 10-minütigem Waschprozess unter fließendem Wasser gefolgt. Abschließend wurden die gefärbten Gewebsschnitte in Ethanol in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe (50%, 70%, 96%, 100%) und in Xylol gebadet und mit Roti Histokit II (Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckelt.

3.2.5. Humane Lungengewebe Homogenisierung und RNA-Isolierung

Das humane Lungengewebe wurde bis zur Versuchsdurchführung bei -80°C gelagert. Die Bearbeitung erfolgte mit Hilfe des PeqGold Total RNA Kits (PeqLab, Erlangen, Deutschland) gemäß der Versuchsanleitung. Die jeweiligen Proben wurden unter flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Keramikmörser pulverisiert, das Gewebepulver in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 500µl des RNA-Lyse-Puffers resuspendiert und auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lysate auf ein DNA removing column aus dem Kit aufgetragen und bei 8049 x g für 1 Minute zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde nun in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, mit 500µl 70%-igem Ethanol versetzt und durch vortexen gemischt. Im nächsten Schritt wurde die Lösung auf ein RNA Column aufgetragen und bei 5590 x g für 1 Minute zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde verworfen und das RNA Column mit den mitgelieferten Waschsubstraten gemäß der Anleitung dreimal unter 15-sekündiger Zentrifugation gewaschen. Im Anschluss daran wurde das RNA Column durch 2-minütige Zentrifugation getrocknet und auf ein steriles Reaktionsgefäß aufgesteckt. Die RNA konnte dann durch RNase-freies Wasser eluiert werden. Dazu wurden 50µl des RNase freien Wassers auf die Matrix aufgetragen, dieses 2 Minuten

inkubiert und bei 1398 x g abzentrifugiert. Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde mit einem Photometer quantifiziert und die Qualität durch eine Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung im Anschluss überprüft.

3.2.6. Aufbereitung von humanen Blutzellen und RNA-Isolierung

Die Isolierung von Leukozyten erfolgte wie nachfolgend beschrieben. Die Blutproben wurden mit einem 7,5ml EDTA-Röhrchen abgenommen. Anschließend wurden die Proben in ein Falcon-Röhrchen gegeben und mit dem gleichen Volumen an PBS versetzt. In ein weiteres Falcon-Röhrchen wurden 15ml Biocoll Separations-Puffer (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gegeben. Danach wurde die Blut-PBS-Mischung vorsichtig mit einer Saug-Pipette auf die Biocoll-Lösung aufgetragen und das gesamte Reaktionsgemisch bei 1120 x g für 30 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Leukozytenschicht zeigte sich anschließend als heller Ring auf der Plasmaphase und wurde mit einer Saugpipette abpipettiert und in einem kleinen Falcon gesammelt. Nach Zugabe von 45ml PBS wurde nun erneut für 15 min bei 194 x g zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Falls das gewonnene Pellet noch eine Kontamination mit Erythrozyten aufwies, wurde 1ml Ultra pure Water (B. Braun AG, Melsungen, Deutschland) hinzugegeben und der Ansatz für einige Sekunden geschwenkt. Anschließend wurde dieser mit 9ml PBS versetzt und 10 min bei 194 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde nun abpipettiert und das gereinigte Pellet mit 400µl Lysis-Puffer resuspendiert. Die weitere RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des PeqGold Total RNA Kits analog obiger Beschreibung.

3.2.7. Isolierung von Alveolarepithel-Typ II-Zellen und RNA-Isolierung

Die Isolierung von AT II erfolgte wie bei Gonzales LW et al. beschrieben (75). Das Lungengewebe wurde zerkleinert und unter Rühren bei 37°C für 45 min in Minimum Essential Medium (MEM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) unter Zusatz von Trypsin (1mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), Kollagenase I (0,5mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), Kollagenase IA (0,5mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) sowie DNase (20µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) inkubiert. Anschließend wurde die gewonnene Suspension viermal gefiltert und somit von Geweberesten und verklumpten Zellen befreit. Die resultierende Zellsuspension wurde danach in Zellkulturschalen dreimal für jeweils 10 min durch Adhärenz von Fibroblasten gereinigt. Die danach übrig gebliebene Zellsuspension wurde anschließend bei 1000 x g für 5 min zentrifugiert. Die isolierten Zellen wurden auf Reinheit mittels Färbung mit polyklonalem Hase-anti-ProSPC-Antikörper (Merck, Darmstadt, Deutschland) überprüft. Dabei lag die Reinheit der Zellen zwischen 90-95%. Das gereinigte Zellpellet wurde mit RNA-Lyse-Puffer resuspendiert. Die

weitere RNA-Isolierung erfolgte unter Verwendung des PeqGold Total RNA Kits gemäß obiger Arbeitsanleitung.

3.2.8. Reverse Transkription

Für die Herstellung von cDNA aus RNA wurde eine reverse Transkriptions (RT)-Reaktion durchgeführt. Dabei wurde ein Master Mix der Firma Applied Biosystems (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA) verwendet. Die Zusammensetzung des Master Mix ist in Tabelle 3.4 veranschaulicht.

Tabelle 3.4. Zusammensetzung des Master Mix für die reverse Transkription

Master Mix	Volumen (µl)
MultiScribe™ Reverse Transkriptase (50U/µl)	1,0
10x Reverse Transkriptase Puffer	2,0
10x RT Random Primer (25µM)	2,0
dNTP (100mM)	0,8
RNase Inhibitor (20U/µl)	1,0
RNase freies Wasser	3,2
Total	10,0

Die Vorbereitung wurde auf Eis durchgeführt. Insgesamt hatte der Master Mix ein Volumen von 10µl. Diesem wurde nun 1µg RNA mit einem maximalen Volumen von 10µl hinzugefügt. Die reverse Transkription wurde im Thermocycler unter folgenden Bedingungen der verschiedenen Zyklen durchgeführt:

Tabelle 3.5. Reaktionszyklen der reversen Transkription

Zyklen	1	2	3	4
Temperatur	25°C	37°C	85°C	4°C
Zeitdauer	10 Min	120 Min	5 Min	∞

3.2.9. Real time Polymerasekettenreaktion

Die Lagerung der cDNA-Proben war bis zur Versuchsdurchführung bei -20°C. Die real time Polymerasekettenreaktionen (qPCR) wurden unter Verwendung des Platinum® Sybr Green qPCR Super Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA) durchgeführt. Dabei kann die Zusammensetzung des Versuchsansatzes nachfolgend Tabelle 3.6 entnommen werden.

Tabelle 3.6. Zusammensetzung des Master Mix für die qPCR

Master Mix	Volumen (µl)
Reverse Primer (10µM)	0,5
Forward Primer (10µM)	0,5
Sybr Mix	12,5
RNase freies Wasser	10,5
cDNA	1,0
Total	25

Die folgenden Primer wurden verwendet: human C1-INH forward: 5'-CTC CGA TAC CCG CCT TGT C-3'; human C1-INH reverse: 5'- GCA CTT TTA TAA CTG AGT TTT TGA AGT GA-3' (C1-INH Accession Number: NM_001032295.1; PCR-Produkt 121 Nukleotide); human β-actin forward: 5'-ATT GCC GAC AGG ATG CAG GAA-3'; human β-actin reverse: 5'-GCT GAT CCA CAT CTG CTG GAA-3' (β-Aktin Accession Number: NM_001101.3; PCR-Produkt 149 Nukleotide); β-Aktin wurde als Referenzgen verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde mit 1µl cDNA versetzt und in eine 96-Well-Platte (Thermo-Fast 96 PCR Detection Platte, ABGene ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) pipettiert. Anschließend wurde die Platte mit einer Klarsichtmembran (Absolute QPCR SEAL, ABGene ThermoFisher Scientific) abgedichtet. Der PCR-Prozess wurde im Thermocycler durchgeführt. Die einzelnen Phasen der Denaturierung, Hybridisierung und Elongation erfolgten wie in Tabelle 3.7 veranschaulicht.

Tabelle 3.7. Reaktionszyklen der qPCR

	Denaturierungsphase	Denaturierungs-, Hybridisierungs-u. Elongationsphase (40 x Wiederholungen)	
Temperatur	95°C	95°C	60°C
Zeitdauer	10 min	0,25 min	1 min

Im Anschluss wurden unspezifische Amplifikationen und Kontaminationen im Rahmen der Schmelzkurvenanalyse ausgewertet und eradiziert. Zusätzlich erfolgte die Kontrolle durch eine Agarose-Gel Analyse. Die Ergebnisse wurden als ΔC_T -Werte, also der Differenz aus den jeweiligen C_T -Werten des C1-INH und des Referenzgens β -Aktin, angegeben.

3.2.10. Statistik

Die densitometrische Analyse der verschiedenen Western-Blot-Ergebnisse wurde mittels LabImage 1D (1D Analyse Software, INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Zur anschließenden weiteren statistischen Auswertung wurde GraphPad (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) genutzt. Die Ergebnisse sind in Form von Box-Whisker-Plots als Median \pm Interquartilsabstand angegeben. Somit beschreiben diese den Median und den Abstand zwischen dem ersten und dritten Quartil. Die Whiskers spiegeln als Spannweite das Maximum und Minimum des jeweiligen Ergebnisbereichs wieder. Der Median wird durch einen waagrechten Strich in der Mitte der Box gekennzeichnet. Die Unterschiede zweier Gruppen wurden mittels des nichtparametrischen Mann-Whitney-Tests analysiert. Die statistische Auswertung mehrerer Gruppen erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und anschließendem Tukey-post-hoc-Test. Die statistischen Testverfahren wurden als zweiseitige Hypothesentests durchgeführt. Dabei wurde eine statistische Signifikanz ab einem Level von $p < 0,05$ definiert.

4. Ergebnisse

4.1. C1-Inhibitor-Expression zeigt keine Unterschiede zwischen IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Spendern in humanen Lungenhomogenaten

Die Proteinausprägung des C1-INH im Rahmen pulmonaler Fibrosen wurde in humanen LH untersucht. Abbildung 4.1. zeigt die Ergebnisse von Western-Blot-Analysen, bei denen drei verschiedenen Primärantikörper mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften eingesetzt wurden. Verglichen wurden pulmonale Gewebeproben von Spendern, IPF-Patienten und NSIP-Patienten.

In der oberen Western-Blot-Analyse wurde ein polyklonaler Kaninchen-anti-C1-INH-Antikörper verwendet, der freien C1-INH mit einer Proteingröße von circa 100kDa bindet. In der Proteinausprägung des C1-INH zeigt sich dabei kein Unterschied zwischen den LH von IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Spendern.

In der mittleren Western-Blot-Analyse wurde der monoklonale Maus-anti-C1-INH-Antikörper RII verwendet. Dieser Antikörper markiert sowohl freien C1-INH als auch C1-INH in einer C1-INH-Substrat-Komplexform. In diesem Western-Blot zeigen sich Banden im Bereich des Molekulargewichts von freiem C1-INH von circa 100kDa. Interindividuelle Unterschiede zwischen den LH von IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Spendern lassen sich dabei nicht erkennen. Spezifische Banden im Bereich höherer Molekülmasse als Indikator für C1-INH-Substrat-Komplexe demarkieren sich nicht.

In der unteren Western-Blot-Analyse wurde der monoklonale Maus-anti-C1-INH-Antikörper KOK 12 verwendet, der spezifisch nur komplexierten C1-INH markiert. Es zeigen sich, wie auch im vorherigen RII-Western-Blot, in keinem der LH Banden im Bereich des zu erwartenden Molekulargewichtes entsprechender C1-INH-Substrat-Verbindungen.

