

**Mechanismen eines veränderten Wachstumsverhaltens
von Lungenfibroblasten bei Patienten mit Emphysem –
Hinweise auf einen seneszenten Phänotyp**

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
des Fachbereichs Umweltwissenschaften
der Universität Lüneburg

vorgelegt von

Diplom-Umweltwissenschaftler
Kai-Christian Müller

aus Hamburg

Lüneburg
im Januar 2006

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom 07.04.2003 bis 16.01.2006 unter der Betreuung von Prof. Dr. Ing. Wolfgang Ruck, Universität Lüneburg, Fachbereich Umweltwissenschaften, Institut für Ökologie und Umweltchemie, Abteilung Umweltchemie, Scharnhorststraße 1, 21335 Lüneburg, angefertigt.

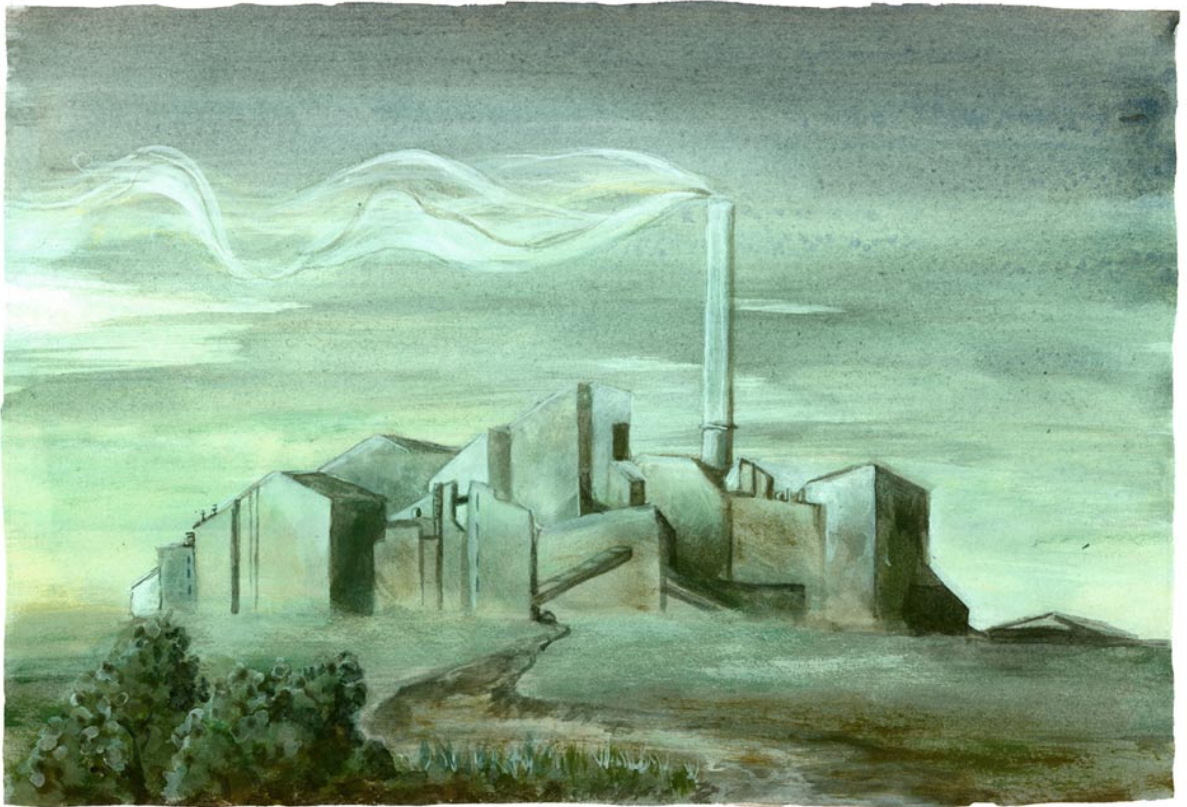
Die praktischen Arbeiten wurden am Krankenhaus Großhansdorf, Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie, Wöhrendamm 80, 22927 Großhansdorf (Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. Helgo Magnussen) im zellbiologischen Forschungslabor unter Betreuung durch Dipl. Ing. Olaf Holz und Dr. rer. nat. Rudolf A. Jörres, ferner am Fraunhofer Institut für Experimentelle Medizin und Toxikologie, Abteilung für klinische Allergie-, Asthma- und Inhalationsforschung, Nikolai-Fuchs-Str. 1a, 30625 Hannover unter Betreuung durch Dr. med. Veit J. Erpenbeck PhD, Prof. Dr. med. Norbert Krug und Prof. Dr. med. Jens M. Hohlfeld, sowie in der PCR-Abteilung (Dr. Pahl und Dr. Tewes) der Gemeinschaftspraxis für Labormedizin Dr. Kramer und Kollegen, Lauenburger Str. 65–67, 21502 Geesthacht, durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liegen publiziert vor bzw. wurden zur Publikation angenommen:

Holz O, Zühlke I, Jaksztat E, Müller KC, Welker L, Nakashima M, Diemel KD, Branscheid D, Magnussen H, Jörres RA. Lung fibroblasts from patients with emphysema show a reduced proliferation rate in culture. *Eur Respir J* 2004; 24: 575-579.

Müller K-C, Welker L, Paasch K, Feindt B, Erpenbeck VJ, Hohlfeld JM, Krug N, Nakashima M, Branscheid D, Magnussen H, Jörres RA, Holz O. Lung fibroblasts from patients with emphysema show markers of senescence *in vitro*. *Respiratory Research*, *in press*, angenommen zur Publikation am 17.01.2006.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ing. W. Ruck, Universität Lüneburg, Fachbereich Umweltwissenschaften, Institut für Ökologie und Umweltchemie, Abteilung Umweltchemie, Scharnhorststr. 1, 21335 Lüneburg
2. Gutachter: Prof. Dr. med. H. Magnussen, Krankenhaus Großhansdorf, Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie, Lehrstuhl für Innere Medizin-Pneumologie, Schleswig-Holstein Universität, Campus Lübeck, Wöhrendamm 80, 22927 Großhansdorf



Umseitige Abbildung:

Smoking - Industry
2006

Illustration: Maria Leinweber
Konzept: Kai-Christian Müller

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	viii
Tabellenverzeichnis:	x
Abbildungsverzeichnis	x
1. Einleitung	1
1.1 Mensch und Umwelt	1
1.2 Chronisch-obstruktive Bronchitis und Lungenemphysem (COPD)	2
1.2.1 Chronische Bronchitis	3
1.2.2 Lungenemphysem	3
2. Stand der Wissenschaft	4
2.1 Risikofaktoren für die Entwicklung einer COPD	4
2.1.1 Umweltbezogene Risikofaktoren	4
2.1.2 individuelle Risikofaktoren	5
2.2 Verbreitung der Noxe und Bedeutung der COPD – gegenwärtig und prognostiziert	5
2.2.1 Rauchen von Tabakprodukten	5
2.2.2 Bedeutung der COPD – global	6
2.2.3 Bedeutung der COPD – Abhängigkeit vom Geschlecht	6
2.2.4 Bedeutung der COPD – Deutschland	6
2.3 Hypothesen zur Entstehung eines Emphysems	7
2.3.1 Alpha1-Antitrypsinmangel oder Protease-Antiprotease-Imbalance	7
2.3.2 Rauchinduziertes Emphysem	8
2.3.3 Reaktive Sauerstoffspezies	8
2.3.4 Einfluß der Zellen der Lunge	8
2.3.4.1 Makrophagen	9
2.3.4.2 T-Zellen	9
2.3.4.3 Neutrophile	9
2.3.4.4 Eosinophile	10
2.3.4.5 Epithel- und Endothelzellen	10
2.3.4.6 Fibroblasten	10
3. Problemstellung	12
4. Eigene Arbeiten	14
4.1 Gesamtkollektiv der Patienten	14
4.1.1 Methode der Patientencharakterisierung	14
4.1.2 Ergebnisse der Patientencharakterisierung	14
4.2 Methode der Gewebegewinnung und der Fibroblastenkultur	15
4.2.1 Probenahme	15
4.2.2 Primärkultur	16
4.2.3 Passage der Zellen	16
4.3 Immunzytochemie - Zelldifferenzierung, Apoptose und Nekrose	17
4.3.1 Methode der Immunzytochemie	17
4.3.2 Ergebnisse der Immunzytochemie	17
4.4 Basales Wachstum	19
4.4.1 Wachstumskurven und Verdopplungszeit der Lungenfibroblasten in Passage 2	19
4.4.1.1 Methode	19
4.4.1.2 Ergebnisse	20
4.4.2 Einfluß der Kryokonservierung	20
4.4.2.1 Methode	20
4.4.2.2 Ergebnisse	20
4.4.3 Langzeitwachstum der Lungenfibroblasten	21
4.4.3.1 Methode	21
4.4.3.2 Ergebnisse	21

4.5	Alterungsmarker	23
4.5.1	Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase	23
4.5.1.1	Methode	23
4.5.1.2	Ergebnisse	23
4.5.2	Telomerenlänge	26
4.5.2.1	Methode	26
4.5.2.2	Ergebnisse	27
4.6	Genexpression	28
4.6.1	cDNA-Mikroarray	29
4.6.1.1	Methode	29
4.6.1.2	Ergebnisse	29
4.6.2	qPCR	30
4.6.2.1	RNA-Ernte	30
4.6.2.2	RNA-Isolation	30
4.6.2.3	Reverse Transkription der mRNA zu cDNA	31
4.6.2.4	Primerdesign	31
4.6.2.5	Amplifikation	32
4.6.2.6	Qualitätskontrolle der Primer - Schmelzkurven	33
4.6.2.7	Herstellung der Kalibrationsreihen (Standardreihen)	33
4.6.2.8	Ergebnisse: Genexpressionsdaten aus der qPCR	34
4.7	Proteinexpression – ELISA für sezerniertes IGFBP-3	36
4.7.1	Gesamtproteinbestimmung	36
4.7.2	ELISA für IGFBP-3	36
4.7.2.1	Methode	36
4.7.2.2	Ergebnisse	37
4.8	Unabhängigkeit der Untersuchungsergebnisse vom biologischen Alter	37
4.9	Statistik	38
5.	Diskussion	38
5.1	Wachstum	39
5.1.1	Basale Wachstumsgeschwindigkeit	40
5.1.2	Zelldifferenzierung	43
5.1.3	Kryokonservierung	44
5.1.4	Langzeitwachstum	44
5.2	Seneszenz	45
5.2.1	Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase	47
5.2.2	Telomerenlängen	48
5.3	Bedeutung der Genexpression	50
5.3.1	DNA-Ebene	51
5.3.2	mRNA-Ebene	51
5.3.3	Protein-Ebene	52
5.4	Verfahren zur Quantifizierung der Genexpression	52
5.4.1	cDNA-Mikroarrays	53
5.4.2	qPCR	54
5.5	Informationen zu den untersuchten Genen	55
5.5.1	Insulin-like growth factor-binding proteins und die Insulin/IGF-Familie	55
5.5.2	LOXL2	58
5.5.3	Ornithin-Decarboxylase-Antizym 1	58
5.5.4	CDK4	59
5.5.5	FOS-like antigen 1	59
5.5.6	Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den Befunden der mittels zweier Methoden erfassten Genexpression	60
5.6	Sezerniertes IGFBP-3	62
5.7	Schlußfolgerungen	62
5.8	Ausblick	63
5.8.1	Implikationen der Befunde in Hinsicht auf COPD als systemische Erkrankung	63
5.8.2	Implikationen für Interventionsversuche als Therapie des Emphysems	64
5.8.3	Stammzellen	66
5.8.4	Interaktion von Fibroblasten und anderen Lungenzellen	66
6.	Zusammenfassung	68

7.	Literatur	71
8.	Anhang	85
8.1	Charakteristika der Teilkollektive der Patienten	85
8.2	Steriles Arbeiten	90
8.3	Abbildungen zur qPCR	91
9.	Erklärung	93
10.	Danksagung	94

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AP	alkalische Phosphatase
BBodSchG	Bundes-Bodenschutzgesetz
BImSchG	Bundes-Immissionsschutzgesetz
BMI	<i>body mass index</i> ; BMI = Körpergewicht [kg] / Körperlänge ² [m]
bp	Basenpaare, <i>base pairs</i>
C	Cytidin
cDNA	komplementäre DNA, <i>complementary DNA</i>
CDK	Zyclin-abhängige Kinase, <i>cyclin-dependent kinase</i>
CSE	Zigarettenrauchextrakt, <i>cigarette smoke extract</i>
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser, <i>aqua bidest.</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyllindol-dihydrochlorid
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>desoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat; Nukleotide A,C,G, PCR:T bzw. RT:U/T
Da	atomare Massen, u, 1/12 der Masse des ¹² C-Nuklides, 1,6605655x10 ⁻²⁷ kg
DMSO	Dimethylsulfoxid [(CH ₃) ₂ SO]
EGF	Epidermis-Wachstumsfaktor, <i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FCS	fötale Kälberserum, <i>fetal calf serum</i>
FEV ₁	forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde
g	Erdbeschleunigung
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GOLD	<i>Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease</i>
HUGO	<i>Human Genome Organisation</i>
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor; <i>insulin-like growth factor</i>
IGFBP	IGF-bindendes Protein, <i>IGF-binding protein</i>
IL	Interleukin
ITGV	intrathorakales Gasvolumen
J	Jahre
kb	1000 Basen
kbp	1000 Basenpaare; <i>kilo base pairs</i>
kDa	Kilodalton; 1000 Da
KrW-/AbfG	Kreislaufwirtschafts- und Abfallgesetz
mRNA	Botenribonukleinsäure, <i>messenger ribonucleic acid</i>
PBS	Phosphatpuffer, <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
py	20 Zigaretten/Tag über 1 Jahr; <i>pack year</i>
qPCR	quantifizierende PCR

RNA	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies, <i>reactiv oxygen species</i>
RPM	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkriptase bzw. reverse Transkription, <i>reverse transcriptase/ reverse transcription</i>
RV	Residualvolumen
SA-beta-Gal	Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase
SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>sodium dodecyl sulfate</i> ; $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}$
SMA	Protein der glatten Muskulatur, <i>smooth muscle actin</i>
SSC	Natriumchlorid-Natriumzitat-Puffer, <i>saline socium citrate</i>
T	Thymidin
Taq	<i>thermophilus aquaticus</i>
TBS	Trispuffer, <i>Tris-buffered saline</i>
TGF	Tumorwachstumsfaktor, <i>tumor growth factor</i>
TLK	totale Lungenkapazität
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol; $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$;
U	Uracil
WHG	Wasserhaushaltsgesetz
VK	Vitalkapazität

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Charakteristik des Gesamtkollektives der Patienten	15
Tabelle 2: Verdopplungszeiten der Lungenfibroblasten	19
Tabelle 3: Mastermix für die qPCR	31
Tabelle 4: Primersequenzen und Amplifikatgrößen	32
Tabelle 5: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse	35
Tabelle 6: Patientencharakteristika der Teilkollektive der Untersuchungen der Zelldifferenzierung (inkl. Apoptose und Nekrose), des Einflusses der Kryokonservierung und des sezernierten Proteins	85
Tabelle 7: Patientencharakteristik des Teilkollektives der Untersuchung des Langzeitwachstums der Lungenfibroblasten	86
Tabelle 8: Patientencharakteristik des Teilkollektives der Untersuchung der Seneszenz-assoziierten beta-Galaktosidase	87
Tabelle 9: Patientencharakteristik des Teilkollektives der Untersuchung der Telomerenlänge	88
Tabelle 10: Patientencharakteristik des Teilkollektives der Genexpressionsuntersuchung (12K-cDNA-Array)	89
Tabelle 11: Patientencharakteristik des Teilkollektives der Genexpressionsuntersuchung (qPCR)	90

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Emphysembulla	3
Abbildung 2: Zytodifferenzierung – Beispiele der Immunfärbungen	18
Abbildung 3: Langzeitwachstum	22
Abbildung 4: Färbung für Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase	24
Abbildung 5: Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase – zeitlicher Verlauf	24
Abbildung 6: Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase – Vergleich der Gruppen	25
Abbildung 7: Telomere I - Southern blot	27
Abbildung 8: Telomere II – Längenverteilung	28
Abbildung 9: Genexpressionsdaten für IGFBP-3 und IGFBP-rP1	35
Abbildung 10: qPCR - Schmelzkurve	91
Abbildung 11: qPCR - Amplifikation einer Standardreihe	91
Abbildung 11: qPCR – Doppelbestimmung einer Standardreihe	92

1. Einleitung

1.1 Mensch und Umwelt

Das Bestreben nach einer Begrenzung der Belastung der Umwelt mit Schadstoffen ist zum Teil seit Jahrzehnten in der nationalen Gesetzgebung verankert (z.B. BImSchG, WHG, KrW-/AbfG, BBodSchG). Eine der maßgeblichen Zielsetzungen des Umweltschutzes durch den Gesetzgeber war und ist dabei der Schutz der menschlichen Gesundheit vor Schaden (z.B. „Zweck dieses Gesetzes ist, Menschen,... vor schädlichen Umwelteinwirkungen,..., Gefahren, erheblichen Nachteilen und erheblichen Belästigungen,..., zu schützen...“ §1BImSchG (Der Bundesminister für Umwelt Naturschutz und Reaktorsicherheit 2005)).

Bei der Identifikation der Schadstoffe, denen der Mensch ausgesetzt ist, finden immer sensitivere Messverfahren Verwendung, um selbst versteckte Gefahren (z.B. in Möbeln, Lebens- und Genussmitteln) für die menschliche Gesundheit zu lokalisieren und zu eliminieren. Diesem intensiven Bemühen um Schadensminimierung steht die weitgehende Duldung einer offensichtlichen Schadstoffquelle mit großer Verbreitung - dem Rauch von Zigaretten und anderen Tabakprodukten – gegenüber. Besonders problematisch wird die Sachlage dadurch, dass sowohl einer passiven Zigarettenrauchexposition als auch dem aktiven Rauchen ein erhebliches Schadpotential für die Gesundheit des Menschen innewohnt. Viele Menschen setzen sich bewusst und wiederholt dieser gesundheitsschädigenden Noxe aus und in der Tat muss das Passivrauchen inzwischen als hauptsächliche Quelle der (partikulären) Luftverschmutzung gelten, der der Mensch zumindest im Innenraum ausgesetzt ist. Aus diesem Grunde ist es gerechtfertigt, Zigarettenrauch als Umweltproblem zu behandeln. Dies gilt auch insofern, als das durch Zigarettenrauchen hervorgerufene Krankheitsbild der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung, welches Gegenstand dieser Arbeit ist, in anderen Ländern häufig durch eine starke Belastung der Umwelt bzw. des Innenraums mit Schadstoffen hervorgerufen wird. Beispielsweise führt die Verwendung offener Feuer im Innenraum, die in Ländern wie Indien oder China nicht selten zum Kochen verwendet werden, zu teils extrem hohen Schadstoffbelastungen, deren Folgen denen des Zigarettenrauchens vergleichbar sind.

Zigarettenrauch ist ein komplexes Schadstoffgemisch. Man geht von über 4800 Komponenten aus, die während der unvollständigen Verbrennung des Tabaks beim Rauchen entstehen; 70 von ihnen sind krebserregend oder stehen im Verdacht, krebserregend zu sein (z.B. Benzol, Benz[a]pyren, Formaldehyd, Dioxin) (Deutsches Krebsforschungszentrum (Hrsg.) 2005; Huber et al. 1991; U.S. Environmental Protection Agency 1992). In Innenräumen stellen die Bestandteile des Tabakrauches eine kontinuierliche Exposition gegenüber Schadstoffen dar, da sie aufgrund der geringen Partikelgröße eine hinreichende Verweildauer besitzen. Ferner lagern sich beispielsweise Tabakfeinstaubpartikel an Wänden, Decken, Böden und Gegenständen ab und können u.U. von dort wieder freigesetzt werden (Deutsches Krebsforschungszentrum (Hrsg.) 2005).

Die Lunge des Menschen ist eines der Organe, das notwendigerweise auf den Austausch mit der Umwelt angelegt ist. Aufgrund ihrer physiologischen Funktion, die in dem Austausch der Atemgase Sauerstoff und Kohlendioxid besteht, ist sie der Umwelt direkt ex-

poniert, so dass eine Zigarettenrauchexposition insbesondere dieses Organ betrifft. Die Lunge weist eine alveoläre Oberfläche von 70-80 m² auf (Tammeling und Quanjer 1980), eine Fläche, die durch den Bedarf nach Gasaustausch erfordert wird. Der Aufbau der Lunge ist dadurch gekennzeichnet, dass sich die Gewebestärke am Ende eines komplex verästelten Bronchialbaumes bis auf eine sehr dünne Schicht reduziert, die als Grenze zwischen den Kompartimenten Luft und Blut fungiert, zugleich jedoch dem Gasaustausch so wenig Widerstand wie möglich entgegensetzt und ein umfängliches, filigranes Netzwerk aus Blutgefäßen und Lufträumen aufrechterhält (Weibel et al. 1976). Das immer feiner werdende Netzwerk der Atemwege (Trachea, Bronchien, Bronchiolen, Bronchioli respiratorii, Alveolen) bietet allerdings im Zusammenspiel mit der abnehmenden Strömungsgeschwindigkeit in den peripheren Bereichen der Lunge die Möglichkeit, dass sich Partikel und gasförmige Schadstoffe ablagern, aufgenommen werden und mit dem Gewebe der Lunge interagieren. Die Selbstreinigungsfunktion (Tammeling und Quanjer 1980) mittels Mukusproduktion und Transport des Mukus durch Flimmerepithelien dient dazu, Schadstoffe und Partikel aus der Lunge zu entfernen. Da diese Reinigungsfunktion durch Zigarettenrauch massiv beeinträchtigt werden kann (Wanner 1977), ist die Lunge dem Risiko ausgesetzt, durch Noxen oder Partikel der Luft im Sinne einer sich selbst verstärkenden Reaktion geschädigt zu werden. Im Falle des Zigarettenrauches wird die Schädigung insbesondere durch den Anteil an Oxidantien und anderen reaktiven Verbindungen hervorgerufen (Jörres und Magnussen 1997).

Ausgehend von der Beobachtung, dass weltweit viele Millionen von Menschen wiederholt und langjährig dieser Noxe, sei es aktiv, sei es passiv, ausgesetzt sind, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit einer wesentlichen Folgeerkrankung des Zigarettenrauchens, der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD). Sie versucht dabei unter Anwendung zell- und molekularbiologischer Methoden, experimentelle Daten unter dem Gesichtspunkt eines integrativen Konzepts der Gen-Umwelt-Interaktion zu gewinnen, das für das Verständnis auch anderer Interaktionen zwischen Umwelt bzw. Umweltschadstoffen und Organismen von fundamentaler Bedeutung ist.

1.2 Chronisch-obstruktive Bronchitis und Lungenemphysem (COPD)

Die *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD) definiert die COPD in ihren Leitlinien als einen "...Krankheitszustand, der durch eine Limitierung des Luftstroms {durch die Atemwege} gekennzeichnet ist, die nicht vollständig reversibel ist. Diese Luftstromlimitierung ist normalerweise progressiv und mit einer veränderten entzündlichen Antwort der Lungen auf toxische Partikel oder Gase assoziiert..." (GOLD 2005). Diese Definition der COPD beschreibt die Krankheit allerdings nur phänomenologisch und nimmt nicht Bezug auf alle Eigenarten der Erkrankung, insbesondere ihre zwei grundlegenden und verschiedenen Ausprägungen „chronische Bronchitis“ und „Lungenemphysem“.

Die COPD erreicht meist zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr der Patienten eine Schwere ihrer Symptome (Atemnot, geringe Belastbarkeit, Husten, Auswurf (GOLD 2005)), die zur Konsultation eines Arztes führt (Hansel und Barnes 2004). Oftmals sind die Symptome und funktionellen Einschränkungen des Patienten selbst dem Hausarzt über lange Zeit unbekannt (Welte et al. 2000). Daher lässt sich die Prävalenz der Erkrankung, insbesondere der Krankheitsstadien mit leichtgradigen Symptomen, in der Bevölkerung nicht mit Sicherheit angeben; sie wird vermutlich unterschätzt.

1.2.1 Chronische Bronchitis

Die chronische oder die chronisch-obstruktive Bronchitis weisen als Hauptcharakteristikum eine chronische Entzündung der großen, zentralen Atemwege auf. Diese Veränderungen gehen mit erhöhter Schleimproduktion und vermehrtem Hustenreiz einher (Hansel und Barnes 2004). Sie lassen sich im Vergleich zum Emphysem (s.u.) in der Mehrzahl der Fälle verhältnismäßig gut symptomatisch therapieren. Dabei werden eine Erweiterung der verengten Atemwege sowie eine Verminderung der Mukussekretion und eine Erleichterung des Abhustens des Bronchialschleims angestrebt (GOLD 2005).

1.2.2 Lungenemphysem



Abbildung 1: Emphysembulla

Die Abbildung zeigt eine resectierte Emphysembulla, bei der das Lungenparenchym nahezu vollständig zerstört wurde. Zur Verdeutlichung des Volumens und des Fehlens des Parenchyms in dieser Bulla wurde sie mit Wasser gefüllt (Abdruck mit freundlicher Erlaubnis von Prof. Magnussen, Krankenhaus Großhansdorf, Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie).

Das Lungenemphysem ist durch eine Erweiterung der Lufträume der Lunge aufgrund einer fortschreitenden Zerstörung der Alveolarwände gekennzeichnet (GOLD 2005). Bei besonders schwerer Ausprägung kann eine nahezu vollständige Zerstörung des Parenchyms auftreten, so dass sich große Blasen bilden und i. W. nur die Pleura der Lunge in diesem Bereich bestehen bleibt (Abbildung 1). Mit der Zerstörung der Alveolen geht eine Reduktion der internen Lungenoberfläche und somit der Kapazität zum Austausch der Atemgase einher. Gleichzeitig verliert die Lunge durch den Strukturabbau an Elastizität, so dass die Atemwege nicht mehr adäquat aufgehängt bzw. aufgespannt sind und bei der Ausatmung kollabieren. Die resultierende, vornehmlich expiratorische Obstruktion der Atemwege führt zu erheblichen Atembeschwerden und funktionellen Beeinträchtigungen, und die als Folge auftretende Überblähung der Lunge potenziert diese Probleme (O'Byrne und Postma 1999; O'Donnell et al. 2004a). Im Gegensatz zur chronischen Bronchitis ist das Lungenemphysem bislang nicht nur nicht kausal, sondern auch schwerlich symptomatisch therapierbar. Außer

der rechtzeitigen Beendigung der inhalativen Schadstoffbelastung gibt es keine Therapie, die die COPD in ihrem Fortschreiten aufhält (Barnes et al. 2003).

2. Stand der Wissenschaft

2.1 Risikofaktoren für die Entwicklung einer COPD

Die Risikofaktoren, die zu der Entstehung einer COPD bzw. eines Lungenemphysems beitragen, sind sowohl in der Umwelt als im Individuum selbst zu suchen.

2.1.1 Umweltbezogene Risikofaktoren

Unter den umweltbezogenen Faktoren findet sich als Hauptursache eine wiederkehrende oder langjährige, inhalative Exposition des Menschen gegenüber Partikeln und gasförmigen Luftschadstoffen (Hansel und Barnes 2004). In der "Sich-entwickelnden-Welt" sind dies zunächst Rauchabgase, die aus der offenen Verbrennung organischer Brennstoffe zum Heizen oder Kochen im direkten Lebensumfeld (Wohnung, Arbeitsplatz) entstehen. Weitere Faktoren, die zur Entstehung einer COPD, auch in der industrialisierten Welt, beitragen können, sind Luftschadstoffe allgemein (z.B. Schwefeldioxid, Stickstoffmonoxid, Ozon und insbesondere Partikel). Im Rahmen von Expositionen am Arbeitsplatz können Cadmium, Silikate, Kohle und Stäube von Holz, Papier, Getreide und Textilien eine Rolle spielen (Amoli 1998; Barnes und Godfrey 1997; Dennis et al. 1996; Dossing et al. 1994; Fabel und Konietzko 2005; Pandey 1984a; Pandey 1984b; Perez-Padilla et al. 1996).

In der westlichen, industrialisierten Welt entstammen die schädigenden Expositionen in erster Linie dem inhalativen Rauchen von Zigaretten und anderen Tabakprodukten. Die Inhalation des nahezu unverdünnten Noxengemisches „Zigarettenrauch“ unmittelbar an dessen Entstehungsort ist vermutlich eine der intensivsten inhalativen Expositionen, denen die Bevölkerung ausgesetzt ist.

Da sich die chemische Zusammensetzung des Passivrauches qualitativ nicht wesentlich von der des aktiv inhalierten Tabakrauches unterscheidet, nimmt ein gegenüber Passivrauch exponierter Nichtraucher ähnliche Gifte und Kanzerogene (z.B. Blausäure, Acetonitril, Ammoniak, Kohlenmonoxid, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, N-Nitrosamine, aromatische Amine, Benzol, Vinylchlorid, Arsen, Cadmium, Chrom, das radioaktive Isotop Polonium 210 sowie Tabakfeinstaubpartikel) auf wie ein Raucher (Deutsches Krebsforschungszentrum (Hrsg.) 2005). Passive Tabakrauchexpositionen (*environmental cigarette smoke*) stehen ebenfalls im Verdacht, zum einen über Fehlregulationen des Lungenwachstums beim Fötus und in der Kindheit, zum anderen durch Exposition im Erwachsenenalter zur Entwicklung einer COPD beizutragen (Cook et al. 1998; Cook und Strachan 1999; Deutsches Krebsforschungszentrum (Hrsg.) 2005; Gold et al. 1996). Beispielsweise deuten an Kellnern und Barpersonal erhobene Daten auf ein reales Risiko hin, auch durch Passivrauchexposition eine COPD zu erwerben; eine Beobachtung, die auch durch Daten gestützt wird, die an einem Kollektiv nicht rauchender Hausfrauen mit einer langjährigen Tabakrauchexposition erhoben wurden (Sezer et al. 2006).

2.1.2 individuelle Risikofaktoren

Bei den individuellen Risikofaktoren ist nur der Alpha-1-Antitrypsinmangel als maßgebliche erbliche Komponente nachgewiesen (GOLD 2005). Ob und ggf. welche weiteren Gene an der Pathogenese der COPD einen maßgeblichen Anteil haben, ist trotz einer Vielzahl von Daten bislang nicht abschließend geklärt. Unter den Kandidatengenen sind solche der antioxidativen Abwehr am ehesten durch konsistente Befunde gestützt.

Als Risikofaktoren für die Entwicklung einer COPD wurden u.a. eine Frühgeburt mit geringem Geburtsgewicht und beeinträchtigter Lungenentwicklung, sowie eine Atemwegsüberempfindlichkeit, Besonderheiten der Ernährung, wie beispielsweise ein Mangel an antioxidativen Vitaminen, Fischölen und Proteinen (Hansel und Barnes 2004) beschrieben. Zusätzliche systemische Faktoren, die mit einer schlechten Nährstoffversorgung zusammenhängen (Schols und Wouters 2000), wirken vermutlich im Sinne einer positiven Rückkopplung und können die Entstehung eines Emphysems begünstigen. Dies wurde u.a. durch Hungerversuche an Mäusen und Ratten in eindrucksvoller Weise gezeigt (Massaro et al. 2004; Sahebjamini und Wirman 1981). Damit übereinstimmend scheinen Raucher, die nicht übergewichtig sind, bereits *per se* im Vergleich zu leichtgradig übergewichtigen Rauchern ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer COPD aufzuweisen (Harik-Khan et al. 2002). Weiterhin scheinen ein Asthma bronchiale sowie das Vorhandensein einer Atemwegsüberempfindlichkeit die Entwicklung einer COPD zu begünstigen (GOLD 2005).

Die Entwicklung einer COPD beruht zweifelsohne auf einer Kombination persönlicher und umweltbezogener Faktoren, da nicht jeder Raucher zwangsläufig eine COPD oder gar ein Lungenemphysem entwickelt (Barnes 1999; Sandford et al. 1997). Die Befunde epidemiologischer und klinischer Studien belegen unzweideutig eine erhebliche Erhöhung der Wahrscheinlichkeit, ein Emphysem zu entwickeln, durch Zigarettenrauchen. In Übereinstimmung damit besteht eine Dosis-Wirkungs-Beziehung, da eine Korrelation der Schwere der Erkrankung bzw. des Risikos mit der Menge an Zigarettenrauch besteht (Auerbach et al. 1972; Lee et al. 2000; Sherrill et al. 1999).

2.2 Verbreitung der Noxe und Bedeutung der COPD – gegenwärtig und prognostiziert

2.2.1 Rauchen von Tabakprodukten

Die langfristigen Folgen des Rauchens werden mittlerweile auf den Tabakprodukten selbst mitgeteilt (DAS EUROPÄISCHE PARLAMENT UND DER RAT DER EUROPÄISCHEN UNION 2001). Zu den rauchbezogenen Erkrankungen gehören neben der bereits erwähnten COPD auch Erkrankungen des Herzens und des Gefäßsystems, des Gastrointestinaltraktes, des Reproduktionsapparates, maligne Erkrankungen verschiedener Gewebe, Hautalterung und Osteoporose bei Frauen (Hansel und Barnes 2004).

Obwohl in einigen Hochlohnländern der Anteil der Raucher über die Jahre rückläufig ist (z.B. GB von 80 % der Männer 1948 auf 39 % in 1998), bleiben tabakbezogenen Erkrankungen weiterhin von großer Bedeutung, da beispielsweise in vielen „Sich-entwickelnden-Ländern“ das Rauchen stark verbreitet ist (durchschnittlich etwa 50 %, in China etwa 2/3 der männlichen Bevölkerung) (Hansel und Barnes 2004). Insgesamt wird ein Anstieg der tabakbezogenen Todesfälle von weltweit 3 Mio. (im Jahr 1990) auf 8,4 Mio. (im Jahr 2020) erwartet (Murray und Lopez 1997a), wobei der Schwerpunkt in der „Sich-entwickelnden-Welt“

vermutet wird (Barnes 2000; Mackay 1991). Etwa 80-95 % aller Fälle einer COPD lassen sich auf den Konsum von Tabakprodukten zurückführen (Biring et al. 2002; Deutsches Krebsforschungszentrum (Hrsg.) 2005).

2.2.2 Bedeutung der COPD – global

Der "Global-Burden-of-Disease"-Studie zufolge rangierte die COPD 1990 weltweit auf dem sechsten Platz in der Häufigkeit der Todesursachen (4,4 % bzw. 2.211.000 Betroffene von 50.467.000 Gesamttodesfällen). Zum Vergleich lag der Anteil der Verkehrstoten an allen Todesfällen 1990 bei etwa 2 % (Murray und Lopez 1997b).

Dieselbe Studie prognostizierte der COPD im Jahr 2020 den dritten Platz unter den Haupttodesursachen und den fünften Platz (Platz 12 im Jahre 1990) unter den Gründen für eine gesundheitliche Beeinträchtigung (Murray und Lopez 1997a). Eine mögliche Ursache für den Anstieg der Bedeutung der COPD liegt dieser Studie zufolge in der künftig verbesserten Versorgung und dadurch verringerten Mortalität aufgrund anderer Erkrankungen, wie kardiovaskulärer Erkrankungen in der industrialisierten Welt und Infektionen in der "Sich-entwickelnden-Welt". Zusätzlich legt man eine zunehmende Exposition der Bevölkerung gegenüber Tabakrauch und einigen anderen Umweltschadstoffen zugrunde. Diese ziehen steigende Zahlen der Erkrankungen nach sich; hierbei wird wiederum ein besonderer Anstieg in der "Sich-entwickelnden-Welt" erwartet (Barnes 2000).

2.2.3 Bedeutung der COPD – Abhängigkeit vom Geschlecht

Betrachtet man die Prävalenz der COPD-Erkrankungen unter Berücksichtigung des Geschlechts des Patienten, so ist insbesondere eine Zunahme der Krankheitsfälle bei den Frauen zu beobachten. Im Jahr 1980 verteilten sich die Todesfälle durch die COPD in den USA etwa zu einem Drittel auf Frauen und zu zwei Dritteln auf Männer. Im Jahr 2000 war der Anteil der COPD an den Gesamttodeszahlen gestiegen (von ca. 5 % auf 11 %), und der Anteil der betroffenen Frauen lag leicht über dem der betroffenen Männer (Mannino 2002).

Es gibt Anzeichen für eine höhere Suszeptibilität von Frauen gegenüber den Effekten des Tabakrauches als bei Männern (Anthonisen et al. 1994; Xu et al. 1994). In jüngerer Zeit nehmen auch die Anzeichen für eine Veränderung des Rauchverhaltens unter den Frauen zu. Beispielsweise wurde in Deutschland eine Zunahme des Anteils der Raucherinnen (in Ostdeutschland um 42 %) beobachtet, während im gleichen Zeitraum der Raucheranteil unter den Männern nahezu konstant war (Junge und Nagel 1999).

Berücksichtigt man, dass das Auftreten der Erkrankung erst in höherem Lebensalter von den Betroffenen wahrgenommen wird, so muss sich das veränderte Rauchverhalten der Frauen verzögert in den Erkrankungszahlen niederschlagen. Frühere Untersuchungen, die einen erhöhten Tabakkonsum bei den Männern ermittelten und somit einen höheren Anteil an den induzierten Erkrankungen als bei den Frauen, stehen daher nicht in Widerspruch zu den neueren Daten (Feinleib et al. 1989; GOLD 2005; Thom 1989; Xu et al. 1994).

2.2.4 Bedeutung der COPD – Deutschland

Das "Weißbuch Lunge" gibt einen Überblick über die Situation auf dem Gebiet der Atemwegserkrankungen in Deutschland. Die Erkrankungen der Lunge waren in Deutschland im Jahre 1997 (Fabel und Konietzko 2000) und sind weiterhin (Fabel und Konietzko 2005)

mit ca. 10-11 % an der Gesamtmortalität beteiligt. Herz- und Kreislauferkrankungen waren insgesamt für die meisten Todesfälle verantwortlich (47 %). Hauptmortalitätsfaktor (1999 und 2002) im Bereich der Lungenerkrankungen war das Bronchialkarzinom (42 %, 41501 Tote) (Fabel und Konietzko 2000; Fabel und Konietzko 2005). An den Todesfällen durch Lungenerkrankungen, bezogen auf das Jahr 1997, war das Emphysem mit 3 % (2.649 Tote) und die COPD ohne Emphysemanteil mit 24 % beteiligt (21.192 Tote).

Für das Jahr 2002 wurden ca. 4 Mrd. Euro Gesamtkosten, mehr als 1,5 Mio. Krankenhaustage und ca. 3,9 Mio. Arbeitsunfähigkeitstage in Folge einer COPD einschließlich des Lungenemphysems ermittelt (Fabel und Konietzko 2005). Bezogen auf den einzelnen Patienten betragen die durchschnittlichen jährlichen Kosten in Deutschland für die Volkswirtschaft € 3027 und für die gesetzlichen Krankenversicherungen € 1944 (Nowak et al. 2004). Die Höhe der Kosten nahm in dieser Betrachtung mit der Schwere der Erkrankung zu. Da unter den Begriff der COPD sowohl die chronisch-obstruktive Bronchitis als auch das Lungenemphysem subsumiert werden, ist die Zahl der Erkrankungen an einem Lungenemphysem nicht im Detail angebar. Man geht von etwa 400.000 Betroffenen in Deutschland aus (Fabel und Konietzko 2005). Die erbliche Form des Emphysems, der Alpha-1-Antitrypsinmangel, ist in Europa mit einem Fall pro 2000-7000 Einwohner vertreten. In Deutschland sind nur ca. 600-800 Fälle identifiziert (Fabel und Konietzko 2005).

2.3 Hypothesen zur Entstehung eines Emphysems

Es herrscht breiter Konsens, dass eine kontinuierliche Reizung der Atemwege durch toxische Substanzen eine entzündliche Reaktion hervorruft, die auf der Basis einer entsprechenden genetischen Disposition zur Entwicklung der COPD führt (GOLD 2005). Da es sich bei der COPD um eine heterogene und vermutlich multifaktorielle Krankheit handelt, muss man von einer Vielzahl relevanter genetischer Faktoren ausgehen, die bislang weitgehend unbekannt sind.

2.3.1 Alpha1-Antitrypsinmangel oder Protease-Antiprotease-Imbalance

Der selten vorkommende Alpha-1-Antitrypsinmangel wird in vieler Hinsicht als Archetyp des Emphysems angesehen. Er ist der am besten dokumentierte genetische Risikofaktor (GOLD 2005; Silverman 2002). Raucher wie Nichtraucher, die diesen Mangel aufweisen, können frühzeitig, z.T. bereits in der Kindheit, eine Verschlechterung der Lungenfunktion sowie ein Emphysem entwickeln. Diese Prozesse werden durch das Rauchen erheblich verstärkt (Silverman 2002).

Beim Alpha-1-Antitrypsinmangel liegt eine verminderte Produktion der Hauptantiprotease des Lungenparenchyms, des Alpha-1-Antitrypsins, in der Leber vor, wodurch es in zu geringer Menge vorliegt, um seine Funktion in der Lunge ausreichend auszuüben (Crystal et al. 1989; Mahadeva und Lomas 1998). Das Emphysem wird zurückgeführt auf das resultierende Ungleichgewicht zwischen Proteasen (Enzyme, die z.B. Elastin und andere Strukturproteine der Alveolarwand abbauen können) und Antiproteasen (Faktoren, die gegen diesen Abbau schützen). Man fasst dieses Konzept als sog. Protease-Antiprotease-Imbalance zusammen (Stockley 1994). Bislang bekannte Kandidatenproteasen für eine Zerstörung des Lungenparenchyms in Abwesenheit des Alpha-1-Antitrypsin sind z.B. die Neutrophilene-lastase, Proteinase 3, Cathepsine G, B, K, L und S (Hansel und Barnes 2004) sowie Matrix-

metalloproteinasen (MMPs) (Finlay et al. 1997b; Finlay et al. 1997a; Hautamaki et al. 1997; Shapiro et al. 1993; Shapiro 1994). Eine Beteiligung analoger Prozesse wird für die Entstehung des Emphysems in Abwesenheit eines Alpha-1-Antitrypsinmangels vermutet.

2.3.2 Rauchinduziertes Emphysem

Ein Emphysem kann auch ohne Alpha-1-Antitrypsinmangel vorliegen. Die Zerstörung der alveolären Septen ist vermutlich ein Resultat der chronischen Entzündung der Atemwege. Da diese Inflammation vorwiegend durch neutrophile Granulozyten getragen wird (s.u.), könnte die Freisetzung von Proteasen und reaktiven Sauerstoffspezies durch diese Zellen an der Pathogenese des Emphysems beteiligt sein (GOLD 2005). Experimentelle Tiermodelle des Emphysems, bei denen beispielsweise durch Instillation von Elastase in die Atemwege emphysemartige Veränderungen hervorgerufen wurden, unterstützen diese Ansicht (Wright und Churg 2002)

Im Unterschied zu diesen akuten, experimentellen Interventionen tritt bei Patienten mit einem Lungenemphysem nur eine moderate alveoläre Entzündung auf. Dies trifft insbesondere bei solchen Patienten zu, bei denen die Gewebeerstörung bereits fortgeschritten ist (O'Donnell et al. 2004b), so dass weitere Einflussfaktoren vermutet werden können, die die Krankheit aufrechterhalten.

