

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

Chitinasen und Chitinase-ähnliche Proteine bei der CF-Lungenerkrankung



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

vorgelegt von

Ines Mack

aus

München

2013

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. D. Hartl

Mitberichterstatter:

Priv. Doz. Dr. med. C. Neurohr

Prof. Dr. med. O. Eickelberg

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dr. med. A. Hector

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung:

10. Oktober 2013

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	6
1.1 Chitinasen und Chitinase-ähnliche Proteine	6
1.1.1 YKL-40/BRP-39.....	7
1.1.2 Chitinasen	9
1.1.3 Cystische Fibrose.....	10
1.1.4 Morbus Gaucher	11
1.1.5 Asthma bronchiale	13
1.2 Das angeborene Immunsystem der Lunge.....	14
1.2.1 Neutrophile Granulozyten	15
1.2.2 Monozyten/Makrophagen.....	17
2 Fragestellung.....	19
3 Material und Methoden	20
3.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay.....	20
3.1.1 ELISA für humanes CHI3L1 (YKL-40)	21
3.1.2 ELISA für murines CHI3L1 (BRP-39)	23
3.2 Enzymaktivitätsassays	25
3.2.1 Enzymaktivitätsassay für Chitinasen.....	25
3.3 Zellkultur	28
3.3.1 Isolierung neutrophiler Granulozyten und mononukleärer Zellen	28

3.3.2	Stimulation neutrophiler Granulozyten und mononukleärer Zellen.....	29
3.4	Patienten und gesunde Kontrollgruppe.....	31
3.4.1	Cystische Fibrose.....	31
3.4.2	M. Gaucher	32
3.4.3	Asthma bronchiale.....	32
3.4.4	Kontrollen.....	32
3.5	Murine Proben	33
3.6	Statistische Auswertung	34
4	Ergebnisse	35
4.1	Chitinase-ähnliche Proteine.....	35
4.1.1	YKL-40.....	35
4.1.2	BRP-39	39
4.2	Chitinasen	41
4.2.1	Chitotriosidase.....	41
4.2.2	Saure Säuger-Chitinase (Acidic Mammalian Chitinase).....	44
4.3	in vitro	47
4.3.1	PMN (Polymorphnukleäre Neutrophile Granulozyten)	47
4.3.2	PBMC (Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)	48
5	Diskussion.....	50
5.1	Chitinase-ähnliche Proteine.....	50
5.1.1	YKL-40/BRP-39.....	51
5.2	Chitinasen	54
5.2.1	Chitotriosidase.....	54
5.2.2	Saure Säuger-Chitinase (Acidic Mammalian Chitinase).....	61

5.3	in vitro	65
6	Zusammenfassung	67
7	Anhang.....	70
7.1	Literaturverzeichnis	70
7.2	Tabellenverzeichnis	81
7.3	Abbildungsverzeichnis	82
7.4	Danksagung	84
7.5	Publikationen.....	85

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	acid ceramidase
AMCase	acidic mammalian chitinase
ASM	acid sphingomyelinase
BAL(F)	Bronchoalveoläre Lavage (Flüssigkeit)
° C	Grad Celsius
CCL18	chemokine ligand 18
CF	Cystische Fibrose
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CLPs	chitinase-like proteins
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ENA-78	epithelial-derived neutrophil-activating peptide-78
FEV ₁	Forciertes expiratorisches Einsekundenvolumen
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
IL-	Interleukin-
(k)Da	(Kilo-) Dalton
kbp	Kilo-Basenpaare
M	Mol
MCP-1/2	monocyte chemotactic protein-1/2
MIP-1 β	macrophage inflammatory protein-1 beta
MMS	Monozyten-Makrophagen-System

mRNA	messenger ribonucleic acid
N	Normalität
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PARC	pulmonary and activation-regulated chemokine
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PMN	Polymorphnukleäre Neutrophile Granulozyten
RAST	Radio-Allergo-Sorbens-Test
ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
Th	T helper (cell)
TLR	toll-like receptor
U	Unit

1 Einleitung

1.1 Chitinasen und Chitinase-ähnliche Proteine

Das Polysaccharid Chitin ist nach Zellulose das am zweithäufigsten vorkommende Polymer der Natur. Pro Jahr werden in der Biosphäre bis zu 10 Gigatonnen Chitin synthetisiert und abgebaut. Aufgebaut aus N-Acetyl-D-Glucosamin-Einheiten (GlcNAc), die durch β -1,4-glykosidische Bindungen verknüpft sind, besitzt Chitin die nötige Stabilität, um als Hauptbestandteil der Zellwand von Insekten, Krustentieren, Pilzen und Parasiten zu dienen¹⁻³. Der Chitinpanzer bietet den Organismen Schutz vor den rauen Bedingungen in ihrer Lebensumwelt und schirmt sie gegen Angriffe innerhalb eines Wirtsorganismus ab⁴. Der Aufbau von Chitin erfolgt unter der katalytischen Wirkung des Enzyms Chitin-Synthase, der Abbau zu GlcNAc-Einheiten geschieht mit Hilfe sog. chitinolytischer Hydrolasen, von denen mehrere Enzyme mit unterschiedlicher Spezifität existieren⁵. Die meisten Organismen besitzen β -Hexosaminidasen, welche die terminale GlcNAc-Einheit am nicht-reduzierenden Ende des Chitin-Polymers abbauen können. Einige Eukaryoten besitzen das Enzym Chitobiase, das imstande ist, Chitobiose-Bausteine vom reduzierenden Ende des Chitins abzuspalten. Schließlich existieren Chitinasen, die grob in Endo- und Exo-Chitinasen unterteilt werden⁶. Per definitionem spalten Endo-Chitinasen glykosidische Bindungen innerhalb der Chitin-Kette, wohingegen Exo-Chitinasen am nicht-reduzierenden Ende des Chitin-Polymers angreifen und schrittweise Chitobiose- oder GlcNAc-Einheiten abspalten⁶⁻⁸. Das Zusammenspiel von Endo- und Exo-Chitinasen ermöglicht Organismen, Chitin zu degradieren⁹. In niederen Lebensformen stellen Chitinasen damit effiziente anti-parasitäre Abwehrwaffen dar, die Chitin-tragende Pathogene abtöten¹⁰. Chitinase-ähnliche Proteine (chitinase-like proteins, CLPs) hingegen können Chitin nicht abbauen. Sie binden das Polymer und wandeln so dessen Effekte auf das Immunsystem des Wirtsorganismus ab¹¹.

Kürzlich wurde beim Menschen das Vorkommen zweier Chitinasen, der „Chitotriosidase“ und der „sauren Säuger-Chitinase“ (Acidic Mammalian Chitinase, AMCCase), sowie des Chitinase-ähnlichen Proteins „YKL-40“ beschrieben^{4,12}. Da jedoch weder Chitin noch Chitin-Synthase im Organismus der Säugetiere existieren, betrachtete man Chitinasen und Chitinase-ähnliche Proteine beim Menschen zunächst als bedeutungslose, evolutionäre

Relikte. Aktuelle Untersuchungen weisen allerdings darauf hin, dass diese Proteine eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Unterhaltung von Erkrankungen des Menschen spielen.

1.1.1 YKL-40/BRP-39

YKL-40 gilt als Prototyp der Chitinase-ähnlichen Proteine (CLPs). Das zugehörige Gen CHI3L1 (chitinase 3-like 1) befindet sich auf Chromosom 1 (1q31-q32). Benannt wurde YKL-40 nach dem Ein-Buchstaben-Code seiner drei N-terminalen Aminosäuren Tyrosin (Y), Lysin (K) und Leucin (L) und seinem Molekulargewicht (40 kDa)¹¹. Es existieren allerdings viele weitere Namen, unter denen das Protein in der Literatur bekannt ist, u.a. „Human Cartilage glycoprotein-39 (HC gp-39)“¹³, „Chitinase-3-like-1 (CHI3L1)“¹⁴ und „Chondrex“¹⁵. Das entsprechende Protein der Maus, „breast regression protein-39 (BRP-39)“, wird einige Tage nach der Entwöhnung der Jungmäuse in den Epithelzellen der mütterlichen Brust gebildet und führt dort zur Rückbildung des Gewebes (daher der Name „breast regression protein“) ^{3,11,16,17}. Das Protein gilt als Mediator in Th₂-dominierten Entzündungsreaktionen, reguliert die zelluläre Apoptose und die Differenzierung von Makrophagen im murinen Organismus¹⁶. Im Unterschied zu Chitinasen sind CLPs aufgrund einer Punktmutation in ihrem katalytischen Zentrum nicht imstande, Chitin abzubauen^{18,19}. Einige von ihnen, so auch YKL-40, können allerdings Chitin binden und so dessen Effekte auf das angeborene Immunsystem des Menschen modulieren¹¹. Ferner kann YKL-40 Heparin, Hyaluron, Typ I Kollagen und Lektin binden¹². Das Protein wird von einer Vielzahl von Zellen produziert, unter anderem von neutrophilen Granulozyten²⁰, (Alveolar-) Makrophagen^{12,14,21-23}, glatten Gefäßmuskelzellen^{24,25}, Chondrozyten^{13,26}, Synovialzellen^{13,27} und einigen Tumorzellen (Tabelle 1). Im Rahmen von akut- und/oder chronisch-entzündlichen Erkrankungen stellen neutrophile Granulozyten und Makrophagen die Haupt-Produzenten des Proteins dar^{12,17}. Aufgrund seines Speicherortes in den spezifischen Granula der neutrophilen Granulozyten, gilt YKL-40 als „Marker-Protein“ dieses Zelltyps. Es wird angenommen, dass YKL-40 als Teil der angeborenen Immunabwehr antimikrobielle Wirkung besitzt, eine wichtige Rolle im Rahmen von Angiogenese und Gewebeumbau spielt, als Wachstumsfaktor für Fibroblasten wirkt und die Anti-Apoptose beeinflusst^{11,17,20,28}. Die genaue biologische Funktion von YKL-40 bleibt jedoch bislang unklar. Hohe Konzentrationen von YKL-40

finden sich typischerweise im Serum von Patienten, deren Erkrankungen durch Entzündung und/oder übermäßigen Gewebeumbau gekennzeichnet sind^{12,17}. Einen Überblick gibt Tabelle 1:

Charakter der Erkrankung	Erkrankung
Infektion ^{12,17,29,30}	<i>S. pneumoniae</i> -Pneumonie <i>S. pneumoniae</i> -Bakteriämie Purulente Meningitis/Enzephalitis
Gelenkerkrankungen ^{12,17,31}	Rheumatoide Arthritis Osteoarthritis Ankylosierende Spondylarthritis
Lungenerkrankungen ^{32,33}	Asthma COPD
Chronische Entzündung und Granulomatöse Erkrankungen ^{12,34-39}	M. Crohn/Colitis ulcerosa Sarkoidose Riesenzellerarthritis Systemische Sklerose
Krebserkrankungen (fortgeschritten) ^{12,17,40-43}	Malignes Melanom Glioblastom Kleinzelliges Bronchialkarzinom Mammakarzinom Kolorektales Karzinom Papilläres Schilddrüsenkarzinom Ovarialkarzinom Prostata-Karzinom u.a.
Gefäßerkrankungen ^{40,44}	Artherosklerose

Tabelle 1: Erkrankungen mit erhöhten YKL-40-Serumkonzentrationen (nach¹²)

Bisherige Studien konnten zeigen, dass sich YKL-40 als Biomarker bei verschiedenen akut- und/oder chronisch-entzündlichen Erkrankungen eignet¹⁷. Die Expression von YKL-40 bei der chronisch-entzündlichen Lungenerkrankung Cystische Fibrose (CF) wurde bislang nicht untersucht. Die chronische Inflammationsreaktion in der Lunge von CF-Patienten wird überwiegend durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen

unterhalten. Die Analyse von YKL-40 bei CF-Patienten ist somit von hoher Relevanz und war ein Gegenstand dieser Arbeit.

1.1.2 Chitinasen

Chitinasen sind Chitin-spaltende Enzyme, die in Superfamilien von 18- und 19-Glykosyl-Hydrolasen (GH) eingeteilt werden, basierend auf Ähnlichkeiten in ihren Aminosäure-Sequenzen¹². Chitinasen, die beim Menschen gefunden wurden, gehören alle der GH-18-Familie an und haben ihre Genloci überwiegend auf Chromosom 1 lokalisiert, darunter Chitotriosidase (1q32.1) und saure Säuger-Chitinase (AMCase, 1p13.2)^{3,12}. Auch in der Maus kommen entsprechende Formen der beiden Chitinasen vor³. Die wichtigsten Zelltypen, die Chitinasen beim Menschen produzieren sind neutrophile Granulozyten, (Alveolar-) Makrophagen und verschiedene Epithelzellen^{12,19,40,45}. Nur wenige Mitglieder der humanen GH-18-Familie sind imstande, das Polymer Chitin unter Wasserabspaltung zu degradieren, darunter Chitotriosidase und saure Säuger-Chitinase. Die restlichen Mitglieder der GH-18-Familie werden als Chitinase-ähnliche Proteine zusammengefasst. Sie verbindet die Fähigkeit, Chitin zwar binden, aber nicht abbauen zu können¹².

Aktuelle Untersuchungen weisen darauf hin, dass sowohl die humane Chitotriosidase als auch die humane saure Säuger-Chitinase eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Unterhaltung von Erkrankungen des Menschen spielen. Chitotriosidase konnte mit besonders hoher Enzymaktivität bei Patienten mit lysosomalen Speicherkrankheiten nachgewiesen werden⁴⁶. In diesem Zusammenhang findet Chitotriosidase heute als diagnostischer und therapeutischer Verlaufsparemeter bei Patienten mit der lysosomalen Speicherkrankheit M. Gaucher klinisch Anwendung^{47,48}. Die saure Säuger-Chitinase wird vor allem mit der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale in Verbindung gebracht und im Rahmen dieser Erkrankung bereits als therapeutische Zielstruktur diskutiert^{2,45}.

Die Expression der Chitinasen im Krankheitsbild der Cystischen Fibrose ist bislang unbekannt. CF-Patienten leiden unter einer chronischen pulmonalen Entzündung, die überwiegend von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen unterhalten wird. Da diese beiden Zelltypen als wichtige Produzenten von Chitinasen im Menschen gelten, wurden in der vorliegenden Studie die Enzymaktivität von Chitotriosidase und saurer Säuger-Chitinase bei der CF-Lungenerkrankung untersucht. Als Analyse-Vergleichsgruppen dienten Proben von M. Gaucher- und Asthma-Patienten.

1.1.3 Cystische Fibrose

Cystische Fibrose (CF) oder Mukoviszidose ist die bei Kaukasiern häufigste autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung⁴⁹. Es kommt ca. ein betroffenes Kind pro 2.500 Geburten in Europa zur Welt, die Frequenz für heterozygote Genträger beträgt 1:20 bis 1:30^{49,50}. Die Krankheit beruht auf der Mutation des 230 kbp großen *CFTR*-Gens auf Chromosom 7 (7q31.2), welches für den „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)“ kodiert^{49,51}. CFTR ist ein signalgesteuerter Chloridkanal, der neben seiner Hauptfunktion, dem Transport von Chlorid-Ionen, auch Glutathion und Bikarbonat transportieren kann^{52,53}. Die CF-auslösenden Mutationen am CFTR-Kanal lassen sich in sechs Klassen einteilen. Bei der in Mittel- und Nordeuropa häufigsten Mutation $\Delta F508$ (70-75%) fehlt im zugehörigen Gen an Position 508 die Kodierung für Phenylalanin⁴⁹. Es kommt zur fehlerhaften Reifung und einem gestörten intrazellulären Transport des CFTR-Proteins, worauf die Zellen mit einer unspezifischen Stressantwort reagieren, bei der vermehrt pro-inflammatorische Signale freigesetzt werden⁴⁹. Aufgrund der weiträumigen Verteilung des CFTR-Kanals in den Körpergeweben sind die (sekretorischen) Epithelzellen verschiedenster Organsysteme betroffen. Es resultieren u.a. eine gestörte Flüssigkeitsabsorption im Bereich der Atemwege und im Dickdarm, fehlerhafte Elektrolytaborption im Bereich der Schweißdrüsen und eine mangelhafte Volumensekretion in Pankreas und Dünndarm^{52,53}. Hauptverantwortlich für die Morbidität und Mortalität der Mukoviszidose sind die pathologischen Vorgänge in der Lunge: über 90% der Patienten versterben an den Komplikationen der Lungenerkrankung⁵⁴⁻⁵⁶. Gestörte Ionentransportvorgänge sorgen für eine erhöhte Viskosität des Bronchialsekrets und das Fehlen periziliärer Flüssigkeit fördert die Schleimadhäsion auf der zellulären Atemwegsoberfläche⁵³. Es kommt zum Zusammenbruch der normalen Sekret-Clearance und infolge dessen zu den für CF typischen (chronischen) Atemwegsinfekten. Besonders häufig sind Infektionen durch *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* zu beobachten^{57,58}.

Eine Ansammlung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen ist, als Zeichen einer chronischen Inflammationsreaktion, charakteristisch für die Lungenerkrankung von CF-Patienten⁵⁹. Die beiden Zelltypen gelten als wichtige Produzenten von Chitinasen und Chitinase-ähnlichen Proteinen im Menschen. Ein Gegenstand der vorliegenden Studie war deshalb, die Expression der Chitinasen und Chitinase-ähnlichen Proteine bei der chronisch-entzündlichen Lungenerkrankung Cystische Fibrose zu untersuchen.

1.1.4 Morbus Gaucher

Der Morbus Gaucher zählt zu den lysosomalen Speicherkrankheiten, denen eine Fehlfunktion im Lysosom zugrunde liegt⁵². Lysosomen sind heterogene Zellorganellen in nahezu allen eukaryotischen Zellen, deren Hauptaufgabe der Abbau von körpereigenen und körperfremden Substanzen mittels verschiedener Enzyme (sog. saurer Hydrolasen) ist⁴⁸. Ist die Aktivität eines dieser Enzyme herabgesetzt, können bestimmte Makromoleküle nicht mehr oder nur noch vermindert abgebaut werden und reichern sich in der Zelle an. Oberhalb einer bestimmten Konzentration gelangen diese unkontrolliert über die Plasmamembran in die extrazelluläre Matrix und lagern sich im gesamten Organismus ab⁵². Der M. Gaucher beruht auf einem Defekt des lysosomalen Enzyms Glukozerebrosidase, welcher autosomal-rezessiv vererbt wird (*GBA*-Gen)⁵². Die Enzymaktivität ist typischerweise in allen Zellen des Körpers vermindert, dennoch beschränkt sich die Anhäufung von nicht abgebautem Glukosylceramid (Glukozerebrosid) auf Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems (MMS). So entstehen die lipidspeichernden „Gaucher-Zellen“ und es bilden sich die typischen Symptome der Gaucher-Erkrankung heraus⁶⁰. Eine Übersicht dazu liefert Tabelle 2:

Zellen	Organ	Symptom
Kupffer-Stern-Zellen	Leber	Hepatomegalie
Rote Pulpa	Milz	Splenomegalie, Anämie
Osteoklasten	Knochen	Krisenartige Knochenschmerzen, Osteolysen, Osteonekrosen, Störungen der Hämatopoese
Alveolar-Makrophagen	Lunge	Rezidivierende Atemwegsinfekte, Restriktion/Obstruktion
Gliazellen	Gehirn	Gliose

Tabelle 2: Anhäufung von Glukosylceramid in Zelltypen des MMS mit nachfolgender Symptomatik (nach⁴⁸)

Die Gaucher-Krankheit lässt sich, anhand der jeweiligen neuro-pathologischen Veränderungen, in drei Typen mit unterschiedlichem Krankheitsbeginn, unterschiedlicher Symptomatik und Lebenserwartung einteilen (Tabelle 3):

	Nicht- Neuronopathisch*	Neuronopathisch	
		akut**	chronisch***
Inzidenz	1:40.000-1:60.000	<1:100.000	1:50.000-1:100.000
Ethnische Gruppe	panethnisch	panethnisch	panethnisch
Alter bei Ausbruch der Krankheit	jedes Alter	Säuglingsalter	Kindheit
ZNS-Symptomatik	---	+++	+ bis +++
Hepatosplenomegalie	+ bis +++	++	+ bis +++
Hämatologische Symptomatik	+ bis +++	+++	+ bis +++
Ossäre Symptomatik	- bis +++	---	++ bis +++
Lebenserwartung	adult	~ 2 Jahre	2 Jahre bis adult

Tabelle 3: Klinische Einteilung der Verlaufsformen des M. Gaucher.

***ehemals Typ 1, **ehemals Typ 2, ***ehemals Typ 3 (nach^{47,52})**

Die Messung der Chitotriosidase-Enzymaktivität im Serum der Patienten hat sich als geeigneter Parameter zur Diagnose-Sicherung und Therapie-Überwachung erwiesen. Chitotriosidase wird von den Gaucher-Zellen produziert und findet sich im Blut der Patienten um das 100- bis 1000-fache erhöht. Nach seiner Entdeckung 1994 (Hollak et al.)⁴⁶ ist das Enzym heute im Therapie-Monitoring des M. Gaucher etabliert. Unter erfolgreicher Therapie fällt die Enzymaktivität von Chitotriosidase im Blut der Patienten ab. Normwerte werden jedoch auch nach langjähriger Therapie nicht immer erreicht. Ein Wiederanstiegen der Enzymaktivität von Chitotriosidase im Serum der Patienten geht häufig der klinischen Verschlechterung voraus⁴⁷. Bei ca. 5% der Bevölkerung (panethnisch) ist Chitotriosidase aufgrund einer 24-Basenpaar-Insertion im zugehörigen Gen nicht nachweisbar^{6,19,61}. Als Krankheits- und Verlaufspareter kann dann PARC/CCL18 dienen^{6,62}. Weder Chitotriosidase noch das Chemokin PARC/CCL18 reflektieren ein bestimmtes klinisches Symptom der Gaucher-Erkrankung, sondern nur das Ausmaß der übermäßigen Lipidspeicherung im Organismus der Patienten^{6,63}.

