Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. B. Autenrieth

Immunhistochemische Quantifizierung von Elastin und qualitativer Nachweis von aktivierten neutrophilen Granulozyten in den Alveolarsepten von Patienten mit Cystischer Fibrose.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Jan Philipp Ruprecht
aus Stuttgart

2004

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Döring

2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Flehmig

1 Einleitung 3

1.1 Cystische Fibrose 3

1.2 Bakterielle Lungeninfektion und Entzündungsreaktionen bei CF-Patienten 4

1.3 Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (PMN) 5

1.4 Aufbau und Funktion des Elastins 6

1.5 Neutrophile Elastase 7

1.6 Gewebedestruktion und Reaktionen des Organismus 9

1.7 Entzündungsmediatoren in der Lunge von CF-Patienten 10

1.8 Hypothese und Ziele 13

2 Material und Methoden 14

2.1 Geräte 14

2.2 Chemikalien und Reagenzien 14

2.3 Antikörper 15

2.4 Medien und Stammlösungen 16

2.5 Patienten 17

2.6 Präparation des Lungengewebes 17

2.7 Elastinquantifizierung im peripheren Lungengewebe 18

2.7.1 Histologische Aufbereitung der Präparate 18
2.7.2 Elastinnachweis im peripherem Lungengewebe mittels Immunhistochemie 19
2.7.3 Quantitative Elastinbestimmung 20
2.7.4 Statistik 22

2.8 Nachweis von PMN und aktivierten PMN in der Lungenperipherie 23

2.8.1 Fertigen von Kryopräparaten 23
2.8.2 Färbung aktivierter PMN im Lungengewebe 23
2.8.3 Färbung von PMN im Lungengewebe 24

3 Ergebnisse 25

3.1 Elastinquantifizierung im peripheren Lungengewebe 25

3.2 Nachweis von aktivierten PMN in der Lungenperipherie 28

4 Diskussion 30

4.1 Elastinquantifizierung im peripheren Lungengewebe 30

4.2 Nachweis von PMN und aktivierten PMN in der Lungenperipherie 34

5 Zusammenfassung 35

6 Literaturverzeichnis 36

1 Einleitung

1.1 Cystische Fibrose

Die Cystische Fibrose (CF; Synonym Mukoviszidose) kommt in Mitteleuropa und Nordamerika mit einer Prävalenz von 1:2500-3000 Lebendgeburten vor und ist damit die häufigste schwerwiegende Erbkrankheit in diesem Gebiet [20]. Sie wird autosomal-rezessiv vererbt [71], nur homozygote Merkmalsträger erkranken. CF wird verursacht durch Mutationen auf dem langen Arm des Chromosoms 7 in der Position 7q31-32. Dieses Gen kodiert den „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)“ [37, 57, 58]. Dessen Funktion ist bei CF gestört [7, 71]. Die am häufigsten vorkommende, von über 1000 beschriebenen Mutationen, ist eine Deletion von 3 Basenpaaren, die für die Kodierung der Aminosäure Phenylalanin (ΔF508) verantwortlich sind [54]. Daraus resultiert eine Funktionsstörung des Chloridkanals mit der Folge einer verringerten Chloridionendurchlässigkeit [69]. Bei der Schweißsekretion manifestiert sich dies durch eine fehlende Chloridionen-Reabsorption in den Ausführungsgängen der Schweißdrüsen und einer daraus resultierenden stark erhöhten Chloridkonzentration im Schweiß [19]. Auch andere Organe wie beispielsweise Lunge, Pankreas, Leber und Gastrointestinaltrakt sind von dem defekten Chloridkanal betroffen. Die luminalen Sekrete seromuköser und muköser Drüsen dicken ein und verlegen die Ausführungsgänge. Die klinischen Symptome werden durch die sekundären pathomorphologischen Veränderungen und Funktionsstörungen bestimmt [56]. Die schwerwiegendsten Organkomplikationen finden in der Lunge statt [20, 54]. Hier kommt es aufgrund der verringerten Chloridpermeabilität der apikalen Epithelzellmembranen zu einer fehlenden intraluminalen Chloridsekretion. Die gestörte Chloridsekretion in das Lumen der Luftwege hat eine erhöhte Natriumreabsorption zur Folge und führt schließlich zu einer verringerten Wasserkonzentration in den Bronchialsekreten [11, 46]. Das hochvisköse Sekret beeinträchtigt die mukoziliäre Clearance, es kommt zu Stauungen und Obstruktionen [77]. Dies begünstigt bakterielle Infektionen, die meist bereits kurz nach der Geburt eintreten [47]. Über 90% der CF-Patienten sterben aufgrund von Lungenerkrankungen. Damit stellen bronchopulmonale Erkrankungen die Hauptursache für die Mortalität der CF-Patienten dar [20].

1.2 Bakterielle Lungeninfektion und Entzündungsreaktionen bei CF-Patienten

Kurz nach der Geburt treten bei den meisten CF-Patienten Lungeninfektionen auf [1]. *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* sind dabei die bedeutendsten Erreger [4]. Aber auch andere Keime, wie *Haemophilus influenzae* und opportunistische Pilzinfektionen mit *Candida albicans* oder *Aspergillus fumigatus* kommen vor [4, 28]. Im Kleinkindalter ist die Inzidenz der *S. aureus* Infektion am häufigsten, sie wird mit zunehmenden Alter von *P. aeruginosa* übertroffen [28]. Die Bakterien befinden sich vor allem im Tracheobronchialtrakt, in den Alveolen kommen sie nur vereinzelt vor [3, 72]. Bakterien in den Alveolen lassen sich nicht in allen CF-Lungen auffinden. In CF-Lungen mit intraalveolär lokalisierten Erregern sind diese häufig peripher um die von Infektion und Inflammation betroffenen Bronchioli mit einem Durchmesser < 1mm anzutreffen [3]. Bei einer Untersuchung konnte in einer von drei untersuchten CF-Lungen *P. aeruginosa* in den Alveolen gefunden werden. Durchschnittlich ließen sich bei diesem Patienten im Schnittpräparat 2 bis 4 Erreger pro Alveole ermitteln [72]. Die chronischen Infektionen im Tracheobronchialtrakt sind mitverantwortlich für eine Kaskade von Entzündungsreaktionen, wobei Infektion und Entzündungsreaktion innerhalb der Lunge stark variieren [23]. Der Organismus versucht die Keime mit Hilfe von sekretorischen IgA, Lymphozyten, alveolären Makrophagen, Granulozyten, Lysozym, Lactoferrin und der Komplementkaskade zu eliminieren [27]. Eine Immunreaktion wird so durch die bakteriellen Infektionen ausgelöst, die durch spezifische Serumantikörper gegen die bakteriellen Erreger, Immunkomplexe und die Einwanderung hoher Zahlen von neutrophilen Granulozyten (PMN) charakterisiert ist [23]. Trotz intakter Immunabwehr ist der Organismus jedoch nicht in der Lage, *P. aeruginosa* dauerhaft zu eradizieren. Der Keim ändert im Tracheobronchialtrakt von CF-Patienten seinen Phänotyp, indem er von einer non-mukoiden in eine mukoide Form übergeht [10, 15, 21, 31]. Dabei umgibt sich das Bakterium mit einer schützenden Alginatschicht, und es bilden sich Mikrokolonien [42], die von Phagozyten nicht eliminiert werden können [15]. Die Virulenz des Erregers ist außerdem charakterisiert durch die Produktion von Hämolysinen, Proteasen und Exotoxin A [33].

1.3 Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (PMN)

PMN werden im Knochenmark aus Myeloblasten gebildet [36]. Sie sind in der Lage von der Blutbahn in das Bindewebe zu gelangen. Die Extravasation der PMN verläuft dabei in mehreren Schritten:

- Durch entzündungsvermittelnde Stoffe werden auf den Endothelzellen der entsprechenden Gefäße Selektine exprimiert, die mit Glykoproteinen auf den PMN schwache Bindungen eingehen können. Aufgrund des Blutstroms rollen die PMN entlang des Endothels, indem sich Bindungen neu bilden und alte gelöst werden [34].

- In einem zweiten Schritt bilden sich über Adhäsionsmoleküle festere Bindungen, die die Rollbewegung beenden. Die PMN haften dem Endothel direkt an und sind dadurch zur Diapedese fähig [34].

- Die PMN drängen sich zwischen den Endothelzellen hindurch und durchwandern die Basalmembran mit Hilfe proteolytischer Enzyme [34].

Anschließend gelangen die PMN entlang des Gradienten der Entzündungsmediatoren zum Ort der Entzündung [34]. Die PMN werden chemotaktisch angelockt von bakteriellen Produkten und Endotoxinen, aktivierten Komplementprodukten wie C5a und C5adesARG, Leukotrien B4 (LTB_4) und Zytokinen wie vor allem IL8 [23]. Diese Chemotaxine aktivieren die PMN, die daraufhin Rezeptoren wie CR1 und CR3 auf der Zelloberfläche exprimieren. Die Komplementrezeptoren sind wichtig für Diapedese, Migration und Phagozytose. Sie erkennen opsonierte Partikel oder Keime und leiten damit die Phagozytose ein [53]. Am Ort der Entzündung spielen die PMN eine bedeutende Rolle der unspezifischen Immunabwehr. Durch verschiedene Mechanismen sind sie in der Lage, ihre antimikrobielle Aktivität zu entfalten und Pathogene, jedoch auch körpereigenes Gewebe zu zerstören. PMN enthalten in den azurophilen Granula das Enzym Elastase, das Elastin abbauen und eine Reihe weiterer Proteine spalten kann [65].

Antiproteasen wie das α_1-Antitrypsin binden freie Elastase und inaktivieren diese [48]. Über das NADPH-Oxidase-System bilden die PMN Peroxide (H_2O_2), Superoxidanionen (O_2^-) und Hydroxyl Radikale (OH^-) [76]. PMN enthalten größere Mengen an Myeloperoxidase. Dieses Enzym kann freigesetzt werden und Cl^- in der Gegenwart von H_2O_2 zu Hypochlorsäure (HOCl) oxidieren [68]. Die gebildeten Oxidantien wirken bakterizid. Bei CF-Patienten konnten hohe Konzentrationen an extrazellulärer Myeloperoxidase gemessen werden [50]. HOCL ist in der Lage, die schützenden Antiproteasen wie α_1-Antitrypsin und sekretorischen Leukozyteninhibitor (SLPI) zu inaktivieren. Oxidiertes α_1-Antitrypsin kann nicht mehr an neutrophile Elastase binden und diese somit nicht mehr inhibieren. Die Elastase entwickelt damit in Gegenwart von oxidiertem α_1-Antitrypsin ihr volles destruktives Potential. Da sie an Gewebe bindet, bevor sie von α_1-Antitrypsin gehemmt wird, kann sie im größeren Umfang Gewebe zerstören. An Elastin gebundene Elastase kann nicht mehr von α_1-Antitrypsin inhibiert werden [76].

1.4 Aufbau und Funktion des Elastins

Elastische Fasern kommen gehäuft in Haut, Gefäßen, elastischem Knorpel, Submukosa der Bronchien und Alveolarmembranen der Lunge vor. Sie sind charakterisiert durch ihre Zugelastizität und können bis auf das 2,5-fache ihrer ursprünglichen Länge gedehnt werden. Die Fibroblasten synthetisieren Tropoelastin, das sich im Extrazellulärraum zu Elastin umwandelt [44]. Elastische Fasern bestehen aus zwei Komponenten. Die Hauptkomponente besteht aus Elastin und befindet sich im Zentrum der Fasern. Die zweite Komponente besteht aus elastischen Mikrofibrillen, die das Zentrum aus Elastin umgeben. Die Elastinfilamente weisen einen hohen Gehalt der Aminosäuren Glycin und Prolin auf. Zusätzlich enthalten diese einen hohen Anteil hydrophober Aminosäuren, wie Alanin, Valin, Leuzin und Isoleuzin [36]. Die Filamente sind durch die für Elastin spezifischen Aminosäuren Desmosin und Isodesmosin quervernetzt. Desmosin und Isodesmosin kommen beim Menschen ausschließlich im Elastin vor und können deshalb zum Elastinnachweis verwendet werden [32, 74]. Elastin ist unlöslich gegenüber Säuren und Basen, kann jedoch durch das Enzym Elastase sehr leicht gespalten werden [36].