2.3.3 Reaktive Sauerstoffspezies

Der Rauch einer Zigarette enthält je nach Technik der Inhalation bis zu 10^{14} freie Radikale und andere Oxidantien pro Atemzug (Kim et al. 2002), die auf die Atemwege einwirken. Im Organismus kann Zigarettenrauch zu einem Einstrom von Entzündungszellen führen (z.B. Neutrophile und Makrophagen), die ihrerseits reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produzieren (Hansel und Barnes 2004; Jörres und Magnussen 1997). Es wird vermutet, dass eine erhöhte Aktivität von Proteasen in der Lunge zum Teil auf einer Schädigung bzw. Inaktivierung von Antiproteasen durch ROS beruht (Hubbard et al. 1987; Wallaert et al. 1993a). Eine Zerstörung von Matrixkomponenten oder anderen Makromolekülen durch ROS könnte ebenfalls an einem solchen Prozess beteiligt sein und zur Entstehung einer COPD beitragen (Jörres und Magnussen 1997).

2.3.4 Einfluß der Zellen der Lunge

In der Lunge ist eine Anzahl unterschiedlicher Zellarten anzutreffen (Tammeling und Quanjer 1980). Vermutlich sind verschiedene dieser Zellarten in unterschiedlichen strukturellen Bereichen der Lunge oder bei unterschiedlichen Schweregraden der Erkrankung an der Entstehung einer COPD beteiligt. Nach gängiger Auffassung ist die COPD eine entzündliche Erkrankung der Atemwege. In der Tat treten inflammatorische Zellen z.T. in einem räumlichen Zusammenhang mit einem Lungenemphysem auf (Saetta et al. 2001). Möglicherweise sind aber auch andere Zellarten an der Entstehung eines Emphysems beteiligt, da insbesondere die neutrophile Entzündung nicht zwangsläufig mit der Schwere des Emphysems zusammenhängt (O'Donnell et al. 2004b). Hansel und Barnes (2004) geben eine Übersicht über mögliche Beiträge unterschiedlicher Zellarten zur Pathogenese der COPD und des Emphysems.

2.3.4.1 Makrophagen

Makrophagen werden durch Zigarettenrauch und andere inhalative Reize aktiviert und in der Lunge akkumuliert (Jörres und Magnussen 1997). Sie stehen im Verdacht, die entzündlichen Prozesse bei der COPD über die Sezernierung von ROS, Stickstoffmonoxid und Chemokinen anzutreiben (Hansel und Barnes 2004), welche sie z.T. auch nach Exposition gegen oxidativen Stress (z.B. Ozon) freisetzen (Bascom et al. 1996). Makrophagen wurden in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von Patienten mit COPD im Vergleich zu Kontrollpatienten in größerer Zahl gefunden (Pesci et al. 1998). Sie akkumulierten in den zentriären Regionen, in denen das Emphysem am ausgeprägtesten war (Finkelstein et al. 1995; Meshi et al. 2002), und ihre Zahl in der Alveolarwand korrelierte mit der Schwere der Gewebeerstörung (Finkelstein et al. 1995). Ob dies die Ursache oder eine Folge der Gewebeerstörung ist, ist unbekannt. In jedem Fall können Makrophagen inflammatorische Mediatoren und Proteinase freisetzen (Tomita et al. 2002) und somit für eine proteolytische Aktivität in der Lunge von Patienten mit Emphysem verantwortlich sein.

2.3.4.2 T-Zellen

Bei Patienten mit COPD wurden erhöhte Anteile von Zellen gefunden, die für CD45 (Gesamtleukozyten), CD3 (T-Lymphozyten), CD25 und VLA-1 (*very late antigen*) positiv waren (Saetta et al. 1993). T-Lymphozyten lagen vermehrt im Oberflächenepithel und dem Subepithel vor (Fournier et al. 1989; O'Shaughnessy et al. 1997). Bei diesen Patienten waren Anzahl und Anteil der CD8-positiven Zellen (zytotoxische /Suppressor-Lymphozyten) erhöht; diese Zellen wurden zum dominanten T-Zell-Subtyp. Der Anstieg der CD8-positiven Zellen war mit der Einschränkung der Lungenfunktion verknüpft (O'Shaughnessy et al. 1997). Die CD8-positiven T-Zellen sind sowohl in den zentralen und peripheren Atemwegen als auch im Lungenparenchym bei der COPD vermehrt zu finden (Finkelstein et al. 1995; O'Shaughnessy et al. 1997) (Majo et al. 2001; Saetta et al. 1999). Diese Zellen könnten über eine Freisetzung von Granzymen, Perforinen und TNF-alpha die Apoptose von Typ-I-Alveolarzellen begünstigen und auf diese Weise an der Pathophysiologie der COPD beteiligt sein (Hashimoto et al. 2000; Liu et al. 1999a; Majo et al. 2001). Allerdings ist nicht bekannt, ob die CD8-positiven T-Zellen bei der COPD vorwiegend Zellen vom Typ Th1 (Interferon-gamma produzierende) oder Th2 (IL-4 produzierende) darstellen (Vukmanovic-Stejić et al. 2000).

2.3.4.3 Neutrophile

Im Sputum und in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von Patienten mit COPD wurden vermehrt Neutrophile (ca. 60-80 %) gefunden (Keatings und Barnes 1997; Richter et al. 1999; Taube et al. 2001). Die Verschlechterung der Lungenfunktion bei Rauchern scheint mit erhöhten Anzahlen von Neutrophilen im Sputum verbunden zu sein (Stanescu et al. 1996). Biopsien und induziertes Sputum bei Ex-Rauchern zeigen ähnliche Änderungen. Es steht zu vermuten, dass die Entzündung persistiert, sobald sie hinreichend etabliert wurde (Rutgers et al. 2000; Turato et al. 1995).

Da Neutrophile eine Reihe von Proteasen freisetzen können (z.B. Neutrophilenelastase, Cathepsin G und Proteinase-3), ist nicht auszuschließen, dass sie an der alveolären Zerstörung beteiligt sind (Di Stefano et al. 1994). Allerdings wurde eine negative Assoziation zwischen Neutrophilenzahl und Grad der alveolären Zerstörung beschrieben (Finkelstein et

al. 1995). Obwohl Neutrophile die Fähigkeit besitzen, Elastolyse auszulösen (Wallaert et al. 1993b), ist diese ferner bei der zystischen Fibrose mit ausgeprägter Atemwegsneutrophilie nicht in wesentlichem Maße zu beobachten (Hansel und Barnes 2004). Die Rolle der Neutrophilen ist also letztlich nicht geklärt.

2.3.4.4 Eosinophile

Auch eine Beteiligung der Eosinophilen bei der COPD und dem Emphysem ist denkbar. Es gibt einige Literaturdaten über erhöhte Zahlen von – allerdings inaktiven - Eosinophilen in den Atemwegen und der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit bei Patienten mit stabiler COPD (Turato et al. 2001). Eosinophile deuten eher auf eine Koexistenz von COPD und Asthma hin und lassen eine Prognose über die Wirksamkeit von Kortikosteroiden zu (Brightling et al. 2000; Papi et al. 2000). Man vermutet, dass die Eosinophilen in der COPD auch degranuliert vorliegen können und somit nicht mehr identifizierbar sind, da eosinophiles kationisches Protein (ECP) und Eosinophilenperoxidase im Sputum von COPD-Patienten vermehrt gefunden wurden (Keatings und Barnes 1997). Zudem ist Neutrophilenelastase in der Lage, die Degranulation von humanen Eosinophilen *in vitro* auszulösen (Liu et al. 1999b). Die stärkste Eosinophilie tritt während einer akuten Exazerbation bei der COPD auf (Di Stefano et al. 1994; Saetta et al. 1994).

2.3.4.5 Epithel- und Endothelzellen

Das Atemwegsepithel ist vermutlich ebenfalls eine wichtige Quelle für Mediatoren bei der COPD. Beispielsweise konnten Epithelzellen durch Zigarettenrauch angeregt werden, TNF-alpha und IL-8 auszuschütten; interessant ist hierbei auch, dass die Sezernierung von TGF-beta eine lokale Fibrosierung auslösen kann (Takizawa et al. 2001).

Beim Emphysem wurde eine vermehrte Apoptose von kapillaren Epithel- und Endothelzellen beobachtet (Kasahara et al. 2001). *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) könnte benötigt werden, um die Alveolarzellen am Leben zu erhalten, da die Blockierung des VEGF-Rezeptors (VEGFR2) bei Ratten die Apoptose der Alveolarzellen und eine Emphysem-ähnliche Pathologie induzieren konnte (Kasahara et al. 2000). Eine Beteiligung dieser Substanzklasse wurde 2005 als Anhaltspunkt genommen, die Entstehung des Emphysems als Autoimmunerkrankung zu erwägen (Taraseviciene-Stewart et al. 2005), bei der ein erhöhter Anteil von Zellen abstirbt, jedoch nicht effektiv abtransportiert wird. Dieser fehlende Abtransport erzeugt ein inflammatorisches Milieu, bei dem vermehrt Nekrose auftritt. Diese führt schließlich zu einer Autoimmunreaktion gegen die Lungenstrukturzellen, da Antikörper gegen die nekrotischen Zellfragmente gebildet wurden (Taraseviciene-Stewart et al. 2005). Die Details der Wirkmechanismen in der Lunge sind aber weiterhin ungeklärt.

2.3.4.6 Fibroblasten

Das Interstitium der Lunge, d.h. der Raum zwischen Alveolarepithelzellen und Kapillarendothelzellen, macht etwa die Hälfte der Gewebebarriere der Lunge aus. Zu $\frac{3}{4}$ besteht das Interstitium aus Zellen und zu $\frac{1}{4}$ aus Fasern und dem eigentlichen Interstitialraum (Weibel et al. 1976). Dabei sind die Zellen des Interstitium bei normalen alveolären Septen ortsfeste Zellen, die entweder als Fibroblasten an „*connective tissue*“-Fasern oder als Perizyten an Kapillaren angelagert vorliegen. Die Fibroblasten sind mithin die überwiegende Zellart, die im

Interstitium gefunden wird (Weibel et al. 1976). Sie zeigen eine längliche, spindelförmige Morphologie (Absher 1995). Eine ihrer primären Aufgaben ist die Aufrechterhaltung der Integrität des alveolären Kompartimentes durch den Umsatz von Komponenten der extrazellulären Matrix (Absher 1995). Sie nehmen dabei etwa einen Anteil von 95 % an den Zellen der Alveolen ein (Kapanci et al. 1974; Kaplan et al. 1985). In humanen Alveolarwänden stellen interstitielle Fibroblasten auch eine Verbindung zwischen Endothel- und Epithelzellen her. Dieser Kontakt wird durch Öffnungen in den Basallaminae der Zellen vermittelt. Die Verbindung oder Interaktion dieser verschiedenen Zellenarten erzeugt ein kontinuierliches Zytoplasma vom Kapillarlumen bis zum Alveolarlumen, entlang dessen vermutlich die Leukozyten migrieren können. Ein Verlust dieses Kontinuums könnte architektonische Veränderungen der Lunge z.B. beim Emphysem bewirken (Sirianni et al. 2003).

Über die Bedeutung der Fibroblasten bei der Entstehung des Emphysems ist nur wenig bekannt. Von Hansel und Barnes (2004) wurden sie in einem Übersichtsband zur COPD nur im Zusammenhang mit fibrosierenden Erscheinungen, also einer Überproduktion von extrazellulären Matrixproteinen durch Überaktivität der Fibroblasten in den kleinen Atemwegen (obstruktive Bronchiolitis), erwähnt.

Da beim Emphysem allerdings ein markanter Strukturverlust der Lunge vorliegt und Fibroblasten maßgeblich an der Aufrechterhaltung dieser Struktur beteiligt sind, scheint es plausibel, einen Funktionsverlust dieser Zellen als Beitrag zur Entstehung der Erkrankung anzunehmen. Außerdem scheint es generell einer hohen Stoffwechselrate der Parenchymzellen zu bedürfen, um mit physikalischem und chemischem Stress im Alveolarraum fertig zu werden. Dies wurde aus den strukturellen Veränderungen, die kurz nach Zellschäden durch Apoptose-induzierende Substanzen zu beobachten waren, geschlossen (Aoshiba et al. 2003; Tudor et al. 2003).

In der Vergangenheit wurde verschiedentlich der Einfluß von Zigarettenrauchextrakten (CSE) auf gesunde Fibroblasten untersucht. In hohen Konzentrationen ist Zigarettenrauchextrakt für gesunde humane Lungenfibroblasten zytotoxisch und induziert entweder Apoptose (10-25 % CSE) oder Nekrose (50-100 % CSE) (Ishii et al. 2001). Selbst in Konzentrationen zwischen 1 und 10 % CSE wurden Apoptose und oxidativer Stress, zum Teil sogar DNA-Strangbrüche beobachtet (10 % CSE) (Carnevali et al. 2003). Diese Zytotoxizität, die u.U. zu Schäden an den Alveolarwänden führen könnte, wurde durch die Expression von Glutathion S-Transferase P1 reguliert (Ishii et al. 2001). Glutathion scheint auch einen regulatorischen Einfluß auf die Kontraktion von Fibroblasten (im Kollagengel) sowie die Produktion von Fibronectin auszuüben (Kim et al. 2002). Glutathion (GSH) selbst ist als Antioxidanz bei der intra- und extrazellulären Protektion gegenüber oxidativem Stress beteiligt und nimmt eine zentrale Funktion bei der Kontrolle der Signaltransduktion und der proinflammatorischen Prozesse in der Lunge ein (Rahman 2005).

In nicht-toxischen Konzentrationen von Zigarettenrauchextrakt wurden Lungenfibroblasten ihrer Proliferation inhibiert (Nakamura et al. 1995). Diese Inhibition wurde zum Teil, aber nicht ausschließlich durch volatile Komponenten des CSE, wie Acrolein und Acetaldehyd, vermittelt. In ähnlichem Maße wurde auch die Migrationsfähigkeit der Zellen durch Zigarettenrauchextrakt und seine Teilkomponenten beeinträchtigt (Nakamura et al. 1995).

Ebenfalls wurde die Kontraktion von Kollagenmatrices durch gesunde humane Lungenfibroblasten bei Inkubation mit Zigarettenrauchextrakt oder seinen volatilen Komponenten

(s.o.) inhibiert (Carnevali et al. 1998). Dieser Effekt war von der Produktion des Kontraktionsinhibitors Prostaglandin E2 und der Expression von Zelloberflächenintegrinen unabhängig, jedoch teilweise von der Fibronectinproduktion abhängig (Carnevali et al. 1998). Hierbei schien die Wirkung des Zigarettenrauchextrakts auf die Fibroblasten auch von der Zelldichte im Gel abzuhängen (Wang et al. 2003).

Nur wenige Arbeiten befassen sich mit der möglichen Rolle von Fibroblasten bei der COPD. Die Eigenschaften von Fibroblasten aus emphysematösem Gewebe wurden zuerst von Nobukuni et al. (2002) untersucht. Sie zeigten, dass Zigarettenrauchextrakt zu einer stärkeren Inhibition der Proliferation der Zellen von Patienten mit Emphysem als der Zellen von Patienten ohne Emphysem führte; dieser Effekt war nicht auf vermehrtes Absterben von Zellen zurückzuführen. Zusätzlich beschrieben sie ein vermindertes basales Wachstum der Fibroblasten der Patienten mit Emphysem. Allerdings umfassten die Stichproben nur drei Patienten pro Gruppe, und die Messzeitpunkte waren nicht vollständig durch Daten abgedeckt.

3. Problemstellung

Aufbauend auf den skizzierten Überlegungen fokussierte die vorliegende Arbeit auf die Analyse der Änderungen, die bei Lungenfibroblasten von Patienten mit Lungenemphysem zu finden sind. Ziel war, das Wachstumsverhalten der Fibroblasten vergleichend zu analysieren und im Falle von Unterschieden zwischen Zellen von Patienten mit und ohne Lungenemphysem die Charakteristika dieser Zellen zu erfassen. Der Fokus auf der Zellproliferation resultierte aus der Hypothese, dass die Zerstörung der alveolären Struktur beim Emphysem auf einer dauerhaften Störung der zellulären Ersatzfunktion bzw. Reparatur beruhen könnte. Ein vermindertes Wachstum von Fibroblasten könnte eine der Erklärungen für den langsam verlaufenden und ab einem gewissen Schweregrad autonomen Verlauf der Erkrankung sein.

Die Analyse des Proliferationsverhaltens sollte unter dem besonderen Aspekt erfolgen, zu eruieren, inwieweit die Störung der zellulären Funktionen Kennzeichen einer vorgezogenen Alterung trägt. Dies beinhaltete sowohl die Analyse der Proliferationsrate als auch die Analyse der maximalen Zahl von Zellteilungen in Kultur als Maß der proliferativen Kapazität. Die Hypothese der Alterung gründete vornehmlich auf der Beobachtung, dass Raucher Zeichen einer vorgezogenen Alterung zeigen und dass Fibroblasten in Zellkultur durch oxidative Noxen in einen seneszenten Zustand versetzt werden können. Daher sollten mögliche Kennzeichen einer zellulären Seneszenz zusätzlich erfasst werden. Die Hypothese der Alterung würde auch eine Erklärung für die Umprogrammierung der Zellen liefern, falls das Verhalten der Zellen in Kultur unter standardisierten Bedingungen außerhalb der entzündlichen Umgebung durch ein Lungenemphysem verändert war.

Darüber hinaus sollte mit Hilfe molekularbiologischer Techniken geklärt werden, welche Ursachen einem veränderten Verhalten der Fibroblasten zugrundelagen. Eine der wichtigsten, aber auch schwierigsten Unterscheidungen betrifft die Differenzierung zwischen chronologischer, „natürlicher“ und induzierter, stressbedingter zellulärer Seneszenz. Ein nicht absolut trennscharfes, aber hilfreiches Kriterium ist hierbei die Telomerenlänge, die als Zähler der jeweils verbleibenden Zellteilungskapazität an den Chromosomenenden fungiert. Die

Analyse der Telomeren würde helfen, zu entscheiden, inwieweit ein möglicher Verbrauch proliferativer Kapazität durch eine vermehrte Zahl von Zellteilungen als Folge von Reparaturprozessen eine Seneszenz der Zellen erklärt. Im Falle, dass die Telomeren nicht verschieden lang wären, wäre eine über andere Faktoren vermittelte, stressinduzierte Seneszenz wahrscheinlicher. Diese Unterscheidung hätte Folgen für mögliche therapeutische Ansätze.

Im nächsten Schritt sollte mit Hilfe eines umfassenden cDNA-Arrays (Genchip) eine Übersicht darüber gewonnen werden, welche Gene bei Fibroblasten von Patienten mit Emphysem gegenüber Fibroblasten von Kontrollpatienten auf der Ebene der mRNA unterschiedlich exprimiert waren. Eine kritische Analyse der Ergebnisse unter Berücksichtigung der Variabilität der Messungen sowie der Einbeziehung von Literaturdaten sollte zu einer rationalen Auswahl von Genen führen, die einem veränderten zellulären Verhalten zugrundeliegen könnten. Die so ausgewählten Genexpressionen sollten sodann mit einer quantitativen Technik (qPCR) in unabhängigen Experimenten auf ihre Stichhaltigkeit und Reproduzierbarkeit überprüft werden.

Die leitenden Hypothesen der vorliegenden Arbeit waren somit:

- (a) Das Lungenemphysem geht mit einer Reduktion der Proliferationsrate und der maximalen proliferativen Kapazität parenchymaler Lungenfibroblasten einher.
- (b) Diese Veränderungen persistieren unter standardisierten Kulturbedingungen und tragen die Kennzeichen einer induzierten Seneszenz.
- (c) Die Veränderungen gehen mit Unterschieden der Expression solcher Gene einher, deren Assoziation mit zellulärer Seneszenz und/oder möglichen systemischen Änderungen bei Patienten mit Lungenemphysem bekannt oder plausibel ist.

Basierend darauf sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden,

- (1) ob und inwieweit sich die Proliferation der Fibroblasten von Patienten mit und ohne Lungenemphysem unterscheidet,
- (2) ob es Anzeichen für eine vorzeitige Alterung der Fibroblasten bei Patienten mit Emphysem gibt und
- (3) welche Gene potentiellen Anteil an einem veränderten Phänotyp der Fibroblasten haben könnten.

Der in dieser Arbeit verfolgte Forschungsansatz birgt das Potential, zu neuen Einsichten in die Wirkung von Zigarettenrauch und oxidativ potenten Luftschadstoffen im allgemeinen zu gelangen. Die leitende Hypothese einer induzierten Seneszenz, d.h. einer dauerhaften Umprogrammierung von Zellen, hat Konsequenzen für die Konzeption therapeutischer Ansätze, die auf eine Regeneration der Lunge abzielen. Unabhängig davon birgt der Ansatz das Potential, das Feld der epigenetischen Analyse für das Verständnis des Lungenemphysems und anderer chronischer, mit einem Strukturabbau einhergehender Erkrankungen zu eröffnen.

4. Eigene Arbeiten

4.1 Gesamtkollektiv der Patienten

4.1.1 Methode der Patientencharakterisierung

Um die gestellten Fragen bezüglich der Beteiligung der Lungenfibroblasten an der Entstehung des Lungenemphysems beantworten zu können, mußten geeignete Gewebespende ermittelt werden, die in diese Untersuchung einbezogen werden konnten. Insgesamt wurden in dieser Arbeit 14 Patienten mit mittel- bis schwergradigem Lungenemphysem und 15 Patienten ohne klinische, morphologische oder funktionelle Anzeichen einer COPD untersucht (Tabelle 1). Alle Patienten unterzogen sich einer Operation zur Entfernung eines Lungentumors, mit Ausnahme von zwei Patienten bei denen aufgrund ihres Lungenemphysems eine Volumenreduktion (Entfernung der überblähten Lungenregion) durchgeführt wurde. Bis auf zwei Kontrollpatienten ohne COPD waren alle Patienten Raucher. Die Tumorgröße oder das Tumorstadium unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen. Bei keinem Patienten lag nach Aktenlage eine Diabeteserkrankung vor.

Lungenfibroblasten wachsen nur eine begrenzte Zeit in Kultur und nicht von allen Patienten konnten ausreichende Mengen an Zellen für sämtliche Untersuchungen gewonnen werden. Darüber hinaus war es erforderlich, hinsichtlich der Zeit in Kultur (Anzahl der Passagen) nur vergleichbare Fibroblasten für die Messungen heranzuziehen. Daher erfolgten die jeweiligen Untersuchungen nicht alle an dem gesamten Patientenkollektiv, sondern an verschiedenen, aber überlappenden Subkollektiven. Die Auswahl der Patienten erfolgte nach Verfügbarkeit des Materials. Die markantesten Charakteristika des jeweils untersuchten Subkollektives sind im Ergebnisteil der jeweiligen Untersuchung dargestellt, die umfassenden Daten der Subkollektive sind im Anhang (Abschnitt 8.1) angegeben.

Für die Zuordnung der Patienten zur jeweiligen Untersuchungsgruppe wurden alle verfügbaren Daten der Patienten herangezogen. Dazu gehörte die Patientenanamnese, röntgenologische Befunde des Brustkorbes (Röntgenbild: Emphysem: n=10, Kontrollen: n=11 und/oder Computertomographie: Emphysem: n=10, Kontrollen: n=7), histologische Befunde des Pathologen, Spirometrie und Bodyplethysmographie mit ein. Die Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid (CO) war für einen Teil der Patienten verfügbar (Emphysem: n=7, Kontrollen: n=3). Diese Untersuchung war durch die zuständige Ethikkommission der Ärztekammer des Landes Schleswig-Holstein genehmigt und alle Patienten gaben nach ärztlicher Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis. Die Teilnahme an dieser Untersuchung wurde nicht vergütet.

4.1.2 Ergebnisse der Patientencharakterisierung

Das Gesamtkollektiv der untersuchten Patienten unterschied sich hoch signifikant in allen funktionellen Parametern. Ein weiterer signifikanter Unterschied wurde für die Körpergröße und dem aus Größe und Körpergewicht abgeleiteten BMI zwischen den Patienten mit einem Emphysem und den Kontrollen ohne Emphysem beobachtet. Beim Alter, dem Gewicht und der Rauchanamnese der Patienten bestand kein signifikanter Unterschied (Tabelle 1). Die Darstellung der Teilgruppen, die für die einzelnen Untersuchungsparameter herange-

zogen wurden, sind zusammengefasst in den jeweiligen Ergebnissectionen und ausführlich in Abschnitt 8.1 dargestellt.

Tabelle 1: Charakteristik des Gesamtkollektives der Patienten

	Kontrollen		Emphysem	
n	15		14	
Alter [J]	62	(54; 67)	63	(56; 70)
Geschlecht [w / m]	5 / 10		0 / 14	
Größe [cm]	172	(159; 176)	180	(170; 182)*
Gewicht [kg]	75	(63; 85)	69	(65; 82)
BMI [kg/m ²]	24,9	(24,3; 26,6)	22,7	(22,2; 24,8)*
Rauchstatus [#] [py]	25,0	(20; 44)	48	(25; 70)
VK [%Soll]	101,7	(87,2; 110,5)	73,8	(71,6; 90)**
FEV ₁ [%Soll]	94,7	(83,9; 106,3)	38,0	(33,5; 46)**
FEV ₁ /VK [%Soll]	99,4	(94,3; 104,2)	53,5	(44,6; 59)**
FEV ₁ /FVK [%]	79,3	(76,3; 82,7)	41,6	(36,5; 48,1)**
ITGV [%Soll]	104,0	(90,2; 117,8)	175,4	(165,8; 222,3)**
RV [L]	2,16	(1,86; 2,92)	5,06	(4,3; 6,42)**
TLK [L]	6,47	(4,6; 7,54)	8,45	(7,49; 9,89)**
RV/TLK [%]	38,1	(32,6; 45,1)	62	(52,3; 67,8)**
GOLD-Stadium				
[0/I/II/III/VI]	15/0/0/0/0		1/0/1/11/1	

Die Tabelle zeigt Medianwerte und Quartile (in Klammern); für das Geschlecht und die GOLD-Klassifikation sind die Fallzahlen je Kategorie angegeben; *p<0,05, **p<0,01 bezogen auf den Unterschied zwischen den Gruppen; [#]geschätzte Rauchmenge anhand der Patientenakten. VK = Vitalkapazität, FEV₁ = forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde, FVK = forcierte Vitalkapazität, ITGV = intrathorakales Gasvolumen, RV = Residualvolumen, TLK = totale Lungenkapazität. Die Sollwerte wurden den Richtlinien der *European Respiratory Society* entnommen (Quanjer et al. 1993), Klassen (Schweregrade) der COPD (GOLD 2005).

4.2 Methode der Gewebegewinnung und der Fibroblastenkultur

4.2.1 Probenahme

Die Probenahme an dem resezierten Lungengewebe der Patienten erfolgte durch den Zytologen des Krankenhaus Großhansdorf, wobei von ihm gleichzeitig das makroskopische Erscheinungsbild des Gewebes untersucht wurde. Die entnommenen, pleurafreien, parenchymalen Proben stammten ausschließlich aus peripheren, nicht von einem Tumor betroffene-

nen Regionen der resektierten Lunge. Gewebe mit makroskopisch erkennbaren Entzündungen oder tastbaren Metastasen wurden nicht in die Untersuchung einbezogen.

4.2.2 Primärkultur

Zur Isolierung der Fibroblasten wurde die entnommene Gewebeprobe in Hank's gepufferter Salzlösung (HBSS) (Invitrogen, Karlsruhe) gewaschen, mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten (1–2 mm³) und in 25 cm² Zellkulturflaschen (T25, Sarstedt; Nürnberg) unter Nährmedium (Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM) supplementiert mit 10 % (v/v) FCS (eine Charge für die gesamte Untersuchung), 100 U x mL⁻¹ Penicillin, 100 mg x mL⁻¹ Streptomycin und 50 mg x mL⁻¹ Gentamycin (alle Zellkulturreagenzien und Antibiotika: Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) in einem befeuchteten Brutschrank (37°C, 5 % Kohlendioxid) inkubiert (Holz et al. 2004). Die Zellkulturbedingungen waren so gewählt, dass sie bevorzugt das Wachstum der Fibroblasten ermöglichten (Lindl 2002). Nach 1-3 Tagen wuchsen erste Zellen aus den Gewebestückchen heraus, von denen ein Großteil eine typische spindelförmige Fibroblastenmorphologie zeigte. Die primäre Explantkultur wurde beendet, bevor die Zellen in den Kulturgefäßen einen zusammenhängenden Zellrasen bildeten (Konfluenz). Die Manipulation der Zellkulturen fand unter sterilen Bedingungen statt (Abschnitt 8.2)

4.2.3 Passage der Zellen

Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert (geerntet und in geringerer räumlicher Dichte in ein neues Kulturgefäß verbracht). Zu diesem Zeitpunkt wurde das von den Zellen konditionierte Kulturmedium entfernt und teilweise für weitere Untersuchungen bei -80°C eingelagert. Anschließend wurden die Zellkulturen einmal mit HBSS gespült, um restliches, FCS-haltiges Medium aus der Kultur zu entfernen. Zur Ernte wurden die Zellen durch 8minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit Trypsin-EDTA (0,05 % Trypsin (Schwein), 0,53 mM EDTA* 4 Na⁺ in HBSS) vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst (Lindl 2002). Zum Beenden dieses Vorganges wurde ein gleiches Volumen Kulturmedium mit FCS zugegeben, um die verdauende Wirkung des Trypsins zu inhibieren. Nach dem Transfer der Zellsuspension in 15 mL Falconröhrchen und anschließender Zentrifugation bei 1800 RPM (612 x g) für 8 Minuten wurde das überstehende Medium schlüpfend abgesaugt, um das Zellpellet nicht aufzuwirbeln. Je nach Zellmenge wurde das Pellet in 1-3 mL Medium mit 10 % FCS resuspendiert und ein Aliquot von ca. 10 µL für die Bestimmung der Zellzahl in der Neubauerzählkammer (VWR International GmbH, Darmstadt) verwendet. Die Zellzahl berechnet sich aus der gemittelten Zellzahl innerhalb einer Fläche von vier Quadraten mit je 1 mm² Fläche und einer Tiefe von 0,1 mm (entspricht 0,1 µL). Diese Anzahl wurde mit 10000 multipliziert, um die Zellzahl pro mL innerhalb des Suspensionsvolumens zu berechnen.

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde in ein neues Kulturgefäß verbracht (Saatdichte: 4,000 Zellen * cm⁻²), kultiviert und wiederum passagiert bevor Konfluenz erreicht wurde. Weitere Proben der Kulturen wuchsen für mindestens zwei Wochen in DMEM ohne Antibiotika. Keine dieser Kulturen zeigte während dieser Zeit Anzeichen von Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen.

4.3 Immunzytochemie - Zelldifferenzierung, Apoptose und Nekrose

4.3.1 Methode der Immunzytochemie

Wie zuvor beschrieben (Holz et al. 2004) wurden Zellen von jeweils 10 Patienten mit und ohne Emphysem in Passage 2 nach Primärkultur für eine immunzytochemische Differenzierung der verschiedenen Zelltypen zum Anwachsen über Nacht auf Objektträgern verbracht. Um Präparate für die immunzytochemische Differenzierung der Zellpopulationen herzustellen, wurden die Objektträger in eiskaltem Aceton fixiert, luftgetrocknet und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit „Protein block“ (Dako, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Nach dem Spülen mit Trispuffer (TBS 1x) wurden die jeweiligen Zellart-spezifischen Primärantikörperlösungen auf die Zellen aufgebracht. Die Färbung erfolgte mit Envision (alkalische Phosphatase(AP)-konjugierter Sekundärantikörper gegen die Wirtsspezies des Erstantikörpers) und mit einem Neu-Fuchsin Färbekit (Dako) als AP-Substrat entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Nach Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid, Roche, Mannheim, Deutschland) (Lindl 2002) wurden die Präparate unter dem Mikroskop ausgewertet. Zur Differenzierung der Fibroblasten von anderen Zellen wurden Antikörper gegen Vimentin (Mesenchymzellen; Dianova, Hamburg, Deutschland), CD-45 (Gesamtleukozyten; Dianova) und *smooth muscle actin* (SMA; Dianova) (glatte Muskulatur, ausdifferenzierte Myofibroblasten, Perizyten) Antikörper für pan-Zytokeratin (Epithelzellen; Dako, Hamburg, Deutschland) eingesetzt (Goulet et al. 1996).

Ebenfalls in Passage 2 wurden Fibroblasten auf Deckgläser eingesät und für 2 Tage unter Standardbedingungen inkubiert, um sie auf Apoptose- und Nekrosemarker hin zu untersuchen (Holz et al. 2004). Die Apoptosefärbung erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des Annexin-V-Fluos Färbekits (Roche, Mannheim, Deutschland) durch Bindung von Annexin-V gegen Phosphatidylserin, welches bei Apoptose aus dem Zellinneren an die Außenseite der Zelle verlagert wird. Auch nekrotische Zellen sind Annexin-V positiv, da bei nekrotischen Zellen aber die Zellmembranen durchlässig werden, erfolgt die Unterscheidung zur Apoptose über eine zusätzliche Kernfärbung der nekrotischen Zellen mit Propidiumjodid.

Die Anzahl der fluoreszierenden Zellen und die Gesamtzellzahl pro Sichtfeld wurde jeweils unter dem Mikroskop (Leitz Laborlux S, Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar) ermittelt. Eine weitere Probe der Zellen wurde auf ihre Gesamtvitalität nach Trypsinierung mittels des Trypan-blau-Ausschlusses hin untersucht (Bucher 1980; Lindl 2002).

Zusätzlich wurden die Zellüberstände nach drei Tagen in Kultur gesammelt und die Konzentration der Lactatdehydrogenase gemessen (Photometer Cobas Mira, Roche).

4.3.2 Ergebnisse der Immunzytochemie

Die beiden Patientengruppen, die für diese immunzytochemischen Untersuchungen herangezogen wurden, unterschieden sich nicht signifikant in BMI (Größe und Gewicht) und Alter, wohl aber in den funktionellen Parametern (Emphysem: n=10, Median (Quartile): Alter 65,5 (58; 70) J, FEV₁ 39,6 (34,2; 46,0) %Soll, ITGV 175,5 (165,8; 193,9) %Soll; Kontrollen: n=10, Alter 63,5 (54; 67) J, FEV₁ 94,8 (83,9; 103,3) %Soll, ITGV 103,8 (94,4; 110,0) %Soll).

Die vollständige Charakterisierung dieses Kollektives ist in Abschnitt 8.1 (Tabelle 6) dargestellt.

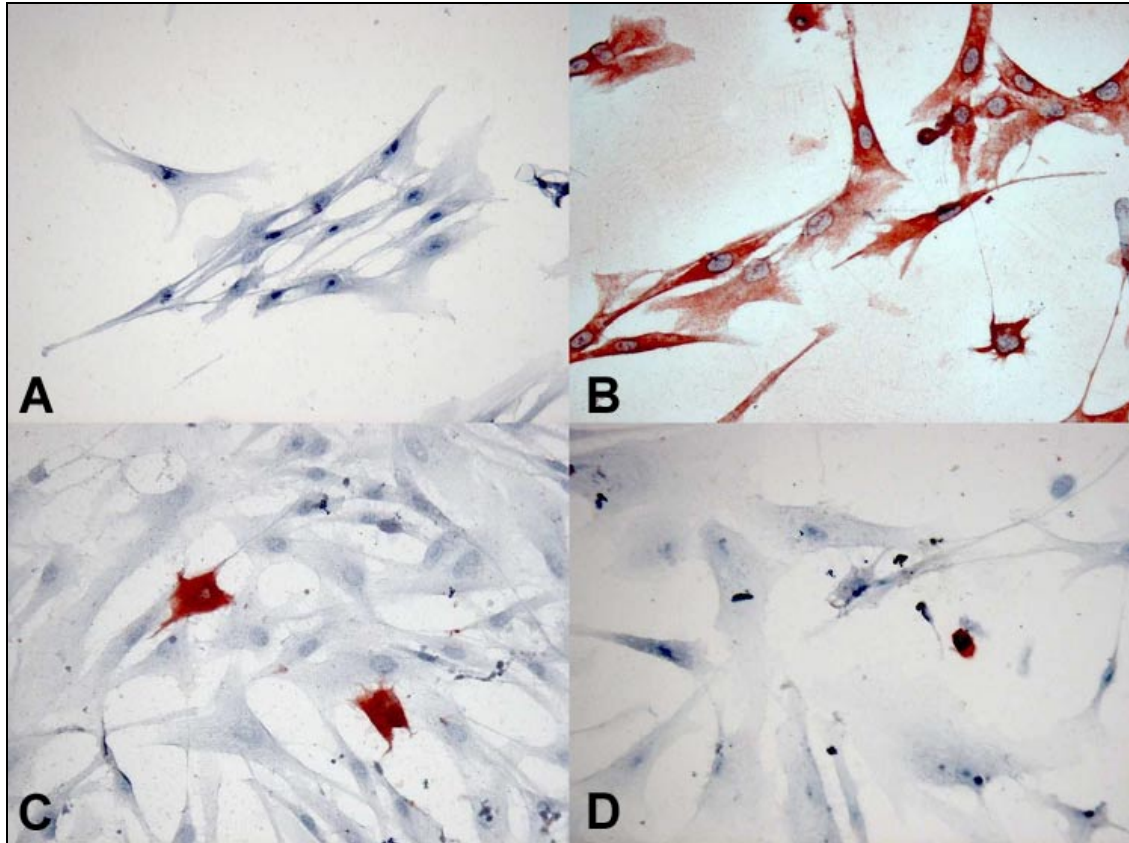


Abbildung 2: Zytodifferenzierung – Beispiele der Immunfärbungen

Die Abbildung zeigt vier repräsentative Ergebnisse der jeweiligen Immunfärbungen der Fibroblastenkulturen und der Zellart-unspezifischen Gegenfärbung mit Hämalaun (blau) in 400facher Vergrößerung. A: Fibroblasten (blau) ohne Antikörperfärbung, B: zusätzlich positive Färbung der Fibroblasten auf Vimentin (rot), C: Fibroblasten (blau) und zwei Epithelzellen (rot, positiv für pan-Zytokeratin), D: Fibroblasten (blau) und ein einzelner Leukozyten (rot, positiv für CD45).

In den untersuchten Kulturen zeigten die meisten Zellen die typische, spindelförmige Morphologie der Fibroblasten in Kombination mit einer positiven Färbung für Vimentin (Abbildung 2). Alle untersuchten Kulturen waren negativ für *smooth muscle actin* (SMA), die Kulturen der Fibroblasten von Patienten ohne Emphysem ebenfalls für den Lymphozytenantikörper CD45. Der Anteil der CD45-positiven Zellen in den Kulturen der Fibroblasten von Patienten mit Emphysem lag bei 0,1 (0; 0,8) % (Median (Quartile)). Die Anfärbung für Zytokeratin betrug bei den Fibroblastenkulturen von Patienten mit Emphysem 1,1 (0,4; 3,8) %; 0,6 (0,4; 1,2) % bei den Kulturen der Kontrollpatienten ohne Emphysem. Die Zelldifferenzierung unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (Holz et al. 2004).

Die Vitalität der Zellen in Passage 2 unterschied sich ebenfalls nicht signifikant zwischen den Gruppen und betrug (Median (Quartile)) 95 (93; 97) % bei den Fibroblasten der Patienten mit und 98 (97; 98) % bei denen der Kontrollpatienten ohne Emphysem. Der Anteil der apoptotischen Zellen lag am Untersuchungstag bei 0,5 (0; 0,6) % für die Fibroblasten der Gruppe des Emphysems und bei 0,8 (0,1; 1,7) % für die Zellen der Kontrollgruppe. Der Anteil nekrotischer Zellen lag bei 0,7 (0; 1,2) % bzw. 0,4 (0; 0,8) % bei den Fibroblasten der Patienten mit und ohne Emphysem.

Als weiteres Anzeichen für nekrotische Zellen wurde zudem die Konzentration von LDH in den Zellkulturüberständen gemessen. Sie lag bei 58,4 (55,9; 70,1) U/L bzw. 59,3 (56,1; 69,6) U/L für die Fibroblasten der Patienten mit bzw. ohne Emphysem. Beide Parameter wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf (Holz et al. 2004).

4.4 Basales Wachstum

4.4.1 Wachstumskurven und Verdopplungszeit der Lungenfibroblasten in Passage 2

4.4.1.1 Methode

Zur Charakterisierung des Zellwachstums wurden in Passage 2 nach Primärkultur je Zelllinie zwölf Ansätze mit 7500 Zellen je Kammer einer 24-Lochplatte eingesät und unter 500 µL bzw. ab Tag 2 unter 1 mL Medium mit 10 % FCS inkubiert. Zu den Zeitpunkten 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Einsaat wurden jeweils Dreifachbestimmungen des Zellwachstums wie zuvor beschrieben geerntet und die Zellzahl bestimmt (Holz et al. 2004). Zur Berechnung der mittleren Verdopplungszeit der Zellkulturen wurde die Steigung der linearen Regression über die logarithmierten Zellzahlen zu den vier Zeitpunkten der Wachstumsversuche ermittelt. Diese ergab die Verdopplungszeit (VZ) der jeweiligen Kultur (Holz et al. 2004).

Tabelle 2: Verdopplungszeiten der Lungenfibroblasten

Untersuchungskollektiv:	Kontrollen			Emphysem		
	n	VZ [Std.]		n	VZ [Std.]	
Gesamtkollektiv	15	24,5	(21,7; 25,4)	14	31,3	(29,3; 40,9)**
Zelldifferenzierung	10	25,0	(21,7; 25,4)	10	31,2	(29,3; 40,1)**
Langzeitwachstum	7	25,4	(22,8; 26,3)	7	30,2	(27,4; 40,9)*
Zellalterung (SA-beta-Gal)	9	24,8	(22,8; 25,8)	8	30,7	(28,3; 36,1)**
Telomerenlängen	8	24,9	(22,5; 25,6)	8	30,6	(27,3; 33,6)*
12K-cDNA-Array	3	22,8	(21,2; 23)	3	42,1	(40,8; 47,8)*
qPCR	9	24,8	(21,7; 25,4)	10	31,2	(29,3; 40,9)**
IGFBP-3-ELISA	10	25,0	(21,7; 25,4)	10	31,2	(29,3; 40,1)**

In der Tabelle sind die Medianwerte (Quartile) der Verdopplungszeit der Fibroblastenkulturen in Passage 2 sowie die Fallzahlen des jeweils betrachteten Kollektives für die beiden Untersuchungsgruppen dargestellt. *p<0,05, **p<0,01 bezogen auf den Unterschied zwischen den Gruppen.

4.4.1.2 Ergebnisse

Für die einzelnen untersuchten Subkollektive sowie für das Gesamtkollektiv der betrachteten Patienten zeigte sich zwischen den Gruppen ein signifikanter Unterschied der Verdopplungszeit in Passage 2 (Tabelle 2). Die Charakteristika der einzelnen Teilkollektive der Patienten, die jeweils in die Auswertung einbezogen wurden, sind in Abschnitt 8.1 (Tabellen 6-11) dargestellt, die Charakteristik des Gesamtkollektives in Tabelle 1.