Da die bisher höchste Enzymaktivität von Chitotriosidase bei M. Gaucher-Patienten gefunden wurde und die Enzymmessung hier bereits klinisch etabliert ist, wurde die lysosomale Speicherkrankheit in der vorliegenden Studie als Vergleichsgruppe zur Cystischen Fibrose analysiert.

1.1.5 Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist eine chronisch-entzündliche Lungenerkrankung und zählt zum Kreis atopischer Erkrankungen⁶⁴. Die chronische Entzündung verursacht eine bronchiale Hyperreagibilität, also eine Überempfindlichkeit der Atemwege auf verschiedenste Reize. Bei prädisponierten Personen kommt es zu anfallsweise (seltener chronisch) auftretender Atemwegsobstruktion, bedingt durch Spasmen der glatten Muskulatur, ödematöse Schleimhautschwellung und Dyskrinie. Die häufigsten Symptome sind intermittierende Hustenanfälle, pfeifende Atmung und Luftnot. Bei Erwachsenen besteht eine Prävalenz von ca. 5%, bei Kindern von bis zu 10%⁴⁸. Damit stellt Asthma die häufigste chronische Lungenerkrankung bei Kindern dar und entwickelte sich innerhalb der letzten 30 Jahren in den westlichen Industrienationen zu der allgemein häufigsten chronischen Erkrankung im Kindesalter⁶⁵. Asthma ist eine chronische Erkrankung, bei der es durch kontinuierliche Umbauvorgänge in den Atemwegen (Remodeling) zu einer dauerhaften Schädigung der Lungenstruktur mit Emphysembildung und Verlust der Atemkapazität kommt⁶⁶.

In vorangegangenen Studien wurde für Chitinasen und Chitinase-ähnliche Proteine eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Asthma bronchiale diskutiert. Die Analyse von Asthma-Proben als Vergleichsgruppe zu CF war somit ein wichtiger Gegenstand der vorliegenden Untersuchung.

1.2 Das angeborene Immunsystem der Lunge

Die Immunabwehr höherer Organismen ist ein komplexes System, das der Erkennung und Elimination mikrobieller Erreger dient, ohne dabei körpereigenes Gewebe anzugreifen. Man unterscheidet ein angeborenes und ein erworbenes Immunsystem. Die angeborenen Abwehrmechanismen sind jederzeit aktivierbar und vielschichtig miteinander verzahnt⁶⁷. Durch ihre sofortige Einsatzbereitschaft kommt der angeborenen Immunität entscheidende Funktion zur (frühen) Eindämmung einer Infektion zu^{6,68,69}. Die einzelnen Abwehrmechanismen richten sich jedoch nicht spezifisch gegen den jeweiligen Erreger und bieten keinen Schutz gegen eine erneute Infektion. Die erworbenen Abwehrmechanismen hingegen, welche erst nach Erregerkontakt aktiviert werden können, sind adaptiv, das heißt sie richten sich spezifisch gegen den Erreger. Eine Immunantwort durch das erworbene Abwehrsystem tritt allerdings erst verzögert (nach vier bis sieben Tagen) ein. Sowohl die erworbene, als auch die angeborene Immunabwehr umfassen zelluläre und lösliche Komponenten:

Lösliche Komponenten des angeborenen Immunsystems umfassen Proteine des

- Komplementsystems
- Akut-Phase-Proteine
- Zytokine
- Kleinmolekulare Proteine, die bestimmte Strukturen auf mikrobiellen Oberflächen erkennen, um so eine Eliminierung von nicht-körpereigenen Molekülen zu ermöglichen^{69,70}.

Zu den **zellulären Komponenten** des angeborenen Immunsystems gehören

- phagozytierende Zellen (neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Monozyten)
- Zellen, die inflammatorische Mediatoren freisetzen (Basophile Granulozyten, Eosinophile Granulozyten und Mastzellen)
- Natürliche Killerzellen
- Epithelzellen⁶⁹.

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit waren Experimente mit neutrophilen Granulozyten und Monzyten/Makrophagen. Deshalb wird im Folgenden speziell auf diese beiden Zelltypen als Teil der zellulären Komponente des angeborenen Immunsystems eingegangen.

1.2.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten (Polymorphnukleäre Neutrophile Granulozyten, PMN) sind mit ca. 60% die zahlenmäßig stärkste Fraktion der Leukozyten im Blut und wichtige zelluläre Funktionsträger des unspezifischen Abwehrsystems^{71,72}. Nach ihrer Reifung im Knochenmark wandern sie in den Blutkreislauf aus, wo sie nur wenige Stunden zirkulieren. Kommen die Zellen in diesem Zeitfenster nicht mit Infektionserregern in Kontakt, verlassen sie den Blutstrom und erfahren einen programmierten Zelltod (Apoptose)⁷¹. Im Falle einer Infektion verlassen sie in einem durch Adhäsionsmoleküle und Chemokine vermittelten, mehrstufigen Prozess den Blutstrom nahe dem Infektionsort^{68,71,73}. Durch die Extrazellulärmatrix gelangen sie mit Hilfe von Verdauungsenzymen (u.a. Kollagenase und Gelatinase), die sie aus zytoplasmatischen Granula freisetzen⁶⁸. Am Zielort angekommen und durch chemotaktische Faktoren stimuliert, versuchen die neutrophilen Granulozyten durch Freisetzung verschiedenster Substanzen eingedrungene Mikroben zu eliminieren. Beispiele für einige dieser defensiven Substanzen sind ROS (reactive oxygen species), Hydrogenperoxid, Hypochlorazid, Chloramine und eine Vielzahl proteolytischer und zytotoxischer Enzyme⁷⁴⁻⁷⁶. Da die antimikrobiellen Substanzen nicht zwischen Mikrobe und Wirtszelle unterscheiden, werden sie zum Schutz der Zelle in abgekapselten Granula im Zytoplasma gespeichert, bis sie im Rahmen einer Entzündung nach außen abgegeben werden oder im Inneren der Zelle mit phagozytotischen Vesikeln verschmelzen⁷³. Auf diese Weise werden phagozytierte Mikroben oder anfallende Gewebstrümmer verdaut. Neutrophile Granulozyten besitzen eine Vielzahl dieser zytoplasmatischen Granula, die essentiell für ihre antimikrobielle Funktion im Rahmen der unspezifischen Abwehr sind. All diese Granula unterscheiden sich in Inhalt, Zeitpunkt ihrer Freisetzung und auch in ihrer biologischen Funktion. Sie werden typischerweise in vier Untergruppen eingeteilt, die in Tabelle 4 aufgelistet sind:

Azurophile Granula	Spezifische Granula	Gelatinase Granula	Sekretorische Granula
Saure β -Glycerophosphatase, Saure Mukopolysaccharide, α_1 -Antitrypsin, α -Mannosidase, Azurocidin/CAP37/Heparin- bindendes Protein, BPI (bactericidal permeability- increasing protein), β -Glycerophosphatase, β -Glucuronidase, Cathepsine, Defensine, Elastase, Lysozym, Myeloperoxidase, N-acetyl- β -Glucosaminidase, Proteinase 3, Sialidase.	β_2 -Mikroglobulin, Kollagenase, Gelatinase, Heparanase, Lactoferrin, Lysozym, NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin), Plasminogen-Aktivator, Vit. B ₁₂ -bindendes Protein, Sialidase.	Acetyltransferase, β_2 -Mikroglobulin, Gelatinase, Lysozym.	Plasma-Proteine, u.a. Albumin.

Tabelle 4: Inhaltsstoffe der verschiedenen zytoplasmatischen Granula von neutrophilen Granulozyten (nach^{73,77})

In den spezifischen („sekundären“) Granula der neutrophilen Granulozyten konnte YKL-40 nachgewiesen werden, weswegen es auch als „Marker-Protein“ dieses Zelltyps bezeichnet wird²⁰. Chitotriosidase stammt ebenfalls aus den spezifischen Granula der neutrophilen Granulozyten¹⁹. Der Speicherort dieser Proteine zusammen mit anderen Matrix-abbauenden Enzymen und defensiven Substanzen lässt vermuten, dass sowohl YKL-40 als auch Chitotriosidase eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr spielen^{20,78}.

Bei entzündlichen Lungenerkrankungen kommt es zu einer massiven Akkumulation von neutrophilen Granulozyten im Lungengewebe. Von besonderer Bedeutung ist dies bei der chronisch-entzündlichen Lungenerkrankung Cystische Fibrose. Einmal aktiviert, schütten die neutrophilen Granulozyten den Inhalt ihrer Granula aus, und damit etwa 40 verschiedene hydrolytische Enzyme und Oxidanzien. Da sich diese Substanzen

unspezifisch sowohl gegen exogene Mikroorganismen als auch gegen körpereigenes Gewebe richten, kommt es langfristig zur Degradation und zum zystischen Umbau des Lungengewebes⁷⁹.

1.2.2 Monozyten/Makrophagen

Monozyten machen ca. 4-8% der Leukozyten im Blut aus und sind die Vorläuferzellen der in den Geweben lokalisierten Makrophagen sowie eines Teils der Dendritischen Zellen („Monozyten-Makrophagen-System“, MMS)^{48,68}. Sie gehören sowohl zum spezifischen als auch zum unspezifischen Abwehrsystem⁸⁰. Ihre Aufgabe ist die Zerstörung körperfremder Strukturen durch Phagozytose und die Aktivierung der erworbenen Immunabwehr mittels Antigenpräsentation⁸¹. Die im Knochenmark produzierten Monozyten zirkulieren nur wenige Stunden bis Tage im Blut, bevor sie in die Gewebe auswandern und sich dort in unterschiedliche (langlebige) Zelltypen wie z. B. Makrophagen differenzieren⁶⁸. Vor allem in den späten Stadien der Ausdifferenzierung vom Monozyten zum reifen Makrophagen wird von den Zellen zunehmend YKL-40 produziert^{14,21}. Sie stellen außerdem eine der Haupt-Quellen für die Produktion von saurer Säuger-Chitinase im menschlichen Organismus dar¹². Makrophagen sind neben den neutrophilen Granulozyten die wichtigsten Phagozyten des Organismus. Sie nehmen Erreger per Endozytose auf und führen die endozytotischen Vesikel den in ihrem Zytoplasma enthaltenen Lysosomen zu. Deren Lumen wird durch Protonenpumpen angesäuert und der Inhalt durch verschiedene (pH-sensitive) Enzyme im sauren Milieu abgebaut^{68,80}. Diese Funktion scheint bei (Alveolar-) Makrophagen von CF-Patienten gestört zu sein: Während bei gesunden Probanden der pH in den Lysosomen u.a. mit Hilfe des CFTR-Kanals niedrig gehalten wird, scheint die Ansäuerung der Lysosomen bei CF-Patienten durch den defekten CFTR-Kanal gestört zu sein⁸²⁻⁸⁵. Dies hat weitreichende Folgen für den Abbau von in die Lunge eingedrungene Mikroorganismen, die zwar weiterhin von den Makrophagen phagozytiert, jedoch nicht komplett abgebaut werden können⁸². Neben verschiedenen pH-sensitiven Enzymen wie Proteasen, Lipasen und Desoxyribonukleasen befindet sich in den Lysosomen auch der Speicherort von Chitotriosidase in menschlichen Makrophagen¹⁹. Ein wichtiger Schritt in der Entstehung der Lysosomen ist die Markierung der lysosomalen Enzyme mit einem spezifischen Mannose-6-Phosphat-Rest im trans-Golgi-Netzwerk⁸⁰. Chitotriosidase hingegen scheint über einen anderen Sortierungspfad in die Lysosomen der

Zelle transportiert zu werden, da sie über keinerlei Mannose-6-Phosphat-Gruppen verfügt⁸⁶. Als 50 kDa-Protein synthetisiert, kann das Enzym Chitin (C-terminal) binden und degradieren⁴⁰. In dieser Form wird es von den Makrophagen in erster Linie in den Blutkreislauf sezerniert. Ein bestimmter Anteil akkumuliert jedoch in den Lysosomen und wird dort in eine C-terminal-gekürzte 39 kDa-Form prozessiert^{19,86}.

2 Fragestellung

Bisherige Studien deuten darauf hin, dass Chitinasen und Chitinase-ähnliche Proteine eine entscheidende Rolle bei verschiedenen Erkrankungen des Menschen spielen. Aus diesem Grund war das übergeordnete Ziel dieser Studie, die Expression des Chitinase-ähnlichen Proteins YKL-40 und seines murinen Analogons BRP-39 sowie der beiden Chitinasen Chitotriosidase und saurer Säuger-Chitinase bei der chronisch-entzündlichen Lungenerkrankung Cystische Fibrose zu untersuchen.

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit lautet somit: Finden sich erhöhte Expressions- bzw. Aktivitätslevel von Chitinasen und Chitinase-ähnlichen Proteinen bei der CF-Lungenerkrankung?

Mit Hilfe einer Aufteilung in folgende Einzelaspekte soll diese komplexe Frage beantwortet werden:

1. Lässt sich das Chitinase-ähnliche Protein YKL-40 und sein murines Analogon BRP-39 bei der CF-Lungenerkrankung nachweisen?
 - Finden sich bei Patienten mit CF im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Konzentrationen von YKL-40? Können analog erhöhte Konzentrationen von BRP-39 im CF-Mausmodell nachgewiesen werden?
 - Korrelieren erhöhte Konzentrationen von YKL-40 bzw. BRP-39 klinisch mit eingeschränkter Lungenfunktion?
2. Können erhöhte Enzymaktivitäten von Chitinasen bei der CF-Lungenerkrankung nachgewiesen werden?
 - Findet sich erhöhte enzymatische Aktivität einer Chitinase bei CF und welche ist die entscheidende Chitinase bei dieser Erkrankung?
 - Welche Zellen setzen Chitinase(n) frei und auf welche Stimuli hin?

3 Material und Methoden

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von den Firmen Merck oder Sigma bezogen. Steriles Wasser (Aqua ad iniectabilia) stammte von der Braun Melsungen AG.

3.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Unter „enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)“ versteht man die quantitative Messung eines Antigens in einem Medium mittels enzymgekoppelter Antikörper. Zunächst wird ein Stoffgemisch mit einem primärem Antikörper inkubiert, der spezifisch das gesuchte Antigen erkennt und bindet. Anschließend wird ein sekundärer Detektions-Antikörper zugegeben, der ein anderes Epitop des Antigens bindet und an dessen Ende ein Reporter-Enzym gekoppelt ist. Nach Zugabe einer Farbreagenz wird diese durch das indirekt an die gesuchte Substanz gekoppelte Enzym verändert. Die Intensität der Farbreaktion ist somit von der Konzentration der gesuchten Substanz im Stoffgemisch abhängig⁸⁷. In der vorliegenden Studie wurde die Technik des Sandwich-ELISA verwendet, die in Abbildung 1 schematisch dargestellt ist:

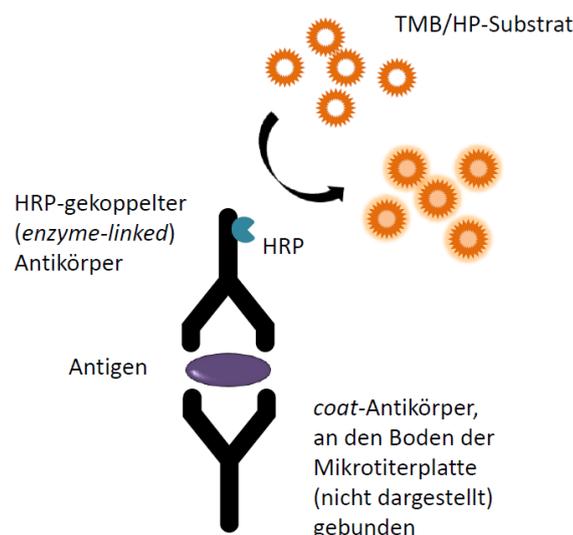


Abbildung 1: Prinzip eines Sandwich-ELISA. HRP: horseradish peroxidase, TMB: tetramethylbenzidine, HP: hydrogen peroxide (nach⁸⁷)

3.1.1 ELISA für humanes CHI3L1 (YKL-40)

Der Quantikine® ELISA für humanes CHI3L1 wurde zur Messung der Proteinkonzentration von YKL-40 im Serum, Sputum und der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BALF) der jeweiligen Patienten- bzw. Kontrollgruppe angewandt.

Material:

ELISA für humanes CHI3L1 (R&D Systems, USA):

CHI3L1 Mikrotiterplatte (Part 893664)
96-well-Platte, beschichtet mit einem monoklonalen Ratten-Antikörper gegen CHI3L1

CHI3L1 Konjugat (Part 893665)
21 ml eines polyklonalen Antikörpers gegen CHI3L1, gebunden mit Meerrettich-Peroxidase

CHI3L1 Standard (Part 893666)
40 ng von rekombinantem humanem CHI3L1 in gepufferter Protein-Basis; lyophilisiert

Assay Diluent RD1-34 (Part 895265)
11 ml einer gepufferten Protein-Basis-Lösung

Calibrator Diluent RD5P Concentrate (Part 895151)
21 ml einer gepufferten Protein-Basis-Lösung

Wasch-Puffer-Konzentrat (Part 895003)
21 ml einer 25-fach konzentrierten Lösung von gepuffertem Surfactant

Farblösung A (Part 895000)
12,5 ml von stabilisiertem Wasserstoffperoxid

Farblösung B (Part 8905001)
12,5 ml von stabilisiertem Chromogen (Tetramethylbenzidin)

Stopp-Lösung (Part 895032)
6 ml einer 2N Schwefelsäure

- Klebefolie
- Photometer (Anthos hill labtec HT3, Version 1.06)

Method:

Es wurde gemäß dem mitgelieferten Protokoll verfahren. Serum-, Sputum- und BALF-Proben wurden 1:20 verdünnt.

Präparation der Reagenzien: Es wurden 20 ml des Wasch-Puffer-Konzentrats mit 480 ml Aqua ad iniectibilia verdünnt, sowie 20 ml des Calibrator Diluent RD5P mit 80 ml Aqua ad iniectibilia. Durch Zugabe von 1 ml Aqua ad iniectibilia zum lyophilisierten Standard-Pulver wurde eine Stock-Lösung von 40.000 pg/ml hergestellt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe mit einem maximalen Standard von 4000 pg/ml und einem minimalen Wert von 62,5 pg/ml erstellt.

Durchführung: Nachdem pro well 100 µl Assay Diluent verteilt wurden, mussten anschließend je 50 µl Standard, Kontrolle oder Probe nach einem bestimmten Reaktionsschema in die 96-well-Platte eingebracht und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit dem Verdünnungsmittel vermischt werden. Die Platte wurde daraufhin mit einer Klebefolie bedeckt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde die Platte insgesamt viermal gewaschen und pro well wurden 200 µl CHI3L1 Konjugat eingebracht. Erneut wurde die Platte per Klebefolie verschlossen und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Es folgte ein erneuter Wasch-Schritt, nach dem eine Substrat-Lösung hergestellt wurde. Farblösung A und B wurden in gleichen Volumina gemischt und anschließend wurden davon pro well 200 µl pipettiert. Danach wurde unter Lichtausschluss für 30 Minuten inkubiert.

Substratreaktion: Als letzter Schritt wurden die Reaktionen durch Zugabe von jeweils 50 µl Stopp-Lösung (H₂SO₄) angehalten.

Detektion: Die Absorption wurde bei 450 nm mittels Photometer gemessen. Eine Wellenlängenkorrektur erfolgte durch Subtraktion der gemessenen Werte bei 540 nm von den Werten bei 450 nm. Die Berechnung der Standardkurve aus den zwei Standardreihen und dem Leerwert sowie die davon abhängige Berechnung der Messwerte erfolgte mit der speziellen Biolise Software. Das untere Detektionslimit lag bei 1,25-8,15 pg/ml (Mittelwert 3,55 pg/ml).

3.1.2 ELISA für murines CHI3L1 (BRP-39)

Der Quantikine® ELISA für murines CHI3L1 wurde zur Messung der Proteinkonzentration von BRP-39 in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BALF) von β -ENaC-Transgen-Mäusen sowie gesunden Wildtyp-Mäusen angewandt.

Material:

ELISA für murines CHI3L1 (R&D Systems, USA):

Mouse CHI3L1 Mikrotiterplatte (Part 893317)
96-well-Platte, beschichtet mit einem polyklonalen Antikörper spezifisch gegen murines CHI3L1

Mouse CHI3L1 Konjugat (Part 893318)
12 ml eines polyklonalen Antikörpers gegen murines CHI3L1, gebunden mit Meerrettich-Peroxidase

Mouse CHI3L1 Standard (Part 893319)
20 ng von rekombinantem murinem CHI3L1 in gepufferter Protein-Basis; lyophilisiert

Mouse Assay Diluent RD1-21 (Part 895215)
12 ml einer gepufferten Protein-Basis-Lösung

Calibrator Diluent RD5-26 Concentrate (Part 895525)
21 ml einer gepufferten Protein-Basis-Lösung

Wasch-Puffer-Konzentrat (Part 895024)
50 ml einer 25-fach konzentrierten Lösung von gepuffertem Surfactant

Farblösung A (Part 895000)
12,5 ml von stabilisiertem Wasserstoffperoxid

Farblösung B (Part 8905001)
12,5 ml von stabilisiertem Chromogen (Tetramethylbenzidin)

Stopp-Lösung (Part 895174)
23 ml einer verdünnten Salzsäure

- Klebefolie
- Photometer (Anthos hill labtec HT3, Version 1.06)

Methoden:

Es wurde gemäß dem mitgelieferten Protokoll verfahren. Die murinen BALF-Proben wurden 1:1000 verdünnt.

Präparation der Reagenzien: Es wurden 25 ml des Wasch-Puffer-Konzentrats mit 600 ml Aqua ad iniectibilia verdünnt, sowie 20 ml des Calibrator Diluent RD5-26 mit 60 ml Aqua ad iniectibilia. Durch Zugabe von 5 ml Calibrator Diluent RD5-26 (1X) zum lyophilisierten Standard-Pulver wurde eine Stock-Lösung von 4000 pg/ml hergestellt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe mit einem maximalen Standard von 2000 pg/ml und einem minimalen Wert von 62,5 pg/ml erstellt.

