

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Professor Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer)

**Nachweis und Funktion der Surfactantproteine A und D  
im Tränenapparat, der Augenoberfläche und der  
Tränenflüssigkeit des Menschen**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Christian Kindler  
geboren am 11.10.1976 in Halle/Saale

Betreuer: Professor Dr. med. Friedrich P. Paulsen

Gutachter:

1. Professor Dr. med. Friedrich P. Paulsen
2. Professor Dr. med. Matthias Ochs (Bern)

Verteidigung: 05.06.2009

Meinen Eltern gewidmet

## Referat

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll das Vorkommen und die funktionelle Bedeutung der Surfactantproteine A und D (SP-A und SP-D) im Tränensystem, an der Augenoberfläche und in der Tränenflüssigkeit des Menschen untersucht werden.

Aktuelle Studien haben ergeben, dass SP-A und SP-D auch außerhalb der Lunge vorkommen und immunmodulatorische Aufgaben übernehmen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden Untersuchungen mittels RT-PCR, Western Blot, Dot Blot und immunhistochemische Analysen an Tränendrüse, Tränenflüssigkeit, Konjunktiva, Cornea und ableitenden Tränenwegen sowie an Cornea- und Konjunktivaepithelzelllinien durchgeführt, um nähere Erkenntnisse über die Existenz von SP-A und SP-D und deren Funktion an der Augenoberfläche und im Tränenwegsystem zu gewinnen. Das Expressionsverhalten von SP-A und SP-D konnte durch Untersuchungen an pathologisch veränderten Gewebeproben sowie durch Zellkulturexperimente mit Hilfe der Real-time-PCR und Immunhistochemie qualitativ und quantitativ analysiert werden.

Die Ergebnisse bestätigen das Vorkommen von SP-A und SP-D in Tränendrüse, Konjunktiva, Cornea, ableitenden Tränenwegen und Tränenflüssigkeit. Durch Stimulation der humanen Cornea- und Konjunktivaepithelzelllinien mit Zytokinen und bakteriellen Bestandteilen konnte gezeigt werden, dass die Expressionsstärke von SP-A und SP-D beeinflussbar ist. Außerdem konnte durch Untersuchungen an pathologisch veränderten Gewebeproben von Cornea und ableitenden Tränenwegen der Nachweis erbracht werden, dass sich die Expressionsstärke bzw. das Verteilungsmuster der Surfactantproteine verändert.

Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass SP-A und SP-D im Rahmen der Immunabwehr der Augenoberfläche und des Tränensystems von Bedeutung sind und in der Ätiologie und Pathogenese verschiedener Augenerkrankungen eine Rolle spielen.

Kindler, Christian: Nachweis und Funktion der Surfactantproteine A und D (SP-A und SP-D) im Tränenapparat, der Augenoberfläche und der Tränenflüssigkeit des Menschen.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 77 Seiten, 2008

## Inhaltsverzeichnis

	Seite	
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	1
1.1	Schutzmechanismen des Auges	1
1.2	Surfactantproteine A und D	4
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	11
2.1	Eingesetzte Chemikalien und Materialien	11
2.1.1	Chemikalien	11
2.1.2	Kits und Enzyme	12
2.1.3	Gebrauchslösungen	14
2.1.4	Geräte	15
2.1.5	Allgemeine Materialien	16
2.1.6	Sterilisation von Lösungen und Geräten	17
2.1.7	Molekulargewichtsstandard	17
2.2	Art und Herkunft des verwendeten Probenmaterials	17
2.2.1	Gewebeproben	17
2.2.2	Zelllinien	18
2.2.3	Medien und Kultivierung	18
2.2.4	Stimulationsversuche	18
2.3	RNA-Isolierung	19
2.3.1	RNA-Isolierung aus Gewebeproben	19
2.3.2	RNA-Isolierung aus Zellen	20
2.4	DNase-Verdau	21
2.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	21
2.6	Reverse Transkription	22
2.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.8	Agarosegel-Elektrophorese	25
2.9	Quantitative Real-time-PCR	26
2.10	Proteinisolierung	28
2.10.1	Proteinisolierung aus Zellen	28
2.10.2	Proteinisolierung aus Gewebe	29
2.11	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	29

2.12	SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot-Analyse	30
2.13	Western Blot	31
2.14	Dot Blot	32
2.15	Immunhistochemie	33
2.15.1	Immunhistochemischer Nachweis eines Epitopes	34
2.16	Statistik	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>36</b>
3.1	Nachweis der Expression von SP-A und SP-D in Tränendrüse, Konjunktiva, Cornea und ableitenden Tränenwegen auf mRNA-Ebene	36
3.2	Nachweis auf Proteinebene	37
3.2.1	Western Blot	37
3.2.2	Dot Blot	39
3.2.3	Immunhistochemische Analyse	40
3.3	Analyse pathologischer Corneagewebeschnitte	43
3.4	Stimulierte Zellen aus der Corneaepithelzelllinie (HCE) und der Konjunktivaepithelzelllinie (IOBA-NHC)	47
3.4.1	Immunhistochemische Analyse der relativen Expression	47
3.4.2	Bestimmung der relativen Expression mittels Real-time-PCR	48
3.5	Beeinflussung der Expressionstärke von SP-A und SP-D in stenosierten ableitenden Tränenwegen (Dacryostenose)	50
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>52</b>
4.1	Lokalisation der Surfactantproteine A und D in Geweben der Augenoberfläche und des Tränensystems	52
4.2	Verteilungsmuster von SP-A und SP-D in pathologisch veränderten Gewebeschnitten der Cornea	55
4.3	Beeinflussung des Expressionsverhaltens durch Zytokine und Zellwandbestandteile	58
4.4	Expression von SP-A und SP-D in gesunden und pathologischen ableitenden Tränenwegen	60
4.5	Einflüsse der Surfactantproteine A und D auf Allergien und Unverträglichkeitsreaktionen	61

---

4.6	Regulation der Surfactant-Homöostase	62
4.7	Schlussfolgerungen	63
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>Thesen</b>	<b>75</b>
	Lebenslauf	
	Selbstständigkeitserklärung	
	Danksagung	

**Abkürzungs- und Symbolverzeichnis**

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AMP	antimikrobielles Peptid
APS	Ammoniumperoxidisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cornea
°C	Grad Celsius
cDNA	„copy“-Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylenamintetraacetat
FKS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HCE	humane corneale Epithelzelllinie
IFN	Interferon
IG	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IOBA	Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada
K	Konjunktiva
kDa	Kilodalton
L	Lunge
LPS	Lipopolysaccharid
mA	Milliamper
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

---

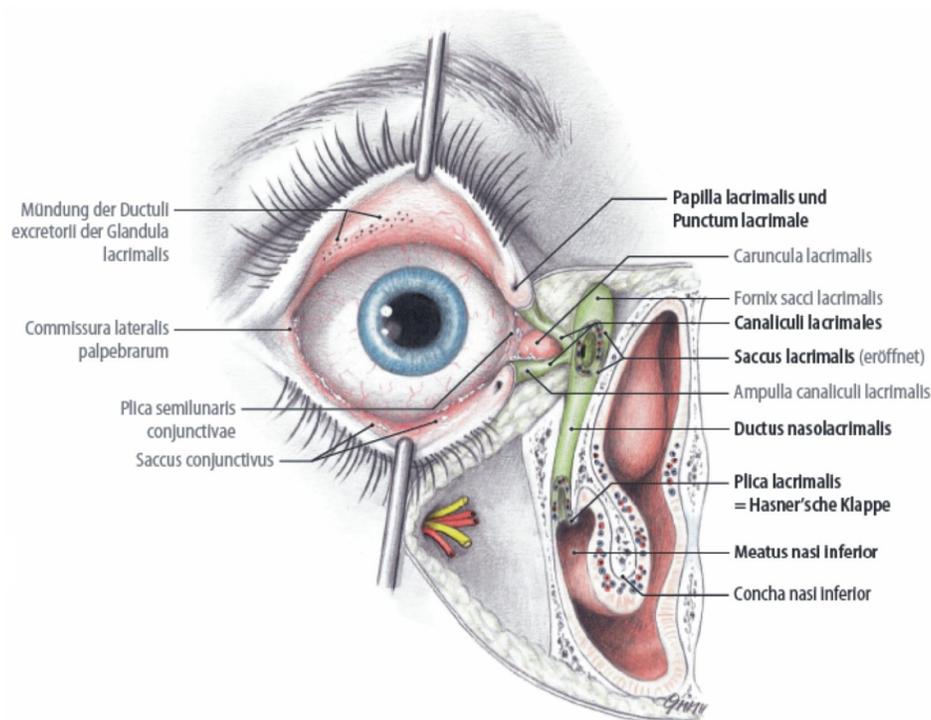
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minute
Mio	Millionen
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
ng	Nanogramm
NHC	normal human conjunctiva
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
OD	optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBS	posphatgepufferte Saline
PGN	Peptidoglycan
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Surfactantprotein
Tab.	Tabelle
TBS	trisgepufferte Saline
TD	Tränendrüse
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosfaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen

# 1 Einleitung

## 1.1 Schutzmechanismen des Auges

Das Auge ist jederzeit zahlreichen Umwelteinflüssen, Mikroorganismen und infektiösen Substanzen ausgesetzt. Dementsprechend existieren zum Schutz des Auges eine Vielzahl von Abwehrmechanismen. Die Lider, Wimpern und Augenbrauen schützen vor Umwelteinflüssen wie Licht, Wind, Staub und größeren Fremdkörpern. Auf der Augenoberfläche ist der Tränenfilm die entscheidende Schutzbarriere gegen Schadstoffe wie Mikroorganismen, Schimmel, Pollen, Staubkörnchen, tierische Epithelien und Fremdproteine sowie Verunreinigungen durch Schmutz und Sand. Ein funktionsfähiger, normaler Tränenfilm ist daher essentiell für den Schutz und die Funktion des Auges. Der präokuläre Tränenfilm, der von verschiedenen Augenangsstrukturen synthetisiert wird, ist ein komplexes Gemisch aus mehreren Komponenten wie Lipiden, Muzinen und einer wässrigen Komponente, in der eine Vielzahl von chemischen Verbindungen gelöst sind. Der größte Teil des Tränenfilms besteht aus der wässrigen Komponente, die zu 95 % aus dem orbitalen und palpebralen Teil der großen Tränendrüse (*Glandula lacrimalis*) stammt. Der Rest wird in den akzessorischen Tränendrüsen, die nach Krause und Wolfring benannt sind, gebildet. Die Krause-Drüsen sind vor allem im Bereich des Fornix conjunctivae superior lokalisiert. Die Wolfring-Drüsen dagegen liegen nahe dem Rand des oberen Tarsus. Die wässrige Komponente enthält außer Wasser Elektrolyte, zahlreiche Proteine, Oligopeptide und Glycopeptide (Van Haeringen 1981; Mircheff 1989). Zum Schutz vor rascher Verdunstung wird die wässrige Phase von einer Lipidschicht überzogen. Die oberflächliche Lipidkomponente wird von den Meibom-Drüsen im Tarsus der Augenlider gebildet und besteht u. a. aus Cholesterin und Triglyceriden (McCulley und Shine 2003; Sullivan et al. 2004). Die dritte Komponente des Tränenfilms umfasst sekretorische und membrangebundene Muzine. Sekretorische Muzine werden von den Becherzellen der Konjunktiva (MUC5AC) (Göke et al. 2004) sowie von der Tränendrüse (MUC5B, MUC7) (Jumblatt et al. 2003; Paulsen et al. 2004) gebildet und der wässrigen Komponente des Tränenfilms beigemischt. Membran-gebundene Muzine werden von den Epithelzellen der Konjunktiva und der Cornea synthetisiert (MUC1, MUC4, MUC16) (Gipson et al. 2004; Paulsen und Berry 2006; Paulsen 2006). Sie stellen die Verbindung zwischen der wässrigen

Komponente und den Epithelzellen her und sorgen so für die Fixierung des Tränenfilms an der Augenoberfläche. Der Lidschluss erneuert den Tränenfilm kontinuierlich und transportiert verbrauchte Tränenfilmsubstanzen in Richtung des nasalen Lidwinkels, an dem die ableitenden Tränenwege mit dem oberen und unteren Tränenpünktchen beginnen (*Punctum lacrimale*). Man nimmt an, dass Tränenflüssigkeit aufgrund der Kapillarkräfte durch das obere und untere Tränenkanälchen (*Canaliculi lacrimales*) in den Tränensack (*Saccus lacrimalis*) gesogen werden. Hierbei kommt der Pars lacrimalis des *Musculus orbicularis oculi* entscheidende Bedeutung zu. Der genaue Mechanismus ist allerdings nicht bekannt (Paulsen et al. 2003). Der Tränensack geht in den Tränennasengang über und mündet unterhalb der unteren Nasenmuschel in den unteren Nasengang (Abb. 1). Die Sekretion der Tränendrüse unterliegt einer neuronalen Kontrolle. Zusätzlich stimulieren Reflexe der Augenoberfläche, des Sehnervs und höhere Zentren im Gehirn die Flüssigkeitssekretion der Tränendrüse, so dass die Flussrate zwischen 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  und 100  $\mu\text{l}/\text{min}$  variieren kann. Das Volumen der Tränenflüssigkeit wird normalerweise mit 5 bis 7  $\mu\text{l}$  angegeben. Die durchschnittliche Umsatzrate liegt beim Menschen etwa bei 15 % pro Minute (ca. 1 ml pro 24 h, wobei die Tränenproduktion nachts fast gänzlich eingestellt wird (Dartt 1994).



**Abb. 1** Ableitende Tränenwege aus Atlas der Anatomie (Tillmann 2004)

Die Integrität der Augenoberfläche wird durch verschiedene Systeme gesichert, wobei die Tränenflüssigkeit vielfältige Aufgaben übernimmt. Sie ist für die Benetzung und Ernährung von Konjunktiva und Cornea verantwortlich und verhindert die Austrocknung beider Strukturen. Die Hornhaut ist intensiv innerviert, so dass die geringste Reizung, z. B. durch Staubpartikel, einen Reflex auslöst (Corneareflex), der zum Lidschlag und zur nachfolgenden Tränensekretion führt. Fremdkörper werden dadurch weggespült. Außerdem garantiert ein intakter Tränenfilm eine optimal lichtbrechende Augenoberfläche und ermöglicht das reibungsfreie Gleiten der Lider.

Cornea und Konjunktiva zeichnen sich durch charakteristische Epitheloberflächen aus, die ständig mit Bakterien, bakteriellen Bestandteilen und deren pathogen-assoziierten Molekülen (PAMs) sowie Viren in Kontakt kommen. Unter normalen Umständen führt nicht jeder Kontakt zu einer Infektion der Augenoberfläche, da zahlreiche Schutzmechanismen existieren. Verschiedene Untersuchungen an gesunder Konjunktiva belegen, dass verschiedene induzierbare antimikrobielle Peptide (AMP) scheinbar konstitutiv exprimiert werden (Cullor et al. 1990; Haynes 1999). Des Weiteren enthält die Tränenflüssigkeit eine Vielzahl von sezernierten Proteinen und Enzymen mit bakteriostatischer oder bakteriozider Wirkung, die so zum Schutz der Augenoberfläche beitragen. Dazu gehören u. a. Laktoferrin, Lysozym und Defensine. Laktoferrin wirkt durch Bindung des für Mikroorganismen essentiellen Eisens bakteriostatisch und bildet Komplexe mit Immunglobulinen. Angriffspunkt für Lysozym ist die glycosidische Bindung im Proteoglycangerüst bakterieller Zellwände, die durch enzymatische Spaltung zerstört wird. Neben dieser unspezifischen, angeborenen Immunantwort spielen auch spezifische Abwehrmechanismen eine Rolle. Innerhalb der Lamina propria der Konjunktiva kommen neben zahlreichen T-Lymphozyten auch andere Abwehrzellen vor, die oftmals in Form von Lymphfollikeln (Sekundärfollikel) angeordnet sein können. Auf Grund des organisierten lymphatischen Gewebes wird dieses, entsprechend der internationalen Terminologie, als CALT (conjunctiva-associated lymphoid tissue) bezeichnet (Osterlind 1944; Wotherspoon et al. 1994; Knop et al. 2005). Auch in den ableitenden Tränenwegen findet man vergleichbar organisierte Strukturen, die hier als TALT (tear duct-associated lymphoid tissue) bezeichnet werden (Paulsen et al. 2000).

Trotz der Abwehrmechanismen sind Patienten mit Augenoberflächeninfektionen sehr häufig in der augenärztlichen Praxis anzutreffen. Dabei ist eine Konjunktivitis mit Abstand die häufigste Erkrankung der Augenoberfläche. Auslöser sind meist Bakterien wie *Staphylokokkus aureus*, nichthämolyisierende Streptokokken der Gruppe A, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia trachomatis* aber auch Adeno- und Herpes-simplex-Viren und Pilze. Bakterielle und virale Metabolite sowie Entzündungsmediatoren führen dabei oft zu einem ausgedehnten Gewebeschaden mit dauerhafter Narbenbildung oder im schlimmsten Fall zum Visusverlust des betroffenen Auges (Baum 1995). Die zunehmende Resistenzbildung von Mikroorganismen gegenüber gebräuchlichen Antibiotika bildet den Hintergrund für die Erforschung verschiedener neuartiger antimikrobiell wirksamer Substanzen, die als mögliche Alternativen zur Infektionsbekämpfung in Betracht kommen. Aus der Lunge sind die Surfactantproteine A und D (SP-A und SP-D) als Proteine der unspezifischen Abwehr gut untersucht. In mehreren Arbeiten wurden SP-A und SP-D auch in Geweben außerhalb der Lunge nachgewiesen (Madsen et al. 2000; Stahlman 2002; Akiyama 2002; Leth-Larsen 2004). Hieraus ergibt sich die Frage nach der Expression und Produktion sowie ihrer potentiell funktionellen Rolle an der Augenoberfläche. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, das Vorkommen und die Regulation von SP-A und SP-D an der Augenoberfläche und im Tränensystem zu analysieren. Um die Thematik zu veranschaulichen, folgt ein Überblick über Surfactantproteine und deren funktionelle Bedeutung.

## 1.2 Surfactantproteine A und D

Surfactant wurde ursprünglich in der Lunge entdeckt und ist ein komplexes Gemisch aus Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten. Dabei machen die Lipide einen Anteil von 90 % und die Proteine von 8 % aus. Surfactant senkt die Oberflächenspannung an der Luft-Flüssigkeitsgrenze und verhindert somit das Kollabieren der Alveolen. Dies war über 70 Jahre die gängige Definition für Surfactant (Pattle 1955; Clements 1957).

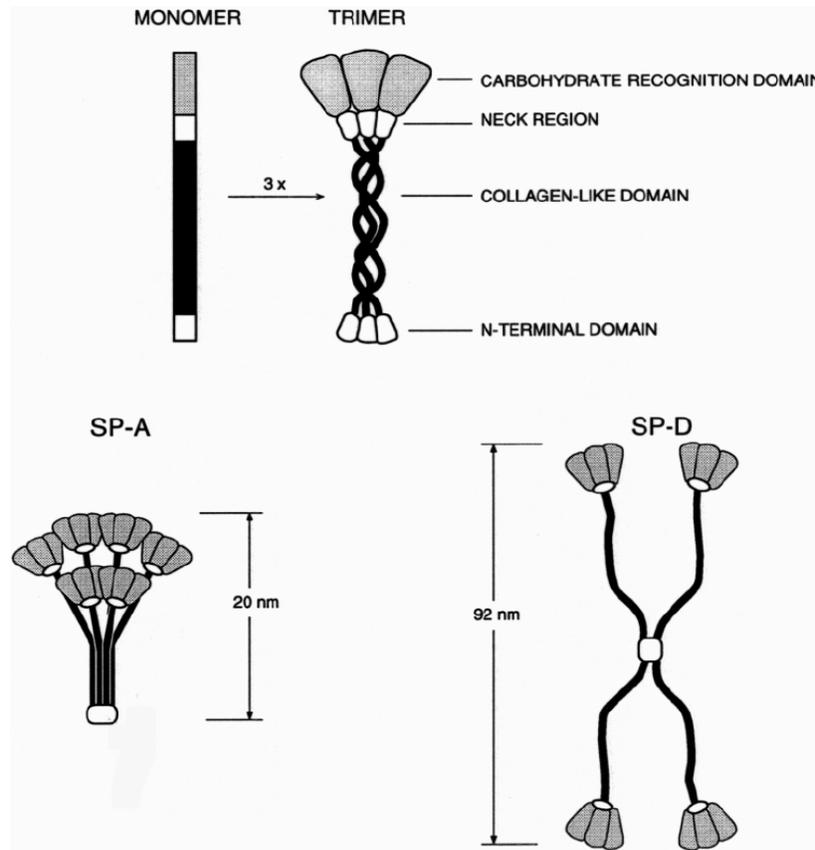
Mit Beginn der Molekulartechnologie und der Entdeckung der Surfactantproteine wurde diese Definition grundlegend geändert. Erste Untersuchungen belegten, dass eines der Surfactantproteine, SP-A, strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Komplementfaktor C1q aufweist (Brodsky et al. 1976). Seitdem gewinnt diese

neue Proteinfamilie, heute bekannt als Collectine, als Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr zunehmend an Bedeutung.

Die im Surfactant vorkommenden Proteine wurden von A bis D durchalphabetisiert und werden in hydrophobe und hydrophile Proteine unterteilt. Zu den hydrophoben Surfactantproteinen gehören SP-B und SP-C. Beide Proteine interagieren mit Lipiden und beeinflussen dadurch die Synthese und Stabilität des Surfactant (Nogee 2004; Schürch et al. 1995; Amrein et al. 1997). Die hydrophilen Surfactantproteine werden durch SP-A und SP-D vertreten und unterscheiden sich grundlegend von SP-B und SP-C.

SP-A und SP-D sind große, glykosylierte, multimerere, wasserlösliche Proteine, die zur Untergruppe der C-Typ-Lektine, den Collectinen, gezählt werden. Weitere Collectine sind das humane Mannose-bindende Lectin (MBL) sowie die bovinen Collectine Conglutinin, CL-43 und CL-1 (Crouch 1998; Hoppe und Reid 1994). Die Struktur von SP-A hat große Ähnlichkeit mit MBL und dem Komplementfaktor C1q. Im Gegensatz dazu ähnelt SP-D dem bovinen Conglutinin. Da C1q und Conglutinin eine wichtige Rolle in der unspezifischen Immunabwehr spielen, weisen diese Strukturähnlichkeiten schon auf mögliche immunologische Funktionen hin. Auch die Gene beider Proteine sind nahe dem MBL-Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 10 (10q22.2-q23.1) lokalisiert, ein weiterer Hinweis für evolutionsgeschichtlich bedingte ähnliche Funktionen (Bruns et al. 1987; Crouch et al. 1993).

Die Collectine sind Oligomere, die sich aus trimeren Untereinheiten zusammensetzen. Jede Untereinheit (Monomer) besteht aus einer kurzen N-terminalen, glycinreichen Disulfid-Domäne (N), gefolgt von einer langen kollagenähnlichen Region (collagen-like domain), einer spiralförmig gedrehten „Hals“-Region (neck region) und schließlich einer Kohlenhydratbindungsstelle (carbohydrate-recognition-domain, CRD) (Hoppe 1994). Jedes Collectin unterscheidet sich im Grad der Multimerisierung. SP-A ist ein Octadecamer bestehend aus sechs trimeren Untereinheiten, die sich jeweils aus 26 bis 35 kDa großen Monomeren zusammensetzen (Voss 1991). SP-D besteht aus 12 Untereinheiten, die in 4 Trimeren arrangiert sind, mit einer Molekülmasse von je 43 kDa pro Monomer. Dabei hat SP-A gewisse Ähnlichkeit mit einem Blumenstrauß und SP-D mit einem Kreuz (Abb. 2) (Hoppe und Reid 1994; Voss et al. 1991; Crouch et al. 1994).