4.4.2 Einfluß der Kryokonservierung

4.4.2.1 Methode

Nicht alle Zelllinien der Fibroblasten können unmittelbar nach der Primärkultur für die Analyse der verschiedenen Untersuchungsparameter herangezogen werden. Daher werden die Zellen häufig bis zur weiteren Untersuchung kryokonserviert. Zur Überprüfung der Frage nach Veränderungen der Kultur durch diesen Vorgang wurde das Wachstumsverhalten nach der Lagerung in Flüssigstickstoff erneut gemessen.

Unmittelbar vor dem Einfrieren wurden die Zellen mit 10 % DMSO (in Zellkulturmedium) versetzt und in Kryoröhrchen überführt (Lindl 2002). Nach vorsichtigem Mischen wurden die Zellen zunächst in einem Gefäß, das mit 1-Propanol befüllt war, bei -80°C eingefroren. Auf diese Weise wurde ein optimales, schonendes Abkühlen von $1^{\circ}\text{C} / \text{min}$ erreicht (Lindl 2002). Spätestens 24 h später wurden die Zellen zur Dauerlagerung in Flüssigstickstofftanks transferiert.

4.4.2.2 Ergebnisse

Für ein Teilkollektiv von 10 Patienten je Gruppe wurde die Verdopplungszeit nach Kryokonservierung ermittelt (Holz et al. 2004). Während sich diese Teilkollektive nicht signifikant in Alter und BMI (Größe und Gewicht) unterschieden, waren die funktionellen Parameter signifikant unterschiedlich (Emphysem: $n=10$, Alter 65,5 (58; 70) J, FEV_1 39,6 (34,2; 46,0) %Soll, ITGV 175,5 (165,8; 193,9) %Soll; Kontrollen: $n=10$, Alter 63,5 (54; 67) J, FEV_1 94,8 (83,9; 103,3) %Soll, ITGV 103,8 (94,4; 110,0) %Soll). Die vollständige Charakterisierung ist in Abschnitt 8.1 (Tabelle 6) wiedergegeben).

Nicht von allen Patienten lagen für beide Zeitpunkte auswertbare Wachstumsversuche vor, so dass die Übersicht unvollständig bleiben musste. Die Verdopplungszeit der Fibroblasten von Patienten mit einem Lungenemphysem war auch nach Kryokonservierung signifikant höher als bei den gesunden Kontrollen und betrug 29,0 (26,0; 36,8) Stunden bzw. 36,3 (34,1; 47,9) Stunden (Median (Quartile), $p=0,05$), wobei von zwei Patienten mit Emphysem und einem Kontrollpatienten die Zellzahlen zu gering für weitere Experimente nach der Kryokonservierung waren. Die Verdopplungszeit nach Lagerung war in beiden Gruppen leicht erhöht und korrelierte signifikant ($r=0,66$, $p=0,004$) mit derjenigen vor der Kryokonservierung (Holz et al. 2004).

4.4.3 Langzeitwachstum der Lungenfibroblasten

4.4.3.1 Methode

Zusätzlich zur Bestimmung der Verdopplungszeit in Passage 2 wurde die Dynamik und die maximale Zahl der Populationsverdopplungen in Zelllinien von sieben Patienten mit einem Emphysem sowie sieben Kontrollpatienten ermittelt (Holz et al. 2004). Fibroblasten, die nach Primärkultur kryokonserviert worden waren, wurden aufgetaut in Kultur genommen (100.000 Zellen / 25 cm²). Nach 24 Stunden wurde durch Zählung der nicht angewachsenen Zellen im Überstand auf die Zahl der angewachsenen Zellen geschlossen. Ab Passage 2 wurden die Zellen immer mit einer Dichte von 100.000 Zellen pro 25 cm² eingesät, für eine Woche mit regelmäßigen Mediumwechseln kultiviert, mit Trypsin geerntet, gezählt und wiederum passagiert.

Die Anzahl der Populationsverdopplungen wurde aus der Differenz zwischen eingesäter Zellzahl und geernteter Zellzahl berechnet und die Kultur solange fortgeführt, bis die geerntete Zellzahl unter 100.000 Zellen lag. Die Summe aller wöchentlichen Verdopplungen ergab die maximale Anzahl der Populationsverdopplungen (PD) jeder Kultur. Der Vergleich der Gruppen erfolgte über die ersten 35 Tage (Passage 1 - Passage 6), da nach diesem Zeitpunkt die ersten Linien keine Proliferation mehr zeigten.

Zusätzlich wurde das Langzeitwachstum der Fibroblasten beider Gruppen mit einem auf 1 % FCS reduzierten Wachstumsstimulus im Zellkulturmedium erhoben.

4.4.3.2 Ergebnisse

Die Teilgruppen, deren Fibroblasten auf Unterschiede in ihrem Langzeitwachstum hin untersucht wurden, unterschieden sich nicht signifikant in BMI (Größe und Gewicht), Rauchhistorie und Alter, wohl aber in den funktionellen Parametern (Emphysem: n=7, Median (Quartile) Alter 65 (58; 70) J, FEV₁ 38,7 (34,2; 49) %Soll, ITGV 185,1 (156,0; 222,3) %Soll; Kontrollen: n=7, Alter 66 (44; 73) J, FEV₁ 102,1 (83,9; 108,0) %Soll, ITGV 103,6 (94,4; 110,0) %Soll). Die vollständige Charakterisierung ist in Abschnitt 8.1 (Tabelle 7) wiedergegeben.

Die Kurven aus der kumulativen Populationsverdopplung gegen die Zeit in Kultur zeigten eine relativ große Steigung in frühen Passagen, die mit der Zeit abnahm. Die anfängliche Steigung war im Mittel für die Kulturen von Patienten mit Emphysem verglichen mit den Kontrollpatienten geringer ($p < 0,001$, ANOVA, Abbildung 3).

Post hoc Vergleiche ergaben, dass sich die Verdopplungen zwischen den Gruppen an Tag 0 ($p=0,94$) und Tag 7 ($p=0,17$) nicht signifikant voneinander unterschieden, wohl aber an Tag 14, 21, 28 und 35 signifikant unterschiedlich waren ($p=0,01$, $p=0,0003$, $p=0,0002$, $p=0,0002$; Abbildung 3 kleines Teilbild).

An Tag 42, proliferierten noch vier Kulturen der Patienten mit Emphysem und fünf Kulturen der Kontrollpatienten. An Tag 49 waren es noch drei und fünf; an Tag 56 drei und vier und an Tag 63 nur noch zwei bzw. eine Kultur in der jeweiligen Gruppe, so dass aufgrund

der geringen Fallzahlen für diese Tage keine gesonderte statistische Analyse durchgeführt wurde.

Der Median (Spannweite) der maximalen kumulativen Populationsverdopplungen lag für die Lungenfibroblasten von Patienten mit Emphysem bei 13,8 (7,4-22,6) und bei 20,2 (11,2-25,5) für die Kontrollpatienten ($p=0,070$, einseitig).

Die Reduktion des proliferativen Stimulus, durch Absenkung der Konzentration von FCS auf 1 % (statt 10 %), führte zu einem sofortigen Proliferationsstop bei einigen der Kulturen, insbesondere bei Zellen von Patienten mit Emphysem. Für die übrigen Kulturen konnte ein deutlich reduziertes Wachstum beobachtet werden ($n=7$ für die Kontrollen und $n=6$ beim Emphysem). In diesen Versuchen lag der Median (Spannweite) der maximalen kumulativen Populationsverdopplungen bei 1,8 (0,0-2,6) für die Gruppe der Patienten mit Emphysem und bei 3,8 (0,8-13,1) für die Gruppe der Kontrollpatienten ($p=0,032$, einseitig).

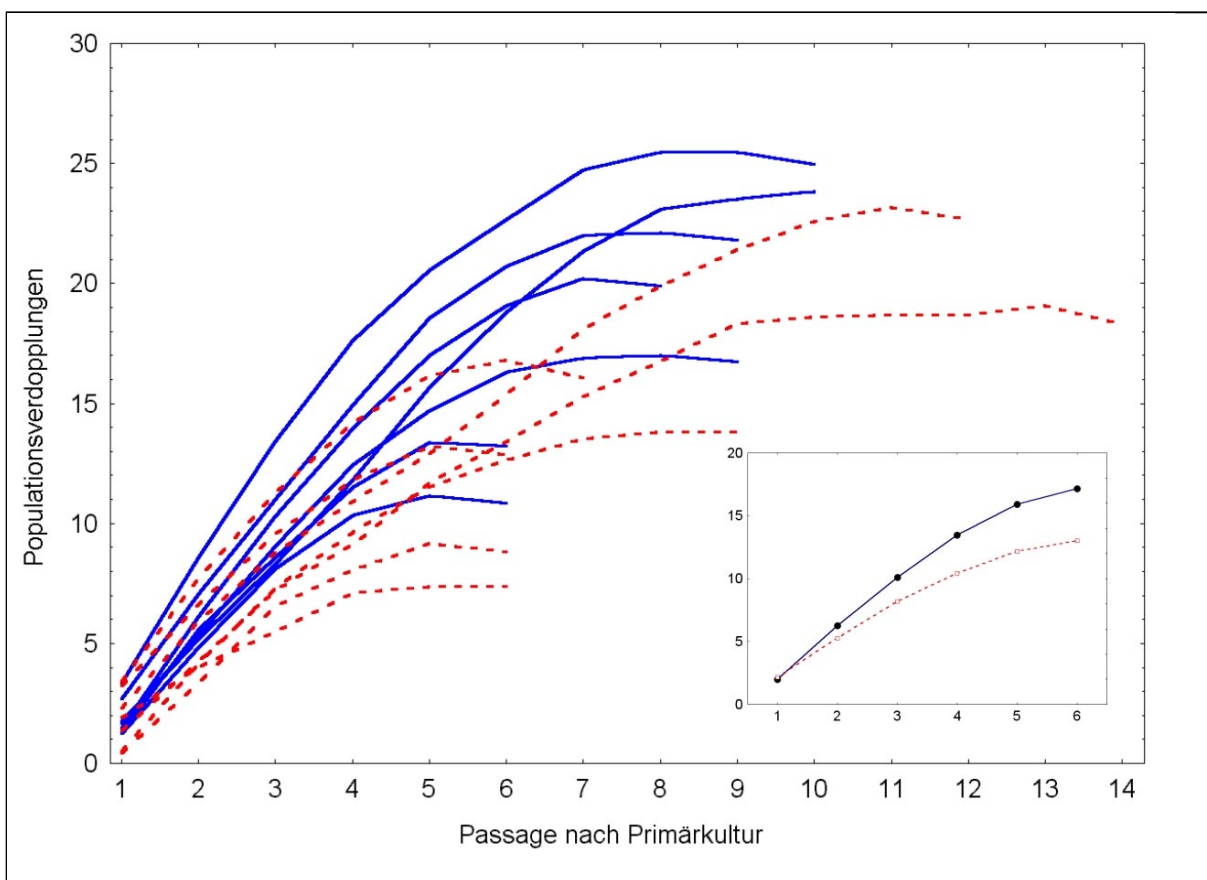


Abbildung 3: Langzeitwachstum

In dieser Grafik sind die kumulativen Populationsverdopplungen (PDL) individueller Fibroblastenkulturen von 7 Kontrollpatienten (blaue Linien) und 7 Patienten mit Emphysem (rote unterbrochene Linien) dargestellt. Nach Lagerung in Flüssigstickstoff wurden die Zellen dieser Patienten aufgetaut und in Kultur genommen. Der erste Datenpunkt repräsentiert die Populationsverdopplungen während des initialen Wachstums in Passage 1. Die Zellzahlen in jeder Kultur wurde wöchentlich ermittelt. Die Kultur der Zellen wurde fortgeführt bis die geerntete Zellzahl geringer war als die eingesäte (100.000 Zellen).

Kleines Teilbild: Ergebnisse der ANOVA-Analyse des initialen Bereiches der PDL-Kurven. Um die Vergleichbarkeit der Gruppen zu gewährleisten, wurden die Daten bis Passage 6 (Tag 35 der Kultur) in die Analyse einbezogen, da bis zu diesem Zeitpunkt noch alle Kulturen ein Wachstum zeigten.

4.5 Alterungsmarker

4.5.1 Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase

4.5.1.1 Methode

Die Expression von Seneszenz-assoziiierter beta-Galaktosidase (SA-beta-Gal) durch Zellen ist ein Kennzeichen ihrer Alterung. Die Anzahl der SA-beta-Gal positiven Zellen ist somit ein Maß für den Grad der Seneszenz einer Kultur. Zur Quantifizierung des Anteils der gealterten, seneszenten Zellen an den Populationen in Kultur wurden Fibroblasten in unabhängigen Anzuchten für weitere Zellfärbungen verwendet. Unter sterilen Bedingungen wurde je ein Deckgläschen (18 mm x 18 mm) pro Kammer einer 6-Loch-Zellkulturplatte gelegt, 10000-15000 Fibroblasten nach dem Trypsinieren aus T25-Flaschen auf das Deckglas aufgetropft und möglichst gleichmäßig auf dem Glas verteilt. Der Grad des Anwachsens der Zellen nach 11,5 Stunden bei 37°C wurden unter dem Mikroskop begutachtet. Waren die Zellen angewachsen, wurden sie unter 2 mL Zellkulturmedium mit 10 % FCS für weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Die Färbung für die Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase (SA-beta-Gal) wurde nach Herstellerangaben unter Verwendung eines beta-Galaktosidase Färbekits (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) durchgeführt. Hierzu wurde das Medium entfernt, die Zellen einmal mit 2 mL Phosphatpuffer (PBS 1x) gewaschen, für 10-15 Minuten in einer Fixativlösung (1x) bei Raumtemperatur fixiert und anschließend zweimal mit jeweils 2 mL PBS (1x) gewaschen. Die eigentliche Färbung der Zellen wurde durch Inkubation über Nacht bei 37°C mit 1 mL eines Färbeansatzes (Färbung durch X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid)) erreicht. Die gefärbten Präparate wurden von überschüssiger Färbelösung befreit und die Zellen im feuchten Zustand mit zwei Sprühstößen Fixierungsspray auf dem Deckglas (Merckofix, 1.03981.0102) fixiert. Nach 10minütiger Trocknung wurden die Kerne der Zellen mit 100 µL DAPI-Lösung (Roche) gegengefärbt und unter UV-Licht die Gesamtzellzahl anhand der fluoreszierenden Zellkerne ausgezählt. Unter Normallicht (VIS) wurde jeweils im selben Sichtfeld die Zahl der blau gefärbten Zellen (SA-beta-Gal positiv, Abbildung 4) bestimmt. Zur Konservierung der Zellfärbungen wurde die DAPI-Lösung entfernt, der Objektträger an der Luft getrocknet und das Präparat unter Aquatex-Lösung (Merck, VWR International GmbH, Darmstadt) mit einem weiteren Glas abgedeckt.

4.5.1.2 Ergebnisse

In Vorversuchen wurden zunächst sechs Zelllinien in ihrem Verlauf der Färbung für die Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase über die Zeit in Kultur hinweg untersucht. Dabei konnte bei längerer Zeit in Kultur eine Zunahme der Zahl von Zellen beobachtet werden, die sich für SA-beta-Gal positiv färbten (Abbildung 5). Aus dem teilweise sehr starken Anstieg des Anteils der gefärbten Zellen über eine Passage wurde die Notwendigkeit des Vergleich der Gruppen in der gleichen Woche der Kultur abgeleitet.



Abbildung 4: Färbung für Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase

Die Abbildung zeigt einen Fibroblasten in bläulicher Anfärbung für die Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase im Zytoplasma (Lysosomen). Gleichzeitig weist dieser seneszente Fibroblast die für diesen Phänotyp typische, verbreiterte Morphologie im Vergleich zu dem spindelförmigen, nicht seneszenten Fibroblasten in der linken Bildhälfte auf (Abdruck mit freundlicher Erlaubnis von Dr. rer. nat. Jörres, Ludwig-Maximilians-Universität München, Institut für Arbeits- und Umweltmedizin).

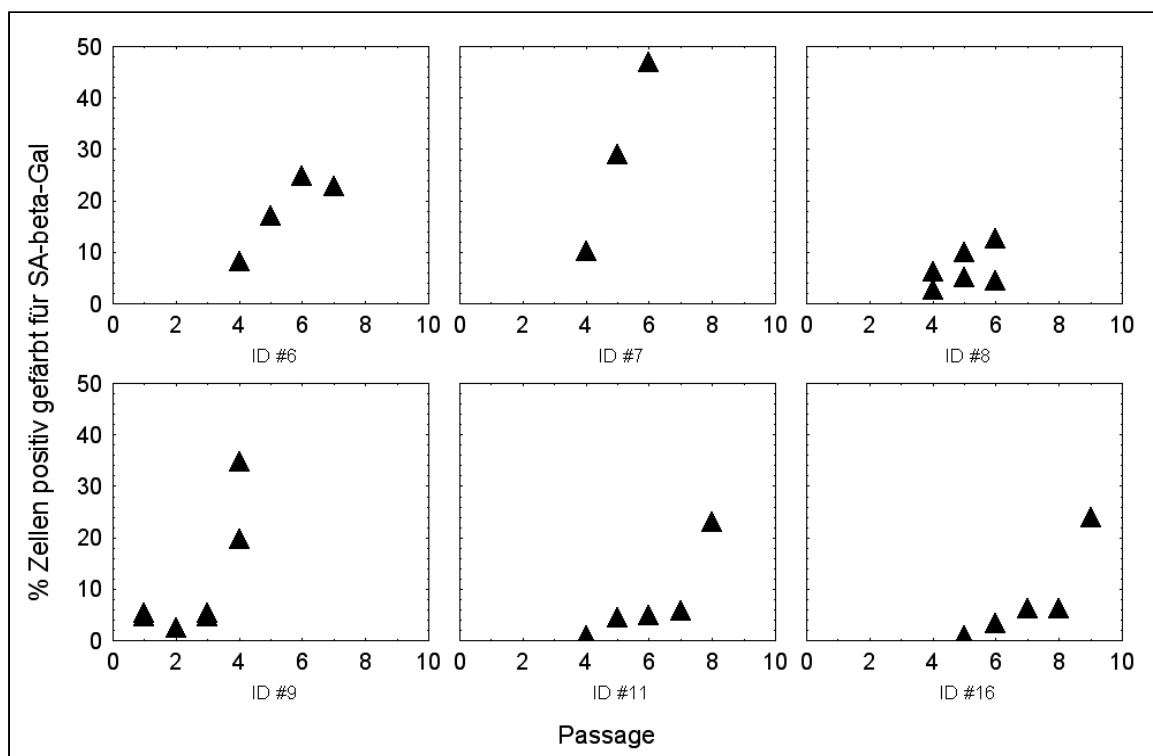


Abbildung 5: Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase – zeitlicher Verlauf

Die Grafik zeigt für die Fibroblastenkulturen von sechs einzelnen Patienten (ID#7/6/8/9/11/16) den prozentualen Anteil der Zellen, die sich in der jeweiligen Passage nach Primärkultur für die Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase positiv färbten. Man kann die typische Zunahme des Anteils solcher gealterten Zellen über die Zeit in Kultur erkennen.

Die Teilgruppen der Patienten, bei denen die Fibroblasten auf Unterschiede in dem Anteil der gealterten, Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase-positiven Zellen hin untersucht wurden, unterschieden nicht signifikant in BMI, Rauchhistorie und Alter, wohl aber in den funktionellen Parametern (Emphysem: n=8, Median (Quartile) Alter 61,5 (54,5; 70) J, FEV₁ 35,7 (32,3; 44,8) %Soll, ITGV 208 (171; 241) %Soll; Kontrollen: n=9, Alter 65 (54; 67) J, FEV₁ 102 (86,0; 106,3) %Soll, ITGV 110 (94,4; 121,2) %Soll). Die vollständige Charakterisierung ist in Abschnitt 8.1 (Tabelle 8) wiedergegeben.

Der Median (Quartile) der Verdopplungszeit (VZ) in Passage 2, zum Zeitpunkt der ursprünglichen Charakterisierung dieser Zelllinien, lag bei 30,7 (28,3; 36,1) Std. für die Fibroblasten von Patienten mit Emphysem und bei 24,8 (22,8; 25,8) Std. für solche von den Kontrollpatienten (p=0,004), während die entsprechende Zahl (Median (Quartile)) der kumulativen Verdopplungen der Population nach Auftauen der Zellen bei 1,8 (0,5; 3,2) bzw. 4,2 (2,9; 5,7) für die Fibroblasten der Patienten mit bzw. ohne Emphysem lag (p = 0,020).

Für die Fibroblasten der Patienten mit Emphysem betrug der Anteil (Median (Quartile)) derjenigen Zellen, die sich für SA-beta-Gal positiv färbten 16,0 (10,0; 24,8) % und war damit signifikant höher als der Anteil von 4,4 (3,2; 4,7) %, der für die Fibroblasten der Kontrollpatienten ermittelt wurde (p=0,0001, Abbildung 6). Entsprechend gab es eine positive Korrelation zwischen dem Anteil der SA-beta-Gal positiven Zellen und der VZ ($r_s = 0,79$, $p = 0,0003$) sowie einer negativen Korrelation mit den PD ($r_s = -0,68$, $p = 0,004$).

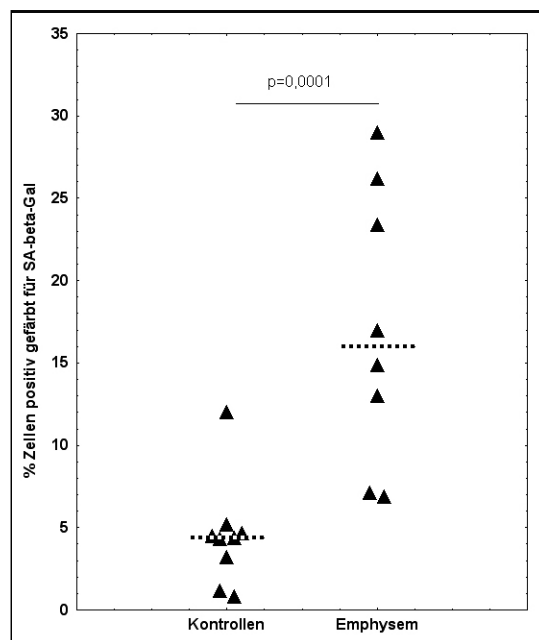


Abbildung 6: Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase – Vergleich der Gruppen

In der Grafik ist die Verteilung des Anteils der für SA-beta-Gal positiv gefärbten Zellen bei Patienten mit einem Emphysem und Kontrollpatienten dargestellt (gestrichelte Linie: Medianwert). Alle Kulturen befanden sich zum Zeitpunkt der Untersuchung eine vergleichbar lange Zeit in Kultur (Passage 4-5)

4.5.2 Telomerenlänge

4.5.2.1 Methode

Um einen Hinweis auf das Gesamtalter der untersuchten Kulturen der Lungenfibroblasten zu erhalten, wurden deren mittlere Telomerenlängen bestimmt. Die Telomere sind repetitive TTAGGG-Sequenzen am Ende der Chromosomen, die sich bei jeder Zellteilung verkürzen. Aus der Telomerenlänge kann man somit auf Anzahl der Zellteilungen zurückschließen, die eine Zellkultur im Mittel über die Zeit vollzogen hat. Zur Bestimmung der Länge der Telomeren (repetitive TTAGGG-Sequenzen am Ende der Chromosomen) der Fibroblasten wurden kryokonservierte Zelllinien von 8 Patienten je Gruppe, von denen genügend Zellmaterial zur Verfügung stand, bis Passage 2-3 in Kultur gehalten und wie zuvor beschrieben geerntet. Die Zellen wurden trypsiniert, zentrifugiert und die Zellpellets bei -80°C bis zur Weiterverwendung gelagert oder sofort für die Extraktion der DNA eingesetzt (DNeasy-Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Menge an extrahierter DNA wurde gegen eine Kalibrierreihe bekannter Konzentrationen von Lachssperma-DNA im Agarosegel oder mit einem Biophotometer (Absorption bei 260 nm) ermittelt. Zur Bestimmung der Telomerenlänge wurde der „TeloTAGGG-Telomere Length Assay“ (Roche, Mannheim) verwendet und nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden 2 mg DNA je Probe durch die Restriktionsenzyme RSA I und Hinf I für 2 Stunden bei 37°C verdaut und die Verdaufragmente anschließend in einem 0,8%-igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt (50 V; 4,5-5,5 Stunden). Im Gel wurden die separierten DNA-Fragmente zerkleinert (Schimpf 2002) und über Nacht im Southern Blot mit SSC-Puffer (20x) als Transfermedium auf eine kationische Nitrocellulose-Membran (Roche, Mannheim, Deutschland) überführt. Auf der Membran wurde die DNA mittels 5minütiger UV-Bestrahlung im Transilluminator unter Klarsichtfolie fixiert.

Zur Detektion der Telomerenfragmente wurde ebenfalls das Nachweissystem Assays verwendet, bei dem die Membran für eine Stunde bei 42°C im Rüttelbad vorhybridisiert wird, bevor mit einer anti-TTAGGG-Sonde mit Digoxigenin(DIG)-Konjugat (Verdünnung 1:5000) für 3 Stunden im Rüttelbad bei 42°C inkubiert wurde. Nach mehreren Waschschritten (2x 5 Minuten bei Raumtemperatur in SSC 2x + 0,05 % SDS, 2x 15 Minuten bei 50°C in SSC 0.2x + 0,05 % SDS, 1x 5 Minuten bei Raumtemperatur mit Waschpuffer des Kits) wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert (30 Minuten, Raumtemperatur) und mit einem Anti-DIG-Antikörper, an den alkalische Phosphatase konjugiert war (Verdünnung 1:10000), inkubiert. Nach weiteren Waschschritten (2x 15 Minuten, Raumtemperatur, Waschpuffer) und Equilibrierung der Membran (5 Minuten, Raumtemperatur, Detektionspuffer) wurde die Membran in einem Hybridisierungsbeutel für eine Minute mit dem AP-Substrat CDP-star™ zur Initiierung der Chemilumineszenzreaktion inkubiert.

Nach Entfernung überschüssigen Substrates erfolgte die Visualisierung des Chemilumineszenzsignals durch Exposition eines Röntgenfilms (bis zu 7 Minuten), bis eine ausreichende Signalintensität erreicht worden war. Die mittlere Länge der visualisierten Verdaufragmente der Telomere (terminale Restriktionsfragmente, TRF) berechnete sich aus der Summe der Chemilumineszenzintensität an jedem Punkt der Membran, geteilt durch die Summe des Verhältnis der Intensität an jeder Position zur TRF-Länge dieser Position.

4.5.2.2 Ergebnisse

Die beiden Patientengruppen, deren DNA untersucht worden war, unterschieden sich signifikant in allen Parametern aus Tabelle 1, mit Ausnahme des Alters und der Rauchanamnese (Median (Quartile): Emphysem: n=8, Alter 60 (57; 68) J, FEV₁ 35,7 (33,8; 47,5) %Soll, ITGV 169,9 (161,5; 213) %Soll; Kontrollen: n=8, Alter 66,5 (60; 74,5) J, FEV₁ 104,8 (93,0; 113,0) %Soll, ITGV 107,9 (101; 121,6) %Soll). Der Median (Quartile) der VZ in Kultur in Passage 2 lag bei 30,6 (27,3; 33,6) Stunden (Patienten mit Emphysem) bzw. 24,9 (22,5; 25,6) Stunden (Kontrollpatienten, p = 0,012). Die vollständige Charakterisierung ist in Abschnitt 8.1 (Tabelle 9) wiedergegeben.

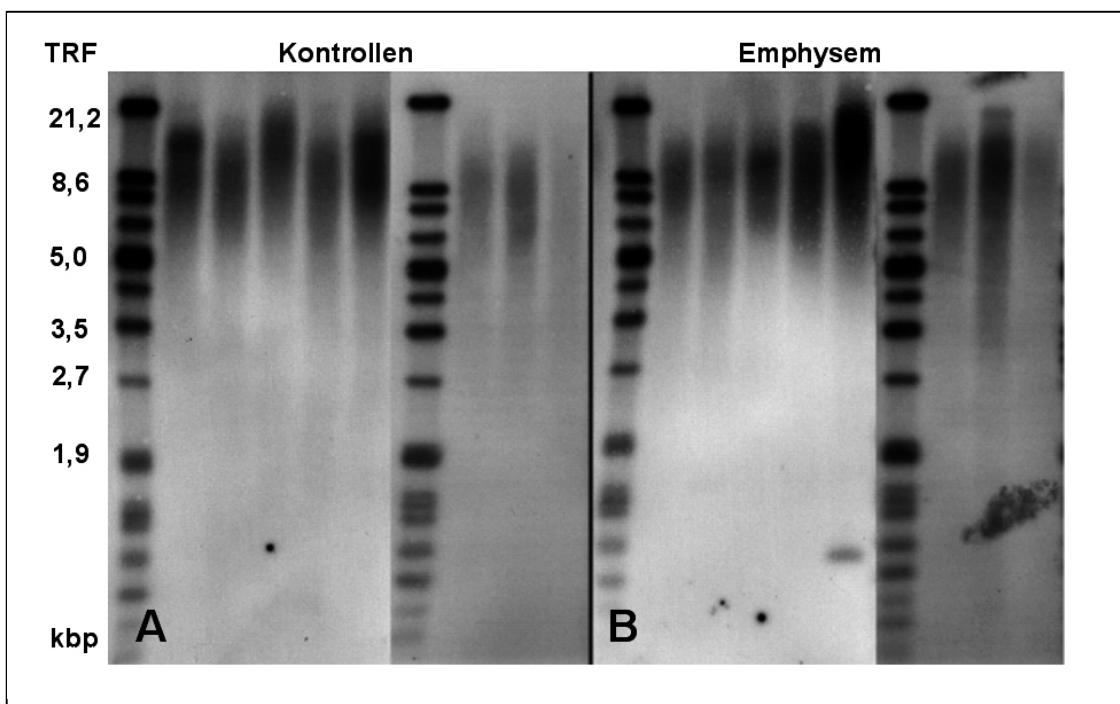


Abbildung 7: Telomere I - Southern blot

Die Abbildung zeigt den Southern Blot der terminalen Telomerenrestriktionsfragmente (aus RSA I/ Hinf I Verdau von DNA-Proben), detektiert durch Belichtung eines Röntgenfilmes über die Chmilumineszenzreaktion des Nachweissystemes aus Digoxigenin(DIG)-gekoppelter Telomerensonde, anti-DIG-Zweitantikörper mit konjugierter alkalischer Phosphatase (AP) und CDP-starTM als AP-Substrat. Spalte A: DNA-Proben der Fibroblasten von 8 Kontrollpatienten (Gruppen von 5 und 3 Patienten-DNAs getrennt durch Molekulargewichtsmarker). Spalte B: DNA-Proben der Fibroblasten von 8 Patienten mit Emphysem (Gruppen von 5 und 3 Patienten-DNAs getrennt durch Molekulargewichtsmarker).

Mit dem verwendeten Assay wurden in Immunfärbung die Telomere sequenzen, die terminalen Restriktionsfragmente (TRF), und deren Länge visualisiert. Die Länge der TRF unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen, wobei der Median (Quartile) für die

Fibroblasten der Patienten mit Emphysem bei 9,2 (8,8; 9,9) kbp und bei 8,9 (8,3; 9,4) kbp für diejenigen der Kontrollpatienten lag (Abbildung 7). In diese Untersuchung wurden die Fibroblasten eines Patienten einbezogen, dessen Emphysem makroskopisch im Gewebe, nicht jedoch anhand seiner funktionellen Parameter erkennbar war. Bei Ausschluß dieses Patienten aus der Betrachtung, um eine überlappungsfreie Trennung der Kollektive anhand der GOLD-Stadien zu erreichen, verschob sich die mittlere TRF-Länge für die Gruppe der Patienten mit Emphysem auf 9,3 (8,6;10,0). Der Unterschied war ebenfalls nicht statistisch signifikant.

Die Reproduzierbarkeit des Assays wurde an 5 Patienten pro Gruppe in wiederholter Messung derselben DNA-Probe untersucht, deren TRF-Längen als Mittelwert in die obige Analyse eingingen. Über alle Proben hinweg lag die Korrelation der Analysen bei $r_s = 0,75$ ($p=0,013$).

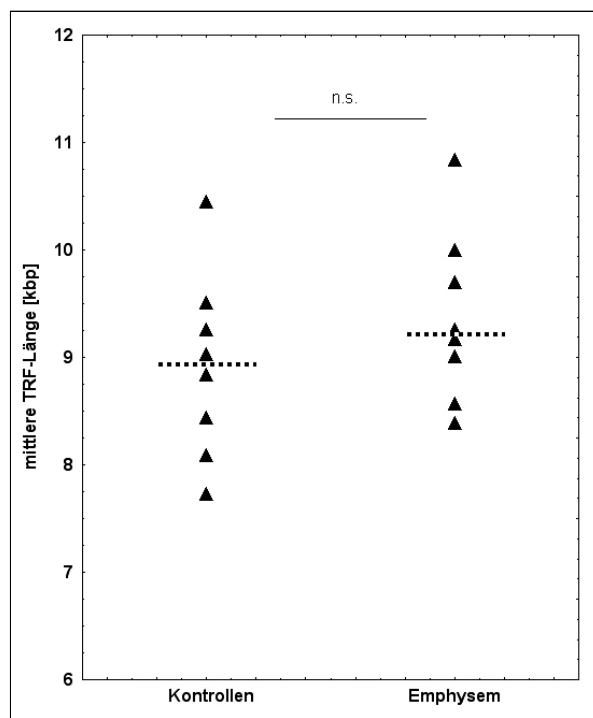


Abbildung 8: Telomere II – Längenverteilung

Die Grafik zeigt die Verteilung der mittleren Längen der terminalen Restriktionsfragmente der Telomere bei Kontrollpatienten und Patienten mit einem Emphysem (jeweils $n=8$, gestrichelte Linie: Median, n.s.: nicht signifikant)

4.6 Genexpression

Da die Genexpression einen grundlegenden Schritt in der Regulation der Funktionen der Zelle darstellt, sollten Unterschiede in der Zusammensetzung des abgelesenen Genpools einen Anhaltspunkt liefern können, welche Veränderungen im Phänotyp der Fibroblasten beim Emphysem vorliegen. Um einen möglichst breiten Überblick über die Genexpression in den Fibroblasten zu erhalten, wurde zunächst ein cDNA-Array verwendet, auf dem gleichzeitig die Expression von vielen Genen gemessen werden kann. Aus der Übersicht der Genexpression wurden dann einzelne Gene selektiert, deren Expression mit PCR-Techniken überprüft werden sollte.

4.6.1 cDNA-Mikroarray

4.6.1.1 Methode

Bei der explorativen Analyse der Genexpression mit cDNA-Mikroarray-Technologie fanden zwei 12K-Plastikarrays (jeweils 11.835 Gene; Atlas™ Plastic Human 12k Microarray, #634811, Custom Service, BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA) Verwendung.

Für den explorativen Einsatz des 12K-cDNA-Plastikarrays wurden Fibroblasten mit reproduzierter Verdopplungszeit von jeweils drei Patienten mit und ohne Emphysem verwendet, deren Charakteristik für die jeweilige Gruppe möglichst extrem war (Holz et al. 2004).

Diese Zellen wurden aufgetaut und bis Passage 3 in Kultur gehalten. Nach der Ernte wurden die Zellen in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zum Versand auf Trockeneis bei -80°C gelagert. Die weitere Behandlung der Proben erfolgte durch die Herstellerfirma des Arrays. Dort wurden die Fibroblasten jeder Gruppe gepoolt, ihre RNA extrahiert, deren Qualität mittels Agilent Bioanalyzer überprüft und radioaktiv markierte cDNA-Sonden auf jeweils einen Array je Gruppe hybridisiert. Die Bindung der Sonden an den Array und damit die Menge der pro Gen vorhandenen mRNA wurde durch Belichtung eines Röntgenfilmes und Quantifizierung der Schwärzung je Spot ermittelt. Diese Expressionsdaten, die die Herstellerfirma zur Verfügung stellte, wurden für die globale Schwärzung des jeweiligen Arrays normalisiert, um Unterschiede in der Belichtung zu eliminieren. Anschließend wurde die Expression der *house-keeping*-Gene (GAPDH und beta-Actin) zur weiteren Normalisierung der beiden Arrays aufeinander herangezogen, um Verschiebungen der gemessenen Genexpressionen zwischen den Gruppen durch eventuelle Unterschiede in der Beladung der Arrays mit den RNA-Probe zu korrigieren.

4.6.1.2 Ergebnisse

Die Gruppe der Patienten, deren Fibroblasten für die Analyse der Genexpression mit dem cDNA-Array herangezogen wurden, unterschieden sich signifikant in FEV₁ und ITGV (Emphysem, n=3: Median (Quartile): Alter 64 (51; 66) J, FEV₁ 38,7 (28,0; 40,7), ITGV 181 (165,8; 222,3) %Soll, VZ der einzelnen Kulturen in Passage 2: 40,9; 42,1 und 47,8 Std.; Kontrollen, n=3: Median (Quartile): Alter 67 (66; 67) J, FEV₁ 92,3 (58; 117,9) %Soll, ITGV 90,2 (88,5; 123) %Soll, VZ der einzelnen Kulturen in Passage 2: 22,8; 21,2 und 25,5 Std. Die vollständige Charakterisierung ist in Abschnitt 8 (Tabelle 10) wiedergegeben.

Insgesamt war bei dem Array, der mit der gepoolten RNA aus den Fibroblasten von Patienten mit Emphysem hybridisiert worden war, eine geringere Gesamtexpression zu verzeichnen.

In diesem explorativen Ansatz wurden 979 Gene mit einer Differenz von \geq Faktor 2 zwischen den Gruppen gefunden. Um die Schlussfolgerungen so sicher wie möglich ziehen zu können, ohne dabei zu viele Kandidatengene zu übersehen, wurde nur solche Gene selektiert, die sich um mehr als Faktor 3 unterschieden. Gleichzeitig mußten die jeweiligen Signalintensitäten auf beiden Arrays eine bestimmte Mindestintensität aufweisen (\geq Faktor 2 der Intensität, die dem 75-Perzentil der Intensitätsverteilung der auf- oder abregulierten Gene entsprach).

Unter diesen Randbedingungen wurden 15 Gene in emphysematösen Fibroblasten aufreguliert gefunden, unter ihnen IGFBP-rP1 (4,9-fach), LOX (3,3-fach), LOXL2 (3,9-fach) und TIMP3 (3,0-fach), wobei 121 Gene abreguliert gefunden wurde, hierunter CDK4 (6,3-fach), FOSL1 (4,8-fach), OAZ1 (6,7-fach) und IGFBP-5 (5,3-fach).

Die Rohdaten dieser Mikroarrayexperimente wurden bei NCBI, Gene Expression Omnibus (GEO) zur Onlinepublikation hinterlegt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/> (Stand 04.01.2006)). Die Zugangskennung für diese Untersuchung, über die nach Publikation der Daten ein öffentlicher Zugriff auf die Daten möglich sein wird, lautet "GSE 3510".

4.6.2 qPCR

Für ausgewählte Gene wurde die Expression mit Hilfe der qPCR an individuellen Proben beider Gruppen nachgemessen. Hierzu wurden Fibroblasten erneut in Kultur genommen, in Passage 3 geerntet, die RNA aus den Zellen extrahiert und in cDNA übersetzt. Anschließend mussten für die Zielgene entsprechende selektive Primer entwickelt werden, die eine spezifische Amplifikation der Sequenz des jeweiligen Genes zuließ, ohne dabei durch unspezifische Nebenprodukte oder Kontaminationen mit DNA beeinflusst zu werden. Diese Primer wurden zunächst in der qPCR überprüft. Bei Eignung der Primer wurde ein entsprechendes PCR-Amplifikat jedes Zielgenes als Ausgangsmaterial für die Erstellung einer Verdünnungsreihe zur relativen Kalibration der später zu bestimmenden Genexpression herangezogen. Nach Doppelbestimmung der Kalibrationsreihe für das jeweilige Zielgen und für ein *house-keeping*-Gen in der PCR wurden die eigentlichen Quantifizierungen durchgeführt.

4.6.2.1 RNA-Ernte

Die Gewinnung der RNA erfolgte direkt im Zellkulturgefäß unter Verwendung des RNeasy-Extraktionskits (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland).

Dazu wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Kultur mit 1 mL HBSS gespült und je Kammer 350 µL Lysispuffer (RTL-Puffer des Kits supplementiert mit 1 % (v/v) beta-Mercaptoethanol) zugegeben. Das Lysat, das auch die RNA enthielt, wurde in Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C bis zur Isolierung der RNA gelagert.

4.6.2.2 RNA-Isolation

Die geerntete RNA-Lösung wurden zunächst zur Homogenisierung durch spezielle „Shredder“-Säulen (Qiagen) zentrifugiert (2 Min, 15000 RPM (17860 x g)). Das Filtrat wurde mit 350 mL Ethanol (70 %) vermischt, auf eine Filtrationssäule des Kits gegeben und für 15 Sek. bei 15000 RPM zentrifugiert. Die RNA verblieb auf der Membran der Säule, wurde mit 700 µL RW1-Puffer des Kits versetzt und erneut zentrifugiert (15 Sek. für 15000 RPM). Nach 2 Waschschritten mit je 500 µl RPE-Waschpuffer und erneuter Zentrifugation (15 Sek. bzw. 2 Min bei 15000 RPM) wurde die RNA mit 30 µL RNase freiem Wasser (Qiagen) durch Zentrifugation (1 Min bei 15000 RPM) eluiert. Zur Steigerung der Ausbeute an RNA konnte ggf. mit diesem ersten Eluat oder mit 20 µL RNase freiem Wasser erneut eluiert werden. Bis zur Übersetzung in cDNA wurde die RNA bei -80°C gelagert.

4.6.2.3 Reverse Transkription der mRNA zu cDNA

Zur Übersetzung der mRNA in die cDNA wurde folgender Reaktionsansatz (Tabelle 3) für die reverse Transkription verwendet (Omniscript RT-Kit, Qiagen):

Tabelle 3: Mastermix für die qPCR

<u>Mastermix (20 µl Ansatz/ Probe)</u>	
2,0 µl	10xRT-Puffer
2,0 µl	dNTP-Mix
2,0 µl	Oligoprimer
1,0 µl	RNase-Inhibitor (1:4 verdünnt)
7,0 µl	Wasser, RNase frei
<u>1,0 µl</u>	<u>Omniscript-Reverse-Transkriptase</u>
<u>15 µL</u>	<u>Gesamtvolumen</u>

Die zu übersetzende Probe (5 µL) wurde in ein PCR-Reaktionsgefäß vorgelegt, 15 µL Mastermix zugegeben und anschließend gut durchmischt. Die Übersetzung der mRNA erfolgte im Thermocycler (MJ Research Inc., Watertown, Mass., USA) für 60 Min bei 39°C, gefolgt von 3 Min bei 95°C (Temperatur bis zum Einfrieren der Proben: 4°C). Als Kontrollen wurden ein Blindansatz ohne Probe, sowie ein Ansatz ohne die reverse Transkriptase parallel behandelt.