1.5 Neutrophile Elastase

Die ständige Stimulation des Immunsystems aufgrund chronischer bakterieller Infektionen bei CF-Patienten hat einen massiven Einstrom von PMN aus der Blutbahn in die Lumina der Bronchien und Bronchiolen zur Folge [23]. Als Antwort auf bakterielle Reize und chemotaktische Gradienten wandern die PMN mit Hilfe der Freisetzung von Proteasen aus den Blutgefäßen zum Ort der Infektion [65]. Dabei können bei *P. aeruginosa* infizierten CF-Patienten bis zu 10^8 PMN pro Milliliter Sputum oder Bronchiallavage (BAL) vorhanden sein [23]. Die Anwesenheit von PMN bewirkt erhebliche bronchialdestruktive Prozesse. Bei CF-Patienten ist freie neutrophile Elastase im Sputum oder in der BAL in vergleichbar hohen Konzentrationen nachweisbar [14, 29, 50]. Die Menge an freier Elastase beeinflusst dabei den Grad der Obstruktion und weist eine negative Korrelation zum FEV_1 auf [50]. Die neutrophile Elastase ist eine Serinprotease, die zusammen mit Cathepsin G und Proteinase 3 in den azurophilen Granula der PMN vorkommt [65]. Besonders beim Zerfall von PMN werden große Mengen von Proteasen freigesetzt [65]. Freie Elastase spaltet neben Elastin eine Reihe weiterer Proteine. Dies führt neben der direkten Gewebezerstörung zu weiteren Veränderungen:

- freie Elastase spaltet Immunkomplexe [24], Transferrin [13], Komplementrezeptoren der Phagozyten und Opsonine [5, 70] in inaktive Fragmente und beeinträchtigt dadurch die Abwehrmechanismen des Organismus in den Atemwegen.

- Fibronektin auf der Oberfläche der Bronchialschleimhaut wird zerstört [51], so dass die Bakterien besser adhärieren können [67, 78].

- In vitro Versuche zeigen, dass Elastase dosisabhängig die CD2-, CD4- und CD8-Rezeptoren auf der Oberfläche der T-Lymphozyten spaltet, diese jedoch von den T-Lymphozyten im elastasefreiem Milieu wieder exprimiert werden [23].

- Elastase bewirkt außerdem eine Erhöhung der Sekretproduktion durch Stimulation submuköser Drüsen und Becherzellen [12, 35, 60]. Weiterhin ist die Schlagfrequenz der Zilien unter Elastaseeinfluss erniedrigt [62]. Dies beeinträchtigt die mukoziliäre Clearance und erhöht das Risiko für bronchopulmonale Obstruktionen und Infektionen.

- Größere Mengen an freier Elastase, wie sie mit einer durchschnittlichen Konzentration von 100 µg/mL im Sputum von CF-Patienten vorkommen, sind in der Lage Elastin abzubauen [22].

Bei in vitro Versuchen mit humanem Lungengewebe konnte nach Behandlung mit humaner neutrophiler Elastase beobachtet werden, dass die Elastase an Elastin binden kann und Epithel, Endothel, Basalmembran und elastische Fasern schädigt [51]. Die elastischen Fasern wurden dabei nur in den Randbereichen abgebaut, wohingegen die zentralen Bereiche der Fasern noch intakt waren. Desweiteren wurde beobachtet, dass in Bereichen, in denen elastische Fasern geschädigt waren, meistens keine Epithelzellen mehr vorhanden waren und die Alveolarwand nur noch mit einer freiliegenden Basalmembran bedeckt war [51]. Es wird daher vermutet, dass ein zusätzlicher Angriffspunkt der Elastase die Zelladhäsine sind, mit denen die Epithelzellen an die Basalmembran geheftet sind.

Eine gesunde Lunge ist in der Lage, freie Elastase mittels Inhibitoren wie α_1-Antitrypsin und sekretorischen Leukozyteninhibitor (SLPI) zu inaktivieren [48, 75]. In den Bronchien bei CF-Patienten, greift dieser Schutzmechanismus nicht mehr [22]. Es liegt eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Elastase und den Inhibitoren zugunsten der Elastase vor [6]. α_1-Antitrypsin und SLPI können durch hohe Konzentrationen von Elastase und Sauerstoffradikalen gespalten und inaktiviert werden [17]. Aufgrund der hohen Elastasekonzentration in den Bronchien und Bronchioli bei CF-Patienten findet sich überwiegend gespaltenes α_1-Antitrypsin im Sputum. Dieses kann die destruktiven Prozesse nicht mehr aufhalten, da es nicht mehr an freie Elastase bindet [29]. In nächster Umgebung der aktiven PMN befindet sich aufgrund Degranulation der azurophilen Granula eine proteolytisch aktive Zone [16, 43].

In dieser Mikroumgebung erreicht die Elastase hohe Konzentrationen und kann dort durch die Antiproteasen nicht mehr inhibiert werden [22]. In den Alveolarsepten von CF-Patienten ist die Anzahl der PMN nur leicht erhöht [3, 73]. Inwiefern elastasebedingte Destruktionen hier auftreten und ob ein Elastase-Antielastase-Ungleichgewicht in den Alveolen vorliegt, ist bisher nur unzureichend untersucht worden.

1.6 Gewebedestruktion und Reaktionen des Organismus

Das Ungleichgewicht zwischen der Elastase und den Inhibitoren in den Bronchien und Bronchioli bewirkt einen Elastinabbau [65]. Ein Elastinabbau in den Alveolarsepten durch den gesteigerten PMN-Influx wird vermutet [73]. Eine entscheidende Rolle für die Pathophysiologie der Erkrankung spielt dabei, ob der Elastinabbau durch einen Wiederaufbau ausgeglichen werden kann oder nicht [45]. Das Ausmaß des Elastinabbaus in der Lunge kann, bei Ausschluss von Haut- und Gefäßkrankheiten, mit Hilfe der ausgeschiedenen Desmosin- und Isodesmosinmenge im Urin bestimmt werden [30, 74]. Die Exkretion dieser Abbauprodukte nimmt bei CF-Patienten mit dem Alter ab. Dies weist auf darauf hin, dass sich mit zunehmendem Alter der Elastingehalt in CF-Lungen reduziert [79]. Die Menge an ausgeschiedenem Desmosin und Isodesmosin ist bei erwachsenen CF-Patienten, aufgrund der chronischen Infektion und massiven Entzündungsreaktion höher als bei Patienten mit chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen im exazerbierenden Stadium und höher als bei Patienten mit α_1-Antitrypsindefekt. Gegenüber einer Kontrollgruppe gesunder Nichtraucher sind die Werte in dieser Studie ca. um den Faktor 2,5 erhöht [74].

Aufgrund des Elastinabbaus findet in der Lunge im Rahmen des Remodelings ein Wiederaufbau durch reparative Mechanismen und Neubildung von elastischen Fasern statt. Es konnten erhöhte mRNA-Werte für Elastin bei der Untersuchung von Hamsterlungen nach Behandlung mit Elastase festgestellt werden [45]. Bei in vitro Untersuchungen mit Kulturen aus Lungenfibroblasten von Ratten konnte nach Elastasebehandlung ebenso eine Erhöhung der mRNA für Elastin festgestellt werden [26]. Dies spricht für eine gesteigerte Elastinneubildung. Elastische Fasern können nach

vollständiger Zerstörung neu synthetisiert werden, dies geht jedoch mit einer Desorganisation des Lungengewebes einher [63]. Zusätzlich werden beschädigte elastische Fasern repariert, indem von den Fibroblasten hergestelltes Tropoelastin in die defekten Fasern eingebaut wird [63].

Auch der Kollagenaufbau und Abbau wird in der Lunge von CF-Patienten von der chronischen Entzündung beeinflusst. Beim Remodeling der Alveolarsepten verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau zugunsten der Kollagensynthese. Die chronische Entzündung verursacht durch Freisetzung von Interleukinen und Wachstumsfaktoren eine gesteigerte Kollagensynthese [39]. Mikroskopisch sind Bereiche mit fibrotisch verdickten Alveolarsepten sichtbar [61]. Aufgrund dieser fibrotischen Bereiche sind die Diffusionswege verlängert, und der Gasaustausch beeinträchtigt. Außerdem ist das Lungengewebe verhärtet. Wegen der eingeschränkten Ausdehnungsfähigkeit muss eine erhöhte Atemarbeit geleistet werden [61]. Der pathophysiologische Prozess bei CF begünstigt Fibrosen, aufgrund einer gesteigerten Kollagensynthese [39], und Emphysembildung durch einen erhöhten Elastinabbau [51, 65].

1.7 Entzündungsmediatoren in der Lunge von CF-Patienten

Es besteht die Theorie, dass es sich bei CF nicht ausschließlich um eine infektiös bedingte Entzündungsreaktion handelt. In einigen Fällen konnte bei CF-Patienten festgestellt werden, dass eine Entzündung einer Infektion vorausgeht [38, 40]. So fand man bei Säuglingen im Rahmen von Screeninguntersuchungen Fälle, bei denen keine Bakterien nachgewiesen werden konnten, jedoch klare Hinweise auf entzündliche Vorgänge in der BAL gefunden wurden [2]. *P. aeruginosa* ist vor allem in den Bronchien und Bronchioli lokalisiert. In den Alveolen der Lungenperipherie von CF-Patienten lassen sich nicht in allen Fällen Erreger auffinden [3, 72]. Die Erregerdichte ist bei diesen Patienten mit 2-4 Bakterien pro Alveole gering im Vergleich zu den Bakterienkonzentrationen im Tracheobronchialtrakt [23, 72]. In den Alveolarsepten bei CF-Patienten liegt eine erhöhte Konzentration des proinflammatorischen Zytokins Interleukin 8 (IL-8) und eine etwa dreifach erhöhte PMN Infiltration vor [73].

Entzündung und Infektion können in verschiedenen Lungenbereichen unterschiedlich ausgeprägt sein [49]. Inwieweit entzündliche Prozesse in den Alveolen bei der Pathogenese von CF eine Rolle spielen, ist bisher nur unzureichend untersucht worden. In den Bronchien und Bronchioli besteht bei CF-Patienten eine hohe Elastaseaktivität, die die Ausschüttung von Leukotrien B4 (LTB4) und IL-8 begünstigt [41, 52]. IL-8 bewegt als Lockstoff die PMN dazu, die Blutbahn zu verlassen und in das umgebende Gewebe einzuwandern und aktiviert die PMN, ihre Speichergranula freizusetzen [34]. Zudem ist das antiinflammatorische Zytokin, Interleukin 10 (IL-10), bei CF-Patienten erniedrigt [9]. Dieses wird in den Epithelzellen der Bronchien gebildet und wirkt hemmend auf die PMN-Chemotaxis und die T-Lymphozytenstimulation [8]. Bei mit *P. aeruginosa* infizierten CF-Patienten sorgen, neben IL-8, weitere erhöhte Werte proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin 1 (IL-1), Interleukin 6 (IL-6) und TNF-α für eine Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung [9]. Dies wiederum hat eine erhöhte Freisetzung von PMN zur Folge. Dieser Circulus vitiosus aus Infektion, Entzündung und Gewebedestruktion ist nur schwer zu durchbrechen und ist verantwortlich für das Voranschreiten der Erkrankung. Der pathophysiologische Prozess führt von einer normalen Lunge im Säuglingsalter über die zunehmende Gewebezerstörung im Kindes- und Jugendalter zur Bronchiektasenbildung, respiratorischen Insuffizienz und cor pulmonale im Erwachsenenalter [56]. Ein Schema zur pathophysiologischen Kaskade der Lungenveränderungen bei CF-Patienten ist in Abb.1.1 dargestellt. Die durchschnittliche Lebenserwartung von CF-Patienten liegt heutzutage aufgrund verbesserter und vielfältig ansetzender Therapiemethoden bei ca. 33 Jahren [18].

