

# **Humane Surfactant Proteine - Detektion und Charakterisierung**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

**Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von

Herrn Martin Schicht

geb. 06.10.1980 in Dessau

Gutachter:

1. Prof. G. Sawers
2. Prof. L. Bräuer
3. PD Dr. W. Brand

Halle (Saale), 15.11.2012

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	5
<b>1. Einleitung</b>	6
1.1 Humane Surfactant Proteine	6
1.1.1 Surfactant Protein A (SP-A)	
1.1.2 Surfactant Protein D (SP-D)	
1.1.3 Surfactant Protein B (SP-B)	
1.1.4 Surfactant Protein C (SP-C)	
1.2 Surfactant Proteine im Tränenfilm	13
1.3 Wechselwirkungen zwischen Surfactant Proteinen und den opportunistisch pathogenen Bakterien <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
1.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	
1.3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
1.4 Unbekannte Surfactant Proteine	19
1.4.1 Surfactant Protein G (SFTA2)	
1.4.2 Surfactant Protein H (SFTA3)	
1.5 Der humane Gelenkknorpel	20
1.5.1 Surfactant Proteine im humanen Gelenkknorpel	
1.6 Zielstellung der Arbeit	24
<b>2. Material und Methoden</b>	26
2.1 Material	26
2.1.1 Bakterienstämme und Protozoen	
2.1.2 Plasmide und Vektoren	
2.1.3 Oligonukleotid-Primer	
2.1.4 Verwendete Gewebeproben von Mensch und Maus	
2.2 Molekularbiologische Standardmethoden	28
2.2.1 Restriktionsverdau	
2.2.2 Ligation	
2.2.3 Transformation	
2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	

2.2.5	Elektrophoretische Auftrennung und anschließende Isolierung von DNA-Fragmenten	
2.2.6	Kolonie-PCR	
2.2.7	Herstellung von Surfactant Protein Fusionskonstrukten für die Etablierung von Expressionssystemen	
2.2.8	RNA Isolierung	
2.2.9	Reverse Transkription	
2.2.10	Isolierung genomischer DNA aus Bakterien	
2.2.11	DNA-Analyse durch Sequenzierung	
2.3	Proteinbiochemische Methoden	36
2.3.1	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	
2.3.2	Nachweis von Proteinen mittels Western-Blot	
2.3.3	<u>Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay</u> (ELISA)	
2.3.4	Surfactant Proteinsynthese	
2.3.5	Tryptischer Verdau von Proteinen	
2.4	Zellkultur	38
2.4.1	Isolation primärer Knorpelzellen	
2.4.2	Kultivierung von primären Knorpelzellen	
2.4.3	Kultivierung von immortalisierten Zelllinien	
2.4.4	Kultivierung der <i>Leishmania tarantolea</i>	
2.4.5	Kultivierung von <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
2.5	Immunzytologische Methoden	41
2.5.1	Herstellung und Rehydrierung von Paraffinschnitten	
2.5.2	Immunhistochemie an Paraffinschnitten	
2.5.3	Immunmarkierung von Bakterien	
2.5.4	Immunogold-Transmissions-Elektronenmikroskopie an Bakterien	
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
3.1	Die Surfactant Proteine SP-G (SFTA2) und SP-H (SFTA3)	42
3.1.1	Surfactant Protein G (SFTA2)	
3.1.1.1	Analyse und Nachweis humaner SP-H mRNA mittels PCR	
3.1.1.2	Generierung eines spezifischen Surfactant Protein G Antikörpers	
3.1.1.3	Nachweis von Surfactant Protein G in humanen Gewebeproben mittels immunhistochemischer Methoden	
3.1.1.4	Vorarbeiten für die rekombinante Expression von SP-G	

3.1.2	Surfactant Protein H (SFTA3)	
3.1.2.1	Analyse und Nachweis humaner SP-H mRNA mittels PCR	
3.1.2.2	Generierung eines spezifischen Surfactant Protein H Antikörpers	
3.1.2.3	Nachweis von Surfactant Protein H in humanen Gewebeproben mittels immunhistochemischer Methoden	
3.1.2.4	Vorarbeiten für die rekombinante Expression von SP-H	
3.1.3	Nachweis von Surfactant Protein G und H in der Tränenflüssigkeit	
3.2	Surfactant Proteine bei pathogenen Mikroorganismen	56
3.2.1	Analyse des Bakteriengenoms auf Surfactant Proteine mittels PCR	
3.2.2	Analyse der bakteriellen Plasmide auf Surfactant Proteine mittels PCR	
3.2.3	Sequenzanalyse der PCR Fragmente mit Genomdatenbanken	
3.2.4	Analyse der Bakterienproteine auf Surfactant Proteine mittels Western-Blot	
3.2.5	Nachweis bakterieller Surfactant Proteine mittels immunhistochemischer Färbungen und Elektronenmikroskopie	
3.2.6	Quantitative Konzentrationsbestimmung bakterieller Surfactant Proteine mittels ELISA	
3.3	Surfactant Proteine im humanen Gelenkknorpel	67
3.3.1	Nachweis von Surfactant Protein mRNA in Chondrozyten	
3.3.2	Nachweis von Surfactant Proteinen in Knorpelproben mittels Western-Blot	
3.3.3	Immunhistochemischer Nachweis von Surfactant Proteinen in humanen Knorpelproben	
3.3.4	Immunhistochemischer Nachweis von Surfactant Proteinen im Gelenkknorpel von genetisch zur Arthrose prädisponierten Mäusen	
3.3.5	Quantifizierung der Surfactant Proteine in Knorpelpräparaten mittels ELISA	
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>77</b>
4.1	Die Surfactant Proteine G und H	77
4.1.1	Surfactant Protein G (SFTA2)	
4.1.2	Surfactant Protein H (SFTA3)	
4.2	Bakterielle Surfactant Proteine	87
4.3	Surfactant Proteine im humanen Gelenkknorpel	94
4.3.1	Nachweis von Surfactant Protein A im Gelenkknorpel	

4.3.2	Nachweis von Surfactant Protein D im Gelenkknorpel	
4.3.3	Nachweis von Surfactant Protein B im Gelenkknorpel	
4.3.4	Nachweis von Surfactant Protein C im Gelenkknorpel	
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	101
5.1	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	101
5.2	Ausblick	104
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	105
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	118
7.1	Immunogold-Transmissions-Elektronenmikroskopie an Bakterien	118
7.2	Elektroporation - Transfektion der Plasmide in <i>Leishmania tarentolea</i>	119
7.3	Übersicht der für molekularbiologische Untersuchungen verwendeten Bakterienstämme	121
7.4	Übersicht der verwendeten Oligonukleotid-Primer	122
7.5	Übersicht der verwendeten Antikörper	123

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxydisulfat
bp	Basenpaare
cDNA	Komplementäre DNA (Matrize der mRNA)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosid-5'-triphosphat
E.coli	Escherichia coli
EtOH	Ethanol
forw	forward
kb	Kilobasen
LB	Luria-Bertani-Medium
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
OD	optische Dichte
ORF	„open reading frames“
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
rev	reverse
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehung pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Surfactant Protein
Taq	<i>Thermococcus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)
TIMPs	Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen (engl. „Tissue Inhibitors of Metalloproteinases“)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ü.N.	über Nacht

## 1. Einleitung

Vor über 80 Jahren vermutete der Physiologe Von Neergaard die Existenz eines oberflächenaktiven Films auf der Alveolaroberfläche der Lunge (Von Neergaard, 1929). Die als Anti-Atelektase-Faktor und später als Surfactant beschriebene Komponente der Alveolen dient seitdem als Grundlage zur Erklärung vieler wissenschaftlicher Fragestellungen im Zusammenhang mit physiologischen, immunologischen und biochemischen Reaktionen im menschlichen Organismus.

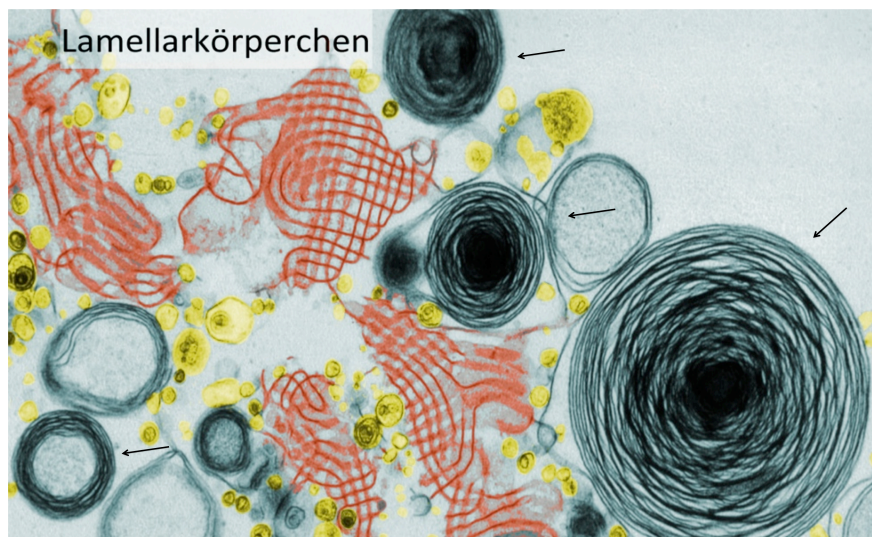
Der Name Surfactant leitet sich von der englischen Bezeichnung „**surface active agent**“ (oberflächenaktive Substanz) ab. Humanes Surfactant bezeichnet ein komplexes Gemisch aus Lipiden (Phospholipiden), Proteinen (Surfactant Proteinen) und Kohlenhydraten.

Die sogenannten Surfactant Proteine (SP) konnten außer in der Lunge bereits in zahlreichen extrapulmonalen Geweben, z.B. in der Tuba auditiva, in der Nasenschleimhaut, auf der Haut, in der Plazenta sowie in den Speicheldrüsen detektiert werden. 2007 wurden Surfactant Proteine sowohl in den Geweben der Augenoberfläche als auch im Tränenapparat (Tränendrüse, akzessorische Tränendrüsen des Lides und ableitende Tränenwege) und in der Tränenflüssigkeit beschrieben (Bräuer et al., 2007a; Bräuer et al., 2007b).

### 1.1 Humane Surfactant Proteine

Die vier bislang beschriebenen Surfactant Proteine (SP-A, SP-B, SP-C und SP-D) wies man erstmals in der Lunge nach (Von Neergaard, 1929; Klaus et al., 1961; King et al., 1973; Van Iwaarden et al., 1990), wo sie am rauen endoplasmatischen Retikulum von Pneumozyten Typ 2 sowie von Clara-Zellen gebildet werden (Polin and Fox, 1997; LM., 1998). Nach ihrer Verpackung im Golgi-Apparat erfolgt der Transport in multivesikulären Strukturen und die Speicherung in Form sogenannter „lamellar bodies“ (Voorhout et al., 1992) (siehe Abbildung 1.1). Den hydrophilen Surfactant Proteinen SP-A und SP-D werden immunologische Funktionen im Rahmen der unspezifischen und spezifischen Immunabwehr zugeschrieben, darüber hinaus sind sie in der Lage mit T-Lymphozyten zu interagieren (Kramer and Speer, 2003). Beide Surfactant Proteine besitzen unterschiedliche Wirkmechanismen (Crouch and Wright, 2001). Sie sind Vertreter der Kollektin-Familie des C-Typs, zu der eine Vielzahl unterschiedlicher Moleküle mit bekannter immunologischer

Funktion gezählt werden (z.B. Mannose-bindendes Lektin, MBL). Entsprechend dem derzeitigen Verständnis über den Mechanismus der C-Typ-Kollektine erfolgt, vermittelt durch Kalzium, die Bindung mikrobiologisch exponierter Kohlenhydrate (z.B. in der Zellwandoberfläche diverser Mikroorganismen) an eine Kohlenhydraterkennungsdomäne der Proteine. Dadurch wird zunächst eine Immobilisierung und dementsprechend eine Opsonierung sowie eine beschleunigte Abwehr der Mikroorganismen durch Phagozytose und intrazelluläre Lyse erreicht (Creuwels et al., 1997).



**Abb. 1.1:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von Lamellarkörperchen in der Zelle (siehe Pfeil).  
Abbildung modifiziert vom Departments of Pathology and Laboratory Medicine at the University of California

Im Gegensatz dazu zeichnen sich die Surfactant Proteine SP-B und SP-C durch eine hochgradige Hydrophobizität aus, die den Proteinen eine Integration in Zellmembranen und Luft-Flüssigkeits-Interphase ermöglicht. Sie können entsprechend ihrer physikochemischen Eigenschaften die Oberflächenspannung von biologischen Grenzflächen reduzieren und bei der Adsorption von Phospholipiden an der Luft-Flüssigkeits-Grenze mitwirken (Notter et al., 1987; Yu and Possmayer, 1990). Die Erstbeschreibung der Surfactant Proteine erfolgte bereits 1979 durch Phizackerle in organischen Extrakten (Phizackerley et al., 1979). Die Charakterisierung und Aufreinigung der Proteine gestaltete sich durch ihre hohe Hydrophobizität und aufgrund des kleinen Molekulargewichts allerdings sehr schwierig (Phizackerley et al., 1979). In den Folgejahren konnte gezeigt werden, dass pulmonales Surfactant zwei unterschiedlich kleine hydrophobe Proteine - SP-B



und SP-C - beinhaltet (Whitsett et al., 1986a; Yu et al., 1987). Diese sind aufgrund der hydrophoben Eigenschaften beim „Acute Respiratory Distress Syndrom“ (ARDS) von großer pathophysiologischer Relevanz. Ein Verlust der Proteine führt zu einem Anstieg der alveolären Oberflächenspannung, die im Rahmen des Atmungsprozesses eine Kollabierung der Lungenalveolen bewirkt (Spragg et al., 1994). Dies bedeutet eine Beeinträchtigung des Gasaustausches und kann zur Schwächung der alveolären Immunabwehr führen.

### 1.1.1 Surfactant Protein A (SP-A)

Das Protein wird durch zwei funktionelle Genabschnitte (SP-A1 und SP-A2) codiert, die auf dem Chromosom 10 des Menschen lokalisiert sind. Beide Gene sind notwendig, um ein stabiles SP-A Molekül zu bilden (Voss et al., 1991). Das Gen codiert ein 248 Aminosäuren großes Protein (White et al., 1985), das durch vier verschiedene Domänen charakterisiert wird (siehe Abbildung 1.1.1).

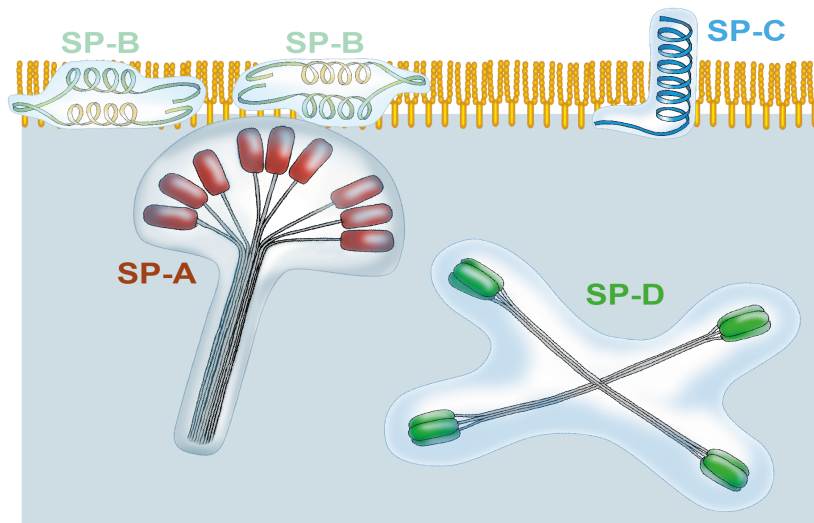


Abb. 1.1.1: Schematische Darstellung der 4 bekannten Surfactant Proteine SP-A, -B, -C und -D.

Das Protein besitzt eine N-terminale Region mit Cysteinresten, durch die eine Disulfidbrücke gebildet wird, die eine hohe Bedeutung für die Struktur des Proteins hat. Daran schließt sich eine kollagenartige Domäne an, die wichtig für die korrekte Zusammenlagerung der Proteinuntereinheiten ist. Die dritte Domäne, als Übergangsregion bekannt, besteht aus einer kurzen Sequenz hydrophober Aminosäuren, die eine  $\alpha$ -Helix bilden. Die letzte Domäne ist die Kohlenhydraterkennungsdomäne. Sie weist eine strukturelle und funktionelle

Ähnlichkeit zur Kollektin-Familie des C-Typs auf und bindet, vermittelt durch Kalzium, Glykolipide und -proteine (Day, 1994).

Die beschriebene Struktur von SP-A weist eine hohe Homologie zum Mannose-bindenden Protein (MBP) auf (Drickamer and McCreary, 1987). In Form von Surfactant-Lipid-Aggregaten bildet SP-A ein 28-36 kDa schweres Protein (Cole et al., 2001), das aus bronchoalveolären Lavagen isoliert werden konnte. SP-A ist für die Bildung von tubulärem Myelin, einer Speicherform des extrazellulären alveolären Surfactants, verantwortlich (Suzuki et al., 1989). Mit der Bildung von tubulärem Myelin wurde SP-A auch eine Funktion bei der Regulation der Insertion von Phospholipiden in Monolayern zugeschrieben. Es fördert somit die von SP-B induzierte Verringerung der Oberflächenspannung in den Alveolen der Lunge, da SP-B die Insertion von Lipiden in den Oberflächenfilm reguliert (Kobayashi et al., 1991).

Dennoch führt die Deletion des SP-A-Gens in Mäusen nicht zu einer Verschlechterung der Lungenstabilität (Korfhagen et al., 1996). SP-A wird zum einen durch Pneumozyten Typ II-Zellen gebildet und über Endocytose von den Pneumozyten Typ II wieder aufgenommen (recycelt) (Wissel et al., 2001). Weiterhin bindet SP-A an Immunzellen und teilweise an Makrophagen (Van Iwaarden et al., 1990), bewirkt die Opsonierung von Mikroorganismen, verstärkt die Stimulation zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen und erhöht die Fc-Rezeptor-vermittelte Phagozytose von Makrophagen (Creuwels et al., 1997). Fc-Rezeptoren binden den konstanten Teil (Fc-Teil) der schweren Ketten von Immunglobulinen. Nach LeVine (1998) weisen SP-A-defiziente Mäuse eine geschwächte Abwehr gegen verschiedene pulmonale pathogene Mikroorganismen auf (LeVine et al., 1998).

### **1.1.2 Surfactant Protein D (SP-D)**

SP-D ist ein hydrophiles 43 kDa großes Protein, das ebenfalls von Pneumozyten Typ II des Alveolarepithels, aber auch von verschiedenen Zellen des Atemtrakts, von mukösen Zellen des Magens und weiteren Zellen synthetisiert wird. Das Gen für SP-D ist ebenfalls auf dem Chromosom 10 lokalisiert und codiert für ein Protein mit 355 Aminosäuren. Es zeichnet sich durch eine sehr hohe strukturelle Ähnlichkeit und eine damit verbundene Homologie zu SP-A und anderen säugetierspezifischen Lektinen aus (Crouch and Wright, 2001). SP-D bindet, vermittelt durch Kalziumionen, Kohlenhydrate und Lipide von Mikroorganismen und spielt daher im

Rahmen der angeborenen Immunabwehr besonders gegen verschiedene bakterielle, virale und fungiforme Pathogene eine Rolle. So bindet es mit seiner Kohlenhydraterkennungsdomäne an Polysaccharide (z.B. Glykane) der äußeren Hülle von Mikroorganismen (z.B. das LPS gramnegativer Bakterien oder Glykoproteine der Hüllmembran von Influenzaviren) und bewirkt dadurch deren Agglutination (Creuwels et al., 1997). Es interagiert direkt z.B. mit dem *Influenzavirus Typ A* (Hartshorn et al., 1998), *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* (Sastry and Ezekowitz, 1993; Ferguson et al., 1999).

Durch die gezielte Deletion von SP-D in Mäusen konnte dessen wichtige Rolle in der Lipidhomöostase der Lunge gezeigt werden (Botas et al., 1998). SP-D-defiziente Mäuse sind durch eine vermehrte Infektanfälligkeit gekennzeichnet und entwickeln eine alveoläre Lipidose, die mit der Aktivierung von Makrophagen und einer vermehrten Aktivierung von Metalloproteinasen einhergeht (Wert et al., 2000). Die SP-D-defizienten Mäuse bilden darüber hinaus eine emphysemähnliche pathologische Veränderung aus, welche die besondere Rolle der Surfactant Proteine während der Regulation pulmonaler Entzündungen widerspiegelt (Ikegami et al., 2000).

### **1.1.3 Surfactant Protein B (SP-B)**

Die Gensequenz von SP-B ist auf Chromosom 2 lokalisiert. Es ist ein sehr kleines Protein mit nur 79 Aminosäuren, das zahlreiche Cysteine enthält (Curstedt et al., 1988). Mittels nicht-reduzierender Präparationen konnte die molekulare Masse von SP-B per SDS-PAGE auf 15-18 kDa geschätzt werden, wohingegen reduzierende Bedingungen ein gut abgrenzbares Produkt bei etwa 7 kDa liefern (Whitsett et al., 1986b; Yu et al., 1988). SP-B als „Pro-Form“ enthält drei Saposin-ähnliche Domänen (SP-B-N; SP-B-R; SP-B-C) und zählt daher zur „Saposin-like“ Proteinfamilie (Patthy, 1991). Saposine sind eine heterogene Familie von Lipid-interagierenden Proteinen, die verschiedene, nur teilweise verstandene, aber unerlässliche, zelluläre Funktionen haben (Bruhn, 2005). Die Pro-Form unterliegt einer posttranslationalen Modifizierung und ist darüber hinaus in der Lage, über Disulfid-Brücken Oligomere unterschiedlicher Größenordnung zu bilden (Whitsett et al., 1986b), welche die vorübergehende oder dauerhafte Interaktion mit Membranen erleichtern (Liepinsh et al., 1997). Durch die Disulfid-Brücken wird eine Stabilisierung des SP-B-Dimers, bestehend aus 2 amphipathischen Helices erreicht (Johansson et al., 1991).

Die N-terminale Domäne des Propeptids SP-B (SP-B-N) spielt eine entscheidende Rolle im intrazellulären Transport des reifen hydrophoben Peptids. Die C-terminale Domäne des Propetids (SP-B-C) ist analog zu Saposin, das in der Pathogenese anderer Lipidspeicherkrankheiten, wie Morbus Chediak-Higashi, von Bedeutung ist.

Im Gegensatz zu den Domänen SP-B-R und SP-B-C ist SP-B-N ein nichtkationisches Peptid. In dieser Hinsicht ähnelt SP-B-N den Amoebapores (porenbildende Proteine), einer Untergruppe der Saposin-Peptide mit zytolytischen und antimikrobiellen Eigenschaften (Leippe, 1999; Bruhn, 2005).

SP-B tritt mit der Lipidschicht an der Lungenoberfläche in Wechselwirkung und bewirkt die Insertion und den Einbau von Lipiden in den Oberflächenfilm, wodurch dessen Stabilisierung gewährleistet wird (siehe Abbildung 1.1.1) (Kobayashi et al., 1991; Oosterlaken-Dijksterhuis et al., 1991). Bei der Expiration wird die alveoläre Oberfläche kleiner und der Oberflächendruck erhöht sich. Dies führt dazu, dass SP-B mit 2 bis 3 Lipidmolekülen aus der Lipidschicht austritt (Taneva and Keough, 1994). Die anschließende Inspiration führt zu einer von SP-B koordinierten Aufnahme von Phospholipiden in die Lipidschicht. In diesem Zusammenhang wird beschrieben, dass die Deletion von SP-B in neugeborenen Kaninchen zu einer ernsthaften Störung und Schädigung der alveolären Oberfläche führt und somit respiratorischen Stress bei den Kaninchen auslöst (Kobayashi et al., 1991). Weiterhin kommt es auch zur Ausbildung einer schweren Atemstörung mit Todesfolge (Nogee et al., 1993). Die Deletion von SP-B bei Mäusen verursacht ein tödliches neonatales Atemnotsyndrom (Melton et al., 2003). Beim Menschen ist die letal verlaufende Alveolarproteinose die bekannteste durch einen Gendefekt von SP-B hervorgerufene Erkrankung (Voss et al., 1992).

Aufgrund der Homologie zu Amoebapores wird auch eine immunologische Funktion von SP-B diskutiert. Neueste Veröffentlichungen belegen die Rolle von SP-B bei der Aktivierung von Alveolarmakrophagen im Rahmen der angeborenen Immunabwehr in der Lunge (Yang et al., 2010).

### **1.1.4 Surfactant Protein C (SP-C)**

Mit 33 bis 35 Aminosäuren ist SP-C eines der kleinsten und gleichzeitig hydrophobsten Surfactant Proteine überhaupt. Die Proteinstruktur besteht zu zwei Dritteln aus einer  $\alpha$ -Helix, die zahlreiche Valine beinhaltet. Das Gen für SP-C ist auf dem Chromosom 8 lokalisiert. Sein primäres Translationsprodukt besteht aus 191

Aminosäuren, die reife Form hat ein Molekulargewicht von 4-6 kDa (Possmayer, 1988; Hawgood and Shiffer, 1991). Wie SP-B unterliegt auch SP-C einer hochgradigen posttranslationalen Modifizierung durch Glycosylierung, Acylierung oder Veresterung mit Fettsäuren (Jacobs et al., 1987; Glasser et al., 1988; Voorhout et al., 1992). Man kann sowohl Monomere als auch dimere Formen von SP-C nachweisen, wobei Es nach wie vor unklar ist, ob diese funktionell unterschiedlich sind. SP-C ist wie SP-B maßgeblich für die Ausbildung und Stabilität oberflächenaktiver Membranschichten verantwortlich und wird darüber hinaus bei der Adsorption von Phospholipiden an der Luft-Flüssigkeits-Grenze benötigt (Notter et al., 1987; Yu and Possmayer, 1990). Es beeinflusst wie SP-B direkt biologische Grenzflächen, verringert die Oberflächenspannung und erhöht die Fähigkeit zur Adsorption des Surfactants, indem es wie ein Anker (siehe Abbildung 1.1.1) zwischen der Phospholipidschicht und der wässrigen Phase vermittelt (Oosterlaken-Dijksterhuis et al., 1991).

Strukturell weist die Pro-Form von SP-C im C-terminalen Teil eine sogenannte BRICHOS-Domäne auf (Sanchez-Pulido et al., 2002). BRICHOS-Domänen kommen auch in anderen Typ-II-Transmembranproteinen vor. Es ist bekannt, dass Mutationen in der BRICHOS-Domäne mit schweren Lungenerkrankungen assoziiert sind (Beers and Mulugeta, 2005). Diese Mutationen führen zu einer fehlerhaften Faltung des murens Proteins und zu einer perinukleären Akkumulation von SP-C (Hawkins et al., 2011). Folglich ist die BRICHOS-Domäne für die korrekte Faltung von SP-C erforderlich und für die amyloidogene Eigenschaft von SP-C verantwortlich. Dies bedeutet, dass SP-C ohne eine intakte BRICHOS-Domäne zur Bildung von verschiedenen  $\beta$ -Faltblatt-Polymeren in Form von Amyloid-Fibrillen neigt (Gustafsson et al., 2000; Kallberg et al., 2001). Als Amyloid bezeichnet man aggregierte Eiweißkörper, die sich in Form von Fibrillen zusammenlagern. Die an der Aggregation beteiligten Proteine werden als amyloidogen bezeichnet. Ca. 25 humane Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson, sind mit Amyloid-Fibrillen assoziiert, welche die Hauptbestandteile seniler Plaques darstellen (Butterfield and Lashuel, 2010). Damit besitzt die BRICHOS-Domäne von SP-C eine Anti-Amyloid-Funktion und beugt als Chaperon der Aggregation von amyloidogenen Domänen im Vollängenprotein vor (Sanchez-Pulido et al., 2002; Johansson et al., 2009; Willander et al., 2012).

## 1.2 Surfactant Proteine im Tränenfilm

Das Auge ist das wichtigste Sinnesorgan des Menschen. Über 90 Prozent aller Sinneswahrnehmungen werden darüber aufgenommen und über 40 Prozent aller Leitungswege des zentralen Nervensystems arbeiten für das Auge. Die Fähigkeit des Sehens beruht auf einem komplexen System aus funktionellen, physiologischen und biochemischen Komponenten. Eine Fehlregulation in nur einem Bereich führt zu einer Beeinträchtigung des Sehvermögens, die wiederum zu einer Einschränkung der Lebensqualität führen kann. Außer den bekannten und weit verbreiteten Schwächen wie Kurz- oder Weitsichtigkeit rücken auch Erkrankungen, die die Hornhaut betreffen, mehr und mehr in den Fokus der Öffentlichkeit. So sind Zahlreiche Infektionen des Auges durch Hornhautverletzung, zu langes Tragen von Kontaktlinsen, Hornhautoperationen oder immunsuppressive Behandlungen begründet (Baum, 1995; McDonald, 2005; Khalil et al., 2007; Lemp, 2008; Resnikoff et al., 2008).

Bakterielle Keratitis und Konjunktivitis sind die am häufigsten auftretenden Infektionserkrankungen in der praktischen Ophthalmologie. Wie Baum nachweisen konnte, verursachen bakterielle Toxine beim Wirt weitreichende Zellschädigungen, die zu bleibenden Vernarbungen oder sogar zur Erblindung führen können (Baum, 1995). Die Krankheitserreger *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* sind sehr oft für diese Infektionen verantwortlich (Brennan and Coles, 1997; Levartovsky et al., 2001). Außer diesen grampositiven und gramnegativen Bakterien können auch Viren wie das Herpes-simplex-Virus (HSV) eine Keratitis - häufigste virale korneale Erblindungsursache in den Industrieländern - auslösen (Fleiszig et al., 1992).

Zum Schutz gegen bakterielle Infektionen des Auges sind seit langem antimikrobielle Substanzen bekannt (z.B. das Lysozym in der Tränenflüssigkeit), die von den unterschiedlichen Zellen der Augenoberfläche und des Tränenapparates (Tränendrüse, Epithelien der Konjunktiva, Kornea und der ableitenden Tränenwege) synthetisiert werden. Die Aufgaben des durch den Lidschlag gleichmäßig über die Augenoberfläche verteilten Tränenfilms sind unterschiedlich. So entfernt der Tränenfluss Fremdkörper und abgeschilferte Epithelzellen in Richtung ableitende Tränenwege, schützt die Augenoberfläche vor Mikroorganismen und den mit ihnen verbundenen Infektionen wie auch durch eine gleichmäßige Befeuchtung vor einer Austrocknung. Die Tränenflüssigkeit sorgt für ein reibungsarmes Gleiten der

Augenlider über das Auge, gleicht kleinere Unebenheiten auf der Augenoberfläche aus und verbessert die optischen Eigenschaften der Hornhaut, indem sie für eine optisch glatte Oberfläche am Luft-Auge-Übergang sorgt und somit in der Brechung des Lichtes eine wichtige Rolle spielt. Zudem unterstützen die Tränen als einzige Nährstoffquelle für die gefäßlose Hornhaut den aeroben Stoffwechsel durch Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen, wie zum Beispiel Vitamin A (Brandis, 1985).

Die Tränenflüssigkeit ist ein komplexes Flüssigkeitsgemisch aus über 500 Inhaltsstoffen (de Souza et al., 2006) und wird von den serösen und seromukösen Tränendrüsen produziert. Sie ist eine klare, alkalische Lösung und besteht zu ca. 98 % aus Wasser. Die restlichen ca. 2 % setzen sich aus gelösten Proteinen wie z.B. Albumin als Transportprotein für Metabolite, sowie aus Globulinen und den bakterizid wirkenden Lysozym, Laktoferrin und Lipocalin zusammen. Darüber hinaus zählen auch Lipide, Muzine abgeschilferte Epithelzellen und Fremdstoffe aus der Umgebungsluft zu den Komponenten des Tränenfilms.

Weitere Bestandteile der Tränenflüssigkeit sind die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Surfactant Proteine A, B, C und D, die erst vor kurzem am Auge beschrieben wurden (Bräuer et al., 2007a; Bräuer et al., 2007b). Diese oberflächenaktiven Proteine, die in ähnlicher Form im Surfactant-System der Lunge vorkommen (vgl. Abschnitt 1.1.1), haben vermutlich im Hinblick auf Funktionalität und Stabilität des Tränenfilms eine große Bedeutung. Fehlregulationen in diesem komplexen System können leicht zur Ausbildung diverser Pathologien führen.

Funktionsstörungen des Tränenfilms haben zahlreiche Ursachen. Dabei spielen exogene (z.B. Kontaktlinsen, Raumluft, Medikamente, Ernährung) sowie endogene Einflüsse (Alter, Hormonstörungen, Nachlassen der Tränenproduktion, Diabetes u.a.) eine Rolle. Etwa 10 bis 20 % der Normalbevölkerung Mitteleuropas und nahezu jeder sechste Deutsche leidet unter dem Krankheitsbild „Trockenes Auge“. Das „Trockene Auge“ ist eine Störung des Tränenfilms, die häufig von Symptomen wie Jucken, Brennen oder Fremdkörpergefühl begleitet wird (DEWS-Report, 2007). Die Symptome und deren Begleiterscheinungen führen zu einem Verlust an Lebensqualität.

Ein intakter Tränenfilm verhindert, wie oben erwähnt, die Besiedlung des Auges mit pathogenen Mikroorganismen. Von den antimikrobiell wirkenden Substanzen der Tränenflüssigkeit ist Lysozym die am besten beschriebene. Sein hauptsächlich gegen grampositive Bakterien gerichtetes Wirkspektrum verhält sich synergistisch

zum Enzym  $\beta$ -Lysin, das ebenfalls bakterielle Zellmembranen zerstört (Fleming, 1932; Pleyer and Baatz, 1997). Das eisenbindende Protein Lactoferrin verfügt ebenfalls über antimikrobielle Eigenschaften und bewirkt unter anderem die Hemmung des Wachstums von *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* und *Pseudomonas aeruginosa* (Kijlstra, 1990; Flanagan and Willcox, 2009). In den letzten Jahren waren die Forschungsgruppen um Bernhard Redl (Innsbruck, Österreich, Medizinische Universität) sowie die Arbeitsgruppe um Thomas Miller (Sydney, Australien, School of Natural Sciences) in der Lage, das Protein Lipocalin der Tränenflüssigkeit funktionell zu charakterisieren (Fluckinger et al., 2004; Mudgil and Millar, 2008). Sie wiesen nach, dass Lipocalin durch Entzug von Eisen antibakteriell gegen *Escherichia coli* und verschiedene Pilze wirkt. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass Tränenflüssigkeit außer den genannten Substanzen auch sekretorische Phospholipase A<sub>2</sub> enthält. Phospholipase A<sub>2</sub> ist ein Enzym, das in Verbindung mit Lysozym und  $\beta$ -Lysin besonders gegen grampositive Bakterien wirksam ist (Qu and Lehrer, 1998; Girgis et al., 2003).

Außer den erwähnten Proteinen lassen sich im Tränenfilm noch andere antimikrobielle Proteine und Peptide nachweisen, die entweder in immer gleich bleibender Menge (wie Lysozym) oder aber erst auf einen mikrobiellen Reiz hin induziert werden. Sie stellen somit eine Art körpereigener Antibiotika dar. Man nimmt an, dass sie in der Lage sind, Poren in die Zellwand von Mikroorganismen zu generieren und damit zum Absterben der Mikroorganismen beitragen. Zu den am besten charakterisierten Gruppen von antimikrobiellen Peptiden zählen die Defensine, die in  $\alpha$ -Defensine und  $\beta$ -Defensine eingeteilt werden (Garreis et al., 2010).

Andere antimikrobielle Peptide der Augenoberfläche sind das BPI (bactericidal permeability-increasing protein), CAP37 (heparin-bindendes Protein), LL37 (humanes antimikrobielles Peptid/hCAP-18), LEAP1 (leber-exprimiertes antimikrobielles Peptid 1 oder Heptacidin) und LEAP2. Eine Übersicht zur funktionellen Bedeutung der Proteine an der Augenoberfläche wurde von Mc Dermott (2004) erstellt (McDermott, 2004). Die Expression der antimikrobiellen Wirkstoffe kann direkt durch bakterielle Stoffwechselprodukte oder Zellwandbestandteile, wie beispielsweise Endotoxin, induziert werden (Fearon and Austen, 1980). Diese auch als „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs)



bezeichneten Produkte der Mikroorganismen werden durch eine Fülle verschiedenartiger Membranrezeptoren, wie den 11 humanen „Toll like“ Rezeptoren (TLRs), erkannt und lösen somit eine Immunantwort aus (Qureshi et al., 1999).

### **1.3 Wechselwirkungen zwischen Surfactant Proteinen und den opportunistisch pathogenen Bakterien *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa***

Die Bakterien *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* verursachen in der Lunge pulmonale Infektionen. Zum Beispiel kommt es bei der zystischen Fibrose zur übermäßigen Besiedelung durch *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* (Lindemann, 2000). Bei dieser Erkrankung konnte gezeigt werden, dass es zu einer Reduktion der funktionsfähigen Surfactant Proteine kommt (Postle et al., 1999; Von Bredow et al., 2003). Eine Deregulation der Surfactant Proteine wirkt sich infolgedessen negativ auf die Immunität der Atemwege aus und führt zu einer gesteigerten Entzündungsreaktion. Unter normalen Bedingungen sind SP-A und SP-D in der Lage, sowohl gramnegative als auch grampositive Bakterien zu binden und zu neutralisieren, indem sie als Opsonine wirken. Opsonine sind im Körper vorkommende Proteine, die einen Teil der unspezifischen Immunantwort darstellen. Diese Proteine induzieren eine bakterielle Aggregation und leiten damit die Phagozytose ein (Mason et al., 1998; Orgeig et al., 2010). Sie interagieren mit einer Vielzahl von Mikroorganismen, wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella minnesota* oder *Staphylococcus aureus* (LeVine et al., 2001; Alcorn and Wright, 2004; Kishore et al., 2006a). Sowohl SP-A als auch SP-D binden Kalzium vermittelt an Lipopolysaccharide (LPS) der Bakterien (Van Iwaarden et al., 1994). Die Bindung der Bakterien durch die Surfactant Proteine erleichtert die bakterielle „clearance“ durch zahlreiche Mechanismen, von denen einige im Folgenden exemplarisch aufgeführt sind. Als Opsonine unterstützen SP-A und SP-D die Phagozytose der Bakterien durch die Stimulierung der Aktivität von Makrophagen (LeVine et al., 2001; Ledford et al., 2010). Darüber hinaus erhöhen sie die Durchlässigkeit der Membranen, was zum Zelltod führt (Kishore et al., 2006b; Kuang et al., 2011). Die Wechselwirkung von SP-A mit *Staphylococcus aureus* ist eine spezialisierte Interaktion. SP-A vermittelt die Opsonisierung durch Bindung an das Adhäsin „Eap“ von *Staphylococcus aureus* (Sever-Chroneos et al., 2011) und interagiert dann mit dem SP-A-Rezeptor-210 (SP-R210) der Makrophagen, die

wiederum die Phagozytose durchführen.

Die Rolle von SP-B im Rahmen der angeborenen Immunabwehr von gramnegativen und grampositiven Mikroorganismen konnte durch Li Yang (2010) gezeigt werden (Yang et al., 2010). Der Mechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt, man vermutet allerdings, dass die amoebapore Eigenschaft von Pro-SP-B die Bildung transmembraner Poren induziert, die dann wiederum zum Tod der Mikroorganismen führen (Leippe et al., 1991).

Bräuer et al. (2007) konnten durch *in vitro*-Untersuchungen an kultivierten Kornea- und Konjunktivaepithelzellen zeigen, dass bakterielle Zytokine Einfluss auf die Synthese von SP-A und SP-D haben (Bräuer et al., 2007b). Bakterielle Überstände beinhalten zahlreiche Zellwandbestandteile, wie zum Beispiel LPS oder Protein A, und ermöglichen somit eine intrazelluläre Reaktion im Zellkulturmodell darzustellen, wie sie durch eine Besiedlung mit Bakterien hervorgerufen würde. Auf dieser Grundlage werden schon seit langem Stimulationsexperimente mit Bakterienüberständen von *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa in vitro* durchgeführt, um eine bakterielle Infektion zu simulieren.

### **1.3.1 *Staphylococcus aureus***

Der humanpathogene Erreger *Staphylococcus aureus* ist ein obligat aerobes, grampositives Bakterium. Die kokkoiden Bakterien sind unbeweglich, bilden keine Sporen und lagern sich traubenförmig zusammen. *Staphylococcus aureus* zählt bei ca. 70 % der Bevölkerung zur normalen Haut- und Schleimhautflora. Als opportunistisch pathogener Mikroorganismus kann er bei Menschen mit geschwächtem Immunsystem Krankheiten initiieren bzw. diese verstärken. Er ist Auslöser von Wundinfektionen und Abszessen und kann lebensbedrohliche Infektionen, wie Herzmuskelentzündungen (Myokarditis), Sepsis oder auch eine Lungenfibrose hervorrufen. Seine Pathogenität beruht auf einer Vielzahl von Pathogenitätsfaktoren (z.B. Adhäsine, Invasine), die das Andocken an die Zelle bis hin zur Kolonisation im Gewebe ermöglichen können. Weiterhin produziert *Staphylococcus aureus* das Oberflächenprotein A und bildet Mikro-Kapseln aus. Protein A erlaubt die Bindung des Fc-Teils von IgG, wodurch die Fc-Rezeptor-vermittelte Phagozytose verhindert wird (Hawiger et al., 1979).

