

Aus dem Institut für Humanpathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität
Gießen

ACE (CD143) in granulomatösen Entzündungen von Mensch und Tier:
Speziesspezifische Expression in Endothel und Makrophagen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
MELANIE GEORG

Gießen 2001

Aus dem Institut für Humanpathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. med. A. Schulz

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität
Gießen

Im Fachbereich vertreten durch Prof. Dr. med. vet. E. Burkhardt

ACE (CD143) in granulomatösen Entzündungen von Mensch und Tier:
Speziesspezifische Expression in Endothel und Makrophagen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
MELANIE GEORG
Tierärztin aus Heidelberg (Baden-Württemberg)

Gießen 2001

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. med. vet. M. Reinacher

1.Berichterstatter: Prof. Dr. med. A. Schulz

2.Berichterstatter: Prof. Dr. med. vet. E. Burkhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 18.04.2001

Meinen Eltern, die mir ermöglicht haben
zu werden –
Meinem Mann, der mich täglich darin unterstützt
zu sein –
was ich bin.

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>3</u>
<u>2</u>	<u>LITERATURÜBERSICHT</u>	<u>4</u>
2.1	ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME (KININASE II, CD143)	4
2.1.1	GEN, MRNA UND MOLEKÜLSTRUKTUR	4
2.1.2	GEWEBLICHE DETEKTION UND ZELLULÄRE VERTEILUNG	5
2.1.3	ENDOTHELIALE HETEROGENITÄT MIT SPEZIESSPEZIFITÄT	6
2.2	GRANULOMATÖSE ENTZÜNDUNGEN	7
2.2.1	PATHOGENESE UND PATHOLOGIE BEI TIER UND MENSCH	7
2.2.2	TUBERKULOSE	8
2.2.3	SARKOIDOSE	9
2.2.4	TOXOPLASMOSE	10
2.2.5	EXPRESSION VON ACE IN GRANULOMATÖSEN ENTZÜNDUNGEN	11
<u>3</u>	<u>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u>	<u>13</u>
3.1	MATERIAL UND METHODEN	13
3.1.1	UNTERSUCHUNGSMATERIAL	13
3.1.2	METHODEN	14
3.2	ERGEBNISSE	24
3.2.1	ACE (CD143) IN GRANULOMATÖSEN ENTZÜNDUNGEN BEIM MENSCHEN	24
3.2.2	ACE (CD143) IN VERSCHIEDENEN TIERSPEZIES	58
3.2.3	ACE (CD143) IN GRANULOMATÖSEN ENTZÜNDUNGEN BEI TIEREN	69
<u>4</u>	<u>DISKUSSION</u>	<u>74</u>
4.1	ACE IN GRANULOMATÖSEN ENTZÜNDUNGEN DES MENSCHEN	74
4.2	ACE IM GEWEBE VERSCHIEDENER TIERSPEZIES	79
4.3	ACE IM GEFÄßSYSTEM VERSCHIEDENER TIERSPEZIES	80
4.4	ACE IN GRANULOMATÖSEN ENTZÜNDUNGEN DER TIERE	83
<u>5</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>85</u>

6	SUMMARY	88
7	LITERATURVERZEICHNIS	91
8	ANHANG	104
8.1	ANSÄTZE DER GEBRAUCHSLÖSUNGEN	104
8.1.1	TRIS-WASCHPUFFER	104
8.1.2	RPMI	104
8.1.3	ENTWICKLUNGSPUFFER	104
8.1.4	PROPANDIOL	104
8.1.5	NEUFUCHSIN	105
8.1.6	CITRATPUFFER	105
8.1.7	HÄMALAUN	105
8.1.8	EOSIN	105
8.1.9	ENTWICKLERLÖSUNG	106
8.2	TABELLENVERZEICHNIS	107
8.3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	108
9	DANKSAGUNG	109

1 Einleitung

Obwohl seit langem Schwerpunkt kardiovaskulärer Forschung, war bis vor kurzem nur wenig über die exakte topografische Verteilung von ACE bekannt. Dies beruhte auf der mangelnden Verfügbarkeit spezifischer monoklonaler Antikörper (mAk). In den letzten Jahren ist es dann mittels mAk erstmals möglich geworden immunhistologisches Vorkommen von ACE systematisch in Geweben zu prüfen und unter physiologischen Bedingungen für die Spezies Mensch und Ratte komplett zu kartieren.

Bisher liegen jedoch keine Erkenntnisse darüber vor, wie das endotheliale ACE-Expressionsmuster anderer Tierarten aussieht, und ob die vorhandenen mAk überhaupt mit dem ACE anderer Tierarten reagieren.

Unumstritten ist zwar eine auffallend erhöhte ACE-Expression bei der Sarkoidose, dagegen fehlt jedoch noch Wissen über mikrotopografische und individuelle Besonderheiten sowie über ACE in granulomatösen Entzündungen anderer Genese bei Mensch und Tier.

In der vorliegenden Arbeit wird daher mit Hilfe verschiedener mAk untersucht, welche Expressionsmuster des ACE sich in granulomatösen Entzündungen unterschiedlicher Ätiologie sowie in verschiedenen Stadien der Granulomentwicklung finden. Insbesondere soll der Frage nachgegangen werden, ob die ACE-Expression einen generell makrophagenassoziierten Faktor darstellt oder ob sich aus dem Expressionsmuster Hinweise auf eine differentialdiagnostische Bedeutung bei granulomatösen Entzündungen ergeben. Weiterhin soll überprüft werden, inwieweit die gegen humanes ACE gerichteten Antikörper auch mit dem ACE verschiedener Tierarten reagieren, welche gewebliche Detektion und zelluläre Verteilung und welches endotheliale Expressionsmuster ACE im Gewebe verschiedener Tierspezies zeigt. Außerdem soll die ACE-Expression im makrophagozytären System verschiedener Tierspezies sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch bei granulomatösen Entzündungen unterschiedlicher Ätiologie untersucht und mit der des Menschen verglichen werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Angiotensin-Converting Enzyme (Kininase II, CD143)

2.1.1 Gen, mRNA und Molekülstruktur

Angiotensin-Converting Enzyme ist eine unspezifische Dipeptidyl-Carboxypeptidase, welche eine bedeutende Stellung in der Blutdruckregulation über das Renin-Angiotensin-System (RAS) und das Kinin-Kallikrein-System (KKS) einnimmt, indem sie einerseits Angiotensin I (Ang I) durch Abspaltung von L-Histidyl-Leucin am carboxyterminalen Ende in den potenten Vasopressor Angiotensin II (Ang II) umwandelt und andererseits den Vasodepressor Bradykinin degradiert ^[98,131]. Weitere Substrate des Enzyms sind: Substance P, Atrialer Natriuretischer Faktor (ANF), Neurotensin, Luteinisierendes Hormon Releasing Hormon (LHRH), das Tetrapeptid Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP) und weitere chemotaktische Peptide (Penta-, Hepta-, Oktapeptide) und Enkephaline ^[23, 40, 52, 70, 110].

ACE wurde erstmals 1956 von Skeggs et al. aus Pferdeplasma isoliert ^[109]. Heute weiß man, dass zwei Isoformen (somatische und testikuläre Isoform) dieses Enzymes existieren. Die somatische Isoform besitzt ein Molekulargewicht von ca. 170 kDa und kommt membrangebunden in Endothelzellen sowie im Bürstensaum verschiedener Epithelzellen vor, wobei sie über eine hydrophobe Domäne am C-terminalen Ende in der Plasmamembran der Zellen verankert ist. Für die Spaltung von Ang I weniger bedeutsam ist die nicht membrangebundene, frei im Blut zirkulierende sowie in Sekreten von Prostata und Nebenhoden und Körperflüssigkeiten wie Urin, Lymphe und Liquor vorkommende sogenannte plasmatische Unterform des somatischen ACEs, welcher die Ankerregion am C-terminalen Ende fehlt ^[39]. Die testikuläre Isoform besitzt ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa und ist ausschließlich in den Tubuli seminiferi des Hodens lokalisiert, wo sie hauptsächlich von postmeiotischen Keimzellen und Spermatiden exprimiert wird ^[23, 61, 89]. Die somatische Isoform des ACE besteht aus zwei homologen Domänen mit je einem aktiven Zentrum, welches je ein Zinkatom als zentrales Metallion besitzt. Beide Domänen weisen ein hohes Maß interner Homologie auf, was vermuten lässt, dass das Molekül durch eine früh in der Evolution (vor Entwicklung der Säugetiere) stattgefundenen Genduplikation entstanden ist ^[2,23,61,112]. Die testikuläre Isoform verfügt dagegen nur über eine Domäne. Das COOH-terminale Ende beider

Isoformen ist identisch, das NH₂-terminale Ende verschieden aufgebaut ^[24]. Die zwei gewebsspezifischen ACE-Isoenzyme werden von zwei verschiedenen mRNAs (somatische mRNA: 5kB; testikuläre mRNA: 2,5 kB) codiert, welche eine identische Basensequenz am 3'-Ende und eine verschiedene am 5'-Ende besitzen. Beide mRNAs entstehen durch Transkription zweier separater, aber sich überlappender Transkriptionseinheiten ein und desselben Genes (beim Menschen lokalisiert auf Chromosom 17q23) durch Aktivierung verschiedener Promotoren ^[37,67]. Die zellulären und plasmatischen ACE-Spiegel sind genetisch festgelegt. Verantwortlich für die individuelle Variabilität des ACE-Spiegels ist ein Gen-Polymorphismus. Durch das Klonen humaner cDNA und durch Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (RFLP-Analyse) konnte ein Insertions-Deletions-Polymorphismus entdeckt werden, welcher auf dem Vorhandensein bzw. der Abwesenheit eines 287-Basenpaarfragmentes im 16. Intron des ACE-Gens beruht. Individuen mit einer Homozygotie des D-Allels besitzen eine höhere ACE-Plasmaaktivität als solche mit einer Homozygotie des I-Allels ^[25].

2.1.2 Gewebliche Detektion und zelluläre Verteilung

Die stärkste Expression von CD 143 in Epithelzellen wird im Bürstensaum der proximalen Nierentubuli, der Enterozyten des Dünndarmes und im Mikrovillisaum der Ductuli efferentes des Nebenhodens angetroffen. Geringere Gehalte an CD 143 weisen Epithelzellen der Hautanhangsdrüsen, Brustdrüsen, Speicheldrüsen und Nebennieren und in noch geringerem Maß die Epithelzellen der Prostata auf. Die ACE-Expression in Epithelzellen des Plexus chorioideus und des Ependyms scheint altersabhängig zu sein. Weiterhin findet sich CD 143 akzentuiert im Neuropil der Basalganglien, der grauen Substanz, dem Hypothalamus, der gesamten Vierhügelplatte des Hirnstammes und in geringerem Ausmaß auch im Thalamus sowie im Stratum granulosum des Kleinhirnes. Weitere Zellen, die die somatische Isoform von CD 143 exprimieren, sind die Leydigzellen des Hodens, die Granulosazellen des Ovars und in unterschiedlicher Ausprägung auch die Fibrozyten und Fibroblasten des lockeren Bindegewebes und der Gefäßadventitia, aktivierte Makrophagen und Histiozyten, Kupffer'sche Sternzellen, sowie unreife Knorpelzellen ^[44]. Die testikuläre Isoform von CD 143 wird ausschließlich in Keimzellen während der Spermatogenese exprimiert ^[9, 26, 89]. Ultrastrukturell konnte epitheliales ACE in den Mikrovilli der Bürstensäume lokalisiert werden ^[11] und ist in proximalen Nierentubulusepithelien strikt auf diese Strukturen begrenzt ^[76]. Die größte

spezifische ACE-Aktivität wurde bei der Ratte in Hoden und Nebenhoden festgestellt; ebenfalls sehr hohe Werte fanden sich in der Lunge. Eine deutlich geringere Aktivität wiesen der Verdauungstrakt, der weibliche Genitaltrakt, Gehirn und Aorta auf. Kaum Aktivität konnte in der Niere (lediglich in geringem Maß in den Partes rectae des inneren Kortex) sowie in Milz, Herz und Leber angetroffen werden ^[21]. Soweit analysiert stehen diese Daten in gutem Einklang mit immunhistologischen Untersuchungen zur zellulären Verteilung von CD 143 in der Ratte ^[76].

Beim Kaninchen wurde epitheliales ACE bisher nur in den luminalen Zellen der proximalen Nierentubuli lokalisiert ^[12].

ACE neuronalen Ursprungs konnte im Gehirn der Ratte ^[113] und des Schweines ^[58] sowie in der Medulla oblongata von Ratte, Kaninchen und Schaf nachgewiesen werden ^[4].

Über die gewebliche Detektion und zelluläre Verteilung von CD 143 bei anderen Tierspezies liegen noch keine Ergebnisse vor.

2.1.3 Endotheliale Heterogenität mit Speziesspezifität

Die endotheliale Expression von CD 143 im Gefäßsystem des Menschen ist heterogen verteilt. Während sich die stärkste Expression in Arteriolen und kleinen muskulären Arterien findet, ist sie in muskelstarken kleinen Venen deutlich schwächer ausgeprägt und fehlt oftmals vollkommen in den Endothelien von Kapillaren, Venolen sowie großen Arterien und Venen. Die Stärke der endothelialen ACE-Expression korreliert morphologisch mit dem Verhältnis glatter Muskelfasern zu elastischen Fasern in der Gefäßwand und funktionell mit der Anwesenheit vasokonstriktorischer Strukturen zur Regulation der Mikrozirkulation. Es gibt jedoch zwei bemerkenswerte Ausnahmen in der endothelialen ACE-Verteilung im menschlichen Gefäßsystem: Im Gegensatz zu den ACE-negativen Endothelien sämtlicher Nierengefäße zeigen die Endothelien der Lungenkapillaren eine sehr starke und homogene Expression von CD 143 ^[26]. Während die Expression von CD 143 in der Mikrozirkulation von Mensch und Ratte nahezu identisch ist, zeigt die Ratte im Gegensatz zum Menschen eine homogene endotheliale Expression in allen Arterien und größeren Venen. In der Niere wurde darüber hinaus auch eine starke Expression in den Arterien, Arteriolen einschließlich Vas afferens und eine fehlende Immunreaktion der glomerulären und interstitiellen Kapillaren, sowie sämtlicher venöser Endothelien festgestellt ^[76]. Beim Kaninchen wurde eine ACE-Expression in Endothelien der Kapillaren sowie größeren Arterien und Venen von Lunge, Leber,

Niere, Nebenniere, Pankreas und Milz beschrieben ^[12]. Im Gegensatz dazu beobachteten Taugner und Ganten ^[120] beim Kaninchen eine der Ratte entsprechende endotheliale ACE-Expression der Nierengefäße. Über die endotheliale ACE-Verteilung im Gefäßsystem verschiedener anderer Tierspezies liegen zum heutigen Zeitpunkt noch keine Erkenntnisse vor.

2.2 Granulomatöse Entzündungen

2.2.1 Pathogenese und Pathologie bei Tier und Mensch

Die granulomatöse Entzündung ist eine besondere immunologisch bedingte Reaktionsform, die aufgrund einer Reihe verschiedener Mechanismen entstehen kann. Hierzu gehören: 1. die Aufnahme anorganischen Materials (wie z.B. bei Silikose), 2. eines schlecht verdaulichen organischen Antigens (wie z.B. bei Mykobakterien), 3. ein Defekt im phagozytotischen System, der einen unvollständigen Abbau von Bakterien oder anderen Substanzen zur Folge hat und 4. das Vorhandensein großer schlecht abbaubarer Antigen-Antikörper-Komplexe. Faktoren, die die Aktivität des Krankheitsprozesses beeinflussen sind die Art und Einwirkungsdauer des unbekannten Antigens, genetische Faktoren und der Immunstatus des Individuums ^[121]. Hauptkennzeichen der granulomatösen Entzündung ist die fokale Ansammlung von Zellen des mononukleären Phagozytensystems (Makrophagen, Epitheloidzellen, mehrkernige Riesenzellen). Im Rahmen der Granulomentstehung werden sowohl eingewanderte als auch residente Makrophagen aktiviert, welche dann eine Reihe potenter Mediatoren (Zytokine) produzieren, die autokrine wie auch parakrine Wirkungen haben ^[69]. Der Kontakt mit Antigen, Fremdkörpermaterial oder körpereigenen Zerfallsprodukten stimuliert die Phagozytoseaktivität der Makrophagen, welche durch den Einfluß von Lymphokinen der T-Lymphozyten, v.a. T-Helferzellen, noch gesteigert wird. Bei geringem Phagozytosestimulus entstehen aus den Makrophagen Epitheloidzellen, die die Membranrezeptoren (z.B. Fc-Rezeptoren) für die Phagozytose vorübergehend verloren haben. Sie sind durch eine große sekretorische Aktivität von abbauenden Enzymen wie Proteasen, Elastasen, Kollagenasen und von Zytokinen gekennzeichnet. Weiterhin bilden sie mit ihren Pseudopodien einen epithelähnlichen Zellwall, der den Entzündungsherd begrenzt und innerhalb dessen ein aggressives und bakteriostatisches Mikromilieu entsteht. Mehrkernige Riesenzellen entstehen, wenn Makrophagen zu einem Syncytium fusionieren. Zunächst entstehen

ungeordnete Riesenzellen deren bis zu 100 Zellkerne im Zytoplasma verstreut liegen. Später können daraus geordnete Riesenzellen entstehen, deren Kerne in der Peripherie als Kranz zu erkennen sind. Die Riesenzelle hat gegenüber den mononukleären Zellen eine geringere Phagozytoseaktivität, aber eine 30 mal höhere Produktion von toxischen Sauerstoffverbindungen (H_2O_2 , O_2 -Radikale, $\cdot\text{OH}$ -Radikale). Bei längerem Andauern des Entzündungsprozesses kann es durch vermehrte Kollagensynthese der das Granulom umgebenden Fibroblasten zur bindegewebigen Abkapselung (Fibrose) und schließlich nach weitgehendem Schwund von Entzündungszellen zur Vernarbung kommen ^[80, 81].

2.2.2 Tuberkulose

Die Tuberkulose des Menschen wird in den meisten Fällen durch Infektion mit dem *Mycobacterium tuberculosis*, wesentlich seltener durch *Mycobacterium bovis* und bei immunsupprimierten Individuen durch *Mycobacterium avium* oder durch atypische Mykobakterien (z.B. *Mycobacterium kansasii*) verursacht ^[53]. Die minimale Infektionsdosis ist für diese Erreger unbekannt und wird für *Mycobacterium tuberculosis* auf eine Anzahl zwischen 5 und 200 Bakterien geschätzt ^[27]. Die Primärinfektion erfolgt gewöhnlich durch Inhalation der Mykobakterien. Bakterienhaltige Aerosol-Tröpfchen mit einer Größe von bis zu 5 μm erreichen die Alveolen, wo sie von Makrophagen phagozytiert werden. Mykobakterien können sich in Makrophagen intrazellulär vermehren ^[27, 103]. Über den Lymph- und Blutstrom kommt es zur Weiterverbreitung der Bakterien in andere Lungenbezirke und in andere Organe wie z.B. Lymphknoten, Niere und Knochen. Nur geringe Mengen bakteriellen Antigens führen zu einer proliferativen Wirtsreaktion mit Akkumulation von Lymphozyten und Makrophagen, während hohe Antigendosen zu einer exsudativen Wirtsreaktion mit Nekrosebildung führen. Ob sich die proliferative oder die exsudative Form entwickelt hängt aber auch von der Reaktionslage des Wirtsorganismus ^[27], von der Art des infizierenden Mykobakteriums und vor allem aber auch von der betroffenen Spezies ab. Somit wird die exsudative Form vor allem bei den großen und kleinen Wiederkäuern und bei der *Mycobacterium bovis*-Infektion des Schweines angetroffen, während die proliferative Form überwiegend beim Pferd und bei der *Mycobacterium avium*- und *Mycobacterium intracellulare*-Infektion des Schweines und Fleischfressers beobachtet wird ^[22]. Die Fähigkeit des Wirtsorganismus die Infektion mit Mykobakterien unter Kontrolle zu bekommen, basiert auf dem Aufbau einer effektiven

zellulären Immunantwort. Die zellvermittelte Immunität einschließlich der Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ tritt im Wirt als Ergebnis der T-Zell-Aktivierung auf. Die Überempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp führt nicht zur Abtötung der Mikroorganismen ist aber mitverantwortlich für Verkäsung und Kavernenbildung. Die Verkäsung folgt den frühen exsudativen Läsionen und entsteht, wenn dem Entzündungsgebiet direkt benachbarte Blutgefäße thrombosieren und somit eine ischämische Gewebsnekrose verursachen. Im Rahmen der zellvermittelten Immunität ist der Makrophage die Effektorzelle, welche wiederum von der Interaktion mit T-Lymphozyten abhängig ist. Aktivierte Makrophagen bewirken sowohl durch oxidative Mechanismen (Produktion von Wasserstoffperoxid und Sauerstoffradikalen), als auch durch nichtoxidative Mediatoren (hydrolytische Enzyme wie saure Phosphatase und Lysozym) eine Abtötung der Mykobakterien ^[28, 34].

2.2.3 Sarkoidose

Im Jahre 1899 wurde diese Erkrankung erstmals von Boeck beschrieben, als „Benignes Sarkoid“ bezeichnet und in die Gruppe der Neoplasien eingeordnet. 1905 erkannte er, dass es sich um eine entzündliche und nicht um eine tumoröse Erkrankung handelt. In der VII Internationalen Konferenz über Sarkoidose und andere granulomatöse Entzündungen in New York im Jahre 1975 wurde die Sarkoidose wie folgt definiert: Es handelt sich um eine multisystemische granulomatöse Erkrankung unbekannter Ätiologie, die v.a. Personen im zweiten bis vierten Lebensjahrzehnt betrifft und sich in den meisten Fällen in einer hilären Lymphadenopathie, pulmonären Infiltraten und Haut- oder Augenläsionen äußert. Die Diagnose kann mit größter Sicherheit gestellt werden, wenn klinisch-röntgenologische Befunde durch die histologische Diagnose von nicht verkästen Epitheloidzellgranulomen in mehr als einem Organ unterstützt werden ^[92,96]. Gleichzeitig müssen Granulome bekannter Ursache und lokale Sarkoidreaktionen ausgeschlossen werden. Weitere Kennzeichen der Sarkoidose sind erhöhte Serum-ACE-Spiegel, erhöhte Absorptionsraten von radioaktivem Gallium, abnormer Calciummetabolismus und abnorme Fluorescein-Angiographie ^[83]. Als Erkrankungsursache wird ein unbekanntes Agens exogener oder endogener Natur angenommen, welches in der Lunge Alveolarmakrophagen aktiviert und alveoläre T-Lymphozyten zur Sekretion proinflammatorischer Mediatoren anregt. Mediatorvermittelt kommt es dann zur Aktivierung benachbarter, noch ruhender Entzündungszellen und zur

Ausbildung einer Alveolitis. Die Mediatoren der Alveolitis sind wiederum eine notwendige Voraussetzung für die Granulombildung ^[82, 86]. Die Symptome der Sarkoidose werden verursacht durch granulombedingte Gewebekompressionen sowie Organdysfunktionen durch Fibrose und Immunkomplexvaskulitis ^[84].

Ein der menschlichen Sarkoidose ähnliches, jedoch nicht identisches Krankheitsbild wurde in der Veterinärmedizin nur beim Pferd beschrieben. Diese sehr selten vorkommende, ätiologisch ungeklärte generalisierte granulomatöse Entzündung manifestiert sich typischerweise mit einer exfoliativen Dermatitis und geht mit generalisierter Lymphadenopathie, Gewichtsverlust, Inappetenz und persistierendem niedrigem Fieber einher ^[100].

2.2.4 Toxoplasmose

Toxoplasma gondii ist ein weltweit verbreiteter, ubiquitär vorkommender, obligat intrazellulärer Parasit, dessen Wirtsspektrum zahlreiche Säugetiere, Vögel und den Menschen umfasst. Die Katze ist der einzige Endwirt für *Toxoplasma gondii*; sexuelle und asexuelle Vermehrung der Protozoen finden im felines Darmepithel statt. Die Oozysten werden dann mit dem Kot ausgeschieden. Zwischenwirte infizieren sich durch die Ingestion sporulierter mit dem Katzenkot ausgeschiedener Oozysten oder durch die Aufnahme von zystenhaltigem ungekochtem Fleisch. Nach der Aufnahme von Zysten oder Oozysten dringen die Sporozoiten in die Darmmukosa ein und werden dann mittels Blutstrom oder Lymphe in alle Gewebe verbreitet. In allen kernhaltigen Zellen kommt es zu einer raschen Vermehrung des als Tachyzoit bezeichneten Parasitenstadiums. Während die Tachyzoiten hauptsächlich in der Lunge lokalisiert sind, finden sich die ca. 7 Tage nach der Infektion durch langsame Vermehrung entstandenen Bradyzoiten bevorzugt in Gehirn, Herz- und Skelettmuskulatur, wobei es zur Formierung von Zysten kommt, welche Tausende von Parasiten enthalten ^[31]. Der Krankheitsverlauf ist stark variabel und hängt von einer großen Anzahl von Wirtsfaktoren, wie z.B. genetischen Faktoren und Immunstatus, aber auch vom Infektionsweg sowie der Pathogenität des Parasiten und der Art des infizierenden Parasitenstadiums ab ^[115]. Die Toxoplasmose-Infektion des Menschen verläuft gewöhnlich asymptomatisch aufgrund einer effektiven Immunantwort, die sich aus Antikörperbildung, T-Zellaktivierung und Zytokinfreisetzung sowie einer erregeresorbierenden kleinherdig-granulomatösen Entzündungsreaktion zusammensetzt. Lediglich in 15-20% der Fälle kommt es in der akuten Phase der Erkrankung zu milden klinischen Symptomen wie

Lymphadenopathie, Asthenie und moderatem Fieber. Im Gegensatz dazu kommt es bei immundefizienten Patienten zu einer Destruktion des Wirtsgewebes mit Manifestationen, die Pneumonie, Myokarditis und nekrotisierende Enzephalitis umfassen [31, 33, 45, 116].

2.2.5 Expression von ACE in granulomatösen Entzündungen

Die ersten Beobachtungen einer erhöhten ACE-Aktivität im Serum von Sarkoidosepatienten stammten von Liebermann [72], Silverstein [104] und Hinman [56]. Mittels immunhistochemischer Untersuchungen konnte eine große Anzahl ACE-positiver Zellen in Sarkoidosegranulomen festgestellt werden, was darauf schließen ließ, dass diese aktiv ACE synthetisieren und somit für die erhöhten Blutspiegel verantwortlich sind [91, 108]. Mittels ACE-mRNA-Bestimmung und Vergleich mit dem Granulomvolumen konnte die Theorie, dass die ACE-Serumaktivität die Bürde des Körpers an Granulomen reflektiert, bestätigt werden. Der starke Anstieg von ACE-spezifischer mRNA war sowohl auf eine größere Anzahl von Granulomen und in geringerem Maße wohl auch auf einen höheren Aktivitätsgrad der in die Granulomformierung einbezogenen Makrophagen und Epitheloidzellen zurückzuführen [19, 49]. Mit zunehmender Krankheitsdauer fallen die ACE-Serumspiegel generell ab, was einerseits auf eine Abnahme der Granulommasse und andererseits auf eine Zunahme der Fibrosierung zurückgeführt wird. Die Existenz eines Rezeptors für Ang II auf Makrophagen wurde aufgrund von Rezeptorbindungsversuchen vermutet und konnte durch Ergebnisse von Reverser-Transkriptase-PCR (polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion) gestützt werden. Anstiege der Transkriptionsrate des Ang II-Rezeptorgens konnten bei Patienten mit aktiver Sarkoidose, nicht jedoch bei Patienten mit inaktiver Sarkoidose oder bei gesunden Patienten beobachtet werden [84]. Es fehlt jedoch eine Beziehung zwischen erhöhtem ACE-Serumgehalt und dem röntgenologisch diagnostizierten Erkrankungsstadium, was die Bestimmung des Serum-ACE als Prognosefaktor ungeeignet erscheinen läßt [74, 102]. Obwohl die Epitheloidzellen bei Sarkoidose denen anderer granulomatöser Entzündungen morphologisch sehr ähnlich sind, konnte Silverstein [105] keine erhöhte ACE-Aktivität in tuberkulös veränderten Lymphknoten beobachten; auch waren die ACE-Serumspiegel bei Tuberkulosepatienten deutlich niedriger als bei Sarkoidosepatienten, was die Ergebnisse von Liebermann [72] bestätigt. Zu dem Ergebnis, dass die granulomatösen Entzündungen in ACE-bildend (wie z.B. Berylliose, Silikose,

Asbestose und Sarkoidose) und nicht-ACE-bildend (Tuberkulose) eingeteilt werden könnten, kam auch Allen ^[6]. Dahingegen stellte Mayr ^[74] bei 5-6% der an Tuberkulose und anderen granulomatösen Entzündungen leidenden Patienten eine erhöhte ACE-Serumaktivität fest. Bei Patienten mit Fremdkörpergranulomen war das Serum-ACE ebenfalls deutlich erhöht ^[93]. Grundsätzlich muss jedoch beachtet werden, dass die ACE-Serumspiegel in einigen Fällen weder die wahre zelluläre, noch die wahre plasmatische ACE-Konzentration widerspiegeln. Abhängig von der Messmethode können falsch hohe plasmatische Werte z.B. bei Anwesenheit anderer Serumpeptidasen, falsch niedrige Werte bei Anwesenheit endogener oder pharmakologischer Inhibitoren entstehen ^[10]. Welche biologische Funktion ACE im Rahmen granulomatöser Entzündungen übernimmt, ist nicht geklärt. Nachgewiesen werden konnte jedoch eine Förderung der Chemotaxis und Phagozytoseaktivität mononukleärer Zellen ^[130]. Außerdem greift ACE in den Entzündungsprozess ein, indem es die regulatorisch wirksamen Peptide Bradykinin und Substance P hydrolysiert, welche eine wichtige Rolle bei entzündlichen und immunologischen Reaktionen spielen, die z.B. lymphozytäre Proliferation, neutrophile Chemotaxis, Phagozytose und die Freisetzung von Mediatoren umfassen ^[20]. Weiterhin reguliert ACE durch seine vasokonstriktorische Wirkung die hyperämische Reaktion und die kapilläre Permeabilität im Entzündungsgebiet ^[65, 129].

3 Eigene Untersuchungen

3.1 *Material und Methoden*

3.1.1 Untersuchungsmaterial

Bei dem zu untersuchenden Material handelte es sich um formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe, entnommen von Patienten mit Tuberkulose, Sarkoidose, Toxoplasmose, Fremdkörpergranulomen oder Sonderformen granulomatöser Erkrankungen sowie um Normalgewebe und Gewebe mit granulomatösen Entzündungen unterschiedlicher Ätiologie verschiedener Tierarten. Die Sonderfälle granulomatöser Entzündungen des Menschen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Metze, Departamento de Anatomia Patológica, Universidade Estadual de Campinas aus Brasilien zur Verfügung gestellt. Das gesamte übrige Material stammte aus den Asservaten der Institute für Veterinär-Pathologie und Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen und rekrutierte sich aus dem diagnostischen Eingang der letzten zehn Jahre. Die Vorauswahl des Materials wurde anhand vorliegender klinischer Befunde, Diagnosen der histologischen Routinediagnostik sowie Spezialuntersuchungen, wie Ziehl-Neelsen-Färbung und Anzüchtung von Mykobakterien getroffen. Dies geschah mit der freundlichen Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Velcovsky, Abteilung für Pneumonologie der JLU Gießen. Die endgültige Auswahl erfolgte durch erneute Beurteilung eines Hämatoxylin-Eosin (HE)–gefärbten Paraffinschnittes.

3.1.1.1 *Gewebe vom Menschen*

Insgesamt wurden 41 Fälle von Tuberkulose, 29 Fälle von Sarkoidose, 30 Fälle von Toxoplasmose, 14 Fremdkörpergranulome und 22 Fälle sonstiger granulomatöser Entzündungen untersucht. Die Fälle sonstiger granulomatöser Entzündungen gliederten sich auf in 10 Fälle von Blastomykose, 9 Fälle von Morbus Hansen, 2 Fälle von Histiozytose bei Aidspatienten und einen Fall von Schistosomiasis.