Pathogenese der Lungenveränderungen bei CF

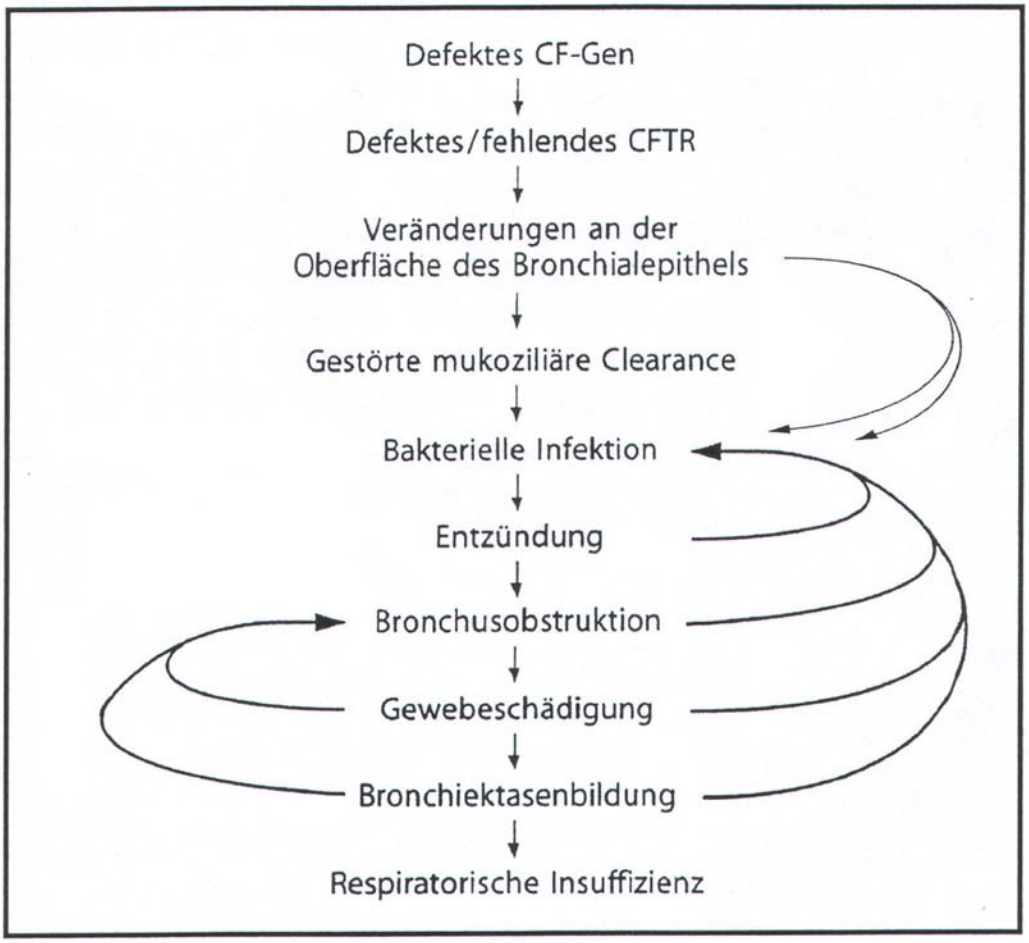

Abb. 1.1: Schema zur Pathogenese der Lungenveränderungen bei CF:
Eine zentrale Rolle spielen Infektion und Entzündung, die wie in einem Circulus vitiosus zur fortgesetzten Destruktion des Lungengewebes führen. Die chronologische Abfolge der einzelnen Schritte ist noch nicht im einzelnem geklärt. (Modifiziert nach Konstan und Berger [40]).

1.8 Hypothese und Ziele

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung bei CF-Patienten ist charakterisiert durch Entzündung, Infektion und Gewebedestruktion. Während im Tracheobronchialtrakt Bakterien und PMN in großen Mengen nachweisbar sind, sind die Alveolen nahezu keimfrei. Trotzdem kommt es hier zu einem erhöhten Einstrom von PMN. Die PMN können durch proteolytische Enzyme gewebedestruktive Prozesse induzieren.

Das Ziel der Arbeit war es, zu überprüfen, ob CF-Patienten einen geringeren Elastingehalt in den Alveolarsepten haben. Dazu sollten mit immunhistochemischen Methoden elastische Fasern in den Alveolarsepten von Patienten mit CF im Vergleich zu einer non-CF Kontrollgruppe quantifiziert werden, und aktivierte PMN in den Alveolarsepten nachgewiesen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Brutschrank (Jouan EB 115, St.Herblain, Frankreich)

Dewar (CP 65, Tec-Lab, Königstein)

Einbettautomat (Hypercenter, Shandon, SI, Frankfurt)

Gefriermikrotom (Cryocut 1800 Reichert-Jung, Leica, Wetzlar)

Kamera (3CCD, Sony, Köln)

Kontron-Imaging-Systems KS 300 (Kontron electronic GmbH, Eching)

Mikrotom (2050 Supercut Reichert-Jung, Leica, Wetzlar)

Mikroskop (Axioplan, Zeiss, Jena)

Rüttler (Vortex Genie 2 Bender & Hobein, Zürich, Schweiz)

Zentrifuge (Minifuge GL, Heraeus-Christ GmbH, Osterode)

2.2 Chemikalien und Reagenzien

0,1% Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat), Merck, Darmstadt

Aceton 100%, Merck, Darmstadt

BCIP/NBT Substrat, Dako, Hamburg

Cellstar-Gewebekulturröhrchen, Greiner Labortechnik, Frickenhausen

Choleratoxin, 10 ng/ml, Sigma, Deisenhofen

DAPI (Diamedin-2-Phenylindol-Dihydrochlorid, 2µg/ml), Sigma, Deisenhofen

Dextran T 500, Pharmacia AB, Uppsala, Schweden

Eindeckmedium Faramount aqueos mounting medium, Dako, Hamburg

Eindeckmedium für Fluoreszenspräparate Fluorescent mounting medium, Dako, Hamburg

Eiweißglycerin, Schmid GmbH & Co, Köngen

Ethanol, Merck, Darmstadt

Ficoll-Lösung (Biocoll Separation Solution, Density 1,077), Biochrom KG, Berlin

Flüssiger Stickstoff (N_2), Messer-Griesheim, Darmstadt

Formaldehyd, Merck, Darmstadt

Heparin (Liquemin N 2500, Heparin-Natrium aus Schweinemucosa), Hoffmann-La Roche AG, Grenzach- Whylen

KH_2PO_4, Merck, Darmstadt

Levamisole endogenious AP inhibitor, Dako, Hamburg

Na_2HPO_4 x $12H_2O$, Merck, Darmstadt

NaCl, Merck, Darmstadt

Nystatin, Gibco BRL, Heidelberg

Penicillin/Streptomycin 50µg/ml, Gibco BRL, Heidelberg

PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat, 1µg/ml), Sigma, Deisenhofen

p-Xylol, Merck, Darmstadt

Retinsäure, 10 ng/ml, Sigma, Deisenhofen

Schweineserum (normal), Dako, Hamburg

Silikonstift DAKO Pen, Dako, Hamburg

Ultroser G, 2% ig, Gibco BRL, Heidelberg

2.3 Antikörper

Monoklonaler Kaninchen-anti-Mensch alpha-elastin-Antikörper	Biotrend, Köln
Polyklonales Ziege-anti-Kaninchen-IgG konjugiert mit dem Enzym alkalische Phosphatase	DAKO, Hamburg
Monoklonaler Maus-anti-Mensch CR3-Antikörper	DAKO, Hamburg
Monoklonaler Maus-anti-Mensch neutrophile elastase-Antikörper	DAKO, Hamburg
Polyklonales Indocarbocyanin-2-labeled-Ziege-anti-Maus-IgG (Cy2)	DAKO, Hamburg

2.4 Medien und Stammlösungen

Transportmedium für das Lungengewebe

500 ml DMEM/Nut Mix F12 (Ham) enthalten:

5ml Ultroser G, 2%

100 µl Choleratoxin, 10 ng/ml

125 µl Retinsäure, 10 ng/ml

750 µl Nystatin und Penicillin/Streptomycin 50 µg/ml

Formaldehyd (4%)

Formaldehyd (37%) 1:9 mit aqua dest. verdünnen, bei 4^{o}C aufbewahren.

20-fache PBS-Stammlösung (Phosphate Buffered Saline)

170 g NaCl

28,64 g Na_2HPO_4 x $12H_2O$

2,7 g KH_2PO_4

1000 ml aqua dest.

PBS-Gebrauchslöung

PBS-Stammlösung 1:20 (v/v) mit aqua dest. verdünnen.

PBS-Tween 20

50 ml PBS-Stammlösung

950 ml aqua dest.

1 ml Tween 20

Sterile Dextranlösung

50 g Dextran T 500

950 ml NaCl 0,9%

sterilisieren.

2.5 Patienten

Für die Quantifizierung von Elastin im peripherem Lungengewebe wurden insgesamt 16 Patientenlungen untersucht. 10 Patienten hatten cystische Fibrose (CF). Diese Lungen stammten aus dem CF/Pulmonary Research and Treatment Centre in Chapel Hill, University of North Carolina, North Carolina, USA und aus dem Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Bénite, Frankreich. Das Durchschnittsalter der CF-Patienten betrug 27,2 Jahre (± 8,3 Jahre), es waren 4 männliche und 5 weibliche Patienten. Bei einem Patienten lagen keine Daten über das Geschlecht vor. Für den Nachweis aktivierter PMN in der Lungenperipherie wurde eine CF-Lunge aus Lyon untersucht. Dieser Patient war weiblich und 10 Jahre alt. Die CF-Patienten wurden aufgrund ihrer chronisch obstruktiven und mit Bakterienbesiedlung einhergehenden Lungenerkrankung einer Lungentransplantation unterzogen. Die 6 non-CF-Lungen kamen aus der Klinik Schillerhöhe der Landesversicherungsanstalt Württemberg, Stuttgart-Gerlingen. Es handelte sich um Raucher, deren Lungen wegen eines Karzinoms teilreseziert, bzw. lobektomiert wurden. Bei der anschließenden Präparation wurde darauf geachtet, dass keine tumorinfiltrierten Bereiche weiterverarbeitet wurden. Die non-CF Patienten waren im Durchschnitt 62,6 Jahre alt (± 11,4 Jahre); es waren 5 männliche und 1 weiblicher Patient.

Alle Patienten hatten einer Nutzung des Lungengewebes für wissenschaftliche Zwecke zugestimmt. Die Zustimmung der jeweilig zuständigen Ethikkomission wurde eingeholt.

2.6 Präparation des Lungengewebes

Das Lungengewebe wurden innerhalb 5 Minuten nach Lobektomie bzw. Teilresektion in Würfel mit einer Kantenlänge von ca. 1 cm geschnitten. Dabei wurde darauf geachtet, dass nur Alveolargewebe weiterverarbeitet wurde. Das Lungengewebe aus der Klinik Schillerhöhe wurde in ein Falkonröhrchen (50 ml) mit 20 ml Transportmedium überführt und beim Transport direkt nach Entnahme auf Eis gelagert. Am selben Tag wurden die Gewebestücke 3 mal mit sterilem PBS gewaschen und bis zur Weiterverarbeitung in frischem Formaldehyd (4%) bei 4^{o}C aufbewahrt.