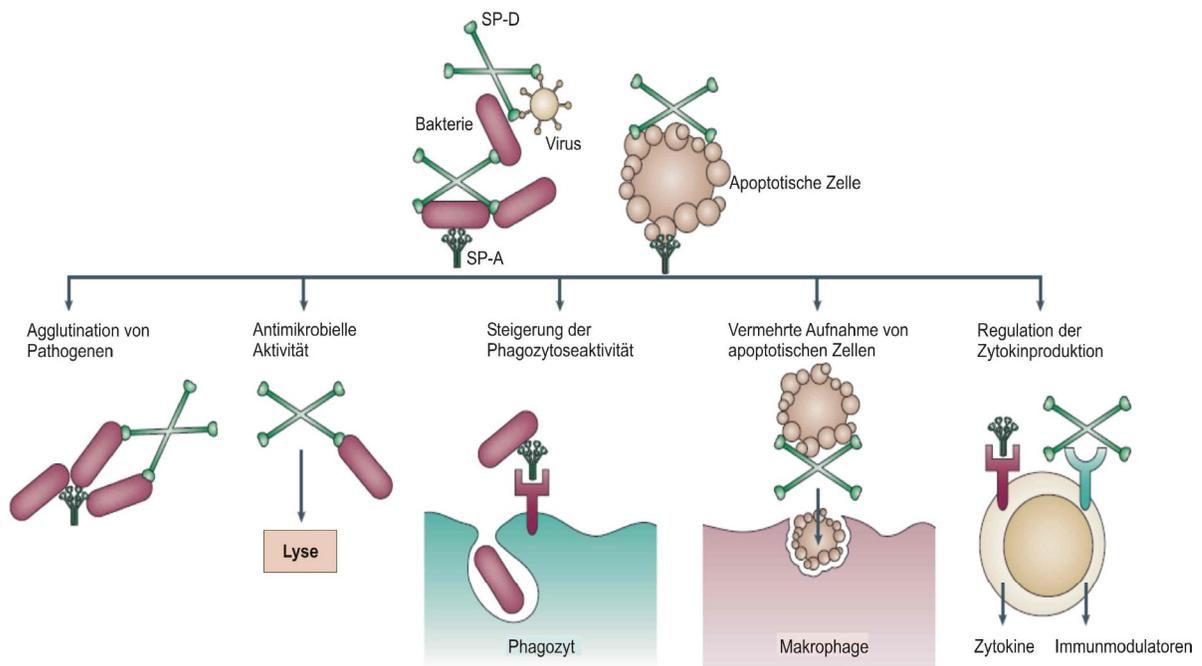


**Abb. 2** Struktur von SP-A und SP-D (Haagsman und Diemel 2001)

In der Lunge werden SP-A und SP-D hauptsächlich von Typ-II-Pneumocyten gebildet. Dabei ließ sich SP-A, im Gegensatz zu SP-D, zum Teil auch in den intrazellulären Lamellarkörperchen und im Alveolarraum am tubulären Myelin nachweisen und somit in unmittelbarer Nähe zu den Phospholipiden. Außerdem werden beide Surfactantproteine von Drüsenzellen der Trachea und von Clara-Zellen produziert (Voorhout et al. 1991; Crouch 1998; Walker et al. 1986).

Zahlreiche Studien belegen, dass SP-A und SP-D eine wichtige Rolle im Rahmen der angeborenen direkten Immunabwehr spielen (Hoppe und Reid 1994; Wright 1997; Crouch 1998). Besonders die Kohlenhydratbindungsstelle übernimmt dabei eine wichtige Funktion. Sie ist in der Lage, sich an Kohlenhydratliganden auf der Zelloberfläche von Pathogenen zu binden. Dadurch werden die Krankheitserreger rasch und effizient agglutiniert oder effektiv den Immunzellen (Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen) zur Phagozytose präsentiert. Bei zahlreichen Erregern hat dies eine Steigerung der Phagozytoseaktivität zur Folge. Besonders die kreuzförmige Oligomerisation von SP-D ist dabei ideal für die Agglutination (van Golde 1995). Tenner und Mitarbeiter konnten 1989 auch die direkte

Aktivierung von Makrophagen über spezifische membranständige Rezeptoren nachweisen. In aktuellen Studien wird berichtet, dass SP-A und SP-D sogar einen unmittelbaren antimikrobiellen Einfluss auf Bakterien und Pilze ausüben (Wu 2003; Schaeffler 2004; McCormack 2003). Darüber hinaus wird durch die Bindung die Elimination der Pathogene durch toxische Sauerstoff- und Stickstoffmetabolite induziert sowie die Chemotaxis der Immunzellen stimuliert (van Iwaarden 1990; Wright 1997). Ein weiterer Effekt beider Proteine ist die Regulation der Zytokinproduktion, z. B. von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . Jedoch wird die Rolle beider Surfactantproteine kontrovers diskutiert. Je nach Autor wird von einer Hoch- oder Herunterregulation der Entzündungsmediatoren berichtet. Sicher ist, dass der Effekt von verschiedenen Faktoren, wie z. B. Art des Erregers, Aktivierungsgrad der Zelle oder des Zelltyps abhängig ist. Weiterhin wird diskutiert, ob die Surfactantproteine A und D die Funktionen von T-Lymphozyten und dendritischen Zellen modulieren und somit ein Bindeglied zwischen unspezifischer und spezifischer Immunität darstellen. Abbildung 3 gibt einen Überblick über die derzeit bekannten unterschiedlichen Funktionen der Surfactantproteine.



**Abb. 3** Funktionen von SP-A und SP-D (Wright 2005)

*In-vivo*-Untersuchungen an SP-A- und SP-D-Knockout-Mäusen geben weitere Anhaltspunkte für die Modulation der Immunantwort durch Collectine. SP-A-Knockout-Mäuse zeigen keinerlei Veränderungen der Atemfunktion, der Lungencompliance oder im Surfactantmetabolismus, solange sie keinem Pathogen oder Stimulus ausgesetzt sind (Korfhagen 1996). Bei Infektion der Mäuse kommt es zu ausgeprägten Lungenentzündungen, einer starken Zunahme des Bakterienwachstums, insbesondere von Streptokokken der Serogruppe B, und zur Dissemination der Bakterien in die Milz. Auch die Clearance von *S. aureus* und *P. aeruginosa* ist erheblich gestört (LeVine 1997 und 1998). Interessanterweise normalisiert sich die Abwehrlage nach Gabe von gereinigtem SP-A. SP-D-Knockout-Mäuse fallen gleich nach der Geburt durch einen veränderten Phenotyp auf, bedingt durch eine progressive Lipidakkumulation in den Atemwegen. Im Laufe der Zeit entwickeln sie progressive pulmonale Emphyseme und subpleurale Fibrosen verbunden mit chronischen Entzündungen (Wert 2001). Außerdem zeigen sie eine erhöhte Anfälligkeit für Influenza-A-Viren (LeVine 2001). Aufgrund dieses komplexen Geschehens ist die Funktion von SP-D nur schwer zu beurteilen. Generell kann man sagen, dass die Knockout-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp eine gesteigerte Anfälligkeit für bakterielle und virale Infektionen aufweisen.

Die positive Wirkung von Surfactant auf die Elimination von *S. aureus* durch Alveolarmakrophagen war eine der ersten Studien, die demonstrierte, dass Surfactant die Immunabwehr beeinflussen kann (LaForce 1973).

Inzwischen existieren eine Vielzahl von Publikationen, die zeigen, dass die Abwehrfunktion und Interaktion mit Pathogenen von SP-A und SP-D vermittelt werden und ein weites Spektrum umfassen. Die Collectine binden an grampositive Bakterien (*Streptokokkus pneumoniae*, *S. aureus*), gramnegative Bakterien (*Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*), *Mycobacterium tuberculosis*, Viren (*Influenza-Virus Typ A* und *B*, *Herpes-simplex-virus*) und Protozoen (*Pneumozystis carinii*). Einen zusammenfassenden Überblick über die Bindungskapazitäten von SP-A und SP-D soll die folgende Tabelle (Tab. 1) geben (Shepherd 2002; Crouch und Wright 2001; Holmskov et al. 2003).

Pathogen	Bindung an SP-A	Bindung an SP-D
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	+
<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>	+	?
<i>Cryptococcus neoformans</i>	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+
<i>Haemophilus influenzae</i>	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+	+
<i>Pneumocystis carinii</i>	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+
Streptococcus Gruppe A	+	?
Streptococcus Gruppe B	+	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	+
Cytomegalievirus	+	?
Herpes-simplex-Virus	+	?
Influenza-A-Virus	+	+
Rotavirus	+	+
Pollen	+	?

**Tab. 1** Interaktion von SP-A und SP-D mit verschiedenen Mikroorganismen; Bindung erfolgt (+); Bindungsverhalten unbekannt (?)

Es gibt große Unterschiede zwischen den einzelnen Collectinen bzw. Surfactantproteinen. Eine Erklärung dafür ist die unterschiedliche Bindungsaffinität der Kohlenhydratbindungsstelle für verschiedene Zuckermoleküle auf Zelloberflächen. So bindet SP-A bevorzugt an N-acetylmannosamin und L-Fucose. SP-D bindet im Gegensatz dazu vorzugsweise an Inositol, Maltose und Glukose (Haagsman 1987). Auch die daraus resultierende Immunreaktion ist Collectin- und Pathogen-spezifisch. Neuere Studien beschäftigen sich speziell mit der Funktion von SP-A und SP-D bei der Immunabwehr von *P. aeruginosa* (Bufler 2003; Zhang et al 2007; Mikerov et al. 2007). *P. aeruginosa*, ein opportunistischer gram-negativer Keim, ist häufig Verursacher akuter Pneumonien bei Immunsuppression, von Wundinfektion nach Verbrennungen, chronischer Atemwegserkrankungen bei zystischer Fibrose oder von Augeninfektionen, die zum vollständigen Sehverlust führen können. Solche Augeninfektionen schreiten schnell voran, sind destrierend und nur sehr schwer therapierbar. Hauptrisikofaktoren sind Kontaktlinsen, aber auch Augenverletzungen und Augenoberflächenerkrankungen. Fleiszig und Kollegen (2005) konnten in Tränenflüssigkeit und in humanen

Corneaepithelzellkulturen SP-D nachweisen und demonstrieren, dass rekombinantes SP-D die Vermehrung und Verbreitung von *P. aeruginosa* reduzieren kann. Viele Ergebnisse weisen darauf hin, dass Surfactantproteine A und D auch in zahlreichen anderen Geweben exprimiert werden. Trotzdem beziehen sich die meisten Studien immer noch auf die Rolle von SP-A und SP-D im Rahmen der Immunabwehr der Lunge. SP-D mRNA wurde in Geweben von Speicheldrüse, Ovar, Uterus, Ösophagus, Magen, Hoden und Tränendrüse nachgewiesen. Auf Proteinebene wurde SP-D im Ovar, im Uterus und in der Tränendrüse detektiert (Madsen et al. 2000; Stahlman 2002; Akiyama 2002; Leth-Larsen 2004). Hingegen gehen viele Studien davon aus, dass SP-A ausschließlich in der Lunge vorkommt und nicht in der Tränendrüse oder Tränenflüssigkeit (Stahlman et al. 2002; Ni et al. 2005). Im Gegensatz dazu wiesen bereits Dobbie und Kollegen 1994 mittels Immunhistochemie nach, dass SP-A in unterschiedlichen humanen Geweben und Flüssigkeiten, unter anderem auch in der Tränendrüse, synthetisiert wird. Basierend auf diesen widersprüchlichen Angaben und Ergebnissen ist es das Ziel der vorliegenden Dissertation zu analysieren, ob SP-A und SP-D im Tränensystem des Menschen und in der Tränenflüssigkeit exprimiert und produziert werden und somit auch außerhalb der Lunge einen wichtigen Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr der Augenoberfläche darstellen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Eingesetzte Chemikalien und Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Acetonitril	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid Solution	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Amino Acids Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Aquatex	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bromphenol Blau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM/Ham's F-12)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
EDTA	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ethanol (99,8 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
Entwickler-6 Fixierlösung (GBX Developer & Fixer Twin Pack)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Glucose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Gentamycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mercaptoethanol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Natriumhydrogencarbonat	VEB Laborchemie Apolda, Apolda, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NMDG (N-methyl-D-glucamin)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Non-essential Amino Acid Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ponceau S	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure (HCl) 37%ig	VEB Laborchemie Apolda, Apolda, Deutschland
SDS (sodium dodecyl sulfat)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Sucofin – Milchpulver	TSI, Zeven, Deutschland
Trifluoressigsäure	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
TEMED	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Triton X 100 (Cell Lysis Buffer)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trizol Reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tween 20	Serva Feinbiochemie, Heidelberg, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Zitronensäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

### 2.1.2 Kits und Enzyme

AEC Substratlösung	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
Avidin/Biotin Blocking Kit	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
Biotinylierte Zweitantikörper	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland

DNA Molecular Weight Marker II	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland
dNTP's	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
5 x First Strand Buffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
MassRuler™ DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
0,1 M DTT (1,4-Dithiothreitol)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Normalserum Schweineserum Kaninchenserum Ziegenserum	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
PageRuler™ Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
10 x PCR Rxn Buffer (-MgCl <sub>2</sub> )	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Platinum SYBR-Green-qPCR SuperMix	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Phosphataseinhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Proteaseinhibitor Mix	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Protein Assay Kits	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
Proteinmarker SeeBlue Plus 2	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
RQ1 RNase-Free DNase (1 Units/μl) Dnase Stop Solution Dnase 10 x Reaktion-Buffer	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Rnase-Free Wasser	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Random Hexamers (50 μM, 5nmoles)	Applied Biosystems, Foster City, USA
Strept ABCComplex/HRP	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
Super Script II RNase H <sup>-</sup> Reverse	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Taq DNA Polymerase Kit (5 Units/μl)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland

### 2.1.3 Gebrauchslösungen

#### Citrat-Puffer

Stammlösung A:	0,1 M Zitronensäure (21,01 g Zitronensäure in 1 l Sera dest)
Stammlösung B:	0,1 M Natriumcitrat (29,41 g Natriumcitrat in 1 l Sera dest)
Gebrauchslösung:	4,5 ml Stammlösung A 20,5 ml Stammlösung B ad 225 ml Sera dest
TBS-Puffer Stammlösung:	6,1 g TRIS in 50 ml Sera dest ad 37 ml einer 1 N HCl-Lösung Sera dest ad 1 l (pH 7,6)
TBS-Puffer Gebrauchslösung:	100 ml TBS Stammlösung ad 900 ml 0,85%ige NaCl-Lösung (pH 7,3)
Strept ABComplex/HRP	
Reagenz A:	Streptavidin aus Streptomyces in 0,01 mol/l Phosphatpuffer (pH 7,2)
Reagenz B:	biotinylierte Meerrettichperoxidase in 0,01 mol/l Phosphatpuffer (pH 7,2)
AEC Substratlösung:	0,75 mg/ml 3-Amino-9-ethylcarbazole in 2,5 % N, N-dimethylformamide und 0,05 mol/l Acetat-Buffer (pH 5,0)
TBS/TBST:	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 3 g Tris, Reinstwasser ad 1 l (pH 7,4) für TBST ad 1 ml Tween
Stripping-Puffer:	10 ml 20 % SDS, 12,5 ml 1 M Tris-HCl, 700 µl Mercaptoethanol (pH 6,8) Reinstwasser ad 1 l
Transferpuffer:	0,84 g NaHCO <sub>3</sub> , 0,318 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ad 800 ml Reinstwasser (pH 9,6) ad 200 ml Methanol (pH ca. 10,4)
Reducing Sample Buffer (RSB):	2 ml Glycin, 4 ml 10 % SDS, 2,5 ml Solution 3, 1 ml Mercaptoethanol
PBS:	0,4 g KCl, 8 g NaCl, 0,3 g NaHCO <sub>3</sub> , 1 g Glucose, 0,2 g EDTA in 1 l Sera dest lösen, sterilfiltrieren, autoklavieren

## 2.1.4 Geräte

Spektrophotometer Ultrospec 3300	Amersham Biosciences, New York, USA
Analysewaage Typ MC5 OCE	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Blot-Apparatur/Western Blot	Hoefer SemiPhor, Pharmacia Biotech, San Francisco, USA
Brutschrank: Hepa Class 100	Thermo Scientific, Milford, USA
Digital Graphic Printer UP-D890	Sony Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland
Elektrophoresekammer	OWI Separation Systems, Porthmouth, Niederlande
Elektrophores-Apparatur	Hoefer SemiPhor, Pharmacia Biotech, San Francisco, USA
Eppendorf-Zentrifuge EC 5402	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
ImageMaster VDS	Pharmacia Biotech, San Francisco, USA
Kühlzentrifuge Biofuge primo R	Heraeus Instruments, Gera, Deutschland
Laminarbox	Lamin Air, Holten, Dänemark
Magnetrührer	MLW Rührgerätewerk Medingen, Freital, Deutschland
Mikroskop Telaval 3	Carl Zeiss Jena, Jena, Deutschland
Mikroskop Olympus BX 50	Optical Co. GmbH, Hamburg, Deutschland
pH-Meter - Digital pH-Meter pH 525	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Photo-Dokumentationsanlage Herolab E.A.S.Y 429K	Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland
Präzisionswaage Typ 870-13	G. Kern & Sohn, Albstadt, Deutschland
Schüttelgerät Thys 2	MLW Labortechnik Ilmenau, Deutschland
Thermocycler PTC – 200 DNA Engine Cycler CFD – 3200 Opticon 2 Detector	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
Software: Opticon Monitor 2	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
UV-Vis-Spektrophotometer	Shimadzu Corp., Duisburg, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad Thermostad B3-DC 1	Haake, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.5 Allgemeine Materialien

Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Füllspatel	VEB Dentalfabrik, Treeurt, Deutschland
Gelblotting-Filterpapier (0,37 mm)	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland
Gelkassetten	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Hybond-ECL	Amersham Biosciences, New York, USA
Kryoröhrchen und Deckeleinsätze	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
96er und 24er Mikroliterplatten	Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Nitrocellulose Membran	Amersham Biosciences, New York, USA
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, New York, USA
PCR Softlubes	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Pipetten	Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland  Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, kristall 0,5-10 µl	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen, gelb 5-100 µl	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen, blau 100-1000 µl	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Quarzküvette (50 µl)	Typ Hellma, Novodirekt GmbH, Kehl, Deutschland
Röntgenkassette Typ G 24 x 30 cm	rego X-ray GmbH, Augsburg, Deutschland
Zellkulturflaschen (50 ml, 25 cm <sup>2</sup> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

### 2.1.6 Sterilisation von Lösungen und Geräten

Hitzeunempfindliche Lösungen und Gebrauchswaren werden für 30 min bei 120 °C und 10<sup>5</sup> Pascal autoklaviert; hitzeempfindliche Lösungen werden über einen Sterilfilter mit 0,2 µm Porengröße steril gefiltert.

### 2.1.7 Molekulargewichtstandard

DNA-Längenstandard	DNA Molecular Weight Marker II Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland
	MassRuler™ DNA Ladder, Low Range (80– 1031 bp), Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Protein-Längenstandard	PageRuler™ Prestained Protein Ladder (11– 170 kDa), Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

## 2.2 Art und Herkunft des verwendeten Probenmaterials

### 2.2.1 Gewebeproben

Es werden Gewebeproben aus Tränendrüse, Konjunktiva, Cornea und ableitenden Tränenwegen von Körperspendern des Anatomischen Institutes der Christian-Albrechts-Universität (CAU) Kiel und der Martin-Luther-Universität (MLU) Halle-Wittenberg gewonnen und für histologische, immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen verwendet. Den Körperspendern, 5 männlichen und 8 weiblichen im Alter von 49 bis 88 Jahren, wurden innerhalb von 4 bis 12 Stunden die entsprechenden Gewebeproben entnommen. Außerdem werden Gewebeproben von Patienten der Klinik für Augenheilkunde und Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der MLU Halle-Wittenberg und der CAU Kiel, denen aufgrund unterschiedlicher Erkrankungen operativ die Cornea oder Teile der ableitenden Tränenwege entfernt worden sind, für die Untersuchungen asserviert. Die Gewebeproben werden bis zur Untersuchung bei -80 °C gelagert oder in Paraffin eingebettet. Für die Untersuchungen an Patientengewebe liegen positive Voten der Ethikkommissionen in Kiel und Halle vor.

## 2.2.2 Zelllinien

### *Konjunktivaepithelzelllinie IOBA-NHC*

Die morphologische und funktionelle Charakterisierung der spontan immortalisierten IOBA (Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada, Universidad de Valladolid, Spanien) -NHC (normal human conjunctiva) -Zelllinie zeigt, dass die Zelllinie die Konjunktiva des Menschen weitgehend repräsentiert und somit als Modellzelllinie nutzbar ist. Die Zellen sind durch eine hohe Proliferationsrate charakterisiert. Die humane Herkunft der IOBA-NHC-Zelllinie ist durch Chromosomenanalysen bestätigt (Diebold et al. 2003).

### *Corneaepithelzelllinie HCE*

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine immortalisierte humane corneale Epithelzelllinie (HCE). Die Zelllinie wurde aus einer Spenderhornhaut generiert und mit dem Simian-Virus 40 (SV40), das das Large-T-Antigen enthält, transfiziert und immortalisiert. Die Zelllinie zeigt normale humane corneale Eigenschaften und wurde freundlicherweise von Herrn Kaoru Araki-Sasaki aus Osaka in Japan zur Verfügung gestellt (Araki-Sasaki et al. 1995).

## 2.2.3 Medien und Kultivierung

Die Corneaepithelzelllinie (HCE) und die Konjunktivaepithelzelllinie (IOBA-NHC) werden in sterilen Gewebekulturflaschen als Monolayer kultiviert. Das Medium, DMEM/Ham's F-12 im Verhältnis 1:1, wird mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) versetzt. Zusätzlich wird das Medium der Konjunktivaepithelzellen mit 1 µg/ml Insulin und 5 µg/ml Hydrocortisol angereichert. Auf weitere Zusätze wie Antibiotika wird verzichtet. Die Zellkulturen wachsen in Begasungsbrutschränken bei 37 °C, 5 % Kohlendioxid und 18 % Sauerstoff. Alle Zellkulturarbeiten werden unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt.

## 2.2.4 Stimulationsversuche

Um den Einfluss bestimmter biochemischer Reize auf die Expressionstärke der Surfactantproteine zu untersuchen, werden die Zelllinien mit unterschiedlichen Agenzien stimuliert. Die verwendeten Substanzen entsprechen denen, die beim

Ablauf einer Infektion im Gewebe vorkommen. Nachdem die Zellen zu 90 % konfluent gewachsen sind, werden die Zellen zunächst drei Stunden in serumfreiem Medium kultiviert. Die Agenzien werden mit serumfreiem Medium verdünnt, bis die gewünschte Konzentration erreicht ist, und auf die Zellen appliziert. Die Zelllinien werden jeweils mit 10 ng/ml Lipopolysacchariden (LPS), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), Interferon-gamma (INF- $\gamma$ ), Interleukin-1alpha (IL-1 $\alpha$ ), Interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ) und Peptidoglycan (PGN) für jeweils 6 Stunden inkubiert. Eine unbehandelte Kontrolle wird mitgeführt.

## 2.3 RNA-Isolierung

### 2.3.1 RNA-Isolierung aus Gewebeproben

In der vorliegenden Arbeit wird hierzu das RNeasy-Mini-Kit verwendet. Das Prinzip des Kits bzw. dessen Spezifität beruht darauf, dass in Gegenwart eines chaotrophen Salzes Nukleinsäuren spezifisch an Glasfaser- oder Silica-Oberflächen gebunden werden. Die Bindungsreaktion wird durch die Zerstörung der geordneten Struktur der Wassermoleküle und ihrer Wechselwirkung mit den gelösten Nukleinsäuren verursacht. Durch eine DNase-Verdauungsreaktion direkt auf dem Glasvlies werden Reste von kontaminierender DNA abgebaut. Nach einfachen Waschschrritten kann die RNA frei von Begleitsubstanzen in RNase-freies Wasser eluiert werden.

Die bei -80 °C gelagerten Gewebeproben werden für den Gewebeaufschluss mit einem Mörser und Pistill direkt in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermahlen. Das Gewebepulver wird in ein RNase-freies, mit Flüssigstickstoff gekühltes 2-ml-Mikrozentrifugenröhrchen überführt und mit 600  $\mu$ l stark denaturierendem Guanidinium-Isothiocyanat-haltigem Lysepuffer und 6  $\mu$ l 14,3 M  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt, um RNasen zu inaktivieren, die in allen Geweben vorkommen und innerhalb weniger Minuten große Mengen RNA degradieren können (Bekman et al. 1986). Dabei sollte die Ausgangsmenge der zerkleinerten Probe maximal 30 mg betragen, damit später die Bindungskapazität der Säulen (100  $\mu$ g RNA) und die Lysekapazität des Puffers nicht überschritten werden. Von zellarmen Geweben dagegen, wie beispielsweise Cornea, müssen für die Isolierung mindestens 100 mg Gewebe eingesetzt werden, um eine ausreichende RNA-Ausbeute zu erzielen. Mit einem Rotor-Stator-Homogenisator werden die

Gewebeproben weiter aufgeschlossen und dabei zugleich in Lysepuffer homogenisiert. Eine unvollständige Homogenisation beeinträchtigt die Bindung der RNA an die RNeasy-Membran und damit die RNA-Ausbeute.