3.1.1.2 *Gewebe vom Tier*

Die Testung der Antikörperklone CG1, CG2, CG3, CG4, CG5 und 5F1 sowie CD31 und KP1 erfolgte am Gewebematerial folgender 21 Tierarten: Menschenaffe, Hund, Katze, Panther, Leopard, Schwein, Wildschwein, Schaf, Ziege, Reh, Rind, Pferd,

Hamster, Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Gürteltier, Igel, Schildkröte und Vogel.

Um die ACE-Expression in den Blutgefäßen verschiedener Tierarten zu studieren, wurden Immunfärbungen an Geweben von 2 Affen, 18 Hunden, 14 Katzen, einem Löwen, einem Panther, einem Leoparden und 3 Kaninchen durchgeführt. Die entnommenen Proben stammten von folgenden Organen: Lunge, Leber, Niere, Magen, Darm, Gehirn, Milz, Lymphknoten, Haut und Skelettmuskulatur, wobei jedoch nicht bei jedem Tier Proben aller Organe vorhanden waren.

Die ACE-Expression in granulomatösen Entzündungen von Tieren wurden anhand der Tuberkuloseinfektion eines Menschenaffen, eines Hundes, sechs Katzen, eines Löwen, eines Panthers, eines Leoparden, der Lungenmykose eines Kaninchens und der granulomatösen Fremdkörperreaktionen von zehn Hunden untersucht.

3.1.2 Methoden

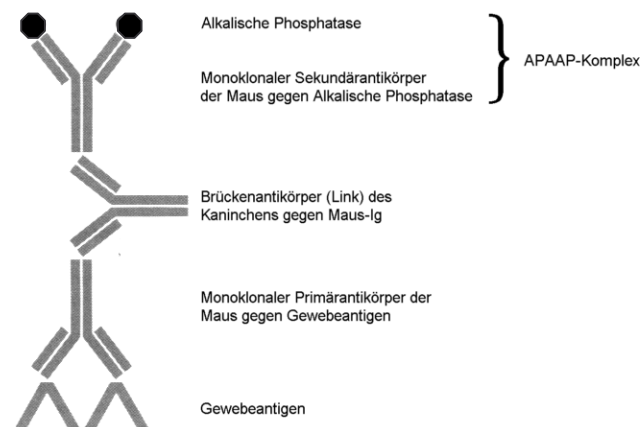
3.1.2.1 Schnittpräparate und HE-Färbung

Die Paraffinschnitte wurden mit einem Schlittenmikrotom (Jung SM 2000 R. Leica, Nussloch) in einer Schnittdicke von ca. 5 µm angefertigt. Zum Glätten der Schnitte wurden diese in ein mit ca. 48°C warmem Aqua dest. gefülltes Wasserbad eingebracht und nach wenigen Minuten auf Superfrostobjektträger (Menzel, Braunschweig) aufgezogen. Das Trocknen der Schnitte erfolgte für 24 Stunden in einem Brutschrank (BE 400, Memmert, Schwabach). Bis zur immunhistologischen Färbung wurden die Schnitte bei Raumtemperatur aufbewahrt. Für die HE-Färbung wurden die Schnitte für 10 Minuten in Xylol entparaffiniert, im Anschluß für jeweils 3 Minuten in Alkohol absteigender Konzentration (100%, 96%, 70%, 50%, 30%) gestellt und danach für ebenfalls 3 Minuten mit Aqua dest. gespült. Anschließend wurden sie für 7 Minuten in Hämalaulösung (Ansatz s. S. 105) gefärbt, für 10 Minuten mit Leitungswasser gespült und dann für 4 Minuten in Eosinlösung (Ansatz s. S. 105) gegengefärbt. Daraufhin wurden sie jeweils für 3 Minuten in Alkohol aufsteigender Konzentration (30%, 50%, 70%, 96%, 100%) gestellt. Zuletzt erfolgte eine Spülung in Xylol für 3 Minuten, danach wurden die Schnitte mit Diatex eingedeckt.

3.1.2.2 APAAP-Methode und monoklonale Antikörper

3.1.2.2.1 Prinzip

Der erste immunhistologische Reaktionsschritt ist der zwischen dem von der Maus stammenden mAk und dem Zielepitop des entsprechenden Antigens in dem zu untersuchenden Gewebe. Ein danach im Überschuss aufgebracht, vom Kaninchen stammender polyklonaler Antikörper (Link) stellt eine Brücke zwischen dem Primärantikörper und dem APAAP-Komplex her (Schema 1). Der APAAP-Komplex besteht zum einen aus einem von der Maus stammenden und gegen Alkalische Phosphatase gerichteten mAk und zum anderen aus löslichen Komplexen der aus Kälberdarm gewonnenen Alkalischen Phosphatase. Die Alkalische Phosphatase hydrolysiert dann das Substrat Naphthol AS-BI-phosphat zu Phenolkomponenten und Phosphaten. Die Phenole reagieren mit dem Chromogen Neufuchsin zu einem unlöslichen roten Azofarbstoff. Die wiederholte Applikation des Link und des APAAP-Komplexes bringt zusätzliche Enzymmoleküle an die Antigenbindungsstelle und bewirkt dadurch eine intensivere Farbreaktion. Die Zugabe von Levamisol zur Substratlösung dient der Blockade der endogenen Alkalischen Phosphatase ^[18].



Schema 1: Schema der Enzym-Immunkomplex-Methode nach dem APAAP-Prinzip (in Anlehnung an Handbuch II immunochemischer Färbemethoden, S. 24, DAKO, Hamburg, 1989)

3.1.2.2.2 Vorbehandlung der Schnittpräparate

Die Schnitte wurden zunächst 10 Minuten in Xylol entparaffiniert, dann jeweils 10 Minuten in Aceton und einem Aceton-Tris-Waschpuffer-Gemisch (1 Vol : 1 Vol) inkubiert und abschließend einmal mit Tris-Waschpuffer (Ansatz s. S. 104) gespült.

3.1.2.2.3 Antigen-Retrieval

Durch Hitzebehandlung der Paraffinschnitte mit Hilfe von Mikrowellenbestrahlung in einem Haushaltsmikrowellengerät kann bei den meisten Antikörpern eine deutlich verbesserte Immunreaktivität erzielt werden ^[101]. Dies beruht auf der Denaturierung bestimmter Proteine, die die Zielepitope verwendeter Antikörper besetzt halten. Durch die Hitzeeinwirkung wird deren Polypeptidgerüst gespalten und die durch die Formalinfixierung entstandenen Querverbindungen gelöst. Hierfür ist es jedoch notwendig, dass die Erhitzung nicht in trockenem Zustand erfolgt, da viele Proteinspezies, solange sie nicht hydratisiert sind, gegenüber Hitzedenaturierung resistent sind ^[85].

Spezielle Kunststoff-Mikrowellen-Küvetten wurden mit je 8 Objektträgern bestückt und mit kurz zuvor angesetztem Citratpuffer (Ansatz s. S. 105) schnittbedeckend gefüllt. In nicht vollständig besetzte Küvetten wurden Leerobjektträger hinzugesteckt, um standardisierte Bedingungen zu erhalten. Die Küvetten wurden auf dem Drehteller des Mikrowellenofens in einem Kreis aufgestellt. Um konstante Voraussetzungen für die Färbung zu schaffen, wurde immer die gleiche Anzahl an Küvetten (n=8) verwendet. Die Inkubation in der Mikrowelle erfolgte bei 600 Watt für 5 mal 5 Minuten, wobei jeweils nach Ablauf von 5 Minuten der durch Verdunstung und Siedeverzug entstandene Flüssigkeitsverlust durch Auffüllen mit Citratpuffer wieder ausgeglichen wurde. Im Anschluß an die Mikrowellenbehandlung wurden die Schnitte 3mal in Tris-Waschpuffer gespült.

3.1.2.2.4 Verwendete Antikörper

3.1.2.2.4.1 *Primärantikörper*

Anti-CD 143 (CG 2):

Zur Beurteilung der ACE-Expression in granulomatösen Entzündungen bei Mensch und Tier sowie der endothelialen ACE-Verteilung im Blutgefäßsystem gesunder Individuen verschiedener Tierarten wurde der Antikörper CG2/1193-36-18 (BMA, Augst, Schweiz) eingesetzt. Der von der Maus stammende mAk vom Ig G1-Typ ist gegen humanes ACE gerichtet ^[24], das in dominierender Weise von kleinen Arterien und Arteriolen, nicht jedoch von kleinen oder großen Venen und ebenfalls nicht von Endothelzellen in der Niere des Menschen exprimiert wird ^[76]. Eine Reaktion dieses

Antikörpers auch mit ACE anderer Spezies, wurde bisher nicht geprüft. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt.

Anti-CD 143 (CG1, CG3, CG4, CG5):

Diese ebenfalls gegen humanes ACE der Niere gerichteten, von der Maus stammenden mAk sind nicht kommerziell erhältlich und wurden freundlicherweise von Herrn Dr. H. Towbin (Novartis, Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Sie wurden jeweils in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt.

Anti-CD 143 (5F1):

Dieser gegen humanes ACE der Lunge gerichtete, von der Maus stammende mAk wurde von Herrn Dr. S. M. Danilov (UIC, Chicago, USA) zur Verfügung gestellt. Er wurde 1:50 verdünnt.

Anti-CD 68 (KP 1):

Um Lage, Art und Anzahl der Makrophagen, Epitheloidzellen und Riesenzellen immunhistologisch zu vergleichen, wurde der Anti-Human-Makrophagen-Antikörper KP1 verwendet. Dieser erkennt ein transmembranes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 110 kDa, wie es von Makrophagen aus einer Vielzahl von Geweben wie z.B. der roten Milzpulpa, der Leber, der Lamina propria des Darmes und vom Knochenmark exprimiert wird und als CD 68 klassifiziert ist. Dieser Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt und von der Firma DAKO, Hamburg bezogen.

Anti-CD 31 (JC/70A):

Der monoklonale Maus-anti-Humanendothel-Antikörper JC/70A (DAKO) reagiert mit einem 100 kDa Glykoprotein, welches von allen Endothelzellen exprimiert wird sowie mit einem 130 kDa Glykoprotein, welches von Thrombozyten exprimiert wird und als CD 31 klassifiziert ist. Dieser Antikörper wurde eingesetzt, um eine Aussage über die Anzahl der Gefäße im Entzündungsgebiet zu treffen und um die vaskulären Strukturen in unterschiedlichen Organen verschiedener Tierspezies unter physiologischen Bedingungen beurteilen zu können. Seine Verdünnung betrug 1:50.

Negativkontrolle (MR12/53):

Der gegen Kaninchen-Ig gerichtete Maus-Antikörper (DAKO) wurde als Negativkontrolle eingesetzt; die Verdünnung betrug 1:50.

3.1.2.2.4.2 *Brückenantikörper*

Als Brückenantikörper wurde für alle Primärantikörper ein polyklonales Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin (DAKO) in einer Verdünnung 1:40 verwendet. Er fungiert als Brücke zwischen dem von der Maus stammenden Primärantikörper und dem ebenfalls von der Maus stammenden APAAP-Komplex.

3.1.2.2.4.3 *Detektionssystem*

Als Detektionssystem wurde für alle Schnitte der 1:50 verdünnte APAAP-Komplex (DAKO) eingesetzt, welcher Alkalische Phosphatase und mAk gegen Alkalische Phosphatase beinhaltet.

3.1.2.2.5 *Inkubation der Antikörper*

3.1.2.2.5.1 *Primärantikörper*

Der jeweilige Antikörper wurde in RPMI-Lösung (Ansatz s. S. 104) verdünnt. Um ein Abfließen des Antikörpers zu verhindern, wurden die Objektträger auf ihrer Rückseite und auf der Vorderseite rings um den Schnitt mit Papiertüchern abgetrocknet. Auf jeden Objektträger wurden 120 µl Antikörperlösung pipettiert, gleichmäßig über den Schnitt verteilt und für 30 Minuten in horizontaler Lage bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach wurden die Objektträger in Glasküvetten gefüllt und 3mal mit Tris-Waschpuffer (Ansatz s. S. 104) gespült.

3.1.2.2.5.2 *Brückenantikörper*

Der Brückenantikörper wurde ebenfalls mit RPMI-Lösung verdünnt. Nach Abtrocknen der Objektträger wurden 120 µl der Verdünnung auf die Schnitte aufgebracht und 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte ein 3maliges Spülen mit Tris-Waschpuffer.

Bei der immunhistologischen Färbung von Kaninchengewebe wurde dem RPMI des Brücken-Antikörpers Kaninchenserum zugefügt, um die Kreuzreaktivität des Antikörpers mit Serumproteinen des Kaninchens zu unterdrücken und somit eine unspezifische Hintergrundreaktion zu vermeiden.

3.1.2.2.5.3 *Detektionsantikörper*

Auch der APAAP-Komplex wurde in RPMI-Lösung verdünnt. Nach Abtrocknen der Objektträger wurden 120 µl der Verdünnung auf die Schnitte aufgebracht und für 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte ein 3maliges Spülen mit Tris-Waschpuffer.

3.1.2.2.5.4 *Brückenantikörper*

Die Arbeitsschritte der Zweitinkubation des Brückenantikörpers glichen denen der Erstinkubation; die Inkubationszeit betrug jedoch nur 10 Minuten. Nach der Inkubation wurden die Objektträger 3 mal mit Tris-Waschpuffer gespült.

3.1.2.2.5.5 *Detektionsantikörper*

Für die Zweitinkubation des Detektionsantikörpers galt das gleiche wie für die des Brückenantikörpers jedoch wurde nach der Inkubation 8 mal mit Tris-Waschpuffer gespült.

3.1.2.2.6 Entwicklung, Gegenfärbung und Eindecken

Entwicklung:

Jeweils 10-12 Objektträger wurden in Glasküvetten gestellt und die Küvetten mit der Entwicklerlösung (Ansatz s. S. 106) schnittbedeckend gefüllt. Die Küvetten wurden dann für 25 Minuten auf einem Schüttler (Swip KL2. E. Bühler. Bodelshausen) (120-140/ Min) gestellt. Nach Abschluß der Entwicklung wurden die Objektträger mit Leitungswasser gespült.

Hämalaun-Gegenfärbung:

Die Gegenfärbung erfolgte durch Eintauchen der Objektträger für 2 Minuten in Hämalaunlösung. Danach wurden die Schnitte 3mal mit Leitungswasser gespült, um überschüssiges Hämalaun zu entfernen.

Eindecken:

Das Eindecken der gefärbten Schnitte erfolgte mittels Glycingelatine (Glycerol, DAKO) und handelsüblichen Deckgläsern der Größe des jeweiligen Schnittes entsprechend. Zunächst wurde die Glycingelatine in einem Wasserbad auf einer Heizplatte bei 75°C verflüssigt, dann auf jeden Schnitt ein Tropfen aufgetropft und ein Deckgläschen vorsichtig luftblasenfrei aufgedrückt.

3.1.2.3 *Auswertung der immunhistologischen Untersuchungen*

3.1.2.3.1 Gewebereaktionen beim Menschen

Die granulomatösen Entzündungen Sarkoidose, Tuberkulose und Toxoplasmose des Menschen wurden zunächst nach morphologischen Kriterien beurteilt. Hierbei wurden Anzahl, Größe und Form der Granulome, Anzahl und Form der Epitheloidzellen, Anzahl der Riesenzellen (geordnete und ungeordnete sowie Riesenzellen insgesamt), Anzahl der einzeln, in Gruppen und in Granulomen liegenden Makrophagen, der Endothelien und der Lymphozyten sowie Quantität und Art der Nekrosen bzw. Fibrose beachtet. Eine exakte Erkennung und Beurteilung der obengenannten Strukturen wurde durch den parallelen Einsatz des Endothelmarkers Anti-CD 31 (Klon JC 70A) und des Makrophagenmarkers Anti-CD 68 (Klon KP1) gewährleistet. Bei der semiquantitativen lichtmikroskopischen Auswertung wurden die morphologischen Kriterien mit 0, 1, 2 oder 3 entsprechend einer einfachen kategorischen Rangfolge bewertet. Die Definitionen dieser Zahlen können Tab. 1 entnommen werden. Die zelltyp- und zellformationsspezifische ACE-Expression der am Bild der granulomatösen Entzündung beteiligten Zellen wurde unter Verwendung der Klone CG1, CG2 und CG4 beurteilt. Hierbei wurde die Immunreaktivität der einzeln, in Gruppen und in Granulomen liegenden Makrophagen, der spindelförmigen und polygonalen Epitheloidzellen, der geordneten und ungeordneten Riesenzellen sowie der Endothelzellen, der Lymphozyten und der Fibroblasten z.B. mit 3 bewertet, wenn eine starke ACE-Expression vorlag. Der Wert 2 entsprach einer mäßigen, der Wert 1 einer geringen ACE-Expression. Mit 0 wurde eine fehlende Immunreaktivität gewertet, die dem Resultat der Negativkontrolle (MR12/53) entsprach.

Definition Auswertungskriterien		Scorewerte			
		0	1	2	3
Granulome	Anzahl	keine 0	gering 1-2 (1-4)	mäßig 3-12 (5-12)	hoch >12
		-	klein < 150 µm	mittelgroß 150-500 µm	groß >500 µm
	Form	-	rund	unregelmäßig	landkartenartig
Epitheloid- zellen	Anzahl	keine 0	gering 1-14 (1-9)	mäßig 15-40 (10-20)	hoch >40 (>20)
	Form	spindelförmig	polygonal	-	-
Riesen- zellen	Anzahl gesamt	keine 0	gering 1-2	mäßig 3-5	hoch >5
	Anzahl geordnet	keine	gering	mäßig	hoch
	Anzahl ungeordnet	keine	gering	mäßig	hoch
Makro- phagen	Anzahl einzeln	keine 0	gering 1-5	mäßig 6-20 (6-15)	hoch >20 (>15)
	Anzahl in Gruppen	keine 0	gering 1-4	mäßig 5-9	hoch >9
	Anzahl in Granulomen	keine 0	gering <33,3%	mäßig 33,3-66,6%	hoch >66,6%
Endothelien	Anzahl	keine 0	gering 1-5	mäßig 6-9	hoch >9
Lympho- zyten	Anzahl	keine 0	gering 1-9	mäßig 10-30	hoch >30
Nekrosen	Quantität	keine	gering	mäßig	ausgeprägt
	Art	strukturiert	unstrukturiert	-	-
Fibrose	Quantität	keine	gering	mäßig	ausgeprägt
	Art	zellreich	zellarm	-	-
Zelltyp- und zellformationsspezifische Immunreaktivität		keine	gering	mäßig	ausgeprägt

Tabelle 1: Auswertungskriterien der analysierten Gewebeproben granulomatöser Entzündungen.

Anzahl, Größe und Form der Granulome wurden anhand der 4er-Objektivvergrößerung beurteilt; die Bewertung der übrigen Kriterien erfolgte anhand der 40er-Objektivvergrößerung. In der Tabelle sind die den Scorewerten entsprechenden Zahlen bei Sarkoidose und Tuberkulose (bzw. bei Toxoplasmose: Wert in Klammern) jeweils bezogen auf ein Gesichtsfeld angegeben.

3.1.2.3.2 Gewebereaktionen bei Tieren

3.1.2.3.2.1 *Testung der Antikörper*

Um zu überprüfen ob die gegen humanes ACE gerichteten Antikörperklone CG1, CG2, CG3, CG4, CG5 und 5F1 auch die ACE-Formen verschiedener Tierarten erkennen, wurden am Gewebematerial 21 verschiedener Tierarten APAAP-Färbungen durchgeführt. Ebenso wurde mit dem Endothelmarker JC/70A und dem Makrophagenmarker KP1 verfahren. Bei der mikroskopischen Auswertung wurde eine positive Immunreaktion mit +, eine fehlende Immunreaktion mit – bewertet, wobei die Stärke der Expression unberücksichtigt blieb.

3.1.2.3.2.2 *Vaskuläre ACE-Verteilung bei verschiedenen Tierspezies*

Für die Tierarten, deren ACE von den getesteten Antikörperklonen erkannt wurde (Menschenaffe, Hund, Katze, Löwe, Kaninchen), wurde eine Kartierung der Vaskularisation der Organe Leber, Lunge und Niere in Bezug auf die ACE-Expression vorgenommen.

Dabei wurde das Gefäßsystem der Leber in folgende Gefäßabschnitte unterteilt: GA= große Arterien, MA= mittlere Arterien, KA= kleine Arterien, GPA= große Portalarterien, GPV= große Portalvenen, KPA= kleine Portalarterien, KPV= kleine Portalvenen, SI= Sinusoide, ZV= Zentralvenen und GV= große Venen.

Die Vaskularisation der Lunge wurde wie folgt gegliedert: GPA= große Pulmonalarterien, MPA= mittlere Pulmonalarterien, KPA= kleine Pulmonalarterien, AKP= Alveolarkapillaren, BKP= Bronchialkapillaren, KAV= kleine Alveolarvenen, KPV= kleine Pulmonalvenen, MPV= mittlere Pulmonalvenen und GPV= große Pulmonalvenen.

Die analysierten Gefäßabschnitte in der Niere waren: GA= große Arterien, MA= mittlere Arterien, KA= kleine Arterien, VAVE= Vas afferens/Vas efferens, GKP= Glomerularkapillaren, IKP=interstitielle Kapillaren, KV= kleine Venen, MV= mittlere Venen und GV= große Venen.

Die Stärke der Immunreaktion wurde wie folgt bewertet: - = keine Immunreaktion, (+)= sehr geringe Immunreaktion, += geringe Immunreaktion, ++= mäßig starke Immunreaktion und +++= starke Immunreaktion. Zeigten die Individuen einer Tierart voneinander abweichende Ergebnisse der Immunreaktion, so wurde in die Tabelle die Expressionsstärke eingetragen, die bei den meisten Individuen beobachtet

wurde. Gleichzeitig wurde diese, innerhalb einer Tierart vorkommende Heterogenität gekennzeichnet.

3.1.2.4 *Datenverarbeitung und Statistik*

Die bezüglich der Morphologie und ACE-Expression unterschiedlicher Zelltypen und Zellformationen in den granulomatösen Entzündungen Sarkoidose, Tuberkulose und Toxoplasmose des Menschen erhobenen Daten wurden mittels des Statistikprogrammes SPSS 8.0 für Windows[®] analysiert. Es wurden die morphologischen und immunhistologischen Kriterien erfasst, die Expressionsstärken verschiedener Zelltypen und Zellformationen untereinander und gegeneinander korreliert, wobei der Korrelationskoeffizient nach Spearman über Richtung und Stärke der jeweiligen Korrelationen Auskunft gab. Das Signifikanzniveau wurde mittels des CHI-Quadrat-Tests nach Pearson bestimmt. Korrelationen mit einem Signifikanzniveau unter 5% sind in den Tabellen mit einem ↑, solche mit einem Signifikanzniveau unter 1% mit ↑↑ und solche unter 0,1% mit ↑↑↑ gekennzeichnet. Inverse Korrelationen werden entsprechend des Signifikanzniveaus mit ↓, ↓↓ bzw. ↓↓↓ angegeben. Bei Fällen mit einer erwarteten Häufigkeit von unter 5 wurde der Fisher-Exakt-Test verwandt. Die Säulendiagramme wurden mittels Microsoft Excel 97 für Windows[®] erstellt. Die statistischen Analysen wurden unter der Betreuung von Herrn Dr. F.E. Franke, Institut für Pathologie der JLU Gießen und der Co-Betreuung von Herrn Dr. E. Eichner, Mathematisches Institut der JLU Gießen durchgeführt.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 ACE (CD143) in granulomatösen Entzündungen beim Menschen

Zunächst wurden die charakteristischen morphologischen Kriterien der Sarkoidose, der Tuberkulose und der Toxoplasmose untersucht. Die ermittelten Daten gaben einerseits Auskunft über zelluläre und gewebliche Besonderheiten dieser granulomatösen Erkrankungen, andererseits konnte Umfang und Ausprägung der ACE-Expression direkt verglichen werden. Dieser Vergleich stützt sich ebenso wie alle angegebenen Zahlenwerte auf den kommerziell erhältlichen anti-ACE mAk CG2. Abgesehen von geringen Unterschieden in der Affinität zu ihren Epitopen an formalinfixiertem Paraffinmaterial ergaben die mAk CG1 und CG4 in den Zellen des makrophagozytären Systems und granulomatösen Entzündungen des Menschen ein identisches immunhistologisches Reaktionsmuster.

3.2.1.1 Sarkoidose

3.2.1.1.1 Morphologische Kriterien

In 64,3% der Sarkoidosefälle waren Granulome im histologischen Schnittpräparat zahlreich vertreten, nur 7,1% der Fälle (2 von 29) wiesen wenige Granulome auf. Die Mehrzahl der Granulome (59,3%) waren von mittlerer Größe (150-500 μm), 37% waren kleiner als 150 μm . Die Granulome waren zumeist unregelmäßig geformt (77,8%), wobei überwiegend sowohl rundliche, als auch landkartenartige Granulome in jeweils 11,1% der Fälle (3 von 29) angetroffen wurden. In knapp der Hälfte (48,1%) wurden in mäßiger Anzahl Epitheloidzellen angetroffen, wobei es sich bei 76% um großleibige, polygonale und in 24% um spindelförmige Epitheloidzellen handelte. Die Anzahl der Riesenzellen variierte sehr stark: In 35,7% der Fälle waren Riesenzellen zahlreich, in 25% in mäßiger Anzahl, in 17,9% in geringer Anzahl und in 21,4% überhaupt nicht vertreten. Nahezu gleich häufig waren Riesenzellen des geordneten und des ungeordneten Typs nachweisbar. In 57,1% der Sarkoidosen fehlten einzeln liegende Makrophagen vollkommen und in keinem Fall wurden sie zahlreich gefunden. Mit 64,3% wiesen die meisten Präparate nur wenige in Gruppen liegende Makrophagen auf, im Gegensatz dazu aber mit 85,7% zahlreiche in Granulomen organisierte Makrophagen. In knapp der Hälfte der histologischen Schnittpräparate

(44,4%) wurden perigranulomatös zahlreiche Endothelien angetroffen. Die Anzahl der Lymphozyten war in 62,5% der Sarkoidosegewebe gering. Nur ein einziger der 29 Sarkoidosefälle wies Nekrosen auf. Die Stärke der entzündungsumgebenden Fibrose variierte stark. Eine Fibrosierung fehlte in 32,1% der Fälle überhaupt und war in der überwiegenden Anzahl der Gewebeproben (78,9%) von zellarmer und faserreicher Struktur.

3.2.1.1.2 Korrelation morphologischer Kriterien untereinander

In Tab. 2 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung zusammengefasst.

Mit zunehmender Anzahl nachweisbarer Granulome waren quantitativ sowohl Epitheloidzellen ($r=0,427^*$, $p=0,026$, $n=27$), als auch in Granulomen organisierte Makrophagen ($r=0,638^{**}$, $p<0,001$, $n=28$) vermehrt nachzuweisen, quantitativ vermindert aber einzeln liegende Makrophagen ($r=-0,385^*$, $p=0,043$, $n=28$). Im Gegensatz hierzu zeigten Größe und Form der Granulome keine quantitativen Abhängigkeiten von der Anzahl der Epitheloidzellen oder der Position der Makrophagen, jedoch korrelierten beide Kriterien qualitativ mit dem Nachweis groß-leibiger polygonaler Epitheloidzellen. Das heißt, je größer oder unregelmäßiger die Granulome waren, desto häufiger wurde dieser Epitheloidzelltyp angetroffen ($r=0,410^*$, $p=0,047$, $n=24$). Der spindelförmige Epitheloidzelltyp war dagegen signifikant häufiger mit einer ausgeprägten Fibrosereaktion verbunden ($r=0,597$, $p=0,002$, $n=25$), ebenso der Nachweis kleinerer Granulomformen ($r=-0,412^*$, $p=0,033$, $n=27$).

Darüber hinausgehend waren keine weiteren möglichen Einflußfaktoren (z.B. Lymphozyten oder Endothelien) und keine weiteren Gewebsreaktionen (z.B. Fibrose oder Nekrose) signifikant korreliert. Auffällig war allerdings noch die gewebliche Position der Makrophagen: Je mehr einzeln liegende Makrophagen nachweisbar waren, desto häufiger waren auch in kleinen Gruppen liegende Makrophagen anzutreffen ($r=0,666^*$, $p<0,001$, $n=28$); die Anzahl der in Granulomen liegenden Makrophagen korrelierte jedoch negativ dazu ($r=0,622^{**}$, $p<0,001$, $n=28$). Die Anzahlen geordneter und ungeordneter Riesenzellen zeigten statistisch zahlenmäßig keine Abhängigkeiten voneinander ($r=0,336$, $p=0,101$, $n=25$), korrelierten jeweils aber positiv mit der Gesamtzahl nachweisbarer Riesenzellen ($r=0,777^{**}$ bzw. $r=0,740^{**}$, $p<0,001$, $n=25$).

Morphologische Kriterien		Granulome			Epitheloidzellen		Riesenzellen			Makrophagen			Endothelien	Lymphozyten	Nekrose		Fibrose	
		Anzahl	Größe	Form	Anzahl	Form	Anzahl gesamt	Anzahl geordnet	Anzahl ungeordnet	Anzahl einzel	Anzahl in Gruppen	Anzahl in Granulomen	Anzahl	Anzahl	Quantität	Art	Quantität	Art
Granulome	Anzahl		-	-	↑	-	-	-	-	↓	-	↑↑↑	-	-	-	-	-	-
	Größe			-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-
	Form				-	↑↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Epitheloidzellen	Anzahl					-	-	-	-	↓	-	↑	-	-	-	-	-	-
	Form						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓↓	-
Riesenzellen	Anzahl gesamt							↑↑↑	↑↑↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Anzahl geordnet								-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Anzahl ungeordnet									-	-	-	-	-	-	-	-	-
Makrophagen	Anzahl einzeln										↑↑↑	↓↓↓	-	-	-	-	-	-
	Anzahl in Gruppen											↓↓↓	-	-	-	-	-	-
	Anzahl in Granulomen											↓↓↓	-	-	-	-	-	-
Endothelien	Anzahl													-	-	-	-	-
Lymphozyten	Anzahl														-	-	-	-
Nekrose	Quantität															-	-	-
	Art																-	-
Fibrose	Quantität																	-
	Art																	-

Tabelle 2: Sarkoidose, Korrelationsanalyse morphologischer vs. morphologischer Kriterien. Nur signifikante Ergebnisse sind verzeichnet nach ihrem Signifikanzniveau: ↑ = p<0,05, ↑↑ = p<0,01, ↑↑↑ = p<0,001. Inverse Korrelationen sind durch ↓, ↓↓, ↓↓↓ entsprechend dem Signifikanzniveau gekennzeichnet.

3.2.1.1.3 Einfluss morphologischer Kriterien auf die ACE (CD143)-Expression verschiedener Zelltypen

Tab. 3 gibt einen Überblick über die analysierten Faktorbeziehungen.

Die Immunreaktivität der verschiedenen mAk und die Besonderheiten bei Sarkoidose illustriert Abb. 1 an einigen Beispielen. Mit zunehmender Anzahl und Größe der Granulome konnte eine stärkere ACE-Expression der polygonalen Epitheloidzellen ($r=0,527^*$, $p=0,017$, $n=20$) beobachtet werden; die Expression übriger Makrophagen, der spindelförmigen Epitheloidzellen sowie der geordneten und ungeordneten Riesenzellen war hiervon jedoch unbeeinflusst. Die ACE-Expression polygonaler Epitheloidzellen war außerdem abhängig von der Anzahl nachweisbarer Epitheloidzellen ($r=0,470^*$, $p=0,037$, $n=20$) und in Granulomen liegender Makrophagen ($r=0,506^*$, $p=0,23$, $n=20$) und war invers mit der Anzahl in Gruppen liegender Makrophagen korreliert ($r=-0,471$, $p=0,036$, $n=20$). Der vermehrte Nachweis von Riesenzellen war mit einer gesteigerten ACE-Expression der in Granulomen liegenden Makrophagen assoziiert ($r=0,393^*$, $p=0,039$, $n=28$). Je mehr in Gruppen liegende Makrophagen vorhanden waren, desto ausgeprägter war die ACE-Expression benachbarter Endothelzellen ($r=0,522^*$, $p=0,022$, $n=19$), wohingegen sich die Anzahl der in Granulomen liegenden Makrophagen schwächend auf den Expressionsnachweis der Endothelzellen auswirkte ($r=-0,538$, $p=0,018$, $n=19$). Die endotheliale Expression war ferner umso stärker ausgeprägt, je zellärmer und faserreicher eine umgebende Fibrose aufgebaut war ($r=0,482^*$, $p=0,036$, $n=19$). Weitere Abhängigkeiten, insbesondere zu Lymphozyten und zur Quantität entzündungsbedingter Fibrosen, waren statistisch nicht ersichtlich.