Um neu entstandene Fumarsäure zu entfernen, wurde das Formaldehyd einmal pro Woche gewechselt. Das Lungengewebe aus dem Centre Hospitalier Lyon wurde vor Ort mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren. Transportiert wurde es in einem Dewar mit flüssigem Stickstoff und anschließend bei –70°C gelagert. Das Lungengewebe aus Chapel Hill wurde in Paraffinschnitten von Scott Randell (Cystic Fibrosis/Pulmonary Research and Treatment Center in Chapel Hill, University of North Carolina, USA) zur Verfügung gestellt.

2.7 Elastinquantifizierung im peripheren Lungengewebe

2.7.1 Histologische Aufbereitung der Präparate

Die Paraffineinbettung des Lungenmaterials wurde von Frau B. Bachmann und Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Universität Tübingen durchgeführt. Hierfür wurde ein Einbettautomat verwendet. Das Gewebe wurde zunächst vom Formaldehyd gereinigt, entwässert und anschließend mit Paraffin durchtränkt. Das Formaldehyd hätte ansonsten negative Auswirkungen auf die Paraffineinbettung und die Färbung. Es wurden, wenn genügend Gewebematerial vorhanden war, von jeder Lunge 3 Paraffinblöcke hergestellt. Diese enthielten Gewebe aus verschiedenen Bereichen der Lungenperipherie. Zur Herstellung der Schnittpräparate wurden die in Paraffinblöcke eingebetteten Lungengewebe mittels eines Mikrotoms geschnitten. Als Schichtdicke wurden 5 µm gewählt. Nach dem Schneiden wurden die Schnitte in einem 50°C warmen Wasserbad gestreckt. Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und bei 60°C eine Stunde in den Brutschrank gegeben, um das Paraffin ablaufen zu lassen.

Zum Entparaffinieren wurden die Präparate jeweils 2 min. in folgende Tauchbäder gegeben:

1. Xylol > 99%
2. Xylol > 99%
3. Xylol > 99%
4. Xylol > 99%
5. Ethanol 100%
6. Ethanol 100%
7. Ethanol 96%
8. Ethanol 96%
9. Ethanol 70%

Die Präparate wurden unmittelbar nach dem letzten Ethanolbad für 5 min. in einem PBS-Tween 20 Tauchbad belassen.

2.7.2 Elastinnachweis im peripherem Lungengewebe mittels Immunhistochemie

Nach dem Abtropfen der Objektträger wurde, um maskierende Proteine zu verdauen, auf die Präparate für 10 min. Proteinase K gegeben. Daraufhin wurde 3 x mit PBS-Tween 20 gewaschen, indem auf die Präparate 3 x für jeweils 5 min. PBS-Tween gegeben wurde. Das PBS-Tween 20 wurde nach jedem Waschgang mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Anschließend wurde die endogene alkalische Phosphatase mit Levamisole endogen AP Inhibitor gehemmt. Danach wurde wieder 3 x mit PBS-Tween 20 gewaschen. Die Präparate wurden anschließend mit Schweineserum (normal) für 30 min. abgesättigt, um unspezifische Hintergrundfärbungen zu unterdrücken. Hierfür wurde das Schweineserum 1:10 mit PBS-Tween verdünnt. Nochmals wurde 3 x mit PBS-Tween 20 gewaschen. Der erste Antikörper (monoklonaler Kaninchen-anti-Mensch alpha-elastin-Antikörper), der an das Elastin bindet, wurde nun 1:20 mit PBS-Tween verdünnt, und die Präparate damit eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde 3 x mit PBS-Tween 20 gewaschen.

Der zweite Antikörper, der an den ersten Antikörper bindet, (Ziege-Anti-Kaninchen-IgG, AP-konjugiert) wurde 1:50 mit PBS-Tween 20 verdünnt und die Präparate damit eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde 3 x mit PBS-Tween 20 gewaschen. Das BCIP/NBT Substrat, das mittels der alkalische Phosphatase des zweiten Antikörpers den Farbumschlag bewirkt, wurde für 6 min. auf dem Präparat belassen. Daraufhin wurde der Farbumschlag durch zweimaliges Aufbringen von aqua dest. gestoppt. Zum Schluss wurde das Präparat mit Eindeckmedium und einem Deckglas versehen. Die Negativkontrollen wurden nach gleichem Verfahren, nur ohne Aufbringen des ersten Antikörpers angefertigt, um eine unspezifische Bindung des zweiten Antikörpers auszuschließen.

2.7.3 Quantitative Elastinbestimmung

Die unter 2.7.2. gefärbten Präparate wurden mit einem Mikroskop in 200-facher Vergrößerung bei einer Aperturblendeneinstellung von 0,6 und der gleichen Lichtintensität zwischen 4 und 5 ausgewertet. Von den 6 non-CF-Patientenlungen wurden insgesamt 17 Präparate ausgewertet. Wenn vorhanden wurden 3 Präparate pro Patient ausgewertet, die jeweils von Gewebeblöcken aus unterschiedlichen Lappenbereichen der Lungenperipherie gefertigt wurden. Von den 10-CF-Patientenlungen wurde mindestens ein Gewebeblock pro Patient eingebettet. Bei 5 der CF-Patientenlungen lagen 3 Gewebeblöcke pro Patient aus unterschiedlichen Lappenbereichen der Lungenperipherie vor. Bei den restlichen 5 CF-Patientenlungen lag nur ein Gewebeblock pro Patient vor. Von jedem Gewebeblock wurde ein Präparat ausgewertet. Es wurden also insgesamt 20 Präparate von CF-Lungen ausgewertet. Pro Präparat wurden zwischen 11 und 36 Gesichtsfelder, beziehungsweise eine Mindestseptenlänge von 15,5 mm, ausgewertet. Um Ergebnisverfälschungen vorzubeugen, wurde darauf geachtet, dass sich keine Gefäße oder Bronchioli in den Gesichtsfeldern befanden. Zur Überprüfung der spezifischen Bindung des zweiten Antikörpers wurden die Negativkontrollen mitgeführt. Bilder wurden mittels einer analogen Kamera erstellt und in digitale umgewandelt.

Die quantitative Bestimmung des Elastins wurde mit Hilfe des Imaging Analyzers Kontron-Imaging-System KS 300 unternommen. Dieses Computerprogramm erkannte durch das vorher eingestellte Macro die angefärbten Elastinbereiche des Präparats. Die geometrische Calibration wurde auf 200-fache Vergrößerung eingestellt.

Das Macro wurde genau dem Farbwert des angefärbten Elastins angepasst und definierte damit den Farbwert, der in die Messung einbezogen werden sollte. Dadurch erkannte das Programm die Fläche des angefärbten Elastins und wandelte das Bild in ein schwarz/weißes Mask Image um (Abb 2.1). Die angefärbten Elastinbereiche erschienen nun weiß vor schwarzem Hintergrund. Die weiß markierten Elastinflächen des Bildes wurde nun errechnet und in μm^2 im Menü Data Histogramm angegeben. Das Programm ermöglichte das Einblenden eines Markers auf dem Monitor, der entsprechend der tatsächlichen Größe des Bildausschnittes des Präparats skaliert war. 10 cm auf dem Bildschirm entsprachen einer Septenlänge von 181,2 µm. Hiermit war es möglich, die am Monitor gemessene Septenlänge in cm, in die tatsächliche Septenlänge umzurechnen. Somit wurde die gemessene Elastingesamtfläche des Gesichtsfeldes zu der dazugehörigen Septenlänge in Relation gesetzt.

Histologisches Präparat von Alveolarsepten der Lungenperipherie

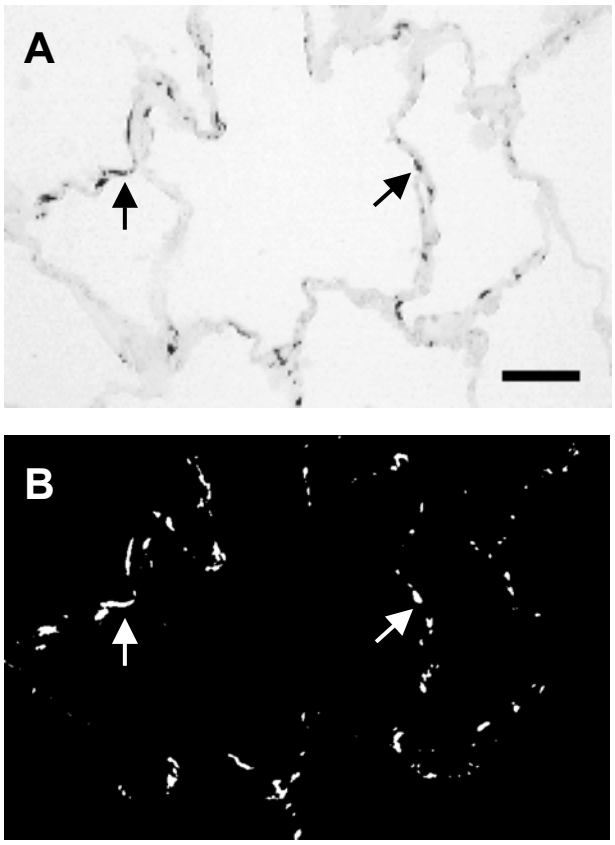

Abb. 2.1: Histologisches Präparat von Alveolarsepten aus der Lungenperipherie eines non-CF-Patienten (A,B). Nach immunhistochemischer Elastinfärbung stellt sich das Elastin dunkel dar (A, Pfeile). Dazugehöriges Mask-Image zur Elastinberechnung (B). Das Elastin stellt sich weiß dar (Pfeile). Die weißen Flächen werden vom Computer berechnet und in μm^2 ausgegeben. Der Balken entspricht 40 µm. Originalvergrößerung 200 x.

2.7.4 Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) angegeben. Außerdem wurden die Signifikanzen mit dem zweischwänzigen ungepaarten Student´s t-Test errechnet. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert $< 0,05$ wurden als signifikant betrachtet.

2.8 Nachweis von PMN und aktivierten PMN in der Lungenperipherie

2.8.1 Fertigen von Kryopräparaten

Zur besseren Haftung der Schnitte auf den Objektträgern wurden diese dünn mit Eiweißglycerin bestrichen. Das Lungengewebe wurde mit einem Gefriermikrotom mit einer Schichtdicke von 5 µm bei –20 ^{o}C geschnitten. Nach dem Aufziehen der Schnitte auf die Objektträger wurden die Präparate durch zweimaliges Aufbringen von Aceton 100% fixiert. Das Aceton wurde so lange auf den Objektträgern belassen, bis es verdunstet war.

2.8.2 Färbung aktivierter PMN im Lungengewebe

Bei dieser Färbung machte man sich zu nutze, dass aktivierte PMN im Gegensatz zu nicht aktiven PMN wie sie im Blut vorkommen einen Rezeptor (CR3) an der Zelloberfläche exprimieren. Diesen Rezeptor färbte man immunhistochemisch an. Die Färbung funktionierte aufgrund der Antikörpereigenschaften nicht bei den formaldehydfixierten Geweben, sondern nur bei Gefrierschnitten. Die auf den Objektträgern fixierten Präparate wurden 3x mit PBS-Tween 20 gewaschen. Anschließend wurden die endogene alkalische Phosphatase 5 min. mit Levamisole endogen AP Inhibitor gehemmt.

Danach wurde wieder 3 x mit PBS-Tween 20 gewaschen. Die Präparate wurden anschließend mit Schweineserum (normal) für 30 min. abgesättigt, um unspezifische Hintergrundfärbungen zu unterdrücken. Hierfür wurde das Schweineserum 1:10 mit PBS-Tween verdünnt. Nochmals wurde 3 x mit PBS-Tween 20 gewaschen. Der erste Antikörper (monoklonaler–Maus-anti-Mensch CR3-Antikörper), der an die aktivierten PMN bindet, wurde 1:50 mit PBS-Tween verdünnt und die Präparate damit eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde 3x mit PBS-Tween 20 gewaschen. Der zweite Antikörper (Ziege-anti-Maus-IgG, AP-konjugiert), der an den ersten Antikörper bindet, wurde 1:50 mit PBS-Tween 20 verdünnt, und die Präparate damit eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde 3 x mit

PBS-Tween 20 gewaschen. Das BCIP/NBT Substrat wurde für 6 min. auf dem Präparat belassen. Der Farbumschlag wurde durch Phosphatabspaltung der alkalischen Phosphatase des 2. Antikörpers bewirkt. Der Farbumschlag wurde mit zweimaligem Aufbringen von aqua dest. gestoppt. Zum Schluss wurde das Präparat mit Eindeckmedium und einem Deckglas versehen. Die Negativkontrollen wurden nach gleichem Verfahren, nur ohne Aufbringen des ersten Antikörpers angefertigt, um eine unspezifische Bindung des zweiten Antikörpers auszuschließen.