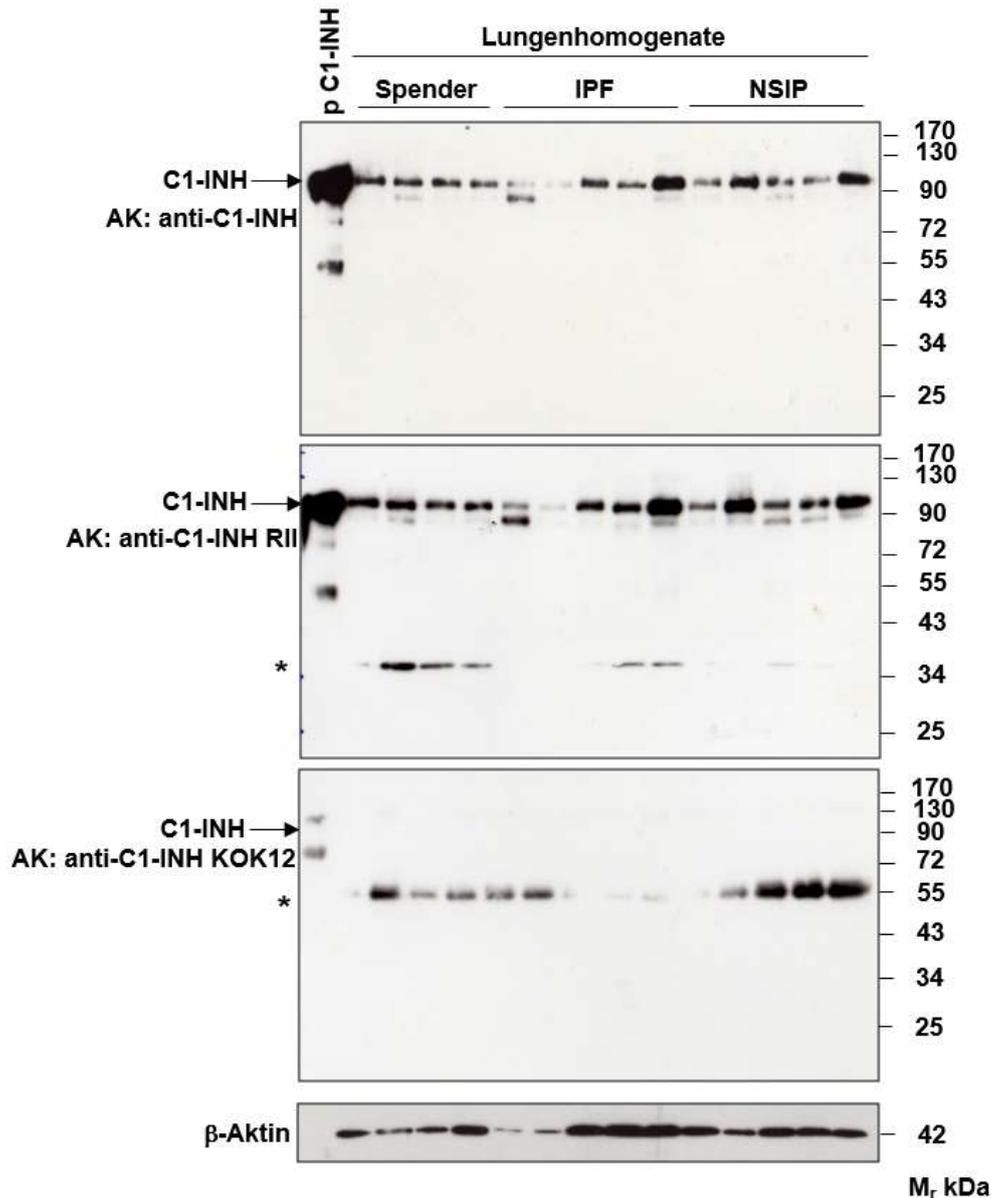


Abbildung 4.1. Keine Unterschiede in der C1-INH-Expression in humanen Lungenhomogenaten von IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Spendern. C1-INH-Expression nachgewiesen mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung von: polyklonalem Kaninchen-anti-C1-INH-Antikörper (obere Abbildung), monoklonalem Maus-anti-C1-INH-Antikörper RII (mittlere Abbildung) und monoklonalem Maus-anti-C1-INH-Antikörper KOK 12 (untere Abbildung). Dargestellt ist eine repräsentative Auswahl von IPF-Patienten (5 von 13), NSIP-Patienten (5 von 10) und von Spendern (4 von 14). Die Loading-Kontrolle erfolgte mit β -Aktin. Unspezifische Bandenmarkierungen sind mit (*) gekennzeichnet. p C1-INH, Plasma gereinigter C1-Inhibitor; IPF, idiopathische pulmonale Fibrose; NSIP, nicht spezifische interstitielle Pneumonie; AK, Antikörper

Abbildung 4.2. veranschaulicht die densitometrische Auswertung der durchgeführten Western-Blot-Analysen. Dabei zeigen sich keine signifikanten Unterschiede der C1-INH-Proteinausprägung in humanen LH von IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Spendern.

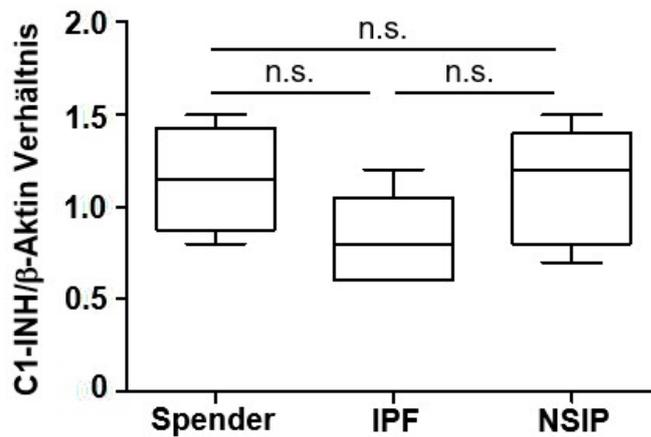


Abbildung 4.2. Densitometrische Auswertung der Western-Blot-Ergebnisse der humanen Lungenhomogenaten von IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Spendern. Ergebnisse von allen IPF-Patienten (n=13), NSIP-Patienten (n=10) und Spendern (n=14) sind dargestellt als relative densitometrische Intensität (im Vergleich zur Referenzprobe β -Aktin); IPF, idiopathische pulmonale Fibrose; NSIP, nicht spezifische interstitielle Pneumonie; n.s., nicht signifikant

Zur quantitativen Auswertung des C1-INH in humanen LH wurde ein ELISA-Test durchgeführt. Abbildung 4.3. veranschaulicht die Ergebnisse. Die Konzentration des C1-INH wird dabei auf der y-Achse in ng/ml angegeben. Es zeigt sich in der Konzentration des C1-INH zwischen LH von IPF-Patienten (n=13), NSIP-Patienten (n=10) und Spendern (n=14) kein signifikanter Unterschied. Diese Ergebnisse bestätigen die bereits zuvor gezeigten Resultate der Western-Blot-Analysen.

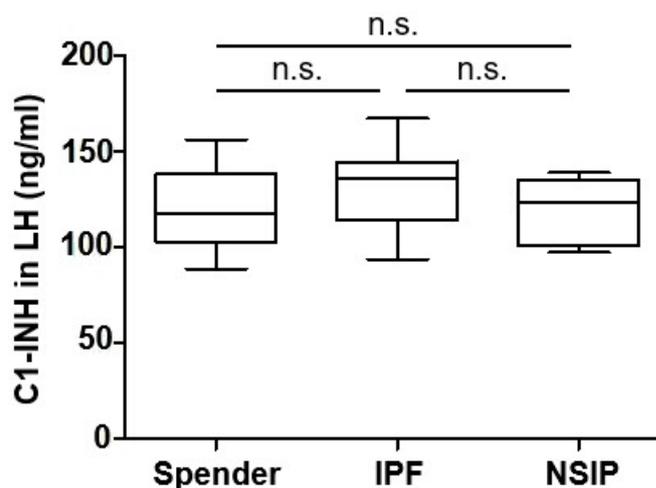


Abbildung 4.3. Keine C1-INH-Konzentrationsunterschiede in humanen Lungenhomogenaten von IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Spendern. C1-INH-Konzentration von IPF-Patienten (n=13), NSIP-Patienten (n=10) und Spendern (n=14) nachgewiesen durch ELISA; LH, Lungenhomogenate; IPF, idiopathische pulmonale Fibrose; NSIP, nicht spezifische interstitielle Pneumonie; n.s., nicht signifikant

4.2. Erniedrigung der C1-Inhibitor-Ausprägung von IPF-Patienten in der bronchoalveolären Lavage

Die Proteinausprägung des C1-INH wurde in BALF untersucht. Abbildung 4.3. veranschaulicht die durchgeführten Western-Blot-Analysen. Es wurden BALF-Proben von IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Spendern getestet. Dabei wurden die gleichen Antikörper verwendet wie bereits bei den Western-Blot-Versuchen der humanen LH.

Im oberen Western-Blot-Versuch markiert sich unter Verwendung des polyklonalen Kaninchen-anti-C1-INH-Antikörpers die C1-INH-Banden im Bereich von ca. 100kDa. Unter Berücksichtigung des Bindungsverhaltens des verwendeten Primärantikörpers entspricht dies dem Molekülgewicht des freien C1-INH. Im Rahmen dieser Analyse zeigt sich eine deutliche Erniedrigung der Proteinausprägung des C1-INH im Kollektiv der IPF-Patienten im Vergleich zu den Gruppen der NSIP-Patienten und Spendern.

In der mittleren Versuchsreihe wurde der monoklonale Maus-anti-C1-INH RII verwendet. Entsprechend dem Bindungsverhalten dieses Primärantikörpers zeigt sich, dass die IPF-BALF-Proben im Vergleich zu den NSIP-BALF-Proben und den Spender-BALF-Proben eine erniedrigte C1-INH-Proteinausprägung im Bereich des Proteingewichts des freien C1-INH aufweisen. Spezifische Banden im Bereich höherer Molekülmasse, die C1-INH-Substrat-Komplexverbindungen markieren, lassen sich nicht erkennen.

Die untere Abbildung zeigt den Proteinnachweis unter Verwendung des monoklonalen Maus-anti-C1-INH-Antikörpers KOK 12, der spezifisch nur C1-INH-Substrat-Komplexe markiert. Unter Berücksichtigung des Bindungsverhaltens dieses Primärantikörpers lassen sich keine spezifischen Banden im Bereich der zu erwartenden Proteinmasse erkennen.

Zur Verifizierung und genaueren Untersuchung der Western-Blot-Ergebnisse wurden die BALF-Proben von IPF-Patienten, von NSIP-Patienten und von Spendern in einem ELISA getestet. Abbildung 4.4. veranschaulicht die in diesem antikörperbasierten Verfahren gewonnenen quantitativen Ergebnisse. Die C1-INH-Konzentration ist auf der y-Achse in ng/ml aufgetragen.

Dabei zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen der IPF-Gruppe und den beiden anderen Gruppen. Nach statistischer Analyse zeigt sich die gemessene C1-INH-Konzentration von IPF-Erkrankten im Vergleich zur Konzentration von Spendern in der BALF signifikant erniedrigt. Im Vergleich von IPF-Patienten und NSIP-Erkrankten zeigt sich

ebenfalls eine signifikant erniedrigte C1-INH-Konzentration der IPF-Gruppe. Im Vergleich der Spender-Gruppe und der NSIP-Gruppe ist kein Signifikanzunterschied statistisch zu erfassen.

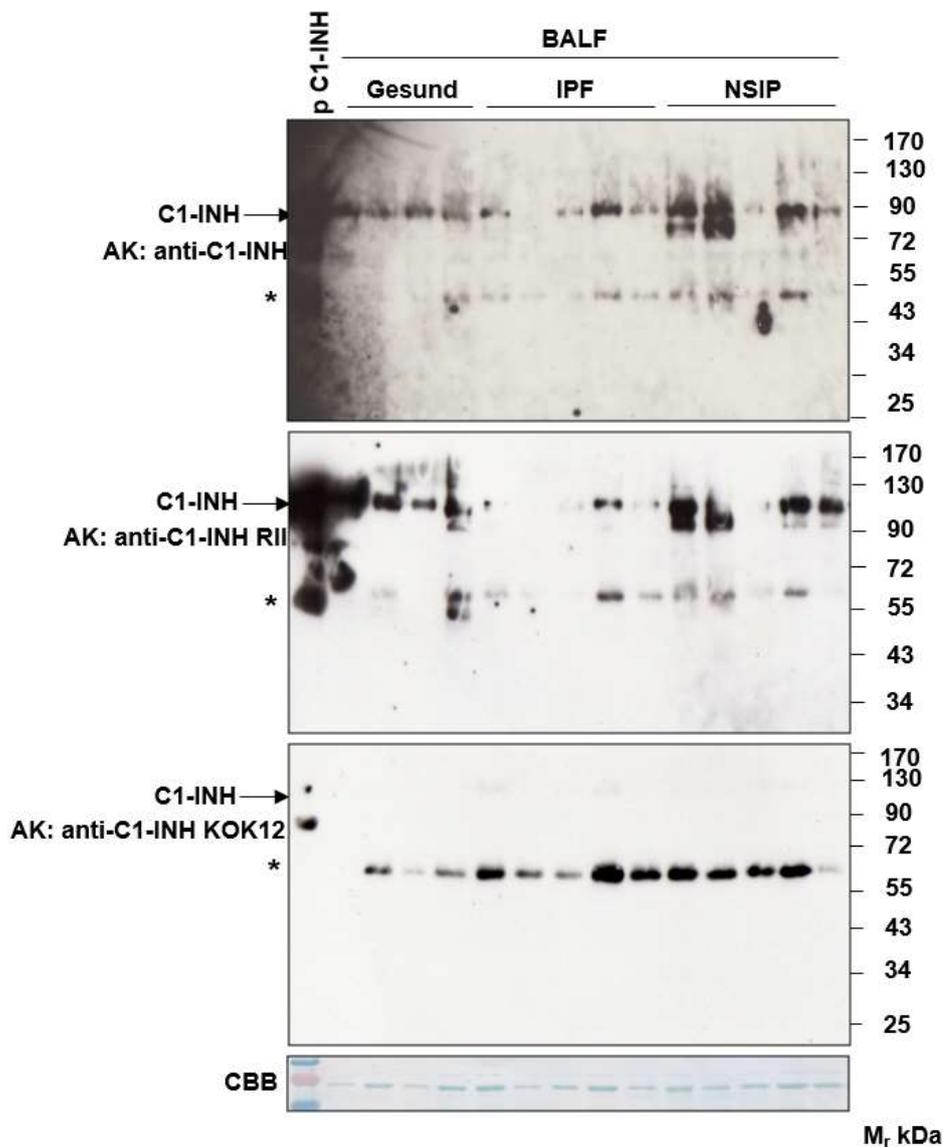


Abbildung 4.4. Erniedrigte C1-INH-Expression in IPF-BALF. C1-INH-Expression nachgewiesen mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung von: polyklonalem Kaninchen-anti-C1-INH-Antikörper (obere Abbildung), monoklonalem Maus-anti-C1-INH-Antikörper RII (mittlere Abbildung) und monoklonalem Maus-anti-C1-INH-Antikörper KOK 12 (untere Abbildung). Dargestellt ist eine repräsentative Auswahl von IPF-Patienten (5 von 20), NSIP-Patienten (5 von 10) und von Spendern (4 von 19). Die Loading-Kontrolle erfolgte mit CBB. Unspezifische Bandenmarkierungen sind mit (*) gekennzeichnet. p C1-INH, Plasma gereinigter C1-Inhibitor; IPF, idiopathische pulmonale Fibrose; NSIP, nicht spezifische interstitielle Pneumonie; AK, Antikörper; CBB, Coomassie-brilliant-blue

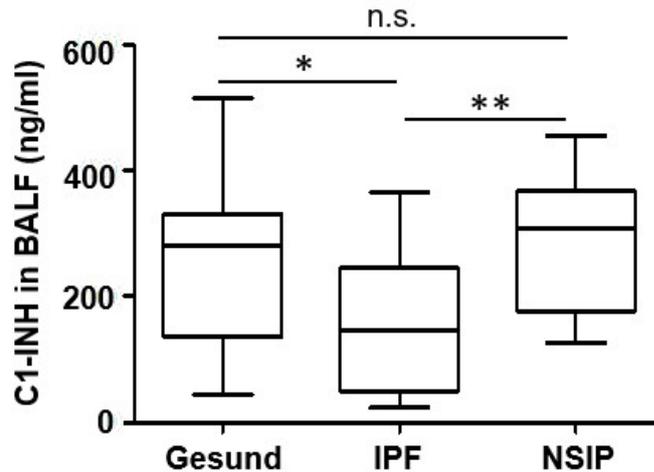


Abbildung 4.5. Signifikant erniedrigte C1-INH-Konzentration in IPF-BALF. C1-INH-Konzentration von IPF-Patienten (n=20), NSIP-Patienten (n=10) und Spendern (n=19) nachgewiesen durch ELISA. *p<0,05. IPF, idiopathische pulmonale Fibrose; NSIP, nicht spezifische interstitielle Pneumonie, BALF, bronchoalveoläre-Lavage-Flüssigkeit, n.s., nicht signifikant

4.3. Keine Unterschiede der C1-Inhibitor-Ausprägung und Aktivität in humanen Blutplasma-Proben

Neben den bereits erwähnten Kompartimenten (LH, BALF) wurden Western-Blot-Analysen auch von humanen BP-Proben durchgeführt. Es wurden dabei die BP-Proben von IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Spendern mittels der bereits etablierten Primärantikörper untersucht. Die gewonnenen Ergebnisse veranschaulicht Abbildung 4.6.

