

Aus der
LungenClinic Grosshansdorf
Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität zu Lübeck
Klinischer Direktor: Prof. Dr. K.F. Rabe

in Zusammenarbeit mit der
Klinischen und Experimentellen Pathologie
des Forschungszentrums Borstel
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. P. Zabel

**Charakterisierung inflammatorischer Vorgänge
im induzierten Sputum bei COPD
unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses von Dithiothreitol**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Sektion Medizin-

vorgelegt von
Frauke Pedersen
aus Delmenhorst

Lübeck 2013

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Torsten Goldmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Schultz

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 18.12.2013

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Kennzeichen der chronisch obstruktiven Atemwegserkrankung (COPD)	1
1.2 Einsatz von induziertem Sputum zur Untersuchung entzündlicher Prozesse	3
1.3 Einsatz der HOPE-Technik bei induziertem Sputum	5
1.4 Fragestellung	7
2 Material und Methoden	8
2.1 Studiendesign	8
2.2 Auswahl der Studienteilnehmer	10
2.3 Probengewinnung durch Sputuminduktion	10
2.3.1 Praktische Durchführung der Sputuminduktion	11
2.3.2 Aufarbeitung der Sputumproben für die Differentialzytologie	12
2.3.3 Auswertung der Cytospin-Präparate	16
2.3.4 Herstellung von HOPE-Sputumzellpräparaten	17
2.3.5 Immunozytochemische Nachweise	18
2.3.6 RNA-Untersuchungen an HOPE-Sputumzellpräparaten	22
2.3.7 Transkriptom-Analyse aus HOPE-Sputumzellpräparaten	23
2.3.8 Einzelanalyse von Proteinen im Sputumüberstand (ELISA-Technik)	25
2.3.9 Multiplex-Analyse von Proteinen im Sputumüberstand (Human Inflammation MAP [xMAP®] Panel)	26
2.3.10 Statistische Verfahren und Auswertung der Messdaten	29
3 Ergebnisse	31
3.1 Charakterisierung der Studienpopulation	31
3.2 Verträglichkeit der Sputuminduktion	31
3.3 Sputumqualität und Sputumzellzahlen	33

3.4	Auswertung der Differentialzytologie	36
3.4.1	Sputumaufarbeitung mit und ohne Dithiothreitol (DTT)	36
3.4.2	Differentialzytologie der COPD-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe	37
3.5	Auswertung der immunozytochemischen Nachweisverfahren	39
3.6	Einzelanalysen der Proteine im Sputumüberstand	40
3.7	Multiplex-Analyse der Proteine im Sputumüberstand	41
3.7.1	Validierung der Multiplex-Matrix für den Sputumüberstand	43
3.7.2	Einfluss von DTT auf die Analytkonzentrationen auf dem validierten Human inflammation xMAP® v 1.0 Panel	43
3.8	RNA-Qualität von HOPE-Sputumzellpräparaten	48
3.9	Transkriptom-Daten aus HOPE-Sputumzellpräparaten	50
3.10	Vergleich der RNA-Expression mit den im Sputumüberstand gemessenen Proteinkonzentrationen	51
3.10.1	Einfluss von DTT auf das Transkriptom	53
3.10.2	Unterschiede im Transkriptom zwischen der COPD-Gruppe und der Kontrollgruppe	55
3.10.3	Kandidatengene aus der Transkriptom-Analyse	59
4	Diskussion	63
4.1	Sputuminduktion und Differenzierung	63
4.2	Proteinanalysen im Sputumüberstand	64
4.3	Immunozytochemische Nachweise	66
4.4	Transkriptom-Analyse in HOPE-Sputumzellproben	68
4.5	Weiterführende Untersuchungen	68
5	Zusammenfassung	70
6	Literaturverzeichnis	72
7	Anhang	84
7.1	Linearitäts-Test im Human Inflammation xMAP® Panel	84
7.2	Spike-Wiederfindungs-Test im Human Inflammation xMAP® Panel	86
7.3	Listen der verwendeten Geräte und Reagenzien	88

8	Danksagung	95
9	Lebenslauf	97
10	Publikationen	98

Abkürzungsverzeichnis

AEC	Aminoethylcarbazol
AK	Antikörper
AM	Alveolare Makrophagen
BEC	Bronchiale Epithelzellen
BDNF	engl. <i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
cDNA	engl. <i>Complementary DNA</i>
C3	Complement C3
CF	Cystische Fibrose
CTP	Cytidintriphosphat
Cy 3	Cyanine 3
CRP	engl. <i>C-Reactive Protein</i>
CXCR-2	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2
COPD	engl. <i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i> , Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>Desoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	engl. <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EOS	Eosinophile Granulozyten

EtOH	Ethanol
FEV ₁	Forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde der Ausatmung [L]
FEV ₁ %	Sollwert des FEV ₁ in Prozent vom Normalwert
FU	engl. <i>Fluorescence Unit</i>
FVC	Forcierte Vitalkapazität [L]
GM-CSF	engl. <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
GOLD	engl. <i>Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HOPE	engl. <i>Hepes-Glutamic-acid-buffer mediated Organic solvent Protection Effect</i>
HTX	Hämatoxylin
ICAM-1	engl. <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IL	Interleukin
IL-1RA	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
IFN- γ	Interferon-gamma
IQR	engl. <i>Interquartil range</i>
LDD	engl. <i>Least Detectable Dose</i>
LLOQ	engl. <i>Lower Limit of Quantification</i>
LY	Lymphozyten
MARCO	engl. <i>Macrophages Receptor with collagenous Structures</i>
MAP	engl. <i>Mitogen Activated Protein</i>
miRNA	engl. <i>microRNA</i>
MIP	engl. <i>Macrophages Inflammatory Protein</i>

MCP1	engl. <i>Monocyte Chemotactic Protein 1</i>
MO	Monozyten
MPO	Myeloperoxidase
MMP	Matrixmetalloproteinase
nt	engl. <i>Nucleotid</i>
NG	Neutrophile Granulozyten
OD	Optische Dichte
P	engl. <i>Probability</i> , Signifikanzwert
PBS	engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDE-4	Phosphodiesterase-4
PE	Plattenepithelzellen
PCR	engl. <i>Polymerase-Chain-Reaction</i>
py	engl. <i>pack years</i> , 1 py = 20 Zigaretten/Tag über ein Jahr geraucht
r	Korrelationskoeffizient
RNA	engl. <i>Ribonucleic Acid</i>
SCF	engl. <i>Stem Cell Factor</i>
SD	engl. <i>Standard Deviation</i> , Standardabweichung
SM	Sputum-Makrophagen
SRGAP1	engl. <i>Slit-Roundabout-GTPase Activated Protein 1</i>
TCC	engl. <i>Total Cell Count</i> , Gesamtzellzahl
TIMP-1	engl. <i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1</i>
TNF	engl. <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNFR2	engl. <i>Tumor Necrosis Factor Receptor 2</i>

T-TBS	engl. <i>Tween Tris Buffered Solution</i> , T-TBS Spülpuffer
TTP	Thymidintriphosphat
UTP	Uridintriphosphat
VCAM-1	engl. <i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VDBP	engl. <i>Vitamin D-binding Protein</i>
VEGF	engl. <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vWF	Von Willebrand Factor

„Die Endlosigkeit des wissenschaftlichen Ringens sorgt unablässig dafür, daß dem forschenden Menschengest seine beiden edelsten Antriebe erhalten bleiben und immer wieder von neuem angefacht werden: die Begeisterung und die Ehrfurcht.“
Max Planck (1858-1947)

1 Einleitung

Die Erforschung von Mechanismen, die chronischen Entzündungsvorgängen zugrunde liegen, dient dem Verständnis der komplexen Regulationsvorgänge innerhalb eines Organismus und bietet Ansatzmöglichkeiten für die anti-inflammatorische Therapie und damit zur Verringerung des Leides erkrankter Menschen.

Mit dem Ziel neue methodische Ansätze zur Entzündungscharakterisierung im induzierten Sputum zu entwickeln, werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit induzierte Sputumproben von Patienten mit chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen auf zellulärer, Protein- und RNA-Ebene untersucht.

1.1 Kennzeichen der chronisch obstruktiven Atemwegserkrankung (COPD)

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (engl. Chronic obstructive pulmonary disease, COPD) gehört zu den häufigsten Erkrankungen der Atemwege (Murray und Lopez, 1997). Sie ist die vierthäufigste Todesursache in den Industrienationen und Prognosen deuten darauf hin, dass sie bis 2020 auf Rang drei steigt (Wang et al., 2012). Zu den Ursachen der Erkrankung gehören das Zigarettenrauchen, sowie das Einatmen feiner Stäube und Rauch, die bei der Verbrennung von organischem Material in geschlossenen Räumen entsteht (Rivera et al., 2008).

Für die Krankheit charakteristische äußere Symptome sind die Einschränkung der körperlichen Belastbarkeit verbunden mit Atemnot, Husten und Sputumproduktion. Bei genauer Untersuchung findet sich eine Einschränkung der Lungenfunktion, im Sinne einer obstruktiven Ventilationsstörung. Sie zeigt sich in einer Verminderung des Atemstoßes bei

der Ausatmung (FEV_1 -Wertes) bei gleichzeitiger Verringerung des FEV_1/FVC -Koeffizienten.

Der Schweregrad der COPD kann nach den spirometrischen GOLD-Kriterien in die Klassen I (leicht), II (mittel), III (schwer) bis IV (sehr schwer) klassifiziert werden (Rabe et al., 2007).

Das Fortschreiten der Erkrankung ist mit einer zunehmenden alveolaren Wanddicke und einer vermehrten Ansammlung von entzündlichem Exsudat in den kleinen Atemwegen verbunden (Hogg et al., 2004).

Die Untersuchung von Entzündungsmediatoren, die zu einem Umbau des Lungengewebes, und damit zu einer Verschlechterung der Lungenfunktion führen, hat in der klinischen Forschung eine besondere Bedeutung. Dabei ist eine Vielzahl von Lipidmediatoren, inflammatorischen Peptiden, Zytokinen und Wachstumsfaktoren am Entzündungsprozess beteiligt (Barnes und Hansel, 2004; Barnes, 2006; Barnes et al., 2006).

Da COPD als einzige der zehn häufigsten Todesursachen eine steigende Tendenz zeigt (Mathers und Loncar, 2006), erscheint die Entwicklung weiterer diagnostischer und therapeutischer Möglichkeiten und damit verbunden die weitere Erforschung der zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen dringend notwendig (Rabe et al., 2007).

Bei der Entwicklung neuer Medikamente zur Therapie der COPD werden in den letzten Jahren verstärkt entzündungshemmende Wirkstoffe erprobt. Da eine erhöhte Konzentration an neutrophilen Granulozyten und Interleukin-8 in der Lunge zu den gesicherten Kennzeichen der COPD zählen (Singh et al., 2010; Stockley, 2002) zielt die anti-inflammatorische Therapie hauptsächlich auf eine Verminderung des Einstromes neutrophiler Granulozyten aus dem Blut ins Lungengewebe ab.

Entzündungshemmende Wirkstoffe wie CXCR-2-Inhibitoren, Anti-IL-17A-Antikörper, MAP-Kinase Inhibitoren, Pan-Selectin-Antagonisten und PDE-4-Hemmern sind bereits in klinischen Studien zur Therapie der COPD geprüft worden (Grootendorst et al., 2007; Holz et al., 2010; Kirsten et al., 2011; 2013, Lomas et al., 2012; Rabe, 2010; 2011; Watz et al., 2013).

Dabei zeigen alle bisherigen entzündungshemmenden Substanzen nur einen begrenzten Effekt auf die chronische Inflammation. Sie können ebenso wie ein Rauchstopp die pa-

thologischen Veränderungen in der Lunge und damit verbunden, die kontinuierliche Verschlechterung der Lungenfunktion nicht aufhalten (Curtis et al., 2007). Diese Beobachtungen führen in den letzten Jahren zu der Vermutung, dass es sich bei der COPD um eine Autoimmunerkrankung handelt, an der eine angeborene, als auch eine erworbene Immunantwort beteiligt ist (Cosio et al., 2009; Brusselle et al., 2011).

Die chronische Inflammation wird durch komplexe intra- und interzelluläre Prozesse aufrecht erhalten. Die Charakterisierung dieser Entzündungsreaktion kann anhand der Untersuchung von induziertem Sputum erfolgen (Nicholas und Djukanovic, 2009). Allerdings erklären die bisherigen Quantifizierungsmethoden der zellulären Sputumdifferenzierung und der Messung einzelner Biomarker im Sputumüberstand die Pathophysiologie der COPD nur unzureichend.

1.2 Einsatz von induziertem Sputum zur Untersuchung entzündlicher Prozesse

Zur Charakterisierung des entzündlichen Anteils der Erkrankung wird zur Gewinnung von Untersuchungsmaterial neben der Biopsie und bronchoalveolären Lavage (BAL) in den letzten Jahren verstärkt induziertes Sputums verwendet (Magnussen et al., 2000; Singh et al. 2010; Sagel et al., 2012).

Dieses Verfahren hat gegenüber der bronchoalveolären Lavage und der Biopsie-Probenentnahme den Vorteil, dass induziertes Sputum nicht-invasiv gewonnen werden kann. Die Sputuminduktion kann auch bei schwerer COPD, sofern der FEV₁-Wert > 30% bzw. über einem Liter liegt, durchgeführt werden (Taubе et al., 2001). Hingegen ist die Rückgewinnungsrate der Spülflüssigkeit nach BAL in diesem Stadium der Erkrankung vermindert und damit das Untersuchungsergebnis weniger aussagekräftig (Löfdahl et al., 2005). Induziertes Sputum kann für wiederholte Messungen innerhalb von klinischen Studien, als auch zur Überwachung von Krankheitsverläufen eingesetzt werden (Gibson et al., 2001; Pavord et al., 2002; Pizzichini et al., 1996).

Das Verfahren der Sputuminduktion ist für verschiedene Atemwegserkrankungen nach ERS/ATS-Richtlinien standardisiert (Djukanovic et al., 2002).

Die Patienten inhalieren vernebelte NaCl-Lösungen, wodurch die Schleimbildung in den Atemwegen angeregt und das Abhusten von Sputum erleichtert wird (Paggiaro et al.,

2002). Die NaCl-Konzentration bei der Sputuminduktion hat keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der differenzierten Sputumzellen und die Entzündungsmediatoren im Sputumüberstand (Cataldo et al., 2001). Die zelluläre Zusammensetzung des Sputums ändert sich bei Gesunden und Asthmatikern im Verlaufe der Inhalationsperioden, da vermehrt tiefer gelegene Atemwege erreicht werden (Holz et al., 1998). Bei COPD-Patienten hingegen treten diese zellulären Veränderungen in Abhängigkeit von der Anzahl der Inhalationsperioden nicht auf (Toungoussova et al., 2007).

Die Aufarbeitung des abgehusteten Materials sollte innerhalb von zwei Stunden erfolgen, da eine längere Lagerung zu Verlust der Vitalität und damit Veränderungen der Proteinkonzentrationen sowie zu morphologischen Veränderungen an den Zellen führt (Holz et al., 2000).

Im Gegensatz zur BAL-Aufarbeitung, bei der die Zellen frei in der Spüllösung vorliegen, ist vor der Analyse der induzierten Sputumzellen eine Homogenisierung der Sputumzellcluster notwendig, um diese aus dem Bronchialsekret zu lösen (Popov et al., 1994). Dazu wird standardmäßig Dithiothreitol verwendet (Efthimiadis et al., 2002), welches als Reduktionsmittel entwickelt wurde und sowohl freie SH-Gruppen schützt als auch Disulfidbrücken aufspaltet (Cleland, 1964).

Im Sputum führt diese reduzierende Wirkung zur Aufspaltung der Disulfidbrücken der Mucus-Glykoproteine und ermöglicht so die Auftrennung des Sputums in eine Zellfraktion und eine flüssige Phase, den sogenannten Sputumüberstand (Pin et al., 1992).

Die reduzierende Wirkung von DTT bewirkt eine Auffaltung von Proteinstrukturen die hauptsächlich durch Disulfidbrücken stabilisiert werden. Eine Veränderung der Detektierbarkeit von inflammatorischen Mediatoren im Sputumüberstand durch DTT ist für zahlreiche Analyte nachgewiesen (Efthimiades et al. 1997, Woolhouse et al., 2002, Wang et al., 2009). DTT beeinflusst auch die Integrität der Epitope von Proteinen, und damit die immunozytochemische Nachweisbarkeit von Proteinen der Leukozytenzellmembran (Loppow et al., 2000). Neben diesem DTT-Effekt auf den Sputumüberstand und die Proteine in der Zellmembran, wirkt DTT intrazellulär auf den oxidativen Status von Sputumzellen (Hector et al., 2009).

Vor diesem Hintergrund ist es erforderlich, bei der Weiterentwicklung der Sputumanalytik mögliche DTT-Effekte auf zellulärer Ebene, bei der Messung von Proteinen im Sputumüberstand und bei der Untersuchung von intrazellulären Vorgängen, wie z. B. der RNA-Expression zu berücksichtigen.

1.3 Einsatz der HOPE-Technik bei induziertem Sputum

Im Sputum werden zunehmend molekularbiologische Techniken zur RNA- und miRNA-Analyse eingesetzt, wobei die Sputumzellproben durch den Einsatz von Trizol u. a. Reagentien lysiert und eingefroren werden (Singh et al., 2011; Van Pottelberge et al., 2011). Für weitere bestätigende Analysen, wie immunozytochemische Nachweise, müssen hier zusätzliche Proben generiert werden, da morphologische Untersuchungen nicht möglich sind. Außerdem führt die Lagerung von Sputumproben unter dem Gefrierpunkt zu Veränderungen in der Zellzusammensetzung und insbesondere zu einer prozentualen Abnahme der neutrophilen Granulozyten (Prince et al., 2005).

Eine andere Möglichkeit biologisches Material lagerfähig zu machen, ist die für Gewebe häufig verwendete Formalin-Fixierung. Sie ist jedoch keine geeignete Alternative, da die Proteine ihre antigenen Eigenschaften verändern und so schwieriger zu detektieren sind (Olert et al., 2001). Die Fixierung von Sputumzellen mit einer Azeton-Methanol-Lösung wurde getestet, zeigte aber einen negativen Einfluss auf die Qualität der Morphologie, da die Fixierung zur Dehydration und Schrumpfung der Zellen führte (St.-Laurent et al., 2006).

Eine in den letzten Jahren erprobte Möglichkeit biologische Proben zu konservieren ist die Hepes-glutamic acid buffer-mediated Organic solvent Protection Effect (HOPE)-Technik (Olert et al., 2001). Auch nach mehrjähriger Lagerung war es möglich mit dieser Technik an Geweben molekularbiologische Untersuchungen, wie zum Beispiel In-situ Hybridisierung, Northern Blots und Western Blots, durchzuführen (Goldmann et al., 2002; Goldmann et al., 2004; Uhlig et al., 2004; Umland et al., 2003). Für HOPE-behandelte, paraffin-eingebettete Gewebeproben ist gezeigt worden, dass Proteine, die als Biomarker dienen, immunohistochemisch ohne Antigen-Wiederherstellung nachweisbar sind (Goldmann et al., 2003). Weiterhin ist die HOPE-Protektionslösung in der Lage

Nukleinsäuren in paraffin-eingebetteten Geweben vor Degradierung zu schützen (Goldmann et al., 2005; Goldmann et al., 2006).

Diese Protektionslösung unterscheidet sich in ihrer Wirkung von der Formalin-Fixierung, da sie nicht zur Quervernetzung der Proteine führt. Die HOPE-Technik erhält so die Epitope für die Bindung von Antikörpern in immunzytochemischen Nachweisverfahren frei zugänglich.

Die HOPE-Protektionslösung ist eine wässrige, hyperosmolare, patentierte HEPES-Pufferlösung, welcher verschiedene Aminosäuren, Monosaccharide sowie verschiedene Zusatzstoffe wie Glutaminsäure, Imidazol, Natriumazid und Phenolrot zugesetzt sind (Olert, 2003). Ein Teil der Wirkung der HOPE-Lösung wird folgendermaßen beschrieben: Sie dringt durch Diffusion in die Zellen ein und verändert die Permeabilität der Zellmembran, sodass bei der späteren Azeton-Entwässerung die schädigenden Effekte von Azeton vermindert werden (Olert, 2001).

Diese Technik wurde bereits für BAL-Proben erfolgreich angewandt. Dabei wurden Proben verschiedener pulmonaler Erkrankungen mit verschiedenen molekularbiologischen Analyseverfahren untersucht (Marwitz et al., 2011).

Die Anwendbarkeit der HOPE-Technik für induzierte Sputumzellproben und für klinische Studien ist zu klären. Diese Technik könnte die Sammlung von Sputumzellproben in Biobanken und deren spätere molekularbiologische Untersuchung ermöglichen.

Die hier für HOPE-Sputumproben eingesetzte Transkriptom-Analyse hat das Ziel, Gene mit differentieller Expression zwischen COPD-Patienten und gesunden Kontrollpersonen zu ermitteln. Weiterhin kann der Vergleich von signifikant unterschiedlichen Genexpressionen dazu genutzt werden, mögliche neue Gene zu finden, die für die Entstehung der chronischen Entzündung bedeutsam sein könnten.

1.4 Fragestellung

Die Untersuchungen haben das Ziel, die Analysemöglichkeiten im induzierten Sputum unter besonderer Berücksichtigung des DTT-Effektes zu erweitern, um Entzündungsvorgänge bei der COPD näher zu charakterisieren (siehe Abbildung 1, Seite 8). Dazu wird induziertes Sputum von mittel- bis schwergradigen COPD-Patienten (GOLD-Stadium II und III) und einer gesunden Kontrollgruppe gewonnen. Für die Sputumaufarbeitung werden die Homogenisierung mit DTT und eine mechanische, DTT-freie Homogenisierung miteinander kombiniert.

Der in beiden Verfahren gewonnene Sputumüberstand wird auf einem validierten Multiplex-Panel mit 47 Proteinen, welche für Entzündungsprozesse relevant sein könnten gemessen und auf einen möglichen DTT-Effekt untersucht.

Die aus dem Sputum isolierten Zellen werden mittels Differentialzytologie untersucht und auf einen DTT-Effekt geprüft.

Die übrigen Sputumzellen werden pelletiert, mit der HOPE-Technik behandelt und eine kombinierte Nutzung zur RNA-Expressionsanalyse (Transkriptom) und immunozytochemischen Nachweisen untersucht.

Dabei ist zu klären, ob genügend Zellen aus induzierten Sputumproben für die Transkriptom-Analyse gewonnen werden können. Weiterhin ist zu klären, ob die RNA-Qualität nach der Sputumaufarbeitung der Zellen für die Transkriptom-Analyse ausreicht und auch in klinische Studien zuverlässig einsetzbar ist.

Es stellt sich die Frage, ob die Genexpression zwischen den verschiedenen Gruppen COPD (Raucher), COPD (Exraucher) und Kontrollgruppe signifikante Unterschiede zeigt und damit die Suche nach neuen krankheitsrelevanten Markern ermöglicht.

Ein eventueller Einfluss von DTT auf das Transkriptom wird durch den Vergleich der Genexpression zwischen einer RNA-Probe aus der COPD-Gruppe (Raucher) mit DTT-Behandlung bei der Sputumaufarbeitung und einer RNA-Probe der gleichen COPD-Gruppe (Raucher) ohne DTT-Homogenisierung untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Die methodische Weiterentwicklung der Sputumanalytik wurde gemäß der in Abbildung 1 dargestellten Untersuchungsschritte durchgeführt.

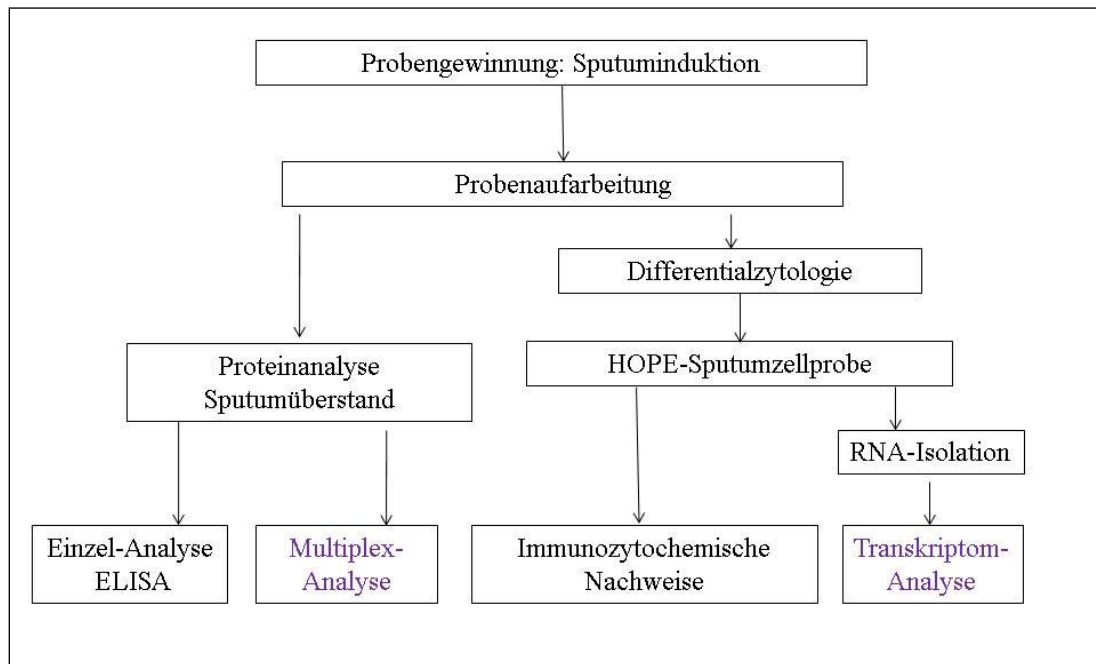


Abbildung 1. Studiendesign zur erweiterten inflammatorischen Charakterisierung von induziertem Sputum bei COPD.

Der Untersuchungsverlauf gilt für beide Gruppen: COPD-Patienten und Kontrollpersonen. Dabei wurde die Probenaufarbeitung in der COPD-Gruppe parallel mit und ohne DTT, für die Kontrollgruppe immer mit DTT durchgeführt.

Für die **Multiplex-Analyse** wurde das Multi Analyte Profile xMAP® Panel (RBM, Rules Based Medicine, Texas, USA) verwendet (siehe Kapitel 2.3.8.2). Dabei wurde die Validierung der Matrizen zur Proteinanalyse und die Messung der Proteinkonzentrationen im Sputumüberstand von Rules Based Medicine® (RBM, Texas, USA) durchgeführt.

Für die **Transkriptom-Analyse** wurde das Agilent Human Genome Microarray 4x44 k. (Agilent Technologies, Heilbronn, D) eingesetzt (siehe Kapitel 2.3.7). Die Qualitätskontrolle der gepoolten RNA-Proben und die Messung der Genexpressionen auf dem Agilent Human Genome Microarray 4x44 k wurden von der Firma ImaGenes, Berlin durchgeführt.

Im Verlauf der Untersuchungen zur Erweiterung der methodischen Möglichkeiten zur inflammatorischen Charakterisierung von induziertem Sputum wurden folgende Schritte geprüft:

1. Sputuminduktion: Probandenverträglichkeit, Qualität und Quantität des Ausgangs-sputums.
2. Probenaufarbeitung mit und ohne DTT: Vitalität und Quantität der aus dem Sputum isolierten Zellen, insbesondere für die HOPE-Technik.
3. Differentialzytologie: Qualitätsvergleich der Probenhomogenisierung mit und ohne DTT.
4. RNA in den Einzelproben: Qualität, Menge und Reinheit, Reproduzierbarkeit der HOPE-Technik, Vergleich der HOPE-Technik mit anderen Konservierungsmethoden.
5. RNA in gepoolten Proben: Qualität, Menge und Reinheit, sowie Einbaurate für die Transkriptom-Analyse.
6. Immunzytochemische Nachweise an HOPE geschützten Sputumpräparaten: Morphologie und Anwendbarkeit.
7. Validierung des Multiplex-Panels für den Sputumüberstand.

Alle Angaben zu verwendeten Geräten, die dazu gehörigen Reagentien sowie die Rezepturen von Lösungsansätzen sind in Kapitel 7.3 benannt.

2.2 Auswahl der Studienteilnehmer

Die Patienten und lungengesunden Kontrollpersonen wurden aus der Datenbank des Pneumologischen Forschungsinstitutes an der LungenClinic Grosshansdorf rekrutiert.

Dabei wurden in die Untersuchung Patienten mit mittlerer COPD (Gold II) und schwerer COPD (Gold III), entsprechend den spirometrischen GOLD-Kriterien (Rabe et al., 2007) und mit einer Raucheranamnese von mindestens 10 pack years (py) eingeschlossen. Weitere Voraussetzungen für den Studieneinschluss war in der COPD-Gruppe, dass keine Behandlung mit entzündungshemmenden Medikamenten, wie Steroiden bzw. Theophyllin, sowie PDE₄-Hemmern in den letzten 4 Wochen vor Studienteilnahme erfolgt ist und keine Atemwegsinfektionen in den letzten 4 Wochen vorlagen.

