

Aus dem Pathologischen Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner)

**Etablierung einer cDNA-Microarray-Technologie zur Genexpressionsanalyse
bei akuter und chronischer allogener Lungenschädigung nach
Lungentransplantation**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Michael Brendel

aus München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Iris Bittmann

.....

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Heinrich Netz

PD. Dr. med. Christian Graeb

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Iris Bittmann

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2009

Verzeichnis der Abkürzungen.....	7
1. Einleitung.....	9
1.1 <i>Lungentransplantation.....</i>	9
1.1.1 Indikationen zur Lungentransplantation.....	10
1.1.2. Prognose nach Lungentransplantation.....	10
1.1.3. Patientenselektion und operatives Vorgehen.....	12
1.1.4 Komplikationen nach Lungentransplantation.....	13
1.2 <i>Transplantationsimmunologie.....</i>	17
1.3 <i>Diagnostik der Abstoßungsreaktion.....</i>	19
1.3.1 Die transbronchiale Biopsie.....	19
1.3.2 Die bronchoalveoläre Lavage.....	22
1.3.3 BAL-Zytologie in der Abstoßungsdiagnostik.....	22
1.4 <i>Ziele der Arbeit.....</i>	23
2. Methoden.....	24
2.1 <i>Design und Etablierung des cDNA-Microarrays.....</i>	24
2.1.1 Hintergrund und Prinzip der Methodik.....	24
2.1.2 Auswahl der Gene für das cDNA-Microarray-Projekt.....	26
2.1.2.1 Proinflammatorische und antiinflammatorische Faktoren....	27
2.1.2.2 Leukozytenadhäsion.....	29
2.1.2.3 Lymphopoese, Lymphozytendifferenzierung und T-Zell-Antwort.....	29
2.1.2.4 Wachstumsfaktoren, fibrogene und antifibrogene Entzündungsmediatoren.....	31
2.1.2.5 Allgemeine Entzündungsmediatoren.....	34
2.1.2.6 Hox-Gene.....	35
2.1.2.7 Kontroll- und Housekeeping-Gene.....	37
2.1.3 Generierung und Validierung von cDNA-Klonen für die Etablierung der cDNA-Microarray-Technologie.....	38
2.1.4 Präparation der cDNA-Fragmente (Klon-Inserts) für die Microarrayanalyse des Patientenkollektivs nach Lungen- transplantation.....	46
2.1.5 Beschichtung der Glasslides.....	48

2.1.6 Der Spottingvorgang des cDNA-Microarrays.....	49
2.1.7 Vorbehandlung der gespotteten Slides / Array-Post-Processing.....	55
2.1.8 Qualitätskontrolle der gespotteten Microarrays.....	55
2.2 <i>Präparation bronchoalveolärer Lavageproben und Hybridisierung</i>	56
2.2.1 Patientenkollektiv.....	56
2.2.2 RNA-Extraktion.....	60
2.2.3 Lineare Amplifikation.....	61
2.2.4 Direkter Fluoreszenzeinbau.....	62
2.2.5 Komparative Hybridisierung.....	63
2.2.6 Waschung des cDNA – Microarrays.....	65
2.3 <i>Statistische Auswertung</i>	65
2.4 <i>Immunhistochemie</i>	71
2.5 <i>Real-Time-QRT-PCR</i>	73
2.5.1 RNA-Umschreibung der BAL-Proben in cDNA.....	74
2.5.2 Erstellen einer Standardreihe.....	74
2.5.3 Primer.....	75
2.5.4 Real-Time-QRT-PCR Protokoll für cDNA (Patientenprobe) sowie Standards.....	76
2.5.5 Schmelzkurve.....	78
2.6 <i>Material</i>	79
2.6.1 Geräte und Instrumente.....	79
2.6.2 Reagenzien.....	80
2.6.3 Lösungen und Puffer.....	82
2.6.4 Kit-Systeme.....	82
2.6.5 Sonstige Arbeitsmaterialien.....	82
3. Ergebnisse	85
3.1 <i>cDNA Klone des IMAGE Consortiums</i>	85
3.2 <i>BAL-Proben</i>	85
3.3 <i>Microarray</i>	86
3.4 <i>One-way ANOVA for Multiple Groups Scores</i>	91
3.4.1 Akute Abstoßung.....	93
3.4.2 Chronische Abstoßung.....	93
3.5 <i>Validierung und Korrelation mit den Ergebnissen des Microarrays</i>	94
3.5.1 Validierung durch RT-PCR.....	95

3.5.1.1 Proinflammatorische und antiinflammatorische Faktoren.....	95
3.5.1.1.1 IL-12A.....	95
3.5.1.1.2 LTB.....	95
3.5.1.2 Leukozytenadhäsion.....	96
3.5.1.2.1 Sele.....	96
3.5.1.3 Lymphopoese, Lymphozytendifferenzierung und T-Zell-Antwort.....	96
3.5.1.3.1 IL-18.....	96
3.5.1.3.2 CD 24.....	97
3.5.1.4 Hox-Gene.....	97
3.5.1.4.1 Hox-A2.....	97
3.5.1.4.2 Hox-A4.....	97
3.5.1.4.3 Hox-B3.....	98
3.5.1.4.4 Hox-B5.....	98
3.5.1.4.5 Hox-C4.....	98
3.5.1.4.6 Hox-C10.....	99
3.5.2 Validierung durch Immunhistochemie.....	99
3.5.2.1 Lymphopoese, Lymphozytendifferenzierung und T-Zell-Antwort.....	99
3.5.2.1.1 SDF.....	99
3.5.2.2 Wachstumsfaktoren, fibrogene und antifibrogene Entzündungsmediatoren.....	100
3.5.2.2.1 MMP-1.....	100
3.5.2.2.2 MMP-9.....	101
3.5.2.2.3 TIMP-1.....	102
3.5.2.2.4 Fibronectin-1.....	103
3.5.2.2.5 PDGFB.....	104
3.5.2.3 Allgemeine Entzündungsmediatoren.....	104
3.5.2.3.1 eNOS.....	104
3.5.2.3.2 iNOS.....	105
3.5.3 Nicht validierte Genexpressionsmuster.....	107
3.5.3.1 Surfactant Proteine.....	107
3.5.3.2 Hox-A1.....	107

3.5.3.3 TNFa.....	108
3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	108
3.7 Zusammenstellung (nach Expression gewertet).....	111
3.8 BAL-Differenzialzytologie.....	112
4. Diskussion.....	115
4.1 cDNA-Microarray-Technologie.....	115
4.2 BAL-Proben des zu untersuchenden Patientenkollektivs.....	118
4.3 Genexpressionsanalyse.....	119
4.3.1 Genexpressionen bei der akuten Transplantatabstoßung.....	119
4.3.2 Genexpressionen bei der chronischen Transplantatabstoßung.....	123
4.3.3 Heterogenität der Expressionsmuster und kritische Betrachtung der Validierung.....	128
4.3.4 BAL-Zelldifferenzierung.....	130
5. Zusammenfassung.....	133
6. Literaturverzeichnis.....	135
7. Danksagung.....	151
8. Curriculum vitae.....	152

Verzeichnis der Abkürzungen

<u>Verwendete Abkürzung</u>	<u>Erläuterung (Volltext)</u>
A-1-ATM	Alpha-1-Antitrypsinmangel
ABB	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AK	Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zelle
Aqua dest.	Aqua destillata
ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrome
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALT	Bronchus assoziiertes lymphatisches Gewebe
BO	Bronchiolitis obliterans
BOS	Bronchiolitis obliterans Syndrom
cDNA	copy-DNA
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CF	Cystische Fibrose
CMV	Cytomegalie-Virus
CyA	Cyclosporin A
DLTX	Doppellungentransplantation
Exo.all.Alveo.	Exogen allergische Alveolitis
FEV1	Forced Expiratory Volume in 1 Sekunde
HLTX	Herz-Lungen-Transplantation
HPF	High Power Field
HR-CT	High Resolution-Computertomographie
IHC	Immunhistochemie
IPF	Idiopathische Lungenfibrose
ISHLT	International Society for Heart and Lung Transplantation
KHK	Koronare Herzkrankheit
LAM	Lymphangioliomyomatose

LB	Luria-Bertani
MHC	Major histocompatibility complex
PPH	Primärer pulmonaler Hypertonus
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real Time-Polymerase-Ketten-Reaktion
SLTX	Einzellungentransplantation
TBB	Transbronchiale Biopsie

1. Einleitung

1.1 Lungentransplantation

Die Lungentransplantation hat sich im Laufe der letzten Jahrzehnte zu einer etablierten klinischen Therapie für ein gut ausgewähltes Kollektiv von Patienten mit Lungenerkrankungen im Terminalstadium entwickelt (Hosenpud et al, 2000). Historisch wurde die erste Lungentransplantation von James D. Hardy im Jahre 1963 (Hardy, 1999) durchgeführt, die aufgrund mangelnder therapeutischer Optionen durch eine Abstoßungsreaktion bereits am 18. postoperativen Tag zum Exitus letalis des Patienten führte. Durch die Entdeckung immunsuppressiver Pharmaka wie dem Cyclosporin A wurde die Lungentransplantation als kombinierte Herz-Lungentransplantation durch Bruce A. Reitz (Reitz et al, 1982) im Jahre 1981 erfolgreich durchgeführt. 1983 folgte die Einzellungentransplantation durch Joel D. Cooper (Cooper et al, 1989). In Deutschland führte die herzchirurgische Abteilung unter der Leitung von Prof. Dr. Bruno Reichart erstmals kombinierte Herz-Lungentransplantationen 1983 und 1984 sowie eine isolierte Lungentransplantation 1991 im Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München durch (Reichart et al, 1984).

Durch den medizinischen Fortschritt und die Optimierung der operativen Technik konnte die Gesamtzahl der Lungentransplantationen von 5.642 zwischen 1985 und 1995 auf insgesamt 14.262 zwischen 1996 und Juni 2005 ausgebaut werden. Im Jahr 2004 wurden 1815 Lungentransplantationen durchgeführt, wobei darunter mehr unilaterale als bilaterale Transplantationen zu finden waren (Trulock et al, 2006). Bei stetig steigenden Patientenzahlen und folglich zunehmenden Wartezeiten auf eine Spenderlunge, konnte die Anzahl der Lungentransplantationen als Therapie der Wahl nur begrenzt ausgebaut werden, da der Mangel an zur Verfügung stehenden Organen limitierend war. Folglich stieg auch die Zahl der Mortalität der Patienten auf den Wartelisten (Arcasoy et al, 1999). Bedingt durch Pneumonien, schock-assoziierte Veränderungen oder Traumata, können nur weniger als 20 % der zur Verfügung stehenden Spenderlungen für die Transplantation genutzt werden (Richmond, 1997).

Ferner darf die kritische kalte Ischämiezeit der Lunge bis zur Transplantation nicht über 6 Stunden liegen. Eine Blutgruppeninkompatibilität sowie fakultativ ein CMV-Status werden vor Transplantation evaluiert (Arcasoy et al, 1999).

Um eine optimale, nach Dringlichkeit geordnete Zuordnung der Spenderlungen zu gewährleisten, wurden länderübergreifende Organisationen wie Eurotransplant (Europa), Scandiatransplant (Skandinavien), United Kingdom Transplant Services Authority (Großbritannien), United Network for Organ Sharing (USA) oder Australia and New Zealand Cardiothoracic Organ Transplant Registry (Australien und Neuseeland) eingerichtet (Taylor et al, 2005).

1.1.1 Indikationen zur Lungentransplantation

Die größte Gruppe der zur unilateralen Lungentransplantation führenden Erkrankungen entstammt dem Formenkreis der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen und dem alpha-1-Antitrypsin-Mangel. Daneben stellt die Gruppe der fibrosierenden Lungenerkrankungen ein weiteres wichtiges Kollektiv dar.

Indikationen zur adulten Einzellungentransplantation stellten, auf den Zeitraum Januar 1995 bis Juni 2005 bezogen, prozentual dar: 53 % chronisch obstruktive Lungenerkrankungen (COPD), 24 % idiopathische Lungenfibrosen (IPF), zu 8% Alpha-1-Antitrypsin-Mangel, 2 % Re-Transplantationen, 2 % Cystische Fibrosen (CF), zu 1 % der primär pulmonale Hypertonus (PPH), zu 10 % Andere (Sarkoidose, Bronchiektasen, kongenitale Herzerkrankung, Bronchiolitis obliterans, Lymphangioliomyomatose) (Taylor et al, 2005).

Indikationen zur Doppellungentransplantation sind vor allem die CF und der PPH. Im Zeitraum Januar 1995 bis Juni 2005 verteilten sich die Indikationen zur adulten bilateralen bzw. Doppellungen-Transplantation folgendermaßen: 32 % CF, 23 % COPD, 10 % IPF, zu 9 % Alpha-1-Antitrypsin-Mangel, 7 % PPH, 5 % Bronchiektasen, zu 3 % die Sarkoidose, zu 11 % Andere (Re-Transplantation, kongenitale Herzerkrankung, Bronchiolitis obliterans, Lymphangioliomyomatose) (Taylor et al, 2005).

Kombinierte Herz-Lungentransplantationen werden vor allem bei kongenitalen Herzerkrankungen, einem Eisenmangel Syndrom oder bei ausgeprägter linksventrikulärer Dysfunktion durchgeführt.

1.1.2. Prognose nach Lungentransplantation

Die 1-Jahres-Überlebensrate liegt zwischen 65,8 % beim PPH und 81,8 % bei der COPD. Die 5-Jahres-Überlebensrate ist insgesamt im Vergleich zu anderen soliden Organtransplantationen schlecht, sie liegt zwischen 43,1 % beim IPF und 54,1 % bei der CF. Im Hinblick auf das Langzeitüberleben (long-term survival) sinkt die 10-Jahres-Überlebensrate auf 18,7 % bei IPF bzw. 37,1 % bei der Sarkoidose. (Trulock et al, 2006).

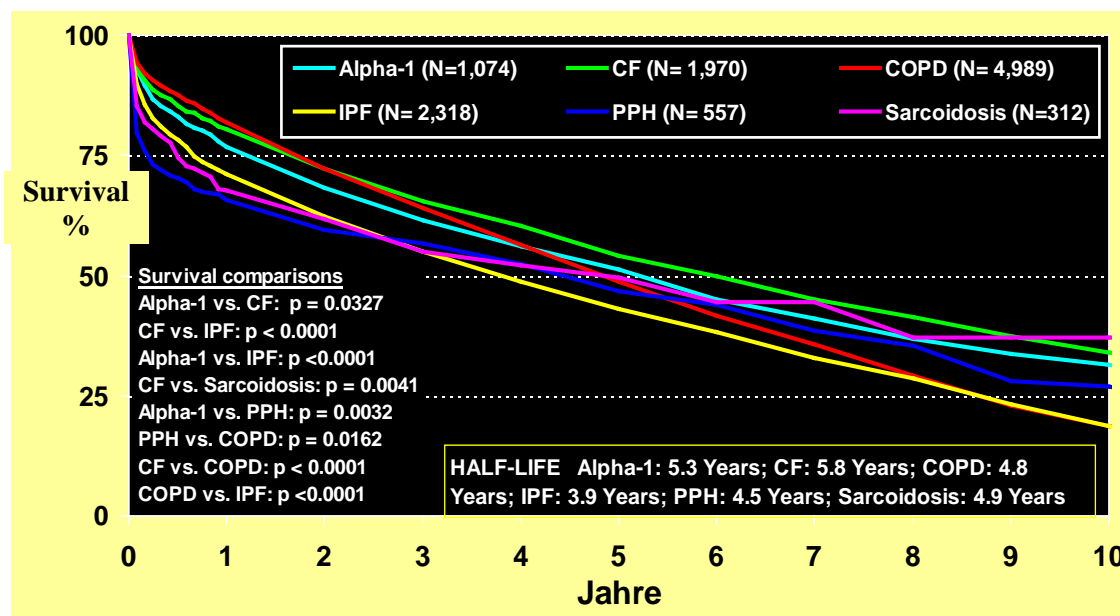


Abb. 1: Langzeitverlauf nach adulter Lungentransplantation: Darstellung der prozentualen Überlebensrate im Verlauf post transplantationem nach Grunderkrankungen unterteilt (Darstellung nach Kaplan-Meier im beobachteten Zeitraum: Januar 1994 – Juni 2004), nach Trulock et al, 2006.

Die 1-Jahres-Überlebensrate wird vor allem durch Infektionen, Transplantatversagen oder kardiovaskuläres Versagen bestimmt. Bei der 5-Jahres-Überlebensrate stellen die Bronchiolitis obliterans als Manifestation der chronischen Abstoßungsreaktion sowie Infektion und Transplantatversagen die limitierenden Komplikationen dar.

Todesursachen	Zeit nach Tx	Zeit nach Tx	Zeit nach Tx	Zeit nach Tx	Zeit nach Tx
	0-30 Tage	31 Tage – 1 Jahr	>1 Jahr - 3 Jahre	>3 Jahre - 5 Jahre	>5 Jahre
	(N = 1,273)	(N = 1,886)	(N = 1,581)	(N = 910)	(N = 1,001)
Bronchiolitis	5 (0.4%)	87 (4.6%)	414 (26.2%)	263 (28.9%)	265 (26.5%)
Akute Abstoßung	65 (5.1%)	37 (2.0%)	26 (1.6%)	5 (0.5%)	7 (0.7%)
Lymphom	1 (0.1%)	51 (2.7%)	35 (2.2%)	14 (1.5%)	31 (3.1%)
Sonstige maligne Erkrankungen	1 (0.1%)	50 (2.7%)	94 (5.9%)	73 (8.0%)	89 (8.9%)
CMV	0	69 (3.7%)	21 (1.3%)	4 (0.4%)	3 (0.3%)
Infektionen, (Nicht-CMV)	270 (21.2%)	685 (36.3%)	395 (25.0%)	172 (18.9%)	180 (18.0%)
Transplantatversagen	361 (28.4%)	359 (19.0%)	278 (17.6%)	169 (18.6%)	170 (17.0%)
Kardiovaskulär	131 (10.3%)	82 (4.3%)	53 (3.4%)	43 (4.7%)	52 (5.2%)
Technisch bedingt	107 (8.4%)	50 (2.7%)	11 (0.7%)	2 (0.2%)	3 (0.3%)
Sonstige Ursachen	332 (26.1%)	416 (22.1%)	254 (16.1%)	165 (18.1%)	201 (20.1%)

Tabelle 1: Todesursachen bei adulten Lungentransplantationen: Darstellung der Todesursachen in absoluten Werten und in Prozent nach Transplantation im Verlauf von Monaten bis Jahren post transplantationem (im beobachteten Zeitraum Januar 1992 bis Juni 2005 (Zeitangabe post transplantationem)), nach Trulock et al, 2006.

(Nach Tx: nach Transplantation; N = Patientenzahl)

1.1.3. Patientenselektion und operatives Vorgehen

Bei der Auswahl der Patienten für eine Lungentransplantation werden stringente Kriterien angewendet. Eine gestellte Indikation muß mit einem erhöhten Risiko eines Todesfalles innerhalb der nächsten 2-3 Jahre einhergehen. Neben der Lebenserwartung werden Kriterien wie Sauerstoffbedürftigkeit, FEV1 < 25%, Vitalkapazität < 50%, Alter unter 60-65 Jahren bei Einzellungentransplantation, Alter unter 60 Jahren bei Doppellungentransplantation sowie der Ernährungszustand beurteilt (Schwaiblmair et al, 1995).

Absolute Kontraindikationen sind: Therapieresistente extrapulmonale bzw. systemische Infektionen, Tumorerkrankungen, schwere extrapulmonale Organdysfunktionen bzw. –insuffizienzen, persistierender Nikotinabusus, linksventrikuläre Insuffizienz beispielsweise im Sinne einer KHK, schwere psychiatrische Erkrankungen und Suchterkrankungen sowie Malnutrition (Arcasoy, 1999).

Das operative Vorgehen richtet sich nach der Art der Transplantation. Bei unilateralen Transplantationen erfolgt die Pneumektomie via eine posterolaterale Thorakotomie. Bei bilateralen Transplantationsvorhaben wird eine bilaterale transversale antero-laterale Thorakosternotomie (Clam-Shell-Inzision) bevorzugt (Metras et al, 1995). Dabei findet im Gegensatz zur früher durchgeführten „en bloc Doppellungentransplantation“ die bilaterale sequentielle Transplantation Anwendung. Diese entspricht zwei sequentiellen Einzellungentransplantationen, die ohne kardiopulmonalen extrakorporalen Bypass durchgeführt werden können. Transplantationen von Lungenlappen von blutgruppenkompatiblen Lebendspendern werden heutzutage ebenfalls eingesetzt (Starnes et al, 1997). Eine kontinuierliche Immunsuppression ist nach Transplantation obligat.

1.1.4 Komplikationen nach Lungentransplantation

Die Lunge ist nach Transplantation durch eine Vielzahl von Komplikationen gefährdet. Zu den Frühkomplikationen gehört der **Ischämie-/Reperfusionsschaden**, der in der Regel innerhalb der ersten 24 Stunden post transplantationem auftreten und zum primären Transplantatversagen führen kann. Das histopathologische Korrelat entspricht einem diffusen alveolären Lungenschaden, der im Hinblick auf eine akute Abstoßung oder eine Infektion abgegrenzt werden muß (Koor et al, 2005).

Anastomosenkomplikationen konnten durch verbesserte chirurgische Techniken reduziert werden, insbesondere durch den Ersatz der en bloc Doppellungentransplantation durch die bilaterale sequentielle Lungentransplantation (Kshetry et al, 1997). Die am häufigsten vorkommende bronchiale Anastomosenstenose tritt nach Wochen bis Monaten nach Transplantation auf und kann u. a. durch Stentimplantation via Bronchoskopie korrigiert werden (Susanto et al, 1998). Perioperativ bedingte ischämische Schleimhaut- und Bronchialwandnekrosen können neben starken Blutungen auch durch eine eitrige Mediastinitis imponieren.

Die **akute Abstoßungsreaktion** hat ihren Gipfel in den ersten 3 bis 6 Monaten nach Transplantation, ist zwar mit einer geringen unmittelbaren Mortalität behaftet, jedoch für den Langzeitverlauf relevant. Die akute Abstoßung tritt in 30-50% der Patienten nach Lungentransplantation auf und ist der führende Risikofaktor für die Entwicklung

einer Bronchiolitis obliterans (BO) (Husain et al, 1999 sowie Kroshus et al, 1997). Klinisch können neben einem Status febrilis, Husten, Dyspnoe, pathologische Auskultationsbefunde oder eine Verschlechterung der Lungenfunktion vorliegen. Diese klinischen Zeichen sind jedoch nicht spezifisch.

Mittels täglicher Spirometrie versucht man Hinweise u. a. für eine Abstoßung früh zu detektieren (Otulana et al, 1990). HLA mismatching, besonders HLA-DR und HLA-B Loci sind Risikofaktoren (Schulman et al, 1998).

Infektionen stellen während des gesamten Verlaufs ein großes klinisches Problem und eine wichtige häufige Mortalitätsursache dar. Begünstigende Faktoren sind neben der Immunsuppression, ein abgeschwächter Hustenreiz und -reflex durch operative Denervierung der Lunge mit Aspirationsgefahr, schlechte Lymphdrainage oder etwa eine insuffiziente mukoziliäre Clearance. Bakterielle Erreger sind die häufigsten Pneumonieverursacher, ein Gipfel der frühen Infektion liegt in den ersten 2 Wochen post transplantationem (Zenati et al, 1990). Staphylokokken und gramnegative Bakterien, insbesondere *Pseudomonas aeruginosa*, sind besonders gefürchtet (Maurer et al, 1992). Ferner sollte auch an *Burkholderia cepacia*, *Legionella pneumophila* sowie Chlamydien und Mykoplasmen gedacht werden.

Infektionen stellen ebenso bei der Bronchiolitis obliterans (BO) eine lebensbedrohliche Komplikation dar.

Cytomegalie-Virus (CMV) verursacht die häufigste opportunistische virale Infektion, die sich typischerweise 1 bis 4 Monate nach Transplantation manifestiert (Fishman et al, 1998). CMV-seronegative Empfänger haben bei seropositivem Spender die größte Gefahr für einen schweren Verlauf einer Pneumonitis (Ettinger et al, 1993). Eine Auswahl CMV-negativer Spender würde wiederum zu verlängerten Wartezeiten führen. Der CMV-Nachweis erfolgt durch PCR, DNA in situ Hybridisierung oder Immunhistochemie via Biopsie (Ettinger et al, 1993).

Aspergillen besiedeln bei oft subklinischem Verlauf häufig die Atemwege (Westney et al, 1996). Als Komplikation kann es zu schweren invasiven und hämorrhagischen Verläufen kommen. *Pneumocystis carinii* bzw. *jiroveci* wird durch medikamentöse Prophylaxe heutzutage seltener gesehen.

Die wichtigste Spätkomplikation ist die **chronische Transplantatabstoßung**, die sich morphologisch als Bronchiolitis obliterans (BO) manifestiert (Yousem et al, 1985). Sie tritt in der Regel nicht vor einem halben Jahr nach Transplantation, am häufigsten zwischen dem 9. und 15. postoperativen Monat, auf (Paradis et al, 1993). Die BO ist bei 60-70 % der Patienten mit einem Überleben von mehr als 5 Jahren zu diagnostizieren (Bando et al, 1995). Sie stellt die Haupttodesursache im Langzeitverlauf nach Transplantation dar. Nach Diagnosestellung liegt die Mortalität bei etwa 40 % innerhalb von 2 Jahren (Date et al, 1998). Der Verlauf ist in der Regel progressiv und irreversibel und selbst unter immunsuppressiver Therapie nicht vollständig aufzuhalten. Die Pathogenese ist nicht komplett verstanden.

Einen wesentlichen Risikofaktor für die Entwicklung einer Bronchiolitis obliterans stellen akute Abstoßungsepisoden im Verlauf nach Transplantation dar (Bando et al, 1995). Neben akuten Abstoßungsereignissen stellen die kalte Ischämiezeit und die nach mindestens 3 postoperativen Monaten auftretende lymphozytäre Bronchitis/Bronchiolitis Risikofaktoren für die BO dar (Hosenpud et al, 2000). Ein HLA Mismatch, eine CMV oder Non-CMV Infektion stellen fragliche Risikofaktoren dar (Sharples et al, 2002).

Anti-HLA Klasse I Antikörper stimulieren die Epithelproliferation und könnten bei der Entwicklung der BO relevant sein (Reznik et al, 2000).

Beim klinisch diagnostizierten Korrelat, dem Bronchiolitis obliterans Syndrom (BOS), ist per definitionem eine progressive Reduktion der FEV₁ auf Werte kleiner als 80 % bzw. eine Mindestreduktion von 20 % des individuellen postoperativen „Normalwertes“ bzw. „Baseline-Wertes“ nach Transplantation, zu finden (Cooper et al, 1993). Ein verschlechterter Diffusionswert kann ein klinischer Hinweis auf eine Bronchiolitis obliterans sein, jedoch ohne erfolgte morphologische Sicherung.

Pathomorphologisch wird eine konzentrische oder exzentrische Bindegewebsvermehrung und proliferative Fibrose in der Submukosa unterschieden, die im Bereich der terminalen Bronchiolen mit einer Einengung des Lumens einhergeht (Kelly et al, 1997).

Nach einer initialen inflammatorischen Phase schließt sich ein inhomogener und fibroproliferativer Prozess an und führt zur Ablagerung von kollagenem Fasermaterial

und extrazellulärer Matrix. Folglich kommt es zu einer progressiven Atemwegsobstruktion, die letztendlich zum Transplantatversagen führen kann.

Pathogenetisch relevant ist auch ein Protease-Antiprotease-Ungleichgewicht (Hirsch et al, 1999; Behr et al, 2000), das den Umbauprozess (Remodelling) begünstigt.

Bei der aktiven Form der BO findet man neben der Fibrose eine entzündliche Komponente mit Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, wobei besonders Lymphozyten und neutrophile Granulozyten die Fibroblasten stimulieren. Bei der inaktiven Form liegt eine relativ blande Fibrose ohne wesentliche Entzündung vor.

Durch die luminale Obliteration bedingt, kommt es zur Überblähung der Lunge und zur Ausbildung einer Mukostase, die prädisponierend für eine chronische bakterielle Besiedelung ist. Häufig ist hier *Pseudomonas aeruginosa* zu finden.

Die Obliteration kann in der Spirometrie Zeichen einer progressiven obstruktiven Ventilationsstörung zeigen, im HR-CT mögliche Zeichen des „air trapping“. Dennoch ist der Verlauf variabel, klinische Zeichen der Dyspnoe oder des produktiven Husten können zu finden sein.

Evidenzbasierte prädiktive Faktoren, die zur Detektion von Patienten mit einem besonderen Risiko zur BO-Entwicklung helfen würden, fehlen. Durch präventive Biopsien wird versucht eine frühe und möglichst noch subklinisch verlaufende akute Abstoßung zu diagnostizieren und zu therapieren, um die Entwicklung zu einer BO aufzuhalten bzw. nicht zu fördern (Tamm et al, 1997). Die Diagnosestellung einer BO erfolgt dabei immer im klinischen Gesamtkontext.

Therapeutische Möglichkeiten sind unzufriedenstellend. In frühen Stadien der BO kann eine ausgebaute immunsuppressive Therapie einen stabilisierenden Einfluss haben, dennoch ist der progressive Prozess in der Regel nicht vollständig zu unterdrücken. Retransplantationen werden im Hinblick auf den Organmangel kontrovers diskutiert. Eine Stabilisierung der Lungenfunktion wurde bei einer kleinen Fallzahl von BO-Patienten mit inhaliertem Cyclosporin A erreicht (Iacono et al, 1996). Andere immunmodulierende Ansätze beziehen sich auf Bestrahlung von lymphoidem Gewebe oder auf Photopherese (Salerno et al, 1999).

1.2 Transplantationsimmunologie

Die Lunge wird mit einer Vielzahl immunkompetenter Zellen, wie Makrophagen oder Lymphozyten bzw. lymphatischer Strukturen in Form von Lymphknoten oder Bronchus-assoziiertem lymphoiden Gewebe (BALT), transplantiert. BALT scheint eine wichtige Rolle im Abstoßungsprozess zu spielen (Prop et al, 1985) und ist im „recirculation pathway“ der Lymphozyten beteiligt. Spender-Lymphozyten und Spender-Makrophagen sind am Tag 90 nach Transplantation größtenteils durch Empfänger-Lymphozyten und Empfänger-Makrophagen ersetzt. Empfänger-Zellen infiltrieren das BALT, kommen mit den Spender-Zellen in Kontakt und initiieren immunologische Vorgänge. Aktivierte Empfänger-Zellen stellen die Grundlage für eine systemische Stimulation einer Abstoßungsreaktion dar (Hummel, 2003).

T-Zellen erkennen und binden sowohl an prozessierte fremde Peptidfragmente, die durch MHC Moleküle präsentiert werden, als auch an MHC Moleküle selber. Der MHC Komplex Klasse II wird auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie Makrophagen, B-Lymphozyten und dendritischen Zellen gefunden, der MHC Komplex Klasse I dagegen auf allen kernhaltigen Zellen. MHC Klasse I interagiert mit CD8+ T-Lymphozyten, MHC Klasse II mit CD4+ T-Lymphozyten.

Die T-Zell-Aktivierung wird durch „costimulation molecules“, Oberflächenmoleküle auf antigenpräsentierenden Zellen, die mit T-Zellen interagieren, unterstützt (Sayegh et al, 1998). Die potenteste immunogene Zelle, die die Abstoßung stimuliert, ist der sog. „passenger leukocyte“, der als MHC Klasse II tragende Zelle des Spenderorgans (Makrophage, dendritische Zelle) Alloantigene präsentiert. Dies entspricht einer direkten Aktivierung der Empfänger T-Zellen.

Das transplantierte Gewebe wird durch die direkte und indirekte Antigenpräsentation (Allorecognition) von T-Zellen erkannt (Lechler et al, 1990).

Bei der direkten Antigenpräsentation erkennt die Empfänger T-Zelle MHC II des Spenders auf APC des Spenders. MHC II präsentiert ein Fremdpeptid.

Abzugrenzen dazu ist die indirekte Antigenpräsentation, bei der die Empfänger T-Zelle MHC II des Empfängers auf APC des Empfängers erkennt. MHC II präsentiert analog ein Fremdpeptid.

Bei der direkten „Allorecognition“ liegt das Konzept der „high determinant density“ zu Grunde, da auf den meisten Zellen MHC-Moleküle dicht exprimiert sind und fremde

Antigene direkt T-Zellen präsentiert werden. Das Prinzip der „Allorecognition“ führt zu einer Aktivierung von einer Vielzahl von T-Zellen, wobei die direkte Aktivierung stärker verläuft.

Der Mechanismus mit dem die T-Zellen das Transplantat zerstören, kann spezifisch via Antikörper oder zytotoxische T-Zellen bzw. unspezifisch über inflammatorische Zytokine ablaufen. Ferner hängt die gegen das Transplantat gerichtete Immunreaktion auch vom Grad der Histoinkompatibilität zwischen Spender und Empfänger ab, da bei ausgeprägter Inkongruenz eine stärkere Immunantwort zu erwarten ist (Hutchinson, 1991).

Die CD4+ T-Zelle spielt eine zentrale Rolle (Rosenberg et al, 1987). Die T-Helferzelle induziert u. a. eine Aktivierung von B-Zellen, die zur Differenzierung von Antikörper produzierenden Plasmazellen führt. Die Antikörper richten sich direkt gegen das Transplantat. Diese Form der Immunantwort vollzieht sich nur, wenn es zu einer Aktivierung über die indirekte „Allorecognition“ kommt. Es existiert eine Th-2 (T-Helfer-Zelle Typ 2) abhängige Aktivierung von B-Zellen zu Antikörper produzierenden Plasmazellen (Morton et al, 1993). Dabei schüttet die Th-2-Zelle die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-6 aus.

Eine Aktivierung der T-Helferzelle Typ 1 dagegen führt zur Zytokinausschüttung von IFNG (Interferon Gamma) und IL-2. Hier kann die Aktivierung über direkte oder indirekte „Allorecognition“ erfolgen. IFNG erhöht die Expression von Adhäsionsmolekülen auf dem Transplantat und erleichtert die Adhäsion und Transmigration von Leukozyten in das Transplantatgewebe. Ferner aktiviert IFNG Makrophagen und deren Freisetzung von Enzymen, freien Radikalen sowie inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 und TNFa (Tumor Necrosis Factor alpha). Dieser Pathway (die Aktivierung von Makrophagen durch spezifische T-Zellen) ist bei der Abstoßung äußerst wichtig. IFNG fördert die MHC II Expression mit konsekutiver Stimulation des Abstoßungsprozesses sowie die Aktivierung von T-Zellen via APC (Antigen präsentierende Zelle) und prozessierten Antigenen. IL-2 fördert die Proliferation von T- und B-Zellen.

Die Schlüsselfunktion des IL-2 wird auch pharmakologisch genutzt, um die Transplantatabstoßung zu unterdrücken. Dabei wird die IL-2 Produktion durch Calcineurin Inhibitoren wie Cyclosporin A oder Tacrolimus blockiert, ferner die IL-2 Aufnahme durch monoklonale Antikörper gegen CD 25, eine Kette des IL-2 Rezeptors, verhindert. Die Blockade von intrazellulären Signalwegen durch Sirolimus wird pharmakologisch ebenso ausgenutzt.

IL-2 kann die CD8+ zytotoxische T-Zelle aktivieren, deren Rolle bei der Transplantatabstoßung noch nicht völlig geklärt ist (Rosenberg et al, 1987). Die Aktivierung muß über die direkte „Allorecognition“ erfolgen. Aktivierte zytotoxische T-Zellen können bei der Abstoßungsreaktion gefunden werden (Snider et al, 1986). CD8+ T-Zellen benötigen jedoch eine Aktivierung, alleine richten sie keinen Schaden im Transplantat aus (Hall, 1991). CD8+ zytotoxische T-Zellen induzieren einen Zellschaden via lytischen oder apoptotischen Zelltod (Shresta et al, 1998). Der lytische Zelltod wird dabei durch Perforin, das die Zellmembran permeabel macht, und Granzym, das ein Lyseprogramm der Zelle aktiviert, hervorgerufen. Folglich kann eine inflammatorische Antwort beobachtet werden. Die Expression von Perforin und Granzym wurde in Transplantatbiopsien (Vasconcellos et al, 1998 sowie Shulzhenko et al, 2001) und in peripheren Blutzellen als molekularer Marker für die akute Abstoßung beschrieben. Die Induktion der Apoptose durch zytotoxische T-Zellen erfolgt durch Fas-Fas Ligand Interaktion mit der Zielzelle (Dennert, 1997 sowie Shresta et al, 1998).

1.3 Diagnostik der Abstoßungsreaktion

1.3.1 Die transbronchiale Biopsie

Trotz des immer weiter steigenden Wissens um die mit der Abstoßungsdiagnostik verbundenen immunologischen Vorgänge, stellt den Goldstandard der Abstoßungsdiagnostik die transbronchiale Biopsie (TBB) dar.

Für eine Beurteilung morphologisch definierter Veränderungen findet die Arbeitsklassifikation der Internationalen Gesellschaft für Herz- und Lungentransplantation (ISHLT) Anwendung (Yousem et al, 1996).

Grad der Abstoßung	Histologische Veränderungen
<i>Akute Abstoßung</i>	
Grad A0 (keine Abstoßung)	Keine perivasalen lymphoiden Infiltrate
Grad A1 (minimale Abstoßung)	wenige, in der Übersichtsaufnahme nur schwer erkennbare perivasale lymphoide Infiltrate
Grad A2 (geringe Abstoßung)	Zahlreiche perivasale lymphoide Infiltrate, Eosinophile und Plasmazellen nachweisbar
Grad A3 (mittelmäßiger Abstoßungsgrad)	Infiltrate dehnen sich in die angrenzenden Alveolarsepten aus
Grad A4 (schwere Abstoßung)	Diffuse interstitielle lymphoide Infiltrate mit diffusem alveolären Schaden, Hämorrhagien und/oder Parenchymnekrosen
<i>Mit bronchialer/bronchiolärer Entzündung</i>	
Grad B0	Keine Entzündung
Grad B1	Wenige Lymphozyten in der Mukosa
Grad B2	Zirkumferentielles Band aus Lymphozyten ohne epitheliale Entzündung oder Nekrosen
Grad B3	Zirkumferentielles Band aus Lymphozyten mit epithelialer Entzündung oder Nekrosen
Grad B4	Zirkumferentielles Band aus Lymphozyten mit epithelialer Entzündung und Ulzeration und Nekrosen
Grad Bx	Nicht graduerbar
<i>Chronische Abstoßung (Bronchiolitis obliterans)</i>	
Grad Ca (aktiv)	Fibrose mit mononukleärem Infiltrat
Grad Cb (inaktiv)	Fibrose mit minimaler Entzündung
<i>Chronische vaskuläre Abstoßung (Transplantatvaskulopathie)</i>	
Grad D	

Tabelle 2: Arbeitsklassifikation der Internationalen Gesellschaft für Herz- und Lungentransplantation: Gemäß ISHLT, Einteilung des Abstoßungsgrades und der histologischen Veränderung (Yousem et al, 1996).

Trotz klar definierter morphologischer Charakteristika bestehen erhebliche differentialdiagnostische Schwierigkeiten in der Abgrenzung der akuten

Abstoßungsreaktion z. B. von viralen Pneumonien, Aspirationen oder eines Ischämie-/Reperfusionsschadens in der Frühphase nach Transplantation. Ferner muß auch der diffuse alveoläre Lungenschaden, beispielsweise im Rahmen eines ARDS, in die Differentialdiagnose miteinfließen (Paradis et al, 1992). Eine Komorbidität von Abstoßung und Infektion muß in Erwägung gezogen werden.

Für die akute Abstoßungsreaktion liegt die Sensitivität der TBB zwischen 77 und 84 % und die Spezifität zwischen 90 und 100 % (Trulock et al, 1992). Deutlich geringer ist die Sensitivität für die BO mit 17 bis 82 %, die Spezifität liegt bei 94 % (Chamberlain et al, 1994). Dies ist durch das fokale Auftreten von akuter Abstoßungsreaktion und BO im Lungengewebe zu erklären.

Anzumerken ist, dass eine lymphozytäre Bronchitis/Bronchiolitis alleine kein ausreichendes Kriterium für die Annahme einer Abstoßungsreaktion darstellt. Sie kann zu jedem Zeitpunkt nach Transplantation auftreten, ist aber für sich genommen unspezifisch. Trotzdem muss berücksichtigt werden, dass in 77 % der Fälle einer bioptisch gesicherten akuten Abstoßung eine lymphozytäre Bronchitis vorausgeht. 88 % der Patienten mit Bronchiolitis obliterans hatten eine lymphozytäre Bronchitis in der Vorgeschichte (Yousem et al, 1993 sowie Husain et al, 1999).

Differentialdiagnostisch kommt beim Vorliegen einer lymphozytären Bronchitis auch eine Infektion, Aspiration und Abstoßung in Betracht. Unspezifische klinische Befunde und teils fehlende radiologische Kriterien erschweren die Differentialdiagnose.

TBBs bei asymptomatischen Patienten dagegen zeigten in bis zu 39 % der Fälle milde Formen der akuten Abstoßung (Trulock et al, 1992).

Trotz klinischer Besserung kann eine persistierende Abstoßungsreaktion im Verlauf bei 1/3 der Patienten durch TBB festgestellt werden (Guilinger et al, 1995). Bezüglich der Diagnostik müssen klinische und laborchemische Parameter, ferner Lungenfunktionsprüfung, radiologische sowie mikrobiologische Resultate und natürlich TBB und BAL bei der Diagnosestellung herangezogen werden.

1.3.2 Die bronchoalveoläre Lavage

Die bronchoalveoläre Lavage stellt ein diagnostisches Routineverfahren im Rahmen einer Bronchoskopie dar und kommt vor allem bei unklaren interstitiellen Lungenerkrankungen zum Einsatz. Im Rahmen einer Fiberglasbronchoskopie wird ein Lungensegment lavagiert bzw. gespült und dabei Zellen der Bronchiolen und Alveolen gewonnen. Häufig wird die BAL im Zusammenhang mit einer TBB durchgeführt, eine Differentialzytologie erfolgt in der Regel via Lichtmikroskopie.

Eine sichere Abstoßungsdiagnostik ist mittels BAL nicht möglich. Der Schwerpunkt liegt in der mikrobiologischen Untersuchung.

1.3.3 BAL-Zytologie in der Abstoßungsdiagnostik

Clelland et al, 1990, untersuchte BAL-Proben bei bioptisch gesicherter Abstoßung und stellte fest, dass ein Nachweis der an der Abstoßungsreaktion beteiligten Lymphozyten in nur 23 % der Fälle möglich war.

Die Lavagezytologie zeigt vornehmlich Makrophagen, neutrophile Granulozyten und in geringem Ausmaß Lymphozyten. Ein signifikanter Unterschied der Lymphozyten zwischen akuter und chronischer Abstoßung (3 bzw. 1 %) wurde jedoch nicht nachgewiesen. Die BAL-Differentialzytologie besitzt einen geringen diagnostischen Wert in der Abstoßungsdiagnostik. Dennoch können trotz weniger Lymphozyten in der BAL Genexpressionen detektiert werden und gehen somit nicht verloren (Gimino et al, 2003).

Dies bestätigten auch Untersuchungen von Hertz et al, 2001, die periphere Blutzellen (75 % Lymphozyten, 25 % Monozyten) und BAL-Zytologien (77 % Makrophagen, 21 % Neutrophile, 2 % Lymphozyten) nach Transplantation verglichen.

Neben dem routinemäßigen Einsatz für mikrobiologische Untersuchungen, kann die BAL Zytologie dennoch zusätzliche Informationen geben. Neutrophile Granulozyten und Lymphozyten sind neben Abstoßungsepisoden auch bei bakteriellen bzw. viralen Infektionen zu finden (Tiroke et al, 1999). Untersuchungen von DiGiovine et al, 1996, zeigten, dass Neutrophile bei der BO präsent sind und mit IL-8 korrelieren. Eine Assoziation einer Neutrophilie und der BO wurde auch von Riise et al, 1998, gezeigt.

1.4 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein cDNA-Microarray zu entwickeln, mit dessen Hilfe es möglich ist, typische Genexpressionsmuster für die akute und chronische Abstoßungsreaktion zu detektieren.

Es wurden zu diesem Weg Zytokine, Faktoren der Leukozyten- und Lymphozytenfunktion, Wachstumsfaktoren sowie Entzündungsmediatoren, die in der akuten und chronischen Abstoßung involviert sind und sein könnten, ausgewählt und mit Ihnen ein cDNA-Microarray entwickelt und methodisch etabliert.

Mit Hilfe des Microarrays wurden bronchoalveoläre Lavageproben von lungentransplantierten Patienten untersucht und detektierte Genexpressionen den unterschiedlichen Gruppen eines Patientenkollektivs zugeordnet sowie vergleichend analysiert und beschrieben.

Die Expressionsmuster der BAL sollen mittels RT-PCR und Immunhistochemie validiert werden. Diese Ergebnisse sollten mit den morphologischen Ergebnissen von parallel entnommenen transbronchialen Biopsien korreliert werden.

Ziel der vorgelegten Arbeit ist es, weitere Einblicke in die Pathogenese und molekularen Mechanismen der Entstehung der akuten und chronischen Abstoßungsreaktion nach Lungentransplantation zu gewinnen.

Weiterhin sollte geklärt werden, ob es möglich ist, Genexpressionsmuster zu detektieren, die einen Hinweis auf die mögliche Entwicklung einer Bronchiolitis obliterans geben können.

2. Methoden

2.1 Design und Etablierung des cDNA-Microarrays

2.1.1 Hintergrund und Prinzip der Methodik

Unter einem Microarray versteht man eine dichte Anordnung von kreisförmigen Nukleinsäurespots, die nach festgelegten Kriterien auf eine immobile Oberfläche gedruckt werden. Diese Nukleinsäurespots bekannter Sequenz werden als „Probe“ bzw. Sonde definiert und auf eine exakt errechnete Position in einem geordneten Muster als Microarray gespottet. Die „Probe“ liegt als Einzelstrang vor und bindet durch komplementäre Basenpaarung einen Nukleotidstrang zunächst unbekannter Sequenz. Diese Nukleotidsequenz kann aber indirekt über die Komplementarität ermittelt werden, da jene mit der Probe/Sonde hybridisiert. Definitionsgemäß wird die zugeführte Nukleotidsequenz als „Target“ bezeichnet. Ziel dieser Technik ist eine Detektion von zunächst unbekanntem Targets, die im Hinblick auf das Genexpressionsverhalten analysiert werden.

Für die Etablierung eines cDNA-Microarrays werden in einem ersten Schritt Gen-spezifische cDNA-Klone auf eine Matrix gespottet bzw. gedruckt. Alternativ kann man anstatt von cDNA-Fragmenten auch Oligonukleotide oder Peptid-Nukleinsäuren einsetzen.

Unter dem Gesichtspunkt einer fokussierten Fragestellung, wurde ein Design mit quantitativ wenigen, aber qualitativ hochwertigen Sonden in Form von cDNAs gewählt.

Als Trägermaterial werden „standard microscope“ Glasslides verwendet, die zuvor mit Poly-L-Lysin beschichtet worden sind. Neben Glasslides können auch Kunststoffmembranen, z.B. aus Nitrozellulose, als Trägermaterial verwendet werden.

In einem parallelen Ansatz werden die Targetsequenzen generiert. Um Expressionsmuster unterschiedlicher Gene untersuchen zu können, wird mRNA aus dem zu untersuchenden Probenmaterial isoliert. Um die sehr instabile mRNA im Experiment detektieren zu können, wird diese durch Einbau von Fluoreszenzfarbstoffen markiert und gleichzeitig durch eine Reverse Transkriptase in

die stabilere cDNA (copy-DNA) umgeschrieben. Erst dadurch werden die Bedingungen für eine Hybridisierung mit den cDNA-Klonen auf dem cDNA-Microarray geschaffen.