2.8.3 Färbung von PMN im Lungengewebe

Die Färbung wurde bei formaldehydfixierten in Paraffin eingebetteten sowie bei gefrorenen Lungengeweben durchgeführt. Die formaldehydfixierten in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden folgendermaßen vorbereitet, um mit den unter 2.8.1 vorbereiteten Kryopräparaten gefärbt zu werden: Nach dem Schneiden, wurden sie wie unter 2.7.1 beschrieben entparaffiniert. Nach dem Abtropfen der Objektträger, wurde auf die Präparate für 10 min. Proteinase K gegeben, um maskierende Proteine zu verdauen. Von nun an war das Vorgehen für die Präparate gleich und ist der Methodenbeschreibung unter 2.8.2 zu entnehmen. Bei der Färbung der PMN machte man sich deren Elastasegehalt zunutze. Diese Elastase wurde immunhistochemisch angefärbt. Hierfür wurde als erster Antikörper ein monoklonaler Maus-anti-Mensch neutrophile elastase-Antikörper verwendet. Der Antikörper wurde 1:100 mit PBS-Tween verdünnt und die Präparate damit eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert**.**

3 Ergebnisse

3.1 Elastinquantifizierung im peripherem Lungengewebe

Der Elastingehalt in der Lungenperipherie wurde bei CF- und bei non-CF-Patienten quantifiziert. Dieser wurde in μm^2 gemessen und in Relation zur Septenlänge gesetzt. Bei den untersuchten CF-Patienten beträgt der Mittelwert des Elastingehaltes 0,558 $\mu m^2/\mu m$ Septenlänge, bei einer Standardabweichung von ± 0,409. Der Mittelwert des Elastingehaltes bei non-CF Patienten beträgt 0,749 $\mu m^2/\mu m$ Septenlänge, bei einer Standardabweichung von ± 0,345. Es wurde hiermit festgestellt, dass die CF-Patienten im Vergleich zu den non-CF-Patienten einen geringeren Elastingehalt in der Lungenperipherie aufweisen. Dieser Elastingehalt ist dabei bei CF-Patienten um ca. 45% reduziert. Gleichzeitig war jedoch auch festzustellen, dass der Elastingehalt innerhalb der untersuchten Patientengruppen stark variierte. So lagen die Mittelwerte des Elastingehalts bei den CF-Patienten zwischen 0,186 und 1,256 $\mu m^2/\mu m$ Septenlänge. Bei den non-CF-Patienten bewegten sich diese zwischen 0,395 und 1,295 $\mu m^2/\mu m$ Septenlänge. Die Überprüfung der Signifikanz wurde mit dem zweischwänzigen ungepaarten Student´s t-Test ermittelt. Der p-Wert liegt bei 0,137. Da Alle p-Werte, die < 0,05 waren, als signifikant betrachtet wurden, lässt sich eine Signifikanz des unterschiedlich hohen Elastingehaltes hieraus nicht ableiten.

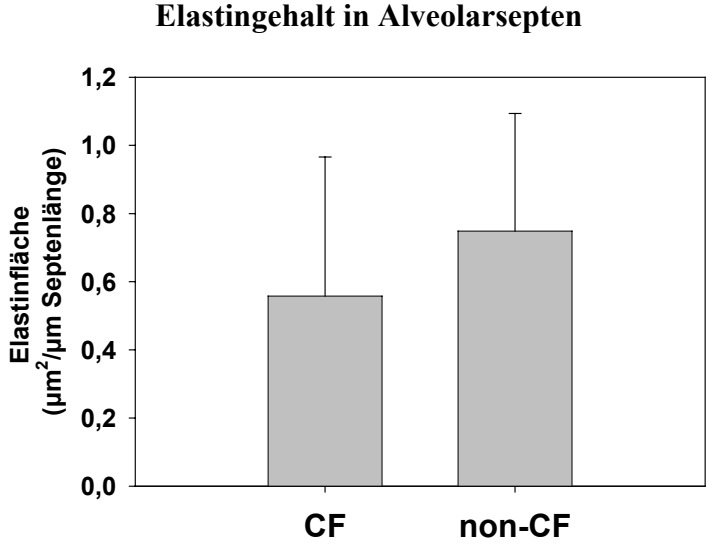

Abb. 3.1: Elastingehalt in Alveolarsepten der 10 CF-Patienten und 6 non-CF-Patienten. Der Elastingehalt wurde nach immunhistochemischer Färbung gemessen und in Relation zur Septenlänge gesetzt. Ergebnisse sind mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

Histologische Präparate von Alveolarsepten eines CF-und non-CF-Patienten

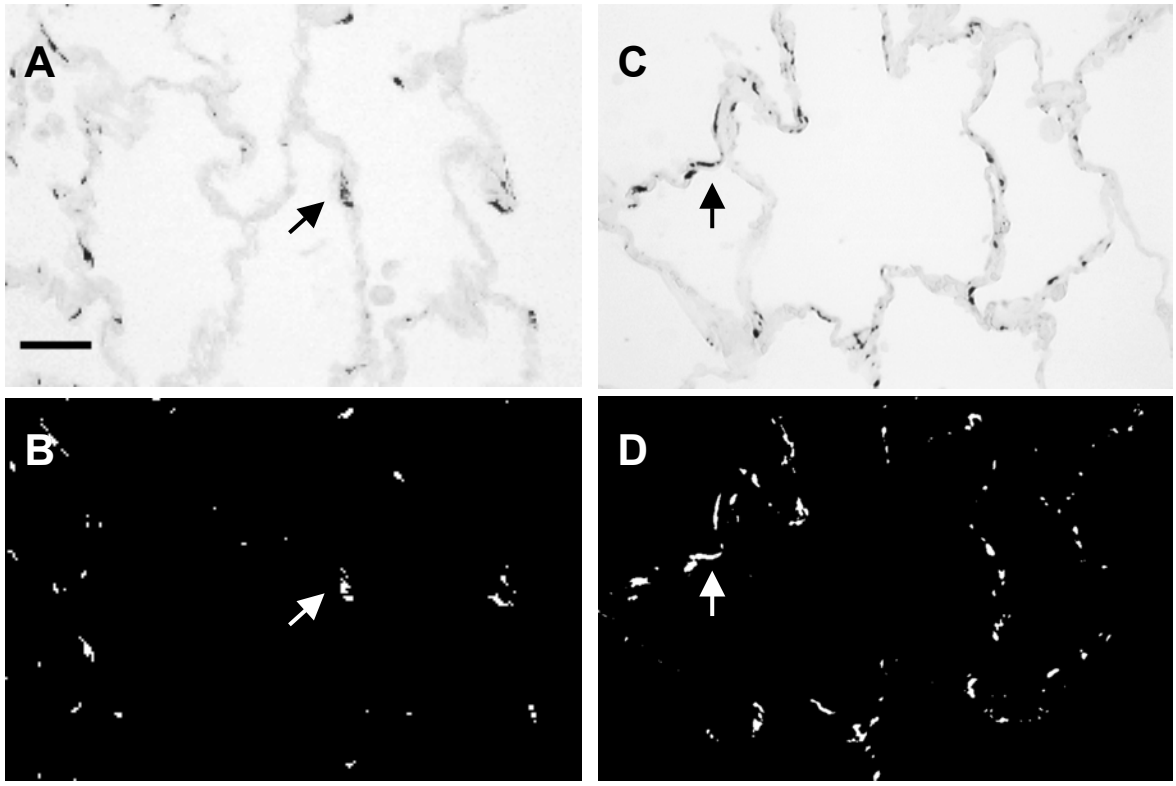

Abb. 3.2: Histologische Präparate von Alveolarsepten mit dazugehörigem Mask-Image, eines CF-Patienten (A, B) und eines non-CF-Patienten (C, D). Das Elastin ist immunhistochemisch gefärbt (schwarzer Pfeil) und wird zur Flächenberechnung weiß dargestellt (Pfeil, B, D). Der Elastingehalt ist bei dem CF-Patienten (A, B) reduziert. Der schwarze Balken entspricht 40 µm. Originalvergrößerung 200 x.

Elastingehalt der CF-Patienten

Patienten-nummer	Patientenalter (Jahren)	Anzahl Blöcke	Gesichts-felder	Elastingehalt ($\mu m^2/\mu m$ Septenlänge)
CF1	nicht bekannt	1	11	1,108
2355	38	1	14	1,089
3254	35	1	27	0,379
1611	30	1	27	0,425
1601	28	1	23	0,602
2462	30	3	95	0,186
2565	25	3	89	0,519
2549	20	3	93	0,389
2370	29	3	86	0,243
px	10	3	44	1,256
	Durchschnitt	**Summe**	**Summe**	
	27,2	**20**	**509**	

Abb. 3.3: Elastingehalt der 10 untersuchten CF-Patienten-Lungen. Wenn vorhanden, wurden Präparate aus 3 Gewebeblöcken von unterschiedlichen Regionen der Lungenperipherie ausgewertet.

Elastingehalt der non-CF-Patienten

Patienten-nummer	Patientenalter (Jahre)	Anzahl Blöcke	Gesichts-felder	Elastingehalt ($\mu m^2/\mu m$ Septenlänge)
2	69	3	72	0,435
3	55	3	71	0,713
4	nicht bekannt	2	37	1,295
7	77	3	75	0,984
8	48	3	68	0,395
9	64	3	75	0,797
	Durchschnitt	**Summe**	**Summe**	
	62,6	**17**	**398**	

Abb. 3.4: Elastingehalt der 6 untersuchten non-CF-Patienten-Lungen. Wenn vorhanden, wurden Präparate aus 3 Gewebeblöcken von unterschiedlichen Regionen der Lungenperipherie ausgewertet.

3.2 Nachweis von aktivierten PMN in der Lungenperipherie

PMN in der Lungenperipherie kommen in hoher Anzahl vor allem bei inflammatorischen Prozessen vor. Sie enthalten größere Mengen an Elastase. Durch immunhistochemische Färbung der Elastase lassen sich die PMN in den Alveolarsepten darstellen. Um nachzuweisen, dass diese PMN aktiviert sind, wurde der sich bei Aktivierung exprimierende Komplementrezeptor CR3 immunhistochemisch gefärbt. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass alle PMN in den Alveolarsepten von CF-Patienten CR3-positiv sind. Dieses Ergebnis spricht für die Annahme, dass die zahlreich vorhandenen PMN in den Alveolarsepten von CF-Patienten aktiviert sind. Die mitgeführten Negativkontrollen wiesen keine unspezifischen Färbungen auf.