Als Vergleichsgruppe wurden gesunde Kontrollpersonen mit normaler Lungenfunktion, Nieraucher, oder Exraucher mit weniger als 5 pack years in die Studie eingeschlossen. Zusätzlich wurden für die Kontrollgruppe Personen in der gleichen Altersspanne wie in der COPD-Gruppe ausgewählt, da bekannt ist, dass sich die zelluläre Zusammensetzung des Sputums mit zunehmendem Lebensalter verändert (Thomas et al., 2004). Atemwegsinfekte in den letzten vier Wochen vor Studienbeginn, sowie anti-inflammatorische Therapie waren ebenfalls Ausschlusskriterien.

Nach Genehmigung durch die zuständige Ethikkommission (Ethik-Kommission der Ärztekammer Schleswig-Holstein, AZ 030/11) wurden alle Teilnehmer vor Studienbeginn über die Studieninhalte aufgeklärt und ihr schriftliches Einverständnis eingeholt.

Zur Überprüfung der Kandidatgene aus der Transkriptom-Analyse wurden archivierte Lungengewebeproben der Klinischen und Experimentellen Pathologie des Forschungszentrums Borstel verwendet (Referenznummer 03/153, Ethikkommission der Universität Lübeck).

2.3 Probengewinnung durch Sputuminduktion

Die Sputuminduktion ist ein für verschiedene Atemwegserkrankungen standardisiertes Verfahren, bei dem nach einer Bronchospasmolyse für einen bestimmten Zeitraum NaCl-Lösungen in unterschiedlichen Konzentrationen inhaliert werden und nach jeder

Inhalationsperiode die Lungenfunktion kontrolliert und vom Patienten eine Sputumprobe abgehustet wird (Holz et al., 1998).

Hier wurde ein Protokoll mit vier Inhalationsperioden bei COPD-Patienten und sechs Perioden bei Kontrollpersonen verwendet, welches unter Berücksichtigung der Sicherheitskriterien, vollständig durchgeführt wurde, um eine maximale Sputumzellzahl zu gewinnen.

2.3.1 Praktische Durchführung der Sputuminduktion

Die COPD-Patienten erhielten zur Bronchospasmolyse 400 µg, gesunde Kontrollpersonen 200 µg Salbutamol (Sandoz Pharmaceuticals GmbH, Rotkreuz, Schweiz). Vor und nach der Bronchospasmolyse wurde die Lungenfunktion mit einem Masterscope-Spirometer (Viasys-Healthcare GmbH, Hoechberg, D) gemessen, um das GOLD-Stadium als Einschlusskriterium für die COPD-Patienten zu klassifizieren. Gleichzeitig wurden so Sicherheitswerte der Lungenfunktion für die nachfolgenden NaCl-Inhalationen bestimmt. Dabei wurde der höchste FEV₁-Wert nach der Bronchospasmolyse als Ausgangswert für die Berechnung des 90 bzw. 80 % FEV₁-Wertes verwendet. Beim Erreichen des 90 %-Wertes, d. h. das FEV₁ fällt um > 10 % vom Referenzwert ab, wurde die NaCl-Konzentration nicht weiter gesteigert. Beim Erreichen des 80 %-Wertes wurde die Sputuminduktion abgebrochen, 200 µg Salbutamol appliziert und nach 10 Min. eine Kontroll-Lungenfunktion durchgeführt.

Zur Sputuminduktion wurden die NaCl-Lösungen (Antares-Apotheke, Großhansdorf, D) mit einem Ultraschallvernebler (NE-U12, Omron, Japan) vernebelt und inhaliert. Die COPD-Patienten inhalierten 2 x 5 Min. 0,9 %ige NaCl-Lösung und anschließend 2 x 5 Min. 3 %ige NaCl-Lösung. Nach jeder Inhalationsperiode wurde die Lungenfunktion auf einen FEV₁-Abfall hin kontrolliert und die Patienten gebeten Sputum abzuhusten. Um eine qualitativ hochwertige Sputumprobe zu gewinnen, wurden die Patienten aufgefordert vor dem Abhusten gründlich die Nase zu putzen, den Mund mehrmals mit klarem Wasser auszuspülen und zu gurgeln, sodass der Anteil an Plattenepithelzellen aus Mund- und Rachenschleimhaut im abgehusteten Sputum so gering wie möglich war. Danach sollte bei möglichst trockenem Mund durch stoßartiges Ausatmen Sputum „nach oben“ befördert und durch leichtes Aushusten in eine Petrischale gebracht werden. Aus Sicherheits-

gründen wurden die Patienten während der NaCl-Inhalation beobachtet und bei starkem Hustenreiz die Inhalation unterbrochen.

Bei den Kontrollpersonen wurden insgesamt sechs fünfminütige NaCl-Inhalationen (2 x 3 %, 2 x 4 % und 2 x 5 %ige NaCl-Lösung) durchgeführt.

Die Sputumproben wurden nach dem Abhusten direkt unter dem Mikroskop (Leica DM LS, Wetzlar, D) auf das Vorhandensein von Sputumzellclustern geprüft, diese Sputumzellcluster selektiert und bis Induktionsende bei + 4 °C gelagert (max. 1 Std.).

2.3.2 Aufarbeitung der Sputumproben für die Differentialzytologie

Für die Untersuchung des DTT-Effektes auf zellulärer Ebene wurden in der COPD-Gruppe zwei Methoden zur Homogenisierung der Sputumproben parallel angewandt (Abbildung 2). Dabei wurde die Sputumaufarbeitung mit DTT, wie im Protokoll für selektierte Sputumzellcluster beschrieben (Pedersen et al., 2013) und die Sputumaufarbeitung ohne DTT mit einer modifizierten mechanischen Homogenisierungsmethode (Hector et al., 2008) durchgeführt (Abbildung 2). Insbesondere wurde hier, im Vergleich zur Arbeit von Hector, das Volumen der selektierten Sputumzellcluster erhöht, um alle Sputumzellen innerhalb der 15-minütigen Inkubationszeit der DTT-behandelten Proben mechanisch homogenisieren zu können.

In der Kontrollgruppe mit lungengesunden Probanden erfolgte die Sputumaufarbeitung ausschließlich mit DTT (Calbiochem, Bad Soden, D), da das erwartete Gesamtvolumen an abgehustetem Material geringer eingeschätzt wurde als für die COPD-Gruppe. Das Ziel war die Isolation einer Mindestzellzahl von 10^6 Zellen, um die erforderliche Menge von 1 µg RNA für die Agilent Microarray 4x44K-Analyse extrahieren, sowie zusätzliche immunozytochemische Nachweise an HOPE-Sputumzellpräparaten durchführen zu können.

Das frisch abgehustete Sputum wurde zunächst unter dem Mikroskop auf seine Qualität geprüft. Zur Erreichung einer optimalen Vitalität der Zellen und einer geringen Einflussnahme von Enzymen aus dem Speichel, wurden die Sputumzellcluster parallel zur Sputuminduktion selektiert.

Dabei wurden drei Parameter zur Bewertung der Qualität des Ausgangssputums ermittelt:

1. Menge der enthaltenen Sputumzellcluster
2. Anteil an Plattenepithelzellen
3. Selektierbarkeit der Sputumzellcluster

Die Bewertung erfolgte anhand einer 6er-Skala:

- 1 Viele große Sputumzellcluster, in allen Proben vorhanden, leicht selektierbar, keine Plattenepithelzellen.
- 2 Viele große Sputumzellcluster, in den meisten Proben vorhanden, gut selektierbar, wenige Plattenepithelzellen.
- 3 Viele Sputumzellen vorhanden, teilweise in Clustern, teilweise diffus verteilt, in den meisten Proben vorhanden, befriedigend selektierbar, wenige Plattenepithelzellen.
- 4 Mittlere Anzahl an Sputumzellen, teilweise in Clustern und teilweise diffus verteilt in den meisten Proben vorhanden, ausreichend selektierbar, Plattenepithelzellen vorhanden.
- 5 Wenige Sputumzellen, diffus verteilt, schwer selektierbar, größere Anzahl an Plattenepithelzellen und Speichel.
- 6 Keine Sputumzellen selektierbar, Speichel und Plattenepithelzellen überwiegen.

Die Sputumzellcluster wurden mit einer sterilen Impfschlinge selektiert und in eine Petrischale überführt. Die selektierten Sputumzellcluster wurden bei 4 °C bis zum Induktionsende gelagert und direkt im Anschluss aufgearbeitet.

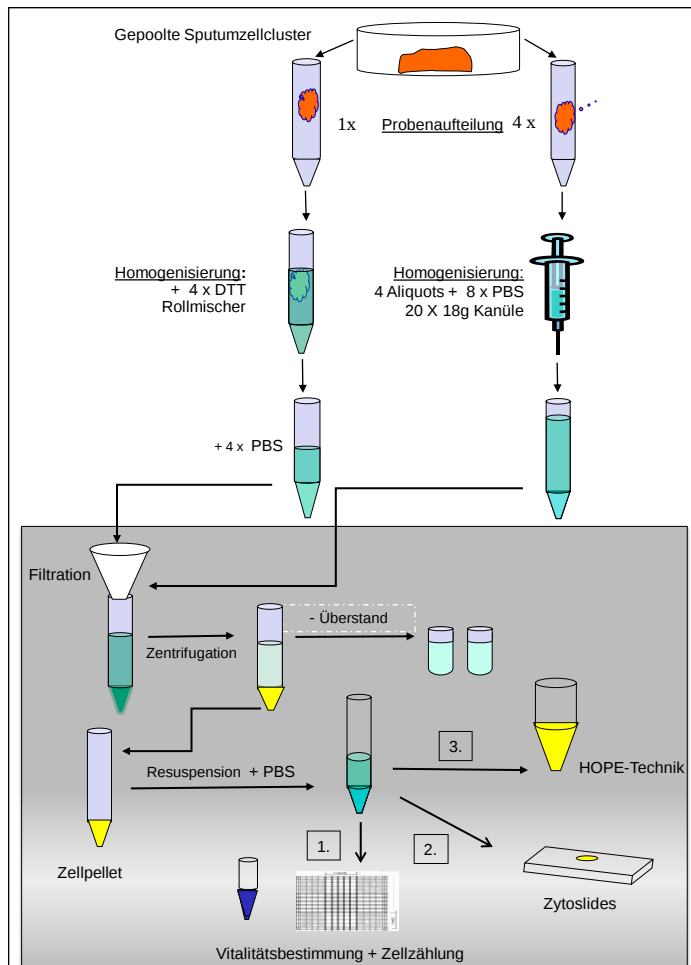


Abbildung 2. Sputumaufarbeitung mit paralleler Homogenisierung mit und ohne DTT und vollständiger Nutzung der Zellen für die Zelldifferenzierung und HOPE-Technik. Die Arbeitsschritte im grau unterlegten Bereich wurden für beide Homogenisierungsmethoden parallel und in gleicher Weise ausgeführt.

Die resuspendierten Sputumzellpellets wurden 1. für die Vitalitätsbestimmung und die Bestimmung der Zellzahl, 2. Anfertigung der Zelldifferenzierung und 3. die HOPE-Technik eingesetzt.

Für die parallele Sputumaufarbeitung mit und ohne DTT-Zusatz in der COPD-Gruppe wurde das selektierte Ausgangssputum in zwei Aliquots aufgeteilt (Abbildung 2).

Einem Sputum-Aliquot wurde jeweils das vierfache Volumen an 0,65 mM DTT-Gebrauchslösung zugefügt und 15 Min. bei Raumtemperatur auf einem Rollenmischer (Karl Hecht KG, Sondheim, D) inkubiert. Danach wurde das vierfache Volumen an Ausgangssputumgewicht an 1x PBS (Ambion®, Live Technologies GmbH, Frankfurt, D) zugefügt.

Das zweite Sputum-Aliquot für die mechanische Homogenisierung der Sputumzellcluster ohne DTT wurde in 4 Aliquots aufgeteilt und zu jedem Ansatz das 8-fache Volumen 1x PBS zugefügt. Jeder Ansatz wurde 20 Mal mit einer 18G-Kanüle (Terumo, Eschborn, D) in einer 2ml Spritze (B. Braun, Melsungen, D) vorsichtig aufgezogen und langsam wieder in das Reaktionsgefäß zurückgeführt.

Danach wurden die Sputumproben beider Aufarbeitungsvarianten durch einen mit 1x PBS angefeuchteten 50 µm-Nylonfilter (Fritz Eckhart GmbH, Waldkirch, D) filtriert und die filtrierten Zellsuspensionen gewogen.

Im nächsten Aufarbeitungsschritt wurden die Zellen vom Überstand separiert. Dazu wurden die filtrierten Zellsuspensionen für 10 Min. bei 800g und 4 °C zentrifugiert (Kühlzentrifuge Labofuge 400R, Heraeus Instruments, Hanau, D).

Der Sputumüberstand wurde in fünf Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C gelagert.

Nach Resuspension der Zellpellets mit PBS wurde das Gesamtgewicht bestimmt und 10 µl Zellsuspension für die Vitalitätsbestimmung abgenommen.

Die Vitalität der Zellen wurde durch Anfärbung der toten Zellen mit Trypanblau (Sigma, Irvine, UK) bestimmt und erfolgte parallel zur Zellzählung in der Neubauer Zählkammer (Fisher Scientific, Schwerte, D). Dabei wurden alle nicht-PE Zellen in einem Großquadrat der Zählkammer, nach lebenden (farblosen) und toten (blau-angefärbten) Zellen getrennt, ausgezählt. Bei weniger als 100 nicht-PE Zellen in einem Großquadrat wurden weitere Großquadrate ausgezählt.

Die Zellkonzentrationen für beide Aufbereitungsverfahren wurden auf jeweils 30000 Zellen/ml eingestellt und je vier Cytospin-Präparate angefertigt. Dazu wurden je 100 µl Zellsuspension in das Zytofiltersystem (Zytotrichter + Filterkarte + Objektträger) transferiert und 6 Min. bei 450 U/min mit der Zytofuge (Shandon Life Sciences Int. Ltd. Europe, Astmoor, U.K) auf die Objektträger (Henry Schein ®, Hamburg, D) zentrifugiert. Die Cytospin-Präparate wurden unter dem Mikroskop auf Homogenität, Zelldichte und Plattenepithelanteil geprüft und 30 Min. luftgetrocknet.

2.3.3 Auswertung der Cytospin-Präparate

Für die Differenzierung wurden die Cytospin-Präparate 5 Min. mit Methanol (Sigma Aldrich, Taufkirchen, D) fixiert, 15 Min. mit Giemsa-Färbelösung (Ansatz, siehe Anhang, S. 91) gefärbt und kurz in Aqua dest. gespült.

Von jedem Sputumpräparat wurden 400 Zellen von zwei unabhängigen Personen differenziert. Dabei wurde die Anzahl der Sputum-Makrophagen (SM), der neutrophilen Granulozyten (NG), der eosinophilen Granulozyten (EOS), der bronchialen Epithelzellen (BEC), der Lymphozyten (LY) und der Plattenepithelzellen (PE) ermittelt.

Die Qualität der Cytospin-Präparate wurde von beiden Auswertern nach der Zelldifferenzierung mit einer Klassifikation von 2 - 1,5 - 1 - 0,5 - 0 bewertet. Dabei wurden der morphologische Zustand der Zellen, der Anteil an nicht differenzierbaren Zellen und der Plattenepithelanteil bewertet. Zusätzliche Einflüsse auf die Auswertung, wie Homogenität der Zellverteilung, Schleim und Detritus, Färbeartefakte wurden vermerkt.

Klassifikation der Cytospin-Präparate-Qualität:

- 2 Zellen morphologisch optimal erhalten, alle Zellen differenzierbar, keine Plattenepithelzellen enthalten.
- 1,5 Zellen morphologisch gut erhalten, einzelne Zellen nicht differenzierbar, wenige Plattenepithelzellen enthalten.
- 1 Zellen morphologisch befriedigend erhalten (neutrophilen Granulozyten, teilweise ohne Zytoplasma und Zellmembran, Zellen leicht gequollen, oder geschrumpft), einige Zellen nicht differenzierbar, Plattenepithelzellen enthalten.
- 0,5 Zellen morphologisch gerade noch erkennbar, größerer Anteil Zellen nicht differenzierbar, erhöhter Anteil an Plattenepithelzellen.
- 0 Zelldetritus, keine auswertbaren Zellen vorhanden, oder >50 % Plattenepithelzellen.

Aus den Ergebnissen der Zelldifferenzierung der beiden Auswerter wurden folgende Größen für jedes Präparat berechnet:

Prozentualer Anteil nicht-PE Zellen:

$400 \text{ (Gesamtzahl differenzierter Zellen)} - \text{Anzahl PE-Zellen}$, daraus wird der Prozentsatz Nicht-PE-Zellen für die einzelnen Zelltypen berechnet (Zelltyp [%]).

Mittelwerte der prozentualen Zellanteile:

Für die in Schritt 1 durch zwei Personen erhobenen Werte werden die Mittelwerte berechnet.

Gesamtzellzahl (TCC, total cell count):

$(\text{Nicht-PE-Zellen/ml PBS}) \cdot (\text{Gewicht des Zellpellets} + \text{PBS [mg]}) / 1000$

TCC/ml Sputum:

$\text{TCC} / \text{Gewicht der selektierten Sputumzellclustern [mg]} \cdot 1000$

$\text{TCC} \cdot 10^6/\text{ml Sputum pro Zelltyp:}$

$(\text{Zelltyp [\%]} \text{ nicht-PE-Zellen}/100) \cdot \text{TCC/ml Sputum}/1.000.000$

2.3.4 Herstellung von HOPE-Sputumzellpräparaten

Direkt im Anschluss an die Sputumaufarbeitung für die Zelldifferenzierung wurden die restlichen Zellsuspensionen aus beiden Aufarbeitungsverfahren in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, D) überführt und bei 4 °C für 8 Min. mit 1120g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und auf die Zellpellets wurde je 1 ml 4 °C kalte HOPE-Protektionslösung (DCS Innovative Systems, Hamburg, D) zugefügt.

Die weitere Verarbeitung der HOPE-Sputumzellpellets wurde in der Klinischen und Experimentellen Pathologie von den dortigen Mitarbeitern nach der für BAL-Proben entwickelten Methode, durchgeführt (Marwitz et al., 2011). Dabei wurden die HOPE-Sputumzellpellets über Nacht bei 4 °C inkubiert und am nächsten Morgen die HOPE-Lösung abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet sechs Mal mit 4 °C kaltem Azeton (Merck, Darmstadt, D) gewaschen. Dabei wurde das Zellpellet jeweils mit 1 ml Azeton für 30 Min. bei 4 °C inkubiert und anschließend für 2 Min. mit 8000g bei 4 °C zentrifugiert.

Für die Einbettung der gewaschenen HOPE-Sputumzellpellets in Low melting Paraffin (Polarit, DCS, Hamburg, D) wurden die Proben circa 16 Stunden bei 54 °C mit dem Paraffin inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Danach wurde der entstandene Paraffinkonus mit dem Zellpellet herausgetrennt und in einen warmen Paraffinblock eingesetzt. Die so erhaltenen HOPE-Sputumzellpräparate wurden bei 4 °C gelagert. Bei der weiteren Verwendung der HOPE-Sputumzellpräparaten wurde die im Zellpellet enthaltene Zellzahl berücksichtigt: Präparate mit weniger als 10^6 Zellen wurden komplett für die RNA-Isolation verwendet. Von Präparaten mit mehr als 10^6 Zellen wurden zunächst sechs 5 µm Schnitte für immunozytochemische Nachweise abgenommen und die restliche Probe für die RNA-Isolation eingesetzt.

2.3.5 Immunozytochemische Nachweise

Die Basis der immunozytochemischen Nachweise in HOPE-Sputumzellpräparaten bilden drei Analyte, die im Sputum als inflammatorische Marker bei COPD verwendet werden und die im Sputumüberstand im ELISA-Verfahren detektierbar sind.

Dabei ist Interleukin-8 ein chemotaktisches Zytokin, welches von Makrophagen und neutrophilen Granulocyten gebildet und bei COPD, unabhängig vom Rauchstatus, erhöht ist (Chung, 2001). MPO gilt als Marker für die Aktivität der neutrophilen Granulozyten (Cockayne et al., 2012) und MMP-9 ist ein proteolytisches Enzym, welches von alveolaren Makrophagen gebildet und bei COPD als Marker für den Abbauprozess in der Lunge verwendet wird (Russell et al., 2002).

Als vierter Analyt wurde Interleukin-17A welches von T-Lymphozyten gebildet wird, ausgewählt. Eine erhöhte Anzahl IL-17A⁺ Zellen kann bei COPD (Exraucher) in Lungenbiopsien nachgewiesen werden (Doe et al., 2010). Dabei ist die sekretierte Konzentration von IL-17A im Sputumüberstand mit dem ELISA-Verfahren unter der Nachweisgrenze (Doe et al., 2010) und der immunozytochemische Nachweis kann Hinweise auf das Vorhandensein von IL-17A im Sputum geben.

Im zweiten Teil der Untersuchungen wurden mit MARCO und SRGAP1 zwei Proteine ausgewählt, die im Transkriptom eine signifikante unterschiedliche RNA-Expression

zwischen der COPD-Gruppe (Raucher) und der Kontrollgruppe zeigten (siehe Kapitel 3.10.3).

Alle immunozytochemischen Nachweise wurden manuell an 5 µm dicken Schnitten aus HOPE-Sputumzellpräparaten durchgeführt.

Die HOPE-Sputumschnitte wurden entparaffiniert (Marwitz et al., 2011), indem sie für 10 Min. mit Isopropanol bei 60 °C inkubiert und danach kurz mit Isopropanol 60 °C gespült wurden. Anschließend wurden die Präparate für 10 Min. mit 70%igem Azeton bei 4 °C entwässert und 10 Min. mit Aqua dest. bei 4 °C rehydriert. Zum Abschluss wurden die Präparate mit Aqua dest. auf Raumtemperatur temperiert.

Zur Deaktivierung endogener Peroxidasen wurden die entparaffinierten Schnitte 10 Min. mit 3 %igem H₂O₂ (Merck, Darmstadt, D) behandelt und danach mit T-TBS Spülpuffer (pH 7,6) (Carl Roth, Karlsruhe, D; Ansatz, siehe Anhang) gewaschen.

Anschließend wurden die Schnitte zur Minimierung unspezifischer Bindung des Primär-, oder des Sekundärantikörpers mit 200 µl Protein-Block (Lösung 1, HRP-Polymer Kit, Zytomed Systems, Berlin, D) für 5 Min. inkubiert und anschließend 3 x 2 Min. mit T-TBS Spülpuffer (pH 7,6) gewaschen.

Die Primärantikörper (Primär-AK) wurden mit Antibody Diluent (Zytomed Systems, Berlin, D) angesetzt (Verdünnungsfaktoren, siehe Tabelle 1). Zur Markierung des Zielantigens wurden die Sputumpräparaten für 30 – 60 Min. mit je 100 µl Primär-AK überschichtet.

Als Negativkontrolle wurden in der COPD-Gruppe jeweils zwei Kontrollen (+DTT/-DTT) mitgeführt, welche keine Behandlung mit dem primären Antikörper erhalten, sondern 30 – 60 Min. mit AK-Diluent inkubiert wurden. In der Kontrollgruppe wurde jeweils eine Negativkontrolle (+DTT) mitgeführt.

Bei immunozytochemischen Nachweisen mit Borsäure (siehe Tabelle 1) wurde als Negativkontrolle ein Präparat mit Borsäure-AK-Diluent (Verhältnis 1: 1) inkubiert und separat mitgeführt.

Nach 3 x 2-minütigem Abwaschen von ungebundenem Primär-AK mit T-TBS Spülpuffer (pH 7,6) wurde circa 200 µl Sekundär-, oder Brücken-AK (Lösung 2, HRP-Polymer Kit)

aufgebracht, 15 Min. inkubiert und 4 x 2 Min. mit T-TBS Spülpuffer pH 7,6 gewaschen. Das Auftragen eines Brücken-AK wurde nur bei Verwendung von Primärantikörpern aus der Maus durchgeführt (Tabelle 1).

Im nächsten Schritt wurden die Präparate für 20 Min. mit circa 200 µl Meerrettichperoxidase-gekoppeltes Polymer (HRP-Polymer, Zytomed Systems, Berlin, D) überschichtet.

Das ungebundene HRP-Polymer wurde durch 4 x 2 Min. Waschen mit T-TBS Spülpuffer (pH 7,6) entfernt und die Schnitte nacheinander mit 0,014 %iger AEC-Chromogenlösung (Zytomed Systems, Berlin, D; Ansatz, siehe Anhang) überschichtet. Die Farbentwicklung auf dem Schnitt wurde unter dem Mikroskop beobachtet und durch Überführen in Aqua dest. abgestoppt. Dabei wurde bei der ersten Farbreaktion die optimale Entwicklungszeit ermittelt und diese für alle nachfolgenden Schnitte konstant gehalten (Tabelle 1).

Zur Anfärbung der Zellkerne wurden die Präparate 5 – 10 Sek. in filtrierter Hämatoxylin-Lösung (Sigma-Aldrich, Ekham, UK) gefärbt, anschließend 3 x 10 Sek. in Aqua dest. gewaschen, mit 0,05 % NH₃-Wasser (Carl Roth, Karlsruhe, D) kurz gebläut und zum Abschluss mit Aqua dest. gespült.

Zum Entwässern der Schnitte wurde eine aufsteigende Alkoholreihe in 10 Sek. Schritten durchlaufen: 70 % Ethanol – 80 % Ethanol – 90 % Ethanol - 2 x 96 % Ethanol - 2 x Abs. Ethanol - Xylol.

Abschließend wurden die Präparate mit Pertex- Einbettmedium (Medite GmbH, Burgdorf, D) eingedeckelt.

Tabelle 1. Übersicht zu immunozytochemischen Nachweisverfahren an HOPE-Sputumzellpräparaten.

Antigen	Hersteller Bestellnummer	Primär- antikörper (PA)	PA-Verd.	PA- Inkub. [Min.]	AEC- Entw.zeit [Min.]
Interleukin-8	Proteintech Europe, Manchester, UK Cat No 7038 -1-AP	Polyklonal, Kaninchen	1/100*	30	1,5
Interleukin-17A	Abcam, Cambridge, UK; ab9565	Polyklonal, Kaninchen	1/100*	30	2
Myeloperoxidase	Zytomed Systems, Berlin, D; Cat. No. Mob 206	Monoklonal, Maus	1/100	30	2
MMP-9	Zytomed Systems, Berlin, D; Ref. No. 513- 3664	Polyklonal, Kaninchen	1/200*	30	0,5
MARCO	Abcam, Cambridge, UK; ab33453	Monoklonal, Maus	1/100	60	4
SRGAP1	Sigma Aldrich; Saint Louis, MO, USA, WH0057522M3-100UG	Monoklonal, Maus	1/500	45	2

Abkürzungen: PA, Primärantikörper; PA-Verd., PA-Verdünnung; PA-Inkub., PA-Inkubationszeit; AEC-Entw.zeit, AEC-Entwicklungszeit; IL-8, Interleukin-8; IL-17, Interleukin-17; MPO, Myeloperoxidase; MMP-9, Matrixmetalloproteinase-9; MARCO, Macrophage receptor with collagenous structure; SRGAP1, Slit-Roundabout-GTPase activated protein 1; * PA-Ansatz mit 0.1 M Borsäure (pH 7.2).

Für die Kandidatengene MARCO und SRGAP1 wurden die im Transkriptom enthaltenen Proben der COPD-Gruppe (Raucher) und der Kontrollgruppe ausgewertet. Dazu wurden jeweils 100 angefärbte Sputum-Makrophagen nach Anfärbungsintensität mit einer Score von 1 bis 3 von zwei unabhängigen Auswertern bewertet. Die Ergebnisse beider Bewertungen wurden gemittelt.

Zusätzlich wurden immunozytochemische Nachweise von MARCO und SRGAP1 an archivierte HOPE-geschützte paraffin-eingebettete Lungengewebsproben von COPD-Patienten und Nierauchern nach dem zuvor beschriebenen Protokoll angefertigt. Diese Nachweise wurden von einer Mitarbeiterin der Experimentellen und Klinischen Pathologie des Forschungszentrums Borstel durchgeführt.

2.3.6 RNA-Untersuchungen an HOPE-Sputumzellpräparaten

Die RNA Extraktion wurde wie bei Marwitz et al., 2011 beschrieben durchgeführt. Dazu wurden die in Paraffin eingebetteten Sputumproben in 20 µm dicke Schnitte geschnitten und in Reaktionsgefäße überführt.

Zur Entparaffinierung wurde je 1 ml Xylol (Merck, Darmstadt, D) zu jeder Probe zugefügt, 10 Min. auf einem Rotator bei 30 U/Min. inkubiert und anschließend 5 Min. bei 13000g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Dieser Xylol-Waschschritt wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde die Waschung der Probenpellets zwei Mal in gleicher Weise mit je 1 ml Ethanol (Merck, Darmstadt, D) fortgesetzt. Abschließend wurden die Proben für circa 3 Min. in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

Aus den entparaffinierten HOPE-Sputumproben wurde die RNA mit dem RNAeasy Kit nach den Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden, D) extrahiert.