Zu den Pathogenitätsfaktoren von *Staphylococcus aureus* zählen ebenfalls verschiedene Toxine, wie z.B. das hochwirksame Enterotoxin, das bei

Lebensmittelvergiftungen eine entscheidende Rolle spielt (Harris et al., 1993). Sehr dramatisch ist dabei die Wirkungsweise des „toxic shock syndrome toxin 1“. Es verursacht toxische Schockzustände, die von Blutungen, Fieber bis hin zu Organversagen begleitet werden (Bohach et al., 1990; Marrack and Kappler, 1990). Cytotoxine führen zu einer kontinuierlichen Zerstörung von Zellen (Sepsis) (Bhakdi and Trantum-Jensen, 1991) und zur Initiation pro-inflammatorischer Prozesse. Auch die im Abschnitt 1.2 beschriebene bakterielle Keratitis und Konjunktivitis werden durch diese Toxine verursacht (Baum, 1995). Durch *in vitro*-Untersuchungen an kultivierten Kornea- und Konjunktivaepithelzellen konnte der Einfluss der bakteriellen Zellwandbestandteile auf die Synthese von SP-A und SP-D gezeigt werden (Bräuer et al., 2007b). Staphylokokken sind in der Lage, noch andere gewebezerstörende Enzyme, wie Proteasen, Lipasen und Hyaluronidasen zu bilden.

### **1.3.2 *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* ist ein gramnegatives, aerobes Stäbchen. Es ist außerordentlich anspruchslos und daher sowohl in feuchter als auch trockener Umgebung lange überlebensfähig. Die übermäßige Besiedelung mit *Pseudomonas aeruginosa* wird besonders bei Patienten mit Läsionen an der Haut und an den Schleimhäuten durch eine geschwächte Immunität begünstigt (Stryjewski and Sexton, 2003). Das Bakterium verfügt über eine Vielzahl von Pathogenitätsfaktoren. Unter anderem bildet es zwei extrazelluläre Proteinasen, die als alkalische Proteinase und Elastase bezeichnet werden (Matsumoto et al., 1998). Die Serin-Protease LasA und die Zink-Metalloproteinase LasB bauen Elastin ab, das nahezu 30 % des Proteingehalts der Lunge darstellt (Galloway, 1991). Das Lipopolysaccharid ist das wichtigste Oberflächenmolekül des Mikroorganismus und ist mit seinem Lipidanteil (Lipid A) in der äußeren bakteriellen Membran verankert. LPS wird erst bei Lyse des Bakteriums freigesetzt, besitzt toxische Eigenschaften und wird auch als Endotoxin bezeichnet. Darüber hinaus verfügt LPS über ausgeprägte immunstimulierende Eigenschaften (Kronborg et al., 1992; Goldberg and Pler, 1996). Des Weiteren ist bekannt, dass die chronische Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* und die Freisetzung des zugehörigen LPS zur Destruktion des Lungenparenchyms bei Patienten mit zystischer Fibrose beiträgt (Kronborg et al., 1992). Innerhalb der Lunge kommt es dabei zur Ausbildung mukoider Varianten (Gibson et al., 2003). Die Zellen bilden durch Sekretion innerhalb von 24 Stunden

exomukopolysacchariden Schleim (Tielen et al., 2005), der aus Alginat besteht, das sich aus Copolymeren der Monosaccharide Mannuronat und Guluronat zusammensetzt (Grobe et al., 1995). Durch Quervernetzung und Acetylierung der Mukopolysaccharide sind die so eingeschlossenen Bakterien vor enzymatischem Abbau und Immunabwehr geschützt. In diesem Schutzfilm aus Alginat wächst *Pseudomonas aeruginosa* in der Lunge in Mikrokolonien und ist für die körpereigene Abwehr erschwert zugänglich (Vochem et al., 2001).

### **1.4 Unbekannte Surfactant Proteine**

Im Zusammenhang mit Untersuchungen von Surfactant Proteinen (SP-A, -B, -C und -D) in der Lunge konnte durch weitere Genomanalysen theoretisch und bioinformatisch die Existenz von zwei bislang unbekanntem Surfactant Proteinen auf Genomebene gezeigt werden. Das bedeutet, dass nur die DNA-Sequenz zur Verfügung steht, die Proteinstrukturen und Funktionen aber noch nicht aufgeklärt sind. Sie werden putatives SP-G (Surfactant assoziiertes Protein 2 (SFTA 2)) und putatives SP-H (Surfactant assoziiertes Protein 3 (SFTA 3)) genannt (Heilig et al., 2003; Zhang and Henzel, 2004). Die Nomenklatur SP-H und -G beruht vermutlich auf der Reihenfolge der Benennung. Diese putativen Surfactant Proteine besitzen keine sequenziellen Ähnlichkeiten zu den bekannten Surfactant Proteinen. Sie weisen jedoch physikochemische Eigenschaften auf, die ebenfalls bei den bekannten Surfactant Proteinen eine wichtige Rolle spielen (F. Rausch, Dissertation 2012). Somit stellen diese noch uncharakterisierten Proteine möglicherweise eine neue Gruppe von oberflächenaktiven Proteinen dar.

#### **1.4.1 Surfactant Protein G (SFTA2)**

Das noch nicht charakterisierte Surfactant Protein G (SFTA2) ist auf dem Chromosom 6 codiert. Mittels spezieller Analysesoftware (Translate, ExPASy Proteomics tools) konnte gezeigt werden, dass es sich mit nur 78 Aminosäuren um ein kleines Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 8 kDa handeln muss. Strukturanalysen weisen auf ein leicht hydrophobes Protein mit zwei verschiedenen Strukturdomänen hin (F. Rausch, Dissertation 2012). N-Terminal wird ein Signalpeptid vermutet. Es ist bekannt, dass sezernierte Proteine und die Mehrzahl der Zelloberflächenproteine ein N-terminales Signalpeptid besitzen. Das Signalpeptid ist in der Regel zwischen 15 und 40 Aminosäuren lang, von

wesentlicher Bedeutung für die Proteinsekretion und wird anschließend vom reifen Protein abgespalten (Nakai, 2000). Das Signalpeptid von SP-G ist 19 Aminosäuren lang. Es kann angenommen werden, dass es sich bei SP-G ebenfalls um ein sekretorisches Protein handelt (Datenbank UniProt KB).

Die zweite Domäne stellt vermutlich die oberflächenaktive Struktur des Proteins dar, über dessen möglichen Aufbau jedoch keinerlei Informationen vorliegen. Es ist seit längerem bekannt, dass Surfactant Proteine hochgradig posttranslational z.B. durch Glykosylierung, Phosphorylierung, Acetylierung, Prenylierung, Palmitoylierung oder Myristoylierung hochgradig modifiziert sind (Jacobs et al., 1987; Glasser et al., 1988; Voorhout et al., 1992). Aus Analysen der Proteinsequenz lässt sich ableiten, dass SP-G mit hoher Wahrscheinlichkeit glykosyliert, phosphoryliert und palmitoyliert sein kann (F. Rausch, Dissertation 2012). Über die Bedeutung ist noch nichts bekannt.

### **1.4.2 Surfactant Protein H (SFTA3)**

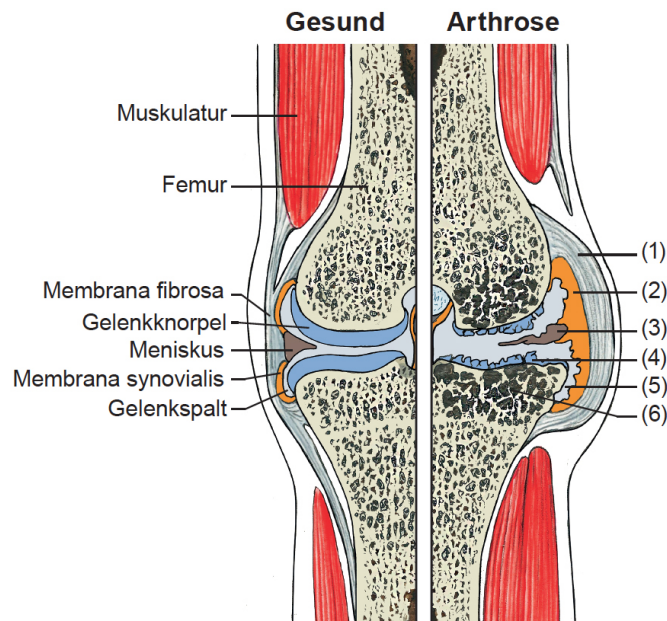
Das auf dem Chromosom 14 codierte putative Surfactant Protein H (SFTA3) ist mit ca. 10 kDa ebenfalls ein sehr kleines Protein, das sich aus 94 Aminosäuren zusammensetzt. Aus der Sequenz lässt sich ableiten, dass es sich um ein hydrophiles Protein handelt. Über die 3-dimensionale Struktur des Proteins und die funktionelle Domäne in der Sequenz ist jedoch noch nichts bekannt. Lediglich Modifizierungen wie Glykosylierung, Phosphorylierung und Palmitoylierung konnten durch statistische Vorhersageprogramme prognostiziert werden (F. Rausch, Dissertation 2012). SP-H verfügt demnach über posttranslationale Modifizierungen wie sie auch für andere Surfactant Proteine beschrieben wurden (Jacobs et al., 1987; Glasser et al., 1988; Voorhout et al., 1992).

## **1.5 Der humane Gelenkknorpel**

Knorpel ist aufgrund seiner funktionellen Eigenschaften ein spezielles Stützgewebe, das sich bei mechanischer Be- und Entlastung verformen kann und so der Belastung entgegen wirkt. Diese Druckelastizität kommt durch das Zusammenspiel von Proteoglykanen und Kollagenfibrillen zustande. Außer dem im menschlichen Körper am weitesten verbreiteten hyalinen Knorpel werden noch zwei weitere Typen (elastischer Knorpel und Faserknorpel) unterschieden, die zusätzliche Matrixkomponenten besitzen (Lüllmann-Rauch, 2009).

Der hyaline Knorpel besteht in erster Linie aus Knorpelzellen (Chondrozyten) und Extrazellulärmatrix (EZM), die von den Chondrozyten synthetisiert und sezerniert wird. Die Hauptbestandteile der EZM sind Kollagene und Proteoglykane. Das Grundgerüst der EZM wird von Kollagenfibrillen gebildet (Sandell, 2007). Im hyalinen Knorpel sind verschiedene Kollagentypen eingelagert, wobei Kollagen Typ II den Hauptanteil bildet. Weiterhin finden man die Kollagentypen VI, IX und XI (Mullan et al., 2007). Proteoglykane sind Makromoleküle, die aus gekoppelten sulfatierten Glykosaminoglykanen bestehen. Das Hauptproteoglykan ist das Aggrecan, was zusammen mit dem Polysaccharid Hyaluronan große Aggregate bildet, die an ein Netz aus Kollagenfibrillen binden (Kiani et al., 2002).

Das von einem Perichondrium (Knorpelhaut) umgebene hyaline Knorpelgewebe ist normalerweise nicht vaskularisiert und gehört somit zu den bradytrophen, über Diffusion versorgten Geweben (Claassen et al., 2011). Die Hauptfunktion des Perichondriums liegt in der Nährstoffversorgung des Knorpels. Die benötigten Nährstoffe gelangen durch das Perichondrium in die unmittelbare Nähe des Knorpels und werden dann durch Diffusionsprozesse zu den Chondrozyten transportiert. Eine Ausnahme bildet der Gelenkknorpel, dem ein Perichondrium fehlt. Die Funktion der Nährstoffversorgung übernimmt beim Gelenkknorpel die Synovia (Gelenkschmiere), die von Typ-B-Synoviozyten produziert wird. Die obere Knorpelschicht wird dabei durch einfache Diffusionsvorgänge versorgt und die tieferen Schichten über Konvektion. Bei der Konvektion handelt es sich um eine Flüssigkeitsverschiebung durch Belastung des Gelenkes. Durch die auftretenden Kräfte wird gebundenes Wasser aus der EZM in den Gelenkspalt gepresst und es kommt zur Durchmischung nährstoffhaltiger Synovia mit der Knorpelflüssigkeit. Bei der anschließenden Entlastung des Gelenks nimmt die EZM wieder Flüssigkeit aus der Gelenkhöhle auf, wodurch Nährstoffe in die tiefen Knorpelschichten gelangen. Bei jeder Be- und Entlastung wird somit der Knorpel mit wichtigen Metaboliten (Nährstoffe, Sauerstoff) versorgt (Junqueira et al., 2005). Eine ausreichende Bewegung ist daher für das Knorpelgewebe von entscheidender Bedeutung. Bei längerer Bewegungseinschränkung, aber auch bei einer Überbelastung kommt es zur Unterversorgung des Knorpels mit nachfolgenden Knorpelschädigungen (Schünke, 2000).



**Abb. 1.4.1:** Schematische Darstellung des gesunden im Vergleich zum arthritisch veränderten Gelenk mit deutlich verdickter Gelenkkapsel (1) Membrana synovialis (2) Schematische Darstellung weiterer typischer Befunde bei der Arthrose: Auffaserungen und Fissuren (Risse) am Meniskus (3) und gelenküberziehenden Knorpel (4), Osteophyten (5) und Geröllzysten (6).

Eine der häufigsten Schädigungen des Gelenkknorpels ist die Arthrose (siehe Abbildung 1.4.1). Ihr kommt mit zunehmendem Alter der Bevölkerung eine wachsende Bedeutung zu. Bereits 90 % der über 65-Jährigen sind betroffen (Theiler, 2002). Zahlreiche Faktoren, wie die genetische Disposition oder das Geschlecht, haben einen Einfluss auf die Erkrankung. So konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass hauptsächlich Frauen an Gelenksarthrose erkranken (Claassen et al., 2011). Als eine viel diskutierte Ursache wird dabei die hormonelle Umstellung in den Wechseljahren angesehen.

### 1.5.1 Surfactant Proteine im humanen Gelenkknorpel

Das Vorhandensein von Surfactant Proteinen im Knorpel selbst wurde bis heute noch nicht beschrieben. Jedoch konnte in den umliegenden Bereichen des Gelenkknorpels gezeigt werden, dass SP-A und -D in der Synovia des Gelenkspalts exprimiert werden (Kankavi, 2006). Es gibt Hinweise darauf, dass auch Stammzellen der Membrana synovialis SP-A sezernieren können (Vandenabeele et al., 2003).

Wie Teile des Auges zählt auch der Knorpel zu den sogenannten immunprivilegierten Geweben (Streilein, 1996). Sie zeichnen sich durch einen immunologischen Sonderstatus aus, der durch eine reduzierte Aktivierbarkeit des

spezifischen und des unspezifischen Immunsystems gekennzeichnet ist (Streilein, 1996), obwohl auch hier analog zu anderen Organen humorale und zelluläre Immunreaktionen stattfinden können (Grisanti, 1998). Bei Transplantationen spielt das Immunprivileg eine besondere Rolle. Dadurch sind Transplantationen von z.B. Knorpel, Kornea und Linse ohne besondere Überprüfung des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) möglich.

Außer der bekannten Gelenkerkrankung wie Arthrose können auch andere entzündliche Erkrankungen vorliegen. Die bakterielle Arthritis ist durch das Eindringen von Bakterien, hauptsächlich von *Staphylococcus aureus*, in den Gelenkraum gekennzeichnet (Horowitz et al., 2011). Bakterielle sowie virale Infektionen und die Regulation von Entzündungsprozessen werden dabei, wie bereits erwähnt, durch die Surfactant Proteine als Bestandteil des unspezifischen Immunsystems reguliert (Van Iwaarden et al., 1990; Stahlman et al., 2002; Sano and Kuroki, 2005).



### 1.6 Zielstellung der Arbeit

Voraussetzung für die vorliegende Arbeit ist die Annahme, dass die in der Literatur beschriebenen funktionalen Eigenschaften der Surfactant Proteine auch in anderen Geweben für die Immunabwehr und die Stabilität von Oberflächenfilmen eine große Bedeutung haben. Entsprechend sollen Surfactant Proteine in verschiedenen Organen / Geweben des menschlichen Organismus untersucht werden, in denen Flüssigkeiten und Lipidfilme für die Aufrechterhaltung der biologischen Funktionen eine Rolle spielen.

In die Untersuchungen sind die Surfactant Proteine SP-G und SP-H mit dem Ziel: a) der Detektion in verschiedenen Geweben (hauptsächlich am Auge und in der Lunge), b) der umfassenden Charakterisierung der Proteine unter Zuhilfenahme von bioinformatischen Analysen (ExpASy, Proteomics Tools) und c) der Erstellung erster Modellstrukturen mittels computergestützter Proteinmodellierung, einbezogen worden. Die Existenz der Proteine sollte mittels klassischer molekularbiologischer Experimente auf mRNA- Ebene, Proteinebene und immunhistologisch bestätigt werden. Für funktionelle Untersuchungen der Surfactant Proteine SP-G und -H werden „größere“ Mengen an gereinigtem und aktivem Surfactant Protein benötigt. Um diese in ausreichend hoher Konzentration zur Verfügung zu haben, muss ein geeignetes Expressionssystem etabliert werden. Zunächst ist für die Versuche das klassische auf *E. coli* basierende Expressionssystem genutzt worden, um die generell schwer zu isolierenden Proteine erstmalig zu gewinnen. Im zweiten Schritt ist beabsichtigt, ein eukaryontisches Expressionssystem einzusetzen, da bekannt ist, dass die posttranslationalen Modifikation der bekannten Surfactant Proteine die Funktionen bestimmen. Übliche Expressionssysteme wie Hefe und Insektenzelllinien weisen nur eine unzureichende Proteinmodifikation auf. Deshalb wird auf *Leishmania tarentolae* zurückgegriffen. Dieses auf Protozoen basierende Expressionssystem zeichnet sich durch eine hohe Proteinmodifizierung aus, die den humanen Modifikationen sehr nahe kommt.

Die Wechselwirkung von *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* mit den Surfactant Proteinen bildet einen weiteren Schwerpunkt bei der Untersuchung der funktionellen Eigenschaften der oberflächenaktiven Proteine. Bräuer et al. (2007) konnten mit *in vitro*-Untersuchungen an kultivierten Kornea- und Konjunktivaepithelzelllinien zeigen, dass bakterielle Zellwandbestandteile auf die Synthese von SP-A und SP-D einen Einfluss haben (Bräuer et al., 2007b). Schon seit langem

werden im Zellkulturmodell Stimulationsexperimente mit Bakterienüberständen von *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa in vitro* durchgeführt, um eine bakterielle Infektion zu simulieren. Bei Vorarbeiten wurden SP-spezifische Antikörper gegen die eingesetzten Bakterienüberstände getestet. Dabei wurden unerwarteterweise Antikörper-Reaktionen festgestellt. Ziel dieser Arbeit ist es, die in den Vorarbeiten erhaltenen Ergebnisse näher zu analysieren und Einflüsse von Nährbodenbestandteilen humanen Ursprungs oder eine Kontamination mit humanen Materialien auszuschließen. Weitere Untersuchungen mit *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* sollen zeigen, ob die Bakterien selbst zur Produktion von Surfactant Proteinen oder vergleichbaren Proteinen fähig sind. Darüber hinaus soll der Gehalt an diesen Proteinen mittels ELISA bestimmt und mittels Immun-Transmissions-Elektronenmikroskopie lokalisiert werden. Außerdem soll untersucht werden, ob die Proteine aktiv unter Stressbedingungen reguliert werden.

In der vorliegenden Arbeit wird auch der Frage nach der möglichen Existenz der Surfactant Proteine A, B, C und D in den Chondrozyten des hyalinen Gelenkknorpels nachgegangen. Hintergrund für diese Überlegungen ist, dass Knorpel zu den Immunprivilegierten Organen gezählt wird. Er besitzt wie die Kornea bradytrophe Eigenschaften (Claassen et al., 2011). Die Kornea wird ebenfalls gefäß- und nervenfrei über Diffusion versorgt und auch dort konnten Surfactant Proteine nachgewiesen werden (Bräuer and Paulsen, 2008). Über klassische molekularbiologische Experimente soll die Existenz der Proteine auf mRNA-Ebene, Proteinebene und immunhistochemisch nachgewiesen werden. Am klinischen Beispiel der Arthrose werden alters- und abnutzungsabhängige Veränderungen der Expression der Surfactant Proteine mittels ELISA untersucht.

Alle Untersuchungen setzen die umfangreiche Anwendung molekularbiologischer, mikrobiologischer und bioinformatischer Techniken und Methoden voraus und sollen zu einem besseren Verständnis der Surfactant Proteine beitragen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme und Protozoen

Für die Vervielfältigung rekombinanter Plasmide wurden folgende chemokompetente Bakterien verwendet:

<i>Escherichia coli</i> ; XL-Gold 10	Tetr $\Delta(mcrA)183$ $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15</i> Tn10 (Tet') Amy Cam'] (Stratagene)
--------------------------------------	---

Die in der Tabelle (siehe Anhang 7.4) zusammengefassten Stämme kamen für die molekularbiologischen Untersuchungen an Bakterien zum Einsatz.

Die Etablierung eines Surfactant Expressionssystems erfolgte an:

<i>Leishmania tarentolae</i>	Jena Bioscience
<i>Escherichia coli</i> ; BL21Star (DE3)	F' <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lac ZΔM15</i> <i>ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galk</i> <i>rpsL (Str<sup>r</sup>) endA1 nupG</i> (Invitrogen)

#### 2.1.2 Plasmide und Vektoren

Für die Erstellung von Genkonstrukten wurden Plasmide der Firma Source BioScience LifeSciences eingesetzt, welche die „*open reading frames*“ (ORF) für das jeweilige Surfactant Proteine beinhalten.

Surfactant Protein A	IRAUp969H0686D
Surfactant Protein B	IRAKp961K1368Q
Surfactant Protein C	IRAUp969F0244D
Surfactant Protein D	IRAUp969D0386D
Surfactant Protein H (SFTA3)	IRAKp961P2288Q
Surfactant Protein G (SFTA2)	IRAKp961J2287Q

Für Klonierungsarbeiten wurden folgende Vektoren verwendet:

pET100/D-Topo	Klonierung von PCR Produkten	Invitrogen
pLEXSY-2	Klonierung von PCR Produkten	Jena Bioscience

### 2.1.3 Oligonukleotid-Primer

Die Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma MWG.net synthetisiert. Die verwendeten Primer sind in der Tabelle 7.4 (siehe Anhang) zusammengefasst.

### 2.1.4 Verwendete Gewebeproben von Mensch und Maus

#### 2.1.4.1 Humane Kniegelenksknorpelproben

Die Proben (n=15) stellte das Institut für Rechtsmedizin der Berliner Charité zur Verfügung. Sie wurden für Western-Blot Analysen und zur immunhistologische Färbung eingesetzt. Tabelle 2.1.4.1 zeigt eine Aufstellung der Präparate in Bezug auf Alter und Geschlecht der Probanden. Die Bereitstellung der Präparate ermöglichte die freundliche Unterstützung von Dr. S. Guddat.

Tab. 2.1.4.1: Kniegelenksknorpelpräparate Mensch

Alter	3	7	22	28	33	38	41	48	54	59	62	66	73	83	90
Geschlecht	♀	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♀	♂	♂	♀	♀

#### 2.1.4.2 Kniegelenksknorpelpräparate Maus

Das Tiermodell der STR/Ort Maus dient der Untersuchung des Krankheitsbildes Arthrose. Die Mäuse sind durch eine genetische Prädisposition für die Entwicklung einer Arthrose in weniger als 6 Monaten gekennzeichnet. In Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Müller-Hilke aus dem Institut für Immunologie der Universität Rostock wurden die Präparate immunhistochemisch untersucht. Das jeweilige Alter der Mäuse und der Arthrosegrad sind der Tabelle 2.1.4.2 zu entnehmen. Die Einteilung der Stadien erfolgte nach Kellgren und Lawrence (1963).

Tab. 2.1.4.2: Arthrosegrade und Alter der STR/Ort Mäuse

Grad	Alter	Geschlecht	Sichere Arthrosezeichen
0	4 Monate	♀	Keine morphologischen Veränderungen
I	9 Monate	♀	Abnahme der Knorpelhöhe
II	10 Monate	♂	Subchondrale Sklerose, Knorpeldefekte
III	12 Monate	♂	Zystenbildung, Osteophytenbildung, Knochenabschliff
IV	≥ 12 Monate	♂ / ♀	Vollständiger Knorpelverlust mit blankem Knochen

### 2.1.4.3 Verschiedene humane Gewebeproben

Die untersuchten Proben stammen von Körperspendern aus dem Institut für Anatomie Lehrstuhl 2 der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg sowie dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Augenlider, Kornea, Konjunktiva, Tränendrüse, Tränenflüssigkeit, Lunge, Milz, Hoden, Knorpel, Magen, Darm, Nasenepithel, Niere wurden im aufgeführten Methodenspektrum eingesetzt. Die Tränenflüssigkeit wurde mit Hilfe eines in den Saccus conjunctivalis (Bindehautsack) eingesetzten Schirmer-Streifens gewonnen.

## 2.2 Molekularbiologische Standardmethoden

### 2.2.1 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau ermöglicht durch das spezifische Schneiden von DNA die Linearisierung von Vektoren und die Herstellung von DNA-Fragmenten. Die Restriktion von DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen (MBI / Fermentas) durchgeführt und ein dafür passender Puffer gemäß der Enzymaktivitätsliste des Herstellers eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde nach Angabe des Herstellers gewählt, für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und im Anschluss bei 80°C für 5 Minuten inaktiviert.

<b>Ansatz:</b>	0,4 µg DNA
	1 µl Puffer (10x)
	0,2 µl Enzym 1 (10 Units)
	0,2 µl Enzym 2 (10 Units)
	<hr/>
	10 µl Ansatz Rest mit dest. H <sub>2</sub> O

### 2.2.2 Ligation

Lineare DNA wurde nach Angaben des Herstellers mittels eines Ligationssystems (Fermentas) mit einem Vektor ligiert. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur (RT) (2 Stunden). Daran schloss sich eine 10-minütige Inaktivierung der Ligase bei 65°C an. Für die Klonierung von PCR-Produkten mittels Pfx-Polymerase wurden die Vektoren pET100/D-Topo (Invitrogen) und pLEXSY-2 (Jena Bioscience) verwendet.

<b>Ansatz:</b>	10 µl Verdau Ansatz (Insert)
	20 -100 ng Plasmid (Vektor)
	2 µl T4 Ligase Puffer (10x)
	0,2 µl T4 Ligase (5 U/ µl)
	<hr/>
	20 µl Ansatz Rest mit dest. H <sub>2</sub> O

### 2.2.3 Transformation

Nach der Ligation wurde die Plasmid-DNA entsprechend der Versuchsansätze in chemokompetente *E. coli* (BL21 und XL-10 Gold) transformiert. Zunächst wurden 20 µl Ligationsansatz auf 100 µl kompetente Zellen gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann erfolgte der Hitzeschock (30 Sekunden bei 37°C) und ein weiterer Inkubationschritt auf Eis für 2 Minuten. Nach Zugabe von 700 µl LB-Medium sind die Zellen für 2 Stunden bei 37°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert worden. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugieren sedimentiert, der Überstand verworfen und die Zellen in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Je 200 µl wurden auf eine LB-Selektivagarplatte ausplattiert. Das Wachstum erfolgte bei 37°C im Wärmeschrank über Nacht.

**Der LB-Selektivagar enthielt folgende Zusätze:**

pET100/D-Topo Klonierung	100 µg/ml Ampicillin
pLEXSY-2-Klonierung	100 µg/ml Ampicillin

### 2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die (PCR) wird genutzt, um Nukleotidsequenzen enzymatisch *in vitro* exponentiell zu amplifizieren (Mullis et al., 1986). Der PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl enthielt 50 - 200 ng DNA-Template sowie 2,5 mM dNTP's (ATP, TTP, CTP und GTP). Anschließend wurden 5 pmol/µl Primer für das spezifische Fragment

eingesetzt und 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl 10x PCR-Puffer (Promega) sowie 1 unit Taq-Polymerase (Fermentas) zugegeben.

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermo-Gradienten-Cycler (Biometra) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung des Templates	95°C	2-5 Minuten
<u>Synthesezyklen (20-40)</u>		
Denaturierung des Templates	95°C	30 Sekunden
Primer-Annealing	40-65°C	30 Sekunden
Elongation (DNA-Synthese)	72-75°C	30 Sekunden bis 7 Minuten
Synthese	72-75°C	10 Minuten

Die Elongationszeit orientierte sich dabei an der Amplifizierungsrate der Taq-Polymerase und der Fragmentgröße (Taq-Polymerase mit einer Amplifizierungsrate von ca. 2 kb pro Minute). Für die Klonierungsarbeiten (siehe 2.2.2) wurde die Pfx-Polymerase (Invitrogen) verwendet.

### **2.2.5 Elektrophoretische Auftrennung und anschließende Isolierung von DNA-Fragmenten**

Doppel- und einzelsträngige DNA wurde in nativen Agarosegelen analysiert. Entsprechend der Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente wurde eine Agarosekonzentration von 0,8 - 1,5 % (w/v) eingesetzt.

Für die Herstellung der Gele und als Laufpuffer wurde TBE-Puffer verwendet. Zum Anfärben der Nukleinsäuren wurde Ethidiumbromid (EtBr) in einer Konzentration von 0,5mg/ml zugesetzt. Die „Anregung“ des EtBr mit UV-Strahlung erfolgte bei  $\lambda=356\text{nm}$ . Zum Auftragen auf das Gel wurde die DNA mit 5x Stopplösung (0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 50 % (v/v) Glycerin in 1 x TBE) versetzt. Für die Fragmentgrößenanalyse wurde 1 kb-DNA-Ladder (MBI/Fermentas) verwendet. Die Auftrennung erfolgte für 1 bis 2 Stunden bei einer Spannung von 80 - 120 V.

Zur Isolierung der gewünschten DNA-Banden aus dem Gel wurden die Banden ausgeschnitten und mit Hilfe des Nucleo Spin Extrakt Kit (Macherey-Nagel) aus dem Agarosegel extrahiert.

### 2.2.6 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde durchgeführt, um den Erfolg der Klonierung und der Transformation in *E. coli* zu testen. Der PCR-Ansatz zur genetischen Analyse erfolgte gemäß Punkt 2.2.5. Mittels einer Pipettenspitze wurden einzelne Kolonien von der Selektivagarplatte „gepickt“ und direkt als Template dem PCR-Ansatz zugesetzt. Parallel wurden die „gepickten“ Kolonien in LB-Medium überführt und anschließend zur Plasmid-Vervielfältigung bei positiven Klonen genutzt.

### 2.2.7 Herstellung von Surfactant Protein Fusionskonstrukten für die Etablierung von Expressionssystemen

Zunächst wurde mit spezifischen Primern eine PCR am Surfactant-Plasmid durchgeführt. Die verwendeten Primer beinhalten Restriktionsschnittstellen zur Generierung spezifischer Fragmente.

Nachdem die PCR-Produkte auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt wurden, konnten die Fragmente isoliert und mit spezifischen Restriktionsenzymen verdaut werden. Im Anschluss erfolgte die Ligation der Fragmente in die speziellen Plasmide (siehe 2.1.2) und die Transformation in BL 21 bzw. XL-Gold (2.1.1). Die Kolonie-PCR und spezifische Primer wurden zur Identifizierung der gewünschten Klone eingesetzt. Mit einer Midi-Präparation konnte die DNA in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt werden.

### 2.2.8 RNA-Isolierung

#### 2.2.8.1 Isolierung von RNA aus Zellen

Für die Isolation von RNA aus Zellen wurde 1 ml Trizol (Invitrogen) auf die Probe gegeben. Die Aufarbeitung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers und das gewonnene Pellet wurde in 25 µl DEPC Wasser gelöst. Um eine absolut reine RNA zu erhalten, folgte ein Abbau der DNA nach folgendem Ansatz:

<b>Ansatz:</b>	25,5 µl RNA Isolat
	1 µl DNase
	3 µl 10xDNase Puffer
	0,5 µl RNase Inhibitor
	<hr/>
	30 µl Ansatz Rest mit dest. H <sub>2</sub> O



Die weitere Bearbeitung erfolgte nach Herstellerangaben (Promega). Das Pellet wurde in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen und die Konzentrationsmessung am Spektralphotometer (260 nm) durchgeführt.

### **2.2.8.2 Isolierung von RNA aus Bakterien**

Für die Isolierung der RNA aus Bakterien wurde ein Aufreinigungssystem der Firma Zymo Research (ZR Bacterial RNA Mini Präp.) unter Verwendung des Herstellerprotokolls genutzt. Das hierfür benötigte Zellpellet wurde zuvor aus 5 ml Bakterienkultur durch Zentrifugieren bei 13000 rpm gewonnen.

### **2.2.8.3 Isolierung von RNA aus Gewebe**

Die Isolierung der RNA aus humanen Geweben erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers Qiagen. Dazu wurden Proben in flüssigem Stickstoff tiefgekühlt und anschließend in einem vorgekühlten Mörser mit einem Stößel zerkleinert. Das Gewebepulver wurde in vorgekühlte Reaktionsgefäße (2 ml) überführt und mit 600 µl RTL-Puffer (Qiagen) pro 30 mg Gewebe versetzt. Daran schloss sich eine Homogenisierung des Gewebes mittels eines Ultra-Turrax und die Zentrifugation des Gewebelysates bei Raumtemperatur für 3 Minuten und 13.000 rpm an. Der Überstand wurde auf eine RNAeasy-Minisäule gegeben und 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Im weiteren Verlauf wurde auf das Protokoll der Firma Qiagen zurückgegriffen. Zum Schluss erfolgte die Aufnahme der Probe in 50 µl RNase-freiem Wasser. Die gewonnene RNA wurde für weitere Experimente verwendet oder bei -80°C gelagert.

### **2.2.8.4 Isolierung von RNA aus Gewebe mit Trizol**

Die im flüssigen Stickstoff gelagerten Gewebeproben sind unter Verwendung von Mörser und Stößel homogenisiert worden. Das Gewebepulver wurde in vorgekühlte Reaktionsgefäße (2 ml) überführt und mit 1 ml Trizol (60°C) pro 200 mg Gewebe versetzt. Die Proben wurden dann mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation bei 60°C im Wasserbad für 5 Minuten und eine kurze Behandlung für 15 Sekunden mit Ultraschall (30 % Intensität).

Es wurden 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch im Verhältnis 24:1 zugegeben und für 5 Minuten geschüttelt (Vortex). Die Probe wurde für 15 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues vorgekühltes

Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Zu gleichen Volumina ist dann Isopropanol zugegeben und wiederum geschüttelt (Vortex) worden. Eine Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur und ein Zentrifugationschritt (10 Minuten bei 12000 rpm und 4°C) schlossen sich an.

Der Überstand wurde verworfen und es folgte ein *DNase*-Verdau:

<b>Ansatz:</b>	Pellet in 50µl DEPC H <sub>2</sub> O aufnehmen
	1U DNaseI pro 1µg RNA (2µl da ~ 2µg RNA)
	6µl 10x DNase Buffer
	2µl RNase-Inhibitor
	<hr/>
	60 µl Ansatz

Die anschließende Fällung der RNA erfolgte durch die Zugabe von 6 µl Natriumacetat-Lösung (3M, pH 5,2) und 200 µl Isopropanol und Inkubation für 30 Minuten bei -20°C. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min bei 12.000 rpm und 4°C) wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 75 %-igem ETOH/DEPC gewaschen. Abschließend wurde das Pellet in 30-50 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

### 2.2.9 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben (Kogan et al., 1987). Reverse Transkriptase benötigt als Startpunkt ein kurzes Stück einer Doppelstrang-Nukleinsäure. Als Primer werden p(dT)-Oligomere eingesetzt, die mit den Poly-A-Enden der mRNA hybridisieren und den Startpunkt für die Transkription liefern. Zur Durchführung der reversen Transkription wurde das Superscript™ II-RT-Kit von Invitrogen nach folgendem Standardprotokoll verwendet.

<b>Ansatz:</b>	1-2 µg RNA
	1 µl Oligo (dt) Primer
	ad. DEPC H <sub>2</sub> O
	<hr/>
	11 µl Ansatz

Der Reaktionsansatz wurde für 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße auf Eis gestellt und folgende Substanzen zugefügt:

<b>Ansatz:</b>	4 µl 5x Puffer
	2 µl 10 mM dNTP's
	1 µl RNase Inhibitor
	1 µl DEPC H <sub>2</sub> O
<hr/>	
	11 µl Ansatz

Nach einer weiteren Inkubation (5 Minuten bei 37°C) wurden zu jeder Probe 1 µl RevertAid-Reverse-Transkriptase (Fermentas) pipettiert und erneut inkubiert (60 min bei 42°C und 10 Minuten bei 70°C). Die Lagerung der Proben bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -20°C.

### **2.2.10 Isolierung genomischer DNA aus Bakterien**

Zur Isolierung genomischer DNA wurden die Bakterien in einer Schüttelkultur über Nacht bei 37°C in LB-Flüssigmedium vermehrt. 5 ml dieser Bakterienkultur wurden 5 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl 10 mM Tris + 25 % Saccharose pH 7,5 aufgenommen. Zusätzlich wurden 15 µl 0,5 M EDTA pH 8 zugefügt. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 10 µl Lysostaphin (2 mg/ml) und Inkubation für 20 Minuten bei 37°C. Zu diesem Ansatz wurden dann 375 µl TE-Puffer, 225 µl 10 % SDS und 20 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben und das Gemisch 30 Minuten bei 55°C inkubiert. Um die Plasmid-DNA von der chromosomalen DNA zu trennen, wurden 150 µl 5 M Natriumperchlorat-Lösung hinzugefügt, das Gemisch kurz geschwenkt und mit Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) versetzt. Nach mehrmaligem Invertieren des Ansatzes sind zunächst die Proteine durch ständiges Schütteln (1 h) ausgefällt worden. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min bei 13.000rpm) wurde letztendlich die DNA mit dem doppeltem Volumen 100 %-igem Ethanol aus dem Überstand gefällt. Danach wurde der Ansatz bei RT für 10 Minuten und 13.000 rpm zentrifugiert, das DNA-Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und bei RT für ca. 1 Stunde getrocknet. Abschließend ist es in 50 µl dest. H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei 4°C gelagert worden.

### **2.2.11 DNA-Analyse durch Sequenzierung**

Als Standardmethode wurde die Sanger-Sequenzierung genutzt (Sanger et al., 1992), welche auch als Kettenabbruch- oder Didesoxynucleotidverfahren bezeichnet

wird. Für die Terminations-Sequenzierung kam das Big DYE Kit (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben zum Einsatz. Nach der Reaktion wurde der PCR-Ansatz mit der darin amplifizierte DNA mit 2 µl Natriumacetatlösung (3 M; pH 4,8) und 75 µl Ethanol (96 %-ig) versetzt und für 20 Minuten bei 13.000 rpm bei RT zentrifugiert. Das Pellet ist mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und bei minus 20°C aufbewahrt worden. Die automatische Sequenzierung erfolgte mittels dem ABI377 (APPLIED BIOSYSTEMS, Darmstadt). Die Sequenzierungsdaten wurden mit Hilfe eines Sequenzierprogrammes (SeqMan) analysiert und mit der NCBI-Datenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) verglichen.

**PCR-Sequenzprogramm:**

5 Minuten	95°C
<u>Synthesezyklen (20-40)</u>	
40 Sekunden	95°C
40 Sekunden	56-60°C
4 Minuten	60°C

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970). Die Polyacrylamidkonzentration im Sammelgel betrug 4 %, im Trenngel 7,5-15 % (abhängig vom aufzutrennenden Molekulargewichtsbereich). Die Elektrophorese wurde in Laufpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS) bei 20 mA für ein Minigel (10 cm x 15 cm) durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandard wurde „Proteinladder“ von Invitrogen bzw. MBI/Fermentas eingesetzt.

Tab. 2.3.1: Verwendete Polyacrylamidgele

Konzentrationen	Zusammensetzung [ml]						
	Trenngel						Sammelgel
	8 %		10 %		15 %		5 %
dest. H <sub>2</sub> O	4,6	7	4	5,9	2,3	3,5	2,7
30 % AA-mix	2,7	4	3,3	5	5	7,5	0,67
1,5M Tris-Cl, pH 8,8	2,5	3,8	2,5	3,8	2,5	3,8	-
1,5M Tris-Cl, pH 6,8	-	-	-	-	-	-	0,5
10 % (w/v) SDS	0,1	0,15	0,1	0,15	0,1	0,15	0,04
10 % (w/v) APS	0,1	0,15	0,1	0,15	0,1	0,15	0,04
TEMED	0,006	0,009	0,004	0,006	0,004	0,006	0,004
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>4</b>

### 2.3.2 Nachweis von Proteinen mittels Western-Blot

Im Anschluss an die gelelektrophoretische Auftrennung wurden die Proteine mittels Elektroblootting auf eine Trägermembran übertragen. Der Transfer erfolgte bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> für 2 Stunden in einem Semidry-Blotter. Mit Ponceau-S-Lösung wurde der erfolgreiche Transfer der Proteine im voraus überprüft. Anschließend wurde die Membran in dest. H<sub>2</sub>O entfärbt und für 1 Stunde in Blockpuffer inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper bei 4°C über Nacht.

Nach 3 Waschschritten von je 15 Minuten mit PBST wurde der zweite Antikörper (1:1.000, Ziege-anti-Maus, Peroxydase konjugiert) zugesetzt und weitere 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach wiederholtem Waschen der Membran mit PBST erfolgte die

Detektion des zweiten Antikörpers mittels ECL-Plus-System (Western-Blot Detektionsreagenz) und die optische Dokumentation im Fotolabor.

### **Verwendete Puffer**

Ponceau-S-Lösung:	0,2 % (w/v) Ponceau S., 3 % (v/v) Trichloressigsäure, 3 % (v/v) Sulfosalicylsäure
Blotpuffer:	40 ml 12fach Laufpuffer, 50 ml Methanol, 1 ml SDS
Blockpuffer:	5 % (w/v) Milchpulver in 1fach PBST
Waschpuffer (PBST):	1xPBS; 0,2 % (v/v) Tween 20

### **2.3.3 Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)**

Der ELISA ist ein immunologisches Verfahren und beruht auf einer enzymatischen Farbreaktion. Spezifische Antikörper detektieren das gesuchte Protein und ermöglichen zugleich eine Quantifizierung der Proteinkonzentration. Für diese Arbeit wurden ELISAs der Firma Uscn Life Science Inc. Wuhan verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Protokoll der Firma. Es wurden jeweils 100 µl Probe und die Standardreihe pro „well“ aufgebracht und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Das Antigen bindet an den ersten Antikörper. Nach Entfernung der Flüssigkeit wurde die Detektionslösung A dazugegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach mehrfachem Waschen der Platte mit Waschlösung wurden 100 µl der zweiten Detektionslösung B hinzugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Platte wurden 90 µl Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat pro „well“ aufgetragen und für 15-25 min bei 37°C inkubiert. Die Peroxidase katalysiert den Umsatz des farblosen Substrates und bewirkt eine gelbe Farbreaktion der Lösung. Die Reaktion wurde mit 50 µl Schwefelsäure beendet, die Flüssigkeit restlos entfernt, und sofort im Anschluss erfolgte die Messung der Extinktion an einem Mikroplatten-Spektralphotometer (ELISA-Reader) bei einer Wellenlänge von 450 nm und 405 nm. Durch den Abgleich mit der Standardreihe kann anhand der ermittelten Werte die Antigenkonzentration (Proteinkonzentration) in ng Surfactant Protein/mg Gesamtprotein der einzelnen Proben errechnet werden. Das Detektionslimit für die verwendeten ELISA's waren: SP-A 0.3 ng/ml, SP-B 0.28 ng/ml, SP-C 0.18 ng/ml und SP-D 0.043 ng/ml.