In der oberen Abbildung wurde der polyklonale Kaninchen-anti-C1-INH-Antikörper verwendet. Es demarkieren sich die C1-INH-Banden gemäß der spezifischen Bindungseigenschaft dieses Antikörpers im Bereich der Proteinmasse von freiem C1-INH bei ca. 100kDa. Dabei ist in den untersuchten Gruppen zwischen IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Gesunden kein Unterschied in der entsprechenden Proteinausprägung zu erkennen.

Die mittlere Abbildung demonstriert die Western-Blot-Analyse unter Verwendung des monoklonalen Maus-anti-C1-INH-Antikörpers R11. Unter Berücksichtigung des Bindungsverhaltens dieses Antikörpers zeigt sich die Bande des freien C1-INH bei ca. 100kDa. Die Proteinausprägung ist dabei in den untersuchten Gruppen als gleich zu bewerten.

In der unteren Abbildung wurden die Western-Blot-Membranen mit dem monoklonalen Maus anti-C1-INH-Antikörper KOK 12 inkubiert. Die sich dabei demarkierenden Banden im Bereich eines höheren Molekulargewichts von 170kDa könnten auf C1-INH-Protease Komplexe hindeuten, während die anderen Banden, auch auf Grund des Bindungsverhaltens in der oberen und mittleren Abbildung, eher als unspezifische Demarkierungen anzusehen sind. Es ist auch zu erkennen, dass bei IPF-Patienten und NSIP-Patienten mehr Komplexe im Vergleich zu den Plasmaproben von Gesunden vorhanden sind. Da spezifische anti-Faktor XIIa-Antikörper und spezifische anti-Kallikrein-Antikörper keine Komplexe demarkierten, ist hier nicht eindeutig zu klären, ob die sich demarkierenden Banden im Bereich des Molekulargewichts von C1-INH-Protease-Komplexen Verbindungen zwischen Faktor XIIa-C1-INH oder Verbindungen von Kallikrein-C1-INH zuzuordnen sind.

Im Rahmen genauerer Analysen und Verifizierung der Western-Blot-Resultate wurden Blutplasma-ELISA-Tests von IPF-Patienten, NSIP-Patienten und gesunden Probanden ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.7 dargestellt. Die C1-INH Plasmakonzentration wurde auf der y-Achse in $\mu\text{g/ml}$ aufgetragen.

Es zeigten sich zwischen den untersuchten Gruppen statistisch keine signifikanten Unterschiede in der Plasmakonzentration von C1-INH. Insgesamt lag die Konzentration des C1-INH in diesem ELISA im Rahmen der zu erwartenden physiologischen Plasmakonzentration.

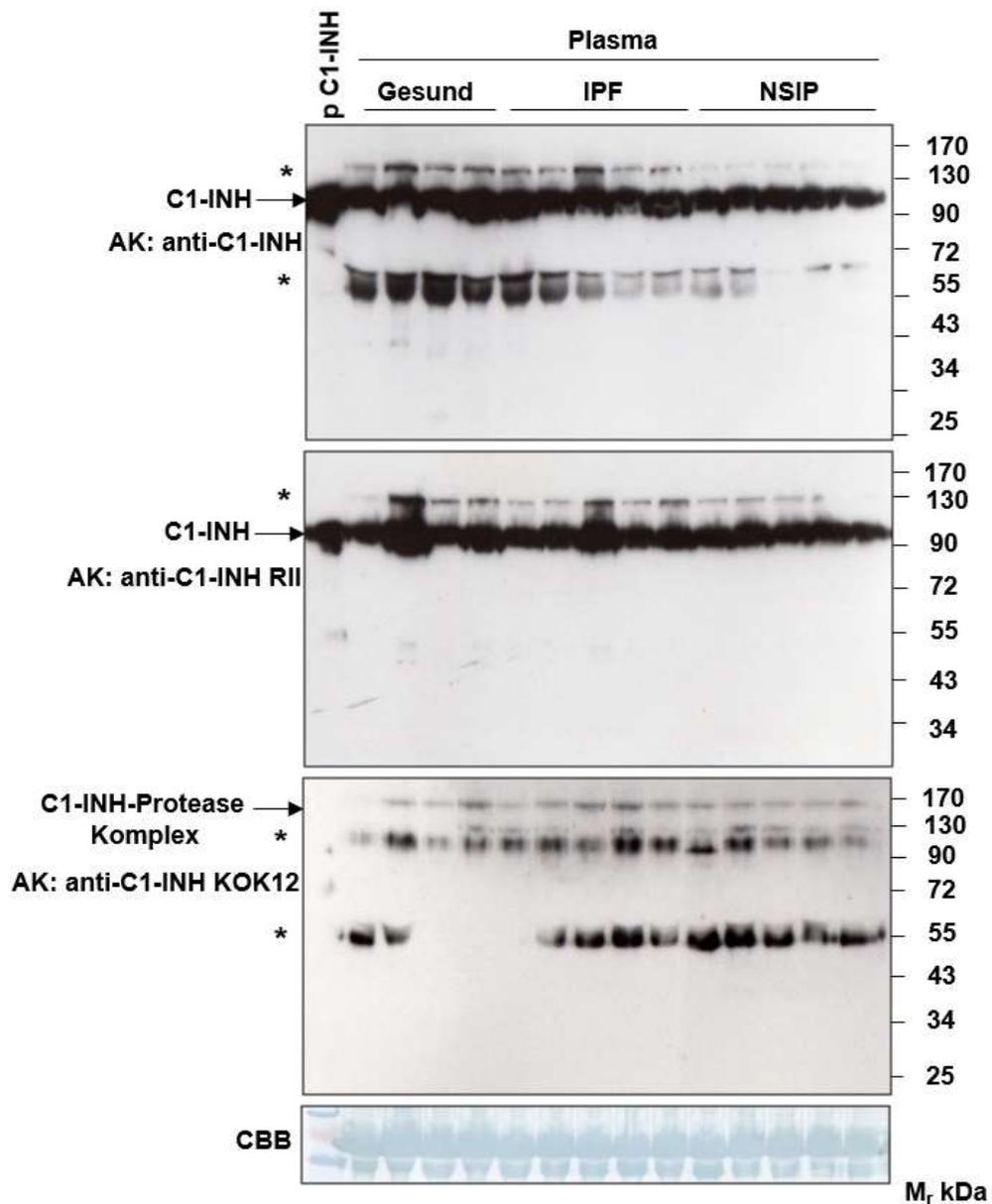


Abbildung 4.6. Keine Unterschiede in der C1-INH-Expression im Blutplasma von IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Gesunden. C1-INH-Expression nachgewiesen mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung von: polyklonalem Kaninchen-anti-C1-INH-Antikörper (obere Abbildung), monoklonalem Maus-anti-C1-INH-Antikörper RII (mittlere Abbildung) und monoklonalem Maus-anti-C1-INH-Antikörper KOK 12 (untere Abbildung). Dargestellt ist eine repräsentative Auswahl von IPF-Patienten (5 von 22), NSIP-Patienten (5 von 12) und von Spendern (4 von 22). Die Loading-Kontrolle erfolgte mit CBB. Unspezifische Bandenmarkierungen sind mit (*) gekennzeichnet. p C1-INH, Plasma gereinigter C1-Inhibitor. IPF, idiopathische pulmonale Fibrose; NSIP, nicht spezifische interstitielle Pneumonie; AK, Antikörper; CBB, Coomassie-brilliant blue

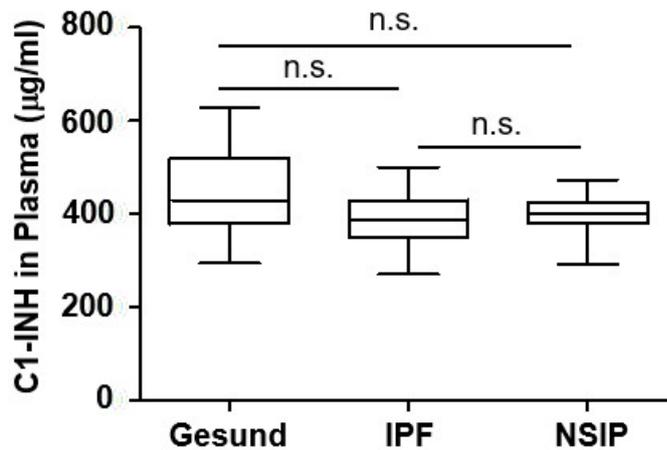


Abbildung 4.7. Keine C1-INH-Konzentrationsunterschiede in humanem Blutplasma von IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Gesunden. C1-INH-Konzentration von IPF-Patienten (n=22), NSIP-Patienten (n=12) und Gesunden (n=22) nachgewiesen durch ELISA; IPF, idiopathische pulmonale Fibrose; NSIP, nicht spezifische interstitielle Pneumonie; n.s., nicht signifikant

In den oben gezeigten Western-Blot-Verfahren und ELISA-Tests zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Ausprägung und Konzentration des C1-INH in den Spender-BP-Proben, IPF-BP-Proben, und NSIP-BP-Proben. Daher sollte zusätzlich die Aktivität des C1-INH im BP auf mögliche Unterschiede zwischen IPF-Patienten, NSIP-Patienten und gesunden Probanden untersucht werden. Tabelle 4.8. verdeutlicht die ELISA-Ergebnisse in Form einer tabellarischen Auflistung. Die Ergebnisse sind dabei, wie im Methodenteil beschrieben, als Prozentsatz des Mittelwerts einer normalen Probe angegeben. Konzentrationen von $\geq 68\%$ des mittleren Normalwertes gelten als normwertig. Bei keinem der gesunden Probanden gab es zuvor anamnestisch bzw. klinische Anzeichen einer pathologischen C1-INH-Aktivität. Es wurden BP-Proben von IPF-Patienten, NSIP-Patienten und gesunden Probanden getestet. Dabei zeigte sich bei allen Gesunden- und NSIP-Proben die C1-INH-Aktivität als normwertig und bei lediglich einer IPF-Probe die Aktivität (67%) als grenzwertig erniedrigt. Daher ist davon auszugehen, dass keine Aktivitätseinbußen bzw.-unterschiede im BP bei IPF-Patienten und NSIP-Patienten im Vergleich zur Gruppe der gesunden Probanden vorliegen. Neben BP-Proben wurden auch BALF-Proben auf pathologische C1-INH-Aktivität untersucht. Auf Grund der abnahmebedingten starken Verdünnung der BALF-Proben konnten aber wegen der Testbeschaffenheit und der damit verbundenen Detektionsgrenze keine Ergebnisse gewonnen werden.

Tabelle 4.8. C1-INH-Aktivität im Blutplasma.

Nr.	Gesund		IPF		NSIP	
	Prozentsatz des mittleren Normalwertes	Interpre- tation	Prozentsatz des mittleren Normalwertes	Interpre- tation	Prozentsatz des mittleren Normalwertes	Interpre- tation
	%		%		%	
1	75	normal	89	normal	79	normal
2	74	normal	83	normal	73	normal
3	79	normal	89	normal	76	normal
4	70	normal	80	normal	74	normal
5	74	normal	85	normal	77	normal
6	74	normal	88	normal	69	normal
7	72	normal	89	normal	73	normal
8	73	normal	92	normal	76	normal
9	73	normal	86	normal	79	normal
10	75	normal	86	normal	75	normal
11	73	normal	79	normal	74	normal
12	73	normal	80	normal	77	normal
13	72	normal	78	normal		
14	74	normal	82	normal		
15	78	normal	80	normal		
16	77	normal	78	normal		
17	75	normal	81	normal		
18	81	normal	77	normal		
19	85	normal	71	normal		
20	74	normal	76	normal		
21	79	normal	73	normal		
22	80	normal	67	erniedrigt		

Tabellarische Auflistung zur Veranschaulichung der C1-INH-Aktivität bei IPF-Patienten (n=22), NSIP-Patienten (n=12) und Gesunden (n=22). Werte $\geq 68\%$ des mittleren Normalwertes gelten als normwertig. IPF, idiopathische pulmonale Fibrose; NSIP, nicht spezifische interstitielle Pneumonie

4.4. Molekulargenetischer Nachweis von C1-Inhibitor

Die bereits gewonnenen Ergebnisse sollten durch molekulargenetische Versuche auf Ebene der C1-INH-mRNA weiter bestätigt und ergänzt werden. Hierzu wurden quantitative PCR (qPCR) von humanen LH, Blutzellen und AT II angefertigt.