Das Homogenat wird anschließend für 3 min bei 13000 U/min und 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 1,5-ml-Tube überführt und mit 70%igem Ethanol auf das doppelte Volumen aufgefüllt, um die Bindungseigenschaften der RNA zu erhöhen. Das Gemisch wird in ein Mikroreaktionsgefäß mit einer Silikagelmembran gegeben und anschließend bei 10000 U/min für 15 s zentrifugiert. In den folgenden Schritten wird die RNA mit zwei verschiedenen Puffern von Verunreinigungen freigeschwenkt. Hierzu werden zunächst 350 µl RW1-Puffer auf die Silikagelmembran gegeben und für 15 s bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Puffer wird in einem 2-ml-Sammelgefäß aufgefangen und verworfen. Es folgt der DNase-Verdau, für den jeweils 10 µl DNase I und 70 µl DNase-Puffer eingesetzt werden. Der Ansatz wird 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut mit 350 µl RW1-Puffer für 15 s bei 10000 U/min zentrifugiert. Anschließend werden in 2 sich wiederholenden Schritten jeweils 500 µl RPE-Puffer auf die Membran pipettiert, erst 15 s, dann 2 min bei 10000 U/min zentrifugiert und Puffer und Sammelgefäß verworfen. Abschließend wird die an die Silikagelmembran gebundene RNA mit 2 x 30 µl RNase-freiem Wasser in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß eluiert. Bei -80 °C kann die RNA für mehrere Wochen gelagert werden. Durch diese Prozedur werden in erster Linie RNA-Moleküle isoliert, die größer als 200 Nukleotide sind. Kleine Nukleotide wie 5,8S RNA, 5S RNA oder tRNA bindet die Silikagelmembran nicht quantitativ.

### 2.3.2 RNA-Isolierung aus Zellen

Um RNA aus Zellen der Zellkultur zu extrahieren, wird 1 ml Trizol pro Gewebekulturflasche direkt auf die Zellen gegeben, nachdem das Kulturmedium entfernt wurde. Die Zellen werden durch das Trizol vom Flaschenboden gelöst und können nun aus der Flasche pipettiert werden. Das Gemisch wird bei -80 °C eingefroren.

Nach dem Auftauen werden 200 µl Chloroform hinzugegeben, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und 15 min bei 10000 U/min zentrifugiert. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation wird die wässrige Phase zur Fällung der

RNA mit Isopropanol (-20 °C) 40 min bei -20 °C inkubiert und anschließend 15 min bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das entstandene Pellet zweimal mit kaltem 70%igen Ethanol gewaschen. Das Pellet wird anschließend in einer SpeedVac unter Vakuum bei Raumtemperatur getrocknet und in 25 µl DEPC-Wasser bei 70 °C gelöst. Die Konzentrationsmessung erfolgt photometrisch.

## 2.4 DNase-Verdau

Da es bei der RNA-Isolierung von Zellen immer zu einer Kontamination mit geringen DNA-Mengen kommt, wird ein zusätzlicher DNA-Verdau mit DNase I durchgeführt (30 min bei 37 °C). Aufgrund der hohen Sensitivität der Polymerasekettenreaktion können kleinste Mengen DNA drastische Auswirkungen auf die Befunde haben. Aus diesem Grund muss man sichergehen, dass das RNA-Eluat absolut DNA-frei ist. Die verwendete DNase darf keine RNA-abbauende Aktivität besitzen, um die RNA nicht in Mitleidenschaft zu ziehen. 5 µg RNA werden nach Isolierung und anschließender Konzentrationsbestimmung für den DNA-Verdau eingesetzt. Folgender Ansatz wird verwendet:

	<b>Volumen</b>
Rnase-freier DNase 10 x Reaktionspuffer	2 µl
Rnase-freie DNase 1 U/µg	5 µl
RNA-Lösung aus Extraktion (5 µg RNA)	x µl
Nuklease-freies Wasser	ad 20 µl

Der Reaktionsansatz wird bei 37 °C für 30 min inkubiert. Um die Reaktion zu unterbrechen werden nachfolgend 2 µl DNase-Stop-Lösung dazugegeben und 10 min bei 65 °C inkubiert. Nach dem Verdau erfolgt nochmals eine photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung.

## 2.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der RNA im Eluat kann durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) in einem Spektrophotometer bestimmt werden. Aufgrund der Spektralcharakteristika ihrer Basen, die ein Absorptionsmaximum bei 260 nm zeigen, absorbieren Nukleinsäuren Licht zwischen einer Wellenlänge von 250 bis

270 nm. Nach Verdünnung der RNA in Wasser entspricht eine  $OD_{260}$  von 1 einer Konzentration von 42,1  $\mu\text{g/ml}$  Gesamt-RNA (Sambrook et al. 1989). Durch folgende Gleichung lässt sich die RNA-Konzentration der eingesetzten Proben errechnen:

$$\text{RNA-Konzentration } (\mu\text{g/ml}) = OD_{260} \times 42,1 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Vor der Messung wird das RNA-Eluat mit DEPC-Wasser 1:100 verdünnt und das Spektrophotometer mit 100  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser auf Null geeicht. Der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  erlaubt einen Rückschluss auf die Reinheit der isolierten RNA hinsichtlich möglicher Kontamination durch UV-absorbierende Stoffe wie zum Beispiel Proteinen. Allerdings ist der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  stark vom pH-Wert abhängig. Ein niedriger pH-Wert resultiert aus einem zu niedrigen Messergebnis für  $OD_{260}/OD_{280}$  und reduziert zudem die Sensitivität gegenüber Protein-Verunreinigungen. Für sehr reine RNA gilt dann:

$$OD_{260}/OD_{280} = 1,9 - 2,1$$

Die Qualität der isolierten Gesamt-RNA kann anhand einer Agarosegel-Elektrophorese nachvollzogen werden, bei der die Banden der ribosomalen 28S- und 18S-RNA (rRNA) nach erfolgter Ethidiumbromid-Inkubation bei 5,0 und 1,9 Kilobasen (kb) begutachtet werden können. Die jeweiligen Banden der rRNA sollten scharf begrenzt im Agarosegel erscheinen.

## 2.6 Reverse Transkription

Der reversen Transkription (Kogan et al. 1987) liegt eine Umschreibung von RNA in komplementäre DNA mit anschließender PCR zugrunde. Die mRNA liegt in den Zellen in nur sehr geringer Kopienzahl vor. Eine Möglichkeit, bestimmte Sequenzen im RNA-Gemisch nachzuweisen, ist die selektive Amplifikation dieser Sequenzen. Dazu muss die mRNA zunächst durch ein virales Enzym, die reverse Transkriptase (RT) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden (Kawasaki 1989). Das Enzym benötigt als Startpunkt ein kurzes Stück doppelsträngiger Nukleinsäure. Man setzt daher p(dT)-Oligomere als Primer ein, die mit den Poly-A-Enden der mRNA hybridisieren und so den Startpunkt für die

Transkription liefern. Für die Erststrangsynthese werden 2 µg RNA aus dem DNase-Verdau eingesetzt und das Super-Script-II-RNase-H-Reverse-Kit nach folgendem Standardprotokoll verwendet:

	Volumen
2 µg RNA aus DNase-Verdau	x µl
OligoT-Primer	1 µl
DEPC-Wasser	ad 12 µl

Der Reaktionsansatz wird 10 min bei 70 °C inkubiert, um die RNA zu denaturieren. Im Anschluss daran werden die Eppendorf-Tubes für eine Minute auf Eis abgekühlt. Danach werden je 8 µl des Mastermixes zu jedem Ansatz hinzugegeben. Folgender Ansatz wird verwendet:

	Volumen
5 x Puffer	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
10 mM dNTP's	1 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
Gesamtvolumen	8 µl

Der Ansatz wird für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Abschließend wird der Ansatz mit 20 µl DEPC-Wasser aufgefüllt, sodass eine Endkonzentration von 1 µg/ml entsteht.

## 2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) erlaubt es, in vitro eine enorme Anzahl von Kopien einer spezifischen DNA-Sequenz zu produzieren (Saiki et al. 1985; Mullis und Faloona 1987). Dazu nutzt man bestimmte Eigenschaften der DNA-Replikation. Eine DNA-Polymerase erzeugt aus dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphate) Kopien von Teilen der vorgelegten cDNA. Die von der Polymerase als Matrize benötigte Einzelstrang-DNA erzeugt man durch Erhitzen doppelsträngiger DNA fast bis zum Siedepunkt. Für den Start der DNA-Synthese braucht die Polymerase jedoch ein kurzes Stück doppelsträngige DNA. Durch Zugabe eines Paares verschiedener Oligonukleotid-

primer, die sich komplementär an beiden Enden der gesuchten Sequenz anlagern, können Start- und Endpunkt der DNA-Synthese festgelegt werden. So erhält man als Produkt einen ganz speziellen, von den Bindungsstellen der Primer flankierten DNA-Strang. Jeder der so neusynthetisierten Stränge enthält wiederum Primer-Bindungsstellen und kann bei einer erneuten Polymerisation wie der Altstrang als Matrize dienen. Die Zunahme der Kopienzahl des Fragments erfolgt daher nicht linear, sondern exponentiell. Durch mehrfache Wiederholung eines Temperaturzyklusses in einem Thermocycler werden die Reaktionsschritte (1) Trennung der Doppelstränge (Denaturierung, 94 °C), (2) Anlagerung der Primer (Annealing, 50–60 °C) und (3) Elongation (72 °C) so oft durchlaufen, bis das gewünschte Fragment in ausreichender Kopienzahl vorliegt. Nach  $n$  Reaktionszyklen enthält das Reaktionsgemisch ein theoretisches Maximum von  $2^n$  doppelsträngigen DNA-Molekülen, die Kopien der Sequenz zwischen den Primern darstellen (Watson et al. 1992). Die Anzahl der Reaktionszyklen wird üblicherweise zwischen 25 und 40 gewählt, je nach Menge der Ausgangs-cDNA. Ein Erhöhen der Zykluszahl ergibt nicht notwendigerweise eine größere Menge an PCR-Produkten, sondern kann zur Bildung von unspezifischen Produkten führen. Die PCR ist so sensitiv, dass sich selbst einzelne Moleküle zu nachweisbaren Mengen amplifizieren lassen. In der vorliegenden Arbeit werden je 1 µg cDNA mit folgendem Reaktionsansatz inkubiert:

	<b>Volumen</b>
cDNA	2 µl
Primer-Mix	0,6 µl
10 mM dNDP's	0,6 µl
10 x Puffer (-MgCl <sub>2</sub> )	3 µl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0,9 µl
RNase-freies Wasser	22,72 µl
Taq-Polymerase	0,18 µl
Gesamtvolumen	30 µl

Es wird ein PCR-Programm mit 40 Reaktionszyklen angewendet, die einzelnen Reaktionsschritte werden wie folgt festgelegt:

	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Vordenaturierung	95 °C	2 min
2	Denaturierung	95 °C	20 s
3	Annealing	primerspezifisch	30 s
4	Elongation	72 °C	40 s
	40 Zyklen Schritt 2–4		
5	Elongation	72 °C	10 min

Die Annealing-Temperatur wird nach Angaben von Baldino et al. (1989) errechnet und beträgt für die Primer für SP-A 59 °C und für SP-D 61 °C. Als Negativkontrolle wird die cDNA im Reaktionsansatz durch Wasser ersetzt. Die PCR-Produkte werden durch die Agarosegel-Elektrophorese identifiziert. Für die RT-PCR werden folgende Primer verwendet:

Primer		Sequenz	Größe des Produktes
Aktin	Sense	5'-AAGAGATGGCCACGGCTGCT-3'	275 bp
	Antisense	5'-TCCTTCTGCATCCTGTCGGCA-3'	
SP-A	Sense	5'-GAAGGACGTTTGTGTTGGAA-3'	439 bp
	Antisense	5'-TGGATTCTCTCTGAGG-3'	
SP-D	Sense	5'-ATGTTGCTTCTCTGAGG-3'	461 bp
	Antisense	5'-TCAGAACTCGCAGACCACAAG-3'	

## 2.8 Agarosegel-Elektrophorese

Im Anschluss an die RT-PCR wird die amplifizierte DNA elektrophoretisch aufgetrennt. Nukleinsäuren haben aufgrund der negativen Nettoladung ihrer Phosphatgruppen die Fähigkeit, in einem elektrischen Feld zur Anode zu wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit durch die Maschen-Struktur des Agarosegels ist von der Größe und Form der Nukleinsäuren abhängig. Dazu wird ein 2%iges Agarosegel verwendet. 2 g Agarose werden in 100 ml 1 x TAE-Puffer durch wiederholtes Erhitzen in der Mikrowelle vollständig gelöst und mit Ethidiumbromid versetzt. Mit Hilfe eines Gelschlittens und einer Gießkammer wird unter Verwendung eines Kammes ein Gel mit Taschen gegossen. Sobald die Agarose

erstarrt ist, wird das Gel in eine Elektrophoresekammer gegeben und der Elektrophoresepuffer zugegeben, bis das Gel knapp bedeckt ist. Damit die DNA in dem Elektrophoresepuffer nicht aufschwimmt, werden die Impfschlitze mit einem Gemisch aus 10  $\mu$ l DNA und 1  $\mu$ l Ladepuffer beschickt. Zusätzlich wird eine Geltasche mit einem Größenmarker beschickt, um nach der Elektrophorese die spezifischen DNA-Banden identifizieren zu können. Anschließend wird eine Spannung von 80 bis 120 Volt bei 180 mA angelegt. Der im Ladepuffer enthaltene niedermolekulare Farbstoff Bromphenol Blau dient als Farbmarker, um den Verlauf der Elektrophorese beurteilen zu können. Ist die DNA ausreichend weit im Gel gelaufen, werden die nun voneinander getrennten DNA-Fragmente im Gel durch Fluoreszenz bei 366 nm auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und mit Hilfe einer Photo-Dokumentationsanlage digital abgespeichert und ausgedruckt. Die im Ergebnisteil dargestellten Abbildungen sind einzelne repräsentative Auswertungen von PCR-Reaktionen. Nur PCR-Resultate, die in der Wiederholung identische Expressionsmuster aufweisen, werden im Ergebnisteil berücksichtigt.

## 2.9 Quantitative Real-time-PCR

Die Real-time-PCR ist ein Verfahren zur schnellen und vollautomatisierten Quantifizierung von DNA. Dabei werden in einem geschlossenen System Amplifikation, PCR-Produkt-Detektion und -Quantifizierung kombiniert, ohne dass weitere Arbeitsschritte nach der PCR erforderlich sind (Higuchi et al. 1993; Gibson et al. 1996; Heid et al. 1996). Durch diese Methode ist es möglich, über die Fluoreszenzintensität eines in doppelsträngige DNA interkalierenden Reporterfarbstoffes, zum Beispiel SYBR-Green, kontinuierlich die Menge des akkumulierenden PCR-Produktes während der PCR zu bestimmen. Die Fluoreszenzfarbstoffe binden sich während des PCR-Zyklus an die Ziel-DNA und werden durch eine Lichtquelle angeregt. Das dabei entstehende Signal korreliert quantitativ mit der Menge an PCR-Produkt und kann mit Hilfe einer Software in Echtzeit (Real-time) dargestellt werden. So wird bei der Real-time-PCR heute nicht mehr primär die DNA-Produktmenge oder -Produktkonzentration berechnet, sondern der Fluoreszenz-Schwellenwert, der so genannten Threshold Cycle oder  $C_t$ -Wert. Der  $C_t$ -Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt und er befindet sich immer in der

exponentiellen Phase der Amplifikation. Je mehr Matrizen-DNA am Anfang der Reaktion vorhanden sind, desto weniger Zyklen sind notwendig, um diesen Wert zu erreichen. Generell können mit Hilfe der Real-time-PCR zwei verschiedene Quantifizierungsstrategien verfolgt werden:

1. Die absolute Quantifizierung wird anhand einer vorgegebenen Kalibrierungskurve realisiert und basiert auf einer Verdünnungsreihe von RT-PCR-Produkten, mit der die absoluten Werte (z. B. Kopienzahl) für die Ausgangskonzentration unbekannter Proben ermittelt werden kann.
2. Bei der relativen Quantifizierung wird die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes Referenzgen bezogen. Diese Methode wird auch als Normalisierung des Expressionsergebnisses bezeichnet. Das Expressionslevel eines idealen Referenzgens sollte konstant sein und nicht aktiv reguliert werden oder unter experimentellen Bedingungen variieren. Außer ribosomaler RNA wie 18S-rRNA dienen vorzugsweise die „Housekeeping-Gene“ als Referenzgene. Diese kodieren Proteine, die zur Erhaltung der Zellfunktion lebensnotwendig sind, wie zum Beispiel  $\beta$ -Aktin und Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase. Die Berechnung der relativen Quantifizierung erfolgt über die so genannte  $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Dabei wird im ersten Schritt die Differenz ( $\Delta C_t$ ) zwischen dem  $C_t$ -Wert des Referenzgens (18S-rRNA) und dem  $C_t$ -Wert des zu untersuchenden Gens berechnet. Nach dieser Normierung wird vom dem  $\Delta C_t$ -Wert der experimentell behandelten Proben der  $\Delta C_t$ -Wert einer Kontrollprobe abgezogen. Der relative Expressionsunterschied zwischen behandelter Probe und Kontrollprobe ergibt sich aus der arithmetischen Formel  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Ob der Expressionsunterschied signifikant ist, wird mittels ungepaartem zweigeteiltem t-Test festgestellt ( $p < 0,05$ ). Die Identität der PCR-Produkte wird durch Analyse der Schmelzkurven überprüft.

In der vorliegenden Arbeit kommt ausschließlich die relative Quantifizierung zusammen mit 18S-rRNA als Referenzgen zum Einsatz, das in den verschiedenen Versuchen die höchste Konstanz zeigt.

Für die Quantitative Real-time-PCR werden folgende Mengen eingesetzt:

	Volumen
SYBR-Green-qPCR-Supermix	12,5 µl
RNase-freies Wasser	6,5 µl
Primer-Mix	1 µl
cDNA	5 µl
Gesamtvolumen	25 µl

5 ng cDNA werden als Template in folgendem Programm amplifiziert:

	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Enzymaktivierung	50 °C	2 min
2	Vordenaturierung	95 °C	2 min
3	Denaturierung	95 °C	15 s
4	Annealing	primerspezifisch	30 s
5	Elongation	72 °C	30 s
6	Messung		
	40 Zyklen Schritt 3–6		
7	Schmelzkurve	60 °C–95 °C	1 s à 0,5 °C

## 2.10 Proteinisolierung

Die intrazellulären Zytosol- und Kernproteine müssen zuvor aus den zu untersuchenden Zellen und Geweben isoliert werden, um sie später für die Western-Blot- und Dot-Blot-Analyse einsetzen zu können.

### 2.10.1 Proteinisolierung aus Zellen

Zu Beginn werden die Zellen mit Hilfe von Trypsin von den Kulturflaschenböden abgelöst, in PBS aufgenommen und 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, das entstandene Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und erneut für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wird das Pellet in frisch zubereiteten Zellysepuffer (150 µl Triton-Puffer + Proteasen-inhibitor 2 µl/1 ml Triton) lysiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Lösung erneut 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen

Proteine werden in ein neues Eppendorf-Tube überführt und deren Konzentration mittels Bradford-Methode bestimmt.

### 2.10.2 Proteinisolierung aus Gewebe

Die Gewebeprouben werden für den Gewebeaufschluss mit einem Mörser und Pistill direkt in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermahlen. Das Gewebepulver wird bis zur 200- $\mu$ l-Markierung eines 2-ml-Eppendorf-Tube gefüllt, mit 300  $\mu$ l Ripa-Puffer versetzt, mit einem Rotor-Stator-Homogenisator aufgeschlossen und dabei zugleich in dem Lysepuffer homogenisiert. Anschließend wird Phosphataseninhibitor (1 ml/100 ml) und Proteaseninhibitor (2  $\mu$ l/1 ml) hinzugefügt. Dieses Gemisch wird 30 min auf Eis inkubiert und im Anschluss daran für 30 min mit 13000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Die im Überstand gewonnenen Proteine werden in ein 1,5-ml-Eppendorf-Tube überführt und die Proteinkonzentration mit Hilfe der Bradford-Methode gemessen.

### 2.11 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1979) ist eine der gebräuchlichsten kolorimetrischen Methoden. Sie beruht auf der Stabilisierung des Farbstoffs Coomasie Brilliant Blue G-250 durch ionische Wechselwirkungen mit den kationischen Aminogruppen der Proteine im sauren Milieu. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm und verursacht in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration eine intensive Blaufärbung. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung.

Die Proteinbestimmung wird mit Hilfe eines Protein-Assay-Kits bestehend aus Farbstoff, Ethanol und Phosphorsäure durchgeführt. In einer Einmal-Küvette werden 1  $\mu$ l der zu bestimmenden Proteinlösung mit 200  $\mu$ l des Bradford-Reagenz versetzt und mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt. Die Proteinkonzentration der Proben wird durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Spektrophotometer bestimmt. Mit Hilfe einer Standard-Proteineichkurve, die vorher mit dem im Kit enthaltenen Rinderserumalbuminstandard erstellt wurde, wird der Umrechnungsfaktor der optischen Dichte zu  $\mu$ g Gesamtprotein errechnet (0,0781) und damit der Proteingehalt

( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) bestimmt. 800  $\mu\text{l}$  destilliertes Wasser und 200  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz in einer Einmal-Küvette dienen als Leerwert. Die isolierten und gemessenen Proteine werden anschließend bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Mit der Bestimmung der Proteinkonzentration wird gewährleistet, dass bei späteren Analysen gleiche Proteinmengen eingesetzt werden.

## 2.12 SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot-Analyse

Zur Analyse von Proteingemischen werden die Proteine nach der Laemmli-Methode (1972) unter denaturierenden Bedingungen in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz und besteht aus einer aliphatischen Kette von 12 C-Atomen mit einer hydrophilen Sulfatgruppe. Diese Kette lagert sich entlang der Aminosäurenkette der Proteine an und bildet einen SDS-Proteinkomplex, dessen Oberfläche nach außen gerichtete, negative Sulfatgruppen aufweist. Somit wird die Eigenladung des Proteins im Vergleich zur negativen Gesamtladung des SDS-Proteinkomplex vernachlässigbar. Alle Proteine sind damit über ein konstantes Ladung/Masse-Verhältnis vergleichbar und die Mobilität des Proteins ist somit proportional zum Molekulargewicht.