Generell benötigt man bei dieser Technologie eine vergleichsweise geringe Konzentration an Targetmolekülen. Konventionelle Methodenprotokolle beziehen sich auf den Einsatz von mRNA von 1-5 µg zur Gewährleistung eines reproduzierbaren Experimentes (Hedge et al, 2000; Lou et al, 2001).

Ebenso können durch Einsatz von zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen Bedingungen für eine komparative Hybridisierung hergestellt werden, die Vergleiche zwischen dem zu untersuchenden Probenmaterial mit einer Referenz erlauben.

Alternativ kann man sich auch für die Technik der Chemiefluoreszenz entscheiden, bei der Signale durch eine Kopplung an ein Enzym, z. B. die alkalische Phosphatase, entstehen.

Neben direkten und indirekten Fluoreszenzmethoden können die Targets auch radioaktiv markiert werden. Diese Anwendung wird vor allem in Verbindung mit Kunststoffmembran-Slides durchgeführt, wobei anzumerken ist, dass trotz eines geringeren Targetbedarfs nur eine „one-color-Hybridisierung“ möglich ist. Durch die Überlagerung der radioaktiven Strahlung kann eine komparative Hybridisierung nicht durchgeführt werden.

Für die statistische Auswertung werden die hybridisierten Glasslides mit Hilfe eines konfokalen Laserscanners, der das fluoreszierende Image erkennt und analysiert, ausgewertet.

Mit Hilfe der cDNA-Microarray-Technologie können physiologische und damit gesunde Patientenproben mit pathologischen Gewebeproben verglichen werden und im Hinblick auf unterschiedliche Genexpressionsmuster untersucht und komparativ analysiert werden.

Expressions-Microarrays bieten die Möglichkeit, mRNA Gemische aus ganz unterschiedlichen Transkripten gemeinsam in einem Experiment zu detektieren und dabei klar differenzierbar zu untersuchen.

Erste Veröffentlichungen beschreiben die Microarray-Technologie als „quantitatives Monitoring von Genexpressionen“ (Schena et al, 1995) sowie als „natural vehicle for

exploring the genome“ (Brown et al, 1999). cDNA-Microarrays sind auch für die Charakterisierung von mRNAs bei Tumorzellen, beispielsweise bei diffus großzelligen B-Zell Lymphomen oder etwa Tumoren der Mamma, verwendet worden (Alizadeh et al, 2000 sowie Perou et al, 2000).

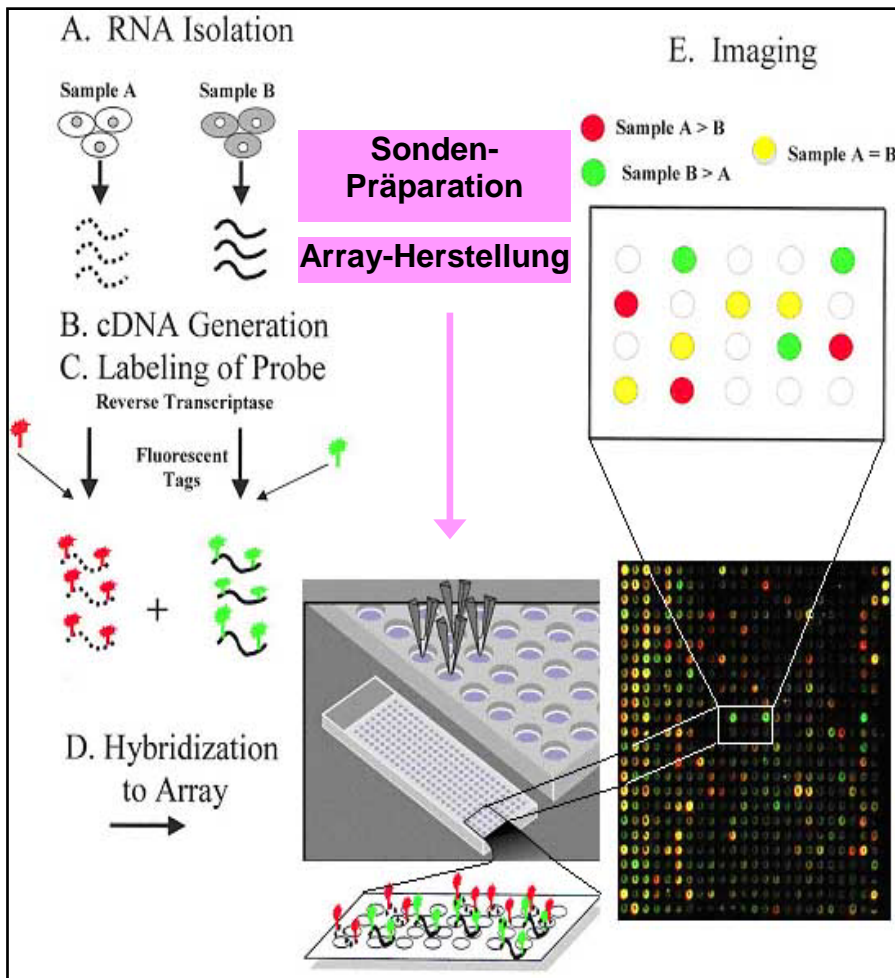


Abb. 2: Übersicht der cDNA-Microarray-Technologie: RNA-Isolation, Umschreibung der RNA in cDNA, Labelingreaktion, komparative Hybridisierung auf einem hergestellten Array mit ausgewählten Sonden, anschließende computerbasierte Auswertung; (modifiziert nach www.fao.org).

2.1.2 Auswahl der Gene für das cDNA-Microarray-Projekt

Bei diesem Projekt wurde eine ausgewählte Gruppe von Genen definiert, die speziell im Zusammenhang mit der allogenen Lungenschädigung nach Transplantation von Interesse sind.

Unter diesen Genen finden sich verschiedene proinflammatorische und antiinflammatorische Faktoren, Gene, die eine Relevanz im Zusammenhang mit der Leukozytenadhäsion aufweisen bzw. bei der Lymphopoese, der Lymphozytendifferenzierung und der T-Zell-Antwort involviert sind. Ferner wurden

Gene ausgewählt, die für Wachstumsfaktoren, fibrogene, antifibrogene und allgemeine Entzündungsmediatoren kodieren, um die Pathogenese der chronischen Transplantatreaktion zu untersuchen.

2.1.2.1 Proinflammatorische und antiinflammatorische Faktoren

Tumor necrosis factor alpha (TNFa) ist ein zentrales proinflammatorisches Zytokin, das bei Erkrankungen wie der Sepsis, der cerebralen Malaria, bei Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose und rheumatoiden Arthritis, dem systemischen Lupus erythematoses, dem Morbus Crohn sowie bei Tumorerkrankungen dysreguliert ist bzw. vermehrt exprimiert wird (Ruuls, 1999).

TNFa wird durch Makrophagen, Lymphozyten und Mastzellen sezerniert. Die genetische Regulation des TNF Genes bleibt aufgrund des Genlocus im Bereich der polymorphen und stark regulierten MHC-Region mit starker Beteiligung bei immunologischen Geschehen, schwer zu bewerten (Ruuls, 1999).

Gemäß einer Studie von McKee et al, 2002, ist TNFa bei der Pathogenese der Lungentransplantatabstoßung involviert, insbesondere bei der BO (Lu et al, 2006).

Interleukin 8 (IL-8) wird als proinflammatorisches Zytokin von einer Vielzahl von Zelltypen, vor allem von Monozyten/Makrophagen, auf einen inflammatorischen Stimulus sezerniert. IL-8 aktiviert neutrophile Granulozyten und leitet diese via Chemotaxis. Eine synergistische Wirkung mit TNFa, IFNG und GM-CSF wird beobachtet (Palmberg et al, 1998). IL-8 wird mit einer Neutrophilie einhergehend bei der BO beobachtet (Riise et al, 1999 sowie DiGiovine et al, 1996). Tilney et al, 1991, beschrieb eine Beteiligung u.a. von IL-8 bei akuten Abstoßungsepisoden der Lunge.

Interleukin 6 (IL-6) ist ein immunregulatorisches Zytokin, das vor allem von Makrophagen sowie T- und B-Lymphozyten sezerniert wird. Eine Rolle im Prozess der akuten Abstoßung der Lunge wird diskutiert (Tilney et al, 1991).

IL-6 und IFNG korrelierten in der Studie von Iacono et al, 1997, mit einer therapierefraktären histologisch gesicherten akuten Abstoßung.

Interleukin 1 beta (IL-1B), hauptsächlich monozytären Ursprungs, agiert im Rahmen der Akut-Phase-Antwort. Eine Rolle im inflammatorischen Pathway bei der BO wird IL-1B zugeordnet (Lu et al, 2006).

Interleukin 12 A (IL-12A) besitzt eine Schlüsselfunktion in der Immunantwort, wird von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gebildet und induziert die IFNG Synthese sowie die Th1 Antwort. IL-12A besitzt möglicherweise ein therapeutisches Potential bei Infektionskrankheiten wie Aids, Malaria, Tuberkulose sowie bei Tumorerkrankungen (Wolf et al, 1994 und Hall, 1995).

Interferon Gamma (IFNG) wird als multifunktionelles Zytokin von T-Lymphozyten gebildet und wirkt antiviral. Ein Mikrosatelliten-Polymorphismus im ersten Intron des IFNG Genes ist assoziiert mit verstärkter Synthese von IFNG in vitro und mit einer Fibrose des Allografts bei Lungentransplantationen (Pravica et al, 2000). Konsens besteht im Zusammenhang mit der akuten Abstoßung bei Lungentransplantation (Tilney et al, 1991 sowie Whitehead et al, 1993 sowie Iacono et al, 1997 sowie Moudgil et al, 1999 sowie Zeevi et al, 2001 sowie Gimino et al, 2003).

Small inducible Cytokine A2 (ScyA2) rekrutiert und reguliert Monozyten bei Infektionen oder Verletzungen von Gewebe. Bei rheumatoider Arthritis rekrutiert es Makrophagen (Corrigall et al, 2001), ebenso ist es bei Diabetes mellitus Typ II beteiligt (Sartipy et al, 2003).

Small inducible Cytokine A3 (ScyA3) beruft neutrophile Granulozyten bei entzündlichen Reaktionen ein, ist ein Chemoattractant und stimuliert IL-1, IL-6 und TNFa (Taub et al, 1993).

Lymphotoxin-beta (LTB) wird durch aktivierte Lymphozyten sezerniert, moduliert die Immunantwort und agiert zusammen mit Lymphotoxin-alpha bei immunologischen Geschehen durch Zell-Zell Kontakt (Nakamura et al, 1995). Expressionen werden bei der akuten Abstoßung der Lunge (Gimino et al, 2003) sowie bei der chronischen Reaktion diskutiert (Lu et al, 2006).

Interleukin 1 Rezeptorantagonist (IL1RA) ist ein spezifischer Rezeptorantagonist bezüglich der Wirkung von IL-1-alpha und IL-1-beta bei der Immunantwort oder bei entzündlichen Vorgängen. IL1RA ist bei einer Vielzahl von infektiösen, immunologischen und traumatischen Konditionen beteiligt.

2.1.2.2 Leukozytenadhäsion

Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) wird von Monozyten, Lymphozyten und Endothelzellen gebildet und führt zur Adhäsion von Leukozyten. Signifikante Expressionen von ICAM-1 von epithelialen Zellen wurde bei der Keratokonjunktivitis sicca beim Sjögren Syndrom beobachtet (Pisella et al, 2000).

Selectin E (SELE) wird von Endothelzellen gebildet und ist bei der akuten und chronischen Abstoßungsreaktion nach Lungentransplantation durch die vermittelte Migration von Leukozyten pathogenetisch beteiligt (Brockmeyer et al, 1993). Analog soll auch ein Bezug zur Parenchymschädigung beim akuten Lungenschaden bestehen (Mulligan et al. 1992).

Selectin P (SELP) interagiert analog dem SELE mit Leukozyten und aktivierten Endothelzellen. Beim Lungenschaden durch Staphylokokken werden SELE und SELP vermehrt exprimiert (Neumann et al, 1997).

CD18 oder Integrin, Beta-2, gehört zu den Zellmembran-Glykoproteinen, die auch als Integrine bezeichnet werden. Diese stellen als Zelladhäsionsmoleküle alpha-beta Heterodimere dar und sorgen für eine adhäsionsabhängige Funktion der Leukozyten.

CD11a oder Integrin, Alpha-L, wird von Lymphozyten und phagozytierenden Zellen exprimiert und ist bei der Adhäsion zytotoxischer T-Zellen an bestimmten Zielzellen involviert.

Cd11b oder Integrin, Alpha-M, führt zur Aktivierung von Leukozyten sowie zur Leukozytenadhäsion.

2.1.2.3 Lymphopoese, Lymphozytendifferenzierung und T-Zell-Antwort

Interleukin 7 (IL-7) wird von Epithelzellen und extramedullären Stromazellen exprimiert (Fry et al, 2002). Tilney et al, 1991, deutet auf eine Rolle in der akuten Abstoßungsreaktion der Lunge hin.

Stromal Cell Derived Factor 1 (SDF1) wird von Stromazellen des Knochenmarks exprimiert und ist ein effektiver „Chemoattractant“ für Lymphozyten (Bleul et al, 1996).

CD24 wird als Oberflächenantigen von B-Lymphozyten und Granulozyten gebildet und fördert die Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen. CD24 ist auf Tumorzellen ein Ligand für SELP (Aigner et al. 1997).

Rantes, ein Akronym für “Regulated upon Activation, Normally T-Expressed, and presumably Secreted”, ist ein Chemoattractant von T-Zellen (Schall et al, 1990), und wird von CD8 positiven T-Lymphozyten produziert. Rantes zeigt ein erhöhtes Expressionsverhalten bei akuter Abstoßung der Lunge (Belperio et al, 2000).

Granzym B (GZMB) wird vor allem von dendritischen Zellen exprimiert, ferner auch von Monozyten, Granulozyten, B- und T-Zellen (Rissoan et al, 2002). GZMB wurde als Marker der akuten Abstoßungsepisode nach LTX beschrieben (Vasconcellos et al, 1998 sowie Shulzhenko et al, 2001).

Perforin ist ein zytolytisches Protein, das aus lymphozytären Granula sezerniert wird und an der Zielmembran der zu lysierenden Zelle angreift. Es wird von T-Zellen sowie NK-Zellen sezerniert (Badovinac et al. 2000). Perforin wurde in Zusammenhang mit GZMB bei der akuten Abstoßung nach LTX diskutiert (Vasconcellos et al, 1998 sowie Shulzhenko et al, 2001).

Interleukin 18 (IL-18), ein immunregulatorisches Zytokin, induziert die Expression von IFNG und stimuliert bzw. verstärkt die Aktivität von NK-Zellen. Eine Beteiligung bei der Entwicklung von Th1-Zellen sowie bei Gewebsschädigung bei entzündlichen Reaktionen scheint plausibel (Okamura et al, 1995).

Interleukin 15 (IL-15) aktiviert T-Lymphozyten und fördert die T-Zell-Proliferation ähnlich wie IL-12. Ein möglicher Zusammenhang mit der Abstoßungsreaktion nach LTX liegt vor (Shi et al, 2004 sowie Li et al, 2001 und Gimino et al, 2003).

Ox40L oder Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily, Member 4. Ox40L wird in der Milz, dem Thymus und im Herz exprimiert und steht in Zusammenhang mit einer Proliferation der T-Helfer-Zellen (Baum et al, 1994).

4-1BB oder Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 9. 4-1BB wird von Monozyten, T- und B-Zellen exprimiert, inhibiert eine Proliferation von T-Zellen und induziert den programmierten Zelltod (Schwarz et al, 1996).

4-1BBL oder Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily, Member 9, wurde erstmals von Alderson geklont (Alderson et al, 1994). Transkripte wurden im ZNS, der Lunge, Niere, Skelettmuskulatur, Plazenta und in aktivierten T-Zellen und Monozyten gefunden.

CD40 oder Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 5, aktiviert über eine Transmembrandomäne Signalkaskaden, intrazelluläre Kinasen und Transkriptionsfaktoren. Lu et al, 2006, zeigte eine relevante Rolle bei der BO auf.

CD40L oder Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily, Member 5. Eine Beteiligung bei der humoralen und zellulären Immunantwort sowie eine Korrelation von CD40L-Expression und IgE-Produktion wurde beobachtet (Gauchat et al, 1993).

FAS Antigen oder Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 6, wird im Thymus, der Leber, dem Ovar und dem Herz exprimiert. FAS spielt neben der Apoptose auch bei der Tumorgenese eine Rolle (Zhang et al, 2005).

B7-1 oder CD80 Antigen wird von B-Zellen, dendritischen und monozytären Zellen exprimiert. B7-1 und B7-2 wird eine mögliche Rolle bei der T-Zell-Aktivierung bei der chronischen Abstoßung zugeteilt (Elssner et al, 2002).

B7-2 oder CD86 Antigen wird von nicht stimulierten B-Zellen exprimiert.

2.1.2.4 Wachstumsfaktoren, fibrogene und anitfibrogene Entzündungsmediatoren

Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) wird von einer Vielzahl von Zellen wie T-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten

gebildet. Die pulmonale Alveolarproteinose ist mit einer Deletion im GM-CSF Gen oder mit einer fehlerhaften beta-Kette assoziiert (Dirksen et al, 1997).

Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1). Neben einem Zusammenhang mit einer altersbedingten Reduktion von kognitiven Funktionen (Aleman et al, 1999) wurde IGF1 in der BAL-Analyse bei Patienten mit BO gefunden (Charpin et al, 2000).

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist ein Glykoprotein, das als Mitogen spezifisch an vaskulären Endothelien ansetzt. Es könnte die Tumorangiogenese sowie das Tumorwachstum regulieren (Folkman et al, 1995).

Platelet-derived Growth Factor (PDGF) wurde bezüglich des fibroproliferativen Prozesses der BO nach LTX beschrieben (Hertz et al, 1992 sowie Kallio et al, 1999). **Platelet-derived Growth Factor A (PDGFA)** ist bei transgenen Mäusen mit einer perinatalen Mortalität aufgrund eines initialen respiratorischen Versagens assoziiert (Li et al, 2001). Die zweite Untereinheit, der **Platelet-derived Growth Factor B (PDGFB)** wurde im Mausmodell im Zusammenhang mit einem Lungenemphysem bzw. einer Fibrosierung der Lunge beschrieben (Li et al, 2002), ferner auch bei der BO (Lu et al, 2006).

Matrix Metalloproteinase 1 (MMP1) baut interstitielles Kollagen Typ I, II, III ab und spielt aufgrund des ubiquitären Auftretens von Kollagen im menschlichen Körper eine Schlüsselrolle beim Remodelling-Prozess unter physiologischen und pathologischen Bedingungen (Brinckerhoff et al, 1987). MMP1 könnte ein möglicher Baustein in der Pathogenese der COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) sein (Joos et al, 2003). MMP1 und MMP9 initiieren die Freisetzung der Makrophagenelastase bei Nikotinabusus (Minematsu et al, 2001). MMP1 kann das Verhalten von Tumorzellen in Zusammenhang mit PAR1 verändern und ist bei der Lungenmetastasierung von Mammakarzinomen möglicherweise beteiligt (Minn et al, 2005).

Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9) oder Typ IV Kollagenase gehört zu einer Gruppe von Zink-Metalloproteasen, die Kollagen der extrazellulären Matrix spalten. MMP9 wird von Alveolarmakrophagen und Granulozyten produziert. In BAL, Sputum, Bronchialschleimhaut und Serum von Asthmatikern ist MMP9 erhöht (Kelly et al,

2003). MMP9 soll bei der Entstehung des pulmonalen Emphysems durch Nikotinabusus beteiligt sein (Minematsu et al, 2001). Ein Anstieg von MMP9 nach bronchialer Provokation wurde im Rahmen des „Remodelling“ bei entzündlichen Veränderungen gefunden (Kelly et al, 2000), ferner bei der BO nach LTX (Taghavi et al, 2005). Die Expression von MMP9 korreliert mit der verminderten Expression von TIMP1 und beeinflusst das Migrationsverhalten von dendritischen Zellen (Osman et al, 2002).

Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 (TIMP1) stellt einen wichtigen Modulator der Aktivität interstitieller Kollagenasen sowie einiger Metalloendoproteasen dar. TIMP1 wird von Thrombozyten und Alveolarmakrophagen sezerniert (Carmichael et al, 1986).

Elastase 2 (ELA-2) wurde in Mitochondrien von Knochenmarkszellen als Serinprotease identifiziert (Aoki, 1978). Eine Inhibition erfolgt durch Alpha-1-Antitrypsin. Bei überwiegender Elastase-Aktivität kommt es zur Gewebszerstörung (Ashcroft et al, 2000).

Fibronectin 1 (FN1) wurde als Glykoprotein auf Fibroblasten nachgewiesen und ist bei Zelladhäsionsvorgängen bzw. -morphologien und oberflächenarchitektonischen Zellprozessen involviert. FN1 stimuliert Endozytosevorgänge. Beim Fehlen von FN1 kann sich die Kontaktinhibition bei malignen Zellen nicht ausbilden und somit zu Fehlregulationen des Zellwachstums beitragen (Bing et al, 1982).

Serpina 1 oder Proteaseinhibitor 1 (PI 1) oder Alpha-1-Antitrypsin ist ein wichtiger Proteinaseinhibitor, der in den Hepatozyten synthetisiert wird und Elastasen, Chymotrypsin, Trypsin und Kollagenasen inaktiviert. Ein Alpha-1-Antitrypsin-Mangel manifestiert sich klinisch in Form eines Lungenemphysems bzw. einer Leberzirrhose (Arnaud et al, 1976).

Transforming Growth Factor Beta 1 (TGFB-1) ist ein multifunktionales profibrogenes Peptid, das die Proliferation und Differenzierung in einer Vielzahl von Zellen kontrolliert. Ebenso spielt TGFB-1 in der Entwicklung einer Fibrose nach Transplantation eine Rolle. Die Integrin vermittelte Aktivierung von TGFB ist in der

Pathogenese des Lungenödems bei einer akuten Schädigung der Lunge involviert. Eine Blockade von TGF β könnte dabei einen therapeutischen Ansatz darstellen (Pittet et al, 2001).

2.1.2.5 Allgemeine Entzündungsmediatoren

Nitric Oxide Synthase 3 (NOS3) oder eNOS synthetisiert NO (Nitric Oxide) aus L-Arginin in den Endothelzellen. NO ist für die Wirkung des EDRF (Endothelium-derived relaxing factor) essentiell (Furchgott et al, 1980). EDRF ist für die Regulation des Vasotonus und den konsekutiven Blutfluss durch Hemmung der glatten Gefäßmuskulatur verantwortlich (Dimmeler et al, 1999). Eine mögliche Assoziation zwischen eNOS und iNOS und der BO nach LTX könnte bestehen (Gabbay et al, 2000).

Nitric Oxide Synthase 2A (NOS2A) oder iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase). iNOS synthetisiert NO (Kim et al, 2002). Erhöhtes **iNOS** wurde bei BO in einer Studie von McDermott et al, 1997, beschrieben.

Heat Shock Proteine (HSP) sind in höchstem Ausmaß konservierte Heat Shock Proteine, die ubiquitär auf Stressreize wie Zelluntergang, Infektion oder Erkrankungen gebildet werden. **HSP-70** agiert als zytosolisches Chaperone als Schutzschild gegen thermale Schädigung und Ischämie. **HSP-40** nimmt dabei eine supportive Funktion ein (Ohtsuka et al, 2000).

Surfactant Protein (SP): Pulmonales Surfactant verhindert durch eine Senkung der Oberflächenspannung ein Kollabieren der Alveolen. Man unterteilt die Surfactant Proteine in 3 Gruppen: **Surfactant Protein A (SP-A)** ist bei entzündlichen und immunologischen Prozessen beteiligt. Möglicherweise sind genetische Variationen im Surfactant Protein A und B mit der Pathogenese der idiopathischen Lungenfibrose gekoppelt (Selman et al, 2003). Ein Mangel an **Surfactant Protein B (SP-B)** wurde bei der kongenitalen alveolären Proteinose nachgewiesen (Nogee et al, 1993). **Surfactant Protein C (SP-C)**-Mangel ist mit interstitiellen Lungenerkrankungen assoziiert (Thomas et al, 2002 sowie Rosen, 2005).

Bactericidal Permeability-increasing Protein (BPI) weist eine antimikrobielle Aktivität auf, gegenüber gramnegativen Bakterien wirkt es bakterizid. BPI erhöht über

ein Rearrangement der Membranmoleküle die Permeabilität für hydrophobe Substanzen (Schumann et al, 1990).

Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP) ist ein antimikrobielles Protein, das in spezifischen Granula von polymorphkernigen Leukozyten gefunden worden ist. Durch extrazelluläre Spaltung von Proteinase-3 entsteht das antimikrobielle Peptid LL-37 (Sorensen et al, 2001). LL-37 könnte Mastzellen an den Ort des entzündlichen Geschehens führen (Niyonsaba et al, 2002).

Humanes Defensin Beta 1 (hBD) wird in Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert, und als antimikrobielles Peptid im Bereich des Respirations- und Urogenitaltraktes, insbesondere der Niere, sowie der Vagina gefunden (Morrison et al, 1998).

2.1.2.6 Hox-Gene

Die Auswahl der Hox-Gene richtete sich auch nach einem Partnerprojekt der gleichen Arbeitsgruppe aus, das sich mit Genexpressionen bei humanen, serösen Ovarialkarzinomen beschäftigte. Hox-Gene stammen aus der Entwicklungsbiologie, und fungieren als Transkriptionsfaktoren. Hox-Gene gelten als morphologische Regulatoren in der Embryogenese und spielen auch in der Onkogenese eine Rolle. Die Expression richtet sich nach verschiedenen, überlappenden Domänen entlang des Chromosoms aus, die sich wiederum entlang der anterior-posterior (A-P) Achse des Embryos ausrichten. Die Hox-Gene teilen eine 180-bp (Basenpaare) Homeobox, es existieren 4 Hox Gencluster, die sich analog der A-P Achse verhalten. Hox A ist auf Chromosom 7, Hox B auf Chromosom 17, Hox C auf Chromosom 12 und Hox D auf Chromosom 2 lokalisiert. Jedes Cluster besteht aus 13 Gruppen. Insgesamt gibt es 38 Homeobox Gene. Diese 180 bp DNA-Sequenz der Homeobox beschrieb Gehring, 1985 in *Drosophila melanogaster*.

Auswahl folgender Hox-Gene für die vorliegende Arbeit:

Hox A: Hox A1, Hox A2, Hox A4, Hox A5, Hox A7, Hox A11, Hox A13.

Hox B: Hox B2, Hox B3, Hox B5, Hox B6, Hox B7, Hox B13.

Hox C: Hox C4, Hox C5, Hox C6, Hox C10, Hox C13.

Hox D: Hox D3, Hox D4, Hox D8, Hox D10, Hox D11, Hox D13.

Auswahl einiger Genbeschreibungen:

Hox A5 besitzt bei der Entstehung von Tumoren einen Stellenwert. Eine verminderte Hox A5 Expression ist mit einer verminderten Expression von p53 bei Mammakarzinomen gekoppelt (Raman et al, 2000).

Hox A9 wird vorwiegend in der Tuba uterina exprimiert. Hox Gene, die die Differenzierung des Müllerschen Ganges regulieren, werden in epithelialen Ovarialkarzinomen, nicht aber in normalem Ovarialepithel exprimiert. Hox A7, A9, A10 und A11 wurden in Zusammenhang mit der Tumorgenese diskutiert (Cheng et al, 2005).

Hox A10 wird im Endometrium exprimiert (Taylor et al, 1997). Das weibliche Reproduktionssystem unterliegt strukturellen und funktionellen Veränderungen, bei denen Hox Gene beteiligt sein könnten.

Hox B7 beeinflusst insbesondere die Differenzierung der Monozyten (Lill et al, 1995).

Hox C6 Transkripte können beim Mammakarzinom down-reguliert sowie beim Ovarial- und Mammakarzinom auch up-reguliert sein (Chariot et al, 1996).

Hox C13. Das HoxC13/NUP98 Fusionsgen ist bei Formen der AML von pathogenetischem Interesse (Panagopoulos et al, 2003).

Hox D3 könnte bei der Regulation von Zelladhäsions-Prozessen beteiligt sein (Taniguchi et al, 1995).

Hox D4: Mutationen im Hox D4 Gen könnten die Entstehung einer ALL im Kindesalter beeinflussen (van Scherpenzeel et al, 2005).

Hox D10: Mutation im Hox D10 Gen wurden bei einer Familie mit kongenitaler Deformität in Form eines vertikalen Talus sowie einer hereditären Polyneuropathie Charcot-Marie-Tooth gefunden (Shrimpton et al, 2004).

Hox D11: Das NUP98/HoxD11 Fusionsgen sowie das NUP98/HoxD13 Fusionsgen spielen eine Rolle bei der AML (Taketani et al, 2002).

2.1.2.7 Kontroll- und Housekeeping-Gene

Mit ausgewählten Kontrollgenen können Aussagen über Sensitivität und Spezifität der Hybridisierungen, Variationen bei der Herstellung der Slides oder unterschiedliche Signalintensitäten der Fluoreszenzfarbstoffe getroffen werden.

Housekeeping-Gene sind Gene, die in den meisten Zellen in relativ gleichem Maße exprimiert werden und unabhängig von physiologischen und pathologischen Veränderungen in der Zelle vorkommen.

Glyeraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) katalysiert einen wichtigen Schritt im Kohlenhydratmetabolismus.

Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) kommt im Purinstoffwechsel vor, beim HPRT1-Defekt kommt es zum Vollbild des Lesch-Nyhan-Syndromes mit Hyperurikämie und zentralnervösen Störungen im Rahmen einer harnsäureinduzierten Enzephalopathie.

Delta-Aminolevulinate Synthase (ALAS1) wurde von Astrin et al, 1989, als Housekeeping-Gen beschrieben und ist ein mitochondriales Enzym, das in der Häm-Biosynthese involviert ist.

Tubulin, Alpha-1 (TUBA1) gehört zu den löslich globulären Tubulinproteinen, die Protofilamente und die Mikrotubuli des Zellskeletts bilden.

Actin, Gamma-1 (ACTG1) und Actin, Beta (ACTB): Actine sind eine wesentliche Komponente von muskulären und zytoskelettalen Filamenten, die für die Muskelkontraktion, Zellmotilität oder den Organellentransport verantwortlich sind.

Beta-2-Microglobulin (B2M) liegt in beta-Faltblattstruktur vor. B2M und seine Funktion ist unvollständig geklärt. Eine erhöhte Expression ist beim multiplen Myelom zu finden.

Als **Positivkontrolle** wurde aus humaner Plazenta-DNA gewonnene Cot-1-DNA verwendet, die als Richtwert fungiert. Fluoreszierende Signale sollten im Idealfall die gleiche Intensität wie Positivkontrollen haben. Dadurch können Aussagen über den

Einbau von Fluoreszenzfarbstoffen sowie über die Signalintensitäten getroffen werden.

Als **Negativkontrolle** wurde 3x SSC/1,5 M Betain für Beurteilungen des Hintergrundes bzw. von unspezifischen Hybridisierungen verwendet. Jedes verwertbare Signal sollte stärker als eine Negativkontrolle sein. Schwächere Signale werden von der Datenanalyse ausgeschlossen. Negativkontrollen sollten keine signifikant stärkere Signalintensität als der Hintergrund haben.

2.1.3 Generierung und Validierung von cDNA-Klonen für die Etablierung der cDNA-Microarray-Technologie

Abhängig vom Microarray Design wird das Spottingmaterial ausgewählt. cDNAs, die aus längeren Fragmenten bestehen, zeigen spezifischere Bindungseigenschaften und generieren stärkere Signalintensitäten als die alternative Wahl der Oligonukleotide. Bei Oligonukleotiden steht die Herstellung eines Microarrays mit hoher räumlicher Dichte im Vordergrund, da hier sehr viele Spots auf einen Array gedruckt werden können. Der sogenannte Genechip® Probe Array (Affymetrix Inc.) als möglicherweise erster kommerzieller Chip mit bis zu 260.000 Spots ist beispielsweise ein „Genomchip“ mit Oligonukleotiden. Da bei cDNAs die spezifische Erkennung eines Gens in größerem Maße gewährleistet ist und es seltener zu Fehlhybridisierungen kommt, wurden im Rahmen dieses Projekts cDNAs gewählt.

Die ausgewählten spezifischen Gensequenzen wurden in Form von cDNA-Klonen über das RZPD, das Deutsche Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (Berlin), bestellt.

Das RZPD ist über das Lawrence Livermore National Laboratory (LLNL), University of California, autorisiert worden, Klone von cDNA Libraries der IMAGE Clone Collection zu vertreiben.

Die Auswahl der Klone hat sich nach vorher festgelegten Einschlusskriterien gerichtet. Für jedes Gen wurden jeweils 2 cDNA-Klone mit möglichst geringer Homologie ausgewählt, um das Gen adäquat durch 2 Klone zu repräsentieren und damit eine erhöhte Sicherheit und Validität zu gewährleisten. Ziel ist es, eine möglichst geringe „cross-Hybridisierung“ zu erreichen. Ferner musste eine Sequenz von mindestens 250 Basenpaaren vorvalidiert sein. Gemäß den Einschlusskriterien war ein Guanin-Cytosin-Gehalt von weniger als 50 % obligat, ebenso das Fehlen von

repetitiven Elementen sowie eine Homologie zu anderen Genen von weniger als 30 %. Die ausgewählten cDNA Klone des IMAGE Consortiums/LLNL (Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression, <http://image.llnl.gov>) stammen überwiegend aus der cDNA-Library 998 der IMAGE cDNA Clone Collection. Die Species ist ausschließlich Homo sapiens. Weitere Kloneigenschaften können über eine spezielle Datenbank abgefragt werden.

Ausgewählte Gensequenzen				
Genname	IMAG-Nr. der Klone	Acc.-nr.	Ref.Seq.	Vektor
Hox A1	IMAGp998N091272	AA070261	NM005522	pBSK-
Hox A2	IMAGp998L025036.1	AI581335	NM006735	pT7T3D-Pac I
Hox A4	IMAGp998A031937.2	BX101261	NM002141	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998N234605.1	AI277552	NM002141	pT7T3D-Pac I
Hox A5	IMAGp998I193363.1	AA811807	NM019102	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998L112825.1	AA788595	NM019102	pSPORT I
Hox A7	IMAGp998C011831.1	AA625551	NM198076	pT7T3D-Pac I
Hox A9	IMAGE 1083921	AA577580	keine Ref.	pT7T3D-Pac I
Hox A10	IMAGp998N082676.1	AA599729	NM018951	pSPORT I
Hox A11	IMAGp998M05462.1	BX101301	NM005523	pT7T3D-Pac I
Hox A13	IMAGp998H135759.1	AI680621	NM000522	pT7T3D-Pac I
Hox B2	IMAGp998H214596.1	AI273508	keine Ref.	pT7T3D-Pac I
Hox B3	IMAGp998L145932.1	AI760844	NM002146	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998H125919.1	AI796199	NM002146	pT7T3D-Pac I
Hox B5	IMAGp998M07232	H02340	NM002147	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998A03192.1	BX106448	NM002147	pT7T3D-Pac I
Hox B6	IMAGp998F061905	BX115208	NM018952	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998O234256.1	AI078264	NM018952	pT7T3D-Pac I
Hox B7	IMAGp998J202238.1	AA513475	NM004502	pT7T3D-Pac I
Hox B13	IMAGp998A226119.1	AI935940	NM006361	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998M205219.1	AI400493	NM006361	pT7T3D-Pac I
Hox C4	IMAGp998N03673	W07690	XM498545	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998A203240.1	AA740717	XM498545	pT7T3D-Pac I
Hox C5	IMAGp998I225031.1	BX108689	NM018953	pT7T3D-Pac I
Hox C6	IMAGp998P182579.1	AA628463	keine Ref.	pT7T3D-Pac I
Hox C10	IMAGp998B051850.1	AA419531	NM003473	pT7T3D-Pac I
Hox C13	IMAGp998H13841	AA024798	NM017410	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998L054548.1	AI223853	NM017410	pT7T3D-Pac I
Hox D3	IMAGp998N131896.1	AA434183	NM006898	pT7T3D-Pac I
Hox D4	IMAGp998B122009.1	BX102979	NM014621	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998I205093.1	AI383535	NM014621	pT7T3D-Pac I
Hox D8	IMAGp998N15795	W81629	NM019558	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998M144307.1	AI093486	NM019558	pT7T3D-Pac I

Hox D10	IMAGp998G221157.2	BX114645	NM002148	pT7T3D-Pac I
Hox D11	IMAGp998J172373.1	AA513505	NM021192	pAMP10
Hox D13	IMAGp998H166022.1	AI858239	NM000523	pT7T3D-Pac I
TNF alpha	IMAGp998C241054.1	AA699697	NM000594	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998I134805.1	AI880081	NM000594	pBluescript SK-
IL-8	IMAGp998E087296	AW615017	NM000584	pCMV-SPORT 6
	IMAGp998K197295	AW613454	NM000584	pCMV-SPORT 6
IL-6	IMAGp998D024271	AI085963	NM000600	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998N075100	AI868566	NM000600	pT7T3D-Pac I
IL-1beta	IMAGp998N0858	T69198	NM000576	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998P041170	AA150507	NM000576	pT7T3D-Pac I
IL-12A	IMAGp998A134743	AI332701	NM000882	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998B155082	AI803560	NM000882	pT7T3D-Pac I
IFNG	IMAGp998A155972	AI769523	NM000619	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998B084029	AA946992	NM000619	pT7T3D-Pac I
Scy-A2	IMAGp998I03771	W5206	NM002982	pBluescript SK-
	IMAGp998N14513	H81587	NM002982	pBluescript SK-
Scy-A3	IMAGp998J20623	N51202	NM002983	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998O231793	AA416584	NM001437	pT7T3D-Pac I
LTB	IMAGp998E045404.1	BX095063	NM002341	pCMV-Sport 6
	IMAGp998C025482.1	AI915038	NM009588	pCMV-Sport 6
IL-1-RA	IMAGp998B132035	AA497054	NM000577	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998K10237	R46871	NM000577	pT7T3D-Pac I
ICAM-1	IMAGp998F205712.1	AI632468	NM000201	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998N1812803	BM923438	NM000201	pCMV-Sport 6
SELE	IMAGp998L045815.1	AI694691	NM000450	pT7T3D-Pac I
	DKFZp586J1120.1	AL047443	NM000450	pSPORT 1
SELP	IMAGp998E2179.1	BX110929	NM003005	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998B055230.1	AI432106	NM003005	pCMV-Sport 6
CD-18	IMAGp998C181204s1	AA149070	NM000211	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998N02782	BX107224	NM000211	pT7T3D-Pac I
CD-11a	IMAGp998E103574.1	AA845731	NM002209	pT7T3D-Pac I
CD-11b	IMAGp998I035699.1	AI631857	NM000632	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998I145060.1	AI334594	NM000632	pT7T3D-Pac I
ESM-1	IMAGp998K195875.1	AI769009	NM007036	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998G03734s1	W46667	NM007036	pT7T3D-Pac I
IL-7	IMAGp998M115826	AI797222	NM000880	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998M171830	AA626701	NM000880	pT7T3D-Pac I
SDF-1	IMAGp998F0987	T84288	NM000609	pT7T3D-Pac I
CD-24	IMAGp998N2069	T65562	NM013230	Lafmid BA
	IMAGp998I10219	R77796	NM013230	pT7T3D-Pac I
Rantes	IMAGp998G127369	AW769950	NM002985	pCMV-SPORT 6
	IMAGp998K118215	BG150137	NM002985	pT7T3D-Pac I
Granzym B	IMAGp998M097974.1	BF589964	NM004131	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998L215725.1	AI652790	NM004131	pT7T3D-Pac I
Perforin	IMAGp998C218506.1	BF059588	NM005041	pT7T3D-Pac I

Perforin	IMAGp998H089392	BG231516	NM005041	pT7T3D-Pac I
IL-18	IMAGp998O218129	BF590479	NM001562	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998M219993	BF968230	NM001562	pCMV-SPORT 6
IL-15	IMAGp998E24625	N49734	NM000585	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998N215096.1	AI379606	NM000585	pT7T3D-Pac I
Ox-40L	IMAGp998L024921.1	AI357120	NM003326	pCMV-SPORT 6
	IMAGp998H15160s1	R45433	NM003326	Lafmid BA
4-1-BB	IMAGp998G018144	BF064069	NM001561	pT7T3D-Pac I
4-1-BBL	IMAGp998P095537	AI918803	NM003811	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998O128118	BF001607	NM003811	pT7T3D-Pac I
CD-40	IMAGp998O20237s1	R49884	NM001250	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998P233776.1	AA886208	NM001250	pT7T3D-Pac I
CD-40L	IMAGp956E14171	AI568217	NM000074	pT7T3D-Pac I
FAS	IMAGp998F061115.1	AA031300	NM000043	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998M19627s1	N54727	NM000043	pT7T3D-Pac I
B-7-1	IMAGp998I234008.1	AA983817	NM005191	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998A217423	AW292185	NM005191	pT7T3D-Pac I
B-7-2	IMAGp998E184146.1	AI093604	NM006889	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998I035716	AI651717	NM006889	pT7T3D-Pac I
GM-CSF	IMAGp998C104061	AA995402	NM000758	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998L158040	BE669962	NM000758	pT7T3D-Pac I
IGF-1	IMAGp998M21790	W72676	NM000618	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998P122007	AA456321	NM000618	pT7T3D-Pac I
VEGF	IMAGp998N202413	AA514977	NM001025366	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998B046620	AW168482	NM001025366	pCMV-SPORT 4
PDGFA	IMAGp998K185709.1	AI651133	XM499092	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998F055511	AI583995	XM499092	pCMV-SPORT 6
PDGFB	IMAGp998D21245	R72020	NM002608	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998G01784.2	W68169	NM002608	pT7T3D-Pac I
MMP-1	IMAGp998I021320	AA081006	NM002421	pBluescript SK-
	IMAGp998K031427	AA157468	NM002421	pBluescript SK-
MMP-9	IMAGp998A111904	AA425227	NM004994	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998O218390	BF732977	NM004994	pT7T3D-Pac I
TIMP-1	IMAGp998O201519	AA187737	NM003254	pBluescript SK-
	IMAGp998B082564	AA664454	NM003254	pBluescript SK
ELA-2	IMAGp998F13399s1	BX114651	NM001972	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998N047199.1	AW468006	NM001972	pCMV-SPORT 6
FN-1	IMAGp998L172s1	T39544	NM002026	pBluescript SK-
	IMAGp998I05843s1	AA082314	NM002026	pT7T3D-Pac I
Serpina-1	IMAGp998L13524	N49722	NM000295	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998P1458	T69235	NM000295	pBluescript SK-
TGFB-1	IMAGp998B22217Q	R76212	NM000660	pT7T3D-Pac I
iNOS	IMAGp998P168385.1	BG099280	NM000625	pT7T3D-Pac I
eNOS	IMAGp956L1818	R21248	NM000603	pT7T3D-Pac I
	IMAGp956H2425	H15032	NM000603	pT7T3D-Pac I
hsp-70	IMAGp998D044139	AA995073	NM005345	pT7T3D-Pac I

hsp-40	IMAGp956C1210	R85906	NM006145	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998C11131	R08623	NM006145	pT7T3D-Pac I
Surfact-A	IMAGp998O236648.1	AW182535	NM005411	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998E2256	T60207	NM005411	pBluescript SK-
Surfact-B	IMAGp998B2353	T64286	NM000542	pBluescript Sk-
	IMAGp998F05679	BX094529	NM000542	pT7T3D-Pac I
Surfact-C	IMAGp998M0253.1	T65969	NM003018	pBluescript Sk-
	IMAGp998B2053	T64292	NM003018	pBluescript Sk-
BPI	IMAGp998H181792	BX101070	NM001725	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998E167201	AW468325	NM001725	pCMV-SPORT 6
hBD	IMAGp998A2012806	AA946653	NM005218	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998I174693.1	AI309115	NM005218	pCMV-SPORT 6
LL-37	IMAGp998K207680	AW574631	NM004345	pT7T3D-Pac I
	IMAGp998D202575.1	AA635187	NM004345	pT7T3D-Pac I

Tabelle 3: Ausgewählte Gensequenzen: Charakterisierung mit Genname, IMAG-Nummer der cDNA-Klone, sowie Account-, Referenz- und Vektorangabe jedes Klons.

Die bestellten cDNA-Klone wurden in Form von Stichkulturen oder ausplattierten Agarkulturen geliefert. Jeder Klon wurde auf eine LB-Agarplatte (Luria-Bertani) mit 50 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37° Celsius angezüchtet. Die zu untersuchenden Gene liegen als cDNA-Fragment vor und sind in unterschiedliche Vektoren kloniert. Jeder Vektor weist eine Ampicillin-Resistenz auf.

Folgende Vektoren in Verbindung mit den vektorspezifischen Primern liegen vor:

RZPD M13 forward, M13 reverse, sp6 und T7 wurden über metabion, Martinsried bezogen und dienen als Primer zur Amplifikation von cDNA-Fragmenten in den entsprechenden Vektoren.

Vektor	Primer
pT7T3d-Pac I	M13 f/r
pBluescript SK-	M13 f/r
pCMV-Sport 1	M13 f/r
pCMV-Sport 4	sp6/T7
pCMV-Sport 6	sp6/T7
Lafmid BA	M13 f/r
pAMP 10	M13 f/r

Tabelle 4: Vektoren: Vektoren mit Angabe ihrer spezifischen Primer.

Primer: RZPD M13 forward:
5'GCT ATT ACG CCA GCT GGC GAA AGG GGG ATG TG 3'
Primer: RZPD M13 reverse:
5'CCC CAG GCT TTA CAC TTT ATG CTT CCG GCT CG 3'
Primer: RZPD sp6:
5'ATT TAG GTG ACA CTA TAG 3'
Primer: RZPD T7:
5'TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'

Tabelle 5: Primer: Primer mit Angabe ihrer spezifischen Gensequenz.

Nach der Ausplattierung wurden bis zu 20 reine Einzelkolonien/Einzelklone erneut auf einer LB-Agarplatte mit Ampicillin ausplattiert und als Übernachtskultur angesetzt. Nach erfolgreicher Anzucht wurden pro Agarplatte je drei Einzelkolonien jedes Klons in jeweils 5 ml LB-Medium mit Ampicillin transferiert und auf einen Flachbettschüttler gegeben, der für eine optimale Belüftung sorgte. Nach erfolgreichem Wachstum (4-10 Std. bei 37° C und 250 rpm) wurden 4 ml dieser LB-Flüssigkultur entnommen und die Escherichia coli Bakterien durch Zentrifugation (10 min. bei 3000 rpm) pelletiert.

Die Plasmidpräparation erfolgte zunächst in kleinem Maßstab mit Hilfe des Qiagen Plasmid MiniKits nach Herstellerprotokoll (Qiaprep® Spin Miniprep Kit Protocol):

Nach Resuspendierung in 50 µl Aqua dest. wurden die Bakterienzellen durch alkalische Lyse, Guanidin Hydrochlorid basiert, aufgeschlossen (nach Angaben des Herstellers entspricht diese Lyse einer modifizierten Methode nach Birnboim & Doly). Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe der QIAprep silica-gel-membrane Technologie adsorbiert, selektiv von RNA und Proteinen, wie Endonucleasen, getrennt und nach erfolgten Waschschritten eluiert.

Eine quantitative Beurteilung der Plasmid-DNA erfolgte photometrisch mittels eines UV-Spektrophotometers, das die Extinktion bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm misst.

Der Quotient der optischen Dichte von 260 und 280 nm erlaubt ebenso qualitative Aussagen über die Plasmid-DNA. Einschlusskriterium der Plasmid-DNA: $1,2 < \lambda_{260}/\lambda_{280} < 1,8$.

Diese „Miniprep“ diente für die sich anschließende Sequenzüberprüfung der cDNA-Fragmente (Inserts) der cDNA-Klone.