CR3-Färbung von PMN in den Alveolarsepten

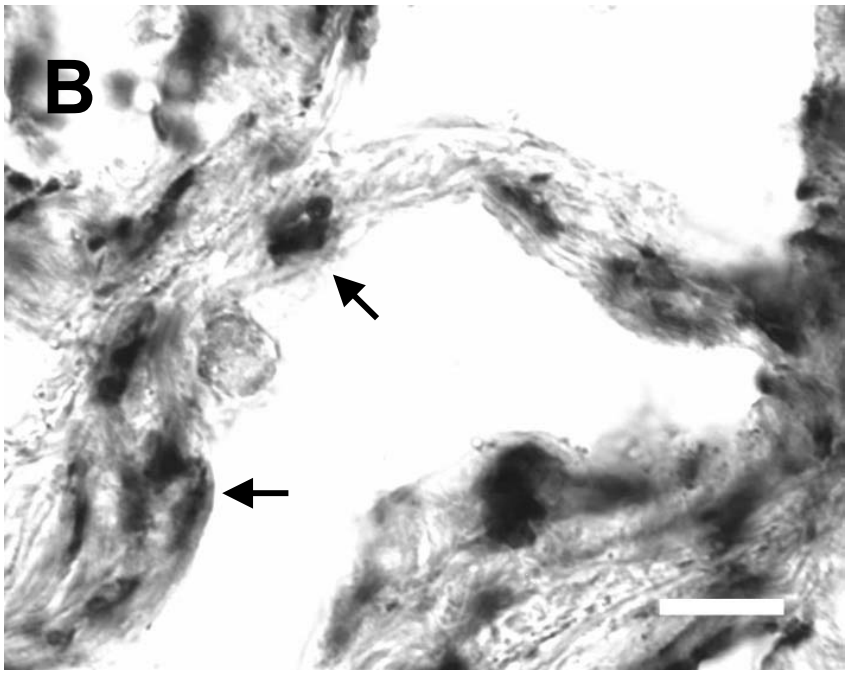

Abb. 3.6: Lichtmikroskopisches Bild von aktivierten PMN in den Alveolarsepten der Lungenperipherie eines CF Patienten nach Färbung des Komplementrezeptors CR3. Die aktivierten PMN sind dunkel angefärbt (Pfeile). Der weiße Balken entspricht 10 µm. Originalvergrößerung: 1000 x.

Elastasefärbung von PMN in den Alveolarsepten

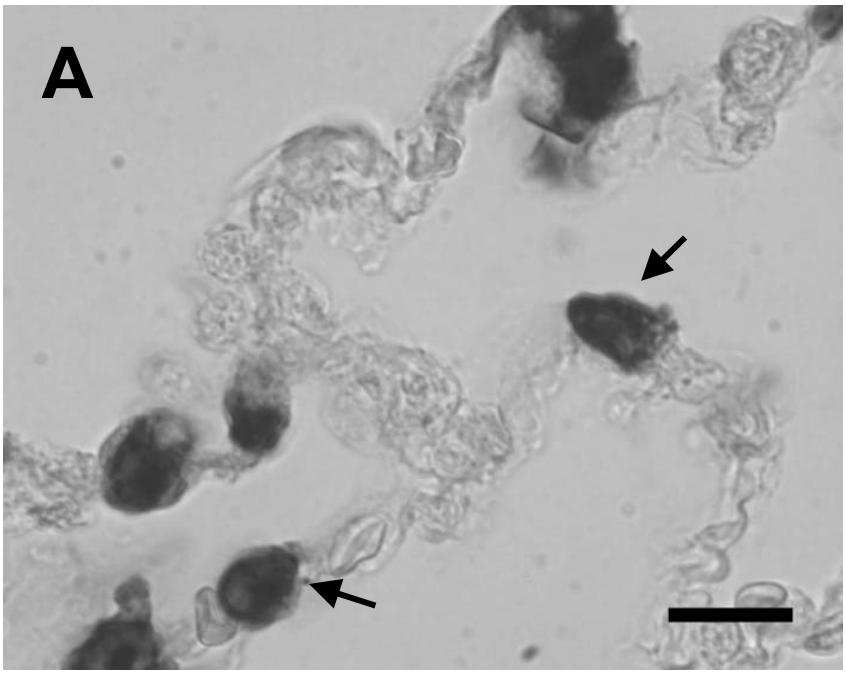

Abb. 3.5: Lichtmikroskopisches Bild von PMN in den Alveolarsepten der Lungenperiphrie eines CF Patienten nach Elastasefärbung. Die PMN sind dunkel angefärbt (Pfeile). Der schwarze Balken entspricht 10µm. Originalvergrößerung: 1000 x.

Negativkontrolle

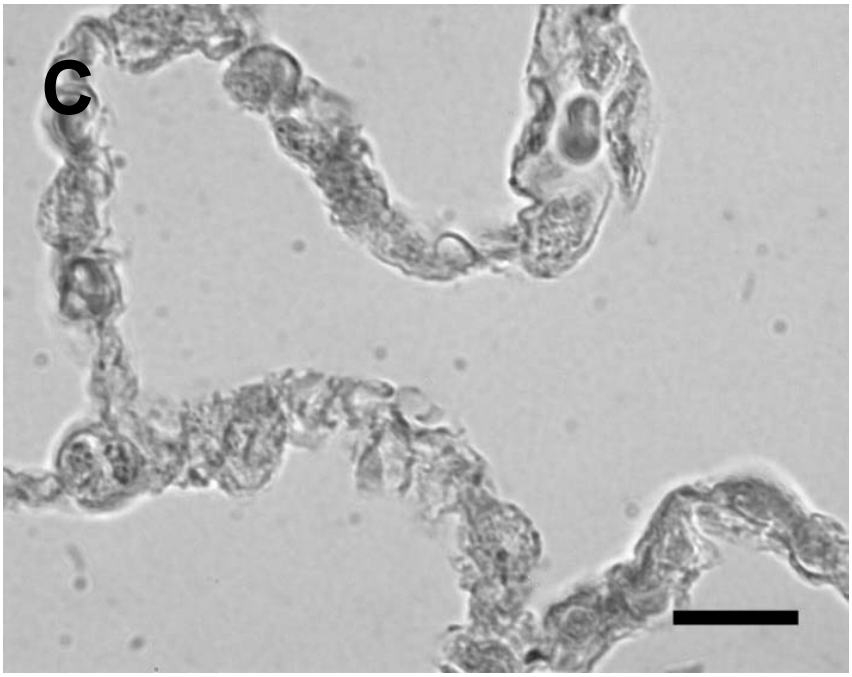

Abb. 3.7: Negativkontrolle, angefertigt ohne Aufbringen des ersten Antikörpers. Es liegen keine unspezifischen Färbungen vor. Der schwarze Balken entspricht 10 µm. Originalvergrößerung: 1000 x.

4 Diskussion

4.1 Elastinquantifizierung im peripheren Lungengewebe

Aufgrund chronischer Infektion und Entzündungsreaktion sind bei CF-Patienten strukturelle Veränderungen wie Fibrosen und Emphyseme, in der Lungenperipherie zu beobachten. Um zu untersuchen, ob diese entzündlich bedingten Umbauprozesse einen geringeren Elastingehalt in den Alveolarsepten der Lungenperipherie zur Folge haben, wurden die elastischen Fasern in den Alveolarsepten von CF- und non-CF-Lungen quantifiziert.

Es konnte kein signifikanter Unterschied des Elastingehaltes in den Alveolarsepten der Lungenperipherie zwischen CF- und non-CF-Patienten festgestellt werden. Die Ursachen hierfür liegen wahrscheinlich in der Vergleichsgruppe der non-CF-Patienten. Diese Patienten waren langjährige Raucher mit Bronchialkarzinomen und hatten ein Durchschnittsalter von 62,6 Jahren (± 11,4 Jahre). Mit zunehmendem Alter nimmt der Elastingehalt in der Lunge aufgrund einer Degeneration des Bindegewebes ab [39]. Zigarettenrauch verursacht in der Lunge einen chronischen Entzündungsreiz und ist der größte Risikofaktor bei der Entstehung von chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD) [30]. Durch oxidative Substanzen des Zigarettenrauchs, die α_1-Antitrypsin inaktivieren, entsteht zudem ein Elastase-Antielastase-Ungleichgewicht [64]. Dieses Ungleichgewicht hat einen erhöhten Abbau von Elastin zur Folge. Die Antiproteasenbarriere wird bei Rauchern zusätzlich durch Freisetzung größerer Mengen von neutrophiler Elastase überwunden [25]. Viglio et al. [74] konnte bei gesunden Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern erhöhte Werte der spezifischen Elastinabbauprodukte Desmosin und Isodesmosin im Urin nachweisen. Da bei allen Patienten Haut- und Gefäßerkrankungen ausgeschlossen wurden, handelte es sich hier vor allem um Abbauprodukte aus der Lunge. Bei Rauchern mit normaler Lungenfunktion zeigten sich mit 11,97 ± 2,75 µg/g Kreatinin erhöhte Desmosinwerte und mit 8,08 ± 1,28 µg/g Kreatinin leicht erhöhte Isodesmosinwerte. Gesunde Nichtraucher wiesen in dieser Studie Desmosinwerte von 9,31 ± 2,75 µg/g Kreatinin und Isodesmosinwerte von 7,34 ± 1,95 µg/g Kreatinin auf. Deutlich höher lagen diese

Werte bei Patienten mit exazerbierter COPD. Diese Patienten waren Raucher mit einer langjährigen Raucheranamnese (38 ± 8 Pack-years). Hier lagen die Desmosinwerte bei 17,15 ± 3,42 µg/g Kreatinin und die Isodesmosinwerte bei 13,67 ± 2,87 µg/g Kreatinin. Die Elastindegradation ist damit bei Rauchern erhöht. [30, 65].

Das deutlich höhere Durchschnittsalter der untersuchten non-CF-Patienten und die Tatsache, dass diese Raucher waren, legt einen reduzierten Elastingehalt dieser Patientenlungen nahe. Es ist daher anzunehmen, dass bei den CF-Patienten und den non-CF-Patienten ein Elastinabbau in der Lunge stattgefunden hat. Beim Vergleich der CF-Lungen mit gesunden non-CF-Lungen jüngerer Patienten, wäre mit hoher Wahrscheinlichkeit ein deutlicherer Unterschied des Elastingehaltes aufgetreten. Vor diesem Hintergrund gewinnt ein reduzierter Elastingehalt in CF-Lungen trotz fehlender Signifikanz der Ergebnisse an Relevanz.

Unterschiede im Elastingehalt zwischen den einzelnen Patienten innerhalb der Patientengruppen lassen sich bei der CF-Patientengruppe durch Altersunterschiede und den Grad der Gewebedestruktion zum Transplantationszeitpunkt erklären. Bei den non-CF-Patienten ist dies auf das Ausmaß der Gewebedestruktion zum Zeitpunkt der Tumorresektion zurückzuführen. Hierbei spielen neben dem Alter Faktoren wie Dauer und Intensität des Nikotinabusus und Ausprägung einer COPD eine Rolle [30, 74]. Die schwierige Beschaffung und sehr aufwändige Aufbereitung des Lungengewebes setzten der Auswahl Grenzen. Gesundes non-CF-Lungengewebe jüngerer Patienten war nicht zu bekommen.