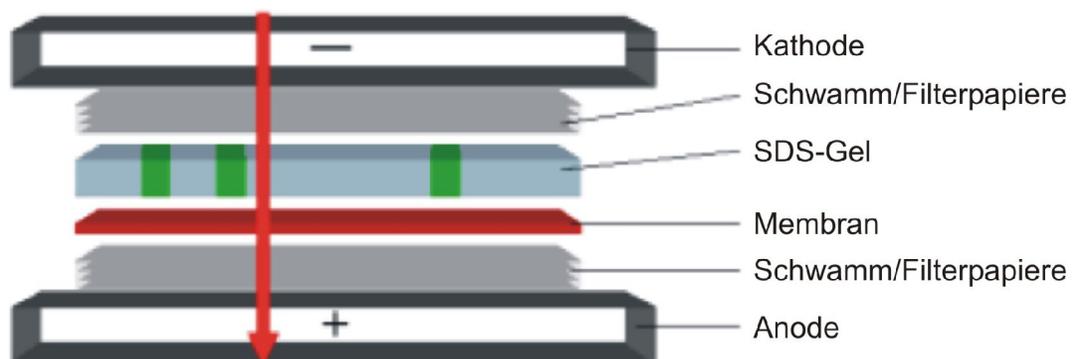
Das Polyacrylamid-Gesamtgel setzt sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammen, deren Konzentration entsprechend der zu erwartenden Proteingröße variiert werden kann. In den vorliegenden Versuchen werden Gele mit einer Acrylamidkonzentration von 10 % verwendet. Dadurch ist es möglich, eine Auftrennung von Proteinen zu erreichen, deren Molekulargewicht zwischen 10 und 60 kDa liegt. Das Trenn- und Sammelgel der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese setzt sich folgendermaßen zusammen:

Bestandteil	10 % Trenngel	4 % Sammelgel
Acrylamid (30 %)	3,32 ml	1 ml
Sol. 2	2,5 ml	-
Sol. 3	-	2,5 ml
Destilliertes Wasser	4,18 ml	6,5 ml
TEMED	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$
APS 10 %	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$

Zu Beginn wird das 10%ige Trenngel in eine Vertikalgelkammer gegossen und mit gesättigtem Butanol bedeckt, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach vollständiger Polymerisation des Gels wird das Butanol restlos entfernt und das Sammelgel aufgegossen, in das zur Ausbildung von Probenaschen ein Kamm eingesetzt wird. Im Anschluss an die Polymerisation des Sammelgels wird das fertige Gel in die Elektrophoresekammer gespannt, die mit Elektrophoreselaufpuffer 1 x SDS-Page-Puffer gefüllt wird, und der Kamm entfernt. Abschließend werden 30 µg der Proteine mit 15 µl Probenpuffer aufgetragen, nachdem die Proben für 5 min bei 90 °C denaturiert und kurz anzentrifugiert worden sind. In die erste Tasche erfolgt die Auftragung von 5 µl eines Molekulargewichtstandards und in die verbleibenden leeren Taschen werden 10 µl des Probenpuffers gefüllt, um einen gleichmäßigen Lauf zu gewährleisten. Die elektrophoretische Trennung erfolgt bei 125 V für 90 min.

### 2.13 Western Blot

Bei der Western-Blot-Analyse werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus einem Polyacrylamid-Trenngel zum späteren immunologischen Nachweis mittels Sandwich-Verfahren auf eine geeignete Membran transferiert. Dazu wird das SDS-Gel luftblasenfrei auf eine Nitrocellulosemembran gelegt, die zuvor 15 min in Transferpuffer äquilibriert wurde. Es folgen sowohl zur Anode als auch zur Kathode hin zwei Lagen mit Transferpuffer angefeuchteten Filterpapiers und zwei bis drei Lagen Schwämme. Alle vier Sandwichkomponenten (SDS-Gel, Filterpapier, Nitrocellulosemembran, Schwamm) werden auf Gelgröße zugeschnitten und zwischen Anode und Kathode gepresst.



**Abb. 4** Schematische Zeichnung eines Western Blot

Anschließend erfolgt der Elektrotransfer (Blot) der Proteine für 90 min bei 25 V und 125 mA. Die Effizienz des Western-Blot-Transfers wird durch Anfärben der Membran mit dem reversiblen Farbstoff Ponceau S kontrolliert. Dazu wird die Membran für 5 Minuten in der Ponceau-S-Farblösung geschwenkt und anschließend mit Wasser entfärbt. Hierbei werden die Proteinbanden sichtbar. Der nachfolgende immunologische Nachweis wird durch die Färbung nicht beeinflusst.

Zu Beginn der Antikörperreaktion erfolgt für eine Stunde die Inkubation der Membran mit 5%igem Milchpulver in TBST für SP-A und 5%igem BSA in TBST für SP-D, um alle unspezifischen Proteinbindungsstellen zu blockieren. Danach wird die Membran mit der primären Antikörperlösung über Nacht bei 4 °C in verschließbaren 50-ml-Polypropylenzentrifugenröhrchen auf einem Kipproller inkubiert. Am nächsten Tag wird dreimal für 15 min mit TBST gespült, um nichtgebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wird die Membran mit dem sekundären Antikörper für 2 Stunden inkubiert. Um den störenden Hintergrund zu entfernen, werden mehrere Waschschrte mit TBST und TBS angeschlossen. Alle weiteren Schritte zur Sichtbarmachung der Proteine wurden mit Hilfe der Enhanced-Chemoluminescence-Methode (ECL) durchgeführt. Dazu wird die Membran 5 min mit jeweils 2 ml ECL-1- und ECL-2-Gemisch inkubiert. Die am Sekundärantikörper haftende Meerrettich-Peroxidase oxidiert unter alkalischen Bedingungen in Gegenwart von Wasserstoffperoxid das zyklische Diacylhydrazid Luminol. Dadurch befindet sich das Luminol kurzzeitig in einem angeregten Zustand. Dieser Zustand wird unter Emission von Lichtquanten wieder verlassen. Phenole verstärken die Reaktion um das 1000-fache und verlängern sie darüber hinaus noch. Die Chemoluminescence auf dem Blot wird in der Dunkelkammer durch das Auflegen eines Röntgenfilms und die damit verbundene Schwärzung lokalisiert. Die Dauer des Auflegens (Belichtungszeit) richtet sich nach der Menge des zu detektierenden Proteins oder der Qualität der Antikörpersysteme und variiert zwischen 5 und 60 Minuten.

## 2.14 Dot Blot

Bei dieser Methode werden für einen spezifischen Nachweis Proteinproben punktförmig (dot) auf eine Nitrocellulosemembran gesaugt. Dies geschieht in einer Apparatur, die mikrotiterplattenartig kleine Löcher aufweist und mit einer Saug-

pumpe in Verbindung steht. Zunächst wird die Membran 20 min mit TBST getränkt und anschließend in die Apparatur eingebracht. 5 bis 10 µl des zu untersuchenden Mediums (Tränen und Kammerwasser) werden in die Slots pipettiert, nachdem diese zweimal mit TBST durchgespült worden sind. Durch Anlegen eines schwachen Unterdrucks von ca. -100 mbar werden die Proteine in die Nitrocellulosemembran absorbiert. Abschließend wird die Membran erneut dreimal mit TBST gespült. Der anschließende Ablauf ist mit einem Western Blot vergleichbar. Die Membran wird zur Absättigung überschüssiger Bindungskapazitäten für eine Stunde mit 5%igem Milchpulver in TBST-Blockpuffer für SP-A und 5%igem BSA in TBST-Blockpuffer für SP-D inkubiert und anschließend mit dem Primärantikörper behandelt. Die Bindung des Sekundärantikörpers wird wie beim Western Blot über die Enhanced-Chemoluminescence-Methode nachgewiesen.

## 2.15 Immunhistochemie

Es werden je 10 gesunde Gewebeproben von Tränendrüsen, Konjunktivae, Corneae, ableitenden Tränenwegen und Lungen mittels Immunhistochemie untersucht. Dazu werden die Präparate wie folgt aufbereitet:

- Fixierung der Gewebeproben in 4 % Paraformaldehyd für 24 Stunden
- Auswaschen der Fixierlösung (24 Stunden fließend wässern)
- Entwässern mit Xylol in einer aufsteigende Alkoholreihe (70 %–100 %)
- Einbettung in Paraplast

Mit dem Grundschlittenmikrotom der Firma Leitz werden Paraffinschnitte von 7 µm Schnittdicke angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Für jede Probe wird eine Negativkontrolle durchgeführt, die statt des Primärantikörpers mit TBS-Puffer inkubiert wird. Als Positivkontrollen dienen für die Surfactantproteine A und D Lungengewebeproben.

### 2.15.1 Immunhistochemischer Nachweis eines Epitopes

Zur Darstellung der Existenz und Verteilung zellulärer Proteine in Geweben wird die Immunhistochemie eingesetzt. Am ersten Tag werden die Objektträger mit den Gewebeschnitten mit Datum, Gewebeart und der Antikörperverdünnung beschriftet. Anschließend werden sie in Küvetteneinsätze sortiert und über Nacht bei 60 °C in den Wärmeschrank gestellt, um das Herauslösen des Paraffins zu erleichtern. Am nächsten Tag werden die Paraffinschnitte in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Endogene Peroxidasen werden mit 3%igem Wasserstoffperoxid geblockt. Die Schnitte werden zur Darstellung der Surfactantproteine A und D zur Epitopdemaskierung in der Mikrowelle nach dem Verfahren von Cattoretti (1993) vorbehandelt. Hierzu werden die Schnitte in eine mit Natriumcitratpuffer (pH 6,0) gefüllte Plastikschaale gestellt und für ca. 10 min in der Mikrowelle gekocht. Nach 5 min wird der Vorgang kurz unterbrochen, um den bereits verdampften Natriumcitratpuffer zu ersetzen. Danach lässt man die Schnitte 20 min abkühlen und spült sie abschließen dreimal mit TBS-Puffer.

Zur Verhinderung einer übermäßig starken, unspezifischen Hintergrundfärbung werden die Schnitte mit Normalserum entsprechend dem Donor des Sekundärantikörpers geblockt. Nach 20 min wird das Serum abgeklopft und die Gewebeschnitte anschließend mit dem Avidin/Biotin-Blocking-Kit behandelt. Nach dem Spülen mit TBS-Puffer wird der Primärantikörper entsprechend den Angaben der Hersteller mit TBS-Puffer verdünnt, auf die Schnitte aufgebracht und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am dritten Tag folgt erneutes Spülen in TBS-Puffer und die Inkubation der Schnitte mit dem entsprechenden biotinylierten Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach abgelaufener Inkubationszeit mit dem Sekundärantikörper werden alle Schnitte dreimal 5 min in TBS-Puffer gespült. Es folgt eine weitere Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Strept-Avidin-Biotin-Komplex für 30 min. Nach abschließendem Spülen in TBS-Puffer werden die Schnitte mit einem AEC-Chromogen inkubiert. Hieraus resultiert bei Vorhandensein des Antigens ein rotes Reaktionsprodukt. Diese Färbemethode basiert auf folgender Grundlage: Streptavidin und Avidin (Hühnereiweiß) zeigen eine hohe Affinität für Biotin und reagieren mit dem zuvor eingesetzten biotinylierten Sekundärantikörper, so dass ein Komplex entsteht. Die Enzymaktivität der Peroxydase wird genutzt, um ein geeignetes Substrat in einen Farbstoff zu überführen. In der vorliegenden Arbeit wird 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) verwendet. AEC bildet unter Oxidation ein rotes

Endprodukt, das alkohollöslich ist. Die Färbezeit richtet sich nach der gewünschten Intensität der rötlichen Färbung des Gewebeschnitts und schwankt zwischen 30 Sekunden und 5 Minuten. Nachdem eine rötliche Färbung sichtbar wird, werden die Schnitte auf eine gesonderte Ablage abgetropft und in destilliertes Wasser überführt. Abschließend werden alle Präparate für 30 Sekunden mit Hämalaun nach Meyer gegengefärbt, erneut mit destilliertem Wasser gespült und mit Aquatex eingedeckt. Die digitale Dokumentation erfolgt mit dem Photomikroskop der Firma Zeiss. AEC ist empfindlich gegenüber fortschreitender Oxidation und starker Lichteinwirkung, so dass die Lagerung der Schnitte im Dunkeln erfolgen muss.

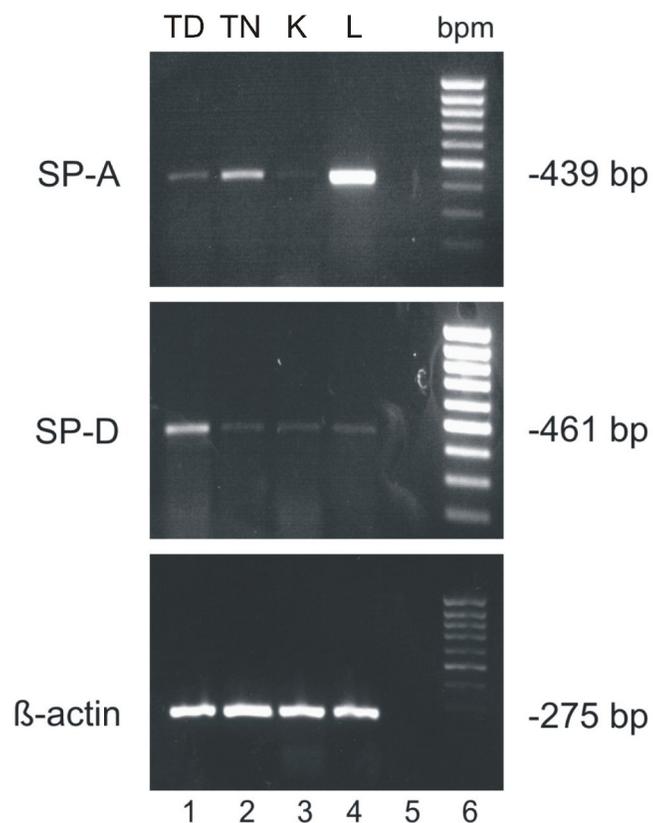
## 2.16 Statistik

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe der Software SigmaStat für Windows. Zur Analyse von drei und mehr Stichproben (Behandlungsgruppen) aus normalverteilten Populationen mit gleicher Varianz wird die Varianzanalyse angewendet. Da dabei lediglich ein Faktor in den unterschiedlichen Mittelwertgruppen untersucht wird, kommt die einfache Varianzanalyse (one-way-ANOVA) zur Anwendung. Hierbei werden Zufallsstichproben mit unbekannter gemeinsamer Varianz untersucht. Zum Vergleich von 3 oder mehreren Gruppen mit Bezug auf eine Kontrolle wird der Bonferroni-T-Test durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Nachweis der Expression von SP-A und SP-D in Tränendrüse, Konjunktiva, Cornea und ableitenden Tränenwegen auf mRNA-Ebene

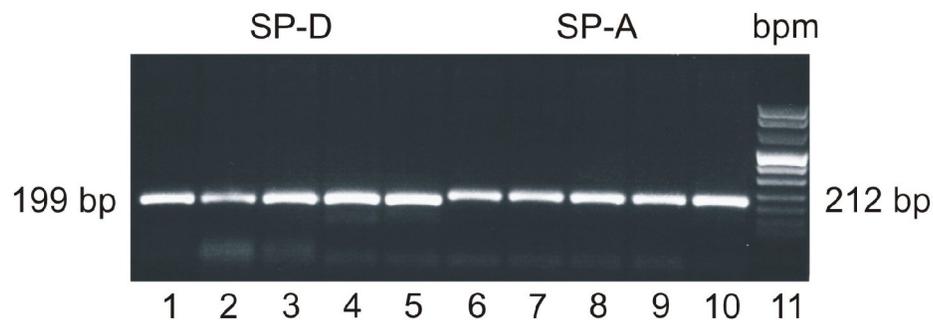
Zum Nachweis der Transkription beider Surfactantproteine in Tränendrüse, Konjunktiva, Cornea und ableitenden Tränenwegen wird aus dem entsprechenden Geweben RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und unter den in 2.7 angegebenen Bedingungen in einer RT-PCR eingesetzt. Die amplifizierten Fragmente werden in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und über eine Ethidiumbromid-färbung unter UV-Licht sichtbar gemacht. Dabei ergeben sich für die Gene von SP-A und SP-D spezifische DNA-Fragmente in allen untersuchten Proben (Abb. 5).



**Abb. 5** Nachweis der Surfactantproteine A und D über eine RT-PCR mit genspezifischen Primern in Tränendrüse (1; TD), Tränennasengang (2; TN), Konjunktiva (3; K), RNA von Lunge (4; L; dient als Positivkontrolle), Leerprobe (5), Größenmarker (6)

Die Länge der Amplifikate beträgt für SP-A 439 bp, für SP-D 461 bp, für  $\beta$ -Aktin 275 bp. Sie entsprechen den aus der Gen-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ermittelten Größen. Zur Validierung der Ergebnisse wird als Positivkontrolle RNA aus Lungengewebe isoliert und für die RT-PCR eingesetzt. Die PCR-Produkte des ubiquitär vorkommenden  $\beta$ -Aktins werden als Referenz für die Integrität der verwendeten cDNA genutzt.

Auch in der Cornea wird die Expression von SP-A und SP-D in allen Proben nachgewiesen. Da sich die RNA-Isolierung aus dem zellarmen Corneagewebe quantitativ als sehr problematisch erweist, wurden die Proben separat von den anderen Gewebeproben untersucht. Im Vergleich zur vorherigen RT-PCR beläuft sich die Länge der Amplifikate für SP-A auf 212 bp und für SP-D auf 199 bp, da bei dieser PCR andere Primer verwendet werden, die auch bei der Real-time-PCR zum Einsatz kommen (Abb. 6).



**Abb. 6** Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate für SP-A und SP-D aus 5 verschiedenen Corneae; SP-D Amplifikat (1–5); SP-A Amplifikat (6–10); Größenmarker (11)

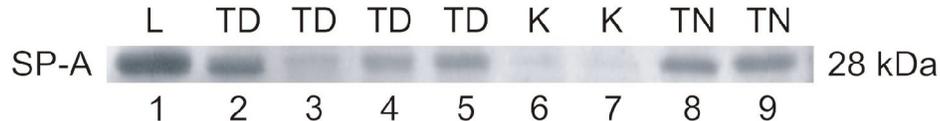
## 3.2 Nachweis auf Proteinebene

Der Nachweis von SP-A und SP-D auf Proteinebene erfolgt mittels Western Blot und Immunhistochemie. Zusätzlich werden Dot-Blot-Analysen durchgeführt.

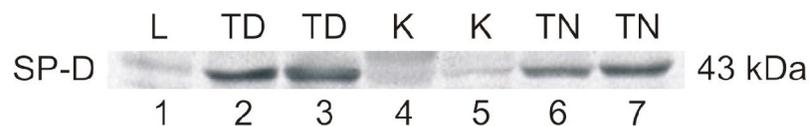
### 3.2.1 Western Blot

Gewebe von Tränendrüse (TD), Konjunktiva (K), Cornea (C) und Tränen-nasengang (TN) werden einer Proteinextraktion unterzogen. Die Extrakte werden mittels Western Blot auf das Vorkommen von SP-A und SP-D analysiert. In allen Proben können so die Surfactantproteine A und D nachgewiesen werden. Dabei zeigen die Proteinextrakte aller Gewebeproben charakteristische Banden bei

28 kDa für SP-A und bei 43 kDa für SP-D. Allerdings ist die Intensität der Banden unterschiedlich. So findet man für SP-A (Abb. 7) die stärkste Bande in Proteinextrakten aus Lungengewebe und die schwächste Bande in Proteinextrakten aus Konjunktiva. SP-D (Abb. 8) zeigt die stärkste Bande im Tränendrüsenextrakt. Proteinextrakte aus Lunge und Konjunktiva reagieren allgemein schwach mit den Antikörpern.

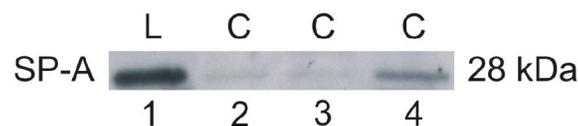


**Abb. 7** Nachweis von SP-A mittels Western Blot, charakteristische SP-A-Bande bei 28 kDa in Proteinextrakten aus Lunge (L, 1), Tränendrüse (TD, 2–5), Konjunktiva (K, 6–7) und Tränennasengang (TN, 8–9)

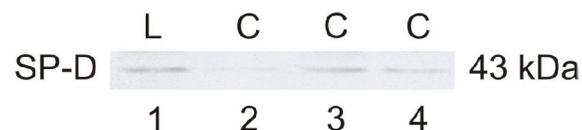


**Abb. 8** Detektion des 43 kDa großen SP-D mittels Western Blot in Proteinextrakt aus Lunge (L, 1), Tränendrüse (TD, 2–3), Konjunktiva (K, 4–5) und Tränennasengang (TN, 6–7)

Im Rahmen der Proteinisolierung aus Corneagewebe war es schwierig, ausreichende Proteinkonzentrationen zu gewinnen, so dass auch die Western-Blot-Analysen separat durchgeführt wurden. Die Extrakte zeigen schwache Banden, belegen aber das Vorkommen von SP-A und SP-D in der Cornea (Abb. 9 und 10).

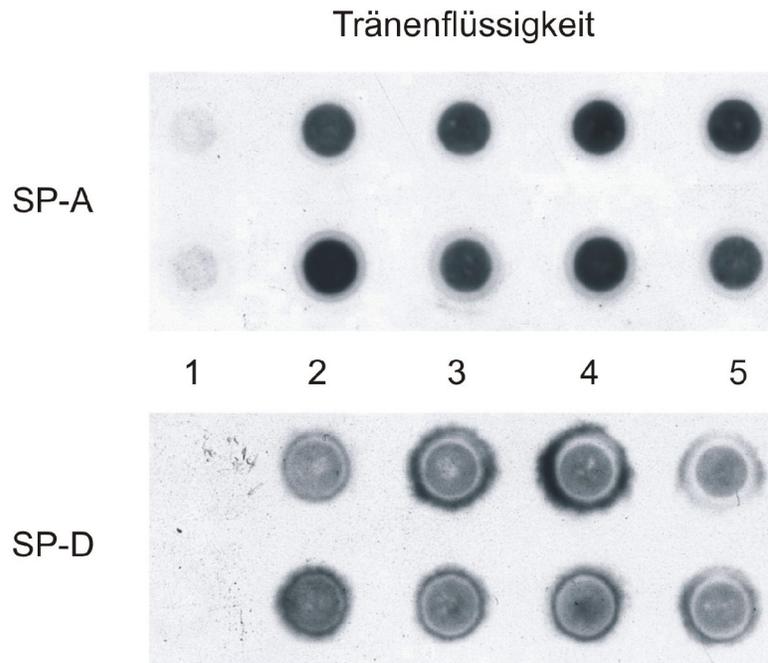


**Abb. 9** Western-Blot-Analyse der Cornea, man erkennt relativ schmale Banden in allen 3 Proteinextrakten (C, 2–4), die das Vorkommen von SP-A (28 kDa) belegen; als Positivkontrolle dient Lunge (L, 1)

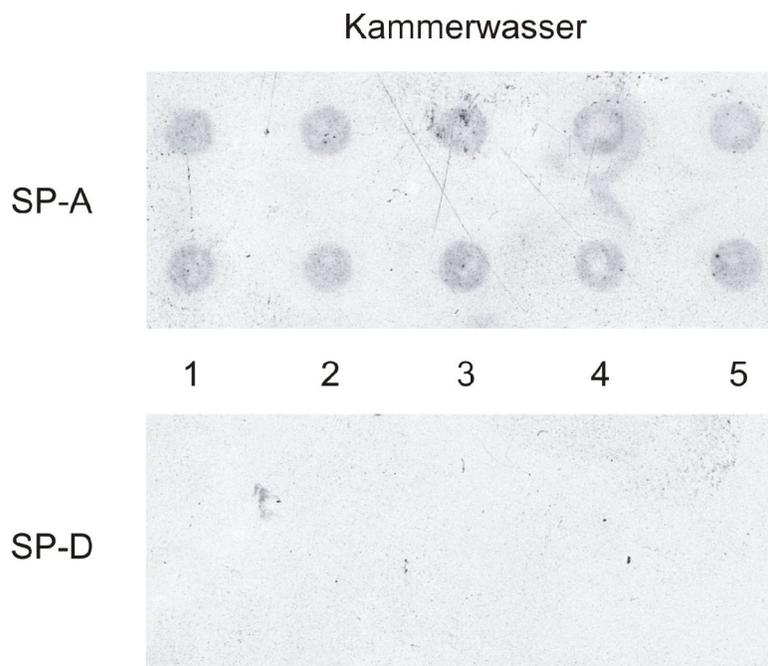


**Abb. 10** Nachweis von SP-D mittels Western Blot, charakteristische SP-D Bande bei 43 kDa in allen 3 Proteinextrakten aus Cornea (C, 2–4) und Lunge (L, 1) als Referenzgewebe

## 3.2.2 Dot Blot



**Abb. 11** Immunodot Blot. Nachweis von SP-A und SP-D in Tränenflüssigkeit (2–5).  
Negativkontrolle (1)



**Abb. 12** Immunodot Blot. Im Kammerwasser sind weder SP-A noch SP-D nachweisbar (2–5). Die Dots sind alle mit der Negativkontrolle (1) vergleichbar

Um zu prüfen, ob in Tränenflüssigkeit, die als Tränenfilm die gesamte Augenoberfläche benetzt, und in Kammerwasser, das die Cornea von der vorderen Augenkammer aus ernährt, Surfactantproteine vorkommen, werden die Flüssigkeiten einer Dot-Blot-Analyse unterzogen. Tränenflüssigkeit wird mittels Kapillarröhrchen gesammelt. Kammerwasser stammt von Patienten der Klinik für Augeneheilkunde, Charité, Berlin (freundlicherweise von Herrn Professor Dr. Uwe Pleyer überlassen) und wurde im Rahmen von Kataraktoperationen entnommen. 5 bis 10 µl des zu untersuchenden Mediums (Tränen oder Kammerwasser) werden in die Slots pipettiert und mit Hilfe des Immunodot Blots analysiert. Als Nullkontrolle dienen 0,1 mg/ml BSA oder TBST-Puffer. Sowohl SP-A als auch SP-D sind in der Tränenflüssigkeit nachweisbar. Kammerwasser führt im Gegensatz dazu zu keinem positiven Dot auf dem Film, so dass man davon ausgehen kann, dass im Kammerwasser keine Surfactantproteine vorkommen oder nur in so schwachen Konzentrationen, dass sie mit dieser Methode nicht erfassbar sind (Abb. 11 und 12).