### 2.3.4 Surfactant Proteinsynthese

Im Zuge der Arbeit wurden transgene Organismen für die Etablierung eines Expressionssystems hergestellt. Zur Analyse der Proteinexpression ist nach folgendem Protokoll verfahren worden. Für einen Expressionsansatz wurden die Bakterien in LB-Flüssigmedium über Nacht für 10 bis 12 Stunden bei 37 °C im Rüttelinkubator (ca. 220 rpm) kultiviert. 250 ml LB<sub>Amp</sub>- Medium wurden mit 5 ml der Übernachtskultur beimpft und die Bakterien bis zu einer optischen Dichte (450 nm) von 0,6 - 0,8 bei 37°C in Schüttelkultur vermehrt. Zur Induktion der Expression des Surfactant Proteins ist die Bakterienkultur mit 1 mM IPTG versetzt und weiter bei 37°C kultiviert worden. Zur Optimierung der Kulturbedingungen wurden die Zeit, die Temperatur und das Antibiotikum variiert. Die Testansätze sind wie folgt aufgearbeitet worden. 50 ml Kulturprobe wurde bei 4°C und 5.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 2 ml Lysis-Puffer resuspendiert. Nach Inkubation auf Eis für 30 min wurde die Suspension dreimal für 30 Sekunden im Sekundenintervall bei 70 % Leistung mit Ultraschall behandelt. Die Probe ist anschließend für 40 Minuten bei 4°C und 5.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -20 °C gelagert worden.

<b>Lysis Puffer (pH 8)</b>	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	300 mM NaCl
	10 mM Imidazol

## 2.4 Zellkultur

### 2.4.1 Isolation primärer Knorpelzellen

Die sterile Entnahme von humanem Knorpelgewebe aus dem Kniegelenk erfolgte während routinemäßiger Operationen der entsprechenden Patienten und die Aufbewahrung in Leibovitz L-15 Medium. Das Gewebe musste innerhalb von 1 bis 2 Stunden nach Entnahme aufgearbeitet werden. Das Knorpelmaterial wurde an einem Sterilarbeitsplatz vom Gelenk präpariert (ca. 1-2 mm<sup>2</sup> Stückchen) und für 5 Minuten in 1 % Antibiotika-Puffer (PBS) inkubiert. Die Isolation der Zellen erfolgte nach einem Protokoll von Dr. Lindenhayn (Charité).

Die Knorpelstückchen wurden in Verdaulösung 1 (siehe unten) für 60 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss ist die Lösung restlos entfernt und im zweiten Schritt Verdaulösung 2 (siehe unten) zugegeben worden. Die Knorpelstückchen wurden

über Nacht bei 37°C unter ständigem Rühren inkubiert. Der Verdau ist abgeschlossen wenn sich alle Stückchen aufgelöst haben. Am folgenden Tag wurde die Verdauungslösung durch einen 70 µm Filter und anschließend durch einen 40 µm Filter filtriert und das Filtrat für 5 Minuten bei 100 rpm zentrifugiert. Der Überstand ist verworfen, das Pellet 3 x mit PBS gewaschen und bei 1.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert worden.

<b>Verdauungslösung 1:</b>	Pronase 0,39 %, 123 mg HAM/F12 30 ml FKS 1,5 ml
<b>Verdauungslösung 2:</b>	Kollagenase 0,05 %, 15 mg HAM/F12 30 ml FKS 1,5 ml

### 2.4.2 Kultivierung von primären Knorpelzellen

Das nach 2.4.1 gewonnene Zellpellet wurde in 5 ml frischem serumhaltigen Zellkulturmedium (siehe unten) resuspendiert, erneut zentrifugiert und entsprechend der gewünschten Zellzahl in serumhaltigem Medium (s.u.) aufgenommen und auf Zellkulturflaschen aufgeteilt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 5 % O<sub>2</sub> Atmosphäre. Die primären Zellen wurden für maximal eine Woche kultiviert, danach sind sie zu stark differenziert.

<b>Serumhaltiges Medium:</b>	DMEM/F12 440 ml FKS 50 ml (entspricht 10 %) Pen/Strep 5 ml Vitamin E 500 µl (21,5 mg in 1ml EtOH) Vitamin C 5 ml (10 mg/ml; steril filtriert)
------------------------------	---

### 2.4.3 Kultivierung von immortalisierten Zelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurden die immortalisierten Zelllinien C28/I2 und T/C 28a2 verwendet, wobei juveniler Rippenknorpel (hyaliner Knorpel) den Ursprung dieser Zelllinien darstellt. Zur Immortalisierung wurden die Zellen mit dem Simian Virus SV 40 T-Antigen (SV 40 TAg) transfiziert (Goldring et al. 1994; Loeser et al. 2000). Die Zelllinien wurden von Frau Prof. Mary Goldring, Hospital for Special



Surgery, New York, USA zur Verfügung gestellt. Die Zelllinien wurden bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>- und 5 % O<sub>2</sub>-Atmosphäre in serumhaltigem Medium (siehe 2.4.2) kultiviert. Die Zellkultur wurde passagiert bis die Zellen annähernd konfluent waren, d.h. bis sich ein geschlossener Zellrasen ausgebildet hatte. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS-Puffer gespült. Anschließend wurde mit Trypsinlösung (5ml) für 5 Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion mit 5 ml Medium gestoppt. Die Zellen sind für 5 Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2 bis 4 ml Medium resuspendiert worden. Je nach gewünschter Zellzahl wurden aus der Lösung entsprechende Volumina in eine neue Zellkulturflasche mit 5 ml serumhaltigem Medium überführt.

### **2.4.4 Kultivierung der *Leishmania tarantolea***

Für die Etablierung eines eukaryotischen Expressionssystems wurden *Leishmania tarantolea* verwendet. Die Kultivierung erfolgte nach dem Protokoll der Firma Jena Bioscience als Standkultur in Zellkulturflaschen bei 26°C und im Dunkeln.

#### **2.4.4.1 Elektroporation an *Leishmania tarantolea***

Für die Herstellung transgener Organismen mittels Elektroporation wurden die Organismen nach einem speziellen Zeitplan unter den o.g. Bedingungen kultiviert. Das Protokoll befindet sich stichpunktartig zusammenfasst im Anhang (siehe Anhang 7.2) dieser Arbeit.

### **2.4.5 Kultivierung von *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa***

Die verwendeten Bakterienstämme sind im Anhang 7.4 aufgeführt. Die Bakterien wurden in LB-Flüssigmedium über Nacht für 10 bis 12 Stunden bei 37 °C im Rüttelinkubator (220 rpm) kultiviert. Für die weiteren Untersuchungen nach Pkt. 2.5.4 wurde die Kultur bei 13.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen.

## **2.5 Immunzytologische Methoden**

### **2.5.1 Herstellung und Rehydrierung von Paraffinschnitten**

Die Gewebeproben verblieben zur Fixierung für vier Wochen in einer 4 %-igen Formaldehydlösung. Falls nötig erfolgte eine Zwischenwässerung sowie bei vorhandenen Knochenresten eine schonende Entkalkung mit 10 % (w/v) EDTA bei 37°C. Die Proben wurden unter fließendem Wasser rehydriert, zur besseren Paraffinaufnahme anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Paraffin eingebettet. Für immunhistochemische Färbungen wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Für die histochemischen Versuche wurden die Paraffinschnitte schrittweise rehydriert. Hierzu wurden die Schnitte für zweimal 10 Minuten in eine nicht-toxische Xylolersatz-Lösung überführt. Im Anschluss folgte in einer absteigenden Alkoholreihe, die mit destilliertem Wasser endet, eine Rehydrierung. Die Schnitte verblieben in jeder Lösung jeweils für 5 Minuten.

### **2.5.2 Immunhistochemie an Paraffinschnitten**

Um die endogene Peroxidase zu blockieren wurden die rehydrierten Schnitte für 30 min in 3 %-iger Wasserstoffperoxid-Lösung inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte in Citratpuffer (pH 6,0) für 15 Minuten bei 95-99°C gekocht und bei Raumtemperatur mindestens 1 Stunde abgekühlt. Für eine verbesserte Immunreaktion sind die Schnitte mit 0,1%-iger Trypsinlösung für 5 Minuten bei 37°C angedaut worden. Nach dreimaliger Spülung mit TBS-Puffer wurden die Schnitte zur Blockierung unspezifischer Bindungen für 20 Minuten mit Normalserum inkubiert und für 10 Minuten Avidin und Biotin zugegeben. Beide Substanzen blockieren die endogene Aktivität Avidin- und Biotin-ähnlicher Gewebestrukturen. Nach erneutem Waschen mit TBS-Puffer erfolgte über Nacht eine Inkubation mit dem primären Antikörper. Am folgenden Tag wurden die Präparate mit TBS-Puffer gewaschen und mit biotinylierten Sekundärantikörper für 2 Stunden inkubiert. Danach sind die Schnitte mit TBS-Puffer gewaschen und für 30 Minuten mit Avidin/Biotin Block Kit behandelt worden. Avidin hat eine ungemein hohe Affinität zu Biotin und zu der in der Peroxidase verbleibenden freien Bindungsstelle. Dort kommt es zur Komplexbildung mit dem Sekundärantikörper. Bei Zugabe eines geeigneten Substrats (Chromogen) katalysiert die Peroxidase eine Reaktion, bei der das Chromogen in einen sichtbaren roten Farbstoff umgesetzt wird. Die Reaktion wurde durch das Waschen mit dest. H<sub>2</sub>O abgestoppt und die Zellkerne mit Hämalaun nach

Meyer gefärbt. Zur Aufbewahrung wurden die Schnitte mit einem wasserlöslichen Medium eingebettet.

### **2.5.3 Immunmarkierung von Bakterien**

Die Bakterien wurden nach Abschnitt 2.4.5 kultiviert. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet mit 1x PBS-Puffer gewaschen, wieder zentrifugiert und das Bakterienpellet in PBS gelöst. Ein Tropfen der Bakteriensuspension ist auf ein fettfreies Deckgläschen aufgetragen, bei 60°C angetrocknet und mit 4 %-iger Paraformaldehydlösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert worden. Danach wurde das Deckgläschen zweimal mit PBS-Puffer gespült und anschließend mit dem primären Antikörper für 2 Stunden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit PBS-Puffer erfolgte die zweite Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Alexa 488 gekoppelt) für 2 Stunden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Bakterien auf dem Deckgläschen gewaschen und mit einem DAPI/ 50 %-igen Glycerol-Gemisch „eingedeckt“ und mit handelsüblichem Nagellack auf einem Objektträger fixiert. Die Präparate wurden am Fluoreszenzmikroskop der Firma Keyence sowie am Laserscanning-Mikroskop der Firma Zeiss ausgewertet.

### **2.5.4 Immunogold-Transmissions-Elektronenmikroskopie an Bakterien**

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in LB-Flüssigmedium über Nacht für 10-12 Stunden bei 37 °C im Rüttelinkubator (220 rpm). Im Anschluss sind die Übernachtskulturen für 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und das Pellet entsprechend Protokoll (siehe Anhang 7.1) aufgearbeitet worden.

### 3. Ergebnisse

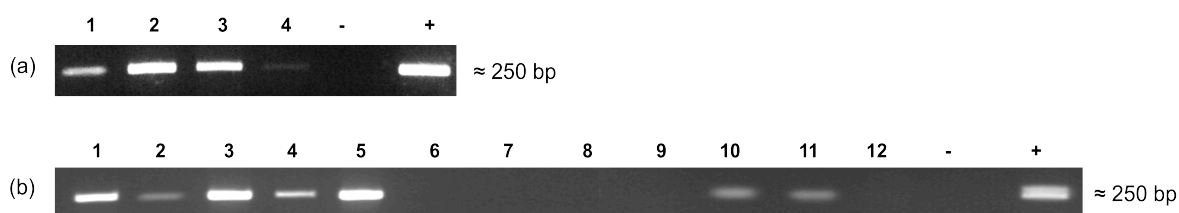
#### 3.1 Die Surfactant Proteine SP-G (SFTA2) und SP-H (SFTA3)

Wie bereits erwähnt, konnte durch Genomanalysen die Existenz von zwei bislang unbeschriebenen Surfactant Proteinen theoretisch und bioinformatisch nachgewiesen werden. SP-G (SFTA 2) und SP-H (SFTA 3) sind Proteine, die keine strukturellen oder sequenziellen Ähnlichkeiten zu den bekannten Surfactant Proteinen besitzen, dennoch aber vermutlich eine neue Gruppe der oberflächenaktiven Proteine darstellen. Der Nachweis der putativen Surfactant Proteine G und H soll helfen, einen tieferen Einblick in das komplexe System der Expression, der Regulation und der Funktion der bereits bekannten Proteine im humanen Organismus zu gewinnen.

##### 3.1.1 Surfactant Protein G (SFTA2)

###### 3.1.1.1 Analyse und Nachweis humaner SP-G mRNA mittels PCR

Zum Nachweis der RNA sind anhand der bekannten Nukleotidsequenz von SP-G Oligonukleotide (Primer) generiert worden. Die Primer wurden in RT-PCR Experimenten eingesetzt (siehe Methode 2.2.4). Hierzu wurde RNA aus humanen Gewebeproben isoliert und mit einer RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Als interne Produktkontrolle kam ein Plasmid zum Einsatz, welches die „*open reading frame*“ (ORF) für das Surfactant Protein G beinhaltet. In der Abbildung 3.1-1 ist das Ergebnis der PCR für die unterschiedlichen untersuchten Gewebe dargestellt.



**Abb. 3.1-1: Nachweis von SP-G mittels RT PCR in verschiedenen humanen Gewebeproben**

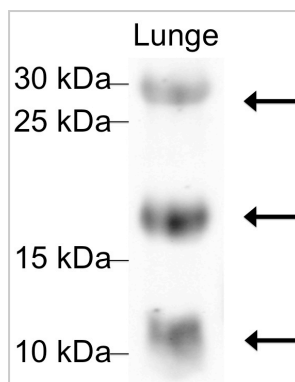
(a) Tränenrinne [1], Lid [2], Konjunktiva [3], Kornea [4];  
 (b) Lunge [1], Lid [2], Herz [3], Niere [4], Hoden [5], Magen [6], Milz [7], Nasenmuschel [8], Speicheldrüse [9], Nabelschnur [10], Trophoblast [11], Leber [12]; Negativkontrolle [-] und Positivkontrolle [+] ORF von SP-G.

Wie die Abbildung 3.1.-1 zeigt, wurde nicht für alle humanen Proben das spezifische PCR-Produkt für SP-G erhalten.  $\beta$ -Aktin als Ladungskontrolle wurde mitgeführt (nicht gezeigt). Anhand der mitgeführten Positivkontrolle konnte für SP-G eine Produktgröße von ca. 250 bp bestimmt werden. Bei den Ansätzen für das okuläre

System (a) war die mRNA für SP-G in der Tränendrüse, im Lid und in der Konjunktiva sehr gut nachweisbar, in der Kornea hingegen konnte nur eine schwach detektierbare Konzentration von SP-G gefunden werden. Im Bild zur RT-PCR (b) sind die Proben Lunge, Lid, Herz, Niere, Hoden, Nabelschnur und Trophoblast positiv für SP-G, die Proben Magen, Milz und Speicheldrüse negativ. Alle ermittelten Produktgrößen entsprechen der Positivkontrolle. Die Negativkontrolle ist jeweils negativ für SP-G.

### 3.1.1.2 Generierung eines spezifischen Surfactant Protein G Antikörpers

Die Herstellung eines anti-Peptid-Antikörpers erlaubt sowohl den Nachweis als auch die zelluläre Lokalisation von Surfactant Protein G mittels Immunoblotting (Western-Blot) bzw. mittels Immunhistochemie. Die Firma SeqLab Göttingen synthetisierte zu diesem Zweck ein Peptid mit einer Länge von 18 Aminosäuren. Die spezifische Peptidsequenz (YESSFLELLEKLCLLLHL) wurde in Kooperation mit PD Dr. W. Brandt und F. Rausch, AG Proteinmodellierung am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Saale) erarbeitet. Diese erwies sich in Computersimulationen (Molekular Modelling) als vielversprechendster Sequenzabschnitt von SP-G für mögliche Protein-Antikörper-Wechselwirkungen. Der Antikörper wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit dem Peptid und anschließender Affinitätschromatographie des Serums gewonnen und aufgereinigt. Im Western-Blot wurde die Wirksamkeit des Antikörpers an Protein aus Lungengewebe (30 µg) getestet (s. Abb. 3.1-2).



**Abb. 3.1-2: Antikörpertest am Lungenprotein mittels Western-Blot**  
(15 %-iges SDS Gel)

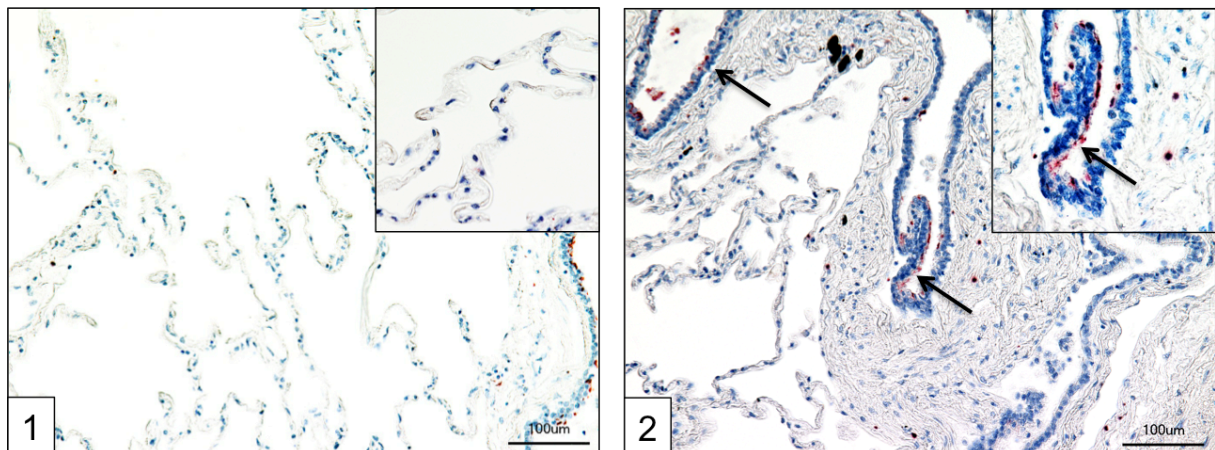
Verwendet wurde Lunge als exponiertes Gewebe für Surfactant Proteine. Pfeile markieren positive Nachweise für das Surfactant Protein G.

Der gereinigte Antikörper zeigt eine hohe Reaktivität für drei Proteingrößen in der Lunge. Es konnte eine spezifische Bande für SP-G bei ca. 11 kDa, 20 kDa und ca. 30 kDa bestimmt werden. Die detektierten Banden entsprechen allerdings nicht der

vorausgerechneten Proteingröße für SP-G von 8 kDa, die mittels spezieller Analysesoftware ermittelt wurde (Translate, ExPASy Proteomics tools). Mögliche Proteinmodifikationen sowie eine Oligomerisierung eines Proteins wurden in die Berechnung nicht einbezogen.

### 3.1.1.3 Nachweis von Surfactant Protein G in humanen Gewebeproben mittels immunhistochemischer Methoden

Im Weiteren wurden Gewebeproben immunhistochemisch unter Verwendung des hergestellten Antikörpers (beschrieben in 3.1.1.2) untersucht (siehe Methode 2.5.2). Es wurden exemplarisch humane Gewebeschnitte eingesetzt, die bereits mittels PCR positiv auf SP-G getestet werden konnten. Der immunhistochemische Proteinnachweis ist positiv, wenn eine Rotfärbung zu erkennen ist. Die Ergebnisse werden unter Abbildung 3.1-3 a bis e dargestellt.



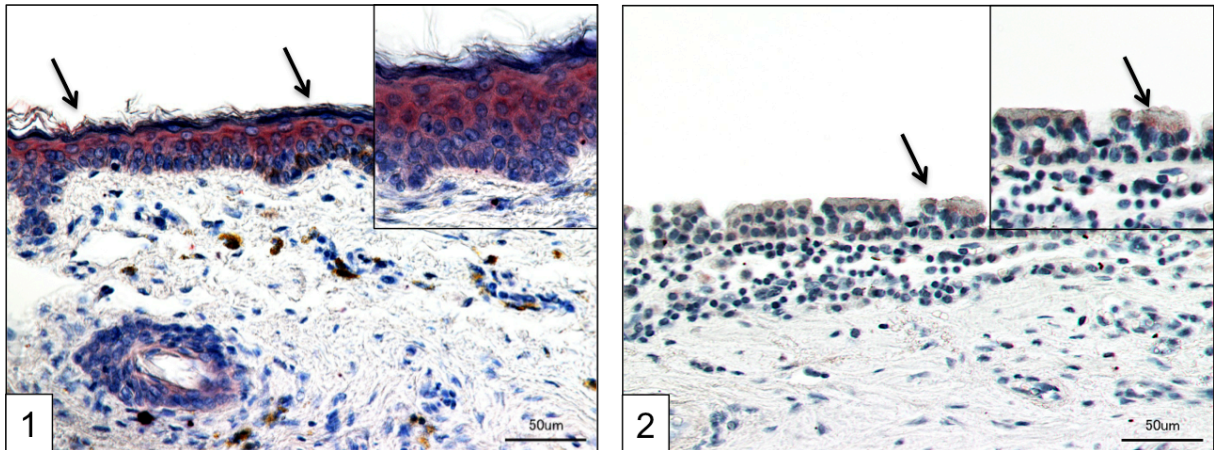
**Abb. 3.1-3a: Immunhistochemischer Nachweis von SP-G an humanem Lungengewebe**

[1] Alveolares Epithel der Lunge, der Detailausschnitt zeigt Epithel mit Pneumozyten Typ I und II

[2] Lungengewebe mit Bronchiolusepithel

Der Balken entspricht (1 und 2) 100 µm. Die Rotfärbung indiziert eine positive Antikörper-Reaktion gegen SP-G (siehe Pfeile).

In der Lunge kann SP-G nur am Epithel der Bronchioli nachgewiesen werden. Am alveolären Epithel der Lunge ist kein Nachweis von SP-G möglich.



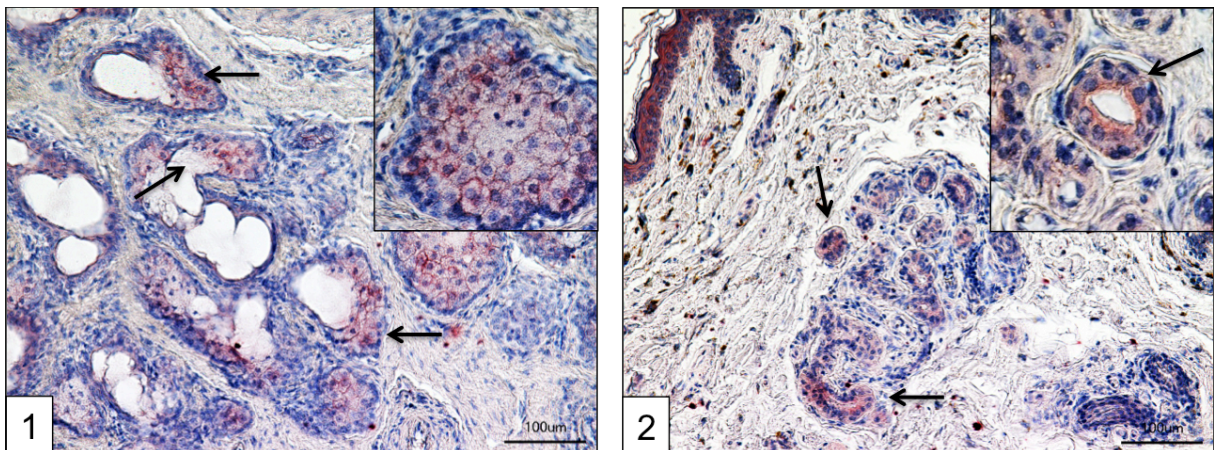
**Abb. 3.1-3b: Immunhistochemischer Nachweis von SP-G am Epithel des Augenlides**

[1] mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel, darunter die Kutis

[2] Konjunktiva, hochprismatisches Epithel mit Becherzellen

Der Balken entspricht 50 µm. Die Rotfärbung indiziert eine positive Antikörper-Reaktion gegen SP-G (siehe Pfeile).

SP-G lässt sich im mehrschichtigen Plattenepithel des Augenlides nachweisen, wobei die Antikörper-Reaktion besonders deutlich im Epithel der Epidermis zu erkennen ist (siehe Ausschnittsvergrößerung). Das darunter liegende subkutane Bindegewebe reagiert nicht bzw. nur sehr schwach mit dem Antikörper. Im konjunktivalen Epithel ist ebenfalls nur eine schwache Antikörper-Reaktion zu verzeichnen.

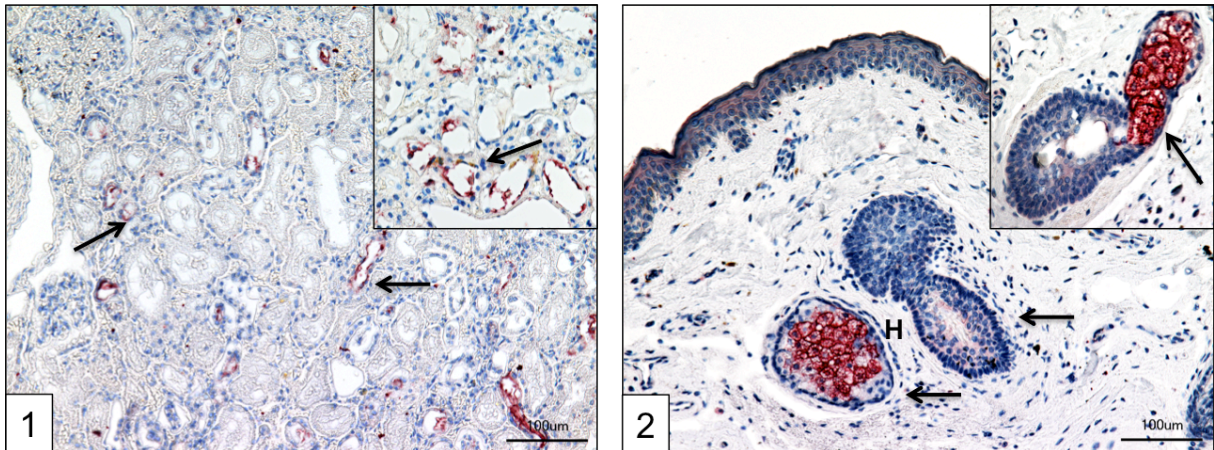


**Abb. 3.1-3c: Immunhistochemischer Nachweis von SP-G im inneren Bereich des Augenlides**

[1] Meibomdrüse mit Meibozyten, [2] akzessorischen Tränendrüsen

Der Balken entspricht 100 µm. Die Rotfärbung indiziert eine positive Antikörper-Reaktion gegen SP-G (siehe Pfeile).

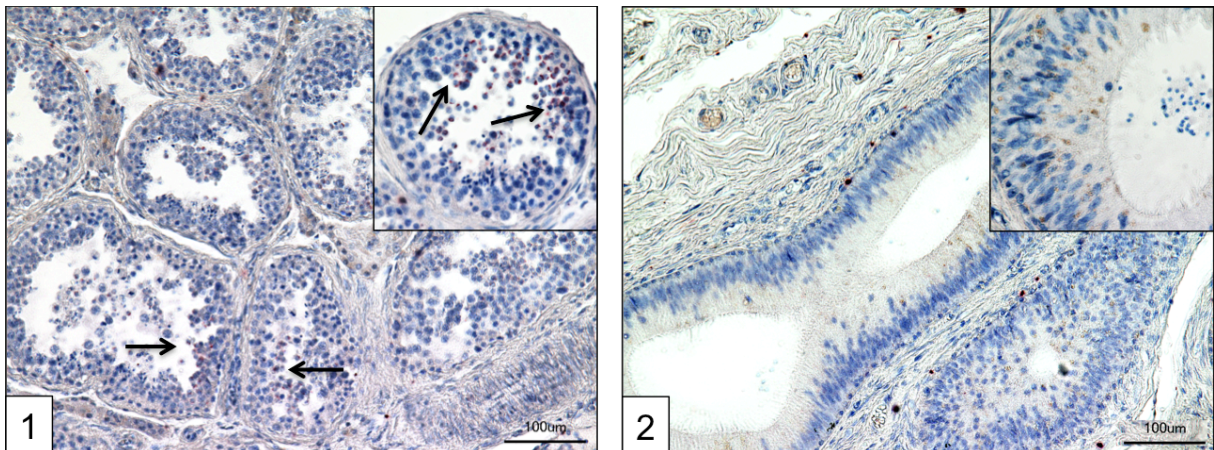
In den Meibomdrüsen ist das Surfactant Protein G durch eine intensive Rotfärbung nachweisbar. Die akzessorischen Tränendrüsen reagieren ebenfalls positiv auf die immunhistologische Färbung (vgl. Abb. 3.1-3c).



**Abb. 3.1-3d: Immunhistochemischer Nachweis von SP-G in der Niere und im Haarfollikel des Augenlides**

[1] Tubulussystem der Niere, [2] Augenlid mit mehrschichtigem, verhorntem Plattenepithel und der Kutis, Haarfollikel angeschnitten mit angrenzender Talgdrüse (H)  
Der Balken entspricht 100 µm. Die Rotfärbung indiziert eine positive Antikörper-Reaktion (siehe Pfeile).

Hauptsächlich im distalen Tubulus der Niere ist eine Antikörper-Reaktion erkennbar. Im Haarfollikel des Augenlides ist SP-G immunhistochemisch nur schwach nachweisbar, jedoch zeigt sich eine starke Antikörper-Reaktion innerhalb der Talgdrüse des Haares.



**Abb. 3.1-3e: Immunhistochemischer Nachweis von SP-G im Hoden und Nebenhoden**

[1] Hodenkanälchen mit Gruppen von Zwischenzellen (Leydig-Zellen) und Sertoli-Zellen  
[2] Nebenhoden mit zweireihigem Zylinderepithel  
Der Balken entspricht 100 µm. Die Rotfärbung indiziert eine positive Antikörper-Reaktion (siehe Pfeile).

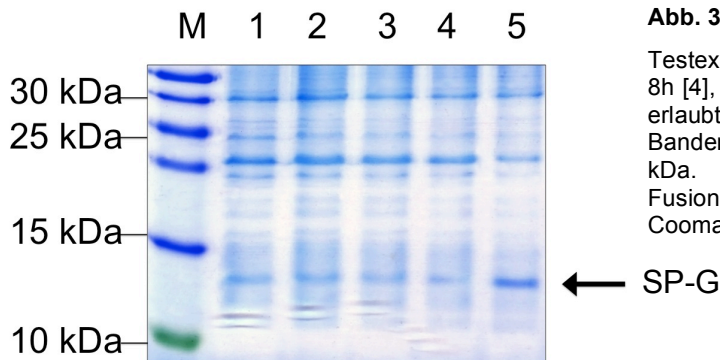
Surfactant Protein G lässt sich in den Hodenkanälchen nachweisen. Vor allem die Spermatozyten erster Ordnung sind angefärbt, die Gruppen von Leydig-Zellen hingegen nicht. Das Nebenhodengewebe ist negativ für Surfactant Protein G.



### 3.1.1.4 Vorarbeiten für die rekombinante Expression von SP-G

Zur Herstellung gereinigter und nativer Surfactant Proteine wurden zwei verschiedene Expressionssysteme etabliert und bezüglich Funktionalität und Ausbeute getestet. Die Testexpression des Proteins erfolgte durch den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3, Invitrogen) (Abb. 3.1-4).

Die induzierte Proteinexpression ergab nach 20 Stunden Kultivierungszeit bei 28°C und einer IPTG-Konzentration von 0,1 mM eine gesteigerte Expressionsrate für das Fusionsprotein bei  $\approx 13$  kDa. Die Testexpressionen mit *Leishmania tarantolea* erbrachten noch keine verwertbaren Ergebnisse.



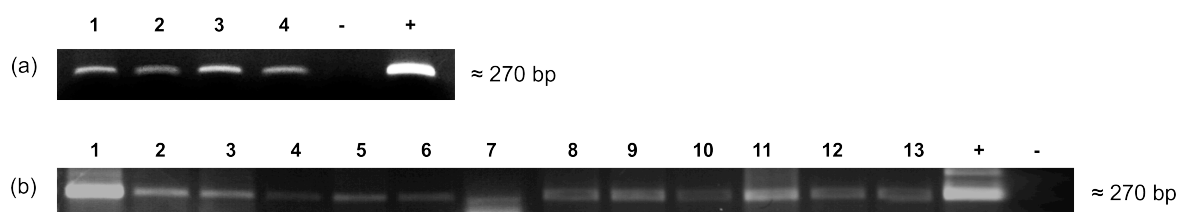
**Abb. 3.1-4: Testexpression für SP-G**

Testexpression an *E. coli* für 2h [1], 4h [2], 6h [3], 8h [4], 20h [5]. Der verwendete Proteinmarker (M) erlaubt die Charakterisierung der distinkten Banden entsprechend ihres Molekulargewichts in kDa. Der Pfeil markiert das vermutete Fusionsprotein. Coomassie-Blau-gefärbtes 15 %-iges SDS-Gel.

### 3.1.2 Surfactant Protein H (SFTA3)

#### 3.1.2.1 Analyse und Nachweis humaner SP-H mRNA mittels PCR

Zum Nachweis der mRNA von SP-H wurden anhand der bekannten Nukleotidsequenz von SP-H spezifische Oligonukleotide (Primer) generiert. Die Primer wurden in RT-PCR Experimenten eingesetzt (siehe Methoden 2.2.4). Als interne Produktkontrolle wurde ein Plasmid verwendet, welches den „*open reading frame*“ (ORF) für das Surfactant Protein H beinhaltet. In der Abbildung 3.1-5 ist das Ergebnis der PCR dargestellt.



**Abb. 3.1-5: Nachweis von SP-H mittels RT-PCR in verschiedenen humanen Gewebeproben**

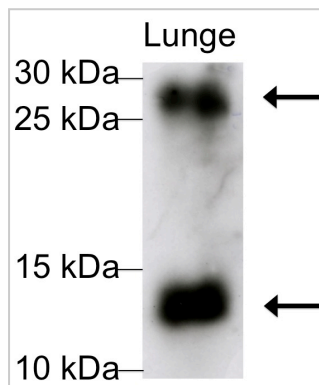
(a) Tränendrüse [1], Lid [2], Konjunktiva [3], Kornea [4]

(b) Lunge [1], Lid [2], Herz [3], Niere [4], Hoden [5], Magen [6], Milz [7], Nasenmuschel [8], Speicheldrüse [9], Nabelschnur [10], Trophoblast [11], Leber [12], Pankreas [13]; Positivkontrolle [+] ORF von SP-H und Negativkontrolle [-].

Wie die Abbildung 3.1-5 verdeutlicht, ist das spezifische Produkt für das Surfactant Protein H nicht bei allen humanen Proben darstellbar. Anhand einer mitgeführten Kontrolle (Plasmid) und eines DNA-Markers wurde für SP-H eine Produktgröße von 270 bp ermittelt. In den Ansätzen zum okulären System (a) ist die mRNA für SP-H in der Tränendrüse, im Lid, in der Konjunktiva, sowie in der Kornea sehr gut nachweisbar. Wie in Abb. 3.1-5 (b) gezeigt ist, sind die Proben der Lunge, Niere, Lid, Herz, Hoden, Magen, Milz, Nasenmuschel, Speicheldrüse, Nabelschnur, Trophoblast, Leber und Pankreas positiv für SP-H mRNA. Alle ermittelten Produktgrößen entsprechen der Positivkontrolle. Die Negativkontrolle ist fragmentfrei.  $\beta$ -Aktin als Ladungskontrolle wurde mitgeführt (nicht gezeigt).

### 3.1.2.2 Generierung eines spezifischen Surfactant Protein H Antikörpers

Der Surfactant Protein H Antikörper ist ebenfalls durch die Firma SeqLab hergestellt worden. Die spezifische Peptidsequenz (CDFQLIRDQVLFLQDQAQE) wurde in Kooperation mit PD Dr. W. Brandt und F. Rausch, AG Proteinmodellierung am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Saale) erarbeitet. Der Antikörper konnte durch Immunisierung von Kaninchen mit dem Peptid und anschließender Affinitätsaufreinigung aus dem Serum gewonnen werden. Im Western-Blot wurde die Wirksamkeit des Antikörpers am Lungenprotein (30 µg) getestet (Abb. 3.1-6).



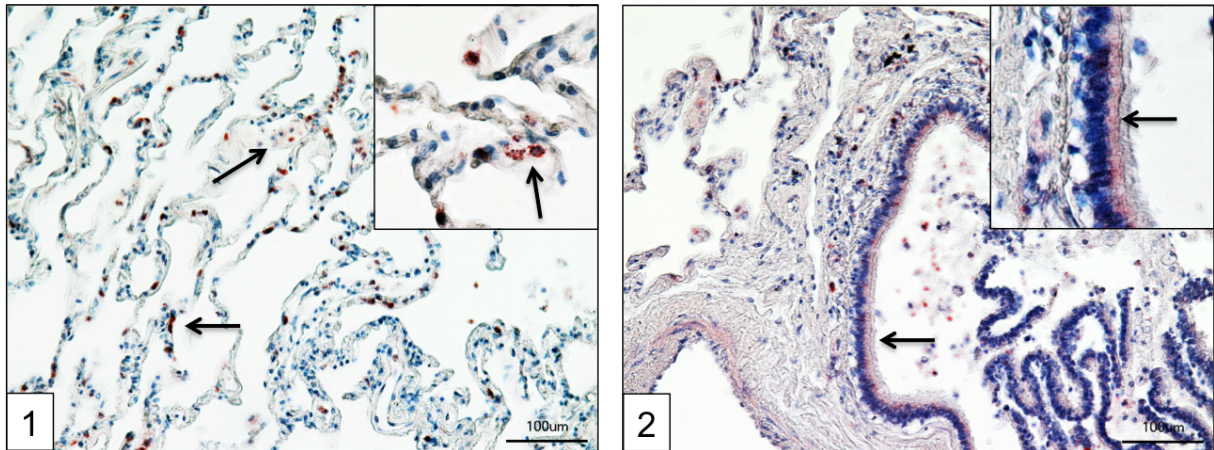
**Abb. 3.1-6: Antikörpertest am Lungenprotein mittels Western-Blot**  
(15%-iges SDS-Gel)

Verwendet wurde Lunge als exponiertes Gewebe für die Surfactant Proteine. Die Pfeile markieren positive Nachweise für das Surfactant Protein H.

Der gereinigte Antikörper zeigte Reaktivität für zwei unterschiedlich große Proteine im Lungengewebe. Es konnte eine spezifische Bande für SP-G bei ca. 13 kDa und ca. 26 kDa detektiert werden, diese entsprechen allerdings nicht der mittels spezieller Analysesoftware (Translate, ExPASy Proteomics tools) vorausgerechneten Proteingröße für SP-H von 10 kDa. Mögliche Proteinmodifikationen sowie eine Oligomerisierung des Proteins wurden in die Berechnung nicht einbezogen.

### 3.1.2.3 Nachweis von Surfactant Protein H in humanen Gewebeproben mittels immunhistochemischer Methoden

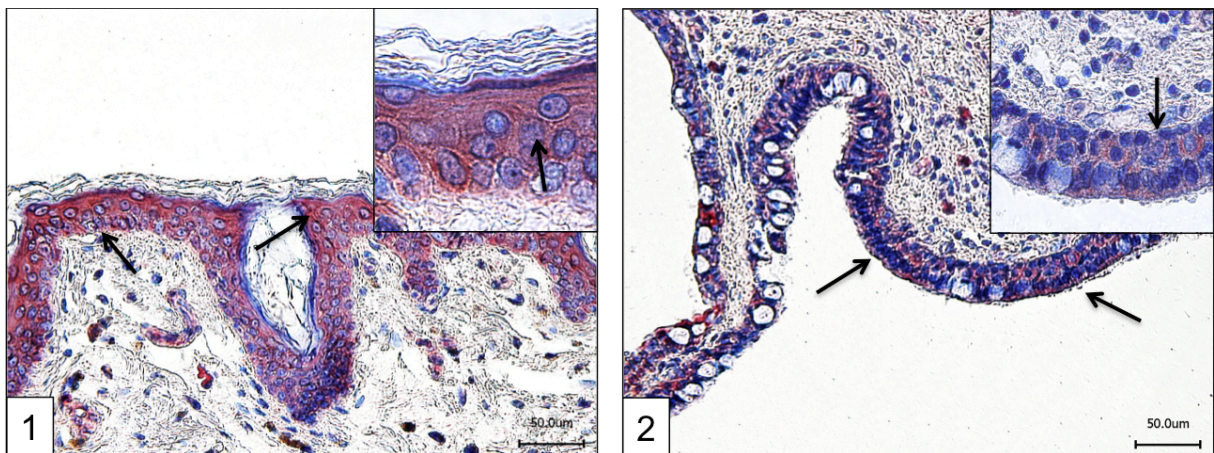
Zur weiteren Analyse des Vorkommens von SP-H sind Gewebeproben immunhistochemisch untersucht worden (siehe Methode 2.5.2). Hierfür wurden exemplarisch bereits mittels PCR positiv auf SP-H getestete humane Gewebeschnitte eingesetzt. Ein positiver Proteinnachweis ist durch eine Rotfärbung zu erkennen. Die Ergebnisse werden in den Abbildungen 3.1-7 a bis h gezeigt.