Bereits zuvor konnten in ELISA-Tests und Western-Blots keine signifikanten Unterschiede bezüglich der C1-INH-Konzentration bzw. –Ausprägung in humanen LH gesehen werden. Um dies auch auf molekulargenetischer Ebene zu verifizieren wurden qPCR-Versuche in IPF-LH, NSIP-LH und Spender-LH durchgeführt. Abbildung 4.8. verdeutlicht die darin gewonnenen Ergebnisse. Es zeigt sich, dass im Vergleich der drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede im C1-INH-mRNA-Level bestehen.

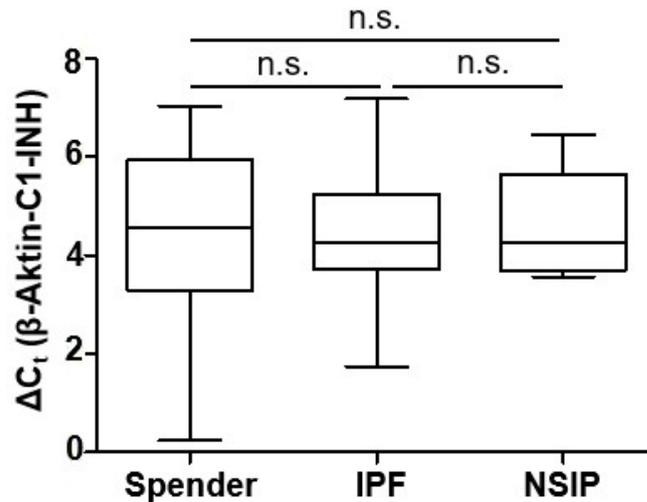


Abbildung 4.8. qPCR der C1-INH-mRNA-Expression in humanen Lungenhomogenaten von IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Spendern. Die Ergebnisse werden als ΔC_t -Werte angegeben, β -Aktin wurde als Referenzgen verwendet. C1-INH, C1-Inhibitor; IPF, idiopathische pulmonale Fibrose; NSIP, nicht spezifische interstitielle Pneumonie; n.s., nicht signifikant

AM und AT II gelten als lokaler Produktionsort von prokoagulatorischen und antifibrinolytischen Faktoren (76). Daher sollte untersucht werden, ob C1-INH-mRNA in AT II nachweisbar ist. Abbildung 4.9. veranschaulicht die qPCR Ergebnisse in AT II. In dieser Analyse zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der C1-INH-mRNA Expression zwischen AT II in Spenderlungen und Lungen von IPF-Patienten. AT II von NSIP-Patienten sowie AM von IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Spendern lagen nicht vor, weswegen darin kein Nachweis geföhrt werden konnte.

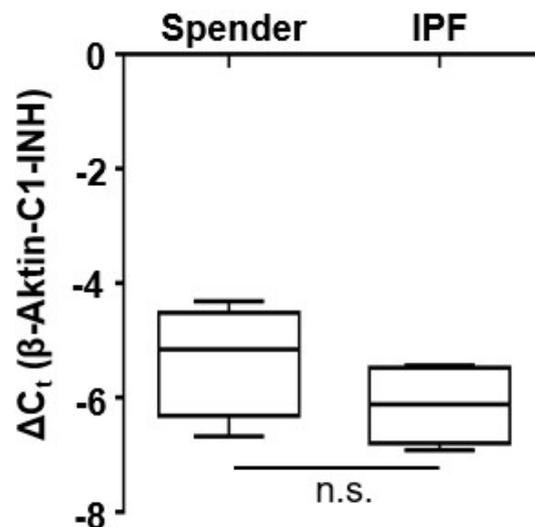


Abbildung 4.9. qPCR der C1-INH-mRNA-Expression in Alveolarepithel-Typ II-Zellen von IPF-Patienten und Spendern. Die Ergebnisse sind als ΔC_t -Werte angegeben. β -Aktin wurde als Referenzgen verwendet. AT II, Alveolarepithel-Typ II-Zellen; C1-INH, C1-Inhibitor; IPF, idiopathische pulmonale Fibrose; n.s., nicht signifikant

Neben AT II sollten auch Blutzellen als mögliche Quelle von C1-INH untersucht werden. Daher wurde über eine qPCR-Analyse die Fähigkeit von Blutzellen zur Expression von C1-INH-mRNA getestet. Die Ergebnisse diesbezüglich verdeutlicht Abbildung 4.10. Es zeigt sich, dass C1-INH-mRNA weder in Blutzellen von IPF-Patienten noch von NSIP-Patienten oder von Spender-Proben detektiert werden kann. Leber wurde dabei als interne Positivkontrolle verwendet, da sie *in vivo* den Hauptproduktionsort von C1-INH darstellt.

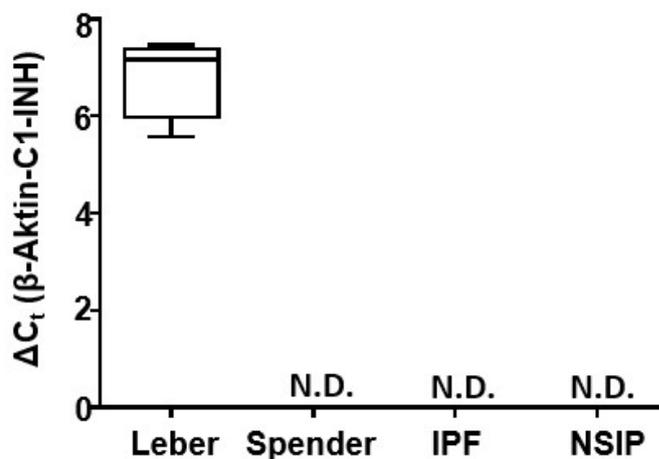


Abbildung 4.10. qPCR der C1-INH-mRNA-Expression in Blutzellen von IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Spendern. Interne Positivkontrolle durch Nachweis von C1-INH-mRNA in der Leber. Die Ergebnisse sind als ΔC_T -Werte angegeben. β -Aktin wurde als Referenzgen verwendet. C1-INH, C1-Inhibitor; IPF, idiopathische pulmonale Fibrose; NSIP, nicht spezifische interstitielle Pneumonie; N.D., nicht detektierbar

4.5. Lokalisation des C1-Inhibitors in der Lunge

Abbildung 4.11 zeigt im oberen und mittleren linken Bild das histopathologische Muster einer IPF-Lunge. Unter Inkubation mit anti-C1-INH-Antikörper RII kommt es in beiden Abbildungen zur Färbung pulmonaler EC und AT II. Die rechte obere Abbildung stellt die Ausschnittvergrößerung der linken oberen Abbildung dar und verdeutlicht den positiven Nachweis von C1-INH in EC (Pfeile). Die mittlere rechte Abbildung zeigt die entsprechende Ausschnittvergrößerung der mittleren linken Abbildung mit Färbung des C1-INH in AT II (Pfeile). Die linke untere Abbildung ist ein histologisches Schnittbild einer Spenderlunge mit Anfärben von Pneumozyten (Pfeilspitzen) und vereinzelt sichtbaren AM (Pfeile) unter Inkubation mit anti-C1-INH-Antikörper RII. In der rechten unteren Abbildung wird ein histologischer Schnitt einer Leber dargestellt, der durch das generalisierte Anfärben von Hepatozyten, dem Bildungsort des C1-INH *in vivo*, als positive Nachweis-kontrolle des verwendeten anti-C1-INH-Antikörpers RII dient.

anti-C1-INH-Antikörper (R11)

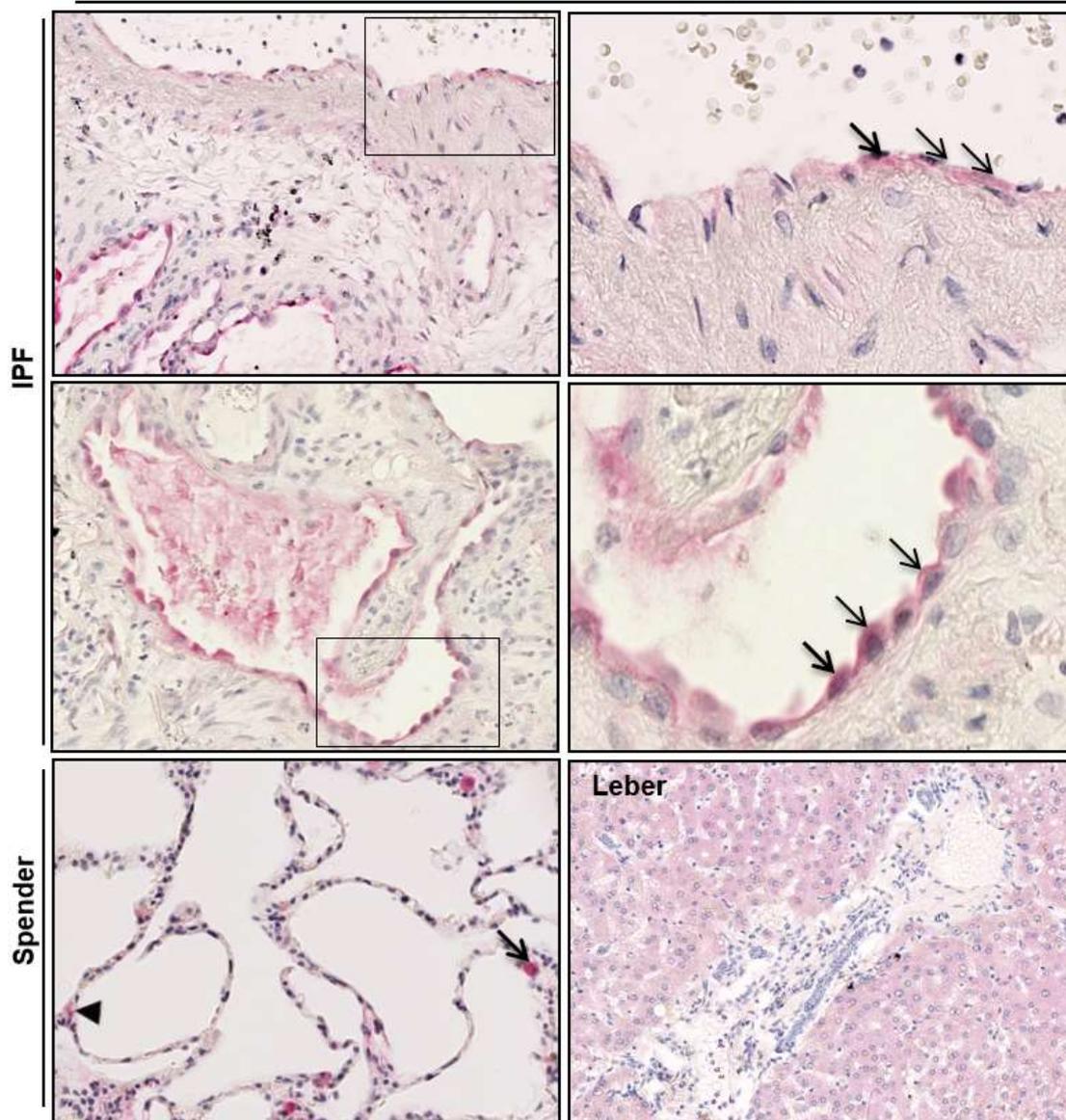


Abbildung 4.11. Immunhistochemische Färbung von C1-INH in IPF-Lungen und Spenderlungen. Färbung mit monoklonalem Maus-anti-C1-INH-Antikörper R11. Gezeigt sind repräsentative histologische Schnitte von IPF-Patienten (2 von 6) und Spendern (1 von 6). **Linke obere Abbildung:** Nachweis von C1-INH in AT II und EC in IPF. **Rechte obere Abbildung:** Ausschnittvergrößerung der linken oberen Abbildung mit positivem Nachweis von C1-INH in EC (Pfeile). **Linke mittlere Abbildung:** Nachweis von C1-INH in AT II in IPF. **Rechte mittlere Abbildung:** Ausschnittvergrößerung der linken mittleren Abbildung. Positiver Nachweis von C1-INH in AT II (Pfeile). **Linke untere Abbildung:** Nachweis von C1-INH in AT II (Pfeilspitze) und AM (Pfeil) in Spenderlunge. **Rechte untere Abbildung:** Histologisches Bild eines humanen Leberschnittes. Färbung. Generalisiertes Anfärben von Hepatozyten als positive Nachweiskontrolle für C1-INH

4.6. Analyse verschiedener klinischer Parameter im Zusammenhang mit der C1-Inhibitor-Konzentration in IPF-BALF

4.6.1. Korrelation von Entzündungsparametern und der C1-Inhibitor-Konzentration in IPF-BALF

Inflammatorische und infektiologische Geschehen könnten einen Einfluss auf die Progression der IPF haben. Gerade während inflammatorischer Reaktionen zeigen sich auch Veränderungen in der C1-INH-Konzentration. Daher war von Interesse, ob sich, gerade wegen der gesehenen signifikanten Unterschiede der C1-INH-Konzentration zwischen IPF-Patienten, NSIP-Patienten und Gesunden, auch ein Korrelat zwischen der C1-INH-Konzentration in der BALF und Laborparametern für klinische Entzündungszeichen zeigen lässt. Dazu wurde die Korrelation zwischen typischen Entzündungsmarkern (Leukozyten, CRP) und der C1-INH-Konzentration in BALF untersucht. Für die folgenden Korrelationsanalysen konnten zusätzlich zu den für die molekulargenetischen und biochemischen Versuche verwendeten IPF-BALF-Proben noch weitere BALF-Proben von IPF-Patienten eingeschlossen werden. Dabei waren die klinisch relevanten Parameter im zusätzlichen Patientenkollektiv mit denen aus dem Kollektiv, das für die molekulargenetischen Versuche verwendet wurde, vergleichbar. Eine Erhöhung des CRP und/oder entweder eine deutliche Leukozytose oder auch eine ausgeprägte Leukopenie deuten im Allgemeinen auf einen stattfindenden Entzündungsprozess mit Aktivierung des Immunsystems hin. Dabei sind je nach Messmethode der einzelnen Laboratorien unterschiedliche Normwerte gültig. Allgemein gelten beim CRP Werte ab 10mg/l als pathologisch erhöht. Die normwertige Blutleukozytenzahl liegt im Bereich zwischen $4 \cdot 10^9/l$. Abbildung 4.12. verdeutlicht die Korrelationsanalyse von Leukozytenzahl im Blut und der C1-INH-Konzentration in BALF. Dabei ist auf der x-Achse die C1-INH-Konzentration (in ng/ml) und auf der y-Achse die Blutleukozytenzahl (in Anzahl $\times 10^9/l$) aufgetragen. Es zeigt sich bereits durch die graphische Darstellung, dass keine direkte Korrelation zwischen den betrachteten Variablen vorliegt. Dies wird auch durch den ermittelten Korrelationskoeffizienten deutlich. Mehrheitlich war auch keine pathologische Abweichung der Leukozytenzahl der IPF-Patienten vom Normwert festzustellen.