### 3.2.3 Immunhistochemische Analyse

Die Lokalisation der Surfactantproteine A und D in den einzelnen Geweben erfolgt mittels immunhistochemischer Analyse. Dafür stehen je 10 in Paraffin eingebettete Gewebeproben aus Tränendrüse, Konjunktiva, gesunden und pathologisch veränderten Corneae sowie aus ableitenden Tränenwegen zur Verfügung. Pro Objektträger werden jeweils 2 gleiche Gewebeschnitte analysiert. Einer dient als Negativkontrolle, der nur mit dem Sekundärantikörper behandelt wird und somit ungefärbt bleibt, am anderen wird die eigentliche immunhistochemische Reaktion durchgeführt. Als Positivkontrolle werden zur Gewährleistung der Integrität der verwendeten Antikörper Gewebeschnitte aus Lungengewebe mitgeführt. Außerdem werden stimulierte Zellen aus der Corneaepithelzelllinie (HCE) und der Konjunktivaepithelzelllinie (IOBA-NHC) immunhistochemisch untersucht. Dazu werden die Zellen auf Objektträgern ausgesät, stimuliert und bei einer Konfluenz von 90 % analysiert. Um die einzelnen Färbungen untereinander vergleichbar zu machen, wird die eingesetzte Methode jeweils in einer Antikörper-Verdünnung von 1:50 durchgeführt. Unstimulierte Zellen dienen jeweils als Kontrolle.

### *Tränenendrüse*

Im Zytoplasma der Azinuszellen erkennt man deutlich eine positive Reaktion für SP-A und SP-D (Abb. 13 A, D). Besonders im apikalen Teil der Azinuszellen, nahe dem Lumen, ist die Farbintensität sehr hoch (Abb. 13 A, D, Inlay).

### *Cornea*

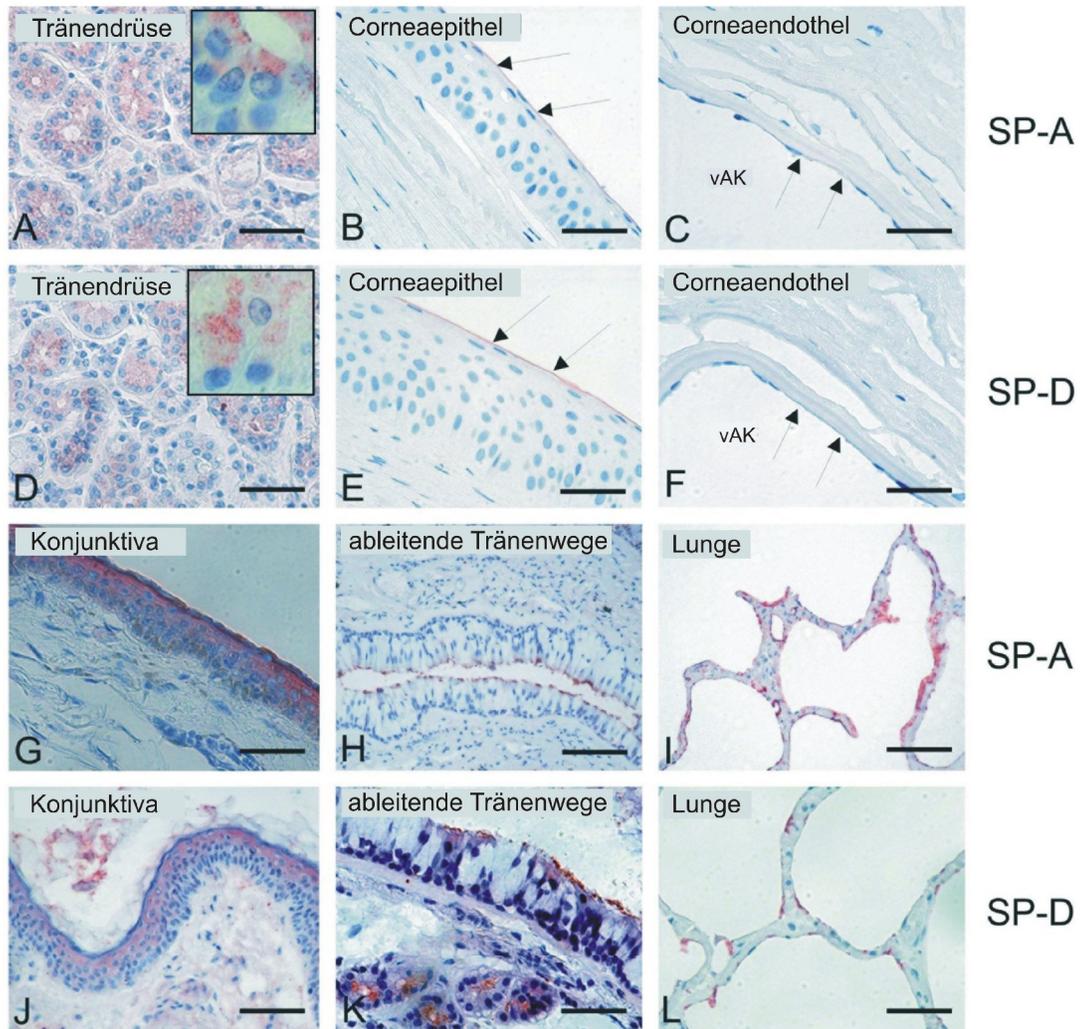
Der immunhistochemische Nachweis von SP-A und SP-D gelingt ausschließlich im Epithel der Cornea. Dabei reagiert lediglich die Oberfläche der obersten Zellschicht des mehrschichtigen Plattenepithels schwach mit dem Antikörper gegen SP-A und SP-D (Abb. 13 B, E). Weder in tieferen epithelialen Zellschichten noch im Stroma der Cornea und im einschichtigen Endothel ist ein positives Reaktionsprodukt für beide Surfactantproteine nachweisbar (Abb. 13 C, F). Einige der Gewebeproben weisen Spaltbildungen im Stroma auf, die als Artefakte zu werten sind.

### *Konjunktiva*

Das mehrschichtige unverhornte Plattenepithel reagiert deutlich mit dem Antikörper gegen SP-A und SP-D. Die Farbintensität nimmt zur Oberfläche hin gut erkennbar zu (Abb. 13 G, J). In der basalen Zellschicht ist nur eine schwache oder gar keine Reaktion erkennbar. In Becherzellen der Konjunktiva konnte keine Reaktion nachgewiesen werden.

### *Ableitende Tränenwege*

SP-A und SP-D werden in allen untersuchten Gewebeproben nachgewiesen. Insbesondere der apikale Anteil der hochprismatischen Epithelzellen des zweireihigen Epithels der ableitenden Tränenwege wird deutlich positiv mit dem Antikörper markiert (Abb. 13 H, K). Dabei gibt es keinen Unterschied für die Verteilung von SP-A und SP-D zwischen Gewebe aus Tränensack und Tränennasengang. In epithelialen Becherzellen und intraepithelialen mukösen Drüsen ist keine immunhistochemische Reaktion für SP-A und SP-D nachweisbar. Dagegen reagieren die serösen Azini sowie das Sekretionsprodukt der subepithelialen seromukösen Drüsen positiv mit dem Antikörper gegen SP-A und SP-D (Abb. 13 K).



**Abb. 13** Immunhistochemischer Nachweis der Surfactantproteine. Positive Reaktion für SP-A und SP-D in den Azinuszellen der Tränendrüse, insbesondere im apikalen, lumennahen Anteil der Zelle (A, D). *Inlays*: vergrößerte einzelne Azinuszellen. Nachweis beider Proteine ausschließlich in den obersten Zellschichten des Epithels gesunder Corneae (B, E), weder im Stroma (B, C, E, F) noch im Endothel der Cornea (C, F, Pfeile) sind die Proteine nachweisbar. Das mehrschichtige unverhornte Plattenepithel der Konjunktiva reagiert deutlich mit dem Antikörper gegen SP-A (G) und SP-D (J). Positives Reaktionsprodukt von SP-A (H) und SP-D (K) im apikalen Anteil der hochprismatischen Epithelzellen der ableitenden Tränenwege. Markierung seröser Azini subepithelialer seromuköser Drüsen mit einem SP-D-Antikörper (K). Humane Lungengewebschnitte als Positivkontrolle. Intensive rote Farbreaktion in Typ-II-Pneumozyten (I, L). vAK = vordere Augenkammer. (A–L) Hämalau. Skalierung: 56 µm (A–G, K). 82,5 µm (H–J, L)

### Lunge

Als Positivkontrolle für alle immunhistochemischen Analysen von SP-A und SP-D dienen Gewebeschnitte aus humaner Lunge. In der Lunge produzieren Typ-II-Pneumozyten die Surfactantproteine. Eindeutig ist die intensive Farbreaktion der

vereinzelt liegenden oder zum Teil in Gruppen zusammen gelagerten Typ-II-Pneumozyten erkennbar (Abb. 13 I, L).

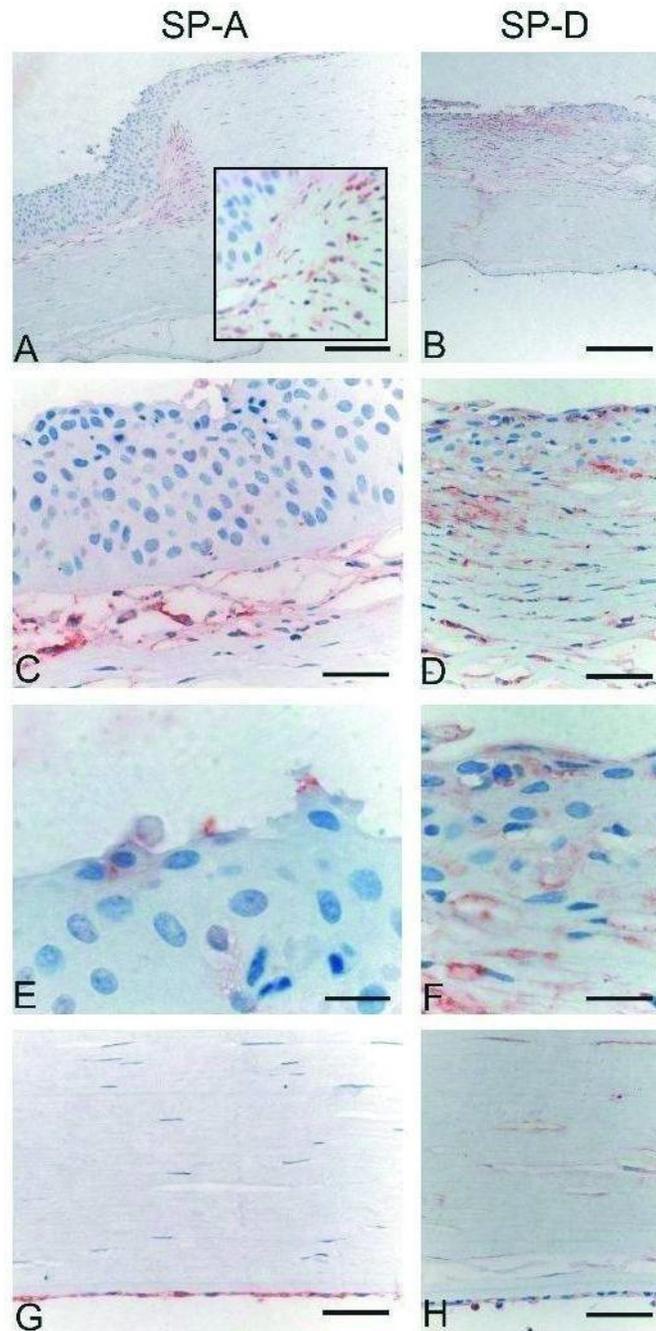
### 3.3 Analyse pathologischer Corneagewebeschnitte

Gewebeschnitte von pathologisch veränderten Corneae werden immunhistochemisch analysiert, um mögliche Veränderungen im Verteilungsmuster der Surfactantproteine zu erfassen. Die dazu benötigten Corneae werden von Patienten der Klinik für Augenheilkunde der CAU Kiel zur Verfügung gestellt (mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. med. Bernhard Nölle), bei denen aufgrund einer bestehenden Krankheit die Cornea chirurgisch entfernt werden musste. Dabei handelt es sich um Herpeskeratitiden, bakterielle Ulcera durch *S. aureus* sowie Keratokoni.

#### *Herpeskeratitis*

Die Herpeskeratitis ist eine Virusinfektion der Hornhaut mit dem Herpes-simplex-Virus und kann in eine oberflächliche (*Keratitis dendritica*) und eine tiefe Form (*Keratitis interstitialis/disciformis*) eingeteilt werden. Bei der oberflächlichen Form ist nur das Epithel betroffen, in dem sich durch zerfallende Virusbläschen astförmig verzweigte Gänge bilden. Die tiefen Formen sind durch eine Schädigung des Hornhautstromas und des Hornhautendothels gekennzeichnet.

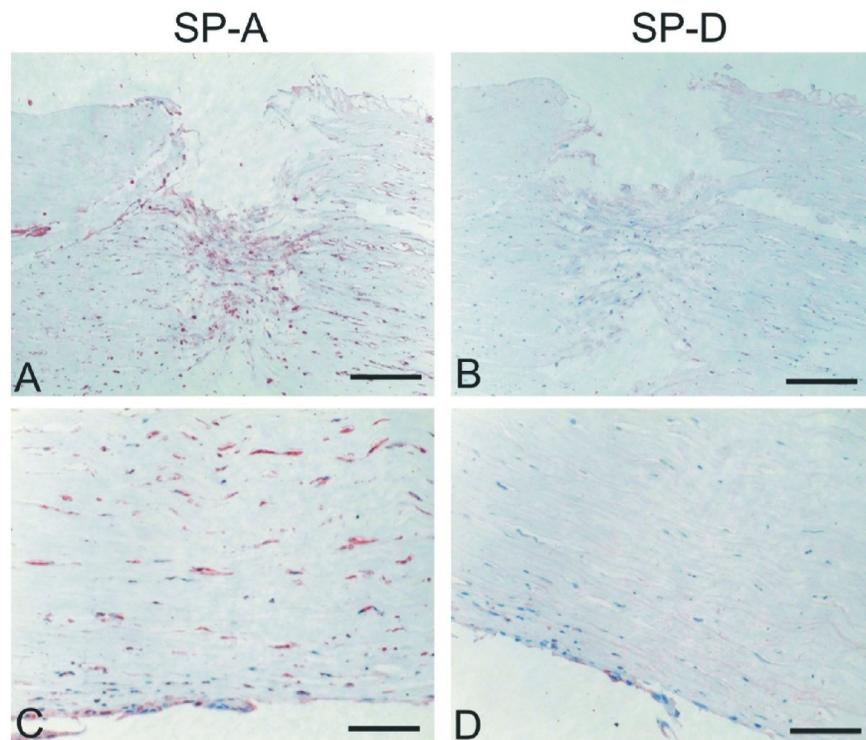
Die immunhistochemische Analyse ergibt im Vergleich zur gesunden Cornea für beide Surfactantproteine eine positive Reaktion innerhalb des gesamten Epithels (Abb. 14 C, D, E, F). Besonders um die herpetischen Läsionen im Epithel und im Stroma ist ein deutliches Reaktionsprodukt für SP-A und SP-D sichtbar (Abb. 14 A, B, C, D). Darüber hinaus werden verschiedene Abwehrzellen (Abb. 14 A – Inlay, D [Vergrößerung von B, in der einige Immunzellen sichtbar sind]), die in das Epithel und Stroma eingewandert sind, durch die Antikörper gegen SP-A und SP-D positiv markiert. Auch das Endothel reagiert mit den Antikörpern gegen SP-A und SP-D und erscheint intensiv gefärbt (Abb. 14 G, H).



**Abb. 14** Immunhistochemischer Nachweis von SP-A und SP-D bei Herpeskeratitis. Positive Reaktionen sind besonders in unmittelbarer Umgebung der Herpesläsionen erkennbar (A, B). Abwehrzellen nahe der Läsion (A, Inlay). In höherer Vergrößerung sieht man das positive Reaktionsprodukt beider Antikörper direkt unter dem Epithel im Stroma (C, D), in Epithelzellen (C, D, E, F) und im Endothel (G, H). (A–H) Hämalaun. Skalierung: 82,5  $\mu\text{m}$  (A, B); 56  $\mu\text{m}$  (C, D, G, H); 14  $\mu\text{m}$  (E, F)

*Bakterielles Ulkus (S. aureus)*

Das bakterielle Ulkus entsteht durch eine Infektion der Augenoberfläche beispielsweise mit *S. aureus*, in deren Folge es zu einem Geschwür der Cornea kommt. Sowohl für SP-A als auch für SP-D ist eine deutliche Farbreaktion im Bereich des Ulkus (Abb. 15 A, B) erkennbar. Im Gegensatz zur gesunden Cornea reagieren die Keratozyten des Stromas und die Endothelzellen mit den Antikörpern gegen SP-A und SP-D positiv (Abb. 15 C, D). Auch in zahlreichen unterschiedlichen Abwehrzellen, die auf Grund der Infektion im Stroma lokalisiert sind, ist eine positive Reaktion erkennbar (Abb. 15 A, B).



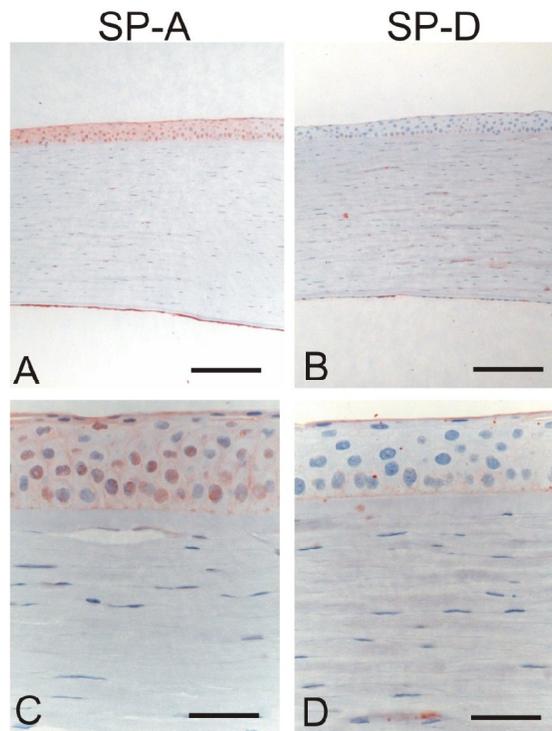
**Abb. 15** Corneaulkus nach einer Infektion mit *S. aureus* (bakterielles Ulkus). Nach Inkubation mit spezifischen Antikörpern gegen SP-A und SP-D zeigen die Zellen am Ulkusgrund und in der Ulkusumgebung eine positive, rote Farbreaktion (A, B). Auch Keratozyten des Stromas und Endothelzellen reagieren mit dem Antikörper gegen SP-A und SP-D (C, D). (A–D) Hämalaun. Skalierung: 112  $\mu\text{m}$  (A, B); 56  $\mu\text{m}$  (C, D)

### *Keratokonus*

Der Keratokonus ist eine kegelförmige Vorwölbung der Cornea, die mit einer Trübung des Parenchyms an der Spitze des Kegels verbunden ist.

Alle Schichten des Epithels, Endothelzellen und vereinzelt Keratozyten im Stroma reagieren positiv mit dem Antikörper gegen SP-A. Dabei ist die intensivste Farbreaktion in den oberflächlichen Epithelzellen und in Endothelzellen zu verzeichnen (Abb. 16 A, D). Das Stroma reagiert nur sehr schwach und vereinzelt (Abb. 16 C).

In der immunhistochemischen Analyse für SP-D werden hauptsächlich die oberflächlichen und die basalen Epithelzellen durch den Antikörper markiert (Abb. 16 B, D). Vereinzelt Zellen im Stroma und einige Endothelzellen reagieren positiv mit dem Antikörper gegen SP-D (Abb. 16 B, D).



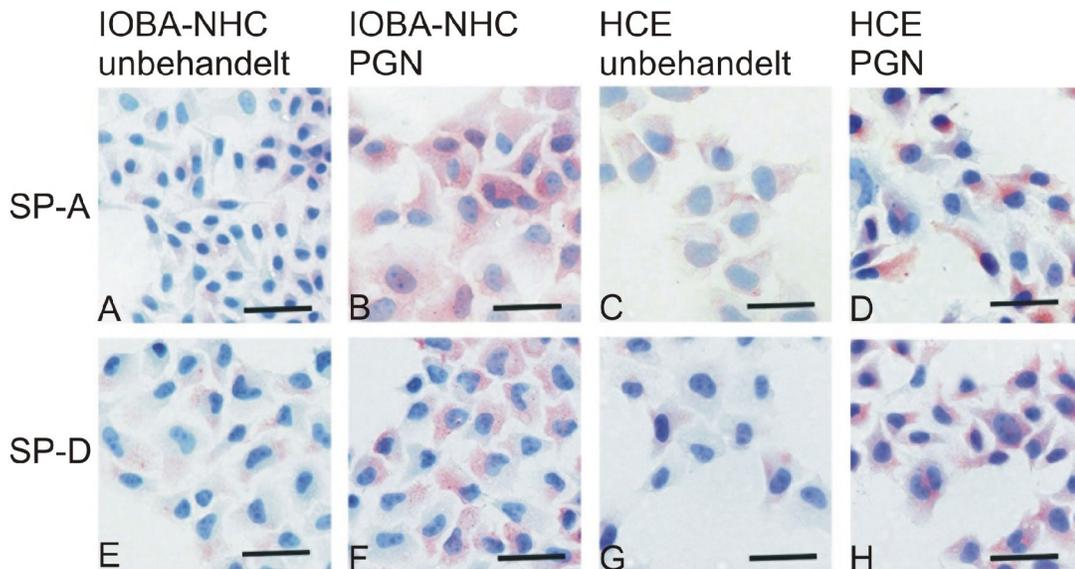
**Abb. 16** Immunhistochemischer Nachweis von SP-A und SP-D in Corneae mit Keratokonus. Positive Reaktionen für SP-A sind besonders im Epithel und Endothel, vereinzelt auch in einzelnen Stromazellen erkennbar (A, C). Der immunhistochemische Nachweis für SP-D gelingt hauptsächlich in oberflächlichen und basalen Epithelzellen, zum Teil auch im Stroma und in Endothelzellen (B, D). (A–D) Hämalan. Skalierung: 32  $\mu\text{m}$  (A, B); 176  $\mu\text{m}$  (C, D)

### 3.4 Stimulierte Zellen aus der Corneaepithelzelllinie (HCE) und der Konjunktivaepithelzelllinie (IOBA-NHC)

Da es an der Augenoberfläche häufig zu Infektionen kommt, soll im Versuch geklärt werden, ob verschiedene Entzündungsmediatoren die Expressionsstärke der Surfactantproteine beeinflussen. Dazu werden die Zellen der Konjunktiva-zelllinie (IOBA-NHC) und der Corneaepithelzelllinie (HCE) mit unterschiedlichen Zytokinen und bakteriellen Zellwandbestandteilen stimuliert, denen im Rahmen von Entzündungsprozessen eine große Bedeutung zukommt. Beide Zelllinien werden mit Interleukin-1alpha (Il-1 $\alpha$ ), Interleukin-1beta (Il-1 $\beta$ ), Lipopoly-sacchariden (LPS), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), Interferon-gamma (INF- $\gamma$ ) und Peptidoglycan (PGN) für jeweils 6 Stunden inkubiert. Eine unbehandelte Kontrolle wird mitgeführt. Im Anschluss werden immunhistochemische Analysen und je 3 unabhängige Real-time-PCRs durchgeführt. Da trotz zahlreicher Ansätze für SP-D nur unspezifische Amplifikationsprodukte resultierten, kann nur für SP-A eine Aussage getroffen werden.