**Abb. 3.1-7a: Immunhistochemischer Nachweis von SP-H in humaner Lunge**

[1] Alveolares Epithel der Lunge, der Detailausschnitt zeigt Epithel mit Pneumozyten Typ I und II  
 [2] Lungengewebe mit Bronchiolusepithel  
 Der Balken entspricht in 100 µm. Die Rotfärbung indiziert eine positive Antikörper-Reaktion gegen SP-H (siehe Pfeile).

In der Lunge konnte am alveolären Epithel eine positive Farbreaktion festgestellt werden. Im Detailausschnitt wird deutlich, dass entweder die Alveolarmakrophagen oder die Pneumozyten Typ II gefärbt sind. Im Epithel der Bronchioli (Abb. 3.1-7a2) wurde mit der Farbreaktion das Vorhandensein von Surfactant Protein H nachgewiesen.

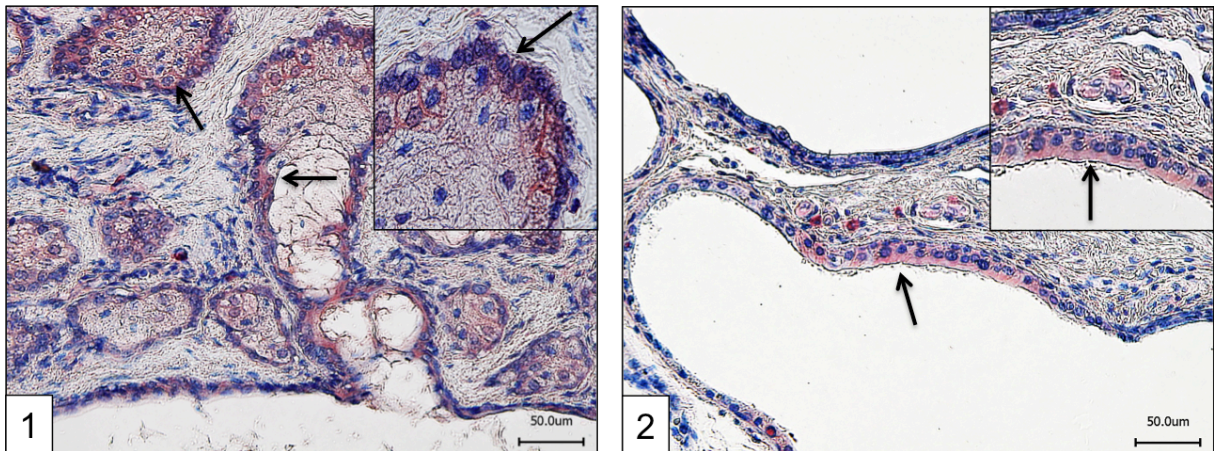


**Abb. 3.1-7b: Immunhistochemischer Nachweis von SP-H am Epithel des Augenlides**

[1] mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel, darunter die Kutis  
 [2] Konjunktiva, hochprismatisches Epithel mit Becherzellen  
 Der Balken entspricht 50 µm. Die Rotfärbung indiziert eine positive Antikörper-Reaktion gegen SP-H (siehe Pfeile).

Surfactant Protein H lässt sich im mehrschichtigen Plattenepithel des Augenlides nachweisen. Die positive Antikörper-Reaktion endet am Übergang zur Kutis. Im konjunktivalen Epithel [2] ist SP-H ebenfalls immunhistochemisch nachweisbar. Im iso- bis hochprismatischen Plattenepithel der Konjunktiva wird das Vorkommen von

SP-H durch die positive Antikörper-Reaktion sichtbar (siehe Ausschnittsvergrößerung), die Becherzellen sind negativ.

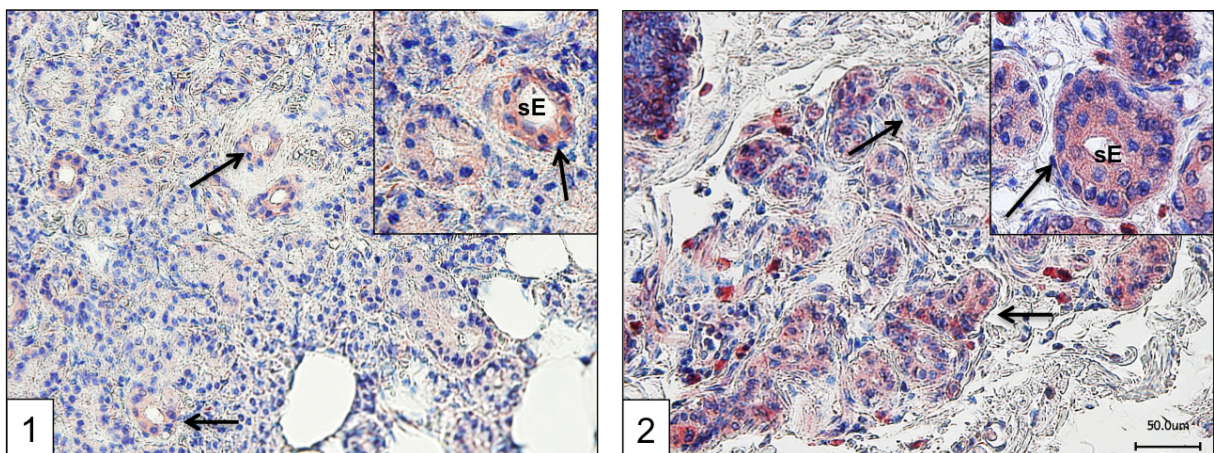


**Abb. 3.1-7c: Immunhistochemischer Nachweis von SP-H im inneren Bereich des Augenlides**

[1] Meibomdrüse mit Meibozyten; [2] Molldrüsen

Der Balken entspricht 50 µm. Die Rotfärbung indiziert eine positive Antikörper-Reaktion gegen SP-H (siehe Pfeile).

Surfactant Protein H ist in den Meibomdrüsen und in den Molldrüsen nachweisbar (Abb. 3.1-7c).



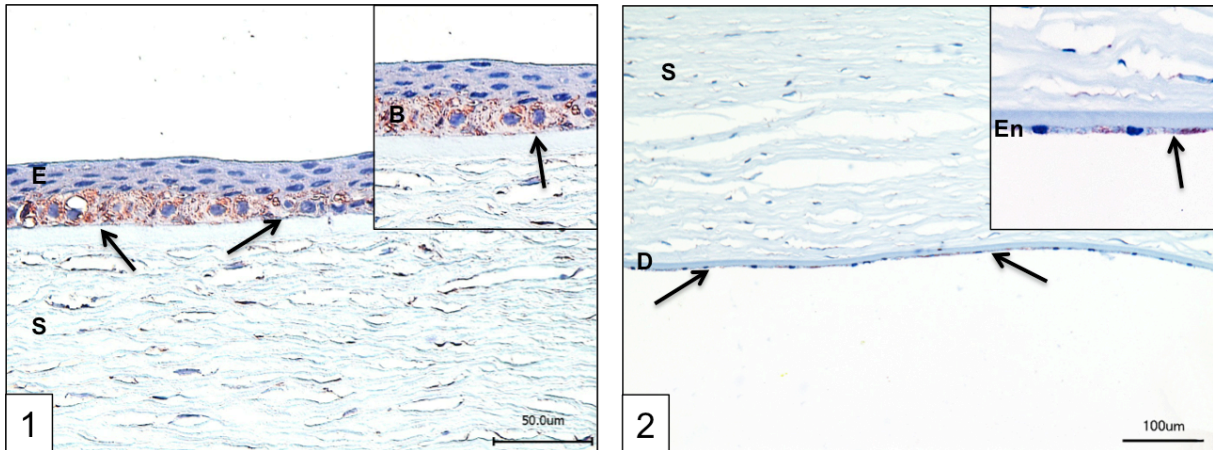
**Abb. 3.1-7d: Immunhistochemischer Nachweis von SP-H in der Tränendrüse**

[1] Querschnitt durch eine verzweigte tubuloalveoläre Tränendrüse mit serösen Endstücken (sE)

[2] akzessorische Tränendrüse mit serösen Endstücken (sE)

Der Balken entspricht 50 µm. Die Rotfärbung indiziert eine positive Antikörper-Reaktion (siehe Pfeile).

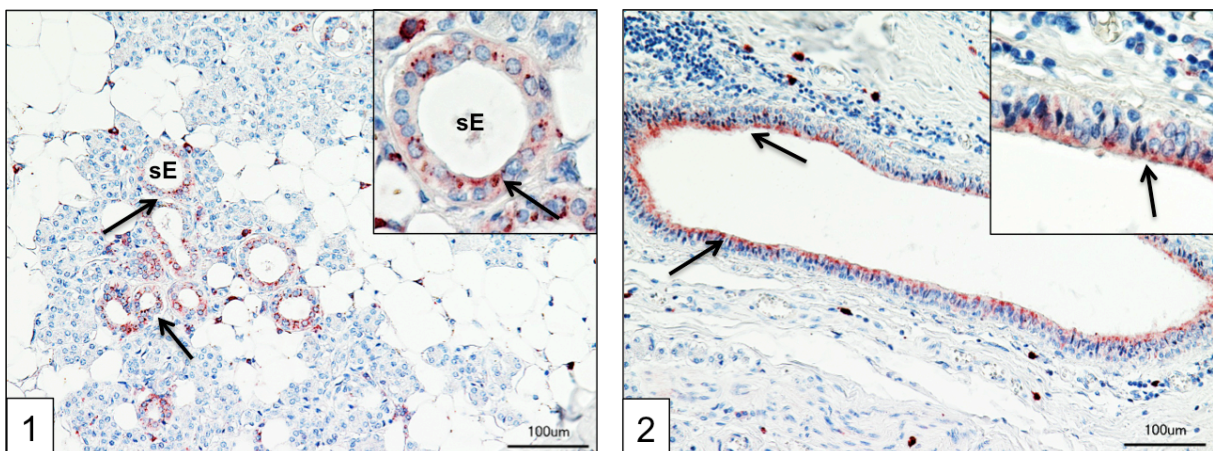
Immunhistochemisch konnte im Gewebe der Tränendrüse SP-H festgestellt werden. Hauptsächlich die mukösen Tubuli des Drüsenepithels weisen eine starke Rotfärbung auf. Ein vergleichbares Ergebnis ist bei der akzessorischen Tränendrüse vorhanden.



**Abb. 3.1-7e: Immunhistochemischer Nachweis von SP-H in der Kornea**

[1] Gesunde Kornea mit mehrschichtigem, unverhorntem Plattenepithel (E) und Stroma (S)  
 [2] Endothel (En) der Kornea mit Descmet-Membran (D) und dem Stroma (S)  
 Der Balken entspricht [1] 50 µm und in [2] 100 µm. Die Rotfärbung indiziert eine positive Antikörper-Reaktion gegen SP-H (siehe Pfeile).

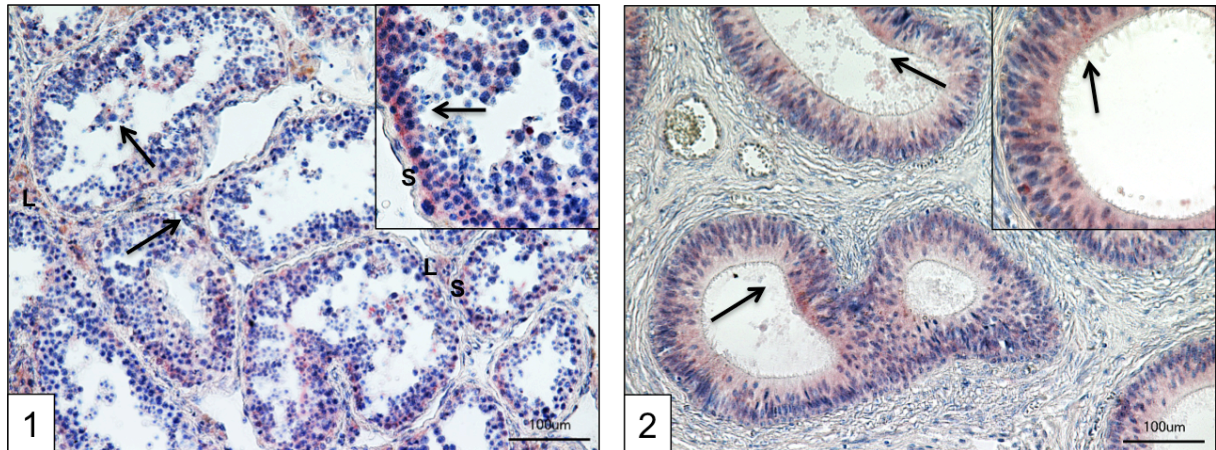
Das detektierte Surfactant Protein lässt sich in der Epithelschicht ausschließlich in den Basalzellen der Kornea nachweisen. Das Endothel (2) ist ebenfalls durch eine Farbreaktion gekennzeichnet (siehe Pfeil). Das Stroma und andere Bereiche der Kornea sind negativ.



**Abb. 3.1-7f: Immunhistochemischer Nachweis von SP-H in der Parotis (Ohr-Speicheldrüse)**

[1] verzweigte azinöse Drüse mit serösen Endstücken (sE), sowie Streifenstücken der Speicheldrüse; [2] Ausführungsgang der Speicheldrüse  
 Der Balken entspricht 100 µm. Die Rotfärbung indiziert eine positive Antikörper-Reaktion gegen SP-H (siehe Pfeile).

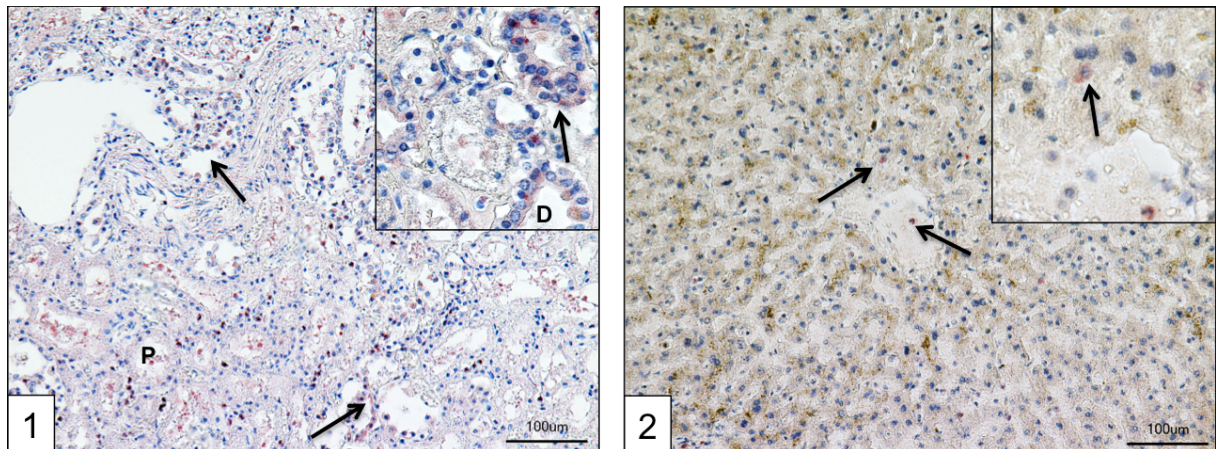
Immunhistochemisch konnte SP-H im Gewebe der Speicheldrüse nachgewiesen werden. Hauptsächlich die Streifenstücke des Drüsenepithels zeigten eine starke Rotfärbung. Abbildung 3.1-7f [2] stellt einen interlobulären Ausführungsgang dar, der ebenfalls positiv auf die immunhistochemische Färbung von SP-H reagiert hat.



**Abb. 3.1-7g: Immunhistochemischer Nachweis von SP-H im Hoden und Nebenhoden**

- [1] Hodenkanälchen mit Gruppen von Zwischenzellen (Leydig-Zellen (L) und Sertoli-Zellen (S)
  - [2] Nebenhoden mit zweireihigem Zylinderepithel.
- Der Balken entspricht 100 µm. Die Rotfärbung indiziert eine positive Antikörper-Reaktion (siehe Pfeile).

Surfactant Protein H lässt sich in den Hodenkanälchen und im Zylinderepithel des Nebenhodens (Epididymis) nachweisen. Vor allem im Bereich der Keimzellen ist eine Reaktion zu erkennen. In den Leydig-Zellen ist kein Nachweis von SP-H möglich.



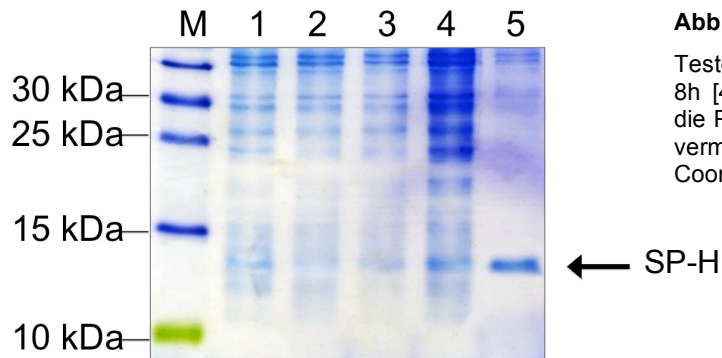
**Abb. 3.1-7h: Immunhistochemischer Nachweis von SP-H in der Niere und in der Leber**

- [1] Tubulussystem der Niere, proximale (P) und distale (D) Tubuli
  - [2] Leberzellplatten mit einer Zentralvene (mittig).
- Der Balken entspricht 100 µm. Die Rotfärbung indiziert eine positive Antikörper-Reaktion (siehe Pfeile).

Immunhistochemisch konnte SP-H im Gewebe der Niere festgestellt werden, d.h. im distalen und proximalen Tubulus der Niere ist eine Rotfärbung zu erkennen. In der Leber ist SP-H nicht nachweisbar, jedoch sind einzelne Zellen, eventuell Makrophagen, angefärbt (siehe Pfeil).

### 3.1.2.4 Vorarbeiten für die rekombinante Expression von SP-H

Gereinigte und native Surfactant Proteine werden für funktionelle Untersuchungen in ausreichender Menge benötigt. Zur rekombinanten Expression wurden zwei mikrobielle Expressionssysteme, *E. coli* und *Leishmania tarantolea*, etabliert und bezüglich Funktionalität und Ausbeute getestet. Die Testexpression des Proteins erfolgte im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3, Invitrogen).



**Abb. 3.1-8: Testexpression für SP-H**

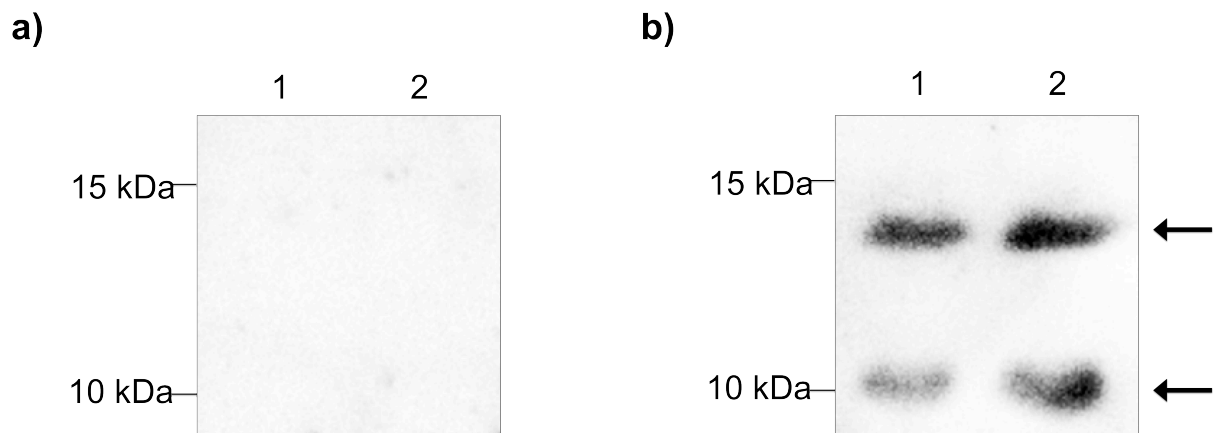
Testexpression an *E.coli* für 2h [1], 4h [2], 6h [3], 8h [4], 20h [5]. Der verwendete Marker (M) gibt die Proteingröße in kDa an. Der Pfeil markiert das vermutete Fusionsprotein. Coomassie-Blau-gefärbtes 15%-iges SDS-Gel.

Die induzierte Proteinexpression zeigte nach einer Kultivierung (20 Std. bei 28°C) und einer IPTG-Konzentration von 0,1 mM eine deutliche Bande bei  $\approx$  14 kDa. Die Testexpressionen mit *Leishmania tarantolea* ergaben noch keine verwertbaren Ergebnisse.



### 3.1.3 Nachweis von Surfactant Protein G und H in der Tränenflüssigkeit

Unter den Absätzen 3.1.1 und 3.1.2 konnte die Existenz der Surfactant Proteine G und H in Geweben des okulären Systems (Kornea, Konjunktiva, Tränendrüse) auf mRNA- und Proteinebene gezeigt werden. Um einen Einblick in das komplexe System der Expression, Regulation und Funktion an der Augenoberfläche und im Tränensystem zu erhalten, wurde im nächsten Schritt humane Tränenflüssigkeit (männlich und weiblich) untersucht. Die Analyse erfolgte dabei mittels Western-Blot. Eingesetzte Antikörper sind im Anhang 7.5 aufgelistet und die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1-9 dargestellt.



**Abb. 3.1-9: Detektion von SP-G und SP-H in der Tränenflüssigkeit mittels Western-Blot**

Verwendet wurden 30  $\mu$ l Tränenflüssigkeit männlich [1] und weiblich [2]; a) Ergebnisse unter Verwendung des SP-G Antikörpers, b) Ergebnisse unter Verwendung des SP-H Antikörpers. (15 %-iges SDS Gel)

SP-G ist in keiner der untersuchten Proben nachweisbar, wohingegen für SP-H in beiden Tränenproben eine Bande bei  $\approx$  10 kDa und  $\approx$  13 kDa detektiert worden ist.

### 3.2 Surfactant Proteine bei pathogenen Mikroorganismen

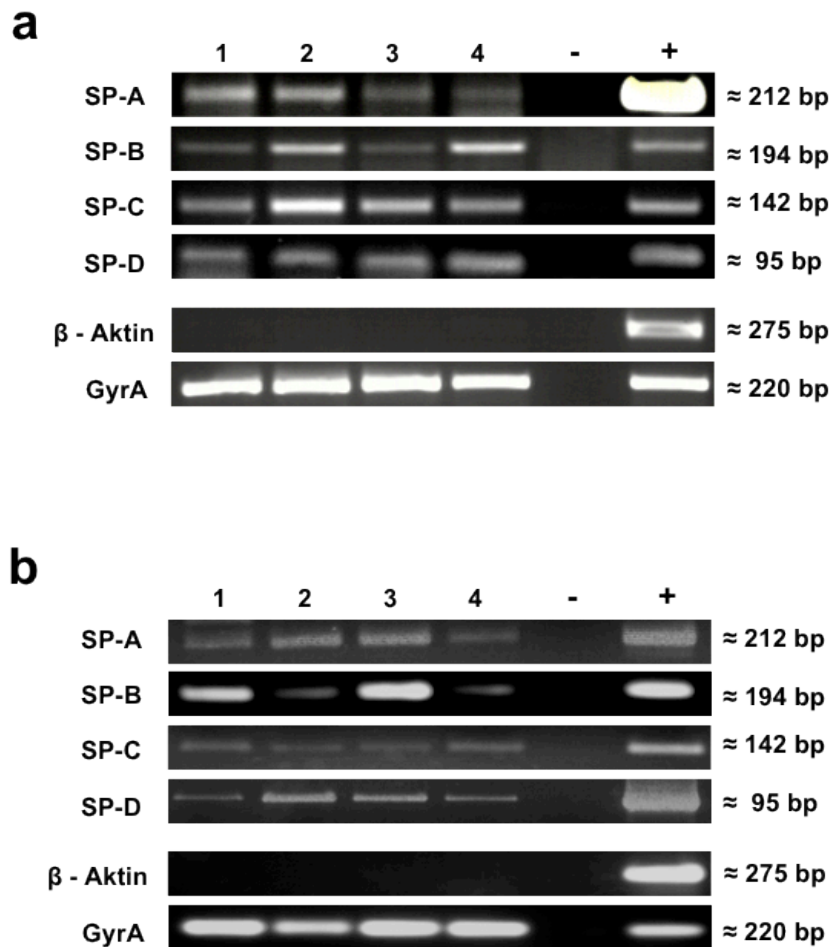
Wie bereits in der Einleitung beschrieben, werden den Surfactant Proteinen A und D immunologische Funktionen zugeschrieben. Auf dieser Grundlage wurden in der Arbeit zahlreiche Zellkulturversuche mit Bakterienüberständen durchgeführt, um die Wechselwirkungen mit Zellen der Kornea und Konjunktiva zu untersuchen.

Bei einer Analyse unserer Antikörper gegen Bakterienüberstände wurden entgegen allen Erwartungen spezifische Antikörper-Reaktionen für alle Surfactant Proteine festgestellt, die Anlass zu den folgenden Untersuchungen an *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* gaben.

#### 3.2.1 Analyse des Bakteriengenoms auf Surfactant Proteine mittels PCR

Die genomische DNA und die RNA verschiedener Proben von *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* wurden mittels PCR und RT-PCR auf das Vorhandensein der genetischen Information für Surfactant Proteine untersucht. Zur Gewinnung der genomischen DNA wurde nach Protokoll 2.2.10 verfahren. Die bakterielle mRNA wurde mit einem Aufreinigungsverfahren der Firma Zymo Research (ZR Bacterial RNA Mini Präp, Methode 2.2.8.2) isoliert und mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Die Plasmidaufreinigung erfolgte nach einem Protokoll der Firma Qiagen (Methode 2.2.9). Als Kontrolle wurde bei den Analysen das humane Housekeeping-Gen  $\beta$ -Aktin verwendet. Diese interne Kontrolle ermöglicht es, Verunreinigung mit humaner DNA zu detektieren. Das bakterielle Gen, welches für Gyrase A kodiert, ist als Kontrolle für die Verwendbarkeit der bakteriellen Proben genutzt worden. Als interne Produktkontrolle wurde ein Plasmid eingesetzt, welches den „open reading frame“ (ORF) für das jeweilige Surfactant Protein beinhaltet. Als Positivkontrolle für das humane  $\beta$ -Aktin diente cDNA von der Lunge, für die Positivkontrolle in Bezug auf Gyrase A bakterielle DNA von *E. coli* (ATCC 35218). Die gewonnenen Ergebnisse sind in den Abb. 3.2-1 und 3.2-2 dargestellt.

## Ergebnisse



**Abb. 3.2-1: Nachweis von Surfactant Protein RNA in *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa***

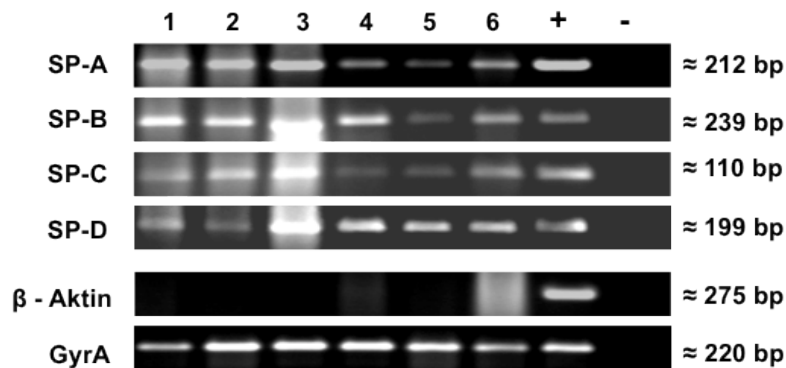
RT-PCR für Surfactant Proteine (A, B, C, D) an (a) *Staphylococcus aureus* und (b) *Pseudomonas aeruginosa*. Dargestellt sind die Proben von verschiedenen *Staphylococcus aureus* Stämmen; [1] SA 113 [ATCC 35556] aerob kultiviert, [2], SA 113 [ATCC 35556] anaerob kultiviert, [3] SA N315 [ATCC 12228] aerobe kultiviert, [4] SA [NCTC 8325] aerob kultiviert

und in Abbildung b die verschiedenen *Pseudomonas aeruginosa* Stämme; [1] PA 01 aerob kultiviert, [2] PA 01 anaerob kultiviert, [3] PA [ATCC 14442] aerob kultiviert, [4] PA [ATCC 27853] aerob kultiviert.

Als interne Kontrollen dienen das humane β-Aktin und das bakterielle Gen Gyrase A sowie spezielle Plasmide, die das ORF für das jeweilige Surfactant Protein beinhalten.

Die analysierten mRNA-Proben von *Staphylococcus aureus* (Abb. 3.2-1, Bild a), und *Pseudomonas aeruginosa* (Abb. 3.2-1, Bild b) weisen in jedem Fall das spezifische PCR-Produkt für das jeweilige Surfactant Protein auf. Durch den mitgeführten DNA-Marker konnte für SP-A eine Fragmentgröße von 212 bp, für SP-B von 194 bp, für SP-C von 142 bp und für SP-D von 95 bp ermittelt werden. Alle Werte entsprechen der jeweiligen Positivkontrolle der Surfactant Proteine. Die Negativkontrolle und das

humane  $\beta$ -Aktin sind fragmentfrei. Die Gyrase A ist außer bei der Negativkontrolle für alle eingesetzten Proben positiv.



**Abb. 3.2-2: Nachweis genomischer Surfactant Protein DNA in *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa***

PCR mit genomischer DNA von *Staphylococcus aureus* (SA) und *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Dargestellt sind die Proben von verschiedenen Isolaten, [1] PA 01 Labor-Stamm, [2] PA 154 Umwelt Isolat, [3] PA 12 Patientenisolat, [4] SA 113 [ATCC 35556] Labor-Stamm, [5] SA 8 Patientenisolat, [6] SA 16 Patientenisolat.

Als interne Kontrollen dienen das humane  $\beta$ -Aktin und das bakterielle Gen Gyrase A sowie spezielle Plasmide, die das ORF für das jeweilige Surfactant Protein beinhalten.

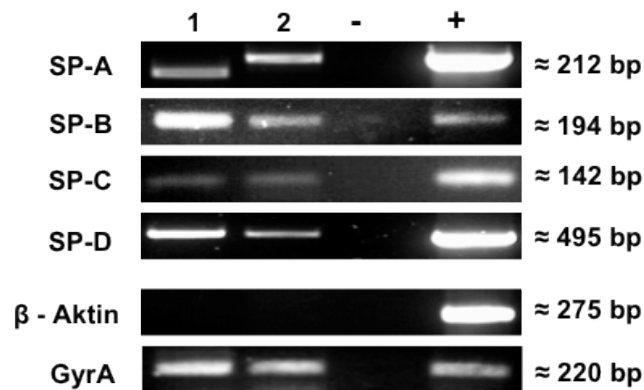
Abbildung 3.2-2 fasst die Untersuchung der genomischen DNA aus *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* zusammen. Bei allen Proben wurde das spezifische Produkt für das entsprechende Surfactant Protein nachgewiesen. Als Produktgrößen sind für SP-A 212 bp, für SP-B 239 bp, für SP-C 110 bp und für SP-D 199 bp mittels eines DNA-Markers und der Positivkontrolle ermittelt worden. Alle Werte entsprechen der jeweiligen Positivkontrolle für die Surfactant Proteine. Die Negativkontrollen und das humane  $\beta$ -Aktin sind fragmentfrei. Außer bei der Negativkontrolle ist Gyrase A für alle eingesetzten Proben positiv.

### 3.2.2 Analyse der bakteriellen Plasmide auf Surfactant Proteine mittels PCR

Der Nachweis der Gene führt zur Fragestellung, ob die Gene im Genom selbst oder auf Plasmidebene codiert sind. Da die Plasmidisolierung aus den Bakterien fehlerhaft sein kann und eine genomische Kontamination nicht ausgeschlossen ist, wurde auf einen kommerziellen plasmidfreien *E. coli* Stamm zurückgegriffen und dieser mit einem Laborstamm verglichen. Als Kontrolle wurde bei den Analysen das humane  $\beta$ -Aktin verwendet. Diese Kontrolle ermöglicht die Verunreinigung mit humaner DNA auszuschließen. Das bakterielle Gen, welches für Gyrase A kodiert, dient als

## Ergebnisse

Kontrolle für die Verwendbarkeit der bakteriellen Proben. Als interne Produktkontrolle ist ein Plasmid genutzt worden, welches den „*open reading frame*“ (ORF) für das jeweilige Surfactant Proteine beinhaltet. Als Positivkontrolle für das humane  $\beta$ -Aktin wurde cDNA von der Lunge eingesetzt, für die Positivkontrolle in Bezug auf Gyrase A bakterielle DNA von *E. coli* (ATCC 35218). Die gewonnenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.2-3 dargestellt.



**Abb. 3.2-3: Nachweis der Surfactant Proteine auf Plasmid-DNA in *Escherichia coli***

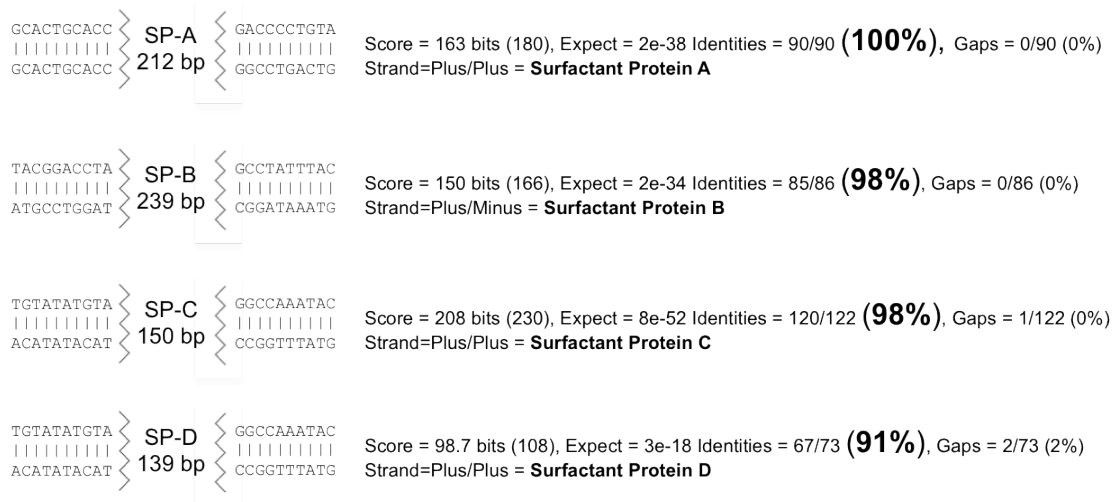
Plasmidanalyse mittels PCR [1] an einem plasmidfreien *E. coli*-Stamm (BL21) und [2] an einem plasmidhaltigen *E. coli* Laborstamm [ATCC 35218]. Als interne Kontrollen dienten das humane Gen  $\beta$ -Aktin und das bakterielle Gen Gyrase A sowie spezielle Plasmide, die das ORF für das jeweilige Surfactant Proteine beinhalten.

Es wurden bei allen Proben die spezifischen PCR-Produkte für die jeweiligen Surfactant Proteine ermittelt. Durch einen festgelegten DNA-Marker konnten für SP-A eine Produktgröße von 212 bp und für SP-B von 194 bp bestimmt werden. Die Fragmente für SP-C betragen 142 bp, die für SP-D 495 bp. Alle erhaltenen Werte entsprechen der jeweiligen Positivkontrolle für die Surfactant Proteine. Die Negativkontrollen und das humane  $\beta$ -Aktin sind ebenfalls fragmentfrei. Die Gyrase A ist außer bei der Negativkontrolle positiv für alle eingesetzten Proben.

### 3.2.3 Sequenzanalyse der PCR Fragmente mit Genomdatenbanken

Die in Abschnitt 3.2.1 erhaltenen PCR-Fragmente von *Staphylococcus aureus* wurden im Anschluss an die Geldokumentation aus dem Gel eluiert. Die Sequenzierung der PCR-Fragmente ist mittels Big Dye 3.1 (siehe Methode 2.2.11) durchgeführt und durch die Firma Eurogen analysiert worden.

Abbildung 3.2-4 ist eine Zusammenfassung ausgewählter Ergebnisse eines Abgleichs mit der Genomdatenbank von NCBI am Beispiel von *Staphylococcus aureus*.



**Abb. 3.2-4: Ergebnisse eines Datenabgleiches mit der Genomdatenbank von NCBI**

Sequenzanalyse der unter Absatz 3.1.1 erhaltenen Fragmente aus *Staphylococcus aureus*. Die fett markierten Prozentangaben zeigen die Übereinstimmung mit den Sequenzen humaner Surfactant Proteine.

Die in Abbildung 3.2-4 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass bei den erhaltenen Sequenzen (n=1) aus *Staphylococcus aureus* eine Übereinstimmung von 91 bis zu 100 Prozent mit dem Gen, welches das jeweilige Surfactant Protein kodiert, vorliegt.

### 3.2.4 Nachweis bakterieller Surfactant Proteine mittels Western-Blot

Zur Immundetektion der Surfactant Proteine A, B, C und D aus Proteinproben von *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* wurden diese aus den Bakterien isoliert (siehe Methode 2.3) und mittels Western-Blot ausgewertet. Als Kontrolle wurde Lungengewebe verwendet. Die eingesetzten monoklonalen Antikörper sind im Anhang 7.5 aufgelistet. Es kamen jeweils 30 µg Protein zum Einsatz. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.2-5 zusammengefasst.

SP-A				SP-B				SP-C				SP-D				β - Aktin			
Lu	SA	PA	kDa	Lu	SA	PA	kDa	Lu	SA	PA	kDa	Lu	SA	PA	kDa	Lu	SA	PA	kDa
			66				40				26				43				42
			36 28				18				16 12								

**Abb. 3.2-5: Analyse der bakteriellen Proteine von *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* auf Surfactant Proteine mittels Western-Blot**

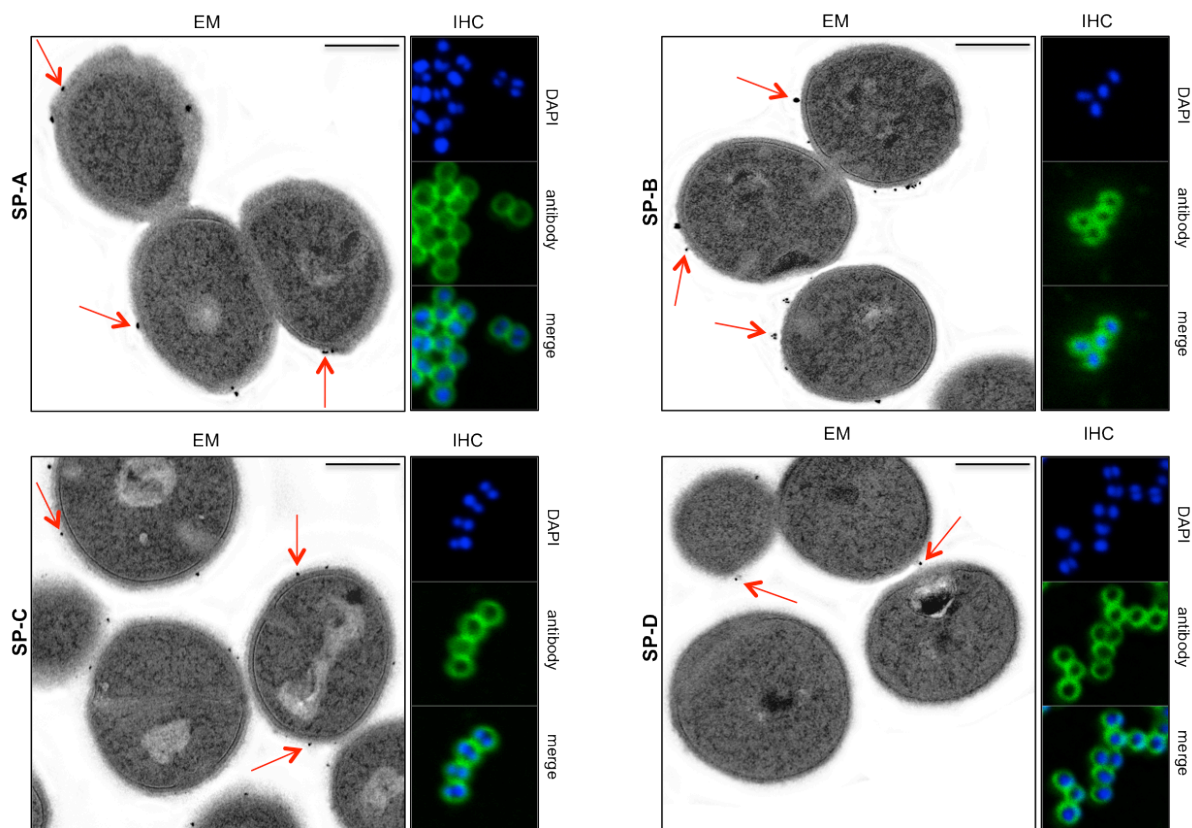
Lunge (Lu) als Positivkontrolle, *Staphylococcus aureus* (SA) und *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Die Darstellung erfolgt nebeneinander entsprechend ihrer Nomenklatur (SP-A; SP-B; SP-C; SP-D). β-Aktin diente als interne Kontrolle. (15 %-iges SDS Gel)

Der Nachweis von SP-A wurde für *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* erbracht. Einschließlich des Kontrollgewebes (Lunge) konnte eine spezifische Bande bei 66 kDa detektiert werden. Für SP-B ist im Vergleich mit dem Lungengewebe in beiden Bakterienproben eine Bande bei 40 kDa und bei 18 kDa bestimmt worden. Dies entspricht den bekannten publizierten Größen für SP-B. Beim Proteinnachweis von SP-C zeigten sich mehrere Banden im Vergleich zur Kontrolle. Die erste liegt bei 12 kDa und ist nur bei den Bakterien sichtbar. Die zweite Bande bei 16 kDa ist in allen Proben vorhanden. Die dritte Bande liegt bei 26 kDa und ist ebenfalls bei allen Proben zu erkennen. Bei der Untersuchung auf SP-D ist eine Bande bei der Größe von 43 kDa festgestellt worden, was der bekannten Proteingröße für SP-D entspricht.