Durchführung: Nachdem pro well 50 µl Assay Diluent verteilt wurden, mussten anschließend je 50 µl Standard, Kontrolle oder Probe nach einem bestimmten Reaktionsschema in die 96-well-Platte eingebracht und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit dem Verdünnungsmittel vermischt werden. Die Platte wurde daraufhin mit einer Klebefolie bedeckt und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Platte insgesamt fünfmal gewaschen und pro well wurden 100 µl CHI3L1 Konjugat eingebracht. Erneut wurde die Platte per Klebefolie verschlossen und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Es folgte ein erneuter Wasch-Schritt, nach dem eine Substrat-Lösung hergestellt wurde. Farblösung A und B wurden in gleichen Volumina gemischt und anschließend wurden davon pro well 100 µl pipettiert. Danach wurde unter Lichtausschluss für 30 Minuten inkubiert.

Substratreaktion: Zuletzt wurden die Reaktionen durch Zugabe von jeweils 100 µl Stopp-Lösung (HCl) angehalten.

Detektion: Die Absorption wurde bei 450 nm mittels Photometer gemessen. Eine Wellenlängenkorrektur erfolgte durch Subtraktion der gemessenen Werte bei 540 nm von den Werten bei 450 nm. Die Berechnung der Standardkurve aus den zwei Standardreihen und dem Leerwert sowie die davon abhängige Berechnung der Messwerte erfolgte mit der speziellen Biolise Software. Das untere Detektionslimit lag bei 2,23-16,0 pg/ml (Mittelwert 6,57 pg/ml).

3.2 Enzymaktivitätsassays

Enzymaktivitätsassays erlauben die indirekte Bestimmung einer Enzymaktivität, indem man entweder den Substratumsatz oder die Bildung eines Reaktionsprodukts pro Zeiteinheit (=Aktivität) unter standardisierten Bedingungen bestimmt. Wenn das Substrat bzw. das Produkt eine spezifische Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge besitzt, kann an der Extinktionsänderung in der photometrischen Messung der durch das Enzym katalysierte Umsatz berechnet werden. Die gebräuchliche Definition der Enzymmenge ist Unit (U), wobei 1U die Enzymmenge ist, die 1 μmol Substrat pro Minute bei 37 °C unter standardisierten Bedingungen umsetzt⁸⁸.

3.2.1 Enzymaktivitätsassay für Chitinasen

Der Sigma® Enzymaktivitätsassay für Chitinasen wurde angewandt, um die Enzymaktivität von Chitotriosidase und saurer Säuger-Chitinase (Acidic Mammalian Chitinase, AMCase) nachzuweisen. Dazu wurden Serum, Sputum und bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit (BALF) der jeweiligen Patienten- bzw. Kontrollgruppe untersucht.

Material:

Enzymaktivitätsassay für Chitinasen (Sigma, USA):

- Substrate:

4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide (Catalog No. N9376)
Zum Nachweis von β -N-Acetylglucosaminidase-Aktivität (Exo-Chitinase)

4-Nitrophenyl N,N'-diacetyl-β-D-chitobioside (Catalog No. N6133)
Zum Nachweis von Chitobiosidase-Aktivität (Exo-Chitinase)

4-Nitrophenyl β-D-N,N',N''-triacetylchitotriose (Catalog No. N8638)
Zum Nachweis von Chitotriosidase-Aktivität (Endo-Chitinase)

- Puffer:

Assay Puffer (Catalog No. A4855)

p-Nitrophenol-Lösung 10 mM (Catalog No. N7660)	
$C_6H_5NO_3$	10 mM

Stopp-Lösung (Catalog No. S2127)	
Na_2CO_3	0,39 M
In H_2O	

- 96-well-Platten (nuncTM-immuno-plates F96 maxisorp)
- 37 °C Wasserbad (GFL, Version 1008)
- Brutschrank (Heraeus-electronic, Typ B5060 EC-CO2)
- Photometer (Anthos hill labtec HT3, Version 1.06)

Method:

Es wurde gemäß dem mitgelieferten Protokoll verfahren. Serum-, Sputum- und BALF-Proben wurden unverdünnt verwendet.

Lösen der Substrate: Die drei Substrate zum Nachweis verschiedener Arten von chitinolytischer Aktivität wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml bzw. 0,5 mg/ml und 0,2 mg/ml in Assay Puffer gelöst. Zur besseren Lösung wurden die Substratlösungen bis zu eine Stunde lang auf einem Horizontalschüttler belassen und während des Experiments auf Eis gelagert.

Herstellung der Stopp-Lösung: Zu 1 g Natrium-Carbonat wurden 24 ml Aqua ad iniectibilia zugegeben. Die Lösung wurde auf dem Vortex-Rüttler durchmischt und bei Raumtemperatur gelagert.

Herstellung der Standard-Lösung: Es wurden 5 µl der 10 mM p-Nitrophenol-Lösung mit 995 µl Stopp-Lösung verdünnt. Anschließend wurde die Lösung auf dem Vortex-Rüttler durchmischt und auf Eis gelagert.

Inkubation von Substrat und Probe in der 96-well-Platte: Die Substrat-Lösungen wurden zusammen mit der Standard-Lösung für einige Minuten im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Anschließend wurden Substrat- und Standard-Lösungen nach einem bestimmten Reaktions-Schema in die 96-well-Platte pipettiert. Daraufhin wurden 10 µl der jeweiligen

Probe in die Platte eingebracht und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit der Substratlösung vermischt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation im Brutschrank bei 37 °C. *Substratreaktion:* Im sauren Milieu (pH ~4.8) erfolgte bei 37 °C die enzymatische Hydrolyse der Substrate durch die verschiedenen Chitinasen. Zur Veranschaulichung des Sachverhaltes zeigt Abbildung 2 die Degradation des Substrates Chitin durch die saure Säuger-Chitinase und Chitotriosidase:

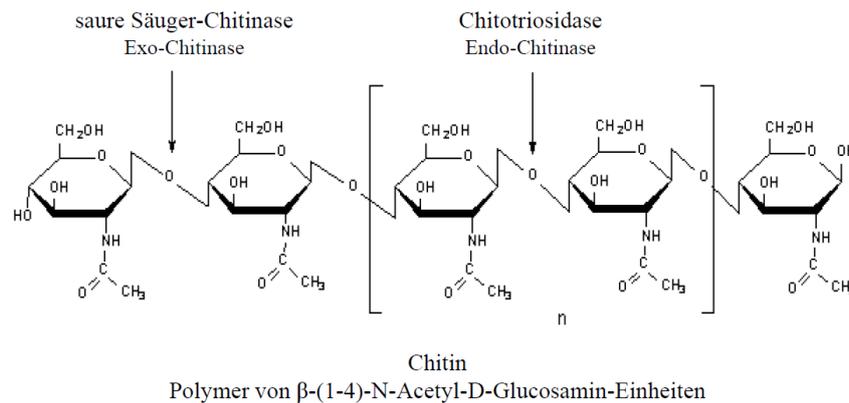


Abbildung 2: Chitinase-spezifische Degradation eines Chitin-Polymers durch Endo- und Exo-Chitinasen in N-Acetyl-D-Glucosamin-Einheiten⁸⁹

Durch die enzymatische Hydrolyse wurde p-Nitrophenol freigesetzt, das nach Zugabe der Stopp-Lösung durch Ionisierung eine gelbe Farbreaktion erzeugte.

Detektion: Zur Quantifizierung der Färbung wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm im Photometer gemessen. Die Berechnung der Standardkurve aus den Standard- bzw. Leerwerten sowie die davon abhängige Berechnung der Messwerte erfolgte mit der speziellen Biolise Software. Als optimaler Messbereich wurde derjenige Abschnitt auf der Standardkurve festgelegt, welcher ein mindestens doppeltes Signal des Leerwertes aufwies und in dem eine ausreichende Steigung vorlag.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Isolierung neutrophiler Granulozyten und mononukleärer Zellen

Material:

- Eppendorf-Reaktionsgefäße
- Zentrifuge (Heraeus Megafuge 1.0 R)
- Brutschrank (Heraeus-electronic, Typ B5060 EC-CO2)
- Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB)
- Puffer:

PBS-Puffer	
NaCl	137 mM
KCl	2,68 mM
Na ₂ HPO ₄	5,36 mM
KH ₂ PO ₄	1,76 mM
In H ₂ O pH 7,4	

Ammoniumchlorid-Puffer	
NH ₄ Cl	4,15 g
KHCO ₃	500 mg
EDTA	18 mg
In 500 ml H ₂ O	

Methode:

Verwendet wurde das Vollblut von CF-Patienten/-innen bzw. gesunden Kontrollprobanden/-innen in jeweils gleichen Volumina. Mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden die neutrophilen Granulozyten bzw. mononukleären Zellen isoliert. Dazu wurde das Vollblut 1:1 mit PBS-Puffer verdünnt und die Mischung vorsichtig auf das gleiche Volumen an Separationsmedium geschichtet. Anschließend wurde 20 Minuten bei 20 °C und 400 g zentrifugiert. Entsprechend der Dichte der jeweiligen Blutbestandteile entstand im Zentrifugationsröhrchen zuunterst ein Pellet aus verschiedenen Zellen, das durch eine Phase aus Ficoll-Paque®-Plus von der Interphase mit mononukleären Zellen getrennt war. Zuerst entstand ein Plasma-Phosphatpuffer-Gemisch. Zur Veranschaulichung dient Abbildung 3:

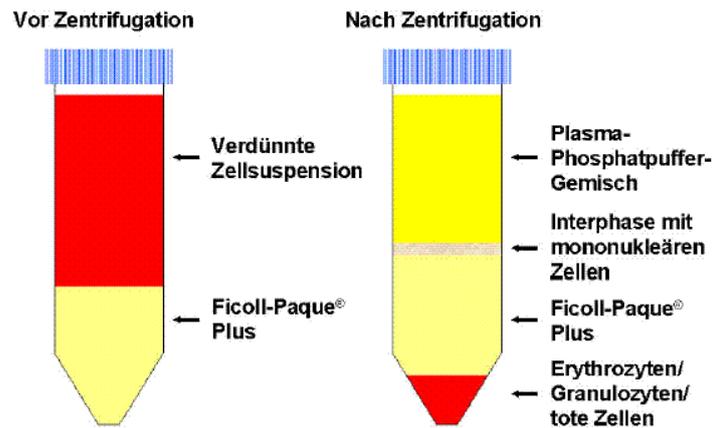


Abbildung 3: Schema zur Dichtegradientenzentrifugation

Der Plasma-Phosphatpuffer-Überstand wurde abgenommen und die Interphase, bestehend aus mononukleären Zellen, wurde in einem neuen Röhrchen konserviert. Anschließend wurden diese mit Ammonium-Chlorid-Puffer gewaschen und für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Im Zentrifugationsröhrchen wurde der Ficoll-Paque®-Plus-Überstand entfernt, sodass das Pellet aus Granulozyten und Erythrozyten übrig blieb. Die Granulozyten/Erythrozyten wurden mit PBS-Puffer gewaschen. Die mononukleären Zellen bzw. Granulozyten/Erythrozyten wurden anschließend für 10 Minuten bei 4 °C und 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen mit Ammoniumchlorid-Puffer resuspendiert und 10 bzw. 30 Minuten bei 4 °C zur Lyse der Erythrozyten inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand abgekippt. Die Zellen wurden mit Ammoniumchlorid-Puffer resuspendiert und erneut für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt und Verwerfen des Überstandes behielt man im Zellpellet die mononukleären Zellen bzw. neutrophilen Granulozyten.

3.3.2 Stimulation neutrophiler Granulozyten und mononukleärer Zellen

Material:

- Eppendorf-Reaktionsgefäße
- Zentrifuge (Heraeus Megafuge 1.0 R)
- 37 °C Wasserbad (GFL, Version 1008)
- Brutschrank (Heraeus-electronic, Typ B5060 EC-CO2)
- RPMI 1640 Medium with stable glutamine (PAA Laboratories GmbH)

- Stimulanzen (Tabelle 5):

Stimulanzen	Abkürzung	Hersteller	verwendete Konzentration
Synthetic bacterial lipoprotein	Pam ₃ CSK ₄	Invivogen	1 µg/ml
Heat Killed <i>Listeria monocytogenes</i>	HKLM	Invivogen	1 µg/ml
Flagellin from <i>S. typhimurium</i>	FLA-ST	Invivogen	1 µg/ml
Synthetic diacylated lipoprotein	FSL1	Invivogen	1 µg/ml
Single-stranded GU-rich oligonucleotide complexed with LyoVec™	ssRNA40	Invivogen	1 µg/ml
Type B CpG oligonucleotide	ODN2006	Invivogen	5 µM
Lipopolysaccharide from <i>E.coli</i>	LPS	Invivogen	1 µg/ml
Phorbol myristate acetate	PMA	Sigma-Aldrich	20 ng/ml
Interleukin-8	IL-8	Peprtech	200 ng/ml
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	GM-CSF	Peprtech	50 ng/ml

Tabelle 5: Verwendete Substanzen zur Stimulation von neutrophilen Granulozyten und mononukleären Zellen

Methoden:

Die isolierten neutrophilen Granulozyten bzw. mononukleären Zellen wurden in RPMI-Nährmedium resuspendiert und unter dem Lichtmikroskop mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Anschließend wurden jeweils vergleichbare Zellzahlen in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Nach Zugabe der Stimulanzen wurden die neutrophilen Granulozyten eine Stunde, die mononukleären Zellen 6 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand abgesaugt und konserviert.

3.4 Patienten und gesunde Kontrollgruppe

Die klinischen Parameter der Patienten/-innen und der Kontrollgruppe sind in der folgenden Tabelle 6 aufgelistet. Von allen Studienteilnehmern/-innen bzw. deren Eltern wurde eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt und alle durchgeführten Methoden wurden von der Ethikkommission des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München bewilligt.

	Cystische Fibrose	Morbus Gaucher	Asthma bronchiale	Kontroll- gruppe
Anzahl n	59	3	30	26
Alter (Jahre)	22 ± 15	32 ± 11	15 ± 6	25 ± 9
Geschlecht (♂/♀)	31/28	1/2	13/17	12/14
FEV₁ (%)	63 ± 15	n.g.	61 ± 12	n.g.
Leukozytenzahl (10⁹/l) im Blut	10 ± 5	n.g.	12 ± 2	8 ± 3
Neutrophile (%) in Sputa	83 ± 32	n.g.	n.g.	17 ± 10
<i>Ps. aeruginosa</i>*	35	n.g.	n.g.	0
Antibiotika	35	n.g.	0	0
ΔF508 homozygot/heterozygot/andere	34/19/6	---	---	---

Tabelle 6: Klinische Daten zu den untersuchten Patientengruppen¹

3.4.1 Cystische Fibrose

Insgesamt wurden 338 CF-Patienten in die Studie eingeschlossen. Aus dieser Kohorte konnten von 59 Patienten Serum-, Sputum- und BALF-Proben gewonnen werden. Im Analysematerial wurden die Proteinkonzentration von YKL-40 sowie die enzymatische Aktivität von Chitotriosidase und saurer Säuger-Chitinase untersucht und mit den

¹ Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben; FEV₁: Forciertes expiratorisches Volumen der ersten Sekunde (% des Vorhersagewertes); *definitionsgemäß bei Isolation von *Pseudomonas aeruginosa* in mind. zwei aufeinanderfolgenden Sputum-Proben in einem Intervall von mind. sechs Monaten; n.g.=nicht gemessen.

Ergebnissen bei gesunden Kontroll-Probanden verglichen. Die CF-Gruppe beinhaltete 31 männliche und 28 weibliche Patienten/-innen mit einem Durchschnittsalter von 22 Jahren (Mittelwert). Einschlusskriterien waren die Diagnose der CF anhand klinischer Symptome und einem positiven Schweiß-Test (Cl^- -Konzentration im Schweiß >60 mmol/l) und/oder der Nachweis einer krankheitsauslösenden *CFTR*-Genmutation. Weitere Kriterien waren ein forciertes expiratorisches Volumen der ersten Sekunde (FEV_1) von $>30\%$ des Vorhersagewertes und klinische Stabilität unter laufender Therapie über mindestens vier Wochen vor Studienbeginn. Bezüglich der CF-auslösenden Genmutationen waren 34 Patienten ΔF508 homozygot, 19 Patienten waren heterozygote Träger der ΔF508 -Mutation und sechs Patienten wiesen anderen *CFTR*-Mutationen als ΔF508 auf.

3.4.2 M. Gaucher

Es wurden drei Personen mit M. Gaucher im Alter zwischen 22 und 48 Jahren (Mittelwert 32 Jahre) in die Studie eingeschlossen, von denen jeweils Serum-Proben gewonnen werden konnten. Die Gruppe beinhaltete einen männlichen und zwei weibliche Patienten/-innen.

3.4.3 Asthma bronchiale

In die Asthma-Gruppe wurden 30 Personen zwischen 7 und 28 Jahren (Mittelwert 15 Jahre) aufgenommen, die eine anfallsweise auftretende oder chronische Atemwegs-obstruktion mit oder ohne Infektassoziation aufwiesen und bei denen Asthma bronchiale durch erhöhtes IgE oder im Prick- und/oder RAST-Test bestätigt wurde. Aus dieser Kohorte konnten von allen Studienteilnehmern Serum- und BALF-Proben gewonnen werden. Die Gruppe beinhaltete 13 männliche und 17 weibliche Probanden/-innen.

3.4.4 Kontrollen

Sechszwanzig Personen mit einem Durchschnittsalter von 25 Jahren (Mittelwert) ohne Lungen- und/oder infektiöse Atemwegserkrankungen oder Allergien wurden als Kontroll-Gruppe ausgewählt (davon 12 männlich, 14 weiblich). Von den Kontrollprobanden konnten Serum-, Sputum- und BALF-Proben gewonnen und untersucht werden.

3.5 Murine Proben

Die Erzeugung von β -ENaC-Transgen-Mäusen (Linie 6608) wurde bereits im Vorfeld beschrieben⁹⁰. Die Tiere zeichnen sich durch die Überexpression eines epithelialen Natrium-Kanals („ β -ENaC^c“) aus, wodurch in den Atemwegsepithelien vermehrt Natrium absorbiert wird. Dadurch kommt es zur periziliären Flüssigkeitsarmut, abnehmender Zilien-Schlag-Frequenz und eingeschränkter Mukus-Clearance. Auf diese Weise wird die charakteristische Pathologie der CF-Lungenerkrankung imitiert^{90,91}. Zur Veranschaulichung dient Abbildung 4:

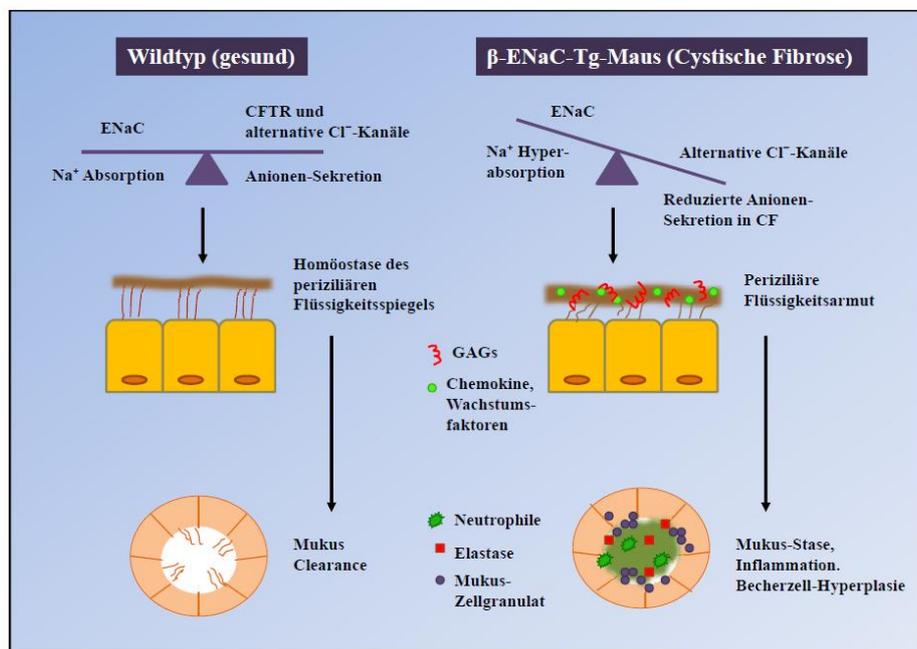


Abbildung 4: Überexpression von epithelialen Na⁺-Kanälen (β -ENaC) in den Atemwegen von transgenen Tieren. GAGs=Glykosaminoglykane (nach⁹¹)

Alle Tierexperimente wurden durch das Regierungspräsidium Karlsruhe oder München freigegeben. Bei Erhaltung der Kolonie wurde auf eine genetische Vielfalt geachtet und die jeweiligen β -ENaC-Transgen-Mäuse wurden durch PCR identifiziert. Nachkommen aus einer Generation von Wildtyp-Mäusen dienten in allen Experimenten als Kontrollen. Die Mäuse wurden in der pathogen-freien Umgebung einer Kleintieranlage untergebracht und hatten stets freien Zugang zu Futter und Wasser. Zur Gewinnung der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BALF) wurden die Mäuse per intraperitonealer Injektion einer Kombination aus Ketamin/Xylazin (120 mg/kg bzw. 16 mg/kg) anästhesiert, anschließend

wurde die Trachea kanüliert und die Lungen mit jeweils 800 µl PBS lavagiert. Die Proteinkonzentrationen von BRP-39 wurden schließlich mit Hilfe eines ELISA der Firma R&D Systems in den Überständen der BALF gemessen (siehe Abschnitt 3.1.2). Gesamt- und differenzierte Zellzählungen wurden mittels Zytospin-Zählmethode untersucht. Die Experimente wurden von Untersuchern durchgeführt, die bezüglich des Genotyps der Mäuse geblendet waren. Die Lungenfunktion wurde durch eine im Vorfeld beschriebene Methode gemessen⁹².