Morphologische Kriterien		ACE (CD143)-Expression								
		Makrophagen			Epitheloidzellen		Riesenzellen		Endothelzellen	Fibroblasten
		einzeln	in Gruppen	in Granulomen	spindelförmig	polygonal	geordnet	ungeordnet		
Granulome	Anzahl	-	-	-	-	↑	-	-	-	-
	Größe	-	-	-	-	↑	-	-	-	-
	Form	↑	-	-	-	-	-	-	-	-
Epitheloidzellen	Anzahl	-	-	-	-	↑	-	-	-	-
	Form	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Riesenzellen	Anzahl gesamt	-	-	↑	-	-	-	-	-	-
	Anzahl geordnet	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Anzahl ungeordnet	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Makrophagen	Anzahl einzeln	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Anzahl in Gruppen	-	-	-	-	↓	-	-	↑	-
	Anzahl in Granulomen	-	-	-	-	↑	-	-	↓	-
Endothelien	Anzahl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lymphozyten	Anzahl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nekrose	Quantität	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Art	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fibrose	Quantität	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Art	-	-	-	-	-	-	-	↑	-

Tabelle 3: Sarkoidose: Korrelationsanalyse der ACE (CD143)-Expression vs. morphologischer Kriterien. Nur signifikante Ergebnisse sind verzeichnet nach ihrem Signifikanzniveau: ↑ = p<0,05. Inverse Korrelationen sind durch ↓ entsprechend dem Signifikanzniveau gekennzeichnet.

3.2.1.1.4 ACE (CD143)-Expression verschiedener Zelltypen und Zellformationen

Die ACE-Expressionsstärke der Makrophagen stand in eindeutigem Zusammenhang mit deren Lokalisation und stieg mit zunehmendem Grad der Granulomformierung. Während einzeln liegende Makrophagen in der überwiegenden Anzahl (54,5%) der histologischen Schnittpräparate eine mäßig starke, in 36,4% nur eine geringe und in keinem Fall eine starke ACE-Expression zeigten, überwog bei den in Gruppen liegenden Makrophagen mit 44% und bei den in Granulomen liegenden Makrophagen sogar mit 92,9% eindeutig die starke Expression. Spindelförmige Epitheloidzellen wiesen in allen Fällen, polygonale in 80% der Fälle eine starke ACE-Expression auf. Auch bei den geordneten sowie bei den ungeordneten Riesenzellen dominierte mit 94,7% bzw. 89,5% eindeutig die starke ACE-Expression; eine geringe oder fehlende Expression wurde hier nicht verzeichnet. Die Expressionsstärke der perigranulomatös oder im Entzündungsfeld lokalisierten Endothelien variierte von negativ bis stark positiv, wobei geringe, mäßige und starke Expressionen nahezu gleich häufig beobachtet wurden. Die vorhandenen Fibroblasten exprimierten in rund zwei Drittel der Fälle kein und in rund einem Drittel nur gering ACE.

3.2.1.1.5 Korrelation ACE (CD143)-exprimierender Zelltypen und –formationen untereinander

Einen Überblick über die Ergebnisse gibt Tab. 4.

Die ACE-Expressionen einzeln und in Gruppen liegender Makrophagen waren positiv miteinander korreliert ($r=0,784^{**}$, $p=0,004$, $n=11$), während die ACE-Expression der in Granulomen liegenden Makrophagen von beiden unabhängig war ($r=0,280$, $p=0,404$, $n=11$ bzw. $r=0,110$, $p=0,602$, $n=25$). Die ACE-Expression in Granulomen liegender Makrophagen korrelierte positiv mit der polygonaler Epitheloidzellen ($r=0,667^{**}$, $p=0,001$, $n=20$) und diese wiederum mit der ungeordneter Riesenzellen ($r=0,671^{*}$, $p=0,024$, $n=11$). Die Expressionsstärke der Endothelzellen stand in Zusammenhang mit der von Fibroblasten ($r=0,586^{**}$, $p=0,008$, $n=19$). Weitere Abhängigkeiten wurden durch die statistische Analyse nicht aufgedeckt.

ACE (CD143)		Makrophagen			Epitheloidzellen		Riesenzellen		Endothelzellen	Fibroblasten
		einzel	in Gruppen	in Granulomen	spindel-förmig	polygonal	geordnet	ungeordnet		
Makrophagen	einzel		↑↑	-	-	-	-	-	-	-
	in Gruppen			-	-	-	-	-	-	-
	in Granulomen				-	↑↑	-	-	-	-
Epitheloidzellen	Spindel-förmig					-	-	-	-	-
	polygonal						-	↑	-	-
Riesenzellen	geordnet							-	-	-
	ungeordnet								-	-
Endothelzellen										↑↑
Fibroblasten										

Tabelle 4: Sarkoidose: Korrelationsanalyse ACE (CD143)-exprimierender Zellformen untereinander. Nur signifikante Ergebnisse sind verzeichnet nach ihrem Signifikanzniveau:

↑ = p<0,05, ↑↑ = p<0,01. Inverse Beziehungen wurden nicht gefunden.

Abb. 1

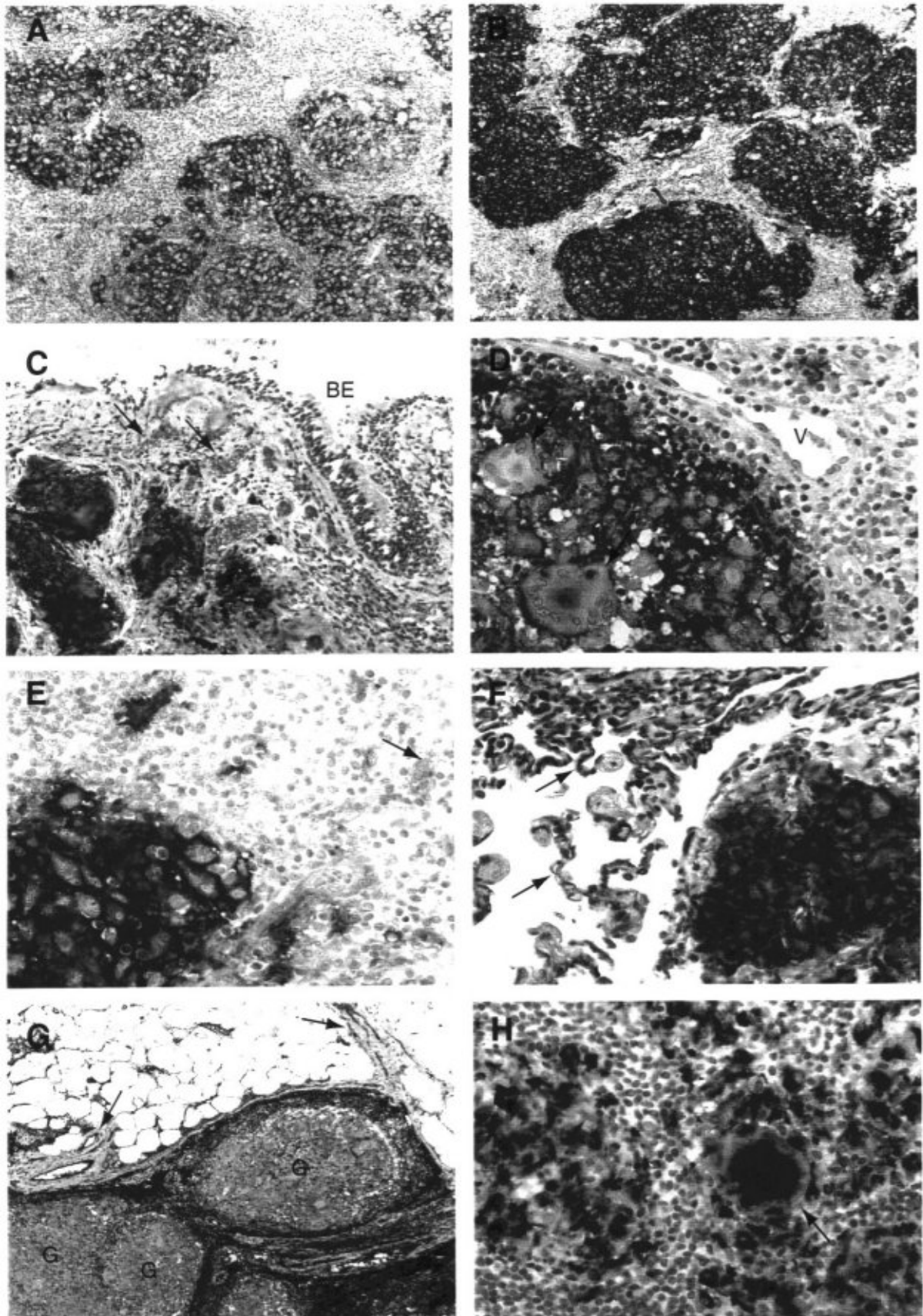


Abb. 1: Expression von ACE (CD 143) (A-F) in der **Sarkoidose des Menschen** im Vergleich zum Endothelmarker PECAM-1 (CD 31) (G) und Makrophagenmarker KP1 (CD 68) (H).

A: Lymphknoten: Mäßig bis starke ACE-Expression in den Granulomen (Anti-ACE mAk CG 1), x 40.

B: Lymphknoten: Deutlich ACE-positive Granulome und Endothelien einzelner kleiner Gefäße (Anti-ACE mAk CG2), x 40.

C: Lunge: Die starke ACE-Expression kleiner Granulome im Bereich der oberflächlichen Bronchuswand steht im Gegensatz zu negativem Bronchialepithel (BE). Im Endothel kleiner Schleimhautvenen (Pfeile) kann kein ACE detektiert werden (Anti-ACE mAk CG4), x 120.

D: Lymphknoten: Nahezu geordnete Riesenzellen eines Granuloms zeigen sowohl eine starke membranöse Expression als auch eine Sequestrierung von immunreaktivem ACE im Zellinnern (Pfeile weisen auf Riesenzellen). Im Gegensatz zu den stark ACE-exprimierenden im Granulom lokalisierten Makrophagen und Epitheloidzellen ist das Venenendothel (V) negativ (Anti-ACE mAk CG1), x 360.

E: Lymphknoten: Während die in Granulomen lokalisierten Makrophagen stark ACE exprimieren, zeigen die einzeln liegenden Makrophagen (Pfeil) nur eine geringe Expression (Anti-ACE mAk CG2), x 360.

F: Lunge: Starke endotheliale ACE-Expression in unveränderten Alveolarkapillaren (Pfeile) in der Nachbarschaft eines Granuloms (Anti-ACE mAk CG 4), x 360.

G: Lymphknoten: Homogene Detektion aller Gefäßendothelien durch den Endothelmarker PECAM-1 (Pfeile). Im Vergleich liegt nur eine schwache Immunreaktion der in den Granulomen (G) lokalisierten Makrophagen, Epitheloid- und Riesenzellen vor (Anti-CD31mAk JC/70A), x 40.

H: Lymphknoten: Starke, inhomogene plasmatische Expression von CD68 der Makrophagen, Epitheloid- und Riesenzellen (Pfeil) (Anti-CD 68 mAk KP1), x 360.

3.2.1.2 Tuberkulose

3.2.1.2.1 Morphologische Kriterien

Während die Anzahl der Granulome stark variierte (in 31,7% der Fälle waren Granulome vereinzelt, in 24,4% mäßig und in 39% zahlreich vorhanden), war die Größe der Granulome in 74,4% der Fälle mit „groß“ ($>500\ \mu\text{m}$) zu beurteilen. Lediglich 20,5% der Präparate wiesen überwiegend mittelgroße und nur 5,1% (2 von 41) kleine Granulome ($<150\ \mu\text{m}$) auf. Die Granulomform war in der Mehrzahl (69,2%) verzweigt landkartenartig und nur in 30,8% unregelmäßig. Abgerundete Granulome wurden nicht beobachtet. In knapp der Hälfte der Gewebeproben (48,8%) waren Epitheloidzellen in mäßiger Anzahl anzutreffen. Sie hatten in 87,5% eine polygonale Form und in 12,5% eine Spindelform. In 48,8% der histologischen Schnitte waren nur wenige Riesenzellen präsent, was für die Anzahl geordneter Riesenzellen in 36,6% und ungeordneter Riesenzellen in 56,1% galt. In der überwiegenden Anzahl der Fälle (51,2%) waren auch nur wenige einzeln liegende Makrophagen und ebenfalls nur wenige in kleinen Gruppen liegende Makrophagen vorhanden. Im Gegensatz hierzu dominierten die in Granulomen liegenden Makrophagen, welche in 82,9% der Präparate zahlreich vorlagen. In nahezu der Hälfte der Präparate (48,8%) war die Anzahl der perigranulomatös bzw. im Entzündungsfeld lokalisierten Endothelien mäßig und die der Lymphozyten (44,4%) gering. Mit 41,5% dominierten die Fälle, die reichlich Nekroseherde aufwiesen, wobei strukturierte und unstrukturierte Nekroseformen etwa gleich häufig vorkamen. Die Quantität der Fibrose unterlag dagegen einer stärkeren Varianz, war aber in den meisten Gewebeproben (39%) mäßig ausgeprägt und zellreiche und zellarme Formen waren nahezu gleich häufig vertreten.

3.2.1.2.2 Korrelation morphologischer Kriterien untereinander

Tab. 5 gibt eine Übersicht über die Korrelationsanalyse morphologischer Faktoren bei Tuberkulose.

Mit zunehmender Anzahl nachgewiesener Granulome war die Anzahl der in Granulomen liegenden Makrophagen ($r=0,394^*$, $p=0,011$, $n=41$), die Häufigkeit von Riesenzellen ($r=0,346^*$, $p=0,027$, $n=41$), sowohl des geordneten ($r=0,409^{**}$, $p=0,008$, $n=41$), als auch des ungeordneten Typs ($r=0,474^{**}$, $p=0,002$, $n=41$), ferner die

Anzahl nachweisbarer Endothelien ($r=0,339^*$, $p=0,030$, $n=41$) jeweils gleichsinnig korreliert. Weiterhin wurden signifikante Beziehungen zwischen Entzündungsherden mit einem hohen Granulomgehalt und einer zellreichen und faserarmen Fibrose ($r=-0,485^{**}$, $p=0,005$, $n=32$) sowie dem Auftreten einer unstrukturierten Nekrose ($r=0,357^*$, $p=0,033$, $n=32$) gefunden.

Je größer sich die Granulome darstellten, desto eher dominierten landkartenartige Granulomformen ($r=0,450^{**}$, $p=0,004$, $n=39$) mit vermindertem Gehalt an Riesenzellen ($r=-0,370^*$, $p=0,020$, $n=39$), insbesondere vom geordneten Typ ($r=-0,391^*$, $p=0,013$, $n=39$) und verminderter Anzahl einzeln ($r=-0,351^*$, $p=0,028$, $n=39$) und in Gruppen liegender Makrophagen ($r=-0,338^*$, $p=0,036$, $n=39$) sowie umgebender Lymphozyten ($r=-0,609^*$, $p=0,012$, $n=16$). In großen Granulomen war der Anteil polygonaler Epitheloidzellen erhöht ($r=0,318^*$, $p=0,049$, $n=39$). Quantitativ war die Anzahl der Riesenzellen in ähnlichem Maße auf ungeordnete Riesenzellen ($r=0,692^{**}$, $p=0,000$, $n=41$) und geordnete Riesenzellen ($r=0,883^{**}$, $p<0,001$, $n=41$) zurückzuführen, die sich im Gegensatz zur Sarkoidose auch untereinander deutlich assoziiert zeigten ($r=0,522^{**}$, $p<0,001$, $n=41$). In Granulomen positionierte Makrophagen waren zudem häufiger mit dem Nachweis von Riesenzellen verknüpft ($r=0,385^*$, $p=0,013$, $n=41$). Wiederum im Gegensatz zur Sarkoidose stand, dass geordnete Riesenzellen eine positive Abhängigkeit zu perigranulomatösen Lymphozyten aufwiesen ($r=0,472^*$, $p=0,048$, $n=18$). Weiterhin ließ sich feststellen, dass mit der Anzahl einzeln liegender Makrophagen auch die Anzahl in Gruppen liegender Makrophagen eng verbunden war ($r=0,590^{**}$, $p<0,001$, $n=41$) und ihr Vorhandensein gegen eine stärker ausgeprägte Fibrosereaktion sprach ($r=-0,363^*$, $p=0,020$, $n=41$).

Morphologische Kriterien		Granulome			Epitheloidzellen		Riesenzellen			Makrophagen			Endothelien	Lymphozyten	Nekrose		Fibrose	
		Anzahl	Größe	Form	Anzahl	Form	Anzahl gesamt	Anzahl geordnet	Anzahl ungeordnet	Anzahl einzeln	Anzahl in Gruppen	Anzahl in Granulomen	Anzahl	Anzahl	Quantität	Art	Quantität	Art
Granulome	Anzahl		-	-	-	-	↑↑	↑↑	↑↑	-	-	↑	↑	-	-	↑	-	↓↓
	Größe		↑↑	↑	-	↑	↓	↓	-	↓	↓	-	-	↓	-	-	-	-
	Form			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Epitheloidzellen	Anzahl			↓			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Form						-	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-
Riesenzellen	Anzahl gesamt							↑↑↑	↑↑↑	-	-	↑	-	-	-	-	-	-
	Anzahl geordnet								↑↑↑	-	-	-	-	↑	-	-	-	-
	Anzahl ungeordnet									-	-	↑↑	-	-	-	-	-	-
Makrophagen	Anzahl einzeln										↑↑↑	-	-	-	-	-	↓	-
	Anzahl in Gruppen											-	-	-	-	-	-	-
	Anzahl in Granulomen											-	-	-	-	-	-	-
Endothelien	Anzahl													-	-	-	-	-
Lymphozyten	Anzahl														-	-	-	-
Nekrose	Quantität															-	-	-
	Art																-	-
Fibrose	Quantität																	-
	Art																	-

Tabelle 5: Tuberkulose, Korrelationsanalyse morphologischer Kriterien vs. morphologischer Kriterien. Nur signifikante Ergebnisse sind verzeichnet nach ihrem Signifikanzniveau: ↑ = p<0,05, ↑↑ = p<0,01, ↑↑↑ = p<0,001. Inverse Korrelationen sind durch ↓, ↓↓ entsprechend dem Signifikanzniveau gekennzeichnet.

3.2.1.2.3 Einfluss morphologischer Kriterien auf die ACE (CD143)-Expression verschiedener Zelltypen

Tab. 6 gibt einen Überblick über die analysierten Faktorbeziehungen.

Repräsentative Beispiele immunhistologischer Bilder bei Tuberkulose sind in Abb. 2 dargestellt. Weder Anzahl, Größe noch Form der Granulome zeigten eine Beziehung zur Intensität der ACE-Expression von Makrophagen, Epitheloidzellen, Riesenzellen oder Endothelien. Die in Granulomen zusammengezogene Anzahl an Makrophagen korrelierte dagegen mit einer erhöhten ACE- Expression dieser Makrophagen selbst ($r=0,509^{**}$; $p=0,002$, $n=36$), der ACE-Expression polygonaler Epitheloidzellen ($r=0,538^{**}$, $p=0,001$, $n=32$) und Riesenzellen vom geordneten ($r=0,544^{**}$, $p=0,002$, $n=29$) und ungeordneten Typ ($r=0,417^{*}$, $p=0,038$, $n=25$). Je mehr Endothelien im Entzündungsgebiet und perigranulomatös vorhanden waren, desto stärker ausgeprägt war auch deren ACE-Expression ($r=0,417^{*}$, $p=0,020$, $n=31$), wobei die endotheliale Expression zudem eine Beziehung zur Anzahl entzündungsbenachbarter Lymphozyten aufwies ($r=0,645^{**}$, $p=0,007$, $n=16$). Tuberkulöse Entzündungsherde, die an unstrukturierte „verkäsende“ Nekrosen angrenzten, waren mit einer deutlich reduzierten ACE-Expression in Gruppen liegender Makrophagen ($r=-0,441^{*}$, $p=0,024$, $n=26$), insbesondere aber in Granulomen liegender Makrophagen ($r=-0,515^{**}$, $p=0,003$, $n=31$) und polygonaler Epitheloidzellen ($r=-0,480^{**}$, $p=0,008$, $n=29$) assoziiert, ganz im Gegensatz zu solchen, welche an strukturierte, noch nicht typischerweise verkäsende Nekrosezonen grenzten. Letztlich korrelierte auch die Quantität der perientzündlichen Fibrosereaktion mit der Expressionsstärke der geordneten ($r=0,435^{*}$, $p=0,018$, $n=29$) und ungeordneten ($r=0,455^{*}$, $p=0,022$, $n=25$) Riesenzellen.

Morphologische Kriterien		ACE (CD143)-Expression								
		Makrophagen			Epitheloidzellen		Riesenzellen		Endothelzellen	Fibroblasten
		einzel	in Gruppen	in Granulomen	spindelförmig	polygonal	geordnet	ungeordnet		
Granulome	Anzahl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Größe	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Form	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Epitheloidzellen	Anzahl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Form	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Riesenzellen	Anzahl gesamt	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Anzahl geordnet	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Anzahl ungeordnet	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Makrophagen	Anzahl einzeln	-	-	-	-	↑	-	-	-	-
	Anzahl in Gruppen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Anzahl in Granulomen	-	-	↑↑	-	↑↑	↑↑	↑	-	-
Endothelien	Anzahl	-	↓	-	-	-	-	-	↑	-
Lymphozyten	Anzahl	-	-	-	-	-	-	-	↑↑	-
Nekrose	Quantität	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Art	-	↓	↓↓	-	↓↓	-	-	-	-
Fibrose	Quantität	-	-	-	-	-	↑	↑	-	-
	Art	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 6: Tuberkulose, Korrelationsanalyse der ACE (CD143)-Expression vs. morphologischer Kriterien. Nur signifikante Ergebnisse sind verzeichnet nach ihrem Signifikanzniveau: ↑ = p<0,05, ↑↑ = p<0,01. Inverse Korrelationen sind durch ↓, ↓↓ entsprechend dem Signifikanzniveau gekennzeichnet.

3.2.1.2.4 ACE (CD143)-Expression verschiedener Zelltypen und Zellformationen

In mehr als der Hälfte (57,1%) der untersuchten Tuberkulose-Gewebe zeigten einzeln liegende Makrophagen eine nur geringe, in 28,6% eine mäßig ausgeprägte ACE-Expression. Bei in Gruppen liegenden Makrophagen überwog in 45,2% eine ausgeprägte ACE-Expression gegenüber einer mäßigen ACE-Expression in 41,9% der Fälle. 83,3% der in Granulomen liegenden Makrophagen exprimierten ACE stark, ferner alle spindelförmigen und 71,9% der polygonalen Epitheloidzellen. Auch geordnete und ungeordnete Riesenzellen exprimierten in der Mehrheit der Fälle ausgeprägt ACE (55,2% bzw. 68,0%). Endothelien zeigten eine eher heterogene ACE-Expression, die alle Stufen von negativ bis stark umfasste und geringe, mäßiggradige und starke Expressionen nahezu gleich häufig betraf. Die Fibroblasten zeigten in 71,0% der untersuchten Gewebe keine und in 29,0% eine nur geringe Expression.

3.2.1.2.5 Korrelation ACE (CD143)-exprimierender Zelltypen untereinander

Einen Überblick über die Ergebnisse gibt Tab. 7. Die Expressionsintensität der in Granulomen liegenden Makrophagen korrelierte einerseits mit der in Gruppen liegender Makrophagen ($r=0,436^*$, $p=0,018$, $n=29$) und andererseits mit der geordneter Riesenzellen ($r=0,544^{**}$, $p=0,003$, $n=28$). Weitere Beziehungen fielen nicht auf.

ACE (CD143)		Makrophagen			Epitheloidzellen		Riesenzellen		Endothelzellen	Fibroblasten
		einzel	in Gruppen	in Granulomen	spindel-förmig	polygonal	geordnet	ungeordnet		
Makrophagen	einzel		-	-	-	-	-	-	-	-
	in Gruppen			↑	-	-	-	-	-	-
	in Granulomen				-	-	↑↑	-	-	-
Epitheloidzellen	spindel-förmig					-	-	-	-	-
	polygonal						-	-	-	-
Riesenzellen	geordnet							-	-	-
	ungeordnet								-	-
Endothelzellen										-
Fibroblasten										

Tabelle 7: Tuberkulose, Korrelationsanalyse ACE (CD143)-exprimierender Zellformen untereinander. Nur signifikante Ergebnisse sind verzeichnet nach ihrem Signifikanzniveau:

↑ = $p < 0,05$, ↑↑ = $p < 0,01$. Inverse Korrelationen wurden nicht gefunden.

Abb. 2

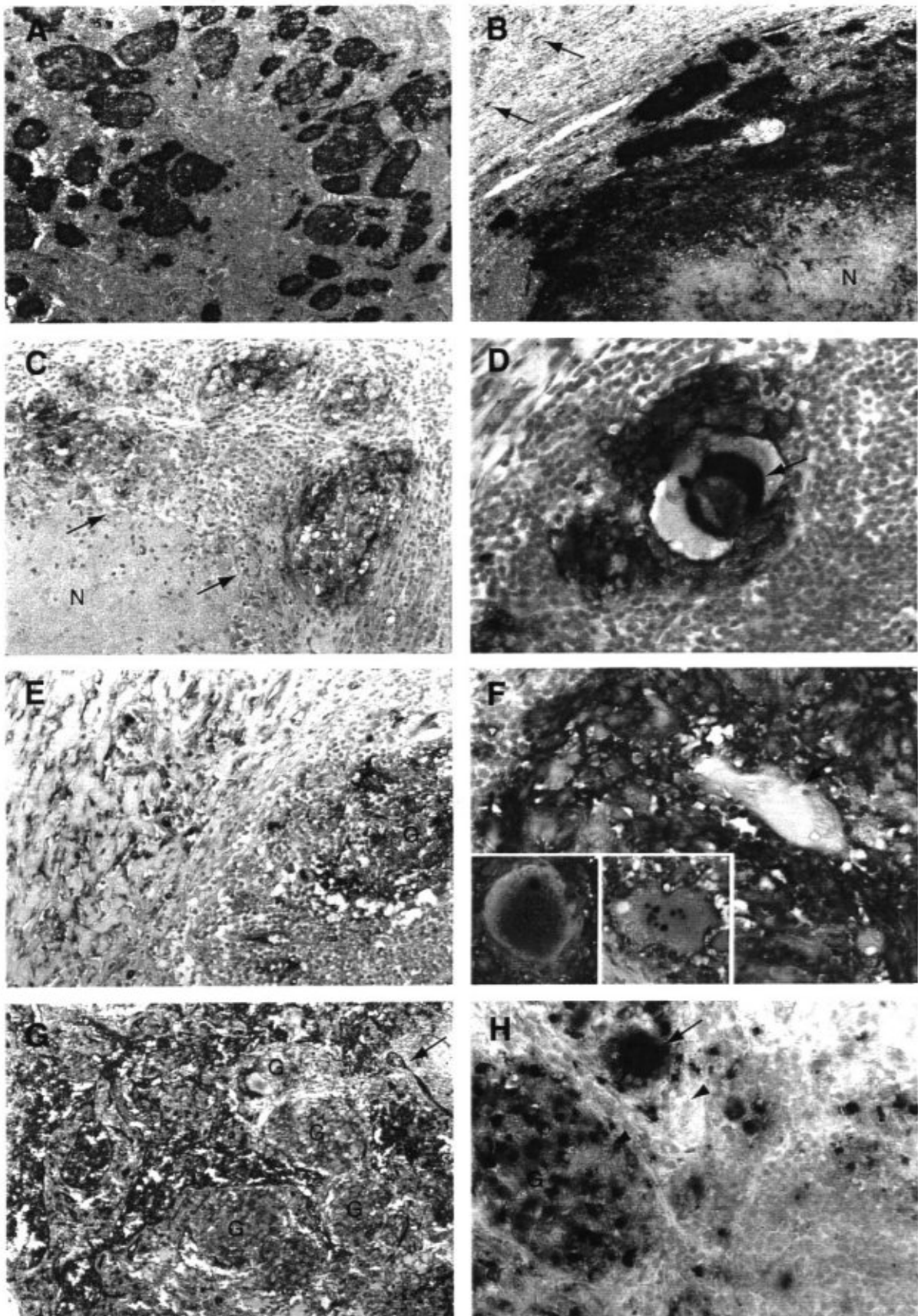


Abb. 2: ACE (CD143) (A-F) in der **Tuberkulose des Menschen** im Vergleich zum Endothelmarker PECAM-1 (CD31) (G) und zum Makrophagenmarker KP1 (CD68) (H). **Lymphatisches Gewebe (A-H).**

A: Starke und überwiegend homogene ACE-Expression in Granulomen einer Lymphknotentuberkulose (Anti-ACE mAk CG 1), x 20.

B: Während die Granulomperipherie stark ACE exprimiert, kann ACE im Bereich der zentralen Nekrose (N) nur deutlich abgeschwächt detektiert werden. Das arterielle Endothel exprimiert ebenfalls ACE (Pfeile) (Anti-ACE mAk CG2), x 40.

C: Fehlende und reduzierte Immunreaktion der Epitheloidzellen, Makrophagen und Gefäßendothelien im Randbereich einer zentralen unstrukturierten Nekrose (Pfeile) (Anti-ACE mAk CG4), x 120.

D: Weitgehend geordnete Riesenzelle mit starker ACE-Expression im Bereich von halbmondförmig sequestriertem Material im Zellinnern (Pfeil) sowie auf der Zelloberfläche (Anti-ACE mAk CG2), x 360.

E: Deutliche faserreiche Fibrosereaktion mit ACE-positiven Endothelien und in einem Granulom (G) lokalisierten Makrophagen (Anti-ACE mAk CG2), x 120.

F: Die ungeordnete Riesenzelle (linkes Insert) zeigt eine diffuse ACE-Verteilung im Zellzentrum, die nahezu geordnet erscheinende Riesenzelle (rechtes Insert) dagegen eine starke ACE-Markierung granulären Materials im Zellinnern, während die geordnete Riesenzelle (Pfeil) ausschließlich auf der Zelloberfläche ACE exprimiert (Pfeil) (Anti-ACE mAk CG2), x 360.

G: Starke und homogene Anfärbung sämtlicher Gefäßendothelien durch den Endothelmarker PECAM-1 (CD31) (Pfeil). Die Granulome (G) zeigen dagegen nur eine mäßiggradige Immunreaktion (Anti-CD31 mAk JC70/A), x 40.

H: Sowohl Makrophagen als auch Riesenzellen (Pfeil) zeigen mit dem Makrophagenmarker KP1(CD68) eine starke, aber inhomogene Immunreaktivität im Zellinnern, wohingegen viele Epitheloidzellen (Pfeilspitzen) der Granulome (G) negativ sind (Anti-CD68 mAk KP1), x 360.

3.2.1.3 *Toxoplasmose*

3.2.1.3.1 Morphologische Kriterien

In 50,0% der untersuchten Lymphknoten mit Toxoplasmose (15 von 30) wurden Granulome in mäßiger Anzahl, in 33,3% in nur geringer Anzahl angetroffen. Sie hatten in 85,7% der Präparate eine unregelmäßige Form und hatten in der überwiegenden Anzahl einen Durchmesser kleiner als 150 μm (82,1%). Große Granulome ($>500\mu\text{m}$) kamen nicht vor. In den meisten Fällen (65,5%) waren Epitheloidzellen in mäßiger Anzahl vorhanden, und nahezu alle Epitheloidzellen (92,3%) hatten eine großleibig-polygonale Form. Keines der Präparate wies histologisch weder geordnete noch ungeordnete Riesenzellen auf. In der überwiegenden Anzahl der Gewebe (70,0%) wurden nur wenige einzeln liegende Makrophagen, im Gegensatz dazu aber in 60,0% der Fälle in kleinen Gruppen liegende Makrophagen zahlreich angetroffen. In Granulomen gelagerte Makrophagen waren in 36,7% der Gewebeproben häufig, in mit 30,0% bzw. 23,3% der Fälle in mäßiger bzw. geringer Anzahl vertreten. Die Anzahl der Endothelien variierte. Nekroseherde konnten in keinem Fall beobachtet werden und 73,3% der histologischen Präparate zeigten auch keinerlei Tendenz zur Fibrosierung. In den Fällen, in denen eine Fibrosereaktion auffiel, hatte diese eine zellreiche Struktur. Entzündungsbedingte Lymphozytenansammlungen konnten nicht beurteilt werden, da ausschließlich Lymphknotenbiopsien vorlagen.