Dazu wurden zu den vakuumgetrockneten Zellpellets je 600 µl RLT-Puffer (Qiagen, Hilden, D; Ansatz siehe Anhang) zugefügt und mit dem Homogenisator kurz homogenisiert. Anschließend wurden die Proben 3 Min. bei 1400g zentrifugiert, sodass sich die wässrige Phase mit der darin enthaltenen RNA abtrennt. Vom Überstand wurden je 700 µl abgenommen und in Reaktionsgefäße mit vorgelegten 600 µl 70 % Ethanol überführt. Anschließend wurden 700 µl der Lösung auf die Säule gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden mit der Qiagen-Säule 1 Min. bei 8000g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen.

Der restliche Ethanol-Überstand wurde, zur Erhöhung der RNA-Ausbeute, auf die Säule gegeben und für 1 Min. bei 8000g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und 700 µl Puffer RW1 (Qiagen, Hilden, D) auf die Säule pipettiert. Die Qiagen-Säule wurde für 2 Min. bei 8000g zentrifugiert und der Durchlauf aus den Reaktionsgefäßen verworfen. Danach wurde die Qiagen-Säule auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt, 500 µl Waschpuffer RPE (Qiagen, Hilden, D) auf die Säule gegeben und 2 Min. bei 8000g zentrifugiert. Das Reaktionsgefäß wurde geleert, 500 µl Waschpuffer RPE auf die Säule pipettiert und 2 Min. bei 14000g zentrifugiert. Danach wurde die Qiagen-Säule auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt, 30 µl DEPC-Wasser (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D, Ansatz siehe Anhang) genau mittig auf die Säule gegeben, und so die RNA aus der Säule eluiert. Nach 1 Min. Einwirkzeit wurde die Säule für 2 Min. auf höchster Stufe zentrifugiert. Von der

so erhaltenen RNA-Lösung wurden 2 µl für die Qualitätsbestimmung abgenommen und die restliche RNA für die Transkriptom-Analyse bei -80 °C eingefroren.

Die Quantifizierung und Qualitätsbestimmung der extrahierten RNA wurde mit dem Agilent Bioanalyser 2100 und dem RNA 600 Nano chip Assay (Agilent, Böblingen, D) entsprechend des Agilent RNA 6000 Kit Guide durchgeführt.

Für die Messung der Qualität und Menge an extrahierter RNA aus den HOPE-Sputumproben wurde, wie für BAL-Proben beschrieben (Marwitz et al., 2011) vorgegangen.

Die Qualität der mit HOPE geschützten RNA-Proben wurde mit der von Formalin-fixierten und frisch-gefrorenen Sputumproben verglichen. Die RNA-Extraktion aus den frisch-gefrorenen Proben und den Formalin-fixierten Proben erfolgte, wie zuvor beschrieben.

Die Reproduzierbarkeit der RNA-Qualität wurde getestet, indem eine Sputumprobe parallel 3-malig aufgearbeitet, aus diesen Proben die RNA extrahiert und die Qualität analysiert wurde.

2.3.7 Transkriptom-Analyse aus HOPE-Sputumzellpräparaten

Für die Transkriptom-Analyse wurden je vier bis fünf aus den HOPE-Sputumproben gewonnene RNA-Proben in folgenden vier Gruppen gepoolt: COPD (Raucher) mit DTT, COPD (Exraucher) mit DTT, COPD (Raucher) ohne DTT, Kontrollgruppe (gesund) mit DTT.

Dazu wurden die RNA-Proben vorsichtig von -80 °C auf 4 °C aufgetaut, 600 ng Gesamt-RNA aus jeder Einzelprobe entnommen, gepoolt und sofort wieder auf -80 °C gekühlt.

Mit den gepoolten RNA-Proben wurde eine one-Color Microarray-Based Gene Expression Analyse von der Firma ImaGenes, Berlin durchgeführt. Diese Analyse umfasste die praktische Durchführung der Analyse als auch die Gewinnung der Rohdaten.

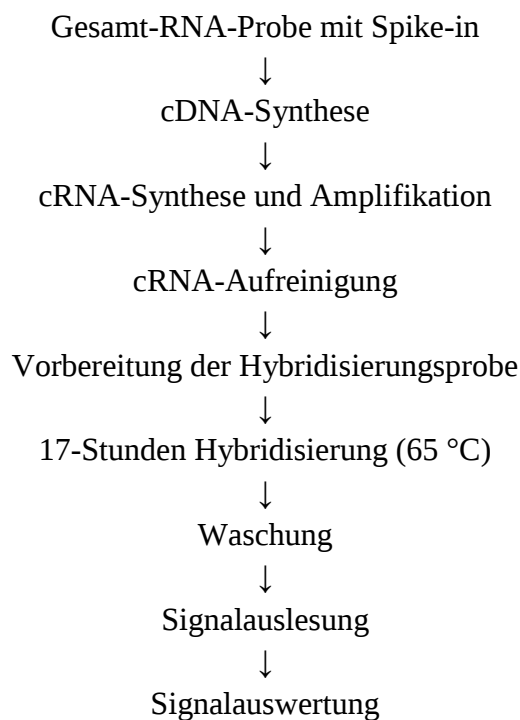
Dazu wurde zunächst die Konzentration und Qualität der vier gepoolten RNA-Proben kontrolliert.

Qualitätskriterien für die Microarray-Analyse sind dabei eine Mindestmenge von 1 µg Gesamt-RNA in 10 µl RNase-freiem Wasser. Weiterhin wurde die RNA-Reinheit mit

dem optischen Dichteverhältnis OD 260/280 bestimmt, welche nach den Eingangsqualitätskriterien von ImaGenes mindestens 1,7 betragen soll.

Die Analyse wurde auf einem Agilent 4x44k human whole genome assay (Agilent technologies, Waldbronn, D) durchgeführt und enthält das Proben-Labeling mit Cyanine 3 (Cy 3), die Kontrolle der Labeling-Effizienz (Nanodrop 2000, peqlab, Erlangen, D), die Hybridisierung der Proben auf den Chip, das Scannen des Chips und die primäre Datenanalyse (entsprechend der Hersteller Anleitung, Agilent technologies, Waldbronn, D).

Die One-Color Microarray-based Gene Expression Analyse wurde nach dem Protokoll von Agilent Technologies in folgenden Schritten durchgeführt:



Bei dieser Methode wird T7 RNA-Polymerase verwendet, die gleichzeitig das Zielmaterial amplifiziert und Cyanine-3-markiertes CTP einbaut.

Für die Datenauswertung wurden folgende vier Vergleichsgruppen gebildet:

Gruppe 1: COPD (Raucher) mit DTT verglichen mit COPD (Exraucher) mit DTT

Gruppe 2: COPD (Raucher) mit DTT verglichen mit COPD (Raucher) ohne DTT

Gruppe 3: COPD (Raucher) mit DTT verglichen mit Kontrollgruppe mit DTT

Gruppe 4: COPD (Exraucher) mit DTT verglichen mit Kontrollgruppe mit DTT

Die Rohdaten der RNA-Expressions-Signale auf dem Agilent Microarray 4x44K Chip wurden in Textfiles gespeichert. Diese Daten dienten als Grundlage für die Quantil-Normalisierung und die hierarchische Cluster-Analyse. Dabei wurde die Quantil-Normalisierung mit der DirectArray Software (Oaklabs, Henningsdorf, D) und die hierarchische Clusteranalyse mit dem GenSpring 12 Software Paket (Agilent, Böblingen, D) in der Klinischen und Experimentellen Pathologie in Borstel durchgeführt. Die aus der hierarchischen Cluster-Analyse resultierende Abbildung 18 wurde von Frau Dr. Sophie Seehase angefertigt.

Nach der Quantil-Normalisierung wurden die Signale zur Qualitätskontrolle einem t-Test unterzogen und ein $p < 0,05$ als Signifikanzschwelle festgelegt.

Die quantil-normalisierten Genexpressionsdaten wurden mit Hilfe einer „supervised method“ (Butte, 2002) analysiert. Dabei wurden die Genexpressionen der COPD-Gruppe (Raucher) mit der Kontrollgruppe, nach Ausschluss aller unbekannten Gene, analysiert. Analysekrterien waren das absolute Expressionsniveau und die Differenz des Expressionsniveaus, die $\log_2$ -Änderung (sog. „fold change“) zwischen den verglichenen Gruppen.

Für Gene mit signifikant unterschiedlichen Expresionen ($\log_2$ Änderung $> 2,0$) wurde eine iHOP-Datenbankrecherche (Hoffmann et al., 2004) durchgeführt.

2.3.8 Einzelanalyse von Proteinen im Sputumüberstand (ELISA-Technik)

Alle ELISA wurden entsprechen der im Kit enthaltenen Herstelleranleitungen durchgeführt. Die Vorverdünnungen des Sputumüberstandes sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2. Übersicht der eingesetzten ELISA-Kits.

Nachzuweisendes Antigen	Hersteller/Vertrieb	Messbereich	Vorverdünnung Probe
Interleukin-8	Thomas Ehret Consult, Schöneck TECompact human IL-8 kit Cat.No. TEC1918	0 - 240 pg/ml	1/121 (alle Proben)
Interleukin-17A	eBioscience, San Diego CA, USA, BMS2017HS	0-15 pg/ml	unverdünnt (alle Proben)
Myeloperoxidase	Immundiagnostik AG, Bensheim, Art.nr. K6631	0-30 ng/ml	1/61 (COPD) 1/41 (Kontrollgruppe)
Matrixmetallo- proteinase-9	R&D Systems, Abingdon, UK, Catalogno. DMP900	0-20 ng/ml	1/31 (alle Proben)

Zur Bestimmung der Proteine im Sputumüberstand wurden diese aufgetaut und wie in Tabelle 2 angegeben vorverdünnt. Die vorverdünnten Proben wurden auf, mit gegen das Zielantigen gerichteten monoklonalen Antikörpern (AK) beschichtete, Mikrowellplatten aufgetragen. Der nachfolgende Waschschrift entfernt ungebundenes Substrat.

Durch Zugabe eines Biotin-gekoppelten Antikörpers gegen das jeweilige Zytokin wurde dieses markiert. Nach der Entfernung überschüssiger biotinylierter Antikörper wurde Meerrettichperoxidase (HRP), gebunden an Streptavidin zugegeben, welches an der biotinylierten Seite des Biotin-AK-Sandwich bindet.

Nachdem durch einen weiteren Waschschrift das ungebundene HRP-Konjugat entfernt ist, wurde eine Substratlösung zugefügt, welche eine Zytokin-konzentrationsabhängige Farbreaktion bewirkt.

Nach einer Inkubationsphase wurde diese Reaktion mit einem Stopreagenz unterbrochen und die Absorption mit einem Plattenreader bei 450 nm gemessen. Nach der Bestimmung einer Standardkurve wurden die Zytokinkonzentrationen der Proben interpoliert.

2.3.9 Multiplex-Analyse von Proteinen im Sputumüberstand (Human Inflammation MAP [xMAP®] Panel)

Für die Charakterisierung des DTT-Effektes auf Proteinebene wurden die Sputum-überständen mittels bead-basierter Multiplex-Analyse gemessen. Diese Technologie

ermöglicht eine simultane Messung einer großen Anzahl von Proteinen innerhalb von kurzer Zeit in kleinen Probenvolumina (Mandy et al., 2001). Sie wurde bisher für die Messung von Zytokinen und Chemokinen in Serum, Plasma und Zellkulturüberstand verwendet, während für Sputumüberstände bislang wenige Daten, insbesondere für den Einfluss von DTT vorliegen (Bafadhel et al., 2012, Aaron et al., 2010).

Um eine erweiterte und abgesicherte Charakterisierung entzündlicher Komponenten in Sputumüberständen von COPD-Patienten durchzuführen, wurde bei Rules-Based Medicine (RBM, Austin, Texas) das Human Inflammation Multi Analyte Profile (xMAP®) Panel für Sputumüberstände mit und ohne DTT Zusatz validiert. Anschließend wurden in der COPD-Gruppe und der gesunden Kontrollgruppe die in Abbildung 12 aufgeführten Analyte bestimmt.

Das Messprinzip ist dabei eine Markierung der Biomarker mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Beads und die Messung mit einem Luminex-System (Funktionsprinzip wie ein Durchflusszytometer), bestehend aus zwei Lasern, die die Signale konzentrationsabhängig verarbeiten. Alle Multiplex-Assays wurden von Tecan-Robotern durchgeführt.

2.3.9.1 Multiplex-Matrizen-Validierung

Die Validierung des Human Inflammation MAP (xMAP®) Panels wurde von Rules Based Medicine RBM® (Texas, USA) durchgeführt. Dazu wurden die Sputumüberstände von vier COPD-Patienten (40 Aliquots) mit DTT-Behandlung und drei Patienten (30 Aliquots) ohne DTT-Behandlung verwendet.

Es wurden vier Validierungsversuche im Sputumüberstand mit und ohne DTT nach den RBM-Richtlinien für die quantitative Analyse des Human Inflammation Multi Analyte Profile (Welsh und Mapes, RBM White paper) durchgeführt:

1. Linearitäts-Test:

Dabei wurde die Linearität des Assays getestet, wobei die Konzentration der Proben bei 2facher serieller Verdünnung im Standardbereich des Assays gemessen wurde. Der Linearitätsbereich wurde durch den Vergleich des jeweiligen Ausgangswertes mit dem

Wert nach der Verdünnung ermittelt. Das Akzeptanzkriterium für die Linearität war der Bereich von 70 – 130 %.

2. Spike-Wiederfindungs-Test:

Dabei wurde der Einfluss der Matrixzusammensetzung auf die Probe untersucht. Es wurden unterschiedliche Mengen des Standards dem Verdünnungsmedium zugesetzt, sowie den vorverdünnten Sputumüberstandsproben („Spiking“). Die mittlere Wiederfindungsrate wurde aus dem Verhältnis der „gespikten“ Probe zum „gespikten“ Standard ermittelt. Das Akzeptanzkriterium für die Spike-Wiederfindung war 70-130 % in mindestens einer von drei Proben.

3. Kurzzeit-Stabilitäts-Test:

Die Validierung der Kurzzeitstabilität schätzt ab, wie lange ein Antigen nach dem Auftauen der Probe in konstanter Konzentration gemessen werden kann. Die Proben wurden dazu 2 - 24 Stunden bei Raumtemperatur bzw. 2 - 8 °C gelagert. Die prozentuale Wiederfindungsrate wurde durch den Vergleich einer frisch aufgetauten Probe mit einer länger aufgetauten Probe ermittelt. Da die Ausgangskonzentration von einigen Markern für die Berechnung der initialen Kurzzeitstabilität nicht ausreichte, wurden diese Proben mit Standardmarkern „gespikt“. Der akzeptierte Bereich beträgt 70 - 130 % des Messwertes in der frisch aufgetauten Probe.

4. Einfrier-Auftau-Stabilitäts-Test:

Die Stabilität der einzelnen Antigene gegenüber Auftau-Einfrierzyklen wurde bis zu drei Mal pro Probe getestet. Dazu wurden die Proben für mindestens zwei Stunden gefroren vor dem nächsten Auftauen. Die prozentuale Wiederfindungsrate wurde durch den Vergleich der behandelten Probe gegenüber der frisch aufgetauten Probe bestimmt. Da die Ausgangskonzentration von einigen Markern für die Berechnung der Einfrier-Auftau-Stabilität nicht ausreichte, wurden diese Proben mit Standardmarkern „gespikt“. Der akzeptierte Bereich lag bei 70 - 130%.

Die untere Nachweisgrenze (LLOQ) ist definiert als niedrigste Konzentration eines Analyten in der Probe, welche zuverlässig gemessen werden kann.

Zusätzlich soll der Variationskoeffizient von Standardproben bei Wiederholungstest weniger als 30 % der niedrigsten Nachweiskonzentration (LDD) betragen. Dabei ist die niedrigste Nachweiskonzentration als dreifache mittlere Standardabweichung von 20 Leerwertmessungen definiert.

2.3.9.2 Multiplex-Messungen auf den validierten Matrizen

Die validierten Matrizen für DTT-behandelten und ohne DTT-Behandlung gewonnenen Sputumüberstand wurden verwendet, um die Analyte in davon unabhängig gewonnenen Proben von 20 COPD-Patienten und 12 gesunden Kontrollpersonen auf dem Human Inflammation MAP (xMAP®) Panel zu messen.

2.3.10 Statistische Verfahren und Auswertung der Messdaten

Die statistische Datenauswertung der auf dem Human Inflammation MAP (xMAP®) Panel gemessenen Analytkonzentrationen im Sputumüberstand wurde unter Verwendung des SAS Softwarepaketes (SAS®, version 9.2, SAS institute INC.) von der Firma Norimed (Nürnberg, D) durchgeführt. Die Analytkonzentrationen wurden als Mediane mit Interquartilbereich (IQR) berechnet und zur statistischen Auswertung der Unterschiede zwischen den beiden Aufarbeitungsmethoden mit und ohne DTT der Signed-Rank-Test verwendet.

Die statistische Prüfung des Unterschiedes zwischen dem mittleren Lebensalter der COPD- und der Kontrollgruppe erfolgte mit dem Wilcoxon-Rank-Sum-Test. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen der Sputumaufarbeitung mit und ohne DTT wurde für die Qualität des Ausgangssputums, den TCC und die Vitalität der Zellen mit dem Signed Rank Test geprüft.

Die statistische Signifikanz der Zellkonzentrationsunterschiede von der COPD (Raucher) und COPD (Exraucher) Gruppen gegen die Kontrollgruppe wurde in der Klinischen und Experimentellen Pathologie, Borstel mit dem One-Way ANOVA und Dunnett's multiple Vergleichstest unter Verwendung der GraphPad Prism 5 (GraphPad Software INC., La Jolla, CA, USA) durchgeführt.

Die Signifikanzprüfung der Unterschiede zwischen den im ELISA-Verfahren gemessenen Biomarker-Konzentrationen mit und ohne DTT-Behandlung wurde mit dem Signed-Rank-Test durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Studienpopulation

Die COPD-Gruppe besteht aus 21 Patienten, wovon ein Patient aufgrund einer zusätzlich bestehenden Asbestose aus der Auswertung ausgeschlossen wurde, sodass sich die weitere Auswertung auf 20 COPD-Patienten bezieht.

In die Kontrollgruppe wurden 12 gesunde Nichtraucher eingeschlossen. Die wichtigsten demographischen Größen sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3. Charakterisierung der Studienpopulation

	COPD (Raucher)	COPD (Exraucher)	Kontrollgruppe (gesund)
Anzahl der Patienten	12	8	12
Alter, Lebensjahre	62,6 ($\pm 14,47$)	68,0 ($\pm 5,93$)	67,1 ($\pm 6,59$)
Geschlecht (männlich/weiblich)	8/4	7/1	8/4
FEV ₁ (% des Normwertes)	58,7 ($\pm 14,24$)	59,9 ($\pm 11,87$)	110,1 ($\pm 29,5$)

Abkürzung: FEV₁, Forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde der Ausatmung; die Daten sind als Mittelwerte ($\pm$ SD) angegeben. (aus: Pedersen et al., 2013)

Das mittlere Lebensalter in der COPD-Gesamtgruppe beträgt 64,8 ($\pm 7,5$) Jahre und unterscheidet sich von dem der Kontrollgruppe mit 67,1 ($\pm 6,59$) nicht signifikant ($P = 0,401$).

3.2 Verträglichkeit der Sputuminduktion

Die Sputuminduktion wurde bei allen Studienteilnehmern in der Kontrollgruppe vollständig durchgeführt. Bei zwei Teilnehmern trat ein leichter FEV₁- Abfall um mehr als 10 % auf, sodass die NaCl-Konzentration nicht weiter gesteigert wurde. Der FEV₁-Wert fiel im Vergleich zum Ausgangswert nach Bronchospasmolyse bis zum Ende der Sputuminduktion im Mittel um 5 % ab (Tabelle 4).

Tabelle 4. Übersicht zur Verträglichkeit der Sputuminduktion in der Kontrollgruppe.

Nr.	FEV ₁ [L] post Broncho- spasmolyse	FEV ₁ [L] 1. Inhalation 3 % NaCl	FEV ₁ [L] 2. Inhalation 3 % NaCl	FEV ₁ [L] 3. Inhalation 4 % NaCl	FEV ₁ [L] 4. Inhalation 4 % NaCl	FEV ₁ [L] 5. Inhalation 5 % NaCl	FEV ₁ [L] 6. Inhalation 5 % NaCl
31	4,18	3,99	4,1	4,18	4,06	3,9	3,91
32	2,55	2,54	2,55	2,53	2,55	2,51	2,54
33	2,63	2,55	2,41	2,35	2,3	2,18	2,18
34	3,08	3,11	3,05	3,54	3,42	2,87	3,01
35	3,42	3,36	3,4	3,38	3,28	3,34	3,36
36	3,79	3,91	3,95	4,05	3,99	4,07	4,02
37	3,89	3,85	3,84	3,78	3,75	3,81	3,81
38	2,77	2,73	2,56	2,58	2,61	2,48	2,47
39	3,56	3,49	3,42	3,39	3,33	3,21	3,13
40	2,73	2,56	2,5	2,53	2,44	2,55	2,42
41	2,88	2,9	2,96	2,93	2,9	2,89	2,91
MW	3,23 (±0,92)	3,18 (±0,77)	3,16 (±0,81)	3,20 (±0,88)	3,15 (±0,82)	3,07(±0,71)	3,07(±0,71)

Abkürzungen: MW, Mittelwert (±SD); lila unterlegte Tabellenfelder zeigen NaCl-Induktionen an, bei denen der FEV₁-Wert > 10 % gegenüber dem Wert nach Bronchospasmolyse abgefallen ist.

In der COPD-Gruppe wurde die Sputuminduktion bei 3 von 20 Patienten vorzeitig abgebrochen, da der FEV₁-Abfall > 20 % des FEV₁-Wertes nach Bronchospasmolyse betrug. Dabei reagierten zwei Patienten auf die Inhalation von physiologischer NaCl-Lösung und ein Patient auf 3 %ige NaCl-Lösung mit einem FEV₁-Abfall von > 20 % (Tabelle 5).

Bei 6 Patienten fiel die Lungenfunktion bei Inhalation von 3 %iger NaCl-Lösung um mehr als 10 %, aber weniger als 20 % mit der Lungenfunktion ab, sodass die NaCl-Konzentration nicht weiter gesteigert wurde.

Insgesamt wurden bei 17 von 20 COPD-Patienten alle vier Inhalationsperioden der Sputuminduktion komplett durchgeführt. Der FEV₁-Abfall über die vier Inhalationsperioden betrug im Mittel bei den COPD-Patienten 10 %.

Tabelle 5. Übersicht zur Verträglichkeit der Sputuminduktion bei COPD-Patienten

Nr.	FEV ₁ [L] post Brocho- spasmolyse	FEV ₁ [L] 1. Inhalation 0.9% NaCl	FEV ₁ [L] 2. Inhalation 0.9% NaCl	FEV ₁ [L] 3. Inhalation 3% NaCl	FEV ₁ [L] 4. Inhalation 3% NaCl
2	1,37	1,27	1,07	1,13	1,23
3	1,6	1,9	1,82	1,83	1,91
4	1,37	1,27	1,27	1,23	1,11
5	1,85	1,57	1,41	Ø	Ø
6	2,18	1,86	1,85	1,8	1,89
7	3,04	2,74	2,86	2,77	2,6
8	1,5	1,47	1,45	1,31	1,25
9	1,82	1,81	1,86	1,83	1,87
12	1,77	1,43	1,53	1,54	1,46
13	1,93	1,86	1,9	1,76	1,63
14	1,56	1,05	Ø	Ø	Ø
16	1,94	1,91	1,91	1,79	1,77
17	1,21	1,17	1,17	1,31	1,26
19	2,16	1,94	2,07	1,82	1,76
20	2,37	2,32	2,36	2,31	2
21	1,35	1,38	1,37	1,19	1,04
22	1,14	1,01	1,01	1	0,85
23	1,83	1,69	1,49	1,5	1,46
24	1,45	1,29	1,24	1,13	Ø
26	1,43	1,49	1,5	1,53	1,55

MW 1,74 (±0,04) 1,62 (±0,16) 1,64 (±0,30) 1,60 (±0,28) 1,57 (±0,23)

Abkürzungen: MW, Mittelwert (±SD); Ø, keine NaCl-Inhalation durchgeführt. Rot unterlegte Tabellenfelder zeigen vorzeitig abgebrochene Sputuminduktionen an; lila unterlegte Felder die NaCl-Induktionen bei denen der FEV1-Wert zwischen 10 % und 20 % abgefallen ist und die NaCl-Konzentration beibehalten wurde.

3.3 Sputumqualität und Sputumzellzahlen

Die Ausgangsqualität des induzierten Sputums ist bei den untersuchten Gruppen vergleichbar (Tabelle 6, Abbildung 3). Weiterhin ist die Vitalität der nicht-Plattenepithel-(PE) Zellen in allen Gruppen mit über 90 % auf einem hohen und vergleichbaren Niveau. Die resultierenden Cytospin-Präparate werden im Mittel von zwei unabhängigen Auswertern mit der zweitbesten Note der Klassifikation bewertet.

Tabelle 6. Bewertung der Sputum-Ausgangsqualität, der Vitalität der isolierten Zellen und der Qualität der Cytospin-(CS)-Präparate.

Gruppe	Ausgangsqualität	Vitalität [%]	CS-Qualität
COPD (+ DTT)	3,3 ($\pm 0,95$)	95,5 ($\pm 3,08$)	1,53 ($\pm 0,32$)
COPD (ohne DTT)	3,3 ($\pm 0,95$)	92,7 ($\pm 9,34$)	1,35 ($\pm 0,45$)
Kontrollgruppe (+ DTT)	2,9 ($\pm 0,86$)	95,2 ($\pm 2,54$)	1,60 ($\pm 0,34$)

Alle Werte sind als Mittelwerte ($\pm$ SD) angegeben.

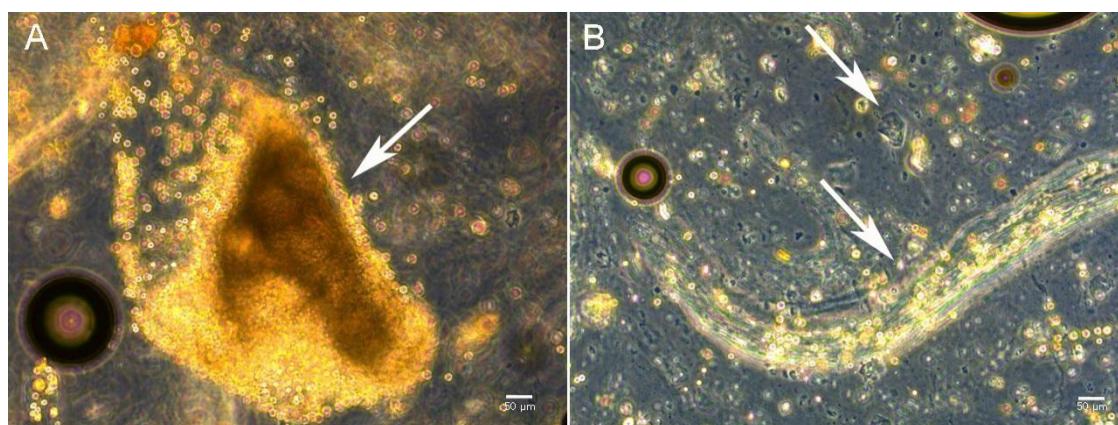


Abbildung 3. Beispiel für die Ausgangsqualität des induzierten Sputums (Note „3“ auf der Wertskala), wobei die Sputumzellen teilweise in Clustern (A) und teilweise diffus verteilt (B) vorliegen. Einzelne Plattenepithelien sind in der Probe enthalten (oberer Pfeil in B). Aufnahmen in 100facher Vergrößerung, Phasenkontrast, Maßstabsbalken 50 μ m.

Das mittlere Gewicht an selektierten Sputumzellclustern aus allen Inhalationsperioden betrug in der Kontrollgruppe 989 mg. In der COPD-Gruppe wurden im Mittel 2141 mg Sputum selektiert. Dabei schwankte das Gewicht der abgehusteten Sputumzellcluster in der Kontrollgruppe mit einer Standardabweichung von ± 1006 mg stärker als in der COPD-Gruppe mit ± 611 mg.

Für die parallele Aufarbeitung der Sputumproben in der COPD-Gruppe wurden für die Sputumaufarbeitung mit DTT im Mittel ($\pm$ SD) 818 ($\pm 113,8$) mg und für die DTT-freie Aufarbeitung 1322,7 ($\pm 610,9$) mg selektierte Sputumzellcluster eingesetzt.

Dabei lag das mittlere Gewicht ($\pm$ SD) der Aliquots für die DTT-freie Aufarbeitung bei 422 ($\pm 4,2$) mg.