Bei der konventionellen enzymatischen Sequenzierung nach Sanger-Coulson (<http://www.dhgp.de>) liegt die cDNA zu Beginn durch die Hitzedenaturierung als Einzelstrang vor. Nach Primeranlagerung synthetisiert die DNA-Polymerase den cDNA-Strang unter Einbau von dNTPs. Beim Einbau von ddNTPs (Didesoxyribonucleosid-Triphosphate, fluoreszenzmarkiert) kommt es zu einem Kettenabbruch. Der Kettenabbruch erfolgt statistisch gesehen in dem Maße, dass es zu cDNA-Fragmenten jeder beliebigen Länge kommt. Nach elektrophoretischer Auftrennung erfolgt die computergestützte Analyse.

Die Sequenzierung wurde sowohl vom 5´ als auch vom 3´ Ende durchgeführt, dazu wurden die Sequenzierprimer gemäß dem Datenblatt der Clone Card des RZPD eingesetzt. Hier handelte es sich abhängig vom Klon um M13 forward/reverse, T7 oder Sp6. 700-800 ng Plasmid-DNA wurde auf ein Gesamtvolumen von 15 µl eingestellt. Die gewünschte Leseweite betrug ca. 400 bp, das entspricht der Länge eines sogenannten „short terms“.

Die zu sequenzierenden Proben wurden in Mikrotiterplatten bereitgestellt und zusammen mit den spezifischen Sequenzierprimern an den Sequenzierservice Entelechon GmbH, Regensburg gesendet:

Die Sequenzier-PCR wurde unter Verwendung des ABI PRISM™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits, bestehend aus Ampli Taq™ DNA Polymerase, dNTPs und ddNTPs mit verschiedenen Fluoreszenzen gelabelt (= BigDye Terminators), durchgeführt. Die Reaktion gestaltete sich in 25 Zyklen folgendermaßen:

96° C für 10 Minuten, 50° C für 5 Minuten, 60° C für 4 Minuten.

Durch eine Aufreinigung mittels Ethanol-fällung werden die nicht eingebauten BigDye Terminators, dNTPs und Primer eliminiert, damit die Sequenzierreaktion nicht behindert wird. Nach Resuspension in HiDi Formamid wurden die Proben in den Sequenzierer überführt. Der Applied Biosystems 3100 Automated Capillary DNA Sequencer (ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer) trennt die zu sequenzierenden Proben in 16 Kapillaren auf einem hochauflösenden 5 % Polyacrylamid - 7 M Harnstoffgel elektrophoretisch auf, detektiert die verschiedenen Fluoreszenzsignale

bei einer Wellenlänge von 488 bzw. 514,5 nm und führt eine Computeranalyse durch. Die analysierten Gensequenzen wurden via e-mail als Elektropherogramm bzw. Buchstabenfile an die Kunden versandt.

Die Validierung des jeweiligen Klons vollzog sich über eine Genomdatenbank (NCBI BLAST 2 Sequences engine; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), bei der ein Basenabgleich der Gensequenz mit der Genomdatenbank erfolgte.

Bei einer validen Klonsequenz wurde der restliche Teil der LB-Flüssigkultur (1 ml) in 5 ml ampicillinhaltigem LB-Medium erneut über Nacht bei 37° C in einem Schüttelinkubator (250 rpm) angezogen. Davon wurden 3 ml entnommen und in 250 ml LB-Medium mit Ampicillin als Übernachtskultur in einem Schüttelkolben bei 37° C angesetzt. Nach erfolgreichem Wachstum wurde das durch Zentrifugation (6000 rpm, 15 min. bei 4° C) gewonnene Bakterienpellet für die in großem Maßstab durchgeführte Plasmidpräparation verwendet. Die verbliebenen 2 ml dieser Kultur wurden in Form eines Glycerolstocks bei -80° C als Reserve gelagert.

Die sogenannte „Maxiprep“ wurde nach dem Herstellerprotokoll des Qiagen Plasmid MaxiKits (QIAGEN® Plasmid Purification Handbook) durchgeführt:

Nach Resuspension mit dem kitspezifischen P1-Puffer und Zellyse wurde die Plasmid-DNA durch Bindung an das QIAGEN Anion-Exchange Resin, ein produktspezifisches Anionen-Austauscherharz, gewonnen. Nach mehreren Waschschritten wurde die cDNA des Plasmids aus 500 µl Eluat durch eine Ethanolfällung gewonnen. Die pelletierte cDNA wurde in verschiedenen Mengen von Aqua dest. aufgenommen, da aufgrund der teils sehr geringen Konzentrationen an cDNA eine photometrische Quantifizierung zwischen 250-500 µl nicht gewährleistet werden konnte. Für die photometrische Quantifizierung wurde 1µl der cDNA aliquotiert und 1:7 verdünnt. Damit ein vergleichbares Experiment durchgeführt werden konnte, wurde die eluierte Plasmid-cDNA auf eine Konzentration von 520 ng/µl eingestellt. (Sчена et al. 1995).

Dies erfolgte jeweils durch entsprechende Verdünnung mit 3xSSC/1,5 M Betain bzw. durch Trockenzentrifugation unter Vakuum mit Wiederaufnahme in der entsprechenden Menge 3xSSC/1,5 M Betain. Nach exakter Berechnung wurde die Spotting-Solution bzw. der Spotting-Stock von 50 µl angelegt und bis zum Spotten auf -80° C gelagert.

Da die Spotting-Solution denaturierend wirkt, waren die Bedingungen für das Vorliegen der cDNA in Form eines Einzelstranges als notwendige Voraussetzung für anschließende Hybridisierung erfüllt.

Die Plasmid-cDNA diente neben der Bereitstellung einer Matrix zur Amplifikation der cDNA-Fragmente vor allem der Etablierung der cDNA-Technologie.

2.2.4 Präparation der cDNA-Fragmente (Klon-Inserts) für die Microarrayanalyse des Patientenkollektivs nach Lungentransplantation

25 µl des sequenzvalidierten, bei der Plasmidpräparation hergestellten Glycerolstocks des jeweiligen cDNA-Klons wurden in Form einer Übernachtskultur mit jeweils 1,2 ml LB-Medium in einer Mikrotiterplatte angelegt und 18 h auf dem Flachbettschüttler bei 37° C inkubiert. 10 µl der erfolgreich gewachsenen Kultur wurde mit 190 µl Aqua dest. verdünnt und die Zellen bei 95° C (10 min.) lysiert. Nach Zentrifugation (3 min. bei 3600 rpm) wurden 150 µl des Überstandes aus Plasmid-cDNA entnommen und eine PCR-Amplifikation durchgeführt. Bei der PCR-Amplifikation wurde nur das gewünschte cDNA-Fragment durch spezifische Primerbindungen an dem Plasmidvektor (Primer-Template Hybridisierung) in hoher Zahl hergestellt.

Amplifikation der cDNA Inserts im 50 µl Ansatz:

Bestandteile des PCR-Ansatzes	50 µl-Ansatz
AccuPrime™ Super Mix II mit rekombinanter Taq DNA Polymerase (5 U/µl), 10 x AccuPrime™ PCR Buffer I und dNTPs	25 µl
Primer M13 forward rzpd 100 µM	0,5 µl
Primer M13 reverse rzpd 100 µM	0,5 µl
Aqua dest.	22 µl
Template DNA (LB-Kultur-Überstand)	2 µl

Tabelle 6: PCR-Amplifikation der cDNA Fragmente: 50 µl Ansatz mit Angabe der Bestandteile des PCR-Ansatzes.

PCR-Profil	Funktionelle Unterteilung der PCR-Reaktion
2 Min. bei 96 ° Celsius	Denaturierung des Templates und Aktivierung der Enzyme
35 Zyklen	
25 sec. bei 94° C	<i>Denaturierung</i>
25 sec. bei 62° C	<i>Annealing</i>
1 Min. 30 sec. bei 72° C	<i>Elongation</i>
5 Min. bei 72° C	Reaktionsende

Tabelle 7: PCR-Profil: PCR-Profil zu Tabelle 6. Nach Denaturierung des Templates und Aktivierung der Enzyme folgen 35 Zyklen nach angegebenen Zeit- und Temperatureinstellungen.

Eine Validierung der PCR-Produkte erfolgte durch eine Agarose-Gelelektrophorese, sowie teils auch durch photometrische Quantifizierung und erneute Sequenzüberprüfung.

Es wurden Ethidiumbromid-haltige, horizontale 1,5 %ige Agarose-Gele bei einer angelegten Spannung von 110 Volt verwendet. Unter Verwendung von Ethidiumbromid war eine Fluoreszenz der cDNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar und auswertbar.

Da für jeden Klon zwei Glycerolstocks angelegt worden sind und beide als Ausgang für die PCR-Amplifikation dienten, wurden 2 PCR Ansätze angestrebt. Demzufolge entstand für jeden Klon zweimal 50 µl Amplifikat. Beide Amplifikate wurden zu einem Volumen von 100 µl zusammengelegt und in Ethanol gefällt. Durch die Ethanolfällung wurde das PCR-Produkt von Primern, Nukleotiden und Enzymen gereinigt, um eine unspezifische Hybridisierung zu verhindern. Das cDNA-Pellet wurde in 50 µl 3xSSC/1,5 M Betain aufgenommen und in Form des Spotting-Stocks bei -80° C gelagert. Der Spotting-Stock lag mit einer Konzentration von ungefähr 500 ng/µl cDNA vor. 1,5 M Betain sorgt für eine homogene Spotmorphologie, verbessert die Bindungseigenschaften der cDNA und reduziert Hintergrundsignalitäten (Diehl et al, 2001).

Für die Untersuchung des Patientenkollektivs nach Lungentransplantation wurde das Spotting von Inserts gegenüber der Verwendung von Plasmiden favorisiert. Die PCR-amplifizierten cDNA-Fragmente lassen sich nicht nur leichter herstellen, sondern garantieren spezifischere Bindungseigenschaften.

Spezifischere Bindungseigenschaften korrelieren wiederum mit spezifischeren Signalintensitäten. Ebenso können geometrische Probleme der Plasmidstereometrie vernachlässigt werden, da der Vektor des Plasmids Bindungskapazitäten einnimmt, dadurch die cDNA-Konzentration limitiert und schließlich zu schwächeren Signalen führt. Positive Ergebnisse mit Plasmiden von cDNA-Klonen sind jedoch ebenfalls in der Literatur beschrieben und können alternativ verwendet werden (Ziauddin et al, 2001).

2.1.5 Beschichtung der Glasslides

Glasslides zeichnen sich durch eine geringe „intrinsische“ Fluoreszenz aus, sind hoch transparent, relativ temperaturunempfindlich und stellen einen direkten Kontakt zwischen Probe und Target her. Das Bindungsvermögen von Glasslides ist geringer als bei Netzstrukturen. Die Folge ist, dass höhere Konzentrationen der Probe gespottet werden müssen und mit einer niedrigeren Sensitivität zu rechnen ist.

Für die Beschichtung der Glasslides stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung, neben Poly-L-Lysin kann alternativ eine Beschichtung mit Amino-Silan oder aktivierten Aldehyd- bzw. Isothiocyanatverbindungen durchgeführt werden.

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden die Glasslides mit Poly-L-Lysin beschichtet; diese Form des „coatings“ bildet eine kovalente Bindung zwischen den Aminogruppen des Poly-L-Lysins und der gespotteten cDNA aus. Das Protokoll wurde in Anlehnung an das Laborprotokoll von Patrick Brown, Stanford etabliert (Skena et al, 1995; <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html>):

Standard microscope slides aus reinem Weißglas werden nach sorgfältiger Auswahl in 0,5 M Natronlauge (30 Min.) und sog. „Cleaning Solution“ (2 Stunden) inkubiert. Die Cleaning Solution für 50 Slides besteht aus 70 g NaOH-Pellets in 280 ml Aqua dest. gelöst ad 420 ml 95 % Ethanol. Waschvorgänge zur Entfernung der Natronlauge mit Aqua dest. schließen sich unmittelbar an. Für die Beschichtung der Glasslides wird die Poly-L-Lysin-Lösung, bestehend aus 70 ml Poly-L-Lysin ad 70 ml PBS in 560 ml Aqua dest. gelöst, angesetzt.

Die Beschichtungs- und Inkubationszeit in Poly-L-Lysin beträgt 30 Min. Überschüssiges Poly-L-Lysin wird durch eine adäquate Spülung mit Aqua dest. entfernt. Die Glasslides werden über Nacht staubfrei luftgetrocknet. Die minimale

Lagerung vor dem Spottingvorgang liegt bei 2 Wochen, maximal sollten die Slides 4 Monate gelagert werden.

Poly-L-Lysin liegt in kationischer Form als Substrat vor, das mit der anionischen Spottingsolution aus 3xSSC/1,5 M Betain ähnlich einem Anionenaustauscher interagieren kann.

2.1.6 Der Spottingvorgang des cDNA-Microarrays

Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Lafuga für funktionelle Genomanalysen unter der Leitung von Herrn Dr. Blum, Genzentrum München Großhadern, LMU München, wurde das „Spotten“ des cDNA-Microarrays durchgeführt. Als Trägermaterial dienen die mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasslides, die mit cDNA-Fragmenten bedruckt werden. Dies geschieht mit einer computergestützten Robotertechnologie.



Abb. 3: Microarray-Spotter: Spotting Machine OmniGrid® Accent der Firma GeneMachines® (Bild gemäß <http://www.genemachines.com/>).

Der Microarray-Spotter „OmniGrid® Accent von der Firma GeneMachines® arbeitet mit einer „50 slide platform“ auf der die Poly-L-Lysin beschichteten Glasslides staubfrei aufgelegt werden. Wichtigstes Element des Spotters ist ein computergeführter Roboterarm, an dem der Druckkopf mit 48 Drucknadeln aus Stahl, so genannten „solid pins“ aufgehängt ist.

Solid pins können im Gegensatz zu quill pins immer nur einen Spot drucken, da sie keine kontinuierliche Mengenabgabe durch eine Reservoirfunktion leisten. Solid pins drucken durch direkten Kontakt zwischen pin und Glasslide. Es existieren ebenso

kontaktlose Spottingmethoden, die beispielsweise mit einer Tintenstrahl-Technologie arbeiten.

Initial müssen Spottinggeometrie, Array-Designs, Anzahl der Klone bzw. Spots auf dem Array, Spotgröße, Pin-Konfiguration, Luftfeuchtigkeit, Printing Solution sowie die Printer Settings festgelegt werden. Die Spottingparameter können variabel sein und müssen durch Testverfahren etabliert und optimiert werden.

Besonderes Augenmerk muss auf die Luftfeuchtigkeit in Bezug auf die gewählte Oberfläche des Trägermaterials und damit auf die Oberflächenspannung gerichtet werden. Um eine befriedigende Spotmorphologie zu erhalten, sollte der Spottingvorgang bei Raumtemperatur zwischen 20 und 24° C und bei einer relativen Luftfeuchtigkeit zwischen 40 und 65 % durchgeführt werden. Die Luftfeuchtigkeit hat durch die Auswirkung auf die Oberflächenspannung einen großen Einfluss auf die Größe der Spots und auf die Morphologie (Hedge et al, 2000).

Ist die Luftfeuchtigkeit zu hoch, kann der Spotdurchmesser zu groß werden, bei zu geringer Luftfeuchtigkeit kann analog ein zu kleiner Spot mit unregelmäßiger Morphologie (z. B. in „dough-nut“-Form) entstehen. Ebenso ist die Aufrechterhaltung einer konstanten Luftfeuchtigkeit wichtig, damit die Probe während des Druckens an den Pins nicht eintrocknet (GeneMachines Technical Note #614, Optimizing Microarray Spot Morphology, OmniGrid® and OmniGrid® Accent Microarrays, Lisa Romano, GeneMachines, San Carlos, CA, USA).

Konfigurationen des Arrayers sorgen etwa für eine kontrollierte Bewegung des Roboterarms mit definierten Pinbewegungen, damit die Beschichtung der Glasslides nicht zerstört wird und ebenso die konstante Spotmorphologie gewährleistet werden kann.

Die gespottete cDNA sollte nicht unter einer Konzentration von 100 ng/µl vorliegen, da sonst mit Sensitivitätsverlusten zu rechnen ist und das Ausmaß der unterschiedlich ausgeprägten Genexpression zwischen den Proben unterschätzt werden kann (Yue et al. 2001). Die gespottete cDNA sollte im Überschuss zum Target vorhanden sein, um valide Signalintensitäten zu gewährleisten. Eine zu hohe Konzentration dagegen kann sog. „smearing“ oder „Kometenschwänze“ hervorrufen.

Vor diesem Hintergrund wurde die Methode projektspezifisch u.a. durch Testserien mit Cot-I-DNA sowie mit Plasmiden etabliert und optimiert:

Ein konstantes Volumen von 5 µl der Spotting-Solution jedes cDNA-Klons wurde in eine 384-well-Mikrotiterplatte gefüllt, in diese die Pins eintauchen und mit Hilfe der Kapillarkräfte den jeweiligen cDNA-Klon auf eine exakt definierte Position auf dem fixierten Glasslide übertragen. Jeder Druckserie von verschiedenen cDNA-Klonen geht ein Waschvorgang voraus, damit es nicht zu einer „cross-contamination“ zwischen den verschiedenen cDNA-Klonen kommt.

Das Volumen von 5 µl wurde nach Testserien für die Produktion von 50 Slides festgelegt, um eine konstante, gleichmäßige Entnahme der solid pins zu sichern, die wiederum Einfluss auf die Spotsmorphologie hat. Ferner ist auch der Einfluss der Spotting-Solution auf die Slidebeschichtung, die Eintauchzeit der Pins in die Mikrotiterplatte und die schließliche Verweildauer der solid pins auf dem Glasslide zu kalkulieren.

	1	...	20	21	22	23	24
A			33	25	17	9	1
B			34	26	18	10	2
C			35	156	152	107	103
D			133	129	125	121	117
E			36	27	19	11	3
F			37	28	20	12	4
G			38	157	153	108	104
H			134	130	126	122	118
I			39	29	21	13	5
J			40	30	22	14	6
K			41	158	154	109	105
L			135	131	127	123	119
M			42	31	23	15	7
N			43	32	24	16	8
O			44	159	155	110	106
P			136	132	128	124	120

Tabelle 8: Ausschnitt des Belegungsplans einer 384 Mikrotiterplatte für die Herstellung der cDNA-Microarrays: Spezifische Anordnung mit fortlaufenden Zahlen, die jeweils einem Gen zugeordnet werden (Gliederung in Spalten 1 bis 24 sowie in Reihen A bis P). Aufteilung gemäß Spottingprotokoll für charakteristische Geometrie. Dabei gilt: Gene für die allogene Lungenschädigung mit Nummerierung 1-102, Hox-Gene mit 117-151, Housekeeping-Gene mit 103-116 und Kontrollgene mit 152-167.

Um eine korrekte Zuordnung der cDNA-Klone auf dem Microarray zu gewährleisten, wurde ein Multi-Well Plate File (=Array List), in Form einer Excel-Tabelle angelegt, die in einer Übersichtstabelle Reihen und Spalten der Mikrotiterplatte mit hinterlegten Gennamen der Klone enthält (entspricht dem Pipettierschema der Mikrotiterplatte, die die zu druckenden cDNA-Sequenzen enthält). Diese Übersichtstabelle dient der Software des Spotters zur Generierung des **GAL-Files (GenePix Array List-File)**: Neben dem File-Format, den Data Columns mit präziser tabellarischer Zuordnung und Lokalisation eines Gens auf dem Array beinhaltet der GAL-File die Anzahl und Beschaffenheit sowie die geometrischen Messwerte der Blocks auf dem Array. Jedem Spot bzw. Feature muss eine exakte ID zugeordnet werden. Der GAL-File enthält Informationen zur Identität jedes einzelnen Spots und über das Layout jedes Blockes auf dem Array (Zhai, 2001).

Ausschnitt aus dem GenePix Array List File, projektspezifisch				
ATF	1.0			
	51	5		
Type=GenePix arrayList V1.0				
BlockCount=48				
BlockType = 0				
Block1= 500 1000 500 6 740 6 740				
Block2= 5000 1000 500 6 740 6 740				
Block3= 9500 1000 500 6 740 6 740				
Block4= 14000 1000 500 6 740 6 740				
Block5= 500 5500 500 6 740 6 740				
Block6= 5000 5500 500 6 740 6 740				
.....				
Block46= 5000 50500 500 6 740 6 740				
Block47= 9500 50500 500 6 740 6 740				
Block48= 14000 50500 500 6 740 6 740				
Block	Row	Column	ID	Name
	1	1	1	RANTES-1
	1	1	2	SDF-1
	1	1	3	IL 6-1
	1	1	4	CD-18-2
	1	1	5	ELA-2-2
	1	1	6	Sele 2
	1	2	1	IL-7-1
...
Erläuterung des Aufbaus anhand des Block 1:				
Block1= 500 1000 500 6 740 6 740 = 1 Record				
1 2 3 4 5 6 7				
1 "record" für jeden Block mit 7 "block properties)				
1	X-Position des Spots in der linken oberen Ecke des jeweiligen Blocks in µm (X-Koordinate im Raum, horizontal)			
2	Y-Position des Spots in der linken oberen Ecke des jeweiligen Blocks in µm (Y-Koordinate im Raum, vertikal)			
3	Feature Diameter			
4	Anzahl der Spalten in einem Block			
5	Abstand der Spalten in einem Block in µm			
6	Anzahl der Reihen in einem Block			
7	Abstand der Reihen in einem Block in µm			

Tabelle 9: GenePix Array List File (GAL-File) nach projektspezifischer Etablierung:

ATF 1.0 (Axon Text File Format Version 1.0), Block Count (Anzahl der Blocks auf dem Array), Block Type 0 (0 bedeutet rechteckiges Blockformat), 51 (51 Zeilen im Excel-Format belegt), 5 (5 Datenspalten, Block, Row, Column, ID, Name).

Anhand des Block 1 ist im unteren Teil der Abbildung eine Erklärung beigefügt: Exemplarisch der Block 1 mit Erläuterung der einzelnen Zahlenwerte, die jeweils mit 1-7 nummeriert sind, die Blockeigenschaften widerspiegeln und einen gesamten Record repräsentieren.

Vorbereitete beschichtete Objektträger wurden für eine spätere genaue Zuordnung markiert, beschriftet und in die Spotting-machine eingesetzt.

Ein produktspezifisches Ultraschallbad für Reinigungsvorgänge wurde mit einer 1:100 verdünnten Lösung von 1x PBS/15% SDS aufgefüllt sowie eine optimierte Luftfeuchtigkeit von 40 % hergestellt. In einem Durchgang war es möglich 50 Slides nach dem projektspezifischen und optimierten Protokoll zu bedrucken.

Bzgl. der Programmeinstellungen wurde neben einer zeitlichen Komponente auch eine Beschleunigungs- und Geschwindigkeitskomponente (d. h. Geschwindigkeit mit der der Pin auf das Substrat aufsetzt) für das Dippen (Beladen des Pins mit dem jeweiligen zu druckenden cDNA-Klon) und Printen (das eigentliche Drucken) im dreidimensionalen Raum festgelegt. Sowohl die Verweildauer auf der Mikrotiterplatte als auch auf dem Slide, beeinflussen die Aufnahme bzw. Abgabe der zu druckenden cDNA und somit auch die Spotmorphologie.

Der Array wurde in Form von 6 x 6 subarrays hergestellt, d. h. 6 Spots in horizontaler und 6 Spots in vertikaler Anordnung bilden ein Subarray (siehe Abb. 9). Mehrere Subarrays bilden schliesslich den Gesamtarray. Die einzelnen Spots werden horizontal wie vertikal mit einem Abstand von 740 µm aufgetragen (Dot spacing). Die Subarrays weisen einen 200 µm Abstand in der horizontalen bzw. vertikalen Ebene auf (Array spacing). Ein Druckkopf mit 48 Pins ist in einer 4x12 Konfiguration angeordnet. Die Spot- bzw. Feature-Größe lag bei 500 µm im Durchmesser. Dabei wurde jedes Gen durch zwei Klone repräsentiert, jeder Klon wurde wiederum doppelt gespottet. Da sich auf einem Slide zwei Arrays befinden, ist somit jedes Gen achtmal vertreten.

Nachdem die cDNA-Fragmente an das „coating“ des Slides gebunden haben, erfolgte eine staubfreie waagrechte Lagerung für ca. 24 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Slides mit UV-Licht bestrahlt, um die cDNA durch weitere kovalente Bindungen zu fixieren. Dieses „UV-cross-linking“ wird mit einer energiereichen UV-Strahlung von 60 mJ bei 254 nm durchgeführt. Das cross-linking hat Einfluss auf die Signalstärke, kann aber bei mangelhafter Fixierung der cDNA ebenfalls zu den oben erwähnten Kometenschwänzen führen.

Nach zweiwöchiger Lagerung können die Slides weiterverarbeitet werden. Um systematische Variationen zu minimieren, wurde die gesamte für die Untersuchung notwendige Charge an Slides in einem Prozess hergestellt.

2.1.7 Vorbehandlung der gespotteten Slides / Array-Post-Processing

Das „Array Post-Processing“ wurde nach dem Protokoll aus dem DeRisi-Labor der University of California San Francisco (UCSF), 2001, durchgeführt (Bezug via <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html>).

Diese Vorbehandlung beinhaltet zunächst die Rehydratation für eine homogene cDNA-Verteilung in jedem Spot mit dem Ziel eines gesättigten „cDNA monolayer“. Diese Behandlung verhindert den bekannten „Dough-nut-Effekt“ und optimiert die spätere cDNA-Bindung. Ferner erfolgte das Blocken von reaktiven Gruppen, z. B. freien Aminogruppen des Poly-L-Lysins auf dem Array, die eine mögliche unerwünschte Bindungsstelle für die gelabelte cDNA darstellen. Auf eine erneute Hitzedenaturierung wurde verzichtet, da bei diesem Vorgang cDNA von der Slideoberfläche abgelöst werden kann.

Die Slides wurden mit 200 ml 0,5 x SSC bei 42° C für 2 Min. rehydriert. Nach vollständiger Rehydrierung wurden die Slides für 3 Sekunden auf eine 140° C vorgeheizte Platte gelegt. 5,5 g Bernsteinsäureanhydrid wurde in 335 ml 1-methyl-2-pyrrolidinone vollständig gelöst und mit 15 ml 1 M Natrium Borat pH 8,0 versetzt. In dieser „Blocking-Solution“ wurden die Slides für 15 Min. auf einem horizontalen Flachbettschüttler inkubiert.

Inkubationen in Aqua dest. für Fluoreszenzanwendungen für 1 Min. sowie in 99,8 % Ethanol folgten. Nach Trockenzentrifugation der Slides (4 Min. bei 600 rpm) war eine anschließende Verwendung der behandelten Slides obligat.

2.1.8 Qualitätskontrolle der gespotteten Microarrays

Zur Qualitätskontrolle wurde eine Probefärbung mit TOTO®-3 iodide, einem Cyanin-haltigen Nukleinsäure-Farbstoff, durchgeführt. Dieses Färbemittel liegt als Dimer vor und zeichnet sich durch eine hohe Affinität und Sensitivität gegenüber Nukleinsäuren aus. Da dieser Farbstoff seine Fluoreszenz nach DNA-Bindung um 100-1000 fach verstärkt, eignet er sich als konstanter Parameter zur Beurteilung der Spotmorphologie. Aussagen über eine homogene Verteilung der DNA in dem jeweiligen Spot bzw. über mögliche „dough-nut“, „moon“ oder „Kometen“-Formen können getroffen werden.

Nach initialer 10.000 facher Verdünnung der Farbstoffes TOTO®-3 iodide mit TE-Puffer, wurden die Slides mit 100 µl TOTO®-3 iodide für 3 Minuten inkubiert.

Sämtliche Vorgänge mussten im Dunkeln durchgeführt werden, um die Fluoreszenz des Farbstoffes zu gewährleisten. Waschschritte in TE-Puffer sowie ein Zentrifugationsschritt zum Trocknen der Slides (400 rpm für 5 Min.) folgten. Das getrocknete Slide wurde im rotwelligen Fluoreszenzbereich bei 635 nm eingescannt und als tif-File abgespeichert.

2.2 Präparation bronchoalveolärer Lavageproben und Hybridisierung

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. J. Behr, Leiter des Schwerpunktes Pneumologie, Medizinische Klinik und Poliklinik I im Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München wurde das Patientenkollektiv zusammengestellt und charakterisiert. Das Patientenkollektiv bestand aus drei Gruppen, wobei Gruppe I und II jeweils 10 Patienten und Gruppe III 12 Patienten beinhaltete. Gruppe I zeigte einen günstigen Verlauf nach mehr als 6 post-operativen Monaten nach Lungentransplantation, d. h. es lagen weder akute noch chronische Transplantatabstoßungen vor. Gruppe I diente auch als Vergleichsgruppe zu Gruppe II und III. Gruppe II umfasste Patienten, die eine akute Abstoßungsreaktion zeigten, Gruppe III beinhaltete Patienten mit einer chronischen Abstoßungsreaktion der transplantierten Lunge. Alle 32 Patienten waren serologisch in der PCR als auch morphologisch in der Immunhistochemie bzgl. eines CMV-Status negativ. Insgesamt wurden 94 bronchoalveoläre Lavageproben in das Kollektiv aufgenommen, da aber aufgrund der unten beschriebenen RNA Extraktion zu wenig Material für die lineare Amplifikation (2-5 µg in 10µl) bzw. für das CyDye-Labeling (15 µg in 22 µl) zur Verfügung stand, wurden zahlreiche Proben im Verlauf ausgeschlossen.

2.2.1 Patientenkollektiv

Das endgültige Patientenkollektiv wird tabellarisch dargelegt und erläutert.

ID	Alter/Geschlecht	Diagnose	Tx - Art	BAL/Biopsie: Monate nach LTX	ISHLT	BOS (Tage nach LTX)
	Bezug: 01.01.2005					
6	36 / weiblich	PPH	DLTX	17	A0 B1	/
9	56 / männlich	COPD	DLTX	13	A0 B1	/
17	41 / weiblich	Mukoviszidose	DLTX	2	A0 B1	/
18	51 / weiblich	IPF	SLTX re	3	A0 B0	/
23	54 / weiblich	A-1-ATM	SLTX re	5	A0 B0	/
24	65 / männlich	COPD	SLTX re	0	A0 B1	/
25	52 / männlich	Sarkoidose	DLTX	1	A0 B0	/
26	54 / weiblich	A-1-ATM	SLTX re	0	A0 B0	/
27	55 / männlich	PPH	DLTX	11	A0 B1	/
32	53 / männlich	PPH	DLTX	6	A0 B1	/
7	52 / weiblich	Sarkoidose	DLTX	0,33	A2 B1	/
8	48 / männlich	COPD	SLTX re	3	A2 B0	/
1	59 / weiblich	A-1-ATM	SLTX li	0,17	A2 Bx	/
2	64 / weiblich	exo.all.Alveo.	SLTX li	0,5	A2 B1	/
3	65 / weiblich	LAM	DLTX	0	A3 B1	/
4	60 / weiblich	COPD	SLTX li	0,67	A2 Bx	/
5	63 / männlich	exo.all.Alveo.	SLTX li	0,57	A2 B3	/
20	53 / weiblich	PPH	DLTX	3	A2 B1b	/
28	54 / weiblich	COPD	DLTX	9	A2 B1	/
30	42 / weiblich	PPH	DLTX	10	A2 B1	/
10	62 / weiblich	COPD	SLTX re	10	BOS 1	335
11	66 / männlich	IPF	SLTX li	39	BOS 3	966
12	66 / männlich	IPF	SLTX li	31	BOS 3	966
13	45 / weiblich	Mukoviszidose	DLTX	58	BOS 3	1682
14	59 / männlich	COPD	SLTX re	59	BOS 3	1312
15	48 / männlich	IPF	SLTX re	59	BOS 1	1838
16	65 / weiblich	COPD	SLTX re	75	BOS 3	2084
19	66 / männlich	IPF	SLTX li	32	BOS 3	966
21	65 / weiblich	COPD	SLTX re	82	BOS 3	2084
22	44 / männlich	Mukoviszidose	DLTX	115	BOS 3	955
29	36 / männlich	Mukoviszidose	DLTX	105	BOS 1	3190
31	61 / weiblich	A-1-ATM	SLTX re	55	BOS 2	1602

Tabelle 10a: Tabellarisch dargestellte Patientendaten, Teil I. Einteilung gemäß 3 Gruppen des definierten Patientenkollektivs. Gruppe I (keine Abstoßung, nach ISHLT A0), Gruppe II (akute Abstoßung, nach ISHLT > A2), Gruppe III (chronische Abstoßung, Bronchiolitis obliterans 1-3 gemäß ISHLT). Gruppe I (ID 6,9,17,18,23,24,25,26,27,32), Gruppe II (ID 7,8,1,2,3,4,5,20,28,30), Gruppe III (10,11,12,13,14,15,16,19,21,22,29,31).

ID	Mikrobiologie	Follow-up, Monate pLTX	Immunsuppression
		Bis 01.01.2005	
6	Unauffällig	59	Tacrolimus, Azathioprin, Steroid
9	Unauffällig	35	Tacrolimus, Mycophen., Steroid
17	PSAE	34	Tacrolimus, Azathioprin, Steroid
18	Unauffällig	22	Tacrolimus, Mycophen., Steroid
23	Unauffällig	10	Tacrolimus, Mycophen., Steroid
24	Unauffällig	1	Tacrolimus, Mycophen., Steroid
25	Unauffällig	9	Tacrolimus, Mycophen., Steroid
26	Unauffällig	10	Tacrolimus, Mycophen., Steroid
27	Unauffällig	13	Tacrolimus, Mycophen., Steroid
32	Unauffällig	36	Tacrolimus, Steroid
7	CO, CAAL	32	Tacrolimus, Mycophen., Steroid
8	STAU, ASFU	32	Tacrolimus, Mycophen., Steroid
1	Unauffällig	64	CyA, Sirolimus, Steroid
2	KNST	39 bis zum Tod durch respiratorische Insuffizienz	Tacrolimus, Mycophen., Steroid
3	KNST	53	CyA, Mycophen., Steroid
4	Unauffällig	53	CyA, Mycophen., Steroid
5	KNST, CAAL	36	Tacrolimus, Mycophen., Steroid
20	Unauffällig	36	Tacrolimus, Steroid
28	Unauffällig	20	Tacrolimus, Mycophen., Steroid
30	Unauffällig	8	Tacrolimus, Mycophen., Steroid
10	AS terreus	21 bis zum Tod, Ursache Unklar	Tacrolimus, Mycophen., Steroid
11	STRG, HINB	56 bis zum Tod durch BOS	Tacrolimus, Sirolimus, Steroid
12	STRG	56 bis zum Tod durch BOS	Tacrolimus, Sirolimus, Steroid
13	PSAE	89, anschließend Re-LTX	Tacrolimus, Mycophen., Steroid
14	PSAE, STRF	92	Tacrolimus, Sirolimus, Steroid
15	Unauffällig	85	Tacrolimus, Mycophen., Steroid
16	Unauffällig	95	Tacrolimus, Steroid
19	Unauffällig	56 bis zum Tod durch BOS	Tacrolimus, Sirolimus, Steroid
21	HINB,ASFU	95	Tacrolimus, Steroid
22	STAU, STRB, STRC, ESCO	128	CyA, Azathioprin, Steroid
29	Unauffällig	108	CyA, Azathioprin, Steroid
31	Unauffällig	72	CyA, Mycophen., Steroid

Tabelle 10b: Tabellarisch dargestellte Patientendaten, Teil II

Verwendete Abkürzungen: ASFU: Aspergillus fumigatus, AS terreus: Aspergillus terreus, CAAL: Candida albicans, CO: Corynebacterium, ESCO: Escherichia coli, HINB: Hämophilus influenzae Typ B, KNST: Koagulase negativer Staphylococcus, PSAE: Pseudomonas aeruginosa, STAU: Staphylococcus aureus, STRB: B-Streptococcus, STRC: C-Streptococcus, STRF: F-Streptococcus, STRG: G-Streptococcus.

Gruppe I (ID 6,9,17,18,23,24,25,26,27,32), Gruppe II (ID 7,8,1,2,3,4,5,20,28,30), Gruppe III (10,11,12,13,14,15,16,19,21,22,29,31).

Erläuterungen zu den tabellarisch dargestellten Patientendaten

Das Durchschnittsalter der 32 untersuchten Patienten lag im Mittel bei 55 Jahren. Die prozentuale Verteilung der Diagnosen ist in Abbildung 14 dargestellt.

Die 32 Lungentransplantationen bestanden aus 11 Einzellungentransplantationen der rechten Lunge (SLTX re, S=Single), 7 Einzellungentransplantationen der linken Lunge (SLTX li) sowie 14 Doppellungentransplantationen (DLTX, D=Double).

Die analysierten BAL-Proben wurden im Mittel 25,16 Monate nach Transplantation gewonnen. Die jeweils lavagierten Lungenareale sind nachstehend aufgezeigt.

Gemäß den morphologischen Diagnosen, nach der ISHLT eingeteilt, setzte sich die Gruppe I aus 4 Patienten mit A0B0 und 6 Patienten mit A0B1, die Gruppe II aus 1 Patienten mit A2BO, 4 Patienten mit A2B1, 1 Patienten mit A2B1b, 2 Patienten mit A2BX, 1 Patienten mit A2B3 und 1 Patienten mit A3B1, und die Gruppe III aus 3 Patienten mit BOS1, 1 Patienten mit BOS 2 und 8 Patienten mit BOS 3 zusammen.

Die zu den BAL-Proben korrespondierenden Biopsien wurden parallel in einer Untersuchung entnommen und können daher korreliert werden. Generell sei angemerkt, dass die BO entweder histologisch oder klinisch über einen sukzessiven Abfall der FEV1 definiert und diagnostiziert wird.

Alle Untersuchungen fanden retrospektiv statt. Die Transplantationen wurden zwischen April 1994 und November 2004 durchgeführt.

Im Durchschnitt manifestierte sich die BO 1498 Tage (ca.50 Monate, ca. 4,2 Jahre) nach Transplantation. In 13 von 32 Fällen lag eine positive Mikrobiologie vor.

Beim Follow-up bis zum 01.01.2005 nach Transplantation ereigneten sich 5 Todesfälle im zeitlichen Rahmen der Datenerhebung. Das längste Überleben nach Transplantation lag bis zum Stichtag der Datenaufarbeitung (01.01.2005) bei 128 Monaten (ca. 10,67 Jahren).

Die immunsuppressive Therapie setze sich aus einer Kombinationstherapie zusammen, wobei immer ein Kortikosteroid vertreten war. In dem nachfolgenden Diagramm sei auf die unterschiedlichen Kombinationstherapien verwiesen.

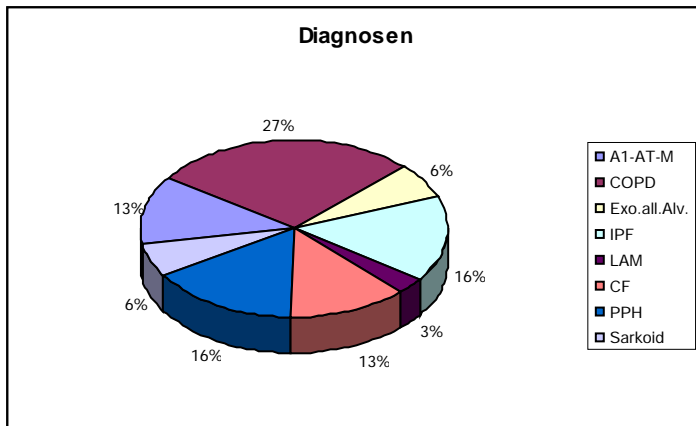


Abb. 4: Diagnosen und Indikationen zur Lungentransplantation (A1-AT-M: Alpha-1-Antitrypsinmangel, COPD: Chronisch obstruktive Lungenerkrankung, Exo.all. Alv: Exogen allergische Alveolitis, IPF: Interstitielle Lungenfibrose, LAM: Lymphangiomeleiomyomatose, CF: Cystische Fibrose, PPH: Primär pulmonaler Hypertonus, Sarkoid: Sarkoidose)

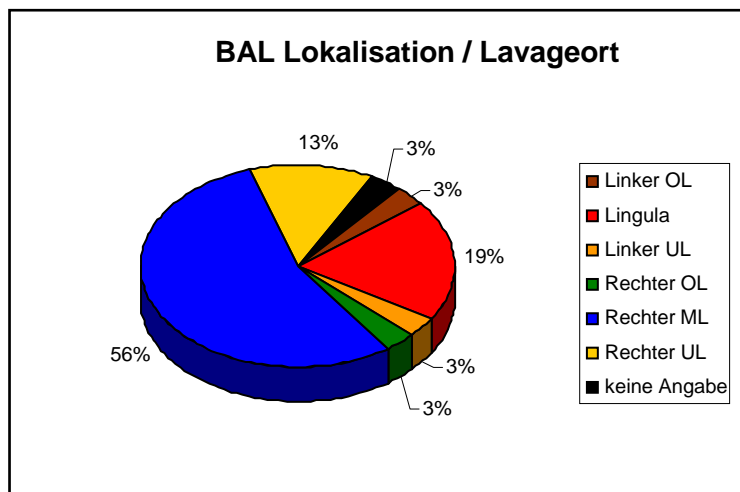


Abb. 5: Darstellung der lavagierten Lungenareale/Lavageort: OL: Oberlappen, ML: Mittellappen, UL: Unterlappen.

2.2.2 RNA-Extraktion

Das zu untersuchende Patientengut bestand aus bronchoalveolären Lavageproben (BAL-Proben), die bei lungentransplantierten Patienten im Klinikum Großhadern gewonnen wurden. Nachdem das bronchoalveoläre Kompartiment via Bronchoskopie lavagiert worden ist, wurde das abgesaugte Lavagevolumen quantifiziert, steril filtriert und zentrifugiert (1200 rpm, 10 min. 4° C). Die pelletierten Zellen wurden in 25-30 ml PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert (1200 rpm, 10 min. 4°C) und nach Verwerfen des Überstandes erneut in 2-3 ml PBS aufgenommen. Nach Quantifizierung der Zellzahl wurden die Zellen zentrifugiert (1200 rpm, 10 min. 4° C) und nach Eliminierung des Überstandes als Zellpellet bei -80° C gelagert, um

einer Degradierung der RNA oder einer Transkriptionsinduktion vorzubeugen. Dieses Vorgehen ist für quantitative Genexpressionsanalysen indiziert. Unter Verwendung des Qiagen RNeasy® MiniKit wurde aus den bronchoalveolären Lavagezellen mRNA nach Herstellerprotokoll extrahiert und gereinigt:

Nach Zellyse durch denaturierende Guanidin-Isothiocyanat enthaltende Puffer wurde eine Homogenisierung der hochmolekularen RNA angestrebt. Um die RNA zusätzlich zu scheren und die Viskosität des Lysats zu senken, wurde eine mechanische Aufbereitung via 0,45 x 25 mm Kanüle durchgeführt. Dies diente zusammen mit der Zugabe von Ethanol für optimale Bindungskonditionen der RNA an der RNeasy mini spin column mit Silica-Gel-Membran. An dieser Membran wurde RNA mit einer Länge von mehr als 200 Nukleotiden selektiv adsorbiert und angereichert. rRNA und tRNA wurden somit nicht gebunden. Nach gepufferten Waschschritten wurde die mRNA zweimal mit 50 µl RNase freiem Wasser eluiert.

Der anschließende DNase Verdau wurde mit 11,5 µl 10x Puffer und 3,5 µl DNase für 30 Min. bei 37° C und weitere 10 Min. bei 65° C mit 11,5 µl Stopp-Puffer durchgeführt. Nach Ethanolfällung wurde die RNA in 25 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

Eine Quantifizierung erfolgte photometrisch 1:7 verdünnt. Als Qualitätskontrolle wurde die errechnete A260/A280 ratio herangezogen, die für reine RNA zwischen 1,9 und 2,1 liegen soll.

2.2.3 Lineare Amplifikation

Da aus den BAL-Proben bei geringer Zellzahl quantitativ zu wenig intakte mRNA isoliert werden konnte, schloss sich eine lineare Amplifikation an, um die für das Labeling benötigte mRNA-Konzentration von 15 µg in 22 µl herzustellen. Gemäß Herstellerprotokoll des RiboAmp™ RNA Amplification Kits wurden 2 µg mRNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl eingesetzt. Dieser festgelegte Ausgangswert diente auch als Richtwert für die Vergleichbarkeit der verschiedenen BAL-Proben.

Zur Synthese des 1. Stranges der cDNA diente die mRNA als Matrize zur Primeranlagerung. Der produktspezifische Mastermix, Enzymmix und Nucleasemix wurde hinzugefügt, mittels reverser Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, wurde ein mRNA-cDNA Hybrid synthetisiert. Nicht eingebaute Nukleotide sowie Primer wurden durch die Nuclease verdaut. Nach Denaturierung des cDNA-Stranges wurde dieser in Form eines Einzelstranges mit

Zufallshexameren, sog. „random primers“, hybridisiert. Diese Zufallshexamere dienen als Primer für die DNA-Polymerase I, die den 2. Strang der cDNA synthetisiert. Eine RNase H baut die mRNA ab. Nach Reinigung der cDNA von mRNA mit kitspezifischer Adsorption erfolgte die Eluierung der cDNA. Diese cDNA wurde durch eine DNA abhängige RNA-Polymerase in aRNA (antisense-RNA) umgeschrieben und die DNA durch DNase verdaut. Durch kitspezifische Adsorption wurde die aRNA von der cDNA gereinigt und eluiert. Die eluierte aRNA wurde erneut photometrisch, 1:7 verdünnt, quantitativ erfasst.

2.2.4 Direkter Fluoreszenzeinbau

Das zu detektierende Target wurde durch den direkten Einbau von Fluoreszenzfarbstoffen farbstoffmarkiert bzw. gelabelt und damit für die spätere Detektion zugänglich gemacht. Für eine komparative Hybridisierung wurden die Test- und Referenzproben mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gelabelt, um ein verändertes Genexpressionsprofil im direkten Vergleich zwischen den Test- bzw. Referenzproben zu verifizieren.

Das zu testende Patientenmaterial wurde mit dem Fluorochromfarbstoff Cyanin 3, das Referenz- bzw. Normalgewebe mit Cyanin 5 markiert. Da Cyanin 3 (Cy 3) und Cyanin 5 (Cy 5) an dUTP gebunden sind, können diese Farbstoffmoleküle bei der Synthese der cDNA direkt eingebaut werden. Durch die Umschreibung der instabilen mRNA in stabile cDNA wurden die Voraussetzungen für die Hybridisierung geschaffen.

Cy 3 hat sein Emissionsspektrum im grünen Bereich bei 532 nm, Cy 5 dagegen im roten Farbbereich bei 635 nm. Als Referenzprobe wurde kommerzielle humane Lungen-RNA (Human Lung Total RNA, Ambion) verwendet. Die linear amplifizierten BAL-Proben sowie die Kontroll-Proben wurden auf eine Ausgangskonzentration von 15 µg in 22 µl eingestellt:

Durch die Zugabe von 2 µl random primers (5 µg/µl) und eine Inkubation bei 70° C (10 min.) vollzog sich das Primer-Annealing. Der Mastermix, bestehend aus 10 µl 5x buffer, 5 µl 0,1 M Dithiothreitol, 1 µl 25 mM d-(AGC)TP, 2 µl 1 mM d-TTP, 2 µl RNase-Inhibitor (30 units/µl) und 4 µl Reverse Transkriptase (Superscript II), wurde jeder aRNA-Probe zugeführt. Da der Fluoreszenzfarbstoff Cy 5 schlechter eingebaut wird als Cy 3, wurde die Referenzprobe mit Cy 5 markiert, da hier die Qualität der RNA standardisierter und besser vorlag als bei den Patientenproben. Der

Referenzprobe wurden 2 µl 1mM Cy 5 und der zu untersuchenden Patientenprobe 2 µl 1 mM Cy 3 der lichtinstabilen und an d-UTP gekoppelten Cyanin-haltigen Fluoreszenzfarbstoffe beigefügt. Die Labeling-Reaktion fand durch Inkubationen bei 27° C (10 min.) und 37° C (2 h) statt. mRNA wurde durch Einbau von dNTPs und fluoreszenzmarkierten d-UTPs in cDNA umgeschrieben. Nach Verdau der aRNA durch 1 µl RNase H (20 min. bei 37° C) wurde die synthetisierte fluoreszenzmarkierte cDNA durch eine Gelfiltration chromatographisch aufgetrennt, gereinigt und selektiv mit einer Länge von mehr als 250-300 Nukleotiden eluiert (Zentrifugation bei 3000 rpm für 2 min. mit MicroSpin/Sephadex G 50). Diese Qualitätssicherung verhinderte eine unspezifische Hybridisierungsreaktion durch RNA-Untergruppen.