Die chronische Infektion und Entzündungsreaktion und die damit verknüpften Gewebedestruktion bei CF-Patienten ist mit einem reduzierten Elastingehalt in den Alveolarsepten vereinbar. Indirekte Hinweise auf reduzierte Elastinwerte bei CF-Patienten geben Untersuchungen, die erhöhte Werte freier Elastase im Sputum oder BAL nachweisen [14, 29, 50]. CF ist charakterisiert durch einen massiven PMN-Influx in den Tracheobronchialtrakt [9]. Die neutrophile Elastase ist, wenn sie nicht durch α_1-Antitrypsin inaktiviert wird, zum Abbau von Elastin fähig. Hohe Elastasekonzentrationen in den Bronchien und Bronchioli überwinden die

Antiproteasenbarriere und bewirken zudem eine gesteigerte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen [52]. Bonfield et al. [9] konnte in der BAL von CF-Patienten erhöhte Werte von proinflammatorischen Zytokinen IL-8, IL-6, IL-1 nachweisen, das antiinflammatorische IL-10 war dabei erniedrigt. Dieses Zytokine bewirken die Chemotaxis weiterer PMN. Ein Ungleichgewicht zwischen der Elastase und den Antiproteasen ist daher für einen gesteigerten Elastinabbau in den Bronchien und Bronchioli verantwortlich [51, 74]. Der erhöhte Elastinabbau durch Verschiebung des Elastase-Antielastasegleichgewichts zu Gunsten der Elastase legt damit einen reduzierten Elastingehalt in CF-Lungen nahe. Ob dieser Mechanismus auch in der Lungenperipherie für einen Elastinabbau in den Alveolarsepten mitverantwortlich ist, ist nicht vollständig geklärt. Bei CF-Patienten ist die Anzahl der PMN in den Alveolarsepten erhöht, obwohl sich nicht in allen CF-Lungen Bakterien in den Alveolen auffinden lassen. [3, 73]. Eine Untersuchung ergab, dass die Anzahl der PMN in den Alveolarsepten von CF-Patienten im Vergleich zu non-CF-Patienten um den Faktor 3 erhöht war [73]. Diese leichte erhöhte PMN-Anzahl in den Alveolarsepten relativiert sich im Vergleich zu Bakterienkonzentrationen im Tracheobronchialtrakt mit bis zu 10^8 PMN pro Milliliter Sputum [23, 72]. Deshalb ist in den Alveolen ein Elastase-Antielastase-Ungleichgewicht und ein Elastinabbau durch freie Elastase unwahrscheinlich. Jedoch sind trotz Anwesenheit ausreichender Mengen von Antiproteasen die PMN in der Lage, in ihrer Mikroumgebung durch Degranulation der azurophilen Granula proteolytisch zu wirken und Elastin abzubauen [22]. Daher liegt es nahe, dass auch die Alveolarsepten von dem PMN induzierten Elastinabbau betroffen sind.

Der Organismus ist in der Lage, dem Elastinabbau durch Elastinneubildung und reparative Mechanismen entgegenzuwirken [26, 45, 66]. So konnte Lucey et al. [45] bei Hamstern, deren Lungen einmalig durch intratracheale Elastaseinstillation behandelt wurden, nach einer Woche einen geringeren Elastingehalt feststellen. Gleichzeitig wiesen diese Lungengewebe zu diesem Zeitpunkt emphysematös erweiterte Alveolarräume auf. Der Elastingehalt war jedoch 30 Tage nach der Elastasebehandlung wieder auf dem Anfangswert. Erhöhte Werte an Elastin-mRNA waren bereits einen Tag nach Elastasebehandlung nachweisbar.

Diese Untersuchung beweist anhand eines Tiermodells einen verstärkten Elastinwiederaufbau nach provoziertem Elastinabbau durch Elastase. Es ist davon auszugehen, dass eine gesteigerte Elastinsynthese auch in den Lungen von CF-Patienten zumindest teilweise der Gewebedestruktion entgegenwirkt. Inwieweit und wie lange der Elastinabbau dadurch kompensiert werden kann, ist jedoch nicht vollständig geklärt.

Die spezifischen Elastinabbauprodukte Desmosin und Isodesmosin sind bei CF-Patienten im Urin stark erhöht. Eine Untersuchung [74] ergab bei CF-Patienten Desmosinkonzentrationen von 23,39 ± 2,02 µg/g Kreatinin und Isodesmosinkonzentrationen von 18,14 ± 4,11 µg/g Kreatinin. Die Menge der im Urin ausgeschiedenen Elastinabbauprodukte war damit höher als bei Patienten mit exazerbierter COPD (Desmosin 17,15 ± 3,42 µg/g Kreatinin, Isodesmosin 13,67 ± 2,87 µg/g Kreatinin) und höher als bei Patienten mit α_1-Antitrypsindefekt (Desmosin 22,3 ± 7,74 µg/g Kreatinin, Isodesmosin 17,4 ± 5,58 µg/g Kreatinin). Im Vergleich zu der Kontrollgruppe gesunder Nichtraucher (Desmosin 9,31 ± 2,75 µg/g Kreatinin, Isodesmosin 7,34 ± 1,95 µg/g Kreatinin) wiesen die CF-Patienten ca. um den Faktor 2,5 erhöhte Werte auf. Aufgrund des gesteigerten Elastinabbaus und dem Ausschluss von Haut- und Gefäßerkrankungen ist ein reduzierter Elastingehalt in CF-Lungen wahrscheinlich.

Die pathophysiologischen Veränderungen in der Lunge bei CF-Patienten sind unter anderem charakterisiert durch Emphyseme in der Lungenperipherie [55]. Diese lassen sich in Tierversuchen durch intratracheale Verabreichung von Elastase provozieren [45]. Die Ursache für die Entstehung von Emphysemen wird unter anderem durch einen elastaseinduzierten Elastinabbau und einen desorganisierten Wiederaufbau der elastischen Fasern erklärt [64]. Damit sind die in CF-Lungen häufig zu beobachtenden Emphyseme ein weiterer indirekter Hinweis für einen geringeren Elastingehalt in den Alveolarsepten.

4.2 Nachweis von PMN und aktivierten PMN in der Lungenperipherie

In diesem Versuch konnte durch immunhistochemische Methoden qualitativ nachgewiesen werden, dass die PMN in den Alveolarsepten bei CF-Patienten aktiviert sind. Aufgrund ihrer Aktivierung sind sie zur Migration, Phagozytose und Gewebedestruktion fähig [5, 59]. Dies legt einen Elastinabbau in den Alveolarsepten, verursacht durch die aktivierten PMN, nahe. Als chemotaktische Wirkstoffe für PMN spielen proinflammatorische Zytokine eine bedeutende Rolle [23]. Eine auf die Präsenz aktivierter PMN zurückzuführende hohe Elastasekonzentration in den Bronchien und Bronchioli bewirkt eine gesteigerte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen [52]. In der BAL von CF-Patienten wies Bonfield et al. [9] erhöhte Konzentrationen von proinflammatorischen IL-8, IL-6, IL-1 nach. Das antiinflammatorische IL-10 war dabei erniedrigt. Eine erhöhte Konzentration von IL-8 konnte immunhistochemisch in den Alveolarsepten bei CF-Patienten nachgewiesen werden [73]. Da die Alveolen nicht bei allen CF-Lungen mit Bakterien besiedelt sind [3, 72], ist nicht vollständig geklärt, warum Il-8 in den Alveolarsepten erhöht ist.

5 Zusammenfassung

Chronische Infektionen und Entzündungsreaktionen bewirken eine Gewebedestruktion und Umbauvorgänge in der Lunge von CF-Patienten. Dies führt zu pathologischen Veränderungen wie Fibrose, Emphysem und Bronchiektasien. Obwohl nicht in allen CF-Lungen Bakterien in den Alveolen vorhanden sind, kommt es dort zu einem erhöhten PMN-Einstrom. Das Elastase-Antielastase-Ungleichgewicht in den Bronchien und Bronchioli hat vielfältige Einflüsse auf die Pathophysiologie und ist verantwortlich für einen gesteigerten Elastinabbau. Unklar ist jedoch, ob ein Elastinabbau auch in den Alveolarsepten stattfindet und ob dieser Abbau durch eine erhöhte Elastinsynthese wieder ausgeglichen werden kann. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, elastische Fasern in den Alveolarsepten von CF-Patienten im Vergleich zu einer non-CF-Kontrollgruppe zu quantifizieren und aktivierte PMN in den Alveolarsepten eines CF-Patienten nachzuweisen. Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers und eines Imaging Analyzing Systems wurde im Lungengewebe von 10 CF-Patienten und 6 non-CF-Patienten das Elastin in den Alveolarsepten quantifiziert. Die PMN in den Alveolarsepten eines CF-Patienten wurden qualitativ auf ihre Aktivierung untersucht. Es wurde ein monoklonaler Antikörper gegen den sich bei Aktivierung exprimierenden Komplementrezeptor CR3 verwendet. Der Elastingehalt in den Alveolarsepten war bei den CF-Patienten (0,558 ± 0,409 $\mu m^2/\mu m$) und den non-CF-Patienten (0,749 ± 0,345 $\mu m^2/\mu m$) nicht signifikant unterschiedlich. Es konnte qualitativ nachgewiesen werden, dass die PMN in den Alveolarsepten eines CF-Patienten aktiviert sind. Ein reduzierter Elastingehalt in den Alveolarsepten von CF-Patienten wird möglicherweise von dem durch Alter und Nikotinabusus reduzierten Elastingehalt in der Vergleichsgruppe relativiert. Die aktivierten PMN in den Alveolarsepten sind mit einer massiven Entzündungsreaktion in der Lunge von CF-Patienten vereinbar. Dies weist darauf hin, dass ein durch die aktivierten PMN induzierter Elastinabbau in den Alveolarsepten von CF-Patienten stattfindet.

6 Literaturverzeichnis

[1] Abman SH, Ogle JW, Harbeck RJ, Butler-Simon N, Hammond KB, Accurso FJ. Early bacteriologic, immunologic, and clinical courses of young infants with cystic fibrosis identified by neonatal screening. J Pediatr 1991; 119: 211-7.

[2] Balough K, McCubbin M, Weinberger M, Smits W, Ahrens R, Fick R. The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 1995; 20: 63-70.

[3] Baltimore RS, Christie CD, Smith GJ. Immunohistopathologic localization of Pseudomonas aeruginosa in lungs from patients with cystic fibrosis. Implications for the pathogenesis of progressive lung deterioration. Am Rev Respir Dis 1989; 140: 1650-61.

[4] Bauernfeind A, Bertele RM, Harms K, Horl G, Jungwirth R, Petermuller C, Przyklenk B, Weisslein-Pfister C. Qualitative and quantitative microbiological analysis of sputa of 102 patients with cystic fibrosis. Infection 1987; 15: 270-7.

[5] Berger M, Sorensen RU, Tosi MF, Dearborn DG, Döring G. Complement receptor expression on neutrophils at an inflammatory site, the Pseudomonas-infected lung in cystic fibrosis. J Clin Invest 1989; 84: 1302-13.

[6] Birrer P, McElvaney NG, Rudeberg A, Sommer CW, Liechti-Gallati S, Kraemer R, Hubbard R, Crystal RG. Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1994; 150: 207-13.

[7] Boat TF, Cheng PW. Epithelial cell dysfunction in cystic fibrosis: implications for airways disease. Acta Paediatr Scand Suppl 1989; 363: 25-9.

[8] Bonfield TL, Konstan MW, Burfeind P, Panuska JR, Hilliard JB, Berger M. Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol 1995; 13: 257-61.

[9] Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, Ghnaim H, Berger M. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. Am J Respir Crit Care Med 1995; 152: 2111-8.

[10] Boucher JC, Yu H, Mudd MH, Deretic V. Mucoid Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis: characterization of muc mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. Infect Immun 1997; 65: 3838-46.

[11] Boucher RC, Stutts MJ, Knowles MR, Cantley L, Gatzy JT. Na+ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. J Clin Invest 1986; 78: 1245-52.

[12] Breuer R, Christensen TG, Lucey EC, Bolbochan G, Stone PJ, Snider GL. Elastase causes secretory discharge in bronchi of hamsters with elastase-induced secretory cell metaplasia. Exp Lung Res 1993; 19: 273-82.

[13] Britigan BE, Hayek MB, Doebbeling BN, Fick RB, Jr. Transferrin and lactoferrin undergo proteolytic cleavage in the Pseudomonas aeruginosa-infected lungs of patients with cystic fibrosis. Infect Immun 1993; 61: 5049-55.

[14] Bruce MC, Poncz L, Klinger JD, Stern RC, Tomashefski JF, Jr., Dearborn DG. Biochemical and pathologic evidence for proteolytic destruction of lung connective tissue in cystic fibrosis. Am Rev Respir Dis 1985; 132: 529-35.

[15] Cabral DA, Loh BA, Speert DP. Mucoid Pseudomonas aeruginosa resists nonopsonic phagocytosis by human neutrophils and macrophages. Pediatr Res 1987; 22: 429-31.

[16] Campbell EJ, Campbell MA, Owen CA. Bioactive proteinase 3 on the cell surface of human neutrophils: quantification, catalytic activity, and susceptibility to inhibition. J Immunol 2000; 165: 3366-74.