Die Qualitätskriterien zeigten beim Vergleich der Vitalität ($P = 0,206$) und der Qualität der Cytospin-Präparate ($P = 0,128$) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Aufbereitungsverfahren mit und ohne DTT in der COPD-Gruppe ($n = 20$) (Tabelle 6, Abbildung 4, 5).

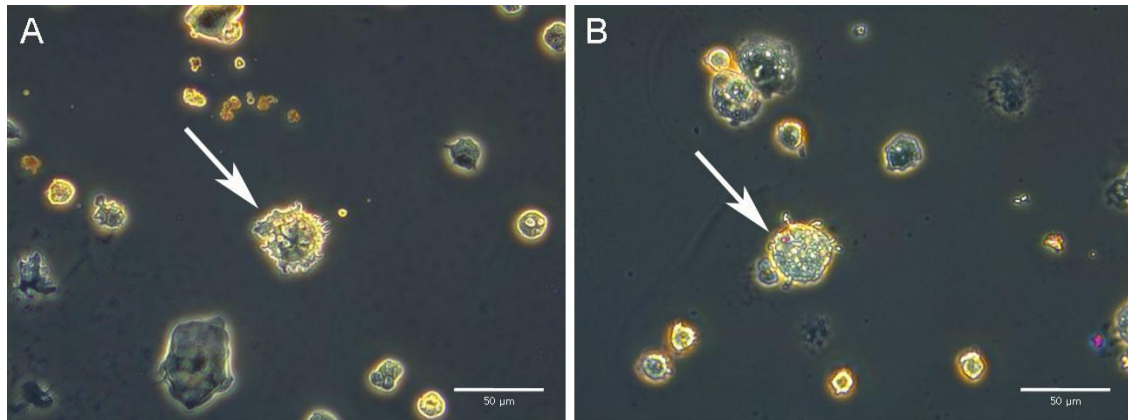


Abbildung 4. Beispiel für die Qualität der homogenisierten Zellen in einer parallel aufgearbeiteten Sputumprobe. A zeigt die Homogenisierung mit DTT, B die mechanische Homogenisierung ohne DTT. Die morphologische Qualität der Sputum-Makrophagen in beiden Verfahren ist vergleichbar. Aufgenommen mit 400facher Vergrößerung, Phasenkontrast, Maßstabsbalken 50 µm.

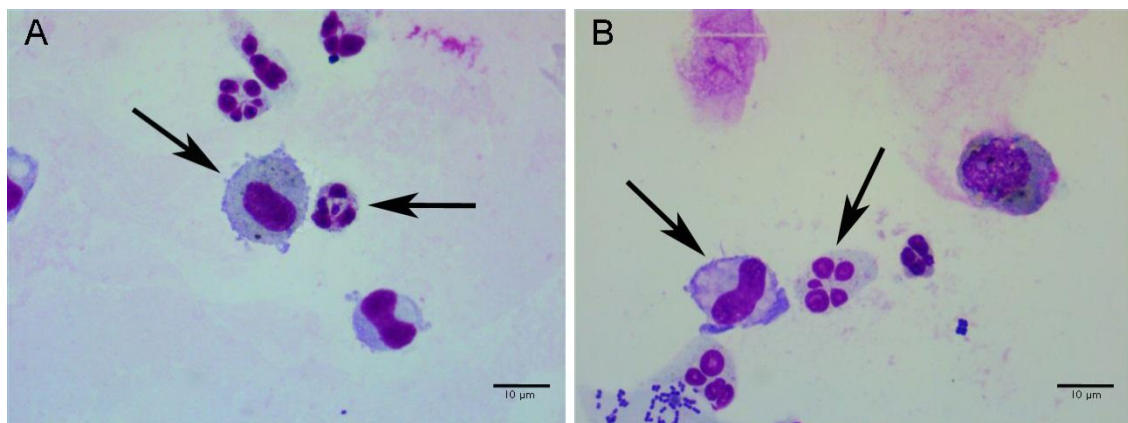


Abbildung 5. Beispiel für zwei Cytospin-Präparate aus einer parallel aufgearbeiteten Sputumprobe. A Homogenisiert mit DTT. B Mechanisch homogenisiert ohne DTT. In beiden Abbildungen zeigen Pfeile links auf einen Sputum-Makrophagen und rechts auf einen neutrophilen Granulozyten. Giemsa-Färbung, 1000fache Vergrößerung, Ölimmersion. Maßstabsbalken 10 µm.

Aus den induzierten Sputumproben sind, nach Abzug der für die Bestimmung der Vitalität und der für die Cytospin-Präparate verwendeten Zellen, im Mittel ($\pm$ SD) folgende Zellzahlen für die HOPE-Technik eingesetzt worden:

COPD-Gruppe (mit DTT): 1,29 ($\pm$ 0,49) $\cdot 10^6$ Zellen

COPD-Gruppe (ohne DTT): 2,02 ($\pm$ 2,67) $\cdot 10^6$ Zellen

Kontrollgruppe (mit DTT): 1,93 ($\pm$ 0,64) $\cdot 10^6$ Zellen

Dabei enthielten 31 (22 COPD-Proben/9 Kontrollproben) der 52 aufgearbeiteten Sputumproben mehr als 10^6 Zellen und wurden sowohl für die Transkriptom-Analyse, als auch für immunozytochemische Nachweise genutzt.

3.4 Auswertung der Differentialzytologie

3.4.1 Sputumaufarbeitung mit und ohne Dithiothreitol (DTT)

Beim Vergleich der parallelen Aufarbeitung von Sputumproben mit und ohne DTT-Behandlung in der COPD-Gruppe zeigt Tabelle 7 eine gute Übereinstimmung der Konzentrationen von Sputum-Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten. Die Konzentration der bronchialen Epithelzellen wies dagegen einen signifikanten Unterschied auf (Tabelle 7).

Tabelle 7. Zelluläre Charakteristika des Sputums in der COPD-Gruppe nach Aufarbeitung mit und ohne DTT.

Zelltyp	10^6 Zellen/ml mit DTT	10^6 Zellen/ml ohne DTT	P
Sputum-Makrophagen	0,286 ($\pm$ 0,260)	0,326 ($\pm$ 0,317)	0,389
Neutrophile Granulozyten	2,110 ($\pm$ 2,860)	1,710 ($\pm$ 2,143)	0,448
Eosinophile Granulozyten	0,016 ($\pm$ 0,021)	0,020 ($\pm$ 0,037)	0,742
Lymphozyten	0,021 ($\pm$ 0,024)	0,027 ($\pm$ 0,026)	0,129
Bronchiale Epithelzellen	0,024 ($\pm$ 0,031)	0,045 ($\pm$ 0,036)	0,001
Gesamtzellkonzentration	2,458 ($\pm$ 2,931)	2,128 ($\pm$ 2,219)	0,725

Alle Zellkonzentrationen sind als mittlere absolute Zellzahlen pro ml ($\pm$ SD) angegeben.

3.4.2 Differentialzytologie der COPD-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe

Der Vergleich der zellulären Zusammensetzung des induzierten Sputums der COPD-Gruppe mit der Kontrollgruppe zeigt eine neutrophile Inflammation (Abbildung 6, 7).

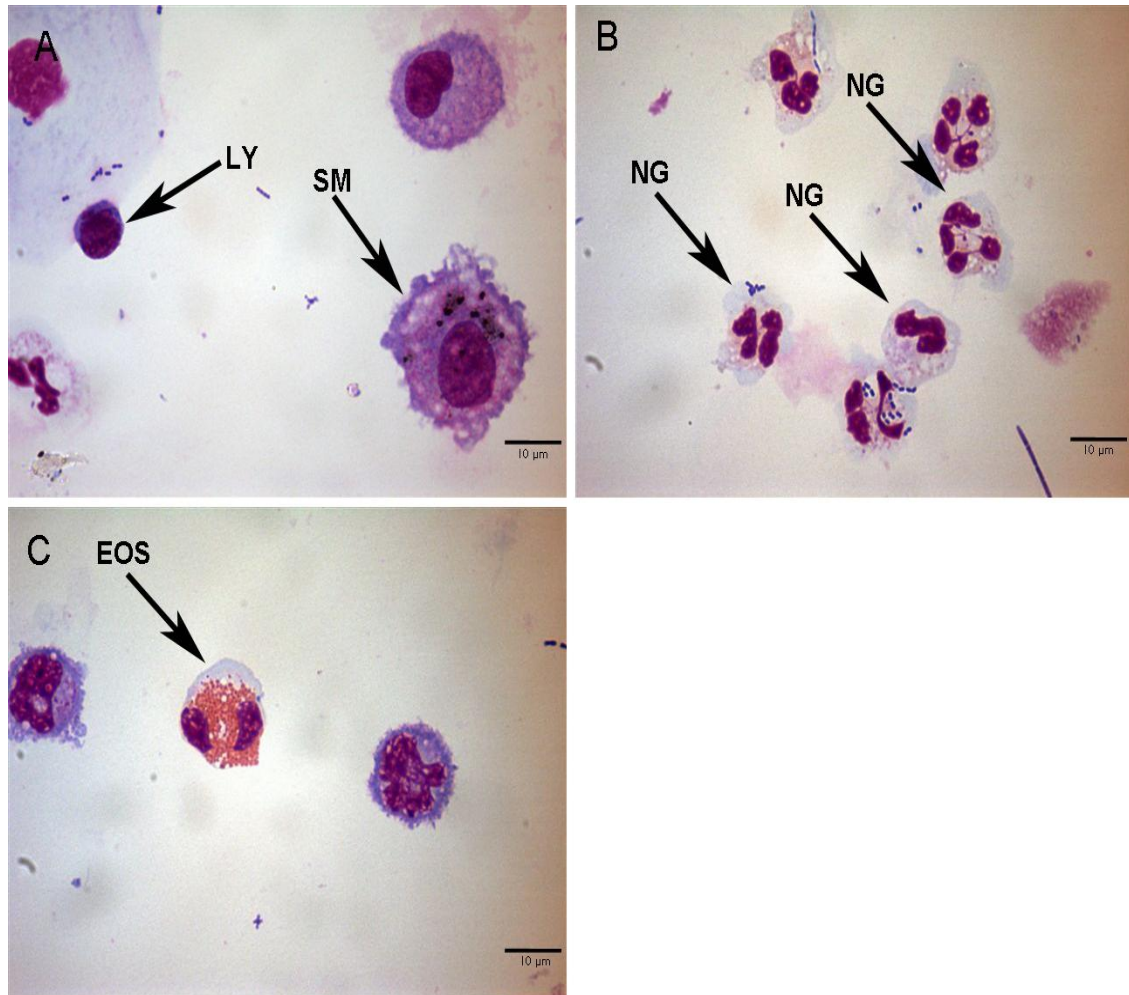


Abbildung 6. Beispielaufnahmen von inflammatorischen Zellen im induzierten Sputum. (A) LY Lymphozyt; SM Sputum-Makrophage; (B) NG Neutrophile Granulozyten; (C) Eosinophiler Granulozyt. Giemsa-Färbung, Aufnahmen bei 1000facher Vergrößerung, Ölimmersion.

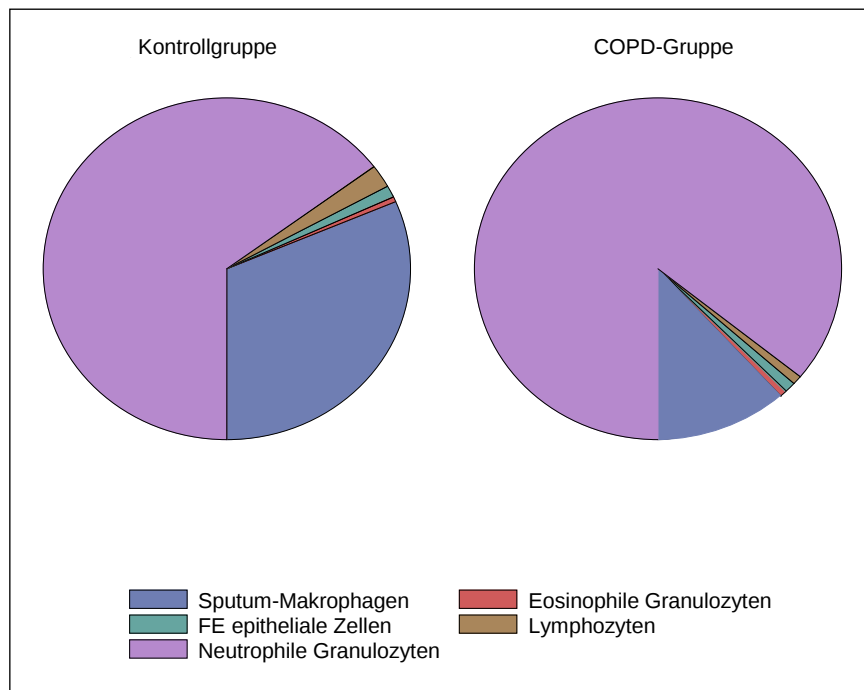


Abbildung 7. Prozentuale Anteile der im induzierten Sputum differenzierten Zelltypen. Vergleich der Kontrollgruppe mit der COPD-Gruppe.

Die Berücksichtigung des unterschiedlichen Rauchverhaltens (Raucher/Exraucher) in der COPD-Gruppe bestätigte diesen Effekt (Tabelle 8). Der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten an der Gesamtzellkonzentration ist sowohl bei den Rauchern, als auch bei den Exrauchern gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Der prozentuale Anteil der Sputum-Makrophagen ist in beiden Gruppen gegenüber den Werten der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt.

Tabelle 8. Zellulären Charakterisierung des induzierten Sputums der COPD-Gruppe und der lungengesunden Kontrollgruppe.

	TCC [10^6 /ml]	SM [%]	NG [%]	EOS [%]	LY [%]	BEC [%]
COPD Gruppe (Raucher)	2,57 ($\pm 3,74$)	14,48 ($\pm 7,09$)***	82,98 ($\pm 8,54$)***	0,75 ($\pm 1,01$)	0,68 ($\pm 0,57$)	1,14 ($\pm 1,23$)
COPD Gruppe (Exraucher)	2,29 ($\pm 1,12$)	15,10 ($\pm 9,69$)**	80,58 ($\pm 10,26$)**	1,38 ($\pm 1,91$)	1,25 ($\pm 0,66$)	1,69 ($\pm 1,42$)
Kontrollgruppe	2,05 ($\pm 1,35$)	30,81 ($\pm 11,84$)	65,12 ($\pm 13,55$)	0,23 ($\pm 0,29$)	2,11 ($\pm 2,58$)	1,73 ($\pm 1,79$)

Abkürzungen: TCC, total cell count, Gesamtzellzahl/ml; SM, Sputum-Makrophagen; NG, Neutrophile Granulozyten; EOS, Eosinophile Granulozyten; LY, Lymphozyten; BEC, Bronchiale Epithelzellen.

Die angegebenen Zellkonzentrationen werden als prozentuale Anteile an nicht-plattenepithelialen Zellen berechnet. Die Daten sind Mittelwerte ($\pm$ SD).

Signifikanz des Unterschiedes gegenüber der Kontrollgruppe: ***: $P < 0,001$, **: $P < 0,01$.

Die Sputumzelldifferenzierung ergab in allen Gruppen einen vergleichbaren Plattenepithelanteil von 9,5 % (COPD-Raucher), 8,5 % (COPD-Exraucher) und 7,6 % Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis spricht für eine gute Sputuminduktion und Selektion der Sputumzellcluster aus dem Ausgangssputum.

3.5 Auswertung der immunozytochemischen Nachweisverfahren

Aus den HOPE-geschützten Zellpellets wurden von 14 COPD-Patienten und 7 Kontrollpersonen je 6 Schnitte für immunozytochemische Nachweise angefertigt.

Alle immunozytochemischen Nachweise wurden an den HOPE-Sputumproben ohne zusätzliche Antigen-Wiederherstellungsbehandlung durchgeführt.

Die Morphologie der Sputumzellen war nach der Behandlung mit der HOPE-Technik gut erhalten und die immunozytochemischen Nachweise von Interleukin-8, Myeloperoxidase und Matrixmetalloproteinase-9 zeigten eine klare Anfärbung der neutrophilen Granulozyten und Sputum-Makrophagen (Abbildung 8A, B, D). Weiterhin wurde auch Interleukin-17A intrazellulär in neutrophilen Granulozyten und Sputum-Makrophagen nachgewiesen (Abbildung 8C).

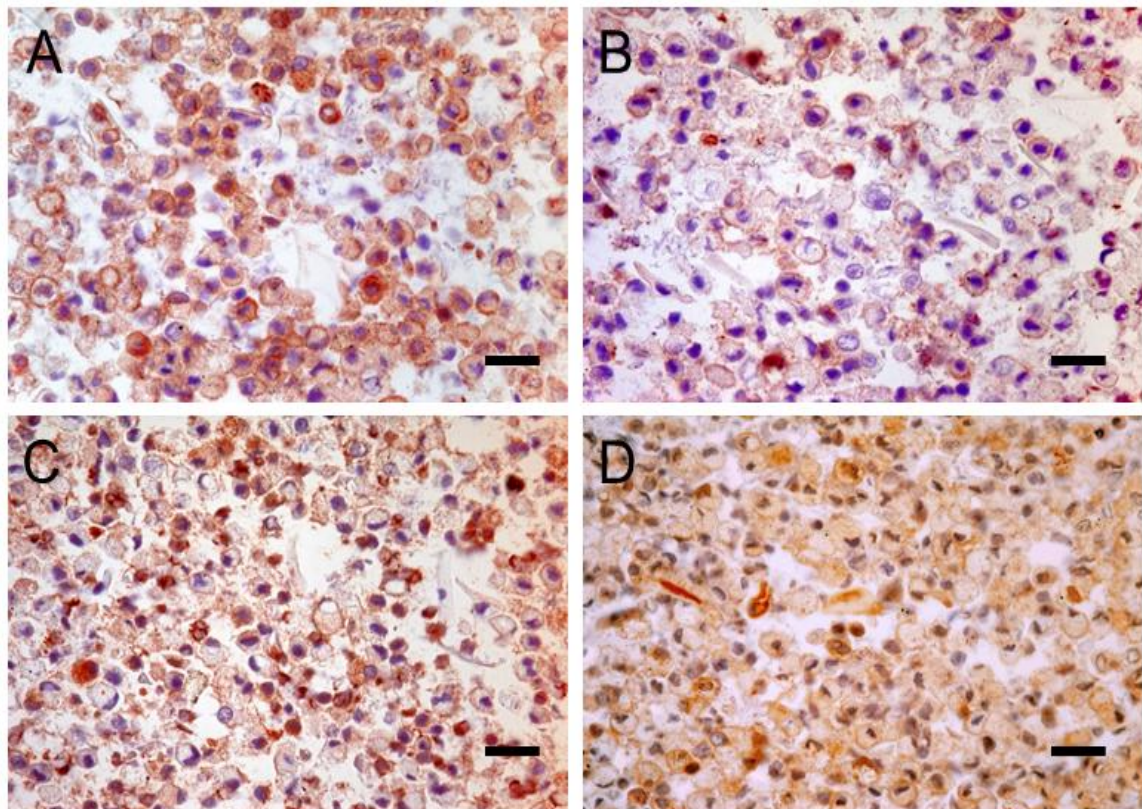


Abbildung 8. Immunozytochemische Färbung der HOPE-geschützten Paraffin-eingebetteten induzierten Sputumproben (Schnittdicke: 5 μ m). Beispiele von Entzündungsmarkern im Sputum einer gesunden Kontrollperson: A Interleukin-8, B Myeloperoxidase, C Interleukin-17A, D Matrixmetalloproteinase-9. Alle Aufnahmen sind bei 400facher Vergrößerung (Maßstabsbalken 50 μ m) und unter Verwendung von Aminoethylcarbazole als Chromogen (rote Signale) entstanden. (aus: Pedersen et al., 2013)

3.6 Einzelanalysen der Proteine im Sputumüberstand

Der Vergleich der mittleren Konzentrationen von IL-8, MPO und MMP-9 zwischen der COPD-Gruppe und der Kontrollgruppe zeigte erhöhte Werte für alle drei Marker und bestätigte die für COPD charakteristische neutrophile Inflammation (Tabelle 9). Die Konzentration von IL-17A im Sputumüberstand lag für alle Proben unter der Nachweisgrenze von 0,23 pg/ml.

Tabelle 9. Inflammatorischen Marker im Sputumüberstand

	IL-8 [ng/ml]	IL-17A [ng/ml]	MPO [ng/ml]	MMP-9 [ng/ml]
COPD-Gruppe (n = 20)	23,8 (±15,1)	nd	4343,3 (±1232,9)	2121,6 (±949,0)
Kontrollgruppe (n = 12)	12,0 (±4,7)	nd	3383,3 (±1257,9)	1624,5 (±707,1)

Abkürzungen: nd, nicht detektierbar; IL-8, Interleukin-8; IL-17A, Interleukin-17A; MPO, Myeloperoxidase; MMP-9, Matrixmetalloproteinase-9. Mittelwerte (±SD).

Die Konzentrationen der inflammatorischen Marker IL-8, MPO und MMP-9 zeigten keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Sputumaufarbeitung mit und ohne DTT (Abbildung 9).

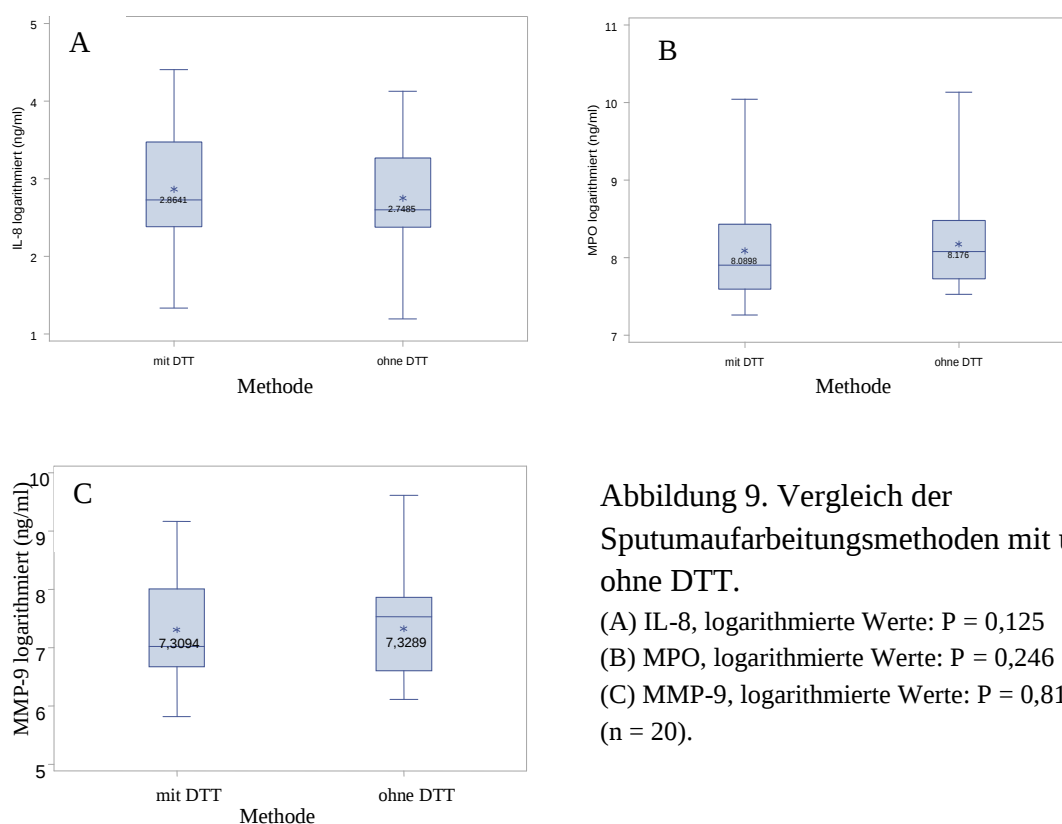


Abbildung 9. Vergleich der Sputumaufarbeitungsmethoden mit und ohne DTT.

(A) IL-8, logarithmierte Werte: $P = 0,125$
 (B) MPO, logarithmierte Werte: $P = 0,246$
 (C) MMP-9, logarithmierte Werte: $P = 0,812$
 (n = 20).

3.7 Multiplex-Analyse der Proteine im Sputumüberstand

Die Validierung des *Human inflammation xMAP® v 1.0 Panels* ist für 31 von 47 Analyten im Sputumüberstand möglich (Abbildung 10). Dabei zeigen sich bei der Validierung und Messung im Sputumüberstand signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen der Analyte mit - und ohne - DTT Behandlung.

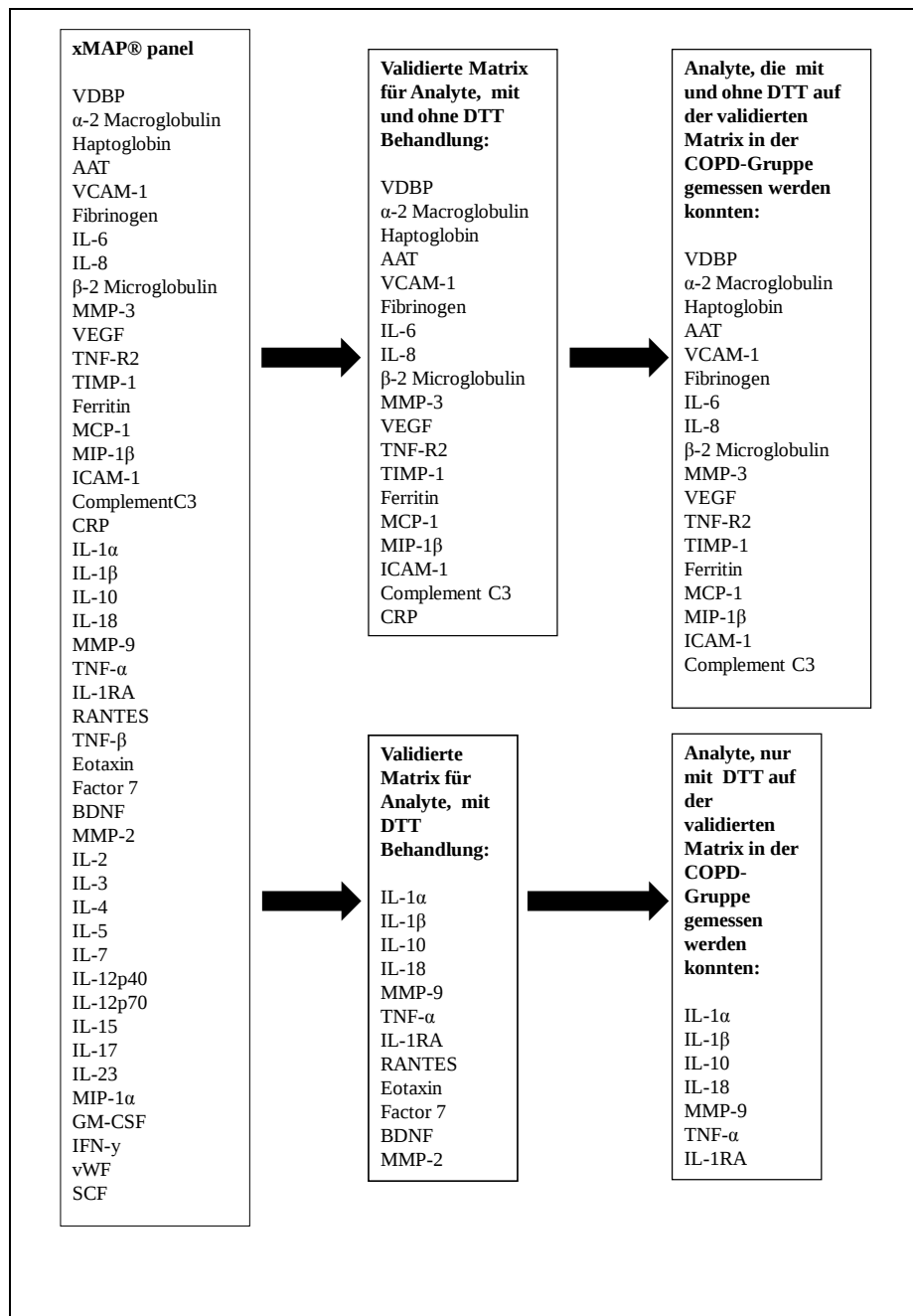


Abbildung 10. Validierung und Nachweis von Proteinen im Sputumüberstand mit - und ohne - DTT Behandlung auf dem Human Inflammation Multi Analyte Profiling® v 1.0 Panel.

Abkürzungen: :Alpha-1-Antitrypsin (AAT), Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), C-Reactive Protein (CRP), Eotaxin, Factor 7, Fibrinogen, Ferritin, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF), Intercellular Adhesion Molecule-1(ICAM-1), Interferon-gamma (IFN- γ), Interleukin (IL), Macrophage-inflammatory-protein-1 α (MIP-1 α), Macrophage-inflammatory-protein-1 β (MIP-1 β), Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP-1), Matrix Metalloproteinase(MMP), Stem Cell Factor (SCF), T-Cell Specific Protein Rantes (Rantes), Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 (TIMP-1), Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α), Tumor Necrosis Factor beta (TNF- β), Tumor Necrose Factor Receptor 2 (TNF-R2), Vitamin-D binding protein (VDBP), Vascular endothelial growth factor (VEGF), Vascular cell adhesion protein-1 (VCAM-1), von Wilbrand Factor (vWF).