Bis zur Verwendung der cDNA-Proben für die qPCR wurden diese bei -20°C gelagert.

4.6.2.4 Primerdesign

Um die spezifische Genexpression bestimmen zu können, muss die in der PCR zu amplifizierende Gensequenz mit Hilfe von spezifischen Primern markiert werden, damit die Taq-DNA-Polymerase nur eine definierte cDNA kopiert. Hierzu musste beim Design der Primer darauf geachtet werden, dass bei der gewählten Anlagerungstemperatur eine möglichst geringe Fehl- oder Eigenbindung der Primer zu erwarten war. Außerdem sollte nach Möglichkeit einer der Primer Exon-überspannend binden, um eine Selektivität der Primer für mRNA zu erreichen. War ein solches Design nicht möglich, wurde die Spezifität des Amplifikates der PCR gesondert im Agarosegel überprüft.

Die Gensequenzen, für welche das Design der Primer erfolgte, wurden anhand der jeweiligen GenBank-Referenzen der Gene des 12K-Arrays der Genomdatenbank ENSEMBL (www.ensembl.org, URL: Stand 14.01.2006) entnommen. Soweit nicht andere Quellen angegeben sind, erfolgte das Design der Primer unter Verwendung der internetbasierten Designsoftware „Primer3“ (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi, URL: Stand 14.01.2006). Die Sequenzen der Primer, die in der qPCR verwendet wurden, sind in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4: Primersequenzen und Amplifikatgrößen

Gen-ID (HUGO)	5'- Sense-Primer-3'	5'-Antisense-Primer-3'	Produkt [bp]
PBGD [#]	CACACAGCCTACTTTCCAAGC	TTCAATGTTGCCACCACACT	155
IGFBP-3	CCTGCCGTAGAGAAATGGAA	GAAGGGCGACACTGCTTT	127
IGFBP-5	GAGCAAGTCAAGATCGAGAGAGA	GAAAGTCCCCGTCAACGTA	463
IGFBP-rP1	CTGCGAGCAAGGTCCTCCATA	CAGGTTGTCCCGGTCACCA	184
IGFBP-rP2 [§]	CCTGCAGGCTAGAGAAGCAGA	TGCACTTTTTGCCCTTCTTAATGT	90
IGFBP-rP4	ACACCAAGGGGCTGGAATG	TGGGGACACAGAGGAATG	193
LOXL2	CGGAGGATGTCGGTGTGGT	GCTTGCGGTAGGTTGAGAGG	150
OAZ1	AGGTGGGCGAGGGAATAG	ATGCGTTTGGCGTCTGTG	150
FOSL1	CAGGCGGAGACTGACAAA	GGGAAAGGGAGATACAAGGT	217
CDK4	TGCAGTCCACATATGCAACAC	CAGCCCAATCAGGTCAAAG	137

Die Tabelle gibt die Sequenzen der Primer an, die in der qPCR eingesetzt wurden. Das Primerdesign erfolgte eigenständig, basierend auf den für den 12K-Array angegebenen GenBank-Referenzen. Die jeweiligen Gensequenzen wurden von der Genomdatenbank Ensembl (www.ensembl.org) bezogen und das Primerdesign mit Hilfe der Primer3 Software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) durchgeführt (beide URLs: Stand 14.01.2006), sofern keine abweichenden Quellen genannt sind.

Die GenBank-Referenzen für die verwendeten Primer lauten: PBGD (NM_000190.2); IGFBP-3 (NM_000598), IGFBP-5 (M65062), IGFBP-rP1 (NM_001553), CTGF (NM_001901), Cyr61 (AF31385), LOXL2 (NM_002318), OAZ1 (U09202), FOSL1 (NM_005438), CDK4 (M14505).

[#] (Erpenbeck et al. 2003), [§] (Ning et al. 2004)

4.6.2.5 Amplifikation

Die cDNA wurde anschließend für die quantitative Echtzeit PCR (qPCR) mit dem Lightcycler eingesetzt (Lightcycler V1.0 bzw. V2.0, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Das Protokoll wurde dabei in Anlehnung an Erpenbeck et al. (2003) verwendet.

Der Reaktionsansatz für die Amplifikation enthielt 2 µL des PCR-Mastermixes des eingesetzten, kommerziellen PCR-Kits (Lightcycler Fast-Start SYBR-Green I Kit, Roche), supplementiert mit 2,5 mmol/L Magnesiumchlorid, je 2 µL extern synthetisierter sense- und antisense-Primer (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) und 2 µL des externen Standards oder der jeweiligen cDNA-Probe, mit Wasser auf ein Endvolumen von 20 µL aufgefüllt.

Nach einem initialen Denaturierungsschritt zur Aktivierung der Taq-Polymerase bei 95°C für 10 Minuten, wurde die eigentliche PCR-Reaktion initiiert. Sie erfolgte in 45 Zyklen, wobei jeder Zyklus den Denaturierungsschritt für 1 Sekunde bei 95°C, das Annealing (Anlagerung der Primer an die cDNA) bei einer Temperatur von 68°C für 10 Sekunden und die Extension (72°C für 9 Sekunden) umfasste. Am Ende jedes Zyklus wurde die Fluoreszenz bei 530 nm in allen Proben gemessen. Aus der zweiten Ableitung der Amplifikationskurve berechnete die Lightcyclersoftware den Punkt der größten Steigungsänderung (*Crossing point*, Cp), der zur Quantifizierung der Genmenge herangezogen wurde (Abbildung 11 Abschnitt 8.3).

4.6.2.6 Qualitätskontrolle der Primer - Schmelzkurven

Die erste Kontrolle der Spezifität der Primer wurde während der qPCR selbst durchgeführt. Am Ende eines PCR-Laufes, wurde mit dem Lightcycler eine sog. Schmelzkurve erstellt. Dazu wurden die Proben zunächst vollständig denaturiert (auf 90°C erhitzt) und anschließend renaturiert (Abkühlung auf 60°C). In diesem Zustand lagen alle PCR-Produkte als doppelsträngige DNA mit eingelagerten SYBR-Green-Molekülen vor. Folglich war das Fluoreszenzsignal auf seinem Maximum. Nun wurde kontinuierlich die Fluoreszenz in allen Proben aufgenommen, während die Temperatur sich gleichmäßig erhöhte (0,1°C pro Sekunde). Der Punkt der größten Abnahme der Fluoreszenz zeigt die Temperatur an, bei der das PCR-Produkt dissoziiert und plötzlich die eingelagerten SYBR-Green-Moleküle freisetzt. Ein solcher Abfall der Fluoreszenz im Bereich von >80°C zeigt ein spezifisches PCR-Produkt an. Ein Abfall der Fluoreszenz bei niedrigeren Temperaturen zeigt z.B. Primerdopplungen (Dimere) an. Allerdings läßt ein einzelner Temperaturabfall in der Schmelzkurve keine Rückschlüsse zu, ob sich auch das gewünschte Produkt bei der PCR gebildet hat, oder ob ggf. ein unspezifisches Produkt entstanden ist (Abbildung 10 in Abschnitt 8.3).

Zur dieser weiteren Kontrolle der Primer wurde das Produkt einer Amplifikation in einem 1,75%-igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Anhand eines ebenfalls aufgetrennten Molekulargewichtsmarkers konnte die Länge des Produktes bestimmt und mit der zu erwartenden Länge verglichen werden. Insbesondere Kontaminationen mit DNA konnten so ausgeschlossen werden, auch wenn die Primer nicht so konstruiert werden konnten, dass sie gleichzeitig links und rechts eines Introns der DNA binden würden.

4.6.2.7 Herstellung der Kalibrationsreihen (Standardreihen)

Zur Herstellung einer Kalibrationsreihe für die Abundanz eines Genes wurde mit dem entsprechenden Primerpaar eine cDNA humaner Lungenfibroblasten in 45 Zyklen amplifiziert und das Amplifikat gereinigt (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche Diagnostics GmbH Penzberg, Deutschland). Dazu wurde das PCR-Produkt durch Zentrifugation aus der über Kopf gestellten PCR-Kapillare entfernt und mit 80 µL PCR-Wasser aufgefüllt. Zu dieser Probe wurden 5 Volumina (500 µL) des Bindepuffers (Herstellerangaben: 3 M Guanidiniethiozyanat, 10 mM Tris-HCl, 5 % (v/v) Ethanol, pH 6,6) zugegeben und gemischt. Anschließend wurde die Probe auf eine Reinigungssäule mit einer Glasfasermatrix verbracht. Nach Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge wurde das Zentrifugat verworfen und die Säule zunächst mit 500 µL Waschpuffer (Herstellerangaben: 80 % Ethanol; 20 mM Natriumchlorid; 2 mM Tris-HCl; pH 7,5) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) und Entfernung des Zentrifugats wurde erneut mit 200 µL Waschpuffer gewaschen. Ebenfalls nach Zentrifugation und Verwerfen des Zentrifugats wurde das an die Glasfasern gebundene PCR-Produkt mit Elutionspuffer (Herstellerangaben: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5) eluiert und in einem frischen Reaktionsgefäß aufgefangen.

Die gereinigten PCR-Produkte wurden mit PCR-Wasser für 10-fach-Verdünnungsreihen eingesetzt. Die Verdünnungsstufen bildeten die Grundlage für die Erstellung einer Standardkurve. Hierzu wurden die einzelnen Verdünnungen jeweils als Probe für die qPCR eingesetzt und der Cp der jeweiligen Verdünnung aufgenommen.

Aus den Verdünnungsstufen, deren Amplifikation linear erfolgte, wurde die jeweilige Standardkurve erstellt, auf die die spätere Quantifizierung der Genexpression bezogen wurde (Abbildung 11 und 12 in Abschnitt 8.3).

Die resultierenden C_p der jeweiligen Verdünnung ergaben schließlich eine Kalibrationsreihe für das jeweilige Zielgen.

4.6.2.8 Ergebnisse: Genexpressionsdaten aus der qPCR

Zur Überprüfung der Genexpression, die im Array beobachtet wurde, wurden Fibroblasten von 10 Patienten mit und 9 Patienten ohne Emphysem erneut bis Passage 2 gezüchtet, geerntet und in 6-Lochplatten für zwei weitere Tagen wachsen gelassen. Die RNA Proben wurden direkt aus den 6-Lochplatten mit RNA-Puffer geerntet und die RNA extrahiert und in cDNA übersetzt. Wegen zu geringer RNA-Mengen in einem Fall konnten nur 9 vs. 9 Patienten für die Genexpressionsanalyse betrachtet werden. Die cDNA wurde anschließend für die Quantifizierung der Genexpression mit dem Lightcycler (V1.0 bzw. 2.0) nach obigem Protokoll eingesetzt. Die Genexpression der jeweiligen Probe wurde anhand der Standardkurve des jeweiligen Genes und eines *house-keeping*-Genes bestimmt und über die gemessene Expression eines externen Kalibrators für jedes Gen in der jeweiligen Amplifikation normalisiert (RelQuant V1.01, Roche).

Die Subkollektive der Patienten, an deren Fibroblasten die Quantifizierung der Genexpression durchgeführt wurde, unterschieden sich nicht signifikant in BMI und Alter, wohl aber in den funktionellen Parametern (Emphysem: $n=10$, Alter 65,5 (58; 70) J, FEV_1 39,6 (34,2; 46,0) %Soll, ITGV 175,5 (165,8; 193,9) %Soll; Kontrollen: $n=9$, Alter 65 (59; 67) J, FEV_1 98,2 (83,9; 103,3) %Soll, ITGV 103,6 (94,4; 104,4) %Soll). Die vollständige Charakterisierung ist in Abschnitt 8.1 (Tabelle 11) wiedergegeben.

Die Überprüfung der Genexpression aus dem explorativen cDNA-Array mit der qPCR wurde für 9 Gene durchgeführt. Bei sieben der getesteten Gene (IGFBP-5, IGFBP-rP2 und -rP4, FOSL1, LOXL2, OAZ1 und CDK4) konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede der Regulation mit der qPCR ermittelt werden (Tabelle 5). Bei einigen dieser Gene war ein Trend zu beobachten, der eine ähnliche Regulation wie im cDNA-Mikroarray vermuten ließ. Obwohl die Expression auf dem Array für IGFBP-rP2 (CTGF) und -rP4 (Cyr61) eher marginal war, konnte in der qPCR allerdings ein hinreichendes Signal gemessen werden, wobei es einen Trend ($p=0,07$) hin zur Aufregulation des IGFBP-rP2 im Emphysem gab. Für zwei Gene ließen sich die Ergebnisse des 12K-Glassarrays bestätigen. Die mRNAs für IGFBP-3 und IGFBP-rP1 wurden auch mit der qPCR beim Emphysem signifikant aufreguliert gefunden (Abbildung 9, Tabelle 5).

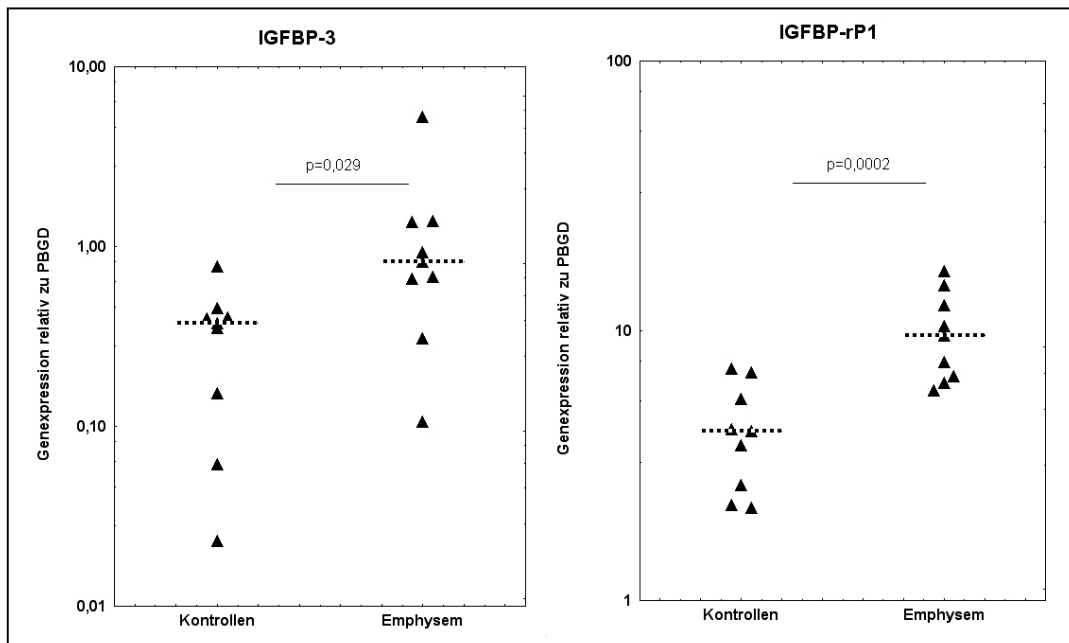


Abbildung 9: Genexpressionsdaten für IGFBP-3 und IGFBP-rP1

Relative Expression der Zielgene nach qPCR bei Kontrollpatienten und Patienten mit einem Emphysem. Die Datenpunkte repräsentieren die normalisierten Ratios der Genexpression relative zur Expression von PBGD und sind für die Kalibratoren der qPCR korrigiert (gestrichelte Linie: Medianwert). Die Werte sind auf einer logarithmieren Skala angegeben. linke Spalte: IGFBP-3 Expression, rechte Spalte: IGFBP-rP1 Expression.

Tabelle 5: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse

Genname (Alias)	cDNA -Array Ratio (E/K)	qPCR		p-Wert
		Kontrollen	Emphysem	
IGFBP-3	1,3	0,38 (0,15; 0,40)	0,82 (0,66; 1,36)	0,029 *
IGFBP-5	0,19	115,0 (60,5; 161,0)	73,6 (49,0; 159,0)	0,51
IGFBP-rP1 (IGFBP-7)	4,87	4,25 (2,67; 5,59)	9,6 (6,77; 12,4)	0,002 **
IGFBP-rP2 (CTGF)	n.b.	2,97 (1,68; 4,25)	4,40 (3,86; 4,99)	0,070
IGFBP-rP4 (Cyr61)	0,84	258 (222; 329)	198 (185; 322)	0,57
LOXL2	3,88	1,27 (0,73; 1,79)	1,41 (1,22; 1,92)	0,63
OAZ1	0,15	0,22 (0,17; 0,25)	0,18 (0,18; 0,25)	0,96
FOSL1 (Fra1)	0,21	0,89 (0,63; 1,16)	1,00 (0,78; 1,34)	0,57
CDK4	0,16	0,91 (0,58; 1,18)	0,73 (0,53; 0,78)	0,63

Die Spalte "cDNA-Array" gibt die differentielle Genexpression der cDNA in dem explorativen 12K-Arrayexperiment als Ratio von Emphysem zu Kontrollen an. Die "qPCR" Spalten zeigen die Genexpression des Zielgens relativ zur Expression des *house-keeping*-Genes (PBGD) in den Fibroblasten der Patienten mit und ohne Emphysem. Die angegebenen Werte sind Mediane (Quartile) der normalisierten Ratios aus der Analyse mittels der RelQuant Software, die zusätzlich um das Verhältnis der qPCR-Kalibratoren berichtigt wurden, um einen groben Eindruck der Abundanz der cDNA zu erhalten. Die p-Werte beziehen sich auf den Vergleich der qPCR-Ergebnisse zwischen den beiden Gruppen und wurden mit den Mann-Whitney U-Test berechnet. *p<0,05, **p<0,01, n.b. nicht bestimmbar.

4.7 Proteinexpression – ELISA für sezerniertes IGFBP-3

Um die Menge des von den Fibroblasten produzierten und in das Zellkulturmedium freigesetzten (sezernierten) IGFBP-3 bestimmen zu können, wurden die untersuchten Fibroblastenkulturen mit Zellkulturmedien ohne FCS für 72 Stunden inkubiert. Das durch die Zellen konditionierte Medium wurde abpipettiert und in Flüssigstickstoff schockgefroren, bevor es bei -80°C bis zur Proteinfällung eingelagert wurde. Für den ELISA wurden Aliquote der konditionierten Zellkulturmedien eingesetzt.

Die Gesamtproteinmenge in den Proben wurde bestimmt, um eine Bezugsgröße für den Anteil des IGFBP-3 zu ermitteln, da es in diesen Versuchen, bei denen die Zellen selbst im Kulturgefäß lysiert wurden, um ihre RNA zu erhalten, nicht möglich war, die genaue Zellzahl in der konditionierenden Kultur zu bestimmen. Für diese Bestimmung musste ein Aliquot des konditionierten Mediums gesondert aufbereitet werden.

4.7.1 Gesamtproteinbestimmung

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts der jeweiligen Probe als Bezugsgröße, wurden die Proteine aus einem Aliquot mit Aceton (-20°C) für 1 Stunde bei 4°C gefällt, für 10 Minuten bei $17860 \times g$ zentrifugiert und das Pellet anschließend Aceton (80 %, -20°C) gewaschen. Hierzu wurde die Probe für 20 Minuten bei 4°C inkubiert, dann erneut zentrifugiert und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Für die Gesamtproteinbestimmung wurden die Pellets jeweils in $25 \mu\text{L}$ SDS-Lösung (1 % w/v) aufgelöst (1 Stunde bei Raumtemperatur) und für den Bicinchoninsäure-(BCA)-Assay eingesetzt (Smith et al. 1985).

Der BCA-Assay verwendet eine BCA-Lösung (1 % (w/v) Bicinchoninsäure, 2 % (w/v) Dinatriumcarbonat, 0,16 % (w/v) Natriumtartrat, 0,4 % (w/v) Natriumhydroxid, 0,95 % (w/v) Natriumhydrogencarbonat in Wasser, pH 11,25) und eine Kupferlösung (4 % (w/v) Kupfersulfat in Wasser) für den Nachweis, die im Verhältnis von 50:1 zum eigentlichen Nachweisreagenz gemischt werden. Für den Nachweis wurden $10 \mu\text{L}$ Probe mit $200 \mu\text{L}$ Nachweisreagenz vermischt und in einer Mikrotiterplatte bei 60°C für 30 Minuten inkubiert. Die Absorption der gefärbten Proteinlösung dieses Assays wurde bei 550 nm im Mikrotiterplattenleser vermessen. Die Quantifizierung der Gesamtproteinmenge erfolgte anhand einer Kalibrationsreihe von Rinderserumalbumin in SDS-Lösung (1 %) für einen Konzentrationsbereich von 5-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.7.2 ELISA für IGFBP-3

4.7.2.1 Methode

Zur Detektion von IGFBP-3 in den Zellkulturüberständen von 6-Lochplatten wurden das konditionierte Medium von den Fibroblasten nach 3 Tagen Konditionierung ohne FCS im Kulturmedium gesammelt und bei -80°C bis zur Untersuchung des Proteingehaltes gelagert. Zum Einsatz kam der *human IGFBP3 Duoset*-ELISA (R&D Systems, Wiesbaden, Germany).

Um diesen ELISA durchführen zu können, musste eine Mikrotiterplatte vorbehandelt werden. Hierzu wurde der Antikörper gegen IGFBP-3 auf seine Gebrauchskonzentration mit PBS (1x) verdünnt und jede benötigte Kammer einer Mikrotiterplatte mit jeweils $100 \mu\text{L}$ dieser Arbeitslösung beschickt. Die Platte wurde mit Klebefilm versiegelt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die überschüssige Antikörperlösung wurde abgesaugt und die

Kammern dreimal mit je 400 µL Waschpuffer gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde die Platte jeweils auf Papiertücher ausgeschlagen. Zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungen wurde die Platte mit 300 µL Blockierungspuffer je Loch für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Zur Durchführung des eigentlichen Assays wurden 100 µL der Probe oder der Standards aufgetragen, unter Klebefilm für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut dreimal gewaschen. Danach wurden 100 µL Detektionsantikörper zugegeben und für 2 Stunden inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde mit 100 µL Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Lösung pro Loch für 20 Minuten inkubiert. Zum Abbruch der Farbreaktion wurden je Probe 50 µL Schwefelsäure. Die Messung der Absorption der Proben erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm in Mikrotiterplattenlesegerät.

4.7.2.2 Ergebnisse

Von den Zelllinien, die für die qPCR-Analysen angezogen worden, standen auch Zellkulturüberstände für die Messung von IGFBP-3 zur Verfügung, die während 3tägiger Inkubation ohne FCS von den Fibroblasten konditioniert worden waren. Das Medium ohne FCS wurde gewählt, um ein möglicherweise störender Einfluß des Kälberserums auf den Nachweis zu vermeiden. Eine ebenfalls potentiell interferierende Präsenz von IGF-I oder IGF- II wurde anhand der fehlenden Expression dieser Gene in den Mikroarray-Experimenten ausgeschlossen.

Die Subkollektive der Patienten, deren Lungenfibroblasten auf die Sezernierung des IGFBP-3 hin untersucht wurden, unterschieden sich nicht signifikant in BMI (Größe und Gewicht) und Alter, wohl aber in den funktionellen Parametern (Emphysem: n=10, Alter 65,5 (58; 70) J, FEV₁ 39,6 (34,2; 46,0) %Soll, ITGV 175,5 (165,8; 193,9) %Soll; Kontrollen: n=10, Alter 63,5 (54; 67) J, FEV₁ 94,8 (83,9; 103,3) %Soll, ITGV 103,8 (94,4; 110,0) %Soll). Die vollständige Charakterisierung ist in Abschnitt 8.1 (Tabelle 6) wiedergegeben).

Der Median (Quartile) der sezernierten Proteinmenge lag bei 1619,6 (1024,1; 2937,0) pg/mg Gesamtprotein für das konditionierten Medium der Fibroblasten von Patienten mit Emphysem und bei 505,8 (288,9; 779,7) pg/mg Gesamtprotein im Medium der Fibroblasten der Kontrollpatienten und war somit für das Emphysem signifikant erhöht (p=0,005).

Bei einer Kontrollkultur und bei zwei Fibroblastenkulturen von Patienten mit Emphysem war kein IGFBP-3 im Zellkulturmedium nachweisbar.

4.8 Unabhängigkeit der Untersuchungsergebnisse vom biologischen Alter

Da die Arbeitshypothesen und die Ergebnisse dieser Arbeit einen Bezug des Phänotyps der Fibroblasten beim Emphysem mit einer Alterung dieser Zellen herstellten, wurde der Einfluss des biologischen Alters auf die Ergebnisse untersucht. Weder für das Gesamtkollektiv noch für die Teilgruppen der Patienten, die für die Untersuchung der einzelnen Parameter herangezogen wurden, gab es eine signifikante Korrelation zwischen dem biologischen Alter der Patienten und der Verdopplungszeit, die diese Zellen in Kultur zeigten.

4.9 Statistik

Aufgrund der stark streuenden Verteilung der meisten Variablen, wurden Median und Quartile zur Beschreibung der Daten verwendet. Entsprechend wurde der Mann-Whitney U-Test für den Vergleich der Gruppen und der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman zur Quantifikation von Korrelationen verwendet. Eine statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen. Die statistischen Auswertungen erfolgten mittels Statistika für Windows 5.1 (Statsoft, Tulsa, USA).

5. Diskussion

Die Noxe Zigarettenrauch stellt eine erhebliche Belastung für den Organismus dar und ist in Form von Passivrauch auch eine zentrale Komponente der Umweltbelastung, der die Atemwege ausgesetzt sind. Als Folge der langjährigen Inhalation von Zigarettenrauch kann sich ein Lungenemphysem entwickeln, welches als großräumige, irreversible Zerstörung der Lungenbläschen zutage tritt. Die Mechanismen, die dieser Erkrankung zugrunde liegen und die unterschiedliche Suszeptibilität verschiedener Individuen bedingen, sind im einzelnen trotz einer Vielzahl von Daten ungeklärt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beleuchten diese Erkrankung unter einem neuartigen Aspekt und haben das Potential, zu einem tieferen Verständnis der Mechanismen beizutragen, die der Entwicklung eines Lungenemphysems zugrunde liegen bzw. sie vorantreiben. Sie stützen die Hypothese, dass parenchymale Lungenfibroblasten bei dieser Erkrankung einen dauerhaft veränderten Phänotyp zeigen und dieser Phänotyp charakteristische Zeichen einer induzierten Seneszenz zeigt. Die zelluläre Seneszenz war phänomenologisch durch eine reduzierte Proliferationsrate und die Ausprägung eines Seneszenzmarkers bei unveränderten Telomerenlängen gekennzeichnet. Änderungen in der Expression von Insulin- und IGF-bindenden Proteinen legten darüber hinaus eine Ankopplung an systemische Faktoren nahe, die die Entstehung der Erkrankung zusätzlich begünstigen könnten. Auf der Basis pathophysiologischer Befunde und Überlegungen geben diese Daten der Hypothese zusätzliches Gewicht, dass persistierende Veränderungen des Phänotyps der Lungenfibroblasten an der Pathogenese des Lungenemphysems ursächlich beteiligt sind und bei Überlegungen zu einer kausalen Therapie dieser Erkrankung berücksichtigt werden sollten .

Im einzelnen konnte gezeigt werden, dass sich Fibroblasten, die aus emphysematös verändertem Lungenparenchym gewonnen wurden, in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit in Kultur signifikant von solchen Fibroblasten unterschieden, die von Patienten ohne Lungenemphysem stammten. Die Zellen wiesen nicht nur eine geringere Verdopplungsrate auf, sondern erreichten auch insgesamt eine geringere kumulative Zahl von Verdopplungen, bis ihr Wachstum in Kultur zu einem Stillstand kam. Ein solches Verhalten ist für gealterte bzw. alternde Zellen typisch. Diese Befunde können nicht als akute Wirkungen des Zigarettenrauchens interpretiert werden, da sich die Zellen unter standardisierten Kulturbedingungen befanden und die Zahl der gerauchten Zigaretten in der Gruppe der Patienten mit Lungenemphysem und der Gruppe ohne Lungenemphysem ähnlich war.

Über die Reduktion der Proliferationsrate hinaus konnte gezeigt werden, dass die Fibroblasten beim Emphysem vermehrt Anzeichen für einen seneszenten Phänotyp aufwiesen, wenn man die Expression eines gut eingeführten Seneszenzmarkers heranzog. Die Zellen der Patienten mit Lungenemphysem ließen sich gegenüber den Kontrollzellen vermehrt für die Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase anfärben. Ferner exprimierten sie auf der Ebene der mRNA einige Gene verstärkt, die nach vorliegenden Daten mit einer zellulären Seneszenz assoziiert sind (insulin-like growth factor-binding proteins, IGFBP-3 und IGFBP-rP1). Das IGFBP-3 schien außerdem auf Proteinebene aufreguliert vorzuliegen und wurde vermehrt in konditionierten Zellkulturmedien der Fibroblasten von Patienten mit Emphysem gefunden. Darüber hinaus ergaben sich aus einer Genchip-Analyse Hinweise auf eine Reihe weiterer Gene, die beim Emphysem anders als bei den Kontrollpatienten exprimiert waren und möglicherweise ebenfalls als Kennzeichen eines seneszenten Phänotyps der Fibroblasten gelten müssen.

Als wesentlicher Befund ergab sich, dass die Telomerenlängen bei Fibroblasten von Patienten mit Lungenemphysem nicht verkürzt waren im Vergleich zu den Fibroblasten der Kontrollpatienten. Daher hatten die Mechanismen, die zu dem beobachteten seneszenten Phänotyp, insbesondere der reduzierten Proliferationsrate, geführt haben, die Verkürzung der Telomere weder als notwendige Voraussetzung noch als notwendige Folge. Sie müssen daher unter den zellulären Reaktionswegen gesucht werden, die eher zu einer induzierten im Gegensatz zu chronologischen Seneszenz passen, da die chronologische Seneszenz in der Regel mit einer Telomerenverkürzung einhergeht oder darauf beruht.

Im folgenden wird die Bedeutung der einzelnen in dieser Untersuchung erhobenen Messgrößen sowie der Einfluss von physiologischen Bedingungen und möglichen Artefakten auf die beobachteten Ergebnisse im Detail diskutiert.

5.1 Wachstum

Ein grundlegendes Ergebnis dieser Arbeit war die Beobachtung, dass die Lungenfibroblasten der Patienten mit Emphysem sich langsamer replizierten als die Fibroblasten der Kontrollpatienten ohne Emphysem. Diese Beobachtung wirft die Frage auf, an welchen Schaltstellen der Ablauf der Zellteilung verlangsamt gewesen sein könnte.

Bekanntlich vollzieht sich die Replikation einer Zelle in einem Regelkreis mit definierten Abläufen und Kontrollmechanismen zu definierten Zeitpunkten, dem sog. Zellzyklus. Im Gewebeverbund liegen viele Zellen, so auch die Lungenfibroblasten, in einem ruhenden Zustand vor (G_0 -Phase des Zellzyklus), aus dem sie zur Zellteilung stimuliert werden können. Diese Stimulation erfolgt u.a. durch Gewebeschäden in der näheren Umgebung oder durch andere mitogene Stimuli. Werden sie zur Zellteilung angeregt, treten sie asynchron wieder in den Zellzyklus ein. Sie beginnen dabei in der sog. Gap1- (G_1) Phase, in der die Zelle wächst und die DNA-Synthese vorbereitet wird, welche in der sich anschließenden S-Phase stattfindet. Es schließt sich die G_2 -Phase an, in der die eigentliche Zellteilung vorbereitet und die synthetisierte DNA auf Fehler überprüft wird. In der folgenden M-Phase findet die eigentliche Teilung der Zelle, die Mitose, statt (Krauss 1997).

Unter den Zellkulturbedingungen, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, ergibt sich der erste Stimulus für das Wachstum der Fibroblasten durch die Explantation des Gewebes und dessen Zerkleinerung für die Primärkultur, da hierbei notwendigerweise etliche Zellen zerstört werden. Dieser Reiz reicht allerdings für sich genommen nicht aus, um die Kultur zu etablieren. In Zellkulturmedium ohne Wachstumsfaktoren vermehren sich demgemäß die Fibroblasten nicht. Erst durch Zugabe verschiedener Wachstumsfaktoren, die beispielsweise im fötalen Kälberserum (FCS) enthalten sind, kann ein Wachstum der Zellen initiiert werden (Lindl 2002).

Da es sich bei dem FCS um ein Naturprodukt handelt, sind Unterschiede zwischen Produkten verschiedener Firmen oder den Chargen ein und desselben Lieferanten nicht auszuschließen. In dieser Arbeit wurde nur FCS aus einer Charge verwendet, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse möglichst weitgehend zu gewährleisten.

Die Verwendung von 10 % FCS für Zellkulturen ist weit verbreiteter (Lindl 2002). Es ist bekannt und wegen der Präsenz von Wachstumsfaktoren verständlich, dass die Proliferationsrate von der Menge des Serums im Medium abhängt (Jordana et al. 1988). In dieser Untersuchung wurde eine Konzentration von 10 % FCS verwendet, da auf diese Weise die Proliferationsassays durch das relativ starke Wachstum der Zellen mit höherer Genauigkeit als bei kleineren Wachstumsraten durchzuführen waren. Ungeachtet dessen muss man eine Konzentration von 10 % FCS als eine starke, unspezifische und auch durchaus unphysiologische Stimulation der Fibroblasten ansehen und bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigen. Grundsätzlich besteht also die Möglichkeit, dass bei niedrigeren FCS-Konzentrationen andere Ergebnisse erhalten worden wären. Die im folgenden Paragraphen diskutierten Ergebnisse lassen jedoch als wahrscheinlich erscheinen, dass auch in diesem Fall der Unterschied zwischen den Zellen der beiden Patientengruppen erhalten geblieben wäre.

Bei der Durchführung der Langzeitkulturen wurden die Populationsverdopplungen auch in Anwesenheit von 1 % FCS erfasst. Während die Zellen der Kontrollpatienten immer noch, wenn auch limitierte, Populationsverdopplungen zeigten, ließ sich bei den Fibroblasten von Patienten mit Emphysem keine oder praktisch keine Proliferation feststellen. Hieraus lässt sich ableiten, dass insbesondere die Fibroblasten der Patienten mit Emphysem einen stärkeren mitogenen Stimulus zur Induktion der Proliferation benötigen als die Fibroblasten der Kontrollpatienten. Ihre Reaktion auf externe Stimuli schien somit bei 1 und 10 % FCS proportional reduziert. In jedem Fall bedurfte die Anzucht einer ausreichenden Zahl von Zellen für die Versuche des stärkeren Stimulus von 10 % FCS und wäre unter Verwendung von 1 % FCS nicht möglich gewesen.

5.1.1 Basale Wachstumsgeschwindigkeit

Das durch FCS stimulierte Wachstum der Lungenfibroblasten der Kontrollpatienten lag in einer ähnlichen Größenordnung wie zuvor für Fibroblastenkulturen beschrieben. Für eine exemplarische Zelllinie adulter humaner Fibroblasten wurde eine mittlere Zeit von 19,8 Stunden zwischen den Verdopplungen berichtet (Absher 1995). Die Verdopplungszeiten, die in der vorliegenden Arbeit ermittelt wurden, lagen etwas höher; dies war möglicherweise auf das höhere Alter der Spender sowie schwer erfassbare Unterschiede in den Zellkulturbedingungen zurückzuführen. Ein Vergleich von absoluten Wachstumsraten zwischen verschie-

denen Arbeitsgruppen, im Gegensatz zum Vergleich relativer Raten, ist damit immer anfechtbar. In jedem Fall müssen die jeweils verwendeten Kulturbedingungen soweit als möglich identisch sein.

Parallel zur Bestimmung des Wachstums mittels der Zellzählung wurden im Rahmen dieser Arbeit Versuche unternommen, die Wachstumsrate der Fibroblasten über den Einbau von 5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU) in die DNA zu messen. Mit diesem Verfahren ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Einbaurrate von BrdU in die DNA der Fibroblasten zwischen den Gruppen detektieren (Daten nicht näher dargestellt), so dass dieses Verfahren zu Gunsten der direkten Zellzählung als Messgröße der Proliferation verworfen wurde. Ob im vorliegenden Fall ein mehrfacher Einbau von BrdU in die DNA möglicherweise schneller Teilpopulationen der Fibroblasten stattgefunden hat, der die Unterschiede verwischt hat, oder ob anderen Faktoren zu diesem Ergebnis beigetragen haben, konnte nicht geklärt werden. Bemerkenswert erscheint in jedem Fall, dass mit einer ähnlichen Technik ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der basalen BrdU-Inkorporation zwischen Lungenfibroblasten von acht Patienten mit und ohne Emphysem gefunden wurde (Noordhoek et al. 2003). Nach den Erfahrungen der vorliegenden Untersuchung ist die direkte Zellzählung zwar aufwendiger, aber zuverlässiger als der BrdU-Einbau. Dies deckt sich mit Berichten anderer Arbeitsgruppen (mündliche Mitteilung).

Die Ergebnisse von Proliferationsassays müssen somit immer vor dem Hintergrund der verwendeten Messmethode und der betrachteten, ggf. nicht statistisch repräsentativen Fallzahl interpretiert werden und lassen sich nicht unbedingt direkt miteinander vergleichen. Während Nobukuni et al. (2002) für ein Kollektiv von jeweils nur 3 Patienten mit und ohne Emphysem einen nicht-signifikanten Trend in Richtung auf ein reduziertes Wachstum beim Emphysem anhand der Zellzählung berichteten, ergaben die eigenen Daten (n=10 je Gruppe) eine statistisch signifikante Reduktion des Wachstums beim Emphysem (Holz et al. 2004).

Die vorliegende Arbeit erweitert diese Beobachtung auf ein Kollektiv von 14 Patienten mit einem Emphysem im Vergleich zu 15 Patienten ohne Emphysem. Weitere Faktoren, die bei der Untersuchung einer progressiven Erkrankung berücksichtigt werden müssen, sind die jeweiligen klinischen Charakteristika der eingeschlossenen Patienten, da der Schweregrad der Erkrankung sowie schwer differenzierbare Subtypen des Emphysems bei ähnlicher Diagnose möglicherweise direkten Einfluss auf die Ergebnisse haben.

Das in dieser Arbeit beobachtete verminderte Wachstum legt eine Veränderung des Phänotyps der Fibroblasten beim Emphysem nahe. Da die Versuche unter standardisierten Zellkulturbedingungen stattfanden, welche die mit der Erkrankung assoziierte entzündliche Umgebung im menschlichen Organismus ausschlossen, lässt sich folgern, dass die Fibroblasten bei Patienten mit einem ausgeprägten Lungenemphysem in dauerhafter Weise verändert sind. Derartige dauerhafte Veränderungen sind nicht ungewöhnlich, da die Differenzierung von Zellen in verschiedene Zelltypen sowie der geordnete Ablauf der Ontogenese und die dauerhafte Programmierung zellulärer Reaktionsmuster ähnliche, Persistenz gewährleistende und vermutlich epigenetische Mechanismen zur Voraussetzung haben.

Vergleichbar mit den Studien anderer Arbeitsgruppen (Nobukuni et al. 2002; Noordhoek et al. 2003) erfolgten die Zellkulturassays in der vorliegenden Arbeit unter definierten

Kulturbedingungen nach Primärkultur. Alle Gewebeprobe wurden aus Bereichen entnommen, die so weit wie möglich von dem soliden Tumor entfernt waren, der der Grund des operativen Eingriffs war. Ferner wurden alle Entnahmestellen mit besonderer Genauigkeit auf makroskopische strukturelle Abnormalitäten untersucht. Obwohl es prinzipiell nicht möglich ist, eventuelle Effekte des Lungentumors auf die kultivierten Zellen auszuschließen, läßt diese Vorgehensweise einen derartigen Einfluß unwahrscheinlich erscheinen, zumal es keinen Unterschied in der TumorgroÙe und Klassifikation zwischen den Gruppen gab. Die beobachteten Unterschiede scheinen also den Fibroblasten des Lungengewebes unabhängig vom Tumor innewohnen.

Dennoch könnte man einwenden, dass die beobachteten Unterschiede zwischen den Patientengruppen auf Unterschieden beruhten, die während des primären Auswachsens der Zellen aus der Gewebeprobe auftraten. Um diesen möglichen Einflussfaktor zu vermeiden, wurde versucht, die Menge des eingesetzten Gewebes für die Primärkultur, die Zelldichte vor der ersten Passagierung und die Dauer der Primärkultur soweit wie möglich zu standardisieren. Die Zeit in Primärkultur unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen, mit der Ausnahme, dass die beiden Kulturen (beide von Patienten mit Emphysem), die die höchsten Verdopplungszeiten aufwiesen, auch die längste Zeit in Primärkultur verbrachten. Daher wäre es schlüssig, anzunehmen, dass Fibroblasten, die in Passage 2 eine geringere Proliferationsrate zeigten, auch in Primärkultur langsamer wuchsen. Leider war es nicht möglich, die Teilung individueller Zellen ohne einen Eingriff in die Zellkulturbedingungen zu beobachten. Grundsätzlich lässt sich die Möglichkeit nicht ausschließen, dass bei diesen beiden Patienten weniger Zellen aus dem Gewebe herausgewachsen sind und sie folglich eine größere Zahl von Teilungen vollziehen mussten, bevor sie in die anschließenden Proliferationsuntersuchungen einbezogen werden konnten. Selbst bei Ausschluss der Daten dieser beiden Patienten aus der Analyse blieb jedoch der Unterschied in der Verdopplungszeit zwischen den Gruppen statistisch signifikant ($p=0,003$).

Weiterhin könnte man einwenden, dass bereits die Explantkultur zu einer Selektion der Zellen geführt hat, da die Fähigkeit der unterschiedlichen Zellarten bzw. der einzelnen Zellen einer Zellart zu migrieren, hier bereits als Selektionskriterium wirksam war. Dieses Phänomen wurde einerseits zur Reinigung der Kultur genutzt, könnte aber andererseits die Selektion einer Subpopulation von Fibroblasten, nämlich der wachstumsstärksten unter ihnen, begünstigt haben.

In diesem Fall ergäbe sich ein Szenario, in dem jeweils die potenteste Subpopulation der Zellen der Kontrollpatienten und der Zellen der Patienten mit Emphysem miteinander verglichen worden wären. Dennoch zeigte sich auch hier ein vermindertes Potential der Fibroblasten von Patienten mit einem Emphysem, sich zu replizieren. In einer Population mit einem unbekanntem Mischungsverhältnis von wachstumsstarken und weniger wachstumsstarken Fibroblasten werden die wachstumsstarken Zellen nach relativ kurzer Zeit dominieren; dieser Effekt ist um so stärker ausgeprägt, je heterogener die Fibroblastenpopulation ist und je mehr wachstumsschwache Zellen vorhanden sind. Man muss also davon ausgehen, dass selbst die wachstumsstärksten Fibroblasten der Patienten mit Emphysem immer noch geringeres Wachstum zeigten als die wachstumsstärksten Zellen der Kontrollpatienten oder eine Mischpopulation dieser Zellen, die primär schnell und mittelschnell wachsende Zellen enthielt.