#### 3.4.1 Immunhistochemische Analyse der relativen Expression

Sowohl in der Konjunktivazelllinie (IOBA-NHC) als auch in der Cornea-epithelzelllinie (HCE) ist bereits vor der Stimulation in 8 unabhängigen Kulturen eine positive Immunreaktion für beide Surfactantproteine nachweisbar (Abb. 17 A, E – unbehandelt). Nach der Stimulation der Zelllinien mit verschiedenen Zytokinen und bakteriellen Komponenten sind für SP-A und für SP-D deutliche Reaktionen erkennbar (Abb. 17 B, D, F, H). Subjektiv ist die immunhistochemische Reaktion in stimulierten Zellen intensiver als in unbehandelten. Dabei ist das Ergebnis unabhängig von den eingesetzten Stimulanzien. Stellvertretend für alle ein-gesetzten Stimulantien werden die Ergebnisse beispielhaft für Peptidoglycan (PGN) demonstriert (Abb. 17).

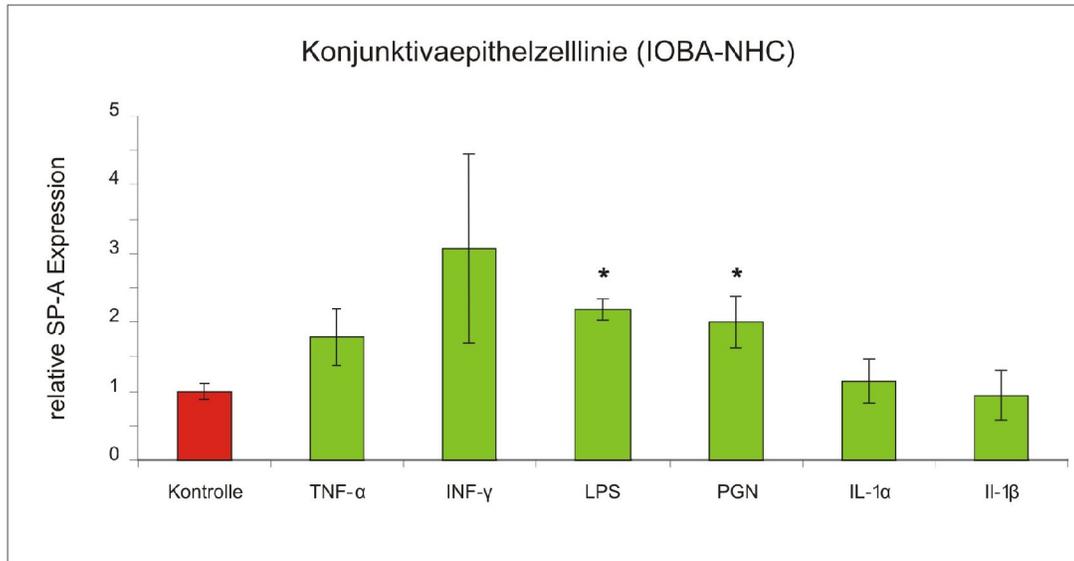


**Abb. 17** Immunhistochemische Analysen in kultivierten Zellen der Konjunktiva- (IOBA-NHC) und Corneaepithelzelllinie (HCE). Die rote Farbreaktion beweist das Vorkommen von SP-A und SP-D im Zytoplasma der Epithelzellen. Die Abbildungen sind charakteristisch für jeweils 8 unabhängige Zellkulturen mit und ohne Stimulation. Skalierung: 32,5  $\mu\text{m}$  (A), 15  $\mu\text{m}$  (B-H)

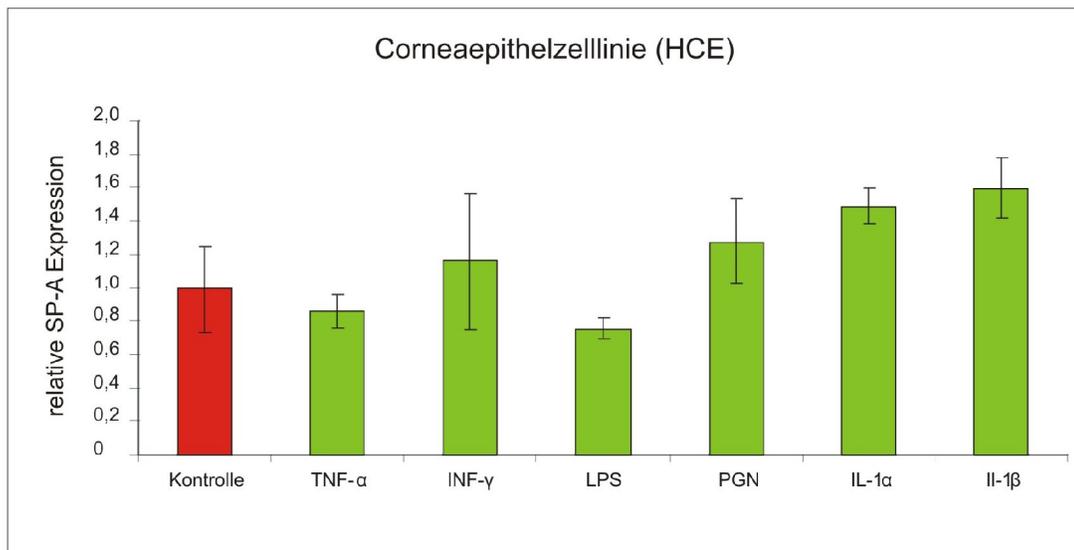
### 3.4.2 Bestimmung der relativen Expression mittels Real-time-PCR

Die Real-time-PCR ergibt, dass die relative SP-A-Expression in der Konjunktivaepithelzelllinie (IOBA-NHC) am stärksten nach Stimulation mit  $\text{INF-}\gamma$  ansteigt. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, die gleich eins gesetzt wird, erhöht sich die Expression um das Dreifache. Nach Stimulation mit LPS, PGN und  $\text{TNF-}\alpha$  wird SP-A zweifach mehr transkribiert als in unbehandelten Zellen.  $\text{IL-1}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  haben keinen Einfluss auf die Expressionsstärke (Abb. 18).

Die SP-A-Expression wird auch in den Zellen der Corneaepithelzelllinie (HCE) beeinflusst. Dabei haben  $\text{IL-1}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  mit 1,6- und 1,5-facher Expression die größte Wirkung auf die SP-A-Expressionsstärke.  $\text{INF-}\gamma$  und PGN erhöhen die Expression nur um den Faktor 1,2.  $\text{TNF-}\alpha$  und LPS führen im Gegensatz dazu zu einer Reduktion der relativen Expression von SP-A (Abb. 19).



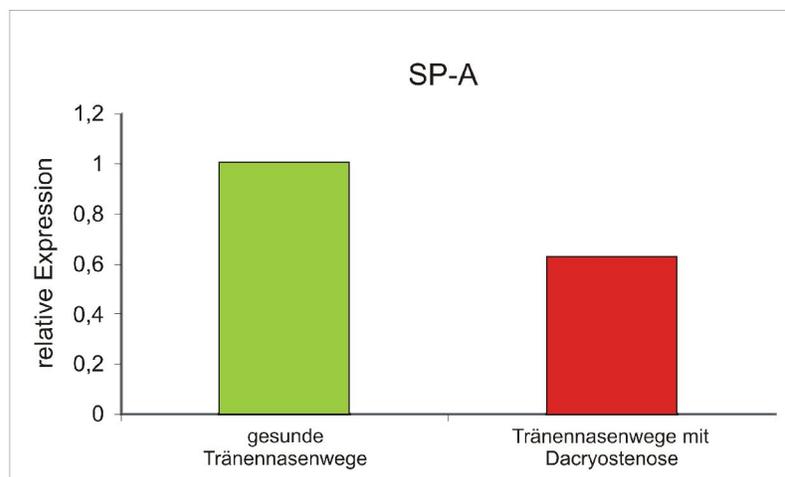
**Abb. 18** Relative Quantifizierung der SP-A-Expression in Zellen der Konjunktivaepithelzelllinie nach Stimulation mit Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), Interferon-gamma (INF- $\gamma$ ), Lipopolysacchariden (LPS), Peptidoglycan (PGN), Interleukin-1alpha (IL-1 $\alpha$ ) und Interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ). Als Kontrolle dienen unbehandelte Konjunktivazellen, die gleich eins (100 %) gesetzt worden sind. (n=3, \*=p<0,05 im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle)



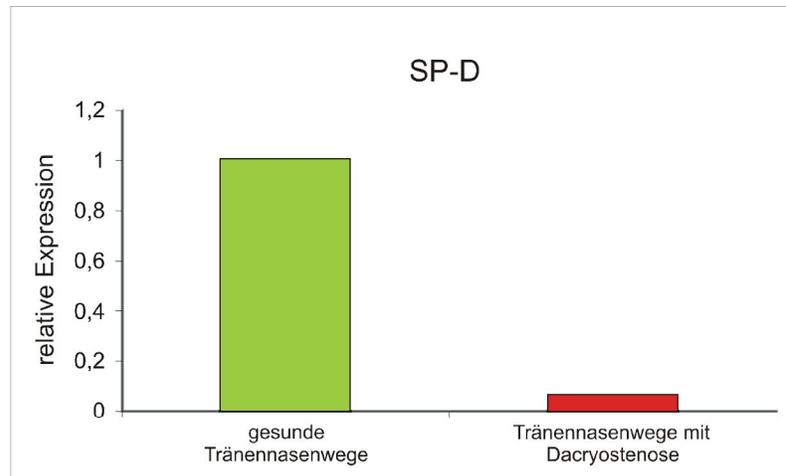
**Abb. 19** Semiquantitative Auswertung der SP-A-Expression in Zellen der Corneaepithelzelllinie nach 6-stündiger Stimulierung mit Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), Interferon-gamma (INF- $\gamma$ ), Lipopolysacchariden (LPS), Peptidoglycan (PGN), Interleukin-1alpha (IL-1 $\alpha$ ) und Interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ). Die Werte beziehen sich auf unbehandelte Corneaepithelzellen. (n=3, \*=p<0,05 im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle)

### 3.5 Beeinflussung der Expressionstärke von SP-A und SP-D in stenosierten ableitenden Tränenwegen (Dacryostenose)

Dakryozystitiden (Entzündungen der ableitenden Tränenwege) führen häufig zu einer Stenose mit Epiphora auf Grund einer Tränenabflussbehinderung. Sie zählen zu den häufigsten Erkrankungen des Tränenableitungssystems. Über die genaue Pathogenese und die Abwehrmechanismen der beteiligten Strukturen in den ableitenden Tränenwegen ist noch wenig bekannt. Die Analyse der relativen Surfactantprotein-Expression in den erkrankten Geweben soll Aufschluss geben, ob SP-A und SP-D einen Einfluss auf das Krankheitsgeschehen haben. Die dazu benötigten stenosierten Tränenwege werden von Patienten der Universitäts-HNO-Klinik Hamburg-Eppendorf gewonnen (freundlicherweise durch Herrn PD Dr. med. Ulrich Schaudig zur Verfügung gestellt), die auf Grund einer bestehenden Dacryostenose operiert werden mussten. Aus dem gewonnenen Material wird RNA isoliert und mittels Real-time-PCR die relative Expressionsstärke bestimmt. Gewebe aus gesunden Tränenwegen von Körperspendern dient dabei als Referenzgewebe.



**Abb. 20** Relative Quantifizierung der SP-A-Expression in gesunden und stenosierten ableitenden Tränenwegen. Die Expressionstärke der gesunden Gewebeproben wird gleich eins gesetzt und dient als Referenzwert für die pathologischen Gewebeproben.



**Abb. 21** Relative Quantifizierung der SP-D-Expression in gesunden ableitenden Tränenwegen und in ableitenden Tränenwegen mit Dacryostenose. Die Expressionsstärke der pathologischen Gewebeprobe wird im Verhältnis zu den gesunden Gewebeprobe beurteilt.

Es ist eine Reduktion der relativen Expressionsstärken von SP-A und SP-D in Gewebeprobe von Patienten mit Tränenwegstenosen nachweisbar. Der Befund ist für SP-D besonders ausgeprägt (Abb. 21). Die SP-A-Expression wird nahezu um die Hälfte vermindert (Abb. 20).

## 4 Diskussion

### 4.1 Lokalisation der Surfactantproteine A und D in Geweben der Augenoberfläche und des Tränensystems

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse demonstrieren, dass außer SP-D auch SP-A in Geweben des menschlichen Tränenapparates und in Tränenflüssigkeit sowie in kultivierten immortalisierten humanen cornealen (HCE) und konjunktivalen Epithelzellen (NHC) vorkommt. Demnach müssen die vorausgehenden Ergebnisse von Stahlmann et al. und Ni et al., die behaupten, dass SP-A weder in der Tränendrüse noch in Tränenflüssigkeit existiert, revidiert werden (Stahlman et al. 2002; Ni et al. 2005). Die Erstbeschreibung von SP-A in der Tränendrüse muss folglich Dobbie et al. zugeschrieben werden. Er und Kollegen wiesen mittels Immunhistochemie nach, dass SP-A im Rahmen rheumatischer Erkrankungen in der Tränendrüse gebildet wird (Dobbie et al. 1994).

Um umfassende Aussagen über die Synthese von SP-A und SP-D erheben zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit alle Gewebeproben mittels RT-PCR, Real-time-PCR, Western Blot und Immunhistochemie analysiert. Das gewonnene Kammerwasser und die Tränenflüssigkeit wurden mit Hilfe von Dot-Blot-Analysen untersucht. Die daraus erhobenen Befunde beweisen die Existenz von SP-A und SP-D im gesamten menschlichen Tränenapparat (Tränendrüse, ableitende Tränenwege) und in der Tränenflüssigkeit sowie im Epithel von Cornea und Konjunktiva. Beide Proteine wurden zunächst auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR in allen untersuchten Gewebeproben detektiert. Als Referenz für die Integrität der verwendeten cDNA wurde  $\beta$ -Aktin amplifiziert. Auf Proteinebene wurden SP-A und SP-D durch spezifische Antikörper in allen Proben mittels Western-Blot-Analysen nachgewiesen. Zur Untersuchung der Tränenflüssigkeit und des Kammerwassers kam zusätzlich der Dot Blot zum Einsatz. Interessanterweise konnten nur in Tränenflüssigkeit beide Proteine nachgewiesen werden. Im Kammerwasser kam es im Gegensatz dazu zu keiner spezifischen Antikörperreaktion. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass entweder die Konzentration im Kammerwasser unter der Nachweisgrenze liegt, oder dass die Surfactantproteine im Kammerwasser nicht vorkommen. Letzteres unterstreicht das Phänomen des Immunprivileges, ein immunologischer Sonderstatus mit reduzierter Aktivierbarkeit des spezifischen und des unspezifischen Immunsystems. Dieser Zustand lokaler Immunsuppression

äußert sich in verzögerter oder gänzlich unterdrückter Abstoßung allogenetischer Transplantate in diesen Organen und ermöglicht somit ein verlängertes Überleben von histoinkompatiblen Geweben (Shirai 1921; Medawar 1948). Zu den immunprivilegierten Organen zählt man das Gehirn, einige endokrine Organe (Nebenniere, Ovar, Testis), die fetoplazentare Einheit und das Auge (Medawar 1948; Streilein 1995, 1996). Bereits vor über 100 Jahren entdeckte Van Dooremal (1873), dass in die Augenvorderkammer implantiertes Fremdgewebe eine verlängerte Überlebensrate im Vergleich zu subkutan implantiertem Fremdgewebe aufwies (Van Dooremal 1873). Das Immunprivileg des Auges beschränkt sich ausschließlich auf intraokuläre Kompartimente und ist von lokalen anatomischen Besonderheiten abhängig. Dazu zählt die hämato-okuläre Barriere, die man in Blut-Kammerwasser-Schranke und Blut-Retina-Schranke unterteilt. Sie verhindert einen unkontrollierten Zugang von spezifischen und unspezifischen Entzündungsmediatoren aus dem Blutkreislauf. Das intraokuläre Kompartiment besitzt außerdem kein typisches Lymphgefäßsystem. Der Abtransport intraokulärer Stoffe wird hauptsächlich über das Trabekelwerk und den Schlemm-Kanal in das venöse System realisiert. Dadurch wird die Milz unter Umgehung des peripheren Lymphsystems direkt erreicht (Grisanti 1998). Der immunregulatorische Mechanismus des Auges hat sich offenbar entwickelt, um die empfindlichen Strukturen des Auges vor gewebsschädigenden Entzündungsreaktionen zu schützen. Jede intraokuläre Entzündung und Immunreaktion hätte nicht kompensierbare deletäre Folgen, die aufgrund der limitierten Regenerationsfähigkeit der Augengewebe zur Visusminderung oder gar zur Erblindung führen könnte. Da die Surfactantproteine ebenfalls entzündungsmodulierende Eigenschaften besitzen, ist es nicht verwunderlich, dass sie im Kammerwasser Gesunder nicht vorkommen.

Immunhistochemische Analysen bestätigen die bisher gewonnenen Resultate. Deutlich ist eine positive Reaktion von SP-A und SP-D im Zytoplasma in Drüsenzellen der Tränendrüse und an der Oberfläche des hochprismatischen Epithels von Tränensack und Tränennasengang zu erkennen. Ferner werden die Superfizialzellen der Cornea, die oberflächlichen Zellschichten der Konjunktiva sowie das Zytoplasma kultivierter HCE- und NHC-Zelllinien durch die Antikörper gegen SP-A und SP-D positiv markiert. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass beide Proteine in den untersuchten Geweben produziert werden. Auffällig ist dabei das Verteilungsmuster der Collectine in den einzelnen Zellen oder Geweben. So ist die

intensivste Farbreaktion im apikalen Bereich der Tränendrüsenzellen und der hochprismatischen Epithelzelle der ableitenden Tränenwege erkennbar. Ein vergleichbarer Befund ergibt sich für das Epithel von Konjunktiva und Cornea. Auch hier nimmt die Intensität oberflächenwärts deutlich zu oder ist in Bezug zur Cornea ausschließlich an der Oberfläche zu finden. Vermutlich werden SP-A und SP-D in der Tränendrüse zusammen mit der wässrigen Komponente des Tränenfilms sezerniert und durch den Lidschlag auf der Augenoberfläche verteilt. Zusammen mit den Surfactantproteinen A und D der Konjunktiva und Cornea ist eine flächendeckende Verteilung gewährleistet. Auch in den ableitenden Tränenwegen scheinen beide Proteine in Form von Granula zusammen mit dem Sekret der subepithelialen Drüsen, die ebenfalls positiv auf SP-A und SP-D reagieren, in das Lumen von Tränensack und Tränennasenweg abgegeben zu werden und sich auf der Schleimhaut zu verteilen. Zusammenfassend kommen SP-A und SP-D hauptsächlich oberflächlich in oder auf allen Epithelien der Augenoberfläche und der ableitenden Tränenwege vor, so dass sie ihrer Rolle als wichtiger Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr insbesondere auf Schleimhäuten gerecht werden können.

Im Hinblick auf SP-D waren die Ergebnisse größtenteils zu erwarten, da die Synthese von SP-D schon in unterschiedlichen Schleimhäuten und Geweben nachgewiesen wurde (Madsen et al. 2000), darunter auch in Tränendrüsen vom Schwein, vom Rind und vom Menschen (Stahlman et al. 2002; Akiyama 2002) sowie in Tränenflüssigkeit des Menschen (Soerensen 2005). Interessanterweise wiesen Ni und Kollegen in ihren Studien an Mäusen SP-D in allen Epithelzellschichten der Cornea nach. In der vorliegenden Arbeit ist SP-D nur in den obersten Zelllagen des Epithels, den Superfizialzellen, detektierbar. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Expression der Surfactantproteine unter physiologischen Bedingungen gewebe- und speziesspezifisch ist. Andererseits könnten die Surfactantproteine aufgrund des Alters der Körperspender schon teilweise zerfallen sein und damit keine oder nur eine geringe Reaktion im Epithel auslösen. Im Gegensatz dazu ist das Verteilungsmuster der Proteine unter pathologischen Bedingungen mit der Maus vergleichbar. Dennoch verdeutlichen die vorliegenden Ergebnisse speziesspezifische Unterschiede, insbesondere für SP-A. So scheinen SP-A und SP-D eine synergistische Wirkung aufeinander zu haben, denn beide Proteine kommen sowohl im humanen Tränenapparat als auch

auf der Augenoberfläche immer gemeinsam vor. Im Gegensatz dazu ist bei Mäusen, zumindest in C57/BL6-Wildtyp-Mäusen, SP-A nur im Lungengewebe nachweisbar. Im Tränenapparat dieser Mäuse konnte SP-A nicht detektiert werden (Akiyama 2002). Deshalb sind für die weitere Erforschung der Funktionen von SP-A im Rahmen der angeborenen Immunabwehr des Tränensystems nur Mäuse von Nutzen, die das Protein überexprimieren. Zur Charakterisierung von SP-D können im Gegensatz dazu SP-D-Knockout-Mäuse als auch SP-D-überexprimierende Mäuse eingesetzt werden.

#### 4.2 Verteilungsmuster von SP-A und SP-D in pathologisch veränderten Gewebeschnitten der Cornea

Interessante Rückschlüsse auf den Einfluss der beiden Collectine auf die Immunabwehr am Auge lassen Untersuchungen an pathologischen Gewebeproben zu. In der vorliegenden Arbeit werden Corneae mit Ulcerationen durch *S. aureus*, Herpes-Keratitis und Keratokonus untersucht. Im Stroma und im Endothel gesunder Corneae lassen sich kein SP-A oder SP-D im Rahmen der Immunhistochemie nachweisen. Im Vergleich dazu kommt es im Stroma und im Endothel der Cornea in den untersuchten pathologischen Gewebeproben zu einer positiven Reaktion. Der Befund lässt die Vermutung zu, dass die Produktion beider Proteine entweder in gesunden Geweben induzierbar ist oder sich hochregulieren lässt. Auch die Immigration beider Proteine vom Corneaepithel aus in das Stroma bis hin zum Endothel ist aufgrund der destruirenden Entzündungsreaktion möglich.