Da eine genaue Kenntnis über den quantitativen Einbau (längen- und sequenzabhängig) der Fluorochromfarbstoffe nicht vorliegt und Cy 5 schlechter in die cDNA eingebaut wird als Cy 3, stellt die cDNA-Microarray-Technologie eine semiquantitative Methode dar.

Im Vorfeld wurde die Referenzprobe sowohl mit Cy 3 als auch mit Cy 5 markiert und komparativ hybridisiert. Dadurch wurden Informationen über das physiologische Expressionsmuster der Lunge sowie über mögliche Autoreaktionen bzw. Interaktionen der Cy-Farbstoffe gewonnen.

2.2.5 Komparative Hybridisierung

Die gelabelten Test- und Referenzproben wurden unter Vakuum trocken zentrifugiert. Die pelletierte fluoreszenzmarkierte cDNA wurde in Hybridisierungspuffer (50 % Formamid, 5x SSC und 0,1 % SDS) gemäß Protokoll „cDNA Microarray Hybridization“ (v2.1.2; Roswell Park Cancer Institute, <http://microarrays.roswellpark.org/code.html>) gelöst. Das Hybridisierungsvolumen von 40 µl setzte sich aus 36,8 µl 1x Hybridization Solution, 1,6 µl Cot-1-DNA (500 µg/500 µl) und 1,6 µl Poly(A)DNA zusammen. Ein 100 µl Ansatz Hybridization Solution besteht aus 50 µl Formamid, 25 µl 20x SSC (pH 8,0; sterilfiltriert), 1 µl 10 % SDS (pH 8,0; sterilfiltriert) und 24 µl Aqua dest. (pH 8,0).

Analog wurde jedes cDNA-Pellet mit 18,4 µl Hybridization Solution (auf 65°C temperiert) versetzt und bei 42° C gelöst. Die Referenzprobe wurde in die Test-/Patientenprobe überführt und mit 1,6 µl Cot-1-DNA und 1,6 µl Poly(A)DNA auf die oben angesprochenen 40 µl gebracht. Eine Denaturierung (95° C für 3 min.)

versicherte nochmals das Vorliegen von cDNA in Einzelstrangform. Nach Zentrifugation (14.000 rpm, 1 min.) wurde der Überstand auf den Array pipettiert und mit einem 25 x 50 mm Plexiglasdeckglas in die Hybridisierungskammer gelegt, die bei einer Temperatur von 42° C und unter konstanten rotierenden Mischbewegungen optimierte Hybridisierungsbedingungen gewährleistete. Die Dauer der Hybridisierung liegt zwischen 16 und 20 Stunden.

Nach einer Optimierung der Hybridisierungsbedingungen ist die Grundlage für eine spezifische Bindung der Target-cDNA in Form eines Einzelstranges mit der ebenfalls in Einzelstrang vorliegenden gespotteten cDNA geschaffen. Durch die ständige Mischung der Hybridization Solution wird jedes Arrayfeld mit beiden cDNA-Präparationen beschichtet und komparativ hybridisiert. Cot-I-DNA aus humaner Plazenta-DNA blockt repetitive Sequenzen der gelabelten cDNA, die mit einer gespotteten Probe unspezifisch hybridisieren und falsch positive Signale liefern könnten. Poly(A)DNA blockiert oligo dT-Sequenzen am 3' OH-Ende der cDNA. Da sich cDNA bei hohen Temperaturen vom Array ablösen und Bindungskapazitäten dem Target entziehen kann, wurde durch den Zusatz von Formamid eine Hybridisierungstemperatur von 42° C ermöglicht.

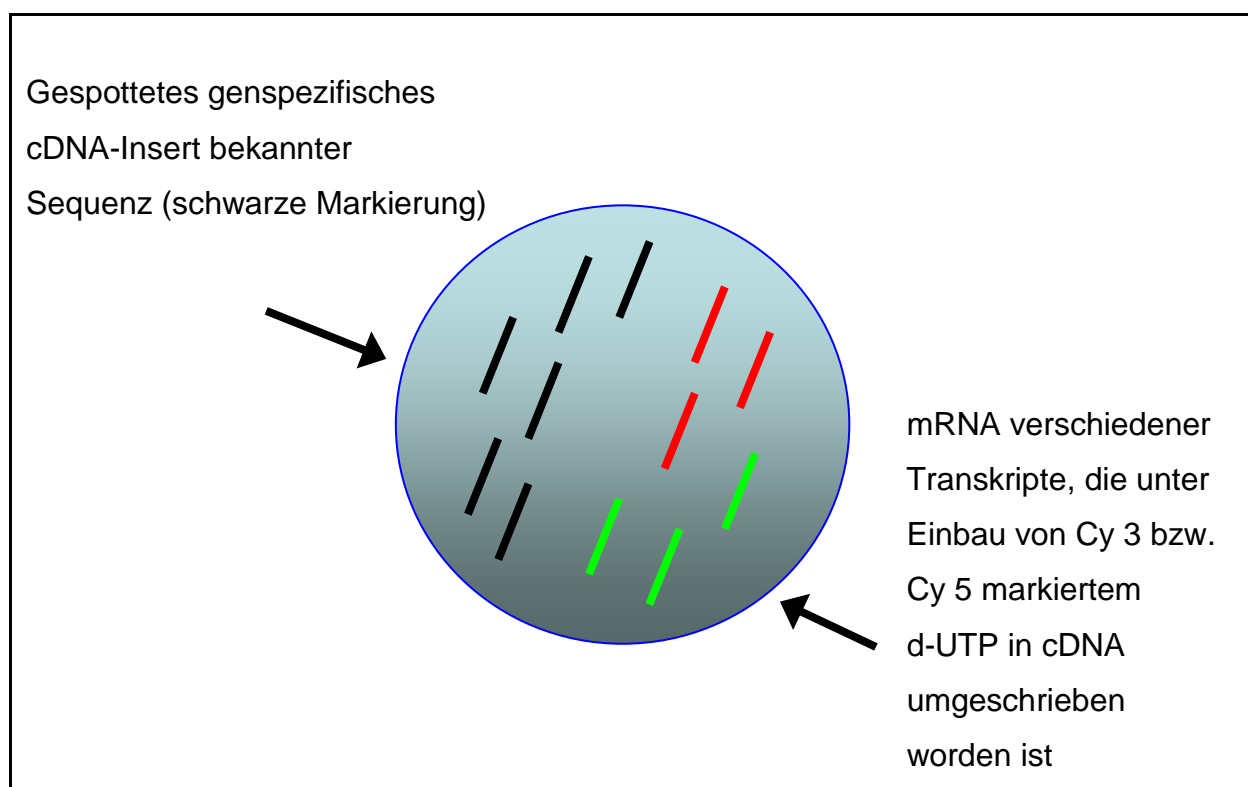


Abb. 6: Detailansicht der komparativen Hybridisierung auf einem fiktiv vergrößerten Spot mit Darstellung der gespotteten cDNA (schwarz) und der zugeführten gelabelten cDNA zur Reaktion.

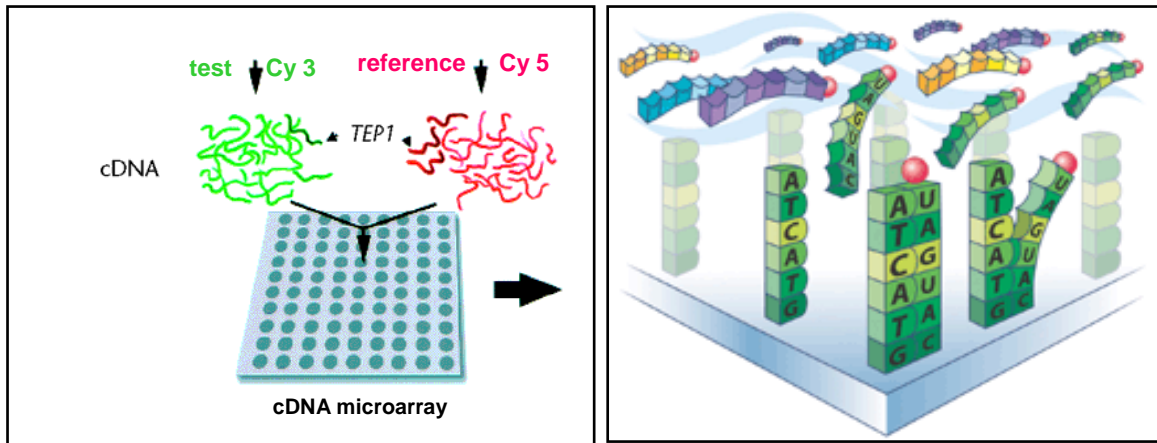


Abb. 7 (links): Komparative Hybridisierung nach Zuführung der Test- und Referenzprobe und konsekutiver in **Abb.8 (rechts)** erwähnter Reaktion durch komplementäre Basenpaarung (linkes Bildelement nach Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. Nat Genet, 21: 33-37, 1999; rechtes Bildelement nach <http://pubs.acs.org>).

2.2.6 Waschung des cDNA – Microarrays

Sämtliche Waschvorgänge erfolgten nach Entfernung des Deckglases im Dunkeln, damit die Signalintensität der Fluoreszenzfarbstoffe nicht abgeschwächt wurde. Angesetzte Waschpuffer wurden steril filtriert (pH 8,0). Nach zweimaliger Waschung im Schüttelwasserbad (1x SSC und 0,2 % SDS; je 4 min. bei 42° C) folgten 6 Waschvorgänge auf dem Horizontalschüttler (zweimalig mit 0,1x SSC und 0,2 % SDS; je 4 min., weitere zweimal mit 0,1x SSC; je 4 min. und erneute zweimal mit 0,01x SSC; je 2 min.). Die Slides wurden durch Zentrifugation getrocknet (600 rpm 5 min.).

Getrocknete Slides wurden unmittelbar eingescannt, da besonders der Fluoreszenzfarbstoff Cy 5 seine Intensität verlieren würde. Durch einen effizienten Waschvorgang wird nicht hybridisiertes Probenmaterial, Puffer, Salze und Proteine entfernt. SDS entfernt Proteine, muss aber selbst wegen Autofluoreszenz eliminiert werden. Inadäquates Waschen kann dazu führen, dass bereits gelöste cDNA erneut bindet und „comet tails“ erzeugt.

2.3 Statistische Auswertung

Das komparativ hybridisierte Glassslide wird durch einen kalibrierten GenePix® 4000 B Microarray Scanner eingelesen. Dieser Microarray Scanner oder Microarray Reader ist ein konfokaler Laserscanner, der auf die Absorptions- und Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe konfiguriert ist. Nach Absorption definierter Wellenlängen können die Emissionsspektren von Cy 3 (532 nm) und Cy 5

(635 nm) durch getrennte Kanäle und den Einsatz von Filtern selektiv detektiert werden. Die Lichtemission des jeweiligen Farbstoffes wird über ein Photomultiplier in elektrische Signale umgewandelt und computergestützt analysiert. Bei der Erzeugung eines „Images“ kommt es zu einer Darstellung, in der beide Farbstoffintensitäten miteinander verrechnet und überlagert dargestellt sind.

Vier verschiedene Grunderscheinungen (rot, grün, gelb, schwarz) werden beobachtet. Rot fluoreszierende Arrayfelder bedeuten zunächst eine vermehrte Expression auf der Seite der Referenzprobe, das im Umkehrschluss einer relativen Unterexpression in der Patientenprobe entspricht. In einem grün fluoreszierenden Spot bindet vermehrt cDNA der Patientenprobe und spricht folglich für eine vermehrte Expression im Vergleich zur Referenzprobe, d. h. eine relative Überexpression des entsprechenden Gens.

Diese Muster kamen durch die Überlegung zustande, das schlechter einzubauende Cy 5 (rot) mit der Referenzprobe zu koppeln. Da aber die konventionelle Definition die Farbe rot für eine Überexpression vorsieht, wurde mit Hilfe des Softwareprogramms Acuity ein sogenannter Dye-swap bzw. Farbentausch durchgeführt. Sollte cDNA der Referenzprobe in gleichem Umfang wie die cDNA der Patientenprobe gebunden haben, erscheint die Mischfarbe gelb. Sämtliche Farben und Farbübergänge sind fließend und zeigen Mischformen. Bei schwarzen Spots wird das Gen nicht exprimiert.

Diese Signalintensitäten in einem Spot sind abhängig von der Menge an gebundenen Targetnukleotiden an den jeweiligen cDNAs.

Nach Justierung des einzulesenden Slides wird mit dem Softwareprogramm GenePix® Pro 6.0 zunächst ein Preview-Scan durchgeführt, der als Orientierung für die Anpassung des GAL-Files dient. Der GAL-File ist ein vom Microarray-Spotter erzeugtes Gitternetz (der sogenannte „Grid“), das genau über die Spots gelegt wird und durch vorherige Programmierung eine präzise Zuordnung der Spots zu den Gendaten gewährleistet. Der GAL-File ist auf das Design des Arrays genau angepasst und erfasst jeden Spot in jedem Block bzw. Array.

Mit angepasstem Grid werden die PMT-Gains über die Hardware-Settings automatisch festgelegt. Die PMTs sind die Photomultiplier-Einstellungen, die eine exakte Wellenlänge im rot- und grünwelligen Bereich berechnen, damit die Fluoreszenzfarbstoffe aufeinander abgestimmt werden. Der bekannte schlechtere

Einbau von Cy 5 wird durch eine Optimierung der beiden Wellenlängen ausgeglichen, so dass die rote und grüne Signalstärke bei einer definierten Laserenergie die gleiche Signalintensität zeigt. Dies entspricht in etwa einer Eichung der beiden Farbkanäle und hat keinen Einfluss durch die Bindung von Referenz- und Patientenprobe. Nach Anpassung einer gewünschten Scan-Area wird der endgültige Data-Scan mit den ermittelten PMTs durchgeführt und das Slide image als multi-image Tif-File abgespeichert.

Als erster Schritt der Analyse des eingescannten Slides ist erneut das Adressing oder Gridding, d. h. die genaue Zuordnung der Gennamen zu den jeweiligen Spots mit Hilfe des oben angesprochenen GAL-Files, notwendig. Nach manueller Anpassung des GAL-Files erfolgt ein Erkennungs- und Analysierungsprozess der GenePix-Software.

Jeder einzelne Spot wird durch eine Maske, den Circular Feature Indicator zunächst erkannt. Der Feature Indicator kann seine Größe verändern und sich somit genau an den jeweiligen Spot anpassen. Das sog. „Alignment“ erlaubt das Verändern des Feature Durchmessers auf einen minimalen Durchmesser von 25 % und einen maximalen Durchmesser von 400 % des zuvor eingestellten und zu erwartenden Feature Durchmessers. Eine automatische Erkennung eines Features setzt mindestens 10 Pixel voraus, ansonsten erfolgt eine Markierung mit „Absent feature“.

Wenn jeder Spot durch den GAL-File mit Gennamen und exakter Position auf dem Slide charakterisiert ist, kann das Slide bzgl. der Spot- und Hintergrundintensitäten analysiert werden. Dabei werden die Pixelintensitäten innerhalb eines sog. Feature indicators bzw. einer Spotmaske zusammen addiert und als Gesamtintensität für jeden Farbstoff dargestellt. Für eine spezifische Untersuchung muss der Hintergrund eliminiert werden. Hierzu wird der Median des lokalen Feature Backgrounds gebildet, und unter Ausschluss von 2 Pixeln um den jeweiligen Spot sowie eines Einzugsbereiches von einer Spannweite von 3 Feature Durchmessern der Background ermittelt und von den spezifischen Pixeln subtrahiert.

Nach Abzug der Hintergrundintensität, einer Intensität, die nicht von der gebundenen cDNA stammt, werden die Signalintensitäten der exprimierten Gene analysiert.

Hintergrundintensitäten entstehen durch unspezifische Hybridisierung, Eigenfluoreszenz des beschichteten Glasslides oder Chemikalien und müssen von der Analyse abgegrenzt werden.

Unter Spotintensität versteht man folglich eine Addition der Pixelintensitäten, die um die Hintergrundintensität reduziert worden ist.

Mit Hilfe des Histogramms können die beiden Fluoreszenzfarbstoffe in Hinblick auf unterschiedliche Eigenschaften beim Einbau zur Synthese der cDNA beurteilt werden.

Durch die GenePix Software wurde eine Analyse der Signalintensitäten ermittelt. Unter Verwendung des „two-color modes“ wurde eine „ratio formulation“ von 635/532 gemäß den oben erwähnten Wellenlängen gewählt. Dieser Wert beinhaltet die Signalintensitäten beider Farbstoffe und trifft Aussagen über eine Überexpression bzw. Unterexpression der Patientenprobe.

Um systemische Variationen, wie den unterschiedlich effizienten Fluoreszenzeinbau oder versuchsbedingte Differenzen auszugleichen, werden die Daten normalisiert. Diese Normalisierung bezieht sich auf einen internen Standard, passt die Intensitätswerte an und macht die Daten somit vergleichbar bei gleichzeitiger Elimination systemischer Fehler. Unter Verwendung der Medianwerte wurde die „ratio of medians“ (Verhältnis der Mediane) der Normalisierungsgene gleich „1“ gesetzt. Die errechneten Normalisierungsfaktoren modifizierten die analysierten Daten. Die Normalisierung wurde über die Housekeeping-Gene errechnet, die durch folgende etablierte Kriterien ausgewählt wurden:

$$(Rgn\ R2\ (635/532)) > 0,4\ AND\ (SNR\ 635) > 0\ AND\ (SNR\ 532) > 0\ AND\ (F\ 635\ \% \text{ Sat.}) < 10\ AND\ (F\ 532\ \% \text{ Sat.}) < 10$$

Rgn R2 entspricht der Regression Square Ratio und stellt ein Korrelationsmaß zwischen den beiden Wellenlängen dar. SNR bedeutet Signal to Noise Ratio und schließt Spots mit zu hoher Hintergrundintensität aus. F % Sat. bezieht sich auf gesättigte Pixel im Spot, die bei festgelegter Prozentzahl zum Ausschluss des Spots führen.

Insgesamt sind 56 Spots auf dem Microarray, die Housekeeping-Gene vertreten.

Um aussagekräftige und valide Spots für die Genexpression herauszufiltern, wurden folgende Qualitätskriterien angewendet:

Es erfolgte ein Ausschluss folgender Spots, versehen mit der sog. „BAD FLAG“, falls folgendes zutraf:

$(\text{SNR } 635) < 0 \text{ AND } (\text{SNR } 532) < 0 \text{ OR } (\text{F } 635 \% \text{ Sat.}) > 10 \text{ OR } (\text{F } 532 \% \text{ Sat.}) > 10$



Abb. 9: Microarray-Ausschnitt mit GAL-File: Erkennung der Spots des cDNA-Microarrays mit Hilfe des GAL-Files durch spotspezifische Anpassung und maßgerechte Analyse.

Nach erfolgter Erkennung, Analyse, Normalisierung und Qualitätsfilterung wurden die akquirierten Daten in das Softwareprogramm Acuity® 4.0 transferiert. Nach Importierung der Daten in das Softwareprogramm Acuity wurden die Daten erneut gefiltert:

$\text{SNR } 532 > 0 \text{ OR } \text{SNR } 635 > 0$

$\text{F } 635 \% \text{ Sat.} < 10 \text{ AND } \text{F } 532 \% \text{ Sat.} < 10 \text{ AND } \text{Flags} \geq 0$

Die Einschlusskriterien sind hier reziprok, da keine Ausschluss-, sondern Einschlusskriterien vorliegen. Flags sind Markierungen der Spots, die bei negativem Wert bzw. nicht erfüllten Qualitätskriterien ausgeschlossen werden.

Für die Analyse mittels Acuity ist es notwendig, sog. „Datasets“ zu kreieren, die als Funktionseinheit fungieren. Unter Verwendung des Dye-Swap, wurde die allseits gängige Zuteilung der Farbstoffe erreicht:

Zusammenfassende Darstellung:

Cy5 (635 nm) => rote Fluoreszenz (Referenzprobe)

Cy3 (532 nm) => grüne Fluoreszenz (Patientenprobe)

Überexpression:

GenePix: 635 / 532 ↑ => < 1

Log ... => < 0 bedeutet Überexpression der Probe: -1

Acuity: Dye-swap: aus Grün -1 wird Rot +1

=> **Überexpression: Rot + 1**

Unterexpression:

GenePix: 635 ↑ / 532 => > 1

Log ... => > 0 bedeutet Unterexpression der Probe: +1

Acuity: Dye-swap: aus Rot +1 wird Grün -1

=> **Unterexpression: Grün -1**

Abb. 10: Darstellung der Expressionsfarben für Über- bzw. Unterexpression:

Erläuterung: Die von der GenePix Software ermittelten Signalintensitäten der Wellenlängen 635 nm und 532 nm werden dividiert; bei einem höheren Wert bei 532 nm, resultiert ein Ergebnis < 1. Logarithmiert liegen die Werte im negativen Bereich (-1 = grün), der Dye-swap führt zur konventionellen Zuordnung von positiven Werten (+1 = rot) bei Überexpression eines Gens. Analoges Vorgehen wird bei der Unterexpression angewendet.

Nach gruppenspezifischer Sortierung und Entfernung von Housekeeping-Genen, Negativ- und Positivkontrollen wurden die Ergebnisse tabellarisch und graphisch nach Gruppen differenziert dargestellt. Insbesondere durch die Erstellung sog. Profiles konnten unterschiedliche Genexpression in den verschiedenen Gruppen des Patientenkollektivs graphisch beurteilt werden. Da drei unabhängige Patientengruppen vorhanden waren, wurde der T-Test ähnliche One-way ANOVA for

Multiple Groups Scores zusätzlich angewendet, um die Genexpressionen auf Signifikanz zu überprüfen.

2.4 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Untersuchungen stellen ein Validierungsinstrument für einen Teil der Ergebnisse des Microarrays dar.

Die nach Lungentransplantation gewonnenen Biopsien wurden in 4% gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Es wurden 2-3 µm dicke Schnitte gefertigt, die auf Objektträger aufgezogen wurden.

Es erfolgte eine Entparaffinierung in Xylol (30 min.) sowie eine anschließende absteigende Ethanolreihe (100%, 96% und 70% EtOH absolut) mit Aqua dest.

Die folgende Mikrowellenbehandlung (750 Watt, Inkubationszeit 30 min.) diente der Demaskierung der zu detektierenden Antigene. Verdampfte Pufferflüssigkeit (abhängig vom Antikörper, z. B. TRS 6) wurde in die mit Objektträgern beladenen Plastikküvetten aufgefüllt. Eine Nachinkubation (20 min.) erfolgte bei Raumtemperatur.

Zur Blockierung endogener Peroxidasen diente 7,5 %iges H₂O₂ (Inkubationszeit 10 min.) mit nachfolgender Spülung unter fließendem Leitungswasser (10 min.). Durch eine weitere Spülung mit Tris-Puffer (10 min.) wurde der pH auf ein Arbeitsoptimum für den Antikörper eingestellt.

Die Primär-Antikörper wurden zuvor, nach Etablierung der Methodik, mit Dako-Medium (Dako Antibody Diluent with Background Reducing Component) verdünnt und auf die entsprechenden Konzentrationen eingestellt, in 10 µl aliquotiert und bei -20° C gelagert. Ebenso wurden die im Folgenden verwendeten Reagenzien gemäß Herstellerprotokoll bereitgestellt (Vectastain® Universal Elite ABC Kit, Vector Laboratories).

Durch Zugabe von 100 µl eines kitspezifischen Serums (20 min.) wurden unspezifische Bindungen des Brückenantikörpers verhindert. Da das Serum sowie der Brückenantikörper vom gleichen Spenderorganismus bzw. von der gleichen Spezies stammen, agieren sie nicht untereinander, sondern sorgen für eine spezifische Bindung des Brückenantikörpers. Das Serum fungiert dabei als Serumblocker.

Anschließend wurde das zu untersuchende Lungengewebe mit 100 µl des Primärantikörpers in entsprechender Verdünnung inkubiert (1 h bei RT). Dieser

Primärantikörper ist mono- bzw. polyklonal und sorgt für eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion. Nach Spülung in Tris-Brij Puffer (10 min.) wurde der biotinylierte Brückenantikörper (Multilink) zugesetzt (100 µl, 30 min. bei RT). Dieser so genannte Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper.

Nach analoger Spülung in Tris-Brij Puffer (10 min.) folgte eine Inkubation mit 100 µl des Meerrettich-Peroxidase konjugierten Avidin-Biotin-Komplexes für weitere 30 min. bei RT. Dieser Avidin-Biotin-Enzym-Komplex agiert mit dem Sekundärantikörper über eine Biotinbindestelle. Nach erneuter Spülung mit Tris-Brij Puffer (10 min.) wurden 100 µl des Chromogen-Farbstoffes AEC, der analog zum Komplex die Meerrettichperoxidase als wechselwirkende Komponente enthält, additiv zugefügt.

Das 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) sorgt somit für die farbliche Detektion des Antigens und wurde für 10 min. bei RT dem Lungengewebe ausgesetzt, bevor dieses unter fließendem Leitungswasser gespült worden ist (10 min.).

In der anschließenden Hämalaun-Gegenfärbung (15-30 sec.) erfolgte eine Kernfärbung, der ebenso eine Spülung unter fließendem Leitungswasser (10 min.) folgte. Abschließend wurde das Lungengewebe mit wasserlöslichem Eindeckmedium und Kaisers Glycerin Gelatine versetzt.

Bei sämtlichen immunhistochemischen Färbungen wurden Negativkontrollen (Ersetzen des jeweiligen Primärantikörpers durch entsprechende Isotyp-Immunglobuline und Ersetzen des Primärantikörpers durch Antikörperverdünnungsmedium) zur Sicherung spezifischer Färbungen verwendet. Nur bei auszuschließenden unspezifischen Färbereaktionen erfolgte der Einschluss einer immunhistochemischen Färbeserie.

Eine mikroskopische Auswertung erfolgte sowohl quantitativ als auch teils semiquantitativ unter zu Hilfenahme eines Lichtmikroskops.

Dabei wurden bei einer 400-fachen Vergrößerung (High Power Field, HPF) 10 Gesichtsfelder ausgezählt. Dies entspricht einer Fläche von 0,196 mm² pro HPF.

Die Quantifizierung erfolgte an jeder untersuchten Biopsie und wurde statistisch unter Verwendung des Programms SPSS mit Mittelwert, Median, Standardabweichung, Minimum, und Maximum verifiziert.

Antikörper	Firma	Protein-Konzentration	Verdünnung Primär-AK	Vorbehandlung	Inkubations-Zeit	System / Methode
TIMP-1	Abcam/Acris	1 mg / ml	1 : 100	30' MW Protags IV	60' bei RT	ABC-Elite
PDGFBB	Abcam	0,2 mg / ml	1 : 100	30' MW Protags II	60' bei RT	ABC-Elite
iNOS	Transductions-Laboratories	keine Angabe	1 : 80	30' MW Protags IV	60' bei RT	ABC-Elite
eNOS	Transductions-Laboratories	keine Angabe	1 : 1000	30' MW TRS 6 (Dako)	60' bei RT	ABC-Elite
SDF	R+ D Systems	Keine Angabe	1 : 50	30' Glykol (Biologo)	60' bei RT	ABC-Elite
MMP-1	Calbiochem	Keine Angabe	1:150	30' MW TRS 6 (Dako)	60' bei RT	ABC-Elite
MMP-9	Linaris	Keine Angabe	1:200	30' MW TRS 6 (Dako)	60' bei RT	ABC-Elite
Fibronectin-1	Abcam	1 mg / ml	1 : 100	30' MW Protags IV	60' bei RT	ABC-Elite

Tabelle 11: Verwendete Antikörper: Charakterisierung der Antikörper nach erfolgter Etablierung.

2.5 Real-Time-QRT-PCR

Neben den immunhistochemischen Untersuchungen wird ein weiterer Teil der Ergebnisse des Microarrays mittels Real-time-QRT-PCR untersucht und validiert.

Gennamen		
CD-24	LTB	Hox-B5
IL-18	Hox-A2	Hox-C4
Sele	Hox-A4	Hox-C10
IL-12A	Hox-B3	

Tabelle 12: Auswahl der zu untersuchenden Gene via RT-PCR.

Die Real-Time-QRT-PCR ist eine Methode zur Quantifizierung einer DNA-Konzentration in der exponentiellen Phase der PCR. Dabei wird die Amplifikations-abhängige Fluoreszenz bei jedem PCR Zyklus detektiert. Der Zyklus, während dessen die Fluoreszenz die Backgroundaktivität 10-fach überschreitet, wird als „threshold cycle“ (Ct) definiert. Ct ist abhängig von der eingesetzten cDNA-Konzentration. Ab hier beginnt die Quantifizierung.

SYBR-Green fluoresziert exponentiell steigend bei Bindung an doppelsträngige DNA und produziert dadurch eine amplifikations-abhängige Fluoreszenz.

Zur Etablierung einer Real-Time-QRT-PCR wird initial eine reverse Transkription der RNA durchgeführt, die gewonnene cDNA wird als Template für die real-time PCR mit genspezifischen Primern verwendet (Wang et al, 2003).

Primär wird die absolute Quantifizierung von der relativen Quantifizierung differenziert.

Absolute Quantifizierung mittels Standardkurve und einer bekannten Ausgangskonzentration des zu untersuchenden Genes zeichnet sich durch eine aufwendigere, aber auch sensitivere Methode aus. Die alternative relative Quantifizierung ist semiquantitativ, stellt durch Kontrollgene bekannter Expression einen Bezug zum zu untersuchenden Gen mittels Ct-Unterschied dar und erfordert eine Normalisierung.

Im Folgenden wurde die absolute Quantifizierung gewählt, um die Gruppen des Patientenkollektivs vergleichen zu können.

2.5.1 RNA-Umschreibung der BAL-Proben in cDNA

PCR-Profil		20 µl Ansatz		
5 min.	25° C		5 x iScript Reaction Mix	4 µl
30 min.	42° C		iScript Reverse Transcriptase	1 µl
5 min.	85° C		Nuclease-freies H ₂ O	13 µl
			RNA	2 µl

Tabelle 13: Reverse Transcriptase/Umschreibung der RNA in cDNA: PCR-Profil bei 20 µl-Ansatz mit Angabe der Bestandteile des PCR-Ansatzes.

2.5.2 Erstellen einer Standardreihe

Als Quelle für die Standardreihe dienten cDNA-Fragmente/Kloninserts, die auch die Ausgangslage der zu spottenden cDNA bildeten. Durch Auswahl spezifischer Primer, die an der Zielsequenz der cDNA-Fragmente ansetzen, wurde eine PCR etabliert. Nach Validierung via Gelelektrophorese erfolgte eine Aufreinigung der PCR-Produkte über eine Nucleospin, eine Silica-Membran Technologie gemäß Herstellerprotokoll. Nach photometrischer Quantifizierung wurde unter Berechnung der Kopienzahl eine Standardreihe erstellt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe einer spezifischen DNA in 10 Schritten, von 10^{10} bis 10^1 Kopien/µl aufgestellt und durch Gelelektrophorese erneut kontrolliert.

PCR-Profil:				50 µl Ansatz		
2 min	96° C					
				Aqua dest.		22 µl
25 sec	94° C			Accu Prime Super Mix II		25 µl
25 sec	62° C	35 Zyklen		M13 forw. RZPD		0,5 µl
1:30 min	72° C			M13 rev. RZPD		0,5 µl
				cDNA		2 µl
5 min	72° C					

Tabelle 14: PCR-Profil: 50 µl-Ansatz mit Angabe der Bestandteile des PCR-Ansatzes; PCR-Profil mit Zeit- und Temperatureinstellungen bei 35 Zyklen.

2.5.3 Primer

Spezifische Primersequenzen wurden über folgende öffentliche Datenbanken für Primersequenzen bezogen:

Datenbank	Internetadresse
RTPrimerDB, Real Time PCR Primer and Probe Database	http://medgen.ugent.be/rtprimerdb/
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/
Primerbank	http://pga.mgh.harvard.edu/cgi-bin/primerbank/
PrimerViewer	http://lpgws.nci.nih.gov/cgi-bin/PrimerViewer

Tabelle 15: Öffentliche Datenbanken für Primersequenzen: Hinterlegung der Internetadresse.

Eine Überprüfung, ob die ausgewählte Primersequenz spezifisch ist, erfolgte erneut via Genomdatenbank (NCBI BLAST 2 Sequences engine; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Die Primer wurden über metabion international AG, Martinsried in einer Konzentration von 100 µg bezogen.

Genname	Primersequenz	Amplifikatlänge	Detektion
IL-18 forward	5'GCT-TGA-ATC-TAA-ATT-ATC-AGT-C3'	ca.300 bp	SYBR Green
IL-18 reverse	5'GAA-DAT-TCA-AAT-TGC-CAT-CTT-AT3'		
LTB forw.	5'TCC-TAC-ATT-TTT-CCC-ACT-GC3'	157 bp	SYBR Green
LTB rev.	5'CAA-CAT-CAG-TCA-CCC-CGA-TA3'		
SELE forw.	5'GGT-TTG-GTG-AGG-TGT-GCT-C3'	193 bp	SYBR Green
SELE rev.	5'TGA-TCT-TTC-CCG-GAA-CTG-C3'		
CD 24 forw.	5'GCC-AGT-CTC-TTC-GTG-GTC-TC3'	142 bp	SYBR Green
CD 24 rev.	5'CCT-GTT-TTT-CCT-TGC-CAC-AT3'		
IL-12A forw.	5'GAG-GCC-TGT-TTA-CCA-TTG-GA3'	130 bp	SYBR Green
IL-12A rev.	5'TAC-TAA-GGC-ACA-GGG-CCA-TC3'		
Hox-C10 forw.	5'TGT-GTC-AAG-CCC-TCA-CTC-AC3'	151 bp	SYBR Green
Hox-C10 rev.	5'AAC-GAT-TCT-GCC-TGT-GCT-CT3'		
Hox-B3 forw.	5'CCG-TGT-AGA-GAT-GGC-CAA-CC3'	106 bp	SYBR Green
Hox-B3 rev.	5'CAA-TCC-CTT-GGC-CTT-CTG-G3'		
Hox-A2 forw.	5'GTA-AAA-GCC-TTG-AGG-ACT-CCG3'	115 bp	SYBR Green
Hox-A2 rev.	5TGA-AAA-GTG-TAG-CCT-TCC-CTC-T3'		
Hox-B5 forw.	5'CTG-CCT-CGC-CTT-GTG-TTA-C3'	191 bp	SYBR Green
Hox-B5 rev.	5'CCC-CAC-AGA-CAC-AAA-ACA-TTC3'		
Hox-A4 forw.	5'GGA-GAG-GGG-AGT-GCA-TTT-AG3'		
Hox-A4 rev.	5'TCC-AAG-TGA-ATC-CAG-CTC-AA3'	221 bp	SYBR Green
Hox-C4 forw.	5'CGC-TAC-CTG-ACC-CGA-AGG-A3'	138 bp	SYBR Green
Hox-C4 rev.	5'TGA-CCT-GAC-TTT-GGT-GTT-GGG3'		

Tabelle 16: Genspezifische Primersequenzen: Darstellung des Gennamens, Primersequenz, Amplifikatlänge und Detektionsmethode.

2.5.4 Real-Time-QRT-PCR Protokoll für cDNA (Patientenprobe) sowie Standards

Für eine absolute Quantifizierung via Standardkurve, wurden jeweils drei Replikate von mindestens 4 unterschiedlichen Verdünnungen der Standard-Verdünnungsreihe (10E10 bis 10E1) unter Verwendung von identischen Primerkonzentrationen (100 µM) über das iCycler iQ System etabliert. Die in cDNA umgeschriebene Patientenprobe wurde im Duplikat angesetzt, ferner NTC (No Template Control) als Negativkontrolle und als interne Kontrolle, Human Lung Total RNA verwendet. Verwendete spezifische Primer unter 2.5.3.

25 µl Ansatz für die Real-Time-QRT-PCR für Standard bzw. Patientenprobe:

Bestandteile des RT-PCR-Ansatzes	25 µl-Ansatz
iQ Sybr Green Supermix (mit iTaq™DNA Polymerase, dNTPs)	12,5 µl
Primer 1 (forward)	1 µl
Primer 2 (reverse)	1 µl
Aqua dest.	9,5 µl
Template/cDNA oder Standard	1 µl

Tabelle 17: RT-PCR (Standard-/Patientenprobe): 25 µl-Ansatz mit Angabe der Bestandteile.

Wenn die Fluoreszenz der eingelagerten Reporter-Moleküle die „background“-Fluoreszenz übersteigt, wird der „threshold cycle“ (Ct) überschritten. Es besteht eine lineare Beziehung zwischen der logarithmierten anfänglich eingesetzten Template-Konzentration und dem dazu gehörigen Ct-Wert. Durch die geplottete Gegenüberstellung der logarithmierten „starting amount“/ Kopienzahl des Templates und dem Ct-Wert wird die Standardkurve konstruiert.

Im Verlauf kann die „starting amount“ (Kopienzahl) jedes Templates mit unklarer Konzentration über den jeweils zugehörigen Ct-Wert bestimmt werden. Der Ct-Wert wird automatisch berechnet.

Um Threshold Cycles, Standardkurven and Konzentrationen der unbekanntes Samples errechnen zu können, wird von den Rohdaten der Hintergrund (Eigenfluoreszenz der Fluorophore) sowie die „Baseline“ (Ausschluss von baseline cycles, bei denen die Fluoreszenzintensität noch nicht exponentiell ansteigt) automatisch subtrahiert.

Nach folgendem editiertem RT-PCR-Profil erfolgte die Durchführung unter den angegebenen Zeit- und Temperaturintervallen.

Editiertes Programm für Sybr® Green						
Cycle	Repeats	Step	Ramp	Dwell	Setpoint	
1	1	1	Max.	10:00	95°C	
2	40	1	Max.	00:10	95°C	
		2	Max.	00:15	60°C	
		3	Max.	00:25	72°C	
3	1	1	Max.	01:00	95°C	
4	1	1	Max.	01:00	58°C	
5	80	1	Max.	00:10	58°C	Melt Temp.Curve + 0,5

Tabelle 18: Programmierung des iCycler IQ Multicolor Real-Time Detection System (Biorad, München): Editiertes Programm für Sybr® Green.

2.5.5 Schmelzkurve

Bei entsprechender Schmelztemperatur eines PCR Produktes zeigt sich im Idealfall ein solitärer, relativ monomorpher Peak, der spezifisch amplifizierte cDNA repräsentiert. Am Schmelzpunkt sinkt die Fluoreszenz deutlich, da durch den Schmelzprozess SYBR Green nicht mehr in gebundener Form vorliegt. Die Schmelztemperatur ist abhängig von Sequenzlänge und G/C-Gehalt.

Nicht spezifische Produkte wie Primer-Dimere, eine Interaktion der Primer untereinander bei fälschlicherweise erfolgter Amplifikation der Primer, sind meist bei einer niedrigeren Schmelztemperatur als das spezifische Produkt zu finden, da die Primerlänge kürzer ist. Um Primer-Dimere zu vermeiden, werden möglichst niedrige Primerkonzentrationen verwendet.

Die „No template control“ dient als Kontrolle zur etwaigen Aufdeckung von nicht spezifischen PCR-Produkten. Somit können Aussagen über die Wahl von spezifischen Primern getroffen werden. Eine gelelektrophoretische Kontrolle schloss sich zudem an.

2.6 Material

2.6.1 Geräte und Instrumente

Brutschrank: Kelvitron t, Heraeus Instruments, Hanau

HL-2000 Hybri Linker, UVP Laboratory Products, Upland, CA, USA

Färbegestelle für Objektträger, 192131700, F.Schultheiss, München

GenePix® 4000 B Microarray Scanner, mit Verwendung der Software GenePix® Pro 6.0 und Acuity® 4.0, Axon Instruments Inc. c/o Biozym Scientific GmbH, Hess.

Oldendorf Glaszylinder, Glaskolben, Glasflaschen, Schott Duran, Mainz

Glaszylinder, Glaspipetten, Silber Brand, Brand Externa Duran, Wertheim

Glasstandküvetten, Glaswerk Wertheim

Heizblock: Unitek HB-130, Luton, Beds, U.K.

Thermo Stat plus, Thermomixer compact, Thermomixer comfort,

Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf

Heizplatte Präzitherm, Typ PZ 35, Störk-Tronic, Stuttgart

Hybridisierungssystem HC4-S2, QInstruments, Quantifoil Instruments GmbH, Jena

iCycler IQ Multicolor Real-Time Detection System, Biorad, München

IMAGE Master®VDS, Fujifilm Thermal Imaging System FTI-500, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Lichtmikroskop: Leitz Labor Lux S, Ernst Leitz GmbH, Wetzlar

Zeiss Axioplan 2, mit Zeiss AxioCam HRc, Carl Zeiss, Göttingen

Mastercycler gradient, Eppendorf, Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf

Mikrotiterschaukel, 7500 6447, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau

OmniGrid® Accent, GeneMachines®, San Carlos, CA, USA

pH-Meter, CG 842, Schott Instruments, Mainz

Photometer GeneQuant pro, 80-2110-98, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Präzisionswaage, ISO 9001, Sartorius AG-Wägetechnik, Göttingen

Quarzküvette, Type 40008455, 5 mm, Super Sub Micro, Abimed, Langenfeld

Rühranlage temperiert, RCT basic, IKA Labortechnik, Staufen

Speedvac, Concentrator 5301, Eppendorf, Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf

Schüttelinkubator, Certomat® IS, Version REL 01, Braun Biotech International, Melsungen sowie GFL Typ 3005, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel

UV-Linker, Spectrolinker, Spectronics, Westbury, NY, USA

Wasserbad, Typ 3047, Köttermann GmbH, Hänigsen

Zählgerät, AC-8 „Assistent“, Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim/Rhön

Zentrifugen: eppendorf centrifuge 5417 R, 5417 C und 5810 R, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf sowie Heraeus Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments, Hanau

2.6.2 Reagenzien:

AccuPrime™ Super Mix II, Cat.No.12341-012, Invitrogen, Karlsruhe

Antibody Diluent with Background Reducing Component, S3022, Dako, Hamburg

Antikörper: Auflistung unter Immunhistochemie

Aqua ad iniectabilia Braun, Ch.-B. 3144A161, B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Aqua destillata, Apotheke des Klinikum Innenstadt der LMU München

Ampicillin, A9518, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Bernsteinsäureanhydrid, Cat.No.23,969-0, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Betaine, B2754, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Biorad IQ™ Sybr Green Supermix, Controll-No.10364A, Biorad, München

Biorad IQ™ Sybr Green Supermix, Catalog-No.170-8880, Biorad, München

Biorad IQ™ Supermix for RT-PCR, Catalog-No.170-8860, Biorad, München

Borsäure, A3581, 100, AppliChem GmbH, Darmstadt

Brij, 1.01894, Merck, Darmstadt

Cot-1-DNA, Best. Nr. 1581074, Roche, Mannheim

Chromogen-Farbstoff, AEC, Cat. No.: 00-1122, Zymed Laboratories, San Francisco, USA

Cy3-dUTP, PA53022, Art.Nr. 25005442, Amersham Biosciences, Freiburg

Cy5-dUTP, PA55022, Art.Nr. 25005446, Amersham Biosciences, Freiburg

d-(AGC)TP, 1934511, Na-salt, PCR grade, Roche, Mannheim

d-(TTP), 1934546, Na-salt, PCR grade, Roche, Mannheim

DEPC, K028.2, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Dithiothreitol, D1532, Invitrogen, Karlsruhe

EDTA, ED2SS, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Ethanol für die HPLC, A 1612, 2500, AppliChem GmbH, Darmstadt

Ethanol absolut, A1613, 2500 PE, AppliChem GmbH, Darmstadt

Ethidiumbromid, No.80293812, Merck, Darmstadt

Formamid, 9684, Merck, Darmstadt

Glycerol, G-6279, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
H₂O₂ , Wasserstoffperoxid, 31642, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hämalaun, Gill's formula, H-3401, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA
HiDi Formamid, ABI, Applied Biosystems, Weiterstadt
Human Lung Total RNA, Cat.No. 7968, Ambion, Huntingdon, U.K.
Kaisers-Glycerin-Gelatine, Art.Nr.1.09242, Merck, Darmstadt
LB-Agar, No.61746, Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz
LB-Broth, No.61748, Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz
Natrium Acetat, A1522,0250 AppliChem GmbH, Darmstadt
Natrium Chlorid, A1149,1000 AppliChem GmbH, Darmstadt
Natrium Citrat, A4522,0250, AppliChem GmbH, Darmstadt
Natronlauge, A4239,1000 AppliChem GmbH, Darmstadt
NaOH-Pellets, 480878, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N-methyl-2-pyrrolidinon, Cat.No.32,863-4, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS: isotonische NaCl-Lösung 0,81 %, Posphatpuffer 0,0067 mol/l, pH 7, 2.
Apotheke des Klinikum Innenstadt der LMU München
Poly(A)DNA, 108626, Roche, Mannheim
Poly-L-Lysin Solution, P 8920, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Power Sybr® Green PCR Master Mix, P/N 4367659, Applied Biosystems,
Weiterstadt
PCR Plates, 96 well, iCycler IQ™, Cat.No. 2239441, Biorad, München
Random hexamers, C1181, Promega, Mannheim
Reverse Transkriptase, Superscript II, 18064022, Invitrogen, Karlsruhe
Ribonuclease H, 18021014, Invitrogen, Karlsruhe
RNasin/RNase-Inhibitor, N2515, Promega, Mannheim
Salzsäure, OC125879, Merck, Darmstadt
SDS, L4390-100G, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TaqMan® Univ.PCR Master Mix, Best.-Nr.: 4364343, Applied Biosystems,
Weiterstadt
TB-Pulvermedium, A0974,5000, AppliChem GmbH, Darmstadt
TOTO®-3 iodide, Dimeric Cyanine Nucleic Acid Stains, Cat No. T3604, Molecular
Probes, Oregon, USA
Tris HCl, T3253-1KG, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trizma® Base, T-1503, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Wasser für Fluoreszenzanwendungen, A 2480,2500; 2, 5 Liter, AppliChem GmbH, Darmstadt

Xylol, 1.08685.2500, Merck, Darmstadt

1-methyl-2-pyrrolidinone, 32,863-4, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2-Mercaptoethanol, M-3148, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

10xPuffer, D´Nase und Stopp-Puffer, M6101, Promega, Mannheim

2.6.3 Lösungen und Puffer

20 x SSC pH 8, 0 sterilfiltriert: 175, 3 g NaCl, 88,2 g Na-Citrat, ad 1000 ml Aqua dest.

10 % SDS pH 8, 0 sterilfiltriert: 100 g SDS ad 1000 ml Aqua dest.