5.1.2 Zelldifferenzierung

Die Proliferation einer Zellkultur hängt von vielen Faktoren ab. Da in dieser Arbeit ausschließlich humane Lungenfibroblasten zum Einsatz kamen, können Speziesunterschiede sowie Unterschiede zwischen verschiedenen Geweben ein und desselben Spenders als Einflussfaktoren ausgeklammert werden. Es verbleiben das Alter des Spenders und durch die zu untersuchende Erkrankung oder andere Vorerkrankungen bedingte Unterschiede in der Antwort der Fibroblasten auf die Stimuli der Zellkultur. Da diese Stimuli für die Kulturen beider untersuchten Gruppen gleich waren und kein signifikanter Unterschied im Alter zwischen den Gruppen bestand, ist zu folgern, dass die Unterschiede des Verhaltens der Zellen in diesen selbst begründet lagen.

Da die Anzucht von Fibroblasten aus Explantkulturen zunächst mit der Anwesenheit auch anderer Zellarten verbunden ist, insbesondere derjenigen bronchialer Epithelzellen und gewebeständiger Leukozyten, könnten unterschiedliche Anteile dieser Zellen, die sich in ihrem Proliferationsverhalten durchaus von demjenigen der Fibroblasten unterscheiden, zu Unterschieden des Wachstums der Gesamtkultur führen, sofern die Gesamtzahl der Zellen betrachtet wird. Auch sind durch Interaktion zwischen Zelltypen Beeinflussungen des Wachstums einzelner Zelltypen denkbar. Die Wachstumsversuche wurden in der vorliegenden Arbeit in Passage 2 nach Primärkultur durchgeführt. Durch spezifische Immunfärbungen der Zellen in Passage 1 ließ sich nachweisen, dass der Anteil von Zellen, die Kennzeichen nicht-fibroblastenartiger Zellen trugen, sehr gering war und sich zudem nicht zwischen den Gruppen unterschied. Folglich waren die Unterschiede des Gesamtwachstums der primär vertretenen Zellart, d.h. den Fibroblasten zuzurechnen.

Drei Arbeitsgruppen berichteten über eine erhöhte Apoptoserate der Zellen der Alveolarwand beim Lungenemphysem als möglicherweise grundlegendem Faktor, der eine gestörte Homöostase der alveolären Septen nach sich zieht (Aoshiba et al. 2003; Kasahara et al. 2001; Tudor et al. 2003). Betrachtet man, wie in der vorliegenden Arbeit, das Nettowachstum der Zellkultur als Kenngröße der Proliferation der Fibroblasten, so wäre prinzipiell denkbar, dass ein Absterben von Zellen durch Apoptose und/oder Nekrose die beobachteten Unterschiede der Verdopplungszeit verstärkt oder gar erst bewirkt haben könnte, sofern Apoptose und/oder Nekrose bei den Fibroblasten der Patienten mit einem Emphysem vermehrt aufgetreten sein sollten.

Da insgesamt eine sehr hohe Vitalität der Zellen und nur sehr wenige Zelltodereignisse gefunden wurden, zudem kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand, kann davon ausgegangen werden, dass zumindest im stationären Zustand, d.h. in Abwesenheit akuter, durch Entzündungszellen oder Noxen ausgelöster Effekte, Apoptose und Nekrose als ursächliche Faktoren für die beobachteten Unterschiede unwahrscheinlich sind. Welche Bedeutung allerdings eine akute, etwa durch Zigarettenrauch oder Entzündungszellen induzierte Apoptose und/oder Nekrose als zusätzlichem Faktor zukommt und welchen Einfluss dieser Faktor bei der Induktion des veränderten Phänotyps der Fibroblasten hat, lässt sich aus den vorliegenden Daten nicht erschließen.

5.1.3 Kryokonservierung

Der Unterschied in der Verdopplungszeit zwischen den Gruppen wurde an Zellen in Passage 2 nach Primärkultur bestimmt, die zwischenzeitlich nicht in Flüssigstickstoff gelagert worden waren. Der Unterschied war aber auch messbar, wenn Zellen derselben Patienten nach Kryokonservierung verwendet wurden. Abgesehen davon, dass Kryokonservierung zu einem geringfügigen Anstieg der mittleren Verdopplungszeit und einer Verbreiterung der Interquartilenabstände, d.h. einer Vergrößerung der Heterogenität zwischen den Zellkulturen, führte, gab es eine signifikante Korrelation zwischen den Zellteilungsraten vor und nach Kryokonservierung. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die Kryokonservierung zu keiner signifikanten Verzerrung der Ergebnisse geführt hat, da sie beide Gruppen gleichsinnig und in gleichem Umfang beeinflusste. Dieser Befund ist von besonderer Bedeutung für die gegenwärtigen und künftige Experimente, da es technisch nicht möglich ist, ohne Kryokonservierung zu arbeiten.

5.1.4 Langzeitwachstum

Nachdem basal in Passage 2 nach Primärkultur eine verminderte Wachstumsrate der Fibroblasten beim Emphysem beobachtet wurde, stellte sich die Frage nach den Faktoren, die hierfür ursächlich sein könnten.

Es ist bekannt, dass Fibroblasten während der *in-vitro*-Alterung ihre Reaktivität auf mitogene Stimuli (z.B. PDGF, EGF, Insulin, Transferrin und Dexamethason) verlieren (Phillips et al. 1984). Langsamer wachsende Fibroblasten könnten also einfach deshalb eine verminderte Reaktion auf das mitogene FCS zeigen, weil sie gealtert sind.

Wenn die Zellen von Patienten mit einem Lungenemphysem gealtert wären im Vergleich zu Zellen von Patienten ohne Emphysem, so sollte man erwarten, dass sie die Ruhephase (d.h. den stationären Zustand ohne weiteres Wachstum in serieller Kultur) früher erreichen als die Zellen der Kontrollpatienten.

Die Analyse der Wachstumsdynamik bis zur Stagnation der Proliferation ergab als erstes, dass der Unterschied der initialen Steigungen mit den Ergebnissen der früheren basalen Wachstumsversuche, die nur auf die Analyse dieser Steigungen ausgerichtet waren, übereinstimmte. Dies bestätigte den Befund, dass die Proliferationsraten bei Patienten mit Emphysem und Kontrollpatienten intrinsisch unterschiedlich sind.

Des Weiteren fand sich ein Trend hin zu einer geringeren kumulativen, maximalen Zahl der Populationsverdopplungen bei Fibroblasten von Patienten mit Emphysem, allerdings mit großer Heterogenität innerhalb der Gruppen. Da die Altersverteilungen der Gruppen sehr ähnlich waren, ist es unwahrscheinlich, dass das Alter einen signifikanten Effekt auf die Unterschiede des Wachstums hatte. Dies gilt um so mehr, als bei gesunden Spendern keine Beziehung zwischen dem Alter des Spenders und der replikativen Lebensdauer der Zellen in Kultur gefunden wurde (Cristofalo et al. 1998). Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass Zellen von Spendern mit verschiedenen Erkrankungen, darunter solchen, die mit einer vorzeitigen Alterung einhergehen, eine signifikant kürzere Lebensdauer bzw. Verdopplungszahl als normale Kontrollen in Kultur aufweisen (Oshima et al. 1995). Aus diesem Grunde ist die Beobachtung unterschiedlicher maximaler Populationsverdopplungen keineswegs unüblich.

Dies legt als einfachste Erklärung die Annahme nahe, dass die reduzierte Proliferationsrate und die Tendenz hin zu einer geringeren kumulativen Maximalzahl von Populations-

verdopplungen bei Fibroblasten von Patienten mit Emphysem eine - möglicherweise lokale - vorgezogene Alterung dieser Zellen widerspiegelt. Als eine mögliche Ursache kann angenommen werden, dass ein vermehrter Bedarf nach Reparatur durch die zigarettenrauchinduzierten Schäden einen Teil der prinzipiell begrenzten Teilungskapazität der Fibroblasten gewissermaßen aufgezehrt hat. Allerdings würde man in diesem Fall eine Verkürzung der Telomeren erwarten (s.u.).

Unabhängig davon, welcher Mechanismus die Verlangsamung der Proliferation hervorgerufen hat, ist zu erwarten, dass diese das Gleichgewicht stimulierter oder unstimulierter zellulärer Ersatzprozesse stört und folglich eine Imbalance zwischen Gewebeerstörung und -erneuerung herbeiführt, zumindest solange man bereit ist, in der Lunge ortsständigen Zellen eine Rolle bei dem Erhalt des Lungengewebes zuzuschreiben. Es ist eine zur Zeit ungeklärte und zugleich heftig umstrittene Frage, ob die Regeneration von Lungengewebe durch ortsständige Zellen erfolgt oder ob Stammzellen des Knochenmarks benötigt werden, die erst in die Lunge migrieren müssen. Die Tierexperimente, welche die Beteiligung von Knochenmarkszellen nahelegen, sehen sich mit ernststen methodologischen Einwänden konfrontiert, sowohl was den Nachweis dieser Zellen angeht als auch bezüglich der Realitätsnähe der Gewebeschädigung. Unabhängig von diesen Fragen und in Verbindung mit klinischen Beobachtungen vorgezogener Alterung bei Rauchern unterstützen die Ergebnisse der Proliferationsanalyse die Hypothese, dass eine vorzeitige Alterung von Strukturzellen an der Pathogenese des Lungenemphysems beteiligt ist.

Die deutliche Limitierung des Wachstums der Fibroblasten von Patienten mit Emphysem nach Reduktion des FCS-Gehaltes im Zellkulturmedium (Holz et al. 2004), sowie die Beobachtung einer verminderten Reaktion dieser Fibroblasten auf pro-proliferative (Interleukin-1beta) und anti-proliferative Stimulation (TGF-beta1) im Vergleich zu Zellen von Kontrollpatienten (Noordhoek et al. 2003) gibt weitere Hinweise auf einen seneszenten Phänotyp der Fibroblasten, in Form einer verminderten Antwort auf externe Signale.

5.2 Seneszenz

Ein erhöhter Anteil seneszenten, zellzyklus-arretierter Zellen könnte insofern einen Beitrag zu der Gewebeerstörung leisten, als Fibroblasten eine wesentliche Rolle für die Integrität der Lunge spielen (Absher 1995).

Es ist plausibel, anzunehmen, dass derartige altersbedingte Defizite den Beginn und Progress emphysematöser Läsionen begünstigen. Tatsächlich wurden bei Mäusen, die durch eine genetische Veränderung vorzeitig altern, Zeichen eines Lungenemphysems gefunden (Kurozumi et al. 1994).

Über die Wachstumsdynamik hinaus, die einen seneszenten Phänotyp der Fibroblasten nahe legt, gibt es weitere Charakteristika einer Alterung der Zellen.

Die serielle Passage normaler Fibroblasten (regelmäßige Teilung der Zellkultur unter Stimulation des exponentiellen Wachstums) geht mit einer Veränderung ihrer Proliferationsrate, Morphologie und ihres Metabolismus einher (Absher 1995).

Es wurden drei Phasen der Lebensspanne von Fibroblasten *in vitro* beschrieben: (1) die Explantkultur bis zur ersten Subkultivierung (Passagierung) der Zellen; (2) die proliferativ

aktive Kultur und schließlich (3) ein seneszenten Zustand der Zellen (Hayflick 1965; Hayflick und Moorehead 1961).

Zellen, die in einen seneszenten Zustand eintreten, können diesen längere Zeit aufrechterhalten, lassen sich aber nicht wieder zur Teilung anregen. Folglich ist die Teilungskapazität von Fibroblasten in Kultur begrenzt. Sie beträgt für fötale Zellen etwa 40-60 Populationsverdopplungen und für Zellen adulter Herkunft etwa 20-40 Verdopplungen (Hayflick 1965). Diese Begrenzung gilt für Zellen, in denen im Normalzustand keine signifikante Telomeraseaktivität nachweisbar ist.

In der Langzeitkultur wurde eine Stagnation des Wachstums der Zellen beobachtet. Dies spricht für eine Alterung der Zellen *in vitro* und gleichzeitig gegen eine nennenswerte Telomeraseaktivität. Es kann also angenommen werden, dass in den Kulturen keine Tumorzellen vorlagen, deren unbegrenztes Wachstum im Laufe der Zeit die Zellkultur dominieren müsste. In diesem Fall sollte keine Stagnation des Wachstums zu beobachten sein. Zu beachten ist in jedem Fall, dass ein Stillstand der Zellteilung nicht notwendigerweise das Absterben der Zellen nach sich zieht; die Lebensdauer von Zellen kann auch und gerade im Zustand geringer oder nicht mehr nachweisbarer Proliferation groß sein. Zellalterung impliziert also keineswegs kurze Lebensdauer.

In gealterten Kulturen von Fibroblasten wurden vermehrt große, abgeflachte Zellkörper beobachtet, deren Größe mit Verlust der proliferativen Kapazität einhergeht (Bird et al. 2003; Bowman und Daniel 1975).

Ähnliche morphologische Veränderungen wurden auch in den Kulturen beobachtet, die in der vorliegenden Arbeit analysiert wurden. Morphologische und funktionelle Veränderungen gealterter Fibroblasten könnten sowohl für die Identifikation dieser Zellen in Kulturen als auch für die Pathogenese des Emphysems eine Rolle spielen, da die mit der Zellalterung einhergehenden Veränderungen des Zytoskeletts funktionelle Konsequenzen haben. Das Fehlen von Mikrofilamentbündeln geht mit dem Verlust der Motilität der Zellen einher (Bowman und Daniel 1975; Kelley et al. 1980).

Eine verzögerte Ausrichtung der Actinbündel führt zu einem verlangsamten Ausbreiten der Zellen in gealterten Fibroblastenkulturen (Kelley et al. 1980). In Abhängigkeit vom Alter verändert sich ebenfalls die Synthese von Collagen und anderer Matrixmoleküle durch die Fibroblasten (Absher 1995). So produzierten senescente fötale Lungenfibroblasten nicht nur weniger Fibronectin als junge Zellen (Vogel et al. 1981), ihr Fibronectin war auch weniger effektiv in der Vermittlung der Adhäsion von jungen oder alten Zellen (Chandrasekhar und Millis 1980).

Solche, auf einer induzierten Seneszenz der Fibroblasten von Patienten mit einem Emphysem beruhenden Veränderungen, könnten zu einer möglicherweise reduzierten Fähigkeit der Fibroblasten beitragen, die Wundheilung in den emphysematösen Läsionen der Lunge zu gewährleisten.

Im Zustand zellulärer Seneszenz wurden außerdem mehr Lysosomen in der Zelle, sowie Veränderungen der Struktur und Morphologie von Mitochondrien und Nuclei gefunden (Brandes et al. 1972; Johnson, Jr. 1979; Lipetz und Cristofalo 1972).

Die Lysosomen wurden in der vorliegenden Arbeit zur Identifikation von seneszenten Zellen genutzt. Um die Hypothese eines beschleunigten oder induzierten Alterns der Lungenfibroblasten als Ursache des Emphysems zu überprüfen, wurden zwei Messgrößen un-

tersucht, die bekanntermaßen mit dem Alter von Zellen verknüpft sind: die Aktivität der Seneszenz-assoziierten beta-Galaktosidase und die Länge der Telomeren.

5.2.1 Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase

Die Aktivität der Seneszenz-assoziierten beta-Galaktosidase (SA-beta-Gal) bei pH 6,0 ist ein verbreiteter Marker für zelluläre Seneszenz (Dimri et al. 1995; Kurz et al. 2000).

Je älter eine Zelle ist, desto stärker färbt sie sich beta-Galaktosidase-positiv. Die mit der Alterung der Zellen erhöhte Färbung spiegelt nach gängiger Auffassung die Zunahme der Zahl der Lysosomen in den gealterten Zellen wider, in denen die SA-beta-Gal lokalisiert ist. Im seneszenten Zustand sind viele oder große Lysosomen und entsprechend viel SA-beta-Gal vorhanden, so dass selbst bei einem suboptimalem pH-Wert von 6,0 noch eine Restaktivität des Enzyms messbar ist (Kurz et al. 2000).

Mit zunehmender Zeit in Kultur zeigten sich an den untersuchten Kulturen die bereits erwähnten morphologischen Änderungen, wie eine Zunahme der Zellgröße und eine stärker abgerundete und breitere Erscheinung der Zellen. Dies ging mit einem Anstieg des Anteils der für die Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase positiv gefärbten Zellen einher.

Da dieser Anteil allerdings nicht nur mit der Zeit in Kultur ansteigt, sondern auch von der Konfluenz der Zellkultur abhängig ist (Severino et al. 2000), fand der Vergleich der Gruppen sowohl in derselben Kulturwoche als auch bei vergleichbarer Zelldichte statt. In dem betrachteten Zeitfenster war die Aktivität der Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase bei pH 6,0 bei Fibroblasten aus emphysematösem Lungengewebe im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöht. Dies deutete auf einen gealterten Phänotyp der Lungenfibroblasten bei Patienten mit Emphysem hin.

Da die Färbungen zwischen Passage 4 und 5 stattfanden, stand von einigen Patienten, deren Zellen sehr früh das Wachstum einstellten, kein Material für diese Untersuchung zur Verfügung. Dies impliziert, dass der Unterschied im Grad der Färbung der Fibroblasten auf SA-beta-Gal zwischen den Patienten mit und ohne Emphysem möglicherweise sogar noch unterschätzt wurde, da nur relativ wuchsstarke und somit junge Zellen der Patienten mit Emphysem in diese Analyse eingingen.

Man könnte allerdings einwenden, dass die Gesamtzahl der Zellteilungen in Kultur die Erscheinung der SA-beta-Gal-positiven Zellen beeinflusst haben könnte. Obwohl keine Daten zur Zahl der Zellteilungen in der primären Explantkultur vor Beginn der einzelnen Untersuchungen vorliegen, bleibt festzuhalten, dass während der Kultur (Passage 1-4) und bevor dieser Assay durchgeführt wurde, die Kontrollfibroblasten mehr Teilungen vollzogen hatten als die der Patienten mit Emphysem. Diese Beobachtung spricht für die Annahme, dass es sich bei dem erhöhten Anteil der SA-beta-Gal-positiven Zellen beim Emphysem nicht um ein Artefakt handelte. Daher erscheint es gerechtfertigt, zu schlussfolgern, dass der erhöhte Anteil gefärbter Fibroblasten bei Patienten mit Emphysem tatsächlich auf ein vermehrtes Vorkommen seneszenten Zellen in dieser Gruppe hinwies.

Bei der Interpretation der Daten zur SA-beta-Gal sind allerdings weitere methodologische Faktoren zu berücksichtigen. So ist zum Beispiel unbekannt, ob der erhöhte Anteil von Zellen, die sich bei Patienten mit Emphysem auf SA-beta-Gal positiv färbten, auf eine homogene Verschiebung der Zellen hin zu replikativer Seneszenz oder einen steigenden Anteil einzelner seneszenten Zellen, die aus dem Zellzyklus ausgeschieden waren, zurückzuführen

war. Ungeachtet dieser Unsicherheiten sprechen die Befunde für einen im Mittel gealterten Phänotyp der Fibroblasten beim Lungenemphysem.

Als weiterer Faktor ist zu bedenken, dass das Auftreten einer replikativen Seneszenz in Kultur auch mit den Wachstumsbedingungen verknüpft sein könnte (Balin et al. 2002).

In diesem Falle würden die beobachteten Unterschiede eine unterschiedliche Antwort der Gruppen auf die Kulturbedingungen (z.B. 21 % Luftsauerstoff) widerspiegeln. Dies würde bedeuten, dass bei Fibroblasten von Patienten mit Emphysem die Fähigkeit, oxidativen Stress abzuwehren, vermindert ist. Dies wiederum könnte implizieren, dass eine geringere Proliferationsrate auf eine im Vergleich zur Kontrolle längere Zeit, die zur Reparatur oxidativer Schäden benötigt wird, zurückzuführen wäre. Unabhängig von der Tatsache, ob dieser Faktor in den Zellkulturen eine Rolle gespielt hat oder nicht, bleibt anzunehmen, dass die unter Kulturbedingungen beobachteten Unterschiede zwischen den Gruppen auch *in vivo* relevant sind, wenn auch möglicherweise zu einem anderen Grade (Wright und Shay 2002), denn oxidativer Stress ist auch *in vivo* allgegenwärtig.

5.2.2 Telomerenlängen

An der zellulären Alterung ist eine Vielzahl von Mechanismen beteiligt. Einer der wichtigsten dieser Mechanismen ist die Verkürzung der Chromosomenendsequenzen (Telomere) (Harley 1991). Er beruht auf der Tatsache, dass sich die Länge der Telomere mit jeder Zellteilung vermindert, da die DNA bei der Reduplikation aufgrund der Tatsache, dass die DNA-Polymerase einen Primer zum Start benötigt, nicht in vollständiger Länge repliziert werden kann („mitotische Uhr“) (Blackburn 1991). Bei jeder Zellteilung geht also ein Endstück der DNA verloren. Telomere, die eine kritische Länge unterschreiten, führen zum Ausstieg der Zelle aus dem Zellzyklus und limitieren dadurch die replikative Kapazität der Zelle. Der Verlust kann durch die Telomerase, ein Ribonukleoprotein mit einem RNA-Template, rückgängig gemacht werden; die weitaus meisten Zellen außerhalb der Keimbahn weisen jedoch keine messbare Telomeraseaktivität auf (Strahl und Blackburn 1996). Damit übereinstimmend verkürzen sich die Telomere von Fibroblasten während der Alterung in Kultur (Harley et al. 1990), und ihre initiale Länge korreliert mit ihrer replikativen Kapazität (Allsopp et al. 1992).

Geht man davon aus, dass in der Lunge eines starken Rauchers, insbesondere dann, wenn er ein Emphysem entwickelt hat, vielfach wiederholte Schädigungen des Lungengewebes aufgetreten sind, so hätte dies zur Folge, dass entsprechend viele Reparaturvorgänge stattgefunden haben oder zumindest initiiert worden sind. Soweit gewebeständige Fibroblasten zur Reparatur beitragen, könnten sie demzufolge angeregt worden sein, sich vermehrt zu teilen. Dies wiederum hätte zur Folge, dass die Telomere der Fibroblasten von Patienten mit Emphysem kürzer wären als diejenigen der Kontrollpatienten.

Andererseits würden unveränderte Telomerenlängen keineswegs gegen die Hypothese einer induzierten Alterung sprechen, da eine replikative Seneszenz auch auf anderen, Telomeren-unabhängigen Wegen erreicht werden kann (Bird et al. 2003; Pascal et al. 2005). Ferner muss bei der Interpretation der Daten bedacht werden, dass immer eine breite Heterogenität der Telomerenlängen innerhalb einer Population besteht, da sich die Zellen in der Regel asynchron teilen. Dies macht es schwierig, zwischen einer über die Population homogenen Reduktion und einer Reduktion der Telomerenlängen in einer Subpopulation zu unterscheiden. Diese Frage ließe sich allenfalls anhand der Streubreite der Telomerenlängen in

beiden Gruppen entscheiden. Die zur Einzelzellanalyse erforderlichen Techniken, z.B. die Durchflusszytometrie, standen wegen des hohen Aufwandes in der vorliegenden Arbeit nicht zur Verfügung, zumal sie derzeit noch einen experimentellen Charakter aufweisen. Unabhängig von der Frage der gleichmäßigen Änderung *versus* Änderung einer Subpopulation würden jedoch beide Wege zum selben Gesamteffekt führen, einer Reduktion der Teilungskapazität des Lungengewebes.

Der Assay zur Bestimmung der Telomerenlänge, der hier Verwendung fand, ist ein etabliertes und gut handhabbares Verfahren, wenn auch nicht von maximaler Sensitivität (Baird et al. 2003). Es wurde z.B. erfolgreich eingesetzt, um kürzere Telomere in Lymphozyten von Rauchern und auf diese Weise eine Form der Alterung des Immunsystems nachzuweisen (Valdes et al. 2005).

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete vorgezogene Alterung der Fibroblasten beim Emphysem war offenbar von der Länge der Telomere unabhängig, da sich diese zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschied. Die Validität unserer Daten wurde zum einen durch vergleichbare Muster der Southern blots in Doppelbestimmungen des enzymatischen Verdauens derselben DNA-Proben und zum anderen dadurch belegt, dass die gefundenen Telomerenlängen in einer Größenordnung lagen, die bereits von anderen für Fibroblasten gefunden wurde (Harley et al. 1990).

Es erscheint ebenfalls unwahrscheinlich, dass der geringe Unterschied im Alter der Patienten beider Gruppen das Ergebnis signifikant beeinflusst hat. Ebenso wie für SA-beta-Gal kann argumentiert werden, dass die Fibroblasten von Patienten mit Emphysem *in vivo* durch einen erhöhten Bedarf an Reparatur von Zellschäden möglicherweise mehr Zellteilungen durchmachen mussten und somit im Mittel kürzere Telomere haben sollten. Andererseits könnte die höhere Replikationsrate der Zellen der Kontrollgruppe, d.h. der stärkere „Verbrauch“ der Zellteilungskapazität, die Unterschiede der Telomerenlänge vermindert haben. Insgesamt erscheint es aber unwahrscheinlich, dass es durch diesen Mechanismus zu einem vollständigen Ausgleich oder gar einer Umkehrung des Verhältnisses der Telomerenlängen gekommen ist. Nimmt man eine Verkürzung der Telomere um ca. 50 Basenpaare (bp) in jeder Fibroblastenreplikation an (Harley et al. 1990), entspräche der beobachtete Unterschied von 300 bp einem Unterschied von 6 Populationsverdopplungen. Aus der Charakteristik des Langzeitwachstums (Holz et al. 2004) würde man ebenfalls einen Unterschied von etwa 6 Populationsverdopplungen erwarten, wobei jedoch die Telomerenlänge (entgegen der tatsächlichen Beobachtung) beim Emphysem geringer sein müsste. Ein Unterschied von 12 Verdopplungen entgegen der Hypothese lässt es trotz der großen Streuung der Daten als wenig wahrscheinlich erscheinen, dass das erwartete Ergebnis kürzerer Telomere bei Patienten mit Emphysem fälschlich nicht erkannt wurde. Eine statistische Analyse der Daten ergab, dass die Wahrscheinlichkeit, dass die Telomere der Patienten mit Emphysem dennoch kürzer als diejenigen der Kontrollpatienten waren, nur maximal 4,7 % betrug (persönliche Mitteilung, R.A. Jörres). Man muss also davon ausgehen, dass die Telomerenlängen in beiden Gruppen im wesentlichen gleich waren.

Ferner ist zu beachten, dass eine Telomeren-unabhängige replikative Seneszenz kein seltenes Phänomen darstellt. Eine Vielzahl anderer zellulärer Faktoren kann einen Arrest der Zellteilung vermitteln, wie z.B. die Bindung von p16 an CDK4- und CDK6-Komplexe, was zu einem Ras-vermittelten Zellzyklusarrest in der G1-Phase des Zellzyklus führt (Bird et al.

2003). Detaillierte, insbesondere mechanistische Untersuchungen zur oxidanzieninduzierten vs. replikativen Seneszenz wurden von Pascal und Mitarbeitern durchgeführt (Pascal et al. 2005). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse scheint es nicht wahrscheinlich, dass die Telomerenlänge die Hauptdeterminante der Unterschiede zwischen den Lungenfibroblasten der beiden untersuchten Gruppen war oder bei der Induktion der Seneszenz auch nur als Folge beeinflusst wurde. Die Unterschiede der Proliferationsrate und -kapazität, SA-beta-Gal-Färbung und Genexpression, die trotz vergleichbarer Telomerenlängen auftraten, müssen daher anderweitig erklärt werden (s.u.).

Da sich die Länge der Telomere während der Phase des exponentiellen Wachstums zwischen den Gruppen nicht unterschied, wurde darauf verzichtet, zu untersuchen, ob Unterschiede in der terminalen Phase des Wachstums, d.h. dem Plateau der kumulativen Populationsverdopplungen, bestanden, da zu diesem Zeitpunkt die zum früheren Zeitpunkt der Zellkultur erwarteten Unterschiede ohnehin hätten nivelliert sein müssen.

Ebenfalls als nicht zielführend betrachtet wurde die Frage, ob sich die Gruppen eventuell in der Aktivität der Telomerase unterschieden, die bei immortalisierten Zelllinien für eine kontinuierliche Verlängerung der Telomeren sorgt (Strahl und Blackburn 1996) und somit die mitotische Uhr umgeht. Aufgrund des Wachstumsverhaltens wäre zu erwarten gewesen, dass im Falle positiver Aktivität der Telomerase bei den Kontrollpatienten eine höhere Aktivität hätte präsent sein müssen, damit eine Alterung verzögert würde. Da jedoch kein Unterschied bei den Telomerenlängen gefunden wurde, würde hier ein differenzieller Befund keine Erklärung für die beobachteten Phänomene liefern, es sei denn, man nähme den unwahrscheinlichen Fall an, dass verkürzte Telomere wieder gerade eben bis zur Gleichheit beider Gruppen verlängert worden wären.

5.3 Bedeutung der Genexpression

Da der seneszenz Phänotyp der Fibroblasten von Patienten mit Emphysem von einer Verkürzung der Telomeren unabhängig zu sein schien, muss es andere Mechanismen geben, die den zu veränderten Zustand der Zellen bedingen.

Die Erbinformationen, die in der DNA gespeichert sind, stellen die Gesamtheit der Möglichkeiten dar, in deren Grenzen sich die Stoffwechselfunktionen eines Organismus befinden können. Jede Zelle enthält die Gesamtheit der Informationen für den vollständigen Organismus. Die Art und Anzahl der aktiven Möglichkeiten des Gesamtpools entscheidet über den Phänotyp der verschiedenen Zellarten im Körper. Da die DNA ortsfest im Zellkern lokalisiert ist, die Stoffwechselprozesse aber sowohl in der Zelle als auch in der äußeren Umgebung der Zelle ablaufen, muss es funktionell aktive Substanzen geben, die die Stoffwechselfunktionen wahrnehmen. Dies sind die strukturell und enzymatisch aktiven Proteine sowie die Botenstoffe, die mitteilen, welcher der vielen möglichen Prozesse im Stoffwechsel gerade aktiv sein soll. Untersucht man also den Stoffwechselzustand einer Zelle, so sind verschiedene Ebenen der Regulation zu beachten, die wiederum verschiedene Schlüsse auf die Beeinflussbarkeit oder Persistenz von Änderungen erlauben.

5.3.1 DNA-Ebene

Die DNA, d.h. die Doppelhelix mit komplementären Basenpaaren (C-G; T-A) als Informationsträger, enthält die gesamten Informationen über die Möglichkeiten, innerhalb derer sich die Zelle bewegen kann.

In speziellen Fragestellungen, wie in dieser Arbeit, können bereits aus der globalen Analyse der DNA, z.B. den Enden der Chromosomen (Telomeren), Informationen über den Zustand der Zelle gewonnen werden.

Die mehr ins Detail gehenden DNA-Untersuchungen betreffen Mutationen bzw. allgemeiner genetische Varianten (Polymorphismen) der Basensequenzen oder Veränderungen der Lokalisierung bestimmter Sequenzen auf den Chromosomen (Translokationen). Fragt man nach genetischen Determinanten einer Erkrankung, so wären sie auf dieser Ebene zu finden. Die Frage, welche genetischen Faktoren außer einem Alpha-1-Antitrypsin-Mangel die Entstehung des zigarettenrauchinduzierten Emphysems begünstigen, war nicht Gegenstand dieser Arbeit. Die Analyse genetischer Dispositionen zur Entwicklung einer COPD hat bislang nicht zu eindrucksvollen Ergebnissen geführt. Es erscheint viel ratsamer, die differentielle Regulation der Genexpression (transkribierte mRNA) zu untersuchen, um von dort aus Rückschlüsse auf beteiligte Gene zu ziehen. Dieser Ansatz wurde in der vorliegenden Arbeit verfolgt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen eine induzierte Veränderung der Zellen nahe, die aufgrund der Großräumigkeit der Erkrankung vermutlich nicht auf somatischen Mutationen beruht, die beispielsweise bei Tumoren eine wesentliche Rolle spielen. Die Veränderungen sind vermutlich eher epigenetischer Natur. Die Epigenetik betrachtet u. a. die Zugänglichkeit und Ablesbarkeit der DNA, die durch kovalente Änderungen der Histone bedingt ist, um die herum die DNA in Form der Nukleosomen gewickelt ist. Die kovalenten Änderungen, z.B. die Acetylierung der Histone, haben einen wesentlichen Einfluss darauf, ob die DNA für die Ablesearratur der Zelle an einem bestimmten Gen (oder auch global für viele Gene) zugänglich ist und welche die Ablesung regulierenden Kofaktoren binden können. Als zweite Regulationsebene können einzelne Gene mittels der Methylierung von Cytosinen innerhalb der Promotorregionen der Gene in ihrer Ablesbarkeit beeinflusst werden. Methylierung der Cytosine geht in der Regel mit einer transkriptionellen Repression einher. Solche Veränderungen lassen sich induzieren und sind z.B. für IGFBP-rP1 (s.u.) bei der Maus berichtet worden (Komatsu et al. 2000).

Für die Untersuchung genetischer und epigenetischer Veränderungen in Fibroblasten von Patienten mit Emphysem wäre es hilfreich, präzise Informationen über die relevanten Gene zu haben. Da diese Arbeit zunächst dazu beitragen sollte, möglicherweise unterschiedlich regulierte Gene durch einen explorativen Ansatz zu identifizieren, müssen die genetischen und epigenetischen Analysen einem zweiten Schritt vorbehalten sein.

5.3.2 mRNA-Ebene

Die in dieser Arbeit vorwiegend untersuchte Ebene ist diejenige der Genexpression. Soll ein Protein im Stoffwechsel aktiv werden, so muss es in der Regel erst von der Zelle hergestellt werden. Der Bauplan für ein Protein ist innerhalb der DNA in den Genen festgelegt. Anhand des Gens wird durch den Multiproteinkomplex der RNA-Polymerase ein RNA-Strang komplementär zu einem Strang der DNA des Gens erstellt. Es entsteht die mRNA,

die den Zellkern verlassen und mehrfach posttranskriptionell modifiziert werden kann, um schließlich in den Ribosomen in das codierte Protein übersetzt zu werden. Die Bausteine der Proteine, die Aminosäuren, sind bekanntlich in der mRNA in Gruppen zu je drei Basen („Tripletts“ aus C,T,G oder U) codiert. Zu den Tripletts komplementäre Transfer-RNAs, an denen die jeweiligen Aminosäuren hängen, binden an die mRNA, und in den Ribosomen werden die Aminosäuren zu Peptiden und Proteinen verknüpft. Die Untersuchung der Genexpression ermittelt, welche Gene zum betrachteten Zeitpunkt in mRNA übersetzt wurden, also welche Proteine im Prinzip produziert werden könnten, sofern die entsprechende mRNA zwecks Proteinsynthese zu den Ribosomen überführt wird. Unterschiede auf dieser Ebene können Hinweise auf einen unterschiedlichen Phänotyp der Fibroblasten beim Emphysem geben, unter dem Vorbehalt, dass die Anwesenheit einer mRNA nicht zwangsläufig die Produktion des Proteins nach sich zieht (Darnell et al. 1990).

5.3.3 Protein-Ebene

Die aussagekräftigste Untersuchungsebene ist diejenige der Proteinexpression, denn nicht jede in der Zelle vorhandene mRNA wird quantitativ in das jeweils codierte Protein übersetzt. Demzufolge lässt eine aufregulierte mRNA nicht unbedingt darauf schließen, dass das Protein in der Zelle in größerer Menge vorliegt (Darnell et al. 1990).

Der Nachweis einer erhöhten Proteinmenge muss also separat geführt werden. Allerdings ist auch dann noch nicht gewährleistet, dass das Protein funktionell aktiv ist. Die mRNA codiert oft nur Vorläuferproteine, die einer posttranslationalen Modifikation (u.a. Phosphorylierung, Glycosylierung oder Entfernung inaktivierender Gruppen) bedürfen, damit sie ihre Stoffwechselfunktion ausüben können. Diese posttranslationalen Modifikationen finden z.B. im Golgi-Apparat, bei der Passage des Endoplasmatischen Reticulums oder durch andere Proteine statt (Krishna und Wold 1993) (Darnell et al. 1990).

Selbst beim Nachweis einer erhöhten Menge eines funktional aktiven Proteins ist nicht unbedingt klar, welche Konsequenzen dies hat, da Proteine multifunktional sein und in verschiedenen Konzentrationsbereichen unterschiedliche Wirkungen auslösen können. Die Wirkungen hängen beispielsweise von möglicherweise ebenfalls in der Zelle oder Zellumgebung vorhandenen (und oftmals nicht im Detail bekannten) Proteasen oder Enzyminhibitoren ab, deren Synthese oder Aktivierung u. U. von dem betrachteten Protein selbst initiiert wird und die es in seiner Wirksamkeit regulieren. Ungeachtet dieser Einschränkungen kann der Nachweis einer Veränderung der Proteinexpression wesentliche Hinweise auf beteiligte Signal- und Stoffwechselwege geben.

5.4 Verfahren zur Quantifizierung der Genexpression

Der Nachweis einer unterschiedlichen Genexpression zwischen Fibroblasten von Patienten mit und ohne Emphysem erfolgte zu dem Zweck, die Mechanismen zu explorieren, die dem reduzierten Wachstum zugrunde lagen. Ein generelles *caveat* gilt sowohl für Untersuchungen der Genexpression als auch solche der Proteine. Da sich eine Zelle permanent in Interaktion mit ihrer Umwelt befindet, auf externe Stimuli reagiert und die Zellkulturen zudem in der Regel asynchron den Zellzyklus durchlaufen, können die Befunde immer nur Moment-

aufnahmen eines über die Zellpopulation gemittelten Stoffwechselzustandes sein. Die asynchrone Kultur kommt den tatsächlichen Gegebenheiten *in vivo* allerdings viel näher als eine synchronisierte und ist zudem experimentell besser zu handhaben.

Zum Zwecke der Exploration wurde die Genexpression zunächst an über mehrere Patienten zusammengefassten (gepoolten) mRNA-Proben mit Hilfe eines umfassenden 12K cDNA-Array qualitativ untersucht. Sodann wurde die Expression ausgewählter Gene mit der qPCR als quantitativ zuverlässigerer Methode überprüft. Die methodologischen Aspekte sowie die Gene, die sich als besonders interessant erwiesen, werden im Folgenden näher diskutiert.

5.4.1 cDNA-Mikroarrays

Um in kurzer Zeit möglichst umfassende Informationen über die Genexpression zu erhalten, steht u.a. die Technik der „Biochips“, „cDNA-Arrays“, „Genchips“ oder „Mikroarrays“ zur Verfügung, welche 1995 erstmals publiziert wurde (Schena et al. 1995) und seither zunehmend in der Forschung Verwendung findet.

Hierbei werden DNA-Sequenzstücke („Oligonucleotide“), die jeweils spezifisch für ein Gen sind und Sequenzhomologien, d.h. Mehrdeutigkeiten der Erkennung, so weit als möglich vermeiden, auf definierten Bereichen eines Substrates (Objektträger aus Glas oder Trägermembran aus Kunststoff) verankert (Baldi und Hatfield 2002; Müller und Röder 2004).

Diese Oligonukleotide dienen als Hybridisierungspartner für markierte cDNA-Proben (Sonden), die anhand der mRNA aus den zu testenden Kulturen hergestellt und sodann mit den spezifischen Bindungspartnern der Arrays hybridisiert werden. Die Sonden werden während ihres Herstellungsprozesses entweder mit Fluoreszenzfarbstoffen oder radioaktiv markiert, um ihre Bindung an das Oligonukleotide qualitativ oder semiquantitativ zu erfassen. Der verwendete Array erforderte eine radioaktive Markierung mittels ^{33}P .

Die Bindung der Sonde, also des der mRNA entsprechenden freien Liganden, der die radioaktive Markierung trug, an das auf dem Array fixierte Oligonukleotid wurde über die Messung der Schwärzung eines Röntgenfilmes quantifiziert. Der verwendete 12K Array der Firma Clontech trug einschließlich Kontrollen insgesamt 11835 Oligonucleotide jeweils zweifach, um mittels Doppelbestimmung Herstellungsfehler und andere Artefakte leichter zu erkennen.

Bislang liegen drei Arbeiten vor, in denen die Genexpression der Lungenzellen von Patienten mit Emphysem auf einem globalen Maßstab mit Hilfe der cDNA-Array-Technologie untersucht wurde (Golpon et al. 2004; Ning et al. 2004; Spira et al. 2004).

Diese drei Gruppen zogen allerdings zur Analyse der Genexpression das Gesamtlungenhomogenat heran. Dieser Ansatz ist zwar in der Lage, unmittelbar und ohne den Umweg der Zellkultur ein umfassendes Bild der Genexpression in dem Bereich der Probenahme zu liefern, beruht jedoch auf einem heterogenen, nicht oder nur ungenau quantifizierbaren Gemisch unterschiedlicher Zelltypen, welche mit nicht näher bekannten Anteilen zu der Gesamtexpression beitragen.

Beispielsweise tragen der Entzündungszustand der Lunge an der Stelle der Probenahme oder die Anteile von Gefäßen und Atemwegen sowie die Zellzusammensetzung des alveolären Gewebes zu den Interpretationsschwierigkeiten bei. Ein weiteres Problem in Hinblick auf die Vergleichbarkeit der Daten dieser drei Gruppen besteht darin, dass unterschied-

liche cDNA-Arrays verwandt wurden. Diese Faktoren sind vermutlich dafür verantwortlich, dass zwischen den drei Arbeitsgruppen nur eine geringe Übereinstimmung der Ergebnisse der Genexpression bei Patienten mit Emphysem bestand (Podiumsdiskussion - Kongress der *American Thoracic Society* 2005).

Der experimentelle Ansatz, der in der vorliegenden Arbeit Verwendung fand, hat den entscheidenden Vorteil, dass nur ein einzelner Zelltyp, i.e. Fibroblasten in ihrer Genexpression betrachtet wurden. Zudem wurden die Zellen nicht direkt *ex vivo* verwendet, sondern hatten bereits mehrere Wochen in Kultur verbracht. Auf diese Weise kann man davon ausgehen, dass akute, durch die Anwesenheit von Entzündungszellen und -mediatoren verursachte Effekte weitgehend ausgeschlossen waren und damit die Chance erhöht war, intrinsische, dauerhafte Veränderungen des Phänotyps der Zellen zu erkennen.

Die Aussagekraft des verwendeten 12K-cDNA-Plastikarrays war allerdings insofern eingeschränkt, als die Verwendung gepoolter Proben im Vergleich zu Einzelproben zu Artefakten führen kann. Zum anderen ist die Verlässlichkeit von cDNA-Arrays nicht sehr hoch, und es bedarf i.a. mehrfacher Wiederholungen eines Versuchsansatzes, um valide Aussagen über die Genexpression treffen zu können (Baldi und Hatfield 2002; Müller und Röder 2004).

Es erschien also nur begrenzt sinnvoll, allein mit Hilfe statistischer Methoden die Daten des 12K-Arrays analysieren zu wollen. Tendenziell waren in den Fibroblasten der Patienten mit Emphysem mehr Gene ab- als aufreguliert. Dies erlaubte immerhin, einen weniger stoffwechselaktiven und in diesem Sinne seneszenten Phänotyp anzunehmen.