Die stromale herpetische Keratitis stellt eine der häufigsten Erblindungsursachen in der Welt dar und wird als klassisches Modell einer virusinduzierten immunpathologischen Erkrankung aufgefasst (Pepose et al. 1991, 1992). Die corneale Läsion und somit der Visusverlust wird nicht durch die gewebschädigende Wirkung des Virus verursacht, sondern durch eine stromale Infiltration der Cornea mit Virus-spezifischen T-Lymphozyten und die daraus resultierende T-Zell-vermittelte Zytolyse infizierter Zellen (Russel et al. 1984). Dies führt jedoch auch unweigerlich zu nicht kompensierbaren Defekten der Cornea und damit zur Visusminderung. Für den immunpathologischen Entzündungsprozess werden verschiedene Theorien diskutiert. So wird unter anderem die

Sekretion bestimmter Zytokine in Erwägung gezogen, die zu einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen, zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen durch Makrophagen und zur Ankopplung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten mit folgender Hornhautschädigung führen (Jaeschke und Smith 1997). Genau in dieses Schema passen ebenfalls SP-A und SP-D aufgrund ihrer vielfältigen bisher beschriebenen Funktionen. So gehen Kuronuma und Kollegen (2004) davon aus, dass beispielsweise SP-A die Phagozytose von *S. pneumoniae* durch die Zunahme der Scavenger-Rezeptor-A-Expression auf der Zelloberfläche verbessert. Ebenfalls wird die verstärkte Expression des Mannose-Rezeptors auf Makrophagen durch SP-A beschrieben (Beharka et al. 2002). Darüber hinaus induzieren beide Proteine die Synthese toxischer Sauerstoff- und Stickstoffmetabolite in Makrophagen, die zur Elimination der Pathogene führt (van Iwaarden 1990). Aktuelle Studien sehen die Surfactantproteine sogar als Schnittstelle zwischen spezifischer und unspezifischer Immunabwehr, da sie die Funktion dendritischer Zellen und von T-Lymphozyten modulieren können (Shepherd 2002). Zumindest in der Lunge hemmt SP-A die Reifung dendritischer Zellen und SP-D fördert die Aufnahme von Pathogenen in dendritische Zellen. Abgesehen davon haben beide Proteine einen supprimierenden Effekt auf die Aktivierung der T-Lymphozyten im Alveolarraum. Dazu passend demonstrierten van Iwaarden und Kollegen 1991, dass SP-A Herpes-simplex-Viren vom Typ I opsonieren und dadurch die Phagozytose durch Makrophagen beschleunigen kann. Einerseits könnten die Surfactantproteine A und D durch Bindung und Opsonierung des Herpesvirus die Aktivierung spezifischer, destruierender T-Lymphozyten im Auge mit induzieren, und damit die Genese der Keratitis fördern, oder andererseits durch eine direkte Hemmung der T-Lymphozyten die Genese hemmen. In den vorliegenden immunhistochemischen Untersuchungen der Gewebeschnitte mit Herpeskeratitis erscheinen SP-A und SP-D hauptsächlich in Assoziation mit den Herpesläsionen im Epithel, im Stroma und sogar im Endothel der Cornea. Ähnliche Beobachtungen machten Steven et al. (2004) mit Trefoil-Family-Factor-Peptid 3 (TFF3). TFF3 wird in gesunder Cornea nicht exprimiert, ist jedoch nach einer Herpesinfektion im geschädigten Epithel und im Stroma um die herpetische Läsion der Cornea nachweisbar. Die Trefoil-Family-Factor-Peptide (TFF) sind in der Konjunktiva (Langer et al. 1999) und in den ableitenden Tränenwegen (Paulsen et al. 2002) beschrieben worden. Ihr Name leitet sich von ihrer Kleeblatt-

Struktur ab, die durch Disulfidbrücken gebildet wird. Als ein Bestandteil des Tränenfilms sind sie in der Lage, mit den Muzinen des Tränenfilms Quervernetzungen zu bilden und dadurch die Rheologie des Tränenfilms zu beeinflussen (Paulsen et al. 2006; Paulsen und Berry 2006). TFF-Peptide werden ansonsten von Schleim produzierenden Epithelien, vor allem im Gastrointestinaltrakt, sezerniert (Wright 1997). Sie beschleunigen die Zellmigration (motogene Eigenschaften), wirken antiapoptotisch und modulieren entzündliche Prozesse. Vor kurzem wurde beschrieben, dass sie signifikant die corneale Wundheilung beschleunigen (Paulsen et al. 2008). Zusammen mit SP-A und SP-D beeinflussen sie so möglicherweise den Krankheitsverlauf cornealer Erkrankungen.

Eine weitere ernstzunehmende Augenentzündung ist die häufig durch *S. aureus* verursachte bakterielle Keratitis. Auf der Grundlage dieser Entzündung entwickeln sich sehr oft Hornhautgeschwüre oder Hornhautulzerationen, die zur Beeinträchtigung der Sehleistung führen können. Im Rahmen der Infektion können SP-A und SP-D ebenfalls einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben. Eine der ersten Studien, die demonstrierte, dass Surfactant immunmodulatorische Eigenschaften besitzt, bewies den positiven Effekt von Surfactant auf das Abtöten von *S. aureus* durch Alveolarmakrophagen (La Force 1973). In weiteren Studien wurde gezeigt, dass vor allem SP-A *S. aureus* bindet, agglutiniert und Abwehrzellen präsentieren kann und dadurch die Abwehr des Keimes fördert (Van Iwaarden 1990; Kuan 1992; Kahba 1997). Immunhistochemisch lassen sich beide Proteine im Epithel, im Stroma und im Endothel der Cornea nachweisen. Besonders in der Umgebung und um den Ulkusgrund ist die positive Farbreaktion sichtbar. Jedoch gibt es einen deutlichen Unterschied im Reaktionsverhalten zwischen SP-A und SP-D. SP-A reagiert äußerst intensiv mit dem Antikörper; SP-D zeigt im Gegensatz dazu nur eine sehr schwache Reaktion. Der Befund bekräftigt die These, dass vor allen Dingen SP-A mit *S. aureus* interagiert und die Wirkung collectin- und pathogenabhängig ist.

Beim Keratokonus, einer nicht entzündlichen Augenerkrankung, ist ebenfalls ein verändertes Verteilungsmuster der Surfactantproteine A und D im Vergleich zur gesunden Cornea nachweisbar. Beide Proteine wurden durch immunhistochemische Verfahren in allen Zellschichten der Cornea detektiert. Ein Keratokonus ist eine angeborene Erkrankung der Hornhaut und gehört zur großen Gruppe der Hornhautdystrophien. Typischerweise ist die Erkrankung durch eine veränderte

Struktur des Hornhautgewebes mit dadurch bedingter Verdünnung und kegelförmiger oder konischer Vorwölbung zentraler Hornhautanteile charakterisiert. Die Häufigkeit des Auftretens eines Keratokonus in der Normalbevölkerung beträgt etwa 1:2000. Histologisch werden unspezifisch regressive Epithelveränderungen und Risse in der Bowman-Membran beschrieben. Im fortgeschrittenen Stadium kann es durch die Dehnung zu Einrissen der Descemet-Membran und zur membranartigen Anhebung des Endothels kommen (Chi et al. 1956; Günther 1958). Insgesamt führen alle diese Veränderungen zu einer Zerstörung der cornealen Struktur und machen das Auge somit infektionsanfällig. Deshalb könnten angepasste Schutzmechanismen, wie beispielsweise die antimikrobiellen Effekte von SP-A und SP-D, die ihrerseits von den betroffenen Geweben produziert werden, von großem Nutzen sein. Im Vorfeld wurde diese Induktion bereits für TFF3 in erkranktem Gewebe diskutiert (Steven et al. 2004). Unter pathologischen Bedingungen, in diesem Fall beim Keratokonus, wird TFF3, das unter physiologischen Bedingungen nicht in der Cornea vorkommt, in allen Zellschichten der Cornea exprimiert.

#### 4.3 Beeinflussung des Expressionsverhaltens durch Zytokine und Zellwandbestandteile

Das Expressionsverhalten von SP-A und SP-D und deren Beeinflussung durch unterschiedliche Zytokine wurde immunhistochemisch in Konjunktiva- (NHC) und Corneaepithelzelllinien (HCE) analysiert. Bereits vor der Stimulierung mit Zytokinen ließen sich in beiden Zelllinien SP-A und SP-D nachweisen, so dass man davon ausgehen kann, dass beide Proteine konstitutiv von Konjunktiva und Cornea gebildet werden. Es ist gut untersucht, dass Zytokinen im Rahmen von Entzündungsprozessen eine große Bedeutung zukommt. Als zelluläre Botenstoffe wirken sie pro- oder anti-inflammatorisch auf Zellen der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr, von denen sie auch selbst gebildet werden. Dadurch modulieren sie entscheidend die Immunantwort. Eine Wirkung auf SP-A und SP-D als Bestandteil der unspezifischen Abwehr ist daher wahrscheinlich. Interessant ist ebenfalls die Auswirkung bakterieller Zellwandbestandteile auf die Expressionsstärke der Collectine. Diese, insbesondere Lipopolysaccharide, ermöglichen aufgrund der Carbohydrate-recognition-domain (CRD) die Bindung

der Collectine an das Pathogen und ermöglichen dadurch die Aktivierung des angeborenen Immunsystems. In der vorliegenden Arbeit wurden Lipopolysaccharide (LPS) und Peptidoglykane (PGN) eingesetzt. Beide Stoffe sind Hauptbestandteile bakterieller Zellwände. Nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen (Interleukin-1 $\alpha$  und -1 $\beta$ , Interferon- $\gamma$ , Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) und bakteriellen Bestandteilen (Lipopolysaccharide, Peptidoglykane) ändert sich die Farbintensität der Immunreaktion subjektiv unterschiedlich und bestärkt die Vermutung, dass Zytokine die SP-A- und SP-D-Expression verändern können. Erste semiquantitative Quantifizierungen zeigen in der Konjunktiva mittels Real-time-PCR, dass durch die eingesetzten Zytokine und bakteriellen Zellwandbestandteile die Expression von SP-A immer hoch reguliert wird. Dabei hatte INF- $\gamma$  den größten stimulierenden Effekt auf die Expression von SP-A, gefolgt von PGN, LPS und TNF- $\alpha$ . Interferone sind Proteine, die von virusbefallenen Zellen gebildet werden und eine Superinfektion der befallenen Zelle durch andere Viren verhindern können. Bisher wurden drei verschiedene Interferone, Interferon- $\alpha$ , - $\beta$  und - $\gamma$ , identifiziert mit jeweils unterschiedlichen Wirkungen auf das Immunsystem. Interferon- $\gamma$  wird als „janusköpfiges“ Protein bezeichnet, da es eine antivirale Wirkung und antiproliferative Aktivitäten gegenüber Bakterien zeigt, aber auch eine Aktivierung des Immunsystems mit negativen Konsequenzen auslösen kann. So wird beispielweise die gewebsschädigende Wirkung im Alveolarraum durch Stickstoffmonoxidradikale und TNF- $\alpha$  aus Alveolarmakrophagen beschrieben, die zuvor durch INF- $\gamma$  aktiviert wurden. Stamme und Wright (2000) demonstrierten, dass SP-A diese aktivierten Makrophagen hemmen und demzufolge das Alveolarepithel vor Schäden schützen kann. Eventuell könnte man die starke Expressionszunahme von SP-A durch INF- $\gamma$  als Rückkopplungseffekt verstehen, um auch an der empfindlichen Konjunktiva Gewebeschäden durch Stickstoffmonoxidradikale, induziert durch INF- $\gamma$ , zu verhindern. Im Corneaepithel haben die verwendeten Zytokine unterschiedliche, teilweise gegenteilige Effekte auf die SP-A-Expression. IL-1 $\alpha$  und -1 $\beta$ , PGN und INF- $\gamma$  regulieren SP-A hoch, TNF- $\alpha$  und LPS regulieren es dagegen herunter. Insgesamt ist der Einfluss nur sehr schwach und nicht signifikant. Dennoch wirft die Beeinflussung der Expression von SP-A und SP-D durch Zytokine und andere zelluläre Bestandteile viele Fragen auf, die in zukünftigen Studien beantwortet werden sollen.

Aufgrund der aktuellen Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung, in der deutlich wird, dass SP-A und SP-D bei verschiedenen Krankheitsbildern des Auges und in stimulierten Zelllinien verstärkt exprimiert werden, wird die Hypothese aufgestellt, dass SP-A und SP-D einen Anteil an der unspezifischen Immunabwehr des Auges und des Tränenfilmes haben. In diesem Zusammenhang belegen bereits Ni und Kollegen (2005) die Eindämmung einer *P. aeruginosa*-Ausbreitung im Corneaepithel unter Anwendung von rekombinantem SP-D. Die positive Immunreaktion von Abwehrzellen in einzelnen Proben gegenüber SP-A- und SP-D-Antikörpern (auf die in dieser Doktorarbeit nicht näher eingegangen wird), ist ein Hinweis auf weitere Funktionen beider Collectine. In diesem Zusammenhang wurde schon mehrmals demonstriert, dass SP-A und SP-D die Phagozytose verschiedener Pathogene durch Makrophagen steigern und positiv beeinflussen können (van Iwaarden et al. 1990).

#### 4.4 Expression von SP-A und SP-D in gesunden und pathologischen ableitenden Tränenwegen

Sämtliche immunmodulatorischen Eigenschaften der Collectine, wie Bindung und Opsonierung infektiöser Pathogene und Hemmung oder Stimulierung immunkompetenter Zellen über verschiedene zelluläre Pfade, sind nicht nur für den Schutz der Augenoberfläche wichtig, sondern auch für die Abwehr von Krankheitserregern in den ableitenden Tränenwegen. Viele Pathogene, die im Tränennasengang Infektionen verursachen, kommen von der Augenoberfläche und werden infolge des Tränenabflusses in die ableitenden Tränenwege drainiert. Dort finden sie ideale Wachstumsbedingungen und können unter bestimmten Voraussetzungen, wie kleinen Verletzungen oder vorbestehenden Dacryostenosen, eine Dacryocystitis auslösen (Paulsen et al. 2001). Die Infektion des Tränensacks ist die häufigste Erkrankung der ableitenden Tränenwege und kann deszendierend vom Auge ausgehen oder aszendierend von der Nasenschleimhaut. Als Erreger kommen meist Streptokokken, Staphylokokken, Pneumokokken oder *E. coli* in Betracht. Der Verlauf kann sich chronisch oder akut gestalten und endet im schlimmsten Fall mit einer Dacryophlegmone, selten sogar mit einer Orbitaphlegmone (Berlin et al. 1980; Paulsen et al. 2001). SP-A und SP-D wurden in den ableitenden Tränenwegen sowohl auf mRNA-Ebene als auch

auf Protein-Ebene detektiert und durch immunhistochemische Analysen lokalisiert. Dabei fällt auf, dass beide Proteine ausschließlich apikal in den hochprismatischen Epithelzellen vorkommen und sich auf dem Epithel verteilen. Gemeinsam mit anderen antimikrobiellen Substanzen, die Paulsen und Kollegen (2001) in den ableitenden Tränenwegen nachwiesen, könnten sie hier eine Rolle in der unspezifischen Immunabwehr übernehmen. Die erhobenen Ergebnisse der semi-quantitativen Real-time-RT-PCR für SP-A und SP-D in gesunden und pathologisch veränderten ableitenden Tränenwegen untermauern diese Hypothese. Die Expression beider Proteine ist in stenosierten Tränennasengängen reduziert. Besonders stark ist die Reduktion im Fall von SP-D ausgefallen, da hier die relative Expressionsstärke gegen null tendiert. Der Befund ist eine mögliche Erklärung, warum gerade stenosierte ableitende Tränenwege sehr häufig Entzündungen des Tränensacks begünstigen. Der Mangel an Surfactantprotein A und D stellt eine insuffiziente, unspezifische Immunabwehr in den ableitenden Tränenwegen dar, die sich nur unzureichend gegen Krankheitserreger richten kann und dadurch die Ausbreitung der Erreger ermöglicht.

#### 4.5 Einflüsse der Surfactantproteine A und D auf Allergien und Unverträglichkeitsreaktionen

Außer dem Schutz der ableitenden Tränenwege, der Cornea und letztendlich der gesamten Augenoberfläche vor infektiösen Mikroorganismen, ist die Abklärung weiterer Funktionen von SP-A und SP-D auf der Augenoberfläche und im Tränenfilm von großem Interesse. So weisen erste Publikationen darauf hin, dass SP-A und SP-D ebenso auf das große Gebiet der Allergien und Unverträglichkeitsreaktionen einen Einfluss haben können (Malhotra et al. 1993; Wang et al. 1996). Allergien haben sich gerade in den westlichen Industrienationen zu einer Volkskrankheit entwickelt. In Europa leben heute etwa 80 Millionen Allergiker und die Tendenz ist weiter steigend. Dabei leiden Patienten mit Pollinosis (Heuschnupfen) zu 93 % unter Augenbeschwerden wie geröteten Augen, vermehrtem Tränenfluss, Juckreiz und zu 92 % unter Nasensymptomen, beispielsweise Fließschnupfen, häufigem Niesen oder Verlegungen der Nase (Wüthrich et al. 1998). Die Lebensqualität ist dadurch erheblich beeinträchtigt. In vielen Fällen besteht eine enge Assoziation zwischen Heuschnupfen und allergischem Asthma

bronchiale. Häufig muss der Heuschnupfen sogar als unmittelbarer Vorläufer eines Asthma angesehen werden. Bei Vorliegen einer derartigen Krankheitsgenese spricht man bekanntermaßen vom „Etagenwechsel“. Dementsprechend wurde in aktuellen Studien berichtet, dass SP-D die Chemotaxis und Degranulation eosinophiler Granulozyten hemmen kann und als potentes antiallergisches Protein anzusehen ist (von Bredow et al. 2006). Eosinophile Granulozyten triggern beim Asthmaanfall in besonderem Maße die protrahiert verlaufende Entzündungsreaktion und verursachen durch Ausschüttung zahlreicher Mediatoren eine direkte zytotoxische Schädigung des Bronchialepithels, die zur bronchialen Hyperreaktivität führt (Nolte 1998). SP-D könnte somit als neue Therapieoption gehandelt werden. Auch SP-A scheint einen Anteil an der Genese der Typ-I-Allergie zu haben. Es ist in der Lage, verschiedene Pollen und deren spezifische wasserlösliche Glycoproteine, beispielsweise von Schwarzpappel (*Populus nigra*), Wiesenrispe (*Poa pratensis*), Roggen (*Secale cereale*) und der aufrechten Ambrosie (*Ambrosia elatior*) kalziumabhängig an die Lectindomäne zu binden und Abwehrzellen zu präsentieren (Rajneesh et al. 1992). Diese Interaktion zwischen Pollen und Immunsystem kann zu einer Sensibilisierung gegenüber Pollen führen und eine Allergie auslösen. Pollen sind die häufigsten Allergene und fast ganzjährig anzutreffen. Gerade der Pollen der Ambrosie, einer eingeschleppten Pflanze aus Nordamerika, hat eine sehr hohe allergene Potenz und bewirkt bei Allergikern ernsthafte Reaktionen. Für beide Proteine wurde zudem experimentell gezeigt, dass sie die Histaminausschüttung aus basophilen Granulozyten hemmen können. Diese Kenntnisse sind weitere Teilstücke für das Verständnis der immunologisch vermittelten Prozesse im Rahmen der Allergiegenese. Möglicherweise ergeben sich daraus neue Therapieansätze.

#### 4.6 Regulation der Surfactant-Homöostase

Nicht zu vergessen ist der Anteil, den SP-A und SP-D an der Regulation der Surfactant-Homöostase in der Lunge haben. So weist SP-A eine Wechselwirkung mit Lipiden auf, indem es beispielsweise deren Wiederaufnahme in Typ-II-Pneumozyten verstärkt (Wright und Clements 1987). Weitere Experimente haben gezeigt, dass SP-A für die Bildung von tubulärem Myelin, der Speicherform des extrazellulären, alveolären Surfactants, verantwortlich ist (Suzuki et al. 1989).

Experimente mit SP-A- und SP-D-Knockout-Mäusen bekräftigen diese Befunde. So leiden die Mäuse unter einer progressiven, alveolären Lipoproteinose und einem Lungenemphysem. Histologisch fällt eine Hyperplasie und Hypertrophie der Typ-II-Pneumozyten mit intrazellulären Surfactantakkumulationen auf (Hawgood et al 2002; Jung et al. 2005).

#### 4.7 Schlussfolgerungen

Viele Jahrzehnte wurde Surfactant nur als seifenähnliche Substanz angesehen, die in der Lunge die Oberflächenspannung reduziert und damit die Atmung erleichtert. Die Erkennung seines eigentlichen Potentials ist der Molekular-technologie zu verdanken. Erst durch sie weiß man, dass SP-A und SP-D als Mediatoren zahlreicher Immunfunktionen anzusehen sind. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten gestatten einen tiefen Einblick in das Surfactantsystem des menschlichen Tränenapparates, der Augenoberfläche und des Tränenfilms (Bräuer et al. 2007). Als Konsequenz ihrer physiologischen Funktionen eröffnen sich möglicherweise faszinierende Therapieperspektiven, um Infektionen oder Entzündungen der Augenoberfläche und der ableitenden Tränenwege zu behandeln oder zu verhindern. Außerdem wird in Zukunft die Untersuchung der hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C von Interesse sein, die vor kurzem ebenfalls im Tränensystem beschrieben wurden (Bräuer et al. 2007).

## 5 Zusammenfassung

Surfactant wurde ursprünglich in der Lunge als Lipoproteinkomplex identifiziert, der die Oberflächenspannung an der Luft-Flüssigkeitsgrenze senkt und so das endexpiratorische Kollabieren der Alveolen verhindert. Durch zahlreiche neue Studien konnte diese sehr allgemein gehaltene Definition verfeinert werden. Außer dieser wichtigen Funktion für die Atemmechanik spielt Surfactant im Rahmen der angeborenen Immunabwehr eine große Rolle. Diese Funktion wird vor allem durch die Surfactantproteine A und D (SP-A, SP-D) vermittelt. Aktuelle Studien haben ergeben, dass SP-A und SP-D auch außerhalb der Lunge vorkommen. Unter anderem wurden sie in Herz, Hoden, Prostata, Niere, Pankreas und Speicheldrüsen nachgewiesen. Diese Befunde lassen die Vermutung zu, dass Surfactantproteine auch außerhalb der Lunge immunmodulatorische Aufgaben übernehmen. Basierend auf den Ergebnissen der Gruppe um Samuel Hawgood (San Francisco, USA), Mildred Stahlman (Nashville, USA) und Susan Fleiszig (Boston, USA), die die Existenz von SP-D in der Tränendrüse, der Tränenflüssigkeit und der Cornea nachgewiesen und die Aktivität von SP-D gegen *P. aeruginosa* demonstriert haben, war es Ziel der Doktorarbeit, die Existenz und Funktion von SP-A und SP-D in gesunden und pathologisch veränderten Gewebeproben des Tränenapparates und der Augenoberfläche sowie in Tränenflüssigkeit zu untersuchen.

Die Expression von SP-A und SP-D wird auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR in gesunden Gewebeproben aus Tränendrüse, Konjunktiva, Cornea und Tränen- nasengang sowie in der spontan immortalisierten Konjunktivaepithelzelllinie (NHC) und der SV40 transfizierten Corneaepithelzelllinie (HCE) analysiert. Das Vorkommen von SP-A und SP-D auf Proteinebene wurde durch Western Blot, Dot Blot und immunhistochemische Analysen in oben genannten gesunden Gewebeproben, Tränenflüssigkeit und Kammerwasser untersucht. Zusätzlich kommen Gewebeproben verschiedener cornealer Erkrankungen zum Einsatz. Beide Zelllinien werden mit verschiedenen Zytokinen und bakteriellen Bestandteilen stimuliert und anschließend mittels Immunhistochemie und Real-time-PCR qualitativ und quantitativ analysiert. Abschließend wurde die Expressionsstärke von SP-A und SP-D in gesunden und stenosierten Tränennasengängen durch Real-time-PCR semiquantitativ miteinander verglichen.

In der vorliegenden Arbeit wird der Nachweis von SP-A und SP-D in gesunden Gewebeprobe aus Tränendrüse, Konjunktiva, Cornea und ableitenden Tränenwegen mittels RT-PCR und Western Blot erbracht. Außerdem können beide Proteine in Tränenflüssigkeit nachgewiesen werden. Im Kammerwasser hingegen fehlen SP-A und SP-D. Durch immunhistochemische Analysen wird die Produktion beider Proteine in den Drüsenzellen der Tränendrüse und im Epithel von Cornea und Konjunktiva detektiert. Das Epithel der ableitenden Tränenwege reagiert ebenfalls positiv auf die spezifischen Antikörper von SP-A und SP-D. Eine Ausnahme bilden dabei die Becherzellen, in denen es zu keiner Reaktion kommt. In stenotisierten ableitenden Tränenwegen ist die Expression beider Proteine semiquantitativ vermindert. In gesunden Corneagewebeprobe ist nur an der Epitheloberfläche eine sehr schwache Reaktion für SP-A und SP-D sichtbar. Im Gegensatz dazu kommt es im Rahmen verschiedener Krankheitsbilder der Cornea, wie bei Herpeskeratitis, *S. aureus*-induziertem Corneaulkus und Keratokonus, zu einer deutlichen Reaktion in allen cornealen Zellschichten. Durch Untersuchungen an Zelllinien konnte gezeigt werden, dass SP-A und SP-D konstitutiv in Cornea und Konjunktiva gebildet werden und die Expressionsstärke durch verschiedene Zytokine und bakterielle Bestandteile beeinflussbar ist. Die vorliegenden Ergebnisse belegen, dass zusätzlich zu SP-D auch SP-A ein Protein des Tränenfilms ist.

Die Daten lassen vermuten, dass SP-A und SP-D ein wichtiger Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr des Tränenapparates und der Augenoberfläche sind. Aufgrund ihrer direkten und indirekten antimikrobiellen Wirkung und ihres immunmodulierenden Einflusses auf Abwehrzellen des unspezifischen und spezifischen Immunsystems kann die weitere Analyse der Proteine in den Geweben des Tränenapparates und der Augenoberfläche einige der noch vielen offenen Fragen zur Ätiologie und Pathogenese zahlreicher Augenerkrankungen beantworten und damit neue Therapieoptionen eröffnen.