LB-Medium: Trypton 10g, Yeast Extrakt 5g, NaCl 5g, Ampicillin 50 µg/ml, pH 7, 2

TE-Puffer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0

1 M Tris-HCl, pH 7, 5: 121,14 g Tris (Trizma® Base) ad 1000 ml Aqua dest.

Titration mit HCl

2.6.4 Kit-Systeme

ABI PRISM™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, P/N 4303149, Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Weiterstadt

IScript cDNA Synthesis Kit, Controll-No.10326A, Biorad, München

IScript™ cDNA Synthesis Kit, Catalog-No.170-8890, Biorad, München

Plasmid Maxi Kit, Cat. No. 12162, Qiagen, Hilden

Plasmid MiniKit, Cat. No. 12123, Qiagen, Hilden

RiboAmp™ RNA Amplification Kit, KIT0215, Arcturus, Weiterstadt

RNeasy Mini Kit, No. 74104, Qiagen, Hilden

SuperScript™ RNA Amplification Kit, Part.No.46-6318, Invitrogen, Karlsruhe

Vectastain® Universal Elite ABC Kit, Cat. No. PK-6200, Vector Laboratories Inc,

Burlingame, CA, USA

2.6.5 Sonstige Arbeitsmaterialien

Alufolie, Grass Hopper GH 55, Dahlewitz

B-D® Plastikpak®, sterile Spritze, ISO 7886,-1,2(PP), Luer-Lok®, BD Clontech, Heidelberg

Beckman centrifuge bottles polypropylene, Reorder No.356011, Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA

Cell Culture Dish, No.430167, Corning GmbH, Wiesbaden
Collection tubes, No. 19201, Qiagen, Hilden
Cryogenic Vials, Cat.No. 5000-1020, Nalge Company, Rochester, NY, USA
Deckgläser: Menzel-Gläser, 25x50 mm, No. 6803603, Menzel GmbH+CoKG,
Braunschweig
Deep Well Plate 96, 1,2 ml und 2,2 ml, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Druckluft 67 Super, Art.Nr. 1-6240, Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH
Einmalinjektionskanülen, Sterican® Braun, REF 4657683, 0,45 x 25 mm,
B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalösen, Bioloop® Elkay Products, Inc, Shrewsbury, MA, USA
Einmalspritzen, Norm-Jet, ISO 7886-1, Henke, Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
Eppendorf Multipette Plus, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Falcon TPP®, ISO 9001, Polypropylenröhrchen, BD Clontech, Heidelberg
Fertiggel G5018-02, G6000-02, Invitrogen, Karlsruhe
Filter System, 0,22µm CA, No. 430769; 0,45µm CA, No. 430770; Corning
GmbH,Wiesbaden
Fliespapier, Ref.No.10340689, Schleicher+Schuell, Dassel
Metallschachteln, 224-8, Edgar Hefele, Medizintechnik, München
Microscope slide holder, Z374407-1EA, Cat.No. 445420000, Sigma-Aldrich,
Taufkirchen
MicroSpin G50/Sephadex G50, No.27-5330-01, Amersham Biosciences,Freiburg
MN Sterilizer, filter unit, 0,22 µm cellulose acetale, REF 740400.50, Macherey-Nagel,
Düren
Mulitpette® plus, Serial No. 086025, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
NucleoSpin®Extract II, Cat. No. 740609.250 Macherey-Nagel, Düren
Objektträger: Menzel Objektträger mit mattiertem Rand, Art.Nr.021102, 76 x 26 mm.
SuperFrost® Plus, Art.Nr.J1800AMNZ, Menzel GmbH+ CoKG,
Braunschweig
Optical Tape, 100 sheets, Art.Nr. 223-9444, Biorad, München
Parafilm: PM-996, 4 IN. X 125 FT, Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA
Parafilm "M" Laboratory Film, Chicago, IL, 60631, USA
Plastikküvetten, Art.No.471400; -becherglas, ISO7056, -zylinder, ISO6706, Brand,
Wertheim

Pipettenspitzen, sterile Filter-Spitzen mit „Sealing Filter“, DNase-, RNase-, pyrogenfrei; 10 µl (Art.Nr. 692150), 100µl (Art.Nr. 692066), 1000 µl (Art.Nr.691000)

Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf

Pipetten, 10, 100, 1000 µl eppendorf research bzw. reference, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Plastikpipetten, 10 ml Stripette®, Cat.No. 4101, 25 ml Stripette®, Cat.No. 4251,

Corning Costar GmbH, Bodenheim

Präzisionswischtücher Kimwipes® Lite, Code: 7106010, Kimberly-Clark, Mainz

Qiafilter für Plasmid Maxi Kit, Cat.No. 12263, Qiagen, Hilden

Qia shredder für RNeasy Mini Kit, No.79656, Qiagen, Hilden

RNase Zap™, Product No. R 2020, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Seakem® LE Agarose, Cat.No.50004, Cambrex Bio Science Rockland, ME, USA

Siedesteine, J.P. Pöllath, Dr.M.Winkler, Zeil a. Main

Square-well blocks (24), Cat.No. 19573, Qiagen, Hilden

Strips; 0,2 ml Thin-Wall 8-Tube Strips, Art.Nr. 223-9469, Biorad, München

Strips; 0,2 ml Thin-Wall 8-Cap Strips, Art.Nr. 223-9472, Biorad, München

Titerplatte, 384 Micro Array Plate, X 7020 UN, Genetix GmbH, Dornach

96-well 0,2 ml Thin-Wall PCR Plate, Art.Nr. 223-9441, Biorad, München

Tubes: Prelubricated, 1,7 ml, Cat.No.3207, Corning Costar GmbH, Bodenheim

RT-PCR Beads, 0,2 ml; No. 27-9259-03, Amersham Biosciences, Freiburg

Safe-Lock 0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml; Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

3. Ergebnisse

3.1 cDNA Klone des IMAGE Consortiums

Die statistische Erhebung von aquirierten Daten der sequenzanalysierten cDNA-Klone wurde bereits im Vorfeld vor Etablierung der cDNA Microarray Technologie durchgeführt.

Aufgrund der Relevanz sowie des chronologischen Zusammenhangs sei hier kurz auf einen Teil der Beobachtungen verwiesen:

Bei der Analyse der cDNA-Klone zeigte sich, dass etwa 22,2 % der Klone das Insert nicht in der Nukleotidsequenz, wie es bei der RZPD-Datenbank hinterlegt worden war, aufwiesen. Darüber hinaus korrelierten 52,4 % der Nukleotidsequenzen nicht mit der in der Datenbank angegebenen, ansequenzierten Sequenzlänge. Die Sequenzlänge variierte mit bis zu mehr als 330 Basenpaaren. 24,8 % der Nukleotidsequenzen zeigten sogar eine Länge von mehr 1 kb.

Auf die Fehlerrate der IMAGE cDNA Klone in Form einer inkorrekten Sequenz wurde in der Literatur immer wieder hingewiesen (Halgren et al, 2001). Nach Sequenzüberprüfung der bestellten cDNA-Klone wurde der Klon im Falle eines inkorrekten Inserts verworfen, neu bestellt, angezchtet und wiederholt überprüft bis eine korrekte Sequenz vorlag.

3.2 BAL-Proben

Insgesamt wurden 94 bronchoalveoläre Lavageproben zur RNA-Extraktion ausgewählt. Die Zellzahl betrug im Mittel $3,3 \times 10^6$ Zellen bei einer Standardabweichung von 1,14.

Bei der RNA-Extraktion war es bei gegebener Zellzahl nur in einem Teil der Fälle möglich, eine ausreichend hohe mRNA-Ausbeute zu erzielen. Ferner kam es zu einem weiteren Ausschluss nach erfolgter linearer Amplifikation, sofern auch hier eine für den Labelingprozess nicht ausreichend notwendige RNA-Menge vorlag.

62 BAL-Proben mussten ausgeschlossen werden und es verblieb ein Kollektiv von 32 Proben, an denen die nachfolgenden Untersuchungen durchgeführt werden konnten.

3.3 Microarray

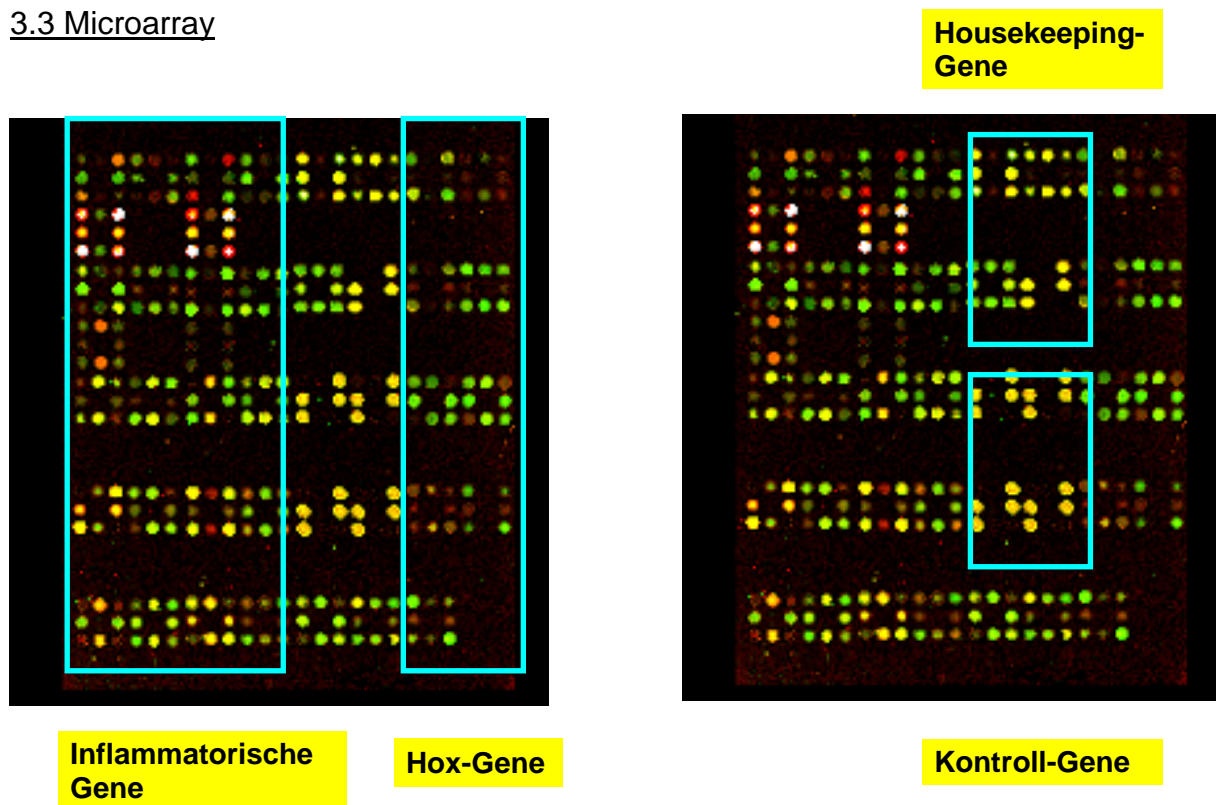


Abb. 11: Eingescannter erfolgreich hybridisierter in-house hergestellter cDNA- Microarray: Markierung der Anordnung der erläuterten Gengruppen (inflammatorische Gene, Hox-Gene, Housekeeping-Gene, Kontroll-Gene).

Nach Detektion, Analyse und statistischer Auswertung wurden die Genexpressionen in Form der bereits beschriebenen logarithmierten Ratio tabellarisch dargestellt.

Bei Werten bis 0,5 lag keine Expression vor. Von einer relativen Expression wurde bei Werten zwischen 0,5 und 1,0, von einer definitiven Expression bei Werten zwischen 1,0 und mehr ausgegangen. Bei negativen Werten lag analog eine Unterexpression vor.

Bei den Werten ist zu beachten, dass bei einem Logarithmus von +1 eine Verdoppelung des Expressionswertes „1“, also der Wert „2“, vorliegt. Analog wird ein halbierter Expressionswert von „1“ nicht in Form von „0,5“, sondern in Form von Logarithmus -1 dargestellt.

Eine Bilanzierung der Features und Substances mittels des Softwareprogrammes Acuity zeigte:

Features/Substances	Bilanz in Zahlen/Prozent
Total Features (alle Spots auf einem Microarray)	672
% Features (Durchschnittswert aller in die Analyse eingegangenen Features nach Ausschluss der erwähnten Kriterien, bezogen auf 33 Microarrays)	78,7 %
Total Substances (alle Gene/Substanzen auf einem Microarray)	154
% Substances (Durchschnittswert aller in die Analyse eingegangenen Gene nach Ausschluss der erwähnten Kriterien, bezogen auf 33 Microarrays)	88,8 %

Tabelle 13: Bilanzierung der Features (Spots) und Substances (Gene).

Im Folgenden sind die Gesamtdaten der Microarray-Untersuchung mit Medianwerten der Gruppen 1, 2 und 3 dargestellt, definitive Expressionen sind fettgedruckt hervorgehoben.

Genexpressionen bronchoalveoläre Lavage			
Genname	Median Gruppe I	Median Gruppe II	Median Gruppe III
TNF alpha 1	-0.326	0.104	0.534
TNF alpha 2	0.041	0.241	3.892
MMP-1-1	<invalid>	1.390	<invalid>
MMP-1-2	1.467	1.081	3.587
Serpina-1-1	0.572	-0.696	0.223
Serpina-1-2	0.237	-0.354	3.195
eNOS-1	-1.156	-0.902	0.944
eNOS-2	0.439	-0.403	1.539
iNOS-1	-1.083	-0.447	1.686
FN1-1	0.480	-0.369	1.123
FN1-2	0.591	-0.032	0.783
GM-CSF-1	-2.169	<invalid>	0.138
GM-CSF 2	-1.010	-0.526	1.587
VEGF-1	-1.414	-1.434	-0.125
VEGF-2	-1.624	-1.399	1.910
BPI-1	1.048	1.730	2.404
BPI-2	1.133	1.573	3.809
MMP-9-1	0.239	0.500	1.159
MMP-9-2	-0.883	1.596	1.320
B-7-2-1	2.007	1.901	0.574
B-7-2-2	1.785	2.341	0.804
SELP-1	1.528	0.936	1.791
SELP-2	1.125	1.777	3.189
IL-15-1	1.203	2.440	0.103
IL-15-2	2.567	2.686	1.537
TIMP-1-1	1.000	0.387	0.961
TIMP-1-2	-1.344	-1.968	-1.259
Granzym-B-1	0.934	0.197	1.363
Granzym-B-2	0.266	0.842	1.066
RANTES-1	1.544	1.563	3.942
RANTES-2	1.251	1.179	1.863
CD-11b-1	1.064	2.438	2.111
CD-11b-2	1.526	2.214	2.629
hsp-40-1	0.370	0.896	1.661
hsp-40-2	1.050	1.867	2.625
B-7-1-1	1.161	1.755	1.887
B-7-1-2	0.429	0.202	0.668
CD-18-1	2.622	2.921	1.527
CD-18-2	-0.118	0.793	1.149
CD 40L-1	0.758	0.774	1.407
SDF-1	-0.555	0.802	2.591
IL-7-1	2.126	2.094	3.289
IL-7-2	0.265	0.729	1.135
SELE-1	0.886	1.089	1.001
Sele 2	1.060	1.556	0.727
CD-40-1	0.774	0.671	1.081
CD-40-2	1.452	1.487	1.226

Tabelle 14a: Genexpressionen Teil I.

Genname	Median Gruppe I	Median Gruppe II	Median Gruppe III
PD -GFB-1	0.270	0.643	0.749
PD-GFB-2	0.327	-0.018	0.721
IL 12A-1	1.530	1.892	1.636
IL-12A-2	1.242	1.905	2.692
FAS-1	0.101	0.711	0.457
FAS-2	0.809	1.082	0.999
IGF-1-1	-0.188	-0.597	0.027
IGF-1-2	-0.255	<invalid>	3.424
IL 1-RA-1	1.911	2.757	3.266
IL-1-RA-2	0.839	0.153	0.683
ELA-2-1	0.879	1.499	1.263
ELA-2-2	<invalid>	1.494	1.000
LTB-1	0.678	2.156	1.912
LTB-2	0.625	2.029	1.546
IL-18-1	0.832	1.193	1.683
IL 18-2	0.366	1.023	1.396
Scy-A2-1	0.115	0.099	-0.610
Scy-A2-2	0.417	-1.167	0.014
IFNG-1	0.678	-0.633	0.295
IFNG-2	0.138	-0.119	-0.173
ESM-1-1	0.111	-0.120	0.402
ESM-1-2	0.164	-0.417	0.710
4-1-BBL-1	0.817	0.166	1.366
4-1-BBL-2	0.978	<invalid>	0.679
IL-8-1	-2.899	0.891	-2.611
IL-8-2	-0.741	1.576	-1.008
hBD-1	2.480	2.263	2.364
hBD-2	2.301	1.644	2.918
TGFB-1	-2.717	-3.997	-1.962
CD-11a-2	0.878	-0.149	0.611
IL 6-1	-1.694	-2.138	-2.241
IL 6-2	-2.463	-3.672	-2.079
4-1-BB-1	1.383	1.243	1.850
OX-40-L-1	1.472	1.365	1.169
OX-40-L-2	0.985	0.238	0.979
ICAM-1-1	-0.001	-0.868	-0.372
ICAM-1-2	-0.734	-1.126	-0.646
CD-24-1	-1.045	0.028	0.042
CD-24-2	0.098	0.712	0.242
LL-37-1	1.108	1.784	3.114
LL-37-2	1.705	2.319	2.658
PD-GFA-1	0.653	1.115	2.249
PD-GFA-2	<invalid>	0.447	0.486
Surfact-A-1	-7.733	-6.253	-5.922
Surfact-A-2	-5.097	-4.608	-4.295
Surfact-B-1	-4.519	-3.386	-2.906
Surfact-B-2	-4.676	-3.913	-3.632
Surfact-C-1	-5.002	-5.166	-4.252
Surfact-C-2	-5.447	-4.966	-3.990

Tabelle 14b: Genexpressionen Teil II.

Genname	Median Gruppe I	Median Gruppe II	Median Gruppe III
IL-1-beta-1	1.638	2.090	1.101
IL-1-beta-2	0.876	0.972	1.327
hsp-70-1	0.641	0.348	-0.949
Scy-A3-1	0.112	0.544	0.984
Scy-A3-2	0.597	1.514	0.319
Perforin-1	0.644	1.483	1.469
Perforin-2	-0.001	-0.265	0.350
HOX-A1-1	0.905	0.712	2.821
HOX-A2-1	0.195	0.730	1.790
HOX-A4-1	1.753	0.856	2.782
HOX-A4-2	0.335	0.210	2.061
HOX-A5-1	0.984	0.573	1.704
HOX-A5-2	0.012	0.362	0.032
HOX-A7-1	0.549	1.399	1.159
HOX-A9-2	2.743	3.757	1.910
HOX-A10-2	0.157	-0.088	2.705
HOX-A11-1	2.152	1.264	1.484
HOX-A13-2	1.447	1.217	2.322
HOX-B2-1	1.685	1.457	1.576
HOX-B3-1	-1.095	-0.319	0.257
HOX-B3-2	-2.098	0.427	0.426
HOX-B5-1	-0.692	0.023	2.528
HOX-B5-2	-0.193	1.233	1.449
HOX-B6-1	0.099	0.837	-0.167
HOX-B6-2	-1.318	0.155	1.874
HOX-B7-1	1.905	2.828	3.453
HOX-B13-1	-0.276	0.761	2.970
HOX-B13-2	-0.353	1.026	0.628
HOX-C4-1	0.053	1.045	0.602
HOX-C4-2	-1.236	-0.065	-0.036
HOX-C5-1	0.684	1.288	<invalid>
HOX-C6-1	1.168	2.157	2.383
HOX-C10-1	0.701	1.362	1.610
HOX-C13-1	2.448	2.976	3.386
HOX-C13-2	2.100	2.123	4.368
HOX-D3-1	-0.583	-0.113	1.044
HOX-D4-1	2.833	2.668	2.778
HOX-D4-2	1.626	2.779	4.123
HOX-D8-1	1.911	1.710	1.567
HOX-D8-2	1.889	1.735	1.642
HOX-D10-1	-1.033	-0.995	0.343
HOX-D11-1	1.774	2.772	3.273

Tabelle 14c: Genexpressionen Teil III: Angabe der Medianwerte in der Gruppe I (keine Abstoßung), Gruppe II (akute Abstoßung), Gruppe III (chronische Abstoßung).

Die dargestellten erhöhten Expressionswerte der Gruppe II (akute Abstoßung) sowie der Gruppe III (chronische Abstoßung) wurden zunächst auf signifikante Unterscheidung zu den Genexpressionswerten der entsprechenden beiden anderen Patientengruppen (Gruppe I mit Patienten mit günstigem Verlauf nach

Transplantation, Gruppe II mit Patienten mit akuter Abstoßung und Gruppe III mit Patienten mit chronischer Abstoßung) überprüft. Ferner erfolgte eine weiterführende Validierung ausgewählter Gene mittels RT-PCR und Immunhistochemie.

Bei mäßigen Genexpressionen bei der akuten Abstoßung in den Gruppen der inflammatorischen Gene, Gene der Leukozytenadhäsion oder der Lymphopoese/Lymphozytendifferenzierung und T-Zell-Antwort zeigten sich insbesondere bei der chronischen Abstoßung deutlichere Genregulationen. Neben inflammatorischen Faktoren und Entzündungsmediatoren waren vor allem Hox-Gene und Wachstumsfaktoren beteiligt.

3.4 One-way ANOVA for Multiple Groups Scores

Die Genexpressionswerte wurden mit Hilfe einer induktiven Statistik in Form des One-way ANOVA for Multiple Groups Scores analysiert, einem modifizierten Students T-Test bei mehr als zwei zu untersuchenden Gruppen.

	Gruppe I und II	Gruppe I und III	Gruppe II und III
id	Student's t-Test, equal variances	Student's t-Test, equal variances	Student's t-Test, equal variances
TNF alpha 2		0.000003	0.000021
MMP-1-2		0.012706	0.000285
MMP-9-1		0.056949	
MMP-9-2		0.045838	
Serpina-1-2		0.001521	0.001223
eNOS-1		0.042805	0.002985
eNOS-2		0.088280	0.014850
iNOS-1		0.006141	0.015984
Scy-A2-2	0.023706		0.003402
FN1-1	0.030955		0.019908
FN1-2			0.039588
IL-8-1			0.021030
IFNG-1	0.019249		0.022407
GM-CSF 2		0.022581	0.034177
Perforin-1		0.038772	
Granzym-B-2		0.012637	
VEGF-2		0.026653	
hsp-40-2		0.014701	
HOX-A1-1		0.005230	0.001881
HOX-A5-1			0.005875
HOX-A11-1	0.036080		
HOX-B3-2		0.030882	
HOX-B5-1		0.003004	0.025074
HOX-B5-2		0.001604	
HOX-B6-2	0.046756	0.003835	
HOX-B7-1		0.024611	
HOX-B13-1		0.008050	0.028949
HOX-B13-2		0.033909	

Tabelle 15: One-way ANOVA for Multiple Groups Scores: abgebildet sind nur signifikante Werte im direkten Gruppenvergleich bei einem Signifikanzniveau von $< 0,05$. Gruppe I bezieht sich auf Patienten mit günstigem Verlauf nach Transplantation ohne Nachweis einer akuten oder chronischen Abstoßung, Gruppe II auf Patienten mit akuter Abstoßung und Gruppe III auf Patienten mit chronischer Abstoßung.

Der One-way ANOVA for Multiple Groups Scores ist ein modifizierter Students-T-Test für mehr als zwei zu untersuchende Gruppen. Da bei der vorliegenden Untersuchung ein Patientenkollektiv mit 3 Gruppen vertreten ist, findet dieser Test Anwendung. Dabei werden jeweils 2 Gruppen über einen Students-T-Test auf Signifikanz überprüft. Unter Verwendung einer H_0 -Hypothese („Die zu untersuchenden Gruppen unterscheiden sich nicht“) und einer H_1 -Hypothese („Die zu untersuchenden Gruppen unterscheiden sich“) wird bei einem Signifikanzniveau von 0,05 ($p\text{-value} < 0,05$) die H_1 -Hypothese bestätigt, sofern das Testergebnis signifikant ist.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der jeweils zu vergleichenden Patientengruppenkonstellation nochmals verdeutlicht dargestellt:

3.4.1 Akute Abstoßung

Es fanden sich keine signifikant unterschiedlichen definitiven (log ratio größer 1) Genexpressionsmuster zwischen Gruppe I (keine Abstoßung) und Gruppe II (akute Abstoßung) sowie zugleich zwischen Gruppe II (akute Abstoßung) und Gruppe III (chronische Abstoßung).

Analog Tabelle 15 zeigte sich aber bei einigen Genen ein rechnerisch, im Rahmen des One-way ANOVA for Multiple Groups Score, signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen I und II bzw. II und III.

Exemplarisch sei hier auf das Gen Scy-A2-2 verwiesen, das zwar in Gruppe I und II sowie II und III einen rechnerisch signifikanten Unterschied zeigte, dennoch in der Microarrayuntersuchung keine signifikante Expression aufwies. Trotz rechnerisch bestehenden signifikanten Unterschieden, muß der Rohwert der Microarrayanalyse in der Gruppe II (akute Abstoßung) betrachtet werden, ob überhaupt ein per definitionem relativer (log ratio 0,5 bis 1) oder definitiver (log ratio größer 1) Expressionswert vorliegt.

3.4.2 Chronische Abstoßung

Bei Patienten mit chronischer Abstoßung (Gruppe III) zeigte sich gegenüber Patienten mit unauffälligem Befund ohne Nachweis einer akuten oder chronischen Abstoßung (Gruppe I) ein signifikanter Unterschied mit definitiver Microarray-Expression (log ratio größer 1) von:

- proinflammatorischen und antiinflammatorischen Faktoren mit TNFa
- Genen der Gruppe der Lymphopoese, Lymphozytendifferenzierung und T-Zell-Antwort mit Perforin und Granzym B
- Wachstumsfaktoren mit MMP-1, MMP-9, Serpina-1, GM-CSF und VEGF
- allgemeinen Entzündungsmediatoren mit eNOS, iNOS und Hsp 40
- Hox-Genen mit Hox A1, Hox B5, Hox B6, Hox B7 und Hox B13.

Ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe II (akute Abstoßung) und Gruppe III (chronische Abstoßung) mit definitiver Microarray-Expression (log ratio größer 1) zeigte sich bei den

- proinflammatorischen und antiinflammatorischen Faktoren mit TNF α
- Wachstumsfaktoren, fibrogenen und antifibrogenen Entzündungsmediatoren mit MMP-1, Serpina-1, FN-1 und GM-CSF
- allgemeinen Entzündungsmediatoren mit eNOS und iNOS
- Hox-Genen mit Hox A1, Hox A5, Hox B5 und Hox B13.

Bei der Betrachtung einer funktionellen Schnittmenge und Darstellung von definitiven Microarray-Expressionen (log ratio größer 1) in der Gruppe III mit signifikantem Unterschied zur Gruppe I (keine Abstoßung) und zugleich zur Gruppe II (akute Abstoßung) zeigte sich bei den

- proinflammatorischen und antiinflammatorischen Faktoren TNF α
- Wachstumsfaktoren MMP-1, Serpina-1 und GM-CSF
- allgemeinen Entzündungsmediatoren eNOS und iNOS
- Hox-Genen mit Hox A1, Hox B5 und Hox B13

eine Erfüllung des Signifikanzniveau von $< 0,05$.

Eine zusätzliche weiterführende Untersuchung der Expressionen von TNF α , MMP-1, MMP-9, FN-1, eNOS, iNOS, Hox-A1, Hox-B5 erfolgte mittels RT-PCR bzw. Immunhistochemie.

3.5 Validierung und Korrelation mit den Ergebnissen des Microarrays

Für die folgenden Gene wurde eine Validierung durch RT-PCR durchgeführt:

IL-12A, LTB, Sele, IL-18, CD24, Hox-A2, Hox-A4, Hox-B3, Hox-B5, Hox-C4, Hox-C10.

Bei der RT-PCR wurden für die Auswertung Proben ausgewählt, die sich durch die gesamte Untersuchung mit einer stabilen Amplifikation präsentierten. Ausgewertet wurden die SQ (Starting Quantity) Mean Werte, die der RNA Kopienzahl entspricht und jeweils graphisch oder in Form des Mittelwertes der jeweiligen Patientengruppe dargestellt wurden.

Automatisch berechnete und definierte Ct-Werte liefern durch die etablierten Standardkurven die jeweilige „starting amount“ (Kopienzahl) des zu untersuchenden

Gens als vergleichbaren Zahlenwert zwischen den drei Gruppen des Patientenkollektivs.

Für die folgenden Gene wurde die Proteinexpression immunhistochemisch an der parallel zur BAL entnommenen Biopsie überprüft:

SDF, MMP1, MMP9, Fibronectin-1, TIMP1, PDGFB, eNOS, iNOS.

Im Rahmen der Immunhistochemie erfolgte die Auswertung durch quantitative Erfassung spezifisch gefärbter Zellen (400-fache Vergrößerung, High Power Field (HPF), Betrachtung von 10 Gesichtsfeldern) sowie durch semiquantitative Untersuchung (0: negativ/ 0,5:schwach positiv/ 1: einfach positiv/ 2: zweifach positiv).

Für die folgenden Gene wurde keine Validierung durchgeführt, charakteristische Genexpressionsmuster wurden dargestellt:

TNFa, Surfactant-Protein, Hox-A1.

Insgesamt wurden 11 Gene mittels RT-PCR und 8 Gene mittels Immunhistochemie jeweils über das gesamte Patientenkollektiv untersucht.

3.5.1 Validierung durch RT-PCR

3.5.1.1 Proinflammatorische und antiinflammatorische Faktoren

3.5.1.1.1 IL-12A:

In der Microarray-Untersuchung zeigte sich eine mögliche Expression in Gruppe III.

Eine Expression ließ sich in der Gruppe III mittels RT-PCR bestätigen und korrelierte somit mit dem Microarray-Ergebnis, jedoch zeigte sich zudem eine diskret ausgeprägtere Expression in Gruppe I. Numerische Werte in Form der Starting Quantity (Kopienzahl) zeigten folgende Mittelwerte der PCR-Funktion der jeweiligen Patientengruppe: Gruppe I mit 23,2; Gruppe II mit 7,32 und Gruppe III mit 18,4.

3.5.1.1.2 LTB:

In der Microarray-Untersuchung zeigte sich eine fragliche Expression in Gruppe II und III.

Eine Expression ließ sich in der Gruppe II und III mittels RT-PCR bestätigen und korrelierte somit mit dem Microarray-Ergebnis, jedoch zeigte sich eine diskret ausgeprägtere Expression in Gruppe I. Numerische Werte in Form der Starting Quantity (Kopienzahl) zeigten folgende Mittelwerte der PCR-Funktion der jeweiligen Patientengruppe: Gruppe I mit 569; Gruppe II mit 473 und Gruppe III mit 431.

3.5.1.2 Leukozytenadhäsion

3.5.1.2.1 Sele:

In der Microarray-Untersuchung zeigte sich eine Expression in Gruppe II.

Diese ließ sich ebenfalls mittels RT-PCR nachweisen und korrelierte mit dem Microarray-Ergebnis. Numerische Werte in Form der Starting Quantity (Kopienzahl) zeigten folgende Mittelwerte der PCR-Funktion der jeweiligen Patientengruppe: Gruppe I mit 0,8; Gruppe II mit 1,5 und Gruppe III mit 0,7.

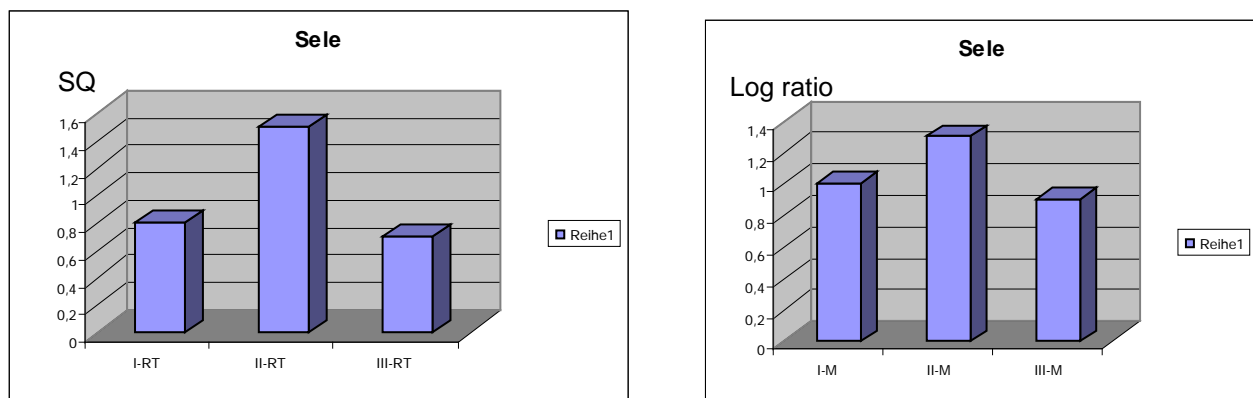


Abb. 12: Graphische Darstellung der Ergebnisse von Sele der RT-PCR im Vergleich zum cDNA-Microarray (X-Achse: I-RT ist Gruppe I RT-PCR, II-RT ist Gruppe II RT-PCR, III-RT ist Gruppe III RT-PCR, analog mit M: Microarray; Y-Achse bei RT: SQ = Starting Quantity/Kopienzahl; Y-Achse bei M: Log ratio).

3.5.1.3 Lymphopoese, Lymphozytendifferenzierung und T-Zell-Antwort

3.5.1.3.1 IL-18

In der Microarray-Untersuchung zeigte sich eine mögliche Expression in Gruppe II und III.

Eine Expression ließ sich in der Gruppe II und III mittels RT-PCR bestätigen und korrelierte mit dem Microarray, jedoch zeigte sich eine ausgeprägtere Expression in Gruppe I. Numerische Werte in Form der Starting Quantity (Kopienzahl) zeigten

folgende Mittelwerte der PCR-Funktion der jeweiligen Patientengruppe: Gruppe I mit 14532; Gruppe II mit 6717,8 und Gruppe III mit 13045,5.

3.5.1.3.2 CD24

In der Microarray-Untersuchung zeigte sich in Gruppe II per definitionem mit Log ratio Werten $< 0,5$ keine Expression.

In der RT-PCR-Untersuchung zeigte sich in Gruppe II das deutlichste Expressionsmuster bei fehlender Korrelation zum Microarray. Numerische Werte in Form der Starting Quantity (Kopienzahl) zeigten folgende Mittelwerte der PCR-Funktion der jeweiligen Patientengruppe: Gruppe I mit 720; Gruppe II mit 1540,2 und Gruppe III mit 462,8.

3.5.1.4 Hox-Gene

3.5.1.4.1 Hox-A2

In der Microarray-Untersuchung zeigte sich eine Expression in Gruppe III und eine relative Expression in II (Log ratio < 1).

Dieses Expressionsverhalten zeigte sich auch in der RT-PCR-Untersuchung und korrelierte mit dem Microarray, jedoch imponierte bei der RT-PCR eine deutlichere Expression in Gruppe I. Numerische Werte in Form der Starting Quantity (Kopienzahl) zeigten folgende Mittelwerte der PCR-Funktion der jeweiligen Patientengruppe: Gruppe I mit 307; Gruppe II mit 176,6 und Gruppe III mit 167.

3.5.1.4.2 Hox-A4

In der Microarray-Untersuchung zeigte sich ein Expressionsverhalten in Gruppe III.

Dies konnte via RT-PCR bestätigt und mit dem Microarray korreliert werden. Numerische Werte in Form der Starting Quantity (Kopienzahl) zeigten folgende Mittelwerte der PCR-Funktion der jeweiligen Patientengruppe: Gruppe I mit 1,5; Gruppe II mit 0,92 und Gruppe III mit 4, 24.

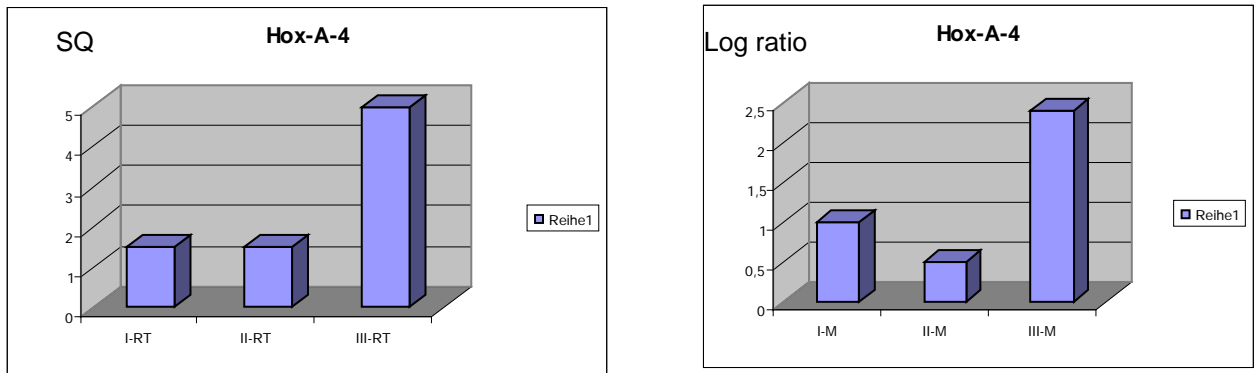


Abb. 13: Graphische Darstellung der Ergebnisse von Hox-A4 der RT-PCR im Vergleich zum cDNA-Microarray (X-Achse: I-RT ist Gruppe I RT-PCR, II-RT ist Gruppe II RT-PCR, III-RT ist Gruppe III RT-PCR, analog mit M: Microarray; Y-Achse bei RT: SQ = Starting Quantity/Kopienzahl; Y-Achse bei M: Log ratio).

3.5.1.4.3 Hox-B3

In der Microarray-Untersuchung zeigten sich per definitionem mit Log ratio Werten < 0,5 keine Expressionen.

In der RT-PCR-Untersuchung zeigte sich in Gruppe I das deutlichste Expressionsmuster bei fehlender Korrelation zum Microarray.

Numerische Werte in Form der Starting Quantity (Kopienzahl) zeigten folgende Mittelwerte der PCR-Funktion der jeweiligen Patientengruppe: Gruppe I mit 18,5; Gruppe II mit 7,9 und Gruppe III mit 6,8.

3.5.1.4.4 Hox-B5

In der Microarray-Untersuchung zeigte sich eine Expression in Gruppe III.

In der RT-PCR-Untersuchung zeigte sich neben einer Expression in Gruppe III mit Korrelation zum Microarray ein teils deutlicherer Nachweis in Gruppe I und II.

Numerische Werte in Form der Starting Quantity (Kopienzahl) zeigten folgende Mittelwerte der PCR-Funktion der jeweiligen Patientengruppe: Gruppe I mit 47; Gruppe II mit 20,7 und Gruppe III mit 33,6.

3.5.1.4.5 Hox-C4

In der Microarray-Untersuchung zeigten sich per definitionem mit Log ratio Werten < 0,5 keine Expressionen.

In der RT-PCR-Untersuchung zeigte sich die deutlichste Expression in Gruppe I bei fehlender Korrelation zum Microarray.

Numerische Werte in Form der Starting Quantity (Kopienzahl) zeigten folgende Mittelwerte der PCR-Funktion der jeweiligen Patientengruppe: Gruppe I mit 153; Gruppe II mit 139 und Gruppe III mit 74.

3.5.1.4.6 Hox-C10

In der Microarray-Untersuchung zeigten sich Expressionen in Gruppe II und III.

In der RT-PCR-Untersuchung zeigte sich die deutlichste Expression in Gruppe II, es zeigte sich eine Korrelation zum Microarray. Numerische Werte in Form der Starting Quantity (Kopienzahl) zeigten folgende Mittelwerte der PCR-Funktion der jeweiligen Patientengruppe: Gruppe I mit 3; Gruppe II mit 11 und Gruppe III mit 2,6.

3.5.2 Validierung durch Immunhistochemie

Ein direkter Vergleich der Ergebnisse ist nur eingeschränkt aussagekräftig, da ein unterschiedliches Kompartiment zwischen Gewebe (Immunhistochemie) und bronchoalveolärer Lavage (Microarray) vorliegt.

3.5.2.1 Lymphopoese, Lymphozytendifferenzierung und T-Zell-Antwort

3.5.2.1.1 SDF

In der Microarray-Untersuchung zeigte sich eine Expression in Gruppe II und III.

Dieses Expressionsmuster ließ sich in der immunhistochemischen Untersuchung bestätigen und korrelieren. Numerische Werte der immunhistochemisch gefärbten Zellen lagen pro Biopsie bei einem Minimum 530, einem Maximum 1405, einem Mittelwert 1018,19 sowie einer Standardabweichung 243,295. Die Mittelwerte betragen in Gruppe I 954, in Gruppe II 1008 und in Gruppe III 1079.

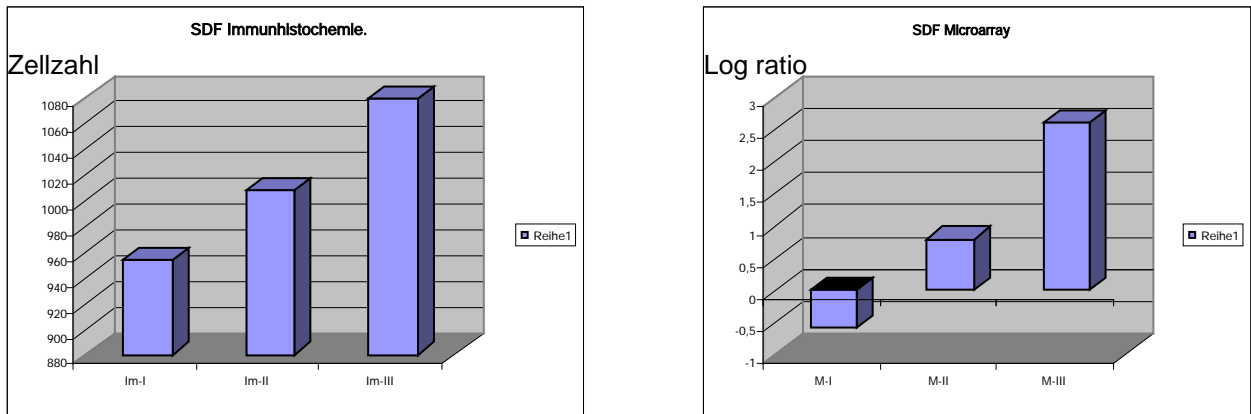


Abb. 14: Graphische Darstellung der Ergebnisse von SDF der Immunhistochemie im Vergleich zum cDNA-Microarray (X-Achse: Im-I ist Gruppe I Immunhistochemie, Im-II ist Gruppe II Immunhistochemie, Im-III ist Gruppe III Immunhistochemie, analog M: Microarray; Y-Achse bei Immunhistochemie zeigt gefärbte Zellzahl; Y-Achse bei M: Log ratio).

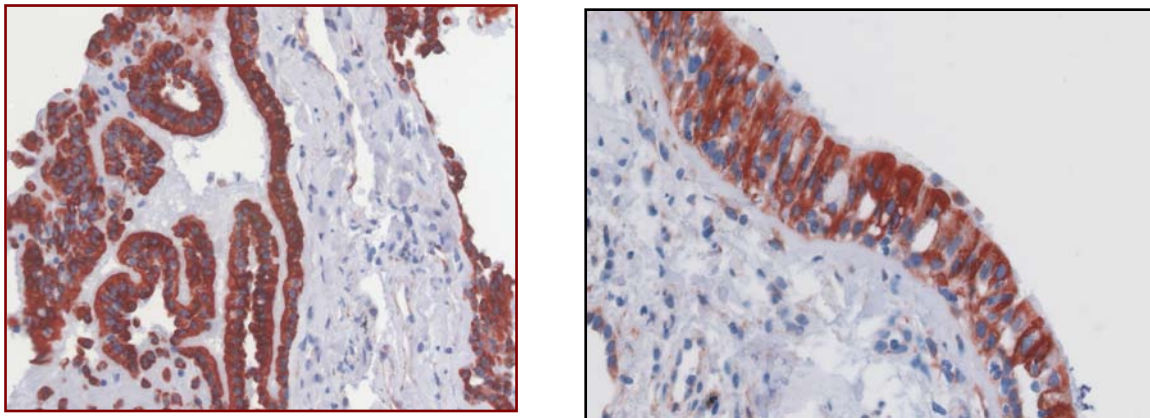


Abb. 15: Transbronchiale Lungenbiopsie mit deutlicher Expression von SDF am Alveolarepithel, Gruppe II (akute Abstoßung, Grad A2 nach ISHLT), immunhistochemische Färbung mit SDF-Antikörper, Gegenfärbung Hämalaun, Originalvergrößerung x400.

3.5.2.2 Wachstumsfaktoren, fibrogene und antifibrogene Entzündungsmediatoren

3.5.2.2.1 MMP-1

In der Microarray-Untersuchung zeigte sich eine mögliche Expression in Gruppe III, ferner in Gruppe II und I.

Immunhistochemisch wurde ein Nachweis von MMP-1 in Gruppe III bestätigt und zeigte eine Korrelation, Gruppe I und II zeigten jedoch ausgeprägtere Expressionen. Numerische Werte der immunhistochemisch gefärbten Zellen lagen pro Biopsie bei einem Minimum von 63, einem Maximum von 1077, einem Mittelwert 335,35 sowie einer Standardabweichung von 233,394. Die Mittelwerte betragen in Gruppe I 440, in Gruppe II 306 und in Gruppe III mit 196.

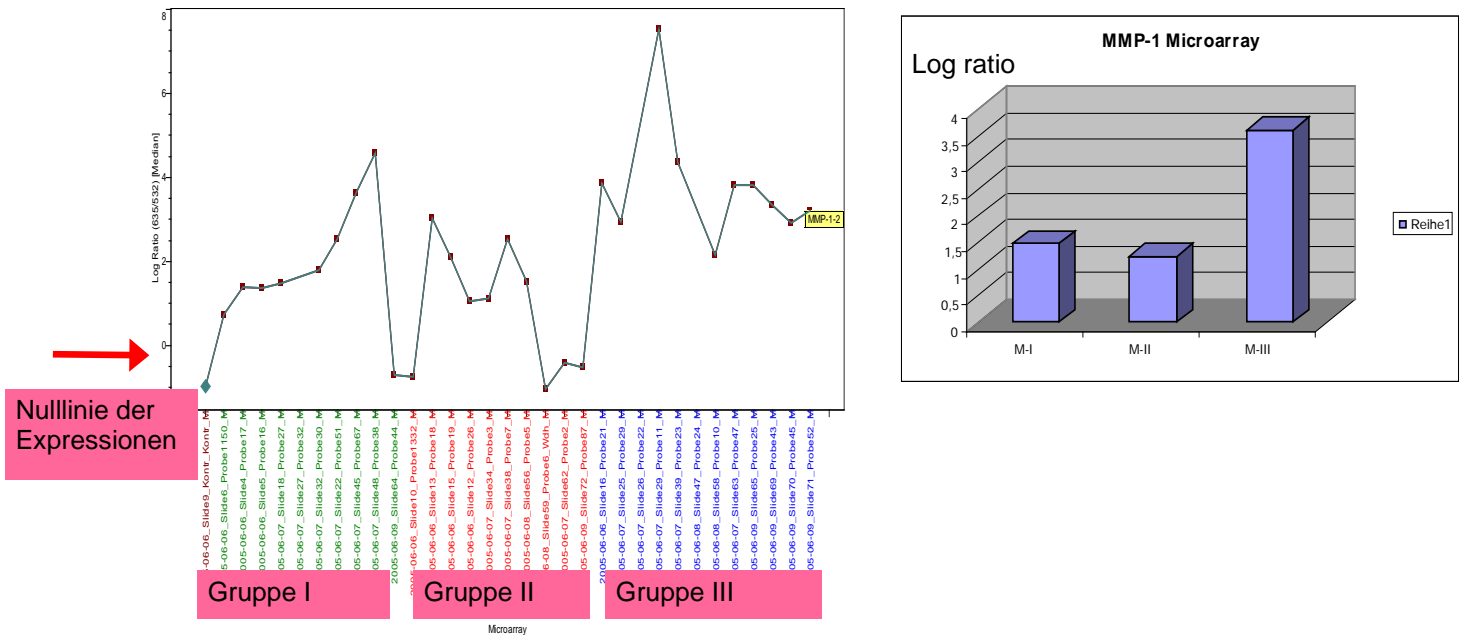


Abb. 16: Linkes Bild: Microarray Genexpressionsprofil von MMP-1 in Bezug auf das zu untersuchende Kollektiv (von links nach rechts: Grün-Gruppe I (Proben 2-11), Rot-Gruppe II (Proben 12-21) Blau-Gruppe III (Proben 22-33).
Rechtes Bild: Microarray (X-Achse: M-I ist Gruppe I Microarray; M-II ist Gruppe II Microarray; M-III ist Gruppe III Microarray; Y-Achse: Log ratio).