### 3.2.5 Nachweis bakterieller Surfactant Proteine mittels immunhistochemischer Färbungen und Elektronenmikroskopie

Da durch Western-Blot spezifische Antikörper-Reaktionen feststellbar waren, wurde zur weiteren Auswertung eine Fluoreszenzfärbung und Immunogold-Elektronenmikroskopie an Zellen von *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* durchgeführt.

Die Methoden sind unter 2.5.3 und 2.5.4 beschrieben. Die Tabelle im Anhang 7.5 listet die verwendeten Antikörper auf und die Ergebnisse werden in den Abbildungen 3.2-6a und 3.2-6b dargestellt.



**Abb. 3.2-6a: Nachweis der Surfactant Proteine bei *Staphylococcus aureus* mittels immunhistochemischer Reaktionen und Elektronenmikroskopie**

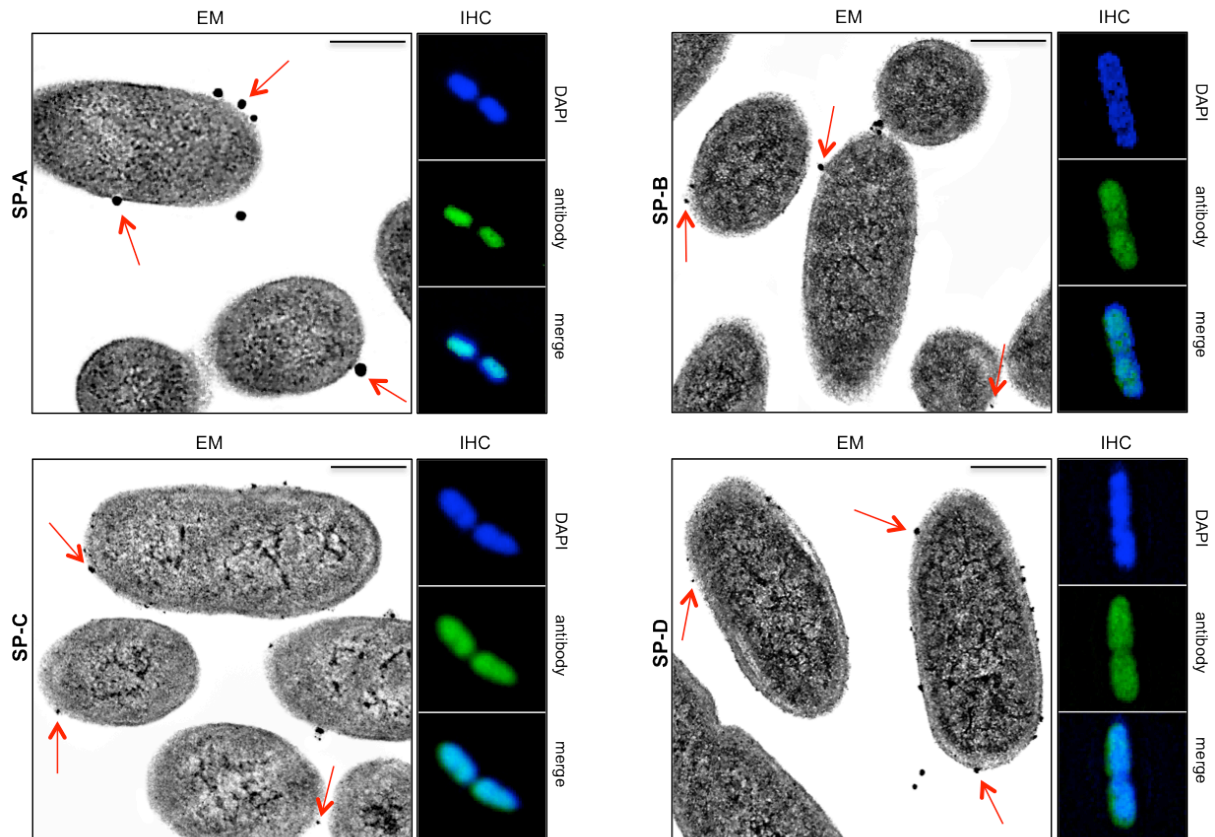
Fluoreszenznachweis mit spezifischen Antikörpern gegen Surfactant Protein A, B, C und D. Die jeweiligen Antikörpernachweise wurden mit der Immunogold–Elektronenmikroskopie kombiniert. Die Fluoreszenzfärbung (IHC) ist am grünen Farbstoff zu erkennen. DAPI markiert die DNA durch eine Blaufärbung. Merge stellt die Überlagerung von DAPI und der Fluoreszenzfärbung dar. Die elektronenmikroskopische Aufnahme (EM) zeigt Immunogoldpartikel in Form von schwarzen Punkten (Kennzeichnung durch rote Pfeile).

Für jedes Surfactant Protein wurde eine positive Antikörper-Reaktion in Form einer Grünfärbung an der äußeren Zellwand von *Staphylococcus aureus* erbracht. Durch Überlagerung der zwei Abbildungen konnte gezeigt werden, dass die



nachgewiesenen Proteine membranassoziiert sind. Die Immunogold-Elektronenmikroskopie an Ultradünnschnitten (50 nm) untermauert dieses Resultat. Kreisrunde Goldpartikel (siehe Abb. 3.2-6a, roter Pfeil) weisen auf eine positive Antikörperbindung hin, die ebenfalls an der Zellwand lokalisiert ist.

In Abbildung 3.2-6b sind die Ergebnisse für *Pseudomonas aeruginosa* dargestellt.



**Abb. 3.2-6b: Nachweis der Surfactant Proteine bei *Pseudomonas aeruginosa* mittels immunhistochemischer Reaktionen und Elektronenmikroskopie**

Fluoreszenznachweis mit spezifischen Antikörpern gegen Surfactant Protein A, B, C und D. Die jeweiligen Antikörpernachweise wurden mit der Immunogold-Elektronenmikroskopie kombiniert. Die Fluoreszenzfärbung (IHC) ist am grünen Farbstoff zu erkennen. DAPI markiert die DNA durch eine Blaufärbung. Merge stellt die Überlagerung von DAPI und der Fluoreszenzfärbung dar. Die elektronenmikroskopische Aufnahme (EM) zeigt Immunogoldpartikel in Form von schwarzen Punkten (Kennzeichnung durch rote Pfeile).

Der Nachweis der Surfactant Proteine für *Pseudomonas aeruginosa* konnte wie bei *Staphylococcus aureus* erbracht werden. Mit der Fluoreszenzfärbung wurde für SP-A, -B, -C und -D gezeigt, dass die Proteine an der äußeren Membran vorkommen. Die Immunogold-Elektronenmikroskopie an Ultradünnschnitten (50 nm) bestätigt das Ergebnis der Fluoreszenzfärbung. Die kreisrunden Goldpartikel markieren die Surfactant Proteine auf der Zellwand von *Pseudomonas aeruginosa* (siehe Abb. 3.2-6b, roter Pfeil).

### 3.2.6 Quantitative Konzentrationsbestimmung bakterieller Surfactant Proteine mittels ELISA

Mit dem Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) sollte die Fragestellung geklärt werden, ob die Bakterien die Produktion der Surfactant Proteine unter Stress regulieren. Dazu wurden die obligat aeroben Bakterien *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* für 48 Stunden unter anaeroben und aeroben Bedingungen kultiviert. Die Proteinisolation ist entsprechend der Methode 2.3.3 vorgenommen worden. Für die quantitative Bestimmung der Surfactant Proteine A, B, C und D kam ein kommerzielles ELISA-System zum Einsatz. Zur Auswertung werden die exprimierten und aufgereinigten Mengen an Surfactant Protein gegen die verschiedenen Kultivierungsbedingungen graphisch in den Abbildungen 3.2-7a und 3.2-7b dargestellt. Die Proteinkonzentration für die folgenden Analysen ist jeweils in ng Surfactant Protein/mg Gesamtprotein angegeben.

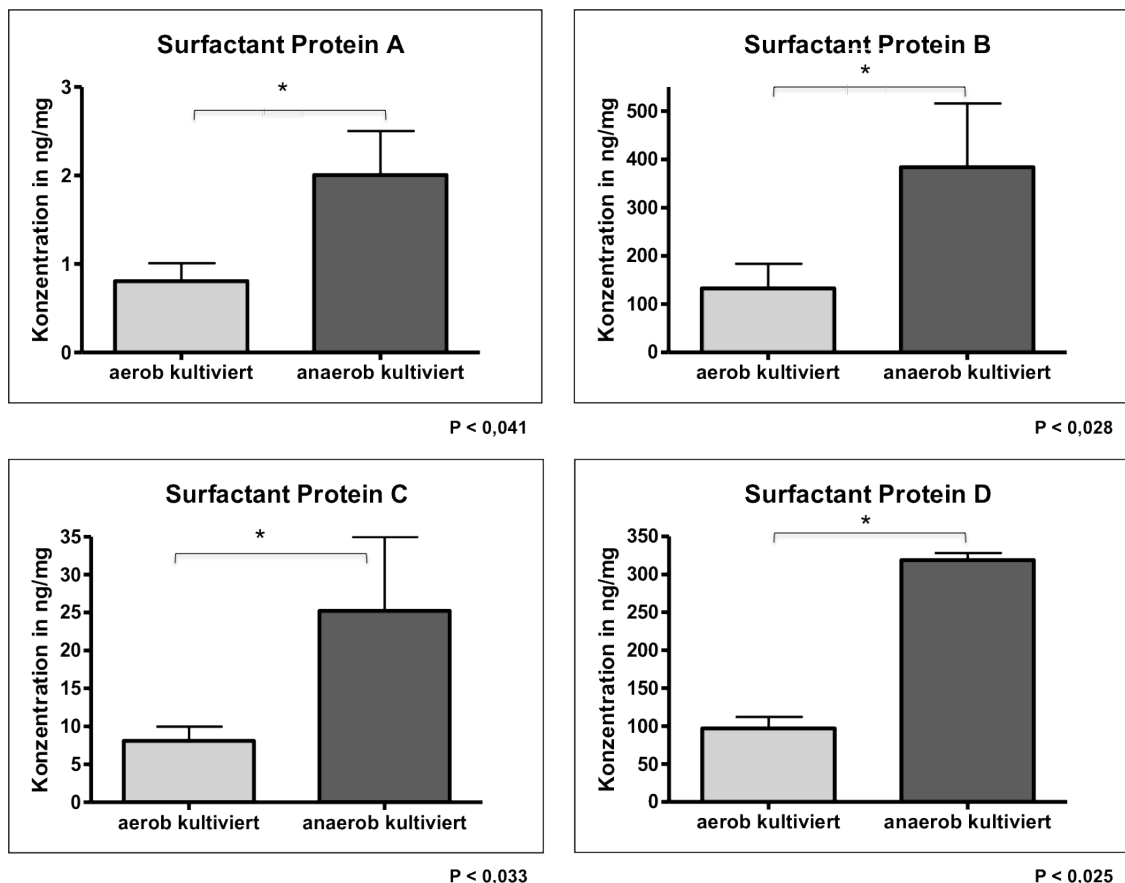


Abb. 3.2-7a: ELISA-Analyse von *Staphylococcus aureus* unter aeroben und anaeroben Kultivierungsbedingungen

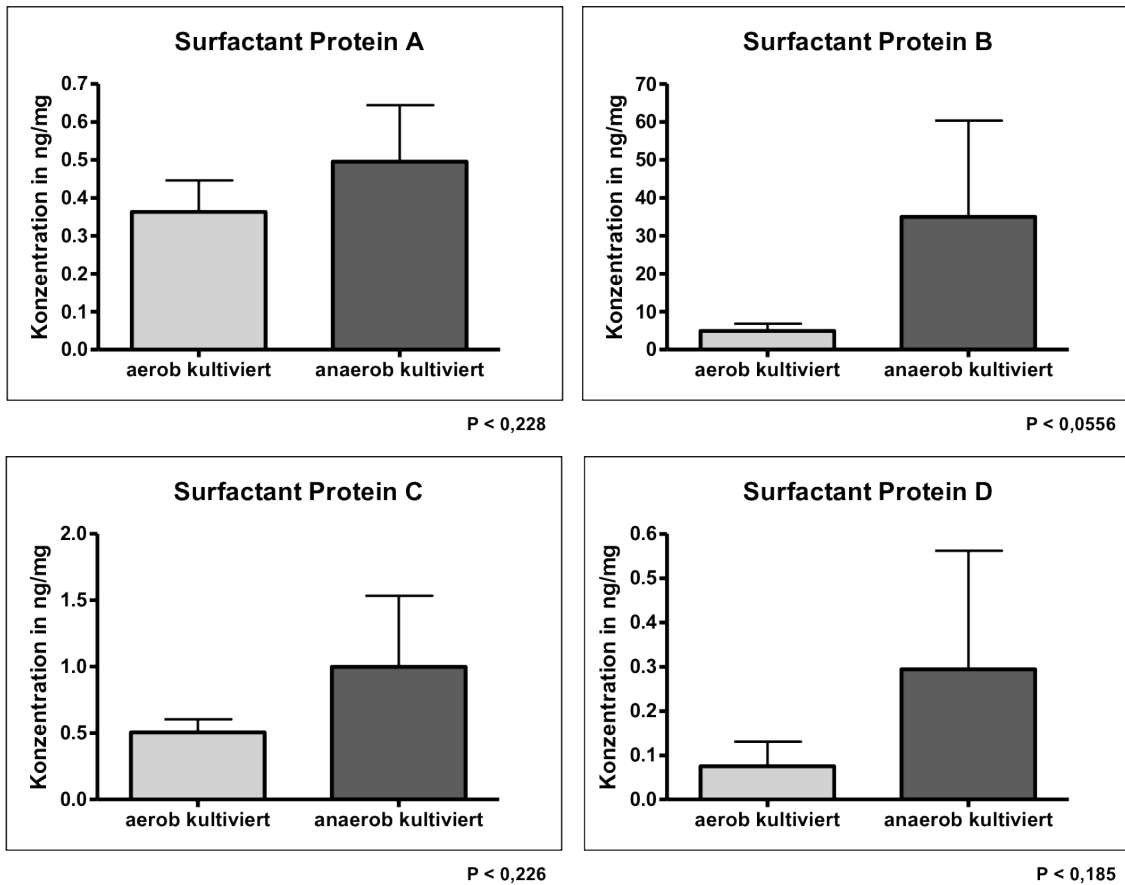
Die Balken im Diagramm stellen den Mittelwert aus 5 Einzelwerten mit der dazugehörigen Standardabweichung dar. Die Proteinkonzentration (y-Achse) ist in ng/mg pro Gesamtproteinkonzentration angegeben.

## Ergebnisse

Aus den Diagrammen wird ersichtlich, dass die Konzentration an Surfactant Protein unter anaeroben Bedingungen zunimmt. Für SP-A ergibt sich eine signifikante Steigerung um etwa 100 % ( $P < 0,041$ ). Die Konzentration liegt bei aerober Kultivierung im Mittel bei 0,9 ng/mg und unter anaeroben Bedingungen bei 2 ng/mg. *Staphylococcus aureus* produziert insgesamt deutlich größere Mengen an SP-B. Im Vergleich zur aeroben Kultivierung ist unter anaeroben Bedingungen die Konzentration an Surfactant Protein B um den Faktor 3 signifikant ( $P < 0,028$ ) erhöht. Der Mittelwert lag unter aeroben Bedingungen bei 120 ng/mg, bei anaeroben Bedingungen bei 390 ng/mg. Die Ergebnisse der Untersuchung für SP-C zeigen ebenfalls eine signifikante Steigerung ( $P < 0,033$ ) der Proteinkonzentration unter anaeroben Bedingungen um das Dreifache. Der Mittelwert beträgt aerob 7 ng/mg und anaerob 26 ng/mg. Im Vergleich zu SP-A und SP-C wird unter den gewählten Bedingungen in den Bakterienzellen deutlich mehr Surfactant Protein D gebildet. Die Konzentration an SP-D ist unter anaeroben Bedingungen gegenüber aerober Kultivierung signifikant erhöht ( $P < 0,025$ ) und liegt im Mittel bei 320 ng/mg Bakterienmasse.

Die in der Abbildung 3.2-7b dargestellten Ergebnisse für *Pseudomonas aeruginosa* zeigen ein ähnliches Bild, wobei jedoch die gebildeten Mengen geringer ausfallen. Die Proteinkonzentration für die folgenden Analysen ist jeweils in ng Surfactant Protein/mg Gesamtprotein angegeben. Es ist zwar eine Steigerung der Konzentration von SP-A unter anaeroben Bedingungen zu beobachten, diese ist jedoch nicht signifikant ( $P < 0,228$ ). Die Konzentration liegt im Mittel bei 0,3 ng/mg unter aeroben Bedingungen, für anaerobe Kultivierung liegt der Wert bei 0,4 ng/mg. Auch *Pseudomonas aeruginosa* bildet im Vergleich zu SP-A deutlich mehr Surfactant Protein B. Der Mittelwert beträgt für aerobe Bedingungen 4 ng/mg und für anaerobe Bedingungen 35 ng/mg. Die Erhöhung der Proteinkonzentration ist nicht signifikant ( $P < 0,0556$ ) für SP-B. Für SP-C ist ebenfalls keine signifikante Zunahme der Proteinkonzentration zu verzeichnen ( $P < 0,226$ ). Der Mittelwert der SP-C Konzentration beträgt 0,5 ng/mg unter aeroben und 1 ng/mg unter anaeroben Bedingungen.

## Ergebnisse



**Abb. 3.2-7b: ELISA-Analyse von *Pseudomonas aeruginosa* unter aeroben und anaeroben Bedingungen**

Die Balken stellen den Mittelwert aus 5 Einzelwerten mit der dazugehörigen Standardabweichung (T) dar. Die Proteinkonzentration (y-Achse) ist in ng/mg pro Gesamtproteinkonzentration angegeben.

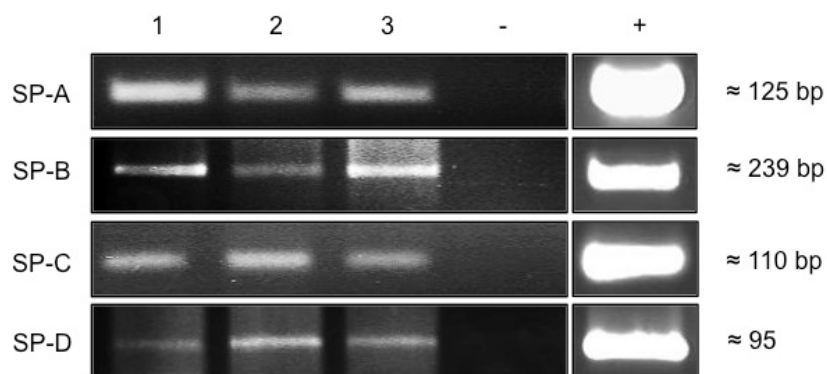
Die ELISA-Analyse des Proteingehaltes zeigt für SP-D gleichfalls eine nicht signifikante Erhöhung ( $P < 0,185$ ) der Konzentration unter anaeroben Bedingungen. Der Mittelwert für die aerobe Kultivierung beträgt 0,9 ng/mg und unter anaeroben Bedingungen 1,1 ng/mg.

### 3.3 Surfactant Proteine im humanen Gelenkknorpel

Ähnlich wie die Kornea ist der Gelenkknorpel unter physiologischen Bedingungen ein gefäß- und nervenfreies Gewebe und erfordert daher einen besonderen Mechanismus zur Versorgung der Zellen mit Nährstoffen. Der Nachweis von Surfactant Proteinen im Knorpel wurde bis heute noch nicht beschrieben. Im folgenden Teil der Arbeit soll untersucht werden, ob von den Chondrozyten Surfactant Proteine exprimiert werden. Gleichzeitig wird geprüft, ob die Expression von Surfactant Proteinen im Gelenkknorpel in Bezug auf das Lebensalter des Menschen und degenerative Prozesse wie Arthrose variiert.

#### 3.3.1 Nachweis von Surfactant Protein mRNA in Chondrozyten

Zur Klärung der Fragestellung, ob die Surfactant Proteine A, B, C und D von Chondrozyten exprimiert werden, wurden die immortalisierten Knorpel-Zelllinien C28/I2 und T/C28a2 sowie primäre Chondrozyten mittels PCR untersucht (siehe Methode 2.2.4). Dazu wurde die mRNA der Zellen isoliert und mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Als interne Produktkontrolle wurde ein Plasmid eingesetzt, welches den „*open reading frame*“ (ORF) für das jeweilige Surfactant Protein beinhaltet. In Abbildung 3.3-1 ist das Ergebnis der PCR dargestellt. Die verwendeten Primer sind im Anhang 7.4 aufgeführt.



**Abb.3.3-1: Nachweis der mRNA von SP-A, -B, -C und -D mittels PCR in verschiedenen Arten von Knorpelzellen**

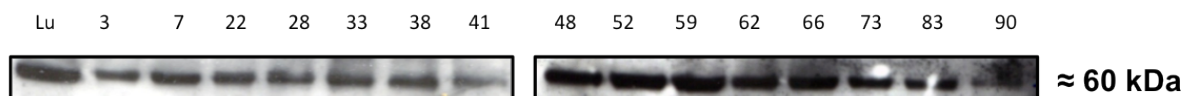
RT-PCR für Surfactant Proteine (A, B, C, D) an den Zelllinien [1] C28/I2, [2] T/C28a2 und [3] an primären Knorpelzellen. Als interne Kontrolle (Positivkontrolle +) wurden spezielle Plasmide, die das ORF für das jeweilige Surfactant Protein beinhalten, mitgeführt. Als Negativkontrolle wurde Wasser eingesetzt.

In allen Proben wurde das spezifische PCR-Produkt für das jeweilige Surfactant Protein detektiert. Durch den mitgeführten DNA-Marker konnte für SP-A eine

Produktgröße von 125 bp und für SP-B ein Produkt von 239 bp ermittelt werden. Das PCR-Produkt von SP-C hat eine Größe von 110 bp und das von SP-D von 95 bp. Alle ermittelten Produktgrößen entsprechen der Positivkontrolle für die Surfactant Proteine. Die Negativkontrolle ist fragmentfrei.  $\beta$ -Aktin als Ladungskontrolle wurde mitgeführt (nicht gezeigt). Um die Spezifität der Banden zu bestätigen, wurden mit den PCR-Produkten Sequenzierungen durchgeführt.

### 3.3.2 Nachweis von Surfactant Proteinen in Knorpelproben mittels Western-Blot

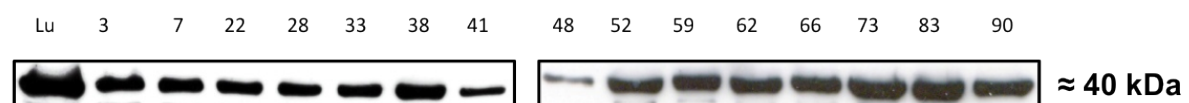
Für die Immundetektion der Surfactant Proteine A, B, C und D im hyalinen Gelenkknorpel, wurden Proteine aus Knorpelstückchen von Patienten im Alter von 3 bis 90 Jahren isoliert (siehe Tabelle 2.1.4.1) und mittels Western-Blot an einem 15 %-igen SDS-Gel analysiert. Die verwendeten Antikörper sind im Anhang 7.5 aufgelistet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden in den Abbildungen 3.3-2 bis 3.3-5 zusammengestellt.



**Abb. 3.3-2: Detektion von SP-A im humanen Knorpel**

Lunge (Lu) als Positivkontrolle und Proben von Patienten im entsprechenden Alter in Jahren (3 bis 90).

Der Nachweis von SP-A konnte in allen Proben erbracht werden. Jede untersuchte Altersstufe von 3 bis 90 Jahren sowie die Kontrolle zeigten eine spezifische Bande bei 66 kDa.

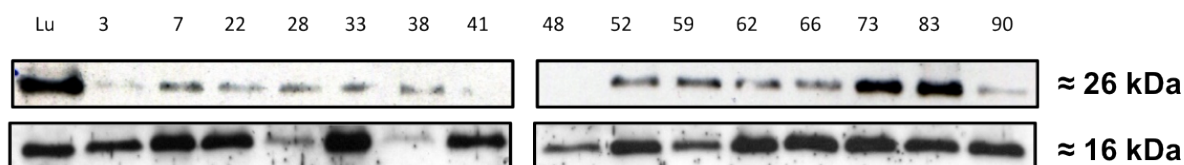


**Abb. 3.3.-3: Detektion von SP-B im humanen Knorpel**

Lunge (Lu) als Positivkontrolle und Proben von Patienten im entsprechenden Alter in Jahren (3 bis 90).

Nach Abbildung 3.3-3 konnte für SP-B eine deutliche Bande bei 40 kDa in den humanen Proben der Lunge und im Knorpel der untersuchten Patienten detektiert werden.

## Ergebnisse

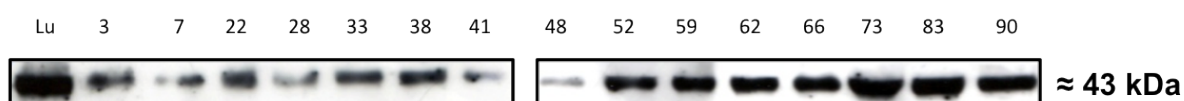


**Abb. 3.3-4: Detektion von SP-C im humanen Knorpel**

Lunge (Lu) als Positivkontrolle und Proben von Patienten im entsprechenden Alter in Jahren (3 bis 90).

In der Abbildung 3.3-4 sind die Detektionsbanden für das Surfactant Protein C zusammengestellt. In der Positivkontrolle und den Patientenproben wurden zwei spezifische Banden identifiziert. Die kleinere liegt bei 16 kDa und ist in jeder Probe einschließlich der Lunge erkennbar. Die zweite, größere Bande wurde bei 26 kDa detektiert. Bei den Proben eines 41 und 48-jährigen Patienten konnte diese Proteinbande nur schwach bis gar nicht ermittelt werden. Eine fehlerhafte Probenverwendung kann nicht ausgeschlossen werden.

Die Abbildung 3.3-5 beinhaltet das Western-Blot Ergebnis für das Surfactant Protein D.



**Abb. 3.3-5: Detektion von SP-D im humanen Knorpel**

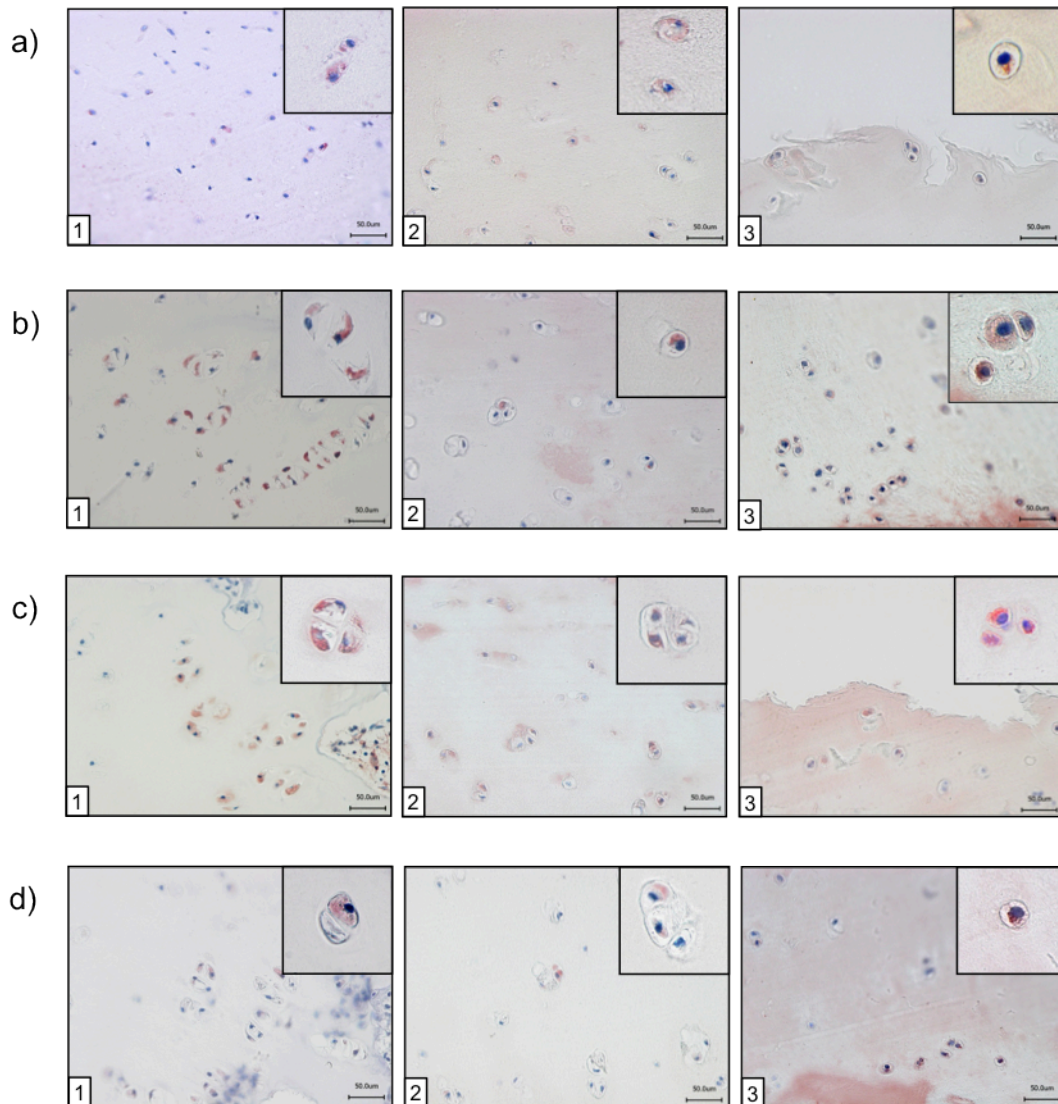
Lunge (Lu) als Positivkontrolle und Proben von Patienten im entsprechenden Alter in Jahren (3 bis 90).

Bei der Untersuchung der Gewebe auf SP-D konnte bei allen Probanden eine spezifische Bande bei 43 kDa nachgewiesen werden.

### 3.3.3 Immunhistochemischer Nachweis von Surfactant Proteinen in humanen Knorpelproben

Die Durchführung ist im Methodenteil unter 2.5.2 beschrieben. Für die Gewebeschnitte wurden Knorpelproben von Patienten im Alter von 3, 48 und 90 Jahren eingesetzt. Die für die immunhistologische Analyse verwendeten Antikörper sind im Anhang 7.5 aufgelistet. Ein positiver Proteinnachweis ist durch eine Rotfärbung der Chondrozyten zu erkennen. Die Untersuchungsergebnisse sind in den Abbildungen 3.3-6 a bis d dargestellt. Altersunabhängig können die Surfactant Proteine immunhistochemisch in den Knorpelzellen nachgewiesen werden.

## Ergebnisse



**Abb. 3.3-6: Immunhistochemischer Nachweis von Surfactant Proteinen im humanen Gelenkknorpel**

Die Übersichts- und Detailaufnahmen positiver rotgefärbter Knorpelzellen stammen von Patienten im Alter von [1] 3 Jahren, [2] 8 Jahren und [3] 90 Jahren. (a) Nachweis von SP-A, (b) Nachweis von SP-B, (c) Nachweis von SP-C, (d) Nachweis von SP-D. Die Rotfärbung entspricht einer positiven Protein-Antikörper-Reaktion.

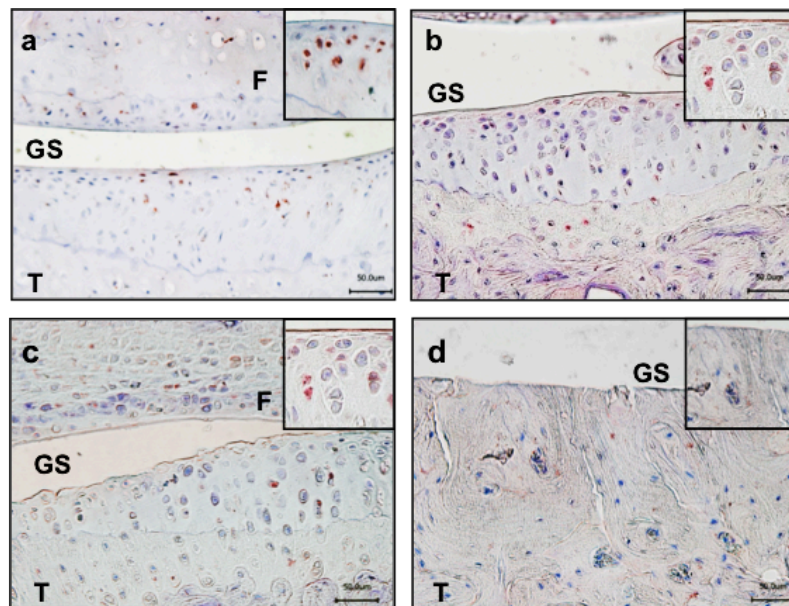
SP-A ist im Zytoplasma der Chondrozyten lokalisiert (vgl. Detailaufnahme Abb. 3.3-6 Bildreihe a). Das Protein SP-B kann immunhistochemisch altersunabhängig ebenfalls zytoplasmatisch in den Knorpelzellen nachgewiesen werden (Abb. 3.3-6 Bildreihe b). Die in Bildreihe c dargestellten immunhistochemischen Abbildungen dokumentieren für alle Proben den Nachweis von SP-C im Gewebe des humanen Gelenkknorpels. Wie bei SP-A und -B ist die Antikörper-Reaktion im Zytoplasma nachweisbar (vgl. Detailaufnahme). Die Bildreihe d zeigt das Ergebnis des Nachweises von SP-D. Das Surfactant Protein D ist in den Gewebeschnitten



vorhanden, es gibt keine Altersabhängigkeit und SP-D kann im Zytoplasma der Chondrozyten detektiert werden.

### 3.3.4 Immunhistochemischer Nachweis von Surfactant Proteinen im Gelenkknorpel von genetisch zur Arthrose prädisponierten Mäusen

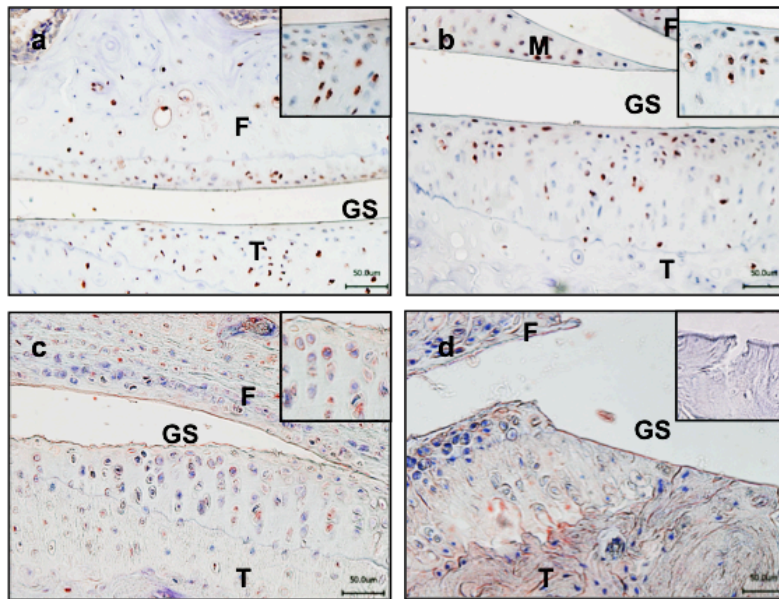
Für den Nachweis der Surfactant Proteinen in Abhängigkeit vom Schweregrad einer ausgebildeten Arthrose wurden Mäuse der Linie STR/Ort eingesetzt. Mit dieser Mauslinie ist es möglich, gezielt Arthrostadien zu untersuchen. Für die immunhistochemische Analyse sind Kniegelenksschnitte der Mäuse im Alter von 4, 9, 10 und 12 Monaten verwendet worden. Sie wiesen entsprechend ihrem Alters die vier Arthrostadien Grad 0, I, II und III auf. Die methodische Durchführung ist unter 2.5.2 beschrieben und die für die immunhistologische Analyse verwendeten Antikörper sind im Anhang 7.5 aufgelistet. Ein positiver Proteinnachweis ist durch eine Rotfärbung zu erkennen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.3-7a bis 3.3-7d dargestellt.



**Abb. 3.3-7a: Immunhistochemischer Nachweis von SP-A in den Chondrozyten des Kniegelenkknorpels von STR/Ort-Mäusen**

Knorpelschnitte (Übersichts- und Detailaufnahmen) von Mäusen im Alter von (a) 4 Monaten mit Arthrosegrad 0, (b) 9 Monaten mit Grad I, (c) 10 Monaten mit Grad II und (d) 12 Monaten mit Grad IV. Darstellung des knorpeligen Gelenküberzuges an Femur (F) und Tibiaplateau (T) neben dem Gelenkspalt (GS) und der *Tidemark* (Pfeil). Die Rotfärbung entspricht einer positiven Protein-Antikörper-Reaktion.

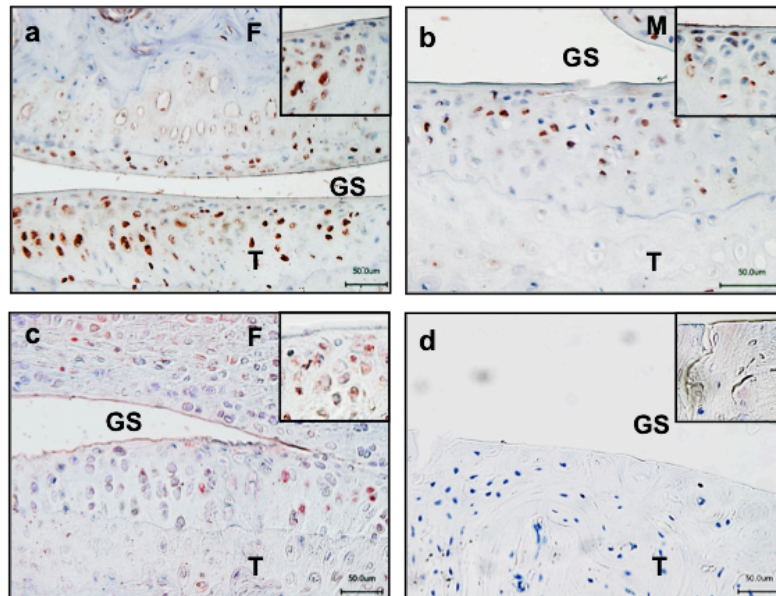
In der Abbildung 3.3-7b ist der Nachweis von SP-B im Mausmodell abgebildet.



**Abb. 3.3-7b: Immunhistochemischer Nachweis von SP-B in den Chondrozyten des Kniegelenkknorpels von STR/Ort-Mäusen**

Knorpelschnitte (Übersichts- und Detailaufnahmen) von Mäusen im Alter von (a) 4 Monaten mit Arthrosegrad 0, (b) 9 Monaten mit Grad I, (c) 10 Monaten mit Grad II und (d) 12 Monaten mit Grad IV. Darstellung des knorpeligen Gelenküberzuges an Femur (F) und Tibiaplateau (T) neben dem Gelenkspalt (GS) und der *Tidemark* (Pfeil). Die Rotfärbung entspricht einer positiven Protein-Antikörper-Reaktion.

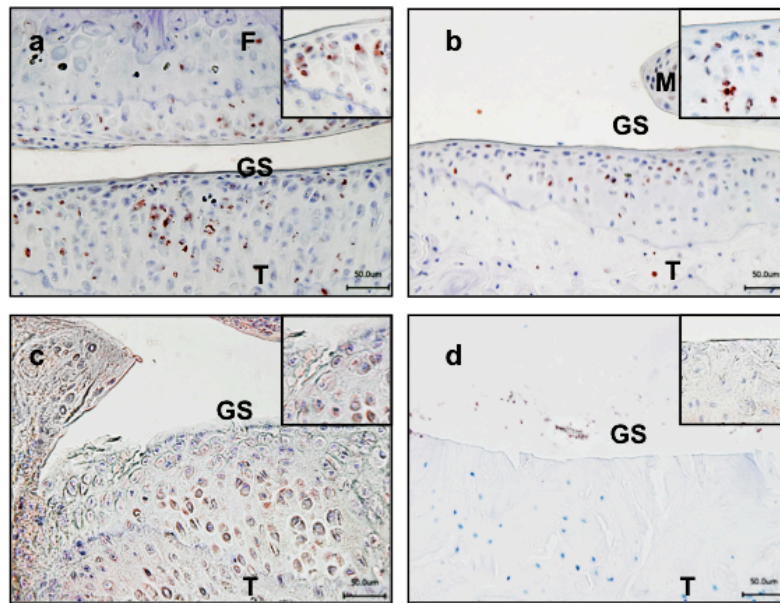
Die Abbildung 3.3-7a zeigt das Ergebnis zum Nachweis von SP-A in den Chondrozyten des Mausmodells. Bei 3 von 4 Altersgruppen konnte in den Knorpelschichten und zum Teil unterhalb der Grenze zum kalzifizierten Knorpel der Tibia (*Tidemark*) eine Rotfärbung festgestellt werden. Bei der Gruppe mit dem Arthrosegrad IV (Bild d) ist kein Knorpel mehr an den Gelenkflächen zu erkennen. Nur im Randbereich lassen sich noch Chondrozyten einzelner Knorpelfragmente positiv anfärben (nicht gezeigt). Die immunhistochemischen Untersuchungen des Knorpelgewebes bezüglich SP-B (Abb. 3.3-7b) lassen positive Antikörper-Reaktionen in den Chondrozyten vor allem im Bereich der oberflächlichen Knorpelschichten oberhalb der *Tidemark* erkennen. Vereinzelt treten rotgefärbte Zellen auch unterhalb der *Tidemark* auf. Bildet das Knorpelgewebe den höchsten Arthrosegrad aus, ist an den Gelenkflächen kein Knorpel mehr zu erkennen (Bild d). Nur im Randbereich des Gewebeschnittes ließen sich noch Knorpelfragmente positiv anfärben.