3.6 Statistische Auswertung

Um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu ermitteln, wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Konnten signifikante Unterschiede ermittelt werden, wurde anschließend beim Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Stichproben der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet. Um Korrelationen stetiger Variablen zu berechnen, wurde der Spearman-Rho-Test angewandt. Ein Wahrscheinlichkeitswert $p < 0,05$ wurde als signifikant angenommen. Bei einem Korrelationskoeffizienten $r > 0,3$ wurde eine Korrelation angenommen. Die statistischen Analysen wurden mit Prism 4.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) und STATA Version 8.2 für Windows (STATA Corporation, College Station, TX, USA) durchgeführt. Die Diagramme wurden anhand der Programme Prism 4.0 und Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA) erstellt und sind im folgenden Ergebnisteil dargestellt. Dabei wurden auf der Abszisse die untersuchten Patientengruppen bzw. das untersuchte Medium aufgetragen und auf der Ordinate der jeweilige Parameter. Es sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Es gilt: $p < 0,05$ (*) und $p < 0,01$ (**).

4 Ergebnisse

4.1 Chitinase-ähnliche Proteine

4.1.1 YKL-40

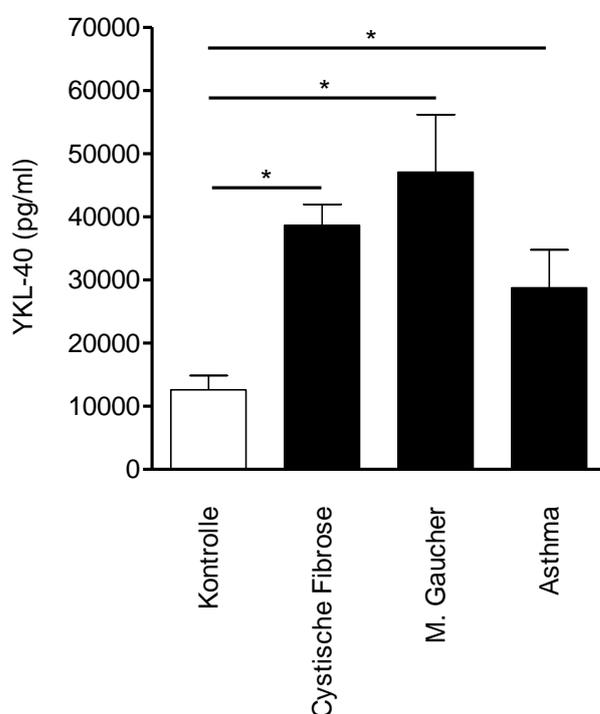


Abbildung 5: YKL-40-Konzentrationen im Serum (in pg/ml)

Abbildung 5 zeigt die YKL-40-Konzentrationen im Serum von Patienten mit Cystischer Fibrose (CF), M. Gaucher und Asthma im Vergleich zur Kontrollgruppe. In jeder der drei Krankheitsgruppen konnten im Vergleich mit gesunden Probanden signifikant erhöhte Protein-Konzentrationen gemessen werden. Die höchsten Werte zeigten sich bei M. Gaucher-Patienten.

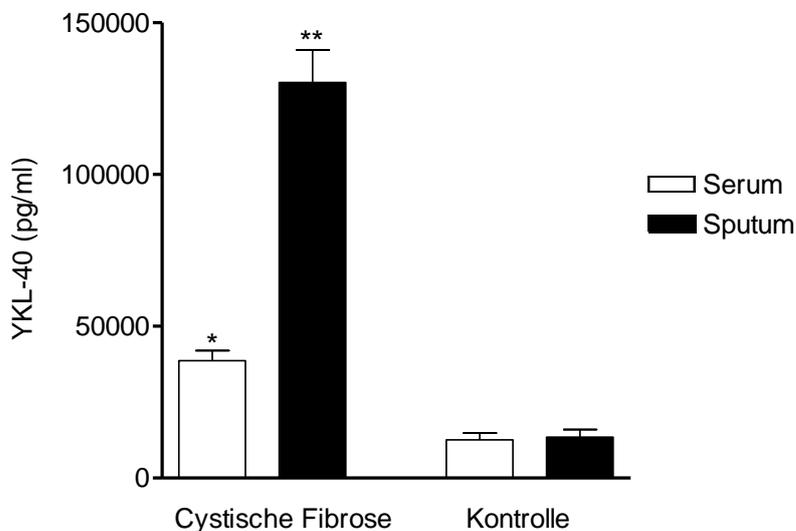


Abbildung 6: YKL-40-Konzentrationen im Serum und Sputum (in pg/ml) als Balkendiagramm

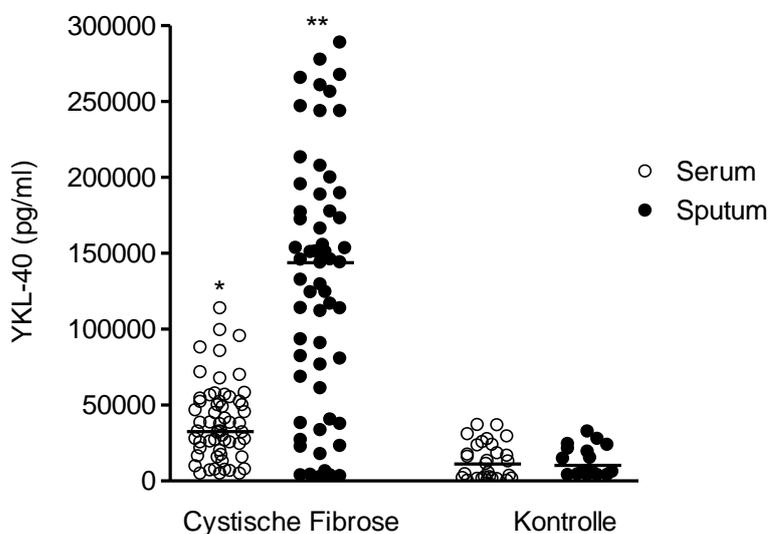


Abbildung 7: YKL-40-Konzentrationen im Serum und Sputum (in pg/ml) als Punktdiagramm

In den Abbildungen 6 und 7 sind die Proteinkonzentrationen von YKL-40 im Serum und Sputum von CF-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe dargestellt. Der obere Graph zeigt Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes als Säulendiagramm, der untere

Graph bringt die Werte der einzelnen Patienten als Punktdiagramm zur Darstellung, wobei horizontale Linien die Mediane repräsentieren.

Es zeigte sich, dass die Konzentrationen von YKL-40 sowohl im Sputum als auch im Serum der CF-Patienten - verglichen mit den gesunden Proben - signifikant erhöht waren. Innerhalb der Sputum-Proben fiel auf, dass die YKL-40-Konzentrationen eine breite Streuung ihrer Werte aufwiesen. Diese reichen von Konzentrationen ähnlich denen gesunder Kontroll-Probanden bis zu 30-fach erhöhten Werten. Insgesamt korrelierten die Konzentrationen von YKL-40 im Serum mit den Konzentrationen in den Sputum-Proben untereinander, sowohl bei CF-Patienten ($r=0,69$, $p<0,01$), als auch in geringerem Ausmaß bei den gesunden Kontroll-Probanden ($r=0,42$, $p<0,05$, Daten nicht abgebildet). Die YKL-40-Konzentrationen im Sputum zeigten wiederum Korrelation zur Anzahl der darin enthaltenen neutrophilen Granulozyten ($r=0,74$, $p<0,01$), nicht jedoch zur Anzahl Eosinophiler Granulozyten ($r=0,13$, $p>0,05$), Lymphozyten ($r=0,18$, $p>0,05$) oder Makrophagen ($r=0,10$, $p>0,05$, Daten nicht abgebildet).

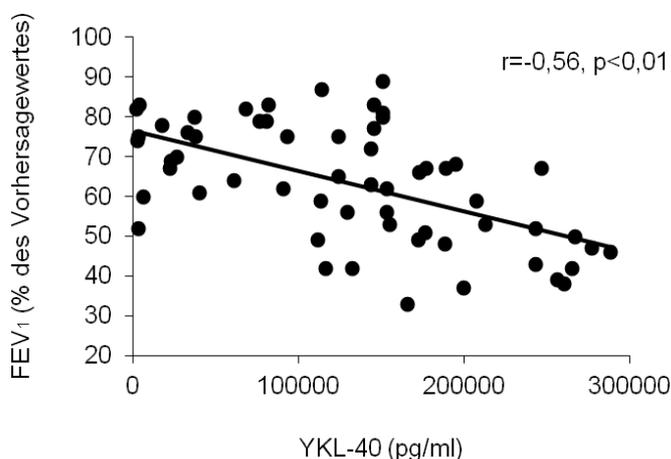


Abbildung 8: Korrelation zwischen YKL-40 im Sputum (in pg/ml) von CF-Patienten und FEV₁ (% des Vorhersagewertes)

Abbildung 8 zeigt die Konzentrationswerte von YKL-40 (im Sputum) in Korrelation zum Lungenfunktionsparameter FEV₁ (Einsekundenkapazität, in Prozent des Vorhersagewertes). Die YKL-40-Level im Sputum der CF-Patienten korrelierten mit einer

Atemwegsobstruktion im Lungenfunktionstest ($r=-0,56$, $p<0,01$), nicht jedoch mit Parametern zur Beschreibung einer restriktiven Ventilationsstörung (Daten nicht abgebildet).

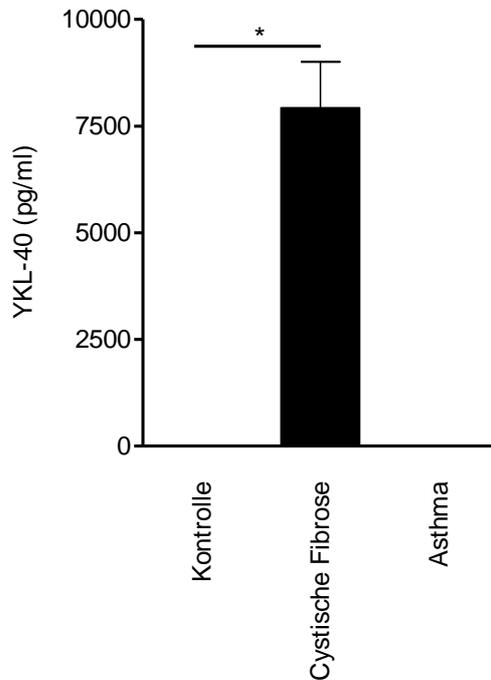


Abbildung 9: YKL-40-Konzentrationen in der BALF (in pg/ml)

Die Messungen von YKL-40 in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BALF) von CF- und Asthma-Patienten sowie von gesunden Kontrollen ergab für CF eine signifikante Erhöhung der Werte gegenüber den Kontrollprobanden. In der BALF der Asthma-Patienten konnte kein YKL-40 nachgewiesen werden.

4.1.2 BRP-39

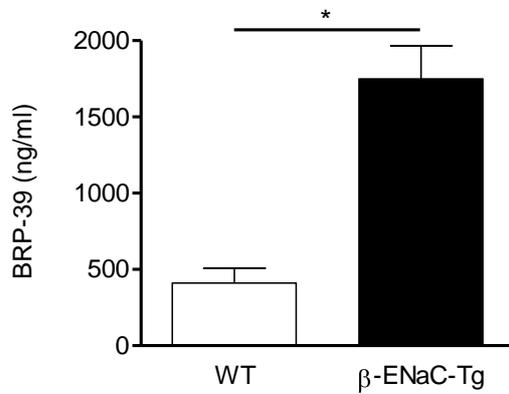


Abbildung 10: BRP-39 in der BALF von β -ENaC-Transgen-Mäusen im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen (in ng/ml)

Abbildung 10 zeigt die Konzentrationen von BRP-39 in der BALF von β -ENaC-Transgen-(Tg)-Mäusen (n=9) im Vergleich mit Wildtyp-(WT)-Mäusen (n=7). Ähnlich der Situation bei der humanen CF-Erkrankung, konnten in der BALF der β -ENaC-Tg-Mäuse signifikant erhöhte Werte des murinen YKL-40-Analogons BRP-39 nachgewiesen werden.

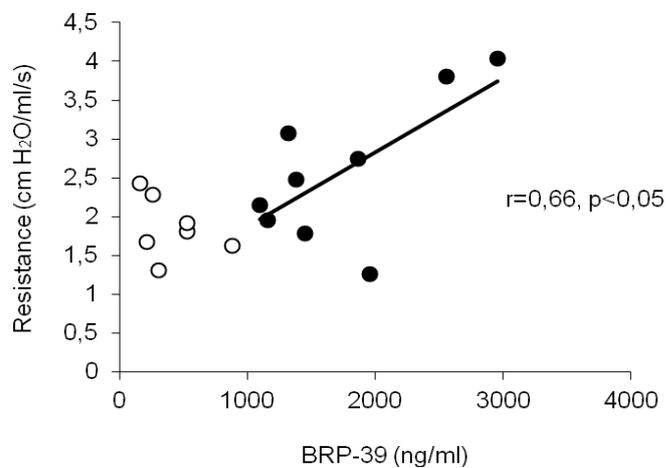


Abbildung 11: Korrelation zwischen BRP-39 in der BALF (in ng/ml) von β -ENaC-Tg-Mäusen (schwarze Füllung) bzw. WT-Mäusen (weiße Füllung) und Resistance (cm H₂O/ml/s)

Das Diagramm in Abbildung 11 zeigt die Konzentrationswerte von BRP-39 (in der BALF) in Korrelation zum Atemwegswiderstand (Resistance) im Lungenfunktionstest für β -ENaC-Transgen-Mäuse (n=9, schwarze Füllung) und Wildtyp-Mäuse (n=7, weiße Füllung). Dabei zeigte sich für die Mäuse mit der β -ENaC-Überexpression eine Korrelation zwischen den BRP-39-Leveln in der BALF und der Atemwegsobstruktion im Lungenfunktionstest ($r=0,66$, $p<0,05$). Dies galt nicht für Parameter der pulmonalen Restriktion (Daten nicht abgebildet).

4.2 Chitinasen

4.2.1 Chitotriosidase

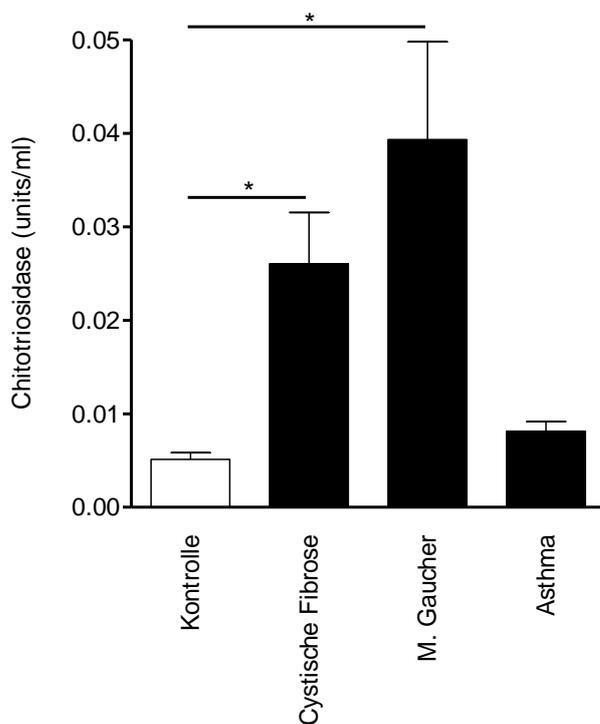


Abbildung 12: Chitotriosidase-Enzymaktivität im Serum (in units/ml)

In Abbildung 12 ist die Chitotriosidase-Enzymaktivität im Serum von Patienten mit Cystischer Fibrose, M. Gaucher, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe dargestellt. Patienten mit CF und M. Gaucher zeigten eine signifikant höhere Enzymaktivität im Serum im Vergleich zu den Kontrollprobanden. Patienten mit Asthma wiesen eine moderat erhöhte Enzymaktivität gegenüber den gesunden Kontrollen auf.

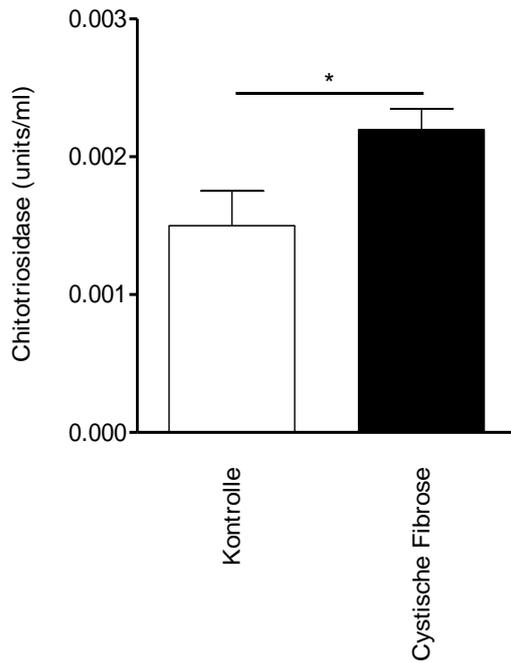


Abbildung 13: Chitotriosidase-Enzymaktivität im Sputum (in units/ml)

Die Sputum-Untersuchungen ergaben eine signifikant höhere Enzymaktivität von Chitotriosidase bei CF-Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

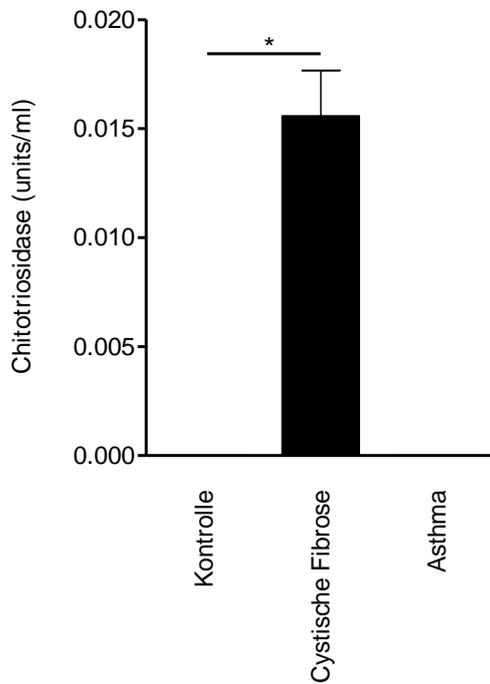


Abbildung 14: Chitotriosidase-Enzymaktivität in der BALF (in units/ml)

Abbildung 14 zeigt die signifikant erhöhte Enzymaktivität von Chitotriosidase in der BALF der CF-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der BALF der Asthma-Patienten konnte keine Enzymaktivität nachgewiesen werden.

4.2.2 Saure Säuger-Chitinase (Acidic Mammalian Chitinase)

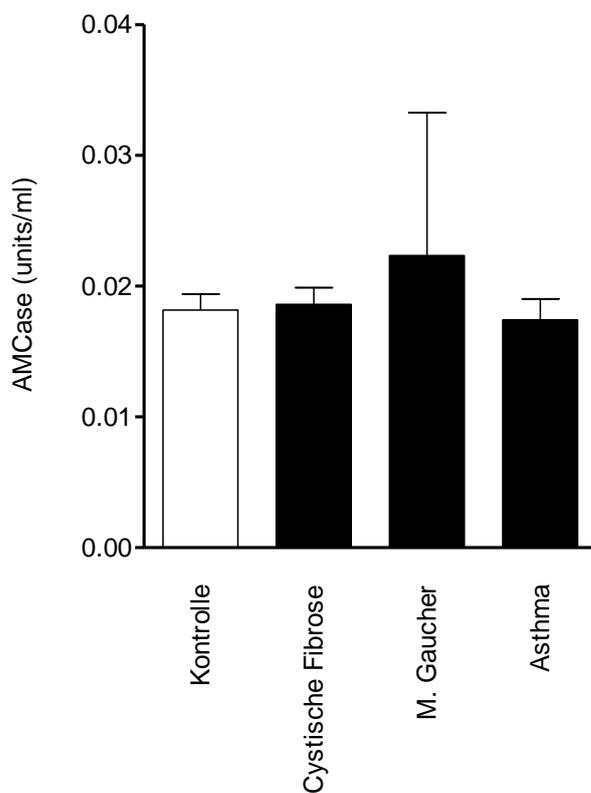


Abbildung 15: Acidic Mammalian Chitinase-Enzymaktivität im Serum (in units/ml)

In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der Enzymaktivitäts-Messungen der sauren Säuger-Chitinase (Acidic Mammalian Chitinase, AMCase) im Serum von CF-, M. Gaucher- und Asthma-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen dargestellt. Für die drei Krankheitsgruppen zeigte sich im Serum keine signifikant erhöhte Enzymaktivität gegenüber der Kontrollgruppe.