Darüber waren eine Reihe von Genen zwischen den Gruppen differentiell reguliert, deren Funktion gemäß Literaturdaten eine Beteiligung an der Regulation der Proliferation oder Transkription, an der Entstehung einer zellulären Seneszenz oder an anderen Mechanismen mit potentieller Bedeutung für die Arbeitshypothese umfasste. Die Expressionsunterschiede von Genen des globalen 12K-Arrays, die nach diesen Kriterien ausgewählt wurden, wurden zwecks Quantifikation mittels qPCR an unabhängigen Proben überprüft. Die Verwendung unabhängiger Proben erschien besonders wichtig, um sowohl unter methodologischem als auch unter statistischem Aspekt zuverlässige Daten zu gewinnen.

5.4.2 qPCR

Der klassische Untersuchungsansatz zur Analyse von mRNAs in einer Probe besteht in der Verwendung der Polymerasekettenreaktion. Nachdem die mRNA mittels reverser Transkription (RT) in komplementäre cDNA übersetzt wurde, wurden mit Hilfe besonders konstruierter Basensequenzen (Primer) ausgewählte Regionen eines Genes zyklisch amplifiziert, wobei jeder Zyklus die Denaturierung der cDNA, die Primeranlagerung und die Elongation umfasste. Die erhaltenen DNA-Abschnitte wurden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter Verwendung einer DNA-Färbung (Ethidiumbromid) sichtbar gemacht (Schimpf 2002). Zur Quantifizierung muss für jede Probe der relativ schmale Bereich gefunden werden, in dem die Amplifikation exponentiell erfolgt, da in den Plateauphasen am Anfang und am Ende der Reaktion keine Quantifizierung der Unterschiede zwischen den Amplifikatmengen möglich ist.

Dieses Problem wird durch die moderne Technik der Echtzeit- oder quantitativen PCR umgangen. In diesem Verfahren erfolgt die Amplifikation der cDNA-Stücke, die durch die

verwendeten Primer festgelegt sind, wiederum zyklisch. Dem Reaktionsmix ist jedoch ein Fluoreszenzfarbstoff beigefügt, der leuchtet, sobald er in doppelsträngige DNA-Stränge interkaliert. Da am Ende jedes Zyklus das PCR-Produkt zur doppelsträngigen DNA ergänzt wird (Elongation), ist es möglich, die Fluoreszenz nach jedem Amplifikationsschritt zu messen. Die resultierenden Amplifikationskurven lassen eine Berechnung des Zeitpunktes zu, an dem sich die Steigung dieser Kurve am stärksten ändert. Dieser Punkt, der *crossing point* (*Cp*), wird zur Quantifizierung der in einer Probe vorliegenden Kopien einer mRNA bzw. cDNA herangezogen und zu den entsprechenden Werten von Verdünnungsreihen bekannter Ausgangskonzentration (quantitative PCR) oder unbekannter Ausgangskonzentration (semi-quantitative PCR) in Beziehung gesetzt. In dieser Arbeit wurden die *crossing points* semi-quantitativ gegen eine Verdünnungsreihe des PCR-Produktes des jeweiligen Genes bestimmt.

5.5 Informationen zu den untersuchten Genen

Im Folgenden wird die mögliche Bedeutung der untersuchten Gene für den beobachteten Phänotyp der Lungenfibroblasten anhand der verfügbaren Literaturdaten im einzelnen diskutiert. Hierbei gilt die besondere Aufmerksamkeit denjenigen Genen, deren Aufregulation bei Fibroblasten von Patienten mit Lungenemphysem sich sowohl im explorativen cDNA-Array als auch in der qPCR zeigte.

5.5.1 Insulin-like growth factor-binding proteins und die Insulin/IGF-Familie

Im cDNA-Array fand sich IGFBP-rP1 um den Faktor 4,9 in Zellen der Patienten mit Lungenemphysem aufreguliert. Andere Vertreter der Proteinsuperfamilie, zu der das IGFBP-rP1 gehört, waren ebenfalls differentiell reguliert (IGFBP-3 1,3-fach aufreguliert, IGFBP-5 5,3-fach abreguliert).

Für die IGFBPs wurde eine Vielzahl von Funktionen beschrieben, von denen einige davon in Zusammenhang mit dieser Arbeit von besonderem Interesse sind.

IGFBP-5, dessen Abregulation beim Emphysem allerdings in der qPCR nicht statistisch gesichert werden konnte, ist an der Regulation der Produktion der extrazellulären Matrix sowie der Lungenentwicklung beteiligt (Schuller et al. 1995). Es wurde außerdem als mit zunehmendem Zellalter abreguliert beschrieben (Mohan und Baylink 1997), so dass seine Beteiligung an der Pathogenese des Lungenemphysems plausibel erscheint. Im Gesamtlungengewebe von Patienten mit schwergradigem Emphysem wurde es jedoch aufreguliert gefunden (Spira et al. 2004).

Zusammen mit den nicht einheitlichen eigenen Befunden erschwert dies eine Beurteilung der potentiellen Rolle dieses Proteins.

Die mittels cDNA-Array gefundene Expression war für IGFBP-rP2 (CTGF) und -rP4 (Cyr61) nur marginal ausgeprägt. In der qPCR konnte allerdings ein hinreichend starkes Signal gemessen werden; hierbei fand sich ein deutlicher, an der Grenze zur statistischen Signifikanz ($p=0,07$) liegender Trend in Richtung einer Aufregulation des IGFBP-rP2 in Zellen von Patienten mit Emphysem. Interessanterweise wurde eine derartige Aufregulation kürzlich zusammen mit derjenigen von IGFBP-rP4 beschrieben (Ning et al. 2004).

Man nimmt an, dass IGFBP-rP2 seine Wirkung durch Interaktion mit IGF-I oder auch IGF-unabhängig ausübt, wobei es pro-proliferative Effekte haben soll (Grotendorst und Duncan 2005). In der Tat wurde IGFBP-rP2 bei fibrotisierenden Erkrankungen, bei denen man eine vermehrte Proliferation vermuten kann, aufreguliert gefunden (Kim et al. 1997). Eine Aufregulation beim Emphysem (Ning et al. 2004) würde für ein schnelleres Wachstum der Fibroblasten sprechen. Da die Experimente der genannten Autoren an Gesamtlungenhomogenat erfolgten, besteht die Möglichkeit, dass ein Teil der Fibroblasten aus den Atemwegen und nicht aus dem Lungenparenchym stammte, so dass dieser Befund möglicherweise eine fibrotisierende Veränderung der Atemwege widerspiegelt und weniger die destruktiven Veränderungen, die das Emphysem charakterisieren. Auch ist unklar, ob nicht andere Zelltypen inklusive Leukozyten zu dem Signal beigetragen haben. Zusätzlich könnte auch die Tatsache, dass diese Autoren Patienten mit sehr weit fortgeschrittener Erkrankung untersuchten, sowie Unterschiede in der Methodologie für die abweichenden Befunde verantwortlich sein. Dies gilt ganz besonders, wenn man die gravierenden Unterschiede zwischen unterschiedlichen cDNA-Arrays in Rechnung stellt.

Für IGFBP-3 und IGFBP-rP1 konnte die Aufregulation in Fibroblasten von Patienten mit Emphysem mit der qPCR bestätigt werden.

Experimentelle Daten, die an fötalen Lungenfibroblasten der Ratte gewonnen wurden, zeigen, dass IGFBP-3 nach Stimulation mit IL-1beta und TNF-alpha vermehrt in das Zellkulturmedium sezerniert wurde (Price et al. 2002); dies könnte eine Verknüpfung mit dem inflammatorischen Zustand der Lunge herstellen.

Sowohl die mRNA für IGFBP-3 innerhalb der Zelle als auch das sezernierte IGFBP-3-Protein in konditionierten Zellkulturmedien seneszenten diploider humaner Fibroblasten wurden im Vergleich zu Kulturen junger Zellen vermehrt gefunden (Goldstein et al. 1991; Moerman et al. 1993). Ferner besteht vermutlich eine Beziehung zur natürlichen *in vivo* Alterung (Goldstein et al. 1993) sowie einer prämaturnen Alterung, wie sie beim Werner-Syndrom vorliegt (Murano et al. 1991). Aus diesen Befunden ergibt sich ein Gesamtbild, das die Hypothese der Seneszenz von Lungenfibroblasten beim Emphysem unterstützt. In diesem Szenario tritt dann als Konsequenz der Schäden und der Inflammation, die durch das Rauchen in der Lunge hervorgerufen werden, ein verändertes Verhalten der Fibroblasten zutage, das möglicherweise zu Beginn durch Epithel- und/oder Entzündungszellen und von ihnen freigesetzte Mediatoren ausgelöst wird, in der Folge aber auch in Abwesenheit dieser Zellen persistiert und insgesamt einem seneszenten Phänotyp der Fibroblasten nahekommt oder ihn darstellt. Die vermutlich epigenetischen Alterationen, die zur Persistenz des Phänotyps führen, wurden allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Die Analyse vorliegender Daten zur Wirkung von IGFBP-rP1 untermauert dies. So ist IGFBP-rP7 in der Lage, das Wachstum von Brustkrebszellen über Seneszenz-ähnliche Mechanismen zu inhibieren; dieser Effekt machte sich u.a. in einer erhöhten Positivfärbung der Zellen für SA-beta-Gal bemerkbar (Wilson et al. 2002). Darüber hinaus wurde eine Aufregulation von IGFBP-rP1 in seneszenten humanen Brustepithelzellen beschrieben (Swishhelm et al. 1995).

Während IGFBP-3 primär an IGF-I bindet (Moerman et al. 1993), bindet IGFBP-rP1 stärker an Insulin und interferiert auf diese Weise mit dessen Rezeptorbindung. Als Konsequenz verhindern IGFBP-rP1 und IFGBP-3 die Signaltransduktion ihres jeweiligen Liganden

über Autophosphorylierung der Insulinrezeptor-beta-Untereinheit und Phosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrates-I; diese Veränderungen interferieren u.a. mit der Signalkaskade der Proliferation (Yamanaka et al. 1997). Die IGFBPs und IGFBP-rPs können ebenfalls eine Stimulation des IGF-I-Rezeptors (IGF-IR) durch IGF-I oder IGF-II (Hwa et al. 1999) oder Insulin (King et al. 1980) beeinträchtigen; dies wiederum beeinflusst die Produktion von Kollagen, einem zentralen Protein der extrazellulären Matrix, durch Lungenfibroblasten und kann über diesen Weg einen Einfluss auf die Reparatur von Gewebeschäden ausüben (Goldstein et al. 1989).

Da die Unterschiede im Phänotyp der Fibroblasten nach mehreren Wochen in Kultur beobachtet wurden, sind sie weder transient noch direkt von der inflammatorischen Umgebung *in vivo* abhängig. Es scheint somit eine vernünftige Annahme, dass die Persistenz der Veränderungen zumindest teilweise auf epigenetische Faktoren zurückzuführen ist. Prinzipiell scheinen die Proteine der Insulinkaskade auf diesem Wege reguliert werden zu können. So wurde beispielsweise für IGFBP-rP1(mac25) bei der Maus eine Regulation der Genexpression über Methylierung der DNA nachgewiesen (Komatsu et al. 2000).

Die Aufregulation von IGFBP-3 und IGFBP-rP1 in Lungenfibroblasten können als Beleg für einen seneszenten Phänotyp beim Emphysem angesehen werden. Ob die erhöhte Expression der mRNA allerdings einen frühen Schritt in der Entwicklung der replikativen Seneszenz oder eine Konsequenz anderer Mechanismen darstellt, lässt sich aus den vorliegenden Daten nicht folgern.

Eine aktive Rolle der IGFBPs an der Seneszenz kann insbesondere deshalb angenommen werden, da diese Proteine mit mitogenen Substanzen wie IGF-I und IGF-II oder Insulin interagieren. Sowohl IGF-I als auch IGF-II werden von interstitiellen mesenchymalen Zellen, Epithelzellen und Makrophagen in der Lunge produziert und können die Zellproliferation, auch diejenige von Fibroblasten regulieren (Aston et al. 1995; Price und Stiles 2000). Im Unterschied zu den „Kompetenzfaktoren“, die einer Zelle den Eintritt in den Zellzyklus ermöglichen, gehören die IGFs (oder Somatomedin B) zu den „Progressionsfaktoren“, die es einer kompetenten Zelle ermöglichen, die G1- und die S-Phase zu durchlaufen (Pledger et al. 1977; Stiles et al. 1979). Unabhängig davon könnte eine Inhibition dieser Substanzen zu einer verminderten mitogenen Aktivität beitragen.

Außerdem scheint der Insulin/IGF-I-Signaltransduktionsweg in verschiedenen Spezies (Hefen, Fadenwürmer, Fruchtfliegen und Nager) eine Verknüpfung mit der Lebensdauer des Organismus aufzuweisen. Hierbei gehen verminderte Insulinsignale, verstärkte Sensitivität gegenüber Insulin und verminderte Plasmalevel von IGF-I mit einer Langlebigkeit einher (Barbieri et al. 2003a). Bei den genannten Spezies sind Mutationen von Genen, die dem humanen Insulin/IGF-I-Signalantwortsweg analog sind, bekannt, die die Lebensspanne des Organismus verlängern. Solche Befunde fördern die Vermutung, dass grundlegende Alterungsmechanismen möglicherweise hochkonserviert vorliegen und eine Beziehung zur Induktion von Langlebigkeit besitzen, bei der ebenfalls Zellen eine geringere Teilungsaktivität aufweisen. Somit scheinen Insulin und IGF-I bei der Kontrolle sowohl von Langlebigkeit als auch von Alterung eine Rolle zu spielen. Insulinresistenz steht im Verdacht, einen Bezug zu Alterung und oxidativem Stress aufzuweisen (Barbieri et al. 2003b). Alterung scheint insgesamt mit einem Anstieg von oxidativem Stress, hauptsächlich durch Rückgang der antioxidativen Aktivität, aber auch vermehrte Oxidantienproduktion durch Mitochondrien, sowie durch

Zunahme der Konzentration von pro-oxidativen Substanzen wie Glukose und Insulin verknüpft zu sein. Zudem scheint mit der Alterung ein Anstieg der Insulinresistenz einher zu gehen. Ferner ist bei Langlebigkeit ein niedriger Grad von oxidativem Stress und Insulinresistenz zu finden, der sich nicht eindeutig auf genetische Faktoren, insbesondere das Insulingen, zurückführen lässt (Barbieri et al. 2003b). Die Unterschiede und Analogien zwischen Langlebigkeit und Alterung sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung und nur zum Teil geklärt. Dies gilt um so mehr, als zwischen den auf eine Zelle und den auf einen Organismus bezogenen Interpretationen zu unterscheiden ist und trotz aller Konservierung über die Evolution Speziesunterschiede bestehen. Letztere beispielsweise deuten an, dass bei Säugern und insbesondere beim Menschen die Beziehung wesentlich komplexer ist als beim Fadenwurm oder der Hefe.

5.5.2 LOXL2

In der Lunge und in Fibroblasten von Mäusen mit genetisch bedingtem Emphysem fand sich ein Defizit an Lysyloxidase, einem kupferabhängigen Enzym, welches bei der Bildung und Reparatur der extrazellulären Matrix eine wesentliche Rolle spielt, indem es Elastine und Kollagene vernetzt (Starcher et al. 1977). Weiterhin wurde eine Abregulation der mRNA für sowie des Proteingehaltes von Lysyloxidase nach Stimulation von Lungenfibroblasten fötaler Ratten mit cigarette smoke extract (CSE) beobachtet (Chen et al. 2005). Bei der Reparatur von elastaseinduzierten Schäden in fötalen Pulmonalfibroblasten der Ratte fand sich allerdings keine unterschiedliche Expression der mRNA für Lysyloxidase (Morris et al. 1998).

Das Lysyloxidase-ähnliche Protein 2 (LOXL2) ist ebenfalls an der Vernetzung der Kollagene und Elastine der extrazellulären Matrix beteiligt (Csiszar 2001). Es wurde in Fibroblasten bei replikativer und stressinduzierter prämaturer Seneszenz aufreguliert gefunden (Pascal et al. 2005).

In dem vorliegenden explorativen 12K-Array erwiesen sich eine Reihe von Genen der Lysyloxidase-Familie als aufreguliert (Lysyloxidase (NM_002317), Lysyloxidase-like 1 (NM_005576), Lysyloxidase-like 2 (NM_002318), Lysyloxidase-like 3 (NM_032603)). Zunächst wurde die Regulation der Expression des Gens für Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) mittels qPCR überprüft und konnte nicht bestätigt werden, zumindest nicht in den Fibroblastenproben, die für die qPCR herangezogen wurden und die unabhängig von denen waren, die für den cDNA-Array verwandt wurden. Die übrigen Mitglieder dieser Genfamilie wurden noch keiner weiteren Analyse unterzogen.

5.5.3 Ornithin-Decarboxylase-Antizym 1

Eine Überproduktion eines regulatorischen Proteins für die Ornithin-Decarboxylase (ODC), nämlich des ODC-Antizyms 1 (OAZ1), wurde von Newman und Mitarbeitern (Newman et al. 2004) in Korrelation mit der Inhibition des Zellwachstums in einer Vielzahl von Zellarten beschrieben. Dieses Gen wurde in seiner Expression insbesondere deswegen überprüft, als eine Abregulation beim Emphysem, wie sie im cDNA-Array angedeutet war, gegen die Hypothese einer zellulären Seneszenz sprechen würde. Die Überprüfung mittels qPCR ergab jedoch keine differenzielle Regulation dieses Genes.

5.5.4 CDK4

Als ein wichtiger Vertreter der zellzyklusassoziierten Faktoren wurde die Zyklin-abhängige Kinase 4 (CDK4) in die Überprüfung der Genexpression einbezogen, da es Hinweise gab, die für eine Abregulation in seneszenten Zellen sprachen (Lucibello et al. 1993). Wiederum ergab die qPCR keine differenzielle Regulation dieses Genes. Dieses Ergebnis allerdings sollte nicht zu weitreichenden Schlüssen verleiten, da die Regelung der CDK4 nicht primär auf Transkriptionsebene stattfindet. Immerhin hätten Unterschiede in der basalen Expression zwischen den Gruppen einen Hinweis auf die Beteiligung dieses Enzyms geliefert.

5.5.5 FOS-like antigen 1

Im explorativen Array war FOSL1 (Fra1) beim Emphysem abreguliert gefunden worden. Allerdings konnte die Abregulation von FOSL1 in der qPCR nicht bestätigt werden. In Anbetracht der methodologischen Unwägbarkeiten heißt dies jedoch nicht notwendigerweise, dass dieses Gen bei der Entstehung eines Emphysems irrelevant ist; wegen seiner vielfältigen pathophysiologischen Bedeutung sollen daher die Funktionen von FOSL1 im folgenden kurz dargestellt werden.

Von FOSL1 ist bekannt, dass es in der Zellproliferation eine Rolle spielt und durch Zigarettenrauch aufreguliert werden kann (Reddy und Mossman 2002). Es ist ein Mitglied der Aktivatorprotein-1-Familie (AP-1), die sich aus Fos-, Jun- und ATF-Proteinen zusammensetzt. Die einzelnen AP-1-Komponenten haben verschiedene spezifische Funktionen in Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und anderen biologischen Prozessen (Bakiri et al. 2002). Die Jun-Proteine umfassen c-Jun, JunB und JunD; die Fos-Proteine c-Fos, FosB, Fra1 (FOSL1) und Fra2. Fra1 besitzt im Unterschied zu c-Fos und FosB keine Transaktivierungsdomäne, die für die Onkogenese und zelluläre Transformation benötigt wird (Matsuo et al. 2000). Während der *in vitro*-Alterung von humanen Fibroblasten wurde der Eintritt in die Seneszenz und das Ausbleiben der Replikation mit einer Abnahme und Verschiebung der Proteine der jun- und fos-Familie in Zusammenhang gebracht (Sheerin et al. 2001).

Eine Interaktion von Fra1 und anderen Faktoren mit Nrf2 scheint über die Regulation der Glutamylcystinylgase (GCL) einen Einfluß auf die Glutathion(GSH)-Biosynthese auszuüben (Rahman 2005). Diese Funktion könnte möglicherweise einen Anknüpfungspunkt an den ursprünglich inflammatorischen Zustand der Lunge herstellen sowie mittels eines erhöhten Pegels an oxidativen Schäden die Persistenz des Phänotyps der Fibroblasten erklären.

Bei Herzfibroblasten der Ratte fand sich eine Vermittlung der Transkription von MMP-2 über eine funktionsfähige AP-1-Bindungsstelle und die Bindung von Fra1-JunB- und FosB-JunB-Heterodimeren (Bergman et al. 2003). Eine Regulation der Matrixmetalloproteinasen könnte also ebenfalls die zelluläre Seneszenz begleiten und zu dem Fortschreiten der Schädigungen der Lunge auch nach Abstinenz vom Zigarettenrauchen beitragen.

Zusätzlich ist interessant, dass eine Verbindung der Regulation von FOSL1 in Verbindung mit der Resistenz von Bronchialepithelzellen gegen Retinsäure (RA) gefunden wurde (Ma et al. 2003). Diese Autoren fanden unter den Zielgenen für die all-trans-RA das FOSL1 bei RA-Resistenz abreguliert. Retinsäuren (natürliche oder auch synthetische Derivate des Vitamin A), die u.a. bei der Krebstherapie eingesetzt werden, wurden ebenfalls als mögliche

Therapie für das Lungenemphysem diskutiert, zumal Tierversuche vielversprechende Ergebnisse lieferten (Massaro und Massaro 1997). Allerdings haben klinische Daten (FORTE trial) bislang beim Menschen keine Evidenz dafür erbracht, dass eine relativ unspezifische Substanz wie Retinsäure den komplexen Prozess der Morphogenese, der zur Reparatur des Lungenemphysems erfordert wird, steuern kann. In der Krebstherapie findet man sowohl RA-Responder als auch RA-Resistenzen, ohne dass die Gründe hierfür bislang geklärt wären.

Eine mögliche Anbindung an das Insulin/IGF-Signalnetzwerk könnten die Regulation von Adipozyten P2 und Fra1 in Präadipozyten durch Fettsäuren liefern. In murinen Fibroblasten wurde das Adipozyten P2 nicht durch Fettsäuren induziert, wohl aber Fra1 (Distel et al. 1992). Diese Befunde sind wegen der bei Patienten mit Lungenemphysem häufig oder gar regelmäßig beobachteten Kachexie von Interesse (Cook et al. 2001; Coxson et al. 2004). Auch scheint es, dass übergewichtige Raucher im Vergleich zu normalgewichtigen Rauchern ein geringeres Risiko besitzen, eine COPD zu entwickeln (Harik-Khan et al. 2002). Ferner kann Hungern bei Mäusen und Ratten zu einer Lebensverlängerung und einer Rarefizierung des Lungengewebes im Sinne eines Lungenemphysems führen (Massaro et al. 2004; Sahebji und Domino 1989; Sahebji und Wirman 1981). Für die Lebenverlängerung bei Mäusen zumindest scheint aber die Abwesenheit von Adipozyten ausreichend zu sein. Diese bislang wenig verstandenen Befunde deuten einen tiefliegenden Zusammenhang zwischen der Entwicklung einer lokalen Erkrankung (des Lungenemphysems) und globalen, systemischen Faktoren an.

Die AP-1-Genfamilie stellt insgesamt eine zentrale Regulationsstelle für die Genexpression einer Vielzahl von Signalwegen dar, die ihrerseits von einer Vielzahl toxischer Stimuli beeinflusst wird (Reddy und Mossman 2002). Über diese Zentralität der Regulationssteuerung könnte eine differenzielle Regulation von FOSL1 als Mitglied dieser Genfamilie in der Pathogenese des Emphysems eine Rolle spielen.

5.5.6 Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den Befunden der mittels zweier Methoden erfassten Genexpression

Die Untersuchung der Genexpression ergab einige auf den ersten Blick widersprüchliche Ergebnisse, aber auch einige konsistente Befunde. Eine Reihe von Genen wie IGFBP5, FOSL1, OAZ1, LOXL2, CDK4 wiesen gemäß dem cDNA-Array eine differenzielle Expression auf der Ebene der mRNA auf. In unabhängigen Anzuchten der Fibroblasten und bei Zugrundelegung einer größeren Patientenzahl ließ sich die unterschiedliche Expression anhand der qPCR nicht bestätigen. Einzig für IGFBP-3 und IGFBP-rP1 konnte die differenzielle Expression in Fibroblasten von Patienten mit Lungenemphysem sowohl dem Vorzeichen nach als auch mit statistischer Signifikanz bestätigt werden.

Die Unterschiede zwischen diesen Ergebnissen können mehrere Ursachen haben. Zum einen handelt es sich bei den in der qPCR untersuchten Kulturen um unabhängige Anzuchten der Fibroblasten, da die mRNA, die für den explorativen Array verwendet wurde, für weitere Versuche nicht zur Verfügung stand. Somit war eine direkte Überprüfung der Befunde des cDNA-Arrays nicht möglich. Die unvermeidbare biologische oder technische Variabilität in der Anzucht verschiedener Proben der Zellen aus Primärkultur könnte einen Einfluss auf die Genexpression gehabt haben. Ferner ist es möglich, dass beim Prozess des Poolens, d.h. der Zusammenfassung der mRNA für den cDNA-Array, nicht-repräsentative Pro-

ben das Ergebnis verzerrt haben. Auch ist denkbar, dass Unterschiede der Aufarbeitung der mRNA und der Effektivität der reversen Transkription in cDNA eine Rolle gespielt haben. Darüber hinaus muss man damit rechnen, dass die Oligonukleotide des cDNA-Arrays eine andere Empfindlichkeit und Spezifität als die Primer der qPCR aufweisen und Querempfindlichkeiten bei aller Sorgfalt nie auszuschließen sind. Die schwer kalkulierbaren sterischen Probleme beim Zugang der Sonden zu den Oligonukleotiden sowie andere Probleme der cDNA-Arrays inklusive Beladungskontrolle und Normierung sind wohlbekannt. Daher sind die Diskrepanzen zwischen cDNA-Array und qPCR bereits aus methodologischen Gründen keineswegs als ungewöhnlich anzusehen.

Zum anderen wurde bei der qPCR eine größere Fallzahl als beim explorativen Array betrachtet. Für den letzteren waren die Kulturen auf besonders große Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich ihrer Verdopplungszeit hin ausgewählt worden. Während also der cDNA-Array die am stärksten verschiedenen Phänotypen der Fibroblasten abdeckte, wurde in der qPCR ein breiteres Spektrum von Schweregraden der Schädigung der Fibroblasten betrachtet. Daher ist denkbar, dass die Unterschiede zwischen den Gruppen relativ zur Streuung innerhalb der Gruppen kleiner waren, mit der Folge, dass sich keine statistisch signifikanten Unterschiede mehr ermitteln ließen, obgleich die Methode genauer als der cDNA-Array war. Andererseits stellt sich die Frage, inwieweit bei extrem fortgeschrittener Erkrankung die eigentlich krankheitsspezifischen Prozesse nicht durch sekundäre Änderungen überlagert sind. Unter diesem Aspekt ließe sich argumentieren, dass die Analyse mittelschwer erkrankter Patienten am ehesten die kausalen, persistierenden Veränderungen des Phänotyps zeigen kann. Anhand der vorliegenden Daten ist es nicht möglich, zwischen diesen einander widersprechenden Argumenten zu entscheiden. Auch stellt sich die Frage, inwieweit durch zu weitgesteckte Ziele und unrealistische klinische Fragestellungen nicht die Methode der Zellkultur, die notwendigerweise Artefakte mit sich führt, über Gebühr beansprucht wird. Sinnvoller scheint es, die grundlegenden molekularen Mechanismen tiefergründiger zu untersuchen, um dann gezielt im Organismus selbst nach den korrespondierenden spezifischen Mustern der Alteration zu suchen. Die relativ unspezifischen und damit in ihrer wissenschaftlichen Aussagekraft begrenzten genetischen und morphologischen bzw. histologischen Analysen würden von spezifischen Vorgaben vermutlich profitieren.

Ferner ist bei der Interpretation zu beachten, dass bei einigen Genen Hinweise darauf vorliegen, dass ihre Regulation vom Konfluenzgrad der Zellkultur abhängen könnte. Dies gilt z.B. in besonderer Weise für das Matrix Gla Protein (MGP), das im cDNA-Array ebenfalls unterschiedlich exprimiert gefunden wurde (Daten nicht gezeigt) und dessen Analyse aus diesen Gründen nicht weiter verfolgt wurde. In solchen Fällen könnten unterschiedliche dichte Bereiche von Zellen in der untersuchten Population zu einer Verschiebung der Expression geführt haben, auch wenn im Mittel die Konfluenz in den Kulturgefäßen ähnlich sein sollte. Für IGFBP-3 und IGFBP-rP1 ergab sich bei visueller Analyse der Kulturen keine Evidenz für eine Abhängigkeit der Genexpression vom Konfluenzgrad der Kultur. Um so bedeutsamer erscheint, dass bei allen Unterschieden der Methodik die Befunde für IGFBP-3 und IGFBP-rP1 in der qPCR Bestand hatten. Daher lässt sich vermuten, dass eine differenzielle Regulation auf der Ebene der mRNA eine Rolle bei der Entwicklung eines Lungenemphysems spielen könnte, da sie auch in einem möglicherweise leichtergradigen Stadium der

Krankheit zu beobachten war. Ferner ist die mögliche Ankopplung an systemische Faktoren mittels der Insulinachse von besonderem Interesse.

5.6 Sezerniertes IGFBP-3

Eine unterschiedliche Genexpression kann wertvolle Hinweise auf die Mechanismen geben, die den beobachteten Proliferationsunterschieden zugrunde liegen könnten. Um einem derartigen Befund weiteres Gewicht zu verleihen, ist allerdings der Nachweis des von der entsprechenden mRNA codierten Proteins notwendig. Da man vom IGFBP-3 weiß, dass es von Zellen sezerniert wird (Goldstein et al. 1991), wurde der Versuch unternommen, dieses Protein im konditionierten Zellkulturmedium nachzuweisen.

Wertete man nur diejenigen Kulturen, bei denen die gemessene Proteinmenge oberhalb der Nachweisgrenze des verwendeten ELISA lag, so ergab sich eine signifikant erhöhte Menge an IGFBP-3 in den konditionierten Zellkulturmedien der Fibroblasten der Patienten mit Emphysem. Dieses Ergebnis belegt einen direkten Zusammenhang zwischen Genexpression und Proteinsynthese bzw. -sezernierung in den analysierten Zellkulturen.

Diese Daten sind allerdings mit einer gewissen Vorsicht zu betrachten. Zum einen überlappen sich die Bereiche der gefundenen Proteinmengen, wenn man die fraglichen Werte, die an der unteren Grenze des Nachweisbereiches des ELISA lagen, als auf Null gesetzte Werte in die Analyse mit einbezog. Zum anderen ist bekannt, dass IGFBP-3 durch Proteasen abgebaut werden kann (Salahifar et al. 1997; Salahifar et al. 2000). Möglicherweise unterlagen also die Proben, bei denen kein IGFBP-3 in den Zellkulturüberständen nachweisbar war, einer Degradation des Proteins durch Proteasen. Eine mögliche Interferenz des ELISA mit der Anwesenheit von IGF-I oder IGF-II war den Daten des 12K-Arrays zufolge wenig wahrscheinlich, da keine Expression der mRNA für diese Wachstumsfaktoren gefunden wurde.

Die hypothetische Beteiligung von IGFBP-3 oder IGFBP-rP1 an der Pathogenese des Lungenemphysems muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Diese könnten funktioneller Natur sein, beispielsweise durch Supplementierung des Zellkulturmediums mit IGFBP-3 oder IGFBP-rP1 und die Analyse der Proliferation der Zellen. Andererseits ließe sich unter Verwendung relativ neuer Technologien versuchen, durch Genabschaltung mittels inhibierender RNA-Sequenzen („siRNA-Intervention“) die Gene für IGFBP-3 und IGFBP-rP1 selektiv auszuschalten, um eine mögliche Veränderung des Phänotyps bzw. der Proliferation der Fibroblasten herbeizuführen und auf diese Weise eine kausale Beteiligung der ausgeschalteten Gene an diesem Phänotyp zu belegen.

5.7 Schlußfolgerungen

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen einen veränderten Phänotyp parenchymaler Lungenfibroblasten bei Patienten mit Emphysem im Vergleich zu Patienten ohne Lungenemphysem, aber vergleichbarer Anamnese bezüglich des Zigarettenrauchens. Die beobachteten Charakteristika der Fibroblasten deuteten auf eine Alterung der Zellen hin. Dies spiegelte sich in einer verminderten Zellteilungsrate, morphologischen Unterschieden und der Expression von Seneszenz-assoziierten Genen wider. Die Unterschiede gingen

nicht mit einer Verkürzung der Telomeren einher und waren nicht mit dem Alter der Patienten assoziiert. Angesichts dieser Befunde scheint es gerechtfertigt, die zelluläre Seneszenz als induzierte Seneszenz zu deuten, die im Verlauf der Erkrankung zu einer vorzeitigen Alterung der Zellen geführt hat.

Fibroblasten, die in ihrer proliferativen Kapazität eingeschränkt sind, können vermutlich nicht mehr in ausreichendem Maße an der Reparatur von Gewebeschäden und der Aufrechterhaltung der Struktur der Lunge teilnehmen. Allerdings setzt diese Argumentation voraus, dass ein steter turn-over von Lungenzellen stattfindet und dass ortsständige Fibroblasten bei dem erforderlichen Zellersatz eine Rolle spielen. Beide Frage sind zur Zeit beim Menschen nicht geklärt. Es ist plausibel, dass eine Beeinträchtigung der Homöostase des Lungengewebes auf Dauer zu einer fortschreitenden Zerstörung der hochkomplexen, vielfach gegliederten alveolären Struktur führen kann und somit die Entstehung eines Emphysems begünstigt oder vorantreibt.

Da die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Untersuchungen unter Zellkulturbedingungen stattfanden, gilt in jedem Fall die Einschränkung, dass hierbei ein artifizielles System vorlag, das u.U. eine besondere und nur teilweise der Realität im Organ entsprechende Form von Stress auf die Zellen ausübte. Gleiches gilt für die verglichen mit dem Gewebe völlig unrealistischen Bedingungen subkonfluenter Kulturen eines einzelnen Zelltyps, die dieser Untersuchung zugrundelagen. Ungeachtet dessen schienen jedoch die Veränderungen des Phänotyps der Fibroblasten der Patienten mit Lungenemphysem so tief verankert, dass sie auch unter diesen Bedingungen zutage traten.

5.8 Ausblick

5.8.1 Implikationen der Befunde in Hinsicht auf COPD als systemische Erkrankung

Die Befunde zur möglichen Beteiligung der Insulin/IGF/IGFBP-Familie an der Pathogenese des Lungenemphysems bieten das Potential einer Verknüpfung lokaler und systemischer Faktoren. Ähnliche Untersuchungen, wie hier für Lungenfibroblasten durchgeführt, an Fibroblasten anderer Organe wie z.B. der Haut könnten darüber hinaus die Frage beantworten, ob die Änderung des zellulären Phänotyps organspezifisch ist. Solche Untersuchungen sind für die Zukunft geplant. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass selbst in der Lunge Fibroblasten eine sehr heterogene Population darstellen. So findet man im Lungenparenchym emphysematöse Bereiche, in denen die Fibroblasten in ihrer Proliferation vermindert vorliegen (Holz et al. 2004), während in den Atemwegen bei der COPD z.T. fibrotisierende Veränderungen beobachtet wurden, die man am ehesten mit einer Proliferation der Fibroblasten in Verbindung bringen könnte (O'Byrne und Postma 1999). Hieraus leitet sich die Frage ab, ob sich der Phänotyp der Fibroblasten zwischen verschiedenen Kompartimenten der Lunge innerhalb eines Patienten unterscheidet (emphysematöse Bereiche, nicht emphysematöse Bereiche, Atemwege). Allerdings ist die Möglichkeit im Auge zu behalten, dass die besonders in den Atemwegen zu findenden entzündlichen Prozesse die peribronchiale und lokal begrenzte Fibrosierung letztlich reaktiv bewirken und die Fibrosierung somit nicht notwendigerweise mit einem veränderten Phänotyp im Sinne einer geringer ausgeprägten Seneszenz

einhergehen muss. Beobachtungen, die an Gewebe von Patienten mit Lungenfibrose gemacht wurden, weisen beispielsweise keineswegs konsistent in die Richtung einer vermehrten Proliferation von Fibroblasten *in vitro*. Insofern, als Zellen in verschiedenen Stadien und Schweregraden einer Erkrankung eine unterschiedliche Rolle spielen können, sollte die Assoziation zwischen dem zellulären Phänotyp in Kultur und den histologischen und morphologischen Alterationen im Organ nicht überstrapaziert werden. Dennoch könnten solche Untersuchungen zur Abschätzungen der Wirkungen und Nebenwirkungen etablierter und in Erprobung befindlicher medikamentöser Therapien der COPD beitragen. Mit Blick auf antientzündliche Medikamente, die in vielen Fällen auch die zelluläre Proliferationsrate beeinflussen, könnten beispielsweise positive Effekte einer Medikation auf das eine Kompartiment der Lunge mit unvorhergesehenen negativen Wirkungen auf ein anderes verbunden sein.

5.8.2 Implikationen für Interventionsversuche als Therapie des Emphysems

Da die beiden Hauptformen der COPD (chronisch-obstruktive Bronchitis und Lungenemphysem) deutliche pathophysiologische Unterschiede aufweisen, sind unterschiedliche Therapieansätze denkbar oder sogar erforderlich, sobald sich ergibt, dass diesen beiden Krankheitsformen unterschiedliche Mechanismen zugrundeliegen. Aus diesem Grunde ist eine differenzierte Betrachtung hilfreich.

So scheinen beim Emphysem gerade anti-inflammatorische Therapien nur einen geringen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung zu haben (Sherrill et al. 1999). Dies legt nahe, dass zusätzlich zur Inflammation weitere Faktoren bei der Pathogenese des Emphysems eine Rolle spielen. Tierversuche haben Hinweise darauf gegeben, dass die Therapie der schwergradigen COPD mit Kortisonpräparaten, wie sie zur Zeit empfohlen wird, gemischte und z.T. problematische Wirkungen haben könnte, da zum einen Prozesse des Remodelling und der (möglicherweise fehlgesteuerten) Wundheilung der Lunge unterbunden werden können (Tomic et al. 2005), zum anderen über eine erhöhte Expression von Matrix-Proteinen bzw. Inhibition von Antiproteasen eine alveoläre Lungenzerstörung hervorgerufen werden kann (Choe et al. 2003). Analog ist bei Erkrankungen der Haut, wie dem atopischen Ekzem, eine Inhibition des Wachstums von Hautfibroblasten durch eine langdauernde Kortisonbehandlung bekannt.

Therapien, bei denen Vitamin-A-(Retinsäure)-derivate eine Regeneration eines künstlich erzeugten Emphysems unterstützten, waren bei der Ratte erfolgreich (Massaro und Massaro 1997). Die Daten zu der Wirksamkeit bei der Maus sind kontrovers (Fujita et al. 2004; Hind und Maden 2004). Beim Menschen zeigten ähnliche Präparate praktisch keine Wirkung (FORTE trial, NHI, Präsentation auf dem Kongress der *American Thoracic Society* 2004). Zum einen sind hierfür vermutlich Unterschiede zwischen den Spezies, zum anderen Unterschiede in der Erzeugung des Emphysems verantwortlich. Während bei der Ratte nur eine sehr kurze Einwirkdauer der Schadschubstanz vorlag, ist die Entwicklung eines Emphysems beim Menschen an eine viele Jahre anhaltende inhalative Schadstoffbelastung gebunden. Somit steht beispielsweise für eine epigenetische Umprogrammierung sehr viel mehr Zeit zur Verfügung. Dies lässt vermuten, dass eine regenerative Therapie beim Menschen am aussichtsreichsten bei den Patienten mit beginnender, noch nicht weit fortgeschrittener Erkrankung sein könnte.

Die einzig effektive therapeutische Intervention bei der COPD bleibt vermutlich in absehbarer Zeit weiterhin die Aufgabe des Rauchens. Dass eine effektivere Prävention des Rauchens noch wünschenswerter wäre, liegt auf der Hand. Da jedoch weltweit mit einer Zunahme der Prävalenz der COPD gerechnet werden muss, sind die Bemühungen zum Verständnis der Erkrankung weiterhin in hohem Maße gerechtfertigt.

Da die vorliegende Arbeit nicht ohne Hinblick auf mögliche Beiträge zur Entwicklung einer kausalen Therapie konzipiert wurde, könnten nachfolgende Versuche eine „Reprogrammierung“ der Zellen zum Ziel haben. Hierbei könnte man zum einen eine dauerhafte Proliferationsreduktion bei den Zellen der Kontrollpatienten bewirken, um Wirkmechanismen der möglicherweise beteiligten Gene und Proteine zu verifizieren, zum anderen eine Beschleunigung der Zellteilung der Fibroblasten von Patienten mit Emphysem anstreben. Allerdings bedarf es dazu konkreter Anhaltspunkte über in Frage kommende Mechanismen. Nach den in dieser Arbeit dargelegten Befunden könnte ein solcher Ansatz darin bestehen, Unterschiede in der Reaktion der Fibroblasten auf die Wachstumsfaktoren Insulin, IGF-I und/oder IGF-II nachzuweisen und die Frage zu klären, ob eine Konzentrationserhöhung dieser Faktoren möglicherweise zu einem veränderten Wachstum führt. Allerdings berühren diese Untersuchungen insofern noch nicht den Kern der möglichen epigenetischen Umprogrammierung, als sie sich in konventioneller Weise externer Stimuli bedienen.

Einen guten Ausgangspunkt könnte eine frühere Untersuchung darstellen, die anhand von minimalen Zellkulturmedien die Wirksamkeit bestimmter Faktoren als mitogene Faktoren untersuchte (Bitterman et al. 1983). In dieser Untersuchung dienten die zu untersuchenden Proteine als basale Progressionsfaktoren, mit denen die Wirksamkeit anderer zugesetzter Komponenten als Kompetenzfaktoren getestet wurden. Diesen experimentellen Ansatz könnte man umkehren, ein entsprechendes Basalmedium mit festgelegten Kompetenzfaktoren herstellen und die Insulin-ähnlichen Faktoren abwechselnd als Progressionsfaktoren einsetzen.

Betrachtet man Alterung und Seneszenz mit den damit einhergehenden verlangsamten Stoffwechselforgängen als einen tumorsuppressiven Mechanismus, so ließe sich spekulieren, dass ein Schutz des Organismus vor genetischen Schäden bzw. vor der Transmission derartiger Schäden auf Tochterzellen im Sinne einer Reaktion auf die Noxe Zigarettenrauch als Nebenfolge die Entwicklung eines Lungenemphysems nach sich ziehen kann. Eine weitere für die Forschung interessante Implikation ist, dass eine genetische Prädisposition nicht nur in den die Entzündung steuernden Genen, sondern auch in den Genen gesucht werden sollte, die die Reaktion von Strukturzellen auf die Entzündung bestimmen. Hierfür liegen im Vergleich zu den Genen der (akuten) Entzündung bzw. Entzündungsantwort sehr viel weniger Daten vor, da sich dieses langfristige Antwortverhalten notwendigerweise den ebenso komplexen wie zentralen Fragen der Regulation der Integrität eines Organs oder Organismus stellen muss. Zwar ist das menschliche Genom inzwischen in einer verbesserten Version sequenziert und dokumentiert, doch ist ein Verständnis der regulativen Netzwerke, das zu einem therapeutisch handhabbaren Wissen führt, in keiner Weise erreicht. Insofern sind für das Verständnis des Lungenemphysems vermutlich – und nur scheinbar paradoxerweise – von der Stammzellforschung wesentliche Impulse zu erwarten, und dies keineswegs nur unter dem Aspekt der Therapie.