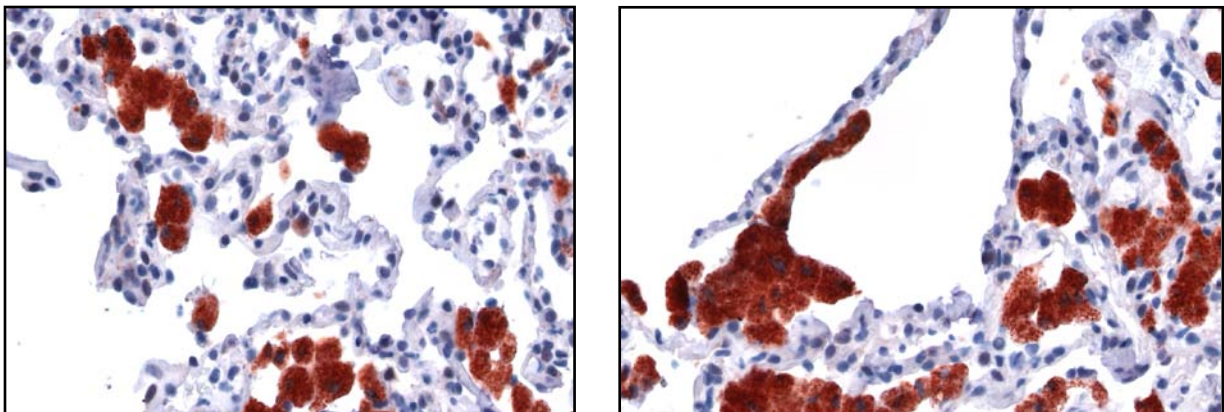


Abb: 17: Transbronchiale Lungenbiopsie mit deutlicher Darstellung von MMP-1 in Makrophagen, Gruppe II (akute Abstoßung, Grad A2 nach ISHLT), immunhistochemische Färbung mit MMP-1-Antikörper, Gegenfärbung Hämalaun, Originalvergrößerung x400.

3.5.2.2.2 MMP-9

In der Microarray-Untersuchung zeigte sich eine mögliche Expression in Gruppe II und III.

Immunhistochemisch bestätigte sich ein Nachweis von MMP9 in Gruppe II und III und korrelierte mit dem Microarray, jedoch zeigte sich ebenso in Gruppe I ein immunhistochemischer Nachweis.

Numerische Werte der immunhistochemisch gefärbten Zellen lagen pro Biopsie bei einem Minimum von 6, einem Maximum von 602, einem Mittelwert 184,50 sowie einer Standardabweichung von 128,676. Die Mittelwerte betrugen in Gruppe I 173, in Gruppe II 244 und in Gruppe III mit 150.

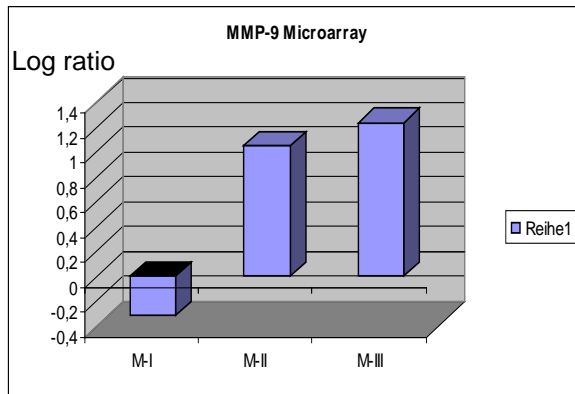


Abb. 18: Graphische Darstellung der Ergebnisse von MMP-9 des Microarrays auf das untersuchende Kollektiv. (X-Achse: M-I ist Gruppe I Microarray, M-II ist Gruppe II Microarray, M-III ist Gruppe III Microarray; Y-Achse: Log ratio).

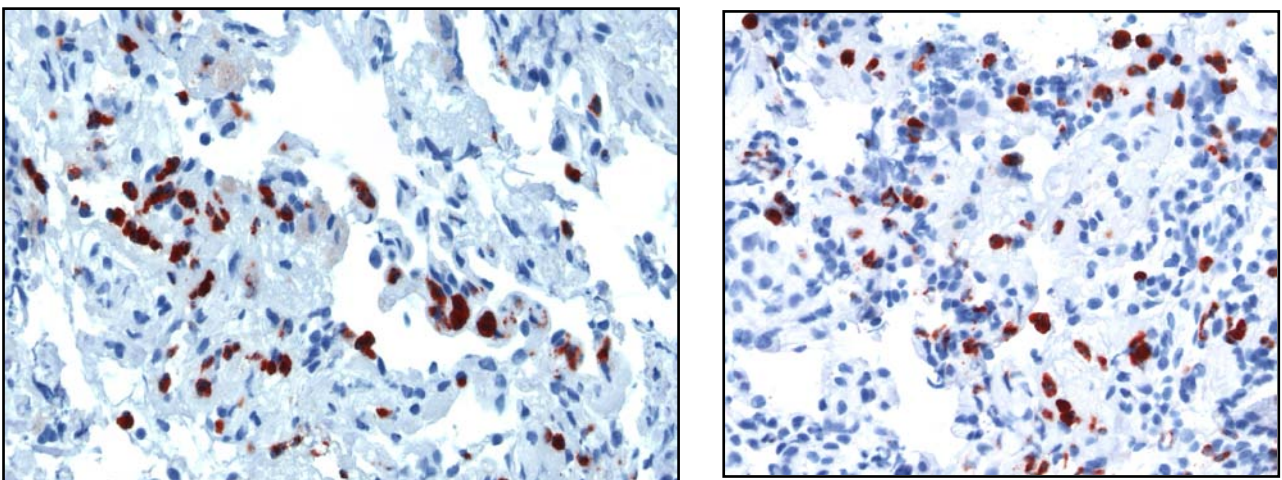


Abb: 19: Transbronchiale Lungenbiopsie mit geringgradiger bis mäßiger Darstellung von MMP-9 in Makrophagen, linkes Bild Gruppe I (keine Abstoßung, A0 nach ISHLT), rechtes Bild Gruppe II (akute Abstoßung, Grad A2 nach ISHLT), immunhistochemische Färbung mit MMP-9-Antikörper, Gegenfärbung Hämalaun, Originalvergrößerung x400.

3.5.2.2.3 TIMP-1

In der Microarray-Untersuchung zeigten sich keine Expressionen bzw. eine Downregulation von TIMP-1.

Immunhistochemisch korrelierte ein regredientes Expressionsmusters mit dem niedrigsten Expressionsniveau in Gruppe III.

Semiquantitativ zeigte sich in Gruppe I ein schwach positiver bis einfach positiver, in Gruppe II ein schwach positiver und in Gruppe III ein negativer bis schwach positiver immunhistochemischer Färbenachweis.

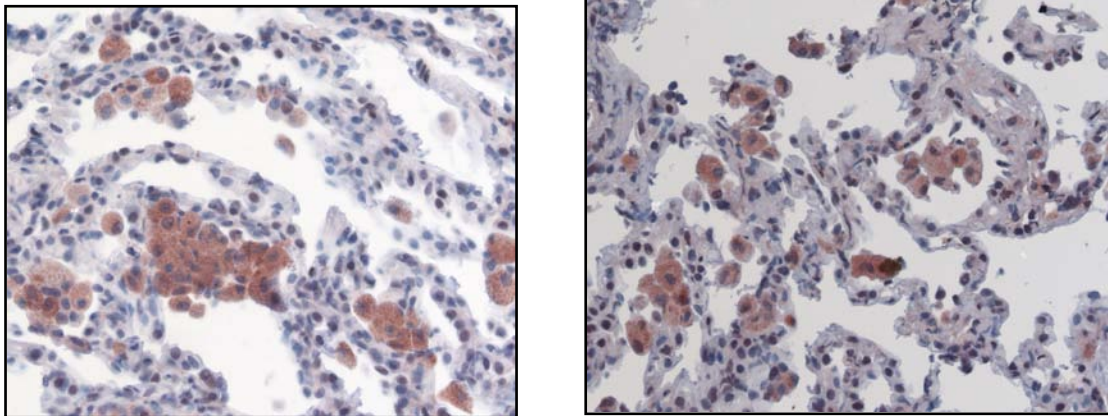


Abb. 20: Transbronchiale Lungenbiopsie mit deutlicher Darstellung von TIMP-1 in Makrophagen, Gruppe I (keine Abstoßung, Grad A0 nach ISHLT), immunhistochemische Färbung mit TIMP-1-Antikörper, Gegenfärbung Hämalaun, Originalvergrößerung x400.

3.5.2.2.4 Fibronectin-1

In der Microarray-Untersuchung zeigte sich eine führende Expression in Gruppe III.

Immunhistochemisch korrelierte dieser Expressionsnachweis.

Numerische Werte der immunhistochemisch gefärbten Zellen lagen pro Biopsie bei einem Minimum von 54, einem Maximum von 935, einem Mittelwert 461,06 sowie einer Standardabweichung von 204,634. Die Mittelwerte betrugen in Gruppe I 458, in Gruppe II 371 und in Gruppe III mit 524.

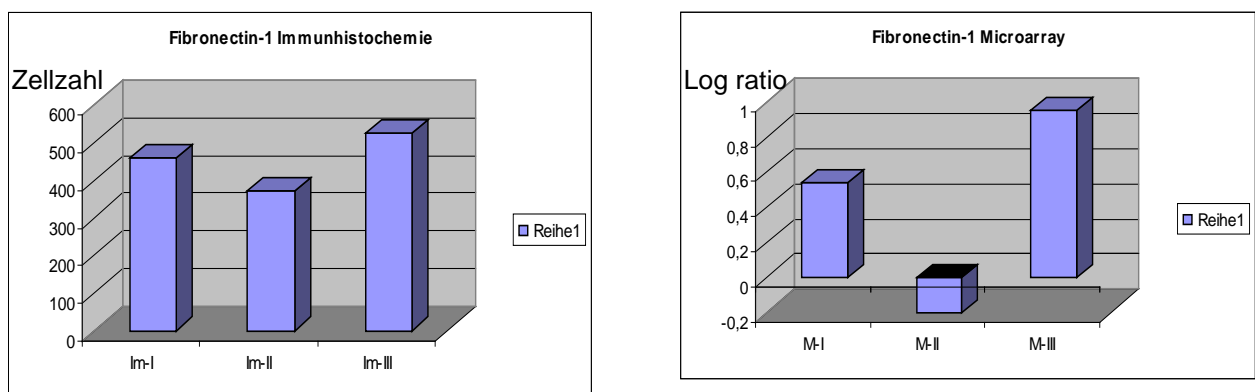


Abb. 21: Graphische Darstellung der Ergebnisse von Fibronectin-1 der Immunhistochemie im Vergleich zum cDNA-Microarray (X-Achse: Im-I ist Gruppe I Immunhistochemie, Im-II ist Gruppe II Immunhistochemie, Im-III ist Gruppe III Immunhistochemie, analog M: Microarray; Y-Achse bei Immunhistochemie zeigt gefärbte Zellzahl; Y-Achse bei M: Log ratio).

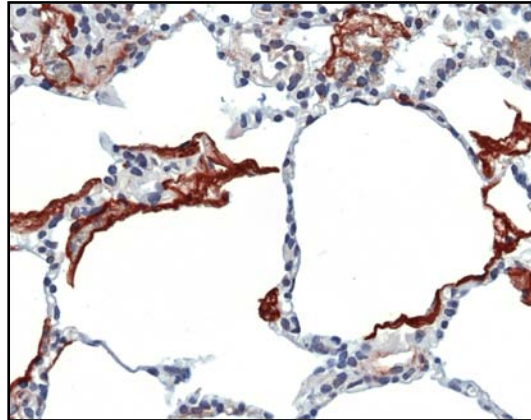
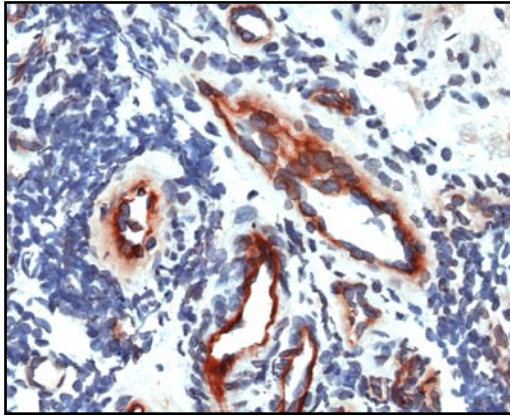


Abb: 22: Transbronchiale Lungenbiopsie mit Darstellung von Fibronectin-1 am Alveolarepithel, Gruppe III (chronische Abstoßung, Bronchiolitis obliterans), immunhistochemische Färbung mit Fibronectin-1-Antikörper, Gegenfärbung Hämalaun, Originalvergrößerung x400.

3.5.2.2.5 PDGFB

In der Microarray-Untersuchung zeigte sich eine relative Expression in Gruppe III.

Semiquantitativ zeigte sich in Gruppe I und II ein einfach bis zweifach positiver Nachweis, in Gruppe III korrelierte ein einfach positiver immunhistochemischer Färbenachweis.

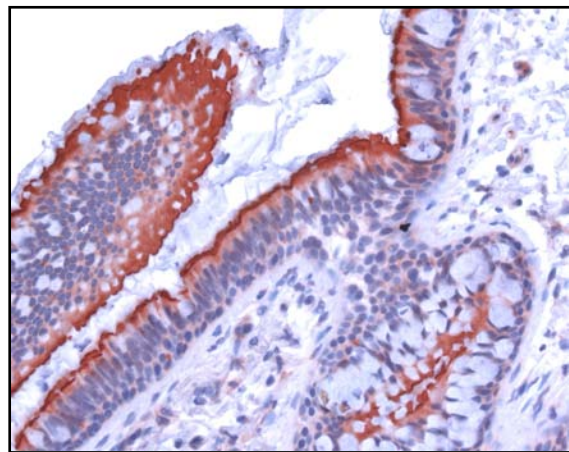
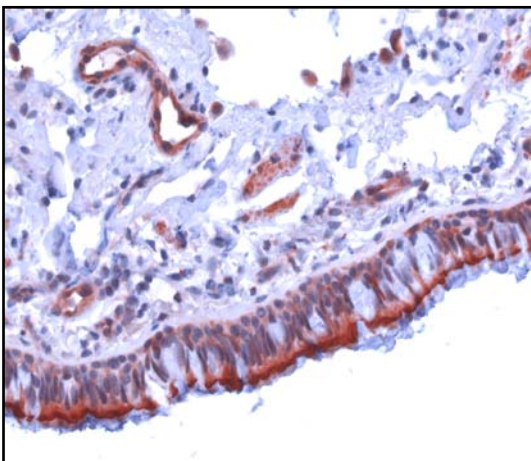


Abb: 23: Transbronchiale Lungenbiopsie mit deutlicher Darstellung von PDGFB am Alveolarepithel, Gruppe III (chronische Abstoßung, Bronchiolitis obliterans), immunhistochemische Färbung mit PDGFB-Antikörper, Gegenfärbung Hämalaun, Originalvergrößerung x400.

3.5.2.3 Allgemeine Entzündungsmediatoren

3.5.2.3.1 eNOS

In der Microarray-Untersuchung zeigte sich eine Expression in Gruppe III.

Immunhistochemisch korrelierte eine semiquantitativ schwach positive Expression in Gruppe III, ein schwach bis einfach positiver immunhistochemischer Färbenachweis zeigt sich in Gruppe I und II.

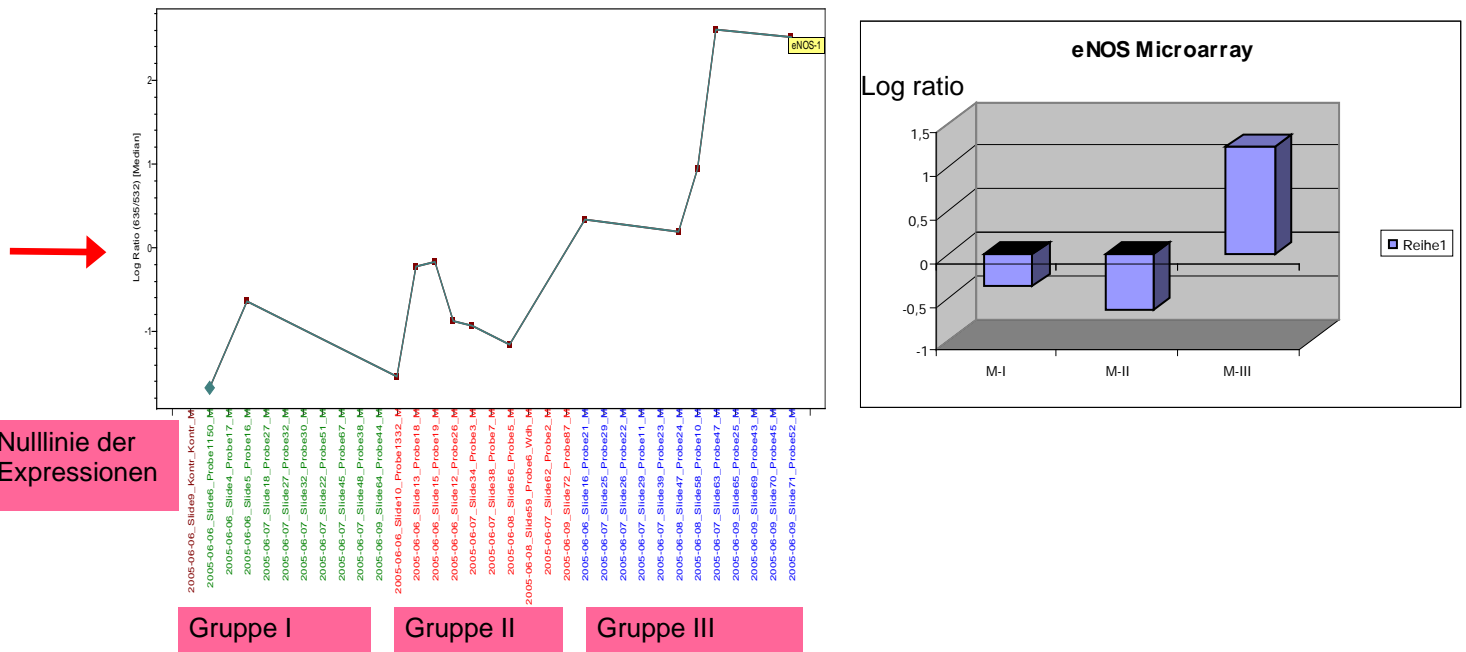


Abb. 24: Linkes Bild: Microarray Genexpressionsprofil von eNOS in Bezug auf das zu untersuchende Kollektiv (von links nach rechts: Grün-Gruppe I (Proben 2-11), Rot-Gruppe II (Proben 12-21), Blau-Gruppe III (Proben 22-33). Rechtes Bild: Microarray (X-Achse: M-I ist Gruppe I Microarray; M-II ist Gruppe II Microarray; M-III ist Gruppe III Microarray; Y-Achse: Log ratio).

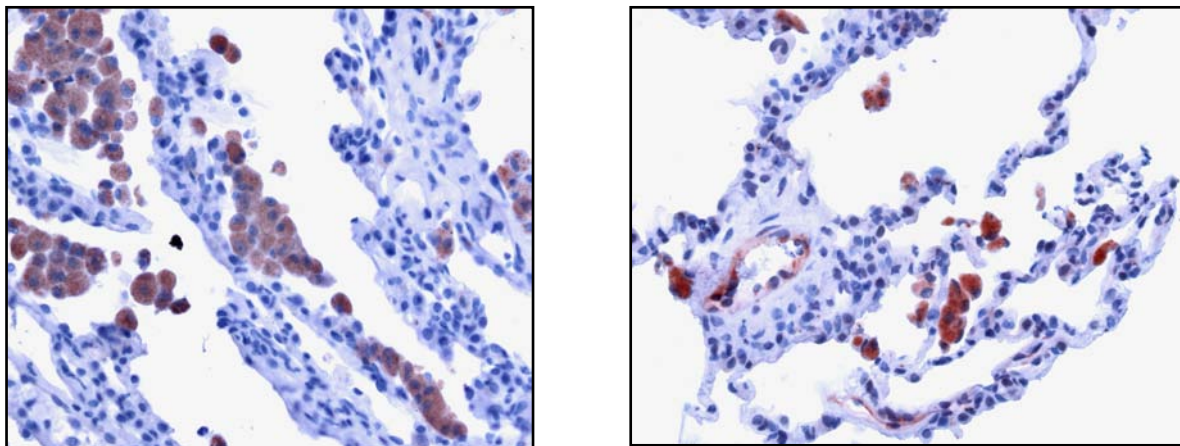


Abb. 25: Transbronchiale Lungenbiopsie mit deutlicher bzw. leichtgradiger Darstellung von eNOS in Makrophagen, links Gruppe I (keine Abstoßung, Grad A0 nach ISHLT), rechts Gruppe II (akute Abstoßung, Grad A2 nach ISHLT), immunhistochemische Färbung mit eNOS-Antikörper, Gegenfärbung Hämalaun, Originalvergrößerung x400.

3.5.2.3.2 iNOS

In der Microarray-Untersuchung zeigte sich eine Expression in Gruppe III.

Immunhistochemisch konnte diese Expression bestätigt und korreliert werden. Immunhistochemisch korrelierte eine semiquantitativ schwach positive Expression in Gruppe I, II und III.

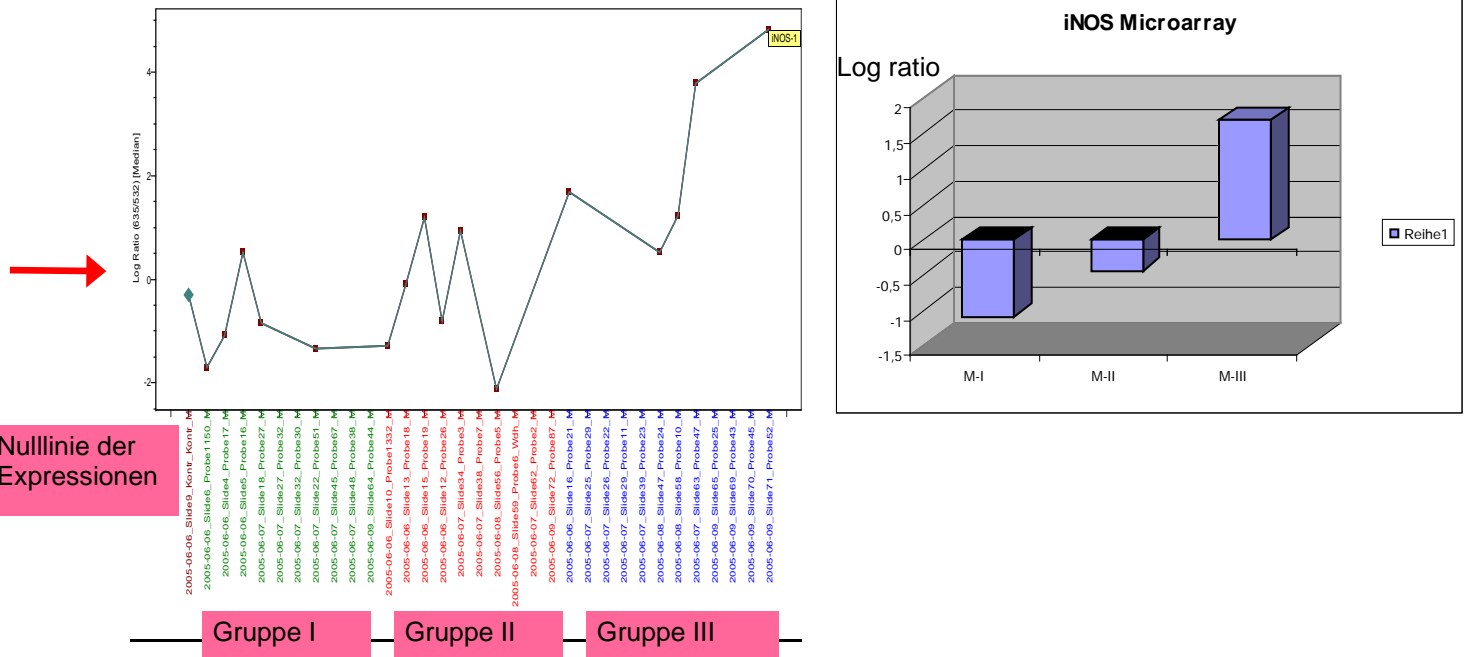


Abb. 26: Linkes Bild: Microarray Genexpressionsprofil von iNOS in Bezug auf das zu untersuchende Kollektiv (von links nach rechts: Grün-Gruppe I (Proben 2-11), Rot-Gruppe II (Proben 12-21), Blau-Gruppe III (Proben 22-33). Rechtes Bild: Microarray (X-Achse: M-I ist Gruppe I Microarray; M-II ist Gruppe II Microarray; M-III ist Gruppe III Microarray; Y-Achse: Log ratio).

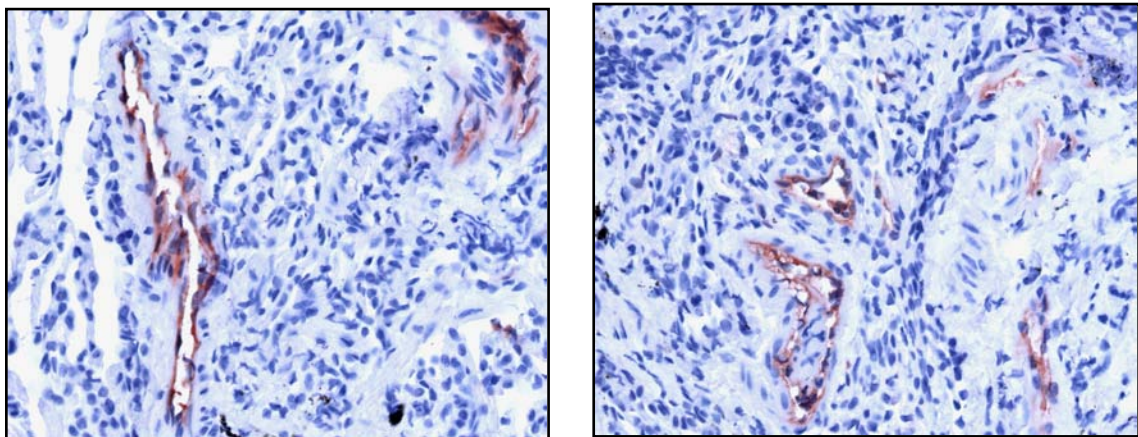


Abb. 27: Transbronchiale Lungenbiopsie mit gering- bis mäßiggradiger Darstellung von iNOS am Alveolarepithel, Gruppe III (chronische Abstoßung, Bronchiolitis obliterans), immunhistochemische Färbung mit iNOS-Antikörper, Gegenfärbung Hämalaun, Originalvergrößerung x400.

3.5.3 Nicht validierte Genexpressionsmuster

3.5.3.1 Surfactant-Protein

In der Microarray-Untersuchung zeigte sich eine Downregulation der Surfactant-Proteine in allen 3 Gruppen.

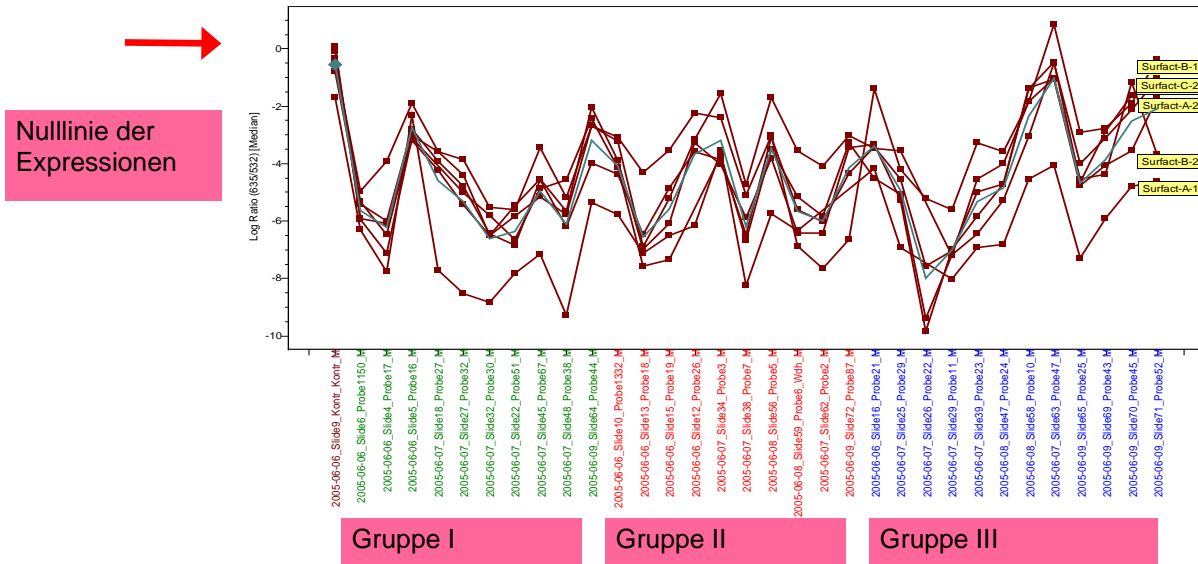


Abb. 28: Microarray Genexpressionsprofil von Surfactant Protein in Bezug auf das zu untersuchende Kollektiv (von links nach rechts: Grün-Gruppe I (Proben 2-11), Rot-Gruppe II (Proben 12-21), Blau-Gruppe III (Proben 22-33)).

3.5.3.2 Hox-A1

In der Microarray-Untersuchung zeigte sich eine erhöhte Expression von Hox-A1 in Gruppe III.

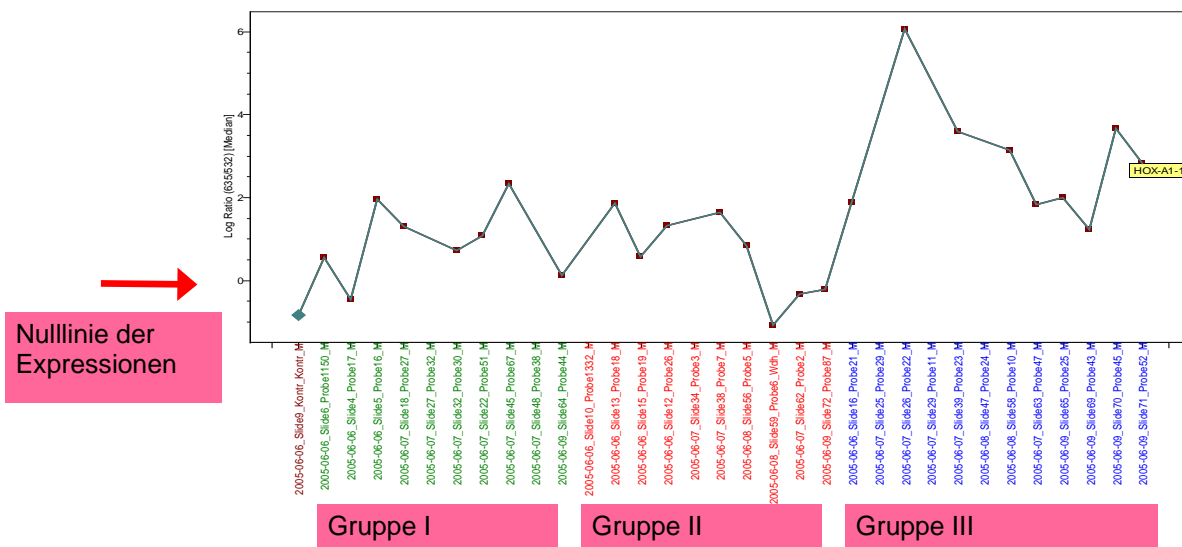


Abb. 29: Microarray Genexpressionsprofil von Hox-A1 in Bezug auf das zu untersuchende Kollektiv (von links nach rechts: Grün-Gruppe I (Proben 2-11), Rot-Gruppe II (Proben 12-21), Blau-Gruppe III (Proben 22-33)).

3.5.3.3 TNFa

In der Microarray-Untersuchung zeigte sich eine mögliche Expression von TNFa in Gruppe III (chronische Abstoßung).

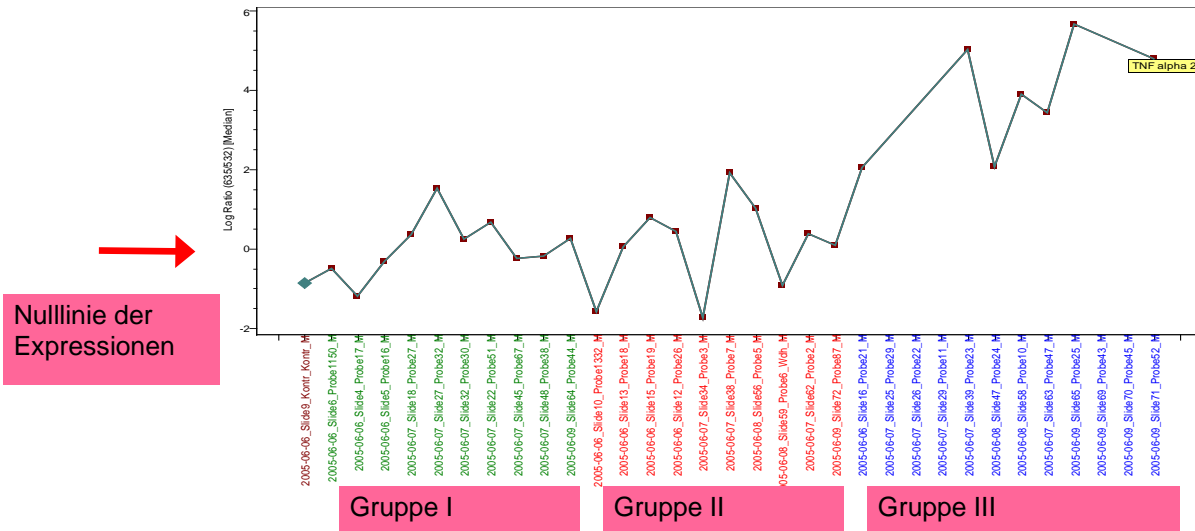


Abb. 30: Microarray Genexpressionsprofil von TNFa innerhalb der untersuchten Kollektive ((von links nach rechts: Grün-Gruppe I (Proben 2-11), Rot-Gruppe II (Proben 12-21), Blau-Gruppe III (Proben 22-33)).

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Darstellung der Gene mit möglichen im Microarray nachgewiesenen, aber nicht weiter validiertem Expressionsmuster sowie der Gene mit validiertem Expressionsmuster. Ferner Vermerk der Signifikanz im Gruppenvergleich (nach durchgeführtem One-way ANOVA for Multiple Groups Scores). Einteilung nach Gruppen des Patientenkollektivs.

			mögl. II	mögl. III	II validiert	III validiert
Proinflamm./antiinflamm.F.:						
IL-12A				X (n.sig.)		
LTB			X (n.sig.)	X (n.sig.)		
TNFa				X (sig.)		
Leukozytenadhäsion:						
Sele					X (n.sig.)	
Lymphop./Lympho.diff./T-A.:						
IL-18			X (n.sig.)	X (n.sig.)		
SDF					X (n.sig.)	X (n.sig.)
Wachstumsf./fibrog.Ent.med.:						
MMP-1			X (n.sig.)	X (sig.)		
MMP-9			X (n.sig.)	X (n.sig.)		
FN-1						X (n.sig.)
TIMP-1						x (Reduktion) (n.sig.)
PDGFB				X (relative E.) (n.sig.)		
GM-CSF				X (sig.)		
Serpina				X (sig.)		
allg. Ent.med.:						
eNOS				X (sig.)		
iNOS						X (sig.)
Hox-Gene:						
Hox-A1				X (sig.)		
Hox-A2			x (relative E.) (n.sig.)	X (n.sig.)		
Hox-A4						X (n.sig.)
Hox-B5				X (sig.)		
Hox-B13				X (sig.)		
Hox-C10			X (n.sig.)	X (n.sig.)		

Tabelle 21: Zusammenfassende Darstellung der Genexpressionen. Mögliche (mögl.) Genexpressionen sind Genexpressionen mittels Microarraynachweis, eine weiterführende Validierung wurde nicht durchgeführt. Gene mit validiertem Status waren nach Microarraynachweis auch in RT-PCR oder Immunhistochemie bestätigt. (Relative E.: = relative Expression via Microarray mit Log ratio zwischen 0,5 und 1; Reduktion: validierte reduzierte Expression in Gruppe III bei TIMP). Gruppe I umfasst Patienten ohne akute oder chronische Transplantatabstoßungen, Gruppe II umfasst die akute Abstoßungsreaktion, Gruppe III die chronische Abstoßungsreaktion. Ferner erfolgte ein Vermerk der Signifikanz nach durchgeführtem One-way ANOVA for Multiple Groups Scores mit Beurteilung eines signifikantem Unterschieds zu den jeweils beiden verbliebenen Gruppen des Patientenkollektivs (n.sig.: nicht signifikant; sig.: signifikant). Beispiel zur Erläuterung: iNOS ist definitiv (log ratio größer 1) im Microarray in Gruppe III exprimiert, zudem in der Gruppe III (chronische Abstoßung) validiert worden und zeigt eine Expression mit signifikantem Unterschied zur iNOS-Expression in Gruppe I und II.

Zusammenfassend zeigten sich deutlichere Expressionsmuster in der Gruppe III (chronische Abstoßung), insbesondere bei den Wachstumsfaktoren mit Expressionen von MMP-1 (signifikant), MMP-9, Fibronectin-1, Serpina (signifikant), GM-CSF (signifikant), PDGFB oder TIMP. In der Gruppe der inflammatorischen Faktoren waren TNFa (signifikant), LTB oder IL-12A reguliert, in der Gruppe der Lymphopoese/Lymphozytendifferenzierung und T-Zell-Antwort beispielsweise SDF. Ebenso waren auch allgemeine Entzündungsmediatoren wie iNOS (signifikant) oder eNOS (signifikant) bei erhöhten Genexpressionen in der Gruppe III (chronische Abstoßung) vertreten. Die Gene der Entwicklungsbiologie waren vor allem mit Hox-A1 (signifikant), Hox-A4, Hox-B5 (signifikant) und Hox-B13 (signifikant) vermehrt exprimiert.

Bei den Genexpressionen in der Gruppe der akuten Abstoßung waren neben der Gruppe der inflammatorischen Gene mit LTB ferner Gene der Leukozytenadhäsion mit Sele reguliert. Auch Hox-A2 und Hox-C10 zeigte eine Expression in der akuten Abstoßungsgruppe. Insgesamt aber keine Signifikanz.

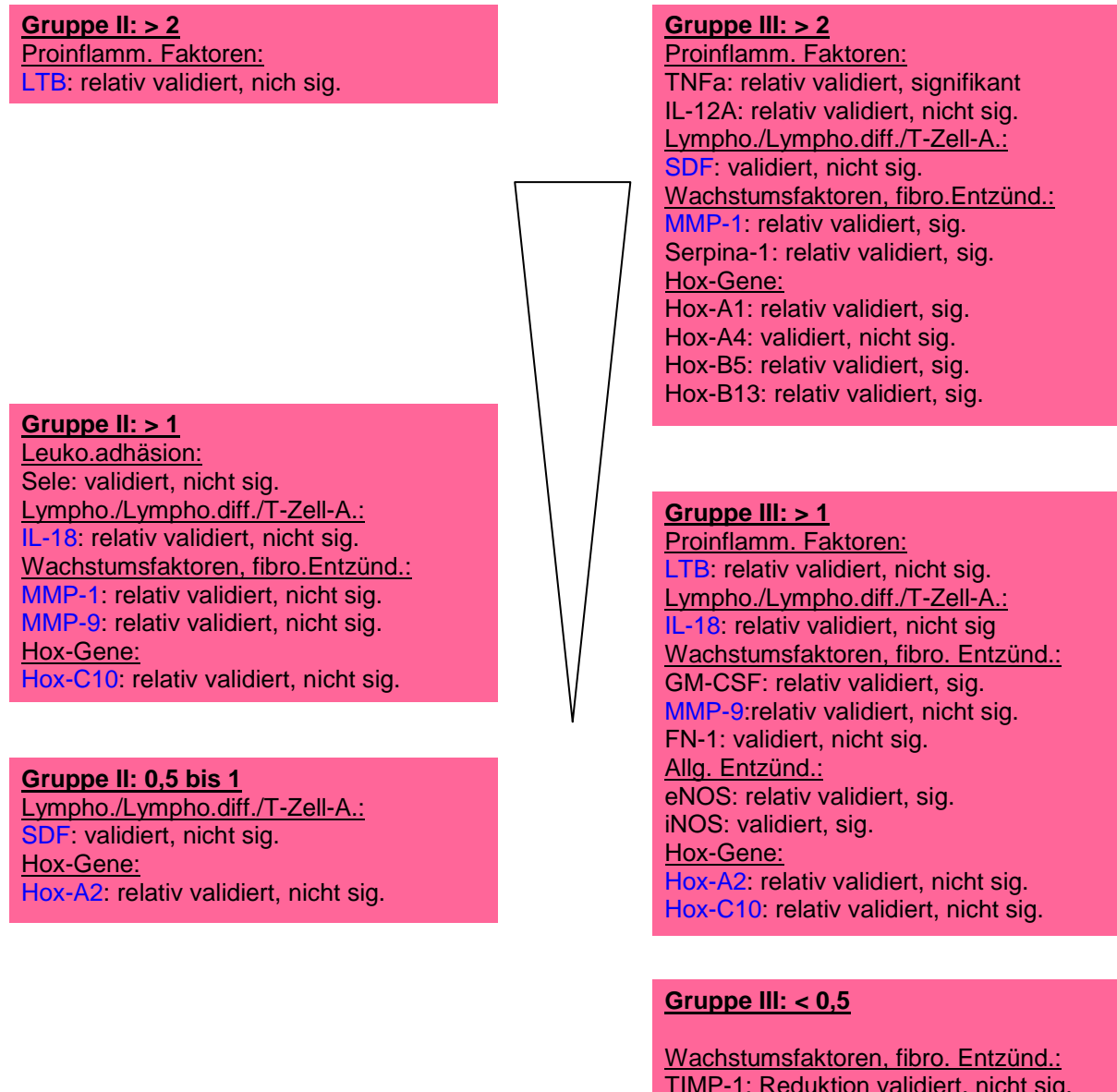
Gesamtzahlen der Microarray-Untersuchung:

Gesamtzahl der untersuchten Gene	80 Gene
Anzahl der Gene im Duplikat	58 Gene
Anzahl der Gene mit definitiver Expression	65 Gene
Definitive Expression und Signifikanz	9 Gene
Definitive Expression, Signifikanz, relativ bestätigt	8 Gene
Definitive Expression, Signifikanz, validiert	1 Gen

Tabelle 22: Gesamtzahlen Microarray: Neben der Gesamtzahl der untersuchten Gene ist die Anzahl der Gene, die im Duplikat (für jedes Gen jeweils 2 cDNA-Klone) auf dem Microarray vorliegen, angegeben. Definitive signifikante Expressionen mit teils relativer Bestätigung mit RT-PCR oder Immunhistochemie oder mit validiertem Status gemäß den oben genannten Ausführungen.

3.7 Zusammenstellung (nach Expressionsstärke gewertet)

Im linken Bildabschnitt ist die Gruppe II (akute Abstoßung), im rechten die Gruppe III (chronische Abstoßung), jeweils nach den angewendeten Gengruppen und einer **Microarray-Expression** >2, >1 (definitiv), >0,5 (relativ) geordnet. Bezüglich Signifikanz und validiertem Status ist das bereits dargestellte Vorgehen angewendet.



Anmerkung:

Blau gekennzeichnete Gene sind in Gruppe II und III
Sig.: signifikant
Relativ validiert: eine eindeutig valide Expression (RT-PCR/Immunhistochemie) konnte nicht gezeigt werden
0,5-1: Bereich der relativen Expression
> 1: Bereich der definitiven Expression

Abb. 31: Zusammenstellung der Microarrayergebnisse (nach Expressionsstärke gewertet):Angabe der Signifikanz und des Validierungsstatus, Einteilung in die üblichen Gengruppen mit Unterscheidung akute (linke Bildhälfte) versus chronische (rechte Bildhälfte) Abstoßung.

3.8 BAL-Differentialzytologie

Die BAL-Differentialzytologie wurde zusätzlich ausgewertet, dabei zeigte sich, dass mit einer Zunahme des Abstoßungsgrades eine mäßige negative Korrelation (Korrelationskoeffizient: -0,553) mit den Makrophagen vorlag, d. h. bei zunehmendem Abstoßungsgrad ist die Makrophagenzahl gesunken. Die Korrelation war signifikant (0,001 bei Signifikanzniveau <0,05).

Ferner zeigte sich, dass mit Zunahme des Abstoßungsgrades eine mäßige Korrelation (Korrelationskoeffizient 0,527) mit den Neutrophilen beobachtet werden konnte, d. h. bei zunehmendem Abstoßungsgrad stieg die Neutrophilenzahl. Die Korrelation war signifikant (0,002 bei Signifikanzniveau < 0,05).

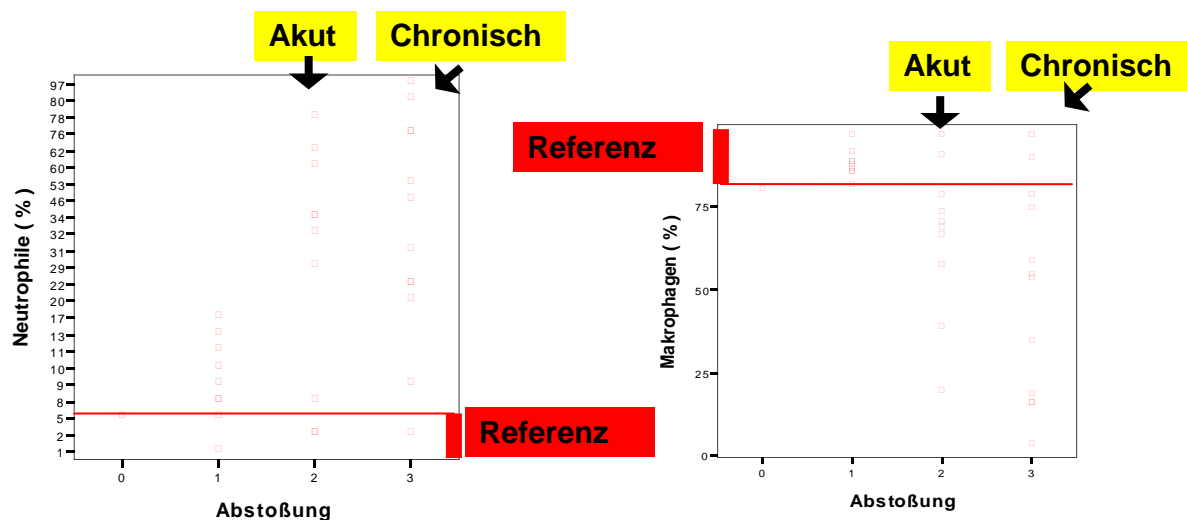


Abb. 32a: Graphische Darstellung der Zelltypen im Zusammenhang mit dem Abstoßungsgrad: 1, 2 und 3 entspricht den Gruppen I, II und III des Patientenkollektivs. Ferner ist das Verhalten der Neutrophilen bzw. der Makrophagen aufgetragen.