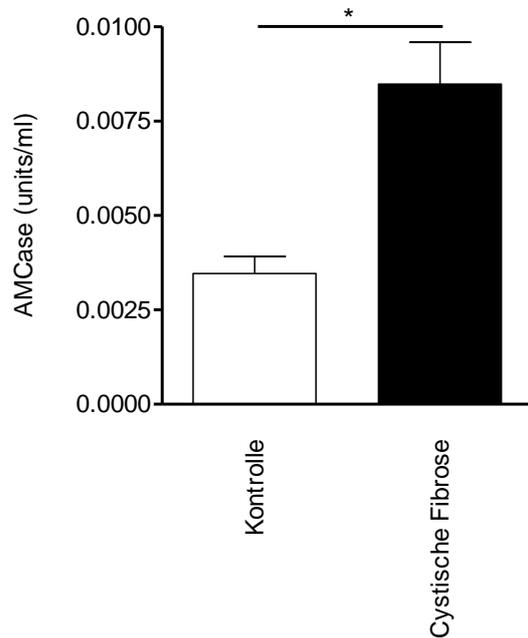


Abbildung 16: AMCase-Enzymaktivität im Sputum (in units/ml)

Die Untersuchungen der Enzymaktivität von saurer Säuger-Chitinase zeigten im Sputum von CF-Patienten signifikant höhere Werte im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

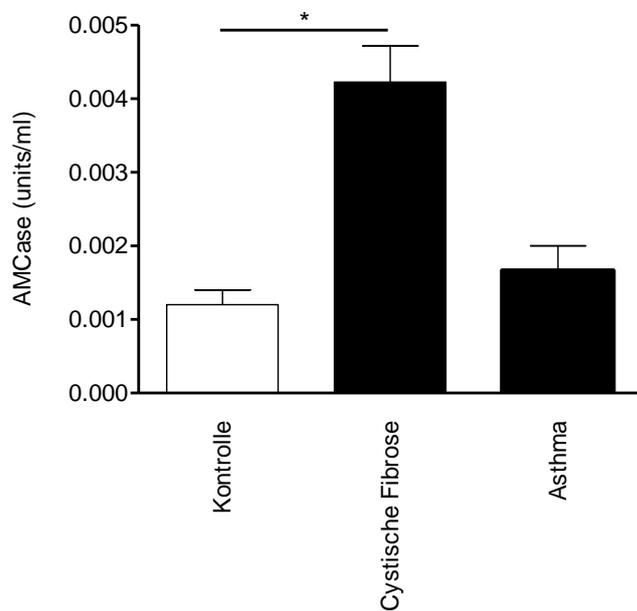


Abbildung 17: AMCase-Enzymaktivität in der BALF (in units/ml)

Die Messungen der Enzymaktivität von saurer Säuger-Chitinase in der BALF zeigten signifikant erhöhte Werte bei CF-Patienten und leicht erhöhte Werte in den Asthma-Proben im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.3 in vitro

4.3.1 PMN (Polymorphnukleäre Neutrophile Granulozyten)

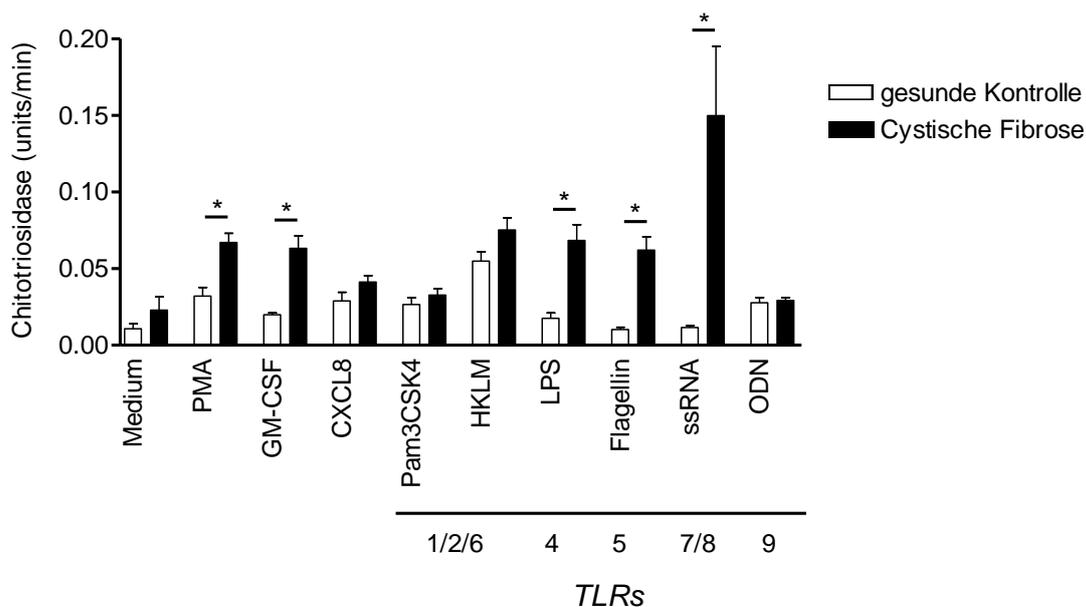


Abbildung 18: Chitotriosidase-Enzymaktivität (in units/min) im Zellkulturüberstand nach Stimulation von PMN mit verschiedenen (TLR-) Liganden für 6 Stunden bei 37 °C

Abbildung 18 stellt die Messungen von Chitotriosidase-Enzymaktivität im Zellkulturüberstand der neutrophilen Granulozyten von CF-Patienten bzw. gesunden Kontrollen mit und ohne Stimulation dar. Die Zellen wurden mit verschiedenen bakteriellen und viralen (TLR-) Liganden stimuliert und für 6 Stunden bei 37 °C inkubiert. Es zeigte sich, dass die Stimulation der CF-Zellen durchweg höhere Enzymaktivitäts-Werte hervorrief als die Stimulation von Zellen gesunder Kontrollprobanden. PMA, GM-CSF, LPS (TLR4), Flagellin (TLR5) und ssRNA (TLR8) hatten den stärksten Effekt auf die CF-Zellen. Die Chitotriosidase-Aktivität im Kulturüberstand der CF-Zellen nach Stimulation mit PMA war mehr als doppelt so hoch wie im Überstand der Zellen gesunder Probanden. Nach Stimulation mit GM-CSF zeigte sie sich mehr als 3-fach so hoch und nach Stimulation mit dem TLR4-Liganden LPS wies die Aktivität einen über 4-fach erhöhten Wert gegenüber den gesunden Kontrollen auf. Die Stimulation der neutrophilen Granulozyten von

CF-Patienten mit Flagellin (TLR5) ergab einen Anstieg der Chitotriosidase-Aktivität auf einen knapp 7-fach höheren Wert als bei der Kontrollgruppe. Die Stimulation mit ssRNA (TLR8) ergab eine Aktivität, die ca. 15-fach gegenüber dem Wert der gesunden Probanden erhöht war. Als etwas schwächer erwiesen sich die Effekte bei Zugabe von CXCL8, Pam3cSK4 (TRL1/2), HKLM (TRL2) und ODN (TLR9): Die Chitotriosidase-Aktivität zeigte sich bei CF tendenziell gegenüber den Kontrollen erhöht, jedoch nicht signifikant.

4.3.2 PBMC (Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)

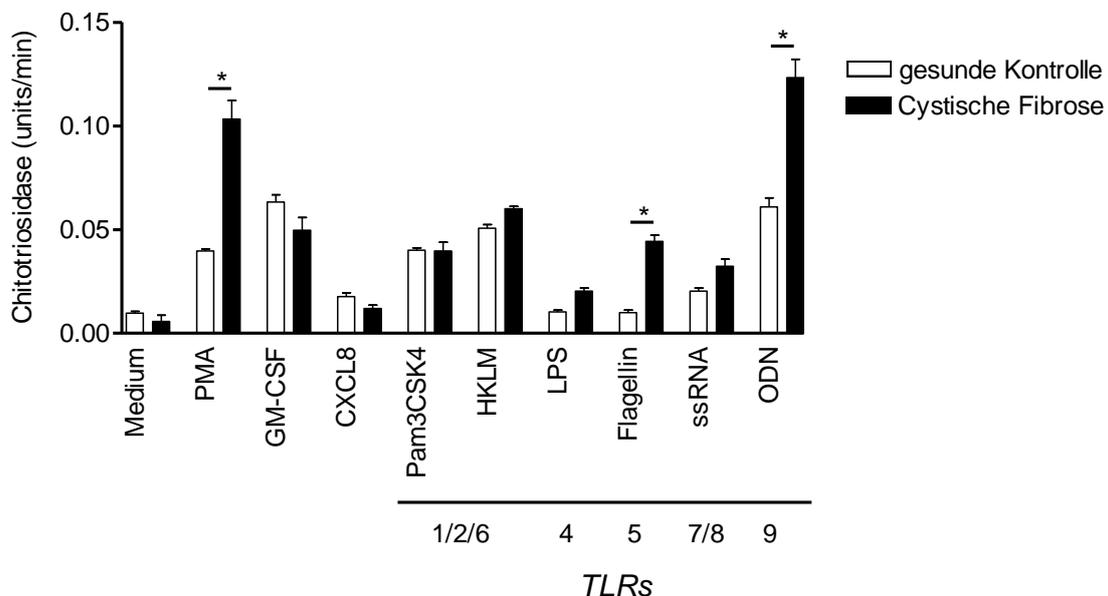


Abbildung 19: Chitotriosidase-Enzymaktivität (in units/min) im Zellkulturüberstand nach Stimulation von PBMC mit verschiedenen (TLR-) Liganden für 6 Stunden bei 37 °C

Abbildung 19 zeigt die Messungen von Chitotriosidase-Enzymaktivität im Zellkulturüberstand der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) von CF- bzw. Kontroll-Probanden mit und ohne Stimulation. Die Zellen wurden mit bakteriellen und viralen (TLR-) Liganden stimuliert und für 6 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach Stimulation der Zellen mit PMA, Flagellin (TLR5) und ODN (TLR9) zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Enzymaktivität im Zellkulturüberstand bei CF-Patienten (5-fach bzw. 2,5-fach bzw. 2-fach erhöht gegenüber den gesunden

Kontrollen). Die Stimulation mit Pam3CSK4 (TLR1/2), HKLM (TLR2), LPS (TLR4) und ssRNA (TLR8) führte zum Nachweis einer moderat erhöhten Enzymaktivität gegenüber den Kontrollen, während die Stimulationsversuche mit GM-CSF und CXCL8 keinen Anstieg der Enzymaktivität gegenüber den Kontrollen zeigten.

5 Diskussion

In der vorgelegten Studie wurden Chitinasen und Chitinase-ähnliche Proteine bei der CF-Lungenerkrankung *ex vivo* und *in vitro* untersucht. Dabei konnten signifikant erhöhte Proteinkonzentrationen von YKL-40 bzw. Enzymaktivitäten von Chitotriosidase und saurer Säuger-Chitinase (Acidic Mammalian Chitinase, AMCCase) im Serum, Sputum und der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BALF) von Patienten mit Cystischer Fibrose (CF) im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. *In vivo*-Untersuchungen am Tiermodell wiesen erhöhte Konzentrationen von BRP-39, dem murinen Analogon zum humanen YKL-40, in der BALF von CF-ähnlichen β -ENaC-Transgen-Mäusen im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen nach. Für beide Proteine, YKL-40 und BRP-39, ergaben sich Korrelationen mit klinischen (Lungen-) Funktionsparametern im humanen bzw. murinen CF-Modell. Im Rahmen der *in vitro*-Untersuchungen konnten Stimuli identifiziert werden, die zur verstärkten Expression von Chitotriosidase aus neutrophilen Granulozyten bzw. mononukleären Zellen führen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen darauf hin, dass die beiden analysierten Chitinasen sowie das Chitinase-ähnliche Protein YKL-40 eine wichtige Rolle im Rahmen der CF-Lungenerkrankung spielen und zukünftig therapeutische Ansatzpunkte bei neutrophilen Lungenerkrankungen bieten könnten.

5.1 Chitinase-ähnliche Proteine

Es wurden das Chitinase-ähnliche Protein YKL-40 beim Menschen und sein murines Analogon BRP-39 in der Maus untersucht. Als Krankheitsgruppen beim Menschen dienten Cystische Fibrose, M. Gaucher und Asthma bronchiale. Analysiert wurde unterschiedliches Probenmaterial, u.a. Serum, Sputum und BALF der Probanden. Im Tiermodell wurde BRP-39 in der BALF von β -ENaC-Transgen-Mäusen im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen analysiert. Die Ergebnisse der humanen bzw. murinen Proteinmessungen wurden jeweils mit klinischen Parametern der Lungenfunktionsprüfung korreliert. Es zeigte sich, dass CF-Patienten erhöhte Proteinkonzentrationen von YKL-40 im Kreislauf und in den Atemwegen aufweisen. Ähnliche Ergebnisse fanden sich für BRP-39 bei den Experimenten mit transgenen Tieren im Rahmen eines murinen CF-Modells. Sowohl für

die humane als auch die murine CF-Erkrankung konnten erhöhte Level von YKL-40 bzw. BRP-39 klinisch mit einer verstärkten Atemwegsobstruktion im Lungenfunktionstest korreliert werden.

5.1.1 YKL-40/BRP-39

Die CF-Lungenerkrankung ist charakterisiert durch einen chronischen Entzündungsprozess, der überwiegend durch neutrophile Granulozyten unterhalten wird und langfristig zur Zerstörung des pulmonalen Gewebes führt⁵⁷. Dementsprechend gelten die pathologischen Vorgänge in der Lunge als richtungsweisend für die Morbidität und Mortalität der Erkrankung⁵⁴⁻⁵⁶. Das Chitinase-ähnliche Protein YKL-40 gilt als „Marker-Protein“ der spezifischen Granula von neutrophilen Granulozyten²⁰ und wurde bereits in einer Reihe früherer Studien untersucht, u.a. zu den beiden (neutrophilen) Lungenerkrankungen Asthma bronchiale (Chupp et al.)³² und COPD (Letuve et al.)³³. In diesem Zusammenhang wurde eine mögliche Rolle des Proteins im Rahmen von Entzündung und Gewebeumbau diskutiert und YKL-40 als möglicher zukünftiger Biomarker und therapeutische Zielstruktur vorgestellt. Seine Expression bei der Cystischen Fibrose, die als „Prototyp“ der neutrophilen Lungenerkrankungen gilt, wurde bisher nicht untersucht. Wir stellten die Hypothese auf, dass die Proteinexpression von YKL-40 bei Patienten mit CF vor allem in den Atemwegen erhöht ist und mit den Ergebnissen der Lungenfunktion (Atemwegsobstruktion) der Patienten korreliert.

Es zeigte sich, dass CF-Patienten stark erhöhte Konzentrationen von YKL-40 in den Atemwegen (Sputa > BALF) aufweisen, die zudem mit dem Ausmaß der neutrophilen Entzündungsreaktion in der Lunge assoziiert sind. So korrelierten die Level von YKL-40 in den Sputa der CF-Patienten jeweils positiv mit der darin enthaltenen Anzahl an neutrophilen Granulozyten, nicht jedoch mit der Anzahl an Eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten oder Makrophagen (siehe Kommentar zu Abb. 6 und 7). Diese Ergebnisse konnten im murinen CF-Krankheitsmodell bestätigt werden: Es zeigten sich, entsprechend den Ergebnissen beim Menschen, erhöhte Level von BRP-39 in der BALF von β -ENaC-Transgen-Mäusen im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen (siehe Abb. 10).

Dies führt zu der Frage, unter welchen Bedingungen es zu diesen stark erhöhten Konzentrationen von YKL-40 in den Atemwegen von CF-Patienten kommt. Die Tatsache, dass überhöhte YKL-40-Level in den Atemwegen der CF-Probanden mit dem Ausmaß der

Neutrophilen-Invasion in der Lunge korrelieren, stützt nebst einigen anderen Punkten unserer Studie die Annahme, dass YKL-40 in CF-Patienten mehr das Ausmaß der neutrophilen Entzündungsreaktion in der Lunge reflektiert, als dass seine Regulation direkt dem Einfluss des CF-Gendefekts (*CFTR*) untersteht:

- (i) Vorangehende Studien konnten zeigen, dass neutrophile Granulozyten das Protein YKL-40 in ihren spezifischen Granula speichern^{20,73}.
- (ii) Später gelang verschiedenen Arbeitsgruppen der Nachweis, dass neutrophile Granulozyten in den Atemwegen von CF-Patienten CD66b exprimieren. Das Protein zeigt die Aktivierung der Zellen und die Ausschüttung ihrer spezifischen Granula an^{28,93}.
- (iii) Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die höchsten Spiegel von YKL-40 in CF-Sputa gefunden wurden, wo zahlreiche aktivierte neutrophile Granulozyten zu finden sind. Ihre Zellzahl korrelierte zudem mit den Proteinleveln von YKL-40 im Sputum (siehe Abb. 6 und 7).

YKL-40 konnte in CF-Seren hingegen nur in moderater Erhöhung nachgewiesen werden. Möglicherweise tritt das Protein mit steigender Konzentration aus den Atemwegen in die Zirkulation über, was die erhöhten Spiegel in den Seren der CF-Patienten erklären würde. Gleichwohl wäre möglich, dass neutrophile Granulozyten mit *CFTR*-Defekt grundsätzlich mehr YKL-40 freisetzen als Zellen gesunder Kontrollen. Dies ist eine wichtige Hypothese, derer man sich in zukünftigen Studien annehmen muss.

Eine weitere entscheidende Fragestellung war, ob in der Lunge sezerniertes YKL-40 bzw. BRP-39 klinisch mit dem Schweregrad der CF-Lungenerkrankung korreliert. In diesem Zusammenhang konnten wir zeigen, dass sowohl im Menschen als auch im Mausmodell der CF-Lungenerkrankung, erhöhte Konzentrationen von YKL-40 bzw. BRP-39 in den Atemwegen (Sputa bzw. BALF) mit einer erhöhten Atemfluss-Obstruktion im Lungenfunktionstest assoziiert waren (FEV_1 bzw. Resistance, siehe Abb. 8 und 11). Für die Parameter zur Charakterisierung einer restriktiven Ventilationsstörung traf dies nicht zu. Bereits 2009 konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die beiden Proteine entscheidenden Einfluss auf die Atemwegsobstruktion haben können, indem sie als wichtige Bindeglieder im Rahmen der Allergen-Sensibilisierung und IgE-Produktion fungieren¹⁶.

Zusammenfassend konnte in der hier vorliegenden Studie gezeigt werden, dass bei CF-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollprobanden durchweg höhere Konzentrationen des Chitinase-ähnlichen Proteins YKL-40 vorliegen. Diese Ergebnisse konnten durch Studien an einem murinen CF-Krankheitsmodell mit transgenen β -ENaC-Mäusen bestätigt werden. Sowohl beim Menschen als auch in der Maus korrelierten die jeweiligen YKL-40- bzw. BRP-39-Level (positiv) mit der Atemfluss-Obstruktion im Lungenfunktionstest. Diese Ergebnisse passen zu den Resultaten der Studie von Lee et al.: Mit Hilfe von *brp-39*-knock-out-Mäusen und Mäusen mit Überexpression von YKL-40 zeigten sie, dass YKL-40 und BRP-39 eine entscheidende Rolle im Gewebeumbau, in der Regulation der Apoptose und in der Entstehung der Atemwegsobstruktion spielen. Die Proteine fungieren dabei als wichtige Regulatoren in der Allergen-Sensibilisierung und IgE-Produktion¹⁶. Damit könnte YKL-40 in Zukunft eine wichtige Rolle als Biomarker und therapeutische Zielstruktur bei der CF-Lungenerkrankung zukommen. Trotz großer Fortschritte, die bei der Erforschung von Chitinase-ähnlichen Proteinen in den letzten Jahren gemacht wurden, sind weitere Untersuchungen nötig, die sich der Erforschung der biologischen Funktion von YKL-40 widmen, um die Rolle des Chitinase-ähnlichen Proteins in der (Patho-) Physiologie der CF-Lungenerkrankung weiter zu evaluieren.

5.2 Chitinasen

In der vorliegenden Studie wurden die Enzymaktivitäten von Chitotriosidase und saurer Säuger-Chitinase (Acidic Mammalian Chitinase, AMCCase) bei CF-Patienten untersucht. Als Probenmaterial dienten Serum-, Sputum- und BALF-Proben von Patienten mit Cystischer Fibrose, M. Gaucher und Asthma. Chitotriosidase konnte mit erhöhter enzymatischer Aktivität sowohl in der Lunge als auch im Kreislauf der CF-Patienten nachgewiesen werden. Im Falle der sauren Säuger-Chitinase fanden sich signifikant erhöhte Aktivitätslevel in der Lunge, nicht jedoch im Serum der CF-Patienten.

5.2.1 Chitotriosidase

Hollak et al. entdeckten 1994 im Plasma von Patienten mit der lysosomalen Speicherkrankheit M. Gaucher eine Enzymaktivität, die das Substrat 4-Methylumbelliferyl-Chitotrioside mit 1000-facher Kapazität hydrolysieren konnte. Das verantwortliche Enzym wurde Chitotriosidase genannt^{46,61}. Weiterführende Studien zeigten, dass Chitotriosidase bei M. Gaucher-Patienten überwiegend von Lipid-beladenen Makrophagen, den sog. „Gaucher-Zellen“ freigesetzt wird⁶. Heute wird das Enzym im Rahmen des Therapie-Managements der Gaucher-Erkrankung regelmäßig im Serum der Patienten bestimmt⁴⁷. Neben Makrophagen gelten heute neutrophile Granulozyten, welche Chitotriosidase in ihren spezifischen Granula speichern, als Hauptproduzenten des Enzyms^{19,78}. Diese beiden Zelltypen dominieren wiederum die chronische pulmonale Entzündungsreaktion im Krankheitsbild der Cystischen Fibrose^{50,59}.

Die Expression des Enzyms Chitotriosidase bei der CF-Lungenerkrankung wurde bislang nicht untersucht und war ein Gegenstand der vorliegenden Studie. Wir stellten die Hypothese auf, dass die Enzymexpression von Chitotriosidase bei Patienten mit CF systemisch und/oder pulmonal erhöht ist. Zudem war von Interesse, auf welche Reize hin Makrophagen bzw. neutrophile Granulozyten Chitotriosidase produzieren und freisetzen. Wir quantifizierten daher zunächst die Enzymaktivität von Chitotriosidase im Serum, Sputum und der BALF von CF-Patienten. Als Vergleichsgruppe dienten unter anderem Serum-Proben von M. Gaucher-Patienten.

In den Messungen zeigte sich sowohl bei CF- als auch bei M. Gaucher-Patienten eine starke Erhöhung der Chitotriosidase-Aktivität im Serum. Für Chitotriosidase-Enzymaktivität im Serum wurde ein „Alterseffekt“ festgestellt, das heißt mit steigendem

Alter konnte in verschiedenen Studien auf niedrigem Niveau erhöhte Enzymaktivitäten nachgewiesen werden^{44,94-98}. Die Höhe der Enzymaktivität in den untersuchten Serum-Proben liegt sowohl für CF (ca. 10-fach), als auch für M. Gaucher (ca. 15-fach) über den Werten, die man alters-assoziert erwarten würde⁹⁷. In den BALF-Proben von CF-Patienten zeigte sich ebenfalls stark erhöhte Aktivität der Chitinase, der moderate Anstieg der Enzymaktivität fand sich in den CF-Sputum-Proben.