5.8.3 Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (*mesenchymal stem cells*, MSC) sind von großem Interesse im Zusammenhang mit der Therapie des Emphysems, könnten sie doch das Potential bergen, die verlorengegangenen Strukturen der Lunge wiederherzustellen. Solche mesenchymalen Stammzellen sind im menschlichen Organismus nachweisbar. Es handelt sich um multipotente Zellen, die sich entlang verschiedener Entwicklungslinien zu Knorpel-, Knochen- oder Fettgewebe entwickeln können (chondrogenic, osteogenic, adipogenic lineage) (Sabatini et al. 2005).

In fötalen humanen Lungen wurden solche mesenchymalen Stammzellen (MSCs) mit einer fibroblastenähnlichen Morphologie identifiziert; ihr Vorkommen in der adulten Lunge wurde ebenfalls berichtet (Sabatini et al. 2005).

Strukturelle Ähnlichkeiten humaner, adulter, bronchialer, fibroblastenähnlicher Zellen mit mesenchymalen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark oder fötalen Lungen und ihre Fähigkeit, sich entlang der drei mesenchymalen Entwicklungslinien zu differenzieren, lassen vermuten, dass diese Zellen in der adulten Lunge vorhanden und möglicherweise an Reparaturprozessen beteiligt sind (Sabatini et al. 2005).

Ebenso von Interesse sind Beobachtungen, dass sich transgene Fibroblasten bei Mäusen intratracheal applizieren lassen, diese durch das Epithel migrieren und sich in den Alveolarwänden festsetzen (Kuang et al. 2005). Auf diese Weise könnten sie strukturelle Schäden des Parenchyms direkt auf zellulärer Ebene reparieren, indem sie die geschädigten Zellen ersetzen. Des weiteren könnten transgene Fibroblasten eingesetzt werden, um die Sezernierung bestimmter Gene zu ermöglichen oder zu verstärken, die möglicherweise während der Pathogenese des Emphysem unterdrückt wurden. Alternativ könnten neutralisierender Strukturen (siRNA) gegen überexprimierte Gene in den Alveolarwänden auf diesem Wege ebenfalls appliziert werden. Allerdings ist als Einschränkung zu beachten, dass die Maus bereits basal eine ausgeprägte Fähigkeit zur Regeneration oder Neubildung alveolären Gewebes besitzt und dass ebenso die verwendeten Modelle, die in der Regel massive Interventionen beinhalten, nicht zwingend auf den chronischen Krankheitsverlauf des Emphysems beim Menschen übertragbar sind.

5.8.4 Interaktion von Fibroblasten und anderen Lungenzellen

In der vorliegenden Arbeit wurden nur Fibroblasten untersucht. Zweifelsohne ist es jedoch nicht ausreichend, sich bei der Untersuchung des Emphysems alleine auf diesen Zelltyp zu beschränken. Beispielsweise ist beim Asthma bekannt, dass Mediatoren, die von Epithelzellen während der Reparatur und bei wiederkehrender Schädigung freigesetzt werden, die Proliferation von benachbarten Myofibroblasten beschleunigen. Unter den sezernierten und pro-proliferativen Faktoren waren bFGF (basic fibroblast growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), IGF-1, TGF-beta2 (transforming growth factor-beta2) und Endothelin-1 (Zhang et al. 1999).

Andere Zellarten der Lunge, die ebenfalls der schädigenden Noxe Zigarettenrauch ausgesetzt sind, könnten analoge Veränderungen wie die Fibroblasten erleiden. Dies gilt um so mehr, als die in dieser Arbeit beschriebenen Änderungen des Phänotyps der Fibroblasten relativ unspezifischer Natur sind und vermutlich auch in anderen Zelltypen auftreten können. Ferner sind vielfältige Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen, insbesondere seitens

Fibroblasten, möglich. Plantier et al. (2005) fokussierten in der Analyse des Lungenemphysems bereits auf diesen Aspekt, indem sie eine mögliche Interaktion von Fibroblasten und Epithelzellen bei der Reparatur alveolärer Schäden untersuchten. Ihrer Hypothese nach ist die Sezernierung von *hepatocyte growth factor* (HGF) und *keratinocyte growth factor* (KGF) durch Fibroblasten für eine effektive Reparatur des geschädigten Epithels notwendig. Im Vergleich von Fibroblasten von Patienten mit Emphysem und Fibroblasten von Kontrollpatienten wurden basal und nach Stimulation mit IL-1beta bzw. Prostaglandin E(2) geringere Mengen an intrazellulärem und sezerniertem HGF beim Emphysem detektiert, wobei weder Retinsäuren (all-trans und 9-cis) noch N-Acetylcystein als Schutz gegen oxidative Schäden das Verhältnis zwischen den Gruppen verändern konnten. Die Sezernierung von KGF unterschied sich nicht zwischen den Gruppen und war auch nicht mit IL-1beta stimulierbar (Plantier et al. 2005). Dies verweist auf die Möglichkeit von Interaktionen durch Botenstoffe, deren Expression ihrerseits möglicherweise innerhalb epigenetisch festgelegter Grenzen erfolgt.

6. Zusammenfassung

Die wiederholte Exposition des Menschen gegenüber inhalierten oxidativen Noxen unterschiedlicher Genese ist ein wesentlicher Faktor bei der Entstehung umweltinduzierter Erkrankungen. Zu diesen Noxen gehört neben arbeitsplatzbezogenen Noxen in Form aggressiver Gase und Partikel insbesondere der inhalative Zigarettenrauch (aktiv wie passiv) als Hauptschadstoffbelastung im Innenraumbereich. Das aktive Rauchen, und in geringerem Maße das Passivrauchen, können die Entstehung einer chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) bewirken. Über die genannten Noxen hinaus kann die Entwicklung der Erkrankung durch andere Umwelt- und Verhaltensfaktoren begünstigt werden.

Eine pathophysiologisch bedeutsame Komponente der COPD ist das Lungenemphysem. Es ist durch eine Zerstörung der alveolären Strukturen gekennzeichnet, die sich im Verlust der elastischen Spannung der Lunge und ihrer Gasaustauschfähigkeit widerspiegelt. Da Fibroblasten eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der Struktur der Lunge spielen, fokussierte die vorliegende Arbeit auf umweltinduzierte Veränderungen im Verhalten dieses Zelltyps. Sie ging von der Beobachtung aus, dass Raucher häufig Zeichen einer vorgezogenen Alterung aufweisen, dass oxidative Noxen Zellen in Kultur in einen gealterten Zustand versetzen können, dass gealterte Zellen eine geringere Bereitschaft zur Zellteilung zeigen und dass die Erkrankung Zeichen eines autonomen Progresses aufweist, der nicht alleine durch akute Entzündung erklärt werden kann. Daraus ergab sich die Hypothese, dass parenchymale, d.h. dem alveolären Bereich entstammende Fibroblasten der Lunge Zeichen einer vorgezogenen Alterung (Seneszenz) im Vergleich zu den Zellen von Rauchern ohne Lungenemphysem aufweisen. Derartige Änderungen hätten die Störung der Regeneration der Lunge und somit einen Gewebeabbau im Verlauf der Jahre zur Folge.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte somit geklärt werden, (1) ob und wie sich das Wachstum der Fibroblasten beim Lungenemphysem von demjenigen der Kontrollzellen unterscheidet, (2) ob der Phänotyp der Fibroblasten von Patienten mit Emphysem Zeichen einer vorzeitigen Alterung aufweist, (3) welche für eine zelluläre Seneszenz möglicherweise relevanten Gene unter den standardisierten Bedingungen der Kultur eine dauerhaft veränderte Expression aufweisen.

Auf dieser Basis wurden Lungenfibroblasten aus Operationsresektaten von Patienten mit und ohne Emphysem untersucht. Die Charakterisierung der aus Explantaten gewonnenen Kulturen umfasste zunächst eine Reinheitsbestimmung der Zellkulturen. Hierbei ergab sich, dass in der zweiten Passage nach Primärkultur die Fibroblasten nahezu in Reinkultur vorlagen.

Sodann wurde die Zellteilungsrate der Fibroblastenkulturen in beiden Gruppen während der exponentiellen Wachstumsphase quantifiziert. Es wurde eine signifikant verminderte Verdopplungsrate der Fibroblasten von Patienten mit Emphysem beobachtet. Da die Zellen im Abstand von 5-6 Wochen von der Entnahme untersucht wurden, ließ sich schließen, dass die Fibroblasten der Patienten mit Emphysem intrinsisch verändert waren und nicht akuter inflammatorischer Reize bedurften, um sich anders als die Kontrollzellen zu verhalten. Gealterte Zellen unterscheiden sich von nicht gealterten Zellen nicht nur durch eine geringere Teilungsrate, sondern auch durch eine geringere maximale Zahl von Teilungen.

Daher wurde in Langzeitkulturen untersucht, ob die langsamere Proliferation beim Emphysem mit einer geringeren proliferativen Kapazität einhergeht bzw. ob die Fibroblasten bei genügend großer zur Verfügung stehender Zeit die gleiche maximale Zahl von Teilungen erreichen, wie die Kontrollzellen.

Die Unterschiede der initialen Steigung der Zellteilungskurven waren gleichsinnig zu den in den Kurzzeitversuchen beobachteten Unterschieden. Der Median der maximalen Zahl der Populationsverdopplungen bis zur Stagnation des Wachstums in serieller Passage lag bei den Zellen der Patienten mit Emphysem um ca. 6 Verdopplungen niedriger, wenn auch wegen der großen Streuung innerhalb der Gruppen der Unterschied nicht statistisch signifikant war. Die Analyse der initialen Form der Kurven ergab ebenfalls eine Verschiebung um 6 Verdopplungen bei den Zellen der Patienten mit Emphysem. Dieser Befund bestätigte die Annahme, dass die verminderte Proliferationsrate der Lungenfibroblasten von Patienten mit Emphysem persistierende, intrinsische Änderungen widerspiegelte.

Als phänomenologischer Indikator der Zellalterung wurde im nächsten Schritt die Expression der Seneszenz-assoziierten beta-Galaktosidase untersucht. In der Tat fand sich in den Zellen der Patienten mit Lungenemphysem eine signifikant stärkere Aktivität dieses Enzyms, im Sinne einer zellulären Seneszenz. Die Validität dieses Nachweises konnte mittels serieller Anfärbungen bestätigt werden.

Einer chronologischen zellulären Alterung liegt i.a. als zentraler Mechanismus die Verkürzung der am Ende der Chromosomen befindlichen Telomeren zugrunde, die als Abwärtszähler der verbleibenden Zellteilungskapazität fungieren. Daher wurden mit Hilfe einer immunologischen Technik die Telomerenlängen vergleichend untersucht. Die Telomerenlängen waren nicht zwischen den Gruppen verschieden und die Wahrscheinlichkeit eines dennoch bestehenden Unterschiedes konnte auf einen Wert von weniger als 5 % berechnet werden. Daher scheint die beobachtete reduzierte Proliferationsrate auf Telomeren-unabhängigen Mechanismen zu beruhen; dies spricht stärker für den Typ einer durch Noxen induzierten als einer chronologischen Seneszenz.

Um einen Überblick über die Mechanismen zu gewinnen, die eine derartige Form der Seneszenz charakterisieren, wurde mit Hilfe eines 12.000 Gene umfassenden cDNA-Arrays (Genchip) die Expression (mRNA) einer für das Genom repräsentativen Menge von Genen in Zellkultur exploriert. Eine Auswahl der auf diese Weise qualitativ identifizierten Gene wurde dann in unabhängig angezogenen Zellkulturen mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) auf ihre Expression hin überprüft.

Der explorative cDNA-Array wurde mit zusammengefassten Proben jeweils dreier Fibroblastenkulturen von Patienten mit und ohne Emphysem durchgeführt; er zeigte summarisch eine größere Zahl ab- als aufregulierter Gene beim Emphysem. Die im Array beobachteten Unterschiede der Genexpression zwischen den Gruppen konnten in der qPCR-Untersuchung für die bekanntermaßen Seneszenz-assoziierten Gene IGFBP-3 und IGFBP-rP1 bestätigt werden, die beim Emphysem signifikant aufreguliert vorlagen. Beide Gene codieren für Proteine, die die Effekte von Insulin und Insulin-artigen Faktoren steuern. Eine unterschiedliche Expression anderer Gene, die nach Literaturbefunden mit zellulärer Seneszenz assoziiert sind und im Array in der Regel unterschiedlich ausgeprägt gefunden wurden, ließ sich in der qPCR nicht bestätigen; dies betraf FOSL1, LOXL2, OAZ1, CDK4, IGFBP-5, -rP2 (CTGF) und -rP4 (Cyr61).

Da eine unterschiedliche Genexpression nicht notwendigerweise eine unterschiedliche Proteinsynthese nach sich zieht, wurde zusätzlich die Proteinmenge von IGFBP-3 im Überstand der Zellkulturen analysiert. In Übereinstimmung mit den Expressionsbefunden fand sich IGFBP-3 vermehrt bei Fibroblasten, die von Patienten mit Emphysem stammten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass parenchymale Lungenfibroblasten von Patienten mit Lungenemphysem eine verminderte Proliferationsrate und -kapazität besitzen. In Verbindung mit den Daten der Anfärbung für einen zellulären Seneszenzmarker spricht dies für das Vorliegen eines seneszenten zellulären Phänotyps beim Emphysem. Die Tatsache, dass einerseits die Änderungen in Kultur persistierten und dass andererseits kein Unterschied der Telomerenlängen bestand, legt eine durch epigenetische Mechanismen vermittelte induzierte Seneszenz der Zellen nahe. Die mittels gestaffelter Analyse der Genexpression gefundene Aufregulation von anti-proliferativen Proteinen der Insulinachse wie IGFBP-3 und IGFBP-rP1 in Lungenfibroblasten von Patienten mit Emphysem erlaubt es darüber hinaus, eine Verbindung zwischen dem lokalen Verhalten von Strukturzellen und systemischen, über Insulin und insulinartige Wachstumsfaktoren vermittelten Änderungen zu schlagen. Diese Daten sind neuartig und erscheinen hilfreich für das Verständnis der Pathogenese des Lungenemphysems. Da sie modellhaft das Ergebnis einer chronischen Belastung mit einer Noxe auf Zellen widerspiegeln, ist anzunehmen, dass der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz und die diesen Ansatz bestätigenden Daten auch für das Verständnis anderer, durch Umwelt und/oder Verhalten induzierter Erkrankungen förderlich sind.

7. Literatur

- Absher, M. (1995): Fibroblasts. In Lung Cell Biology. Lung Biology in Health and Disease.; Edited by Massaro D, Marcel Dekker, Inc New York, Basel **41**, 401-439.
- Allsopp, R.C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futcher, A.B., Greider, C.W. und Harley, C.B. (1992): Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts; Proc Natl Acad Sci U S A **89**, 10114-10118.
- Amoli, K. (1998): Bronchopulmonary disease in Iranian housewives chronically exposed to indoor smoke; Eur Respir J **11**, 659-663.
- Anthonisen, N.R., Connett, J.E., Kiley, J.P., Altose, M.D., Bailey, W.C., Buist, A.S., Conway, W.A., Jr., Enright, P.L., Kanner, R.E., O'Hara, P. und . (1994): Effects of smoking intervention and the use of an inhaled anticholinergic bronchodilator on the rate of decline of FEV1. The Lung Health Study; JAMA **272**, 1497-1505.
- Aoshiha, K., Yokohori, N. und Nagai, A. (2003): Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes; Am J Respir Cell Mol Biol **28**, 555-562.
- Aston, C., Jagirdar, J., Lee, T.C., Hur, T., Hintz, R.L. und Rom, W.N. (1995): Enhanced insulin-like growth factor molecules in idiopathic pulmonary fibrosis; Am J Respir Crit Care Med **151**, 1597-1603.
- Auerbach, O., Hammond, E.C., Garfinkel, L. und Benante, C. (1972): Relation of smoking and age to emphysema. Whole-lung section study; N Engl J Med **286**, 853-857.
- Baird, D.M., Rowson, J., Wynford-Thomas, D. und Kipling, D. (2003): Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells; Nat Genet **33**, 203-207.
- Bakiri, L., Matsuo, K., Wisniewska, M., Wagner, E.F. und Yaniv, M. (2002): Promoter specificity and biological activity of tethered AP-1 dimers; Mol Cell Biol **22**, 4952-4964.
- Baldi, P. and Hatfield, G. W. (2002): DNA microarrays and gene expression: from experiments to data analysis and modeling, Cambridge University Press
- Balin, A.K., Fisher, A.J., Anzelone, M., Leong, I. und Allen, R.G. (2002): Effects of establishing cell cultures and cell culture conditions on the proliferative life span of human fibroblasts isolated from different tissues and donors of different ages; Exp Cell Res **274**, 275-287.
- Barbieri, M., Bonafe, M., Franceschi, C. und Paolisso, G. (2003a): Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans; Am J Physiol Endocrinol Metab **285**, E1064-E1071.
- Barbieri, M., Rizzo, M.R., Manzella, D., Grella, R., Ragno, E., Carbonella, M., Abbatecola, A.M. und Paolisso, G. (2003b): Glucose regulation and oxidative stress in healthy centenarians; Exp Gerontol **38**, 137-143.
- Barnes, P.J. (2000): Chronic obstructive pulmonary disease; N Engl J Med **343**, 269-280.
- Barnes, P. J. and Godfrey, S. (1997): Chronic obstructive pulmonary disease, Martin Dunitz Ltd London.

- Barnes, P.J., Shapiro, S.D. und Pauwels, R.A. (2003): Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms; *Eur Respir J* **22**, 672-688.
- Barnes, P.J. (1999): Genetics and pulmonary medicine bullet 9: Molecular genetics of chronic obstructive pulmonary disease; *Thorax* **54**, 245-252.
- Bascom, R., Bromberg, P.A., Costa, D.A., Devlin, R., Dockery, D.W., Frampton, M.W., Lambert, W., Samet, J.M., Speizer, F.E. und Utell, M.J. (1996): Health effects of outdoor air pollution. Committee of the Environmental and Occupational Health Assembly of the American Thoracic Society; *Am J Respir Crit Care Med* **153**, 3-50.
- Bergman, M.R., Cheng, S., Honbo, N., Piacentini, L., Karliner, J.S. und Lovett, D.H. (2003): A functional activating protein 1 (AP-1) site regulates matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) transcription by cardiac cells through interactions with JunB-Fra1 and JunB-FosB heterodimers; *Biochem J* **369**, 485-496.
- Bird, J., Ostler, E.L. und Faragher, R.G. (2003): Can we say that senescent cells cause ageing?; *Exp Gerontol* **38**, 1319-1326.
- Birring, S.S., Brightling, C.E., Bradding, P., Entwisle, J.J., Vara, D.D., Grigg, J., Wardlaw, A.J. und Pavord, I.D. (2002): Clinical, radiologic, and induced sputum features of chronic obstructive pulmonary disease in nonsmokers: a descriptive study; *Am J Respir Crit Care Med* **166**, 1078-1083.
- Bitterman, P.B., Rennard, S.I., Adelberg, S. und Crystal, R.G. (1983): Role of fibronectin as a growth factor for fibroblasts; *J Cell Biol* **97**, 1925-1932.
- Blackburn, E.H. (1991): Structure and function of telomeres; *Nature* **350**, 569-573.
- Bowman, P.D. und Daniel, C.W. (1975): Aging of human fibroblasts in vitro: surface features and behavior of aging WI 38 cells; *Mech Ageing Dev* **4**, 147-158.
- Brandes, D., Murphy, D.G., Anton, E.B. und Barnard, S. (1972): Ultrastructural and cytochemical changes in cultured human lung cells; *J Ultrastruct Res* **39**, 465-483.
- Brightling, C.E., Monteiro, W., Ward, R., Parker, D., Morgan, M.D., Wardlaw, A.J. und Pavord, I.D. (2000): Sputum eosinophilia and short-term response to prednisolone in chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial; *Lancet* **356**, 1480-1485.
- Bucher, O. (1980): *Cytologie Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*, 10. Auflage, Verlag Hans Huber Bern, Stuttgart, Wien.
- Carnevali, S., Nakamura, Y., Mio, T., Liu, X., Takigawa, K., Romberger, D.J., Spurzem, J.R. und Rennard, S.I. (1998): Cigarette smoke extract inhibits fibroblast-mediated collagen gel contraction; *Am J Physiol* **274**, L591-L598.
- Carnevali, S., Petruzzelli, S., Longoni, B., Vanacore, R., Barale, R., Cipollini, M., Scatena, F., Paggiaro, P., Celi, A. und Giuntini, C. (2003): Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts; *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**, L955-L963.
- Chandrasekhar, S. und Millis, A.J. (1980): Fibronectin from aged fibroblasts is defective in promoting cellular adhesion; *J Cell Physiol* **103**, 47-54.

- Chen, L.J., Zhao, Y., Gao, S., Chou, I.N., Toselli, P., Stone, P. und Li, W. (2005): Downregulation of lysyl oxidase and upregulation of cellular thiols in rat fetal lung fibroblasts treated with cigarette smoke condensate; *Toxicol Sci* **83**, 372-379.
- Choe, K.H., Taraseviciene-Stewart, L., Scerbavicius, R., Gera, L., Tuder, R.M. und Voelkel, N.F. (2003): Methylprednisolone causes matrix metalloproteinase-dependent emphysema in adult rats; *Am J Respir Crit Care Med* **167**, 1516-1521.
- Cook, D.G. und Strachan, D.P. (1999): Health effects of passive smoking-10: Summary of effects of parental smoking on the respiratory health of children and implications for research; *Thorax* **54**, 357-366.
- Cook, D.G., Strachan, D.P. und Carey, I.M. (1998): Health effects of passive smoking. 9. Parental smoking and spirometric indices in children; *Thorax* **53**, 884-893.
- Cook, V.J., Coxson, H.O., Mason, A.G. und Bai, T.R. (2001): Bullae, bronchiectasis and nutritional emphysema in severe anorexia nervosa; *Can Respir J* **8**, 361-365.
- Coxson, H.O., Chan, I.H., Mayo, J.R., Hlynsky, J., Nakano, Y. und Birmingham, C.L. (2004): Early emphysema in patients with anorexia nervosa; *Am J Respir Crit Care Med* **170**, 748-752.
- Cristofalo, V.J., Allen, R.G., Pignolo, R.J., Martin, B.G. und Beck, J.C. (1998): Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation; *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10614-10619.
- Crystal, R.G., Brantly, M.L., Hubbard, R.C., Curiel, D.T., States, D.J. und Holmes, M.D. (1989): The alpha 1-antitrypsin gene and its mutations. Clinical consequences and strategies for therapy; *Chest* **95**, 196-208.
- Csiszar, K. (2001): Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family; *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **70**, 1-32.
- Darnell, J. E., Lodish, H., and Baltimore, D. (1990): *Molecular Cell Biology*, 2. Auflage, Scientific American Books, Inc. New York, Oxford.
- DAS EUROPÄISCHE PARLAMENT UND DER RAT DER EUROPÄISCHEN UNION (2001): Richtlinie 2001/37/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 5. Juni 2001 zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten über die Herstellung, die Aufmachung und den Verkauf von Tabakerzeugnissen ; Amtsblatt Nr L 194 vom 18/07/2001 S 0026 - 0035
- Dennis, R.J., Maldonado, D., Norman, S., Baena, E., Castano, H., Martinez, G. und Velez, J.R. (1996): Wood smoke exposure and risk for obstructive airways disease among women; *Chest* **109**, 55S-56S.
- Der Bundesminister für Umwelt Naturschutz und Reaktorsicherheit (2005): Gesetz zum Schutz vor schädlichen Umwelteinwirkungen durch Luftverunreinigungen, Geräusche, Erschütterungen und ähnliche Vorgänge (Bundesimmissionsschutzgesetz - BImSchG) vom 15. März 1974; (BGBl I , S 1193) in der geänderten Version durch BGBl I S 1865 vom 01 11 2005
- Deutsches Krebsforschungszentrum (Hrsg.) (2005): Rote Reihe Tabakprävention und Tabakkontrolle Band 5: Passivrauchen - ein unterschätztes Gesundheitsrisiko, Heidelberg.

- Di Stefano, A., Maestrelli, P., Roggeri, A., Turato, G., Calabro, S., Potena, A., Mapp, C.E., Ciaccia, A., Covacev, L., Fabbri, L.M. und . (1994): Upregulation of adhesion molecules in the bronchial mucosa of subjects with chronic obstructive bronchitis; *Am J Respir Crit Care Med* **149**, 803-810.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I. und Pereira-Smith, O. (1995): A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo; *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9363-9367.
- Distel, R.J., Robinson, G.S. und Spiegelman, B.M. (1992): Fatty acid regulation of gene expression. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms; *J Biol Chem* **267**, 5937-5941.
- Dossing, M., Khan, J. und al Rabiah, F. (1994): Risk factors for chronic obstructive lung disease in Saudi Arabia; *Respir Med* **88**, 519-522.
- Erpenbeck, V.J., Hohlfeld, J.M., Volkmann, B., Hagenberg, A., Geldmacher, H., Braun, A. und Krug, N. (2003): Segmental allergen challenge in patients with atopic asthma leads to increased IL-9 expression in bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes; *J Allergy Clin Immunol* **111**, 1319-1327.
- Fabel, H. and Konietzko, N. (2000): *Weißbuch Lunge 2000 - Defizite, Zukunftsperspektiven, Forschungsansätze- Zur Lage und Zukunft der Pneumologie in Deutschland*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- Fabel, H. and Konietzko, N. (2005): *Weißbuch Lunge 2005 - Die Lunge und ihre Erkrankungen: Zur Lage und Zukunft der Pneumologie in Deutschland*, 3, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- Feinleib, M., Rosenberg, H.M., Collins, J.G., Delozier, J.E., Pokras, R. und Chevarley, F.M. (1989): Trends in COPD morbidity and mortality in the United States; *Am Rev Respir Dis* **140**, S9-18.
- Finkelstein, R., Fraser, R.S., Ghezzi, H. und Cosio, M.G. (1995): Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers; *Am J Respir Crit Care Med* **152**, 1666-1672.
- Finlay, G.A., O'Driscoll, L.R., Russell, K.J., D'arcy, E.M., Masterson, J.B., FitzGerald, M.X. und O'Connor, C.M. (1997a): Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema; *Am J Respir Crit Care Med* **156**, 240-247.
- Finlay, G.A., Russell, K.J., McMahon, K.J., D'arcy, E.M., Masterson, J.B., FitzGerald, M.X. und O'Connor, C.M. (1997b): Elevated levels of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of emphysematous patients; *Thorax* **52**, 502-506.
- Fournier, M., Lebargy, F., Le Roy, L.F., Lenormand, E. und Pariente, R. (1989): Intraepithelial T-lymphocyte subsets in the airways of normal subjects and of patients with chronic bronchitis; *Am Rev Respir Dis* **140**, 737-742.
- Fujita, M., Ye, Q., Ouchi, H., Nakashima, N., Hamada, N., Hagimoto, N., Kuwano, K., Mason, R.J. und Nakanishi, Y. (2004): Retinoic acid fails to reverse emphysema in adult mouse models; *Thorax* **59**, 224-230.
- GOLD (2005): Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease - Executive Summary. NHLBI/WHO Workshop report. NIH Publication No.2701.2001 updated 2005, <http://www.goldcopd.com/> (URL: Stand 15.01.2006).

- Gold, D.R., Wang, X., Wypij, D., Speizer, F.E., Ware, J.H. und Dockery, D.W. (1996): Effects of cigarette smoking on lung function in adolescent boys and girls; *N Engl J Med* **335**, 931-937.
- Goldstein, R.H., Poliks, C.F., Pilch, P.F., Smith, B.D. und Fine, A. (1989): Stimulation of collagen formation by insulin and insulin-like growth factor I in cultures of human lung fibroblasts; *Endocrinology* **124**, 964-970.
- Goldstein, S., Moerman, E.J. und Baxter, R.C. (1993): Accumulation of insulin-like growth factor binding protein-3 in conditioned medium of human fibroblasts increases with chronologic age of donor and senescence *in vitro*; *J Cell Physiol* **156**, 294-302.
- Goldstein, S., Moerman, E.J., Jones, R.A. und Baxter, R.C. (1991): Insulin-like growth factor binding protein 3 accumulates to high levels in culture medium of senescent and quiescent human fibroblasts; *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9680-9684.
- Golpon, H.A., Coldren, C.D., Zamora, M.R., Cosgrove, G.P., Moore, M.D., Tuder, R.M., Geraci, M.W. und Voelkel, N.F. (2004): Emphysema lung tissue gene expression profiling; *Am J Respir Cell Mol Biol* **31**, 595-600.
- Goulet, F., Boulet, L.P., Chakir, J., Tremblay, N., Dube, J., Laviolette, M., Boutet, M., Xu, W., Germain, L. und Auger, F.A. (1996): Morphologic and functional properties of bronchial cells isolated from normal and asthmatic subjects; *Am J Respir Cell Mol Biol* **15**, 312-318.
- Grotendorst, G.R. und Duncan, M.R. (2005): Individual domains of connective tissue growth factor regulate fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation; *FASEB J* **19**, 729-738.
- Hansel, T. T. and Barnes, P. J. (2004): *An Atlas of chronic obstructive pulmonary disease (COPD)*, The Parthenon Publishing Group, London
- Harik-Khan, R.I., Fleg, J.L. und Wise, R.A. (2002): Body mass index and the risk of COPD; *Chest* **121**, 370-376.
- Harley, C.B. (1991): Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb?; *Mutat Res* **256**, 271-282.
- Harley, C.B., Futcher, A.B. und Greider, C.W. (1990): Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts; *Nature* **345**, 458-460.
- Hashimoto, S., Kobayashi, A., Kooguchi, K., Kitamura, Y., Onodera, H. und Nakajima, H. (2000): Upregulation of two death pathways of perforin/granzyme and FasL/Fas in septic acute respiratory distress syndrome; *Am J Respir Crit Care Med* **161**, 237-243.
- Hautamaki, R.D., Kobayashi, D.K., Senior, R.M. und Shapiro, S.D. (1997): Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice; *Science* **277**, 2002-2004.
- Hayflick, L. (1965): The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains; *Exp Cell Res* **37**, 614-636.
- Hayflick, L. und Moorehead, P.S. (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains; *Exp Cell Res* **25**, 585-621.
- Hind, M. und Maden, M. (2004): Retinoic acid induces alveolar regeneration in the adult mouse lung; *Eur Respir J* **23**, 20-27.

- Holz, O., Zühlke, I., Jaksztat, E., Müller, K.C., Welker, L., Nakashima, M., Diemel, K.D., Branscheid, D., Magnussen, H. und Jörres, R.A. (2004): Lung fibroblasts from patients with emphysema show a reduced proliferation rate in culture; *Eur Respir J* **24**, 575-579.
- Hubbard, R.C., Ogushi, F., Fells, G.A., Cantin, A.M., Jallat, S., Courtney, M. und Crystal, R.G. (1987): Oxidants spontaneously released by alveolar macrophages of cigarette smokers can inactivate the active site of alpha 1-antitrypsin, rendering it ineffective as an inhibitor of neutrophil elastase; *J Clin Invest* **80**, 1289-1295.
- Huber, G.L., First, M.W. und Grubner, O. (1991): Marijuana and tobacco smoke gas-phase cytotoxins; *Pharmacol Biochem Behav* **40**, 629-636.
- Hwa, V., Oh, Y. und Rosenfeld, R.G. (1999): The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily; *Endocr Rev* **20**, 761-787.
- Ishii, T., Matsuse, T., Igarashi, H., Masuda, M., Teramoto, S. und Ouchi, Y. (2001): Tobacco smoke reduces viability in human lung fibroblasts: protective effect of glutathione S-transferase P1; *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280**, L1189-L1195.
- Johnson, J.E., Jr. (1979): Fine structure of IMR-90 cells in culture as examined by scanning and transmission electron microscopy; *Mech Ageing Dev* **10**, 405-443.
- Jordana, M., Schulman, J., McSharry, C., Irving, L.B., Newhouse, M.T., Jordana, G. und Gauldie, J. (1988): Heterogeneous proliferative characteristics of human adult lung fibroblast lines and clonally derived fibroblasts from control and fibrotic tissue; *Am Rev Respir Dis* **137**, 579-584.
- Jörres, R.A. und Magnussen, H. (1997): Oxidative stress in COPD; *Eur Respir Rev* **7**, 131-135.
- Junge, B. und Nagel, M. (1999): Das Rauchverhalten in Deutschland; *Gesundheitswesen* **61**, S121-S125.
- Kapanci, Y., Assimacopoulos, A., Irlé, C., Zwahlen, A. und Gabbiani, G. (1974): "Contractile interstitial cells" in pulmonary alveolar septa: a possible regulator of ventilation-perfusion ratio? Ultrastructural, immunofluorescence, and in vitro studies; *J Cell Biol* **60**, 375-392.
- Kaplan, N.B., Grant, M.M. und Brody, J.S. (1985): The lipid interstitial cell of the pulmonary alveolus. Age and species differences; *Am Rev Respir Dis* **132**, 1307-1312.
- Kasahara, Y., Tuder, R.M., Cool, C.D., Lynch, D.A., Flores, S.C. und Voelkel, N.F. (2001): Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema; *Am J Respir Crit Care Med* **163**, 737-744.
- Kasahara, Y., Tuder, R.M., Taraseviciene-Stewart, L., Le Cras, T.D., Abman, S., Hirth, P.K., Waltenberger, J. und Voelkel, N.F. (2000): Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema; *J Clin Invest* **106**, 1311-1319.
- Keatings, V.M. und Barnes, P.J. (1997): Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects; *Am J Respir Crit Care Med* **155**, 449-453.

- Kelley, R.O., Trotter, J.A., Marek, L.F., Perdue, B.D. und Taylor, C.B. (1980): Variation in cytoskeletal assembly during spreading of progressively subcultivated human embryo fibroblasts (IMR-90); *Mech Ageing Dev* **13**, 127-141.
- Kim, H.J., Liu, X., Wang, H., Kohyama, T., Kobayashi, T., Wen, F.Q., Romberger, D.J., Abe, S., MacNee, W., Rahman, I. und Rennard, S.I. (2002): Glutathione prevents inhibition of fibroblast-mediated collagen gel contraction by cigarette smoke; *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **283**, L409-L417.
- Kim, H.S., Nagalla, S.R., Oh, Y., Wilson, E., Roberts, C.T., Jr. und Rosenfeld, R.G. (1997): Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily; *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12981-12986.
- King, G.L., Kahn, C.R., Rechler, M.M. und Nissley, S.P. (1980): Direct demonstration of separate receptors for growth and metabolic activities of insulin and multiplication-stimulating activity (an insulin-like growth factor) using antibodies to the insulin receptor; *J Clin Invest* **66**, 130-140.
- Komatsu, S., Okazaki, Y., Tateno, M., Kawai, J., Konno, H., Kusakabe, M., Yoshiki, A., Muramatsu, M., Held, W.A. und Hayashizaki, Y. (2000): Methylation and downregulated expression of mac25/insulin-like growth factor binding protein-7 is associated with liver tumorigenesis in SV40T/t antigen transgenic mice, screened by restriction landmark genomic scanning for methylation (RLGS-M); *Biochem Biophys Res Commun* **267**, 109-117.
- Krauss, G. (1997): *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion: das moderne Lehrbuch für Chemiker, Biochemiker, Biologen und Mediziner*, 1, Wiley-VCH Weinheim, New York, Chicester, Brisbane, Singapore, Toronto.
- Krishna, R.G. und Wold, F. (1993): Post-translational modification of proteins; *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **67**, 265-298.
- Kuang, P.P., Lucey, E., Rishikof, D.C., Humphries, D.E., Bronsnick, D. und Goldstein, R.H. (2005): Engraftment of neonatal lung fibroblasts into the normal and elastase-injured lung; *Am J Respir Cell Mol Biol* **33**, 371-377.
- Kurozumi, M., Matsushita, T., Hosokawa, M. und Takeda, T. (1994): Age-related changes in lung structure and function in the senescence-accelerated mouse (SAM): SAM-P/1 as a new murine model of senile hyperinflation of lung; *Am J Respir Crit Care Med* **149**, 776-782.
- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y. und Erusalimsky, J.D. (2000): Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells; *J Cell Sci* **113 (Pt 20)**, 3613-3622.
- Lee, K.W., Chung, S.Y., Yang, I., Lee, Y., Ko, E.Y. und Park, M.J. (2000): Correlation of aging and smoking with air trapping at thin-section CT of the lung in asymptomatic subjects; *Radiology* **214**, 831-836.
- Lindl, T. (2002): *Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*, 5. überarbeitete und erweiterte Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin
- Lipetz, J. und Cristofalo, V.J. (1972): Ultrastructural changes accompanying the aging of human diploid cells in culture; *J Ultrastruct Res* **39**, 43-56.

- Liu, A.N., Mohammed, A.Z., Rice, W.R., Fiedeldej, D.T., Liebermann, J.S., Whitsett, J.A., Braciale, T.J. und Enelow, R.I. (1999a): Perforin-independent CD8(+) T-cell-mediated cytotoxicity of alveolar epithelial cells is preferentially mediated by tumor necrosis factor-alpha: relative insensitivity to Fas ligand; *Am J Respir Cell Mol Biol* **20**, 849-858.
- Liu, H., Lazarus, S.C., Caughey, G.H. und Fahy, J.V. (1999b): Neutrophil elastase and elastase-rich cystic fibrosis sputum degranulate human eosinophils in vitro; *Am J Physiol* **276**, L28-L34.
- Lucibello, F.C., Sewing, A., Brusselbach, S., Burger, C. und Muller, R. (1993): Deregulation of cyclins D1 and E and suppression of cdk2 and cdk4 in senescent human fibroblasts; *J Cell Sci* **105 (Pt 1)**, 123-133.
- Ma, Y., Koza-Taylor, P.H., DiMattia, D.A., Hames, L., Fu, H., Dragnev, K.H., Turi, T., Beebe, J.S., Freemantle, S.J. und Dmitrovsky, E. (2003): Microarray analysis uncovers retinoid targets in human bronchial epithelial cells; *Oncogene* **22**, 4924-4932.
- Mackay, J. (1991): Tobacco: the Third World war; *Thorax* **46**, 153-156.
- Mahadeva, R. und Lomas, D.A. (1998): Genetics and respiratory disease. 2. Alpha 1-antitrypsin deficiency, cirrhosis and emphysema; *Thorax* **53**, 501-505.
- Majo, J., Ghezzi, H. und Cosio, M.G. (2001): Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema; *Eur Respir J* **17**, 946-953.
- Mannino, D.M. (2002): COPD: epidemiology, prevalence, morbidity and mortality, and disease heterogeneity; *Chest* **121**, 121S-126S.
- Massaro, D., Massaro, G.D., Baras, A., Hoffman, E.P. und Clerch, L.B. (2004): Calorie-related rapid onset of alveolar loss, regeneration, and changes in mouse lung gene expression; *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**, L896-L906.
- Massaro, G.D. und Massaro, D. (1997): Retinoic acid treatment abrogates elastase-induced pulmonary emphysema in rats; *Nat Med* **3**, 675-677.
- Matsuo, K., Owens, J.M., Tonko, M., Elliott, C., Chambers, T.J. und Wagner, E.F. (2000): *Fosl1* is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation; *Nat Genet* **24**, 184-187.
- Meshi, B., Vitalis, T.Z., Ionescu, D., Elliott, W.M., Liu, C., Wang, X.D., Hayashi, S. und Hogg, J.C. (2002): Emphysematous lung destruction by cigarette smoke. The effects of latent adenoviral infection on the lung inflammatory response; *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**, 52-57.
- Moerman, E.J., Thweatt, R., Moerman, A.M., Jones, R.A. und Goldstein, S. (1993): Insulin-like growth factor binding protein-3 is overexpressed in senescent and quiescent human fibroblasts; *Exp Gerontol* **28**, 361-370.
- Mohan, S. und Baylink, D.J. (1997): Serum insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-4 and IGFBP-5 levels in aging and age-associated diseases; *Endocrine* **7**, 87-91.
- Morris, S.M., Thomas, K.M., Rich, C.B. und Stone, P.J. (1998): Degradation and repair of elastic fibers in rat lung interstitial fibroblast cultures; *Anat Rec* **250**, 397-407.
- Müller, H-J. and Röder, T. (2004): *Der Experimentator: Mikroarrays*, Elsevier GmbH München.

- Murano, S., Thweatt, R., Shmookler Reis, R.J., Jones, R.A., Moerman, E.J. und Goldstein, S. (1991): Diverse gene sequences are overexpressed in werner syndrome fibroblasts undergoing premature replicative senescence; *Mol Cell Biol* **11**, 3905-3914.
- Murray, C.J. und Lopez, A.D. (1997a): Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study; *Lancet* **349**, 1498-1504.
- Murray, C.J. und Lopez, A.D. (1997b): Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study; *Lancet* **349**, 1269-1276.
- Nakamura, Y., Romberger, D.J., Tate, L., Ertl, R.F., Kawamoto, M., Adachi, Y., Mio, T., Sisson, J.H., Spurzem, J.R. und Rennard, S.I. (1995): Cigarette smoke inhibits lung fibroblast proliferation and chemotaxis; *Am J Respir Crit Care Med* **151**, 1497-1503.
- Newman, R.M., Mobascher, A., Mangold, U., Koike, C., Diah, S., Schmidt, M., Finley, D. und Zetter, B.R. (2004): Antizyme targets cyclin D1 for degradation. A novel mechanism for cell growth repression; *J Biol Chem* **279**, 41504-41511.
- Ning, W., Li, C.J., Kaminski, N., Feghali-Bostwick, C.A., Alber, S.M., Di, Y.P., Otterbein, S.L., Song, R., Hayashi, S., Zhou, Z., Pinsky, D.J., Watkins, S.C., Pilewski, J.M., Sciruba, F.C., Peters, D.G., Hogg, J.C. und Choi, A.M. (2004): Comprehensive gene expression profiles reveal pathways related to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease; *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14895-14900.
- Nobukuni, S., Watanabe, K., Inoue, J., Wen, F.Q., Tamaru, N. und Yoshida, M. (2002): Cigarette smoke inhibits the growth of lung fibroblasts from patients with pulmonary emphysema; *Respirology* **7**, 217-223.
- Noordhoek, J.A., Postma, D.S., Chong, L.L., Vos, J.T., Kauffman, H.F., Timens, W. und Van Straaten, J.F. (2003): Different proliferative capacity of lung fibroblasts obtained from control subjects and patients with emphysema; *Exp Lung Res* **29**, 291-302.
- Nowak, D., Dietrich, E.S., Oberender, P., Uberla, K., Reitberger, U., Schlegel, C., Albers, F., Ruckdaschel, S. und Welsch, R. (2004): [Cost-of-illness Study for the Treatment of COPD in Germany]; *Pneumologie* **58**, 837-844.
- O'Byrne, P.M. und Postma, D.S. (1999): The many faces of airway inflammation. Asthma and chronic obstructive pulmonary disease.; *Am J Respir Crit Care Med* **159**, S41-S63.
- O'Donnell, D.E., Fluge, T., Gerken, F., Hamilton, A., Webb, K., Aguilaniu, B., Make, B. und Magnussen, H. (2004a): Effects of tiotropium on lung hyperinflation, dyspnoea and exercise tolerance in COPD; *Eur Respir J* **23**, 832-840.
- O'Donnell, R.A., Peebles, C., Ward, J.A., Daraker, A., Angco, G., Broberg, P., Pierrou, S., Lund, J., Holgate, S.T., Davies, D.E., Delany, D.J., Wilson, S.J. und Djukanovic, R. (2004b): Relationship between peripheral airway dysfunction, airway obstruction, and neutrophilic inflammation in COPD; *Thorax* **59**, 837-842.
- O'Shaughnessy, T.C., Ansari, T.W., Barnes, N.C. und Jeffery, P.K. (1997): Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1; *Am J Respir Crit Care Med* **155**, 852-857.
- Oshima, J., Campisi, J., Tannock, T.C. und Martin, G.M. (1995): Regulation of c-fos expression in senescing Werner syndrome fibroblasts differs from that observed in senescing fibroblasts from normal donors; *J Cell Physiol* **162**, 277-283.