## 6 Literaturverzeichnis

Akiyama J, Hoffman A, Brown C, Allen L, Edmondson J, Poulain F, Hawgood S:  
Tissue distribution of surfactant proteins A and D in the mouse.  
J Histochem Cytochem 50 Jul (2002) 993–996

Amrein M, von Nahmen A, Sieber M:  
A scanning force- and fluorescence light microscopy study of the structure and  
function of a model pulmonary surfactant.  
Eur Biophys J 26 (1997) 349–357

Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y, Handa H:  
An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization.  
Invest Ophthalmol Vis Sci. 36 Mar (1995) 614–621

Baum J:  
Infections of the eye.  
Clin Infect Dis 21 Sep (1995) 479–486

Beharka AA, Gaynor CD, Kang BK, Voelker DR, McCormack FX, Schlesinger LS:  
Pulmonary surfactant protein A up-regulates activity of the mannose receptor, a  
pattern recognition receptor expressed on human macrophages.  
J Immunol. 169 Oct (2002) 3565–3573

Berlin AJ, Rath R, Rich L:  
Lacrimal system dacryoliths.  
Ophthalmic Surg. 435 Jul (1980) 435–436

Bräuer L, Kindler C, Jäger K, Sel S, Nölle B, Pleyer U, Ochs M, Paulsen FP:  
Detection of surfactant proteins A and D in human tear fluid and the human  
lacrimal system.  
Invest Ophthalmol Vis Sci. 48 Sep (2007) 3945–3953

Bräuer L, Johl M, Börgermann J, Pleyer U, Tsokos M, Paulsen FP:  
Detection and localization of the hydrophobic surfactant proteins B and C in  
human tear fluid and the human lacrimal system.  
Curr Eye Res. 32 Nov (2007) 931–938

Bredow von C, Hartl D, Schmid K, Schabaz F, Brack E, Reinhardt D, Griese M:  
Surfactant protein D regulates chemotaxis and degranulation of human  
eosinophils.  
Clin Exp Allergy. 36 Dec 2006 1566–1574

Brodsky-Doyle B, Leonard KR, Reid KB:  
Circular-dichroism and electron-microscopy studies of human subcomponent C1q  
before and after limited proteolysis by pepsin.  
Biochem J 159 (1976) 279–280

Bruns G, Stroh H, Veldman GM, Latt SA, Floros J:  
The 35 kd pulmonary surfactant-associated protein is encoded on chromosome 10.

Hum Genet 76 May (1987) 58–62

Bufler P, Schmidt B, Schikor D, Bauernfeind A, Crouch EC, Griese M:  
Surfactant protein A and D differently regulate the immune response to nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* and its lipopolysaccharide.

Am J Respir Cell Mol Biol 28 Feb (2003) 249–256

Chi HH, Katzin HM, Teng CC:

Histopathology of keratoconus.

Amer. J. Ophthalmol. 41 (1956) 847–860

Clements JA:

Surface tension of lung extracts.

Proc Soc Exp Biol Med 95 May (1957) 170–172

Crouch E, Rust K, Veile R, Donis-Keller H, Grosso L:

Genomic organization of human surfactant protein D (SP-D). SP-D is encoded on chromosome 10q22.2-23.1.

J Biol Chem 268 Feb (1993) 2976–2983

Crouch E, Persson A, Chang D, Heuser J:

Molecular structure of pulmonary surfactant protein D (SP-D).

J Biol Chem 269 Jun (1994) 17311–17319

Crouch EC:

Collectins and pulmonary host defense.

Am J Respir Cell Mol Biol 19 Aug (1998) 177–201

Crouch E, Wright JR:

Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense.

Annu Rev Physiol 63 (2001) 521–554

Cullor JS, Mannis MJ, Murphy CJ, Smith WL, Selsted ME, Reid TW:

In vitro antimicrobial activity of defensins against ocular pathogens.

Arch Ophthalmol. 108 Jun (1990) 861–864

Dartt DA:

Regulation of tear secretion.

Adv Exp Med Biol 350 (1994) 1–9

Diebold Y, Calonge M, Enríquez de Salamanca A, Callejo S, Corrales RM, Sáez V, Siemasko KF, Stern ME.

Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva.

Invest Ophthalmol Vis Sci 44 Oct (2003) 4263–4274

Dobbie JW, Tasiaux N, Meijers P, Anderson JD, Bodart C, Hind C, Bourguet C, Perret J:  
Lamellar bodies in synoviocytes, mesothelium and specific epithelia as possible site of auto-antigen in rheumatoid disease.  
Br J Rheumatol 33 Jun (1994) 508–519

Gipson IK:  
Distribution of mucins at the ocular surface.  
Exp Eye Res 78 Mar (2004) 379–388

Göke MN, Cook JR, Kunert KS, Fini ME, Gipson IK, Podolsky DK:  
Trefoil peptides promote restitution of wounded corneal epithelial cells.  
Exp Cell Res 264 Apr (2001) 337–344

Golde van LM:  
Potential role of surfactant proteins A and D in innate lung defense against pathogens.  
Biol Neonate 67 (1995) 2–17

Günther G:  
Keratoplastik in zwei Fällen von akutem Keratokonus mit histologischem Beitrag zur Pathologie der Hornhaut.  
Klin. Mbl. Augenheilk. 133 (1958) 40–50

Haagsman HP, Hawgood S, Sargeant T, Buckley D, White RT, Drickamer K, Benson BJ:  
The major lung surfactant protein, SP 28-36, is a calcium-dependent, carbohydrate-binding protein.  
J Biol Chem 262 Oct (1987) 13877–13880

Haagsman HP, Diemel RV:  
Surfactant-associated proteins: functions and structural variation.  
Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 129 May (2001) 91–108

Haeringen van NJ:  
Clinical biochemistry of tears.  
Surv Ophthalmol 26 Sep-Oct (1981) 84–96

Hawgood S, Ochs M, Jung A, Akiyama J, Allen L, Brown C, Edmondson J, Levitt S, Carlson E, Gillespie AM, Villar A, Epstein CJ, Poulain FR:  
Sequential targeted deficiency of SP-A and -D leads to progressive alveolar lipoproteinosis and emphysema.  
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 283 Nov (2002) 1002–1010

Haynes RJ, Tighe PJ, Dua HS:  
Antimicrobial defensin peptides of the human ocular surface.  
Br J Ophthalmol 83 Jun (1999) 737–741

Holmskov U, Thiel S, Jensenius JC:  
Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense.  
Annu Rev Immunol 21 (2003) 547–78

- Hoppe HJ, Reid KB:  
Collectins soluble proteins containing collagenous regions and lectin domains-  
and their roles in innate immunity.  
Protein Sci 3 Aug (1994) 1143–1158
- Hoppe HJ, Reid KB:  
Trimeric C-type lectin domains in host defence.  
Structure 2 Dec (1994) 1129–1133
- Iwaarden van F, Welmers B, Verhoef J, Haagsman HP, van Golde LM:  
Pulmonary surfactant protein A enhances the host-defense mechanism of rat  
alveolar macrophages.  
Am J Respir Cell Mol Biol 2 Jan (1990) 91–98
- Jaeschke H, Smith CW:  
Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury.  
J Leukoc Biol 61 Jun (1997) 647–653
- Jumblatt MM, McKenzie RW, Steele PS, Emberts CG, Jumblatt JE:  
MUC7 expression in the human lacrimal gland and conjunctiva.  
Cornea 22 Jan (2003) 41–45.
- Jung A, Allen L, Nyengaard JR, Gundersen HJ, Richter J, Hawgood S, Ochs M:  
Design-based stereological analysis of the lung parenchymal architecture and  
alveolar type II cells in surfactant protein A and D double deficient mice.  
Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 286 Oct (2005) 885–890
- Knop N, Knop E:  
Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye.  
Invest Ophthalmol Vis Sci 41 May (2000) 1270–1279
- Korfhagen TR, Bruno MD, Ross GF, Huelsman KM, Ikegami M, Jobe AH,  
Glasser SW, Bachurski CJ, Stripp B, Morris RE, Wert SE, Iwamoto H, Whitsett JA:  
Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice.  
Proc Natl Acad Sci 93 Sep (1996) 9594–9599
- Kuronuma K, Sano H, Kato K, Kudo K, Hyakushima N, Yokota S, Takahashi H,  
Fujii N, Suzuki H, Kodama T, Abe S, Kuroki Y:  
Pulmonary surfactant protein A augments the phagocytosis of *Streptococcus*  
*pneumoniae* by alveolar macrophages through a casein kinase 2-dependent  
increase of cell surface localization of scavenger receptor A.  
J Biol Chem 279 May (2004) 21421–21430
- LaForce FM, Kelly WJ, Huber GL:  
Inactivation of staphylococci by alveolar macrophages with preliminary  
observations on the importance of alveolar lining material.  
Am Rev Respir Dis 108 Oct (1973) 784–790

- Langer G, Jagla W, Behrens-Baumann W, Walter S, Hoffmann W:  
Secretory peptides TFF1 and TFF3 synthesized in human conjunctival goblet cells.  
*Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 Sep (1999) 2220–2224
- Leth-Larsen R, Floridon C, Nielsen O, Holmskov U:  
Surfactant protein D in the female genital tract.  
*Mol Hum Reprod* 10 Mar (2004) 149–154
- LeVine AM, Bruno MD, Huelsman KM, Ross GF, Whitsett JA, Korfhagen TR:  
Surfactant protein A-deficient mice are susceptible to group B streptococcal infection.  
*J Immunol* 158 May (1997) 4336–4340
- LeVine AM, Kurak KE, Bruno MD, Stark JM, Whitsett JA, Korfhagen TR:  
Surfactant protein-A-deficient mice are susceptible to *Pseudomonas aeruginosa* infection.  
*Am J Respir Cell Mol Biol* 19 (4) Oct (1998) 700–708
- LeVine AM, Whitsett JA, Hartshorn KL, Crouch EC, Korfhagen TR:  
Surfactant protein D enhances clearance of influenza A virus from the lung in vivo.  
*J Immunol* 167 Nov (2001) 5868–5873
- Madsen J, Kliem A, Tornøe I, Skjødt K, Koch C, Holmskov U:  
Localization of lung surfactant protein D on mucosal surfaces in human tissues.  
*J Immunol* 164 Jun (2000) 5866–5870
- Malhotra R, Haurum J, Thiel S, Jensenius JC, Sim RB:  
Pollen grains bind to lung alveolar type II cells (A549) via lung surfactant protein A (SP-A).  
*Biosci Rep* 13 Apr (1993) 79-90
- McCormack FX, Gibbons R, Ward SR, Kuzmenko A, Wu H, Deepe GS Jr:  
Macrophage-independent fungicidal action of the pulmonary collectins.  
*J Biol Chem* 278 Sep (2003) 36250–36256
- McCulley JP, Shine WE:  
Meibomian gland function and the tear lipid layer.  
*Ocul Surf* 1 Jul (2003) 97–106
- Medawar PB:  
Immunity to homologous grafted skin. III. The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye.  
*British J Exp Pathol* 29 (1948) 58–69
- Mikero AN, Wang G, Umstead TM, Zacharatos M, Thomas NJ, Phelps DS, Floros J:  
Surfactant protein A2 (SP-A2) variants expressed in CHO cells stimulate phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* more than do SP-A1 variants.  
*Infect Immun* 75 Mar (2007) 1403–1412

Mircheff AK:

Lacrimal fluid and electrolyte secretion: a review.  
Curr Eye Res 8 Jun (1989) 607–617

Ni M, Evans DJ, Hawgood S, Anders EM, Sack RA, Fleiszig SMJ:  
Surfactant protein D is present in human tear fluid and the cornea and inhibits  
epithelial cell invasion by *Pseudomonas aeruginosa*.  
Infect Immun 73 Apr (2005) 2147–2156

Nogee LM:

Alterations in SP-B and SP-C expression in neonatal lung disease.  
Annu Rev Physiol 66 (2004) 601–623

Osterlind G:

An investigation into the presence of lymphatic tissue in the human conjunctiva,  
and its biologic and clinical importance.  
Acta Ophthalmol 23 (1944) 1–79

Pattle RE:

Properties, function and origin of the alveolar lining layer.  
Nature 175 Jun (1955) 1125–1126

Paulsen FP, Paulsen JI, Thale AB, Tillmann BN:

Mucosa-associated lymphoid tissue in human efferent tear ducts.  
Virchows Arch 437 Aug (2000) 185–189

Paulsen FP, Pufe T, Schaudig U, Held-Feindt J, Lehmann J, Schröder JM,  
Tillmann BN:

Detection of natural peptide antibiotics in human nasolacrimal ducts.  
Invest Ophthalmol Vis Sci 42 Sep (2001) 2157–2163

Paulsen FP, Thale AB, Maune S, Tillmann BN:

New insights into the pathophysiology of primary acquired dacryostenosis.  
Ophthalmology 108 Dec (2001) 2329–2336

Paulsen FP, Hinz M, Schaudig U, Thale AB, Hoffmann W:

TFF peptides in the human efferent tear ducts.  
Invest Ophthalmol Vis Sci 43 Nov (2002) 3359–3364

Paulsen FP, Schaudig U, Thale AB:

Drainage of tears: impact on the ocular surface and lacrimal system.  
Ocul Surf 1 Oct (2003) 180–191

Paulsen FP, Corfield A, Hinz M, Hoffmann W, Schaudig U, Thale A, Berry M:

Tear outflow. Impact of mucins and TFF-peptides.  
Ophthalmologie 101 Jan (2004) 19–24

Paulsen FP, Berry MS:

Mucins and TFF peptides of the tear film and lacrimal apparatus.  
Prog Histochem Cytochem 41 May (2006) 1–53

Paulsen FP:

Cell and molecular biology of human lacrimal gland and nasolacrimal duct mucins.  
Int Rev Cytol 249 May (2006) 229–279

Schaeffer LM, McCormack FX, Wu H, Weiss AA:

Interactions of pulmonary collectins with *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis* lipopolysaccharide elucidate the structural basis of their antimicrobial activities.

Infect Immun 72 Dec (2004) 7124–7130

Schürch S, Qanbar R, Bachofen H, Possmayer F:

The surface-associated surfactant reservoir in the alveolar lining.

Biol Neonate 67 (1995) 61–76

Shepherd VL:

Distinct roles for lung collectins in pulmonary host defense.

Am J Respir Cell Mol Biol 26 Mar (2002) 257–260

Shirai Y:

On the transplantation of the rat sarcoma in adult heterogenous animals.

Jpn Med World 1 (1921) 15

Stahlman MT, Gray ME, Hull WM, Whitsett JA:

Immunolocalization of surfactant protein-D (SP-D) in human fetal, newborn, and adult tissues.

J Histochem Cytochem 50 May (2002) 651–660

Stamme C, Walsh E, Wright JR:

Surfactant protein A differentially regulates IFN- $\gamma$ - and LPS-induced nitrite production by rat alveolar macrophages.

Am J Respir Cell Mol Biol 23 Dec (2000) 772–779

Steven P, Schäfer G, Nölle B, Hinz M, Hoffmann W, Paulsen F:

Distribution of TFF peptides in corneal disease and pterygium.

Peptides 25 May (2004) 819–825

Sullivan DA:

Tearful relationships? Sex, hormones, the lacrimal gland, and aqueous-deficient dry eye.

Ocul Surf 2 Apr (2004) 92–123

Streilein JW:

Unraveling immune privilege.

Science 270 Nov (1995) 1158–1159

Streilein JW:

Peripheral tolerance induction: lessons from immune privileged sites and tissues.

Transplant Proc 28 Aug (1996) 2066–2070

Suzuki Y, Fujita Y, Kogishi K :  
Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant.  
Am Rev Respir Dis 140 Jul (1989) 75–81

Tenner AJ, Robinson SL, Borchelt J, Wright JR:  
Human pulmonary surfactant protein (SP-A), a protein structurally homologous to C1q, can enhance FcR- and CR1-mediated phagocytosis.  
J Biol Chem 264 Aug (1989) 13923–13928

Tillmann B:  
Atlas der Anatomie.  
Springer, Berlin, 2004

Voorhout WF, Veenendaal T, Haagsman HP, Verkleij AJ, van Golde LM, Geuze HJ:  
Surfactant protein A is localized at the corners of the pulmonary tubular myelin lattice.  
J Histochem Cytochem 39 Oct (1991) 1331–1336

Voss T, Melchers K, Scheirle G, Schäfer KP:  
Structural comparison of recombinant pulmonary surfactant protein SP-A derived from two human coding sequences: implications for the chain composition of natural human SP-A.  
Am J Respir Cell Mol Biol 4 Jan (1991) 88–94

Walker SR, Williams MC, Benson B:  
Immunocytochemical localization of the major surfactant proteins in type II cells, Clara cells and alveolar macrophages of rat lungs.  
J Histochem Cytochem 34 (1986) 1137–1148

Wang JY, Kishore U, Lim BL, Strong P, Reid KB:  
Interaction of human lung surfactant proteins A and D with mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) allergens.  
Clin Exp Immunol 106 Nov (1996) 367–373

Wert SE, Yoshida M, LeVine AM, Ikegami M, Jones T, Ross GF, Fisher JH, Korfhagen TR, Whitsett JA:  
Increased Metalloproteinase Activity, Oxidant Production, and Emphysema in Surfactant Protein D Gene-Inactivated Mice.  
Proc Natl Acad Sci USA 97 May (2000) 5972–5977

Wotherspoon AC, Hardman-Lea S, Isaacson PG:  
Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) in the human conjunctiva.  
J Pathol 174 Sep (1994) 33–37

Wright JR, Clements JA:  
Metabolism and turnover of lung surfactant.  
Am Rev Respir Dis 136 Aug (1987) 426–444

Wright NA, Hoffmann W, Otto WR, Rio MC, Thim L:  
Rolling in the clover: trefoil factor family (TFF)-domain peptides, cell migration and cancer.

FEBS Lett 408 May (1997) 121–123

Wright JR:

Immunomodulatory functions of surfactant.

Physiol Rev 77 Oct (1997) 931–962

Wright JR:

Immunoregulatory functions of surfactant proteins.

Nat Rev Immunol 5 Jan (2005) 58–68

Wu H, Kuzmenko A, Wan S, Schaffer L, Weiss A, Fisher J, Kim KS, McCormack F:  
Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability.

J Clin Invest 111 May (2003) 1589–1602

Zhang S, McCormack FX, Levesque RC, O'Toole GA, Lau GW:

The flagellum of *Pseudomonas aeruginosa* is required for resistance to clearance by surfactant protein A.

PLoS ONE 2 Jun (2007) 564

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Professor Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer)

## **Thesen der Dissertation**

# **Nachweis und Funktion der Surfactantproteine A und D im Tränenapparat, der Augenoberfläche und der Tränenflüssigkeit des Menschen**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Christian Kindler  
geboren am 11.10.1976 in Halle/Saale

1. Die Surfactantproteine A und D (SP-A und SP-D) werden im Epithel von Cornea und Konjunktiva sowie im gesamten Tränenapparat (Tränendrüse, ableitende Tränenwege) des Menschen exprimiert und produziert.
2. Der Nachweis lässt die Vermutung zu, dass SP-A und SP-D im Rahmen der Immunabwehr des Tränensystems und der Augenoberfläche von Bedeutung sind und ihnen in der Ätiologie und Pathogenese verschiedener Augenkrankungen eine Rolle zukommt.
3. SP-A und SP-D kommen hauptsächlich oberflächlich in oder auf allen Epithelien der Augenoberfläche und der ableitenden Tränenwege vor, so dass sie ihrer Rolle als wichtiger Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr insbesondere auf Schleimhäuten gerecht werden können.
4. Die Produktion beider Proteine ist entweder in gesunden Geweben induzierbar oder lässt sich hochregulieren.
5. SP-A und SP-D beeinflussen möglicherweise den Krankheitsverlauf cornealer Erkrankungen.
6. Die Wirkung von SP-A und SP-D ist gewebe- und speziesspezifisch.
7. Die Wirkung von SP-A und SP-D ist außerdem collectin- und pathogenabhängig.
8. Der Nachweis von SP-A und SP-D in Konjunktiva- und Corneaepithelzelllinien lässt die Vermutung zu, dass beide Proteine konstitutiv von Konjunktiva und Cornea gebildet werden.
9. Das Expressionsverhalten von SP-A und SP-D wird in Konjunktiva- und Corneaepithelzelllinien durch Zytokine (Interleukin-1 $\alpha$  und -1 $\beta$ , Interferon- $\gamma$ , Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) und Bestandteile bakterieller Zellwände (Lipopolysaccharide und Peptidoglykane) beeinflusst.

10. SP-A und SP-D sind Bestandteile der Tränenflüssigkeit. Im Kammerwasser kommen sie nicht vor oder liegen unter der Nachweisgrenze. Dies unterstreicht das Phänomen des Immunprivilegs.
11. Dadurch, dass die Surfactantproteine A und D nicht nur in der Konjunktiva, der Cornea und den ableitenden Tränenwegen, sondern auch in der Tränenflüssigkeit vorkommen, ist eine flächendeckende Verteilung und somit eine entsprechende Schutzbarriere gewährleistet.
12. Möglicherweise beeinflussen SP-A und SP-D als Bestandteil der Tränenflüssigkeit auch die rheologischen Eigenschaften des Tränenfilms und damit den Tränenabfluss.
13. Die Expression beider Proteine ist in stenosierten ableitenden Tränenwegen reduziert. Dadurch können Entzündungen der ableitenden Tränenwege begünstigt werden.
14. SP-A und SP-D haben möglicherweise einen Einfluss auf das große Gebiet der Allergien und Unverträglichkeitsreaktionen.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Kindler  
Vorname: Christian  
Geburtsdatum: 11. Oktober 1976  
Geburtsort: Halle/Saale  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

## Ausbildung

1983–1991: POS „Rosa Luxemburg“ in Halle/Saale  
1991–1995: Südstadt-Gymnasium Halle/Saale  
Abitur im Juni 1995  
1995–1996: Bundeswehr – 131. Sanitätsbataillon Halle/Saale

## Hochschulbildung

10/1996–06/2003: Studium der Medizin  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
09/1998: Ärztliche Vorprüfung  
03/2000: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
03/2002: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
06/2003: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## Beruflicher Werdegang

01.01.04 – 31.07.05 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für  
Anatomie und Zellbiologie der MLU Halle-  
Wittenberg  
Seit 01.01.06 Assistenzarzt  
Klinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten  
HELIOS Klinikum Erfurt

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die dieser Arbeit zugrunde liegende Datenerhebung und Auswertung selbstständig durchgeführt und niedergeschrieben habe. Ich habe keine anderen als die von mir aufgeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt und die inhaltlich übernommenen Abschnitte des verwendeten Schrifttums einzeln kenntlich gemacht.

Ich versichere, dass ich die Dissertation bisher keiner anderen Fakultät zur Zulassung vorgelegt und keine weiteren Promotionsversuche unternommen habe.

Erfurt, 24.06.2008

Christian Kindler

## Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer für die Möglichkeit meiner Promotion an dem von ihm geleiteten Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Professor Dr. med. Friedrich P. Paulsen, der mir in allen Phasen der Arbeit stets mit Rat, konstruktiver Kritik, Ansporn sowie einer außerordentlichen Geduld zur Seite stand.

Ich danke insbesondere Frau Dr. rer. nat. Kristin Jäger für ihre fachliche Kompetenz, die wertvollen Hinweise zur Erstellung dieser Arbeit und die stetige freundschaftliche Hilfe und Unterstützung.

Ich bin Frau Ute Beyer für die ausgezeichnete Einarbeitung in die immunhistochemische Methodik zu großem Dank verpflichtet.

Frau Michaela Risch gebührt großer Dank für die sorgfältige und geduldige Einweisung in die molekularbiologische Laborarbeit.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe möchte ich für die Freundlichkeit, ihr kollegiales Verhalten und die gute Zusammenarbeit danken.

Außerdem möchte ich allen hier nicht namentlich aufgeführten Mitarbeitern des Institutes für Anatomie und Zellbiologie danken, die für meine Fragen stets ein offenes Ohr hatten.

Ein besonders herzlicher Dank gilt meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden für ihre unermüdliche Geduld, ihren Zuspruch und ihre Unterstützung, und dafür, dass sie immer an mich geglaubt und mich zum Weitermachen ermutigt haben, auch wenn sich zuweilen alles etwas hinauszögerte.

Nicht zuletzt möchte ich meinem lieben Partner Bodo M. Schick danken, der mir während der gesamten Zeit eine einzigartige Hilfe war und mich unermüdlich zur Fertigstellung der Arbeit motiviert hat.