3.7.1 Validierung der Multiplex-Matrix für den Sputumüberstand

Bei der Validierung ermittelt ein Linearitätstest den Verdünnungsbereich, in welchem eine lineare Korrelation zwischen den berechneten und den gemessenen Analytkonzentrationen besteht. Mit diesem Test konnten von insgesamt 46 Analyten 31 im Sputumüberstand auf dem *Human inflammation xMAP® v 1.0 Panel* validiert werden. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Behandlung mit und ohne DTT. Die Konzentration von 15 Analyten im Sputumüberstand war bei beiden Aufarbeitungsmethoden nicht messbar. (Abbildung 10).

19 Analyte konnten sowohl mit als auch ohne DTT Aufarbeitung validiert werden. Für 12 weitere Analyte konnten nur in den mit DTT behandelten Proben lineare Beziehungen zwischen den berechneten und den gemessenen Konzentrationen dargestellt werden (Abbildung 10, Tabelle 23, siehe Anhang). Für diese 12 Analyte lagen die Messwerte in den Proben ohne DTT-Behandlung unter der Quantifizierungsgrenze (LLOQ).

Der Spike-Wiederfindungstest zeigte mittlere bis gute Ergebnisse für die Mehrzahl der Analyte (Tabelle 24, siehe Anhang). Für MIP-1 α , TNF- β und vWF war der Test negativ.

Die dritte und vierte Versuchsreihe, in welcher die Kurzzeitstabilität und die Einfrier-Auftaustabilität getestet wurde, lag für alle Analyte innerhalb des Akzeptanzbereiches von 70 -130 % Wiederfindung der Konzentrationen.

3.7.2 Einfluss von DTT auf die Analytkonzentrationen auf dem validierten Human inflammation xMAP® v 1.0 Panel

Unter den 12 Analyten, die nur mit DTT-Behandlung validierbar waren, konnten im Sputumüberstand von COPD-Patienten die Konzentrationen von IL-1 α , IL-1 β , IL-10, IL-18, IL-1RA, MMP-9 und TNF- α bestimmt werden (Tabelle 10).

Die Konzentrationen der restlichen 5 Analyte lagen bei mehr als der Hälfte aller Proben unter der unteren Nachweisgrenze (LDD).

Tabelle 10. Analytkonzentrationen bei COPD-Patienten im Sputumüberstand mit DTT-Behandlung.

Analyte	mit DTT
Interleukin-1 α (ng/ml)	0,089 (0,057-0,122)
Interleukin-1 β (ng/ml)	0,122 (0,052-0,263)
Interleukin-18 (ng/ml)	0,106 (0,066-0,179)
IL-1RA (ng/ml)	46,89 (28,08-78,89)
Interleukin-10 (pg/ml)	8,379 (0,56-24,44)
MMP-9 (ng/ml)	811,80 (500,4-1543,5)
TNF- α (pg/ml)	9,45 (6,674-16,38)

Abkürzungen: IL-1RA: Interleukin-1 Rezeptor Antagonist, MMP-9: Matrix Metalloproteinase 9, TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha. Die Daten sind als Median mit Interquartil Bereich (IQR) angegeben, n = 20.

In den Sputumüberständen von COPD-Patienten ergaben sich für sechs Proteine signifikant höhere Konzentrationen, wenn eine Behandlung mit DTT erfolgt war (Tabelle 11), wobei die Ergebnisse mit und ohne DTT-Behandlung miteinander korreliert waren (Abbildung 11, $r > 0,71$).

Bei den in Tabelle 12 aufgeführten Analyten unterschieden sich die Konzentrationen im Sputumüberstand mit und ohne DTT-Behandlung nicht signifikant.

Der Vergleich der Konzentrationen von TIMP-1, Ferritin, MCP-1, MIP-1 β , ICAM-1 und Complement C3 zeigte bei der Aufarbeitung der Sputumproben mit DTT–signifikant niedrigere Werte als bei der Aufarbeitung ohne DTT (Tabelle 13). Dabei waren die mit und ohne DTT gewonnenen Analytkonzentrationen miteinander korreliert (Abbildung 14, $r > 0,69$).

Tabelle 11. Analyte mit signifikant höheren Konzentrationen im Sputumüberstand unter DTT-Behandlung-

Analyte	mit DTT	ohne DTT	P
VDBP (μ g/ml)	0,655 (0,525-0,850)	0,428 (0,231-0,592)	<0,0001
α -2-Macroglobulin (μ g/ml)	17,42 (14,54-21,33)	11,03 (8,20-15,48)	< 0,0001
Haptoglobin (μ g/ml)	1,791 (0,743-2,786)	0,765 (0,129-1,791)	<0,001
α 1-Antitrypsin (μ g/ml)	20,565 (10,17-27,045)	13,995 (10,215-20,385)	0,007
VCAM-1 (ng/ml)	7,385 (5,913-13,860)	6,255 (4,752-8,636)	0,006
Fibrinogen (μ g/ml)	0,626 (0,331-1,206)	0,341 (0,260-0,896)	0,006

Abkürzungen: VDBP: Vitamin-D binding protein; VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule-1. Die Daten sind als Mediane (IQR) angegeben, n = 20.

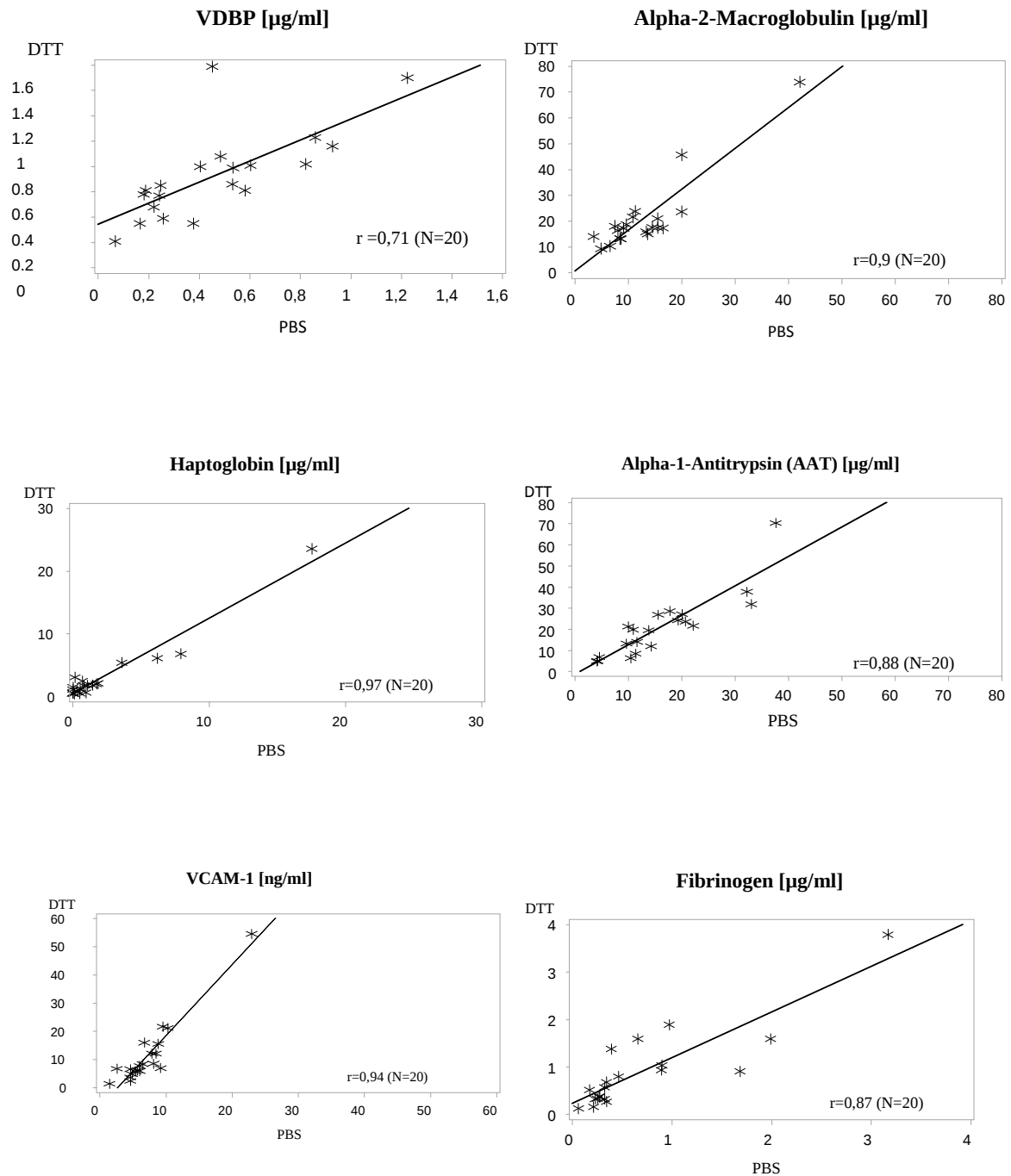


Abbildung 11. Einfluss von DTT auf die Analytkonzentrationen im Sputumüberstand von COPD-Patienten (n = 20). PBS: phosphate buffered saline.

Bei diesen Analyten führte die DTT-Behandlung zu einer signifikanten Erhöhung der Analytkonzentration (Tabelle 11).

Tabelle 12. Analyte ohne signifikante Konzentrationsunterschiede bei der Aufarbeitung von Sputumüberstand mit und ohne DTT.

Analyte	mit DTT	ohne DTT	P
Interleukin-6 (ng/ml)	0,594 (0,191-1,152)	0,608 (0,199-1,134)	0,927
Interleukin-8 (ng/ml)	21,060 (11,475-42,930)	20,97(16,2-31,1)	0,388
β-2-Microglobulin (µg/ml)	5,999 (3,776-7,484)	5,495 (4,037-6,930)	0,076
MMP-3 (ng/ml)	0,732 (0,376-1,278)	0,755 (0,572-1,026)	0,841
VEGF (ng/ml)	6,053 (4,811-10,080)	8,217 (6,381-10,620)	0,064
TNFR2 (ng/ml)	2,709 (1,404-4,919)	2,862 (1,512-4,383)	0,985

Abkürzungen: MMP-3: Matrix metalloproteinase- 3; VEGF: Vascular endothelial growth factor; TNFR-2: Tumor necrosis factor receptor-2. Die Daten sind als Median (IQR) angegeben; n = 20.

Tabelle 13. Analyte mit signifikant niedrigeren Konzentrationen im Sputumüberstand unter DTT-Behandlung.

Analyte	mit DTT	ohne DTT	P
TIMP-1 (µg/ml)	0,888 (0,562-1,080)	1,017 (0,809-1,431)	0,009
Ferritin (ng/ml)	23,5 (10,5-56,4)	43,2 (25,4-98,6)	0,006
ICAM-1 (ng/ml)	21,4 (4,5-36,5)	54,8 (36,0-86,4)	< 0,0001
MCP-1 (ng/ml)	1,197 (0,411-1,949)	1,494 (0,821-3,483)	0,001
MIP-1β (ng/ml)	0,869 (0,301-1,769)	2,363 (0,859-3,816)	< 0,0001
Complement C3 (µg/ml)	13,01(4,72-21,60)	13,86 (6,33-28,94)	0,027

Abkürzungen: TIMP-1: Tissue inhibitor of metalloproteinase-1; ICAM-1: Intracellular adhesion molecule-1; MCP-1: Monocyte chemotactic protein-1; MIP-1β: Macrophage inflammatory protein-1β. Die Daten sind als Median (IQR) angegeben; n = 20.

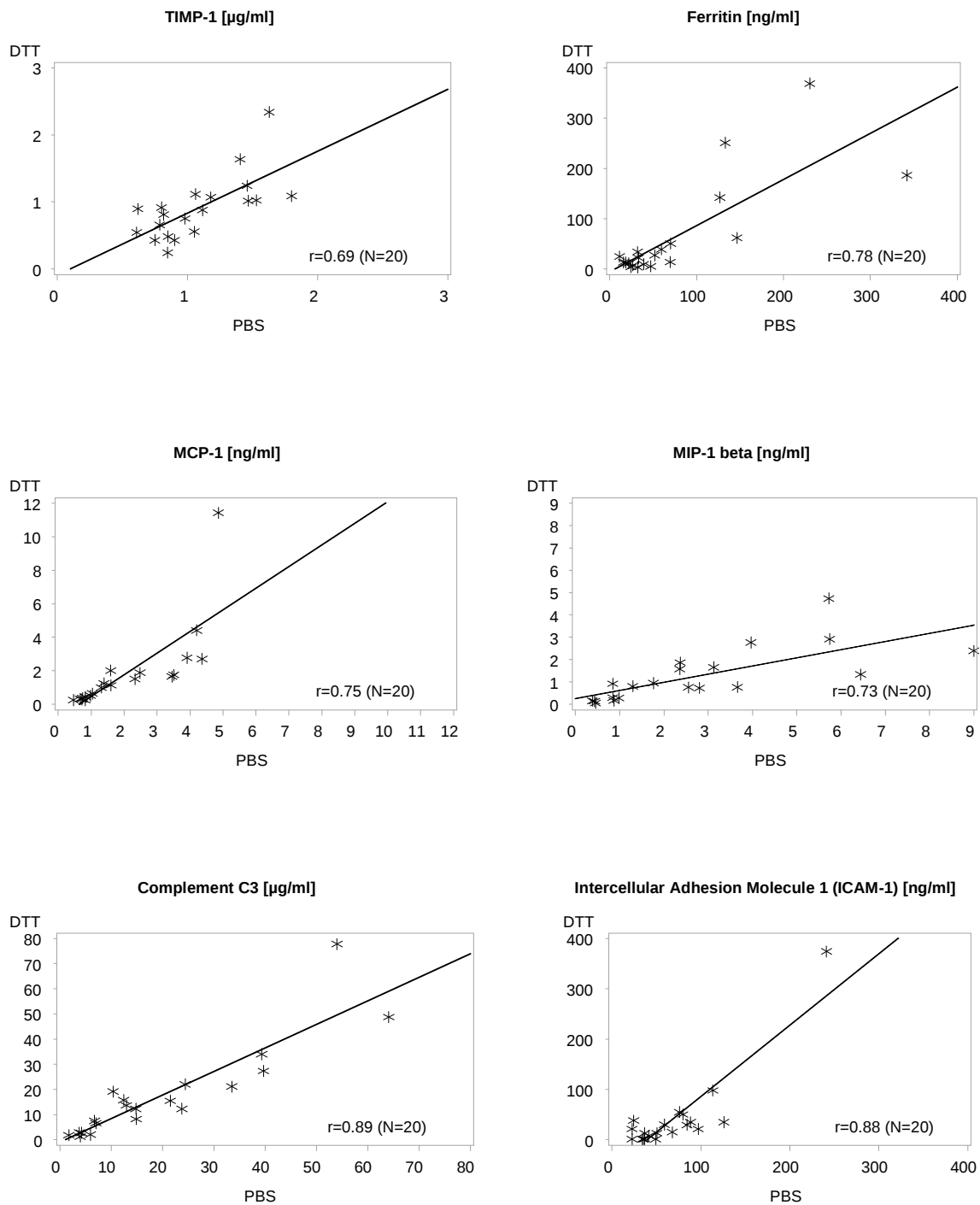


Abbildung 12. Einfluss von DTT auf die Analytkonzentrationen im Sputumüberstand von COPD-Patienten (n = 20). Die hier gezeigten Analyten haben mit DTT-Behandlung eine signifikant niedrigere Analytkonzentration, verglichen mit den Konzentrationen ohne DTT-Behandlung (Tabelle 13). *Abkürzung*: PBS, phosphate buffered saline.

3.8 RNA-Qualität von HOPE-Sputumzellpräparaten

Die Menge an induziertem Sputum und die sorgfältige, schnelle Aufarbeitung der Sputumproben ermöglichte, zusammen mit der HOPE-Technik, die RNA-Extraktion aus Zellproben mit über 10^6 Zellen. Da RNA ein relativ instabiles Molekül ist, das leicht durch Ribonukleasen (RNAsen) zersetzt wird, war eine genaue Überprüfung der Qualität und Quantität der extrahierten RNA Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung von Transkriptom-Analysen aus HOPE-Sputumzellpräparaten.

Die aus HOPE-Sputumzellpräparaten extrahierte RNA-Menge reichte aus, um die erforderliche Mindestmenge für die Transkriptom-Analyse auf dem Agilent Whole Genome Microarray 4x44k von 1 µg RNA pro Gruppe durch das Poolen von je 600 ng RNA aus 4-5 Proben zu erreichen (Tabelle 14).

Tabelle 14. Gepoolte RNA-Proben für die Transkriptom-Analyse auf dem Agilent Human Genome Microarray 4x44 k.

	Probe	Zellzahl im HOPE- Zellpellett ($\cdot 10^6$)	RNA-Konzentration [ng/ μ l]	Volumenanteil an der gepoolten Probe [μ l]
COPD Raucher	3 -	0,8	173,0	3,47
	4 -	5,5	388,3	1,55
	19 -	1,4	158,2	3,79
	20 -	4,2	395,5	1,52
COPD Raucher	3 +	1,1	255,0	2,35
	4 +	5,4	282,5	2,12
	19 +	0,7	159,2	3,77
	20 +	2,8	174,8	3,43
COPD Exraucher	7 +	2,7	86,1	6,97
	12 +	2,0	89,4	6,71
	22 +	1,2	316,9	1,89
	23 +	1,6	287,5	2,09
	26 +	1,6	106,8	5,62
Kontrollgruppe	31 +	2,2	157,1	3,82
	33 +	4,9	178,7	3,36
	34 +	2,4	216,4	2,77
	36 +	1,9	214,1	2,80
	41 +	2,7	101,4	5,92

Der Vergleich verschiedener Fixierungsmethoden zeigte für HOPE-geschützte Sputumproben und frisch-gefrorenen Proben eine vergleichbare Integrität im Elektropherogramm, wogegen die RNA in den Formalin-fixierten Sputumproben vollständig degradiert war (Abbildung 13).

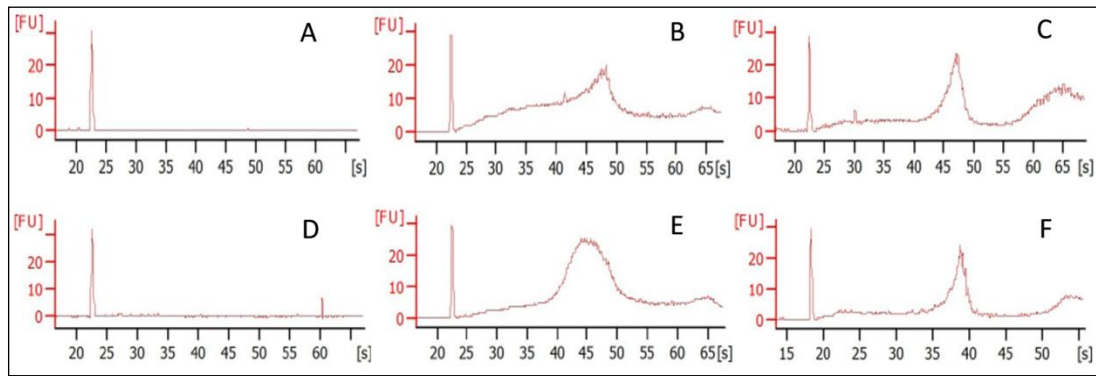


Abbildung 13. Elektropherogramme zeigen die Integrität von Formalin-fixierten (A, D), HOPE-geschützten (B, E) und frisch-gefrorenen (C, F) Sputumproben. Y-Achse, Fluoreszenzintensität [FU]; x-Achse, Zeit in Sekunden [s]. Die Zeit ist proportional zur Kettenlänge der RNA-Moleküle, sodass der Kurvenverlauf Aufschluss über die Integrität der RNA gibt. RNA-Proben aus HOPE-Sputumzellpräparaten, isoliert mit dem Qiagen RNeasy Kit, gemessen mit dem Agilent Bioanalyser 3100. (aus Pedersen et al., 2013)

Weiterhin konnten eine gute Reproduzierbarkeit der RNA Integrität bei der parallelen Aufarbeitung von Sputumproben gezeigt werden (Abbildung 14).

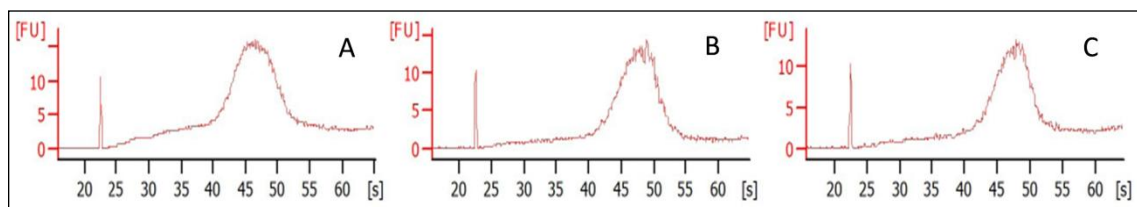


Abbildung 14. Vergleich der Reproduzierbarkeit der Integrität von drei HOPE-geschützten Sputumzellpräparaten (A, B, C), die aus einer parallelen Aufarbeitung einer Sputumprobe stammen. X-Achse: Zeit in Sekunden [s]; y-Achse: Fluoreszenzsignal [FU]. (aus Pedersen et al., 2013)

3.9 Transkriptom-Daten aus HOPE-Sputumzellpräparaten

Die aus HOPE-Sputumzellpräparaten isolierte RNA erfüllte mit einer Gesamtmenge von $> 1,0 \mu\text{g}$ und einer optischen Dichte (OD) von $260/280 > 1,7$ die Qualitätskriterien der Eingangskontrolle der Firma. ImaGenes, Berlin (Tabelle 15).

Tabelle 15. Ergebnisse der RNA-Eingangskontrolle der gepoolten Proben für die Transkriptom-Analyse (durchgeführt von: ImaGenes, Berlin)

Probe	RNA-Konzentration [ng/μl]	OD 260/280	RNA-Gesamtmenge [μg]	Einbaurate Cy3 [pmol/μg]
Kontrollgruppe (gesund) mit DTT	47,25	2,48	2,36	9,95
COPD (Raucher) mit DTT	38,83	2,41	1,94	7,21
COPD (Exraucher) mit DTT	36,07	2,6	1,80	10,26
COPD (Raucher) ohne DTT	24,46	2,77	1,22	10,63

Abkürzungen: OD, optische Dichte; Cy3, Cyanine 3.

Die aus HOPE-Sputumzellpräparaten extrahierten und gepoolten RNA-Proben sind auf dem Agilent Human Genome Microarray 4x44k. hybridisiert worden (durchgeführt von: ImaGenes, Berlin, Abbildung 15).

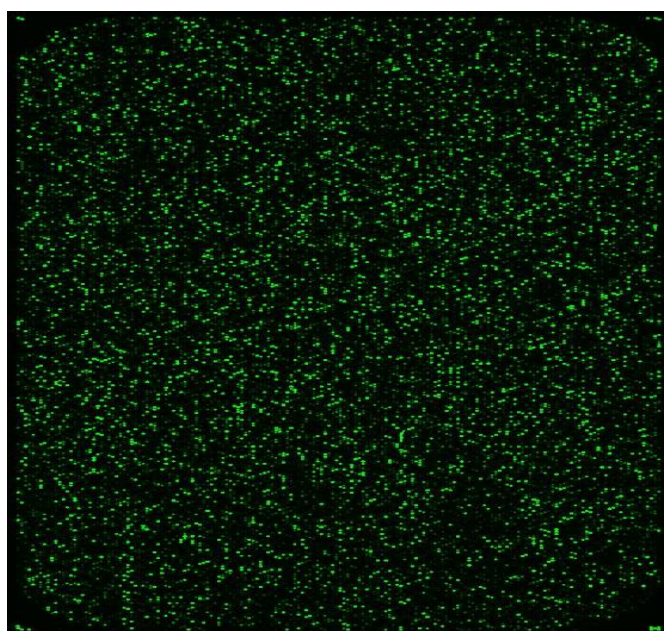


Abbildung 15.

Beispielaufnahme eines der vier Felder des Mikroarrays mit einer der gepoolten RNA-Proben, extrahiert aus HOPE-Sputumzellpräparaten.

Die fluoreszierenden Punkte zeigen einzelne detektierte Gene an, die den fluoreszierenden Farbstoff Cy3 eingelagert haben und auf den Chip hybridisiert sind (angefertigt von: ImaGenes, Berlin).

3.10 Vergleich der RNA-Expression mit den im Sputumüberstand gemessenen Proteinkonzentrationen

Der Vergleich im Transkriptom gemessener Genexpression mit den im Multiplex Panel gemessenen Proteinen zeigte, für Analyte, die auf der Proteinebene im Sputumüberstand

nicht detektierbar waren, ebenfalls sehr geringe Expressionswerte für die RNA (Tabelle 16).

Tabelle 16. Vergleich der quantil-normalisierten mRNA-Ergebnisse im Transkriptom mit den im Sputumüberstand auf dem Human Inflammation xMAP® Panel nicht detektierbaren Analyten.

GenID	Protein	COPD (Raucher)		COPD (Exraucher)		Kontrollgruppe	
		mRNA	Konz.	mRNA	Konz.	mRNA	Konz.
NM_002190	IL-17	10	Low	2	low	nd	low
NM_002985	RANTES	40	Low	89	low	49	low
NM_000758	GM-CSF	1	Low	4	low	nd	low
NM_000619	IFN- γ	6	Low	13	low	nd	low
NM_000586	IL-2	18	Low	10	low	nd	low
NM_000588	IL-3	1	Low	1	low	nd	low
NM_000589	IL-4	1	Low	1	low	nd	low
NM_000879	IL-5	6	Low	3	low	nd	low
NM_000880	IL-7	43	Low	27	low	23	low
NM_002983	MIP-1 α	nd	Low	nd	low	nd	low
NM_004530	MMP-2	1	Low	1	low	nd	low
NM_000572	IL-10	32	Low	26	low	nd	low
NM_000595	TNF- β	nd	Low	4	low	nd	low
NM_002986	Eotaxin-1	8	Low	306	low	nd	low
NM_0012151	Factor VII	118	Low	nd	low	454	low
NM_170734	BDNF	nd	Low	nd	low	nd	low
NM_002187	IL-12p40	10	Low	4	low	nd	low
NM_000882	IL-12p70	3	Low	3	low	nd	low
NM_016584	IL-23	119	Low	37	low	31	low
NM_000567	CRP	4	Low	2	low	nd	low
NM_000552	vWF	7	Low	5	low	nd	low

Abkürzungen: nd; nicht detektierbar, low, Analytekonzentrationen unterhalb der Messgrenze des Human Inflammation x MAP® Panels.

Die im Transkriptom messbaren Genexpressionen zeigten auch auf dem Multiplex Panel messbare Proteinkonzentrationen (Tabelle 17). Ferritin, Fibrinogen und VEGF werden hier nicht verglichen, da ihre Untereinheiten von mehreren Genen kodiert werden.

Tabelle 17. Vergleich der quantil-normalisierten mRNA-Ergebnissen im Transkriptom mit den im Sputumüberstand auf dem human Inflammation xMAP® Panel detektierbaren Analyten.

GenID	Protein	COPD (Raucher)		COPD (Exraucher)		Kontrollgruppe	
		mRNA	Pk	mRNA	Pk	mRNA	Pk
NM_000575	IL-1 α	34	0,0862	36	0,09	38	0,158
NM_000576	IL-1 β	3528	0,238	2049	0,179	1482	0,19
NM_173842	IL-1RA	603	37,98	445	45,99	510	53,23
NM_172175	IL-15	46	0,76	46	1,92	108	1,4
NM_001562	IL-18	3	0,1	22	0,154	52	0,21
NM_000600	IL-6	13	0,514	55	1,197	28	0,322
NM_000584	IL-8	189	34,83	149	37,8	235	35,725
NM_002982	MCP-1	1367	1071	2058	2016	1231	2703,6
NM_002984	MIP-1 β	3018	0,941	3495	2,772	5775	2,275
NM_004994	MMP9	3841	1,34	1694	0,824	1311	1,342
NM_002422	MMP3	1	0,83	10	0,9	nd	0,75
NM_000014	α -2-Macroglobulin	67	16800	370	20000	860	26700
NM_004048	β -2 Microglobulin	1825	6822	7231	7670	14919	5550
NM_003254	TIMP-1	123	997,2	467	1071	438	1004,58
NM_000594	TNF- α	103	0,03	175	0,012	232	0,011
NM_001066	TNF-R2	4	4,92	20	4,1	26	4,2858
NM_001078	VCAM-1	3	8,49	4	12,15	nd	10
NM_000201	ICAM-1	160	24,84	236	37,98	286	130,31
NM_00100223 6	α -1-Antitrypsin	1109	27000	2436	20000	3003	24700
NM_000064	Complement C3	19	14700	45	20000	102	36100
NM_000583	VDBP	1	680	1	880	nd	940
NM_005143	Haptoglobin	107	3600	2205	nd	2054	5950

Abkürzungen: nd, nicht detektierbar, Pk Proteinkonzentration (ng/ml). Die mittleren Analytekonzentrationen sind aus den für die Transkriptom-Analyse gepoolten Sputumüberstandsproben, gemessen auf dem Human Inflammation xMAP® Panel berechnet.