3.2.1.3.2 Korrelation morphologischer Kriterien untereinander

Tab. 8 gibt eine Übersicht über die Korrelationsanalyse morphologischer Faktoren bei Toxoplasmose. Anzahl und Größe der Granulome wurden durch darin lokalisierte Makrophagen bestimmt ($r=0,748^{**}$, $p<0,001$, $n=30$ und $r=0,423^*$, $p<0,025$, $n=28$), was im Wesentlichen durch die Reduktion einzeln liegender Makrophagen erfolgte ($r=-0,738^{**}$, $p<0,001$, $n=30$).

Endothelien wurden etwas häufiger in Nachbarschaft polygonaler Epitheloidzellen gesehen ($r=0,398^*$, $p=0,036$, $n=28$). Weitere Beziehungen morphologischer Faktoren untereinander wurden nicht gefunden.

Morphologische Kriterien				Granulome			Epitheloidzellen		Riesenzellen			Makrophagen			Endothelien	Lymphozyten	Nekrose		Fibrose	
				Anzahl	Größe	Form	Anzahl	Form	Anzahl gesamt	Anzahl geordnet	Anzahl ungeordnet	Anzahl einzeln	Anzahl in Gruppen	Anzahl in Granulomen	Anzahl	Anzahl	Quantität	Art	Quantität	Art
Granulome	Anzahl		-	-	-	-	-	-	X	X	X	↓↓	-	↑↑	-	X	X	X	X	X
	Größe		-	-	-	-	-	-	X	X	X	-	-	↑	-	X	X	X	X	X
	Form						-	-	X	X	X	-	-	-	-	X	X	X	X	X
Epitheloidzellen	Anzahl							-	X	X	X	-	-	-	-	X	X	X	X	X
	Form								X	X	X	-	-	-	↑	X	X	X	X	X
Riesenzellen	Anzahl gesamt									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Anzahl geordnet										X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Anzahl ungeordnet											X	X	X	X	X	X	X	X	X
Makrophagen	Anzahl einzeln												-	↓↓	-	X	X	X	X	X
	Anzahl in Gruppen													-	-	X	X	X	X	X
	Anzahl in Granulomen													-	-	X	X	X	X	X
Endothelien	Anzahl															X	X	X	X	X
Lymphozyten	Anzahl																X	X	X	X
Nekrose	Quantität																	X	X	X
	Art																		X	X
Fibrose	Quantität																			X
	Art																			

Tabelle 8: Toxoplasmose, Korrelationsanalyse morphologischer vs. morphologischer Kriterien. Nur signifikante Ergebnisse sind verzeichnet nach ihrem Signifikanzniveau: ↑ = p<0,05, ↑↑ = p<0,01. Inverse Korrelationen sind durch ↓↓ entsprechend dem Signifikanzniveau gekennzeichnet. Mit X versehene Zellen kennzeichnen nicht beobachtete morphologische Kriterien.

3.2.1.3.3 Einfluss morphologischer Kriterien auf die ACE (CD143)-Expression verschiedener Zelltypen

Abb. 3 zeigt Beispiele typischer immunhistologischer Reaktionsmuster von Lymphknoten mit Toxoplasmose. Tab. 9 gibt die Ergebnisse der Analyse zusammengefasst wieder.

Hier zeigte sich die Intensität der ACE-Expression polygonaler Epitheloidzellen in Granulomen direkt abhängig von der Anwesenheit umgebender Makrophagen ($r=0,607^{**}$, $p=0,001$, $n=27$). Im Gegensatz dazu korrelierte die Anzahl einzeln liegenden Makrophagen invers sowohl mit der Expressionsstärke in kleinen Gruppen liegender Makrophagen ($r=-0,502^{**}$, $p=0,007$, $n=28$), als auch mit der polygonaler Epitheloidzellen ($r=-0,594^{**}$, $p=0,001$, $n=27$).

Morphologische Kriterien		ACE (CD143)-Expression								
		Makrophagen			Epitheloidzellen		Riesenzellen		Endothelzellen	Fibroblasten
		einzel	in Gruppen	in Granulomen	spindelförmig	polygonal	geordnet	ungeordnet		
Granulome	Anzahl	-	-	-	-	-	X	X	-	-
	Größe	-	-	-	-	-	X	X	-	-
	Form	-	-	-	-	-	X	X	-	-
Epitheloidzellen	Anzahl	-	-	-	-	-	X	X	-	-
	Form	-	-	-	-	-	X	X	-	-
Riesenzellen	Anzahl gesamt	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Anzahl geordnet	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Anzahl ungeordnet	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Makrophagen	Anzahl einzeln	-	↓↓↓	-	-	↓↓↓	X	X	-	-
	Anzahl in Gruppen	-	-	-	-	-	X	X	-	-
	Anzahl in Granulomen	-	-	-	-	↑↑↑	X	X	-	-
Endothelien	Anzahl	-	-	-	-	-	X	X	-	-
Lymphozyten	Anzahl	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Nekrose	Quantität	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Art	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fibrose	Quantität	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Art	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Tabelle 9: Toxoplasmose, Korrelationsanalyse der ACE (CD143)-Expression vs. morphologischer Kriterien. Nur signifikante Ergebnisse sind verzeichnet nach ihrem Signifikanzniveau: ↑↑↑ = $p < 0,001$. Inverse Korrelationen sind durch ↓↓, ↓↓↓ entsprechend dem Signifikanzniveau gekennzeichnet. Mit X versehene Zellen kennzeichnen nicht beobachtete morphologische Kriterien.

3.2.1.3.4 ACE (CD143)-Expression verschiedener Zelltypen und Zellformationen

Auch bei den histologischen Schnitten von Lymphknoten mit Toxoplasmose zeigten die beteiligten Makrophagen einzeln liegend eine deutlich geringere Expression als in Gruppen und diese wiederum eine geringere Expression als in Granulomen angeordnete Makrophagen. Während in der Mehrzahl (64,3%) der Fälle eine nur geringe ACE-Expression in einzeln liegenden Makrophagen registriert wurde, dominierte bei den in Gruppen und in Granulomen liegenden Makrophagen eine mäßig starke Expression mit 60,7% bzw. 53,8%. Es gab keinen Fall, in dem in Gruppen oder in Granulomen liegende Makrophagen keine Expression zeigten, während dies bei einzeln liegenden Makrophagen in 35,7% der Fall war. Im Gegensatz zu den in Granulomen liegenden Makrophagen, welche in 46,2% ACE sogar stark exprimierten, kam eine starke Expression bei den einzeln und in kleinen Gruppen liegenden Makrophagen nicht vor. Während alle spindelförmigen Epitheloidzellen ACE mäßiggradig exprimierten, variierte die Expression polygonaler Epitheloidzellen von negativ bis stark, wobei aber auch in diesen Zellformen eine mäßiggradige Immunreaktivität dominierte (55,6%).

3.2.1.3.5 Korrelation ACE (CD143)-exprimierender Zelltypen und Zellformationen untereinander

Tab. 10 gibt einen Überblick über die Ergebnisse.

Die ACE-Expression der einzeln und der in Gruppen liegenden Makrophagen war nicht nur untereinander ($r=0,621^{**}$, $p<0,001$, $n=28$), sondern auch mit der Expressionsstärke polygonaler Epitheloidzellen deutlich und gleichsinnig assoziiert ($r=0,528^{**}$, $p=0,006$, $n=26$ bzw. $r=0,737^{**}$, $p<0,001$, $n=26$). Die Expressionsstärke in Gruppen liegender Makrophagen korrelierte außerdem gleichsinnig mit der in Granulomen liegender Makrophagen ($r=0,480^{*}$, $p=0,043$, $n=26$).

ACE (CD143)		Makrophagen			Epitheloidzellen		Riesenzellen		Endothelzellen	Fibroblasten
		einzel	in Gruppen	in Granulomen	spindel-förmig	polygonal	geordnet	ungeordnet		
Makrophagen	einzel		↑↑↑↑	-	-	↑↑	X	X	-	-
	in Gruppen			↑	-	↑↑↑↑	X	X	-	-
	in Granulomen				-	↑	X	X	-	-
Epitheloidzellen	spindel-förmig					-	X	X	-	-
	polygonal						X	X	-	-
Riesenzellen	geordnet							X	X	X
	ungeordnet								X	X
Endothelzellen										-
Fibroblasten										

Tabelle 10: Toxoplasmose, Korrelationsanalyse ACE (CD143)-exprimierender Zellformen untereinander. Nur signifikante Ergebnisse sind verzeichnet nach ihrem Signifikanzniveau: ↑ = $p < 0,05$, ↑↑ = $p < 0,01$, ↑↑↑ = $p < 0,001$. Inverse Korrelationen wurden nicht beobachtet. Mit X versehene Zellen kennzeichnen nicht beobachtete morphologische Kriterien.

Abb. 3

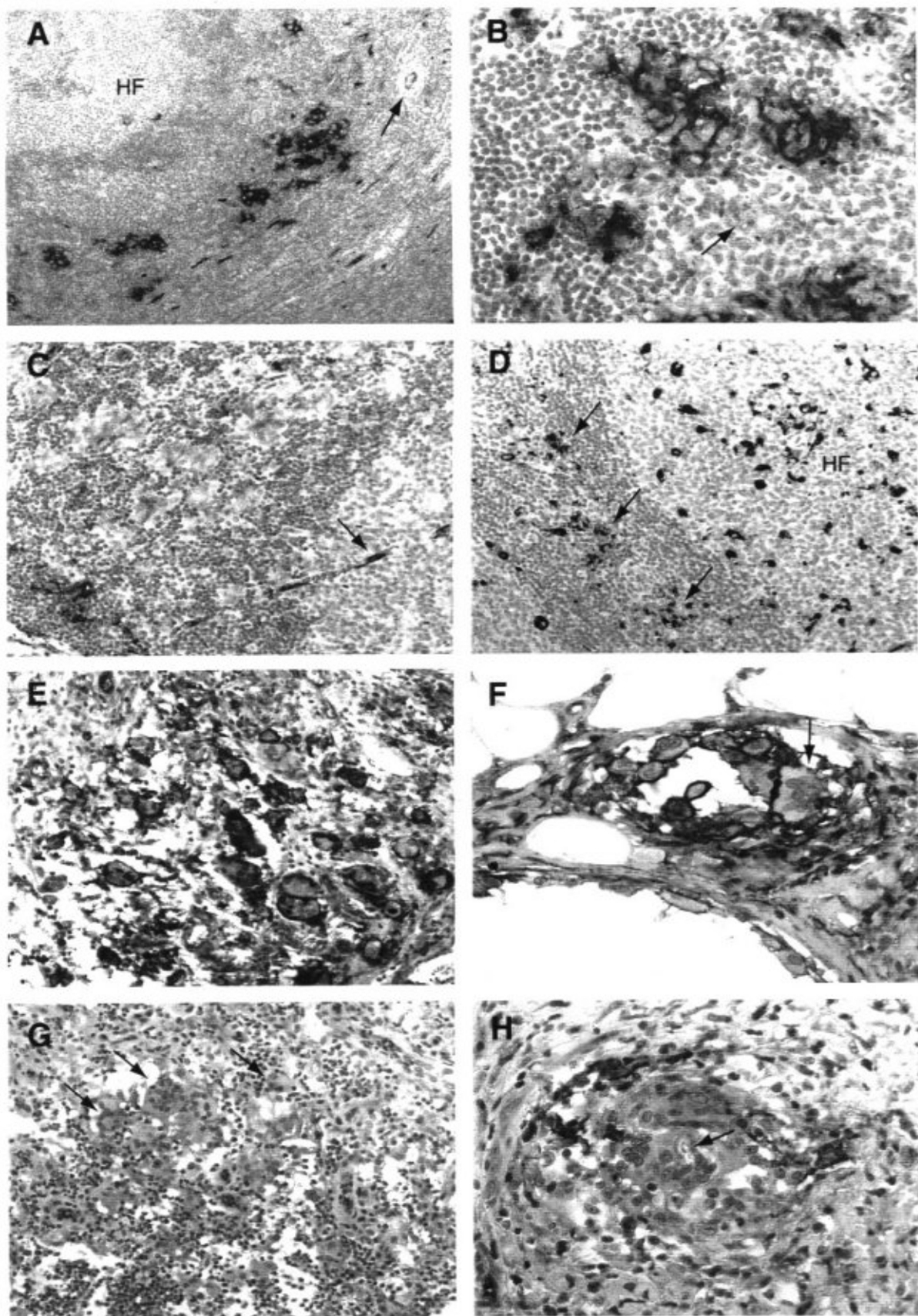


Abb. 3: ACE (CD143) (A und B) in der **Toxoplasmose des Menschen** im Vergleich zum Endothelmarker PECAM-1 (CD31) (C) und zum Makrophagenmarker KP1 (CD 68) (D). ACE (CD 143) (E-H) in **Fremdkörperreaktionen** unterschiedlicher Ätiologie **des Menschen**.

A: Lymphknoten: Hyperplastischer Lymphfollikel (HF) mit perifokal stark ACE-exprimierender kleinherdiger Epitheloidzellreaktion. Außerdem ist eine Expression von ACE in arteriellen Gefäßendothelien zu erkennen (Pfeil) (Anti-ACE mAk CG2), x 40.

B: Lymphknoten: Während in Gruppen oder in kleinen Granulomen liegende Makrophagen eine mäßig starke bis starke ACE-Expression zeigen, exprimieren einzeln liegende Makrophagen (Pfeil zeigt einen Kerntrümmermakrophagen) nur gering ACE (Anti-ACE mAk CG2), x 360.

C: Lymphknoten: Die starke Expression von CD31 des Gefäßendothels (Pfeil zeigt auf follikuläre Arteriole) steht im Gegensatz zu der schwach ausgeprägten Immunreaktion der Makrophagen und Epitheloidzellen (Anti-CD 31 mAk JC/70A), x 120.

D: Lymphknoten: Inhomogene Expression von CD68 in Makrophagen und Epitheloidzellen kleiner Granulome (Pfeile). Ferner ist ein hyperplastischer Lymphfollikel (HF) ebenfalls unter Einschluss einzelner Mikrogranulome miterfasst (Anti-CD 68 mAk KP1), x 120.

E: Nabel: Granulom mit zahlreichen meist stark membranös ACE-exprimierenden Riesenzellen (Anti-ACE mAk CG2), x 120.

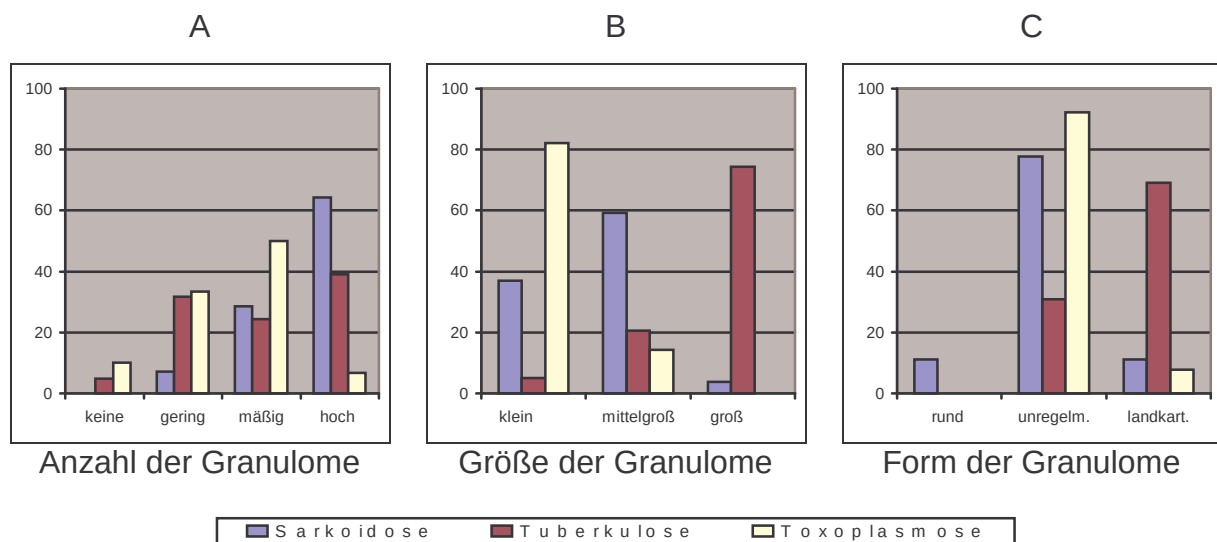
F: Narbengewebe: Ölgranulom mit Touton'scher Riesenzelle (Pfeil), die membranös stark ACE exprimiert (Anti-ACE mAk CG2), x 360.

G: Weichteilgewebe: Akut entzündliche Fremdkörperreaktion mit gering ausgeprägter Expression von ACE auf der Oberfläche der Riesenzellen vom Fremdkörpertyp (Pfeile). Auch im Entzündungsgebiet lokalisierte Endothelien zeigen ACE deutlich reduziert oder nicht detektierbar (Anti-ACE mAk CG2), x 120.

H: Samenstrang: Fadengranulom: Keine Immunreaktion der unmittelbar um den Fremdkörper (Fadenanschnitt, Pfeil) lokalisierten Riesenzellen und Makrophagen, jedoch geringe Zunahme der Expression im Bereich der Granulomperipherie (Anti-ACE mAk CG1), x 360.

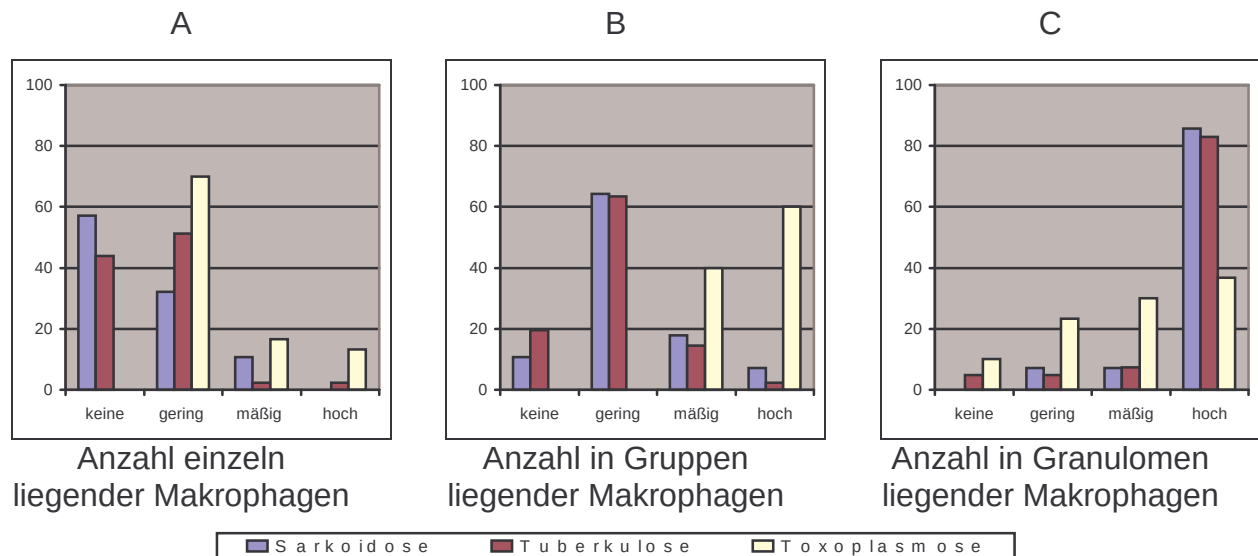
3.2.1.4 Vergleich morphologischer Kriterien

Während bei den Tuberkulosefällen Granulome in geringer, mäßiger und hoher Anzahl nahezu gleich häufig beobachtet wurden, dominierten bei den Fällen von Sarkoidose Gewebe mit zahlreich vorhandenen Granulomen (64,3%) (Grafik 1 A). Bezüglich der Granulomgröße gab es signifikante Unterschiede zwischen den drei Erkrankungen: Bei der Toxoplasmose, die ja bekannterweise zu den kleinherdigen Epitheloidzellreaktionen gehört, überwogen die Fälle mit kleinen Granulomen (<150 µm), bei der Sarkoidose die mit mittelgroßen Granulomen (151-500 µm) und bei der Tuberkulose die mit großen Granulomen (>500 µm) (Grafik 1 B). Die Form der Granulome war bei der Toxoplasmose und Sarkoidose meist unregelmäßig, bei der Tuberkulose dagegen zumeist komplett landkartenartig konfiguriert (Grafik 1 C).



Grafik 1: Vergleich der Granulome in Sarkoidose, Tuberkulose und Toxoplasmose

In Anzahl, Form und relativer Verteilung von Epitheloidzellen und Riesenzellen ähnelten sich die Erkrankungen mit Ausnahme des kompletten Fehlens von Riesenzellen bei Toxoplasmose und der tendenziell häufiger anzutreffenden Riesenzellen bei Sarkoidose. Sowohl einzeln, besonders jedoch in Gruppen liegende Makrophagen waren charakteristisch für eine Toxoplasmose (Grafik 2 A und B) wohingegen eher strikt in Granulomen positionierte Makrophagen charakteristisch für Tuberkulose und Sarkoidose waren (Grafik 2 C).



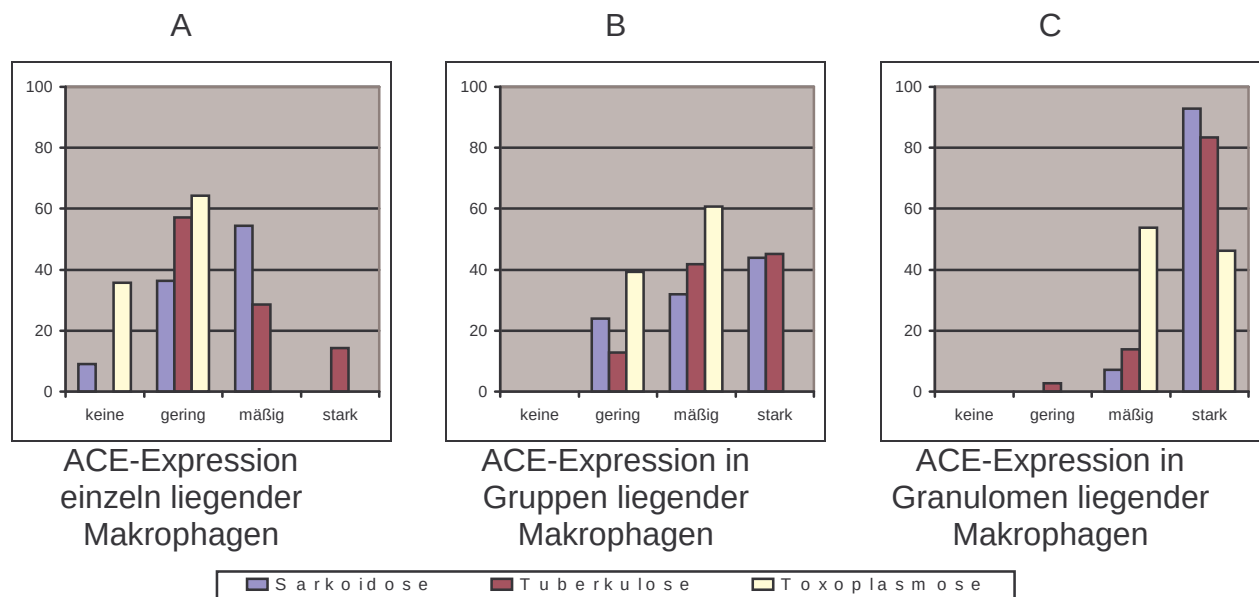
Grafik 2: Vergleich der Makrophagenverteilung in Sarkoidose, Tuberkulose und Toxoplasmose

Der Nachweis von Endothelien und Lymphozyten sowie Ausprägungsgrad und Art der Fibrose ergaben keine zusätzlichen Unterscheidungsmerkmale, abgesehen von den bereits erwähnten Besonderheiten bei Toxoplasmose und dem Vorkommen von Nekrosen fast ausschließlich bei Tuberkulose. Trotz ihrer Ähnlichkeit standen manche morphologische Kriterien in den verschiedenen Erkrankungen in unterschiedlichen Beziehungen zueinander. Vor allem betraf dies einzeln liegende Makrophagen, die bei Sarkoidose, aber auch bei Toxoplasmose (Tab. 2 und 8) in umgekehrter Proportion zu ihrer Nachweisbarkeit in Granulomen standen, nicht aber bei Tuberkulose (Tab. 5). Ferner wurde bei Tuberkulose ein konstantes und gleichgerichtetes Verhältnis ungeordneter zu geordneter Riesenzellen offenbar (Tab. 5), was in dieser Form aber nicht für die Sarkoidose galt (Tab. 2).

3.2.1.5 Vergleich der ACE-Expression

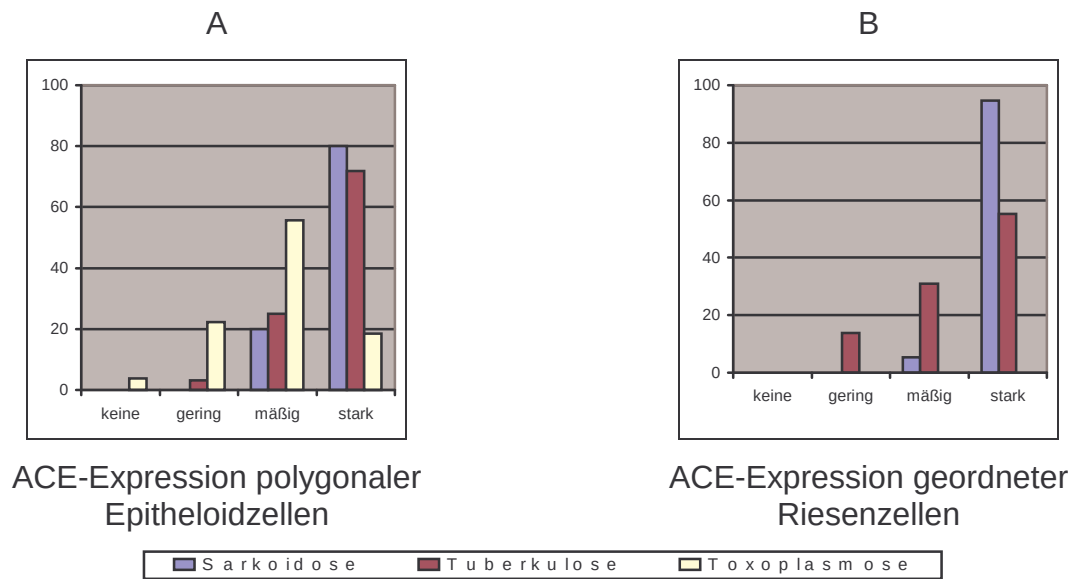
Bei allen drei granulomatösen Erkrankungen zeigte sich eine eindeutige Abhängigkeit der ACE-Expression der Makrophagen von deren geweblicher Lokalisation und Position im Entzündungsgeschehen. Generell exprimierten einzeln liegende Makrophagen geringer ACE als in kleinen Gruppen liegende und diese wiederum geringer ACE als in Granulomen positionierte Makrophagen (Grafik 3). Im Vergleich fiel die ACE-Expression in Makrophagen bei Toxoplasmose ungeachtet der

Makrophagenlokalisierung geringer aus als bei Sarkoidose oder Tuberkulose, die sich hier weitgehend glichen (Grafik 3).



Grafik 3: Vergleich der ACE-Expression in Makrophagen bei Sarkoidose, Tuberkulose und Toxoplasmose

Dieses Verteilungsmuster galt im Prinzip auch für Epitheloidzellen, deren spindelförmiger Typ bei Sarkoidose sowie Tuberkulose regelmäßig stark ACE aufwies (Grafik 4 A).



Grafik 4: Vergleich der ACE-Expression von Epitheloid- und Riesenzellen in Sarkoidose, Tuberkulose und Toxoplasmose

Ungeordnete Riesenzellen, aber noch deutlicher geordnete Riesenzellen exprimierten relativ mehr ACE bei Sarkoidose als bei Tuberkulose (Grafik 4 B).

Das Bild der endothelialen und fibroblastären ACE-Expression bot im Vergleich der drei granulomatösen Entzündungen keine Auffälligkeiten. Über die relativen Verteilungen der ACE-Expressionen hinaus legte der Vergleich der z.T. recht unterschiedlich ausgefallenen Korrelationsanalysen (Tab. 3 und 4, Tab. 6 und 7, Tab. 9 und 10) verschiedene Faktoren nahe, die ACE in granulomatösen Entzündungen verschiedenartig modulieren könnten. Auffallend war auch hier die zahlenmäßige Beziehung in Granulomen vorgefundener Makrophagen zu einer erhöhten ACE-Expression dieser Zellformen selbst (Tuberkulose) und/oder zu benachbarten polygonalen Epitheloidzellen (Tuberkulose, Sarkoidose und Toxoplasmose). Auf den auffallend inversen Einfluss der unstrukturierten Nekrosen auf den ACE-Nachweis bei Tuberkulose wurde bereits hingewiesen.

3.2.1.6 ACE in Sonderformen granulomatöser Entzündungen

Um den Umfang einer ACE-Expression in verschiedenen Erkrankungen zu prüfen, wurden eine Reihe Sonderformen granulomatöser und histiozytärer Gewebereaktionen exemplarisch in diese Studie eingeschlossen. Aufgrund der

jeweils geringen Fallzahlen wurde hier auf eine systematische Erfassung morphologischer und immunpathologischer Kriterien und ihren statistischen Vergleich verzichtet. Die wesentlichen Befunde wurden daher anhand repräsentativer Abbildungen erläutert (Abb. 3 und 4).

3.2.1.6.1 Fremdkörpergranulome

Untersucht wurden Fremdkörperreaktionen unterschiedlicher Ätiologie, zu denen Narbengranulome, Nabelgranulome, Fadengranulome, Intubationsgranulome, Lymphogranulome, silikotische Granulome, Mischstaubgranulome und Granulome unbekannter Genese zählten. Die an der granulomatösen Entzündungsreaktion beteiligten Makrophagen, Epitheloidzellen und Riesenzellen zeigten in der Stärke der ACE-Expression eine breite Varianz, wobei jedoch kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Intensität der ACE-Expression und der Ätiologie der Erkrankung zu erkennen war. In der überwiegenden Anzahl der untersuchten Fälle dominierte eine starke Expression dieser Entzündungszellen, insbesondere der Riesenzellen (Abb. 3 E und F). Den betreffenden Fremdkörperreaktionen gemeinsam war allerdings eine deutlich abgeschwächte oder fehlende ACE-Expression in unmittelbarer Nähe zu granulozytärbetonten aktiven Entzündungskomponenten (Abb. 3 G) oder schwer resorbierbarem Fremdkörpermaterial, wie z.B. operativem Nahtmaterial (Abb. 3 H).

3.2.1.6.2 Schistosomiasis

In dem untersuchten Fall einer Schistosomiasis des Lebergewebes zeigten die an der Granulomformierung beteiligten Makrophagen und Riesenzellen eine mäßige bis ausgeprägte überwiegend membranös lokalisierte ACE-Expression, direkt dem Parasitenei benachbarte Makrophagen aber keine Immunreaktivität (Abb. 4 A). Perigranulomatöse Endothelien wiesen ACE abgeschwächt auf.