In Abbildung 4.13. wird graphisch die Korrelationsanalyse von C1-INH-Konzentration in BALF und dem CRP dargestellt. Hier ist entsprechend vorheriger Abbildung auf der x-Achse die C1-INH-Konzentration (in ng/ml) und auf der y-Achse die CRP-Konzentration (in mg/l) aufgetragen. Bei entsprechender klinischer Symptomatik deuten die hier leicht erhöhten CRP-Werte auf eine unspezifische Entzündungsreaktion hin. An Abbildung

4.13. lässt sich eine negative Korrelation zwischen der C1-INH-BALF-Konzentration und der Höhe des CRPs erkennen.

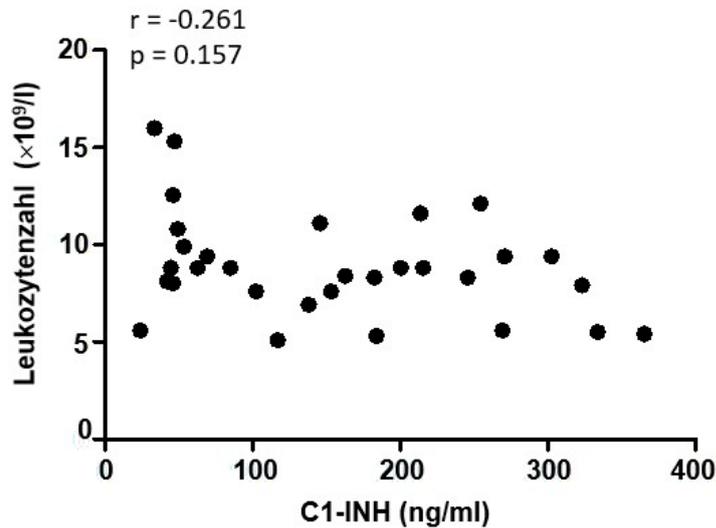


Abbildung 4.12. Keine Korrelation zwischen C1-INH-Konzentration in BALF und Blutleukozytenzahl von IPF-Patienten. $n=31$; r , Spearman Korrelationskoeffizient

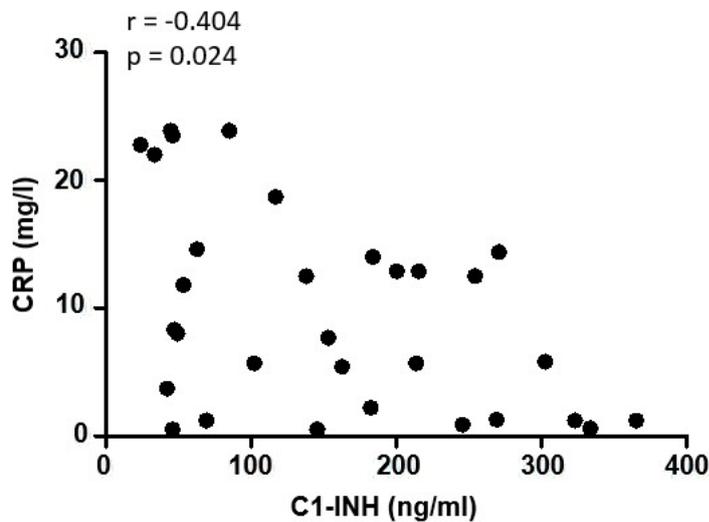


Abbildung 4.13. Negative Korrelation zwischen C1-INH-Konzentration in BALF und CRP im Blut von IPF-Patienten. $n=31$; r , Spearman Korrelationskoeffizient

4.6.2. Korrelation zwischen der C1-Inhibitor-Konzentration in BALF von IPF-Patienten und der forcierten Vitalkapazität

Weiterhin sollte die Korrelation zwischen der C1-INH-Konzentration in BALF und der FVC betrachtet werden. Die FVC spielt unter anderem in der Diagnose einer restriktiven

Ventilationsstörung, zu der die Gruppe der fibrosierenden Lungenerkrankungen zählt, eine Rolle. Abbildung 4.14. stellt dabei die untersuchten Variablen graphisch dar, wobei auf der x-Achse die C1-INH-BALF-Konzentration (in ng/ml) und auf der y-Achse die FVC (in Prozent der entsprechenden klinischen Norm) aufgetragen sind. Es zeigt sich, dass eine Erniedrigung der gemessenen C1-INH-BALF-Konzentration mit einer Reduktion der FVC in der Lungenfunktion korrelierte. Der ermittelte Spearman-Korrelationskoeffizient bestätigt das graphische Ergebnis.

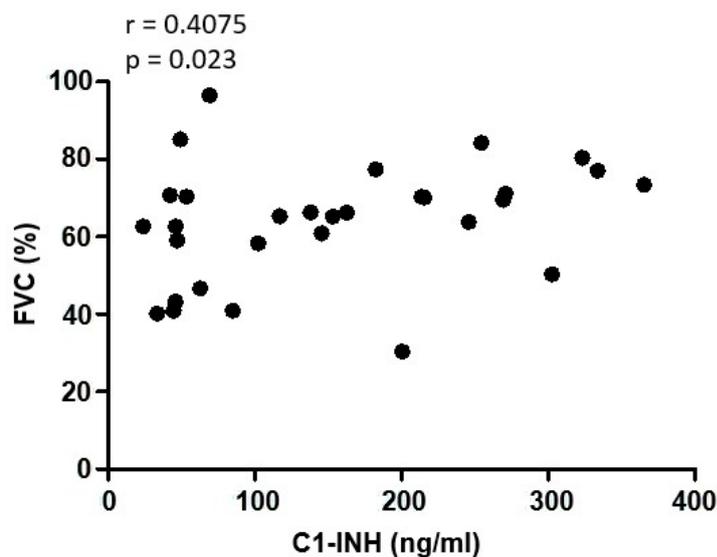


Abbildung 4.14. Positive Korrelation zwischen C1-INH-Konzentration in BALF und forcierter Vitalkapazität (FVC) von IPF-Patienten. n=30; r, Spearman Korrelationskoeffizient

4.7. Erhöhte C1-Inhibitor-Histon-Komplexverbindungen bei IPF-Patienten

In den BALF-ELISA und den BALF-Western-Blot-Analysen zeigt sich eine signifikante Erniedrigung der C1-INH-Konzentration bei IPF-Patienten im Vergleich zu NSIP-Patienten und gesunden Probanden. C1-INH-Protease-Komplexe konnten jedoch durch die Western-Blot-Analysen in BALF nicht nachgewiesen werden. Aus unseren früheren, bislang noch nicht publizierten Studien, ist jedoch bekannt, dass C1-INH auch mit Histon-Proteinen interagieren kann. Daher sollte durch einen weiteren ELISA untersucht werden, ob C1-INH in IPF-BALF auch Komplexverbindungen mit Histon-Proteinen eingeht, die durch die durchgeführten Western-Blot-Verfahren bisher nicht nachgewiesen wurden. Der ELISA in Abbildung 4.15. zeigt dabei, dass C1-INH Komplexe mit Histon-Proteinen in IPF bildet und die Anzahl dieser C1-INH-Histon-Komplexverbindungen (C1-

INH-His) bei IPF-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht ist. In den durchgeführten Versuchen waren jedoch nicht in allen getesteten Spender-BALF-Proben und IPF-BALF-Proben C1-INH-His nachweisbar.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Anzahl vorhandener C1-INH-His mit der C1-INH-Konzentration in BALF und mit klinischen Lungenfunktionsparametern wie der FVC korreliert werden kann. Abbildung 4.16. zeigt die Korrelationsanalyse der C1-INH-Konzentration in BALF und der relativen Anzahl der C1-INH-His. Dabei ist auf der x-Achse die relative Anzahl der C1-INH-His (in arbiträren Einheiten (AE)) und auf der y-Achse die C1-INH-BALF-Konzentration (in ng/ml) angegeben. Es zeigt sich eine negative Korrelation der betrachteten Variablen, d.h. je weniger C1-INH-His vorhanden sind, desto höher ist die freie C1-INH-Konzentration in BALF.

Abbildung 4.17 zeigt eine negative Korrelation zwischen der FVC und den vorhandenen Komplexverbindungen, d.h. je weniger C1-INH-His in den BALF-Proben der IPF-Patienten vorhanden sind, desto höher war der Prozentsatz der FVC von der klinischen Norm. Die C1-INH-His (in AE) werden auf der x-Achse und die FVC (in Prozent der entsprechenden klinischen Norm) auf der y-Achse angegeben.

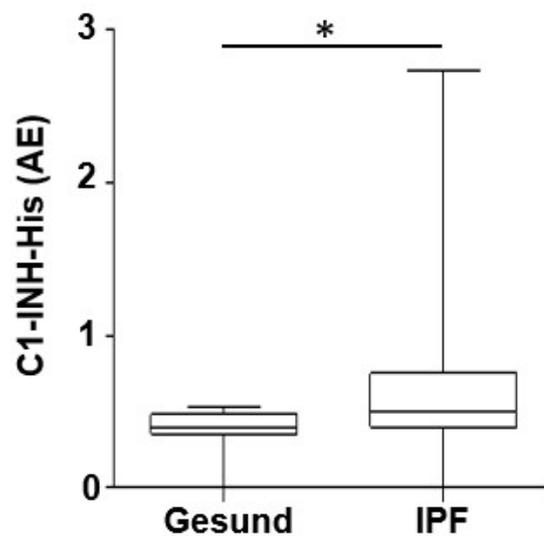


Abbildung 4.15. Nachweis von C1-INH-His in IPF-BALF. Signifikant erhöhte Anzahl von C1-INH-His in IPF-BALF (n=31) im Vergleich zu Gesunden (n=19). Anzahl von C1-INH-Histon-Komplexen angegeben in arbiträre Einheiten. C1-INH-His, C1-Inhibitor-Histon-Komplexe; AE, arbiträre Einheiten

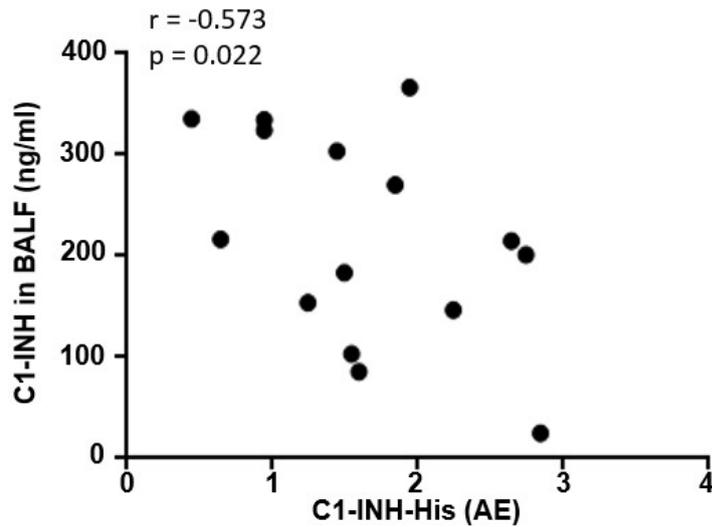


Abbildung 4.16. Negative Korrelation zwischen C1-INH-His-Komplexen und C1-INH-Konzentration in IPF-BALF. n=15; r, Spearman Korrelationskoeffizient; C1-INH-His, C1-Inhibitor-Histon-Komplexe; r, Spearman-Korrelationskoeffizient; AE, arbiträre Einheiten