3.10.1 Einfluss von DTT auf das Transkriptom

In der COPD-Gruppe (Raucher) unterscheidet sich die Genexpression zwischen der Sputumaufarbeitung mit und ohne DTT für 2906 Gene mit einer $\log_2$ Änderung $> 2,0$ signifikant (Tabelle 18).

Tabelle 18. DTT-Einfluss auf die Genexpression im Transkriptom.

Log ₂ Änderung	Hochregulierte Gene	Herunterregulierte Gene
>2,0	1755	1151
>2,5	917	467

Transkriptom-Daten der COPD (Raucher)-Gruppe bei Sputumaufarbeitung mit und ohne DTT.

Der Vergleich der Genexpression von 22 auf dem Human Inflammation xMAP Panel ® gemessenen Proteinen zeigte für die Hälfte aller Proteine eine signifikante Veränderung der Genexpression durch DTT (Tabelle 19).

Tabelle 19. Einfluss von DTT auf die Genexpression. Vergleich der quantil-normalisierten mRNA-Ergebnissen im Transkriptom mit den Analyten im Sputumüberstand (Human Inflammation xMAP® Panel).

GenID	Protein	COPD (Raucher) mit DTT	COPD (Raucher) ohne DTT	log ₂ Änderung
NM_000575	IL-1 α	34	5	2,7
NM_000576	IL-1 β	3528	1763	1,0
NM_173842	IL-1RA	603	303	1,0
NM_172175	IL-15	46	6	3,0
NM_001562	IL-18	3	14	-2,2
NM_000600	IL-6	13	4	1,9
NM_000584	IL-8	189	5	5,2
NM_002982	MCP-1	1367	68	4,3
NM_002984	MIP-1 β	3018	591	2,4
NM_004994	MMP9	3841	1700	1,2
NM_002422	MMP3	1	7	-2,6
NM_000014	α -2-Macroglobulin	67	9	2,9
NM_004048	β -2-Microglobulin	1825	344	2,4
NM_003254	TIMP-1	123	19	2,7
NM_000594	TNF- α	103	42	1,3
NM_001066	TNF-R2	4	5	-0,1
NM_001078	VCAM-1	3	15	-2,2
NM_000201	ICAM-1	160	53	1,6
NM_001002236	α -1-Antitrypsin	1109	252	2,1
NM_000064	Complement C3	19	29	-0,6
NM_000583	VDBP	1	1	0
NM_005143	Haptoglobin	107	100	0

Legende. Ferritin, Fibrinogen und VEGF wurden nicht verglichen, da ihre Untereinheiten von mehreren Genen kodiert werden.

3.10.2 Unterschiede im Transkriptom zwischen der COPD-Gruppe und der Kontrollgruppe

Die quantil-normalisierten Rohdatensignale der vier Gruppen sind verglichen worden. Dabei unterscheidet sich die Gesamtzahl der auf- und abregulierten Gene zwischen den Gruppen wesentlich (Tabelle 20).

Die größten Differenzen traten dabei zwischen der COPD-Gruppe (Raucher) und der Kontrollgruppe (gesund) auf. Im Vergleich der beiden Gruppen sind 4419 Genen der COPD-Gruppe signifikant herunter reguliert und 6768 Gene signifikant hochreguliert. Basierend auf einer $\log_2$ Änderung > 4 sind zwischen diesen Gruppen 374 Gene signifikant hochreguliert und 49 Gene signifikant herunter reguliert (Tabelle 20).

Beim Vergleich der Genexpression zwischen der COPD-Gruppe (Raucher) und COPD-Gruppe (Exraucher) kann ein deutlicher Effekt des Rauchens in Form von signifikant unterschiedlich regulierten Genen gezeigt werden.

Tabelle 20. Ergebnisse der Transkriptom-Analyse von HOPE-Sputumzellpräparaten.

	Gesamtzahl herunter-regulierter Gene			Gesamtzahl hoch-regulierter Gene		
	[$\log_2$ Änderung]			[$\log_2$ Änderung]		
	< 2.1	2.1 – 4.0	> 4.0	< 2.1	2.1 – 4.0	> 4.0
COPD-Gruppe (Raucher) vs. Kontrollgruppe	4419	3864	374	6768	4681	49
COPD-Gruppe (Raucher) vs. COPD-Gruppe (Exraucher)	4499	1543	73	6469	897	24
COPD-Gruppe (Exraucher) vs. Kontroll- gruppe	3849	521	7	5171	555	20

Quantile normalisierte Daten der Genexpressionsanalyse, ausgewertet mit der DirectArray software.

Die hierarchische Clusteranalyse der baseline-tranformierten Rohdaten (41067 Datensätze) zeigt eine größere Übereinstimmung zwischen den COPD-Rauchern und COPD-Exrauchern, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Abbildung 16).

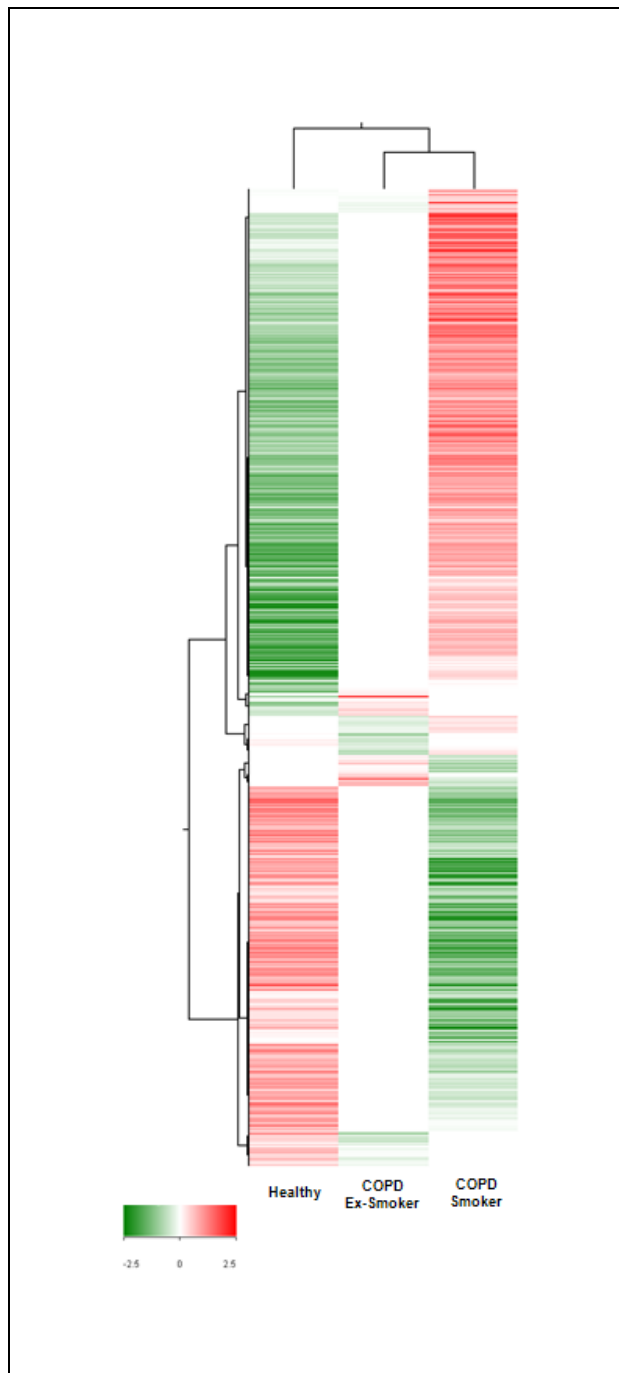


Abbildung 16. Transkriptom-Analyses der RNA-Proben aus HOPE-Sputum. Die hierarchische Clusteranalyse der baseline-transformierten Rohdaten des Transkriptoms zeigt einen Vergleich der Genexpressionen der Kontrollgruppe (gesund) mit den COPD-Rauchern bzw. Exrauchern.

Rot zeigt eine hohe Genexpression,

weiß ein mittleres Niveau,

grün eine niedrige RNA-Expression beim Vergleich der Gruppen an.

(aus Pedersen et al., 2013)

In der weiteren Auswertung aller signifikant niedriger exprimierten Gene ($\log_2$ Änderung > 2.0) mit einem Expressionsniveau von > 100 in der COPD-Gruppe (Raucher) verglichen mit der Kontrollgruppe wurden 31 Gene identifiziert die im Vergleich beider Gruppen herunter reguliert sind und im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen bedeutsam sein könnten (Tabelle 21).

Tabelle 21. Transkriptom-Analyse von HOPE-Sputumzellpräparaten. Vergleich der quantil-normalisierten Signale der COPD – Gruppe (Raucher) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auswahl an signifikant herunterregulierten Genen.

GeneID	log ₂ Änderung	COPD-Gruppe (Raucher)	Kontrollgruppe (gesund)	Beschreibung der mRNA
NM_006770	-3,0	2349	18865	Macrophage receptor with collagenous structure (MARCO)
NM_018643	-2,9	196	1499	Triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM1)
NM_000712	-2,9	353	2637	Biliverdin reductase A (BLVRA)
NM_033554	-2,9	1063	7856	Major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1 (HLA-DPA1)
NM_002116	-2,9	231	1692	Major histocompatibility complex, class I, A (HLA-A)
NM_006384	-2,9	105	763	Calcium and integrin binding 1 (calmyrin) (CIB1)
NM_000700	-2,9	672	4854	Annexin A1 (ANXA1)
NM_000895	-2,9	883	6365	Leukotriene A4 hydrolase (LTA4H)
NM_203401	-2,8	151	1065	Stathmin 1 (STMN1), transcript variant 1
NM_006120	-2,8	210	1479	Major histocompatibility complex, class II, DM alpha (HLA-DMA)
NM_001344	-2,8	116	796	Defender against cell death 1 (DAD1)
NM_007262	-2,7	179	1151	Parkinson disease (PARK7), transkript variant 1
NM_002064	-2,7	324	2066	Glutaredoxin (thioltransferase) (GLRX)
NM_003380	-2,7	3292	20865	Vimentin (VIM)
NM_148170	-2,6	139	837	Cathepsin C (CTSC)
NR_001434	-2,5	364	2116	Major histocompatibility complex, class I, (HLA-H), non-coding RNA
NM_002445	-2,5	118	682	Macrophage scavenger receptor 1 (MSR1)
NM_001040034	-2,4	2366	12911	CD63 molecule (CD63)
NM_001803	-2,4	4359	23691	CD52 molecule (CD52)
NM_002305	-2,4	1126	6091	Lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (LGALS1)
NM_006332	-2,4	12969	68758	Interferon, gamma-inducible protein 30 (IFI30)
NM_018955	-2,4	1836	9597	Ubiquitin B (UBB)
NM_005514	-2,4	1784	9236	Major histocompatibility complex, class I, B (HLA-B)
NM_002119	-2,3	103	516	Major histocompatibility complex, class II, DO alpha (HLA-DOA)
NM_000100	-2,3	1876	9370	Cystatin B (stefin B) (CSTB)
NM_006472	-2,3	728	3597	Thioredoxin interacting protein (TXNIP)
NM_000358	-2,3	911	4340	Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa (TGFB1)
NM_003295	-2,2	1054	4936	Tumor protein, translationally-controlled 1 (TPT1)
NM_147780	-2,1	363	1610	Cathepsin B (CTSB)
NM_000211	-2,1	309	1303	Integrin, β 2 (complement comp. 3 receptor 3 + 4 subunit) (ITGB2)
NM_014624	-2,0	3207	13229	S100 calcium binding protein A6 (S100A6)

Ausgehend von der stärksten $\log_2$ Änderung von $-3,0$ zwischen der Genexpression in der COPD-Gruppe (Raucher) gegenüber der Kontrollgruppe wurde der Macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) für die Validierung im immunozytochemischen Nachweis verwendet.

Der Vergleich der signifikant höher exprimierten Gene zwischen der COPD-Gruppe (Raucher) und der Kontrollgruppe zeigte 13 mögliche Kandidaten, die bei Entzündungsvorgängen bedeutsam sein könnten (Tabelle 22).

Tabelle 22. Transkriptom-Analyse von HOPE-Sputumzellpräparaten. Aus dem Vergleich der quantil-normalisierten Signale ermittelten signifikant hochregulierten Gene in der COPD (Raucher)-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe.

Gen ID	$\log_2$ Änderung	COPD (Raucher)	Kontrollgruppe (gesund)	Beschreibung der mRNA
NM_001783	2,2	1820	389	CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha (CD79A)
NM_138763	2,3	2701	551	BCL2-associated X protein (BAX)
NM_018406	2,6	648	108	Mucin 4, cell surface associated (MUC4)
NM_033199	2,7	1595	244	Urocortin 2 (UCN2)
NM_002991	2,7	1564	237	Chemokine (C-C motif) ligand 24 (CCL24)
NM_033355	2,8	3590	528	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase (CASP8)
NM_001202519	3,1	5241	631	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator (CFLAR)
M55405	3,1	2799	319	Mucin (MUC-3)
NM_002273	3,2	1234	137	Keratin 8 (KRT8)
NM_001039844	3,2	10396	1129	Acyl-CoA binding domain containing 7 (ACBD7)
NM_002014	3,5	2352	214	FK506 binding protein 4, 59kDa (FKBP4)
NM_005217	3,5	4268	388	Defensin, alpha 3, neutrophil-specific (DEFA3)
NM_001032278	3,7	2185	173	Matrix metalloproteinase 28 (MMP28)
NM_020762	4,1	989	58	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1 (SRGAP1)

Ausgehend von der stärksten $\log_2$ Änderung von $+4,1$ zwischen der Genexpression in der COPD-Gruppe (Raucher) gegenüber der Kontrollgruppe wurde das SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1 (SRGAP1) für die weitere Validierung im immunozytochemischen Nachweis verwendet.

3.10.3 Kandidatengene aus der Transkriptom-Analyse

3.10.3.1 Kandidatgen MARCO

Der immunozytochemische Nachweis für das in der Transkriptom-Analyse der COPD-Gruppe (Raucher) gegenüber der Kontrollgruppe stark vermindert exprimierte Gen des Macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) ($\log_2$ Änderung -3,0) zeigte in HOPE-Sputumzellpräparaten eine selektive Anfärbung der Sputum-Makrophagen (Abbildung 17).

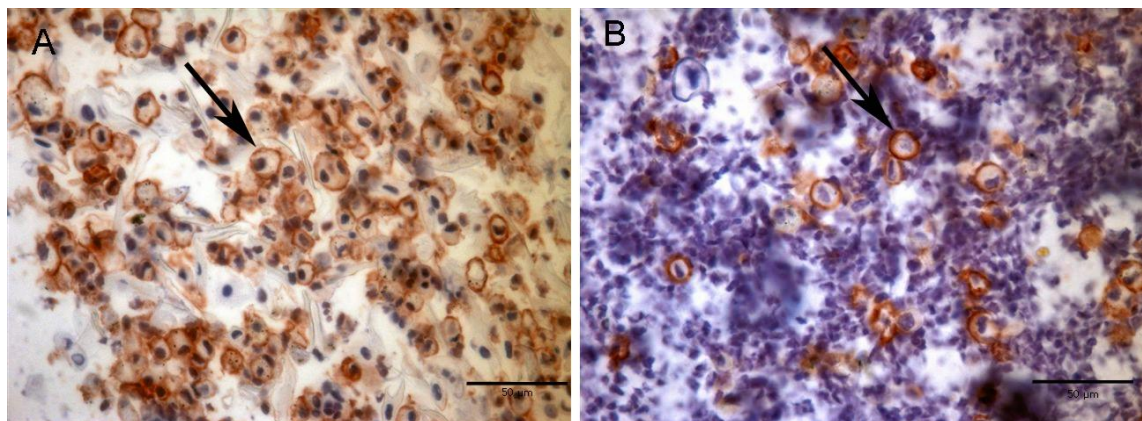


Abbildung 17. Immunocytochemischer Nachweis von MARCO in HOPE-Sputumzellpräparaten. (A) Sputum-Makrophagen (SM) in einem Kontroll Sputum, (B) SM in einer COPD-Sputumprobe. Alle Aufnahmen sind bei 400facher Vergrößerung (Maßstabsbalken 50 μ m) und unter Verwendung von Aminoethylcarbazole als Chromogen (rote Signale) entstanden.

Der mittlere Score von zwei unabhängigen Auswertern zeigt für die Anfärbung von MARCO im immunozytochemischen Nachweis zwischen COPD- und lungengesunden Kontrollproben nur geringe Unterschiede (Abbildung 18).

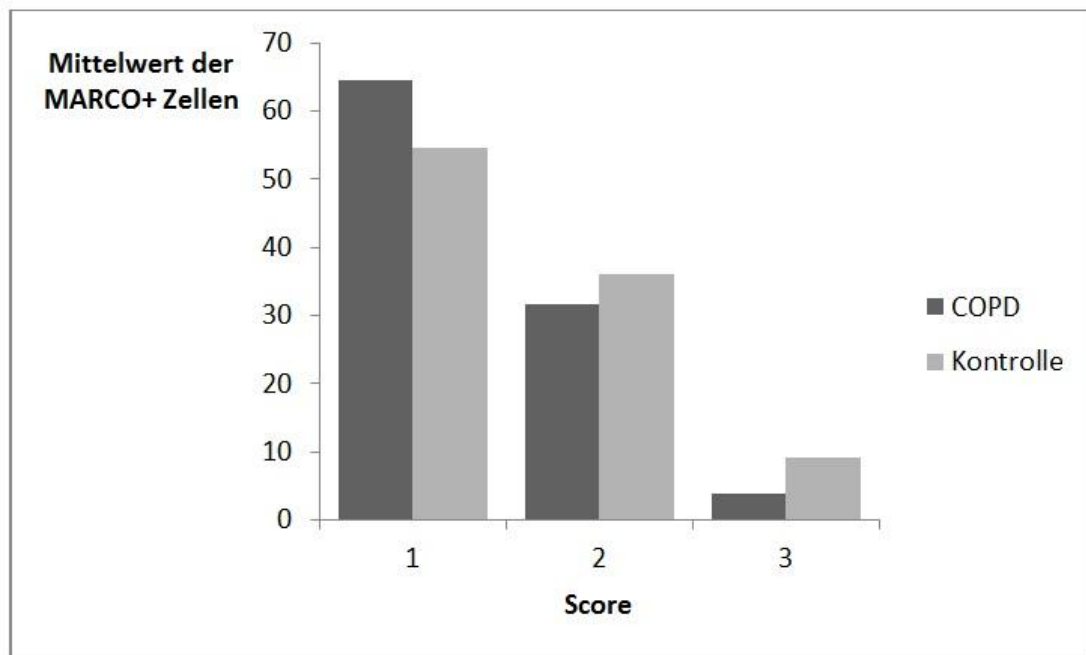


Abbildung 18. Semiquantitative Auswertung der MARCO-Anfärbung der Sputum-Makrophagen. Dabei wurden die HOPE-Sputumzellpräparate ausgewertet, welche auch für die Transkriptom-Analyse eingesetzt wurden (n = 6).

Score: 1 = schwach, 2 = mittel, 3 = starke Anfärbung.

Für die weitere Validierung von MARCO wurden HOPE-geschützte Lungengewebschnitte verwendet. Dabei zeigten erste Vergleiche von MARCO in der Lunge von einem COPD-Patienten im Vergleich zu einem Nie-Raucher eine deutlich geringere Anfärbung der Zellmembran der Alveolarmakrophagen (Abbildung 19).

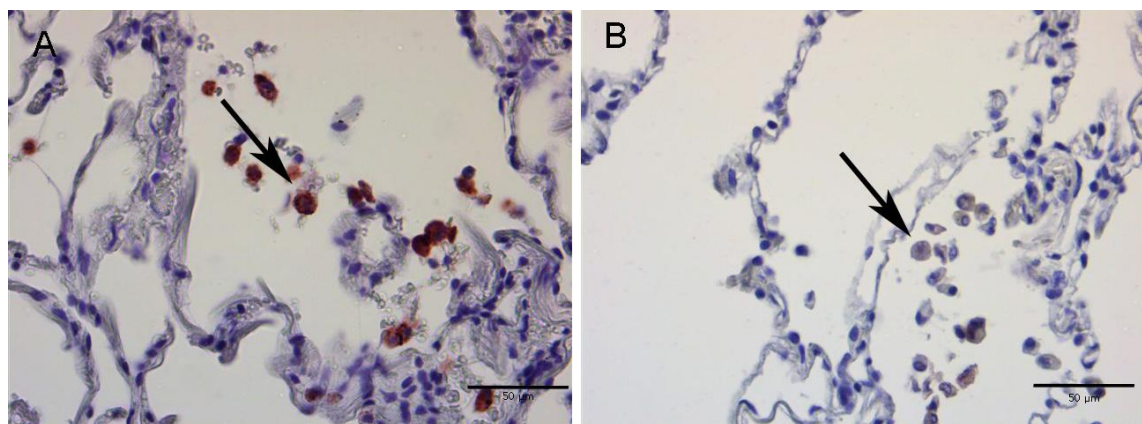


Abbildung 19. Immunozytochemischer Nachweis von MARCO in HOPE-Lungengewebepräparaten. (A) Alveolar Makrophagen (AM) in einer Lunge eines Nierauchers, (B) AM in einer COPD-Lunge (Gold-Stadium III). Alle Aufnahmen sind bei 400facher Vergrößerung (Maßstabsbalken 50 µm) und unter Verwendung von Aminoethylcarbazole als Chromogen (rote Signale) entstanden.

3.10.3.2 Kandidatgen SRGAP-1

Der immunozytochemische Nachweis für das in der Transkriptom-Analyse der COPD-Gruppe (Raucher) gegenüber der Kontrollgruppe stark erhöht exprimierte Gen SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1 (SRGAP1) zeigte in HOPE-Sputumzellpräparaten eine selektive membranständige Anfärbung der Sputum-Makrophagen (Abbildung 20).

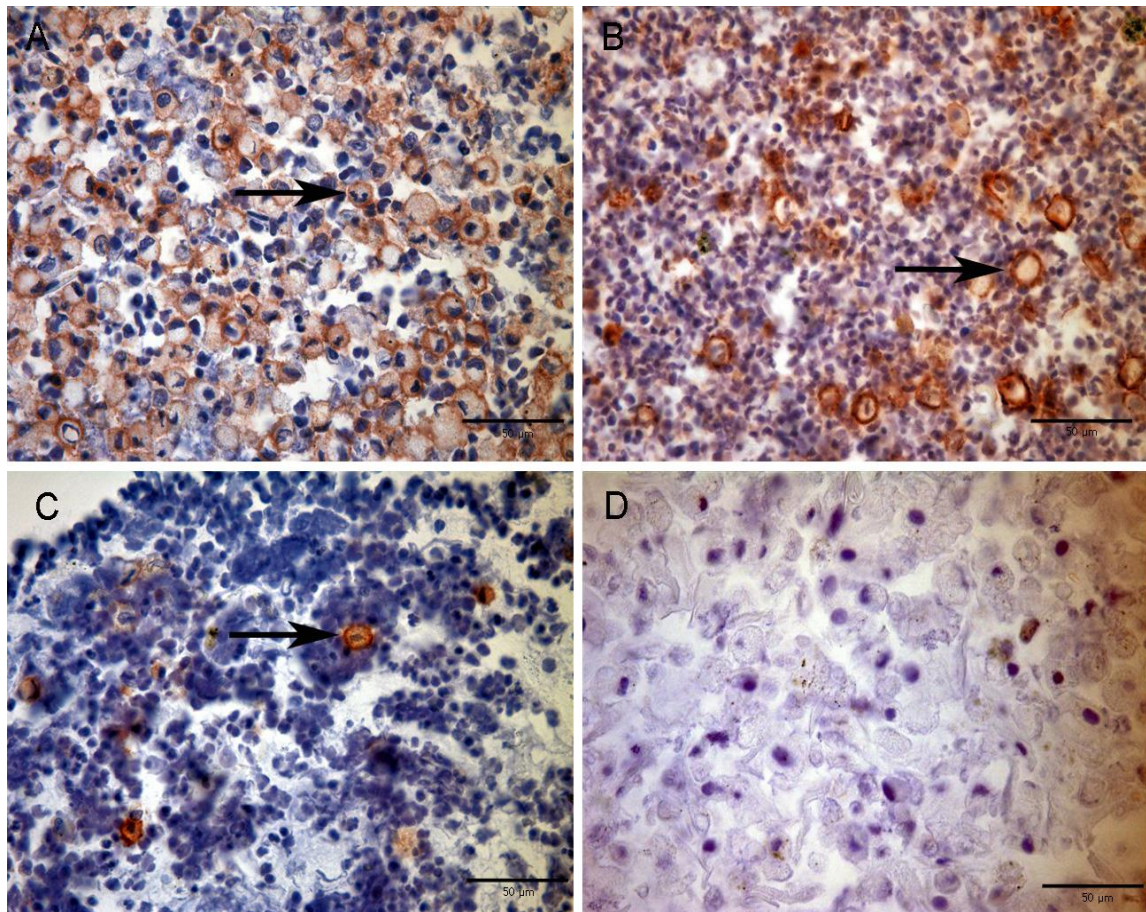


Abbildung 20. Immunozytochemischer Nachweis von SRGAP1 in HOPE-Sputumzellpräparate. (A) Leichte bis mittlere Anfärbung der Sputum-Makrophagen (SM) in einem Kontrollsputum (gesund), (B + C) starke Anfärbung der SM in COPD-Sputumproben, (D) Negativkontrolle ohne Primär-AK. Alle Aufnahmen sind bei 400facher Vergrößerung (Maßstabsbalken 50 µm) und unter Verwendung von Aminoethylcarbazole als Chromogen (rote Signale) entstanden.

Dabei war die immunozytochemische Anfärbung von SRGAP1 in HOPE-Sputumzellpräparaten von COPD-Sputumproben (Raucher) gegenüber den Kontrollproben (gesund) im Mittel verstärkt (Abbildung 21).

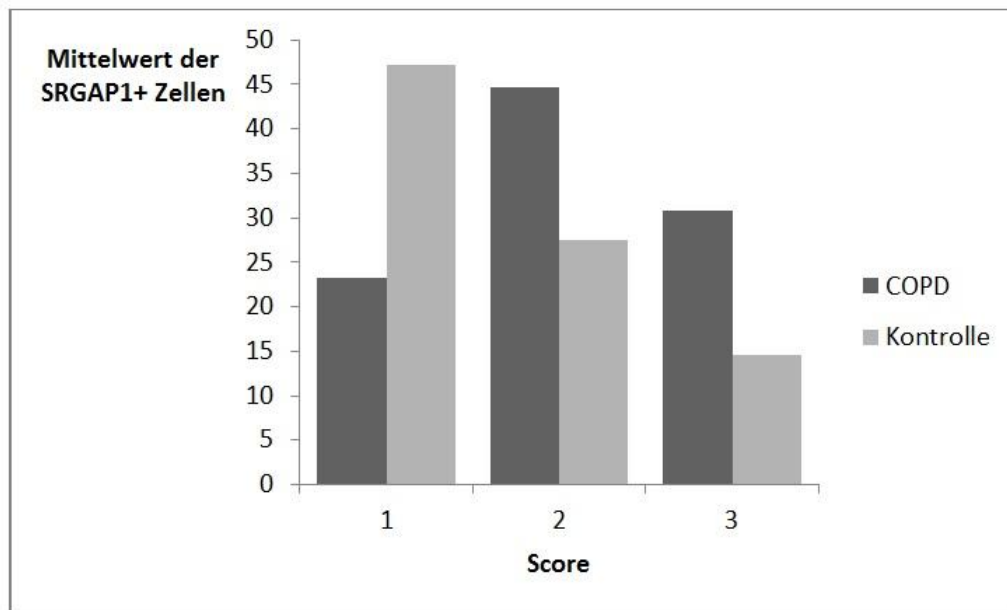


Abbildung 21. Semiquantitative Auswertung der SRGAP1-Anfärbung der Sputum-Makrophagen. Dabei wurden die HOPE-Sputumzellpräparate ausgewertet, welche auch für die Transkriptom-Analyse eingesetzt wurden (n = 6). Score: 1 = schwach, 2 = mittel, 3 = starke Anfärbung.

Erste immunozytochemische Nachweise von SRGAP1 an HOPE-geschützten Lungengewebeschnitten zeigen die membranständige Anfärbung von Alveolarmakrophagen. Weiterhin zeigen erste Vergleiche von SRGAP1 in der Lunge von einem COPD-Patienten und einem Nieraucher deutlich verstärkte Anfärbung der Zellmembran der Alveolarmakrophagen (Abbildung 22).