3.2.1.6.3 Blastomykose

In allen untersuchten Fällen von Blastomykose zeigten die Riesenzellen, die oftmals in ihrem Zytoplasma noch eingeschlossene Sporen von *Blastomyces dermatitidis* enthielten, ebenso wie die umgebenden Makrophagen und Epitheloidzellen eine starke ACE-Expression. Diese starke Immunreaktion der granulomatösen Entzündungszellen wurde sowohl in der Haut als auch im lymphatischen Gewebe

angetroffen. Im Gegensatz dazu waren Lymphozyten oder lymphozytäre Zellformen stets ACE-negativ (Abb. 4 B, C und D).

3.2.1.6.4 Histiozytosen

Aus der Gruppe der generalisierten entzündlichen Histiozytosen wurde die mykobakterielle Histiozytose bei Immundefizienz (AIDS) untersucht. Hier zeigten die im Lungenparenchym oft in größeren, lockeren Gruppen gelegenen Histiozyten zumeist eine mäßige ACE-Expression. Diese war jedoch nicht nur typischerweise membranös lokalisiert, sondern oft auch vakuolär innerhalb des Zytoplasmas verteilt und vermittelte so einen fast charakteristischen, verschwommenen und schaumigen Aspekt der Immunreaktion (Abb. 4 E und F).

3.2.1.6.5 M. Hansen (Lepra)

In der durch *Mycobacterium leprae* hervorgerufenen granulomatösen Entzündungsreaktion der Hautbiopsate konnte in allen Fällen eine starke Immunreaktion der beteiligten Makrophagen und Riesenzellen beobachtet werden. Die ACE-Expression der Riesenzellen war vorwiegend membranös lokalisiert. Wie auch bei der Sarkoidose, Tuberkulose und Toxoplasmose zeigte sich eine starke ACE-Expression der in Granulomen liegenden Makrophagen, während in kleinen Gruppen oder einzeln liegende Makrophagen im Vergleich eine deutlich schwächere Immunreaktion aufwiesen (Abb. 4 G und H).

Abb. 4

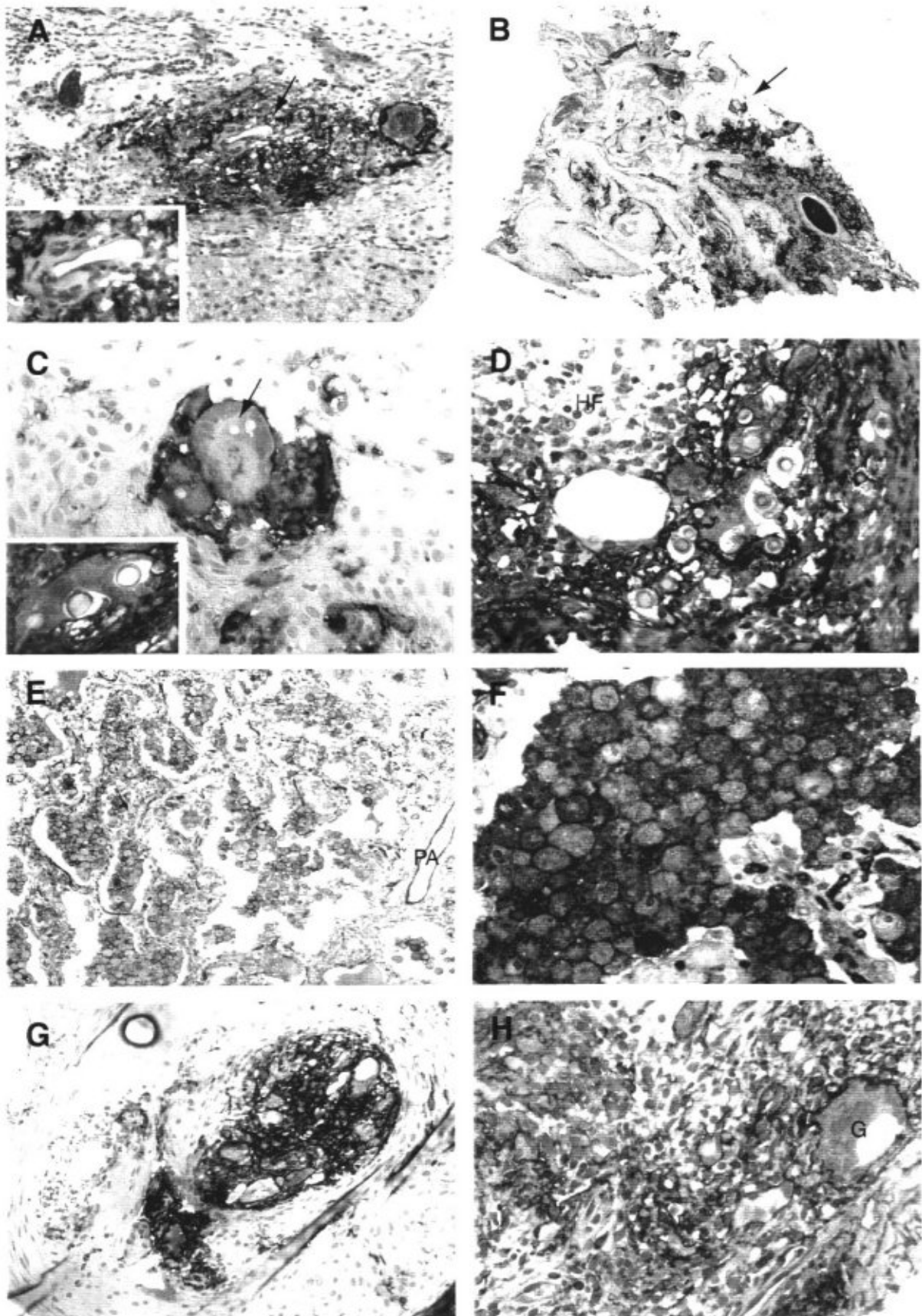


Abb. 4: ACE (CD 143) in **Sonderformen granulomatöser Entzündungen des Menschen.**

A: Leber, Schistosomiasis: Deutliche, überwiegend membranöse ACE-Expression der in Granulomen lokalisierten Makrophagen und Riesenzellen. Pfeil und Insert zeigen das im Granulomzentrum liegende von Makrophagen eingefasste Parasitenei (Anti-ACE mAk CG1), x 120.

B: Haut, Blastomykose: Deutlich ist der ACE-Reichtum in subepidermalen Hautschichten zu erkennen. Der Pfeil zeigt auf den in C vergrößert dargestellten Bereich eines kleineren Granuloms (Anti-ACE mAk CG2), x 10.

C: Haut, Blastomykose: Sporen von *Blastomyces dermatitidis* eingeschlossen im Zytoplasma stark membranös ACE exprimierender Riesenzellen (Insert und Pfeil) (Anti-ACE mAk CG2), x 360.

D: Lymphknoten, Blastomykose: Sporen von *Blastomyces dermatitidis* in lymphatischem Gewebe (HF = hyperplastischer Lymphfollikel) umgeben von stark ACE-exprimierenden Makrophagen und ersten Riesenzellbildungen. Lymphozytäre Zellformen sind dagegen ACE-negativ (Anti-ACE mAk CG2), x 360.

E: Lunge, Mykobakterielle Histiozytose: Gering bis mäßig ausgeprägte ACE-Expression der histiozytären Zellaggregate. Während das Endothel einer Pulmonalarterie (PA) vergleichsweise stark ACE exprimiert, ist die Expression der Alveolarendothelien oft deutlich reduziert (Anti-ACE mAk CG2), x 40.

F: Lunge, Mykobakterielle Histiozytose: Teils membranständige, teils aber schaumig vakuoläre ACE-Expression der Histiozyten bei mykobakterieller Histiozytose, die zu einem verschwommenen Aspekt der ansonsten scharf umschriebenen Immunreaktion beiträgt (Anti-ACE mAk CG2), x 360.

G: Haut, Morbus Hansen (Lepra): Innerhalb der oberen papillären Dermis lokalisiertes Granulom mit zahlreichen, stark ACE-exprimierenden Makrophagen und Riesenzellen (Anti-ACE mAk CG2), x 120.

H: Haut, Morbus Hansen (Lepra): Granulomatöse Entzündungsreaktion tieferer Hautabschnitte. Starke membranständige Expression von ACE einer Riesenzelle (mit Conchoidkörperchen) (G) (Anti-ACE mAk CG2), x 360.

3.2.2 ACE (CD143) in verschiedenen Tierspezies

3.2.2.1 *Monoklonale Antikörper und ACE-Detektion*

An 21 verschiedenen Tierarten wurden die 6 gegen humanes ACE gerichteten Antikörperklone CG1, CG2, CG3, CG4, CG5 und 5F1, ferner der Klon JC/70A gegen humanes CD31 und der gegen CD68 gerichtete Makrophagenmarker Klon KP1 getestet. Die Immunreaktionen mit den Anti-ACE-mAk CG1, CG3, CG4, CG5 und 5F1 verliefen bei sämtlichen untersuchten Tierarten negativ. Dagegen reagierte der Anti-ACE-mAk CG2 bei den Tierarten Menschenaffe, Hund, Katze, Panther, Leopard, Löwe, Kaninchen und Gürteltier. Während CD 68 in keiner der 21 Tierarten durch den eingesetzten mAk zu detektieren war, reagierte der eingesetzte Endothelmarker regelhaft mit CD31 bei den Tierarten Menschenaffe, Hund, Kaninchen und Gürteltier (Tab. 11).

Detektiertes Protein	Angiotensin-Converting-Enzyme						PECAM-1	Lysosomales Glykoprotein
Cluster of differentiation	CD143						CD31	CD68
Antikörper-klon Tierart	CG1	CG2	CG3	CG4	CG5	5F1	JC/70A	KP1
Menschenaffe	-	+	-	-	-	-	+	-
Hund	-	+	-	-	-	-	+	-
Katze	-	+	-	-	-	-	-	-
Panther	-	+	-	-	-	-	-	-
Leopard	-	+	-	-	-	-	-	-
Hausschwein	-	-	-	-	-	-	-	-
Wildschwein	-	-	-	-	-	-	-	-
Schaf	-	-	-	-	-	-	-	-
Ziege	-	-	-	-	-	-	-	-
Reh	-	-	-	-	-	-	-	-
Rind	-	-	-	-	-	-	-	-
Pferd	-	-	-	-	-	-	-	-
Hamster	-	-	-	-	-	-	-	-
Maus	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratte	-	-	-	-	-	-	-	-
Meerschwein	-	-	-	-	-	-	-	-
Kaninchen	-	+	-	-	-	-	+	-
Gürteltier	-	+	-	-	-	-	+	-
Igel	-	-	-	-	-	-	-	-
Schildkröte	-	-	-	-	-	-	-	-
Vogel	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 11: Immunreaktivität humaner anti-CD143, anti-CD31 und anti-CD68 mAk in verschiedenen Tierarten.

Als Kontrolle einer spezifischen Detektion von ACE durch den mAk CG2 diene Nieren-, Leber- und Lungengewebe, das in sämtlichen untersuchten Tierarten eine starke und charakteristische Expression nur in den Epithelien der proximalen Nierentubuli (Abb. 5 C) zeigte, wohingegen distale Nierentubulusepithelien (Abb. 5 C), Gallengangsepithelien (Abb. 6 E und 7 C) und lumenales Bronchialepithel (Abb. 5 F und 6 B) stets negativ waren. Dies entspricht den Befunden beim Menschen. Auch untersuchtes Hirngewebe von Affe und Katze entsprach Befunden beim Menschen mit einer homogenen Immunreaktivität der neuronalen Glia der Basalganglien. Abweichend vom Menschen waren Alveolarmakrophagen aller untersuchter Tierarten aber stets ACE-negativ (Abb 9 A und B).

3.2.2.2 *Endotheliale ACE-Expression*

Die aufgedeckte Immunreaktivität ermöglichte die eingangs bereits erwähnte heterogene endotheliale ACE-Expression mit Organ- und Speziespezifität auch bei Affe, Hund, Katze und Löwe zu analysieren. Beispiele der ACE-Expression sind in Abb. 5 für Affe und Kaninchen, in Abb. 6 für verschiedene Hunderassen und in Abb. 7 für Katze und Löwe dargestellt. Leber, Lunge und Niere dienten im Folgenden als repräsentative Vergleichsorgane, wobei z.T. Ähnlichkeiten, z.T. aber auch deutliche Unterschiede auffielen. Innerhalb der Spezies Hund und Katze wurde eine gewisse Variabilität der endothelialen ACE-Expression je Gefäßabschnitt beobachtet (Tab. 12). Für den Hund, von dem verschiedene Rassen untersucht wurden, konnten keine rassebedingten Unterschiede erkannt werden (Abb. 6).

3.2.2.2.1 Leber

Einen Überblick über die endotheliale ACE-Expression im Gefäßsystem der Leber gibt Tab. 12. Beim Affen war endotheliales ACE hier nicht zu detektieren und beim Kaninchen wurde ACE lediglich gering in großen, vermehrt jedoch in kleinen Portalgefäßen gefunden. In auffälligem Gegensatz zu Affe und Kaninchen war das Endothel großer Portalvenen von Hund und Katze deutlich ACE-positiv (Abb. 6 E und 7 C), was darüber hinaus übrigens auch für das Gefäßsystem der Milz von Hund und Katze galt (Abb. 6 F und 7 D). Allen untersuchten Tierarten gemeinsam war eine fehlende Immunreaktion der Sinusoide, der Zentralvenen sowie der großen Arterien und Venen mit Ausnahme der Katze. Bei ihr war gelegentlich auch in Endothelien

großer Leberarterien und –venen, bisweilen sogar in den Zentralvenen eine positive Reaktion zu beobachten.

3.2.2.2.2 Lunge

Tab. 12 fasst die Befunde des pulmonalen Gefäßsystems zusammen. Im Gegensatz zur fehlenden Immunreaktion fast aller Bronchialkapillaren (Vasa privata, Abb. 6 C) zeigten die Alveolarkapillaren (Vasa publica) aller untersuchter Tierarten eine starke (Abb. 5 F und 6 B), die des Löwen allerdings eine vergleichsweise geringere ACE-Expression. Die venösen Endothelien (Vasa privata, Vasa publica) waren weitgehend ACE-negativ (Abb. 5 B), nur selten schwach positiv (Abb. 6 D). Im pulmonal-arteriellen Gefäßschenkel wurde die stärkste ACE-Expression bei allen Tierarten in den kleinen Pulmonalarterien gefunden, wobei mit zunehmendem Durchmesser der Arterien die endotheliale Expressionsstärke abnahm (Abb. 6 C). Wiederum zeigte die Immunreaktivität innerhalb der Tierart Katze eine gewisse Variabilität. Während die Endothelien großer Pulmonalarterien des Affen und des Löwen nicht immunreaktiv waren, exprimierten die des Hundes, der Katze und des Kaninchens zumeist gering ACE.

3.2.2.2.3 Niere

Die unterschiedlichen Befunde des renalen Gefäßsystems sind ebenfalls in Tab. 12 zusammengefasst. Sämtliche arterielle und venöse Endothelien sowie glomeruläre und interstitielle Kapillaren des Affen (Abb. 5 D) und des Kaninchens (Abb. 5 G) waren komplett ACE-negativ wie auch der gesamte venöse Gefäßschenkel und die interstitiellen Kapillaren der übrigen untersuchten Tierarten. Die Endothelien der Glomerularkapillaren zeigten nur bei den Feliden eine ACE-Expression, welche bei Katze und Löwe als gering gewertet wurde (Abb. 7 F und H). Die Endothelien der Vasa afferentes/efferentes aller Tierarten waren überwiegend nicht immunreaktiv (Abb. 7 H). Der auffälligste Unterschied zwischen den Tierarten bestand in ACE-exprimierenden Endothelien parenchymatöser Arterien von Hund und Katze (Abb. 6 G, H und 7 F), wobei die Expressionsintensität zugunsten kleiner Arterien verteilt war.

Gefäß- abschnitt	n	GA	MA	GPA	GPV	KPA	KPV	SI	ZV	GV
Tierart										
Kaninchen	1	-	-	_*	-	+++*	-	-	-	-
Affe	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katze	9	_*	++*	++*	++	+++	-	-	_*	_*
Hund	4	-	_*	++	+*	+++	++*	-	-	-

Leber: GA=große Arterien, MA=mittlere Arterien, GPA=große Portalarterien, GPV=große Portalvenen, KPA=kleine Portalarterien, KPV=kleine Portalvenen, SI=Sinusoide, ZV=Zentralvenen, GV=große Venen

Gefäß- abschnitt	n	GPA	MPA	KPA	AKP	BKP	KAV	KPV	MPV	GPV
Tierart										
Kaninchen	3	+	+*	++	+++	-	_*	-	-	-
Affe	1	-	(+)	+*	+++	-	-	-	-	-
Katze	8	(+)*	++*	+++*	+++	-	-	_*	-	-
Hund	5	(+)*	++*	+++	+++	-	-	-	-	-
Löwe	1	-	(+)	+	(+)	-	-	-	-	-

Lunge: GPA=große Pulmonalarterien, MPA=mittlere Pulmonalarterien, KPA=kleine Pulmonalarterien, AKP=Alveolarkapillaren, BKP=Bronchialkapillaren, KAV=kleine Alveolarvenen, KPV=kleine Pulmonalvenen, MPV=mittlere Pulmonalvenen, GPV=große Pulmonalvenen

Gefäß- abschnitt	n	GA	MA	KA	VA/VE	GKP	IKP	KV	MV	GV
Tierart										
Kaninchen	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Affe	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katze	9	(+)*	++*	+++*	-	+	-	-	-	-
Hund	5	_*	+*	++*	_*	-	-	-	-	-
Löwe	1				-	(+)*				

Niere: GA=große Arterien, MA=mittlere Arterien, KA=kleine Arterien, VA/VE=Vas afferens/Vas efferens, GKP=Glomerularkapillaren, IKP=interstitielle Kapillaren, KV=kleine Venen, MV=mittlere Venen, GV=große Venen

Tabelle 12: Endotheliales ACE (CD143) im Gefäßsystem von Leber, Lunge und Niere.
*: Variable Expression zwischen den einzelnen Tieren einer Tierart beobachtet.

Abb. 5

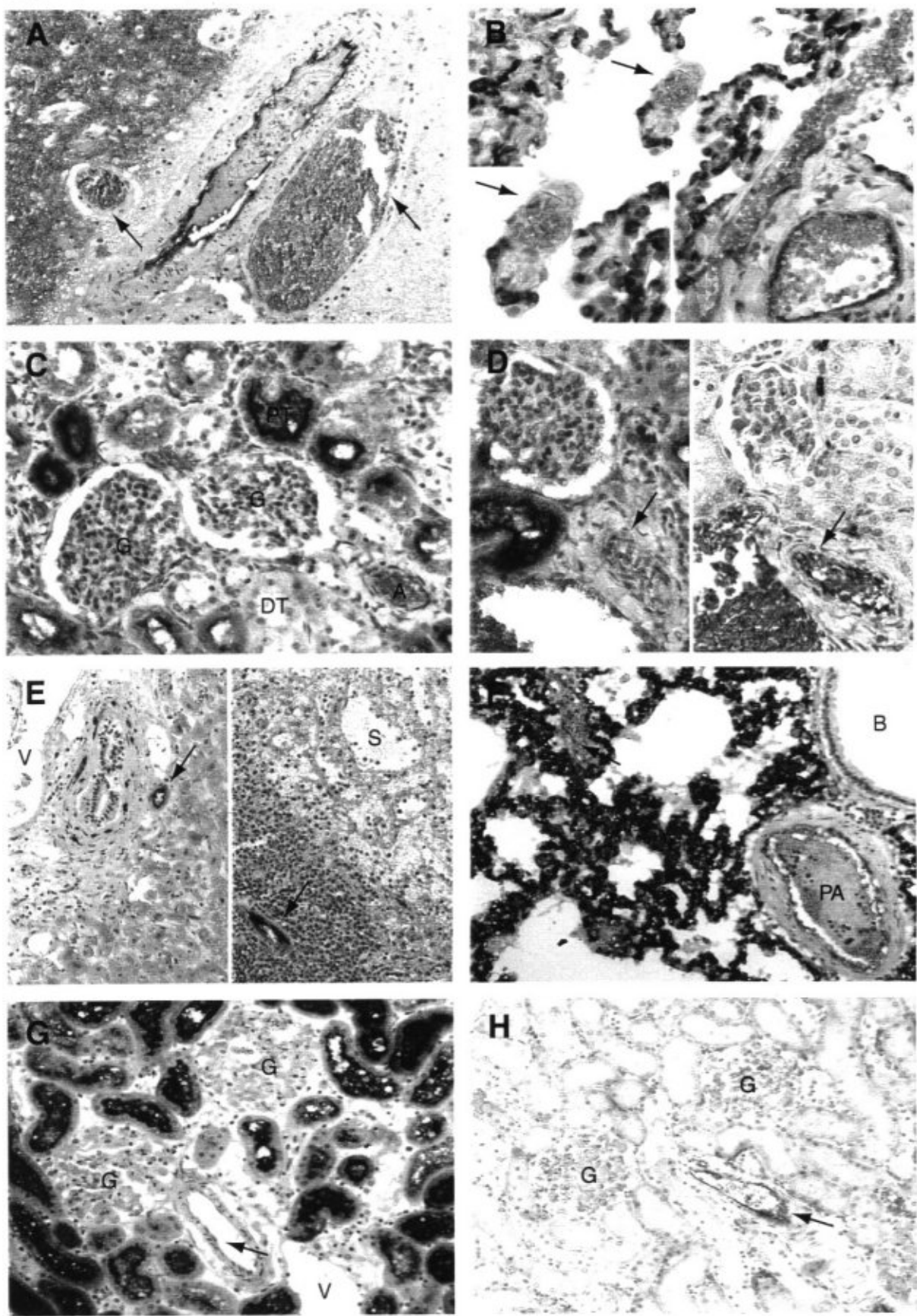


Abb. 5: ACE (CD143) im **Gefäßsystem verschiedener Tierarten** sowie vergleichend dazu Immunfärbungen mit dem Endothelmarker PECAM-1 (CD 31).

A: Gehirn, Affe: Neuronale Zellen der Basalganglien zeigen eine diffuse, geringe ACE-Reaktivität (linke Bildhälfte). Starke endotheliale ACE-Expression einer kleinen Hirnarterie und im Gegensatz dazu ACE-negatives Endothel begleitender Venen (Pfeile) (Anti-ACE mAk CG2), x 120.

B: Lunge, Affe: Im Gegensatz zur durchweg starken endothelialen Expression der Alveolarkapillaren ist ACE im Endothel kleiner Alveolarvenen (Pfeile und Ausschnittsvergrößerung) deutlich reduziert oder nicht detektierbar (Anti-ACE mAk CG2), x 360.

C: Niere, Affe: Starke ACE-Expression im Bereich der Bürstensäume der proximalen Tubulussegmente (PT), jedoch keine ACE-Detektion in den distalen Nierentubuli (DT). Glomerularkapillaren (G), Endothelien der interstitiellen Kapillaren und Arterien (A) sind ACE-negativ (Anti-ACE mAk CG2), x 360.

D: Niere, Affe: Linke Bildhälfte: Endotheliales Fehlen von ACE in allen Blutgefäßen der Niere (Anti-ACE mAk CG2). Rechte Bildhälfte: Partielle endotheliale PECAM-1-Markierung (Anti-ACE mAk CD31). Die Pfeile weisen auf die gleiche Arterie aus der gleichen Schnittfolge, x 360.

E: Leber und Milz, Kaninchen: ACE ist in Leber (linke Bildhälfte) und Milz (rechte Bildhälfte) heterogen verteilt, wobei kleine Portal- und Spiralarterien (Pfeile) eine starke Expression zeigen. Die Endothelien des portalvenösen Systems (V), der Leber-, sowie der Milzsinusoide (S) sind dagegen nicht immunreaktiv (Anti-ACE mAk CG2), x 120.

F: Lunge, Kaninchen: Ebenso wie der Affe zeigt auch das Kaninchen eine starke und homogene ACE-Expression in den Alveolarkapillaren. Deutlich abgeschwächte Expression des Endothels kleiner Alveolarvenen (Pfeil) und des Endothels einer Pulmonalarterie (PA). Luminales Bronchialepithel (B) ist ACE-negativ (Anti-ACE mAk CG2), x 120.

G: Niere, Kaninchen: Die ACE-Expression gleicht der Affenniere. Endothelial kann ACE in den Glomerularkapillaren (G), in den interstitiellen Kapillaren, im arteriellen Endothel (Pfeil) und im venösen Endothel (V) nicht detektiert werden (Anti-ACE mAk CG2), x 120.

H: Niere, Kaninchen: Im Unterschied zu ACE (G) ist PECAM-1 relativ homogen in den Gefäßendothelien detektierbar. Der Pfeil zeigt auf eine Interlobulararterie (Anti-CD31 mAk JC/70A), x 120.

Abb. 6

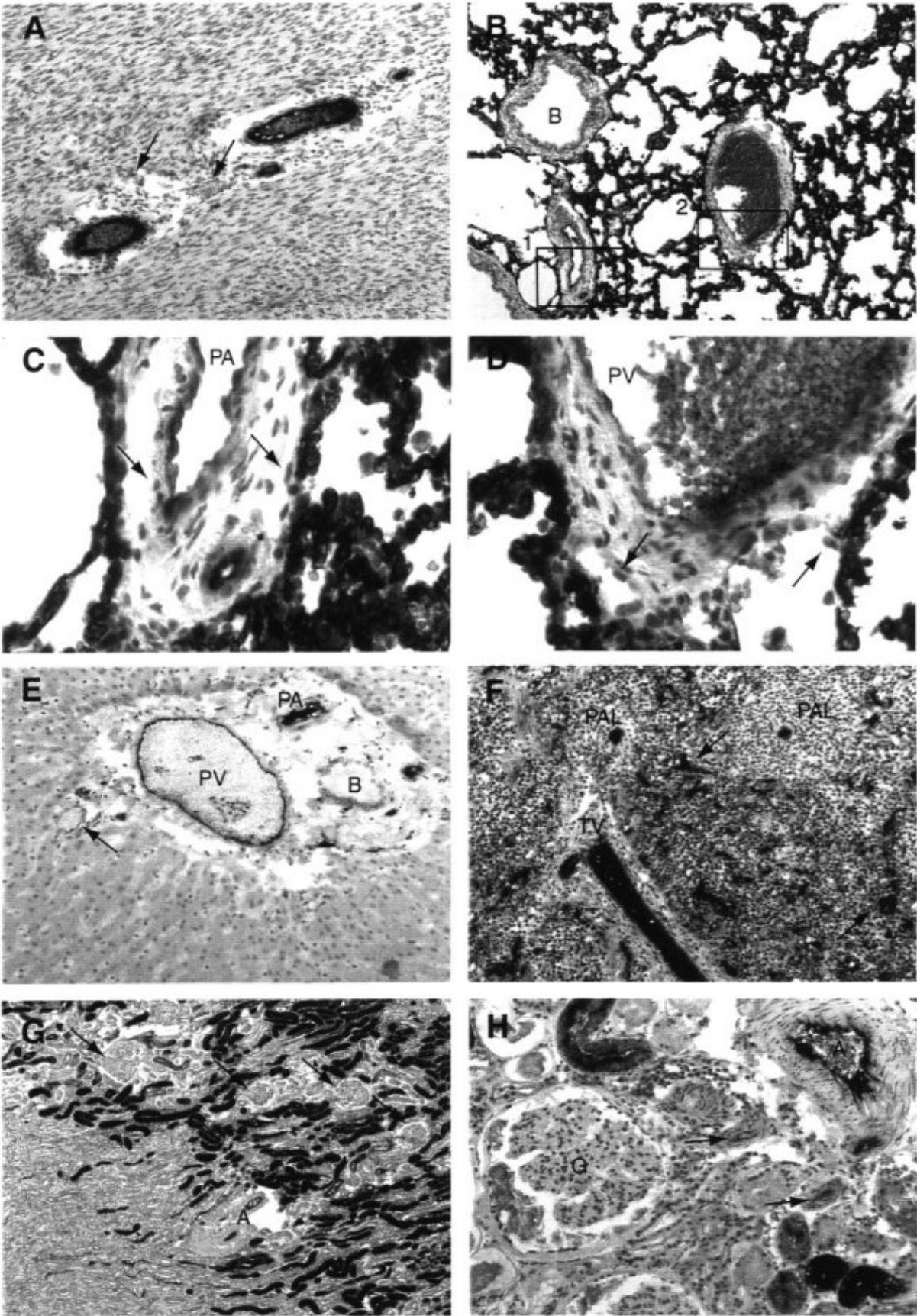


Abb. 6: ACE (CD 143) im **Gefäßsystem des Hundes**: Heterogene Verteilung. Immunreaktion des anti-ACE mAk CG2 (A-H).

A: Herz: Stark ACE-exprimierendes Endothel von Koronararterien steht im Gegensatz zu negativem Endothel begleitender Koronarvenen (Pfeile) in der Herzmuskulatur (Jack-Russel Terrier), x 120.

B: Lunge: Homogen und stark ACE-exprimierendes Endothel der Alveolarkapillaren. Kein Nachweis von ACE im luminalen Epithel der Bronchien (B). Die markierten Areale von 1 und 2 beziehen sich auf C und D (Jack-Russel-Terrier), x 80.

C: Lunge: Ausschnittsvergrößerung (1) aus B: Entgegen dem homogen ACE-exprimierenden Endothel der Alveolarkapillaren folgen die Endothelien der Vasa privata (bronchiale Zirkulation) einem heterogenen Expressionsmuster mit weitgehend negativen Kapillaren und Venen (Pfeile). Auch das Endothel der eingefassten Pulmonalarterie (PA) weist eine schwächere Immunmarkierung auf, x 360.

D: Lunge: Ausschnittsvergrößerung (2) aus B: Das Endothel einer großen Pulmonalvene (PV) ist nur schwach ACE-positiv, negativ ist das der gefäßbegleitenden Kapillaren und kleineren Venen (Pfeile), x 360.

E: Leber: ACE-reaktives Endothel einer Portalarterie (PA), kleinerer Portalarterien und –arteriolen, als auch einer größeren Portalvene (PV). Kleine Portalvenen exprimieren endothelial deutlich abgeschwächt ACE (Pfeil).

Die Lebersinusoide und das Gallengangsepithel (B) sind nicht immunreaktiv (Deutscher Schäferhund), x 120.

F: Milz: Neben einer intensiven endothelialen ACE-Markierung eingefasster Arterien von Follikeln und periarteriellen Lymphscheiden (PAL) ist auch eine intensive endotheliale Expression von Trabekelvenen (TV), Kapillaren (Pfeile) und Sinusoiden zu erkennen (Bearded Collie), x 120.

G: Niere: Die starke ACE-Expression der luminalen Epithelien proximaler Tubulussegmente und des arteriellen Endothels (A) steht im Gegensatz zur fehlenden Expression distaler Tubulussegmente und Endothelien anderer Gefäßabschnitte, wie in den Glomerula (Pfeile) (Deutscher Schäferhund), x 20.

H: Niere: Deutlich ACE-reaktives Endothel einer Interlobulararterie (A), stark abgeschwächte Immunreaktivität im Endothel kleinerer Vasa afferentia (Pfeile) und fehlende Expression in den Glomerulumschlingen (G) (Deutscher Schäferhund), x 120.