Sowohl für neutrophile Granulozyten als auch für Makrophagen konnten bereits in verschiedenen Studien Stimuli identifiziert werden, die zur Induktion bzw. Ausschüttung von Chitotriosidase führen. Für **Makrophagen** definierten Bussink et al. folgende Substanzen als starke Induktoren des Genprodukts Chitotriosidase: in den Zellen akkumulierende Glykosphingolipide, Eisen und/oder Glykogen. Außerdem scheint der Wachstumsfaktor „granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)“ die Chitotriosidase-Expression in Makrophagen zu steigern⁶. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 20 dargestellt:

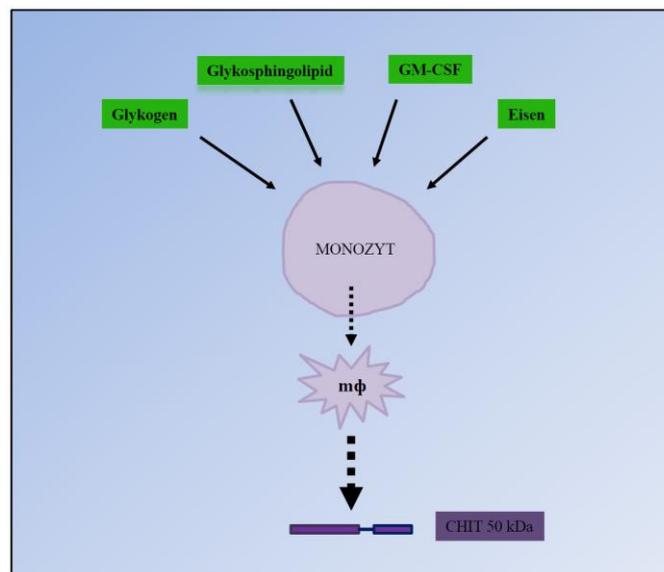


Abbildung 20: Regulation der Chitotriosidase-Expression in humanen Makrophagen.
mφ=Makrophage, CHIT=Chitotriosidase (nach⁶)

Dementsprechend lässt sich erhöhte Chitotriosidase-Enzymaktivität in einer Reihe von Erkrankungen nachweisen, denen alle (i) eine Aktivierung von Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems (MMS) gemein ist und (ii) bei denen alle eine Überladung dieser Zellen mit Glykosphingolipid bzw. mit anderen Lipiden, Eisen und/oder Glykogen vorliegt. Tabelle 7 gibt dazu einen Überblick:

Krankheitscharakter	Krankheit	Akkumulierende Substanz	Zelltyp
Lysosomale Speicherkrankheiten	M. Gaucher ^{46,95,99} M. Niemann-Pick A/B/C ⁹⁵ GM ₁ -Gangliosidosis ⁹⁵ M. Krabbe ⁹⁵ Wolman-Krankheit ⁹⁵	Lipid	Makrophagen
Artherosklerose	Artherosklerose ^{6,44,100} Koronare Herzkrankheit ^{12,101}	Lipid	Makrophagen („Schaum-Zellen“)
Hämatologische Funktionsstörungen	Malaria (<i>Pl. falciparum</i>) ^{12,102} β -Thalassämie ^{6,12,103}	Eisen / Lipid	Makrophagen
Neuro-degenerative Funktionsstörungen	Multiple Sklerose ^{6,104}	Myelin	Makrophagen
Entzündung	Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) ^{12,105} Sarkoidose ^{6,106}	Lipid	Kupffer-Sternzellen (Granulomatöse) Makrophagen
Glykogen-Speicherkrankheiten	Glykogen-Speicherkrankheit Typ IV ^{6,107}	Glykogen	Kupffer-Sternzellen

Tabelle 7: Überblick über Erkrankungen mit erhöhter Chitotriosidase-Enzymaktivität im Serum und der jeweils pathologisch gespeicherten Substanz in Zellen des MMS (nach¹²)

Die höchsten Werte von Chitotriosidase-Enzymaktivität finden sich, wie oben bereits erwähnt, im Serum von Patienten mit der lysosomalen Speichererkrankung M. Gaucher. Lysosomale Speichererkrankungen sind allgemein charakterisiert durch Enzymdefekte, die zu einer pathologisch erhöhten Lipidanreicherung in den Lysosomen der Zellen führen. Aber auch in anderen Erkrankungen, deren gemeinsames Merkmal die zelluläre Akkumulation von Lipiden ist, fanden sich (etwas geringer) erhöhte Enzymaktivitäts-Level von Chitotriosidase. Die folgende Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse von Chitotriosidase-Enzymaktivitätsmessungen bei verschiedenen lysosomalen Speichererkrankungen im Vergleich mit den Ergebnissen, die im Rahmen der vorliegenden Studie bei CF gemacht werden konnten.

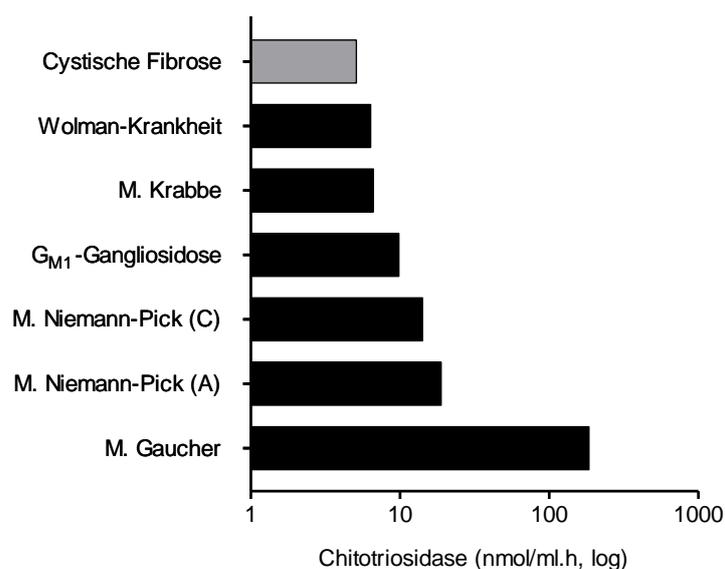


Abbildung 21: Chitotriosidase-Enzymaktivität im Serum (relative Mittelwerte in nmol/ml.h, Referenzgruppe=1) bei lysosomalen Speichererkrankungen und CF (nach¹⁰⁸)

Im Jahre 2008 publizierten Teichgräber et al. die Ergebnisse einer Studie, die zeigen, dass es auch im Falle der Cystischen Fibrose zu einer pathologisch gesteigerten Akkumulation von Lipid in den Zellen kommt¹⁰⁹. Zunächst wies die Arbeitsgruppe vermehrt anfallendes Ceramid in intrazellulären Vesikeln von Epithelzellen des Respirationstraktes CFTR-defizienter Mäuse nach. Anschließend untersuchten sie Gewebeproben von CF-Patienten und bestätigten auch hier die vermehrte Ceramid-Akkumulation in den Epithelzellen des Respirationstraktes und in submukösen Drüsen¹⁰⁹. Wenig später entdeckte die Arbeitsgruppe Zhang et al., dass auch in CFTR-defizienten (Alveolar-) Makrophagen von CF-Patienten eine gesteigerte (lysosomale) Lipid-Speicherung auftritt⁸³. Ausgangspunkt dieser Pathophysiologie ist die der CF-Krankheit zugrunde liegende Mutation des *CFTR*-Gens, welches für den „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)“ kodiert. CFTR ist ein Chloridkanal, der in den Epithelzellen des Respirationstrakts sowie der Haut, aber auch in Makrophagen und Lymphozyten exprimiert wird. Nachweislich befindet er sich sowohl in der Zellmembran als auch in intrazellulären Vesikeln, insbesondere den Lysosomen^{53,110}. Bedingt durch den defekten CFTR-Chloridkanal, kommt es bei CF-Patienten zur Alkalisierung dieser Zell-Organellen⁸². Der zunehmend basische pH in den Lysosomen bewirkt ein Ungleichgewicht zwischen den Aktivitäten der dort angesiedelten, pH-sensitiven Enzymen „Saure Sphingomyelinase“ (acid

sphingomyelinase, ASM) und „Saure Ceramidase“ (acid ceramidase, AC), die für Auf- bzw. Abbau von Ceramid zuständig sind^{84,109-112}. Während die Aktivität der Sauren Ceramidase, die Ceramid abbaut, durch die Alkalisierung des pH-Wertes fast vollständig blockiert wird, vermindert sich die Aktivität der Sauren Sphingomyelinase, welche Ceramid freisetzt, um nur ca. 30%^{84,109,111}. In der Folge akkumuliert Ceramid, ein Glykosphingolipid⁸⁰, in den Lysosomen und später auch in anderen Membranen CFTR-defizienter Zellen und wirkt dort als möglicher Stimulus für die Chitotriosidase-Synthese^{6,83,109}. Die Rolle des CFTR-Kanals im Zusammenhang mit der pH-Regulation intrazellulärer Vesikel bei CF wird in der Literatur allerdings kontrovers diskutiert. Barasch et al. demonstrierten, dass in CFTR-defekten Zellen eine Alkalisierung des trans-Golgi-Netzwerkes und von Mannose-6-Phosphat-positiven Vesikeln bzw. Prä-Lysosomen stattfindet⁸⁴. Diese Ergebnisse konnten später durch verschiedene Studien untermauert werden, welche die Alkalisierung von Lysosomen und Phagosomen in Alveolar-Makrophagen nachwiesen⁸²⁻⁸⁵. Andere wiederum konnten keinen Nachweis erbringen, dass der (defekte) CFTR-Kanal Einfluss auf die Regulation des pHs intrazellulärer Organellen bei CF ausübt^{83,113,114}. Die Diskrepanzen der Ergebnisse bezüglich der Rolle des CFTR-Kanals bei der Regulation des vesikulären pHs könnten der Tatsache geschuldet sein, dass in den genannten Studien jeweils verschiedene Zellsysteme und verschiedene Techniken verwendet wurden. Bringt man jedoch alle Ergebnisse in Zusammenhang, kann die in der vorliegenden Studie nachgewiesene erhöhte Chitotriosidase-Aktivität im Serum von CF-Patienten ein weiterer Hinweis auf die Richtigkeit des oben vorgestellten Konzepts sein:

- (i) Vorangehende Studien konnten zeigen, dass es bei CF-Patienten durch den defekten CFTR-Kanal in (Alveolar-) Makrophagen zu einer Alkalisierung der zellulären Lysosomen kommt⁸².
- (ii) Durch den steigenden pH-Wert in den Zellorganellen wird die Aktivität der dort angesiedelten Sauren Ceramidase, die Ceramid abbaut, fast vollständig blockiert^{84,109,111}.
- (iii) Ceramid akkumuliert in den Lysosomen der Zellen. Entsprechend den Ergebnissen von Bussink et al. ist dies ein möglicher Stimulus für die Chitotriosidase-Expression in CFTR-defizienten Makrophagen⁶.

- (iv) Entsprechend konnte Chitotriosidase im Rahmen der hier vorliegenden Studie mit stark erhöhter enzymatischer Aktivität sowohl im Serum, als auch im Sputum und der BALF von CF-Patienten nachgewiesen werden (siehe Abb. 12-14).

Auch für **neutrophile Granulozyten**, neben Makrophagen die Hauptproduzenten von Chitotriosidase^{19,78}, definierten Bussink et al. bestimmte Stimuli, die zur Ausschüttung des Enzyms aus den spezifischen Granula der Zellen führen: Dies scheint insbesondere durch den „granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)“ bzw. Kontakt mit pathogenem Mimikry stattzufinden⁶. In Abbildung 22 wird dieser Zusammenhang veranschaulicht:

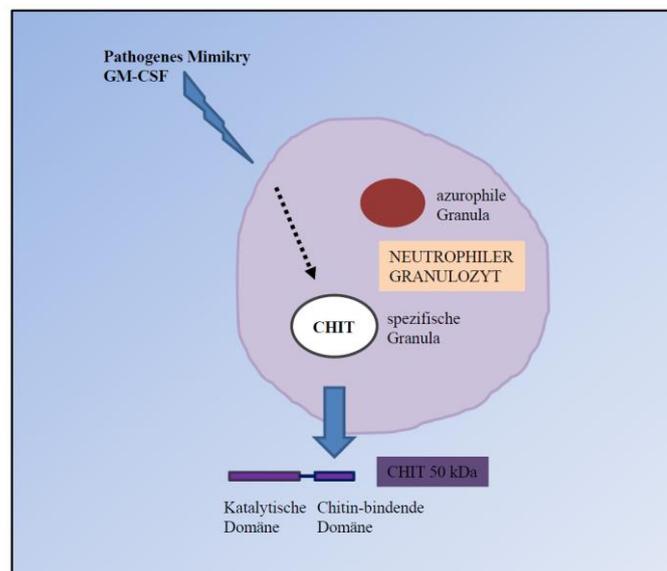


Abbildung 22: Freisetzung von Chitotriosidase aus den spezifischen Granula von neutrophilen Granulozyten. CHIT=Chitotriosidase (nach⁶)

Auch hier liegen entsprechende Korrelationen zur CF-Lungenerkrankung vor. Adib-Conquy et al. konnten zeigen, dass die Gene für GM-CSF (auch G-CSF und M-CSF) in neutrophilen Granulozyten von Probanden mit Cystischer Fibrose hochreguliert waren¹¹⁵. Hartl et al. analysierten 2006 die BALF von CF-Patienten mit und ohne *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion in der Lunge. Die Ergebnisse zeigten signifikant erhöhte Konzentrationen von GM-CSF in der BALF beider Untersuchungsgruppen¹¹⁶. Die *in vitro*-Ergebnisse der hier vorliegenden Studie ergaben eine signifikant erhöhte Chitotriosidase-Enzymaktivität nach Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit GM-CSF (siehe Abb. 18).

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Studie eine erhöhte Enzymaktivität von Chitotriosidase im Serum, Sputum und der BALF von CF-Patienten nachgewiesen werden. Chitotriosidase konnte bereits in früheren Studien in verschiedenen Erkrankungen mit erhöhter Aktivität nachgewiesen werden, dabei fand sich die absolut höchste Enzymaktivität bei Patienten mit der lysosomalen Speicherkrankheit M. Gaucher. Hier scheinen besondere Mechanismen zur verstärkten Induktion und Ausschüttung des Enzyms zu führen, welche von verschiedenen Autoren Stück für Stück identifiziert werden konnten. In dem Versuch, diese Mechanismen auf die pathophysiologischen Vorgänge bei der CF-Lungenerkrankung zu übertragen, ließen sich aus den Ergebnissen der vorliegenden sowie früheren Studien folgende Aussagen ableiten:

- (i) Makrophagen und neutrophile Granulozyten gelten als Hauptproduzenten von Chitotriosidase im menschlichen Organismus^{19,78}. Beide Zelltypen dominieren die Entzündungsreaktion, die sich chronisch in den Atemwegen von CF-Patienten abspielt^{50,59}.
- (ii) Makrophagen produzieren verstärkt Chitotriosidase bei Einwirkung von „Stress“ auf die Lysosomen der Zelle (z. B. pathologisch gesteigerte Lipid-, Eisen- oder Glykogen-Akkumulation in den Zell-Organellen und/oder Einwirkung von GM-CSF)⁶. Eine verstärkte Lipidspeicherung in CFTR-defekten (Alveolar-) Makrophagen sowie Atemwegsepithelien und submukösen Drüsen von CF-Patienten konnte in jüngsten Studien demonstriert werden^{83,109}.
- (iii) Die verstärkte Ausschüttung von Chitotriosidase aus neutrophilen Granulozyten ist u.a. auf die Einwirkung von GM-CSF auf die Zellen zurückzuführen⁶. Dies konnte durch die *in vitro*-Ergebnisse der hier vorliegenden Studie bestätigt werden. Erhöhte Konzentrationen von GM-CSF in BALF von CF-Patienten sowie eine Hochregulierung der zugehörigen Gene in neutrophilen Granulozyten von CF-Patienten konnten in vorangehenden Studien nachgewiesen werden^{115,116}.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen damit auf eine wichtige Rolle von Chitotriosidase bei der CF-Lungenerkrankung hin. Sie zeigen, dass die Erkrankung mit signifikant erhöhter Aktivität des Enzyms Chitotriosidase einhergeht. Die vermehrte Produktion/Ausschüttung des Enzyms geht überwiegend auf aktivierte Makrophagen und neutrophile Granulozyten zurück, welche typischerweise in großer Zahl vor allem in der

Lunge der CF-Patienten zu finden sind und dort eine chronische Entzündungsreaktion unterhalten. Damit könnte die Bestimmung von Chitotriosidase bei CF-Patienten gegebenenfalls als Verlaufsparemeter Bedeutung erlangen. Einige Theorien, die sich mit den Mechanismen zur Induktion bzw. Ausschüttung des Enzyms durch die beiden genannten Zelltypen beschäftigen, wurden in der vorliegenden Arbeit diskutiert und müssen in zukünftigen Studien weiter verifiziert werden.

5.2.2 Saure Säuger-Chitinase (Acidic Mammalian Chitinase)

Boot et al. berichteten im Jahre 2001, kurze Zeit nach der Entdeckung des Enzyms Chitotriosidase im menschlichen Organismus, über die Identifizierung einer weiteren Chitinase in Säugetieren. Das Enzym zeigte in den Messungen einen sauren isoelektrischen Punkt und wurde infolge dessen „Acidic Mammalian Chitinase“ (AMCase, saure Säuger-Chitinase) genannt¹¹⁷. Die Exo-Chitinase wird bisher vor allem mit der Pathogenese des Asthma bronchiale in Verbindung gebracht^{32,45}. Mitarbeiter der „Yale University School of Medicine“ konnten zeigen, dass bei sensibilisierten Mäusen eine Allergen-Provokation zu einem starken Anstieg der Expression von AMCase im Lungengewebe und zu einer Zunahme der Chitinase-Aktivität in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BALF) führte, was bei unbehandelten Kontrolltieren nicht der Fall war. Die Konzentration von AMCase in den Lungen der Asthma-kranken Mäuse war so hoch, dass diese als Kristalle ausfielen. Die Arbeitsgruppe Zhu et al. fand weiterhin, dass Th₂-polarisierte, nicht jedoch Th₁-polarisierte Zellen, die mRNA- und Protein-Expression von AMCase stimulierten. Die Induktion der Chitinase fehlte bei IL-13-defizienten Mäusen und eine lungenspezifische Überexpression von IL-13 induzierte die Expression der Chitinase. Die Arbeitsgruppe schlussfolgerte, dass AMCase selektiv über einen Th₂-, IL13-spezifischen Pfad induziert wird und damit zur Pathogenese des allergischen Asthmas beiträgt⁴⁵. Lungenepithelzellen, die mit rekombinanter AMCase behandelt wurden, produzierten verstärkt die Th₂-assoziierten Chemokine Eotaxin und MCP-1. Zur Evaluation der therapeutischen Relevanz ihrer Ergebnisse bezüglich Asthma bronchiale führte die Arbeitsgruppe Versuche mit dem Chitinase-Inhibitor Allosamidin sowie anti-AMCase-Serum durch. Die Inhibition von saurer Säuger-Chitinase führte u.a. zur verminderten Expression von Eotaxin und MCP-1 sowie zur Abnahme der Atemwegsüberempfindlichkeit. Außerdem wurde die Einwanderung von Makrophagen, Eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten in die

Lunge gehemmt. Weiterhin gelang es der Arbeitsgruppe, die Expression der sauren Säuger-Chitinase auch im Lungengewebe von Asthma-Patienten nachzuweisen. Immunohistochemisch konnten sie zeigen, dass AMCCase in Lungenepithelzellen und Alveolar-Makrophagen von Patienten mit Asthma bronchiale lokalisiert war. Dort lag sie als intrazelluläres und sezerniertes Protein vor, wobei die sezernierte Form überwog. Bei lungengesunden Kontrollprobanden konnte keine Expression nachgewiesen werden⁴⁵.

Die Expression der sauren Säuger-Chitinase bei der Lungenerkrankung Cystische Fibrose wurde bislang nicht untersucht. Wir stellten die Hypothese auf, dass das Enzym im Rahmen der chronischen Entzündungsreaktion vermehrt in den Lungen und/oder im Organismus der CF-Patienten exprimiert wird. Dazu untersuchten wir Serum-, Sputum- und BALF-Proben von CF-Patienten auf erhöhte Enzymaktivität der sauren Säuger-Chitinase. Asthma-Proben dienten als Analyse-Vergleichsgruppe. In unseren Experimenten zeigte AMCCase die signifikant höchste Enzymaktivität in der BALF von CF-Patienten (4-fach erhöht gegenüber Kontrollen bzw. 2,5-fach erhöht gegenüber Asthma-Proben, siehe Abb. 17). Auch in den Sputa von CF-Patienten konnte eine signifikant erhöhte Enzymaktivität nachgewiesen werden (2,5-fach erhöht gegenüber Kontrollen, siehe Abb. 16), nicht jedoch in den Seren der CF-Patienten. Dies könnte der Tatsache geschuldet sein, dass als Produzenten von saurer Säuger-Chitinase in Mensch und Maus neben gastrointestinalen Epithelien vor allem Atemwegsepithelien und Alveolar-Makrophagen identifiziert wurden^{3,12,45}.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass AMCCase bei CF-Patienten verstärkt in der Lunge exprimiert wird, stellte sich die Frage, auf welchen Stimulus hin dies geschieht. Die Arbeitsgruppe Hartl et al. untersuchte kürzlich in einer Studie das Auftreten verschiedener Zelltypen und Chemokine in der BALF von CF-Patienten mit und ohne *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion. Im Verlauf ihrer Erkrankung infizieren sich nahezu 80% aller CF-Patienten mit *Ps. aeruginosa*¹¹⁸. Das Bakterium ist damit der häufigste Verursacher von chronischen Lungeninfektionen bei CF¹¹⁹. Die Arbeitsgruppe entdeckte, dass die Konzentration von IL-13 in der BALF von CF-Patienten mit und ohne pulmonale *Ps. aeruginosa*-Infektion stark erhöht ist. Die höchsten Level von IL-13 konnten bei CF-Patienten nachgewiesen werden, die unter einer chronischen Infektion mit *Ps. aeruginosa* litten. In diesem Fall zeigte sich zudem eine vorwiegend Th₂-dominierte Immunantwort¹¹⁶. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Studien von Hartl bzw. Zhu et al. ist dies womöglich die Ursache für die gesteigerte Enzymaktivität von

saurer Säuger-Chitinase in der Lunge von CF-Patienten, die in der vorliegenden Studie nachgewiesen werden konnte. Ein ähnliches Szenario wie im Falle des Asthma bronchiale wäre denkbar und ist in Abbildung 23 schematisch dargestellt: Th₂-Helferzellen, von dendritischen Zellen per Antigenkontakt aktiviert, setzen IL-13 frei, das die Expression der sauren Säuger-Chitinase in Alveolar-Makrophagen und Atemwegsepithelien von CF-Patienten gezielt und potent stimuliert. Die Chitinase-Expression wiederum induziert in Lungenepithelzellen die Freisetzung von Chemokinen: u.a. MCP-1, MCP-2 und Makrophagen-Inflamations-Protein (MIP)-1 β , wodurch vorwiegend Monozyten rekrutiert werden. Außerdem Eotaxin, das Eosinophile Granulozyten anlockt sowie ENA-78, durch welches neutrophile Granulozyten in die Atemwege rekrutiert werden. Resultat ist eine pulmonale Inflammationsreaktion^{45,120}.