- Pandey, M.R. (1984a): Domestic smoke pollution and chronic bronchitis in a rural community of the Hill Region of Nepal; *Thorax* **39**, 337-339.
- Pandey, M.R. (1984b): Prevalence of chronic bronchitis in a rural community of the Hill Region of Nepal; *Thorax* **39**, 331-336.
- Papi, A., Romagnoli, M., Baraldo, S., Braccioni, F., Guzzinati, I., Saetta, M., Ciaccia, A. und Fabbri, L.M. (2000): Partial reversibility of airflow limitation and increased exhaled NO and sputum eosinophilia in chronic obstructive pulmonary disease; *Am J Respir Crit Care Med* **162**, 1773-1777.
- Pascal, T., Debacq-Chainiaux, F., Chretien, A., Bastin, C., Dabee, A.F., Bertholet, V., Remacle, J. und Toussaint, O. (2005): Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays; *FEBS Lett* **579**, 3651-3659.
- Perez-Padilla, R., Regalado, J., Vedal, S., Pare, P., Chapela, R., Sansores, R. und Selman, M. (1996): Exposure to biomass smoke and chronic airway disease in Mexican women. A case-control study; *Am J Respir Crit Care Med* **154**, 701-706.
- Pesci, A., Balbi, B., Majori, M., Cacciani, G., Bertacco, S., Alciato, P. und Donner, C.F. (1998): Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with chronic obstructive pulmonary disease; *Eur Respir J* **12**, 380-386.
- Phillips, P.D., Kaji, K. und Cristofalo, V.J. (1984): Progressive loss of the proliferative response of senescing WI-38 cells to platelet-derived growth factor, epidermal growth factor, insulin, transferrin, and dexamethasone; *J Gerontol* **39**, 11-17.
- Plantier, L., Marchand-Adam, S., Marchal-Somme, J., Leseche, G., Fournier, M., Dehoux, M., Aubier, M. und Crestani, B. (2005): Defect of hepatocyte growth factor production by fibroblasts in human pulmonary emphysema; *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**, L641-L647.
- Pledger, W.J., Stiles, C.D., Antoniades, H.N. und Scher, C.D. (1977): Induction of DNA synthesis in BALB/c 3T3 cells by serum components: reevaluation of the commitment process; *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 4481-4485.
- Price, W.A., Moats-Staats, B.M. und Stiles, A.D. (2002): Pro- and anti-inflammatory cytokines regulate insulin-like growth factor binding protein production by fetal rat lung fibroblasts; *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**, 283-289.
- Price, W.A. und Stiles, A.D. (2000): The insulin-like growth factor system and lung.; *Endocrinology of the lung* 201-224.
- Quanjer, P.H., Tammeling, G.J., Cotes, J.E., Pedersen, O.F., Peslin, R. und Yernault, J.C. (1993): Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society; *Eur Respir J Suppl* **16**, 5-40.
- Rahman, I. (2005): Regulation of glutathione in inflammation and chronic lung diseases; *Mutat Res* **579**, 58-80.
- Reddy, S.P. und Mossman, B.T. (2002): Role and regulation of activator protein-1 in toxicant-induced responses of the lung; *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **283**, L1161-L1178.

- Richter, K., Holz, O., Jörres, R.A., Mücke, M. und Magnussen, H. (1999): Sequentially induced sputum in patients with asthma or chronic obstructive pulmonary disease; *Eur Respir J* **14**, 697-701.
- Rutgers, S.R., Postma, D.S., ten Hacken, N.H., Kauffman, H.F., Der Mark, T.W., Koeter, G.H. und Timens, W. (2000): Ongoing airway inflammation in patients with COPD who do not currently smoke; *Thorax* **55**, 12-18.
- Sabatini, F., Petecchia, L., Taviani, M., Jodon, d.V., V, Rossi, G.A. und Brouty-Boye, D. (2005): Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities; *Lab Invest* **85**, 962-971.
- Saetta, M., Baraldo, S., Corbino, L., Turato, G., Braccioni, F., Rea, F., Cavallese, G., Tropeano, G., Mapp, C.E., Maestrelli, P., Ciaccia, A. und Fabbri, L.M. (1999): CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease; *Am J Respir Crit Care Med* **160**, 711-717.
- Saetta, M., Di Stefano, A., Maestrelli, P., Ferrareso, A., Drigo, R., Potena, A., Ciaccia, A. und Fabbri, L.M. (1993): Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis; *Am Rev Respir Dis* **147**, 301-306.
- Saetta, M., Di Stefano, A., Maestrelli, P., Turato, G., Ruggieri, M.P., Roggeri, A., Calcagni, P., Mapp, C.E., Ciaccia, A. und Fabbri, L.M. (1994): Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations; *Am J Respir Crit Care Med* **150**, 1646-1652.
- Saetta, M., Turato, G., Maestrelli, P., Mapp, C.E. und Fabbri, L.M. (2001): Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease; *Am J Respir Crit Care Med* **163**, 1304-1309.
- Sahebjami, H. und Domino, M. (1989): Effects of starvation and refeeding on elastase-induced emphysema; *J Appl Physiol* **66**, 2611-2616.
- Sahebjami, H. und Wirman, J.A. (1981): Emphysema-like changes in the lungs of starved rats; *Am Rev Respir Dis* **124**, 619-624.
- Salahifar, H., Baxter, R.C. und Martin, J.L. (1997): Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 protease activity secreted by MCF-7 breast cancer cells: inhibition by IGFs does not require IGF-IGFBP interaction; *Endocrinology* **138**, 1683-1690.
- Salahifar, H., Baxter, R.C. und Martin, J.L. (2000): Differential regulation of insulin-like growth factor-binding protein-3 protease activity in MCF-7 breast cancer cells by estrogen and transforming growth factor-beta1; *Endocrinology* **141**, 3104-3110.
- Sandford, A.J., Weir, T.D. und Pare, P.D. (1997): Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease; *Eur Respir J* **10**, 1380-1391.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. und Brown, P.O. (1995): Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray; *Science* **270**, 467-470.
- Schols, A.M. und Wouters, E.F. (2000): Nutritional abnormalities and supplementation in chronic obstructive pulmonary disease; *Clin Chest Med* **21**, 753-762.
- Schrimpf, G. Hrsg. (2002): *Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.*, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin.

- Schuller, A.G., van Neck, J.W., Beukenholdt, R.W., Zwarthoff, E.C. und Drop, S.L. (1995): IGF, type I IGF receptor and IGF-binding protein mRNA expression in the developing mouse lung; *J Mol Endocrinol* **14**, 349-355.
- Severino, J., Allen, R.G., Balin, S., Balin, A. und Cristofalo, V.J. (2000): Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo?; *Exp Cell Res* **257**, 162-171.
- Sezer, H., Akkurt, I., Guler, N., Marakoglu, K. und Berk, S. (2006): A Case-Control Study on the Effect of Exposure to Different Substances on the Development of COPD; *Ann Epidemiol* **16**, 59-62.
- Shapiro, S.D. (1994): Elastolytic metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Potential roles in destructive lung disease; *Am J Respir Crit Care Med* **150**, S160-S164.
- Shapiro, S.D., Kobayashi, D.K. und Ley, T.J. (1993): Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages; *J Biol Chem* **268**, 23824-23829.
- Sheerin, A., Thompson, K.S. und Goyns, M.H. (2001): Altered composition and DNA binding activity of the AP-1 transcription factor during the ageing of human fibroblasts; *Mech Ageing Dev* **122**, 1813-1824.
- Sherrill, D.L., Enright, P.L., Kaltborn, W.T. und Lebowitz, M.D. (1999): Predictors of longitudinal change in diffusing capacity over 8 years; *Am J Respir Crit Care Med* **160**, 1883-1887.
- Silverman, E.K. (2002): Genetic Epidemiology of COPD; *Chest* **121**, 1S-6S.
- Sirianni, F.E., Chu, F.S. und Walker, D.C. (2003): Human alveolar wall fibroblasts directly link epithelial type 2 cells to capillary endothelium; *Am J Respir Crit Care Med* **168**, 1532-1537.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. und Klenk, D.C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid; *Anal Biochem* **150**, 76-85.
- Spira, A., Beane, J., Pinto-Plata, V., Kadar, A., Liu, G., Shah, V., Celli, B. und Brody, J.S. (2004): Gene expression profiling of human lung tissue from smokers with severe emphysema; *Am J Respir Cell Mol Biol* **31**, 601-610.
- Stanescu, D., Sanna, A., Veriter, C., Kostianev, S., Calcagni, P.G., Fabbri, L.M. und Maestrelli, P. (1996): Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils; *Thorax* **51**, 267-271.
- Starcher, B.C., Madaras, J.A. und Tepper, A.S. (1977): Lysyl oxidase deficiency in lung and fibroblasts from mice with hereditary emphysema; *Biochem Biophys Res Commun* **78**, 706-712.
- Stiles, C.D., Capone, G.T., Scher, C.D., Antoniadis, H.N., Van Wyk, J.J. und Pledger, W.J. (1979): Dual control of cell growth by somatomedins and platelet-derived growth factor; *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 1279-1283.
- Stockley, R.A. (1994): The role of proteinases in the pathogenesis of chronic bronchitis; *Am J Respir Crit Care Med* **150**, S109-S113.

- Strahl, C. und Blackburn, E.H. (1996): Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines; *Mol Cell Biol* **16**, 53-65.
- Swisshelm, K., Ryan, K., Tsuchiya, K. und Sager, R. (1995): Enhanced expression of an insulin growth factor-like binding protein (mac25) in senescent human mammary epithelial cells and induced expression with retinoic acid; *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4472-4476.
- Takizawa, H., Tanaka, M., Takami, K., Ohtoshi, T., Ito, K., Satoh, M., Okada, Y., Yamasawa, F., Nakahara, K. und Umeda, A. (2001): Increased expression of transforming growth factor-beta1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD); *Am J Respir Crit Care Med* **163**, 1476-1483.
- Tammeling, G. J. and Quanjer, P. H. (1980): *Physiologie der Atmung*, Thomaes.
- Taraseviciene-Stewart, L., Scerbavicius, R., Choe, K.H., Moore, M., Sullivan, A., Nicolls, M.R., Fontenot, A.P., Tuder, R.M. und Voelkel, N.F. (2005): An animal model of autoimmune emphysema; *Am J Respir Crit Care Med* **171**, 734-742.
- Taube, C., Holz, O., Mücke, M., Jörres, R.A. und Magnussen, H. (2001): Airway response to inhaled hypertonic saline in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease; *Am J Respir Crit Care Med* **164**, 1810-1815.
- Thom, T.J. (1989): International comparisons in COPD mortality; *Am Rev Respir Dis* **140**, S27-S34.
- Tomic, R., Lassiter, C.C., Ritzenthaler, J.D., Rivera, H.N. und Roman, J. (2005): Anti-tissue remodeling effects of corticosteroids: fluticasone propionate inhibits fibronectin expression in fibroblasts; *Chest* **127**, 257-265.
- Tomita, K., Caramori, G., Lim, S., Ito, K., Hanazawa, T., Oates, T., Chiselita, I., Jazrawi, E., Chung, K.F., Barnes, P.J. und Adcock, I.M. (2002): Increased p21(CIP1/WAF1) and B cell lymphoma leukemia-x(L) expression and reduced apoptosis in alveolar macrophages from smokers; *Am J Respir Crit Care Med* **166**, 724-731.
- Tuder, R.M., Petrache, I., Elias, J.A., Voelkel, N.F. und Henson, P.M. (2003): Apoptosis and emphysema: the missing link; *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**, 551-554.
- Turato, G., Di Stefano, A., Maestrelli, P., Mapp, C.E., Ruggieri, M.P., Roggeri, A., Fabbri, L.M. und Saetta, M. (1995): Effect of smoking cessation on airway inflammation in chronic bronchitis; *Am J Respir Crit Care Med* **152**, 1262-1267.
- Turato, G., Zuin, R. und Saetta, M. (2001): Pathogenesis and pathology of COPD; *Respiration* **68**, 117-128.
- U.S.Environmental Protection Agency (1992): *Respiratory Health Effects of Passive Smoking (Also Known as Exposure to Secondhand Smoke or Environmental Tobacco Smoke ETS)*. U.S.Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Office of Health and Environmental Assessment, Washington, DC, EPA/600/6-90/006F, <http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?deid=2835> (URL Stand 30.12.2005),
- Valdes, A.M., Andrew, T., Gardner, J.P., Kimura, M., Oelsner, E., Cherkas, L.F., Aviv, A. und Spector, T.D. (2005): Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women; *Lancet* **366**, 662-664.

- Vogel, K.G., Kelley, R.O. und Stewart, C. (1981): Loss of organized fibronectin matrix from the surface of aging diploid fibroblasts (IMR-90); *Mech Ageing Dev* **16**, 295-302.
- Vukmanovic-Stejic, M., Vyas, B., Gorak-Stolinska, P., Noble, A. und Kemeny, D.M. (2000): Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes; *Blood* **95**, 231-240.
- Wallaert, B., Aerts, C., Gressier, B., Gosset, P. und Voisin, C. (1993a): Oxidative inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor by alveolar epithelial type II cells; *J Appl Physiol* **75**, 2376-2382.
- Wallaert, B., Gressier, B., Marquette, C.H., Gosset, P., Remy-Jardin, M., Mizon, J. und Tonnel, A.B. (1993b): Inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor by alveolar inflammatory cells from smoking patients with or without emphysema; *Am Rev Respir Dis* **147**, 1537-1543.
- Wang, H., Liu, X., Umino, T., Kohyama, T., Zhu, Y.K., Wen, F.Q., Spurzem, J.R., Romberger, D.J., Kim, H.J. und Rennard, S.I. (2003): Effect of cigarette smoke on fibroblast-mediated gel contraction is dependent on cell density; *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**, L205-L213.
- Wanner, A. (1977): Clinical aspects of mucociliary transport; *Am Rev Respir Dis* **116**, 73-125.
- Weibel, E. R., Gehr, P., Haies, D., Gil, J., and Bachofen, M. (1976): The cell population of the normal lung, in *Lung cells in disease*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press
- Welte, T., Behnke, M., Piecyk, A., Holtmann, I., Stechert, R., Wolf, C., Robra, B., Raspe, H. und Magnussen, H. (2000): Prevalence of respiratory symptoms and lung function impairment in patients treated by German general practitioners; *Eur Respir J* **16**, S111-Abstract P844.
- Wilson, H.M., Birnbaum, R.S., Poot, M., Quinn, L.S. und Swisshelm, K. (2002): Insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 inhibits proliferation of MCF-7 breast cancer cells via a senescence-like mechanism; *Cell Growth Differ* **13**, 205-213.
- Wright, J.L. und Churg, A. (2002): Animal models of cigarette smoke-induced COPD; *Chest* **122**, 301S-306S.
- Wright, W.E. und Shay, J.W. (2002): Historical claims and current interpretations of replicative aging; *Nat Biotechnol* **20**, 682-688.
- Xu, X., Weiss, S.T., Rijcken, B. und Schouten, J.P. (1994): Smoking, changes in smoking habits, and rate of decline in FEV1: new insight into gender differences; *Eur Respir J* **7**, 1056-1061.
- Yamanaka, Y., Wilson, E.M., Rosenfeld, R.G. und Oh, Y. (1997): Inhibition of insulin receptor activation by insulin-like growth factor binding proteins; *J Biol Chem* **272**, 30729-30734.
- Zhang, S., Smartt, H., Holgate, S.T. und Roche, W.R. (1999): Growth factors secreted by bronchial epithelial cells control myofibroblast proliferation: an in vitro co-culture model of airway remodeling in asthma; *Lab Invest* **79**, 395-405.

8. Anhang

8.1 Charakteristika der Teilkollektive der Patienten

Tabelle 6: Patientencharakteristika der Teilkollektive der Untersuchungen der Zelldifferenzierung (inkl. Apoptose und Nekrose), des Einflusses der Kryokonservierung und des sezernierten Proteins

	Kontrollen		Emphysem	
n	10		10	
Alter [J]	63,5	(54;67)	65,5	(58; 70)
Geschlecht [w / m]	4 / 6		0 / 10	
Größe [cm]	175,5	(159,0; 177,0)	175,5	(168,0; 182,0)
Gewicht [kg]	75,5	(62,0; 80,0)	65,5	(65,0; 82,0)
BMI [kg/m ²]	24,7	(24,5; 25,8)	23,2	(20,6; 24,8)
Rauchstatus [#] [py]	22,5	(20,0; 30,0)	47,5	(40,0; 75,0) *
VK [%Soll]	102,4	(87,6; 110,5)	74,6	(72,0; 90,0) *
FEV1 [%Soll]	94,8	(83,9; 103,3)	39,6	(34,2; 46,0) **
FEV1/VK [%Soll]	95,8	(94,2; 102,0)	49,3	(44,1; 54,0) **
FEV1/FVK [%]	78,7	(76,3; 79,4)	39,3	(34,0; 44,7) **
ITGV [%Soll]	103,8	(94,4; 110,0)	175,5	(165,8; 193,9) **
RV [L]	2,3	(2,0; 2,5)	4,6	(4,3; 6,3) **
TLK [L]	6,6	(4,8; 7,1)	8,4	(7,5; 9,9) **
RV/TLK [%]	41,6	(32,6; 45,2)	59,1	(52,3; 65,0) **
GOLD-Stadium [0/I/II/III/VI]	10/0/0/0/0		0/0/2/8/0	

Die Tabelle zeigt Medianwerte und Quartile (in Klammern); für das Geschlecht und die GOLD-Klassifikation sind die Fallzahlen je Kategorie angegeben; *p<0,05, **p<0,01 bezogen auf den Unterschied zwischen den Gruppen; [#]geschätzte Rauchmenge anhand der Patientenakten. VK = Vitalkapazität, FEV₁ = forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde, FVK = forcierte Vitalkapazität, ITGV = intrathorakales Gasvolumen, RV = Residualvolumen, TLK = totale Lungenkapazität. Die Sollwerte wurden den Richtlinien der *European Respiratory Society* entnommen (Quanjer et al. 1993), Klassen (Schweregrade) der COPD (GOLD 2005).

Tabelle 7: Patientencharakteristik des Teilkollektives der Untersuchung des Langzeitwachstums der Lungenfibroblasten

	Kontrollen		Emphysem	
n	7		7	
Alter [J]	66	(44; 73)	65	(58; 70)
Geschlecht [w / m]	3 / 4		0 / 7	
Größe [cm]	176	(159; 178)	179	(170; 183)
Gewicht [kg]	76	(62; 80)	66	(65; 86)
BMI [kg/m ²]	24,9	(24,5; 25,8)	23,1	(19,8; 26,9)
Rauchstatus [#] [py]	20	(20; 25)	40	(20; 75)
VK [%Soll]	103,1	(87,6; 110,5)	75,1	(71,6; 90,0)
FEV ₁ [%Soll]	102,1	(83,9; 108,0)	38,7	(34,2; 49)**
FEV ₁ /VK [%Soll]	99,3	(94,2; 103,2)	53,2	(44,6; 54,0)**
FEV ₁ /FVK [%]	79,3	(76,3; 82,7)	40,9	(36,5; 44,7)**
ITGV [%Soll]	103,6	(94,4; 110,0)	185,1	(156,0; 222,3)**
RV [L]	2,16	(2,04; 2,52)	5,63	(4,18; 6,42)
TLK [L]	6,6	(4,5; 7,5)	9,5	(8,0; 9,9)**
RV/TLK [%]	38,1	(32,6; 50,2)	57,8	(52,3; 67,8)*
GOLD-Stadium				
[0/I/II/III/VI]	7/0/0/0/0		0/0/1/5/1	

Die Tabelle zeigt Medianwerte und Quartile (in Klammern); für das Geschlecht und die GOLD-Klassifikation sind die Fallzahlen je Kategorie angegeben; *p<0,05, **p<0,01 bezogen auf den Unterschied zwischen den Gruppen; [#]geschätzte Rauchmenge anhand der Patientenakten. VK = Vitalkapazität, FEV₁ = forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde, FVK = forcierte Vitalkapazität, ITGV = intrathorakales Gasvolumen, RV = Residualvolumen, TLK = totale Lungenkapazität. Die Sollwerte wurden den Richtlinien der *European Respiratory Society* entnommen (Quanjer et al. 1993), Klassen (Schweregrade) der COPD (GOLD 2005).

Tabelle 8: Patientencharakteristik des Teilkollektives der Untersuchung der Seneszenz-assoziierten beta-Galalaktosidase

	Kontrollen		Emphysem	
n	9		8	
Alter [J]	65	(54; 67)	61,5	(54,5; 70,0)
Geschlecht [w / m]	3 / 6		0 / 8	
Größe [cm]	172	(163; 176)	175,5	(171,0; 180,0)
Gewicht [kg]	69	(63; 80)	66	(65; 73)
BMI [kg/m ²]	24,5	(23,3; 25,8)	22,3	(21; 23,5)
Rauchstatus [#] [py]	27,5	(20; 40,5)	40	(16; 54,5)
VK [%Soll]	103,1	(98,8; 108,3)	74,6	(67; 90) *
FEV1 [%Soll]	102,1	(86,0; 106,3)	35,7	(32,25; 44,75) **
FEV1/VK [%Soll]	99	(96,0; 103,2)	50,1	(45,1; 54) **
FEV1/FVK [%]	79,3	(78,4; 82,7)	40,2	(37,2; 46,2) **
ITGV [%Soll]	110	(94,4; 121,2)	208,1	(170,6; 240,8) **
RV [L]	2,12	(1,93; 2,52)	6,37	(4,9; 7,2) **
TLK [L]	6,69	(4,57; 7,54)	9,88	(8,75; 10,32) **
RV/TLK [%]	38,1	(33,4; 45,1)	66	(53,2; 71,7) **
GOLD-Stadium [0/I/II/III/VI]	9/0/0/0/0		0/0/1/6/1	

Die Tabelle zeigt Medianwerte und Quartile (in Klammern); für das Geschlecht und die GOLD-Klassifikation sind die Fallzahlen je Kategorie angegeben; *p<0,05, **p<0,01 bezogen auf den Unterschied zwischen den Gruppen; #geschätzte Rauchmenge anhand der Patientenakten. VK = Vitalkapazität, FEV1 = forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde, FVK = forcierte Vitalkapazität, ITGV = intrathorakales Gasvolumen, RV = Residualvolumen, TLK = totale Lungenkapazität. Die Sollwerte wurden den Richtlinien der European Respiratory Society entnommen (Quanjer et al. 1993), Klassen (Schweregrade) der COPD (GOLD 2005).

Tabelle 9: Patientencharakteristik des Teilkollektives der Untersuchung der Telomerenlänge

	Kontrollen		Emphysem	
n	8		8	
Alter [J]	66,5	(60; 74,5)	60	(57; 68)
Geschlecht [w / m]	3 / 5		0 / 8	
Größe [cm]	171,5	(161,5; 177,0)	172	(167,5; 179,5)
Gewicht [kg]	69,5	(65,0; 78,5)	66	(65; 74,5)
BMI [kg/m ²]	25,2	(23,8; 25,9)	22,8	(22,3; 23,6) *
Rauchstatus [#] [py]	25	(20; 46)	56,3	(18,5; 72,5)
VK [%Soll]	108	(98,5; 113,8)	74,4	(72,1; 87,3) **
FEV ₁ [%Soll]	104,8	(93,0; 113)	35,7	(33,8; 47,5) **
FEV ₁ /VK [%Soll]	100,7	(97; 104,8)	50,2	(44,8; 61,1) **
FEV ₁ /FVK [%]	80,3	(76,6; 84,5)	40,2	(37,2; 51,9) **
ITGV [%Soll]	108	(101; 121,6)	169,9	(161,5; 213) **
RV [L]	2,27	(1,98; 2,81)	5,01	(4,36; 6,37) *
TLK [L]	6,87	(4,71; 7,58)	8,11	(7,27; 10,02)
RV/TLK [%]	40,7	(31,8; 47,7)	62,7	(52,2; 68,1) *
GOLD-Stadium [0/I/II/III/VI]	8/0/0/0/0		1/0/0/7/0	

Die Tabelle zeigt Medianwerte und Quartile (in Klammern); für das Geschlecht und die GOLD-Klassifikation sind die Fallzahlen je Kategorie angegeben; *p<0,05, **p<0,01 bezogen auf den Unterschied zwischen den Gruppen; [#]geschätzte Rauchmenge anhand der Patientenakten. VK = Vitalkapazität, FEV₁ = forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde, FVK = forcierte Vitalkapazität, ITGV = intrathorakales Gasvolumen, RV = Residualvolumen, TLK = totale Lungenkapazität. Die Sollwerte wurden den Richtlinien der *European Respiratory Society* entnommen (Quanjer et al. 1993), Klassen (Schweregrade) der COPD (GOLD 2005).

Tabelle 10: Patientencharakteristik des Teilkollektives der Genexpressionsuntersuchung (12K-cDNA-Array)

	Kontrollen		Emphysem	
n	3		3	
Alter [J]	67	(66; 67)	64	(51; 66)
Geschlecht [w / m]	0 / 3		0 / 3	
Größe [cm]	178	(168; 181)	182	(160; 183)
Gewicht [kg]	77	(75; 89)	82	(64; 90)
BMI [kg/m ²]	26,6	(24,3; 27,2)	24,8	(19,8; 26,8)
Rauchstatus [#] [py]	22,5	(20; 25)	50,0	(20; 80)
VK [%Soll]	87,2	(59,8; 110,5)	71,6	(61,8; 95,6)
FEV ₁ [%Soll]	92,3	(58; 117,9)	38,7	(28; 40,7)*
FEV ₁ /VK [%Soll]	105,4	(96; 105,6)	44,6	(42; 53,2)*
FEV ₁ /FVK [%]	80,1	(73,9; 82,7)	30,0	(30; 40,9)*
ITGV [%Soll]	90,2	(88,5; 123)	181	(165,8; 222,3)*
RV [L]	2,52	(1,99; 6,7)	4,67	(4,3; 6,42)
TLK [L]	7,54	(5,23; 9,29)	8,70	(8,08; 9,47)
RV/TLK [%]	38,1	(33,4; 72,12)	57,8	(49,4; 67,8)
GOLD-Stadium [0/I/II/III/VI]	3/0/0/0/0		0/0/0/2/1	

Die Tabelle zeigt Medianwerte und Quartile (in Klammern); für das Geschlecht und die GOLD-Klassifikation sind die Fallzahlen je Kategorie angegeben; *p<0,05, **p<0,01 bezogen auf den Unterschied zwischen den Gruppen; [#]geschätzte Rauchmenge anhand der Patientenakten. VK = Vitalkapazität, FEV₁ = forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde, ITGV = intrathorakales Gasvolumen, RV = Residualvolumen, TLK = totale Lungenkapazität. Die Sollwerte wurden den Richtlinien der *European Respiratory Society* entnommen (Quanjer et al. 1993), Klassen (Schweregrade) der COPD (GOLD 2005).

Tabelle 11: Patientencharakteristik des Teilkollektives der Genexpressionsuntersuchung (qPCR)

	Kontrollen		Emphysem	
n	9		10	
Alter [J]	65	(59;67)	65,5	(58; 70)
Geschlecht [w / m]	4 / 5		0 / 10	
Größe [cm]	175	(159;177)	175,5	(168,0; 182,0)
Gewicht [kg]	75	(62;77)	65,5	(65,0; 82,0)
BMI [kg/m ²]	24,5	(24,5;25,4)	23,2	(20,55; 24,76)
Rauchstatus [#] [py]	20	(20;25)	47,5	(40,0; 75,0) *
VK [%Soll]	103,1	(87,6;110,5)	74,6	(72,0; 90,0) *
FEV ₁ [%Soll]	98,2	(83,9;103,3)	39,6	(34,2; 46,0) **
FEV ₁ /VK [%Soll]	96,0	(94,3; 102,0)	49,4	(44,1; 54,0) **
FEV ₁ /FVK [%]	78,4	(76,3; 79,3)	39,3	(34,0; 44,7) **
ITGV [%Soll]	103,6	(94,4;104,4)	175,5	(165,8; 193,9) **
RV [L]	2,37	(2,04;2,52)	4,6	(4,3; 6,3) **
TLK [L]	6,47	(4,82;6,64)	8,4	(7,5; 9,9) **
RV/TLK [%]	45,1	(33,4;45,2)	59,1	(52,3; 65,0) **
GOLD-Stadium				
[0/I/II/III/VI]	9/0/0/0/0		0/0/2/8/0	

Die Tabelle zeigt Medianwerte und Quartile (in Klammern); für das Geschlecht und die GOLD-Klassifikation sind die Fallzahlen je Kategorie angegeben; *p<0,05, **p<0,01 bezogen auf den Unterschied zwischen den Gruppen; [#]geschätzte Rauchmenge anhand der Patientenakten. VK = Vitalkapazität, FEV₁ = forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde, ITGV = intrathorakales Gasvolumen, RV = Residualvolumen, TLK = totale Lungkapazität. Die Sollwerte wurden den Richtlinien der *European Respiratory Society* entnommen (Quanjer et al. 1993), Klassen (Schweregrade) der COPD (GOLD 2005).

8.2 Steriles Arbeiten

Die Arbeiten an den Zellkulturen erfolgten unter sterilen Bedingungen. D.h. die Arbeitsflächen wurden mit Bacillol (Bode Chemie, Hamburg, Deutschland) bzw. Incidin foam (Ecolab GmbH, Wien, Österreich) und die Hände mit Sterilium desinfiziert sowie alle verwendeten Pipetten und sonstigen Geräte, die in direkten Kontakt mit den Zellen kommen, entweder strahlensterilisiert bezogen oder vor Verwendung bei 121°C im Autoclaven dampfsterilisiert. Die verwendeten Zellkulturreagenzien wurden nur unter sterilen Bedingungen geöffnet bzw. dosiert. Die Manipulation der Kulturen selbst wurden an einer sterilen Werkbank (LaminAir HB 2472, Heraeus) durchgeführt.

8.3 Abbildungen zur qPCR

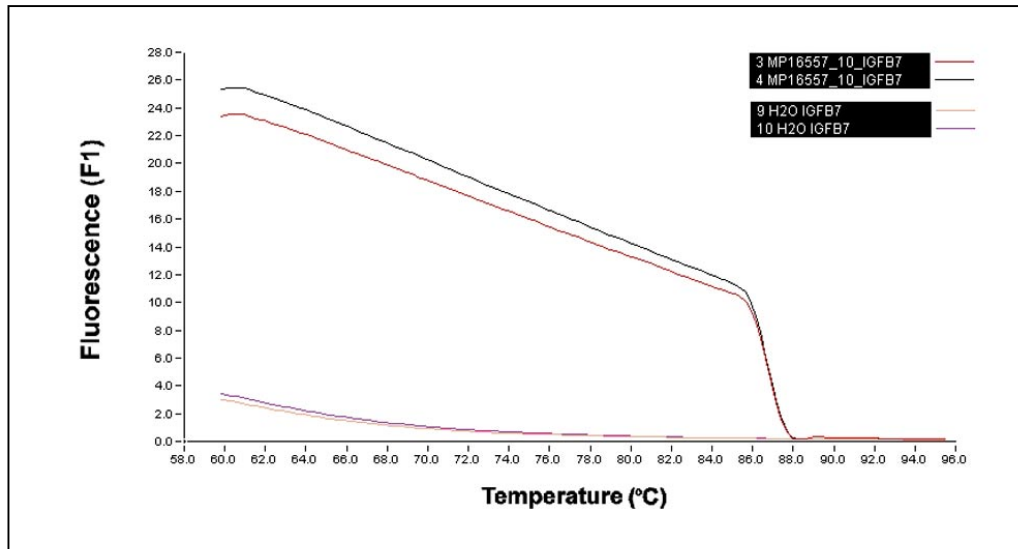


Abbildung 10: qPCR - Schmelzkurve

In der Abbildung sind die Schmelzkurven der Doppelbestimmung eines Primertests (IGFBP-rP1 (IGFBP7), oberes Linienpaar) und der entsprechenden Blindprobe mit Wasser (unteres Linienpaar) dargestellt (x-Achse: Temperatur [°C], y-Achse: Fluoreszenzintensität). Während in der Blindprobe nur eine geringe Ausgangsfluoreszenz ohne steilen Abfall der Temperatur im weiteren Verlauf zu erkennen, folglich kein Amplifikat in diesen Proben vorhanden ist, zeigt die Fluoreszenz des Primertest eine plötzliche Abnahme bei ca. 87°C; ein typischer Verlauf für dieses PCR-Amplifikat ohne Nebenprodukte oder Primerdimere.

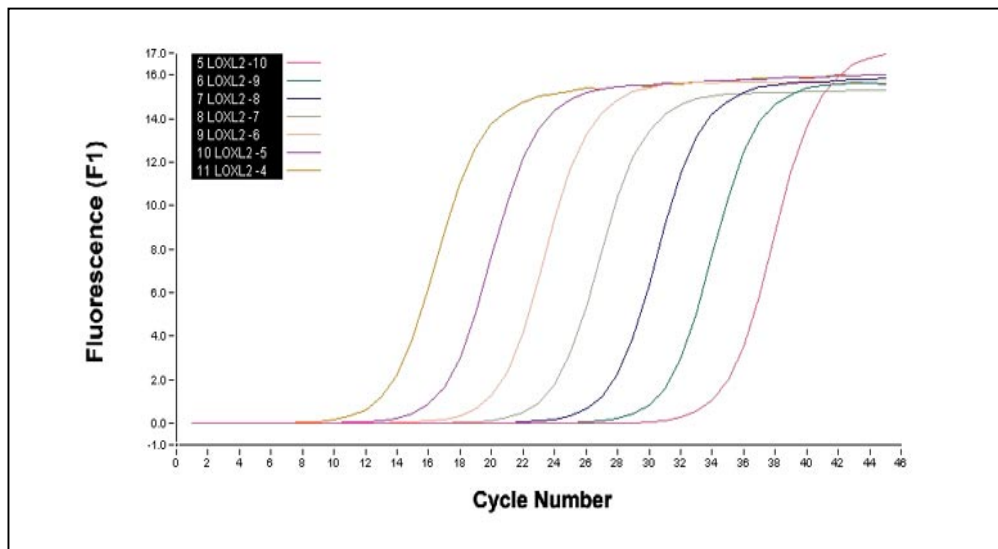


Abbildung 11: qPCR - Amplifikation einer Standardreihe

In der Abbildung ist der typische Verlauf der Fluoreszenz in 10fach Verdünnungen eines PCR-Amplifikates (Verdünnungsstufen 10^{-4} bis 10^{-10} , hier für das LOXL2-Gen) während der Amplifikation zu erkennen. Jede Kurve repräsentiert eine Konzentrationsstufe (x-Achse: Intensität des Fluoreszenzsignals, y-Achse: PCR-Zyklen)

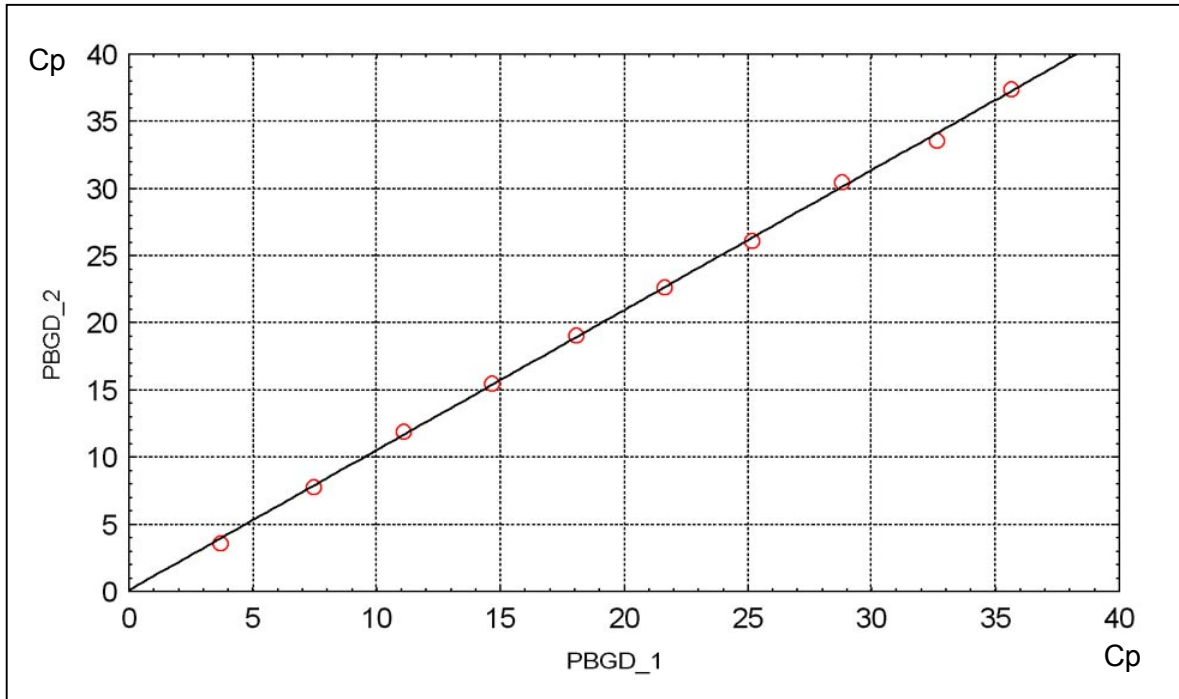


Abbildung 11: qPCR – Doppelbestimmung einer Standardreihe

In der Abbildung ist die Korrelation der Crossing points (Cp) der Amplifikation zweier Standardreihen (PBGD) in unabhängigen PCR-Ansätzen dargestellt (beide Achsen: Crossing points, $R^2=0,9996$).

9. Erklärung

Hiermit versichere ich, Diplom-Umweltwissenschaftler Kai-Christian Müller, Wulfsdorfer Weg 103, 22926 Ahrensburg, dass ich die eingereichte Dissertation

„Mechanismen eines veränderten Wachstumsverhaltens von Lungenfibroblasten bei Patienten mit Emphysem – Hinweise auf einen seneszenten Phänotyp“

selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel verfasst habe. Anderer als der von mir angegebenen Hilfsmittel und Schriften habe ich mich nicht bedient. Alle wörtlich oder sinngemäß den Schriften anderer Autorinnen oder Autoren entnommenen Stellen habe ich kenntlich gemacht.

Ferner hat diese Arbeit weder in der gegenwärtigen, noch in einer anderen Fassung einem anderen Fachbereich vorgelegen.

Ahrensburg, den 18. Januar 2006

10. Danksagung

Prof. W. Ruck und Prof. H. Magnussen danke ich für die Überlassung dieses spannenden Themas, sowie die Betreuung und die Begutachtung dieser Arbeit. Prof. H. Magnussen gilt zudem mein Dank für die Möglichkeit, in der zellbiologischen Forschungsabteilung am Krankenhaus Großhansdorf zu arbeiten.

Dr. rer. nat. R.A. Jörres und Dipl.-Ing. O. Holz gilt mein besonderer und herzlicher Dank für die Unterstützung und Förderung meiner Person und meiner Arbeit, nicht zuletzt durch einen intensiven Austausch von Gedanken, Anregungen und Visionen. Ich freue mich auf eine weitere, anregende Zusammenarbeit.

Dr. rer. nat. B. Feindt und K. Paasch danke ich für ihre unermüdliche technische und moralische Unterstützung.

Dr. med. H. Watz, Dr. med. A. Wewel und I. Schwertfeger gilt mein Dank für die Aufklärung der Patienten über die Teilnahme an dieser Untersuchung.

Dr. med. L. Welker danke ich für sein Engagement in der Begutachtung und Bereitstellung der Gewebe für diese Untersuchung.

Dr. med. V.J. Erpenbeck PhD, Fraunhofer ITEM, gilt mein besonderer Dank für anregende Diskussionen und seine Unterstützung bei der qPCR. Ebenfalls danke ich Prof. N. Krug, Prof. J.M. Hohlfeld, Dr. rer. nat. A. Braun, Dr. med. C. Nassenstein, B. Lavae-Mokhtari, B. Fuchs vom Fraunhofer ITEM, Hannover, die mir die Möglichkeit eingeräumt und ihre eigenen Experimente so organisiert haben, dass ich ihren Lightcycler für meine Untersuchungen nutzen konnte.

Dr. A. Pahl und Dr. A. Tewes vom PCR-Labor der Gemeinschaftspraxis für Labormedizin Dr. Kramer und Kollegen, Lauenburger Str. 65–67, 21502 Geesthacht, danke ich für die Möglichkeit zusätzliche qPCR-Analysen durchführen zu können.

Dank auch der thorax-chirurgischen Abteilung des Krankenhaus Großhansdorf für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung dieser Arbeit.

Ich danke der Landesversicherungsanstalt der Freien und Hansestadt Hamburg für die finanzielle Unterstützung der Forschung am Krankenhaus Großhansdorf, Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie, sowie der Firma AstraZeneca (Wedel) und der Friedrich-Baur-Stiftung (München) für eine spezielle finanzielle Förderung dieses Projektes.

Ganz besonderer Dank gebührt den Patienten, die in einer für sie persönlich sehr schweren Zeit die selbstlose Bereitschaft fanden, meine Arbeit durch ihre Bereitschaft zur Teilnahme daran zu unterstützen.

Ein weiterer besonderer Dank gilt meinen lieben Kollegen im Institut für Umweltchemie an der Universität Lüneburg für ihre kritischen Anregungen zu meinem Thema und die angenehme Zusammenarbeit im Praktikum und drumherum! Danke!

Dir, Maria, danke für Deine schöne Innenillustration, Deine aufmunternde Gesellschaft und Deine Unterstützung während der letzten Jahre. Ich freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft!

Last, but not least, danke ich meinen Eltern für die stetige Unterstützung, die sie mir auf meinem bisherigen Lebensweg in jeder Hinsicht gewährt haben.