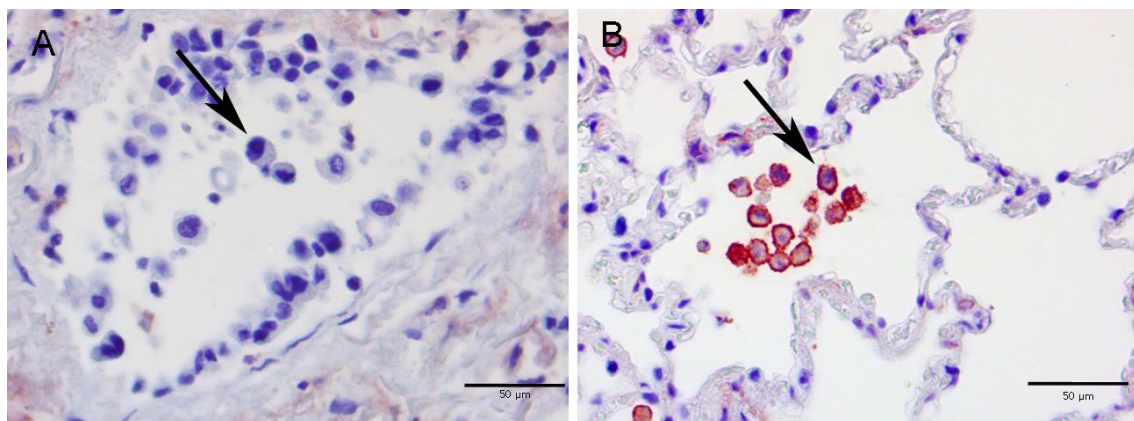


Abbildung 22. Immunozytochemischer Nachweis von SRGAP1 in HOPE-Lungengewebepräparaten. (A) Alveolar Makrophagen (AM) in einer Lunge eines Nierauchers, (B) AM in einer COPD-Lunge (Gold-Stadium III). Alle Aufnahmen sind bei 400facher Vergrößerung (Maßstabsbalken 50 µm) und unter Verwendung von Aminoethylcarbazole als Chromogen (rote Signale) entstanden.

4 Diskussion

4.1 Sputuminduktion und Differenzierung

Für die klinische Diagnostik und in der Erforschung von inflammatorischen Vorgängen bei respiratorischen Erkrankungen bietet die bronchoalveolare Lavage (BAL) ein gutes Untersuchungsmaterial (Riise et al., 1995). Die Invasivität der Bronchoskopie begrenzt jedoch ihre Einsatzmöglichkeiten, da die Rückgewinnungsrate von Spülflüssigkeit bei COPD mit zunehmendem Schweregrad abnimmt (Löfdahl et al., 2005). Die bronchoskopische Untersuchung größerer Patientengruppen ist schwierig und Wiederholungsmessungen innerhalb klinischer Studien, oder beim Monitoring von Krankheitsverläufen sind nicht praktikabel.

Im Gegensatz dazu kann hier gezeigt werden, dass die Gewinnung von induziertem Sputum von COPD-Patienten (GOLD II und III) und gesunden Kontrollpersonen gut vertragen wird. Sie ermöglicht wiederholte Messungen und ist geeignet Krankheitsverläufe zu überwachen (Pizzichini et al., 1996; Gibson et al., 2001). Darüberhinaus reicht die induzierte Sputummenge für eine parallele Aufarbeitung und unter Anwendung der HOPE-Technik für weiterführende Transkriptom-Analysen und immunozytochemische Nachweise aus.

Allerdings ist die Induktion und Aufarbeitung von Sputumproben zeitaufwendiger als bei der BAL und die abgehusteten Zellen sollten innerhalb von zwei Stunden verarbeitet werden (Holz et al., 2000).

Die Sputumaufarbeitung beinhaltet die Homogenisierung der Proben mittels Dithiothreitol, welches einen Einfluss auf verschiedene inflammatorische Biomarker hat (Bafadhel et al., 2012). Bei der Auswertung der Sputumuntersuchungen bilden die Zellvitalität, die Gesamtzellzahl und die prozentualen Anteile der verschiedenen Zelltypen sowie die Zellkonzentrationen die Hauptparameter (Magnussen et al., 2000; Holz et al., 2000). Der Vergleich der Ergebnisse der Sputumhomogenisierung mit und ohne DTT in den hier vorgelegten Untersuchungen zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Vitalität, der Gesamtzellzahl und den differenzierten Leukozyten. Das stimmt mit den Ergebnissen von Hector et al. 2010 überein.

Die in der Zelldifferenzierung signifikant verminderte Anzahl der bronchialen Epithelzellen (BEC) in der Sputumaufarbeitung ohne DTT ist vermutlich auf eine stärkere mechanische Schädigung der BEC zurückzuführen, sodass einige dieser Zellen nicht mehr differenzierbar sind. Da der prozentuale Anteil der differenzierten BEC unter 2 % der jeweils 400 ausgewerteten Zellen liegt, kann dieser Effekt nicht weiter quantifiziert werden.

Das Verfahren der parallelen Sputumhomogenisierung mit und ohne DTT bietet neue Möglichkeiten den Einfluss von DTT bei weiterführenden Untersuchungen auf RNA-, bzw. Proteinebene zu charakterisieren.

Während eine signifikante Erhöhung der neutrophilen Granulozyten (NG) bei COPD gesichert erscheint, lässt sich keine Beziehung zwischen dem Schweregrad der Erkrankung und der Konzentration der neutrophilen Granulozyten feststellen (Singh et al., 2010). Der Vergleich zwischen der COPD-Gruppe (Raucher) und COPD-Gruppe (Exraucher) zur Kontrollgruppe (gesund) zeigt eine signifikante Erhöhung der Konzentration der neutrophilen Granulozyten im Sputum. Dieser Befund stimmt mit der Literatur überein (Barnes, 2000; Peleman et al., 1999; Singh et al., 2010; Stockley et al., 2002). Die Resultate der Zelldifferenzierung im induzierten Sputum bilden die Grundlage für die Einschätzung der Ergebnisse aus der Transkriptom- und Multiplex-Analyse.

4.2 Proteinanalysen im Sputumüberstand

Die mit dem etablierten ELISA-Verfahren gemessenen mittleren Konzentrationen der drei inflammatorischen Biomarker IL-8, MPO und MMP-9 liegen in der COPD-Gruppe über den Konzentrationen in der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse stimmen mit den Literaturdaten für IL-8 und MPO (Yamamoto et al., 1997), sowie MMP-9 (Vignola et al., 1998) überein und können zur Einschätzung der neutrophilen Inflammation in der Untersuchungsgruppe herangezogen werden.

Die erweiterte Untersuchung des Sputumüberstandes mit dem Human Inflammation MAP® v 1.0 Panels zeigt, dass dieses Panel für die validierte Messung von über 2/3 der 47 Analyte auf dem Panel verwendet werden kann. Weiterhin können 25 Analyte, unab-

hängig von der Methode der Sputumhomogenisierung, gemessen werden.

15 Analyte können nicht im COPD-Sputumüberstand bestimmt werden. Die Interpretation dieser Beobachtung ist schwierig, da es für die meisten dieser Proteine keine Referenzwerte gibt. Dabei ist es unklar, ob diese Analyte bisher nicht im COPD-Sputumüberstand gemessen werden, oder ob negative Ergebnisse nicht publiziert wurden. Weitere Messreihen mit empfindlicheren Methoden, zum Beispiel der Mesoscale discovery Plattform (Chowdhury et al., 2009) sind zur Klärung dieser Frage notwendig.

Eine andere Begründung für die Nicht-Detektierbarkeit einiger Analyte könnten auch die Verdünnungsfaktoren in der Sputumaufarbeitung sein., IL-2 und IFN- γ konnten zum Beispiel in COPD-Sputum mit niedrigeren Verdünnungsfaktoren mit der ELISA-Technik gemessen werden (Eickmeier et al., 2010).

DTT erhöht die Anzahl der messbaren Analyte auf dem xMAP® Panel. In der Matrix-Validierung können 13 Analyte mit DTT-Aufarbeitung in der Linearitätstestung gemessen werden, während diese Analyte bei der Aufarbeitung ohne DTT unter der Nachweisgrenze liegen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die hohe Konzentration an Proteinen, wie α -Makroglobulin sein, welches im COPD-Sputum in hohen Konzentrationen vorliegt (Burnett und Stockley, 1981). Da α -Makroglobulin eine Reihe von Zytokinen binden kann (James et al., 1994), könnte es auch deren Detektion beeinflussen. Auf diese Weise könnte DTT die Freisetzung dieser Zytokine aus dem Proteinbindungskomplex fördern und sie für die Detektion zugänglich machen.

Die Luminex-Technologie ist schon früher zur Analyse von COPD-Sputumüberstand verwendet worden (Bafadhel et al., 2012; Aaron et al, 2010). Dabei hatten Aaron und seine Mitarbeiter ein Multiplex-Panel von 22 Proteinen in induzierten Sputumproben untersucht, die mit DTT aufgearbeitet wurden. Sie untersuchten die Schwankungsbreite der Messungen innerhalb eines Patienten und zwischen verschiedenen Patienten. Sie fanden einen signifikanten Zusammenhang zwischen der IL-6, IL-8, VEGF und TIMP-1-Konzentration und dem Schweregrad der Beeinträchtigung der Lungenfunktion und Dyspnoe.

In den hier vorgestellten Ergebnissen auf dem xMAP®Panel zeigen IL-6, IL-8 und VEGF keinen Einfluss von DTT auf die Konzentrationen dieser Marker. Allein für die Konzentration von TIMP-1 wird in den Untersuchungen hier ein signifikanter DTT-Effekt nachgewiesen. Möglicherweise werden die Konzentrationen für diesen Marker in den Proben mit DTT unterschätzt.

Bafadhel et al. haben eine zweistufige Methode zur Sputumaufarbeitung entwickelt, welche die Wiederfindungsrate vieler Zytokine auf Multiplex-Plattformen erhöht (Bafadhel et al., 2012). Sie verwendeten dabei spontan produzierte, als auch induzierte Sputumproben und die Proben wurden im ersten Schritt mit PBS und im zweiten Schritt mit DTT inkubiert. Die Zugabe einer definierten Analyt-Menge (Spiking) zum Sputumüberstand zeigte eine erhöhte Wiederfindung dieser zugesetzten Analyte im Vergleich des Sputumüberstandes vor DTT-Behandlung mit dem Überstand nach DTT-Behandlung.

In der vorgestellten Arbeit wurden hingegen zwei Methoden zur Sputumaufarbeitung mit und ohne DTT parallel eingesetzt, wobei das selektierte Sputum schon am Anfang der Aufarbeitung in zwei Portionen aufgeteilt und getrennt mit und ohne DTT aufgearbeitet wird. Dabei zeigen die Spike-Wiederfindungstests für MIP-1 α , TNF- β und vWF Werte, die unter den Qualitätsstandards für die Analyse von Mediatoren im Sputumüberstand liegen (Kelly et al., 2002).

4.3 Immunozytochemische Nachweise

Die Verwendung der HOPE-Technik für Sputumzellen zeigt eine gute Morphologie der HOPE-behandelten Sputumzellenpräparate. Dabei ist die Anfertigung von Schnitten aus HOPE-Sputumzellblöcken mit weniger als 5 μ m Dicke aufgrund der geringen Größe der eingebetteten Zellpellets und ihrer relativ weichen Konsistenz schwieriger, als in BAL-Proben (Marwitz et al., 2011). Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte die Verwendung von DTT zur Mucus-Auflösung während des Aufarbeitungsprozesses sein, wobei der Erhalt der Proteine diesen Nachteil gering erscheinen lässt.

Weiterhin können Interleukin-8, Myeloperoxidase und Matrixmetalloproteinase-9

immunozytochemisch ohne Antigen-Wiederherstellung detektiert und lokalisiert werden. Die hohe Empfindlichkeit dieses Nachweissystems ermöglicht auch den immunozytochemischen Nachweis von Interleukin-17A, während dieses Zytokin im Sputumüberstand nicht detektierbar ist. Die hohe Empfindlichkeit dieses Nachweissystems könnte bei der Validierung neuer diagnostischer Marker von Vorteil sein.

Der immunozytochemische Nachweis des aus den Transkriptom-Ergebnissen resultierenden Kandidatgens für MARCO zeigt eine leicht verminderte Anfärbung der Zellmembran der Sputum-Makrophagen in der COPD-Gruppe (Raucher) gegenüber der Kontrollgruppe (gesund). Erste Nachweise von MARCO an Lungengewebschnitten von einem COPD-Patienten zeigen eine deutlichere verminderte Anfärbung der Alveolarmakrophagen gegenüber einem Nieraucher. Frühere Untersuchungen zeigen eine verminderte mRNA-Expression von MARCO in selektierten Sputum-Makrophagen bei COPD und CF (Wright et al., 2009) und bestätigen so den hier gezeigten Expressionsunterschied zwischen der COPD-Gruppe (Raucher) und der Kontrollgruppe (gesund). Weiterführende Untersuchungen, z. B. im Lungengewebe sind notwendig, um diese Ergebnisse auf Proteinebene zu bestätigen.

Das in der Transkriptom-Analyse in der COPD-Gruppe (Raucher) gegenüber der Kontrollgruppe (gesund) signifikant erhöht exprimierte Gen von SRGAP1 wird hier erstmalig in der Membran von Sputum-Makrophagen und Alveolarmakrophagen detektiert. Bisher ist eine veränderte Genexpression von SRGAP1 in eosinophilen und neutrophilen Granulozyten bei allergisch entzündlichen Prozessen gezeigt worden (Ye et al., 2010). Dabei kann der im Transkriptom gemessene Expressionsunterschied auf Proteinebene an HOPE-Sputumzellpräparaten bestätigt werden.

Die Bedeutung der hier gefundenen SRGAP1-Expression in Sputum- und Alveolarmakrophagen sowie die signifikanten Unterschiede in der COPD-Gruppe (Raucher) gegenüber der Kontrollgruppe sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

4.4 Transkriptom-Analyse in HOPE-Sputumzellproben

Bisherige Studien, welche mit Genexpressionsprofil-Analysen nach neuen Ansatzpunkten zur Behandlung der COPD suchen, verwenden als Ausgangsmaterial Lungengewebe (Golpon et al., 2004; Ning et al., 2004; Spira et al., 2004; Wang et al., 2008). Diese invasive Probengewinnung kann hier durch die Verwendung von induziertem Sputum vermieden werden.

Im Sputum von COPD-Patienten wurde erst eine Untersuchung zur Genetik der Genexpression durchgeführt, mit dem Ziel Einzelnukleotid-Polymorphismen zu analysieren (Qiu et al., 2011). Bei diesen Untersuchungen wurden die Proben mit DTT aufgearbeitet und mit TRIzol lysiert. In der hier vorgelegten Arbeit kann durch den Einsatz der HOPE-Technik die Genexpression mit immunozytochemischen Nachweisen kombiniert werden, da die Zellen morphologisch in einem guten Zustand erhalten sind. Weiterhin kann der Einfluss von DTT auf das Transkriptom charakterisiert werden (Goldmann et al., 2013).

Neben dem Schutz der Proteine kann RNA aus HOPE-Sputumzellproben in ausreichender Menge und Qualität gewonnen werden, um Transkriptom- Analysen durchzuführen. Die Ergebnisse der Analyse zeigen klare Expressionsunterschiede zwischen allen untersuchten Gruppen, wobei diese beim Vergleich der COPD-Gruppe (Raucher) mit der gesunden Kontrollgruppe am größten sind. Erste Kandidatgene aus der Analyse sind immunozytochemisch nachgewiesen worden. Diese kombinierte Untersuchung der RNA-Expression mit konformatoren immunozytochemischen Nachweisen erweitert die bisherigen Möglichkeiten der Charakterisierung chronischer Entzündungsvorgänge bei COPD.

4.5 Weiterführende Untersuchungen

Die Anwendung der HOPE-Technik an induzierten Sputumproben wird den Aufbau von Sputum-Biobanken am Deutschen Zentrum für Lungenforschung ermöglichen.

Die Kandidatengene MARCO und SRGAP1 werden in mehreren zukünftigen Forschungsprojekten auf ihre Bedeutung für inflammatorische Vorgänge bei COPD und anderen Lungenerkrankungen untersucht.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse werden in zwei klinischen Studien angewendet.

In einer Studie wird der Einfluss eines neuen anti-inflammatorischen Wirkstoffes untersucht, wobei eine Sputumprobe vor und eine Probe am Ende der Behandlungsphase gewonnen wird. Neben der Differentialzytologie wird der Sputumüberstand mit dem hier validierten *Human Inflammation xMAP® v 1.0 Panel* untersucht. Weiterhin werden die Sputumzellpellets mit HOPE-Protektionslösung behandelt und in Paraffin eingebettet. Am Ende der Studie sollen Sputum-Transkriptome vor und nach der Behandlung mit dem entzündungshemmenden Wirkstoff angefertigt und auf mögliche Unterschiede in der RNA-Expression untersucht werden.

In einer zweiten Studie werden Bronchiektasen-Patienten mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Auch hier werden in einer genau charakterisierten Patientengruppe HOPE-Sputumproben gesammelt, um neben den zytologischen Untersuchungen an den frischen Zellpräparationen und Mediatoranalysen im Sputumüberstand zusätzlich Transkriptom-Untersuchungen an HOPE-geschützten Paraffin-eingebetteten Sputumproben durchzuführen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die HOPE-Technik kombiniert mit anschließenden morphologischen und molekularbiologischen Analysen für induzierte Sputumproben verwendet werden kann. Die Kombination der nicht-invasiven Probengewinnung mit dieser Technik bietet Möglichkeiten neue diagnostische Marker und therapeutische Targets für COPD und andere Lungenerkrankungen, wie Asthma oder Bronchiektasen zu entwickeln.

5 Zusammenfassung

Die chronische Entzündung der Atemwege bei COPD (engl. *chronic obstructive pulmonary disease*) ist bislang unzureichend charakterisiert und therapierbar. Für eine umfassendere Entzündungscharakterisierung ist ein erweitertes Screening-Verfahren wichtig.

Induziertes Sputum ist gut geeignet um entzündliche Prozesse in den Atemwegen zu charakterisieren, da es nicht-invasiv gewonnen werden kann. Bei der Homogenisierung des Sputums wird standardmäßig Dithiothreitol (DTT) als Reduktionsmittel eingesetzt, dessen Einfluss auf Proteine und Nukleinsäuren bisher nur teilweise bekannt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden induzierte Sputumproben von 20 COPD-Patienten (Krankheitsstadien GOLD II und III) und 12 gesunden Kontrollpersonen mit der HOPE-Technik (*Hepes-glutamic acid buffer-mediated Organic solvent Protection Effect*) konserviert. Im Überstand wurde eine erweiterte Anzahl inflammatorischer Proteine mit einem Multiplex-Analyse-Verfahren (Human Inflammation MAP [xMAP®] Panel) bestimmt. Die gleichzeitig gewonnenen Zellproben wurden kombiniert für RNA-Expressionsanalysen (Transkriptom) und immunozytochemische Nachweise eingesetzt.

Zur Berücksichtigung eines möglichen DTT-Einflusses auf die Genexpression und die Proteindetektion wurden die Sputumproben parallel mit und ohne DTT homogenisiert. Dabei waren bei Homogenisierung mit DTT mehr Proteine im Sputumüberstand detektierbar. 18 Analyte konnten mit beiden Homogenisierungsverfahren nachgewiesen werden, wobei die Meßergebnisse gut miteinander korreliert waren. Bei je einem Drittel der Messungen führte die Behandlung mit DTT entweder zu einer signifikanten Erhöhung oder zu einer signifikanten Erniedrigung der Protein-Konzentration oder zu keinem statistisch nachweisbaren Unterschied. Auch in Bezug auf die Genexpression war der Einfluss von DTT signifikant meßbar, u.a. für Gene, die COPD-relevante Zytokine wie Interleukin-8 exprimieren.

Die Transkriptom-Analyse der RNA aus den HOPE-Sputumzellpräparaten zeigte für mehrere 1000 Gene signifikant unterschiedliche Genexpressionen bei den COPD-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die im Transkriptom zwischen beiden Gruppen

signifikant unterschiedlich regulierten Gene MARCO und SRGAP1 konnten in denselben Zellpräparaten auch immunozytochemisch nachgewiesen werden.

Die hier vorgestellte Konservierung des induzierten Sputums mit der HOPE-Technik und die erweiterte Analyse von Proteinen auf dem Human Inflammation MAP (xMAP®) Panel bieten neue Möglichkeiten wichtige Biomarker und therapeutische Targets bei inflammatorischen Atemwegserkrankungen zu identifizieren.

Der weitere Einsatz dieser Techniken auch in klinischen Studien ist dringend erforderlich, um z.B. die Bedeutung von Kandidatgenen wie MARCO und SRGAP1 genauer zu erforschen.

6 Literaturverzeichnis

Aaron SD, Vandemheen KL, Ramsay T, Zhang C, Avnur Z, Nikolcheva T, Quinn A. Multi analyte profiling and variability of inflammatory markers in blood and induced sputum in patients with stable COPD. *Respir Res*, 11: 41, 2010.

Agilent RNA 6000 Kit Guide.

<http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/Core%20Facilities/Data/R401-core/RNA6000Nanomanual.pdf>, Tag des Zugriffs: 27.05.2013.

Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analyse Protocol.

http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G4140-90041_One-Color_Tecan.pdf, Tag des Zugriffs: 27.05.2013.

Bafadhel M, McCormick M, Saha S, McKenna S, Shelley M, Hargadon B, Mistry V, Reid C, Parker D, Dodson P, Jenkins M, Lloyd A, Rugman P, Newbold P, Brightling C E. Profiling of sputum inflammatory mediators in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration*, 83 (1): 36-44, 2012.

Barnes PJ. Mechanisms in COPD: differences from asthma. *Chest*, 117 (2 Suppl): 10S-14S, 2000.

Barnes PJ and Hansel TT. Prospects for new drugs for chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 364 (9438): 985-996, 2004.

Barnes PJ. ABC of chronic obstructive pulmonary disease. Future treatments. *BMJ*, 333 (7561): 246-248, 2006.

Barnes PJ, Chowdhury B, Kharitonov S A, Magnussen H, Page C P, Postma D, Saetta M. Pulmonary biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 174 (1): 6-14, 2006.

- Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, 378 (9795): 1015-1026, 2011.
- Burnett D and Stockley RA. Serum and sputum alpha 2 macroglobulin in patients with chronic obstructive airways disease. *Thorax*, 36 (7): 512-516, 1981.
- Butte A. The use and analysis of microarray data. *Nat Rev Drug Discov*, 1 (12): 951-960, 2002.
- Cataldo D, Foidart JM, Lau L, Bartsch P, Djukanovic R, Louis R. Induced sputum: comparison between isotonic and hypertonic saline solution inhalation in patients with asthma. *Chest*, 120 (6): 1815-1821, 2001.
- Chowdhury F, Williams A, Johnson P. Validation and comparison of two multiplex technologies, Luminex and Mesoscale Discovery, for human cytokine profiling. *J Immunol Methods*, 340 (1): 55-64, 2009.
- Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl*, 34: 50s-59s, 2001.
- CLELAND WW. DITHIOTHREITOL, A NEW PROTECTIVE REAGENT FOR SH GROUPS. *Biochemistry*, 3: 480-482, 1964.
- Cockayne DA, Cheng DT, Waschki B, Sridhar S, Ravindran P, Hilton H, Kourteva GH, Bitter H, Pillai SG, Visvanathan S, Muller KC, Holz O, Magnussen H, Watz H, Fine JS. Systemic biomarkers of neutrophilic inflammation, tissue injury and repair in COPD patients with differing levels of disease severity. *PLoS One*, 7 (6): e38629, 2012.
- Cosio MG, Saetta M, Augusti A. Immunologic Aspects of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *New England Journal of Medicine*, 360: 2445-54, 2009.

Curtis JL, Freeman CM, Hogg JC. The immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: insights from recent research. *Proc Am Thorac Soc*, 4 (7): 512-521, 2007.

Doe C, Bafadhel M, Siddiqui S, Desai D, Mistry V, Rugman P, McCormick M, Woods J, May R, Sleeman MA, Anderson IK, Brightling CE. Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD. *Chest*, 138 (5): 1140-1147, 2010.

Djukanovic R, Sterk PJ, Fahy JV, Hargreave FE. Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J Suppl*, 37: 1s-2s, 2002.

Efthimiadis A, Pizzichini MM, Pizzichini E, Dolovich J, Hargreave FE. Induced sputum cell and fluid-phase indices of inflammation: comparison of treatment with dithiothreitol vs phosphate-buffered saline. *Eur Respir J*, 10 (6): 1336-1340, 1997.

Efthimiadis A, Spanevello A, Hamid, Kelly MM, Linden M, Louis R, Pizzichini MM, Pizzichini E, Ronchi C, Van Overvel F, Djukanovic R. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation. *Eur Respir J Suppl*, 37: 19s-23s, 2002.

Eickmeier O, Huebner M, Herrmann E, Zissler U, Rosewich M, Baer PC, Buhl R, Schmitt-Grohe S, Zielen S, Schubert R. Sputum biomarker profiles in cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and association between pulmonary function. *Cytokine*, 50 (2): 152-157, 2010.

Gibson PG, Saltos N, Fakes K. Acute anti-inflammatory effects of inhaled budesonide in asthma: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*, 163: 32-36, 2001.

Goldmann T, Wiedorn KH, Kuhl H, Olert J, Branscheid D, Pechkovsky D, Zissel G, Galle J, Müller-Quernheim J, Vollmer E. Assessment of transcriptional gene activity in situ by application of HOPE-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract*, 198: 91-95, 2002.

Goldmann T, Vollmer E, Gerdes J. What's cooking? Detection of important biomarkers in HOPE-fixed, paraffin-embedded tissues eliminates the need for antigen retrieval. *Am J Pathol*, 163: 2638-2640, 2003.

Goldmann T, Flohr AM, Murua Escobar H, Gerstmayer B, Janssen U, Bosio A, Loeschke S, Vollmer E, Bullerdiek J. The HOPE-technique permits Northern blot and microarray analyses in paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract*, 200: 511-515, 2004.

Goldmann T, Drömann D, Marzouki M, Schimmel U, Debel K, Branscheid D, Zeiser T, Rupp J, Gerdes J, Zabel P, Vollmer E. Tissue microarrays from HOPE-fixed specimens allow for enhanced high throughput molecular analyses in paraffin-embedded material. *Pathol Res Pract*, 201: 599-602, 2005.

Goldmann T, Burgemeister R, Sauer U, Loeschke S, Lang DS, Branscheid D, Zabel P, Vollmer E. Enhanced molecular analyses by combination of the HOPE-technique and laser microdissection. *Diagn Pathol*, 1: 2, 2006.

Goldmann T, Pedersen F, Seehase S, Marwitz S, Lang DS, Kirsten AM, Zabel P, Vollmer E, Magnussen H, Rabe KF, Watz H. The Effect of Dithiothreitol on the Transcriptome of Induced Sputum Cells. *Respiration*, 2013.

Golpon HA, Coldren CD, Zamora MR, Cosgrove GP, Moore MD, Tudor RM, Geraci MW, Voelkel NF. Emphysema lung tissue gene expression profiling. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 31 (6): 595-600, 2004.

Grootendorst DC, Gauw SA, Verhoosel RM, Sterk PJ, Hospers JJ, Bredenbroeker D, Bethke TD, Hiemstra PS, Rabe KF. Reduction in sputum neutrophil and eosinophil numbers by the PDE4 inhibitor roflumilast in patients with COPD. *Thorax*, 62 (12): 1081-1087, 2007.

Hector A, Jonas F, Kappler M, Feilcke M, Hartl D, Griesse M. Novel method to process cystic fibrosis sputum for determination of oxidative state. *Respiration*, 80 (5): 393-400, 2010.

Hoffmann R and Valencia A. A Gene Network for Navigating the Literature. *Nature Genetics*, 36: 664, 2004.

Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Pare PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Eng .J Med*, 350 (26): 2645-2653, 2004.

Holz O, Jorres RA, Koschyk S, Speckin P, Welker L, Magnussen H. Changes in sputum composition during sputum induction in healthy and asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy*, 28: 284-292, 1998.

Holz O, Kips J, Magnussen H. Update on sputum methodology. *Eur Respir J*, 16: 355-359, 2000.

Holz O, Khalilieh S, Ludwig-Sengpiel A, Watz H, Stryszak P, Soni P, Tsai M, Sadeh J, Magnussen H. SCH527123, a novel CXCR2 antagonist, inhibits ozone-induced neutrophilia in healthy subjects. *Eur Respir J*, 35 (3): 564-570, 2010.

James K, Milne I, Cunningham A, Elliott SF. The effect of alpha 2 macroglobulin in commercial cytokine assays. *J Immunol Methods*, 168 (1): 33-37, 1994.

Kelly MM, Keatings V, Leigh R, Peterson C, Shute J, Venge P, Djukanovic R. Analysis of fluid-phase mediators. *Eur Respir J Suppl*, 37: 24-39, 2002.