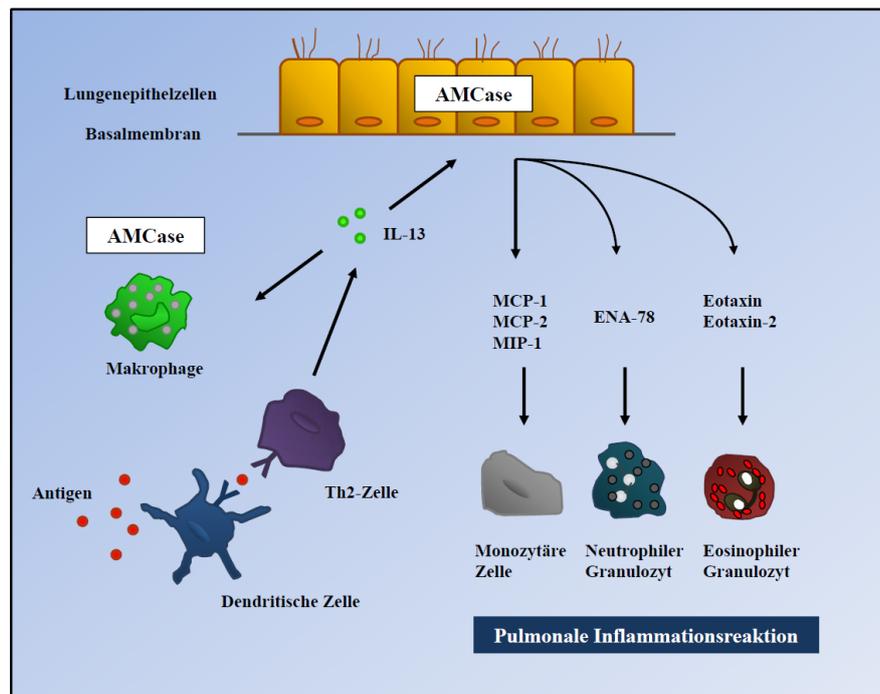


Abbildung 23: Die mögliche Rolle von AMCCase in der Pathogenese der Cystischen Fibrose (+*Ps. aeruginosa*-Infektion) (nach¹²⁰)

In der vorgelegten Studie waren 35 von 59 untersuchten CF-Patienten mit *Pseudomonas aeruginosa* infiziert. Weitere Studien, die *Ps. aeruginosa*-infizierte CF-Patienten unabhängig von nicht-infizierten Patienten auf erhöhte AMCCase-Enzymaktivität untersuchen sind notwendig, um das oben vorgestellte Konzept zu verifizieren.

Es ist festzuhalten, dass die saure Säuger-Chitinase eine wichtige Rolle in Th₂-dominierten, IL-13-vermittelten Immunantworten spielt. In der hier vorliegenden Arbeit konnte der Nachweis erbracht werden, dass die Chitinase bei CF-Patienten (in der Lunge) verstärkt exprimiert wird. Vorangehende Studien konnten zeigen, dass durch das Enzym verschiedene Botenstoffe in den Atemwegsepithelien induziert werden, die Entzündungszellen in die Lunge locken. Durch die Möglichkeit, AMCcase mittels pharmakologischer Substanzen in ihrer Ausprägung hemmen zu können, lässt sich der Circulus vitiosus aus Infektion und Inflammation durchbrechen. Inwieweit dies in Zukunft auch ein therapeutischer Ansatzpunkt bei der CF-Lungenerkrankung sein kann, muss in weiterführenden Studien untersucht werden.

5.3 *in vitro*

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Studie war es, Stimuli zu identifizieren, die unter *in vitro*-Bedingungen zur vermehrten Ausschüttung von Chitotriosidase aus neutrophilen Granulozyten und mononukleären Zellen des peripheren Blutes führen. Dabei konnten verschiedene Substanzen als starke Trigger für die Freisetzung von Chitotriosidase durch die jeweiligen Zelltypen identifiziert werden.

Das klinische Bild der Cystischen Fibrose wird dominiert durch die chronische Entzündungsreaktion in der Lunge, die sich bei einem Großteil der Patienten bereits im frühen Kindes- und Jugendalter manifestiert. Schon in den ersten ein bis zwei Lebensjahren beginnt die Kolonisation der Atemwege mit einer Reihe von mikrobiellen Erregern, u.a. *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* sowie einigen gram-negativen Keimen (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*)^{119,121}. *Pseudomonas aeruginosa*, der bei nahezu 80% aller CF-Patienten über 26 Jahren im Sputum nachzuweisen ist, tritt erst später hinzu und wird nach mehreren antibiotischen Behandlungen oftmals der dominierende Keim im Sputum^{52,118,122}. Als Wegbereiter für bakterielle Infektionen gelten virale Infekte und die Besiedelung der CF-Lunge mit Pilzen¹²³. Mit der bakteriellen Besiedelung der Lunge verstärkt sich die Einwanderung von Zellen des angeborenen Immunsystems in das pulmonale Gewebe, überwiegend neutrophilen Granulozyten und Makrophagen^{50,59}. Sie gelten gleichzeitig als Hauptproduzenten des Enzyms Chitotriosidase¹⁹. Im Falle einer Infektion werden diese Zellen auf schnellstem Wege dorthin rekrutiert, um das Eindringen von Mikroorganismen zu verhindern. Diese Funktion erfüllen sie mit Hilfe von Toll-ähnlichen Rezeptoren (toll-like receptors, TLR), die sie auf ihrer Oberfläche exprimieren. Damit können die Phagozyten eine große Zahl von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) erkennen und somit eine Immunantwort gegen die eindringenden pathogenen Keime initiieren^{124,125}. Um herauszufinden, ob und welche viralen bzw. bakteriellen Bestandteile zur vermehrten Ausschüttung von Chitotriosidase führen, entwickelten wir *in vitro*-Experimente mit neutrophilen Granulozyten bzw. mononukleären Zellen des peripheren Blutes von CF-Patienten und gesunden Probanden. Wir stimulierten die Zellen nach Extraktion aus dem peripheren Blut mit verschiedenen (TLR-) Liganden und maßen daraufhin die Chitotriosidase-Enzymaktivität im Zellkulturüberstand.

Die Ergebnisse der Experimente mit **neutrophilen Granulozyten** zeigen einen starken Anstieg der Chitotriosidase-Aktivität unter Inkubation mit ssRNA (single-stranded RNA, Einzelstrang-RNA), die ihre Wirkung als Vertreter für virale RNA am Toll-like-Rezeptor 8 entfaltet. Die gemessene Enzymaktivität lag für CF ca. 15-fach höher als nach Inkubation von Zellen aus gesunden Organismen. Wie ssRNA hatte auch der bekannte Neutrophilen-Stimulator GM-CSF^{6,19,126} einen starken Effekt auf die Freisetzung von Chitotriosidase. Ebenso Flagellin von begeißelten Bakterien (TLR5) und das von gram-negativen Bakterien gebildete LPS (TLR4). Der Effekt war jedoch milder ausgeprägt als bei Stimulation der Zellen mit ssRNA. Auf die Stimulation mit PMA reagierten die neutrophilen Granulozyten von CF-Patienten mit einem doppelten Anstieg der Chitotriosidase-Aktivität gegenüber gesunden Kontrollen.

Bei den Stimulationsversuchen mit **mononukleären Zellen** aus dem peripheren Blut von CF-Patienten ließen sich PMA, Flagellin (TLR5) und unmethylierte CpG-DNA (ODN, TLR9) als am stärksten wirksame Stimulatoren nachweisen.

Es ist festzuhalten, dass sich die Höhe der absoluten Messwerte der Chitotriosidase-Enzymaktivität zwischen den beiden Zelltypen nur wenig unterscheidet. Auffällig ist jedoch, dass bis auf PMA und Flagellin ein unterschiedliches Liganden-Spektrum maximale Messwerte bei den verschiedenen Zelltypen hervorrief. Über welchen Mechanismus die einzelnen Liganden zu einer vermehrten Freisetzung von Chitotriosidase durch neutrophile Granulozyten und mononukleäre Zellen führen war nicht Gegenstand unserer Untersuchungen und muss in weiterführenden Studien untersucht werden.

Wir konnten folglich mit den Versuchen *in vitro* aufzeigen, dass Chitotriosidase in geringem Ausmaß von ruhenden, nicht stimulierten neutrophilen Granulozyten bzw. mononukleären Zellen in CF produziert wird. Im inflammatorischen Milieu, z. B. im Alveolarraum bei Lungenerkrankungen mit bakterieller/viraler (Super-) Infektion, wird die Chitotriosidase-Synthese in diesen Zellen durch spezifische Stimulation ihrer (TLR-) Liganden um ein Vielfaches gesteigert. Damit reflektiert eine erhöhte Enzymaktivität womöglich das Ausmaß der im CF-Organismus ablaufenden Immun- und Entzündungsreaktionen. Über welchen Mechanismus die einzelnen Liganden zu einer vermehrten Freisetzung von Chitotriosidase durch neutrophile Granulozyten bzw. mononukleäre Zellen führen und inwiefern dies ein möglicher therapeutischer Ansatzpunkt bei der CF-Lungenerkrankung sein kann, muss Gegenstand weitergehender Untersuchungen sein.

6 Zusammenfassung

Aktuelle Untersuchungen weisen darauf hin, dass Chitinasen und Chitinase-ähnliche Proteine eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Unterhaltung von Erkrankungen des Menschen spielen. Wichtige Produzenten dieser Proteine sind neutrophile Granulozyten und Makrophagen. Diese sind wiederum der dominierende Zelltyp der chronischen pulmonalen Entzündungsreaktion im Krankheitsbild der Cystischen Fibrose, deren Morbidität und Mortalität maßgeblich durch die pathologischen Abläufe in der Lunge beeinflusst werden. In diesem Zusammenhang wurden in der vorliegenden Studie die Proteinkonzentrationen der Chitinase-ähnlichen Proteine YKL-40 und BRP-39 sowie die enzymatische Aktivität der beiden Chitinasen Chitotriosidase und saure Säuger-Chitinase (Acidic Mammalian Chitinase, AMCCase) im Rahmen der chronischen Lungenerkrankung Cystische Fibrose (CF) untersucht. Als Vergleichsgruppen wurden Proben von Patienten mit M. Gaucher und Asthma bronchiale analysiert. Methodisch wurde dabei *ex vivo* mit ELISA und *in vitro* mit Zellkultur gearbeitet. Die Ergebnisse wurden anschließend *in vivo* am transgenen CF-Mausmodell überprüft und mit klinischen Funktionsparametern korreliert.

Das Chitinase-ähnliche Protein **YKL-40** fand sich vor allem im Sputum und der BALF von CF-Patienten signifikant erhöht, wohingegen die Proteinkonzentrationen im Serum nur einen moderaten Anstieg gegenüber den gesunden Kontrollen zeigten. Die Ergebnisse der Sputum-Untersuchungen zeigten breit gestreute Messwerte, weshalb die einzelnen Werte anschließend mit den Ergebnissen der Lungenfunktionsprüfung (FEV₁) der Probanden korreliert wurden. Es fand sich eine signifikante Korrelation zwischen erhöhten YKL-40-Konzentrationen im Sputum und einer erniedrigten Einsekundenkapazität im Lungenfunktionstest. Diese Ergebnisse wurden anschließend am Mausmodell überprüft, indem **BRP-39**, das murine Analogon zum humanen YKL-40, in der BALF von CF-ähnlichen β -ENaC-Transgen-Mäusen analysiert wurde. Hier konnten ebenfalls signifikant erhöhte Proteinlevel im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen gemessen werden und die Werte anschließend mit einem erhöhten Atemwegswiderstand (Resistance) im Lungenfunktionstest korreliert werden. Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass in den Atemwegen von CF-Patienten im Vergleich mit

gesunden Kontrollprobanden durchweg höhere Konzentrationen des Chitinase-ähnlichen Proteins YKL-40 vorliegen. Diese Ergebnisse konnten durch Studien an einem murinen CF-Krankheitsmodell mit transgenen β -ENaC-Mäusen bestätigt werden. Sowohl beim Menschen als auch bei der Maus korrelierten die jeweiligen YKL-40- bzw. BRP-39-Level mit der Atemfluss-Obstruktion im Lungenfunktionstest. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass erhöhte Konzentrationen von YKL-40/BRP-39 (i) für eine verstärkte Entzündungsreaktion in den Atemwegen der Patienten sprechen. Die Entzündung kann eine Verengung der Atemwege bedingen und/oder (ii) YKL-40/BRP-39 haben möglicherweise direkt Auswirkungen auf die Obstruktion der Atemwege. In beiden Fällen stehen erhöhte Konzentrationen von YKL-40/BRP-39 (direkt oder indirekt) mit der klinischen Symptomatik der Cystischen Fibrose in Mensch bzw. Maus in Verbindung. Diese Ergebnisse lassen YKL-40 als zukünftigen potentiellen Biomarker und therapeutisches Target in der humanen CF-Lungenerkrankung möglich erscheinen.

Bei den Untersuchungen zur **Chitotriosidase** fand sich in allen Probenmaterialien (Serum, Sputum und BALF) von CF-Patienten eine signifikant erhöhte Aktivität des Enzyms. Als Vergleichsgruppe wurden M. Gaucher-Serumproben analysiert, da in früheren Studien die bisher höchsten Enzymaktivitäten von Chitotriosidase im Serum von Patienten mit der lysosomalen Speicherkrankheit gemessen wurden. Es wurde diskutiert, ob ein ähnliches pathophysiologisches Konzept wie bei der Gaucher-Erkrankung, nämlich die gesteigerte Lipid-Speicherung in Lysosomen von (Alveolar-) Makrophagen, zur vermehrten Ausschüttung von Chitotriosidase bei CF-Patienten durch diesen Zelltyp führt. Die molekular-biologischen Untersuchungen dazu waren jedoch nicht Gegenstand der Untersuchungen und müssen in weiterführenden Studien analysiert werden.

Im Rahmen der *in vitro*-Experimente konnten Stimuli identifiziert werden, die bei neutrophilen Granulozyten bzw. mononukleären Zellen des peripheren Blutes von CF-Patienten zu einer vermehrten Expression von Chitotriosidase führen. Nach Stimulation der Zellen mit bestimmten bakteriellen und viralen (TLR-) Liganden konnte eine erhöhte enzymatische Aktivität von Chitotriosidase im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Für neutrophile Granulozyten wurden PMA, GM-CSF, LPS (TLR4), Flagellin (TLR5) und ssRNA (TLR8) als starke Induktoren des Enzyms Chitotriosidase identifiziert. Bei mononukleären Zellen steigerten vor allem die Stimulanzen PMA, Flagellin (TLR5) und unmethylierte CpG-DNA (ODN, TLR9) die Chitotriosidase-Aktivität im Zellkultur-Überstand um ein Vielfaches. Eine erhöhte

Enzymaktivität im Serum bzw. Sputum der Patienten reflektiert damit womöglich das Ausmaß der im Organismus bzw. der Lunge ablaufenden Entzündungsreaktion. Somit kann die Bestimmung der Chitotriosidase-Aktivität im Serum bzw. Sputum von CF-Patienten in Zukunft als Verlaufsparemeter Bedeutung erlangen.

Im Falle der **sauren Säuger-Chitinase** (AMCase) fanden sich erhöhte Aktivitätslevel vor allem im Sputum und der BALF von CF-Patienten, nicht jedoch in deren Seren. Diese Ergebnisse stimmen überein mit der Tatsache, dass AMCase - nach bisherigem Wissensstand - im Rahmen einer Th₂-dominierten, IL-13-vermittelten Inflammationsreaktion vor allem von Atemwegsepithelien und Alveolar-Makrophagen produziert wird. Die Konstellation aus Th₂-dominierter, IL-13-vermittelter Entzündungsreaktion findet sich auch im Fall der Cystischen Fibrose, insbesondere wenn es zur bakteriellen Infektion der Lunge (z. B. mit *Pseudomonas aeruginosa*) kommt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass AMCase im Szenario der CF-Lungenerkrankung eine wichtige Rolle als Entzündungsmediator spielt. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass durch das Enzym verschiedene Botenstoffe (unter anderem MCP-1, Eotaxin und ENA-78) in den Atemwegsepithelien induziert werden, die Entzündungszellen in die Lunge locken. Die Hemmung der Chitinase *in vivo* führte zur verminderten pulmonalen Entzündungsaktivität. Inwieweit dies in Zukunft ein therapeutischer Ansatzpunkt bei CF sein kann, muss in weiterführenden Studien untersucht werden.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

1. Jollès, P. & Muzzarelli, R.A.A. *chitin and chitinases*, (Birkhäuser Verlag, 1999).
2. Elias, J.A., Homer, R.J., Hamid, Q. & Lee, C.G. Chitinases and chitinase-like proteins in T(H)2 inflammation and asthma. *J Allergy Clin Immunol* **116**, 497-500 (2005).
3. Lee, C.G., *et al.* Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annu Rev Physiol* **73**, 479-501 (2011).
4. Lee, C.G., Da Silva, C.A., Lee, J.Y., Hartl, D. & Elias, J.A. Chitin regulation of immune responses: an old molecule with new roles. *Curr Opin Immunol* **20**, 684-689 (2008).
5. Merz, R.A., Horsch, M., Nyhlen, L.E. & Rast, D.M. Biochemistry of chitin synthase. *EXS* **87**, 9-37 (1999).
6. Bussink, A.P., van Eijk, M., Renkema, G.H., Aerts, J.M. & Boot, R.G. The biology of the Gaucher cell: the cradle of human chitinases. *Int Rev Cytol* **252**, 71-128 (2006).
7. Tronsmo, A. & Harman, G.E. Detection and quantification of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. *Anal Biochem* **208**, 74-79 (1993).
8. Felse, P.A. & Panda, T. Production of microbial chitinase: a revisit. *Bioproc. Eng.* **23**, 127-134 (2000).
9. Bolar, J.P., Norelli, J.L., Harman, G.E., Brown, S.K. & Aldwinckle, H.S. Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. *Transgenic Res* **10**, 533-543 (2001).

10. Hartl, D., Lee, C.G., Da Silva, C.A., Chupp, G.L. & Elias, J.A. Novel biomarkers in asthma: chemokines and chitinase-like proteins. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **9**, 60-66 (2009).
11. Johansen, J.S., Jensen, B.V., Roslind, A., Nielsen, D. & Price, P.A. Serum YKL-40, a new prognostic biomarker in cancer patients? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**, 194-202 (2006).
12. Guan, S.P., Mok, Y.K., Koo, K.N., Chu, K.L. & Wong, W.S. Chitinases: biomarkers for human diseases. *Protein Pept Lett* **16**, 490-498 (2009).
13. Hakala, B.E., White, C. & Recklies, A.D. Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J Biol Chem* **268**, 25803-25810 (1993).
14. Rehli, M., Krause, S.W. & Andreesen, R. Molecular characterization of the gene for human cartilage gp-39 (CHI3L1), a member of the chitinase protein family and marker for late stages of macrophage differentiation. *Genomics* **43**, 221-225 (1997).
15. Harvey, S., *et al.* Chondrex: new marker of joint disease. *Clin Chem* **44**, 509-516 (1998).
16. Lee, C.G., *et al.* Role of breast regression protein 39 (BRP-39)/chitinase 3-like-1 in Th2 and IL-13-induced tissue responses and apoptosis. *J Exp Med* **206**, 1149-1166 (2009).
17. Johansen, J.S. Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer. *Dan Med Bull* **53**, 172-209 (2006).
18. Bleau, G., Massicotte, F., Merlen, Y. & Boisvert, C. Mammalian chitinase-like proteins. *EXS* **87**, 211-221 (1999).
19. van Eijk, M., *et al.* Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *Int Immunol* **17**, 1505-1512 (2005).
20. Volck, B., *et al.* YKL-40, a mammalian member of the chitinase family, is a matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Proc Assoc Am Physicians* **110**, 351-360 (1998).

21. Rehli, M., *et al.* Transcriptional regulation of CHI3L1, a marker gene for late stages of macrophage differentiation. *J Biol Chem* **278**, 44058-44067 (2003).
22. Renkema, G.H., *et al.* Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *Eur J Biochem* **251**, 504-509 (1998).
23. Krause, S.W., *et al.* Differential screening identifies genetic markers of monocyte to macrophage maturation. *J Leukoc Biol* **60**, 540-545 (1996).
24. Shackelton, L.M., Mann, D.M. & Millis, A.J. Identification of a 38-kDa heparin-binding glycoprotein (gp38k) in differentiating vascular smooth muscle cells as a member of a group of proteins associated with tissue remodeling. *J Biol Chem* **270**, 13076-13083 (1995).
25. Nishikawa, K.C. & Millis, A.J. gp38k (CHI3L1) is a novel adhesion and migration factor for vascular cells. *Exp Cell Res* **287**, 79-87 (2003).
26. Johansen, J.S., *et al.* Regulation of YKL-40 production by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* **44**, 826-837 (2001).
27. Dasuri, K., *et al.* The synovial proteome: analysis of fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther* **6**, R161-168 (2004).
28. Hector, A., *et al.* The chitinase-like protein YKL-40 modulates cystic fibrosis lung disease. *PLoS One* **6**, e24399 (2011).
29. Kronborg, G., *et al.* Serum level of YKL-40 is elevated in patients with *Streptococcus pneumoniae* bacteremia and is associated with the outcome of the disease. *Scand J Infect Dis* **34**, 323-326 (2002).
30. Ostergaard, C., Johansen, J.S., Benfield, T., Price, P.A. & Lundgren, J.D. YKL-40 is elevated in cerebrospinal fluid from patients with purulent meningitis. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**, 598-604 (2002).
31. Johansen, J.S., Jensen, H.S. & Price, P.A. A new biochemical marker for joint injury. Analysis of YKL-40 in serum and synovial fluid. *Br J Rheumatol* **32**, 949-955 (1993).
32. Chupp, G.L., *et al.* A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *N Engl J Med* **357**, 2016-2027 (2007).