[17] Cantin A, Bilodeau G, Begin R. Granulocyte elastase-mediated proteolysis of alpha 1-antitrypsin in cystic fibrosis bronchopulmonary secretions. Pediatr Pulmonol 1989; 7: 12-7.

[18] Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry 2001, Annual Report; Bethesda, Maryland. September 2002.

[19] Davis PB, di Sant'Agnese PA. Diagnosis and treatment of cystic fibrosis. An update. Chest 1984; 85: 802-9.

[20] Davis PB, Drumm M, Konstan MW. Cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1996; 154: 1229-56.

[21] Döring G. Cystic fibrosis respiratory infections: interactions between bacteria and host defence. Monaldi Arch Chest Dis 1997; 52: 363-6.

[22] Döring G. Serine proteinase inhibitor therapy in alpha(1)-antitrypsin inhibitor deficiency and cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 1999; 28: 363-75.

[23] Döring G, Bellon G, Knight R. Immunology of cystic fibrosis. In: Hodson ME, Geddes D (eds). Cystic fibrosis. London 2000; Arnold, p. 109-140.

[24] Döring G, Goldstein W, Botzenhart K, Kharazmi A, Schiotz PO, Hoiby N, Dasgupta M. Elastase from polymorphonuclear leucocytes: a regulatory enzyme in immune complex disease. Clin Exp Immunol 1986; 64: 597-605.

[25] Ferlinz R. Pneumonologie in Praxis und Klinik. Thieme-Verlag, Stuttgart, New York 1994.

[26] Foster JA, Rich CB, Miller MF. Pulmonary fibroblasts: an in vitro model of emphysema. Regulation of elastin gene expression. J Biol Chem 1990; 265: 15544-9.

[27] Gemsa D, Kalden JR, Resch K. Immunologie, Grundlagen-Klinik-Praxis. Thieme-Verlag, Stuttgart, New York 1991.

[28] Gilligan PH. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 1991; 4: 35-51.

[29] Goldstein W, Döring G. Lysosomal enzymes from polymorphonuclear leukocytes and proteinase inhibitors in patients with cystic fibrosis. Am Rev Respir Dis 1986; 134: 49-56.

[30] Gottlieb DJ, Stone PJ, Sparrow D, Gale ME, Weiss ST, Snider GL, O'Connor GT. Urinary desmosine excretion in smokers with and without rapid decline of lung function: the Normative Aging Study. Am J Respir Crit Care Med 1996; 154: 1290-5.

[31] Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia. Microbiol Rev 1996; 60: 539-74.

[32] Greiling H, Gressner AM. Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie. Schattauer-Verlag, Stuttgart, New York 1995.

[33] Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann UH. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 2000.

[34] Janeway CA, Travers P. Immunologie. Spektrum-Verlag, Heidelberg, Berlin 1997.

[35] Jany B, Gallup M, Tsuda T, Basbaum C. Mucin gene expression in rat airways following infection and irritation. Biochem Biophys Res Commun 1991; 181: 1-8.

[36] Junqueira LC, Carneiro J, Schiebler TH. Histologie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1996.

[37] Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 1989; 245: 1073-80.

[38] Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1995; 151: 1075-82.

[39] Konietzko N, Wendel H, Wiesner B. Erkrankungen der Lunge. Walter de Gruyter-Verlag, Berlin, New York 1995.

[40] Konstan MW, Berger M. Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology. Pediatr Pulmonol 1997; 24: 137-42; discussion 59-61.

[41] Konstan MW, Walenga RW, Hilliard KA, Hilliard JB. Leukotriene B4 markedly elevated in the epithelial lining fluid of patients with cystic fibrosis. Am Rev Respir Dis 1993; 148: 896-901.

[42] Lam J, Chan R, Lam K, Costerton JW. Production of mucoid microcolonies by Pseudomonas aeruginosa within infected lungs in cystic fibrosis. Infect Immun 1980; 28: 546-56.

[43] Liou TG, Campbell EJ. Quantum proteolysis resulting from release of single granules by human neutrophils: a novel, nonoxidative mechanism of extracellular proteolytic activity. J Immunol 1996; 157: 2624-31.

[44] Löffler G, Petrides PE. Biochemie und Pathochemie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1998.

[45] Lucey EC, Goldstein RH, Stone PJ, Snider GL. Remodeling of alveolar walls after elastase treatment of hamsters. Results of elastin and collagen mRNA in situ hybridization. Am J Respir Crit Care Med 1998; 158: 555-64.

[46] Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzy JT, Davis CW, Boucher RC. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. Cell 1998; 95: 1005-15.

[47] Mearns MB, Hunt GH, Rushworth R. Bacterial flora of respiratory tract in patients with cystic fibrosis, 1950-71. Arch Dis Child 1972; 47: 902-7.

[48] Meyer KC, Lewandoski JR, Zimmerman JJ, Nunley D, Calhoun WJ, Dopico GA. Human neutrophil elastase and elastase/alpha 1-antiprotease complex in cystic fibrosis. Comparison with interstitial lung disease and evaluation of the effect of intravenously administered antibiotic therapy. Am Rev Respir Dis 1991; 144: 580-5.

[49] Meyer KC, Sharma A. Regional variability of lung inflammation in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1997; 156: 1536-40.

[50] Meyer KC, Zimmerman J. Neutrophil mediators, Pseudomonas, and pulmonary dysfunction in cystic fibrosis. J Lab Clin Med 1993; 121: 654-61.

[51] Morris SM, Stone PJ, Snider GL. Electron microscopic study of human lung tissue after in vitro exposure to elastase. J Histochem Cytochem 1993; 41: 851-66.

[52] Nakamura H, Yoshimura K, McElvaney NG, Crystal RG. Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. J Clin Invest 1992; 89: 1478-84.

[53] Ostendorf PC, Seeber S. Hämatologie Onkologie. Urban & Schwarzenberg-Verlag, München, Wien, Baltimore 1997.

[54] Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. Lancet 2003; 361: 681-9.

[55] Riede UN, Schaefer HE. Allgemeine und spezielle Pathologie. Thieme-Verlag, Stuttgart, New York 1995.

[56] Rieger C, von der Hardt H, Sennhauser FH, Wahn U, Zach MH. Pädiatrische Pneumonologie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1999.

[57] Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 1989; 245: 1066-73.

[58] Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. Science 1989; 245: 1059-65.

[59] Ross GD, Vetvicka V. CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. Clin Exp Immunol 1993; 92: 181-4.

[60] Schuster A, Ueki I, Nadel JA. Neutrophil elastase stimulates tracheal submucosal gland secretion that is inhibited by ICI 200,355. Am J Physiol 1992; 262: L86-91.

[61] Siegenthaler W. Klinische Pathophysiologie. Thieme-Verlag, Stuttgart, New York 2001.

[62] Smallman LA, Hill SL, Stockley RA. Reduction of ciliary beat frequency in vitro by sputum from patients with bronchiectasis: a serine proteinase effect. Thorax 1984; 39: 663-7.

[63] Snider GL. Clinical relevance summary: Collagen vs elastin in pathogenesis of emphysema; cellular origin of elastases; bronchiolitis vs emphysema as a cause of airflow obstruction. Chest 2000; 117: 244S-6S.

[64] Snider GL. Emphysema: the first two centuries--and beyond. A historical overview, with suggestions for future research: Part 2. Am Rev Respir Dis 1992; 146: 1615-22.

[65] Snider GL, Ciccolella DE, Morris SM, Stone PJ, Lucey EC. Putative role of neutrophil elastase in the pathogenesis of emphysema. Ann N Y Acad Sci 1991; 624: 45-59.

[66] Stone PJ, Morris SM, Thomas KM, Schuhwerk K, Mitchelson A. Repair of elastase-digested elastic fibers in acellular matrices by replating with neonatal rat-lung lipid interstitial fibroblasts or other elastogenic cell types. Am J Respir Cell Mol Biol 1997; 17: 289-301.

[67] Suter S, Schaad UB, Morgenthaler JJ, Chevallier I, Schnebli HP. Fibronectin-cleaving activity in bronchial secretions of patients with cystic fibrosis. J Infect Dis 1988; 158: 89-100.

[68] Thomas EL, Lehrer RI, Rest RF. Human neutrophil antimicrobial activity. Rev Infect Dis 1988; 10 Suppl 2: S450-6.

[69] Tilly BC, Winter MC, Ostedgaard LS, O'Riordan C, Smith AE, Welsh MJ. Cyclic AMP-dependent protein kinase activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels in planar lipid bilayers. J Biol Chem 1992; 267: 9470-3.

[70] Tosi MF, Zakem H, Berger M. Neutrophil elastase cleaves C3bi on opsonized pseudomonas as well as CR1 on neutrophils to create a functionally important opsonin receptor mismatch. J Clin Invest 1990; 86: 300-8.

[71] Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW, Eiberg H, Mohr J, Kennedy D, Plavsic N, et al. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. Science 1985; 230: 1054-7.

[72] Ulrich M. Unveröffentliche Befunde.

[73] Ulrich M, Worlitzsch D, Greiner S, Ruprecht J, Shute J, Friedel G, Botzenhart K, Döring G. Elastin degredation and collagen replacement in alveolar septa of CF patients. Pediatric Pulmonology, Supplement 22, 2001.

[74] Viglio S, Iadarola P, Lupi A, Trisolini R, Tinelli C, Balbi B, Grassi V, Worlitzsch D, Döring G, Meloni F, Meyer KC, Dowson L, Hill SL, Stockley RA, Luisetti M. MEKC of desmosine and isodesmosine in urine of chronic destructive lung disease patients. Eur Respir J 2000; 15: 1039-45.

[75] Vogelmeier C, Hubbard RC, Fells GA, Schnebli HP, Thompson RC, Fritz H, Crystal RG. Anti-neutrophil elastase defense of the normal human respiratory epithelial surface provided by the secretory leukoprotease inhibitor. J Clin Invest 1991; 87: 482-8.

[76] Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. N Engl J Med 1989; 320: 365-76.

[77] Wood RE, Wanner A, Hirsch J, Farrell PM. Tracheal mucociliary transport in patients with cystic fibrosis and its stimulation by terbutaline. Am Rev Respir Dis 1975; 111: 733-8.

[78] Woods DE, Straus DC, Johanson WG, Jr., Bass JA. Role of fibronectin in the prevention of adherence of Pseudomonas aeruginosa to buccal cells. J Infect Dis 1981; 143: 784-90.

[79] Worliztsch D, Ulrich M, Viglio S, Iadorola P, Luisetti M, Schuster A, Meyer K, Ratjen F, Botzenhart K, Döring G. Elastin degredation in the airways of patients with cystic fibrosis decrease with age. Pediatric Pulmonology 2001; 32 (S.22): 268-269.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Döring für die Themenstellung und Ermöglichung der Ausführung dieser Arbeit, sowie für die wiederholten Anregungen und Denkanstöße.

Herzlichen Dank an Dr. D. Worlitzsch und Dr. M. Ullrich für die ausgezeichnete Betreuung und ihre Geduld und Hilfsbereitschaft während der Durchführung dieser Arbeit.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene möchte ich mich für ein angenehmes Arbeitsklima bedanken.

Danken möchte ich außerdem Herrn Wittenberg und Frau Bachmann vom Institut für Pathologie Tübingen für die Kooperation und technische Unterstützung bei der Präparatherstellung.

Weiterhin möchte ich meiner Familie danken, ohne die mein Studium nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Name:	Jan Philipp Ruprecht
Geboren:	23.08.76 in Stuttgart
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Bildungsweg

Johann-Bruecker-Grundschule Schönaich
1983 – 1987

Max-Planck-Gymnasium Böblingen
1987 – 1996

Abitur
27.06.1996

Zivildienst: Verein für Körperbehinderte Sindelfingen
1.7.1996 – 31.7.1997

Studium der Zahnmedizin in Tübingen:
ab Wintersemester 1997

Zahnärztliche Prüfung
19.11.2002

Approbation als Zahnarzt
6.12.2002