Kirsten A, Watz H, Kretschmar G, Pedersen F, Bock D, Meyer-Sabellek W, Magnussen H. Efficacy of the pan-selectin antagonist Bimosiamose on ozone-induced airway inflammation in healthy subjects--a double blind, randomized, placebo-controlled, cross-over clinical trial. *Pulm Pharmacol Ther*, 24 (5): 555-558, 2011.

Kirsten A, Watz H, Pedersen F, Holz O, Smith R, Bruin G, Koehne-Voss S, Magnussen H, Waltz DA. The anti-IL-17A antibody secukinumab does not attenuate ozone-induced airway neutrophilia in healthy volunteers. *Eur Respir J*, 41 (1): 239-241, 2013.

Lomas DA, Lipson DA, Miller BE, Willits L, Keene O, Barnacle H, Barnes NC, Tal-Singer R. An oral inhibitor of p38 MAP kinase reduces plasma fibrinogen in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Pharmacol*, 52 (3): 416-424, 2012.

Löfdahl JM, Cederlund K, Nathell Eklund A, Skold CM. Bronchoalveolar lavage in COPD: fluid recovery correlates with the degree of emphysema. *Eur Respir J*, 25 (2): 275-281, 2005.

Loppow D, Bottcher M, Gercken G, Magnussen H, Jorres RA. Flow cytometric analysis of the effect of dithiothreitol on leukocyte surface markers. *Eur Respir J*, 16 (2): 324-329, 2000.

Mandy FF, Nakamura T, Bergeron M, Sekiguchi K. Overview and application of suspension array technology. *Clin Lab Med*, 21 (4): 713-29, vii, 2001.

Marwitz S, Abdullah M, Vock C, Fine JS, Visvanathan S, Gaede KI, Hauber HP, Zabel P, Goldmann T. HOPE-BAL: improved molecular diagnostics by application of a novel technique for fixation and paraffin embedding. *J Histochem Cytochem*; 59: 601-614, 2011.

Nicholas B and Djukanovic R. Induced sputum: a window to lung pathology. *Biochem Soc Trans*, 37: 868-872, 2009.

Magnussen H, Holz O, Sterk PJ, Hargreave FE. Noninvasive methods to measure airway inflammation: future considerations. *Eur Respir J*, 16: 1175-1179, 2000.

Mathers CD and Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*, 3 (11): e442, 2006.

Murray CJ and Lopez AD (1997). Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet*, 349 (9064): 1498-1504, 1997.

Ning W, Li CJ, Kaminski N, Feghali-Bostwick CA, Alber SM, Di YP, Otterbein SL, Song R, Hayashi S, Zhou Z, Pinsky DJ, Watkins SC, Pilewski JM, Sciurba FC, Peters DG, Hogg JC, Choi AM. Comprehensive gene expression profiles reveal pathways related to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (41): 14895-14900, 2004.

Olert J, Wiedorn KH, Goldmann T, Kuhl H, Mehraein Y, Scherthan H, Niketeghad F, Vollmer E, Müller AM, Müller-Navia J. HOPE fixation: a novel fixing method and paraffin-embedding technique for human soft tissues. *Pathol Res Pract*, 197: 823-82, 2001.

Olert J. Protective solution and fixation method for the paraffin section technique. United states Patent application publication. Pub. No. US 2003/0064518 A1, 2003.

Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, Ind PW, Djukanovic R, Maestrelli P, Sterk PJ. Sputum induction. *Eur Respir J Suppl*, 37: 3s-8s, 2002.

Pavord ID, Sterk PJ, Hargreave FE, Kips JC, Inman MD, Louis R, Pizzichini MM, Bel EH, Pin I, Grootendorst DC, Parameswirdan K, Djukanovic R. Clinical applications of assessment of airway inflammation using induced sputum. *Eur Respir J Suppl*, 37: 40s-43s, 2002.

Pedersen F, Marwitz S, Seehase S, Kirsten AM, Zabel P, Vollmer E, Rabe KF, Magnusson H, Watz H, Goldmann T. HOPE-preservation of paraffin-embedded sputum samples- A new way of bioprofiling in COPD. *Respir Med*, 107: 587-595, 2013.

Peleman RA, Ryttilä PH, Kips JC, Joos GF, Pauwels RA. The cellular composition of induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 13 (4): 839-843, 1999.

Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, Dolovich J. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax*, 47 (1): 25-29, 1992.

Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, Gleich GJ, Dolovich J, Hargreave FE. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med*, 154: 308-317, 1996.

Prince P, Bertrand M, Boulay ME, Bernier MC, Boulet LP. Optimization of the conditions for preservation of induced sputum: influence of freezing on cellular analysis. *Chest*; 128: 980-985, 2005.

Popov T, Gottschalk R, Kolendowicz R, Dolovich J, Powers P, Hargreave FE. The evaluation of a cell dispersion method of sputum examination. *Clin Exp Allergy*, 24: 778-783 1994.

Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*, 176 (6): 532-555, 2007.

Rabe KF. Roflumilast for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Rev Respir Med*, 4 (5): 543-555, 2010.

Rabe KF. Update on roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Br J Pharmacol*, 163 (1): 53-67, 2011.

Riise GC, Ahlstedt S, Larsson S, Enander I, Jones I, Larsson P, Andersson B. Bronchial inflammation in chronic bronchitis assessed by measurement of cell products in bronchial lavage fluid. *Thorax*, 50: 360-365, 1995.

Rivera RM, Cosio MG, Ghezzi H, Salazar M, Perez-Padilla R. Comparison of lung morphology in COPD secondary to cigarette and biomass smoke. *Int J Tuberc Lung Dis*, 12 (8): 972-977, 2008.

Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, Barnes PJ. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 26 (5): 602-609, 2002.

Sagel SD, Wagner BD, Anthony MM, Emmett P, Zernanick ET. Sputum biomarkers of inflammation and lung function decline in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, as doi: 10.1164/rccm.201203-0507OC, 2012.

Singh D, Fox SM, Tal-Singer R, Plumb J, Bates S, Broad P, Riley JH, Celli B. Induced sputum genes associated with spirometric and radiological disease severity in COPD ex-smokers. *Thorax*, 66 (6): 489-495, 2011.

Singh D, Edwirds L, Tal-Singer R, Rennard S. Sputum neutrophils as a biomarker in COPD: findings from the ECLIPSE study. *Respir Res*, 11: 77, 2010.

Spira A, Beane J, Pinto-Plata V, Kadar A, Liu G, Shah V, Celli B, Brody JS. Gene expression profiling of human lung tissue from smokers with severe emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 31 (6): 601-610, 2004.

Stockley RA. Neutrophils and the pathogenesis of COPD. *Chest*, 121 (5 Suppl): 151-155, 2002.

St-Laurent J, Boulay ME, Prince P, Bissonnette E, Boulet LP. Comparison of cell fixation methods of induced sputum specimens: an immunocytochemical analysis. *J Immunol Methods*, 308: 36-42, 2006.

Taube C, Holz O, Mucke M, Jorres RA, Magnussen H. Airway response to inhaled hypertonic saline in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 164 (10 Pt 1): 1810-1815, 2001.

Thomas RA, Green RH, Brightling CE, Birring SS, Parker D, Wirddlaw AJ, Pavord ID. The influence of age on induced sputum differential cell counts in normal subjects. *Chest*, 126 (6): 1811-1814, 2004.

Toungoussova O, Migliori GB, Foschino Barbaro MP, Esposito LM, Dragonieri S, Carpagnano GE, Salerno FG, Neri M, Spanevello A. Changes in sputum composition during 15 min of sputum induction in healthy subjects and patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*, 101 (7): 1543-1548, 2007.

Uhlig U, Uhlig S, Branscheid D, Zabel P, Vollmer E, Goldmann T. HOPE technique enables Western blot analysis from paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract*, 200: 469-472, 2004.

Umland O, Ulmer AJ, Vollmer E, Goldmann T. HOPE fixation of cytospin preparations of human cells for in situ hybridization and immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem*, 51: 977-980, 2003.

Van Pottelberge GR, Mestdagh P, Bracke KR, Thas O, Durme YM, Joos GF, Vandesompele J, Brusselle GG. MicroRNA Expression in Induced Sputum of Smokers and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 183 (7): 898-906, 2011.

Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, Profita M, Chanez P, Bellia V, Mautino G, D'accardi P, Bousquet J, Bonsignore G. Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*, 158 (6): 1945-1950, 1998.

Wang F and He B. The effect of dithiothreitol on chemotactic factors in induced sputum of chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respiration*, 78 (2): 217-222, 2009.

Wang IM, Stepaniants S, Boie Y, Mortimer JR, Kennedy B, Elliott M, Hayashi S, Loy L, Coulter S, Cervino S, Harris J, Thornton M, Raubertas R, Roberts C, Hogg JC, Crackower M, O'Neill G, Pare PD. Gene expression profiling in patients with chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*, 177 (4): 402-411, 2008.

Wang H, Dwyer-Lindgren L, Lofgren KT, Rajaratnam JK, Marcus JR, Levin-Rector A, Levitz CE, Lopez AD, Murray CJ. Age-specific and sex-specific mortality in 187 countries, 1970-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380 (9859): 2071-2094, 2012.

Watz H, Bock D, Meyer M, Schierhorn K, Vollhardt K, Woischwill C, Pedersen F, Kirsten A, Beeh KM, Meyer-Sabellek W, Magnussen H, Beier J. Inhaled pan-selectin antagonist Bimosiamose attenuates airway inflammation in COPD. *Pulm Pharmacol Ther*, 26 (2): 265-270, 2013.

Welsh BT and Mapes J. An overview of assay quality systems at Rules-Based Medicine®. QA/QC White paper. <http://www.myriadrbm.com/scientific-literature/white-papers/>, Tag des Zugriffs: 18.03. 2013.

Woolhouse IS, Bayley D L, Stockley R A. Effect of sputum processing with dithiothreitol on the detection of inflammatory mediators in chronic bronchitis and bronchiectasis. *Thorax*, 57 (8): 667-671, 2002.

Wright AK, Rao S, Range S, Eder C, Hofer TP, Frankenberger M, Kobzik L, Brightling C, Grigg J, Ziegler-Heitbrock L. Pivotal Advance: Expansion of small sputum macrophages in CF: failure to express MARCO and mannose receptors. *J LeukocBiol*, 86 (3): 479-489, 2009.

Qiu W, Cho MH, Riley JH, Anderson WH, Singh D, Bakke P, Gulsvik A, Litonjua AA, Lomas DA, Crapo JD, Beaty TH, Celli BR, Rennard S, Tal-Singer R, Fox SM, Silverman EK, Hersh CP. Genetics of sputum gene expression in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*, 6 (9): e24395, 2011.

Yamamoto C, Yoneda T, Yoshikawa M, Fu A, Tokuyama T, Tsukaguchi K, Narita N. Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest*, 112 (2): 505-510, 1997.

Ye BQ, Geng ZH, Ma L, Geng JG. Slit2 regulates attractive eosinophil and repulsive neutrophil chemotaxis through differential srGAP1 expression during lung inflammation. *J Immunol*, 185 (10): 6294-6305, 2010.

7 Anhang

7.1 Linearitäts-Test im Human Inflammation xMAP® Panel

Tabelle 23. Validierung des Human Inflammation xMAP® Panels für COPD Sputumüberstände mit und ohne DTT Aufarbeitung: Linearitäts-Test, angegeben sind Verdünnungsbereichen in denen eine Linearität der Analytkonzentrationen besteht.

23A. Analyte, die in beiden Homogenisierungsverfahren im Linearitäts-Test validiert werden konnten.

Analyte	mit DTT	ohne DTT
Interleukin-6	1:2 bis 1:16	1:2 bis 1:16
Interleukin-8	1:16 bis 1:64	1:4 bis 1:32
MIP-1 β	1:4 bis 1:32	1:4 bis 1:32
MCP-1	1:4 bis 1:32	1:4 bis 1:32
ICAM-1	1:2 bis 1:16	1:2 bis 1:16
VEGF	1:2 bis 1:16	1:4 bis 1:32
α -2 Macroglobulin	1:2 bis 1:16	1:4 bis 1:32
β -2 Microglobulin	1:32 bis 1:256	1:32 bis 1:256
Ferritin	1:32 bis 1:256	1:32 bis 1:256
TIMP-1	1:32 bis 1:256	1:4 bis 1:32
TNF-RII	1:4 bis 1:32	1:4 bis 1:32
VCAM-1	1:4 bis 1:32	1:4 bis 1:32
α 1-Antitrypsin	1:250 bis 1:2000	1:32 bis 1:256
Complement C3	1:250 bis 1:2000	1:32 bis 1:256
CRP	1:2 bis 1:16	1:4 bis 1:32
Fibrinogen	1:2 bis 1:16	1:4 bis 1:32
Haptoglobin	1:8 bis 1:64	1:8 bis 1:64
VDBP	1:8 bis 1:64	1:4 bis 1:32

23B. Analyte, die nur mit DTT im Linearitäts-Test validiert werden konnten.

Analyte	mit DTT	ohne DTT
IL-1 α	1:2 bis 1:16	<LLOQ
IL-1 β	1:2 bis 1:16	<LLOQ
IL-10	1:2 bis 1:8	<LLOQ
IL-18	1:2 bis 1:16	<LLOQ
MMP-2	1:2 bis 1:8	<LLOQ
MMP-9	1:2 bis 1:16	<LLOQ
TNF- α	1:1 bis 1:4	<LLOQ
TNF- β	1:2 bis 1:4	<LLOQ
Eotaxin	1:2 bis 1:16	<LLOQ
Factor 7	1:2 bis 1:4	<LLOQ
BDNF	1:2 bis 1:4	<LLOQ
IL-1RA	1:2 bis 1:16	<LLOQ
RANTES	1:2 bis 1:4	<LLOQ

Abkürzungen: LLOQ lower limit of quantification. Für MMP-3 sind keine Daten für den Linearitäts-Test vorhanden. Ergebnisse des Linearitäts-Tests für Probenverdünnungen mit einer mittleren Streuung zwischen 70-130%.

7.2 Spike-Wiederfindungs-Test im Human Inflammation xMAP® Panel

Tabelle 24. Validierung des Human Inflammation xMAP® Panels für COPD Sputumüberstände mit und ohne DTT Aufarbeitung: Spike-Wiederfindungs-Test. Mittelwerte aus je drei Proben mit vier Spikes mit und ohne DTT-Behandlung.

Analyte	Wiederfindungsrate [%] mit DTT	Wiederfindungsrate [%] ohne DTT
GM-CSF	107	96
IFN- γ	83	85
IL-2	119	98
IL-3	123	128
IL-4	112	113
IL-5	107	100
IL-7	106	101
IL-18	121	104
IL-6	129*	117
IL-8	111*	130*
MCP-1	123	102
MMP-2	97	87
MMP3	83	100
TNF-alpha	122	102
IL-10	110	106
MIP-1beta	117	96
Eotaxin	87	85
Factor 7	125*	98
BDNF	73	74
ICAM-1	118	102
IL-1alpha	106	93
IL-1beta	105	83
IL-1RA	122*	113
IL-12p70	98	92
IL-15	96	75
IL-23	<70	109
α -2 Macroglobulin	89	103
β -2 Microglobulin	102	84*
Ferritin	95*	73*
RANTES	98	88
TIMP-1	108	89
TNF-RII	109	94
VCAM-1	100	92
AAT	88*	87
Complement C3	79*	88

Fortsetzung von Tabelle 24

Analyte	Wiederfindungsrate [%] mit DTT	Wiederfindungsrate [%] ohne DTT
CRP	95	97
Fibrinogen	102	95
Haptoglobin	97	94
VDBP	103	88
vWF	98	88
IL-17	107	104
MMP9	110	118
VEGF	107*	91
IL-12p40	77*	82

Zeichenerklärungen: * Spike-Wiederfindung nur für eine Probe im akzeptierten Bereich von 70 – 130%; nicht untersucht.

7.3 Listen der verwendeten Geräte und Reagenzien

Sputuminduktion

Bezeichnung	Hersteller
Ultraschallvernebler	NE-U12, Omron, Tokyo, Japan/MMD
Masterscope-Spirometer	Viasys Healthcare GmbH, Hoechberg, D
NaCl-Lösung p.a. (0,9%, 3%, 4%, 5%ige)	Antares-Apotheke, Großhansdorf, D
Salbutamol DA 100 µg	Sandoz Pharmaceuticals GmbH, Rotkreuz, Schweiz
Mikroskop (Leica DM LS)	Leica, Wetzlar, D
Petrischalen (steril)	Carl Roth, Karlsruhe, D

Sputumaufarbeitung

Bezeichnung	Hersteller
6,5 mM Dithiothreitol (DTT)	Calbiochem, Bad Soden, D Ansatz Gebrauchslösung 1: 10 mit Aqua dest. (Haltbarkeit: 24 Std.)
1 x PBS, Ambion ®	Live Technologies GmbH, Frankfurt, D
Aqua dest., RNase-frei, Ambion ®	Live Technologies GmbH, Frankfurt, D
0,4% Trypanblau-Lösung	Sigma, Irvine, UK
RNase-ZAP, Ambion ®	Live Technologies GmbH, Frankfurt, D
Rollenmischer 348 RM5 Assistent	Karl Hecht KG, Sondheim, D
Nylonfilter 50 µm Porengröße	Fritz Eckhart GmbH, Waldkirch, D
Sterile Impfschlingen	Sarstedt, Nümbrecht, D
15 ml Polypropylen-Spitzbodenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Neubauer-Zählkammer mit Deckglas	Fisher Scientific, Schwerte, D
Manueller Zell-Zähler	VWR International, Hannover, D
Multipetten mit Spitzen	Eppendorf, Hamburg, D
Elektronische Waage BL150S	Sartorius AG, Göttingen, D
Kryoröhrchen, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D

Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Objektträger	Henry Schein ®, Hamburg, D
Filterkarten für Shandon Zytofuge	Mediate, online-shop
Zytotrichter für Shandon Zytofuge	Shandon, Frankfurt, D
Zytospin 3 Zytofuge	Shandon Life Sciences Int. Ltd. Europe, Astmoor, U.K.
Mikroskop DMLS	Leica, Wetzlar, D
Kühlzentrifuge Labofuge 400R	Heraeus Instruments, Hanau, D
Immersionöl	Merck, Darmstadt, D
70% Ethanol	Dr. Hetterich GmbH, Köln, D
Counter AC-8	Karl Hecht KG, Sondheim, D
18 G-Kanülen	Terumo, Eschborn, D
2 ml Spritzen	B. Braun, Melsungen, D
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, D
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, D
Methanol p.a.	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Giemsa Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung	Merck, Darmstadt, D

Herstellung der Färbelösung (pH-Wert 6,5 – 6,8):

Pufferlösung: 16 ml 0.5 M NaH₂PO₄ (= 69 g/l) = 1.104 g in 16 ml

32 ml 0.5 M K₂HPO₄ (=87 g/l) = 2.784 g in 32 ml

+ 952 ml Aqua dest.

Ansatz der Färbelösung: 10 ml Giemsa-Stammlösung + 170 ml Pufferlösung

Herstellung von HOPE-Sputumpräparaten

Bezeichnung	Hersteller
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Minispin Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge Laborfuge 400R	Heraeus Instruments, Hanau, D
Brutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen, D
Paraffin-Bad	Medax GmbH & Co.KG, Neumünster, D
HOPE-Protektionslösung	DCS Innovative Systems, Hamburg, D
Azeton	MERCK, Darmstadt, D
Low-melting Paraffin	Polarit, DCS, Hamburg, D
Mikrotom SM2000R	Leica, Wetzlar, D
Wärmeplatte OTS30 + OTS40	Medite GmbH, Burgdorf, D
Wasserbad HIR-3	Axel Johnson Lab System Inc., Solna, S

RNA-Extraktion

Bezeichnung	Hersteller
Rotator für Reaktionsgefäße 1,5 ml	nicht mehr erhältlich, ähnliches Modell wie Rotator neolab®
Mikro 120 Zentrifuge	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, D
EBA 12 Zentrifuge	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, D
Vakuumzentrifuge Speed Vac SC110	Savant, Farmingdale NY, USA
Homogenisator mit Pistillen	Kontes, New Jersey, USA
Xylol	Merck, Darmstadt, D
RLT-Puffer	Qiagen, Hilden, D; Ansatz: 1 ml RLT + 10 µl 2-Mercaptoethanol)
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
DEPC-Wasser	Ansatz: 1 L Aqua dest. + 1 ml Diethylpyrocarbonate, über Nacht stehen lassen, am nächsten Tag autoklavieren
Diethylpyrogencarbonate	Sigma-Aldrich, Taufkirchn, D
RNAeasy Kit	Qiagen, Hilden, D

Qualitätsbestimmung der RNA

Bezeichnung

RNA 600 Nano chip Assay

Kit-Reagenzien

Chip-Primer Station

Heizblock

RNAseZAP Ambion ®

Aqua dest., RNAse-frei, Ambion ®

Agilent 2100 Bioanalyser

Hersteller

Agilent Technologies, Böblingen, D

Qiagen, Hilden, D

Agilent Technologies, Waldbronn, D

Thermo Hybaid GmbH, Garching, D

Live Technologies GmbH, Frankfurt, D

Live Technologies GmbH, Frankfurt, D

Agilent Technologies, Waldbronn, D

Immunozytochemische Nachweise

Bezeichnung	Hersteller
3% H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt, D Ansatz aus 30%iger H ₂ O ₂ -Lösung
T-TBS Spülpuffer pH 7,6	Carl Roth, Karlsruhe, D Ansatz: 50 mM Tris Puffer mit 0,1% Tween, pH-Wert auf 7,6 einstellen
Borsäure, pH 7,2	Carl Roth, Karlsruhe, D Ansatz: 1,24 g Borsäure in 100 ml Aqua dest., pH-Wert auf 7,2 einstellen
Antibody Diluent	Zytomed Systems, Berlin, D
HRP-Polymer Kit	Zytomed Systems, Berlin, D
Permanent AEC KIT	Zytomed Systems, Berlin, D; Ansatz: 1 ml Aqua dest.+ 22 µl Reagenz 1 (Pufferkonzentrat) + 15 µl Reagenz 2 + 15 µl Reagenz 3 (Chromogen) + 15 µl Reagenz 4 (H ₂ O ₂)
Mayers Hämatoxylin-Lösung	Sigma-Aldrich, Egham, UK
0,05 % NH ₃ -Wasser	Carl Roth, Karlsruhe, D Ansatz aus 30% Ammoniaklösung
Ethanol (absolut, 96%, 90%, 80%,70%)	Merck, Darmstadt, D
Pertex Eindeckmedium	Medite GmbH, Burgdorf, D
Photomikroskop DM 2000	Leica, Wetzlar, D
mit Digitalkamera (DFC295)	Leica, Wetzlar, D
Fixfoto Software	Joachim Koopmann Software, Wrestedt, D

Einzelanalyse (ELISA)

Bezeichnung	Hersteller
Proben-Thermostat Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg, D
Aqua ad injectabilia	B. Braun Melsungen AG, Berlin, D
Combitips plus	Eppendorf, Hamburg, D
Mehrkanalpipette Systems 4540	Thermolab Scientific, Vasai, India
Finntip Multistepper	Thermo Fisher scientific, Bremen, D
Plattenreader EL800 SN234415	BioTek, Bad Friedrichshall, D
Gen5-software	BioTek, Bad Friedrichshall, D

8 Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Herrn PD Dr. T. Goldmann für die freundliche Betreuung der Arbeit und bei Herrn Professor Dr. E. Vollmer für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der Klinischen und Experimentellen Pathologie, Borstel.

Für die freundliche Unterstützung am Institut für klinische und experimentelle Pathologie bei der Herstellung der HOPE-Sputumpräparate danke ich Jasmin Tiebach, Maria Lammers, Steffi Fox und allen technischen Mitarbeitern des Instituts.

Herrn Sebastian Marwitz gilt mein besonderer Dank für seine freundliche Unterstützung bei den Untersuchungen zur RNA-Qualität und die Einführung in die Mikrophotographie. Frau Dr. S. Seehase danke ich herzlich für die statistische Analyse der Ergebnisse der Sputumdifferenzierung.

Bei Herrn Professor Dr. H. Magnussen möchte ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im pneumologischen Forschungsinstitut an der LungenClinic Grosshansdorf und sein Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Bei Herrn PD Dr. H. Watz möchte ich mich für sein großes Interesse und seine besondere Hilfsbereitschaft, insbesondere auch für die Erstellung des Ethikantrages bedanken. Frau Dr. A. Kirsten danke ich für die medizinische Aufklärung und Betreuung der Studienteilnehmer und die freundliche Gesprächsbereitschaft. Frau Dr. Beke Feindt, Petra Timm und Kirsten Paasch gilt mein Dank für die Durchführung der Zweitauswertung der Sputumzellendifferenzierung und das angenehme Arbeitsklima.

Weiterhin möchte ich allen COPD-Patienten und den gesunden Studienteilnehmern danken, die zu einer Sputuminduktion bereit waren und damit diese Untersuchungen ermöglicht haben.

Bei der Firma Takeda, Konstanz möchte ich mich für die Finanzierung der Validierung des Multi Analyte Profile xMAP® Panel (RBM, Rules Based Medicine, Texas, USA) bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Dr. G. Quintini für seine organisatorische Unterstützung und Gesprächsbereitschaft bei der Datenauswertung.

Weiterhin danke ich herzlich Herrn Dr. Olaf Holz, der an der LungenClinic Grosshansdorf die Sputum-Forschung viele Jahre entwickelt, und so die Grundlage für meine Forschungstätigkeit gelegt hat.

Herrn Professor Dr. K. F. Rabe gilt mein besonderer Dank für seine wissenschaftliche Herausforderung und die Wachstumsmöglichkeiten, die er mir an der LungenClinic Grosshansdorf ermöglicht.

Ganz herzlich möchte ich auch allen Kollegen danken, die mir bei der Fertigstellung der Arbeit mit guten Ratschläge, Tipps und Ermutigungen zur Seite gestanden haben.

9 Lebenslauf



Name: Frauke Pedersen, geb. Werkmeister
Geburtstag und –ort: 30.08.1964 in Delmenhorst

Schulabschluß: 1983 Gymnasium Hermannsburg, Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung: 1983 – 1985 biologisch-technische Assistentin (BTA), Landesanstalt für Fischerei, Albaum
1986 – 1992 Studium der Biologie, Ruhr-Universität Bochum, Abschluß: Diplom-Biologin
1995 – 1996 Referentin für betrieblichen Umweltschutz, ZEWU Hamburg

Berufstätigkeit: 1985 – 1990 BTA, Institut für Physiologie, Ruhr-Universität Bochum
1993 – 1994 BTA, Institut für organischen Landbau, Universität Bonn
1998 – 2001 Umweltpädagogin bei Sterni-Park e. V., Hamburg

2002 - 2008 Studienkoordinatorin am Pneumologischen Forschungsinstitut an der LungenClinic Grosshansdorf (PRI), Großhansdorf (GHD)

Seit 01/2009 Diplom-Biologin, Laborleitung Sputumlabor PRI an der LungenClinic Grosshansdorf, GHD

Seit 06/2010 Doktorandin in der Klinischen und Experimentellen Pathologie am Forschungszentrum Borstel

Seit 04/2012 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Deutschen Zentrum für Lungenforschung (DZL), Airway Research Center North, Member of the German Center for Lung Research an der LungenClinic Grosshansdorf, GHD

10 Publikationen

Kirsten A, Watz H, Kretschmar G, Pedersen F, Bock D, Meyer-Sabellek W, and Magnussen H. Efficacy of the pan-selectin antagonist Bimosiamose on ozone-induced airway inflammation in healthy subjects - a double blind, randomized, placebo-controlled, cross-over clinical trial. *Pulm Pharmacol Ther* 24 (5): 555-558, 2011.

Kirsten A, Watz H, Pedersen F, Holz O, Smith R, Bruin G, Koehne-Voss S, Magnussen H, and Waltz DA. The anti-IL-17A antibody secukinumab does not attenuate ozone-induced airway neutrophilia in healthy volunteers. *Eur Respir J* 41 (1): 239-241, 2013.

Goldmann T, Pedersen F, Seehase S, Marwitz S, Lang DS, Kirsten AM, Zabel P, Vollmer E, Magnussen H, Rabe KF, and Watz H. The Effect of Dithiothreitol on the Transcriptome of Induced Sputum Cells. *Respiration*, 107: 587-595, 2013.

Pedersen F, Marwitz S, Seehase S, Kirsten AM, Zabel P, Vollmer E, Rabe KF, Magnussen H, Watz H, Goldmann T. HOPE-preservation of paraffin-embedded sputum samples- A new way of bioprofiling in COPD. *Respir Med*, 107: 587-595, 2013.

Watz H, Bock D, Meyer M, Schierhorn K, Vollhardt K, Woischwill C, Pedersen F, Kirsten A, Beeh KM, Meyer-Sabellek W, Magnussen H, and Beier J. Inhaled pan-selectin antagonist Bimosiamose attenuates airway inflammation in COPD. *Pulm Pharmacol Ther* 26 (2): 265-270, 2013.