Abb. 7

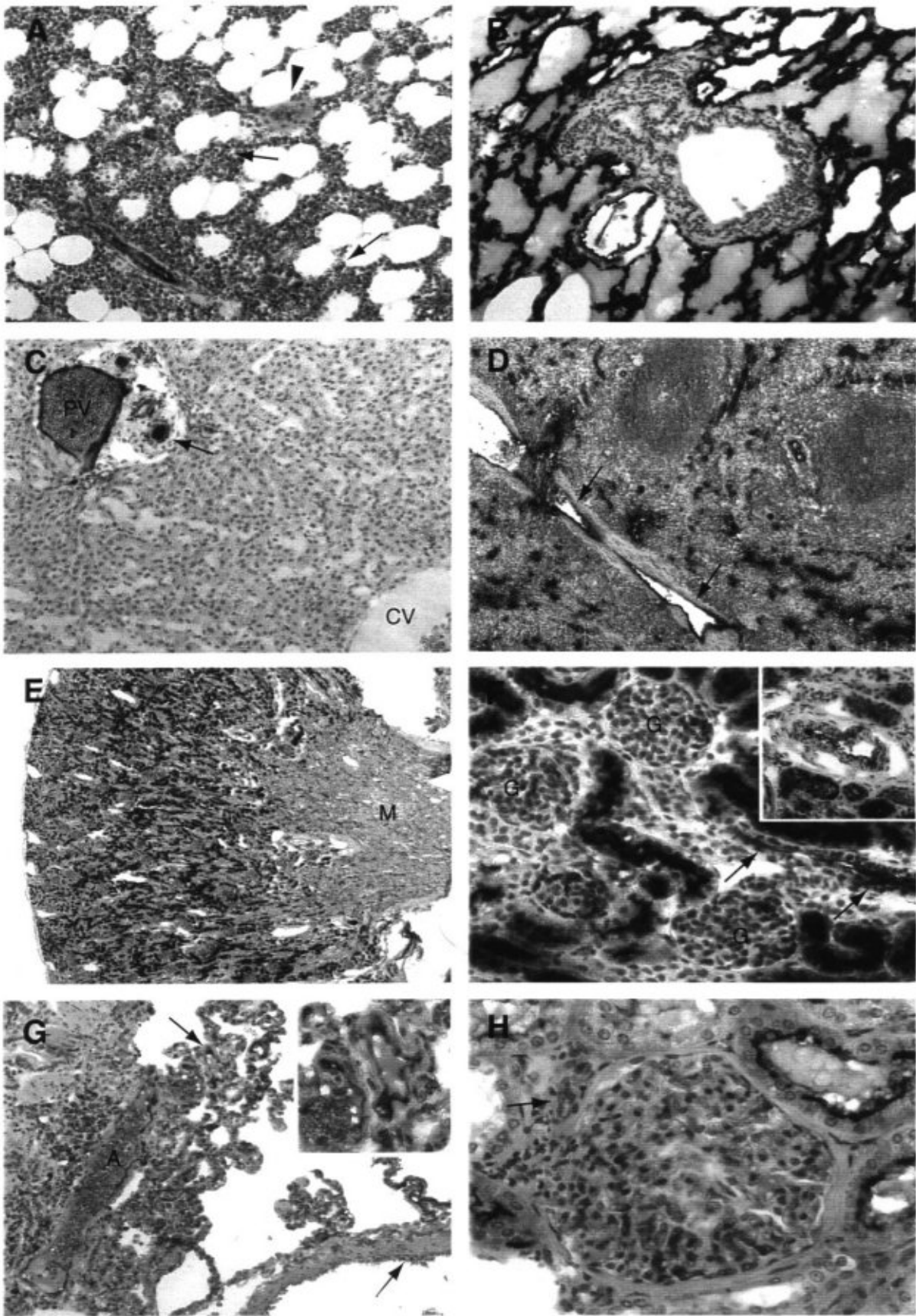


Abb. 7: Endotheliales ACE (CD 143) im **Gefäßsystem von Feliden (Katze und Löwe)**. Immunreaktion des anti-ACE mAk CG2 (A-H).

A: Knochenmark, Katze: Intensive ACE-Expression des Endothels einer kleinen Arterie und fehlende Expression der Kapillarendothelien (Pfeile). Die Pfeilspitze markiert einen ACE-negativen Megakaryozyten, x 120.

B: Lunge, Katze: Stark ACE-exprimierendes Endothel der Alveolarkapillaren steht in deutlichem Gegensatz zu negativem luminalem Bronchialepithel, x 120.

C: Leber, Katze: Starke endotheliale ACE-Expression einer größeren Portalvene (PV) und kleinerer Portalarterien (Pfeil). Im Gegensatz dazu steht das ACE-negative Endothel einer Zentralvene (CV). Die Lebersinusoiden und das Gallengangsepithel sind ebenfalls nicht immunreaktiv, x 120.

D: Milz, Katze: Homogene und intensive ACE-Markierung des arteriellen Endothels, der Milzsinusoiden und mancher Kapillarendothelien sowie des Endothels einer größeren Trabekelvene (Pfeile), x 40.

E: Niere, Katze: ACE-Expression der proximalen Tubulusepithelien der Rindenregion; der Markbereich (M) ist dagegen weitgehend ausgespart, x 10.

F: Niere, Katze: Im Gegensatz zu den ACE-negativen Glomerularkapillaren anderer Tierarten sind die der Katze teilweise schwach immunreaktiv (G), x 360.

Deutlich ACE-exprimierendes Endothel einer Interlobular- (Pfeile) und einer Interlobararterie (Insert), x 240.

G: Lunge, Löwe: Schwache ACE-Markierung der Alveolarkapillaren. Die Ausschnittsvergrößerung aus dem Bereich des oberen Pfeiles zeigt eine kleinere Pulmonalarterie, deren Endothel ebenso wie das einer größeren Pulmonalarterie (A) ACE exprimiert. Das Endothel einer Pulmonalvene (unterer Pfeil) ist dagegen ACE-negativ, x 120.

H: Niere, Löwe: Die Glomerularkapillaren des Löwen exprimieren wie bei der Katze gering ACE. In den Endothelien von Vas afferens und efferens kann ACE aber nicht detektiert werden (Pfeil), x 480.

3.2.2.3 *Endotheliale ACE-Expression*

3.2.3 ACE (CD143) in granulomatösen Entzündungen bei Tieren

Heterogenität herrschte auch in der geweblichen Verteilung des von Makrophagen exprimierten ACE zwischen den verschiedenen Spezies vor. Bereits hingewiesen wurde auf die im Gegensatz zum Menschen fehlende ACE-Expression in Alveolarmakrophagen aller untersuchter Tierarten (Abb. 8 C und 9 A und B). Bei dem an Tuberkulose erkrankten Affen entsprach das immunhistologische Expressionsmuster dem des Menschen. Die in den Tuberkulosegranulomen befindlichen Makrophagen, Epitheloidzellen und Riesenzellen zeigten eine starke ACE-Expression, allerdings im Gegensatz zu der nur geringen und zumeist fehlenden Immunreaktion einzeln liegender Makrophagen. Die an unterschiedlichen granulomatösen Entzündungsprozessen beteiligten Makrophagen und Epitheloidzellen des Kaninchens, Leoparden, Panthers und Löwen zeigten dagegen überraschenderweise keinerlei ACE (Abb. 8 D und 9 C - H).

Innerhalb der beiden Tierarten Hund und Katze wurde wiederum ein breites Spektrum der ACE-Expressionsstärke der in Granulomen liegenden Makrophagen und Epitheloidzellen gefunden, welches von einer fehlenden bis zu einer starken ACE-Immunreaktion reichte (Abb. 8 G, H und 9 A, B). Unter physiologischen Bedingungen ACE-exprimierende Gefäßendothelien zeigten bei allen Tierarten, sofern sie einer akuten granulozytären Entzündung direkt benachbart waren, eine deutlich abgeschwächte oder sogar fehlende Immunreaktion (Abb. 8 E und F). Zudem waren zentrale Nekrosebereiche stets ACE-negativ (Abb. 8 A und 9 C).

Abb. 8

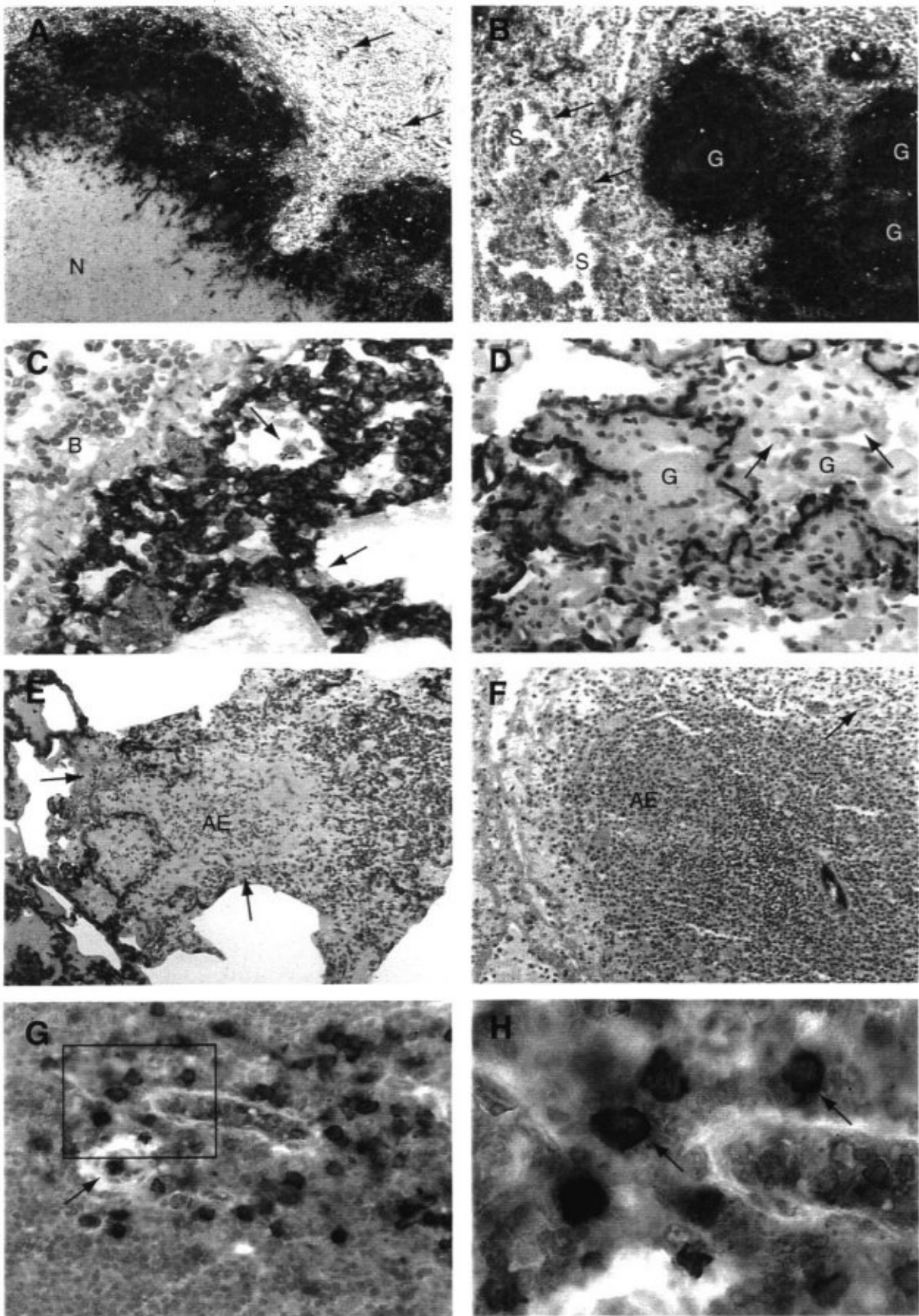


Abb. 8: ACE (CD 143) in **aktivierten Makrophagen** und bei **unterschiedlichen granulomatösen Entzündungen** verschiedener Tierarten. Immunreaktion des anti-ACE mAk CG2.

A: Milz, Affe, Tuberkulose: Der Bereich einer zentralen Nekrose (N) ist nicht immunreaktiv, wohingegen Makrophagen und Riesenzellen der Granulom-peripherie, sowie perigranulomatös lokalisierte Kapillarendothelien (Pfeile) und kleine Arterien deutlich ACE enthalten, x 40.

B: Milz, Affe, Tuberkulose: Mehrere riesenzellreiche stark ACE-exprimierende Granulome (G) im Gegensatz zu ACE-negativen Milzsinusoiden (S) (Pfeile), x 120.

C: Lunge, Kaninchen, Normalgewebe: ACE-negative Alveolarmakrophagen (Pfeile), sowie ebenfalls negatives luminales Bronchialepithel (B) stehen im Gegensatz zu stark ACE-exprimierenden Alveolarkapillaren, x 360.

D: Lunge, Kaninchen, Systemmykose: Weder in den Riesenzellen (G), noch in den assoziierten Epitheloidzellen (Pfeile) ist ACE nachweisbar, x 360.

E: Lunge, Kaninchen, Systemmykose: Gegenüber Normalgewebe deutlich reduzierte Expression von ACE in Alveolarkapillarendothelien (Pfeile), die in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer akuten Entzündungsreaktion (AE) lokalisiert sind, x 120.

F: Milz, Kaninchen, Septikämie: In kleinen Arterien (Pfeil) im Bereich einer akuten Entzündung (AE) fehlt endotheliales ACE, x 120 .

G: Haut, Hund, Haargranulom: Entzündlich hyperplastisches Gewebe zeigt aktivierte Makrophagen mit starker ACE-Expression und ebenfalls deutlicher Immunreaktion des arteriellen Endothels (Pfeil), x 360.

H: Ausschnittsvergrößerung aus G: Starke, überwiegend membranständige ACE-Expression aktivierter Makrophagen (Pfeile) im Gegensatz zu komplett fehlender Immunreaktion der Lymphozyten, x 480.

Abb. 9

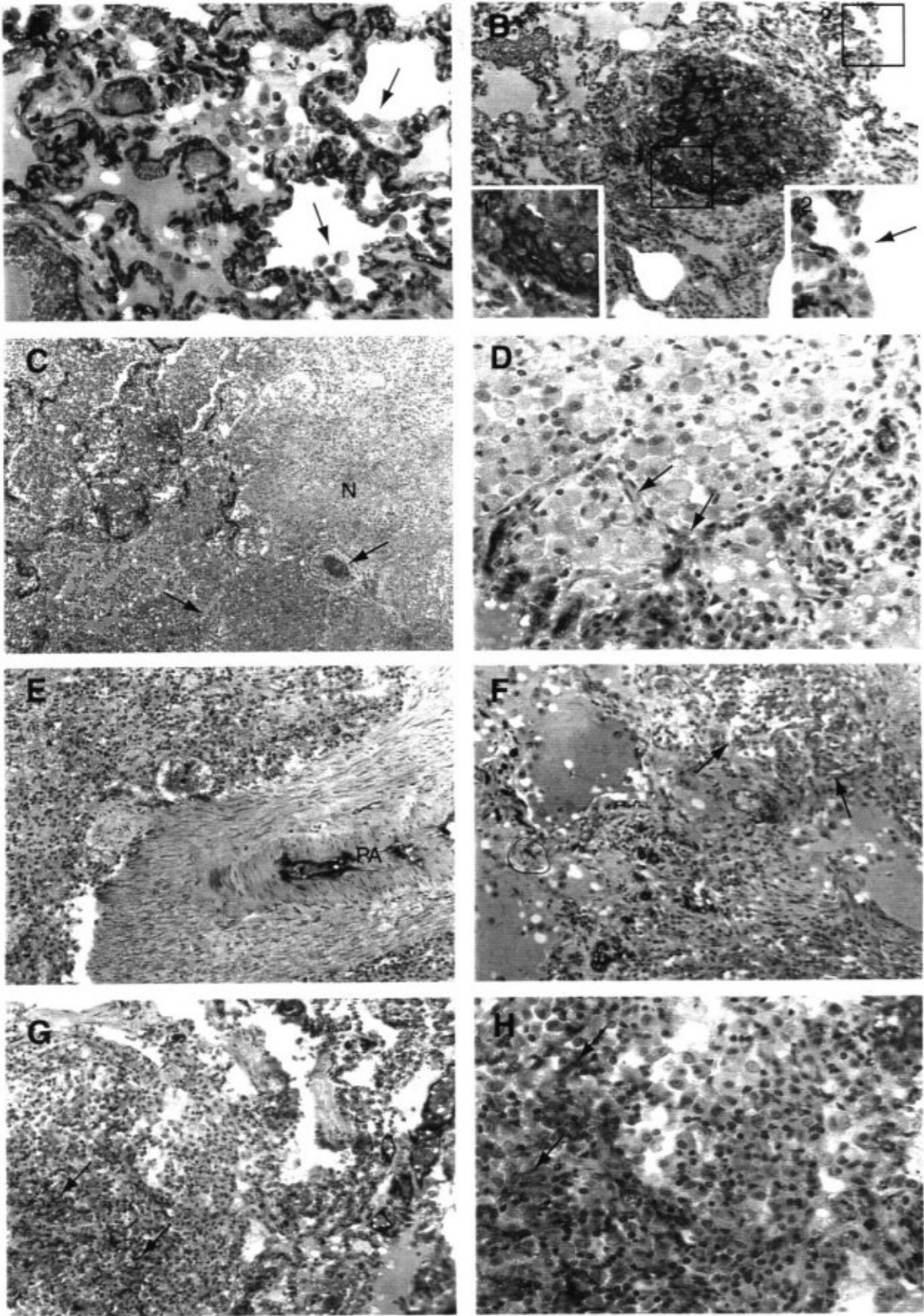


Abb. 9: ACE (CD 143) in **aktivierten Makrophagen** und bei **unterschiedlichen granulomatösen Entzündungen** verschiedener Tierarten. (Anti-ACE mAk CG2).

A: Lunge, Katze, Normalgewebe: ACE ist in Alveolarmakrophagen (Pfeile) nicht detektierbar, x 360.

B: Lunge, Katze, Tuberkulose: Die überwiegend membranöse ACE-Expression der Makrophagen und Epitheloidzellen des Granuloms (Insert 1) steht im Gegensatz zu negativen Alveolarmakrophagen (Pfeil) im nicht direkt betroffenen Lungengewebe (Insert 2), x 120.

C: Lunge, Leopard, Tuberkulose: Fehlende Immunreaktivität im Bereich von Nekrosen (N) und benachbarten arteriellen Endothelien (Pfeile), x 40.

D: Lunge, Leopard, Tuberkulose: Im Entzündungsgebiet ist in den Kapillar-endothelien (Pfeile) und arteriellen Endothelien ACE gegenüber normalem Lungengewebe deutlich reduziert oder nicht detektierbar. Die Makrophagen des Leoparden exprimieren auch im aktivierten Zustand kein ACE, x 360.

E: Lunge, Panther, Tuberkulose: Das deutlich ACE-reaktive Endothel einer großen Pulmonalarterie (PA) steht im Gegensatz zu der fehlenden Immunreaktion des arteriellen und kapillären Endothels im Entzündungsgebiet, x 120.

F: Lunge, Panther, Tuberkulose: ACE-negative Makrophagen und eine nur selten zu beobachtende, angedeutet epitheloidzellige Granulomformation (Pfeile), x 120.

G: Lunge, Löwe, Tuberkulose: Nur sehr schwach ACE-exprimierende Makrophagen und Epitheloidzellen (Pfeile), x 120.

H: Ausschnittsvergrößerung aus G: Nur sehr schwach ausgeprägte (Pfeile), überwiegend aber fehlende Immunreaktion aktivierter Makrophagen und Epitheloidzellen, x 360.

4 Diskussion

4.1 ACE in granulomatösen Entzündungen des Menschen

Die erstmals von Liebermann beobachteten erhöhten ACE-Serumspiegel bei Sarkoidosepatienten ^[72] sind von anderen Forschungsgruppen bestätigt worden ^[91,98,104]. Die Vermutung Silversteins et al., dass biosynthetisch aktive Epitheloidzellen in den Sarkoidosegranulomen für die erhöhten Serumspiegel verantwortlich sind ^[106], wird mittels Immunfluoreszenz-Darstellung von ACE in Sarkoidosegranulomen belegt ^[107]. Takada et al. lokalisieren in ihren Untersuchungen ACE außerdem auch im Zytoplasma sowie an der Zellmembran von Makrophagen bei der Sarkoidose ^[118]. Die klinische Bedeutung von ACE in der Sarkoidose-Diagnostik wird erkannt, da im Gegensatz zur Sarkoidose keine erhöhte ACE-Aktivität in entzündlich alteriertem Gewebe von Tuberkulosepatienten ^[105] und unveränderte bzw. nur unwesentlich erhöhte ACE-Serumspiegel bei diesen Patienten detektiert wurden ^[6,50,72,95]. Im Gegensatz zu jenen Befunden ist nach den eigenen Ergebnissen faktisch jede granulomatöse Entzündung beim Menschen befähigt, ACE in den betroffenen Geweben vermehrt zu exprimieren. Sarkoidose, Tuberkulose, Toxoplasmose, verschiedene Fremdkörperreaktionen, Mykosen und entzündliche Histiozytosen unterschieden sich nicht grundsätzlich in der Fähigkeit zur ACE-Expression. Dies kann erklären, warum gelegentlich auch bei Tuberkulose, M. Gaucher, Lepra, Mykosen, Histiozytosen und Fremdkörpergranulomen erhöhte ACE-Serumspiegel gemessen wurden ^[57,73,74,93,97]. Aktivierte Makrophagen und Alveolarmakrophagen weisen regulär ACE auf ^[44,46,56] und ihre Beteiligung an histiozytären Entzündungen und der Granulomformierung führt daher unweigerlich zu einer geweblichen Akkumulation des Enzyms. Ein gutes Beispiel für die hinsichtlich der Grunderkrankung fehlende Spezifität sind die in der Atherosklerose lokal vorkommenden schaumzelligen Makrophagen und Histiozyten, die ACE besonders ausgeprägt exprimieren und vermutlich in die Pathogenese dieser Gefäßerkrankung eingebunden sind ^[32,77].

Liegt also ein quantitativer Unterschied in der ACE-Expression zwischen den verschiedenen granulomatösen Entzündungen vor, der die unterschiedlichen Serumspiegel erklären könnte? Diese Frage wurde zum einen mit unterschiedlichen Expressionsstärken von ACE beantwortet, abhängig von Reifegrad, Aktivierung und Subtyp beteiligter Makrophagen ^[66]. Die eigenen Daten belegen und bestätigen

zweifelsfrei, dass ACE in Makrophagen spezifisch hochreguliert werden kann ^[46]. Gewebsareale mit einzeln liegenden Makrophagen zeigten generell eine geringere Expression als in Gruppen liegende und diese wiederum eine geringere als in Granulomen lokalisierte Makrophagen. Speziell differenzierte Makrophagen, wie Riesenzellen und Epitheloidzellen waren ebenfalls in aller Regel deutlich ACE-positiv. Offenbar ist dies aber nicht nur für die Sarkoidose, sondern auch für die Tuberkulose und Toxoplasmose charakteristisch. Immunreaktives ACE markiert aktivierte Makrophagen und spezielle histiozytäre Zelldifferenzierungen; seine jeweilig nachweisbare Intensität kann die unterschiedlichen Serumspiegel dieser Erkrankungen aber nur bedingt erklären. Zwar ergaben sich Hinweise für eine zellulär unterschiedlich modulierte Expression und verschiedenartige Zell-Zellbeziehungen, z.B. bei Toxoplasmose mit relativ geringerem ACE-Gehalt in granulomassozierten Makrophagen und polygonalen Epitheloidzellen; Sarkoidose und Tuberkulose aber unterschieden sich hinsichtlich der immunhistologischen Reaktionsintensität praktisch nicht.

Als alternative Erklärung wird das quantitative Ausmaß der jeweiligen Entzündungserkrankung diskutiert, da bei der Sarkoidose eher die Anzahl der Granulome als die Intensität der ACE-Produktion des einzelnen Granuloms erhöhte ACE-Serumwerte widerspiegeln soll ^[19,49,74,95]. Diese Vermutung unterstützt, dass Sarkoidosegewebe auch in der vorliegenden Studie eine durchschnittlich höhere Anzahl von epitheloidzelligen Granulomen aufwies als Gewebeproben einer Tuberkulose und die regelhaft multisystemische Manifestation der Sarkoidose insgesamt zu einer höheren Granulommasse beitragen könnte. Dem steht allerdings entgegen, dass Tuberkulosegranulome zumeist deutlich größer sind als die der Sarkoidose und damit relativ zahlreicher ACE-exprimierende Zellformen beinhalten. Ferner verwundert, dass - abgesehen von dem unbeeinflussten systemischen Blutdruck - gerade bei der Sarkoidose ischämische Gewebenekrosen in der Regel nicht beobachtet werden, was eigentlich bei hoher lokaler ACE-Konzentration mit vasokonstriktorisch potenter Ang II-Bildung und Kinin-Degradation zu erwarten wäre. Eine experimentelle Studie an BCG-induzierten granulomatösen Entzündungen der Maus fand zudem zwar eine deutliche Korrelation zwischen granulomatöser Entzündungsreaktion und ACE-Aktivität in der Lungenlavageflüssigkeit, nicht aber zu der ACE-Serumaktivität ^[99].

Dies läßt zumindest daran zweifeln, ob aus Granulomen überhaupt funktionell wirksames ACE in umgebendes Gewebe diffundieren kann und ob das diffundierte ACE überhaupt für Veränderungen aktueller Serumspiegel verantwortlich ist. Nur plasmatisch freigesetztes und hydrophiles ACE, dem die C-terminale Verankerungsregion in der Zellmembran fehlt, ist biochemisch in Flüssigkeiten normalerweise nachzuweisen ^[58,125]. Dieses im Serum messbare, verkürzte ACE ist katalytisch vergleichsweise gering aktiv und reflektiert nur einen Bruchteil des zellverankerten ACE endothelialer Herkunft ^[38,123]. Die Freisetzung erfolgt über Sekretasen, die als Mg₂-abhängige Metalloproteine in mikrovillären und mikrosomalen Membranen verschiedener Organe von Mensch und Tier nachgewiesen werden ^[60,87]. Nicht auszuschließen ist daher die Möglichkeit, dass nicht die ACE-Expression selbst, sondern eine unterschiedliche Expression und Freisetzung solcher Sekretasen die ACE-Serumspiegel in den verschiedenen granulomatösen Erkrankungen modulieren. Da auch genetische und weitere, z.T. noch unbekannte Faktoren auf den messbaren Serumspiegel Einfluss nehmen ^[3,13,119], ist seine Korrelation zu der tatsächlichen geweblichen Expression und verschiedenen Erkrankungen prinzipiell erheblichen Problemen ausgesetzt und damit nicht sicher möglich.

Bestimmte Besonderheiten wurden dem in Granulomen gefundenen ACE zugeschrieben. Einige Untersucher fanden eine stärkere Expression in der Granulomperipherie gegenüber dem Granulomzentrum, was auf einen stimulierenden Effekt der hauptsächlich in der Granulomperipherie lokalisierten T-Suppressorzellen zurückgeführt wurde ^[5,91]. Auch eine Korrelation zwischen prozentualer Anwesenheit von Lymphozyten und ACE-Produktion wurde bei der Sarkoidose gesehen und lymphozytären Zytokinen eine bedeutende Rolle für die ACE-Induktion zugeordnet ^[90]. Solche Abhängigkeiten können in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Weder die zahlreich geprüften morphologischen noch die immunhistologischen Kriterien ergaben in der Korrelationsanalyse Hinweise auf einen signifikanten Einfluß entzündungsbegleitender Lymphozyten. Nur bei der Tuberkulose stand das vermehrte Auftreten von Lymphozyten in Beziehung zu einem vermehrten Nachweis geordneter Riesenzellen und einer erhöhten ACE-Expression in benachbarten Endothelien. Dagegen unterstreichen die eigenen Daten aber die zentrale Rolle des Makrophagen im granulomatösen Entzündungsgeschehen. Die Anzahl aktivierter, in Granulomen selbst vorgefundener Makrophagen war sowohl bei Sarkoidose und Tuberkulose als auch bei Toxoplasmose deutlich mit einer erhöhten

ACE-Expression dieser Zellen im Granulom assoziiert, und hier besonders mit der von polygonalen Epitheloidzellen. Dies lässt eine Regulation der Expressionsstärke von ACE in Makrophagen durch einen sezernierten, auto- und parakrin wirksamen Faktor vermuten. Aus der Zellkultur sind bisher jedoch nur Steroidhormone, Fibroblastic Growth Factor (FGF) und synthetische Proteinkinase C-Aktivatoren bekannt geworden, welche ACE stimulieren konnten ^[30,41,48,124].

Ein interessanter Befund dieser Arbeit, der auf eine gegenteilige Regulation von zellulärem ACE hinweist, verdient noch kurze Erwähnung. In unmittelbarer Nachbarschaft strukturloser Nekrosen der Tuberkulose von Mensch und Tier (Abb. 2 B, C, 8 A und 9 C), akuter Entzündungskomponenten (Abb. 3 G und 8 E, F) und schwer resorbierbaren Fremdkörpermaterials (Abb. 3 H) fand sich immunreaktives ACE auf normalerweise exprimierenden Zellformen reduziert oder fehlte komplett. ACE ist aber bekanntermaßen molekular sehr stabil und immunhistologisch auch in ACE-exprimierenden nekrotischen Zellformen und selbst nach fortgeschrittener Autolyse noch problemlos nachweisbar ^[76]. Dagegen reagiert ACE überraschend empfindlich auf die oxidative Burst-Reaktion von Granulozyten und hier auf freigesetztes H₂O₂ ^[15,48,76]. In allen der oben erwähnten pathologischen Gewebeveränderungen liegen vermutlich hohe lokale H₂O₂-Konzentrationen vor, die zu einem Verlust sowohl der enzymatischen Aktivität als auch der immunhistologischen Detektionsfähigkeit durch Destruktion der molekularen ACE-Struktur beitragen ^[48]. Als weitere Besonderheit muss erwähnt werden, dass sich Lymphozyten einschließlich aller Aktivierungsstufen stets und strikt immunhistologisch ACE-negativ darstellten. Dies deckt sich nicht mit der bisherigen Vorstellung einer, wenn auch nur geringen Expression in diesen Zellformen. Letztere Befunde beruhen allerdings auf morphologisch nur wenig differenzierenden funktionellen Analysen und auf Reaktionen polyklonaler Antiseren, deren Spezifität durchaus nicht gesichert ist ^[20].

Bezüglich des Sarkoidoseverlaufes wurde eine geringere ACE-Aktivität in fibrosierten gegenüber nicht fibrosierten Granulomarealen festgestellt ^[5,91,104], was vermutlich auf der Größenabnahme eingefasster Granulome, nicht aber auf der Expressionsintensität beteiligter Zellformen beruht. Beziehungen zwischen zellulärer ACE-Expression und der Quantität der umgebenden Fibrose wurden in den eigenen Sarkoidosefällen nicht gefunden, lediglich Endothelien in zellarmen, kollagenfaserreichen Fibrosen exprimierten signifikant vermehrt ACE. Dies lässt Parallelen zu endothelial neuexprimiertem ACE in parenchymatösen

Umbauprozessen verschiedener Nierenerkrankungen erkennen ^[76]. Nur in den Tuberkulosefällen war die ACE-Expression geordneter und ungeordneter Riesenzellen zu dem Ausmaß der entzündungsumgebenden Fibrosereaktion assoziiert. Ob letzterer Befund aber tatsächlich eine direkte funktionelle Beziehung signalisiert, ist fraglich. Sicher aber kommt der gelegentlich schwachen ACE-Expression in Fibroblasten keine gesonderte Rolle zu.

Dennoch ist ACE in granulomatösen und histiozytären Erkrankungen nicht nur immunhistologisch eindrucksvoll. Seine funktionelle Bedeutung bestätigen ältere tierexperimentelle Studien, die eine dosisabhängige Reduktion der Granulomgröße unter ACE-Inhibition (Captopril) beschreiben ^[99,126,127]. Weinstock sieht den Sinn der ACE-Produktion in Granulomen in einer Steigerung der Phagozytoseaktivität ^[128], einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität ^[65,129] und einer chemotaktischen Wirkung auf T-Lymphozyten durch vermehrt generiertes Ang II ^[130]. Als unspezifische Dipeptidylpeptidase nimmt ACE zudem vermutlich an dem Abbau und der biologischen Inaktivierung kurzkettiger Aminosäuresequenzen teil. Der gesteigerte Abbau von Bradykinin sollte die lokale Gefäßpermeabilität aber eher reduzieren, und - falls Ang II tatsächlich chemotaktisch wirkt - ist aufgrund der vorliegenden morphologischen Daten viel eher der Makrophage selbst die Zielzelle. Diese Sichtweise wird durch eine Reihe neuerer Erkenntnisse gestützt, die dem Zytokin „monocyte chemotactic protein-1“ (MCP-1) eine zentrale Rolle in der Granulomformierung zuschreiben ^[42,47]. Dieses, besonders von Makrophagen selbst freigesetzte Chemokin fördert selektiv die Aktivierung und Akkumulation von Makrophagen ^[71]. Es ist in epitheloidzelligen Granulomen massiv nachweisbar ^[62] und zeigt zudem Korrelationen zur Entzündungsaktivität und Verlaufsparemtern der Sarkoidose ^[54]. Interessanterweise scheinen direkte Beziehungen zur Expression von ACE zu bestehen, da einerseits entzündungsbedingte Serumwerte und die Expression von MCP-1 und ACE miteinander korrelieren ^[62], andererseits eine medikamentöse ACE-Inhibition die Expression von MCP-1 auch in anderen Erkrankungen und experimentellen Modellen senkt ^[55,111]. Ob tatsächlich durch ACE gebildetes Ang II direkt MCP-1 induziert ^[16] oder ACE in anderweitiger Beziehung zu MCP-1 steht, ist aufgrund der bisherigen Befunde unklar.