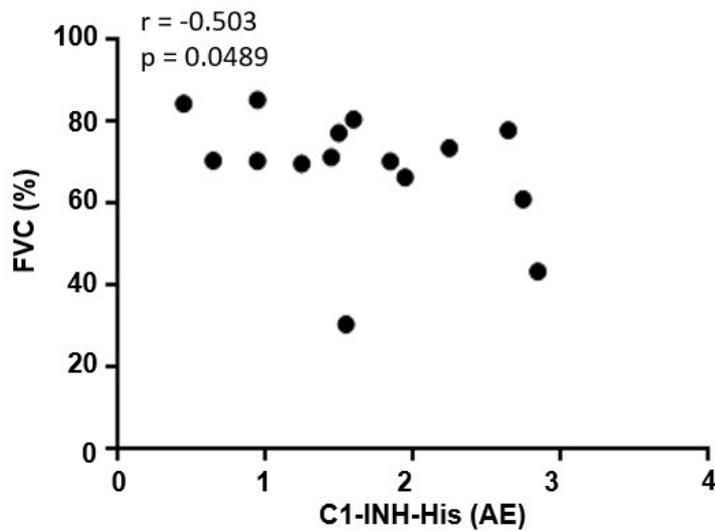


Abbildung 4.17. Negative Korrelation zwischen Anzahl C1-INH-His-Komplexen in BALF und der FVC von IPF-Patienten. n=15; r, Spearman Korrelationskoeffizient; C1-INH-His, C1-Inhibitor-Histon-Komplexe; AE, arbiträre Einheiten

5. Diskussion

Die idiopathische pulmonale Fibrose (IPF) ist eine schwere Erkrankung, die ohne Therapie durch eine progrediente pulmonale Funktionseinschränkung gekennzeichnet ist und schließlich regelhaft einen letalen Verlauf nimmt. Pathophysiologisch handelt es sich um eine fibrosierende, interstitielle Pneumonie unklarer Ätiologie mit dem histologischen Muster einer UIP, das sich durch ein heterogenes Bild mit einem Wechsel aus fibrotischen Arealen und Arealen normalen Lungenparenchyms definiert (6). Neben einer inflammatorischen Komponente, scheinen jedoch hauptsächlich wiederkehrende pulmonale Verletzungen mit abnormaler Wundheilung und stattfindende Remodelling-Prozesse im Vordergrund zu stehen (45). Im Rahmen verschiedener Studien zeigt sich dabei pathophysiologisch eine Beteiligung von Faktoren der extrinsischen Gerinnungskaskade sowie von Faktoren des intrinsischen Gerinnungssystems und von Proteinen des Kontakt- und Komplementsystem (45,47,55). Neben TF sowie Faktor VII als Hauptmediatoren der Fibrinakkumulation der extrinsischen Gerinnungskaskade und PAI als Mediatoren einer verminderten Fibrinolyse wurden in einer neueren Arbeit die Proteine des Kontaktsystems, Faktor XII, Faktor XI und HMWK als Einflussfaktoren auf die Pathogenese fibrotischer Prozesse im Rahmen der IPF beschrieben (45,55). Bereits zuvor war eine Beteiligung des Kontaktsystems unter anderem an pulmonalen Erkrankungen wie dem Acute Respiratory Distress Syndrom (ARDS) auf Grund der prokoagulatorischen und über die Liberation von BK aus HMWK durch Plasmakallikrein bedingten, proinflammatorischen Komponente bekannt (77–80). Weiterhin wurde eine Beteiligung des Kontaktsystems auf die Entwicklung einer pulmonalen Fibrose unabhängig von prokoagulatorischen Effekten durch eine Arbeit von E. Jablonska untersucht (55). Sie konnte in ihrer Arbeit nachweisen, dass die mRNA- und Proteinausprägung von Faktor XII, Faktor XI und HMWK in LH generell und speziell aber auch im Bereich fibrotischer Regionen von IPF-Patienten im Vergleich zu Spendern erhöht waren. Zusätzlich ließ sich in den Lungenlavage-Proben bei IPF-Patienten eine deutlich gesteigerte Faktor XII-Aktivität erkennen. Außerdem zeigte sich, dass die Faktor XII-Expression in humanen Lungenfibroblasten durch TGF- β 1, einem profibrotischen Zytokin, reguliert werden kann und Faktor XII gleichzeitig selbst eine Proliferation von Lungenfibroblasten induziert. Die zur Stimulation der Fibroblastenproliferation notwendige Konzentration von Faktor XII lag dabei unterhalb der physiologischen Plasmakonzentration (55). Neben den Ergebnissen aus der Untersuchung humaner Proben konnte E. Jablonska gleichsinnig auch im Tiermodell einen Einfluss des Kontaktsystems auf die Entwicklung einer pulmonalen Fibrose zeigen. So war in LH von Mäusen nach intratrachealer Bleomycinapplikation sowohl die mRNA-Ausprägung als auch der Proteingehalt von Faktor XII, Faktor XI und

HMWK erhöht. Zusätzlich zeigten Faktor XII-defiziente Mäuse nach intratrachealer Bleomycinapplikation unter anderem eine abgeschwächte fibrotische Reaktion sowie nach Behandlung mit einem spezifischen Faktor XIIa-Inhibitor eine verminderte pulmonale Fibrosebildung und ein besseres Überleben (55). Daher könnten Möglichkeiten zur Inhibition von Faktor XII einen relevanten Einfluss auf die Entstehung bzw. Ausprägung einer Lungenfibrose haben. *In vivo* ist C1-INH, ein zur Familie der Serin-Protease-Inhibitoren gehörendes Protein, der wichtigste Inhibitor von Kontakt- und Komplementsystemproteinen, speziell von Faktor XIIa, Faktor XIa, Plasmakallikrein und Komplementfaktor C1 (56,64). Aus der Inhibition der Proteine des Kontaktsystems resultiert eine erniedrigte Freisetzung von inflammatorisch wirkendem Bradykinin, wodurch sich eine positive Auswirkung der C1-INH-Substitution auf verschiedene Krankheitsbilder bereits erklären konnte (56,77). So zeigt sich z.B. durch die Verabreichung von C1-INH-Konzentraten unter anderem eine Abschwächung der überschießend ablaufenden KLK-Kinin-Kaskade bei dem C1-INH-Mangel bedingten HAE (66). Auf Grund der beschriebenen Relevanz und Beteiligung des Kontaktsystems im Rahmen der Entwicklung einer pulmonalen Fibrose sollte die vorliegende Studie die Rolle des Kontakt- und Komplementsystem-Inhibitors, C1-INH, im Rahmen der IPF evaluieren. In vorliegender Studie zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der C1-INH-Konzentration in BALF-Proben von IPF-Patienten im Vergleich zu NSIP-Patienten und gesunden Probanden. Daher sollte untersucht werden, ob sich die Konzentrationserniedrigung im alveolären Kompartiment z.B. aus einer geringeren lokalen C1-INH-Synthese oder aus einem erhöhten Verbrauch erklären lässt. Hauptsächlich gelten AM und zu geringerem Teil auch AT II als pulmonale Quelle lokal produzierter prokoagulatorischer Faktoren (45). So konnte Faktor XII-mRNA in der Lunge in Fibroblasten nachgewiesen werden (55). Eine C1-INH-Synthese konnte ebenfalls in Fibroblasten, aber auch in anderen Zellreihen wie Makrophagen, Monozyten, Endothelzellen und klassischerweise in Hepatozyten nachgewiesen werden. Dabei scheint die C1-INH-Synthese unter anderem durch Zytokine wie IFN- γ , TNF- α , IL-6 stimuliert zu werden (56). Immunhistochemisch waren in vorliegender Studie AT II, pulmonale EC und vereinzelt auch AM C1-INH positiv. Molekulargenetisch wurde C1-INH-mRNA in Lungengewebe und in AT II, nicht jedoch in Blutzellen nachgewiesen. EC und AM wurden molekulargenetisch nicht analysiert. Man könnte daher jedoch vermuten, dass auch die Lunge als eine extrahepatische Quelle von C1-INH in Frage kommen könnte. Im Vergleich der zwei untersuchten Gruppen konnten in Bezug auf die molekulargenetische Ausprägung des C1-INH keine Unterschiede gesehen werden. Eine verminderte lokale Synthese von C1-INH als Ursache für die Konzentrationserniedrigung ist daher eher unwahrscheinlich. Ebenfalls ist der klinische Einfluss der pulmonalen C1-INH-Synthese auf

Ausbildung und Entwicklung einer IPF daher eher als nicht relevant einzuordnen. Anhand der gezeigten Ergebnisse wäre eine mögliche Erklärung, dass die erniedrigte C1-INH-Konzentration aus einem Verbrauch bzw. einer Inaktivierung von C1-INH durch Bindung mit extrazellulären Histon-Proteinen und konsekutiver Bildung von C1-INH-His resultiert. Intrazellulär spielen Histone eine bedeutende Rolle bei der Bildung von Euchromatin und Heterochromatin und somit in der Regulation der Genexpression (81,82). Extrazellulär gelten Histon-Proteine als „damage-associated molecular patterns“ (DAMPs) und können über die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren (TLR) die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen initiieren. Hohe extrazelluläre Histon-Konzentrationen scheinen zytotoxische Auswirkungen auf Endothel- und Epithelzellen zu haben, indem sie offenbar unter anderem über Interaktionen mit Phospholipiden der Plasmamembran zu einer erhöhten Membranpermeabilität, zu einem Calciumeinstrom und Zellschwellung mit nachfolgender Zytolyse führen (83). Extrazelluläre Histone scheinen unter anderem eine pathogenetische Bedeutung im Rahmen verschiedener Erkrankungen wie Sepsis, Leber- und Niereninfarzierungen sowie dem akuten Lungenversagen (ALI), speziell dem ARDS, zu haben (83). Dabei scheint gerade die Lunge sehr empfindlich auf zirkulierende Histone zu reagieren (84). Es zeigte sich im Tiermodell, dass nach intratrachealer Gabe von anti-Histon-Antikörpern das Vorhandensein von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen und die Schwere des akuten Lungenversagens, gemessen an der Freisetzung von Albumin, signifikant gesenkt werden konnte (85). Extrazelluläre Histon-Proteine scheinen allgemein von apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen aber auch von neutrophilen Granulozyten freigesetzt zu werden (83,86). In den derzeitigen Theorien zur Entstehung der IPF wird eine vermehrte Zellschädigung bzw. eine erhöhte Apoptoserate von AT II und eine nachfolgend inadäquate Wundheilung diskutiert (87,88). In Bezug auf die Untersuchung von Gewebeschädigung im Rahmen des akuten Lungenversagens zeigen *in vitro* Untersuchungen, dass eine Inkubation von AT II mit gereinigten Histonen zu einem intrazellulären Calcium-Anstieg führt und einen Zelltod auslösen kann (85). Inwieweit die Ergebnisse dieser Studien auch auf die IPF zutreffen, bleibt weiterführenden Studien überlassen. Allerdings könnte man spekulieren, dass bei der IPF durch eine erhöhte Apoptose- bzw. Nekroserate von AT II mehr Histon-Proteine in den Extrazellularraum freigesetzt werden und diese wiederum über die beschriebenen Pathomechanismen einen vermehrten Zelltod triggern, was den Circulus vitiosus aufrecht erhält. Dabei könnten extrazelluläre Histone über die Bindung an TLR die Freisetzung von Zytokinen wie TNF- α initiieren und somit auch Einfluss auf die Ausbildung einer IPF haben. So konnte nachgewiesen werden, dass die TLR9-Konzentration bei IPF-Patienten mit einem schnelleren Krankheitsverlauf in der chirurgischen Lungenbiopsie höher war als bei IPF-Patienten mit einem langsameren Progress (89). Zusätzlich konnte

gezeigt werden, dass viele Zellen in der Lunge TLR, im speziellen TLR4, exprimieren können, wobei die Rolle von TLR4 bislang noch kontrovers diskutiert wird (89,90). So wurde TLR4 einerseits mit protektiven Eigenschaften auf die Ausbildung einer Lungenfibrose assoziiert (89), während in einer neueren Studie im Tiermodell zur Lungenfibrose TLR4-Knockout-Mäuse weniger Fibrose ausbildeten, die Rate an Kollagen-I-mRNA erniedrigt war und die Tiere eine signifikant erniedrigte Mortalität im Vergleich zu wild-type Mäusen hatten (90). Daher sollte gerade der Einfluss von extrazellulären Histonen und deren TLR in weiteren Studien auf die Ausprägung einer IPF genauer untersucht werden. Insgesamt konnten in Studien zum Acute Respiratory Distress Syndrom extrazelluläre Histone auch nur in 50% der BALF-Proben von ARDS-Patienten nachgewiesen werden und die Konzentration von extrazellulären Histon-Proteinen in BALF-Proben, die mehr als 10 Tage nach Diagnosestellung abgenommen wurden, war erniedrigt, sodass man davon ausgehen muss, dass Histone eher in der Frühphase des akuten Krankheitsverlaufs eine Rolle spielen könnten (84). Weitere Studien zeigten, dass im Gegensatz zur Mehrheit der BALF-Proben von ARDS-Patienten in Spender-BALF extrazelluläre Histone nicht nachgewiesen werden konnten (83,91). Ähnlich zu diesen Ergebnissen ließen sich in vorliegender Studie in BALF-Proben von IPF-Patienten diskontinuierlich C1-INH-His nachweisen. Zusätzlich zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl an C1-INH-His bei IPF-Patienten im Vergleich zu Spendern und eine Abnahme der C1-INH-Konzentration bei steigender Anzahl der Komplexe, was die Theorie eines Verbrauchs von C1-INH durch Komplexbildung unterstützt. Man könnte somit spekulieren, dass eine vermehrte Komplexbildung von C1-INH-His zu einer Erniedrigung der C1-INH-Konzentration führt und somit folglich nur eine unzureichende Inhibition der Faktoren des Komplement- und Kontaktsystems im bronchoalveolären Kompartiment von IPF-Patienten möglich wäre. Dies unterstützen auch die Daten von E. Jablonska, die zeigen, dass die Konzentration von Faktor XIIa in IPF-BALF erhöht ist und daraus eine vermehrte Fibroblastenaktivität mit Entwicklung einer Fibrose resultieren kann (55). Die Ergebnisse vorliegender Studie spiegeln diesen klinischen Zusammenhang dadurch wieder, dass eine erniedrigte C1-INH-BALF-Konzentration mit einer Erniedrigung der FVC korreliert. Die Reduktion der FVC könnte dabei als Progress der Erkrankung gesehen werden, da sich der Spontanverlauf der IPF eben unter anderem durch eine zunehmende Verschlechterung der pulmonalen Leistungsfähigkeit kennzeichnet. Klinisch äußert sich dies unter anderem in einer Zunahme der Dyspnoe-Symptomatik, in einer Abnahme der DL_{CO} und in einem Verlust der FVC (6). Der Progress der Erkrankung ist jedoch unterschiedlich schnell und erstreckt sich von langsam über mehrere Jahre andauernden pulmonalen Verschlechterungen bis hin zur akuten respiratorischen Dekompensation im Rahmen sekundärer Genesen oder einer akuten Exazerbation (AE-IPF) (6). Ähnlich wie zu dem