**Abb. 3.3-7c: Immunhistochemischer Nachweis von SP-C in den Chondrozyten des Kniegelenkknorpels von STR/Ort-Mäusen**

Knorpelschnitte (Übersichts- und Detailaufnahmen) von Mäusen im Alter von (a) 4 Monaten mit Arthrosegrad 0, (b) 9 Monaten mit Grad I, (c) 10 Monaten mit Grad II und (d) 12 Monaten mit Grad IV. Darstellung des knorpeligen Gelenküberzuges an Femur (F) und Tibiaplateau (T) neben dem Gelenkspalt (GS) und der *Tidemark* (Pfeil). Die Rotfärbung entspricht einer positiven Protein-Antikörper-Reaktion.

Entsprechend Abbildung 3.3-7c konnte in den Knorpelzellen der Gewebeprobe (a, b und c) das Surfactant Protein C nachgewiesen werden, wobei sich die Mehrzahl der positiven Zellen in der oberflächennahen Schicht des Tibiaplateaus befinden. Bei Knorpelproben mit dem Arthrosegrad IV (Abb. 3.3-7c (d)) ist kein Knorpel mehr an den Gelenkflächen zu erkennen. Nur im Randbereich des Gewebeschnittes ließ sich noch in vereinzelt Knorpelfragmenten SP-C nachweisen (nicht gezeigt). Die immunhistochemische Analyse von Surfactant Protein D in Gelenken der STR/ORT Mäuse wird in Abbildung 3.3-7d gezeigt.



**Abb.3.3-7d: Immunhistochemischer Nachweis von SP-D in den Chondrozyten des Kniegelenkknorpels von STR/Ort-Mäusen**

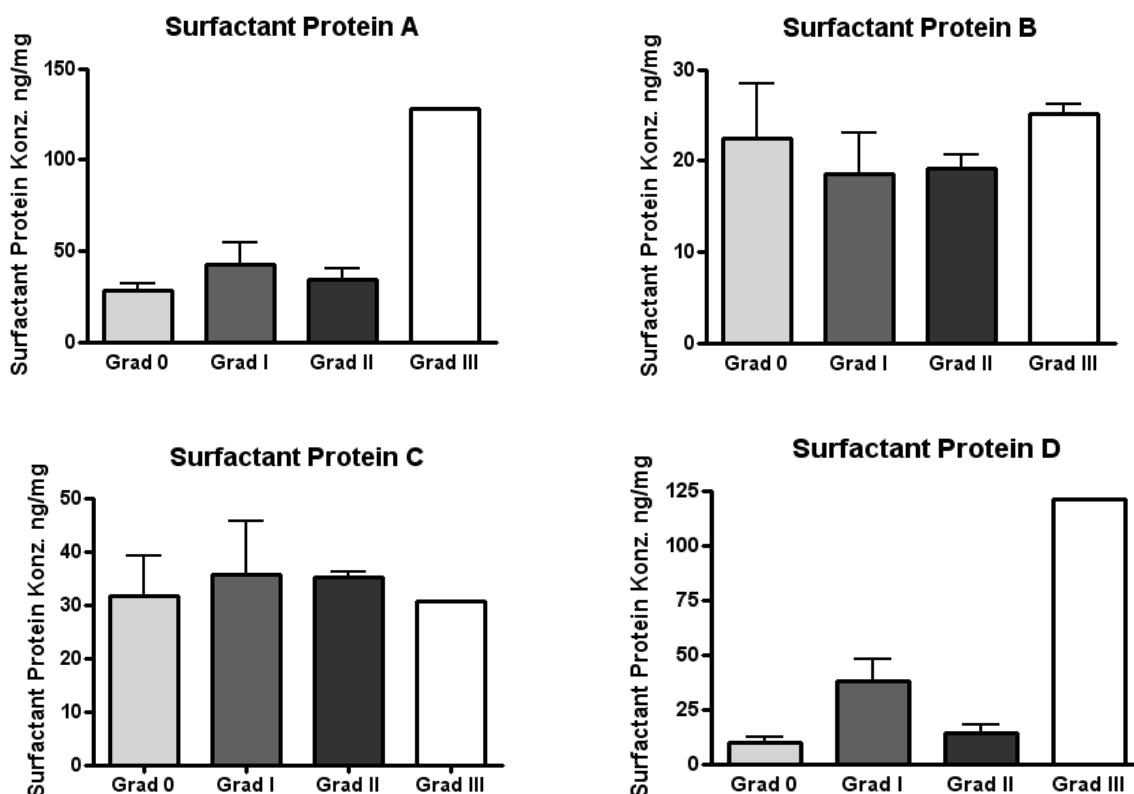
Knorpelschnitte (Übersichts- und Detailaufnahmen) von Mäusen im Alter von (a) 4 Monaten mit Arthrosegrad 0, (b) 9 Monaten mit Grad I, (c) 10 Monaten mit Grad II und (d) 12 Monaten mit Grad IV. Darstellung des knorpeligen Gelenküberzuges an Femur (F) und Tibiaplateau (T) neben dem Gelenkspalt (GS) und der *Tidemark* (Pfeil). Die Rotfärbung entspricht einer positiven Protein-Antikörper-Reaktion.

In den Chondrozyten von STR/Ort-Mäusen konnte SP-D in 3 von 4 Proben nachgewiesen werden (Abb. 3.3-7d). Die positiven Knorpelzellen befinden sich in der oberflächennahen Schicht des Tibiaplateaus. In Bild (d) ist aufgrund des Arthrosegrades IV kein Knorpel mehr an den Gelenkflächen zu erkennen. Nur im Randbereich waren noch Knorpelfragmente mit SP-D nachweisbar (nicht gezeigt).

### 3.3.5 Quantifizierung der Surfactant Proteine in Knorpelpräparaten mittels ELISA

In diesem Experiment wurden 15 Knorpelpräparate von Patienten im Alter zwischen 3 und 90 Jahren untersucht. Es sollte geprüft werden, ob Chondrozyten unter einem degenerativen Prozess wie der Arthrose die Expression der Surfactant Proteine regulieren. Durch histologische Untersuchungen wurden jedem Präparat ein Arthrosegrad zugeordnet und entsprechende Gruppen (Grad 0, Grad I, Grad II, Grad III) gebildet. Die Durchführung erfolgte wie im Methodenteil (Kapitel 2.3.3) beschrieben. Die Ergebnisse sind graphisch in der Abbildung 3.3-8 zusammengestellt. Im Diagramm sind die Arthrosegrad-Gruppen und die Mittelwerte

der bestimmten Proteinkonzentrationen gegeneinander aufgetragen. Alle ermittelten Werte sind in der Tabelle 3.3-1 zusammengefasst.



**Abb. 3.3-8: Quantitativer Nachweis von Surfactant Protein A, B, C und D in Knorpel mittels ELISA**

Analyse von Knorpelproben, die in die Arthrosegrade 0, I, II und III (x-Achse) eingeteilt wurden. Die Proteinkonzentration ist in ng/mg (y-Achse) pro Proteingesamtkonzentration angegeben. Als Konzentration wird der Mittelwerte mit dazugehöriger Standardabweichung (T) angegeben.

Die Proteinkonzentrationen der Surfactant Proteine A, B, C und D sind in den Arthrosegraden 0 bis II nahezu vergleichbar. Die einzelnen Werte variieren kaum innerhalb der einzelnen Gruppen und zeigen auch keine signifikante Veränderung. Vergleicht man die Mittelwerte untereinander, wird SP-B insgesamt etwas niedriger exprimiert. Die Konzentration von SP-B und SP-C verändert sich auch im Arthrosegrad III nicht. Im Gegensatz dazu werden SP-A und SP-D in der Gruppe des Arthrosegrades III höher exprimiert (vgl. Tab. 3.3-1). Aufgrund der geringen Probenzahl sind die ermittelten Werte allerdings nicht signifikant und geben nur einen Hinweis auf mögliche Zusammenhänge zur Arthrose an.

## Ergebnisse

**Tab. 3.3-1: Proteinkonzentration in ng/mg bezogen auf die Gesamtkonzentration**

	<b>Proteinkonzentration</b>			
	Mittelwert [ng pro mg Gesamtprotein]			
	<b>SP-A</b>	<b>SP-B</b>	<b>SP-C</b>	<b>SP-D</b>
Arthrosegrad 0	28,15	22,50	31,62	14,27
Arthrosegrad I	42,75	18,55	35,72	44,44
Arthrosegrad II	39,93	19,10	35,24	19,47
Arthrosegrad III	128,33	25,10	30,54	120,83

## **4. Diskussion**

### **4.1 Die Surfactant Proteine G und H**

Zhang Z. et al (2004) und Heilig et al. (2003) haben im Rahmen verschiedener Genomprojekte Analysen der chromosomalen DNA durchgeführt (Heilig et al., 2003; Zhang and Henzel, 2004). Dabei gelang es ihnen, auf den Chromosomen 6 und 14 die Existenz von zwei bis dahin nicht bekannten Proteinen bioinformatisch nachzuweisen. Mit Hilfe der zur Verfügung stehenden Daten beim ExpASY Bioinformatics Resource Portal wurden die Produkte dieser Gene den Surfactant Proteinen zugeordnet. Sie sind als SP-G (Surfactant assoziiertes Protein 2 (SFTA 2)) und SP-H (Surfactant assoziiertes Protein 3 (SFTA 3)) bezeichnet worden. Diese putativen Surfactant Proteine besitzen keine sequenziellen Ähnlichkeiten zu den bisher bekannten Surfactant Proteinen. Sie weisen jedoch physikochemische Eigenschaften auf, die bei den Surfactant Proteinen A, B, C und D eine wichtige Rolle spielen (F. Rausch, Dissertation 2012).

Die hier durchgeführten Arbeiten zu SP-G und SP-H hatten das Ziel, die Proteine in verschiedenen Geweben (z.B. Auge und Lunge) zu detektieren und zu charakterisieren. Dazu wurden molekularbiologische und bioinformatische Analysen durchgeführt.

#### **4.1.1 Surfactant Protein G (SFTA 2)**

Anhand der bekannten DNA- bzw. Aminosäure-Sequenz wurden durch Molekular-Modelling 3D-Strukturmodelle des Surfactant-assoziierten Proteins erstellt. Aus diesen Modellen kann abgeleitet werden, dass das Protein SP-G hydrophob und posttranslational modifiziert ist (F. Rausch, Dissertation 2012). Diese gewonnenen Informationen über die möglichen physikochemischen Eigenschaften von SP-G ähneln den bekannten Eigenschaften von SP-B und SP-C, die in Veröffentlichungen von Yu SH et al. (1987) und Whitsett et al. (1986a) als klein und hydrophob beschrieben werden (Whitsett et al., 1986b; Yu et al., 1987).

Im Rahmen vorliegender Untersuchungen zu SP-G wurden spezifische Oligonukleotide (Primer) generiert, mit deren Hilfe in verschiedenen Geweben die Existenz des Gens auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden konnte. Die PCR-Ergebnisse zeigen, dass SP-G in den Geweben des okulären Systems sowie in der Lunge, in der Niere und in der Leber genetisch determiniert ist. Auch die Surfactant

Proteine SP-A, -B, -C, -D konnten in diesen Geweben mehrfach nachgewiesen werden (Stahlman et al., 2002; Kankavi, 2003; Bräuer et al., 2007b; Kim et al., 2007a). Für den Nachweis von SP-G auf Proteinebene war zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit kein kommerzieller Antikörper verfügbar. Deshalb wurde ein Peptid-Antikörper entwickelt, der es mittels immunhistochemischer Methoden erlaubte, die zelluläre Lokalisation des Proteins nachzuweisen. Der Antikörper basiert auf einem 18 Aminosäuren langen Peptid, das nach Analyse eines angefertigten dreidimensionalen Proteinstrukturmodells der AG Proteinmodellierung von PD Dr. W. Brandt (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Saale)) vorgeschlagen wurde. Mit Hilfe der Proteinmodellierung wurde ein 3D-Strukturmodell (mit nativ naher Faltung) für SP-G erstellt, anhand dessen mögliche Protein(Antigen)-Antikörper-Erkennungsregionen auf der Oberfläche des Proteins identifiziert werden konnten. Der Sequenzabschnitt mit den meistversprechenden Interaktionsmöglichkeiten wurde anschließend für die Antikörperherstellung ausgewählt. Zur Prüfung des Antikörpers wurde auf humanes Lungengewebe zurückgegriffen, da dies hinsichtlich der Surfactant Proteine bereits umfänglich untersucht ist, an diesem die Erstbeschreibung und funktionelle Charakterisierung der Proteine SP-A, -B, -C und -D erfolgte (King et al., 1973; Notter et al., 1987; Van Iwaarden et al., 1990; Yu and Possmayer, 1990; Crouch and Wright, 2001) und das Gewebe auf mRNA-Ebene positiv reagierte. Wie im Abschnitt 3.1.1.2 dargestellt, ergab die Western-Blot-Analyse spezifische Banden bei ca. 11 kDa, 20 kDa und 30 kDa. Dies entspricht nicht der mit spezieller Analysesoftware (Translate, ExPASy Proteomics tools) berechneten Proteingröße von 9 kDa. Diese Abweichung lässt sich damit erklären, dass in die Berechnung nur die reine Aminosäuresequenz einging und mögliche posttranslationale Modifizierungen, wie sie im nativen Gewebe vorkommen können, unberücksichtigt blieben. Durch sequenzbasierte Vorhersagemethoden wurden Glykosylierung, Phosphorylierung und Palmitoylierung als mögliche posttranslationale Modifikationen vorgeschlagen. Somit wäre theoretisch ein ca. 11 kDa schweres Protein möglich (F. Rausch, Dissertation 2012). Aus der Literatur ist bekannt, dass die Surfactant Proteine B und C erst durch Modifizierung ihre oberflächenaktiven Eigenschaften ausbilden (Gustafsson et al., 2000). Die „kleinen“, hydrophoben Surfactant Proteine SP-B und SP-C unterliegen einer posttranslationalen Modifizierung und bilden über Disulfidbrücken Oligomere unterschiedlicher Größen aus (Whitsett et al., 1986b; Glasser et al., 1988; Voorhout



et al., 1992; Beck et al., 2000). Die Größen variieren dabei für SP-B von 8 kDa in der Lunge über 25 kDa in den Clara-Zellen (sekretorische Zellen der Lunge) bis hin zu 35 kDa im okulären System (Bräuer et al., 2007a). Bei SP-C variieren die Größen ebenfalls von 26 kDa (Vorbrotter et al., 1995) über 21 kDa (Bräuer et al., 2007a) bis hin zu 16 kDa und 7 kDa (Ten Brinke et al., 2002). Da es sich bei SP-G (SFTA 2) ebenfalls um ein kleines hydrophobes Protein zu handeln scheint (F. Rausch, Dissertation 2012), könnten die detektierten Proteinbanden gewebespezifischen Modifikationen entsprechen. Die Proteingrößen könnten sich dabei durch posttranslationale Veränderungen oder durch Oligomersierung ergeben. Es wurde unter reduzierenden Bedingungen (Mercaptoethanol, DTT) gearbeitet, damit kann von einer Spaltung der Disulfid-Brücken ausgegangen werden. Um unspezifische Antikörper-Reaktionen (Kreuzreaktionen) auszuschließen, wurde der Antikörper mit dem SP-G-Peptid präinkubiert und so die Antikörperbindungsstellen blockiert. Der sich anschließende Western-Blot zeigte keine entsprechenden Proteinbanden mehr, weshalb für den SP-G-Antikörper Kreuzreaktionen weitgehend ausgeschlossen werden können.

Es ist davon auszugehen, dass sich aus der zellulären Lokalisation eines Proteins eventuell funktionelle und strukturelle Eigenschaften ableiten lassen. So kann eine membranassoziierte Lokalisation für oberflächenregulatorische Aufgaben und hydrophile Eigenschaften stehen und eine Kernlokalisierung für eine eventuelle Involvierung bei zellinternen Protein-Kaskaden sprechen. Demzufolge wurden mittels immunhistochemischer Methoden verschiedene Gewebe untersucht, die auf mRNA-Ebene bereits positiv auf SP-G getestet wurden. In der Lunge konnte SP-G als oberflächliche Schicht auf dem Epithel der Bronchioli detektiert werden.

In der Zielstellung sollte SP-G auch im Lungenepithel nachgewiesen werden. Der Name Surfactant bedeutet „*surface active agent*“ und charakterisiert eine oberflächenaktive Substanz, die erstmals in der Lunge beschrieben wurde. Obwohl anzunehmen war, dass SP-G oberflächenregulatorische Eigenschaften besitzt, konnte es im Lungenepithel selbst nicht nachgewiesen werden.

Bernhard et al. (1997) und Khor et al. (1994) haben gezeigt, dass SP-B und SP-C nur in geringen Mengen im Sekret der oberen Atemwege vorhanden sind (Khor et al., 1994; Bernhard et al., 1997). Dies legt den Schluss nahe, dass analoge Proteine vorhanden sein müssen, die an der Regulierung der Oberflächenspannung beteiligt sind. Eines dieser Proteine wurde bereits als sogenanntes PLUNC Protein (Palate-

Lung-Nasal-Clone) identifiziert (Weston et al., 1999). PLUNC ist ein sekretorisches Produkt des Bronchialepithels der Lunge (LeClair et al., 2001). Es kann aufgrund seiner ausgeprägten Hydrophobizität zur Familie der Surfactant Proteine gezählt werden (Bartlett et al., 2011). Da auch SP-G durch eine Palmitoylierung hydrophobe Eigenschaften besitzt, lässt sich vermuten, dass SP-G im Bronchialsekret eine ähnliche Funktion wie PLUNC innehat.

Dagegen kann nicht ausgeschlossen werden, dass SP-G eine gänzlich andere Funktion besitzt. Das sogenannte SP-J wurde wie SP-G hypothetisch den Surfactant Proteinen zugeordnet. Aufgrund umfangreicher Analysen stellte sich heraus, dass SP-J ein Zell-Zell-Kontakt-Protein (Claudin 18) ist (Niimi et al., 2001). Das Claudin 18 konnte spezifisch im Bronchialepithel detektiert werden, welches bei den durchgeführten Untersuchungen jedoch nicht positiv auf den Nachweis von SP-G reagiert hat. Somit kann SP-G als ein Zell-Zell-Kontakt-Protein vorerst nicht bestätigt werden.

In den Geweben des okulären Systems wurde SP-G im Plattenepithel, in der Konjunktiva, in den Meibomdrüsen, in den akzessorischen Tränendrüsen und in Talgdrüsen nachgewiesen. Besonders der Nachweis in den lipidhaltigen Talgdrüsen untermauert die Hinweise auf eine Palmitoylierung des Proteins und die damit entstehenden hydrophoben Eigenschaften von SP-G. Durch die Palmitoylierung ist SP-G dazu in der Lage mit Lipiden zu interagieren, was wiederum eine Voraussetzung für die Interaktion mit der Zellmembran darstellt sowie für den Transport und die Lokalisation des Proteins (Bijlmakers and Marsh, 2003). Der Prozess der Palmitoylierung ist auch für weitere funktionelle Proteine, wie z.B. für Cytochrom CYP2B von Bedeutung (Friedberg T, 1992).

Der Nachweis von SP-G in den Meibomdrüsen spricht ebenfalls für hydrophobe Eigenschaften. Im Gegensatz dazu steht der Nachweis in der Tränendrüse für einen hydrophilen Charakter. Da SP-G theoretisch palmitoyliert werden könnte, können sich sowohl hydrophobe als auch hydrophile Eigenschaften ausbilden (amphiphil). Beide Gewebe gelten als Hauptbildner des Tränenfilms, deshalb kann vermutet werden, dass SP-G wie SP-B und SP-C als amphiphiles Protein mit der Lipidschicht des Tränenfilms interagieren kann. In Computersimulationen konnte beobachtet werden, dass das SP-G in der Lage ist, eine transmembranhelix ähnliche Domäne auszubilden, die Interaktionen mit einer Lipidschicht eingeht (F. Rausch, Dissertation 2012). Somit kann angenommen werden, dass SP-G ähnlich wie SP-C in der

Flüssigkeits-Lipidgrenze des Tränenfilms verankert sein könnte, da auch SP-C eine Transmembranhelix aufweist.

Weiterhin konnte SP-G wie auch SP-C in Talgdrüsen detektiert werden (Mo et al., 2007). In der Tränendrüse wurde SP-G hauptsächlich im Ausführungsgangsystem nachgewiesen, so dass hier angenommen werden kann, dass SP-G den Tränenfluss fördert. Bei der Untersuchung von Tränenflüssigkeit konnte entgegen der Vermutung das Vorhandensein von SP-G nicht bestätigt werden, wobei aber nicht vollständig auszuschließen ist, dass die Konzentration von SP-G möglicherweise unter der methodischen Nachweisgrenze liegt.

In der vorliegenden Arbeit konnte SP-G darüber hinaus im Parenchym der Niere und im Keimepithel des Hodens nachgewiesen werden. Die zelluläre Lokalisierung von SP-G im Nierengewebe war nicht genau möglich, jedoch wurde objektiv eine höhere Konzentration von SP-G im Tubulusepithel beobachtet.

Dass SP-G aufgrund seiner Größe und seiner hydrophoben Eigenschaften auch in der Niere rheologische Aufgaben übernimmt, kann nur vermutet werden. Bislang wurden lediglich die immunregulatorischen Surfactant Proteine A und D in der Niere nachgewiesen (Kankavi, 2003), so dass SP-G als ein neues Surfactant Protein die rheologischen Aufgaben übernehmen könnte.

In Präparaten von humanem Hoden konnten innerhalb dieser Arbeit neben SP-G (siehe Abb. 3.1-3e) auch SP-A, -B, -C und -D detektiert werden. Ihre Bedeutung im Hoden ist bislang ungeklärt, grundsätzlich sind aber die bekannten rheologischen und oder immunologischen Funktionen der bekannten Surfactant Proteine zu erwarten. Besonders intensive Antikörperreaktivität gegen SP-G war an den Spermatozyten zu erkennen. Das legt die Annahme nahe, dass SP-G eine Rolle in der Spermatogenese spielt und eventuell die spätere Freisetzung bzw. die Ausschleusung der Spermatozoen vereinfacht und somit rheologische Aufgaben wahrnimmt. Um Kreuzreaktionen seitens des Antikörpers auszuschließen, ist der Antikörper mit dem SP-G-Peptid zuvor inkubiert worden. Die im Anschluss durchgeführte immunhistochemische Färbung zeigte keine positive Antikörper-Reaktion mehr für SP-G.

Zur rekombinanten Expression von Surfactant Protein G wurden zwei verschiedene Expressionssysteme ausgewählt und getestet (vgl. Abb. 3.1-4). Die ersten Vorarbeiten für die rekombinante Expression in *E. coli* ergaben dabei eine gute, sichtbar gesteigerte Proteinausbeute nach 20 Stunden. In der Western-Blot Analyse

mit dem entwickelten SP-G-Antikörper konnte eine Proteinbande bei ca. 11 kDa identifiziert werden (Daten nicht gezeigt), weshalb auch eine gewisse Antikörperspezifität für das SP-G Protein angenommen werden kann.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass das von Zhang (2004) theoretisch nachgewiesene Surfactant assoziierte Protein 2 (SP-G) in verschiedenen Geweben (Lunge, Lid, Niere, Hoden) auf mRNA- und Proteinebene nachweisbar ist (Zhang and Henzel, 2004). Aufgrund der physikochemischen Ähnlichkeit zu den kleinen Surfactant Proteinen B und C kann man oberflächenregulatorische Eigenschaften annehmen. Immunregulatorische Eigenschaften scheiden vorerst aus, da sequenziell keine vergleichbaren Proteindomänen wie bei den bekannten immunregulatorischen Proteinen existieren.

### **4.1.2 Surfactant Protein H (SFTA3)**

Wie SP-G ist auch die Struktur und Funktion des Surfactant assoziierten Proteins SP-H weitgehend unbekannt. Seine DNA-Sequenz wurde durch Genomanalyse identifiziert und der Familie der Surfactant Proteine zugeordnet (Heilig et al., 2003). Zur weiteren Aufklärung der Struktur und Funktion des Surfactant Proteins H wurden für diese Arbeit analog der in 4.1.1 aufgeführten computerchemischen Methoden (Molekular-Modelling) 3D-Strukturmodelle des Proteins erstellt, aus denen abgeleitet werden konnte, dass es sich um ein kleines hydrophiles Protein handelt, welches posttranslational durch Palmitoylierungen modifiziert werden kann und keine Transmembranhelix besitzt (F. Rausch, Dissertation 2012). Damit weist SP-H, von der Modifizierung abgesehen, keine Gemeinsamkeit zu den Surfactant Proteinen SP-B und SP-C auf. Vielmehr könnte SP-H aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften als Bindeglied zwischen der wässrigen und der lipidhaltigen Phase z.B. im Tränenfilm dienen oder auch regulatorisch über Interaktion mit anderen Proteinen wirken. Ähnliche Interaktionen sind von SP-A mit SP-B bekannt, indem SP-A die von SP-B induzierte Insertion von Lipiden in den Oberflächenfilm mitreguliert (Kobayashi et al., 1991). Da SP-H theoretisch palmitoyliert werden könnte, können sich auch hydrophobe Eigenschaften ausbilden (amphiphil). Dadurch würde SP-H zwar nicht wie SP-C direkt mit der Lipidschicht über eine Transmembranhelix interagieren, wäre aber in der Lage, sich über eine membranassoziierte Helix (F. Rausch, Dissertation 2012) an die Lipidschicht anzulagern, wie es bei SP-B der Fall ist.

Für Untersuchungen zum Nachweis des SP-H-Gens auf mRNA-Ebene wurden spezifische Oligonukleotide (Primer) generiert. Die daraus resultierenden PCR-Ergebnisse zeigen, dass SP-H spezifische mRNA in den Geweben des okulären Systems vorkommt. Der Nachweis gelang gleichfalls im Gewebe der Lunge, der Niere und der Leber, wo auch die Surfactant Proteine A, B, C und D bestimmt worden (Stahlman et al., 2002; Kankavi, 2003; Bräuer et al., 2007b; Kim et al., 2007b). Im Weiteren wurde überprüft, ob SP-H in den Geweben auch exprimiert wird und wo im Gewebe das Protein lokalisiert ist. Die Entwicklung eines Peptid-Antikörpers zur immunhistochemischen Detektion erfolgte analog zu SP-G. Zur Überprüfung der Funktionalität des Antikörpers wurde humanes Lungengewebe verwendet. Die Western-Blot-Analyse ergab zwei deutliche Banden bei ca. 13 kDa und 26 kDa, was nicht der mit der Analysesoftware (Translate, ExPASy Proteomics tools) berechneten Proteingröße von 10 kDa entspricht. Die Abweichung ist, wie schon bei SP-G vermutet, auf eine posttranslationale Modifizierung zurückzuführen, wie sie unter natürlichen Bedingungen vorkommt. Aus dem 3D-Struktur-Modell ist bereits bekannt, dass das Protein durch Glykosylierung, Phosphorylierung und Palmitoylierung modifizierbar ist (F. Rausch, Dissertation 2012).

Die im Western-Blot bei 13 kDa detektierte Bande lässt möglicherweise auf eine posttranslationale Modifizierung schließen, während die Proteinbande bei ca. 26 kDa für eine Oligomersierung über Disulfid-Brücken spricht. Entsprechend sequenzbasierter Vorhersagemethoden für Modifikationen könnte ein ca. 13 kDa großes Protein existieren (F. Rausch, Dissertation 2012). Da Disulfid-Brücken normalerweise unter reduzierenden Bedingungen (Mercaptoethanol, DTT) bei einer SDS-PAGE gespalten werden und die Proteine anschließend als Monomer vorliegen, wurde vermutet, dass es sich bei der 26 kDa Bande um unspezifische Kreuzreaktionen des Antikörpers handelt. Um dies zu überprüfen, wurde der Antikörper zuvor mit dem SP-H-Peptid, welches für die Antikörpersynthese eingesetzt wurde, präinkubiert und blockiert. Im anschließenden Western-Blot konnte keine entsprechende Bande detektiert werden, d.h. eine Kreuzreaktion des Antikörpers ist weitestgehend ausgeschlossen werden.

Diese möglichen strukturellen Veränderungen/Anpassungen sind ein Hinweis auf eine etwaige Zugehörigkeit zu den bekannten Surfactant Proteinen, da sowohl das hydrophile SP-A als auch die kleinen hydrophoben Surfactant Proteine solchen Modifizierungen unterliegen (Whitsett et al., 1986b; Glasser et al., 1988; Voorhout et

al., 1992; Beck et al., 2000). Erst hierdurch können diese Proteine ihre regulatorischen Eigenschaften ausbilden (Gustafsson et al., 2000).

Die zelluläre Lokalisation von SP-H wurde mit immunhistochemischen Methoden an Geweben untersucht, die zuvor durch PCR positiv auf SP-H getestet wurden. SP-H konnte in der Lunge im Zytoplasma des Alveolar- und Bronchialepithels sowie in Alveolarmakrophagen und im Epithel der Bronchioli nachgewiesen werden. Die zelluläre Verteilung ist mit den oberflächenregulatorischen Surfactant Proteinen B und C sowie mit den immunregulatorischen Surfactant Proteinen A und D vergleichbar. Die bekannten Surfactant Proteine sind im Zytosol der Epithelzellen eventuell als granuläre Strukturen lokalisiert (Whitsett et al., 2010; Bräuer et al., 2012).

Wie bei SP-G konnte für das SP-H keine Sekretschicht in den Bronchioli festgestellt werden. Damit kann angenommen werden, dass SP-H aufgrund physikochemischer Eigenschaften cytoplasmatisch verbleibt oder sekretorisch noch nicht abgegeben wurde und erst modifiziert werden muss. Wie bereits erwähnt, könnte SP-H theoretisch palmitoyliert werden und dementsprechend wäre es auch in der Lage, mit der Membran zu interagieren.

Die Palmitoylierung von SP-C beeinflusst insbesondere die physikochemischen Eigenschaften des Surfactant, wie beispielsweise die mechanische Stabilität und die Ausbreitung des Surfactantfilms (Gustafsson et al., 2000). Ob SP-H auf dieser Basis ebenfalls oberflächenstabilisierend wirken kann, bedarf noch weiterer funktioneller Untersuchungen.

In Geweben des okulären Systems konnte SP-H im Plattenepithel, in der Konjunktiva, in den Meibomdrüsen, in den akzessorischen Tränendrüsen und in Kornea nachgewiesen werden. Besonders der Nachweis von SP-H in den Basalzellen der Kornea ist interessant, da die Basalzellen des Korneaepithels vor allem somatische (adulte) Stammzellen sind, die ein lebenslang den Zellnachschub gewährleisten.

Dass dem SP-H Protein bei der Ablösung und Wanderung von Tochterzellen in die darüberliegende Schicht ausdifferenzierter Zellen eine Bedeutung zukommt, kann nur vermutet werden. Bei der Wanderung von Zellen spielen rheologische Eigenschaften eine besondere Rolle.

Dass SP-H ggf. eine andere Funktion besitzt, kann nicht ausgeschlossen werden.

Wie bereits bei SP-G im Zusammenhang mit dem Bronchialsekret diskutiert, wurde auch in der Kornea das vermeintliche Surfactant Protein SP-J gefunden, welches sich als Zell-Zell-Kontakt-Protein (Claudin 18) herausstellte (Gustafsson et al., 2000; Niimi et al., 2001; Yoshida et al., 2009). Dieses Kontakt-Protein wurde ebenfalls in anderen Geweben, wie z.B. in der Nasenschleimhaut und in der Lunge, detektiert (Merikallio et al., 2011; Rogers et al., 2011). Ob eventuell SP-H selbst ein Zell-Zell-Kontakt-Protein ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Vorerst kann diese Vermutung zumindest für die Broncholi ausgeschlossen werden, da SP-H im Zytoplasma der Bronchioli lokalisiert ist und nicht membranspezifisch verankert zu sein scheint (Abb. 3.1-7a).

SP-H ist sowohl im epidermalen Epithel als auch im konjunktivalen Epithel des Augenlides nachweisbar. Diese Lokalisation wurde gleichfalls für die bereits bekannten Surfactant Proteine beschrieben (Bräuer et al., 2007a; Bräuer et al., 2007b; Schicht et al., 2010). Der Nachweis in Meibomdrüsen und in der Molldrüse ist ein Indiz dafür, dass SP-H als Peptid des okulären Systems an der Bildung der Lipidschicht des Tränenfilms beteiligt sein könnte. Hier wäre die bereits erwähnte mögliche amphiphile Eigenschaft von Bedeutung und SP-H könnte als Bindeglied zwischen der wässrigen und der Lipidkomponente des Tränenfilms fungieren. Somit würde eine mögliche Glycosylierung von SP-H einen großen Einfluss z.B. auf die Löslichkeit des Proteins im Wasser haben.

Weiterhin konnte SP-H im Epithel der Ausführungsgänge der Tränendrüse und der Glandula parotidea (Parotis/Ohrrspeicheldrüse) detektiert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass SP-H durch Veränderung der Oberflächenspannung beim Abtransport von Sekreten eine wichtige Rolle spielt. Dass Surfactant Proteine bei der Erhaltung der Fließ- und Verformungsfähigkeit eine besondere Aufgabe übernehmen, wurde in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben. So üben die oberflächenregulatorischen Proteine SP-B und -C rheologische Effekte im Epithel der Tuba auditiva (Paananen et al., 2001), im Nasensekret (Schicht et al., 2012), in den Kopfspeicheldrüsen (Bräuer et al., 2009), bei der Hypersekretion (Seong et al., 2002) und beim Abtransport von Bronchialschleim (Veldhuizen et al., 2011) aus.

Mit den Untersuchungen zu dieser Arbeit gelang der Nachweis von SP-H im Parenchym der Niere und des Hodens. SP-H ist sowohl in den proximalen als auch in den distalen Abschnitten der Nierentubuli vorhanden, jedoch nicht in allen Tubuli des histologischen Präparates. Durch die Verwendung von Alkoholen während der

Färbung werden Sekretbestandteile herausgewaschen und sind damit nicht mehr nachweisbar im histologischen Präparat. Dies wäre eine Erklärung für die inhomogene Verteilung von SP-H im Gewebe. Alles in allem scheint das Surfactant Protein H vermehrt im Epithel der Ausführungsgänge vorhanden zu sein. Hierbei ist vorstellbar, dass die beschriebenen rheologischen Eigenschaften im Tubulussystem der Niere eine Rolle spielen und so der Abfluss des Endharns beeinflusst wird. Bis heute sind nur die immunregulatorischen Surfactant Proteine A und D in der Niere detektiert worden (Kankavi and Roberts, 2004), und SP-H könnte die rheologischen Aufgaben übernehmen. Neben den Proteinen SP-A, -B, -C und -D (Schicht M., nicht publiziert) konnte im Hoden SP-H speziell in den Tubuli seminiferi, im Bereich der Keimzellen und um die Spermatogonien nachgewiesen werden. Spermatogonien sind differenzierte Keimzellen, die je nach Reifung im Keimepithel aufsteigen. Die zelluläre Lokalisation ist mit der in der Kornea vergleichbar, wo das Surfactant Protein H nur in den Basalzellen, den Stammzellen der Kornea, detektiert werden konnte. Somit ist anzunehmen, dass SP-H auch im Keimepithel den Prozess der Zellwanderung beeinflusst.

Inwieweit immunregulatorische Eigenschaften mit SP-H verbunden sind, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht beantwortet werden. Eine entsprechende Strukturdomäne wie bei SP-A oder SP-B konnte im 3D-Modell nicht identifiziert werden. Immunhistochemisch reagierten in der Leber nur vereinzelte Zellen positiv auf den SP-H Nachweis. Die Frage, ob es sich dabei um Hepatozyten, Ito-Zellen oder Fibrozyten handelt, wäre noch zu klären. Bei genauer mikroskopischer Betrachtung könnten auch einzelne Makrophagen angefärbt sein und infolgedessen kann angenommen werden, dass im Rahmen der angeborenen Immunabwehr SP-H mit den Makrophagen interagiert und so immunregulatorische Prozesse auslöst. Eine ähnliche Funktion wird auch SP-A und SP-B zugesprochen (Ohmer-Schrock et al., 1993; Yang et al., 2010). Um Kreuzreaktionen seitens des Antikörpers auszuschließen, ist zuvor der Antikörper mit dem SP-H-Peptid inkubiert worden. Die im Anschluss durchgeführte immunhistochemische Färbung zeigte keine positive Antikörper-Reaktion mehr für SP-H.

Zur Herstellung von gereinigtem und nativem Surfactant Protein H wurden zwei verschiedene Expressionssysteme ausgewählt und getestet (vgl. Abb. 3.1-8). Die ersten Vorarbeiten für die rekombinante Expression in *E. coli* ergaben eine gute Proteinausbeute nach 20 Stunden. Im Western-Blot konnte eine distinkte Bande für



SP-H bei ca. 13 kDa identifiziert werden (nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das von Heilig (2003) theoretisch nachgewiesene Surfactant assoziierte Protein 3 (SP-H) in verschiedenen Geweben (Lunge, Lid, Niere, Hoden) auf mRNA- und Proteinebene nachweisbar ist (Heilig et al., 2003). Bezüglich der Funktion von SP-H im humanen Organismus kann nur spekuliert werden. Es ist anzunehmen, dass SP-H primär oberflächenregulatorische Eigenschaften besitzt, wie für SP-B und -C in der Lunge, im Nasenepithel oder im Zahnfleisch beschrieben (Yu and Possmayer, 1990; Bräuer et al., 2012; Schicht et al., 2012). Immunregulatorische Eigenschaften sind gewebespezifisch nicht unwahrscheinlich.

### 4.2 Bakterielle Surfactant Proteine

Den Surfactant Proteinen werden, wie bereits in der Einleitung erwähnt, immunologische und rheologische Funktionen zugeschrieben. Vor allem die Surfactant Proteine SP-A und SP-D sind an der unspezifischen Immunabwehr beteiligt (Pandit et al., 2012). SP-A und SP-D sind in der Lage sowohl gramnegative als auch grampositive Bakterien zu binden und zu neutralisieren, indem sie als sogenannte Opsonine einen Teil der Immunantwort darstellen. Diese Proteine führen zu einer bakteriellen Aggregation und ermöglichen damit die Phagozytose (Mason et al., 1998; Orgeig et al., 2010). Sowohl SP-A als auch SP-D binden, durch Kalzium vermittelt, an Lipopolysaccharide (LPS) der Bakterien (Van Iwaarden et al., 1994). SP-D reagiert mit dem Oligosaccharid des LPS, während SP-A mit dem Protein A interagiert (Alcorn and Wright, 2004). Auch für das kleinere Surfactant Protein B konnte eine Wirkung gegenüber pathogenen Mikroorganismen, speziell *Pseudomonas aeruginosa*, gezeigt werden (Yang et al., 2010). Aufgrund einer Vielzahl von Veröffentlichungen zur immunologischen Bedeutung der Surfactant Proteine kann diese eigentlich als gesichert angesehen werden (Glasser and Mallampalli, 2012). Im Rahmen von Zellkulturexperimenten wurden in unserer Arbeitsgruppe SP-spezifische Antikörper gegen die verwendeten Bakterienüberstände von *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* getestet und entgegen den Erwartungen spezifische Antikörper-Reaktionen festgestellt. In der Literatur sind bisher keine vergleichbaren Ergebnisse beschrieben worden und theoretisch ist die Existenz von Surfactant Proteinen auszuschließen, da

diese über potente antibakterielle Eigenschaften verfügen. Um sicherzustellen, dass keine unspezifischen Kreuzreaktionen für die Antikörper-Reaktion verantwortlich sind, wurden weitere molekularbiologische Untersuchungen an *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* durchgeführt. Die Analyse der bakteriellen genomischen DNA ergab spezifische Amplifikationsprodukte (Banden) für die jeweiligen Surfactant Proteine A, B, C und D. Dieses Ergebnis ist überaus unerwartet, da beim Sequenzabgleich der Primer keine Übereinstimmung mit dem Genom der Bakterien gefunden werden konnte. Um eine humane Kontamination auf Genomebene ausschließen zu können, wurde als Kontrolle das humanspezifische Gen  $\beta$ -Aktin verwendet (Negativkontrolle). Bezugnehmend auf die Tatsache, dass Bakterien RNA als Translationsreplikate nutzen, wurde auch ein RNA-Nachweis geführt. Die Ergebnisse für *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* zeigen hier ebenfalls spezifische PCR-Produkte für die bekannten humanen Surfactant Proteine. Mitgeführte Kontrollen bestätigen die gewonnenen Daten und schließen eine Kontamination aus. Die Sequenzierung der spezifischen Banden ergab zu 91 bis 100 Prozent eine Übereinstimmung mit der entsprechenden humanen Surfactant Protein-Gensequenz. Die Differenz ließe sich mit sequenziellen Varianten zum humanen Genom erklären, wie sie auch bei Schwein und Rind vorliegen (Leth-Larsen et al., 1999). Ein Sequenzabgleich mit den Genomen von *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* ergab jedoch keine Übereinstimmung.

Es stellte sich nun die Frage, warum trotz Ausschluss einer Kontamination SP-spezifische PCR-Produkte auf mRNA- und DNA-Ebenen zu finden sind, aber keine entsprechenden Sequenzen im Genom der Bakterien. Nach dem derzeitigen Wissensstand ist das Genom von *Staphylococcus aureus* und von *Pseudomonas aeruginosa* vollständig aufgeklärt. Unter Einsatz modernster Techniken sind jedoch in letzter Zeit bei anderen Mikroorganismen (z.B. *Helicobacter pylori*) eine Anzahl neuer RNAs gefunden worden (Sharma et al., 2010). So konnte erstmals eine regulatorische 6S-RNA in *Helicobacter pylori* nachgewiesen werden. Handford (2009) konnte bereits in *E. coli* bekannte humane Gene, wie z.B. *ygiD* (involviert in der Zellteilung), identifizieren (Handford et al., 2009). Dies legt den Schluss nahe, dass trotz vollständiger Entschlüsselung eines Genoms mit anderen weiterentwickelten Methoden und gezielten Suchmechanismen neue Gene, auch nicht bakterienspezifische, identifiziert werden können. Handford et al. (2009)

postulieren zudem eine ubiquitäre Rolle solcher nicht bakterienspezifischen Proteine (Handford et al., 2009). Dies könnte ebenfalls für die Surfactant Proteine zutreffen, die bereits in einer Vielzahl von humanen und tierischen Geweben detektiert werden konnten. (Stahlman et al., 2002; Kankavi, 2003; Bräuer et al., 2007b; Kim et al., 2007b).