Mit steigendem Abstoßungsgrad kann eine Zunahme der neutrophilen Granulozyten sowie eine Abnahme der Makrophagen (jeweils prozentual von der Lavagezytologie) beobachtet werden. Referenz = Referenzbereich, in dem die Neutrophilen oder Makrophagen physiologisch liegen (jeweils prozentual von der Lavagezytologie)

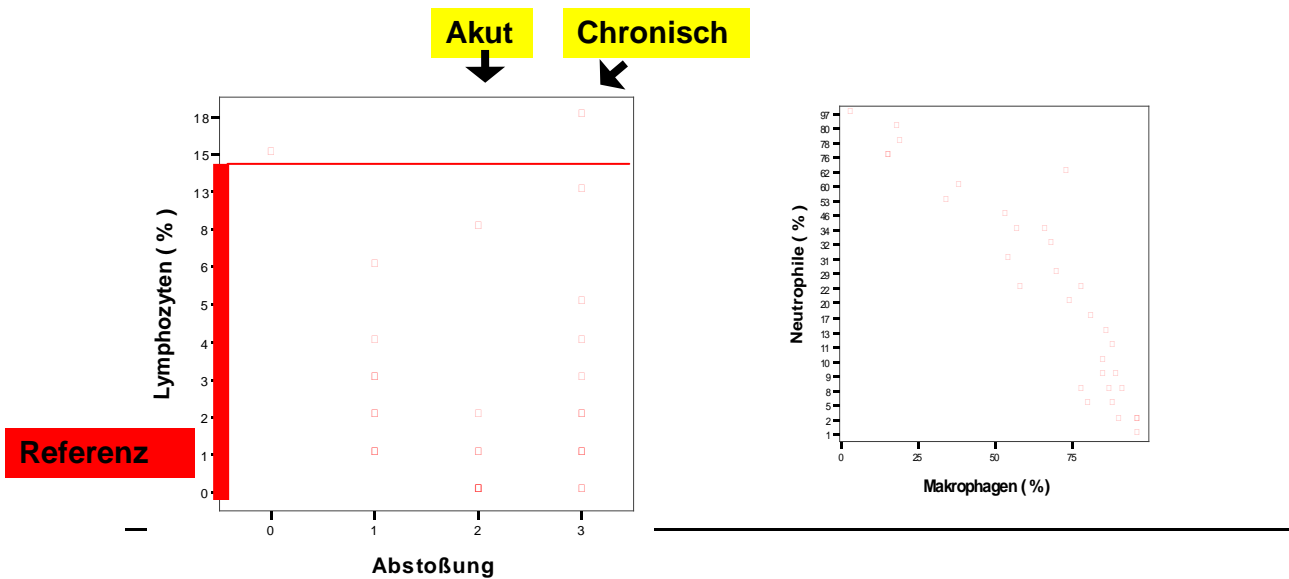


Abb. 32b: Graphische Darstellung der Zelltypen im Zusammenhang mit dem Abstoßungsgrad: 1, 2 und 3 entspricht den Gruppen I, II und III des Patientenkollektivs. Ferner ist das Verhalten der Neutrophilen bzw. der Makrophagen aufgetragen. Mit steigendem Abstoßungsgrad kann keine Zunahme der Lymphozyten (prozentual von der Lavagezytologie) beobachtet werden. Dagegen kann die oben erwähnte negative Korrelation der Neutrophilen und Makrophagen auch graphisch bewiesen werden. Referenz = Referenzbereich, in dem die Neutrophilen oder Makrophagen physiologisch liegen (jeweils prozentual von der Lavagezytologie)

Weiterführend zeigte sich, dass bei einem positiven mikrobiologischen Erregernachweis keine deutliche Korrelation (Korrelation nach Pearson von -0,424 bei Signifikanzniveau $< 0,05$) mit einer Zunahme der Makrophagen, aber eine mäßige Korrelation (Korrelation nach Pearson von 0,508 bei Signifikanzniveau $< 0,05$) mit einer Zunahme der Neutrophilen zu beobachten war.

Mittels Partialkorrelation wurde untersucht, ob der Zusammenhang dieser beiden Merkmale „echt“ oder durch ein Drittmerkmal erklärt werden kann (Scheinkorrelation).

Bei vorliegender Kontrollvariable „Mikrobiologie“ korrelierten Neutrophile negativ mit den Makrophagen, d.h. bei zunehmender Neutrophilenzahl sinkt die Makrophagenzahl. Somit konnte eine Scheinkorrelation ausgeschlossen werden (Korrelation nach Pearson von -0,943, Signifikanzniveau $< 0,05$).

Bei vorliegender Kontrollvariable „Mikrobiologie“ korrelierte ein zunehmender Abstoßungsgrad mäßig mit einer steigenden Neutrophilenzahl. Somit konnte eine Scheinkorrelation bei sich nur diskret unterscheidenden Korrelationskoeffizienten weitestgehend ausgeschlossen werden (Korrelation nach Pearson von 0,400 im Vergleich zu 0,527 ohne Kontrollvariable, Signifikanzniveau $< 0,05$).

Zusammenfassend kann mit steigendem Grad der Abstoßung eine Zunahme der neutrophilen Granulozyten bei einer Abnahme der Makrophagen beobachtet werden.

4. Diskussion

Lungentransplantationen haben sich im Laufe der letzten Jahrzehnte zu einer etablierten Therapie im Rahmen terminaler Lungenerkrankungen entwickelt.

Im Vergleich zu anderen soliden Organtransplantationen besteht jedoch eine niedrige 5-Jahres-Überlebensrate zwischen 43,1 bis 54.1%. Ursache hierfür ist neben Infektionen, Transplantatversagen oder kardiovaskulärem Versagen insbesondere die Bronchiolitis obliterans als Manifestation der chronischen Abstoßungsreaktion.

Goldstandard der Abstoßungsdiagnostik ist die transbronchiale Biopsie, die für die akute Abstoßung eine Spezifität zwischen 90-100% und eine Sensitivität von 77-84% aufweist. Bei der chronischen Abstoßung liegt eine Spezifität von 94% bei einer Sensitivität von 17-82% vor. Die geringe Sensitivität der TBB für die Bronchiolitis obliterans liegt in der Fokalität der Veränderung.

In der Diagnostik der Abstoßung nach Lungentransplantation mittels transbronchialer Biopsie zeigen sich trotz definierter histopathologischer Kriterien Schwierigkeiten in der Differenzierung zwischen einer akuten Abstoßungsreaktion, einer Infektion (insbesondere viral) und eines sich in der Frühphase nach Transplantation manifestierenden Ischämie-Reperfusionsschadens.

Der Langzeitverlauf nach Lungentransplantation ist entscheidend durch die Entwicklung der chronischen Abstoßungsreaktion bzw. der Bronchiolitis obliterans und der damit verbundenen respiratorischen Insuffizienz limitiert. Die Pathogenese der Bronchiolitis obliterans ist bisher unvollständig geklärt, es existieren bislang keine Parameter einer möglichen Früherkennung der BO, das Risiko der BO-Entwicklung ist hoch und die therapeutischen Optionen bei eingetretener BO sind äußerst beschränkt.

Vor diesem Hintergrund erfolgte die Etablierung einer cDNA-Microarray-Technologie mit dem Ziel der Detektion von typischen Genexpressionsmustern bei der akuten und chronischen Abstoßungsreaktion.

4.1 cDNA-Microarray-Technologie

Durch die Entschlüsselung des menschlichen Genoms und einer großen Zahl bekannt gewordener humaner DNA- und mRNA-Sequenzen findet die cDNA-Microarray-Technologie beispielsweise bei onkologischen Fragestellungen im Hinblick auf Karzinogenese, frühe Detektion von Neoplasien, Tumorklassifizierung

(Segal et al, 2004 sowie Macoska, 2002) oder beispielsweise bei „genomweiten“ Genexpressionsrecherchen (Pollack et al, 1999) vermehrt Anwendung.

Neben einem quantitativen Monitoring von Genexpressionen mittels Microarrays (Schena et al, 1995), sprach Lockhart et al, 2000, von einer „fishing expedition“, die es erlaubte Gensequenzen spezifisch und präzise zu detektieren.

Durch die Etablierung eines maßgeschneiderten in-house fabrizierten cDNA-Microarrays (Cheung et al, 1999) wurde eine übersichtliche und speziell auf die allogene Lungenschädigung nach Transplantation fokussierte Genanalyse angestrebt, die kosteneffektiv und bezüglich des Designs und der Fragestellung modifizierbar war. Unter Verwendung von cDNAs sollte eine höhere Spezifität und Sicherheit erlangt werden, zumal komplexere Gensequenzen im Vergleich zu kürzeren Oligonukleotiden eine unspezifische „Cross-Hybridisierung“ zwischen verwandten und strukturähnlichen Genen minimieren sollten.

Es erfolgte eine sorgfältige Auswahl der cDNA-Klone nach vorher festgelegten Einschlusskriterien, um eine erhöhte Sicherheit und Validität zu erzielen. Nach Sequenzvalidierung erfolgte eine weitere Selektierung für eine qualitativ möglichst hochwertige Güte der cDNA und ihrer PCR Produkte.

Vorversuche zeigten, dass eine Sequenzvalidierung eine absolute Notwendigkeit darstellt, da ein Prozentsatz von 22,2 der Klone nicht das angegebene Insert mit entsprechender Nukleotidsequenz enthielt.

Neben der Möglichkeit, cDNA in Vektoren kloniert, auf Slides zu spotten, können auch PCR Produkte verwendet werden. Diese sind leichter herzustellen, weisen spezifische Bindungseigenschaften auf, stellen nicht das Problem der Plasmidstereometrie dar und können bei Gewinnung über Vektoren Vorteile aufweisen, da Vektorprimer spezifischer binden können (Bailey et al, 2002).

Für zukünftige Microarrays erscheint diese Technik die effizientere und unkompliziertere Methode zu sein.

Die Beschichtung der Glasslides vollzog sich nach etabliertem Protokoll. Die Poly-L-Lysin Beschichtung der Slides mit positiv hydrophober Oberfläche könnte mit einem negativen Polymer in Form des 3xSSC/1,5 M Betain, das die zum Spotten vorbereiteten cDNAs enthält, interagieren. Im Rahmen der Etablierung und der retrospektiven Betrachtung wurde die These aufgestellt, dass Betain das Poly-L-Lysin lösen könnte, in Randbereiche des Spots transportieren und dort zur

Akkumulation führen kann. Folglich konnten vereinzelt rote konzentrische ringförmige Strukturen beobachtet werden, die unter dem Risiko eines unspezifischen Signals von der Analyse ausgeschlossen worden sind.

Durch Betain kann auf der anderen Seite die Bindungseffizienz der PCR Produkte auf Poly-L-Lysin erhöht werden, unspezifische Bindungen reduziert und homogenere Spots erzeugt werden (Diehl et al, 2001). Diese Interaktionen im Rahmen eines dynamischen Systems müssen beachtet und durch ausreichende cDNA-Konzentrationen optimiert werden. Um systemische Fehler und intermittierende Störfaktoren wie inhomogene Slidebeschichtungen mit Poly-L-Lysin, variierende Spotmorphologien oder Hintergrundintensitäten zu eliminieren, erfolgte zudem eine manuelle Kontrolle der Spots und des Arrays nach Etablierung und Optimierung des Gesamtsystems.

Ferner wurden alle homogen beschichteten Glasslides vor dem Spottingvorgang erneut evaluiert und ggfs. selektiert.

Nach etablierten Spottingparametern in Form der Spottinggeometrie und Array-Designs sowie der gerätespezifischen definierten Konfiguration mit Einstellung der Pins wurden insbesondere auch Feinjustierungen der Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit vorgenommen, um eine gleichmäßige Spotmorphologie zu erreichen. Um untereinander vergleichbare Arrays zu erhalten, wurden nur in einer Spottingsitzung hergestellte Microarrays verwendet und ausgewertet. Dies erscheint sinnvoll, da Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit einen erheblichen Einfluss auf die Qualität der Spots ausüben. Durch Auswirkung dieser Parameter auf die Oberflächenspannung ist die Größe und Morphologie der Spots variabel, beispielsweise führt eine zu hohe Luftfeuchtigkeit zu einem zu großen Spotdurchmesser mit möglicher unregelmäßiger Morphologie (Hedge et al, 2000).

Es gelang, einen maßgeschneiderten cDNA-Microarray zu entwerfen, der im Sinne klinisch orientierter Fragestellungen modifizierbar und zudem in der Herstellung kostengünstig bleibt.

Dennoch ist die cDNA-Microarray-Technologie trotz standardisierten Untersuchungsbedingungen nur eine semiquantitative Untersuchung, die einen direkten quantitativen Vergleich nur bei Spots des gleichen Gens sowie des gleichen

Arrays erlaubt. Eine weitere Validierung mittels PCR, RT-PCR, Westernblot oder Immunhistochemie ist notwendig.

4.2 BAL-Proben des zu untersuchenden Patientenkollektivs

Die Charakterisierung des Probenkollektivs erfolgte gemäß den histopathologischen Kriterien der ISHLT sowie klinisch definierten Kriterien zum Ausschluss einer BO nach Gewinnung einer transbronchialen Biopsie mit korrespondierender bronchoalveolärer Lavage.

Die Aufarbeitung und Selektion der BAL-Proben gestaltete sich schwierig, der relativ hohe Ausschluss der Patientenproben war zunächst durch geringe Mengen an extrahierter mRNA aus den Zellen der BAL bedingt.

Mögliche Gründe für eine geringe Menge an extrahierter mRNA bestehen in der schwierigen Gewinnung von qualitativ und quantitativ hochwertiger RNA im Rahmen der BAL bei teils schlechtem klinischen Allgemeinzustand der lungentransplantierten Patienten. Neben der Gewinnung von intakter RNA in ausreichendem Maße sind sofortige weitere Aufarbeitungsschritte zur Konservierung und Vermeidung einer relevanten RNA-Degradierung erforderlich. Auch im Rahmen von notwendigen Zentrifugations-, Reinigungs- und Aufarbeitungsmaßnahmen sind weitere Einflußfaktoren wie Temperaturschwankungen, Zeitverzögerungen in der Weiterverarbeitung oder Kontroll- und Mengenmessungen entscheidend für die Stabilität der RNA.

Bei teils schwer zu erreichenden terminalen Bronchiolen und methodischen Limitierungen sollte jedoch auch die klinische Gesamtkonstellation beachtet werden. Durch sterile Filtration und Zentrifugation wurde eine Selektion von gereinigten und resuspendierten Zellen angestrebt. Sämtliche Arbeitsvorgänge im Labor wurden auf Eis in gekühltem Medium durchgeführt, die Probenlagerung erfolgte stets bei -80° C. Es erfolgte der übliche Einsatz RNase freier Medien. Nach kitspezifischer Zellyse erfolgte eine Homogenisierung der RNA, Senkung der Lysatviskosität und Ethanolverdünnung für eine bestmögliche Gewinnung und Selektion von extrahierter, gereinigter RNA. Eine lineare Amplifikation wurde angeschlossen.

Neben standardisierter Gewinnung der BAL könne eine Kryopreservation der Zellen evaluiert werden bzw. modifizierte Aufarbeitungen der Zellen unter Beachtung der erwähnten Störfaktoren erfolgen.

Aufgrund der niedrigen Extraktionsmenge wurde auf eine initiale Integritätskontrolle der mRNA verzichtet, zumal durch die lineare Amplifikation eine Selektion von intakter RNA angestrebt wurde.

Da eine intakte mRNA Voraussetzung für die amplifizierte aRNA ist, könnte eine geringe cDNA-Ausbeute durch teils degradierte mRNA bedingt gewesen sein. Degradierte bzw. größenreduzierte mRNA stellt wenig „templates“ für die lineare Amplifikation dar. Nach selektierter Probengüte erfolgte nach linearer Amplifikation die Fluoreszenzmarkierung gemäß Protokoll.

Nach komparativer Hybridisierung und Einlesung des Microarrays via Laserscanner erfolgte die statische Datenanalyse und Auswertung.

Der programmierte GAL-File gewährleistete eine spotspezifische Zuordnung zum entsprechenden Gen.

Die Vielzahl der exprimierten bzw. regulierten Gene im Transplantationsgeschehen der Lunge wurde zunächst nach Anwendung der Qualitätskriterien den verschiedenen Gengruppen zugeteilt, relative und definitive Expressionen selektiert und weiterführend bearbeitet und analysiert.

Neben Prüfung auf Signifikanz zwischen den einzelnen Gruppen wurden Validierungsverfahren mittels RT-PCR und Immunhistochemie durchgeführt und mit den Microarrayergebnissen korreliert.

4.3 Genexpressionsanalyse

4.3.1 Genexpressionen bei der akuten Transplantatabstoßung

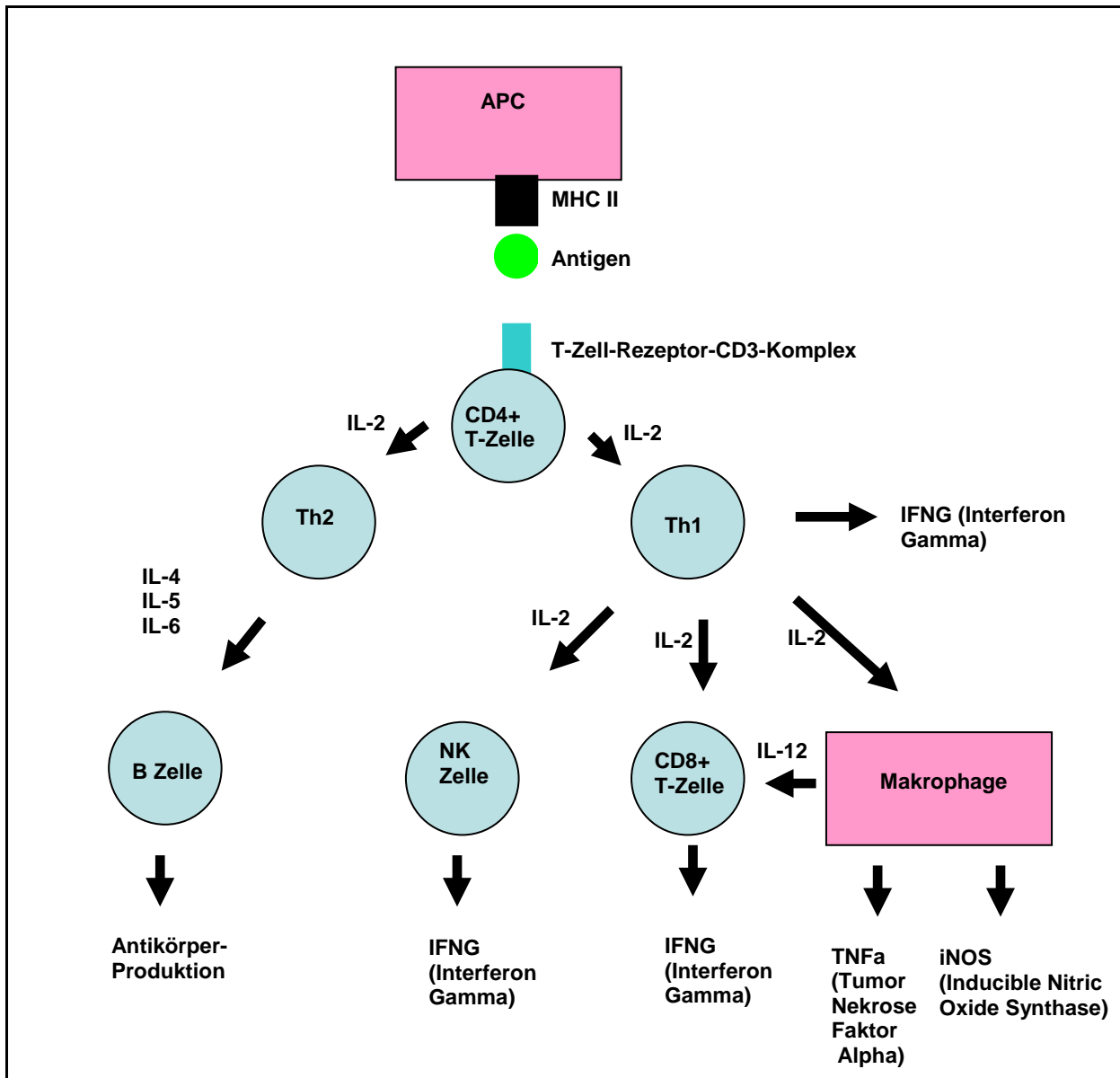


Abb. 33: Modell der akuten Abstoßung: Antigenpräsentation und Interaktion mit einer CD4+ T-Zelle. Konsekutive Signalkaskade unter Teilnahme folgender Zellen (APC: Antigen präsentierende Zelle, MHC: Major Histocompatibility Complex, NK-Zelle: Natürliche Killerzelle, IL-2: Interleukin 2, Th1/Th2: T-Helferzelle Typ 1 bzw. 2). (nach Banner NR, Polak JM, Yacoub MH, Lung Transplantation, S.189, Cambridge University Press, 2003).

Vor dem Hintergrund der bekannten immunologischen Vorgänge (Abb. 33) im Rahmen der akuten Abstoßung mit Aktivierung einer Signalkaskade ist bei der akuten Transplantatabstoßung der Lunge eine Vielzahl von immunologischen Faktoren beteiligt.

In der Microarrayanalyse zeigten sich im Rahmen der akuten Abstoßung mäßige charakteristische Genexpressionsmuster.

LTB als **inflammatorischer Faktor** deutete in der Microarray-Untersuchung auf eine mögliche, nicht signifikante Markerfunktion hin. Dies zeigte sich auch in der RT-PCR bei jedoch zusätzlich vorhandener Expression in der Gruppe I.

Die Sekretion von LTB erfolgt durch aktivierte Lymphozyten, die eine Schlüsselrolle im Abstoßungsprozess spielen. In einer Arbeit von Gimino et al, 2003, wurden neben bekannten Expressionen der Immunantwort bei akuter Abstoßung Expressionen von LTB beobachtet und beschrieben.

Auch vor dem Hintergrund der physiologischen Funktion als modulierender Faktor der Immunantwort könne eine Rolle bei der akuten Abstoßung denkbar sein.

Für die **Leukozytenadhäsion** zeigte sich **Sele** als ein nicht signifikanter Marker in der Microarray-Studie für die akute Abstoßung, der auch in der RT-PCR bestätigt und validiert werden konnte.

Sele wird von den Endothelzellen gebildet. Die funktionell vermittelte Leukozytenmigration könnte bei der akuten Abstoßung die vermehrte Beteiligung von Lymphozyten unterstützen. Sele wurde mit der akuten Abstoßung und der Entwicklung zur BO assoziiert und als denkbarer Leukozytenadhäsionsmarker am Endothel des Transplantates beschrieben (Shreeniwas et al, 1996). Eine früh induzierte Parenchymschädigung wäre zudem denkbar, da dies bei akuten Schädigungen der Lunge beschrieben wurde (Mulligan et al, 1992).

In der Gruppe der **Lymphopoese, Lymphozytendifferenzierung und T-Zell-Antwort** zeigte sich eine mögliche, nicht signifikante **IL-18** Expression in der Gruppe der akuten und chronischen Abstoßung, die aber nicht mittels RT-PCR validiert werden konnte.

IL-18 als immunregulatorisches Zytokin induziert die Expression von IFNG, das wiederum im Zusammenhang mit T-Zellen und natürlichen Killerzellen im Rahmen der akuten Abstoßung bekannt ist (Abb. 33). Eine Rolle in der Transplantatabstoßung wäre denkbar, obgleich Ericson et al, 2004, keinen signifikanten IL-18-Nachweis in der BAL bei der akuten Abstoßung fand.

Die aus der Entwicklungsbiologie stammenden und als Transkriptionsfaktoren beschriebenen Hox-Gene zeigten mit Hox-A2 und Hox-C10 eine Expression in der

akuten Abstoßungsgruppe. Da die Mehrzahl der Hox-Gene im Rahmen der chronischen Abstoßung diskutiert werden, sei hier auf 4.3.2 verwiesen.

In der Literatur wurde weiterführend eine Beteiligung von IFNG, IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8 und IL-10 in der akuten Abstoßungsreaktion beschrieben (Tilney et al, 1991 sowie Whitehead et al, 1993 sowie Iacono et al, 1997 sowie Magnan et al, 1996 sowie Moudgil et al, 1999 sowie Zeevi et al, 2001 sowie Gimino et al, 2003).

IL-15, Granzym B (Shi et al, 2004), Perforin (Li et al, 2001 sowie Gimino et al, 2003) und Rantes wurden ebenso als relevante Mediatoren beschrieben. IL-15 imponierte in bronchoalveolärer Lavage im Rahmen der akuten Abstoßung (Sangeeta et al, 2007). In transbronchialen Biopsien konnte eine Expression von Rantes bei akuter Abstoßung gezeigt werden. Ferner wurde Perforin eine duale Funktion im Sinne einer zytolytischen Aufgabe bei der akuten Abstoßung und einer möglichen „Downregulation“ der CD4- und CD8-vermittelten Immunantwort zugewiesen (Bittmann et al, 2004).

In der vorliegenden Microarray-Untersuchung konnten nicht signifikante oder nicht für die akute Abstoßung spezifische Genexpressionen von IL-1beta, IL-7 und IL-8, IL-15, Perforin oder Rantes beobachtet werden. Die Expression von Rantes in transbronchialen Biopsien bei fehlender Detektion von Rantes in der BAL via Microarrayanalyse könnte auch durch das unterschiedliche Lungenkompartiment bedingt sein. Ein direkter Vergleich der histopathologischen Befunde mit den zytopathologischen Ergebnissen der BAL ist nicht möglich.

In einer Arbeit von Gimino et al, 2003 wurden bei der akuten Abstoßung Expressionen von Genen der Apoptose, u. a. des Regulatorgen der Fas-induzierten Apoptose vorgestellt. Microarray Untersuchungen bei Nierentransplantationen veranschaulichten ebenfalls eine relevante Beteiligung von FAS und Perforin bei akuten Abstoßungsreaktionen (Sarwal et al, 2001).

In der vorliegenden Untersuchung ließ sich dagegen eine nicht signifikante Microarray-Expression von FAS dokumentieren. Neben der Beteiligung bei der Apoptose ist FAS ferner in Zusammenhang mit der Tumorgenese beschrieben worden (Zhang et al, 2005).

Zusammenfassend zeigten sich im Rahmen der akuten Abstoßung nur wenige mögliche Markergene bei überwiegend unspezifischen Genexpressionen. Ein Nachweis weiterer in der Literatur beschriebenen relevanten Faktoren für die akute Abstoßung konnte nicht in allen Fällen erbracht werden. Das unterschiedliche Kompartiment der transbronchialen Biopsie und der BAL könnte hierbei Einfluss nehmen. Dennoch konnten in der Literatur beschriebene Expressionen von LTB₄, Sele oder SDF in der Microarrayanalyse detektiert und ebenfalls dokumentiert werden.

4.3.2 Genexpressionen bei der chronischen Transplantatabstoßung

Im Vergleich zur akuten Abstoßung konnten zahlreichere Genexpressionen bei der Bronchiolitis obliterans detektiert werden.

In der Gruppe der **Wachstumsfaktoren** zeigten die Matrixmetalloproteinasen eine erhöhte Expression in der Microarrayanalyse in der Gruppe III mit chronischer Transplantatabstoßung.

MMP-9 zeigte in der Microarrayanalyse eine erhöhte Expression in Gruppe II (akute Abstoßung) mit einer noch stärkeren Expressionszunahme in der Gruppe III (chronische Abstoßung). Immunhistochemisch bestätigte sich ein Nachweis von MMP-9 in Gruppe II und III und korrelierte mit dem Microarray, jedoch zeigte sich ebenso in Gruppe I (keine Abstoßung) ein immunhistochemischer Nachweis.

MMP-9 spaltet als Typ IV Kollagenase das Kollagen der extrazellulären Matrix und wird von Alveolarmakrophagen und Granulozyten produziert.

MMP-9 wurde als möglicher Marker für die BO-Detektion sowie in prädiktiver Funktion für die Entwicklung einer BO beschrieben. MMP-9 könnte eine Schlüsselrolle im Remodelling-Prozess bei der Bronchiolitis obliterans haben (Taghavi et al, 2005). Die Beteiligung im Remodelling-Prozess wurde ferner bei entzündlichen Veränderungen der Lunge festgestellt (Kelly et al, 2000). Bei einem fibroproliferativen Prozess bei der BO begünstigt ein Protease-Antiprotease-Ungleichgewicht den Umbauprozess (Remodelling). Ein pathogenetischer Zusammenhang von MMP-9 und der BO wurde darüber hinaus auch am Tiermodell nachgewiesen und beschrieben (Eerola et al, 2005).

Dennoch zeigte sich immunhistochemisch ein nicht vollständig deckungsgleiches Proteinexpressionsprofil, das besonders eine zusätzlich ausgeprägte Manifestation in der Gruppe I zeigte. Dies muß erneut vor dem Hintergrund des unterschiedlichen Kompartiments der BAL und der TBB betrachtet werden.

In der Microarray-Untersuchung deutet auch **MMP-1** auf einen möglichen BO-Marker hin, der in der Gruppe III (chronische Abstoßung) signifikant am stärksten exprimiert wird. Anzumerken ist aber auch hier, dass auf Proteinebene teils stärkere Expressionen in Gruppe I und II vorliegen als auf Genexpressionsebene. Ähnlich wie MMP-9 baut MMP-1 interstitielles Kollagen ab und wird beim Remodelling-Prozess sowie in der Pathogenese der COPD (Joos et al, 2003) beschrieben. Ein analoge funktionelle Beteiligung in der Pathogenese der BO ist somit möglich.

TIMP-1 zeigte in der Microarray-Untersuchung eine wesentlich geringere Expression in der Patientenprobe als in der Kontrollprobe, der physiologischen Lungen-RNA-Vergleichsprobe bei der komparativen Hybridisierung. Immunhistochemisch zeigte sich der niedrigste TIMP-1-Nachweis in der BO-Gruppe.

TIMP-1 ist ein wichtiger Modulator der Aktivität der interstitiellen Kollagenasen und wird von Thrombozyten und Alveolarmakrophagen sezerniert (Carmichael et al, 1986).

MMPs und TIMPs wurde eine komplexere, nicht näher definierte Rolle in der Immunpathogenese der chronischen Transplantatabstoßung zugeteilt, es könnte weiterführende Funktionen neben dem Remodellingprozess geben (Yoshida et al, 2007). Vor diesem Hintergrund könnte eine erhöhte Expression der MMPs plausibel mit einer verminderten Expression ihres Inhibitors TIMP einhergehen. In diesem Zusammenhang wurde auch eine Korrelation von MMP-9 mit einer verminderten Expression von TIMP-1 mit der Beeinflussung des Migrationsverhalten von dendritischen Zellen beschrieben (Osman et al, 2002).

FN-1 wies ein erhöhtes Expressionsmuster bei der chronischen Abstoßungsreaktion in der Microarray-Untersuchung auf, welches bestätigt und mittels Immunhistochemie validiert werden konnte.

Fibronectin-1 ist im Rahmen der Zelladhäsion als Glykoprotein auf Fibroblasten nachgewiesen und stimuliert ferner Endozytosevorgänge. Eine Regulation durch Integrine, wie Fibronectin, wurde bei Herztransplantaten im Tiermodell gefunden, bei

denen es gelungen war, durch Blockade des Fibronectins fibroproliferative Vorgänge in den Koronararterien zu modulieren (Molossi et al, 1995). Konsekutiv könnte eine Rolle im fibroproliferativen Prozess der Bronchiolitis obliterans relevant sein.

PDGFB zeigte mittels Microarray eine relative Expression in der Gruppe III (chronische Abstoßung). Eine weitere Validierung wurde nicht durchgeführt.

PDGF wurde mit dem fibroproliferativen Prozess der BO assoziiert, möglicherweise bestehe schon im frühem Stadium einer BO eine erhöhte Expression von PDGF (Hertz et al, 1992 sowie Kallio et al, 1999 sowie Lu et al, 2006).

Eine beschriebene IGF1-Expression in der BAL bei BO (Charpin et al, 2000) sowie eine VEGF-Expression bei der BO (Lu et al, 2006) konnte nur als nicht signifikante Expression via Microarray ohne weitere Validierung beobachtet werden.

Dagegen zeigten sich signifikante Expressionen von GM-CSF und Serpina-1 in der Microarray-Untersuchung. Eine weiterführende Validierung erfolgte nicht. GM-CSF wird neben T-Zellen auch von Makrophagen und Fibroblasten gebildet. Serpina-1 wird als Proteinaseinhibitor in den Hepatozyten synthetisiert und steht im Zusammenhang mit der Entwicklung eines Lungenemphysems sowie einer Leberzirrhose. Ballinger et al, 2008, beschrieben eine paradoxe und komplexe Regulation von GM-CSF nach Knochenmarktransplantation.

Insgesamt imponierten mehrere exprimierte Wachstumsfaktoren bei der BO, die auf einen Einfluss in der Pathogenese und den fibroproliferativen Prozess deuten.

TNFa in der Gruppe der **inflammatorischen Faktoren** konnte signifikant exprimiert in der Gruppe der chronischen Abstoßung dargestellt werden. Eine weitere Validierung wurde nicht durchgeführt.

TNFa als zentrales proinflammatorisches Zytokin wird von Makrophagen und Lymphozyten sezerniert und ist bei einer Vielzahl von Erkrankungen, ferner auch bei der Transplantatabstoßung und der Bronchiolitis obliterans involviert (Lu et al, 2006). Ferner beschrieben Estenne et al, 2002, eine mögliche Beteiligung der inflammatorischen Faktoren TNFa (Lu et al, 2006), IL-6 (Scholma et al, 2000 sowie Zheng et al, 2000 sowie Lu et al, 2002), IL-10, Neutrophilen Elastase (Estenne et al, 2002) sowie IL-8 als Schlüsselmediator in der Pathogenese der BO (Elssner et al, 2000 sowie Zheng et al, 2000).

LTB zeigte eine nicht signifikante Expression im Microarray, diese konnte bei der Validierung mit RT-PCR bestätigt werden, dennoch fanden sich in der RT-PCR auch Expressionen in Gruppe I und II.

LTB wird durch aktivierte Lymphozyten aktiviert und moduliert die Immunantwort. Expressionen wurden im Zusammenhang mit der akuten Abstoßung (Gimino et al, 2003) sowie mit der Bronchiolitis obliterans (Lu et al, 2006) diskutiert.

IL-12A zeigte in der Microarray-Untersuchung eine mögliche, nicht signifikante Expression, die sich auch in der RT-PCR widerspiegelte.

IL-12A hat eine zentrale Funktion in der Immunantwort und wird von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gebildet. IL-12A induziert IFNG, dessen Rolle im Rahmen der Abstoßung bekannt ist. Erhöhte IL-12A Expressionen wurden bereits im Rahmen der Bronchiolitis obliterans beobachtet und beschrieben (Lande et al, 2007 sowie Meloni et al, 2004).

SDF aus der Gruppe der **Lymphopoese, Lymphozytendifferenzierung und T-Zell-Antwort** konnte vor allem in der Gruppe der chronischen Abstoßung nicht signifikant exprimiert mittels Microarray detektiert werden. Immunhistochemisch konnte dies bestätigt und validiert werden.

SDF wird von den Stromazellen des Knochenmarks exprimiert und ist als Chemoattractant von Lymphozyten bekannt (Bleul et al, 1996). SDF wurde in der späten Phase der akuten Abstoßung eine Rekrutierungsfunktion von neutrophilen Granulozyten zugeschrieben. SDF könnte sowohl in der inflammatorischen Antwort bei akuter Abstoßung sowie bei Reparaturvorgängen des Gewebes beteiligt sein (Petty et al, 2007). Neben einer möglichen Beteiligung in der akuten Transplantatabstoßung könnte eine SDF-Expression Auswirkungen auf die Bronchiolitis obliterans haben bzw. eine additive Rolle im Rahmen der chronischen Abstoßung spielen.

Allgemeine Entzündungsmediatoren spielen eine teils kontrovers diskutierte Rolle. **eNOS** und **iNOS** zeigten in der Microarray-Untersuchung eine signifikante Expression in Gruppe III. Immunhistochemisch korrelierte dieses Expressionsmuster, ein semiquantitativer Nachweis zeigte sich aber auch in den beiden anderen Gruppen.

eNOS und iNOS synthetisieren NO in den Endothelzellen und regulieren indirekt den Vasotonus.

Während eNO (exhaled nitric oxide) und iNOS eine vermehrte Expression bei BO aufwiesen und möglicherweise bei gesteigertem eNO auch eine zunehmende Neutrophilie besteht (Gabbay et al, 2000), gibt es Studien, die eNO nur variabel mit der BO assoziiert sehen (Verleden et al, 1998). Erhöhtes iNOS wurde bei BO ebenso in einer Studie von McDermott et al, 1997, beschrieben, ferner auch in Korrelation mit einer Neutrophilie (Gabbay et al, 1999 sowie Mason et al, 1998).

In der Gruppe der **Hox-Gene** zeigten sich signifikante Microarray-Expressionen bei der chronischen Abstoßung von **Hox-A1, Hox-B5 und Hox-B13** sowie nicht signifikante Microarray-Expressionen von **Hox-A2** oder **Hox-C10**.

Hox-A2 konnte nur neben einer Expression in Gruppe I in der RT-PCR bestätigt werden, **Hox-A4** konnte via RT-PCR validiert werden und zeigte somit eine gute Korrelation der Ergebnisse.

Hox-Gene stammen aus der Entwicklungsbiologie, fungieren als Transkriptionsfaktoren und gelten als morphologische Regulatoren in der Embryogenese und Onkogenese. Hox-Gene wurden im Zusammenhang mit Ovarial- und Mammakarzinomen diskutiert (Chariot et al, 1996; Raman et al, 2000; Cheng et al, 2005).

Ferner werden Hox-Gene bei der Entstehung von Leukämien im Kindesalter diskutiert (van Scherpenzeel et al, 2005). Insgesamt kann bei Betrachtung der Hox-Gene und ihrer beschriebenen Funktionen ein heterogenes und vielfältiges Genprofil beobachtet werden. Eine Funktion der modulierenden Transkriptionsfaktoren im Zusammenhang mit dem Remodelling-Prozess oder den inflammatorischen Pathways bei Lungentransplantatabstoßung wäre denkbar.

Ein konträres Expressionsmuster wiesen die **Surfactant Proteine** auf, die eine relativ homogene Unterexpression via Microarray bereits nach Transplantation, bei der akuten und chronischen Transplantatabstoßung aufwiesen. Eine weiterführende Validierung wurde nicht durchgeführt.

Pulmonales Surfactant agiert über eine Senkung der Oberflächenspannung und verhindert ein Kollabieren der Alveolen. Eine Beteiligung bei inflammatorischen sowie immunologischen Prozessen ist bekannt, eine Rolle in der Pathogenese der

idiopathischen Lungenfibrose (Selman et al, 2003) sowie den interstitiellen Lungenerkrankungen wurde diskutiert (Rosen, 2005).

Eine Reduktion der Expression von Surfactant Protein A in der bronchoalveolären Lavage konnte bei Meloni et al, 2007, bereits früh nach Transplantation mit häufiger Persistenz bei BO-Patienten beobachtet werden. Diese Beobachtung wurde durch das Expressionsmuster via Microarray bestätigt.

Zusammenfassend zeigten sich bei der chronischen Abstoßung erhöhte Expressionen von inflammatorischen Genen (TNFa, LTB, IL-12A) und allgemeinen Entzündungsmediatoren (iNOS, eNOS). Insbesondere mehrere Wachstumsfaktoren (MMP-1, MMP-9, Fibronectin-1, TIMP) imponierten in Form erhöhter Expressionen und könnten in der Pathogenese sowie dem Remodelling-Prozess bei der chronischen Abstoßung im Sinne der Bronchiolitis obliterans eine Rolle spielen.

Hox-Gene (Hox-A1, Hox-A4) bilden interessante und näher zu evaluierende Expressionsprofile bei der chronischen Abstoßung.

Die Ergebnisse müssen vor dem Hintergrund des unterschiedlichen Kompartiments zwischen BAL und TBB gesehen werden.

4.3.3 Heterogenität der Expressionsmuster und kritische Betrachtung der Validierung

Ein teils beobachteter geringer Unterschied der Expressionen zur Gruppe 1 (günstiger Verlauf nach Transplantation ohne Vorliegen einer akuten oder chronischen Transplantatabstoßung) sollte vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass bereits in Gruppe I ein Zustand nach Lungentransplantation vorliegt und etwaige Gene bereits in diesem Stadium unterschwellig exprimiert sein könnten. Eine vermehrte Genexpression könnte schlussendlich zu einer klinischen Manifestation der Abstoßung führen.

Bei einer Vielzahl von regulierten Genen ist eine Abgrenzung zwischen den Patientengruppen nicht klar möglich und führt folglich zu unspezifischen Genexpressionsmustern, die eine mögliche Beteiligung an der Abstoßungsreaktion andeuten, im Sinne einer diagnostischen oder therapeutischen Wegweisung aber weniger bedeutsam sind.

Eine Heterogenität der Expressionen innerhalb einer Gruppe könnte neben unterschiedlichen immunsuppressiven Pharmaka und ihrer Serumkonzentration, verschiedenen Stadien der akuten Abstoßung bzw. BO auch durch eine in der Vorgeschichte bereits stattgefundene akute Abstoßung bedingt sein, nach der

etwaige Expressionsmuster möglicherweise persistieren. Ferner hat die dargelegte unterschiedliche Probengüte und konsekutiv teils erschwerte Verarbeitung der entsprechenden Probe weiteren Einfluss auf das resultierende Expressionsmuster.

Da die Entwicklung einer BO mit akuten Abstoßungsepisoden korreliert, wird von manchen Autoren bei der BO von einem "ongoing immunological event" gesprochen (Trulock, 1997; Scott et al, 1991). Auch Vanaudenaerde et al, 2006, postulierte, dass die akute und chronische Abstoßung ein Kontinuum von inflammatorischen Ereignissen sein könnte.

Der Kompartimentswechsel zwischen Biopsie mit histopathologischer Beurteilung und BAL mit zytopathologischer Betrachtung nach Spülung des Bronchialsystems und Alveolarraumes ohne interstitielle Beteiligung ist ferner zu beachten.

Die Diagnostik mittels transbronchialer Biopsie wird neben den erwähnten differentialdiagnostischen Schwierigkeiten durch die Fokalität der chronischen Abstoßung mit teils geringer diagnostischer Sensitivität erschwert (Chamberlain et al, 1994). Anatomisch schwer zu erreichende terminale Bronchiolen sowie die klinische Gesamtkonstellation schwerst kranker Patienten limitiert die zur Verfügung stehende Anzahl an Biopsien. Die weniger invasiv durchzuführende BAL spiegelt bei Betrachtung des Bronchoalveolarraumes nicht das komplette Interstitium wieder.

Trotz unterschiedlicher Kompartimente bei transbronchialer Biopsie und BAL muß das Ziel verfolgt werden, insbesondere die BO möglichst früh zu erkennen vor dem Hintergrund des Transplantatüberlebens und folglichem Empfängerüberleben.

Im Rahmen anschließender Studien soll die Verwendung von bronchialen Bürsten im Vergleich zur BAL und transbronchialen Biopsie evaluiert werden.

Die Validierung vollzog sich durch etablierte immunhistochemische Nachweisverfahren sowie durch RT-PCR-Untersuchungen.

Bei einem direkten Vergleich der Immunhistochemie und des Microarrays muß die Proteinebene von der Ebene der Genexpression unterschieden werden. RNA-Expressionen sind nicht mit Proteinexpressionen gleich zu setzen, bei einer Proteinexpression muß beispielsweise keine erhöhte RNA-Expression vorliegen.

Limitierungen und die Kenntnis, dass die RNA Expression nicht immer mit der Proteinexpression korreliert, sind in Studien beschrieben (Anderson et al, 1997). Gründe für differierende Expressionen der RNA- und Proteinebene liegen in der posttranskriptionalen und posttranslationalen Modifikation. Es sind mehr als 200

verschiedene posttranslationale Modifikationen, wie mRNA Splicing, Glykosilierungen, Phosphorylierungen sowie proteolytisches Processing beschrieben worden (Krishna et al, 1993). Da diese Modifizierungen nicht durch genomische Analysen detektiert werden können, kann durch Anwendung der Proteomic versucht werden, diese molekulare Komplexität zu erfassen (Chen et al, 2002). Hier ist auch die Anwendung von Protein-Arrays weiterführend (Seong et al, 2003).

Durch die Etablierung einer RT-PCR wurde hingegen die Validation auf Genexpressionsebene durchgeführt. Bei der bereits erwähnten limitierenden Probengüte, insbesondere nach stattgehabter Microarray-Untersuchung, lagen auch hier zwei unterschiedliche methodische Anwendungen vor. Im Gegensatz zur RT-PCR wurde bei der Microarray-Analyse eine komparative Hybridisierung durchgeführt, die einen direkten Vergleich mit einer kommerziellen Kontrolle auf Spot- und Genebene erlaubte.

Ferner unterliegt die Effizienz einer RT-PCR zahlreichen Störfaktoren, wie etwa insuffizienten Primern und PCR Templates, variierender Proben- und Reagenzienkonzentrationen, Temperaturschwankungen oder der Bildung sekundärer Strukturen. Konsekutiv muß ein direkter Vergleich kritisch evaluiert werden.

Ferner soll eine komplementierende Immunlokalisation mittels Immunhistochemie und Westernblot angestrebt werden, um die RNA-Ebene weiterführend mit der Proteinebene zu vergleichen und zu verifizieren.

Durch die Validierung der Microarray-Ergebnisse konnten grobe Artefakte des Arrays ausgeschlossen werden, ein heterologes Expressionsmuster deutet möglicherweise auch auf eine komplexe Transplantatbiologie hin.

Methodenkritisch ist anzumerken, dass mit dem cDNA-Microarray ein reales System bzw. Tool mit diagnostischer Relevanz und mit klinischer Fragestellung vorliegt, das aber derzeit als Pilotprojekt noch Optimierungen bedarf. Eine Überprüfung an einem größeren Kollektiv wäre begründet und sinnvoll.

4.3.4 BAL-Zelldifferenzierung

In der BAL-Zelldifferenzierung zeigte sich ein mit zunehmendem Abstoßungsgrad einhergehender Anstieg der Neutrophilen sowie ein Abfall der Makrophagen. Diese Beobachtungen wurden vorbeschrieben (Lu et al, 2006). Unter Verwendung der

Partialkorrelation mit der Kontrollvariable Mikrobiologie konnte gezeigt werden, dass der Anstieg der Neutrophilen nicht durch eine Infektion bedingt war und auch das korrelierende Verhältnis der steigenden Neutrophilen und der abfallenden Makrophagen nicht durch einen mikrobiologischen Befund beeinflusst wurde. Dennoch muss beachtet werden, dass Patienten mit Bronchiolitis obliterans häufig eine zusätzliche Infektion bzw. positive Mikrobiologie aufweisen (Hosenpud et al, 1997). Infektionen sind auch durch immunsuppressive Pharmaka sowie durch die oben erwähnte Mukusretention bedingt.

Derzeit findet die Lavagezytologie keine Anwendung in der Diagnostik der akuten Abstoßung, da die in der Biopsie nachgewiesenen Lymphozyten in der BAL nicht adäquat repräsentiert werden. Auch wenn die BAL weniger invasiv als die Biopsie ist, kann sie möglicherweise aufgrund des unterschiedlichen Kompartiments in der akuten Abstoßungsdiagnostik nur eingeschränkt angewandt werden.

Dennoch wurden mögliche lymphozytäre Produkte wie beispielsweise Rantes, das im Rahmen der akuten Abstoßung bioptisch nachgewiesen wurde, in der BAL ebenfalls gefunden.

Hertz et al, 2001, wies den Fund von Makrophagen spezifischen Genen in der BAL und von Lymphozyten spezifischen Genen im peripheren Blut nach, und schlussfolgerte, dass beide Untersuchungen komplementäre Informationen bringen würden. Dies deutet auf eine möglicherweise gute Detektion von Makrophagen und ihren Genen in der BAL hin und favorisiert für den Nachweis von Lymphozyten und ihren Genen ein anderes Kompartiment wie Blut, die transbronchiale Biopsie oder etwa die bronchiale Bürste.

Bei Betrachtung der BAL bei Bronchiolitis obliterans hat sich gezeigt, dass bei quantitativ weniger Makrophagen dennoch eine spezifische Detektion von Wachstumsfaktoren und anderen Makrophagenprodukten gelingt. Gemäß Studienlage wurde ebenfalls von einer abnehmenden Zahl an Makrophagen bei Bronchiolitis obliterans berichtet. Eine trotz erniedrigter Makrophagen nachgewiesene vermehrte Expression belegt auch die hohe Sensitivität von cDNA-Microarrays (Taghavi et al, 2005 sowie Lu et al, 2006). Konsekutiv könnte die BAL in der chronischen Abstoßungsdiagnostik Anwendung finden.