normalen langsameren Verlauf der IPF werden bei einer AE-IPF ein Verlust einer alveolären Epithelzellintegrität mit folgender alveolärer Entzündungsreaktion und Fibrinakumulation sowie einer gestörten koagulatorischen und fibrinolytischen Komponente als wesentliche pathophysiologische Faktoren diskutiert (92). Dabei stellt eine AE-IPF eine Ausschlussdiagnose dar und ist durch progrediente Dyspnoe sowie radiologisch und lungenfunktionell nachweisbare pulmonale Verschlechterung gekennzeichnet und kann grippeähnliche Symptome bei fehlender florider Infektion sowie erhöhte Laborwerte für Leukozyten und CRP aufweisen (92–94). Die AE-IPF ist eine lebensbedrohliche Komplikation mit nur eingeschränkten Therapiemöglichkeiten und klinisch schwer abgrenzbar von einem akuten Lungenversagen wie dem ARDS (94). Die Patienten dieser Studie stellten sich zwar im Allgemeinen mit einer zunehmenden Dyspnoe-Symptomatik vor, waren aber aus klinischer Sicht nicht einer AE-IPF zu subsumieren. In den klinischen Laborparametern zeigten sich nur moderat erhöhte Werte des CRP und nur vereinzelt eine dezente Leukozytose bzw. -penie, so dass bei den in dieser Studie eingeschlossenen Patienten im Allgemeinen nicht von einem akut schweren Krankheitsbild auszugehen war. Eventuell könnte die allgemeine Zustandsverschlechterung und dezente CRP-Erhöhung im Rahmen einer beginnenden Infektion oder allgemein in der weiteren Progression der IPF gedeutet werden. In den Korrelationsanalysen von Infektparametern und der C1-INH-Konzentration zeigte sich, dass selbst eine moderat erhöhte CRP-Serum-Konzentration mit einer erniedrigten C1-INH-Konzentration korrelierte. Die C1-INH-Konzentration könnte daher schon sehr sensitiv auf ein inflammatorisches Geschehen bei IPF-Patienten reagieren. Die CRP-Konzentration ist jedoch nicht nur im Rahmen klassischer bakteriell infektiöser Ursachen, sondern unter anderem auch bei stattfindender Gewebsnekrose oder immunologisch vermittelter Entzündungsreaktion erhöht (95). Daher könnte man spekulieren, dass die Korrelation von erniedrigter C1-INH-BALF-Konzentration und dezenter CRP-Erhöhung in Kombination mit einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes und Dyspnoe-Symptomatik eher für eine Progression der IPF mit wiederkehrenden lokalen chronischen Entzündungsreaktionen als für ein infektiöses Geschehen sprechen würde. Zusätzlich konnte eine Korrelation zwischen der Blutleukozytenzahl und der C1-INH-BALF-Konzentration, die einen Hinweis auf eine infektiöse Ursache geben würde, nicht nachgewiesen werden. Ob sich die C1-INH-Konzentration auch bei einer akuten Verschlechterung z.B. im Rahmen einer AE-IPF weiter deutlich erniedrigt zeigt und mit Blutentzündungsparametern z.B. auch bei gesicherten pulmonalen Infektionen korreliert, bleibt ebenfalls zukünftigen Studien vorbehalten. Weiterhin wäre interessant, ob die C1-INH-Konzentration und die Anzahl der C1-INH-His auch in anderen IPF-Patienten-Kohorten wie z.B. bei Patienten mit AE-IPF oder sehr schnellen Krankheitsverläufen verändert ist.

Auf Grund der in neueren Untersuchungen gezeigten Ergebnisse zur pathophysiologischen Beteiligung von Faktoren des Kontakt systems in der Entwicklung pulmonal fibrotischer Prozesse war es notwendig die Funktion des C1-INH als Hauptinaktivator von Komplement- und Kontakt system im Rahmen der IPF zu betrachten. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen dabei in der verminderten lokalen C1-INH-Konzentration durch Bindung mit extrazellulären Histonen eine neue Ursache für die gesteigerte Aktivierung von Proteinen des Kontakt systems. Die dadurch bedingte vermehrte Fibroblastenaktivität begünstigt das Fortschreiten fibrotischer Umbauprozesse der IPF mit dem Ergebnis einer Verschlechterung der Lungenfunktionsparameter. Dies spiegeln auch die Korrelationsanalysen dieser Studie wieder. So wird die klinische Relevanz der C1-INH-Konzentrationerniedrigung in IPF-BALF dadurch deutlich, dass eine Korrelation zwischen einer verminderten C1-INH-Konzentration und einer Abnahme der FVC sowie eine Korrelation zwischen einer erhöhten Anzahl an C1-INH-His und einer Abnahme der FVC besteht. Somit kann die erniedrigte C1-INH-BALF-Konzentration auch einen relevanten Einfluss auf das weitere klinische Outcome von Patienten mit einer IPF haben. Ähnliches zeigte sich auch bei Patienten mit einem septischen Krankheitsbild, bei denen die Konzentration von inaktiviertem C1-INH erhöht war und eine Korrelation mit dem klinischen Outcome bestand (73). Gerade bei septischen Patienten konnte durch die Gabe von C1-INH-Infusion eine verminderte inflammatorische Reaktion und insgesamt ein besseres Überleben erzielt werden (96). Schon seit längerem wird C1-INH als Therapeutikum zur Behandlung des HAE mit positiven Ergebnissen eingesetzt. Ob sich daher neben bereits bestehenden medikamentösen Konzepten zur Behandlung der IPF auch neue therapeutische Möglichkeiten z.B. in der Applikation von C1-INH, mit positiven Auswirkungen auf den Progress der Erkrankung in Zukunft ergeben könnten, bleibt abzuwarten.

6. Schlussfolgerung

Die IPF ist eine chronisch fibrosierende interstitielle Pneumonie mit einem Häufigkeitsgipfel im sechsten bis siebten Lebensdezium und ungünstiger Prognose. Die Ätiologie der IPF ist unbekannt (35). Von pathologischer Bedeutung sind epitheliale Verletzungen mit abnormalen Wundheilungsprozessen und in der Folge pulmonalem Remodelling (45). Insgesamt scheint ein Ungleichgewicht zwischen Abbau und Ablagerung von extrazellulären Matrixkomponenten zugunsten einer vermehrten Ablagerung sowie zwischen der Proliferation und Apoptose von Fibroblasten zugunsten einer erhöhten Proliferationsrate die Pathogenese der IPF zu beeinflussen. Zusätzlich scheint eine gestörte alveoläre Homöostase mit einem Verlust von Alveolarepithel-Typ I-Zellen (AT I) und deren Ersatz durch hyperplastische AT II in der Entwicklung der IPF bedeutend (97). Diese Veränderungen sollen dabei durch mehrere Mechanismen beeinflusst werden. So scheinen neben der prokoagulatorischen Komponente mit Bildung von Fibrin auch proinflammatorisch und zellulär vermittelte Effekte (wie Proliferation von Fibroblasten, Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten und Produktion von extrazellulären Matrixkomponenten) oben beschriebene pathologische Vorgänge zu begünstigen (46,97). Neuere Untersuchungen zeigen, dass offensichtlich auch Faktor XII, unter anderem über die Vermittlung zellulärer Effekte und die daraus resultierende Beeinflussung der Fibroblasten- und Alveolarepithelzell-Aktivität, im Rahmen der IPF von Bedeutung sein könnte (55). Ziel dieser Studie war es daher die Rolle des Inhibitors von Faktor XII und Kallikrein, C1-INH, im Rahmen der IPF zu evaluieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen dabei vor allem eine Erniedrigung der C1-INH-Konzentration in der BALF von IPF-Patienten. Dafür ursächlich konnte vorwiegend die Bildung von C1-INH-His-Komplexen erkannt werden. Diese Komplexbildungen zeigten auch in den Korrelationsstudien dieser Arbeit einen klinischen Einfluss auf für restriktive Lungenerkrankungen bedeutsame Lungenfunktionsparameter. Daraus leitet sich ein möglicher Einfluss des C1-INH auf die Progression der IPF ab. Interessant wäre, ob sich auch in einem größeren Patientenkollektiv eine ähnliche Tendenz der C1-INH-BALF-Konzentrationserniedrigung zeigt und ob auch durch die Konzentrationserniedrigung bzw. die Bildung von C1-INH-His ein Einfluss auf die Aktivität des C1-INH im bronchoalveolären Kompartiment besteht. Zudem könnte in weiterführenden Studien auch die Rolle des C1-INH bei Patienten mit einer AE-IPF oder einer „rapid-progression“ der IPF auf den Verlauf der Erkrankung evaluiert werden oder ob bei diesem Patientenkollektiv durch die Messung der C1-INH-BALF-Konzentration frühzeitig ein Hinweis auf akute Verschlechterung gegeben sein kann.

Zusammenfassend unterstützt diese Arbeit die Erkenntnis, dass im Rahmen der IPF eine Beteiligung von Faktoren des Kontaktsystems und die Rolle derer Inhibitoren in pathophysiologische Überlegungen zur Progression der Erkrankung miteinbezogen werden sollten und gibt gleichzeitig mögliche neue Angriffspunkte für weitere IPF-Therapieregime.

7. Literaturverzeichnis

1. Behr J. Idiopathische Lungenfibrose - moderne, leitliniengerechte Diagnostik und innovative Therapien. *Dtsch med Wochenschr* 2012;**137**:601–604.
2. Neurohr C, Behr J. Diagnostik und Therapie interstitieller Lungenerkrankungen. *Dtsch med Wochenschr* 2009;**134**:524–529.
3. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;**165**:277–304.
4. Travis WD, Costabel U, Hansell DM *et al.* An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Update of the International Multidisciplinary Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;**188**:733–748.
5. Raghu G, Mageto YN, Lockhart D *et al.* The accuracy of the clinical diagnosis of new-onset idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial lung disease: A prospective study. *Chest* 1999;**116**:1168–1174.
6. Behr J, Günther A, Ammenwerth W *et al.* S2K-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der idiopathischen Lungenfibrose. *Pneumologie* 2013;**67**:81–111.
7. 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**:646–664.
8. Taskar VS, Coultas DB. Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease? *Proc Am Thorac Soc* 2006;**3**:293–298.
9. Hubbard R. Occupational dust exposure and the aetiology of cryptogenic fibrosing alveolitis. *Eur Respir J Suppl* 2001;**32**:119-121.
10. Ley B, Collard HR. Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin Epidemiol* 2013;**5**:483–492.
11. Stewart JP, Egan JJ, Ross AJ *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**:1336–1341.
12. Egan JJ, Stewart JP, Hasleton PS *et al.* Epstein-Barr virus replication within pulmonary epithelial cells in cryptogenic fibrosing alveolitis. *Thorax* 1995;**50**:1234–1239.

13. Kuwano K, Nomoto Y, Kunitake R *et al.* Detection of adenovirus E1A DNA in pulmonary fibrosis using nested polymerase chain reaction. *Eur Respir J* 1997;**10**:1445–1449.
14. Raghu G, Freudenberger TD, Yang S *et al.* High prevalence of abnormal acid gastro-oesophageal reflux in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2006;**27**:136–142.
15. Gribbin J, Hubbard R, Smith C. Role of diabetes mellitus and gastro-oesophageal reflux in the aetiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* 2009;**103**:927–931.
16. Hodgson U, Pulkkinen V, Dixon M *et al.* ELMOD2 is a candidate gene for familial idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Hum Genet* 2006;**79**:149–154.
17. Thomas AQ, Lane K, Phillips J *et al.* Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;**165**:1322–1328.
18. Wang Y, Kuan PJ, Xing C *et al.* Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer. *Am J Hum Genet* 2009;**84**:52–59.
19. Markart P, Ruppert C, Wygrecka M *et al.* Surfactant protein C mutations in sporadic forms of idiopathic interstitial pneumonias. *Eur Respir J* 2007;**29**:134–137.
20. Lawson WE, Grant SW, Ambrosini V *et al.* Genetic mutations in surfactant protein C are a rare cause of sporadic cases of IPF. *Thorax* 2004;**59**:977–980.
21. Alder JK, Chen JJ, Lancaster L *et al.* Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;**105**:13051–13056.
22. Cronkhite JT, Xing C, Raghu G *et al.* Telomere shortening in familial and sporadic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;**178**:729–737.
23. Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD *et al.* Telomerase Mutations in Families with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med* 2007;**356**:1317–1326.
24. Seibold MA, Wise AL, Speer MC *et al.* A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2011;**364**:1503–1512.
25. Putman RK, Rosas IO, Hunninghake GM. Genetics and early detection in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;**189**:770–778.
26. Herold G. Innere Medizin. Herold, G. 2011. 378f.