Dass der Nachweis der Surfactant-Gene auf RNA-Ebene keine bakterienstammsspezifische Besonderheit ist, wurde durch die Verwendung von 3 verschiedenen *Staphylococcus*- und *Pseudomonas*-Laborstämmen gezeigt. Bei allen Laborstämmen handelt es sich allerdings um humane Isolate, so dass auch ein Gentransfer zwischen Wirt und Bakterium nicht ausgeschlossen werden kann. Normalerweise etablieren sich nur sehr selten Genabschnitte aus Säugern im Genom von Mikroorganismen, denn die Erreger besitzen zahlreiche Mechanismen, wie z.B. das CRISPR/Cas-System (Pul et al., 2010), um sich gegen fremde DNA zu schützen. Jedoch wurde erst kürzlich für *Neisseria gonorrhoeae* beschrieben, dass diese ein aktives humanes Gen (Line, L1) in ihr Genom integriert haben (Anderson and Seifert, 2011). Der Mechanismus der Integration konnte jedoch noch nicht geklärt werden. Die Autoren vermuten aufgrund seiner Lebensweise einen ständigen Zellkontakt und damit eine ständige Wechselwirkung mit den Nukleinsäuren des Wirtes. Sie gehen von einem effizienten System (horizontalen Gentransfer) zur Aufnahme von DNA bei pathogenen Mikroorganismen aus. Eine vergleichbare Aufnahme von Surfactant Protein-Genen oder -Genabschnitten könnte für *Staphylococcus aureus* sowie *Pseudomonas aeruginosa* als opportunistisch humanpathogene Mikroorganismen angenommen werden.

Die Vermutung, dass die SP-Gene auf einem unbekanntem Plasmid codiert sind, wurde durch die Verwendung von plasmidtragenden und -freien *E. coli*-Stämmen ausgeschlossen werden. Es kamen kommerziell erhältliche *E. coli*-Stämme zum Einsatz. Beim Vergleich (mit und ohne Plasmid) sind in beiden Proben spezifische PCR-Fragmente erhalten worden. Somit muss davon ausgegangen werden, dass die Surfactant Proteine auf Genomebene determiniert sind. Gleiches trifft für *Staphylococcus aureus* zu (nicht gezeigt).

Zur Bestätigung der molekularbiologischen Ergebnisse wurden proteinbiochemische Untersuchungen an *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* durchgeführt. Beim Western-Blot konnten mit den kommerziellen Anti-Surfactant-Antikörpern im Vergleich zur Positivkontrolle (humane Lunge) spezifische Banden

detektiert werden. Für SP-A (28, 36 und 66 kDa), für SP-B (18 und 40 kDa) und SP-C (12, 16 und 26 kDa) wurden mehrere Banden detektiert. Für SP-D konnte eindeutig die klassische Proteingröße von 43 kDa ermittelt werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass diese Surfactant Proteine Oligomere unterschiedlicher Größenordnung bilden (Whitsett et al., 1986a; Glasser et al., 1988; Voorhout et al., 1992; Beck et al., 2000). Die Größen variieren dabei in den verschiedenen Geweben. So sind für SP-B 8 kDa in der Lunge, 25 kDa in den Clara-Zellen (sekretorische Zellen der Lunge) und 35 kDa im okulären System beschrieben worden (Akinbi et al., 1999; Bräuer et al., 2007a). Bei SP-C variiert die Molekularmasse in verschiedenen Geweben von 26 kDa (Vorbroker et al., 1995) über 21 kDa (Bräuer et al., 2007a) bis hin zu 7 kDa und 16 kDa (Ten Brinke et al., 2002).

Dass bei der proteinbiochemischen Untersuchung der Bakterienkulturen mit den klassischen Anti-Surfactant-Antikörpern spezifische Banden detektiert werden konnten, ist überraschend und möglicherweise von besonders großer Tragweite. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass bei vielen Zellkulturexperimenten zur Untersuchung der Wirkung von Surfactant Proteinen Bakterienkulturen unterschiedlicher Spezies eingesetzt werden oder auch humanes Probenmaterial bakteriell besiedelt sein kann, wäre eine nochmalige Diskussion und Neubewertung der bisher veröffentlichten Ergebnisse einschließlich unserer eigenen Arbeiten zu überdenken. Es wäre weiterhin abzuklären, ob die bei bakteriell besiedeltem Gewebe nachgewiesene Erhöhung der Konzentration an Surfactant Protein (z.B. (Ni et al., 2005; Bräuer et al., 2007b; Woodworth et al., 2007; Yang et al., 2010; Lemos et al., 2011; Sever-Chroneos et al., 2011) auf die Anwesenheit von bakteriellem Surfactant der Bakterien *Staphylococcus aureus* und/oder *Pseudomonas aeruginosa* zurückzuführen ist. Die Ergebnisse könnten möglicherweise die Sicht auf die Surfactant Proteine verändern.

Welchen Nutzen die Bakterien von der Anwesenheit der Surfactant Proteine haben, kann momentan nur vermutet werden. Tatsache ist, dass sich Bakterien schnell an den Wirt anpassen können, um einer Abwehrreaktion zu entgehen. Die Fähigkeit zur Anpassung konnte bei fünf neu sequenzierten *Bartonella*-Spezies (Isolate aus verschiedenen Säugetieren) gezeigt werden (Engel et al., 2011). Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass die durch horizontalen Gentransfer erworbenen Sekretionssysteme eine Besetzung von verschiedenen Nischen ermöglichen. Dies

wäre eine mögliche Erklärung für das Vorhandensein der Surfactant Proteine in den Bakterien. Durch die Aufnahme und Integration ins Genom käme es zur Ausbildung eines Selektionsvorteils. So könnten die oberflächenregulatorischen Surfactant Proteine B und C die bakterielle Bewegung oder sogar das Eindringen in Epidermisschichten vereinfachen. In einem Übersichtsartikel beschreibt Harshey (2003) die verschiedenen Möglichkeiten der bakteriellen Fortbewegung (Harshey, 2003). Daraus wird ersichtlich, dass oft nur das Prinzip klar ist, aber die beteiligten Proteine unbekannt sind.

Die Erklärung für die Ausbildung der immunregulatorischen Surfactant Proteine A und D ist schwierig, zumal Versuche eindeutig gezeigt haben, dass SP-A und SP-D zur Agglutination und zur Opsonierung der Bakterien führen (Mason et al., 1998; Orgeig et al., 2010). Dagegen schützt die Geißel von *Pseudomonas aeruginosa* den Mikroorganismus vor der Wirkung des Surfactant Protein A und ermöglicht eine Zellmembran-Permeabilisierung (Zhang et al., 2007). Lemos hat 2011 nachgewiesen, dass SP-A und SP-D entbehrlich bei der Immunantwort in der Maus sind (Lemos et al., 2011). Damit spricht auch einiges dafür, dass die immunregulatorischen Eigenschaften umgangen werden können bzw. in der Immunantwort eine untergeordnete Rolle spielen. So könnte bei den untersuchten Mikroorganismen die Ausbildung SP-A- und SP-D- ähnlicher Proteine der „Tarnung“ dienen, um Opsonierungsprozesse oder eine Agglutination zu verhindern oder aber oberflächenregulatorische Prozesse zu verstärken.

Bei der immunhistochemischen und elektronmikroskopischen Analyse ist für *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt worden, dass die Bakterien die Proteine SP-A, -B, -C und -D auf der Oberfläche präsentieren. Die kommerziell verfügbaren Antikörper binden an die bakteriellen Surfactant Proteine und machen somit die Proteine mikroskopisch visualisierbar. Gerade für die oberflächenregulatorischen Eigenschaften ist die Präsentation nach außen wichtig, da die Proteine wie ein Anker zwischen der Phospholipidschicht und der wässrigen Phase vermitteln (Oosterlaken-Dijksterhuis et al., 1991). In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass SP-A durch Interaktion mit SP-B die oberflächenregulatorischen Eigenschaften von SP-B erhöht (Kobayashi et al., 1991). Folglich wäre eine „nicht-immunregulatorische“ Eigenschaft bei Mikroorganismen denkbar.

Ob die Proteine auch unter bestimmten Bedingungen, z.B. oxidativem Stress, reguliert werden können, wurde mittels ELISA-Analysen überprüft. Dazu wurden

Bakterienkulturen unter anaeroben und aeroben Bedingungen kultiviert. Sowohl *Staphylococcus aureus* als auch *Pseudomonas aeruginosa* bilden als fakultativ anaerobe Bakterien unter anaeroben Bedingungen signifikant höhere Konzentrationen an Surfactant Proteinen als unter aeroben Bedingungen. Dabei ist auffällig, dass bei beiden Mikroorganismenarten die Konzentration an SP-B um ein Vielfaches über der Konzentration von SP-A, -C und -D liegt und insgesamt *Pseudomonas aeruginosa* weniger Surfactant Proteine zu bilden scheint. Dieser Effekt ist vermutlich auf die Methodik der Untersuchung zurückzuführen, denn *Pseudomonas* besitzt eine dicke Alginathülle, die bei der Probenaufarbeitung verloren geht. Da die Surfactant Proteine an der Oberfläche der Mikroorganismen detektiert werden, würden somit auch diese abgelöst. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten Alginatreste nachgewiesen werden, die für das jeweilige Surfactant Protein positiv waren.

Im Folgenden soll die Frage diskutiert werden, weshalb die bakteriellen Surfactant Proteine reguliert werden. Es ist vorstellbar, dass die Bakterien diese Proteine benötigen, um Stresssituationen zu bewältigen. Dass Stressfaktoren Einfluss auf die Biofilmbildung von *Staphylococcus aureus* haben, wurde erst kürzlich in einer Studie gezeigt (Mirani et al., 2012). So könnte eine gesteigerte Konzentration von SP-A und SP-D die Zusammenlagerung der Bakterien fördern und somit die Koloniebildung und die Schaffung eines Mikroklimas erleichtern. Eine gesteigerte SP-B und SP-C Konzentration würde die Oberflächenspannung verringern können und damit die Mobilität der Bakterien steigern, um in einen Bereich zu gelangen, der bessere Lebensbedingungen gewährleistet. Auch ist denkbar, dass diese Proteine bei der Umstellung auf anaerobe Lebensbedingungen eine Rolle spielen. Dass die untersuchten Bakterien anaerob leben können, wird deutlich am Beispiel der Cystischen Fibrose (CF), eine der häufigsten schweren erblichen Stoffwechselerkrankung beim Menschen (Worlitzsch et al., 2002). Bei dieser Erkrankung kommt es zu einer übermäßigen Produktion von sehr zähem Schleim (Mucus), der wiederum einen idealen Nährboden für Bakterien darstellt. Der Grund für die Schleimbildung ist ein Gendefekt, der den Transport von Chlorid-Ionen über die Epithelzellen in der Lunge hemmt und somit die Ausbildung zähflüssigen Schleims fördert (Ratjen et al. 2003). Neben *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia* und *Haemophilus influenzae* ist vor allem *Pseudomonas aeruginosa* an der Pathogenese chronischer Lungeninfektionen beteiligt (Ratjen and Doring, 2003).

Durch den abnehmenden Sauerstoffgehalt im Schleim kommt es zur Ausbildung anaerober Verhältnisse (Worlitzsch et al., 2002). Bei *Pseudomonas aeruginosa* haben anaerobe Bedingungen eine vermehrte Bildung von Alginat und von Mikrokolonien zur Folge. Aufgrund der sich wandelnden Lebensbedingungen kommt es zu einer epigenetischen Regulation, was dann wiederum zu einem veränderten Phänotyp führt (Worlitzsch et al., 2002; Bragonzi et al., 2005). Durch das anaerobe Milieu werden spezifische Gene von *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* unterschiedlich reguliert. Solche Aktivierungen oder Hemmungen sind wahrscheinlich für die differenzielle Regulierung der Surfactant Protein-Gene verantwortlich, die zu einer messbaren Verschiebung der Proteinkonzentration führen. Verschiedene Veröffentlichungen beschäftigen sich mit der Bildung von Surfactant Protein A und D im Zusammenhang mit Cystischer Fibrose (Hull et al., 1997; Haczku et al., 2001). Hull et al. (1997) konnten durch ELISA-Untersuchungen zeigen, dass es zu einer etwa 50 %-igen Steigerung der Konzentration von SP-A im Sputum von CF-Patienten kommt (Hull et al., 1997). Unter Berücksichtigung der hier vorgestellten Ergebnisse muss in Betracht gezogen werden, dass eine Erhöhung der Konzentration von SP-A nicht nur auf eine gesteigerte Expression im Lungengewebe, sondern auch in Verbindung mit den latent, chronisch vorhandenen Mikroorganismen im Schleim von CF-Patienten steht. In den durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen an *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* wurde unter anaeroben Bedingungen ein deutlicher Anstieg der Surfactant Protein-Konzentration (von 50 % auf bis zu 300 %) nachgewiesen.

Mit den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die eingesetzten Bakterien Gene besitzen, die bis heute nicht bekannt waren. Eine Verunreinigung durch humane Fremd-DNA wurde durch Verwendung spezieller Bakterien-Laborstämme und zahlreicher Kontrollen ausgeschlossen. Die PCR/ELISA-Daten und die spezifischen Antikörper-Reaktionen lassen folgende Schlussfolgerungen zu: Sowohl *Pseudomonas aeruginosa* als auch *Staphylococcus aureus* besitzen Gene für Surfactant Proteine und transkribieren diese in Abhängigkeit von den Milieubedingungen.

Da sich die immunologischen und rheologischen Eigenschaften der humanen Surfactant Proteine nicht ohne weiteres auf die Bakterien übertragen lassen, sollte man diese Proteine als bakterielle „Surfactant-ähnliche Proteine“ bezeichnen. Der

Begriff beinhaltet zum einen die rheologische und immunologische Bedeutung und lässt zum anderen Raum für neue funktionelle Definitionen der Surfactant Proteine. Obwohl eine fast unüberschaubare Anzahl von Publikationen (mehr als 1000, Quelle NCBI) die immunologische Bedeutung von SP-A und SP-D belegt, sollten deren Erkenntnisse vor dem Hintergrund der hier dargestellten Ergebnisse einer erneuten kritischen Bewertung unterzogen werden. Die heute kommerziell erhältlichen Antikörper und die derzeit etablierten Primer für humane Surfactant Proteine detektieren bakterielle Proteine und Gene. Damit ist nicht auszuschließen, dass die in immunologischen Untersuchungen nachweisbare Erhöhung der Surfactant Protein-Konzentration in humanen Proben (z.B. der Lunge) möglicherweise auch auf die in den Proben vorhandenen Mikroorganismen wie *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* zurückzuführen ist. Gleichfalls konnte mit dem Nachweis Surfactant-ähnlicher Proteine auf RNA- und Proteinebene gezeigt werden, dass möglicherweise eine neue Gruppe bakterieller Proteine existiert, die sequenziell und strukturell in die allgemeinen Datenbanken für Bakterien integriert werden sollten.

#### **4.4 Surfactant Proteine im humanen Gelenkknorpel**

##### **4.4.1 Nachweis von Surfactant Protein A im Gelenkknorpel**

Es ist bekannt, dass SP-A bei der spezifischen und unspezifische Immunabwehr in Geweben des menschlichen Organismus eine Rolle spielt (Crouch and Wright, 2001). Abwehrzellen wie Alveolarmakrophagen und dendritische Zellen werden durch SP-A zur Differenzierung und Chemotaxis angeregt (Griese, 1999; Lee et al., 2005). Die Existenz von SP-A außerhalb des Knorpelgewebes wurde bereits von verschiedenen Autoren beschrieben. Dobbie (1994) konnte Surfactant Protein A in der Synovialmembran nachweisen (Dobbie, 1994). 2003 beschrieb Vandenabeele, dass in der Membrana synovialis fibroblasten-ähnliche Stammzellen existieren, die in der Lage sind, SP-A zu synthetisieren und es vermutlich über eigene Lamellarkörperchen bei Bedarf in die Synovia abzugeben (Vandenabeele et al., 2003). Somit wäre es denkbar, dass hier bereits SP-A durch Konvektion in den Knorpel transportiert wird und dort die Ausbildung der Gelenkflüssigkeit (Lubrikation) fördert. In diesem Zusammenhang wurde bei Pferden die Unterstützung der Adsorption der oberflächenaktiven Phospholipide an der Gelenkoberfläche durch SP-A nachgewiesen (Kankavi and Roberts, 2004). Dass jedoch die Chondrozyten selbst in der Lage sind, SP-A zu bilden, konnte in der vorliegenden Arbeit zum



ersten Mal belegt werden. Der Nachweis auf mRNA-Ebene wurde in zwei immortalisierten Knorpelzelllinien C28/I2, T/C 28a2 und in primären Chondrozyten erbracht (vgl. Abb. 3.3-1). Auf Proteinebene konnte SP-A mittels Western-Blot in allen humanen Knorpelproben eindeutig bestimmt werden (vgl. Abb. 3.3-2).

Der immunhistochemische Nachweis im hyalinen Gelenkknorpel war ebenfalls positiv (vgl. Abb. 3.3-6). Da Knorpelgewebe wie Kornea zu den bradytrophen Geweben gezählt wird, deckt sich dies mit den Ergebnissen von Bräuer et al. (2007), wo belegt werden konnte, dass Korneazellen Surfactant Protein A bilden können (Bräuer et al., 2007b).

Ob im Knorpel die Konzentration von SP-A mit der Ausbildung einer Arthrose korreliert, wurde mittels ELISA an humanen Knorpelproben mit unterschiedlichen Arthrosegraden untersucht (vgl. Abb. 3.3-8). Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Zunahme der SP-A Expression beim Arthrosegrad III. Während die Konzentration von SP-A bis zum Arthrosegrad II annähernd konstant bleibt (28 ng/mg bis 42 ng/mg Gesamtprotein) nimmt sie beim Arthrosegrad III exponentiell zu, obwohl das Knorpelgewebe nahezu abgebaut ist. Eine gesteigerte Konzentration von SP-A konnte bei einer rheumatischen Arthritis auch in der Synovia gezeigt werden (Kankavi, 2006). Es ist bekannt, dass SP-A die pro-inflammatorische Zytokinproduktion (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10) von Abwehrzellen steigert und somit eine Entzündung verstärkt bzw. den Entzündungsverlauf beeinflusst (Salez et al., 2001; Salminen et al., 2011). Eine Voraussetzung hierfür ist die vorangehende Aktivierung des lokalen Immunabwehrsystems (Stevens, 2004). Es kann vermutet werden, dass SP-A das komplexe Gleichgewicht von MMPs und TIMPs, welches essentiell für den Knorpelerhalt ist, durch die gesteigerte Expression pro-inflammatorischer Zytokine stört. Pelletier et al. (1994) und Qureshi (2005) haben beschrieben, wie die Erhöhung der MMPs bei gleichzeitiger Senkung der TIMPs einen weiteren Knorpelabbau und somit die Arthrose fördert (Martel-Pelletier et al., 1994; Qureshi et al., 2005).

Interessanterweise wird SP-A neben der pro-inflammatorischen auch eine anti-inflammatorische Eigenschaft zugeschrieben. Nach Stevens (2004) kann SP-A eine Entzündung hemmen bzw. begrenzen, indem es die Freisetzung von TNF- $\alpha$  verhindert (Stevens, 2004). Bei einem Mangel an SP-A ist die Konzentration von TNF- $\alpha$  erhöht und durch Zugabe von SP-A normalisiert sich die Zytokinproduktion (Sano and Kuroki, 2005). Ein vergleichbarer Effekt ließ sich bei

Stimulationsexperimenten an Korneaepithelzelllinien erzielen. Durch die Zugabe von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , konnte die SP-A Expression auf mRNA-Ebene gesteigert werden (Bräuer et al., 2007b). In Anbetracht dieser doch gegensätzlichen inflammatorischen Effekte stellt sich die Frage, wie SP-A in die Entzündungsprozesse im Knorpel eingreift. Vermutlich liegt bei Ausschluss einer bakteriellen Infektion ein entzündungshemmender Effekt vor. Der Nachweis von SP-A in den Gelenken von STR/Ort Mäusen eröffnete die Möglichkeit, der Rolle von SP-A bei der Arthrose in einem etablierten Osteoarthritis-Mausmodell nachzugehen (Mason et al., 2001).

#### **4.4.2 Nachweis von Surfactant Protein D im Gelenkknorpel**

SP-D besitzt strukturelle Ähnlichkeiten zu SP-A und zu anderen säugetierspezifischen C-Typ-Lektinen (Crouch and Wright, 2001) und ist wie SP-A ein hydrophiles Surfactant Protein mit immunologischen Funktionen. Es bindet an Kohlenhydrate und Lipide und spielt im Rahmen der angeborenen Immunabwehr besonders gegen verschiedene bakterielle, virale und fungiforme Pathogene eine Rolle (Pandit et al., 2012). Aufgrund seiner zentralen Bedeutung für die Immunabwehr wurde SP-D bislang nur in Geweben untersucht, die potentiell mit Pathogenen in Kontakt kommen können. Neben der Lunge kommt SP-D unter anderem auch in Gallengängen, in Hepatozyten, im Tubulussystem der Niere, im Parenchym des Pankreas, in Parietalzellen des Magens, im Speichel, im Epithel der Nasenmuschel, in der Tränendrüse und in der Kornea vor (Stahlman et al., 2002; Kankavi, 2003; Bräuer et al., 2007b; Kim et al., 2007b).

Im Rahmen dieser Arbeit gelang erstmalig der Nachweis von SP-D in den Chondrozyten des hyalinen Gelenkknorpels auf mRNA- und Protein-Ebene (vgl. Ergebnisse 3.3.1, 3.3.2 und 3.3.3). Damit wurde die Ausgangshypothese, dass SP-D in bradytrophen Geweben zu finden sein muss, bestätigt. Eine immunologische Bedeutung von SP-D bei degenerativen Erkrankungen mit gleichzeitig bedingten Entzündungsprozessen kann somit angenommen werden.

Bei der Quantifizierung von SP-D in humanen Knorpelproben verschiedener Arthrosegrade konnte eine deutliche Steigerung der Expression von SP-D im Arthrosegrad III festgestellt werden (vgl. Abb. 3.2-8 und Tab. 3.3-1). Dies deckt sich mit den Ergebnissen zu SP-A. Beide Proteine scheinen bei der Pathogenese einer Arthrose eine wichtige Rolle zu spielen (Kankavi, 2003). Durch Untersuchungen an

Patienten mit rheumatischer Arthritis konnte gezeigt werden, dass SP-D bei einer Synovitis (Entzündungen der Synovialmembran) auch aus dem Blutserum über die Synovialmembran in den Gelenkspalt diffundieren kann (Christensen et al., 2010). Dies könnte ein Grund dafür sein, dass die SP-D-Konzentration erhöht war, obwohl bei Arthrosegrad III ein starker Substanzverlust des Knorpels vorliegt.

Dem Surfactant Protein D werden ebenso wie SP-A gegenläufige pro- und anti-inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben (Gardai et al., 2003). So fördert SP-D bei Anwesenheit mikrobieller Produkte die Entzündung (pro-inflammatorisch) und bei deren Abwesenheit hemmt es die Entzündung (anti-inflammatorisch). Es wird ebenfalls davon ausgegangen, dass SP-D Einfluss auf den Prozess des *Remodellings* verschiedener akuter oder chronischer Erkrankungen hat (Stahlman et al., 2002). Der Prozess des Remodellings bewirkt im Knorpel ein Gleichgewicht zwischen Aufbau und Abbau der Knorpelsubstanz. Je nachdem ob anabole oder katabole Faktoren überwiegen, kann sich dieses Gleichgewicht in die eine oder andere Richtung verschieben (Laufer St., 2002). Wie allerdings SP-D in die Entzündungsprozesse des Knorpels eingreift, muss durch weitere Versuche geklärt werden.

### **4.4.3 Nachweis von Surfactant Protein B im Gelenkknorpel**

Surfactant Protein B (SP-B) ist maßgeblich an der Ausbildung und Stabilität oberflächenaktiver Schichten (Membranen und Grenzflächen) beteiligt und wird dabei für die benötigte Adsorption von Phospholipiden an der Luft-Flüssigkeits-Grenze benötigt (Notter et al., 1987; Yu and Possmayer, 1990). In der Literatur wurde das Vorhandensein von SP-B bereits in verschiedenen Geweben, wie z.B. in der Tuba auditiva (Paananen et al., 2001), in der Niere (Kankavi, 2003), im Gewebe des okulären Systems (Bräuer and Paulsen, 2008), in der Nasenmuschel (Kim et al., 2007b; Schicht et al., 2012) und im Zahnfleisch (Bräuer et al., 2012) beschrieben.

Wie die Ergebnisse unter 3.3 zeigen, konnte im Rahmen dieser Arbeit SP-B in den Chondrozyten nachgewiesen werden. Der Nachweis gelang dabei auf mRNA-Ebene in Knorpelzellen der Zelllinien C28/I2, T/C28a2 und in primären Chondrozyten sowie immunologisch mittels Western-Blot. Das Molekulargewicht des Proteins wurde in den untersuchten Gelenkknorpelproben mit 40 kDa bestimmt (vgl. Abb. 3.3-3). Aus der Literatur sind unterschiedliche Größenangaben des Proteins bekannt, z.B. 8 kDa in der Lunge, 25 kDa in Clara-Zellen und 35 kDa im okulären System

(Kornea, Tränendrüse, ableitende Tränenwege) (Akinbi et al., 1999; Bräuer et al., 2007a). Nach Whitsett et al. (1986) unterliegt SP-B einer posttranslationalen Modifizierung und bildet über Disulfid-Brücken Oligomere unterschiedlicher Größe aus und es wird diskutiert, dass die posttranslational modifizierten Formen von SP-B gewebespezifisch sind (Whitsett et al., 1986a). Möglicherweise handelt es sich bei der im Knorpel nachgewiesenen Form von SP-B um eine solche gewebsspezifische Translationsvariante des Proteins. Erst durch die erwähnte Modifizierung von Surfactant Protein B kann das Protein seine regulatorischen Eigenschaften ausbilden (Gustafsson et al., 2000).

Die quantitativen Untersuchungen mittels ELISA ergaben keinen Hinweis darauf, dass SP-B im Zusammenhang mit einer Arthrose reguliert wird (vgl. Abb. 3.3-8). Unabhängig vom Arthrosegrad bleibt die Proteinkonzentration nahezu konstant (von 18 ng/mg bis 25 ng/mg Gesamtprotein). Somit scheint SP-B auf den Verlauf einer arthritische Entzündung keinen Einfluss zu haben. Eine von Li Yang et al. (2010) beschriebene immunologische Funktion von SP-B bleibt damit auf bakterielle Entzündungen durch *Pseudomonas aeruginosa* beschränkt, wobei dieses Ergebnis in Verbindung mit der vorgelegten Arbeit hinterfragt werden muss (Yang et al., 2010). Die Untersuchungen an Knorpelgewebe haben keine Anhaltspunkte dafür ergeben, dass SP-A die Expression von SP-B beeinflusst. Im Arthrosegrad III blieb bei einer erhöhten SP-A Konzentration die SP-B Konzentration fast unverändert. Dies unterstreicht die Ansicht, dass SP-A die oberflächenregulatorischen Eigenschaften erhöht, diese aber nicht davon abhängig sind (Korfhagen et al., 1996). Die immunhistochemischen Analysen (vgl. Ergebnisse 3.3.3 und 3.3.4) zeigen für SP-B eine positive Immunreaktion im Zytoplasma von Chondrozyten des Menschen und der Maus. Die hydrophoben Eigenschaften des Proteins bewirken die Bildung von Granula (Lin et al., 1996), die jedoch im mikroskopischen Bild nicht erkennbar waren. Auch in anderen Publikationen wurde von einer homogenen Verteilung der Proteine im Zytoplasma, z.B. in der Gingiva (Bräuer et al., 2012), berichtet.

Welche genaue Funktion SP-B im Knorpel erfüllt konnte nicht beantwortet werden. Es ist möglich, dass SP-B ähnlich wie in der Lunge die Oberflächenaktivität beeinflusst und dadurch Diffusionsprozesse des Knorpels erleichtert. Eine Beeinflussung des arthritischen Entzündungsprozesses ist anhand der bestimmten Konzentrationen im Gelenkknorpel nicht nachweisbar. Die Komplexität möglicher

Wirkungsmechanismen wird auch daran deutlich, dass nach wie vor selbst für die intensiv untersuchte Lunge verschiedene Funktionen für SP-B diskutiert werden. So weicht die Funktionen von SP-B in Clara-Zellen (sekretorische Zellen der Lunge) von der in Pneumozyten Typ II-Zellen der Luft-Flüssigkeits-Grenze ab (Paananen et al., 2001). Für die Glandula parotis wird die Beteiligung von SP-B am Transport des Speichels in die Mundhöhle vermutet (Bräuer et al., 2009). Demnach wäre denkbar, dass SP-B rheologische Eigenschaften wahrnimmt und dadurch Diffusionsprozesse im Knorpelgewebe erleichtert.

#### **4.4.4 Nachweis von Surfactant Protein C im Gelenkknorpel**

Lange galt SP-C als ein ausschließlich in der Lunge vorkommendes Protein (Notter et al., 1987; Possmayer, 1988; Serrano and Perez-Gil, 2006; Li et al., 2007). Neuste Veröffentlichungen zeigen aber auch, dass SP-C in der Tränen- und Speicheldrüse und in der Nasenmuschel des Menschen gebildet wird (Bräuer et al., 2009; Schicht et al., 2012). Neben dem Nachweis der mRNA für SP-C in Chondrozyten und in Knorpelzelllinien konnte in der Arbeit erstmals auch die Existenz des Proteins im Gewebe des hyalinen Gelenkknorpels bestätigt werden (vgl. Abb. 3.3-1). Wie SP-B unterliegt SP-C einer hochgradigen posttranslationalen Modifizierung (Jacobs et al., 1987; Glasser et al., 1988; Voorhout et al., 1992). Man kann monomere und dimere Formen unterscheiden, ihre funktionelle Bedeutung ist jedoch noch weitgehend unklar.

Bei der Bestimmung des Proteins von SP-C mittels Western-Blot aus Knorpelproben verschiedener Altersgruppen wurde mit zwei Ausnahmen eine Proteinbande bei 26 kDa nachgewiesen (vgl. Abb. 3.3-4). Die negativen Proben eines 41- und 48-jährigen Mannes stammten wie die anderen Proben aus dem Institut für Rechtsmedizin, so dass als Ursache eine stärkere Proteolyse durch unterschiedlich lange postmortale Intervalle (PMI) nicht ausgeschlossen werden kann. Eine weitere Bande wurde bei 16 kDa detektiert, bei der es sich vermutlich um eine gewebespezifisch modifizierte Form von SP-C im Gelenkknorpel handelt.

Es konnte gezeigt werden, dass SP-C in der Tränenflüssigkeit gewebespezifisch posttranslational oder posttranskriptional modifiziert wird. Dies könnte nicht nur ein anderes Expressionsmuster, sondern auch ein anderes Aktivitätsspektrum als in der Lunge zur Folge haben (Bräuer and Paulsen, 2008).

Die quantitative Bestimmung von SP-C in humanen Gelenkknorpelproben mittels ELISA ließ keine Veränderung der Konzentration in Abhängigkeit zu degenerativen entzündlichen Veränderungen des Gewebes erkennen (vgl. Abb. 3.3-8). Die Konzentration von SP-C variiert in einem Bereich von 30 bis 35 ng/mg Gesamtprotein. Dies legt den Schluss nahe, dass SP-C wie SP-B den Entzündungsprozess im Knorpel nicht beeinflusst. Tafel (2008) wies nach, dass SP-C bezüglich des Verlaufs verschiedener mikrobiell verursachter Lungenerkrankungen ebenfalls keine regulatorischen Eigenschaften hat (Tafel et al., 2008). Die immunhistochemischen Arbeiten ermöglichten die bildhafte Dokumentation von SP-C im hyalinen Gelenkknorpel des Menschen und der Maus (vgl. Ergebnisse 3.3.3 und 3.3.4). Die Lokalisation ist zytoplasmatisch (intrazellulär), so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich dabei, ähnlich wie bei SP-B, um eine intrazelluläre Speicherform des Proteins handelt (Bräuer et al., 2007a). SP-C werden in der Literatur nur oberflächenregulatorische Eigenschaften zugeschrieben. Die Ergebnisse (vgl. Abb. 3.3.3) zum hyalinen Knorpelgewebe legen diese Sichtweise nahe, führen aber nicht zur abschließenden Klärung ihrer Funktion im Knorpel. Wie schon für SP-B besprochen, ist eine rheologische Bedeutung im Zuge der Diffusionsprozesse im Knorpelgewebe wahrscheinlich.

## 5. Zusammenfassung

### 5.1 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, einen tieferen Einblick in das komplexe System der Expression, der Regulation und der Funktion der vier bekannten Surfactant Proteine im humanen Organismus zu erhalten. In den dafür durchgeführten Vorarbeiten wurden kommerzielle Antikörper gegen Surfactant Proteine an den eingesetzten Bakterienüberständen getestet, wobei überraschenderweise spezifische Antikörper-Reaktionen nachgewiesen werden konnten. Diese Ergebnisse könnten von großer Tragweite für hunderte von wissenschaftlichen Studien sein, die einer erneuten kritischen Bewertung unterzogen werden müssten. Auf der Basis dieser Resultate beschäftigte sich die Arbeit mit der Frage, ob *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* möglicherweise selbst zur Produktion von Surfactant Proteinen oder vergleichbaren Proteinen fähig sind.

Die sich anschließenden RT-PCR-Analysen der bakteriellen genomischen DNA und RNA ergaben spezifische Banden für die jeweiligen Surfactant Proteine. Durch eine Sequenzierung der bakteriellen Amplifikationsprodukte konnte eine 90- bis 100 %-ige Übereinstimmung zu den bekannten Surfactant Proteinen gefunden werden. Ein anschließender Sequenzvergleich mit den Genomen von *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* zeigte jedoch keine Übereinstimmung, obwohl beide Genome vollständig sequenziert sind. Durch die Verwendung unterschiedlicher Laborstämme mit dem gleichen Resultat konnten mögliche stammspezifische Einzelfälle ausgeschlossen werden. Mittels immunologischer (Western-Blot), immunhistochemischer und elektronenmikroskopischer Analysen konnte unter Verwendung kommerzieller Antikörper gegen humane Surfactant Proteine die Anwesenheit der Proteine in den Mikroorganismen nachgewiesen werden. Um einen möglichen funktionellen Einfluss der bakteriellen Surfactant Proteine zu analysieren, wurden die Bakterien unter verschiedenen Wachstumsbedingungen (aerob, anaerob) kultiviert. Die Expression der Surfactant Proteine, die mittels eines entsprechenden ELISA-Systems quantifiziert wurde, war in allen Experimenten gesteigert (zum Teil signifikant). Die mögliche Funktion dieser bakteriellen Surfactant Proteine bleibt allerdings weitgehend ungeklärt und bedarf weiterer funktioneller Analysen. Dennoch könnte dieses Ergebnis von großer Relevanz für eine Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten sein (mehr als 1000 Publikationen, Quelle NCBI), welche

die Bedeutung von Surfactant Proteinen belegen. Die derzeit kommerziell erhältlichen Antikörper und etablierten Primer für humane Surfactant Proteine detektieren bakterielle Proteine und Gene. Damit ist nicht auszuschließen, dass die in immunologischen Untersuchungen nachweisbare Erhöhung der Surfactant Protein-Konzentration in humanen Proben (z.B. der Lunge) möglicherweise auch auf die in den Proben vorhandenen Mikroorganismen wie *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* zurückzuführen ist. Gleichfalls kann mit dem Nachweis Surfactant ähnlicher Proteine auf RNA- und Proteinebene gezeigt werden, dass gegebenenfalls eine neue Gruppe bakterieller Proteine existiert, die sequenziell und strukturell in die allgemeinen Datenbanken für Bakterien integriert werden sollten.

Ein weiterer Abschnitt der vorliegenden Arbeit befasst sich mit der Erstbeschreibung und Charakterisierung von zwei bislang unbeschriebenen Proteinen, die unter Umständen eine neue Gruppe von Surfactant Proteinen darstellen. Durch Genomanalysen und die daraus resultierenden Sequenzen wurden spezifische Oligonukleotide (Primer) und ein Anti-Peptid-Antikörper zum Nachweis dieser noch weitgehend unbekannt Proteine generiert. Dadurch konnte erstmals auf RNA/DNA-Ebene der Nachweis dieser Surfactant Proteine (SP-G und SP-H) in einer Vielzahl von humanen Geweben erbracht werden, z.B. in den Geweben des okulären Systems, sowie Niere, Hoden, Leber u.a. Mittels bioinformatischer und computerchemischer Techniken sind nach struktureller und sequenzieller Analysen am menschlichen Genom 3D-Strukturen der humanen Proteine entwickelt worden, woraus sich erste theoretische Vorhersagen über die Eigenschaften der beiden Proteine ableiten ließen. Aufgrund der berechneten physikochemischen Eigenschaften und der vorliegenden Ergebnisse können für die beiden Proteine SP-G und SP-H, ähnlich wie bei den bereits bekannten Surfactant Proteinen, sowohl immunologische als auch oberflächenregulatorische Funktionen vermutet werden.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde entsprechend der ursprünglichen Zielstellung die Anwesenheit und das Expressionsverhalten der Surfactant Proteine A, B, C und D in Chondrozyten des hyalinen Gelenkknorpels untersucht. Hierbei gelang der Nachweis der Existenz der Proteine auf mRNA- und Protein-Ebene sowie immunhistochemisch in Chondrozyten des gesunden wie auch im degenerativ veränderten hyalinen Gelenkknorpel von Mensch und Maus. Innerhalb der Versuche wurde deutlich, dass die Expression von SP-A und -D mit zunehmendem Patientenalter und Arthrosegrad gesteigert war. Im Gegensatz dazu wird die



## Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Expression von SP-B und -C nicht durch eine Entzündungssituation beeinflusst. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass SP-A, -B, -C und -D nicht über Diffusionsprozesse zu den Knorpelzellen gelangen, sondern im Knorpelgewebe selbst gebildet werden und offenbar funktionell bedeutsam sind. Die Frage, welche Rolle die Surfactant Proteine allerdings im Rahmen der Pathogenese der Arthrose spielen, bedarf weiterer Untersuchungen.

## 5.2 Ausblick

Die ersten Arbeiten zur Detektion und Charakterisierung von SP-G und SP-H mittels molekularbiologischer Standardmethoden zeigen die Existenz dieser Proteine in den untersuchten humanen Geweben eindeutig. Für weitere funktionelle Untersuchungen ist es von besonderer Relevanz, „größere“ Mengen an gereinigtem und nativem Surfactant Protein G und H zur Verfügung zu haben. Daher müssten die Arbeiten an den bereits etablierten Expressionssystemen (*Escherichia coli* und *Leishmania tarantolea*) für die rekombinante Gewinnung der Surfactant Proteine optimiert werden. Mit der erfolgreichen rekombinanten Herstellung der Surfactant Proteine G und H könnten sowohl biophysikalische Einflüsse, wie die Oberflächenaktivität, als auch immunologische oder mikrobielle Aspekte näher untersucht werden. In Kombination mit den eigens etablierten Antikörpern könnten darüber hinaus auch ELISA-Systeme entwickelt werden, wodurch eine genaue Konzentrationsbestimmung in Gewebeproben, Flüssigkeitsproben sowie in Überständen aus Zellkulturexperimenten etc. möglich wäre. Die Erstbeschreibung der neuen „Surfactant ähnlichen Proteine“ von *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* eröffnet ein weites Feld für Analysen zur systematischen Einordnung und Charakterisierung dieser Proteine. Weitere sequenzielle Analysen der bakteriellen DNA zur Bestätigung der Ergebnisse sind Voraussetzung für eine exakte Einordnung in die Genomdatenbank. Massenspektrometrische Analysen könnten helfen, die Proteine strukturell und sequenziell genauer zu charakterisieren. Die Existenz der Surfactant Proteine im humanen Gelenkknorpel konnte ebenfalls bestätigt werden. Ob und welchen Einfluss allerdings entzündungsfördernde, körpereigene Botenstoffe auf die Regulation der einzelnen Surfactant-Proteine haben, ist unklar. Zur Untermauerung sollten dafür *in vitro*-Stimulations-experimente an Knorpelzelllinien mit den pro-inflammatorischen Zytokinen, wie zum Beispiel TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , durchgeführt werden, um bessere Voraussagen über die Rolle der Surfactant Proteine im Gelenkknorpel zu treffen. Ebenso interessant ist die Fragestellung, welche Rolle die Surfactant Proteine in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit entzündlichen Gelenkserkrankungen spielen. Eine erhöhte Konzentration von SP-A und -D in diesen Proben ist als sehr wahrscheinlich anzunehmen. Wie sich dies auf den Knorpelmetabolismus auswirkt, müsste allerdings in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

## 6. Literatur

- Akinbi HT, Bhatt H, Hull WM, Weaver TE. 1999. Altered surfactant protein B levels in transgenic mice do not affect clearance of bacteria from the lungs. *Pediatric research* 46:530-534.
- Alcorn JF, Wright JR. 2004. Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *The Journal of biological chemistry* 279:30871-30879.
- Anderson MT, Seifert HS. 2011. *Neisseria gonorrhoeae* and humans perform an evolutionary LINE dance. *Mobile genetic elements* 1:85-87.
- Bartlett JA, Gakhar L, Penterman J, Singh PK, Mallampalli RK, Porter E, McCray PB, Jr. 2011. PLUNC: a multifunctional surfactant of the airways. *Biochemical Society transactions* 39:1012-1016.
- Baum J. 1995. Infections of the eye. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 21:479-486; quiz 487-478.
- Beck DC, Ikegami M, Na CL, Zaltash S, Johansson J, Whitsett JA, Weaver TE. 2000. The role of homodimers in surfactant protein B function in vivo. *The Journal of biological chemistry* 275:3365-3370.
- Beers MF, Mulugeta S. 2005. Surfactant protein C biosynthesis and its emerging role in conformational lung disease. *Annual review of physiology* 67:663-696.
- Bernhard W, Haagsman HP, Tschernig T, Poets CF, Postle AD, van Eijk ME, von der Hardt H. 1997. Conductive airway surfactant: surface-tension function, biochemical composition, and possible alveolar origin. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 17:41-50.
- Bhakdi S, Tranum-Jensen J. 1991. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiological reviews* 55:733-751.
- Bijlmakers MJ, Marsh M. 2003. The on-off story of protein palmitoylation. *Trends in cell biology* 13:32-42.
- Bohach GA, Fast DJ, Nelson RD, Schlievert PM. 1990. Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. *Critical reviews in microbiology* 17:251-272.
- Botas C, Poulain F, Akiyama J, Brown C, Allen L, Goerke J, Clements J, Carlson E, Gillespie AM, Epstein C, Hawgood S. 1998. Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:11869-11874.
- Bragonzi A, Worlitzsch D, Pier GB, Timpert P, Ulrich M, Hentzer M, Andersen JB, Givskov M, Conese M, Doring G. 2005. Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* expresses alginate in the lungs of patients with cystic fibrosis and in a mouse model. *The Journal of infectious diseases* 192:410-419.
- Brandis H-J. 1985. *Anatomie und Physiologie für Krankenschwestern und andere Medizinalberufe*. New York; Fischer 6
- Bräuer L, Johl M, Börgermann J, Pleyer U, Tsokos M, Paulsen FP. 2007a. Detection and Localization of the Hydrophobic Surfactant Proteins B and C in Human Tear Fluid and the Human Lacrimal System. *Curr Eye Res* 32:931-938.
- Bräuer L, Kindler C, Jäger K, Sel S, Nölle B, Pleyer U, Ochs M, Paulsen FP. 2007b. Detection of Surfactant Proteins A and D in Human Tear Fluid and the Human Lacrimal System. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:3945-3953.