4.2 ACE im Gewebe verschiedener Tierspezies

Ein Differieren antigener Determinanten des humanen ACE von dem anderer Spezies hatten erstmals Takada et al. mittels eines kreuzreagierenden Antiserums vom Kaninchen festgestellt ^[118]. Die bei Tieren fehlende Immunreaktivität der im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten monoklonalen Antikörperklone CG1, CG3, CG4, CG5 und 5F1, die jeweils nur ein definiertes Epitop des denaturierten humanen ACE detektieren ^[24], erklärt sich durch strukturelle Unterschiede des ACE-Moleküls der verschiedenen Tierarten. Dennoch überrascht, dass nur ein einzelner Antikörperklon kreuzreagierte (mAk CG2), dann aber gleich mit dem ACE teilweise so verschiedener Tierarten wie Menschenaffe, Hund, Feliden (Katze, Panther, Leopard und Löwe), Kaninchen und Gürteltier. Dieses spricht für eine zwischen diesen Tierarten einschließlich Mensch hochkonservierte Proteindomäne des ACE. Affe, Hund und Kaninchen zeigten auch eine Immunreaktivität des mAk JC/70A gegen humanes CD31, der sich mithin als geeigneter Endothelmarker für diese Spezies anbietet. Der mAk KP1 (humanes CD68) dagegen wurde in keiner der untersuchten Tierarten immunreaktiv gefunden. Daraus kann gefolgert werden, dass zumindest sein detektiertes Epitop ebenso wie die der mAk CG1, CG3, CG4, CG5 und 5F1 offenbar humanspezifisch sind.

Nicht verwunderlich ist aufgrund der engen Verwandtschaft des Menschenaffen die ACE-Kreuzreaktivität des mAk CG2. Interessanterweise erkannte dieser mAk zwar ACE im Gewebe des Kaninchens, nicht aber das ACE anderer, relativ eng mit dem Kaninchen verwandter Kleinnager wie Maus, Ratte, Hamster oder Meerschweinchen. In der ebenfalls untereinander enger verwandten Gruppe der Carnivoren (Hund, Katze, Panther, Leopard und Löwe) bestand dagegen eine einheitliche Kreuzreaktivität des mAk CG2. Ein ähnliches Resultat hatten Conroy et al. mittels Antiserum der Ziege gezeigt ^[17]. Diese Autoren fanden zwischen Hund und Kaninchen eine immunogene Homologie des ACE, ferner auch annähernd gleiche Umsatzraten der Substrate des Enzyms. Im Gegensatz zur Kreuzreaktivität von mAk CG2 mit dem ACE des Menschenaffen, der Carnivoren, des Kaninchens und des Gürteltieres fand sich in der vorliegenden Arbeit keine Kreuzreaktivität mit dem ACE der Herbi- und Omnivoren (Rind, Schaf, Ziege, Pferd und Schwein). In Nicht-Säugetieren, wie Reptilien und Vögel, konnte ACE mit mAk CG2 ebenfalls nicht detektiert werden. Takada et al. stellten eine Kreuzreaktivität ihrer anti-ACE-Seren zwischen Hunde-, Schweine- und Rattenniere, nicht aber mit Nieren von Rind, Schaf

und Kaninchen fest ^[117]. Sie konnten, was die immunogenen Eigenschaften des ACE betrifft, keine phylogenetischen Beziehungen erkennen. Die eigene Studie mit monoklonalen anti-ACE-Antikörpern zeigt jedoch, dass durchaus ähnliche immunogene Eigenschaften des Moleküls verwandter Tierarten vorliegen.

Charakteristisch und speziesübergreifend sind weitgehend einheitliche Expressionsmuster des ACE in den verschiedenen Organen und Geweben. Insbesondere exprimieren die Bürstensäume der proximalen Nierentubulus- und der Dünndarmepithelien stark ACE. Dies wurde bereits 1976 beim Kaninchen und Schwein erkannt ^[12,51]. Vermutlich nimmt das Enzym hier an der Aminosäure-Absorption und Reabsorption teil ^[1,76]. Ferner ist für Ang II ein Effekt auf die Natrium- und Bikarbonatreabsorption bekannt ^[8,64]. Hohe Konzentrationen von ACE wurden schon 1971 im Gehirn der Ratte und später im Gehirn des Schweines und der Medulla oblongata von Ratte, Kaninchen, Schaf und Mensch nachgewiesen ^[4,21,59], wobei das Enzym vermutlich an der Hydrolyse der Substanz P und dem Metabolismus kurzkettiger Neuropeptide teilnimmt ^[114]. Für alle untersuchten Gewebe dieser Studie stimmte das detektierte Expressionsmuster von ACE mit diesen gut bekannten Lokalisationsorten überein.

4.3 ACE im Gefäßsystem verschiedener Tierspezies

Eine Ausnahme der immunhistologischen Homologien zwischen den verschiedenen Spezies bildet jedoch die endotheliale ACE-Verteilung im Gefäßsystem. Die Heterogenität des Endothels bezüglich morphologischer Struktur, Funktion, immunologischer und metabolischer Eigenschaften ist seit längerem bekannt ^[68,88,94]. Auch beim Menschen findet sich ACE endothelial ausgesprochen heterogen exprimiert was die Gefäß- und Organspezifität betrifft und einige Bedeutung für das Verständnis des zirkulierenden Renin-Angiotensin-Systems (RAS) hat ^[44,77]. Unabhängig von dem zirkulierenden RAS wurde die Existenz eines eigenständigen vaskulären RAS postuliert ^[14,35] und funktionell propagiert ^[36], was allerdings hinsichtlich tatsächlich nachweisbarer Komponenten nach wie vor umstritten ist ^[122]. Entgegen der allgemeinen Vorstellung, dass glatte Gefäßwandmuskulatur ACE exprimiert ^[7,41], liegen hierfür aber immunhistologisch keinerlei Hinweise vor ^[77], und auch die vorliegende Arbeit konnte für die verschiedensten Tierarten kein immunreaktives ACE in glatten Gefäßwandmuskelzellen dokumentieren. Dagegen sind speziesspezifische Unterschiede in der endothelialen ACE-Verteilung der Ratte

beschrieben ^[76]. Diese endotheliale Heterogenität dokumentiert auch diese Arbeit mit von Spezies zu Spezies zumeist nur gering, gelegentlich jedoch deutlich variierenden Expressionsmustern (Tab. 12).

Die ausgeprägte endotheliale ACE-Expression in Alveolarkapillaren der Lunge von Mensch und Tier ist seit langem bekannt und immunhistologisch klar belegt ^[12,23,26,98]. Aufgrund des weitverzweigten alveolären Gefäßnetzes und der hohen Durchflussrate stellt die Lunge den Hauptort der Konversion von Ang I zu Ang II in der Blutzirkulation und damit ein wichtiges Organ in der Blutdruckregulation dar ^[123]. Zwar unterliegen gemessene ACE-Serumspiegel in verschiedenen Tierarten einer deutlichen Varianz mit absteigender Reihenfolge von Ratte, Affe, Mensch und Hund ^[78], aber ähnlich stark beobachtete ACE-Aktivitäten in den Pulmonalarterien und -venen (sowie Nierenarterien) finden jedoch bei Hund und Affe kein immunhistologisches Korrelat. Bei detaillierter morphologischer Analyse zeigten sich bereits in engster Nachbarschaft deutliche Expressionsunterschiede der Endothelien, ganz abhängig von ihrer definierten Position in der Lungenstrombahn (Abb. 5 B). Endothelien der Pulmonalvenen zeigten, z.B. auch bei Hund und Affe, kein immunreaktives ACE, und die Endothelien größerer Pulmonalarterien waren stets vermindert immunreaktiv (Abb. 6 C). Speziesspezifische Besonderheiten müssen berücksichtigt werden (Tab. 12). Dennoch entsprechen die eigenen Resultate im Prinzip der Situation beim Menschen ^[43], wobei die Vasa privata der bronchialen Zirkulation dem im Körper üblichen Verteilungsmuster der ACE-Expression unterliegen (Abb. 6 C und D). Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit bestätigen zudem eine frühe Arbeit, die erstmals auf unterschiedliche ACE-Aktivitäten zwischen Pulmonalarterien und -venen und damit erstmals auf eine endotheliale ACE-Heterogenität verwies ^[63].

Die Niere ist das entscheidende Steuerorgan des RAS und der Blutdruckregulation. Erst kürzlich konnte mit mAk gegen humanes ACE, die z.T. auch in dieser Arbeit verwendet wurden, das komplette Fehlen von immunreaktivem ACE in der Nierenvaskularisation beim Menschen demonstriert werden ^[76]. Dieser Befund bestätigt frühere Vermutungen ^[11,79] und *in vivo*-Messungen einer funktionell fehlenden renalen Ang I-Konversion ^[29]. Organspezifisch ist die endotheliale Abwesenheit von ACE nur auf das normale menschliche Nierengewebe beschränkt. Durch verminderte lokale Bildung von Ang II und verminderten Abbau von Kininen erklärt sie den geringen vaskulären Widerstand der Nierengefäße mit hoher

Durchblutungsrate und erheblichem Anteil am Herzminutenvolumen recht gut ^[76]. Manche widersprüchlichen Ergebnisse in der älteren Literatur sind durch unspezifische polyklonale Antikörper oder indirekte Nachweismethoden mittels Autoradiografie bedingt, aber auch durch die experimentelle Verwendung ganz unterschiedlicher Tierarten mit unkritischer Hochrechnung auf andere Säugetierarten einschließlich des Menschen. Daher ist die Feststellung wichtig, dass in der normalen Rattenniere endotheliales ACE nicht in Venen, interstitiellen und glomerulären Kapillaren, hingegen ausgeprägt in Arterien, Arteriolen sowie den Vasa afferentes/efferentes zu verzeichnen ist ^[76]. Die Gegenüberstellung verschiedener Tierarten in der vorliegenden Arbeit verdeutlicht speziesspezifische Differenzen gerade in der Nierenvaskularisation (Tab. 12). Wie beim Menschen fehlte beim Menschenaffen eine ACE-Immunreaktivität in Endothelien aller Nierengefäße (Abb. 5 C und D), aber auch das Kaninchen ließ in der Niere endothelial keinerlei ACE detektieren (Abb. 5 G). Ältere Befunde anderer Autoren, die eine glomeruläre ACE-Expression beim Kaninchen beschreiben ^[75], konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Geringgradige glomeruläre Immunreaktivitäten wurden ausschließlich bei Katze und Löwe gefunden und sind möglicherweise ein für Feliden spezifisches Phänomen. Hunde und Katzen zeigten zudem eine konstante endotheliale ACE-Expression aller Nierenarterien, was in diesen Spezies, ähnlich der Ratte, einen präglomerulär andersartig regulierten Gefäßtonus vermuten läßt. Die Unterschiede zwischen den Tierarten sind ein Hinweis auf speziesspezifische Eigenheiten in der renalen RAS- und Blutdruckregulation.

Während Lunge und Niere die organspezifischen Ausnahmen in der endothelialen ACE-Verteilung stellen, findet sich beim Menschen in allen anderen Organen wie Herz, Leber, Gehirn, Milz, Haut, kleinen und großen Körperdrüsen und im Weichgewebe ein gleichartiges und charakteristisches Verteilungsmuster (s. 2.1.3). Kapillarendothelien, z.B. auch der erwähnten bronchialen Gefäße, zeigen nur zu etwa 10 bis 20% Immunreaktivität, die Endothelauskleidung der meisten venösen Gefäße ist komplett ACE-negativ, und stärkste Expressionen finden sich nur in Endothelien kleiner peripherer Arterien und Arteriolen ^[44]. Die vorliegende Studie bestätigt für die untersuchten Tierarten (außer für die Kleinnager) die heterogene Expression innerhalb größerer Gefäßstämme und der allgemeinen Mikrovaskularisation. Das jeweils miteinander verglichene Lebergewebe, das hinsichtlich der arteriellen und portalen (splanchnalen) Gefäßversorgung zu studieren war, gibt

darüber hinaus Hinweise auf speziesspezifische Besonderheiten (Tab. 12). Der Affe zeigte als einzige der untersuchten Tierarten im Lebergewebe keine ACE-Immunreaktivität in Endothelien der leberinternen Gefäßtypen. Dagegen entsprach das Expressionsmuster des Kaninchens mit stärkster Immunreaktivität in kleinen Portalarterien und –arteriolen (Abb. 5 E) dem des Menschen (F.E. Franke, persönliche Mitteilung). Der organspezifische Unterschied zwischen Affe und Mensch überrascht, da ansonsten ein sehr ähnliches ACE-Verteilungsmuster gefunden wurde. Überraschend und abweichend von Mensch, Affe und Kaninchen sind auch die Befunde bei Hund und Katze. Hier fand sich zusätzlich eine endotheliale ACE-Expression in den Portalvenen (Abb. 6 E und 7 C), was offenbar bei diesen Tierarten für viele splanchnale Gefäße gilt, da auch venöses Gefäßendothel der Milzgefäße deutliche Immunreaktivität aufwies (Abb. 6 F und 7 D). Hund und Katze besitzen bekanntermaßen eine Speichermilz, die in Phasen großer körperlicher Leistung ein höheres Blutvolumen zur Verfügung stellt. Die eigenen Befunde können daher auf eine Bedeutung des splanchnalen ACE bei Hund und Katze für eine effektivere Verteilung des Blutvolumens hinweisen, z.B durch lokal vermehrte Ang II-Freisetzung und Bradykinin-Degradation.

4.4 ACE in granulomatösen Entzündungen der Tiere

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine speziesspezifische Heterogenität der zellulären ACE-Expression offenbar auch das Makrophagen/Histiozyten-System und seine Aktivierung betrifft. Im Gegensatz zu den bereits unter physiologischen Bedingungen stets gering ACE-exprimierenden Alveolarmakrophagen des Menschen fand sich in Alveolarmakrophagen aller untersuchter Tierarten keine Expression (Abb. 8 C und 9 B). Zumindest für das Kaninchen und im Gegensatz zum Menschen findet sich dieser unerwartete Befund in der älteren Literatur bestätigt ^[56]. Ein neuer Befund dieser Arbeit ist dagegen das Fehlen von ACE auch in Alveolarmakrophagen von Menschenaffe, Hund, Katze, Löwe, Panther und Leopard, was bereits auf eine unterschiedliche ACE-Regulation in stimulierten Makrophagen hinweist. Extrem unterschiedlich stellte sich das Expressionsspektrum aber in den verschiedenen granulomatösen Entzündungsreaktionen verschiedener Tierarten dar. Während der Menschenaffe sich hier durchaus mit dem Menschen vergleichen ließ, was Granulomformierung, -größe und ACE-Expressionsintensität angeht (Abb. 8 A und B), war in keinem der aktivierten Makrophagen und in keinem der eher kleinherdigen

Granulome des Kaninchens ACE zu detektieren. Beim Hund wurden nur ganz ausnahmsweise ACE-immunreaktive Makrophagen im Randbereich von Haargranulomen gefunden, und ebenso zeigte die Katze nur ausnahmsweise deutlicher ACE in den wenigen größeren Granulomen der untersuchten Tuberkulosefälle (Abb. 9 B). Die untersuchten, an Tuberkulose erkrankten Großkatzen besaßen ganz überwiegend nicht die Fähigkeit immunreaktives ACE zu exprimieren. Dies deutet auf eine molekular andersartige Gewebereaktion auf Mykobakterien in den verschiedenen Tierarten hin. Rein morphologisch waren voll ausgebildete, dem Menschen oder Menschenaffen vergleichbare Epitheloidzellgranulome ebenfalls nicht nachweisbar, das histologische Bild erinnerte eher an das der mykobakteriellen Histiozytose immundefizienter Patienten (vergleiche Abb. 9 D mit 4 E). In HIV-infizierten Makrophagenkulturen bleibt die durch Phagozytose von *Mycobacterium tuberculosis* induzierte Expression des Zytokins MCP-1 offenbar aus ^[47]. Eine im Reaktionsspektrum von Makrophagen nicht vorgesehene ACE- und damit verminderte MCP-1-Expression, die durch das ACE-Produkt Ang II induziert wird ^[16], könnte die geringe Tendenz vieler Tierarten zu einer epitheloidzellig granulomatösen Gewebereaktion erklären. Interessant wäre daher zu prüfen, ob und in welcher Form das Zytokin MCP-1 in den Makrophagen und Entzündungen der untersuchten Tierarten exprimiert wird und damit gleichfalls seine Beziehung zu ACE zu entschlüsseln.

5 Zusammenfassung

Vorkommen und Verteilungsmuster von Angiotensin I-converting enzyme (ACE, Kininase II, CD143), das die Auswirkungen des RAS und des KKS über die Gewebespiegel bioaktiver Angiotensine und Kinine reguliert, ist in Geweben von Mensch und Tier unzureichend charakterisiert. Erst kürzlich fiel seine endotheliale Heterogenität mit bemerkenswerter Gefäß-, Organ- und Speziespezifität auf. Ferner sind die bei Sarkoidose und einigen histiozytären Entzündungen abnorm erhöht gefundenen ACE-Serumspiegel morphogenetisch nicht erklärt. Ziele dieser Arbeit waren daher, mit sechs gegen denaturiertes menschliches ACE hergestellten neu zur Verfügung stehenden monoklonalen Antikörpern (mAk) (CG1, CG2, CG3, CG4, CG5 und 5F1) das Expressionsmuster von ACE (1.) in Makrophagen und ätiologisch verschiedenen granulomatösen Entzündungen des Menschen zu vergleichen, (2.) diese mAk hinsichtlich einer möglichen Kreuzreaktivität mit dem ACE verschiedener Tierarten zu prüfen, um dadurch (3.) mögliche speziespezifische Unterschiede in der endothelialen, makrophagozytären und granulomatösen ACE-Expression zu analysieren. Außerdem wurden die mAk JC/70A gegen CD31, mAk KP1 gegen CD68 und mAk MR12/53 (unspezifisch) zu Kontrollzwecken eingesetzt.

Grundlage bildeten formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben von Patienten mit klinisch abgesicherter Tuberkulose (n= 41), Sarkoidose (n= 29), Toxoplasmose (n= 30), Fremdkörpergranulomen unterschiedlicher Ätiologie (n= 14) und 20 Patientenfälle mit besonderen granulomatösen und histiozytären Entzündungen wie Schistosomiasis, Blastomykose, mykobakterieller Histiozytose und Morbus Hansen (Lepra). Ferner wurden in Paraffin eingebettete Gewebeproben von 21 verschiedenen Tierarten untersucht. Histiozytäre und granulomatöse Gewebereaktionen konnten hier jeweils an der Tuberkulose von Menschenaffe, Hund, Katze und Großkatzen, an der Lungenmykose des Kaninchens und an Fremdkörperreaktionen des Hundes erfasst werden. Das Gewebematerial entstammte den Instituten für Pathologie und Veterinär-Pathologie der JLU Giessen, die Sonderfälle der Abteilung für Pathologie der Universität Campinas, Brasilien. Als Detektionsmethode der Immunreaktivität diente die APAAP-Technik. Die geweblichen Expressionsmuster von ACE wurden einheitlich analysiert, wobei eine semiquantitative Erfassung morphologisch und immunhistologisch relevanter Gewebe-

veränderungen bei Sarkoidose, Tuberkulose und Toxoplasmose eine vergleichende statistische Analyse zuließ.

Von den analysierten mAk gegen humanes ACE reagierte der mAk CG2 kreuz mit dem ACE des Menschenaffen, der Carnivoren Hund, Katze und aller Großkatzen, des Kaninchens und des Gürteltieres, nicht jedoch mit dem ACE der Kleinnager Hamster, Maus, Ratte und Meerschweinchen oder der Omni- und Herbivoren wie Schwein, Schaf, Ziege, Rind und Pferd. Dies spricht für konservierte ACE-Proteindomänen mit immunogener Ähnlichkeit untereinander verwandter Tierarten. Der mAk CG2 lokalisierte ACE in den Geweben der kreuzreaktiv gefundenen Tierarten jeweils eindeutig. Auffallende gefäß-, organ- und speziesspezifische Unterschiede betrafen jedoch die endotheliale Expression, besonders deutlich im direkten Vergleich der Lungen-, Nieren- und Lebervaskularisation. Während Alveolarendothel allgemein stark und einheitlich exprimierte, fehlte ACE in den Endothelien aller Nierengefäße von Kaninchen und Affe, und nur die Carnivoren Hund und Katze zeigten eine Expression in venösen Endothelien des splanchnalen (und portalen) Gefäßsystems. Die Ergebnisse bestätigen - über Mensch und Ratte hinaus - die Heterogenität der endothelialen ACE-Verteilung für zahlreiche weitere Tierarten. Eine unterschiedliche Regulation von zirkulierendem RAS, KKS und Blutdruck ist daher zu vermuten, jeweils angepasst an die Bedürfnisse der betreffenden Spezies und des betreffenden Organsystems.

In einer überraschenden Heterogenität präsentierte sich ebenfalls das von Makrophagen exprimierte ACE, das spezies- und zudem aktivierungsabhängigen Mustern folgte. Alveolarmakrophagen und andere aktivierte Makrophagen zeigten sich beim Menschen gering immunreaktiv für ACE, jedoch in keiner der untersuchten Tierarten. Eine dem Menschen vergleichbare Morphologie und stets ausgeprägte ACE-Immunreaktivität waren kennzeichnend für die epitheloidzellig granulomatöse Entzündungsreaktion des Menschenaffen bei Tuberkulose, wurden aber nur unregelmäßig und sporadisch bei Hund und Katze und nicht bei Großkatzen gefunden. Trotz massiver Tuberkulose gehörte eine ACE-Expression bei Großkatzen offenbar nicht zu dem Reaktionsspektrum aktivierter Makrophagen, ebensowenig wie bei aktivierten Makrophagen des Kaninchens. Beim Menschen dagegen unterschieden sich Sarkoidose, Tuberkulose und Toxoplasmose nicht substanziell in der histiozytären Fähigkeit zur ACE-Expression. Die hinsichtlich zellulärer Art und Intensität faktisch gleichartigen Expressionsmuster von Sarkoidose und Tuberkulose erklären ihre

unterschiedlich beschriebenen ACE-Serumspiegel nicht. Daher müssen hier andere Einflußfaktoren diskutiert werden, wie eine unterschiedliche Aktivität von Sekretasen, die das plasmatisch erfassbare ACE generieren. Die multifaktorielle Analyse ergab, dass nicht Lymphozyten, sondern die Makrophagen selbst signifikanten Einfluss auf ihre Akkumulation und ACE-Expression in der granulomatösen Entzündungsreaktion haben. Diese Befunde decken sich gut mit der kürzlich bekanntgewordenen Beziehung zwischen ACE und dem von Makrophagen gebildeten Zytokin MCP-1, das - zumindest experimentell von Angiotensin II induziert - für die Makrophagenakkumulation verantwortlich ist und beim Menschen mit ACE-Gehalt und Ausprägungsgrad granulomatöser Gewebereaktionen korreliert. Die eigenen Befunde sprechen dafür, dass Tierarten, denen das Reaktionsspektrum mit lokal ausgeprägter ACE-Expression fehlt, tatsächlich keine vergleichbare epitheloidzellig granulomatöse Entzündungsreaktion aufbauen können.

6 Summary

Angiotensin I-converting enzyme (ACE, Kininase II, CD143) mediates the effects of the renin-angiotensin system (RAS) and kallikrein-kinin system (KKS) by regulating the tissue levels of bioactive angiotensins and kinins. Though remarkable vessel, organ and species specificity has recently been reported, only little is known about the distribution of ACE in tissues of man and animals. Furthermore, the abnormally increased serum levels of ACE found in sarcoidosis and other histiocytic diseases were not adequately explained by morphological methods. Therefore, the tissue expression of the enzyme was assessed by novel monoclonal antibodies (mAbs) and immunohistochemistry. This allowed (1) a comparison of ACE-expression of macrophages in human diseases of different etiology, (2) the detection of possible cross-reactivity of anti-ACE mAbs between different animal species, and (3) the subsequent analysis of species specific differences in the distribution of ACE in endothelial cells, macrophages and granulomatous diseases.

Formalin-fixed and paraffin-embedded tissue specimen of patients with clinically confirmed tuberculosis (n = 41), sarcoidosis (n = 29), toxoplasmosis (n = 30) and foreign body granuloma (n = 14) were obtained from the Institute of Pathology, JLU-University of Giessen. Tissue specimens of patients with peculiar granulomatous and histiocytic diseases such as leprosy (n = 9), blastomycosis (n = 10), schistosomiasis (n = 1), and mycobacterial histiocytosis (n = 2) were obtained from the Department of Pathology, University of Campinas, Brazil. Furthermore, formalin-fixed and paraffin-embedded tissue specimen of 21 different animal species, received from the tissue archives of the Institute of Veterinary Pathology, JLU-University of Giessen, were examined. Here, histiocytic and granulomatous diseases were analyzed in cases of tuberculosis of anthropoid ape, dog, cat and bulk-cat, pulmonary mycosis of rabbit and foreign body granuloma of dog. A set of six mAbs (CG1, CG2, CG3, CG4, CG5 and 5F1) to denatured human ACE were applied on the tissues of man and different animal species, supplemented by the mAbs JC/70A to human CD31, KP1 to human CD68 and MR12/53 as an unspecific control. Immunoreactivity was detected by the APAAP-technique and was uniformly analyzed. A semiquantitative evaluation and statistical comparison of relevant morphological and immunohistochemical features was performed in sarcoidosis, tuberculosis and toxoplasmosis of man.

Among all mAbs to human ACE, only CG2 showed a cross-reactivity with the ACE-molecule of anthropoid ape, carnivores (dog, cat, bulk-cat), rabbit and armadillo as indicated by similar tissue expression, for example at the brush borders of proximal kidney tubules. In contrast, the denatured ACE of mouse, rat, hamster, guinea-pig and herbi- and omnivores (cow, sheep, goat, horse and pig) was not immunoreactive. This implies that certain domains of the ACE-protein, exhibiting immunogenic similarity between different species, are evolutionary preserved. However, the endothelial distribution of ACE differed markedly in the analyzed vessels, organs and animal species. Whereas alveolar endothelium generally showed a strong and uniform ACE-expression in all cross-reactive species, ACE was largely absent from endothelial cells of most animal kidneys and completely missed in renal vessels of the rabbit and anthropoid apes. Only carnivores like dog and cat showed an expression of ACE in the venous endothelium of the splanchnic and portal vessel system. Far beyond former findings in man and rat, these results confirmed the heterogeneity in endothelial distribution of ACE for numerous animal species. Furthermore, this suggests a different regulation of blood pressure and circulating RAS and KKS, adapted to organ and species specific requirements.

Depending on species and cell activation, heterogeneous ACE-expression was found in macrophages as well. Whereas human alveolar macrophages and activated histiocytes regularly showed some immunoreactivity, these cells were completely negative for ACE in all examined animal species. Nevertheless, in animals affected by tuberculosis, strong ACE-expression for example was found in all epitheloid cell granulomas of anthropoid ape and to some extent also in granulomas of dog and cat. In contrast, rabbits did not show any ACE-expression in macrophages or histiocytes despite massive tuberculosis, and typical epitheloid cell reactions were not found. The same was true for most tuberculous tissues of bulk-cats. This indicates that the capability of ACE-expression in macrophages may be linked with the epitheloid cell reaction. However, there was no substantial difference in ACE expression between sarcoidosis, tuberculosis and toxoplasmosis in man. The similar morphology and ACE-expression of epitheloid-cell granulomas in sarcoidosis and tuberculosis may not explain the different serum levels of the enzyme, suggesting other factors of influence in these diseases. For example, secretases generating the measurable form of plasmatic ACE could belong to those still unknown factors. Multifactorial analysis showed that not lymphocytes but macrophages themselves had a significant

influence on their own accumulation and ACE-expression in granulomatous diseases. This finding fits the recently discovered relationship between ACE and the macrophage chemotactic protein 1 (MCP-1) that is produced by macrophages. At least experimentally, MCP-1 is inducible by angiotensin II. Moreover, MCP-1 is responsible for the accumulation of macrophages and correlates with both the ACE-content and degree of granulomatous tissue alterations. The own results indicate that animal species lacking ACE in the spectrum of macrophage activation may not be able to form epitheloid cell granulomas which are comparable to those in humans.