27. Gross TJ, Hunninghake GW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2001;**345**:517–525.
28. Strieter RM. What differentiates normal lung repair and fibrosis? Inflammation, resolution of repair, and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 2008;**5**:305–310.
29. Yue X, Shan B, Lasky JA. TGF- β : Titan of Lung Fibrogenesis. *Curr Enzym Inhib* 2010;**6**:1–20.
30. Sime PJ, Marr RA, Gauldie D *et al*. Transfer of tumor necrosis factor-alpha to rat lung induces severe pulmonary inflammation and patchy interstitial fibrogenesis with induction of transforming growth factor-beta1 and myofibroblasts. *Am J Pathol* 1998;**153**:825–832.
31. Raghu G, Brown KK, Bradford WZ *et al*. A placebo-controlled trial of interferon gamma-1b in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2004;**350**:125–133.
32. Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network. Randomized Trial of Acetylcysteine in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med* 2014;**370**:2093–2101.
33. Conte E, Gili E, Fagone E *et al*. Effect of pirfenidone on proliferation, TGF- β -induced myofibroblast differentiation and fibrogenic activity of primary human lung fibroblasts. *Eur J Pharm Sci* 2014;**58**:13–19.
34. Richeldi L, Du Bois RM, Raghu G *et al*. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2014;**370**:2071–2082.
35. Raghu G, Collard HR, Egan JJ *et al*. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;**183**:788–824.
36. Korfei M, von der Beck D, Henneke I *et al*. Comparative proteome analysis of lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), non-specific interstitial pneumonia (NSIP) and organ donors. *J Proteomics* 2013;**85**:109–128.
37. Travis WD, Hunninghake G, King TE *et al*. Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: report of an American Thoracic Society project. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;**177**:1338–1347.
38. Kondoh Y, Taniguchi H, Yokoi T *et al*. Cyclophosphamide and low-dose prednisolone in idiopathic pulmonary fibrosis and fibrosing nonspecific interstitial pneumonia. *Eur Respir J* 2005;**25**:528–533.

39. Rasso J, Hauser K, Netzker R *et al.* Duale Reihe Biochemie. Thieme Verlag Stuttgart 2006. 1. Auflage:696ff
40. Schmidt RF, Lang F. Physiologie des Menschen. Springer Medizin Verlag Heidelberg 2007. 30. Auflage:541f
41. Kirby EP, McDevitt PJ. The binding of bovine factor XII to kaolin. *Blood* 1983;**61**:652–659.
42. Renné T, Schmaier AH, Nickel KF *et al.* In vivo roles of factor XII. *Blood* 2012;**120**:4296–4303.
43. Kaplan AP. The bradykinin-forming cascade: a historical perspective. *Chem Immunol Allergy* 2014;**100**:205–213.
44. Schmaier AH. Physiologic activities of the contact activation system. *Thromb Res* 2014;**133**:41–44.
45. Wygrecka M, Jablonska E, Guenther A *et al.* Current view on alveolar coagulation and fibrinolysis in acute inflammatory and chronic interstitial lung diseases. *Thromb Haemost* 2008;**99**:494–501.
46. Wygrecka M, Kwapiszewska G, Jablonska E *et al.* Role of protease-activated receptor-2 in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;**183**:1703–1714.
47. Günther A, Mosavi P, Ruppert C *et al.* Enhanced tissue factor pathway activity and fibrin turnover in the alveolar compartment of patients with interstitial lung disease. *Thromb Haemost* 2000;**83**:853–860.
48. Chambers RC, Scotton CJ. Coagulation cascade proteinases in lung injury and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 2012;**9**:96–101.
49. Idell S, James KK, Levin EG *et al.* Local abnormalities in coagulation and fibrinolytic pathways predispose to alveolar fibrin deposition in the adult respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 1989;**84**:695–705.
50. Brown LF, Lanir N, McDonagh J *et al.* Fibroblast migration in fibrin gel matrices. *Am J Pathol* 1993;**142**:273–283.
51. Chambers RC, Leoni P, Blanc-Brude OP *et al.* Thrombin is a potent inducer of connective tissue growth factor production via proteolytic activation of protease-activated receptor-1. *J Biol Chem* 2000;**275**:35584–35591.

52. Howell DC, Laurent GJ, Chambers RC. Role of thrombin and its major cellular receptor, protease-activated receptor-1, in pulmonary fibrosis. *Biochem Soc Trans* 2002;**30**:211–216.
53. Bogatkevich GS, Tourkina E, Silver RM *et al*. Thrombin differentiates normal lung fibroblasts to a myofibroblast phenotype via the proteolytically activated receptor-1 and a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem* 2001;**276**:45184–45192.
54. Howell DC, Johns RH, Lasky JA *et al*. Absence of proteinase-activated receptor-1 signaling affords protection from bleomycin-induced lung inflammation and fibrosis. *Am J Pathol* 2005;**166**:1353–1365.
55. Jablonska ED. Role of intrinsic coagulation pathway in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. VVB Lauffersweiler Verlag Giessen 2010.
56. Caliezi C, Wuillemin WA, Zeerleder S *et al*. C1-Esterase inhibitor: an anti-inflammatory agent and its potential use in the treatment of diseases other than hereditary angioedema. *Pharmacol Rev* 2000;**52**:91–112.
57. Venkatraman GU, Gingras AR, Marshall JE *et al*. Structural basis of the C1q/C1s interaction and its central role in assembly of the C1 complex of complement activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;**110**:13916–13920.
58. Wallis R, Mitchell DA, Schmid R *et al*. Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology* 2010;**215**:1–11.
59. Botto M. C1q knock-out mice for the study of complement deficiency in autoimmune disease. *Exp Clin Immunogenet* 1998;**15**:231–234.
60. Mollnes TE, Song W, Lambris JD. Complement in inflammatory tissue damage and disease. *Trends Immunol* 2002;**23**:61–64.
61. Lewis MJ, Botto M. Complement deficiencies in humans and animals: links to autoimmunity. *Autoimmunity* 2006;**39**:367–378.
62. Travis J, Salvesen GS. Human plasma proteinase inhibitors. *Annu Rev Biochem* 1983;**52**:655–709.
63. Bock SC, Skriver K, Nielsen E *et al*. Human C1 inhibitor: primary structure, cDNA cloning, and chromosomal localization. *Biochemistry* 1986;**25**:4292–4301.
64. Davis AE, Lu F, Mejia P. C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. *Thromb Haemost* 2010;**104**:886–893.
65. Bork K. Recurrent angioedema and the threat of asphyxiation. *Dtsch Arztebl Int* 2010;**107**:408–414.

66. Bork K, Maurer M, Bas M *et al.* Hereditäres Angioödem durch C1-Inhibitor-Mangel, Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Angioödeme (DGA), der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM), der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI) der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin, der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) und der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA). *Allergo Journal* 2012;**21**:109–118.
67. Kaplan AP. Enzymatic pathways in the pathogenesis of hereditary angioedema: the role of C1 inhibitor therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2010;**126**:918–925.
68. Miranda AR, Ue AP, Sabbag DV *et al.* Hereditary angioedema type III (estrogen-dependent) report of three cases and literature review. *An Bras Dermatol* 2013;**88**:578–584.
69. Bork K, Wulff K, Witzke G *et al.* Hereditary angioedema with normal C1-INH with versus without specific F12 gene mutations. *Allergy* 2015;**70**:1004–1012.
70. Hagel S, Brunkhorst F. Sepsis. *Intensivmed* 2011;**48**:57–73.
71. Zeerleder S, Caliezi C, Redondo M *et al.* Aktivierung der plasmatischen Kaskadensysteme bei Sepsis: Rolle von C1-Inhibitor. *Schweiz Med Wochenschr* 1999;**129**:1410–1417.
72. Pixley RA, De La Cadena R, Page JD *et al.* The contact system contributes to hypotension but not disseminated intravascular coagulation in lethal bacteremia. In vivo use of a monoclonal anti-factor XII antibody to block contact activation in baboons. *J Clin Invest* 1993;**91**:61–68.
73. Nuijens JH, Eerenberg-Belmer AJ, Huijbregts CC *et al.* Proteolytic inactivation of plasma C1-inhibitor in sepsis. *J Clin Invest* 1989;**84**:443–450.
74. Krijnen PA, Kupreishvili K, de Vries MR *et al.* C1-esterase inhibitor protects against early vein graft remodeling under arterial blood pressure. *Atherosclerosis* 2012;**220**:86–92.
75. Gonzales LW, Angampalli S, Guttentag SH *et al.* Maintenance of differentiated function of the surfactant system in human fetal lung type II epithelial cells cultured on plastic. *Pediatr Pathol Mol Med* 2001;**20**:387–412.
76. Wygrecka M, Markart P, Ruppert C *et al.* Cellular origin of pro-coagulant and (anti)-fibrinolytic factors in bleomycin-injured lungs. *Eur Respir J* 2007;**29**:1105–1114.
77. Wu Y. Contact pathway of coagulation and inflammation. *Thromb J* 2015;**13**:1–9.

78. Schmaier AH. Physiologic activities of the contact activation system. *Thromb Res* 2014;**133**:41-44.
79. Herrera C, Velasco F, Guerrero A *et al*. Contact phase of blood coagulation in cardiogenic pulmonary oedema (CPO) and adult respiratory distress syndrome (ARDS). *Intensive Care Med* 1989;**15**:99–104.
80. Schapira M, Gardaz JP, Py P *et al*. Prekallikrein activation in the adult respiratory distress syndrome. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1985;**21**:237–241.
81. Bártoová E, Krejčí J, Harnicarová A *et al*. Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem* 2008;**56**:711–721.
82. Allam R, Kumar SV, Darisipudi MN *et al*. Extracellular histones in tissue injury and inflammation. *J Mol Med (Berl)* 2014;**92**:465–472.
83. Ward PA, Grailer JJ. Acute lung injury and the role of histones. *Transl Respi Med* 2014;**2**:1–4.
84. Xu Z, Huang Y, Mao P *et al*. Sepsis and ARDS: The Dark Side of Histones. *Mediators Inflamm* 2015; 205054:1–9.
85. Grailer JJ, Ward PA. Lung inflammation and damage induced by extracellular histones. *Inflamm Cell Signal* 2014;**1**:1–5.
86. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA *et al*. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One* 2012;**7**:e32366:1–14.
87. Zoz DF, Lawson WE, Blackwell TS. Idiopathic pulmonary fibrosis: a disorder of epithelial cell dysfunction. *Am J Med Sci* 2011;**341**:435–438.
88. Günther A, Korfei M, Mahavadi P *et al*. Unravelling the progressive pathophysiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir Rev* 2012;**21**:152–160.
89. Huebener P, Schwabe RF. Regulation of wound healing and organ fibrosis by toll-like receptors. *Biochim Biophys Acta* 2013;**1832**:1005–1017.
90. Li XX, Jiang DY, Huang XX *et al*. Toll-like receptor 4 promotes fibrosis in bleomycin-induced lung injury in mice. *Genet Mol Res* 2015;**14**:17391–17398.
91. Bosmann M, Grailer JJ, Ruemmler R *et al*. Extracellular histones are essential effectors of C5aR- and C5L2-mediated tissue damage and inflammation in acute lung injury. *FASEB J* 2013;**27**:5010–5021.

92. Collard HR, Moore BB, Flaherty KR *et al.* Acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;**176**:636–643.
93. Kondoh Y, Tanyguchi H, Kawabata Y *et al.* Acute exacerbation in idiopathic pulmonary fibrosis. Analysis of clinical and pathologic findings in three cases. *CHEST* 1993;**103**:1808–1812.
94. Bhatti H, Girdhar A, Usman F *et al.* Approach to acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Thorac Med* 2013;**8**:71–77.
95. Póvoa P. C-reactive protein: a valuable marker of sepsis. *Intensive Care Med* 2002;**28**:235–243.
96. Igonin AA, Protsenko DN, Galstyan GM *et al.* C1-esterase inhibitor infusion increases survival rates for patients with sepsis. *Crit Care Med* 2012;**40**:770–777.
97. Todd NW, Luzina IG, Atamas SP. Molecular and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012;**5**:1–24.

8. Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort, Datum

Unterschrift

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

10. Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mir bei der Anfertigung dieser Dissertation zur Seite standen und mich unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Malgorzata Wygrecka-Markart, meiner Betreuerin, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht entstanden wäre. Danke für die Möglichkeit diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen. Vielen Dank für die stetige Hilfe und Unterstützung, die Geduld im Labor, die Ideen, die kreative und inspirierende Atmosphäre und die schnellen Korrekturen. Danke, dass sie mir bei allen Fragen, die während der Anfertigung dieser Arbeit entstanden sind, immer geholfen hat.

Weiterer besonderer Dank geht an Dr. Dariusz Zakrzewicz und Dr. Miroslava Didiasova, die mir bei vielen Fragestellungen im Labor geholfen haben und mit denen mir die Arbeit im Labor, nicht nur wegen der vielen lustigen aber auch privaten Themen, viel Spaß gemacht hat.

Vielen Dank an die gesamte Arbeitsgruppe, besonders an Yvonne und Horst, für die Hilfe und Einführung bei meinen Experimenten.

Danke auch an Prof. Dr. Philipp Markart, der mir das Thema in dieser Arbeitsgruppe vermittelt hat.

Mein letzter und größter Dank geht an meine Mirjam und meine Eltern. Vielen Dank für eure Liebe, eure ganze Unterstützung und eure kontinuierliche Motivation sowie die schönen Momente mit euch als Ausgleich zur Erstellung dieser Arbeit.