33. Letuve, S., *et al.* YKL-40 is elevated in patients with chronic obstructive pulmonary disease and activates alveolar macrophages. *J Immunol* **181**, 5167-5173 (2008).
34. Johansen, J.S., *et al.* YKL-40 in giant cells and macrophages from patients with giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* **42**, 2624-2630 (1999).
35. Bernardi, D., Podswiadek, M., Zaninotto, M., Punzi, L. & Plebani, M. YKL-40 as a marker of joint involvement in inflammatory bowel disease. *Clin Chem* **49**, 1685-1688 (2003).
36. La Montagna, G., D'Angelo, S. & Valentini, G. Cross-sectional evaluation of YKL-40 serum concentrations in patients with systemic sclerosis. Relationship with clinical and serological aspects of disease. *J Rheumatol* **30**, 2147-2151 (2003).
37. Nordenbaek, C., *et al.* High serum levels of YKL-40 in patients with systemic sclerosis are associated with pulmonary involvement. *Scand J Rheumatol* **34**, 293-297 (2005).
38. Johansen, J.S., *et al.* Increased serum YKL-40 in patients with pulmonary sarcoidosis--a potential marker of disease activity? *Respir Med* **99**, 396-402 (2005).
39. Vind, I., Johansen, J.S., Price, P.A. & Munkholm, P. Serum YKL-40, a potential new marker of disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* **38**, 599-605 (2003).
40. Kzhyshkowska, J., Gratchev, A. & Goerdts, S. Human chitinases and chitinase-like proteins as indicators for inflammation and cancer. *Biomark Insights* **2**, 128-146 (2007).
41. Schmidt, H., *et al.* Elevated serum level of YKL-40 is an independent prognostic factor for poor survival in patients with metastatic melanoma. *Cancer* **106**, 1130-1139 (2006).
42. Cinton, C., *et al.* Serum YKL-40 and colorectal cancer. *Br J Cancer* **79**, 1494-1499 (1999).
43. Lal, A., *et al.* A public database for gene expression in human cancers. *Cancer Res* **59**, 5403-5407 (1999).

44. Boot, R.G., *et al.* Strong induction of members of the chitinase family of proteins in atherosclerosis: chitotriosidase and human cartilage gp-39 expressed in lesion macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 687-694 (1999).
45. Zhu, Z., *et al.* Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science* **304**, 1678-1682 (2004).
46. Hollak, C.E., van Weely, S., van Oers, M.H. & Aerts, J.M. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest* **93**, 1288-1292 (1994).
47. Beck, M., *et al.* Leitlinien zu Morbus Gaucher. *Diagnose und Therapie des Morbus Gaucher*, 20 (2006).
48. Herold, G. *Innere Medizin*, (Herold, Gerd, Köln, 2009).
49. Ballmann, M. & Smaczny, C. *CF-Manual*, (UNI-MED-Verlag AG, Bremen, 2008).
50. Elizur, A., Cannon, C.L. & Ferkol, T.W. Airway inflammation in cystic fibrosis. *Chest* **133**, 489-495 (2008).
51. Guggino, W.B. & Stanton, B.A. New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 426-436 (2006).
52. Fauci, A., *et al.* *Harrisons Innere Medizin*, (Dietel, M.; Suttorp, N.; Zeitz, M., 2008).
53. Ratjen, F. & Doring, G. Cystic fibrosis. *Lancet* **361**, 681-689 (2003).
54. Muntau, A.C. *Intensivkurs Pädiatrie*, (Elsevier GmbH, 2011).
55. Conese, M. Cystic fibrosis and the innate immune system: therapeutic implications. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **11**, 8-22 (2011).
56. Davis, P.B., Drumm, M. & Konstan, M.W. Cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **154**, 1229-1256 (1996).
57. Hartl, D., *et al.* Cleavage of CXCR1 on neutrophils disables bacterial killing in cystic fibrosis lung disease. *Nat Med* **13**, 1423-1430 (2007).
58. Postle, A.D., *et al.* Deficient hydrophilic lung surfactant proteins A and D with normal surfactant phospholipid molecular species in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **20**, 90-98 (1999).

59. Wine, J.J. The genesis of cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest* **103**, 309-312 (1999).
60. Brady, R.O., Kanfer, J.N., Bradley, R.M. & Shapiro, D. Demonstration of a deficiency of glucocerebrosidase in Gaucher's disease. *J Clin Invest* **45**, 1112-1115 (1966).
61. Boot, R.G., *et al.* The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency. *J Biol Chem* **273**, 25680-25685 (1998).
62. Boot, R.G., *et al.* Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention. *Blood* **103**, 33-39 (2004).
63. Aerts, J.M., *et al.* Identification and use of biomarkers in Gaucher disease and other lysosomal storage diseases. *Acta Paediatr Suppl* **94**, 43-46; discussion 37-48 (2005).
64. Busse, W.W. & Lemanske, R.F., Jr. Asthma. *N Engl J Med* **344**, 350-362 (2001).
65. O'Connell, E.J. The burden of atopy and asthma in children. *Allergy* **59 Suppl 78**, 7-11 (2004).
66. Elias, J.A., Zhu, Z., Chupp, G. & Homer, R.J. Airway remodeling in asthma. *J Clin Invest* **104**, 1001-1006 (1999).
67. Zaas, A.K. & Schwartz, D.A. Innate immunity and the lung: defense at the interface between host and environment. *Trends Cardiovasc Med* **15**, 195-202 (2005).
68. Alberts, B., *et al.* *Molecular Biology of the cell*, (Garland Science, Taylor&Francis Group, New York, 2008).
69. Delves, P.J. & Roitt, I.M. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* **343**, 37-49 (2000).
70. Palaniyar, N., Nadesalingam, J. & Reid, K.B. Pulmonary innate immune proteins and receptors that interact with gram-positive bacterial ligands. *Immunobiology* **205**, 575-594 (2002).
71. Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol* **5**, 577-582 (2007).

-
72. Painter, R.G., *et al.* CFTR-mediated halide transport in phagosomes of human neutrophils. *J Leukoc Biol* **87**, 933-942 (2010).
 73. Boussac, M. & Garin, J. Calcium-dependent secretion in human neutrophils: a proteomic approach. *Electrophoresis* **21**, 665-672 (2000).
 74. Babior, B.M. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood* **64**, 959-966 (1984).
 75. Henson, P.M. & Johnston, R.B., Jr. Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. *J Clin Invest* **79**, 669-674 (1987).
 76. Weiss, S.J. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* **320**, 365-376 (1989).
 77. Borregaard, N., Kjeldsen, L., Løllike, K. & Sengelov, H. Granules and secretory vesicles of the human neutrophil. *Clin Exp Immunol* **101 Suppl 1**, 6-9 (1995).
 78. Boot, R.G., *et al.* Marked differences in tissue-specific expression of chitinases in mouse and man. *J Histochem Cytochem* **53**, 1283-1292 (2005).
 79. Ratjen, F., Hartog, C.M., Paul, K., Wermelt, J. & Braun, J. Matrix metalloproteases in BAL fluid of patients with cystic fibrosis and their modulation by treatment with dornase alpha. *Thorax* **57**, 930-934 (2002).
 80. Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R. & Deutzmann, R. *Biochemie*, (Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2006).
 81. Hof, H. & Dörries, R. *Medizinische Mikrobiologie*, (Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2009).
 82. Di, A., *et al.* CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat Cell Biol* **8**, 933-944 (2006).
 83. Zhang, Y., Li, X., Grassme, H., Döring, G. & Gulbins, E. Alterations in ceramide concentration and pH determine the release of reactive oxygen species by Cftr-deficient macrophages on infection. *J Immunol* **184**, 5104-5111 (2010).
 84. Barasch, J., *et al.* Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature* **352**, 70-73 (1991).

-
85. Deriy, L.V., *et al.* Disease-causing mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determine the functional responses of alveolar macrophages. *J Biol Chem* **284**, 35926-35938 (2009).
 86. Renkema, G.H., *et al.* Synthesis, sorting, and processing into distinct isoforms of human macrophage chitotriosidase. *Eur J Biochem* **244**, 279-285 (1997).
 87. R&D, S. Quantikine ® Human CHI3L1. 15 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, 2008).
 88. Sigma-Aldrich. Chitinase Assay Kit ® Product Information. (Sigma-Aldrich, Inc., Missouri, 2009).
 89. SigmaAldrich. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/carbohydrate-analysis/carbohydrate-analysis-ii.html>. (28.03.2012).
 90. Mall, M., Grubb, B.R., Harkema, J.R., O'Neal, W.K. & Boucher, R.C. Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med* **10**, 487-493 (2004).
 91. Frizzell, R.A. & Pilewski, J.M. Finally, mice with CF lung disease. *Nat Med* **10**, 452-454 (2004).
 92. Vanoirbeek, J.A., *et al.* Noninvasive and invasive pulmonary function in mouse models of obstructive and restrictive respiratory diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol* **42**, 96-104 (2010).
 93. Tirouvanziam, R., *et al.* Profound functional and signaling changes in viable inflammatory neutrophils homing to cystic fibrosis airways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 4335-4339 (2008).
 94. Bouzas, L., Carlos Guinarte, J. & Carlos Tutor, J. Chitotriosidase activity in plasma and mononuclear and polymorphonuclear leukocyte populations. *J Clin Lab Anal* **17**, 271-275 (2003).
 95. Guo, Y., *et al.* Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis* **18**, 717-722 (1995).

96. Vedder, A.C., *et al.* Plasma chitotriosidase in male Fabry patients: a marker for monitoring lipid-laden macrophages and their correction by enzyme replacement therapy. *Mol Genet Metab* **89**, 239-244 (2006).
97. Kurt, I., *et al.* Chitotriosidase levels in healthy elderly subjects. *Ann N Y Acad Sci* **1100**, 185-188 (2007).
98. Giraldo, P., *et al.* Chitotriosidase genotype and plasma activity in patients type 1 Gaucher's disease and their relatives (carriers and non carriers). *Haematologica* **86**, 977-984 (2001).
99. Aerts, J.M., Hollak, C., Boot, R. & Groener, A. Biochemistry of glycosphingolipid storage disorders: implications for therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 905-914 (2003).
100. Artieda, M., *et al.* Serum chitotriosidase activity is increased in subjects with atherosclerosis disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 1645-1652 (2003).
101. Karadag, B., Kucur, M., Isman, F.K., Hacibekiroglu, M. & Vural, V.A. Serum chitotriosidase activity in patients with coronary artery disease. *Circ J* **72**, 71-75 (2008).
102. Barone, R., Sempore, J., Malaguarnera, L., Pignatelli, S. & Musumeci, S. Plasma chitotriosidase activity in acute Plasmodium falciparum malaria. *Clin Chim Acta* **331**, 79-85 (2003).
103. Barone, R., Di Gregorio, F., Romeo, M.A., Schiliro, G. & Pavone, L. Plasma chitotriosidase activity in patients with beta-thalassemia. *Blood Cells Mol Dis* **25**, 1-8 (1999).
104. Czartoryska, B., Fiszer, U. & Lugowska, A. Chitotriosidase activity in cerebrospinal fluid as a marker of inflammatory processes in neurological disease. *J Lab Med* **25**, 77-81 (2001).
105. Malaguarnera, L., *et al.* Chitotriosidase gene expression in Kupffer cells from patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* **55**, 1313-1320 (2006).
106. Bargagli, E., *et al.* Chitotriosidase activity in the serum of patients with sarcoidosis and pulmonary tuberculosis. *Respiration* **74**, 548-552 (2007).

107. Michelakakis, H., Dimitriou, E. & Labadaridis, I. The expanding spectrum of disorders with elevated plasma chitotriosidase activity: an update. *J Inherit Metab Dis* **27**, 705-706 (2004).
108. Isman, F., Hobert, J.A., Thompson, J.N. & Natowicz, M.R. Plasma chitotriosidase in lysosomal storage diseases. *Clin Chim Acta* **387**, 165-167 (2008).
109. Teichgraber, V., *et al.* Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nat Med* **14**, 382-391 (2008).
110. Doring, G. & Gulbins, E. Cystic fibrosis and innate immunity: how chloride channel mutations provoke lung disease. *Cell Microbiol* **11**, 208-216 (2009).
111. Noe, J., *et al.* CFTR regulation of intracellular pH and ceramides is required for lung endothelial cell apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **41**, 314-323 (2009).
112. Gulbins, E. & Li, P.L. Physiological and pathophysiological aspects of ceramide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**, R11-26 (2006).
113. Haggie, P.M. & Verkman, A.S. Unimpaired lysosomal acidification in respiratory epithelial cells in cystic fibrosis. *J Biol Chem* **284**, 7681-7686 (2009).
114. Barriere, H., *et al.* Revisiting the role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and counterion permeability in the pH regulation of endocytic organelles. *Mol Biol Cell* **20**, 3125-3141 (2009).
115. Adib-Conquy, M., *et al.* Neutrophils in cystic fibrosis display a distinct gene expression pattern. *Mol Med* **14**, 36-44 (2008).
116. Hartl, D., *et al.* Pulmonary T(H)2 response in *Pseudomonas aeruginosa*-infected patients with cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol* **117**, 204-211 (2006).
117. Boot, R.G., *et al.* Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *J Biol Chem* **276**, 6770-6778 (2001).
118. FitzSimmons, S.C. The changing epidemiology of cystic fibrosis. *J Pediatr* **122**, 1-9 (1993).
119. Gibson, R.L., Burns, J.L. & Ramsey, B.W. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **168**, 918-951 (2003).

-
120. Shuhui, L., Mok, Y.K. & Wong, W.S. Role of mammalian chitinases in asthma. *Int Arch Allergy Immunol* **149**, 369-377 (2009).
 121. Bals, R., Weiner, D.J. & Wilson, J.M. The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest* **103**, 303-307 (1999).
 122. Prince, A.S. Biofilms, antimicrobial resistance, and airway infection. *N Engl J Med* **347**, 1110-1111 (2002).
 123. Knutsen, A.P. Immunopathology and immunogenetics of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Allergy (Cairo)* **2011**, 785983 (2011).
 124. Parker, L.C., Whyte, M.K., Dower, S.K. & Sabroe, I. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leukoc Biol* **77**, 886-892 (2005).
 125. Prince, L.R., Whyte, M.K., Sabroe, I. & Parker, L.C. The role of TLRs in neutrophil activation. *Curr Opin Pharmacol* **11**, 397-403 (2011).
 126. Gomez-Cambronero, J., Horn, J., Paul, C.C. & Baumann, M.A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a chemoattractant cytokine for human neutrophils: involvement of the ribosomal p70 S6 kinase signaling pathway. *J Immunol* **171**, 6846-6855 (2003).

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erkrankungen mit erhöhten YKL-40-Serumkonzentrationen (nach ¹²)	8
Tabelle 2: Anhäufung von Glukosylceramid in Zelltypen des MMS mit nachfolgender Symptomatik (nach ⁴⁸).....	11
Tabelle 3: Klinische Einteilung der Verlaufsformen des M. Gaucher. *ehemals Typ 1, **ehemals Typ 2, ***ehemals Typ 3 (nach ^{47,52}).....	12
Tabelle 4: Inhaltsstoffe der verschiedenen zytoplasmatischen Granula von neutrophilen Granulozyten (nach ^{73,77})	16
Tabelle 5: Verwendete Substanzen zur Stimulation von neutrophilen Granulozyten und mononukleären Zellen	30
Tabelle 6: Klinische Daten zu den untersuchten Patientengruppen.....	31
Tabelle 7: Überblick über Erkrankungen mit erhöhter Chitotriosidase-Enzymaktivität im Serum und der jeweils pathologisch gespeicherten Substanz in Zellen des MMS (nach ¹²)	56

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip eines Sandwich-ELISA. HRP: horseradish peroxidase, TMB: tetramethylbenzidine, HP: hydrogen peroxide (nach ⁸⁷)	20
Abbildung 2: Chitinase-spezifische Degradation eines Chitin-Polymers durch Endo- und Exo-Chitinasen in N-Acetyl-D-Glucosamin-Einheiten ⁸⁹	27
Abbildung 3: Schema zur Dichtegradientenzentrifugation	29
Abbildung 4: Überexpression von epithelialen Na ⁺ -Kanälen (β-ENaC) in den Atemwegen von transgenen Tieren. GAGs=Glykosaminoglykane (nach ⁹¹)	33
Abbildung 5: YKL-40-Konzentrationen im Serum (in pg/ml)	35
Abbildung 6: YKL-40-Konzentrationen im Serum und Sputum (in pg/ml) als Balkendiagramm.....	36
Abbildung 7: YKL-40-Konzentrationen im Serum und Sputum (in pg/ml) als Punktdiagramm.....	36
Abbildung 8: Korrelation zwischen YKL-40 im Sputum (in pg/ml) von CF-Patienten und FEV ₁ (% des Vorhersagewertes)	37
Abbildung 9: YKL-40-Konzentrationen in der BALF (in pg/ml).....	38
Abbildung 10: BRP-39 in der BALF von β-ENaC-Transgen-Mäusen im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen (in ng/ml).....	39
Abbildung 11: Korrelation zwischen BRP-39 in der BALF (in ng/ml) von β-ENaC-Tg-Mäusen (schwarze Füllung) bzw. WT-Mäusen (weiße Füllung) und Resistance (cm H ₂ O/ml/s)	40
Abbildung 12: Chitotriosidase-Enzymaktivität im Serum (in units/ml)	41
Abbildung 13: Chitotriosidase-Enzymaktivität im Sputum (in units/ml)	42
Abbildung 14: Chitotriosidase-Enzymaktivität in der BALF (in units/ml)	43
Abbildung 15: Acidic Mammalian Chitinase-Enzymaktivität im Serum (in units/ml)	44
Abbildung 16: AMCCase-Enzymaktivität im Sputum (in units/ml)	45
Abbildung 17: AMCCase-Enzymaktivität in der BALF (in units/ml)	46

Abbildung 18: Chitotriosidase-Enzymaktivität (in units/min) im Zellkulturüberstand nach Stimulation von PMN mit verschiedenen (TLR-) Liganden für 6 Stunden bei 37 °C.....	47
Abbildung 19: Chitotriosidase-Enzymaktivität (in units/min) im Zellkulturüberstand nach Stimulation von PBMC mit verschiedenen (TLR-) Liganden für 6 Stunden bei 37 °C.....	48
Abbildung 20: Regulation der Chitotriosidase-Expression in humanen Makrophagen. mφ=Makrophage, CHIT=Chitotriosidase (nach ⁶).....	55
Abbildung 21: Chitotriosidase-Enzymaktivität im Serum (relative Mittelwerte in nmol/ml.h, Referenzgruppe=1) bei lysosomalen Speichererkrankungen und CF (nach ¹⁰⁸).....	57
Abbildung 22: Freisetzung von Chitotriosidase aus den spezifischen Granula von neutrophilen Granulozyten. CHIT=Chitotriosidase (nach ⁶).....	59
Abbildung 23: Die mögliche Rolle von AMCCase in der Pathogenese der Cystischen Fibrose (+ <i>Ps. aeruginosa</i> -Infektion) (nach ¹²⁰).....	63

7.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Dominik Hartl, für die Möglichkeit, meine Arbeit in den Laboratorien der AG Experimentelle Pneumologie am Forschungszentrum des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der LMU München durchführen zu können. Sein unermüdliches und kontinuierliches Engagement bei der Betreuung meiner Arbeit, seine aufgeweckte Art und die stets konstruktive Kritik haben mich immer motiviert.

Bei meinem Mitbetreuer Herrn Dr. med. Andreas Hector und Frau Dr. med. Veronica Marcos-Nickol möchte ich mich für ihre allzeit freundliche Hilfestellung bedanken.

Herrn Prof. Dr. D. Reinhardt, ehemaliger Direktor des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der LMU München, danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation an seinem Institut verfassen zu können.

Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgemeinschaft Griese möchte ich mich für die Benutzung der Geräte in ihrem Labor bedanken.

Mein Dank gilt auch der Arbeitsgruppe Pädiatrische Pneumologie des Kinderspitals in Bern für die Bereitstellung des Probenmaterials.

Bei unserer TA Eva-Maria Wiedenbauer sowie meinen Mitdotorandinnen Christine Strohmeier und Sofia Burdi möchte ich mich für die hilfreiche Zusammenarbeit und eine schöne Zeit im Labor bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Bruder für die Unterstützung bei der Arbeit mit dem Computer und das Korrekturlesen meiner Arbeit. Meinen Eltern möchte ich besonders für ihren Beistand und ihre Fürsorge danken.

Bei meinem Freund Peter möchte ich mich für das Korrekturlesen und seine stets konstruktiven Beiträge bedanken.

7.5 Publikationen

Hector A*, Kormann S D*, **Mack I***, Latzin P, Casaulta C, Kieninger E, Zhou Z, Yildirim A Ö, Bohla A, Rieber N, Kappler M, Koller B, Eber E, Eickmeier O, Zielen S, Eickelberg O, Griese M, Mall M A, Hartl D. The chitinase-like protein YKL-40 modulates cystic fibrosis lung disease. *PLoS One* **6**, e24399 (2011).

Mack I, Hector A, Latzin P, Kieninger E, Marcos V, Wiedenbauer E M, Burdi S, Strohmeyer C, Griese M, Hartl D. YKL-40 als möglicher Biomarker und therapeutisches Target bei pädiatrischen Lungenerkrankungen; *Poster*.