7 Literaturverzeichnis

1. Alhenc-Gelas, F., Baussant, T., Hubert, C., Soubrier, F., Corvol, P.
The angiotensin converting enzyme in the kidney
J. Hypertens. Suppl. 1989; 7: 9
2. Alhenc-Gelas, F., Soubrier, F., Hubert, C., Allegrini, J., Lattion, A.L.,
Corvol, P.
The Angiotensin I-Converting Enzyme (Kininase II): Progress in molecular and
genetic structure
J. Cardiovasc. Pharmacol. (New York) 1990, 15 (6): 25
3. Alhenc-Gelas, F., Richard, L., Courbon, D., Warnet, J., Corvol, P.
Distribution of plasma angiotensin I-converting enzyme levels in healthy men:
Relationship to environmental and hormonal parameters
J. Lab Clin. Med. 1991; 117:33
4. Allen, A.M., Chai, S.-Y., Sexton, P.M., Lewis, S.J., Verberne, A.J., Jarrott, B.,
Louis, W.J., Clevers, J., Mc Kinley, M.J., Paxinos, G., Mendelsohn, F.A.
Angiotensin II receptors and Angiotensin converting enzyme in the medulla
oblongata
Hypertension 1987; 9: III 198
5. Allen, R.K., Chai, S.Y., Dunbar, M.S., Mendelsohn, F.A.O.
In vitro autoradiographical localization of Angiotensin converting enzyme in sarcoid
lymph nodes
Chest 1986; 90 (3): 315
6. Allen, R.K.
A review of Angiotensin-converting Enzyme in health and disease
Sarcoidosis 1991; 8 (2): 95
7. Arnal, J.F., Battle, T., Rasetti, C., Challah, M., Costerousse, O., Vicaut, E.,
Michel, J.B., Alhenc-Gelas, F.
ACE in three tunics of rat aorta: expression in smooth muscle and effect of
renovascular hypertension
Am. J. Physiol. 1994; 267: H1777
8. Braam, B., Mitchell, K.D., Fox, J., Navar, L.G.
Proximal tubular secretion of angiotensin II in rats
Am.J.Physiol. 1993; 264: F891
9. Beneteau-Burnat, B., Baudin, B.
Angiotensin Converting-Enzyme: Clinical Applications and Laboratory Investigations
on Serum and Other Biological Fluids
Crit.Rev.Clin.Lab.Sci. 1991, 2885: 337

10. Brice, E.A., Friedlander, W., Bateman, E.D., Kirsch, R.E.
Serum Angiotensin-Converting Enzyme Activity, Concentration and Specific Activity in Granulomatous Interstitial Lung Disease, Tuberculosis and COPD
Chest 1995; 107:706
11. Bruneval, P., Hinglais, N., Alhenc-Gelas, F., Tricottet, V., Corvol, P., Menard, J., Camilleri, J. P.
Angiotensin I converting enzyme in human intestine and kidney
Histochem. 1986; 85: 73
12. Caldwell, P.R., Seegal, B.C., Hsu, K.C.
Angiotensin-Converting Enzyme: Vascular endothelial localization
Science 1976; 191: 1050
13. Cambien, F., Alhenc-Gelas, F., Herberth, B., Andre, J.L., Rakotovo, R., Gonzales, M.F., Allegrini, J., Bloch, C.
Familial resemblance of plasma angiotensin I-converting enzyme level: the NANCY study
Am.J. Hum.Gen. 1988; 43: 774
14. Campbell, D.
The site of angiotensin production
J. Hypertens. 1985; 3: 199
15. Chen, X., Tzanela, M., Baumgartner, M.K., McCormick, J.R., Catravas, J.D.
PMA-activated neutrophils decrease ectoenzyme activities in rabbit aortic endothelial cells in culture
Am. J. Physiol. 1992; 263 (6 Pt 1): L 657
16. Chen, X.L., Tummala, P.E., Olbrych, M.T., Alexander, R.W., Medford, R.M.
Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells
Circulation Research 1998; 83 (9): 952
17. Conroy, J.M., Hartley, J.L., Soffer, R.L.
Canine pulmonary angiotensin-converting enzyme physicochemical, catalytic and immunological properties
Biochim. Biophys. Acta 1978; 524: 403
18. Cordell, J.L., Falini, B., Erber, W.N., Ghosh, A.K., Abdulaziz, Z., MacDonald, S., Pulford, K.A., Stein, H., Mason, D.Y.
Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes)
J. Histochem. Cytochem. 1984; 32: 219
19. Costabel, U., Teschler, H.
Biochemical changes in Sarcoidosis
Clin. chest med. 1997; 18: 827

20. Costerousse, O., Allegrini, J., Lopez, M., Alhenc-Gelas, F.
Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes
Biochem. J. 1993; 290: 33
21. Cushman, D.W., Cheung, H.S.
Concentrations of Angiotensin-converting Enzyme in tissues of the rat
Biochim. Biophys. Acta 1971; 250: 261
22. Dahme, E., Weiss, E.
Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere
Enke, 1988, 79
23. Danilov, S.M., Allikmets, E.Y., Sakharov, I.Y., Dukhania, E.A., Trakht, I.N.
Monoclonal antibody to human lung angiotensin-converting enzyme
Biotechnol. Appl. Biochem. 1987; 9: 319
24. Danilov, S., Jaspard, E., Churakova, T., Towbin, H., Savoie, F., Wie, L., Alhenc-Gelas, F.
Structure-function analysis of Angiotensin I-converting Enzyme using Monoclonal antibodies
J. Biol. Chem. 1994; 269: 26806
25. Danilov, S., Savoie, F., Lenoir, B., Jeunemaitre, X., Azizi, M., Tarnow, L., Alhenc-Gelas, F.
Development of enzyme-linked immunoassays for human angiotensin I converting enzyme suitable for large-scale studies
J. Hypertens. 1996; 14: 719
26. Danilov, S.M., Franke, F.E., Erdös, E.G.
CD 143 (angiotensin-converting enzyme) workshop panel report
Leukocyte typing VI, Garland Publishing N.Y. 1997; 746
27. Dannenberg, A.M., Jr.
Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis
Rev. Infect. Dis. 1989; 11: 369
28. Dannenberg, A.M., Jr.
Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis
Immunol. Today 1991; 12: 228
29. Danser, A.H., Admiraal, P.J., Derkx, F.H., Schalekamp, M.A.
Angiotensin I-to-II conversion in the human renal vascular bed
J. Hypertens. 1998; 16: 2051
30. Dasarthy, Y.
Stimulation of bovine pulmonary artery endothelial cell ACE by dexamethasone: involvement of steroid receptors
Am. J. Physiol. 1992; 263: L645

31. Derouin, F.
Pathogeny and immunological control of toxoplasmosis
Braz. J. Med. Biol. Res. 1992; 25: 1163
32. Diet, F., Pratt, R.E., Berry, G.J., Momose, N., Gibbons, G.H., Dzau, V.J.
Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease
Circulation 1988; 77:1
33. Dubey, J.P., Speer, C.A., Shen, S.K., Kwok, O.C.H., Blixt, J.A.
Oocyst- induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed toxoplasma gondii oocysts
J. Parasit. 1997; 83 (5): 870
34. Dunlap, N.E., Briles, D.E.
Immunology of Tuberculosis
Med. Clin. North Am. 1993; 77 (6):1235
35. Dzau, V. J.
Vascular wall renin-angiotensin pathway in control of the circulation
Am. J. Med. 1984;77: 31
36. Dzau, V.J.
Circulation versus local renin-angiotensin systems in cardiovascular homeostasis
Circulation 1988; 77:1
37. Ehlers, M.R.W., Riordan, J.F.
Angiotensin- Converting Enzyme: New concepts concerning it's biological role
Biochem. 1989; 28: 5311
38. Erdös, E.G., Skidgel, R.A.
The angiotensin I-converting enzyme
Lab. Invest. 1987; 56: 345
39. Erdös, E.G.
Editorial: The Angiotensin I-Converting Enzyme
Lab. Invest. 1987; 56: 345
40. Erdös, E.G.
Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years
Hypertension 1990; 16: 363
41. Fishel, R.S., Eisenberg, S., Shai, S.Y., Redden, R.A., Bernstein, K.E., Berk, B.C.
Glucocorticoids induce angiotensin converting enzyme expression in vascular smooth muscle
Hypertension 1995; 25: 343

42. Flory, C.M., Jones, M.L., Miller, B.F., Warren, J.S.
Regulatory roles of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in monocyte chemoattractant protein-1-mediated pulmonary granuloma formation in the rat
Am. J. Pathol. 1995; 146 (2): 450
43. Franke, F.E., Reuter, S.S., Metzger, R., Schindler, C., Towbin, H., Danilov, S.M., Bohle, R.M.
Angiotensin-I-Converting Enzyme in the human body
Path. Res. Pract. 1995; 191: 667
44. Franke, F.E., Metzger, R., Bohle, R.M., Kerkman, L., Danilov, S.M.
Angiotensin-I-Converting Enzyme (CD143) on endothelial cells in normal and in pathological conditions.
In Leucocyte Typing VI, edited by Kishimoto Teal, New York, Garland Publishing Inc., 1997
45. Frenkel, J.K.
Pathophysiology of toxoplasmosis
Parasitol. Today 1988; 4 (10): 273
46. Friedland, J., Setton, C., Silverstein, E.
Induction of angiotensin converting enzyme in human monocytes in culture
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1978; 83: 843
47. Friedland, J.S., Shattock, R.J., Griffin, G.E.
Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis or particulate stimuli by human monocytic cells induces equivalent monocyte chemotactic protein-1 gene expression
Cytokine 1993; 5 (2): 150
48. Friedland, C.
Stimulation und oxidative Inaktivierung von endothelalem Angiotensin I-Converting Enzyme (CD143) Justus-Liebig-Universität Gießen, 2000, Dissertation eingereicht
49. Gilbert, S., Steinbrech, D.S., Landas, S.K., Hunninghake, G.W.
Amounts of Angiotensin Converting-Enzyme mRNA reflect the burden of granulomas in granulomatous lung disease
Am. Rev.-Respir.-Dis. 1993; 148: 483
50. Grange, J.M., Mitchell, D.N., Kemp, M., Kardjito, T.
Serum Angiotensin-Converting Enzyme and delayed hypersensitivity in pulmonary tuberculosis
Tubercle 1984; 65 (2): 117
51. Hall, E.R., Kato, J., Erdös, E.G., Robinson, C.J.G., Oshima, G.
Angiotensin I-converting enzyme in the nephron
Life Sciences 1976; 18: 1299
52. Harris, R., Wilson, I.
Comparison of hydrolysis of atriopeptin II standard in substrate by atrial dipeptidyl carboxyhydrolase and angiotensin I-converting enzyme
Int. J. Pept. Prot. Res. 1985; 26: 78

53. Hartung, W.
Lungentuberkulose, in W.Remmele, Pathologie, Band 3,
Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1997; 660
54. Hashimoto, S., Nakayama, T., Gon, Y., Hata, N., Koura, T., Maruoka, S.,
Matsumoto, K., Hayashi, S., Abe, Y., Horie, T.
Correlation of plasma monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and monocyte
inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha) levels with disease activity and clinical
course of sarcoidosis
Clin. Exp. Immunol. 1998; 111 (3): 604
55. HernandezPresa, M., Bustos, C., Ortego, M., Tunon, J., Renedo, G.,
RuizOrtega, M., Egido, J.
Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor kappa B
activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage
infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis
Circulation 1997; 95 (6): 1532
56. Hinman, L.M., Stevens, C., Matthay, R.A., Gee, J. B.L.
Angiotensin Convertase activities in human alveolar macrophages: effects of
cigarette smoking and Sarcoidosis
Science 1979; 205: 202
57. Hiwada, K., Inoue, Y., Takada, Y., Hashimoto, A., Akutsu, H., Kitatani, F.,
Kokubu, T.
Direct Radioimmunoassay of Angiotensin-Converting Enzyme in sera from patients
with pulmonary diseases
Lung 1987; 165: 27
58. Hooper, N., Keen, J., Pappin, D.J.C., Turner, A.J.
Purification and characterization of amphipathic and hydrophilic forms of the enzyme
establishes c-terminal anchorage to the plasma membrane
Biochem. J. 1987; 247: 85
59. Hooper, N.M., Turner, A.J.
Isolation of two differentially glycosylated forms of peptidyl-dipeptidase (angiotensin
converting enzyme) from pig brain: a re-evaluation of their role in neuropeptide
metabolism
Biochem. J. 1987; 241:625
60. Hooper, N.M., Karran, E.H., Turner, A.J.
Membrane protein secretases
Biochem. J. 1997; 321: 265
61. Hubert, C., Houot, A.-M., Corvol, P., Soubrier, F.
Structure of the Angiotensin I- Converting Enzyme Gene
J. Biol. Chem. 1991; 266: 14377

62. Iyonaga, K., Suga, M., Ichiyasu, H., Yamamoto, T., Hiraga, Y., Ando, M.
Measurement of serum monocyte chemoattractant protein-1 and its clinical application for estimating the activity of granuloma formation in sarcoidosis
Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases 1998; 15 (2): 165
63. Johnson, A.R., Schulz, W.W., Noguiera, L.A., Erdös, E.G.
Kinins and angiotensins. Angiotensin I converting enzyme (kininase II) in endothelial cells cultured from human pulmonary arteries and veins
Clin. Exp. Hypertens. 1980; 2: 659
64. Johnson, M., Malvin, R.
Stimulation of renal sodium reabsorption by angiotensin II
Am. J. Physiol. 1977; 232: F298
65. Johnston, C.I.
Renin-angiotensin system: a dual tissue and hormonal system for cardiovascular control
J. Hypertens. Suppl. 1992; 1087: 13
66. Katz, P., Fauci, A.S., Yeager, H., Reen, B.M.
Serum angiotensin-converting enzyme and lysozyme in granulomatous diseases of unknown cause
Ann. Intern. Med. 1994; 359
67. Kumar, R.S., Thekkumkara, T.J., Sen, G.C.
The mRNAs encoding the two Angiotensin Converting Isozymes are transcribed from the same gene by a tissue-specific choice of alternative transcription initiation sites
J. Biol. Chem. 1991; 266: 3854-3862
68. Kumar, R. S., West, D.C., Ager, A.
Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels
Differentiation 1987; 36 (1):57
69. Kunkel, S.L., Lukacs, N.W., Strieter, R.M., Chensue, S.W.
Animal models of granulomatous inflammation
Sem. Respir. Inf. 1998; 13 (3): 221
70. Lenfant, M., Wdzieczak, B.J., Guittet, E., Prome, J.C., Scotty, D., Frindel, E.
Inhibitor of hematopoietic pluripotent stem cell proliferation: Purification and determination of its structure
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 86: 779
71. Leonard, E.J., Yoshimura, T.
Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)
Immunol. Today 1990; 11 (3): 97
72. Liebermann, J.
Elevation of Serum Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) level in Sarcoidosis
Am. J. Med. 1975; 59: 365

73. Liebermann, J., Rea, Th.
Serum angiotensin-converting enzyme in leprosy and coccidiomycosis
Ann. Intern. Med. 1977; 87: 423
74. Mayr, K., Aspöck, G., Mayer, K.H., Waibel, K., Leitner, L.
Das Angiotensin-Converting-Enzym bei Lungenerkrankungen
Wiener Med. Wochenschr. 1985, 135 (5): 109
75. Marchetti, J., Roseau, S., Alhenc-Gelas, F.
Angiotensin I converting enzyme and kinin-hydrolyzing enzymes along the rabbit nephron
Kidney Intern. 1987; 31: 744-
76. Metzger, R., Bohle, R.M., Pauls, K., Eichner, G., Alhenc-Gelas, F., Danilov, S.M., Franke, F.E.
Angiotensin-converting enzyme in non-neoplastic kidney diseases
Kidney Intern. 1999; 56: 1442
77. Metzger, R., Bohle, R.M., Chumachenko, P., Danilov, S.M., Franke, F.E.
CD 143 in the development of atherosclerosis
Atherosclerosis 2000; 150: 21
78. Miyazaki, M., Okunishi, H., Nishimura, K., Toda, N.
Vascular angiotensin-converting enzyme activity in man and other species
Clin. Science 1984; 66: 39
79. Mounier, F., Hinglais, N., Sich, M.
Ontogenesis of angiotensin I converting enzyme in human kidney
Kidney Intern. 1987; 32: 684
80. Müller-Hermelink, H.K., Kaiserling, E.
Epitheloidzellreaktion im lymphatischen Gewebe
Verh.-Dtsch.-Ges.-Pathol. 1980; 64: 77
81. Müller-Hermelink, H.,
Granulome und Granulomatosen
Begleittext zur Lehrserie 28, IAP Bonn
82. Müller-Quernheim, J.
Prognose der Sarkoidose
Vers.med. 1995; 47: 216
83. Nagai, S.
Pulmonary Sarcoidosis: Pathogenesis and Population differences
Int Med 1995; 34: 833
84. Nagai, S., Izumi, T.
Pulmonary Sarcoidosis: Population Differences and Pathophysiology
South-Med.-J. 1995; 88: 1001

85. Norton, A. J.
Microwave oven heating for antigen unmasking in routinely processed tissue sections
J. Pathol. 1993; 171: 79
86. O'Connor, C.M., FitzGerald, M.X.,
Speculations on Sarcoidosis
Respir. Med. 1992; 86: 277
87. Oppong, S.Y., Hooper, N.M.
Characterization of a secretase activity which releases Angiotensin-converting enzyme from the membrane
Biochem. J. 1993; 292: 597
88. Page, C., Rose, M., Yacoub, M., Pigott, R.
Antigenic heterogeneity of vascular endothelium
Am. J. Pathol. 1992; 141: 673
89. Pauls, K., Fink, L., Franke, F.E.
Angiotensin-converting enzyme (CD143) in neoplastic germ cells
Lab. Invest. 1999; 79: 1425
90. Perez-Arellano, J.L., Barrios, M.N., Martin, T., Sanchez, M.L., Jimenez, A., Gonzalez-Buitrago, J.M.
Hydrolytic enzyme of the alveolar macrophage in diffuse pulmonary interstitial disease
Respir. Med. 1996, 90: 159
91. Pertschuk, L.P., Silverstein, E., Friedland, J.
Immunohistologic diagnosis of Sarcoidosis
Am. J. Clin. Pathol. 1981; 75: 350
92. Puryear, D.W., Fowler, A.A.
Sarcoidosis: A clinical overview
Comp. Therapy 1996, 22 (10): 649
93. Radow, S.K., Nachamkin, I., Morrow, C., Fairman, R.P., Fratkin, M., Rodriguez, G.E., Glauser, F.L.
Foreign Body Granulomatosis
Am. Rev. Respir. Dis. 1983; 127: 575
94. Risau, W.
Differentiation of endothelium
FASEB J. 1995; 9: 926
95. Romer, F.K.
Angiotensin-converting enzyme activity in sarcoidosis and other disorders
Sarcoidosis 1985; 2: 25
96. Rosen, Y., Vuletin, J.C., Pertschuk, L.P., Silverstein, E.
Sarcoidosis
Pathol. Ann. 1979; 405

97. Rosenstein, E.D., Eskow, R.N., Ledermann, D.A., Kramer, N.
Case report: Langerhans cell histiocytosis associated with elevation of angiotensin-converting enzyme levels
Am. J. Med. Sci. 1995; 310: 65
98. Ryan, J.W., Ryan, U.S., Schultz, D.R., Whitaker, C., Chung, A.
Subcellular localization of pulmonary Angiotensin-converting Enzyme (Kininase II)
Biochem. J. 1975; 146: 497
99. Schrier, D.J., Ripansi, L.M., Katzenstein, A.L., Moore, V.L.
Role of angiotensin-converting enzyme levels in bacille calmette-guerin-induced granulomatous inflammation
J. Clin. Invest. 1982; 69: 651
100. Scott, D.
Large animals dermatology,
Philadelphia, W.B. Saunders Co 1988; 326
101. Shi, S-R., Key, M.E., Kalra, K.L.
Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections
J. Histochem. Cytochem. 1991; 39: 741
102. Shorr, A.F., Torrington, K.G., Parker, J.M.
Serum angiotensin converting enzyme does not correlate with radiographic stage at initial diagnosis of sarcoidosis
Respir. Med. 1997; 91: 399
103. Sifford, M., Bates, J.H.
Host determinants of susceptibility to Mycobacterium tuberculosis
Semin. Respir. Inf. 1991; 6: 44
104. Silverstein, E., Friedland, J., Lyons, H.A., Gourin, A.
Markedly elevated Angiotensin-Converting Enzyme in lymph nodes containing non-necrotizing granulomas in Sarcoidosis
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1976; 73: 2137
105. Silverstein, E.
Pathogenesis of sarcoidosis: An hypothetical model
Med. Hyp. 1976; 2: 75
106. Silverstein, E., Friedland, J., Ackermann, T.
Elevation of granulomatous lymph-node and serum lysozyme in sarcoidosis and correlation with angiotensin-converting enzyme
Am. J. Clin. Path. 1977; 68: 219
107. Silverstein, E., Pertschuk, L.P., Friedland, J., Kim, D.S., Rosen, Y., Onur, N.
Evidence for the localization of angiotensin converting enzyme in sarcoidosis granulomas: immunofluorescent detection of angiotensin II
Clin. Res. 1978; 26: 454A

108. Silverstein, E., Pertschuk, L., Friedland, J.
Immunofluorescent localization of angiotensin converting enzyme in epithelioid and giant cells of sarcoidosis granulomas
Proc. Natl. Acad. Sci. 1979; 76 (12): 6646
109. Skeggs, L., Marsh, W., Kahn, J., Shumway, N.
The preparation and function of the Hypertensin-converting Enzyme
J. Exp. Med. 1956; 103: 295
110. Skidgel, R., Engelbrecht, S., Johnson, A., Erdös, E.
Hydrolysis of Substance P and Neurotensin by Converting Enzyme and Neutral Endopeptidase
Peptides 1984; 5: 769
111. Soejima, H., Ogawa, H., Yasue, H., Kaikita, K., Takazoe, K., Nishiyama, K., Misumi, K., Miyamoto, S., Yoshimura, M., Kugiyama, K., Nakamura, S., Tsuyi, I.
Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces monocyte chemoattractant protein-1 and tissue factor levels in patients with myocardial infarction
J. of the American College of Cardiology 1999; 34 (4): 983
112. Soubrier, F., Alhenc-Gelas, F., Hubert, C., Allegrini, J., John, M., Tregear, G., Corvol, P.
Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning
Proc. Nat. Acad. Sci 1988; 85: 9386
113. Strittmatter, S., Thiele, E., Kapiloff, M., Snyder, S.
A rat brain isozyme of angiotensin-converting enzyme. Unique specificity for amidated peptide substrates
J Biol.Chem. 1985; 260: 9825
114. Strittmatter, S., Snyder, S.
Angiotensin converting enzyme immunohistochemistry in rat brain and pituitary gland: correlation of isozyme type with cellular localization
Neuroscience 1987; 21 (2): 407
115. Sumuyen, M.H., Garin, Y.J., Derouin, F.
Early kinetics of Toxoplasma gondii infection in mice infected orally with cysts of an avirulent strain
J. Parasitol 1995; 81 (2): 327
116. Swisher, C.N., Boyer, K., McLeod, R.
Congenital Toxoplasmosis
Semin. Ped. Neurol. 1994; 1 (1): 4
117. Takada, Y., Unno, M., Hiwada, K., Kokubu, T.
Biochemical and immunological studies of angiotensin converting enzymes from human, bovine, dog, hog, rabbit, rat and sheep kidneys.
Comp. Biochem. Physiol. 1982; 73 (2): 189

118. Takada, Y., Hiwada, K., Akutsu, H., Hashimoto, A., Kokubu, T.
The immunocytochemical detection of angiotensin-converting enzyme in alveolar macrophages from patients with sarcoidosis
Lung 1984; 162: 317
119. Tarnow, L., Cambien, F., Rossing, P., Nielsen, F.S., Hansen, B.V., Leclerc, L., Poirier, O., Danilov, S., Parving, H.H.
Lack of relationship between an insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene and diabetic nephropathy and proliferative retinopathy in IDDM patients
Diabetes 1995; 44: 489
120. Taugner, R., Ganten, D.
The localization of Converting enzyme in kidney vessels of the rat
Histochem. 1982; 75: 191
121. Thomas, P.D., Hunninghake, G.W.
Current concepts of the pathogenesis of Sarcoidosis
Am. Rev. Respir. Dis. 1987; 135: 747
122. Unger, T., Gohlke, P.
Converting enzyme inhibitors in cardiovascular therapy: current status and future potential
Cardiovasc. Res. 1994; 28:146
123. Vane, J.R.
The release and fate of vasoactive hormones in the circulation
Br. J. Pharmacol. 1969; 35: 209
124. Villard, E., Alonso, A., Agrapart, M., Challah, M., Soubrier, F.
Induction of angiotensin I-converting enzyme transcription by a protein kinase C-dependent mechanism in human endothelial cells
J. Biol. Chem. 1998; 273: 25191
125. Wei, L., Alhenc-Gelas, F., Soubrier, F., Michaud, A., Corvol, P., Clauser, E.
Expression and characterization of recombinant human angiotensin I-converting enzyme
J. Biol. Chem. 1991; 266 (9): 5540
126. Weinstock, J.V., Boros, D.L.
Alteration of the granulomatous response in murine schistosomiasis by the chronic administration of captopril, an inhibitor of angiotensin-converting enzyme
Gastroenterol. 1981; 81: 953
127. Weinstock, J.V., Boros, D.L.
Alteration of granuloma angiotensin I-converting enzyme activity by regulatory T-lymphocytes in murine schistosomiasis
Inf. and Immun. 1982; 465

128. Weinstock, J., Kassab, J.
Angiotensin II stimulation of granuloma macrophage phagocytosis and actin polymerization in murine schistosomiasis mansoni
Cell. Immunol. 1984; 89: 46
129. Weinstock, J.V.
The significance of Angiotensin I Converting Enzyme in granulomatous inflammation
Sarcoidosis 1986; 3: 19
130. Weinstock, J.V.
Angiotensin II is chemotactic for a T-cell subset which can express migration inhibition factor activity in murine schistosomiasis mansoni
Cell. Immunol. 1987; 107 (1): 180
131. Yang, H.Y.T., Erdös, E.G., Levin, Y.
A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin
Biochim. Biophys. Acta 1970; 214: 374

8 Anhang

8.1 Ansätze der Gebrauchslösungen

8.1.1 Tris-Waschpuffer

Stammlösung (Ansatz für 20 l Gebrauchslösung)

Tris-Base	18 g
Tris-HCL	137 g
NaCl	175,5 g
Aqua demin.	2,5 l

Der pH-Wert der Stammlösung wurde zwischen 7,4 und 7,6 eingestellt, was gegebenenfalls durch Zugabe von NaOH bzw HCL erfolgte. Die Stammlösung wurde in einen Kanister gefüllt und mit Aqua demin. auf 20 l verdünnt.

8.1.2 RPMI

RPMI-Konzentrat	50 ml
Aqua demin.	450 ml
Inaktiviertes Rinderserum	50 ml
Natriumacid	0.5 g

Der pH-Wert des Ansatzes wurde zwischen 7,4 und 7,6 eingestellt, woraus ein Farbumschlag von gelb nach rot resultierte. Die RPMI-Lösung wurde bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

8.1.3 Entwicklungspuffer

NaCL	87 g
Tris-HCL	15 g
Tris-Base	49 g
Aqua demin.	1750 ml

Die Lösung wurde in einer dunklen Flasche bei Raumtemperatur aufbewahrt.

8.1.4 Propandiol

Propandiol	21 g
Aqua demin.	1000 ml

Die Lösung wurde in einer dunklen Flasche bei +4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

8.1.5 Neufuchsin

Neufuchsin 5 g

HCL (2N) 100 ml

Die Lösung wurde in einer dunklen Flasche bei +4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

8.1.6 Citratpuffer

Stammlösung A:	0,1M Zitronensäure	21,01 g
----------------	--------------------	---------

	Aqua demin.	1000 ml
--	-------------	---------

Stammlösung B:	Natriumcitrat	29,41 g
----------------	---------------	---------

	Aqua demin.	1000 ml
--	-------------	---------

Die Stammlösungen wurden bei +4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Kurz vor Verwendung des Citratpuffers wurden 9 ml von Stammlösung A und 41 ml von Stammlösung B mit 450 ml Aqua demin. auf 500 ml aufgefüllt.

8.1.7 Hämalalaun

Hämatoxylin 1g

NaJO₃ 0,2 g

Kalialaun 50 g

Aqua demin. 1000 ml

Chloralhydrat 50 g

Zitronensäure 1g

Die Lösung wurde in einer dunklen Flasche bei Raumtemperatur gelagert.

8.1.8 Eosin

Stammlösung (10 g Eosin in 1 l 96% igem Alkohol) 100 ml

70 %iger Alkohol 100 ml

100%ige Essigsäure 120 µl

8.1.9 Entwicklerlösung

Küvettenzahl		1	2	3	4	5	6	7	8
Entwicklungspuffer	[ml]	35	70	105	140	175	210	245	280
Propandiol	[ml]	12,5	25	37,5	50	62,5	75	87,5	100
Laevamisol	[mg]	20	40	60	80	100	120	140	160
Natriumnitrit	[mg]	10	20	30	40	50	60	70	80
Aqua dest	[ml]	250	500	750	1000	1250	1500	1750	2000
Naphtol	[mg]	25	50	75	100	125	150	175	200
Dimethylformamid	[ml]	300	600	900	1200	1500	1800	2100	2400
Neufuchsin	[ml]	100	200	300	400	500	600	700	800

Tabelle 13: Zusammensetzung der Entwicklerlösung

Entwicklungspuffer und Propandiol wurden im Meßzylinder abgemessen, in ein Becherglas zusammengegeben und mit NaOH bzw. HCL der pH-Wert 9,75 eingestellt. Daraufhin wurde die benötigte Menge Laevamisol abgewogen und der Entwicklungspuffer-Propandiol-Lösung hinzugefügt (Lösung I).

Natriumnitrit wurde in einem Glasfläschchen separat abgewogen und in der entsprechenden Menge Aqua demin. aufgelöst (Lösung II).

Naphthol-AS-Bisphosphat wurde ebenfalls in einem Glasfläschchen separat abgewogen und dann in der entsprechenden Menge Dimethylformamid aufgelöst (Lösung III). Die Lösung muß eine klare gelbe Farbe haben.

Dann wurde die benötigte Menge Neufuchsin in die Lösung II pipettiert und die Lösung 1-2 Minuten stehengelassen.

Daraufhin wurde zuerst die Lösung II und danach die Lösung III der Lösung I zugegeben. Nach dem Einstellen des pH-Wertes auf 8,8 wurde die Lösung filtriert.

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswertungskriterien der analysierten Gewebeproben granulomatöser Entzündungen.	21
Tabelle 2: Sarkoidose, Korrelationsanalyse morphologischer vs. morphologischer Kriterien.	26
Tabelle 3: Sarkoidose: Korrelationsanalyse der ACE (CD143)-Expression vs. morphologischer Kriterien.	28
Tabelle 4: Sarkoidose: Korrelationsanalyse ACE (CD143)-exprimierender Zellformen untereinander.	30
Tabelle 5: Tuberkulose, Korrelationsanalyse morphologischer Kriterien vs. morphologischer Kriterien.	35
Tabelle 6: Tuberkulose, Korrelationsanalyse der ACE (CD143)-Expression vs. morphologischer Kriterien.	37
Tabelle 7: Tuberkulose, Korrelationsanalyse ACE (CD143)-exprimierender Zellformen untereinander.	39
Tabelle 8: Toxoplasmose, Korrelationsanalyse morphologischer vs. morphologischer Kriterien.	43
Tabelle 9: Toxoplasmose, Korrelationsanalyse der ACE (CD143)-Expression vs. morphologischer Kriterien.	45
Tabelle 10: Toxoplasmose, Korrelationsanalyse ACE (CD143)-exprimierender Zellformen untereinander.	47
Tabelle 11: Immunreaktivität humaner anti-CD143, anti-CD31 und anti-CD68 mAk in verschiedenen Tierarten.	59
Tabelle 12: Endotheliales ACE (CD143) im Gefäßsystem von Leber, Lunge und Niere.	62
Tabelle 13: Zusammensetzung der Entwicklerlösung	106

8.3 *Abbildungsverzeichnis*

- Abb. 1: Expression von ACE (CD 143) (A-F) in der Sarkoidose des Menschen im Vergleich zum Endothelmarker PECAM-1 (CD 31) (G) und Makrophagenmarker KP1 (CD 68) (H). 31
- Abb. 2: ACE (CD143) (A-F) in der Tuberkulose des Menschen im Vergleich zum Endothelmarker PECAM-1 (CD31) (G) und zum Makrophagenmarker KP1 (CD68) (H). Lymphatisches Gewebe (A-H). 40
- Abb. 3: ACE (CD143) (A und B) in der Toxoplasmose des Menschen im Vergleich zum Endothelmarker PECAM-1 (CD31) (C) und zum Makrophagenmarker KP1 (CD 68) (D). ACE (CD 143) (E-H) in Fremdkörperreaktionen unterschiedlicher Ätiologie des Menschen. 48
- Abb. 4: ACE (CD 143) in Sonderformen granulomatöser Entzündungen des Menschen. 56
- Abb. 5: ACE (CD143) im Gefäßsystem verschiedener Tierarten sowie vergleichend dazu Immunfärbungen mit dem Endothelmarker PECAM-1 (CD 31). 63
- Abb. 6: ACE (CD 143) im Gefäßsystem des Hundes: heterogene Verteilung. Immunreaktion des anti-ACE mAk CG2 (A-H). 65
- Abb. 7: Endotheliales ACE (CD 143) im Gefäßsystem von Feliden (Katze und Löwe). Immunreaktion des anti-ACE mAk CG2. 67
- Abb. 8: ACE (CD 143) in aktivierten Makrophagen und bei unterschiedlichen granulomatösen Entzündungen verschiedener Tierarten. Immunreaktion des anti-ACE mAk CG2. 70
- Abb. 9: ACE (CD 143) in aktivierten Makrophagen und bei unterschiedlichen granulomatösen Entzündungen verschiedener Tierarten. (Anti-ACE mAk CG2). 72

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. A. Schulz für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung von Mitteln zur Durchführung dieser Promotion.

Herrn Dr. F. E. Franke für die Betreuung dieser Arbeit und seine unermüdliche Unterstützung sowie seine große Hilfe bei der Erstellung der Photodokumentationen.

Herrn Prof. Dr. E. Burkhardt für die Mitbetreuung dieser Arbeit und seine Hilfestellung für den veterinärmedizinischen Teil dieser Promotion sowie für die Zurverfügungstellung des veterinärmedizinischen Materials.

Herrn Prof. Dr. K. Metze und **Herrn Prof. Dr. Velcovsky** für ihre freundliche Unterstützung mit Untersuchungsmaterial und Hilfestellung bei der Auswahl diagnostisch geeigneter Patientenfälle.

Herrn S.M. Danilov, MD, PhD, UCI Chicago, für die Zurverfügungstellung von Antikörpern.

Herrn Dr. E. Eichner für die Betreuung der statistischen Analysen.

Frau S. Mohr-Vogeltanz für die Unterstützung bei der Literaturrecherche

Meinem Mann für Verständnis, Motivation und Kritik und nicht zuletzt für seine unermüdliche Hilfe bei Computerproblemen.

Meinen Eltern für die finanzielle Unterstützung des Studiums und dieser Arbeit aber auch für Aufmunterung und Verständnis.

Meinem Sohn Jonas für sein Lachen und die Freude die er mir macht, auch wenn er das Fortschreiten dieser Arbeit nicht nur gefördert hat.

Melanie Georg