Zusammenfassend ist die Diagnostik mit transbronchialer Biopsie Goldstandard bei Lungentransplantatabstoßung. Derzeit kann die BAL komplementäre Informationen

liefern, scheint aber in der chronischen Abstoßungsdiagnostik wegweisender als in der akuten Abstoßungsdiagnostik zu sein. In der BAL-Zelldifferenzierung konnte mit zunehmendem Abstoßungsgrad ein Anstieg der neutrophilen Granulozyten sowie ein Abfall der Makrophagen im untersuchten Patientenkollektiv festgestellt werden.

5. Zusammenfassung

Lungentransplantationen haben sich im Laufe der letzten Jahrzehnte zu einer etablierten Therapie im Rahmen terminaler Lungenerkrankungen entwickelt. Die 5-Jahres-Überlebensrate ist im Vergleich zu anderen soliden Organtransplantationen niedrig, Komplikationen nach Transplantation wie die akute Abstoßungsperiode, Infektionen oder die chronische Transplantatabstoßung, die mit einer hohen Mortalität einhergeht und den Langzeitverlauf entscheidend beeinflusst, sind wegweisend. Die Bronchiolitis obliterans, das histopathologisch definierte Korrelat der chronischen Abstoßung, erschwert Diagnostik und Therapie.

Derzeit stellt die transbronchiale Biopsie die Diagnostik der 1. Wahl für die akute und chronische Transplantatabstoßung dar, zeigt aber trotz klarer histopathologischer Kriterien Schwierigkeiten in der Differenzialdiagnose. Vor dem Hintergrund der ungeklärten Pathogenese der Abstoßungsreaktion, fehlender Früherkennungsparameter für die BO, dem großen Risiko der BO-Entwicklung sowie der beschränkten therapeutischen Optionen erfolgte die Etablierung einer cDNA-Microarray-Technologie mit dem Ziel der Detektion von typischen Genexpressionen bei der akuten und chronischen Abstoßungsreaktion.

Ein maßgeschneiderter cDNA Microarray mit 80 speziell im Interesse der allogenen Lungenschädigung stehenden Genen wurde konzipiert und etabliert. Genspezifische cDNA-Klone wurden nach PCR-Amplifikation auf eine Matrix mit einer computergesteuerten Robotertechnologie gespottet. Als Trägermaterial fungierte ein mit Poly-L-Lysin beschichtetes Glasslide. mRNAs, gewonnen aus bronchoalveolärer Lavage eines definierten Patientenkollektivs nach Lungentransplantation, wurden nach Fluoreszenzmarkierung in cDNA umgeschrieben, linear amplifiziert und komparativ mit einer physiologischen RNA der Lunge hybridisiert. Die Auswertung der spezifisch fluoreszierenden Gensignale wurde mit einem Microarray-Laserscanner detektiert und statistisch ausgewertet.

Die statistische Auswertung zeigte mäßige Genexpressionen in der Gruppe der akuten Abstoßung bei inflammatorischen Genen (LTB), Genen der Leukozytenadhäsion (Sele) oder Hox-Genen (Hox-A2, Hox-C10).

Im Rahmen der chronischen Abstoßung zeigten sich exprimierte inflammatorische Gene (TNFa, LTB, IL-12A), Gene der Lymphopoese/Lymphozytendifferenzierung und T-Zell-Antwort (SDF) und allgemeine Entzündungsmediatoren (iNOS, eNOS). Insbesondere mehrere Wachstumsfaktoren (MMP-1, MMP-9, Fibronectin-1, Serpina,

GM-CSF, PDGFB, TIMP) zeigten erhöhte Expressionen und könnten in der Pathogenese sowie dem Remodelling-Prozess bei der chronischen Transplantatabstoßung der Lunge eine Rolle spielen. Die Gene der Entwicklungsbiologie waren vor allem mit Hox-A1, Hox-A4, Hox-B5 und Hox-B13 vermehrt bei der Bronchiolitis obliterans exprimiert.

Ein Teil der beobachteten Genexpressionsmuster des cDNA-Microarrays konnte durch einen Validierungsvorgang (RT-PCR oder Immunhistochemie) bestätigt und mit dem Microarray korreliert werden.

Die BAL-Zelldifferenzierung zeigte bei steigendem Abstoßungsgrad von der akuten zur chronischen Transplantatabstoßung eine ansteigende Neutrophilie und eine sinkende Anzahl an Makrophagen.

Eine weiterführende Validierung und Gewinnung komplementierender Ergebnisse ist in Folgeprojekten an größeren Stichproben auch im Vergleich mit bronchialen Bürsten konzipiert.

6. Literaturverzeichnis

Aigner S, Sthoeger ZM, Fogel M, Weber E, Zarn J, Ruppert M, Zeller Y, Vestweber D, Stahel R, Sammar M, Altevogt P: CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood*, 89: 3385-3395, 1997.

Alderson MR, Smith CA, Tough TW, Davis-Smith T, Armitage RJ, Falk B, Roux E, Baker E, Sutherland GR, Din WS, Goodwin RG: Molecular and biological characterization of human 4-1BB and its ligand. *Europ. J. Immun*, 24: 2219-2227, 1994.

Aleman A, Verhaar HJ, De Haan EH, De Vries WR, Samson MM, Drent ML, Van Der Veen EA, Koppeschaar HP: Insulin-like growth factor-I and cognitive function in healthy older men. *J. Clin. Endocr. Metab*, 84: 471-475, 1999.

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403: 503-511, 2000.

Anderson L, Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver: *Electrophoresis*, 18:533, 1997.

Aoki, Y: Crystallization and characterization of a new protease in mitochondria of bone marrow cells. *J. Biol. Chem*, 253: 2026-2032, 1978.

Arcasoy SM, Kotloff RM. Lung Transplantation, *New Engl J Med*, 340:1081-1091, 1999.

Arnaud P, Chapuis-Cellier C, Souillet G, Carron R, Wilson GB, Creysse R, Fudenberg HH: High frequency of deficient Pi phenotypes of alpha-1-antitrypsin in nonatopic infantile asthma. *Trans Assoc Am Physicians*, 89: 205-214, 1976.

Ashcroft GS, Lei K, Jin W, Longenecker G, Kulkarni AB, Greenwell-Wild T, Hale-Donze H, McGrady G, Song XY, Wahl SM: Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nature Med*, 6: 1147-1153, 2000.

Astrin KH, Bishop DF: Assignment of human erythroid delta-aminolevulinic synthase (ALAS2) to the X chromosome. *Cytogenet. Cell Genet*, 51: 953-954, 1989.

Badovinac VP, Tvinnereim AR, Harty JT. Regulation of antigen-specific CD8+ T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma. *Science*, 290: 1354-1358, 2000.

Bailey SN, Wu RZ, Sabatini DM. Applications of transfected cell microarrays in high-throughput drug discovery. *Drug Discovery Today*, 7(18):113-118, 2002.

Ballinger MN, Hubbard LL, McMillan TR, Toews GB, Peters-Golden M, Paine R 3rd, Moore BB. Paradoxical role of alveolar macrophage-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary host defense post-bone marrow transplantation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 295(1):114-22, 2008.

Bando K, Paradis IL, Similo S. Obliterative bronchiolitis after lung and heart-lung transplantation: an analysis of risk factors and management. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 110:4-14, 1995.

Banner NR, Polak JM, Yacoub MH. *Lung Transplantation*. Cambridge University Press 2003, Cambridge, United Kingdom, 2003.

Baum PR, Gayle RB, III, Ramsdell F, Srinivasan S, Sorensen RA, Watson ML, Seldin MF, Baker E, Sutherland GR, Clifford KN. Molecular characterization of murine and human OX40/OX40 ligand system: identification of a human OX40 ligand as the HTLV-1-regulated protein gp34. *EMBO J*, 13: 3992-4001, 1994.

Behr J, Maier K, Braun B, Schwaiblmair M, Vogelmeier C. Evidence for oxidative stress in bronchiolitis obliterans syndrome after lung and heart-lung transplantation. The Munich Lung Transplant Group. *Transplantation*, 69(9):1856-1860, 2000.

Belperio JA, Burdick MD, Keane MP, Xue YY, Lynch JP, Daugherty BL, Kunkel SL, Strieter RM. The Role of the CC Chemokine, RANTES, in Acute Lung Allograft Rejection. *J Immunol*, 165:461-472, 2000.

Bing DH, Almeda S, Isliker H, Lahav J, Hynes RO: Fibronectin binds to the C1q component of complement. *Proc Natl Acad Sci*, 79: 4198-4201, 1982.

Bittmann I, Müller C, Behr J, Groetzner J, Frey L, Löhns U. Fas/FasL and perforin/granzyme pathway in acute rejection and diffuse alveolar damage after allogeneic lung transplantation-a human biopsy study. *Virchows Arch*, 445(4):375-81, 2004.

Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA: A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J. Exp. Med*, 184: 1101-1109, 1996.

Bowtell D, Sambrook J. *DNA Microarrays, A Molecular Cloning Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2003.

Brinckerhoff CE, Ruby PL, Austin SD, Fini ME, White HD. Molecular cloning of human synovial cell collagenase and selection of a single gene from genomic DNA. *J Clin Invest*, 79: 542-546, 1987.

Brockmeyer C, Ulbrecht M, Schendel DJ, Weiss EH, Hillebrand G, Burkhardt K, Land W, Gokel MJ, Riethmuller G, Feucht HE. Distribution of cell adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1) in renal tissue during allograft rejection. *Transplantation* 55: 610-615, 1993.

Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet*, 21: 33-37, 1999.

Carmichael DF, Sommer A, Thompson RC, Anderson DC, Smith CG, Welgus HG, Stricklin GP: Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc. Nat. Acad. Sci*, 83: 2407-2411, 1986.

Chamberlain D, Maurer J, Chaparro C, Idolor L. Evaluation of transbronchial lung biopsy specimens in the diagnosis of bronchiolitis obliterans after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 13:963-971, 1994.

Chariot A, Castronovo V, Le P, Gillet C, Sobel ME, Gielen J: Cloning and expression of a new HOXC6 transcript encoding a repressing protein. *Biochem. J*, 319: 91-97, 1996.

Charpin JM, Stern M, Grenet D, Israel-Biet D. Insulin like growth factor-1 in lung transplants with obliterative bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med*, 161:1991-1998, 2000.

Chen G, Gharib TG, Huang CC. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics*, 1:304, 2002.

Cheng W, Liu J, Yoshida H, Rosen D, Naora H. Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract. *Nature Med*, 11: 531-537, 2005.

Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R, Childs G. Making and reading microarrays. *Nat Genet*, 21:15-19, 1999.

Clelland CA, Higenbottam TW, Monk JA. Bronchoalveolar lavage lymphocytes in relation to transbronchial lung biopsy in heart-lung transplants. *Transplant Proc*, 22:1479, 1990.

Cooper JD, Billingham M, Egan T. A working formulation for the standardization of nomenclature and for clinical staging of chronic dysfunction in lung allografts, *J Heart and Lung Transplant*, 12:713-716, 1993.

Cooper JD, Patterson GA, Grossman R, Maurer J. Double-lung transplant for advanced chronic obstructive lung disease. *Am Rev Respir Dis*, 139:303-307, 1989.

Corrigall VM, Arastu M, Khan S, Shah C, Fife M, Smeets T, Tak PP, Panayi GS: Functional IL-2 receptor beta (CD122) and gamma (CD132) chains are expressed by fibroblast-like synoviocytes: activation by IL-2 stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production. *J. Immun*, 166: 4141-4147, 2001.

Corrin B, Livingstone C. *Pathology of the Lungs*. Harcourt Publishers Limited, 2000.

Date H, Lynch JP, Sundaresan S, Patterson GA, Trulock EP. The impact of cytolytic therapy on bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant*, 17:869-875, 1998.

Dennert G. Molecular mechanism of target lysis by cytotoxic T cells. *Int Rev Immunol*, 14:133-152, 1997.

Diehl F, Grahlmann S, Beier M, Hoheisel JD. Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal. *Nucleic Acids Research*, 29(7) e38:1-5, 2001.

DiGiovine B, Lynch JP, Martinez FJ, Flint A, Whyte RI, Iannettoni MD, Arenberg DA, Burdick MD, Glass MC, Wilke CA, Morris SB, Kunkel SL, Strieter RM. Bronchoalveolar lavage neutrophilia is associated with obliterative bronchiolitis after lung transplantation: a role of IL-8. *J Immunol*, 157(9):4194-4202, 1996.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM: Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation 3. *Nature* 399: 601-605, 1999.

Dirksen U, Nishinakamura R, Groneck P, Hattenhorst U, Noguee L, Murray R, Burdach S: Human pulmonary alveolar proteinosis associated with a defect in GM-CSF/IL-3/IL-5 receptor common beta chain expression. *J. Clin. Invest*, 100: 2211-2217, 1997.

Eerola LM, Alho HS, Maasilta PK. Matrix metalloproteinase induction in post-transplant obliterative bronchiolitis. *J Heart Lung Transplant*, 24: 426–432, 2005.

Elssner A, Jaumann F, Dobmann S, Behr J, Schwaiblmair M, Reichenspurner H, Furst H, Briegel J, Vogelmeier C. Elevated Levels of Interleukin-8 and Transforming Growth Factor-Beta in Bronchoalveolar Lavage Fluid from Patients with Bronchiolitis Obliterans Syndrome: Proinflammatory Role of Bronchial Epithelial Cells. *Transplantation*, 70(2):362-367, 2000.

Elssner A, Jaumann F, Wolf WP, Schwaiblmair M, Behr J, Furst H, Reichenspurner H, Briegel J, Niedermeyer J, Vogelmeier C. Bronchial epithelial cell B7-1 and B7-2 mRNA expression after lung transplantation: a role in allograft rejection ? *Eur Respir J*, 20:165-169, 2002.

Ericson P, Lindén A, Riise GC. BAL levels of interleukin-18 do not change before or during acute rejection in lungtransplant recipients. *Respir Med*, 98(2):159-63, 2004.

Estenne M, Maurer JR, Boehler A, Egan JJ, Frost A, Hertz M, Mallory Jr GB, Snell GI, Yousem S. Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. *J Heart Lung Transplantation*, 21(3):297-310, 2002.

Ettinger NA, Bailey TC, Trulock EP. Cytomegalovirus infection and pneumonitis: impact after isolated lung transplantation, *Am Rev Respir Dis*, 147:1017-1023, 1993.

Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ transplant recipients. *N Engl J Med*, 338:1741-1751, 1998.

Folkman, J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med*. 1: 27-31, 1995.

Fry TJ and Mackall CL: Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood* 99: 3892-3904, 2002.

Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288: 373-376, 1980.

Gabbay E, Walters EH, Orsida B. In stable lung transplant recipients, exhaled nitric oxide levels positively correlate with airway neutrophilia and bronchial epithelial iNOS. *Am J Respir Crit Care Med*, 160:2093-2099, 1999.

Gabbay E, Walters EH, Orsida B, Whitford H, Ward C, Kotsimbos TC, Snell GI, Williams TJ. Post-lung Transplant Bronchiolitis Obliterans Syndrome (BOS) Is Characterized by Increased Exhaled Nitric Oxide Levels and Epithelial Inducible Nitric Oxide Synthase. *Am J Resp Crit Care Med*, 162:2182-2187, 2000.

Gauchat JF, Aubry JP, Mazzei G, Life P, Jomotte T, Elson G, Bonnefoy JY: Human CD40-ligand: molecular cloning, cellular distribution and regulation of expression by factors controlling IgE production. *FEBS Lett*, 315: 259-266, 1993.

Gimino VJ, Lande JD, Berryman TR, King RA, Hertz MI. Gene Expression Profiling of Bronchoalveolar Lavage Cells in Acute Lung Rejection. *Am J Respir Crit Care Med*, 168:1237–1242, 2003.

Guilinger RA, Paradis IL, Dauber JH. The importance of bronchoscopy with transbronchial biopsy and bronchoalveolar lavage in the management of lung transplant recipients. *Am J Respir Crit Care Med*, 152:2037-2043, 1995.

Halgren RG, Fielden MR, Fong CJ, Zacharewski TR. Assessment of clone identity and sequence fidelity for 1189 IMAGE cDNA clones. *Nucleic Acids Research*, 29(2):582-588, 2001.

Hall BM, Cells mediating allograft rejection. *Transplantation*, 52: 936-946, 1991.

Hall, S.: IL-12 at the crossroads. *Science* 268: 1432-1434, 1995.

Hardy JD. The first lung transplant in man (1963) and the first heart transplant in man (1964). *Transplant Proc*, 31:25-29, 1999.

Hegde P, Qi R, Abernathy K, Gay C, Dharap S, Gaspard R, Earle-Hughes J, Snesrud E, Lee N, Quackenbush J. A Concise Guide to cDNA Microarray Analysis. *Biotechniques*, 29(3), 548-562, 2000.

Hertz MI, Henke CA, Nakhleh RE. Obliterative bronchiolitis after lung transplantation: a fibroproliferative disorder associated with platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:10385-10389, 1992.

Hertz MI, Lande J, Gimino V, King R. Gene Expression Patterns in Lung Rejection, *Transplantation Proceedings*, 33, 3566-3567, 2001.

Hetzer R. Lung Transplantation. Steinkopff Verlag Darmstadt, 2003.

Hirsch J, Elssner A, Mazur G, Maier KL, Bittmann I, Behr J, Schwaiblmair M, Reichenspurner H, Fürst H, Briegel J, Vogelmeier C. Bronchiolitis Obliterans Syndrome after (Heart-) Lung Transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*, 160(5):1640-1646. 1999.

Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Boucek MM, Novick RJ. The Registry of the

International Society for Heart and Lung Transplantation:17th Official Report-2000. J Heart Lung Transplant, 19:909-931, 2000.

Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Fiol B, Novick RJ. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: fourteenth official report-1997. J Heart Lung Transplantation, 16:691-712, 1997.

Hummel M. Rejection and infection after lung transplantation aus Lung Transplantation, Roland Hetzer, Steinkopff Verlag Darmstadt, 2003.

Husain AN, Siddiqui MT, Holmes EW, Chandrasekhar AJ, McCabe M, Radvany R, Garrity ER. Analysis of risk factors for the development of bronchiolitis obliterans syndrome. Am J Respir Crit Care Med, 159:829–833, 1999.

Hutchinson IV. Cellular mechanisms of allograft rejection. Curr Opin Immunol, 3:722-728, 1991.

Iacono A, Dauber J, Keenan K, Spichty K, Cai J, Grgurich W, Burckart G, Smaldone G, Pham S, Otori NP, Yousem S, Williams P, Griffith B, Zeevi A. Interleukin 6 and interferon-gamma gene expression in lung transplant recipients with refractory acute cellular rejection: implications for monitoring and inhibition by treatment with aerosolized cyclosporine. Transplantation, 64(2): 263-269, 1997.

Iacono AT, Keenan RJ, Duncan SR. Aerosolized cyclosporine in lung recipients with refractory chronic rejection. Am J Respir Crit Care Med, 153:1451-1455, 1996.

Joos L, He JQ, Shepherdson MB, Connett JE, Anthonisen NR, Paré PD, Sandford AJ. The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of decline in lung function. Hum Mol Genet, 12(7):803-4, 2003.

Kallio EA, Koskinen PK, Aavik E, Vaali K, Lemstrom KB. Role of platelet derived growth factor in obliterative bronchiolitis (chronic rejection) in the rat. Am J Respir Crit Care Med, 160:1324-1332, 1999.

Kelly EA, Busse WW, Jarjour NN: Increased matrix metalloproteinase-9 in the airway after allergen challenge. Am. J. Resp. Crit. Care Med, 162: 1157-1161, 2000.

Kelly K, Hertz MI: Obliterative bronchiolitis. Clin Chest Med, 18:319, 1997.

Kelly EA, Jarjour NN: Role of matrix metalloproteinases in asthma. Curr Opin Pulm Med 9: 28-33, 2003.

Kim J, Ochoa MT, Krutzik SR, Takeuchi O, Uematsu S, Legaspi AJ, Brightbill HD, Holland D, Cunliffe WJ, Akira S, Sieling PA, Godowski PJ, Modlin RL: Activation of toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. J Immunol 169: 1535-1541, 2002.

Koor A, Yousem SA. Pathology of lung transplantation, S. 401 ff. aus Practical Pulmonary Pathology – A Diagnostic Approach, Kevin O.Leslie, Mark R. Wick, Churchill Livingstone, Elsevier, 2005.

Krishna RG, Wold F. Post-translational modification of proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 67:265-298, 1993.

Kroshus TJ, Kshetry VR, Savik K, John R, Hertz MI, Bolman RM. Risk factors for the development of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 114:195–202, 1997.

Kshetry VR, Kroshus TJ, Hertz MI, Hunter DW, Shumway SJ, Bolman RM III. Early and late airway complications after lung transplantation: incidence and management. *Ann Thorac Surg* 63:1576-1583, 1997.

Lande JD, Patil J, Li N, Berryman TR, King RA, Hertz MI. Novel Insights into Lung Transplant Rejection by Microarray Analysis. *Proc Am Thorac Soc*, 4:44–51, 2007.

Lechler RI, Lombardi G, Batchelor JR. The molecular basis of allorecognition. *Immunol Today*, 11:83-88, 1990

Leslie KO, Wick MR, Livingstone C. *Practical Pulmonary Pathology – A Diagnostic Approach*. Elsevier, 2005.

Li J and Hoyle GW: Overexpression of PDGF-A in the lung epithelium of transgenic mice produces a lethal phenotype associated with hyperplasia of mesenchymal cell. *Dev Biol* 239: 338-349, 2001.

Li J, Ortiz LA, Hoyle GW: Lung pathology in platelet-derived growth factor transgenic mice: effects of genetic background and fibrogenic agents. *Exp Lung Res* 28: 507-522, 2002.

Lill MC, Fuller JF, Herzig R, Crooks GM, Gasson JC: The role of the homeobox gene, HOX B7, in human myelomonocytic differentiation. *Blood*, 85: 692-697, 1995.

Lockhart DJ, Winzeler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*, 405:827-836, 2000.

Lou XJ, Schena M, Horrigan FT, Lawn RM, Davis RW. Expression monitoring using cDNA microarrays. A general protocol. *Methods Mol Biol*, 175:323-40, 2001.

Lu BS, Yu AD, Zhu X, Garrity ER, Vigneswaran WT, Bhorade SM. Sequential Gene Expression Profiling in Lung Transplant Recipients With Chronic Rejection. *Chest*, 130:847–854, 2006.

Lu KC, Jaramillo A, Lecha RL, Schuessler RB, Aloush A, Trulock EP, Mendeloff EN, Huddleston CB, Alexander Patterson G, Mohanakumar T. Interleukin-6 and interferon-gamma gene polymorphisms in the development of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Transplantation*, 74:1297–1302, 2002.

Macoska JA. The Progressing Clinical Utility of DNA Microarrays. *Cancer J Clin*, 52:50-59, 2002.

Magnan A, Mege JL, Escallier JC, Brisse J, Capo C, Reynaud M, Thomas P, Méric B, Garbe L, Badier M, Viard L, Bongrand P, Giudicelli R, Metras D, Fuentes P,

Vervloet D, Noirclerc M.: Balance between alveolar macrophage IL-6 and TGF-beta in lung-transplant recipients. *Am J Respir Crit Care Med*, 153:1431, 1996.

Mason NA, Springall DR, Pomerance A, Evans TJ, Yacoub MH, Polak JM. Expression of inducible nitric oxide synthase and formation of peroxynitrite in posttransplant obliterative bronchiolitis. *J Heart Lung Transplant*, 17:710-714, 1998.

Maurer JR, Tullis DE, Grossman RF, Vellend H, Winton TL, Patterson GA. Infectious complications following isolated lung transplantation. *Chest*, 101:1056-1059, 1992.

Mc Dermott CD, Gavita SM, Shennib H, Giaid A. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase and the oxidant peroxynitrite in lung transplant recipients with obliterative bronchiolitis. *Transplantation*, 64(2):270, 1997.

McKee CM, Defina R. Prolonged allograft survival in TNF receptor 1-deficient recipients is due to immunoregulatory effects, not to inhibition of direct antigraft cytotoxicity. *J Immunol* 168(1): 483-489, 2002.

Meloni F, Salvini R, Bardoni AM, Passadore I, Solari N, Vitulo P, Oggionni T, Viganò M, Pozzi E, Fietta AM. Bronchoalveolar lavage fluid proteome in bronchiolitis obliterans syndrome: possible role for surfactant protein A in disease onset. *J Heart Lung Transplant*, 26(11):1135-43, 2007.

Meloni F, Vitulo P, Cascina A, Oggionni T, Bulgheroni A, Paschetto E, Klersy C, D'Armini AM, Fietta A, Bianco AM, Arbustini E, Viganò M. Bronchoalveolar lavage cytokine profile in a cohort of lung transplant recipients: a predictive role of interleukin-12 with respect to onset of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant*, 23(9):1053-60, 2004.

Metras D, Kreitmann B, Riberi A, Viard L, Pannetier A, Garbi O, Marti JY, Noirclerc M. Bilateral single-lung transplantation in children. *Ann Thorac Surg*, 60:578-581, 1995.

Minematsu N, Nakamura H, Tatenno H, Nakajima T, Yamaguchi K: Genetic polymorphism in matrix metalloproteinase-9 and pulmonary emphysema. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 116-119, 2001.

Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, Viale A, Olshen AB, Gerald WL, Massague J: Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436: 518-524, 2005.

Molossi S, Elices M, Arrhenius T. Blockade of very late antigen-4 integrin binding of fibronectin with connecting segment-1 peptide reduces accelerated coronary arteriopathy. *J Clin Invest*, 95:2601-2610, 1995.

Morrison GM, Davidson DJ, Kilanowski FM, Borthwick DW, Crook K, Maxwell AI, Govan JR, Dorin JR: Mouse beta defensin-1 is a functional homolog of human beta defensin-1. *Mammalian Genome* 9: 453-457, 1998.

Morton AL, Bell EB, Bolton EM. CD4+T cell-mediated rejection of major histocompatibility complex class I-disparate grafts: a role for antibody. *Eur J Immunol*, 23:2078-2084, 1993.

Moudgil A, Bagga A, Toyoda M, Nicolaidou E, Jordan SC, Ross D. Expression of gamma-IFN mRNA in bronchoalveolar lavage fluid correlates with early acute allograft rejection in lung transplant recipients. *Clin Transplant*, 13:201-207, 1999.

Mulligan MS, Polley MJ, Bayer RJ, Nunn MF, Paulson JC, Ward PA: Neutrophil-dependent acute lung injury. Requirement for P-selectin (GMP-140). *J Clin Invest* 90: 1600-1607, 1992.

Nakamura T, Tashiro K, Nazarea M, Nakano T, Sasayama S, Honjo T: The murine lymphotoxin-beta receptor cDNA: isolation by the signal sequence trap and chromosomal mapping. *Genomics*, 30: 312-319, 1995.

Neumann B, Engelhardt B, Wagner H, Holzmann B: Induction of acute inflammatory lung injury by staphylococcal enterotoxin B. *J Immunol*, 158: 1862-1871, 1997.

Niyonsaba F, Iwabuchi K, Someya A, Hirata M, Matsuda H, Ogawa H, Nagaoka I: A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. *Immunology*, 106: 20-26, 2002.

Nogee LM, deMello DE, Dehner LP, Colten HR: Deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *New Eng. J. Med*, 328: 406-410, 1993.

Ohtsuka K and Hata M: Molecular chaperone function of mammalian Hsp70 and Hsp40—a review. *Int J Hyperthermia*, 16: 231-245, 2000.

Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, Akita K, Namba M, Tanabe F, Konishi K, Fukuda S, Kurimoto M: Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature*, 378: 88-91, 1995.

Osman M, Tortorella M, Londei M, Quarantino S: Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases define the migratory characteristics of human monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* 105: 73-82, 2002.

Otulana BA, Higenbottam T, Ferrari L, Scott J, Igboaka G, Wallwork J. The use of home spirometry in detecting acute lung rejection and infection following heart-lung transplantation. *Chest*, 97:353-357, 1990.

Palmberg L, Larsson BM, Malmberg P, Larsson K: Induction of IL-8 production in human alveolar macrophages and human bronchial epithelial cells in vitro by swine dust. *Thorax*, 53: 260-264, 1998.

Panagopoulos I, Isaksson M, Billstrom R, Strombeck B, Mitelman F, Johansson B: Fusion of the NUP98 gene and the homeobox gene HOXC13 in acute myeloid leukemia with t(11;12)(p15;q13). *Genes Chromosomes Cancer*, 36: 107-112, 2003.

Paradis I, Yousem S, Griffith B: Airway obstruction and bronchiolitis obliterans after lung transplantation. *Clin Chest Med*, 14:751-763, 1993.

Paradis IL, Duncan SR, Dauber JH, Yousem S, Hardesty R, Griffith B: Distinguishing between infection, rejection and the adult respiratory distress syndrome after human lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 11:232-236, 1992.

Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D.: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406: 747-752, 2000.

Petty JM, Sueblinvong V, Lenox CC, Jones CC, Cosgrove GP, Cool CD, Rai PR, Brown KK, Weiss DJ, Poynter ME, Suratt BT. Pulmonary stromal-derived factor-1 expression and effect on neutrophil recruitment during acute lung injury. : *J Immunol*, 178(12):8148-57, 2007.

Pisella PJM, Brignole F, Debbasch C, Lozato PA, Creuzot-Garcher C, Bara J, Saiag P, Warnet JM, Baudouin C: Flow cytometric analysis of conjunctival epithelium in ocular rosacea and keratoconjunctivitis sicca. *Ophthalmology*, 107: 1841-1849, 2000.

Pittet JF, Griffiths MJ, Geiser T, Kaminski N, Dalton SL, Huang X, Brown LA, Gotwals PJ, Koteliensky VE, Matthay MA, Sheppard D: TGF-beta is a critical mediator of acute lung injury. *J. Clin. Invest*, 107: 1537-1544, 2001.

Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nature Genetics*, 23:41-46, 1999.

Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV: A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum. Immun.* 61: 863-866, 2000.

Prop J, Wildevuur CRH, Nieuwenhuis P. Lung allograft rejection in the rat. II. Specific immunological properties of lung grafts. *Transplantation*, 40:126-131, 1985.

Raman V, Martensen SA, Reisman D, Evron E, Odenwald WF, Jaffee E, Marks J, Sukumar S: Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature*, 405: 974-978, 2000.

Reichart B. Lungentransplantationen. Verlag Hans Huber, Bern, 1995.

Reichart B, Reble B, Kemkes BM, Kreuzer E, Klinner W, Funccius W, Osterholzer G, Raderschad TM, Nollau D, Reichenspurner H, Ertel W, Peters D, Überfuhr P, Welz A, Hammer C, Gokel MJ, Mraz W. Bericht über die beiden ersten Herz-Lungen-Transplantationen in Deutschland. *MMW*, 126:1355-1360, 1984.

Reitz BA, Wallwork JL, Hunt SA, Pennock JL, Billingham ME, Oyer PE, Stinson EB, Shumway NE. Heart-lung transplantation: successful therapy for patients with pulmonary vascular disease. *N Engl J Med*, 306:557-564, 1982.

Reznik S, Jaramillo A, Zhang L, Patterson GA, Cooper JD, Mohanakumar T. Anti-HLA antibody binding to HLA class I molecules induces proliferation of airway epithelial cells: a potential mechanisms for bronchiolitis obliterans syndrome. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 119:39, 2000.

Richmond VA. 1997 Annual report of the U.S. Scientific Registry for Transplant Recipients and the Organ Procurement and Transplantation Network-transplant data:1998-1996. United Network for Organ Sharing, 1997.

Riise GC, Andersson BA, Kjellstrom C. Persistent high BAL fluid granulocyte activation marker levels as early indicators of bronchiolitis obliterans after lung transplant. *Eur Respir J*, 14:1123-1130, 1999.

Riise GC, Williams A, Kjellstrom C, Schersten H, Andersson BA, Kelly FJ. Bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplant recipients is associated with increased neutrophil activity and decreased antioxidant status in the lung. *Eur Resp J*, 12:82-88, 1998.

Rissoan MC, Duhon T, Bridon JM, Bendriss-Vermare N, Peronne C, Saint Vis B, Briere F, Bates EE: Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulinlike transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*, 100: 3295-3303, 2002.

Rosen DM, Waltz DA: Hydroxychloroquine and surfactant protein C deficiency. (Letter) *New Eng. J. Med*, 352: 207-208, 2005.

Rosenberg AS, Mizuochi T, Sharrow SO, Singer A. Phenotype, specificity and function fo T cell subsets and T cell interactions involved in skin graft rejection. *J Exp Med*, 165:1296-1315, 1987.

Ruuls and Sedgwick. Unlinking tumor necrosis factor biology from the major histocompatibility complex: lessons from human genetics and animal models, *Am J Hum Genet*. 65(2):294-301, 1999.

Salerno CT, Park SJ, Kreykes NS. Adjuvant treatment of refractory lung transplant rejection with extracorporeal photopheresis. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 117:1063-1069, 1999.

Sangeeta MB, Andrew Y, Wickii TV, Charles G. Elevation of Interleukin-15 Protein Expression in Bronchoalveolar Fluid in Acute Lung Allograft Rejection, *Chest* 131:533-538, 2007.

Sartipy P, Loskutoff DJ: Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc. Nat. Acad. Sci*, 100: 7265-7270, 2003.

Sarwal M, Chang S, Barry C, Chen X, Alizadeh A, Salvatierra O, Brown P.: Genomic analysis of renal allograft dysfunction using cDNA microarrays. *Transplant Proc*, 33:297, 2001.

Sayegh MH, Turka LA. The role of T cell costimulatory activation in transplant rejection. *N Engl J Med*, 338:1813-1821, 1998.

Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel TV. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature*, 347:669, 1990.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470, 1995.

Scholma J, Slebos DJ, Boezen HM. Eosinophilic granulocytes and interleukin-6 level in bronchoalveolar lavage fluid are associated with the development of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*, 162:2221–2225, 2000.

Schulman LL, Weinberg AD, McGregor C, Galantowicz ME, Suci-Foca NM, Itescu S. Mismatches at the HLA-DR and HLA-B loci are risk factors for acute rejection after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*, 157:1833-1837, 1998.

Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ: Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*, 249: 1429-1431, 1990.

Schwaiblmair M, Vogelmeier C, Fruhmann G. Indikationen und Empfängerauswahl. In: Reichart B, Lungentransplantationen. Verlag Hans Huber, Bern, 9-16, 1995.

Schwarz H, Blanco FJ, von Kempis J, Valbracht J, Lotz M: ILA, a member of the human nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor family, regulates T-lymphocyte proliferation and survival. *Blood*, 87: 2839-2845, 1996.

Scott JP, Higenbottam TW, Sharples L, Clelland CA, Smyth RL, Stewart S, Wallwork J. Risk factors for obliterative bronchiolitis in heart-lung transplant recipients. *Transplantation*, 51:813, 1991.

Segal E, Friedman N, Koller D, Regev A. A module map showing conditional activity of expression modules in cancer. *Nature Genetics*, 36:1090-1098, 2004.

Selman M, Lin HM, Montano M, Jenkins AL, Estrada A, Lin Z, Wang G, DiAngelo SL, Guo X, Umstead TM, Lang CM, Pardo A, Phelps DS, Floros J: Surfactant protein A and B genetic variants predispose to idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum. Genet.* 113: 542-550, 2003.

Seong SY, Choi CY. Current status of protein chip development in terms of fabrication and application. *Proteomics*, 3:2176-2189, 2003.

Sharples LD, McNeil K, Stewart S, Wallwork J: Risk factors for bronchiolitis obliterans: a systematic review of recent publications. *J Heart Lung Transpl*, 21:271-281, 2002.

Shennib H. *Immunology of the Lung Allograft*. Springer-Verlag, Heidelberg, 1995.

- Sheppard MN. Practical Pulmonary Pathology. Edward Arnold, London, 1995.
- Shi R, Yang J, Jaramillo A, Steward NS, Aloush A, Trulock EP, Patterson GA, Suthanthiran M, Mohanakumar T. Correlation between interleukin-15 and granzyme B expression and acute lung allograft rejection, *Transplant Immunology*, 12:103-108, 2004.
- Shreeniwas R, Schulman LL, Narasimhan M, McGregor CC, Marboe CC. Adhesion molecules (E-selectin and ICAM-1) in pulmonary allograft rejection. *Chest*, 110(5):1143-9, 1996.
- Shresta A, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol*, 10:581-587, 1998.
- Shrimpton AE, Levinsohn EM, Yozawitz JM, Packard DS, Cady RB, Middleton FA, Persico AM, Hootnick DR: A HOX gene mutation in a family with isolated congenital vertical talus and Charcot-Marie-Tooth disease. *Am. J. Hum. Genet*, 75: 92-96, 2004.
- Shulzhenko N, Morgun A, Zheng XX. Intra-graft activation of genes encoding cytotoxic T lymphocyte effector molecules precedes the histological evidence of rejection in human cardiac transplantation. *Transplantation*, 72:1705-1708, 2001.
- Snider ME, Armstrong L, Hudson JL, Steinmuller D. In vitro and in vivo cytotoxicity of T cells cloned from rejecting allografts. *Transplantation*, 42:171-177, 1986.
- Sorensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Tjabringa GS, Hiemstra PS, Borregaard N: Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood*, 97: 3951-3959, 2001.
- Starnes VA, Barr ML, Schenkel FA. Experience with living-donor lobar transplantation for indications other than cystic fibrosis. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 114:917-922, 1997.
- Susanto I, Peters JI, Levine SM, Sako EY, Anzueto AR, Bryan CL, Use of balloon-expandable metallic stents in the management of bronchial stenosis and bronchomalacia after lung transplantation, *Chest*, 114:1330-1335, 1998.
- Taghavi S, Krenn K, Jaksch P, Klepetko W, Aharinejad S. Broncho-alveolar Lavage Matrix Metalloproteases as a Sensitive Measure of Bronchiolitis Obliterans. *Am J Transplantation*, 5(6):1548-1552, 2005.
- Taketani T, Taki T, Shibuya N, Ito E, Kitazawa J, Terui K, Hayashi Y: The HOXD11 gene is fused to the NUP98 gene in acute myeloid leukemia with t(2;11)(q31;p15). *Cancer Res*. 62: 33-37, 2002.
- Tamm M, Sharples LD, Higenbottam TW, Stewart S, Wallwork J. Bronchiolitis obliterans syndrome in heart-lung transplantation: surveillance biopsies. *Am J Respir Crit Care Med*, 155:1705-1710, 1997.

Taniguchi Y, Komatsu N, Moriuchi T: Overexpression of the HOX4A (HOXD3) homeobox gene in human erythroleukemia HEL cells results in altered adhesive properties. *Blood* 85: 2786-2794, 1995.

Taub DD, Lloyd AR, Wang JM, Oppenheim JJ, Kevin DJ: The effects of human recombinant MIP-1 alpha, MIP-1 beta, and Rantes on the chemotaxis and adhesion of T cell subsets. *Adv Exp Med Biol* 351: 139-146, 1993.

Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, Trulock EP, Deng MC, Keck BM, Hertz MI. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-second Official Adult Heart Transplant Report—2005. *J Heart Lung Transplant*, 24: 945-982, 2005.

Taylor HS, VandenHuevel GB, Igarashi P: A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biol. Reprod*, 57: 1338-1345, 1997.

Thomas AQ, Lane K, Phillips J, Prince M, Markin C, Speer M, Schwartz DA, Gaddipati R, Marney A, Johnson J, Roberts R, Haines J, Stahlman M, Loyd JE: Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 165: 1322-1328, 2002.

Tilney NL, Kupiec-Weglinski JW. The biology of acute transplant rejection. *Ann Surg*, 214:98-106, 1991.

Tiroke AH, Bewig B and Haverich A. Transplant Review, Bronchoalveolar lavage in transplantation. *Clinical Transplantation*, 13:2, 131, 1999.

Trulock, EP. Lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*, 155:789, 1997.

Trulock EP, Edwards LB, Taylor DO, Boucek MM, Keck BM, Hertz MI; International Society for Heart and Lung Transplantation. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-third official adult lung and heart-lung transplantation report--2006. *J Heart Lung Transplant*, 25:880-892, 2006.

Trulock EP, Ettinger NA, Brunt EM, Pasque MK, Kaiser LR, Cooper JD. The role of transbronchial lung biopsy and bronchoalveolar lavage in the treatment of lung transplant recipients: an analysis of 200 consecutive procedures. *Chest*, 102:1049-1054, 1992.

Van Scherpenzeel Thim VS, Remacle S, Picard J, Cornu G, Gofflot F, Rezsöházy R, Verellen-Dumoulin C: Mutation analysis of the HOX paralogous 4-13 genes in children with acute lymphoid malignancies: identification of a novel germline mutation of HOXD4 leading to a partial loss-of-function. *Hum. Mutat*, 25: 384-395, 2005.

Vanaudenaerde BM, Dupont LJ, Wuyts WA, Verbeken EK, Meyts I, Bullens DM, Dilissen E, Luyts L, Van Raemdonck DE, Verleden GM. The role of interleukin-17 during acute rejection after lung transplantation. *Eur Respir J*, 27(4):779-787, 2006.

Vasconcellos LM, Schachter AD, Zheng XX. Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation*, 66:562-566, 1998.

Verleden GM, Dupont L, Lamont J. Is there a role for measuring exhaled nitric oxide in lung transplant recipients with chronic rejection?. *J Heart Lung Transplantation*, 17:231-232, 1998.

Wang X, Seed B. A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. *Nucleic Acids Research* 31(24): e154: 1-8, 2003.

Westney GE, Kesten S, De Hoyos A, Chaparro C, Winton T, Maurer JR. Aspergillus infection in single and double lung transplant recipients. *Transplantation*, 61:915-919, 1996.

Whitehead BF, Stoehr C, Wu CJ, Patterson G, Burchard EG, Theodore J, Clayberger C, Starnes VA. Cytokine gene expression in human lung transplant recipients. *Transplantation*, 56:956-961, 1993.

Wolf SF, Sieburth D, Sypek J: Interleukin 12: a key modulator of immune function. *Stem Cells* 12: 154-168, 1994.

Yoshida S, Iwata T, Chiyo M, Smith G, Foresman B, Mickler E, Heidler K, Cummings O, Fujisawa T, Brand D, Baker A, Wilkes D. Metalloproteinase Inhibition Has Differential Effects on Alloimmunity, Autoimmunity, and Histopathology in the Transplanted Lung. *Transplantation*. 83(6):799-808, 2007.

Yousem SA: Lymphocytic bronchitis/bronchiolitis in lung allograft recipients. *Am J Surg Pathol*, 17:491-496, 1993.

Yousem SA, Berry GJ, Cagle PT, Chamberlain D, Husain AN, Hruban RH, Marchevsky A, Ohori NP, Ritter J, Stewart S, and Tazelaar HD: Revision of the 1990 working formulation for the classification of pulmonary allograft rejection: Lung Rejection Study Group. *J Heart Lung Transplant*, 15:1-15, 1996.

Yousem SA, Burke CM, Billingham ME. Pathologic pulmonary alterations in long-term heart-lung transplantation. *Hum Pathol*, 16:911-923, 1985.

Yue H, Eastman PS, Wang BB, Minor J, Doctolero MH, Nuttall RL, Stack R, Becker JW, Montgomery JR, Vainer M, Johnston R: An evaluation of the performance of cDNA microarrays for detecting changes in global mRNA expression. *Nucleic Acids Res*. 29: E41, 2001.

Zeevi A, Pavlakis M, Spichty K, Chang S, Iacono A, Dauber J, Burckart G, McCurry K, Keenan R, Grgurich W. Prediction of rejection in lung transplantation. *Transplant Proc*, 33:291-292, 2001.

Zenati M, Dowling RD, Dummer JS, Paradis IL, Arena VC, Armitage JM, Kormos RL, Hardesty RL, Griffith BP. Influence of the donor lung on development of early infections in lung transplant recipients. *J Heart Transplant*, 9:502-509, 1990.

Zhai JY. Making GenePix Array List (GAL) Files. Axon Instruments, Inc., Union City, CA 94587, USA; Application Note Genomics July 5, 2001.

Zhang X, Miao X, Sun T, Tan W, Qu S, Xiong P, Zhou Y, Lin D: Functional polymorphisms in cell death pathway genes FAS and FASL contribute to the risk of lung cancer. *J. Med. Genet.* 42: 479-484, 2005.

Zheng L, Walters EH, Ward C. Airway neutrophils in stable and bronchiolitis obliterans syndrome patients following lung transplantation. *Thorax*, 55:53-59, 2000.

Ziauddin J, Sabatini DM. Microarrays of cells expressing defined cDNAs: *Nature*, 411(6833):107-10, 2001.

7. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zur Fertigstellung dieser Arbeit auf ihre Art und Weise beigetragen haben.

Zuallererst gilt mein besonderer Dank PD Dr. med. Iris Bittmann für die Möglichkeit der Promotion, der Bereitstellung und Überlassung der Thematik sowie der Betreuung und Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Ferner möchte ich mich bei Prof. Dr. med. U. Löhrs sowie seinem Nachfolger Prof. Dr. med. T. Kirchner für die Durchführung der praktischen Arbeiten und für die Betreuung im Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München bedanken. Im Rahmen der Arbeitsgruppe gilt mein herzlicher Dank Prof. Dr. med. J. Diebold, Christian Pfeiffer und den medizinisch technischen Assistentinnen Beate Luthardt und Andrea Sendelhofert.

Bezüglich der Kooperationen möchte ich mich bei Prof. Dr. med. J. Behr, Leiter des Schwerpunktes Pneumologie, Medizinische Klinik und Poliklinik I (Direktor Prof. Dr. med. G. Steinbeck) im Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München sowie Frau Villena für die Bereitstellung der bronchoalveolären Lavageproben bedanken.

Mit Hilfe der Kooperation von Dr. H. Blum im Genzentrum Großhadern und seiner Lafuga-Einheit wurde der cDNA-Microarray gedruckt, in diesem Sinne vielen Dank. Ferner gehört ein großes Dankeschön Prof. Dr. Dr. J. Heesemann, Lehrstuhl Bakteriologie des Max von Pettenkofer-Instituts der LMU-München, für die Aufnahme der Arbeit in das Graduiertenkolleg „Infektion und Immunität“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft mit Verleihung eines Stipendiums sowie die Teilnahme an den Symposien im Kleinwalsertal und in Venedig.

Nicht zuletzt gehört aber der größte Dank meinen Eltern, meinem Bruder Konstantin, meinen Freunden Kristin, Mieke und Michael sowie meiner Freundin Michaela.

8. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Michael Benedikt Günther Brendel
Geburtsdatum: 12. Januar 1981
Geburtsort: München

Schulbildung

1987-1991 Volksschule Tutzing
1991-2000 Neusprachliches Gymnasium Tutzing
2000 Abitur

Studium

2000 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
2002 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1. Staatsexamen)
2006 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2. Staatsexamen)
2007 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (3. Staatsexamen)

Famulaturen

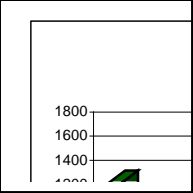
2003 Klinikum Starnberg, Innere Medizin
2004 University of Connecticut, USA, Radiologie
2004 University of Southern California, USA, Plastische Kinderchirurgie
2005 Praxis Innere Medizin, Kardiologie, Dr. Bosiljanoff, München
2005 Klinikum rechts der Isar, TU München, Gynäkologie

Praktisches Jahr

2006 Dr. v. Haunersches Kinderspital, LMU München, Pädiatrie
2006 Universitätsspital Zürich, Schweiz, Innere Medizin
2006 University of Bristol, England, Chirurgie
2007 University of Sydney, Australien, Chirurgie

Berufliche Tätigkeit

Seit 2007 Assistenzarzt in der Klinik Augustinum München, Innere Medizin



Erklärung über die Anfertigung der vorliegenden Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in der Gesamtheit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der oben angegebenen Literatur verfasst habe.

München, 01.03.2009

Michael Brendel