- Bräuer L, Möschter S, Beileke S, Jäger K, Garreis F, Paulsen FP. 2009. Human parotid and submandibular glands express and secrete surfactant proteins A, B, C and D. *Histochem Cell Biol* 132:331-338.
- Bräuer L, Paulsen F. 2008. Tear Film and Ocular Surface Surfactants. *Journal of Epithelial Biology and Pharmacology* 1:62-67.
- Bräuer L, Schicht M, Stengl C, Heinemann H, Götz W, Scholz M, Paulsen F. 2012. Detection of Surfactant Proteins A, B, C and D in human gingiva and saliva. *Biomed Tech BMT*.2011.0113.
- Brennan NA, Coles ML. 1997. Extended wear in perspective. *Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry* 74:609-623.
- Bruhn H. 2005. A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins. *Biochem J* 389:249-257.
- Butterfield SM, Lashuel HA. 2010. Amyloidogenic protein-membrane interactions: mechanistic insight from model systems. *Angewandte Chemie* 49:5628-5654.
- Christensen AF, Sorensen GL, Horslev-Petersen K, Holmskov U, Lindegaard HM, Junker K, Hetland ML, Stengaard-Pedersen K, Jacobsen S, Lottenburger T, Ellingsen T, Andersen LS, Hansen I, Skjodt H, Pedersen JK, Lauridsen UB, Svendsen A, Tarp U, Podenphant J, Vestergaard A, Jurik AG, Ostergaard M, Junker P. 2010. Circulating surfactant protein -D is low and correlates negatively with systemic inflammation in early, untreated rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 12:R39.
- Claassen H, Schicht M, Paulsen F. 2011. Impact of sex hormones, insulin, growth factors and peptides on cartilage health and disease. *Progress in histochemistry and cytochemistry* 45:239-293.
- Cole FS, Hamvas A, Noguee LM. 2001. Genetic disorders of neonatal respiratory function. *Pediatric research* 50:157-162.
- Creuwels LA, van Golde LM, Haagsman HP. 1997. The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects. *Lung* 175:1-39.
- Crouch E, Wright JR. 2001. Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense. *Annual review of physiology* 63:521-554.
- Curstedt T, Johansson J, Barros-Soderling J, Robertson B, Nilsson G, Westberg M, Jornvall H. 1988. Low-molecular-mass surfactant protein type 1. The primary structure of a hydrophobic 8-kDa polypeptide with eight half-cystine residues. *European journal of biochemistry / FEBS* 172:521-525.
- Day AJ. 1994. The C-type carbohydrate recognition domain (CRD) superfamily. *Biochemical Society transactions* 22:83-88.
- de Souza GA, Godoy LM, Mann M. 2006. Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Genome Biol* 7:R72.
- DEWS-Report. 2007. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf* 5:75-92.
- Dobbie JT, N; Meijers, P; Anderson, Jd; Bodart, C; Hind, C; Bourguet, C; Perret, J. 1994. Lamellar bodies in synoviocytes, mesothelium and specific epithelia as possible site of auto-antigen in rheumatoid disease. *British Journal of Rheumatology* 33:508-519.
- Drickamer K, McCreary V. 1987. Exon structure of a mannose-binding protein gene reflects its evolutionary relationship to the asialoglycoprotein receptor and nonfibrillar collagens. *The Journal of biological chemistry* 262:2582-2589.

- Engel P, Salzburger W, Liesch M, Chang CC, Maruyama S, Lanz C, Calteau A, Lajus A, Medigue C, Schuster SC, Dehio C. 2011. Parallel evolution of a type IV secretion system in radiating lineages of the host-restricted bacterial pathogen *Bartonella*. *PLoS genetics* 7:e1001296.
- Fearon DT, Austen KF. 1980. Current concepts in immunology: the alternative pathway of complement--a system for host resistance to microbial infection. *The New England journal of medicine* 303:259-263.
- Ferguson JS, Voelker DR, McCormack FX, Schlesinger LS. 1999. Surfactant protein D binds to *Mycobacterium tuberculosis* bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages. *J Immunol* 163:312-321.
- Flanagan JL, Willcox MD. 2009. Role of lactoferrin in the tear film. *Biochimie* 91:35-43.
- Fleiszig SM, Efron N, Pier GB. 1992. Extended contact lens wear enhances *Pseudomonas aeruginosa* adherence to human corneal epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science* 33:2908-2916.
- Fleming A. 1932. Lysozyme: President's Address. *Proc R Soc Med* 26:71-84.
- Fluckinger M, Haas H, Merschak P, Glasgow BJ, Redl B. 2004. Human tear lipocalin exhibits antimicrobial activity by scavenging microbial siderophores. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48:3367-3372.
- Friedberg T GM, Bartlomowicz-Oesch B, Siegert P, Arand M, Adesnik M, Oesch F. 1992. Sequence of a novel cytochrome CYP2B cDNA coding for a protein which is expressed in a sebaceous gland, but not in the liver. *Biochem J* 1;287 ( Pt 3):775-83.
- Galloway DR. 1991. *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments. *Molecular microbiology* 5:2315-2321.
- Gardai SJ, Xiao YQ, Dickinson M, Nick JA, Voelker DR, Greene KE, Henson PM. 2003. By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell* 115:13-23.
- Garreis F, Schlorf T, Worlitzsch D, Steven P, Bräuer L, Jäger K, Paulsen FP. 2010. Roles of human beta-defensins in innate immune defense at the ocular surface: arming and alarming corneal and conjunctival epithelial cells. *Histochemistry and cell biology* 134:59-73.
- Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. 2003. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168:918-951.
- Girgis DO, Dajcs JJ, O'Callaghan RJ. 2003. Phospholipase A2 activity in normal and *Staphylococcus aureus*-infected rabbit eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44:197-202.
- Glasser JR, Mallampalli RK. 2012. Surfactant and its role in the pathobiology of pulmonary infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 14:17-25.
- Glasser S, Horfhagen TR, Weaver TE, Clark JC, Matias T, Meuth J, Fox J, Whitsett J. 1988. cDNA, Deduced Polypeptide Structure and Chromosomal Assignment of Human Pulmonary Surfactant Proteolipid, SPL(pVal)\*. *The Journal of Biological Chemistry* 263:9-12.
- Goldberg JB, Pler GB. 1996. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides and pathogenesis. *Trends in microbiology* 4:490-494.

- Griese M. 1999. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 13:1455-1476.
- Grisanti S. 1998. [Immune privilege of the eye]. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 95:124-135.
- Grobe S, Wingender J, Truper HG. 1995. Characterization of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from technical water systems. *The Journal of applied bacteriology* 79:94-102.
- Gustafsson M, Palmblad M, Curstedt T, Johansson J, Schurch S. 2000. Palmitoylation of a pulmonary surfactant protein C analogue affects the surface associated lipid reservoir and film stability. *Biochimica et biophysica acta* 1466:169-178.
- Haczku A, Atochina EN, Tomer Y, Chen H, Scanlon ST, Russo S, Xu J, Panettieri RA, Jr., Beers MF. 2001. *Aspergillus fumigatus*-induced allergic airway inflammation alters surfactant homeostasis and lung function in BALB/c mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 25:45-50.
- Handford JI, Ize B, Buchanan G, Butland GP, Greenblatt J, Emili A, Palmer T. 2009. Conserved network of proteins essential for bacterial viability. *Journal of bacteriology* 191:4732-4749.
- Harris TO, Hufnagle WO, Betley MJ. 1993. Staphylococcal enterotoxin type A internal deletion mutants: serological activity and induction of T-cell proliferation. *Infection and immunity* 61:2059-2068.
- Harshey RM. 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual review of microbiology* 57:249-273.
- Hartshorn KL, Crouch E, White MR, Colamussi ML, Kakkanatt A, Tauber B, Shepherd V, Sastry KN. 1998. Pulmonary surfactant proteins A and D enhance neutrophil uptake of bacteria. *The American journal of physiology* 274:L958-969.
- Hawgood S, Shiffer K. 1991. Structures and Properties of the Surfactant-Associated Proteins. *Annual Review of Physiology* 53:375-394.
- Hawiger J, Steckley S, Hammond D, Cheng C, Timmons S, Glick AD, Des Prez RM. 1979. Staphylococci-induced human platelet injury mediated by protein A and immunoglobulin G Fc fragment receptor. *J Clin Invest* 64:931-937.
- Hawkins AE, Zhao M, Beers MF, Mulugeta S. 2011. Impairment of epithelial cell endocytosis by mistargeting SP-CI73T mutant protein. *FASEB J*, 25 p. 865.12.
- Heilig R, Eckenberg R, Petit JL, Fonknechten N, Da Silva C, Cattolico L, Levy M, Barbe V, de Berardinis V, Ureta-Vidal A, Pelletier E, Vico V, Anthouard V, Rowen L, Madan A, Qin S, Sun H, Du H, Pepin K, Artiguenave F, Robert C, Cruaud C, Bruls T, Jaillon O, Friedlander L, Samson G, Brottier P, Cure S, Segurens B, Aniere F, Samain S, Crespeau H, Abbasi N, Aiach N, Boscus D, Dickhoff R, Dors M, Dubois I, Friedman C, Gouyvenoux M, James R, Mairey-Estrada B, Mangenot S, Martins N, Menard M, Oztas S, Ratcliffe A, Shaffer T, Trask B, Vacherie B, Bellemere C, Belser C, Besnard-Gonnet M, Bartol-Mavel D, Boutard M, Briez-Silla S, Combette S, Dufosse-Laurent V, Ferron C, Lechaplais C, Louesse C, Muselet D, Magdelenat G, Pateau E, Petit E, Sirvain-Trukniewicz P, Trybou A, Vega-Czarny N, Bataille E, Bluet E, Bordelais I, Dubois M, Dumont C, Guerin T, Haffray S, Hammadi R, Muanga J, Pellouin V, Robert D, Wunderle E, Gauguier G, Roy A, Sainte-Marthe L, Verdier J, Verdier-Discala C, Hillier L, Fulton L, McPherson J, Matsuda F,

- Wilson R, Scarpelli C, Gyapay G, Wincker P, Saurin W, Quetier F, Waterston R, Hood L, Weissenbach J. 2003. The DNA sequence and analysis of human chromosome 14. *Nature* 421:601-607.
- Horowitz DL, Katzap E, Horowitz S, Barilla-LaBarca ML. 2011. Approach to septic arthritis. *American family physician* 84:653-660.
- Hull J, South M, Phelan P, Grimwood K. 1997. Surfactant composition in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 156:161-165.
- Ikegami M, Whitsett JA, Jobe A, Ross G, Fisher J, Korfhagen T. 2000. Surfactant metabolism in SP-D gene-targeted mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L468-476.
- Jacobs KA, Phelps DS, Steinbrink R, Fisch J, Kriz R, Mitsock L, Dougherty JP, Tausch HW, Floros J. 1987. Isolation of a cDNA clone encoding a high molecular weight precursor to a 6-kDa pulmonary surfactant-associated protein. *The Journal of biological chemistry* 262:9808-9811.
- Johansson H, Nerelius C, Nordling K, Johansson J. 2009. Preventing amyloid formation by catching unfolded transmembrane segments. *Journal of molecular biology* 389:227-229.
- Johansson J, Curstedt T, Jornvall H. 1991. Surfactant protein B: disulfide bridges, structural properties, and kringle similarities. *Biochemistry* 30:6917-6921.
- Junqueira L, Carneiro J, Gratz M. 2005. *Histologie*. Springer Verlag, Heidelberg 6:S. 82-89.
- Kallberg Y, Gustafsson M, Persson B, Thyberg J, Johansson J. 2001. Prediction of amyloid fibril-forming proteins. *The Journal of biological chemistry* 276:12945-12950.
- Kankavi O. 2003. Immunodetection of surfactant proteins in human organ of Corti, Eustachian tube and kidney. *Acta biochimica Polonica* 50:1057-1064.
- Kankavi O. 2006. Increased expression of surfactant protein A and D in rheumatoid arthritic synovial fluid (RASf). *Croatian medical journal* 47:155-161.
- Kankavi O, Roberts MS. 2004. Detection of surfactant protein A (SP-A) and surfactant protein D (SP-D) in equine synovial fluid with immunoblotting. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* 68:146-149.
- Khalil MB, Latkany RA, Speaker MG, Yu G. 2007. Effect of punctal plugs in patients with low refractive errors considering refractive surgery. *Journal of refractive surgery* 23:467-471.
- Khoor A, Stahlman MT, Gray ME, Whitsett JA. 1994. Temporal-spatial distribution of SP-B and SP-C proteins and mRNAs in developing respiratory epithelium of human lung. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 42:1187-1199.
- Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB. 2002. Structure and function of aggrecan. *Cell research* 12:19-32.
- Kijlstra A. 1990. The role of lactoferrin in the nonspecific immune response on the ocular surface. *Regional immunology* 3:193-197.
- Kim JK, Kim S-S, Rha KW, Kim C-H, Cho JH, Lee C-H, Lee J-G, Yoon J-H. 2007a. Expression and localization of surfactant proteins in human nasal epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L879-L884.
- Kim JK, Kim SS, Rha KW, Kim CH, Cho JH, Lee CH, Lee JG, Yoon JH. 2007b. Expression and localization of surfactant proteins in human nasal epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L879-884.

- King RJ, Klass DJ, Gikas EG, Clements JA. 1973. Isolation of apoproteins from canine surface active material. *The American journal of physiology* 224:788-795.
- Kishore U, Greenhough T, Waters P, Shrive A, Ghai R, Kamran M, Bernal A, Reid K, Madan T, Chakraborty T. 2006a. Surfactant proteins SP-A and SP-D: Structure, function and receptors. *Mol Immunol* 43:1293-1315.
- Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, Shrive AK, Ghai R, Kamran MF, Bernal AL, Reid KB, Madan T, Chakraborty T. 2006b. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol Immunol* 43:1293-1315.
- Klaus MH, Clements JA, Havel RJ. 1961. Composition of surface-active material isolated from beef lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 47:1858-1859.
- Kobayashi T, Nitta K, Takahashi R, Kurashima K, Robertson B, Suzuki Y. 1991. Activity of pulmonary surfactant after blocking the associated proteins SP-A and SP-B. *Journal of applied physiology* 71:530-536.
- Kogan SC, Doherty M, Gitschier J. 1987. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *The New England journal of medicine* 317:985-990.
- Korfhagen TR, Bruno MD, Ross GF, Huelsman KM, Ikegami M, Jobe AH, Wert SE, Stripp BR, Morris RE, Glasser SW, Bachurski CJ, Iwamoto HS, Whitsett JA. 1996. Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:9594-9599.
- Kramer BW, Speer CP. 2003. [Surfactant proteins A and D: major factors of the immune response of the lung]. *Zeitschrift fur Geburtshilfe und Neonatologie* 207:41-47.
- Kronborg G, Shand GH, Fomsgaard A, Hoiby N. 1992. Lipopolysaccharide is present in immune complexes isolated from sputum in patients with cystic fibrosis and chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 100:175-180.
- Kuang Z, Hao Y, Hwang S, Zhang S, Kim E, Akinbi HT, Schurr MJ, Irvin RT, Hassett DJ, Lau GW. 2011. The *Pseudomonas aeruginosa* flagellum confers resistance to pulmonary surfactant protein-A by impacting the production of exoproteases through quorum-sensing. *Molecular microbiology* 79:1220-1235.
- Laufer St. GS, Brune K. 2002. *Rheumatische Erkrankungen und Entzündungen: von den molekularen Grundlagen zur medikamentösen Therapie*. Georg Thieme Verlag.
- LeClair EE, Nguyen L, Bingle L, MacGowan A, Singleton V, Ward SJ, Bingle CD. 2001. Genomic organization of the mouse plunc gene and expression in the developing airways and thymus. *Biochemical and biophysical research communications* 284:792-797.
- Ledford JG, Pastva AM, Wright JR. 2010. Review: Collectins link innate and adaptive immunity in allergic airway disease. *Innate immunity* 16:183-190.
- Lee HM, Park IH, Woo JS, Chae SW, Kang HJ, Hwang SJ. 2005. Up-regulation of surfactant protein A in chronic sialadenitis. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* 131:1108-1111.
- Leippe M. 1999. Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa--effector molecules of primitive phagocytes. *Developmental and comparative immunology* 23:267-279.



- Leippe M, Ebel S, Schoenberger OL, Horstmann RD, Muller-Eberhard HJ. 1991. Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88:7659-7663.
- Lemos MP, McKinney J, Rhee KY. 2011. Dispensability of surfactant proteins A and D in immune control of *Mycobacterium tuberculosis* infection following aerosol challenge of mice. *Infection and immunity* 79:1077-1085.
- Lemp MA. 2008. Advances in understanding and managing dry eye disease. *American journal of ophthalmology* 146:350-356.
- Leth-Larsen R, Holmskov U, Hojrup P. 1999. Structural characterization of human and bovine lung surfactant protein D. *Biochem J* 343 Pt 3:645-652.
- Levartovsky S, Rosenwasser G, Goodman D. 2001. Bacterial keratitis after [correction of following] laser in situ keratomileusis. *Ophthalmology* 108:321-325.
- LeVine AM, Kurak KE, Bruno MD, Stark JM, Whitsett JA, Korfhagen TR. 1998. Surfactant protein-A-deficient mice are susceptible to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 19:700-708.
- LeVine AM, Whitsett JA, Hartshorn KL, Crouch EC, Korfhagen TR. 2001. Surfactant protein D enhances clearance of influenza A virus from the lung in vivo. *J Immunol* 167:5868-5873.
- Li D, Zeng Z, Xue W, Yao Y. 2007. The model of the action mechanism of SP-C in the lung surfactant monolayers. *Colloids and Surfaces* 57:22-28.
- Liepinsh E, Andersson M, Ruyschaert JM, Otting G. 1997. Saposin fold revealed by the NMR structure of NK-lysin. *Nature structural biology* 4:793-795.
- Lin S, Akinbi HT, Breslin JS, Weaver TE. 1996. Structural requirements for targeting of surfactant protein B (SP-B) to secretory granules in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry* 271:19689-19695.
- Lindemann Da. 2000. Mukoviszidose. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag:pp. 1-166.
- LM. N. 1998. Genetics of the hydrophobic surfactant proteins. . *Biochim Biophys* 1408:323-33.
- Lüllmann-Rauch R. 2009. Histologie. 3. Aufl. . Georg Thieme Verlag, Stuttgart S.137-144; 551-555.
- Marrack P, Kappler J. 1990. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 248:705-711.
- Martel-Pelletier J, McCollum R, Fujimoto N, Obata K, Cloutier JM, Pelletier JP. 1994. Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 70:807-815.
- Mason RJ, Greene K, Voelker DR. 1998. Surfactant protein A and surfactant protein D in health and disease. *The American journal of physiology* 275:L1-13.
- Mason RM, Chambers MG, Flannely J, Gaffen JD, Dudhia J, Bayliss MT. 2001. The STR/ort mouse and its use as a model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 9:85-91.
- Matsumoto T, Tateda K, Furuya N, Miyazaki S, Ohno A, Ishii Y, Hirakata Y, Yamaguchi K. 1998. Efficacies of alkaline protease, elastase and exotoxin A toxoid vaccines against gut-derived *Pseudomonas aeruginosa* sepsis in mice. *Journal of medical microbiology* 47:303-308.

- McDermott AM. 2004. Defensins and other antimicrobial peptides at the ocular surface. *Ocul Surf* 2:229-247.
- McDonald MB. 2005. Conductive keratoplasty: a radiofrequency-based technique for the correction of hyperopia. *Transactions of the American Ophthalmological Society* 103:512-536.
- Melton KR, Nesselin LL, Ikegami M, Tichelaar JW, Clark JC, Whitsett JA, Weaver TE. 2003. SP-B deficiency causes respiratory failure in adult mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:L543-549.
- Merikallio H, Paakko P, Harju T, Soini Y. 2011. Claudins 10 and 18 are predominantly expressed in lung adenocarcinomas and in tumors of nonsmokers. *International journal of clinical and experimental pathology* 4:667-673.
- Mirani ZA, Khan MN, Aziz M, Asadullah, Naz S, Khan SI. 2012. Effect of stress on biofilm formation by icaA positive and negative strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP* 22:10-14.
- Mo YK, Kankavi O, Masci PP, Mellick GD, Whitehouse MW, Boyle GM, Parsons PG, Roberts MS, Cross SE. 2007. Surfactant protein expression in human skin: evidence and implications. *The Journal of investigative dermatology* 127:381-386.
- Mudgil P, Millar TJ. 2008. Adsorption of apo- and holo-tear lipocalin to a bovine Meibomian lipid film. *Experimental eye research* 86:622-628.
- Mullan RH, Matthews C, Bresnihan B, FitzGerald O, King L, Poole AR, Fearon U, Veale DJ. 2007. Early changes in serum type II collagen biomarkers predict radiographic progression at one year in inflammatory arthritis patients after biologic therapy. *Arthritis and rheumatism* 56:2919-2928.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1:263-273.
- Nakai K. 2000. Protein sorting signals and prediction of subcellular localization. *Advances in protein chemistry* 54:277-344.
- Ni M, Evans DJ, Hawgood S, Anders EM, Sack RA, Fleiszig SMJ. 2005. Surfactant Protein D Is Present in Human Tear Fluid and the Cornea and Inhibits Epithelial Cell Invasion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity* 73:2147-2156.
- Niimi T, Nagashima K, Ward JM, Mino P, Zimonjic DB, Popescu NC, Kimura S. 2001. claudin-18, a novel downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor, encodes lung- and stomach-specific isoforms through alternative splicing. *Molecular and cellular biology* 21:7380-7390.
- Nogee LM, de Mello DE, Dehner LP, Colten HR. 1993. Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *The New England journal of medicine* 328:406-410.
- Notter RH, Shapiro DL, Ohning B, Whitsett JA. 1987. Biophysical activity of synthetic phospholipids combined with purified lung surfactant 6000 dalton apoprotein. *Chemistry and physics of lipids* 44:1-17.
- Ohmer-Schrock D, Schlatterer C, Plattner H, Schlepper-Schafer J. 1993. Interaction of lung surfactant protein A with alveolar macrophages. *Microscopy research and technique* 26:374-380.

- Oosterlaken-Dijksterhuis MA, Haagsman HP, van Golde LM, Demel RA. 1991. Characterization of lipid insertion into monomolecular layers mediated by lung surfactant proteins SP-B and SP-C. *Biochemistry* 30:10965-10971.
- Orgeig S, Hiemstra PS, Veldhuizen EJ, Casals C, Clark HW, Haczku A, Knudsen L, Possmayer F. 2010. Recent advances in alveolar biology: evolution and function of alveolar proteins. *Respiratory physiology & neurobiology* 173 Suppl:S43-54.
- Paananen R, Glumoff V, Sormunen R, Voorhout W, Hallman M. 2001. Expression and localization of lung surfactant protein B in Eustachian tube epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:L214-L220.
- Pandit H, Madhukaran SP, Nayak A, Madan T. 2012. SP-A and SP-D in host defense against fungal infections and allergies. *Frontiers in bioscience* 4:651-661.
- Patthy L. 1991. Homology of the precursor of pulmonary surfactant-associated protein SP-B with prosaposin and sulfated glycoprotein 1. *The Journal of biological chemistry* 266:6035-6037.
- Phizackerley PJ, Town MH, Newman GE. 1979. Hydrophobic proteins of lamellated osmiophilic bodies isolated from pig lung. *Biochem J* 183:731-736.
- Pleyer U, Baatz H. 1997. Antibacterial protection of the ocular surface. *Ophthalmologica* 211:2-8.
- Polin R, Fox W. 1997. Fetal and neonatal physiology:1275-1283.
- Possmayer F. 1988. A Proposed Nomenclature for Pulmonary Surfactant-Associated Proteins. *American Review of Respiratory Disease* 138:990-998.
- Postle AD, Mander A, Reid KB, Wang JY, Wright SM, Moustaki M, Warner JO. 1999. Deficient hydrophilic lung surfactant proteins A and D with normal surfactant phospholipid molecular species in cystic fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 20:90-98.
- Pul U, Wurm R, Arslan Z, Geissen R, Hofmann N, Wagner R. 2010. Identification and characterization of E. coli CRISPR-cas promoters and their silencing by H-NS. *Molecular microbiology* 75:1495-1512.
- Qu XD, Lehrer RI. 1998. Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears. *Infection and immunity* 66:2791-2797.
- Qureshi HY, Sylvester J, El Mabrouk M, Zafarullah M. 2005. TGF-beta-induced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene in chondrocytes is mediated by extracellular signal-regulated kinase pathway and Sp1 transcription factor. *Journal of cellular physiology* 203:345-352.
- Qureshi ST, Gros P, Malo D. 1999. Host resistance to infection: genetic control of lipopolysaccharide responsiveness by TOLL-like receptor genes. *Trends in genetics* : TIG 15:291-294.
- Ratjen F, Doring G. 2003. Cystic fibrosis. *Lancet* 361:681-689.
- Resnikoff S, Pascolini D, Mariotti SP, Pokharel GP. 2008. Global magnitude of visual impairment caused by uncorrected refractive errors in 2004. *Bulletin of the World Health Organization* 86:63-70.
- Rogers GA, Den Beste K, Parkos CA, Nusrat A, Delgaudio JM, Wise SK. 2011. Epithelial tight junction alterations in nasal polyposis. *International forum of allergy & rhinology* 1:50-54.
- Salez L, Balloy V, van Rooijen N, Lebastard M, Touqui L, McCormack FX, Chignard M. 2001. Surfactant protein A suppresses lipopolysaccharide-induced IL-10 production by murine macrophages. *J Immunol* 166:6376-6382.

- Salminen A, Vuolteenaho R, Paananen R, Ojaniemi M, Hallman M. 2011. Surfactant protein A modulates the lipopolysaccharide-induced inflammatory response related to preterm birth. *Cytokine* 56:442-449.
- Sanchez-Pulido L, Devos D, Valencia A. 2002. BRICHOS: a conserved domain in proteins associated with dementia, respiratory distress and cancer. *Trends in biochemical sciences* 27:329-332.
- Sandell LJ. 2007. Modern molecular analysis of a traditional disease: progression in osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* 56:2474-2477.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1992. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* 24:104-108.
- Sano H, Kuroki Y. 2005. The lung collectins, SP-A and SP-D, modulate pulmonary innate immunity. *Mol Immunol* 42:279-287.
- Sastry K, Ezekowitz RA. 1993. Collectins: pattern recognition molecules involved in first line host defense. *Current opinion in immunology* 5:59-66.
- Schicht M, Knipping S, Hirt R, Beileke S, Paulsen F, Bräuer L. 2012. Surfactant proteins A, B, C and D in human nasal mucosa and their regulation during chronic rhinosinusitis with polyposis. *Am J Rhinol Allergy* submitted.
- Schicht M, Posa A, Paulsen F, Brauer L. 2010. [The ocular surfactant system and its relevance in the dry eye]. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 227:864-870.
- Schünke M. 2000. Funktionelle Anatomie, Topographie und Funktion des Bewegungssystems. Georg Thieme Verlag, Stuttgart:S. 50-53.
- Seong JK, Koo JS, Lee WJ, Kim HN, Park JY, Song KS, Hong JH, Yoon JH. 2002. Upregulation of MUC8 and downregulation of MUC5AC by inflammatory mediators in human nasal polyps and cultured nasal epithelium. *Acta otolaryngologica* 122:401-407.
- Serrano AG, Perez-Gil J. 2006. Protein–lipid interactions and surface activity in the pulmonary surfactant system. *Chemistry and Physics of Lipids* 141:105-118.
- Sever-Chroneos Z, Krupa A, Davis J, Hasan M, Yang CH, Szeliga J, Herrmann M, Hussain M, Geisbrecht BV, Kobzik L, Chronos ZC. 2011. Surfactant protein A (SP-A)-mediated clearance of *Staphylococcus aureus* involves binding of SP-A to the staphylococcal adhesin eap and the macrophage receptors SP-A receptor 210 and scavenger receptor class A. *The Journal of biological chemistry* 286:4854-4870.
- Sharma CM, Hoffmann S, Darfeuille F, Reignier J, Findeiss S, Sittka A, Chabas S, Reiche K, Hackermüller J, Reinhardt R, Stadler PF, Vogel J. 2010. The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 464:250-255.
- Spragg RG, Gilliard N, Richman P, Smith RM, Hite RD, Pappert D, Robertson B, Curstedt T, Strayer D. 1994. Acute effects of a single dose of porcine surfactant on patients with the adult respiratory distress syndrome. *Chest* 105:195-202.
- Stahlman MT, Gray ME, Hull WM, Whitsett JA. 2002. Immunolocalization of Surfactant Protein-D (SP-D) in Human Fetal, Newborn, and Adult Tissues. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 50:651-660.
- Stevens P. 2004. Das Surfactantsystem. In: Wauer RR (Hrsg): *Surfactanttherapie – Grundlagen, Diagnostik, Therapie*. Thieme Verlag, Stuttgart 3. Aufl. :S. 11-21.
- Streilein JW. 1996. Peripheral tolerance induction: lessons from immune privileged sites and tissues. *Transplantation proceedings* 28:2066-2070.

- Stryjewski M, Sexton D. 2003. *Pseudomonas aeruginosa* infections in specific types of patients and clinical settings. In: Hauser AR, Rello J, editors *Severe infections caused by Pseudomonas aeruginosa* Vol. 7. :Kluwer Academic Publishers.
- Suzuki Y, Fujita Y, Kogishi K. 1989. Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant. *The American review of respiratory disease* 140:75-81.
- Tafel O, Latzin P, Paul K, Winter T, Woischnik M, Griese M. 2008. Surfactant proteins SP-B and SP-C and their precursors in bronchoalveolar lavages from children with acute and chronic inflammatory airway disease. *BMC pulmonary medicine* 8:6.
- Taneva S, Keough KM. 1994. Pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C in spread monolayers at the air-water interface: I. Monolayers of pulmonary surfactant protein SP-B and phospholipids. *Biophysical journal* 66:1137-1148.
- Ten Brinke A, Vaandrager AB, Haagsman HP, Ridder AN, van Golde LM, Batenburg JJ. 2002. Structural requirements for palmitoylation of surfactant protein C precursor. *Biochem J* 361:663-671.
- Theiler R. 2002. Arthrose, Epidemiologie, Diagnose, Differentialdiagnose, Abklärung und Dokumentation. *Schweiz Med Forum* nr.23.
- Tielen P, Strathmann M, Jaeger KE, Flemming HC, Wingender J. 2005. Alginate acetylation influences initial surface colonization by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological research* 160:165-176.
- Van Iwaarden F, Welmers B, Verhoef J, Haagsman HP, van Golde LM. 1990. Pulmonary surfactant protein A enhances the host-defense mechanism of rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2:91-98.
- Van Iwaarden JF, Pikaar JC, Storm J, Brouwer E, Verhoef J, Oosting RS, van Golde LM, van Strijp JA. 1994. Binding of surfactant protein A to the lipid A moiety of bacterial lipopolysaccharides. *Biochem J* 303 ( Pt 2):407-411.
- Vandenabeele F, De Bari C, Moreels M, Lambrichts I, Dell'Accio F, Lippens PL, Luyten FP. 2003. Morphological and immunocytochemical characterization of cultured fibroblast-like cells derived from adult human synovial membrane. *Archives of histology and cytology* 66:145-153.
- Veldhuizen EJ, van Eijk M, Haagsman HP. 2011. The carbohydrate recognition domain of collectins. *The FEBS journal*.
- Vochem M, Vogt M, Doring G. 2001. Sepsis in a newborn due to *Pseudomonas aeruginosa* from a contaminated tub bath. *The New England journal of medicine* 345:378-379.
- Von Bredow C, Wiesener A, Griese M. 2003. Proteolysis of surfactant protein D by cystic fibrosis relevant proteases. *Lung* 181:79-88.
- Von Neegaard K. 1929. Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik. *ZGesamte Exp Med* 66: 373-394.
- Voorhout WF, Veenendaal T, Haagsman HP, Weaver TE, Whitsett JA, van Golde LM, Geuze HJ. 1992. Intracellular processing of pulmonary surfactant protein B in an endosomal/lysosomal compartment. *The American journal of physiology* 263:479-486.
- Vorbroker DK, Voorhout WF, Weaver TE, Whitsett JA. 1995. Posttranslational processing of surfactant protein C in rat type II cells. *The American journal of physiology* 269:727-733.

- Voss T, Melchers K, Scheirle G, Schafer KP. 1991. 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. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 4:88-94.
- Voss T, Schafer KP, Nielsen PF, Schafer A, Maier C, Hannappel E, Maassen J, Landis B, Klemm K, Przybylski M. 1992. Primary structure differences of human surfactant-associated proteins isolated from normal and proteinosis lung. *Biochimica et biophysica acta* 1138:261-267.
- Wert SE, Yoshida M, LeVine AM, Ikegami M, Jones T, Ross GF, Fisher JH, Korfhagen TR, Whitsett JA. 2000. Increased metalloproteinase activity, oxidant production, and emphysema in surfactant protein D gene-inactivated mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:5972-5977.
- Weston WM, LeClair EE, Trzyna W, McHugh KM, Nugent P, Lafferty CM, Ma L, Tuan RS, Greene RM. 1999. Differential display identification of plunc, a novel gene expressed in embryonic palate, nasal epithelium, and adult lung. *The Journal of biological chemistry* 274:13698-13703.
- White RT, Damm D, Miller J, Spratt K, Schilling J, Hawgood S, Benson B, Cordell B. 1985. Isolation and characterization of the human pulmonary surfactant apoprotein gene. *Nature* 317:361-363.
- Whitsett JA, Hull WM, Ohning B, Ross G, Weaver TE. 1986a. Immunological Identification of a Pulmonary Surfactant-Associated Protein of Molecular-Weight = 6000 Daltons. *Pediatric Research* 20:744-749.
- Whitsett JA, Ohning BL, Ross G, Meuth J, Weaver T, Holm BA, Shapiro DL, Notter RH. 1986b. Hydrophobic surfactant-associated protein in whole lung surfactant and its importance for biophysical activity in lung surfactant extracts used for replacement therapy. *Pediatric research* 20:460-467.
- Whitsett JA, Wert SE, Weaver TE. 2010. Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease. *Annual review of medicine* 61:105-119.
- Willander H, Askarieh G, Landreh M, Westermarck P, Nordling K, Keranen H, Hermansson E, Hamvas A, Noguee LM, Bergman T, Saenz A, Casals C, Aqvist J, Jornvall H, Berglund H, Presto J, Knight SD, Johansson J. 2012. High-resolution structure of a BRICHOS domain and its implications for anti-amyloid chaperone activity on lung surfactant protein C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Wissel H, Lehfelddt A, Klein P, Muller T, Stevens PA. 2001. Endocytosed SP-A and surfactant lipids are sorted to different organelles in rat type II pneumocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281:L345-360.
- Woodworth BA, Wood R, Bhargava G, Cohen NA, Baatz JE, Schlosser RJ. 2007. Surfactant protein B detection and gene expression in chronic rhinosinusitis. *The Laryngoscope* 117:1296-1301.
- Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, Birrer P, Bellon G, Berger J, Weiss T, Botzenhart K, Yankaskas JR, Randell S, Boucher RC, Doring G. 2002. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 109:317-325.
- Yang L, Johansson J, Ridsdale R, Willander H, Fitzen M, Akinbi HT, Weaver TE. 2010. Surfactant protein B propeptide contains a saposin-like protein domain with antimicrobial activity at low pH. *J Immunol* 184:975-983.

- Yoshida Y, Ban Y, Kinoshita S. 2009. Tight junction transmembrane protein claudin subtype expression and distribution in human corneal and conjunctival epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science* 50:2103-2108.
- Yu SH, Chung W, Olafson RW, Harding PGR, Possmayer F. 1987. Characterization of the Small Hydrophobic Proteins Associated with Pulmonary Surfactant. *Biochimica et Biophysica Acta* 921:437-448.
- Yu SH, Possmayer F. 1990. Role of bovine pulmonary surfactant-associated proteins in the surface-active property of phospholipid mixtures. *Biochimica et biophysica acta* 1046:233-241.
- Yu SH, Wallace D, Bhavnani B, Enhorning G, Harding PG, Possmayer F. 1988. Effect of reconstituted pulmonary surfactant containing the 6000-dalton hydrophobic protein on lung compliance of prematurely delivered rabbit fetuses. *Pediatric research* 23:23-30.
- Zhang S, McCormack FX, Levesque RC, O'Toole GA, Lau GW. 2007. The flagellum of *Pseudomonas aeruginosa* is required for resistance to clearance by surfactant protein A. *PLoS One* 2:e564.
- Zhang Z, Henzel WJ. 2004. Signal peptide prediction based on analysis of experimentally verified cleavage sites. *Protein science : a publication of the Protein Society* 13:2819-2824.

## 7. Anhang

### 7.1 Immunogold-Transmissions-Elektronenmikroskopie an Bakterien

1. Tag: - 5 ml Bakterien Übernachtskultur (ÜN) ansetzen, 10 h 37°C
2. Tag: - ÜN auf eine Agarplatte überimpfen und bei 37°C bebrüten  
- Kolonie picken und in neue 5 ml ÜN überführen, 10 h 37°C
3. Tag: - ÜN 10 min 4000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen  
- Pellet mit 1 ml frischem 4 % PFA vorsichtig mischen, 5 min inkubieren  
- im Anschluss 5 min 4000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen  
- Pellet mit 2 ml frischem 4 % PFA vorsichtig mischen, 20 min Schüttelinkubation  
- im Anschluss 5 min 4000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen  
- Pellet mit 1 ml PBS vorsichtig mischen, zentrifugieren 5 min 6000 rpm  
- Pellet mit 1 ml PBS vorsichtig mischen, 20 min Schüttelinkubation 150 rpm  
- im Anschluss 5 min 6000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen  
- Bakterien-Probe mit Primär-Antikörper 1:50 - 100 versetzen  
- ÜN Schüttelinkubation 150 rpm bei 4°C
- 4 Tag: - ÜN 5 min 6000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen  
- Pellet mit 1 ml PBS mischen, 10 min Schüttelinkubation  
- im Anschluss 5 min 6000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen  
- Pellet mit 1 ml PBS mischen, 20 min Schüttelinkubation  
- im Anschluss 5 min 6000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen  
- Bakterien-Probe mit Sekundär-Antikörper 1:100 - 200 versetzen  
- 1 - 2 h Schüttelinkubation 150 rpm bei RT  
- Kultur 5 min 6000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen  
- Pellet mit 1 ml PBS mischen, 20 min Schüttelinkubation 150 rpm  
- im Anschluss 5 min 6000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen  
- Pellet + 1 ml 2,5 %-ige Glutaraldehydsg. mischen, 25 min Schüttelinkubation 150 rpm  
- im Anschluss 5 min 6000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen  
- Pellet mit 1 ml PBS mischen und im Kühlschrank aufbewahren
- 5 Tag: - Bakterien-Probe 5 min 6000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen  
- Pellet + 1 ml 0,5 % OSO<sub>4</sub> in PBS mischen, 40 min Schüttelinkubation 150 rpm  
- im Anschluss 5 min 6000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen  
- Pellet + 1 ml PBS mischen, 25 min Schüttelinkubation 150 rpm  
- im Anschluss 5 min 6000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen  
- Pellet + 1 ml dest. H<sub>2</sub>O mischen, 10 min Schüttelinkubation 150 rpm  
- im Anschluss 5 min 6000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen  
- Pellet + 400 µl Silverenhancement, 40 min Schüttelinkubation 150 rpm  
- + 400 µl dest. H<sub>2</sub>O und gut mischen



## Anhang

- im Anschluss 5 min 6000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet + 1 ml dest. H<sub>2</sub>O mischen, 10 min Schüttelinkubation 150 rpm
- im Anschluss 5 min 6000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet + 1 ml PBS mischen, 45 min Schüttelinkubation 150 rpm
- im Anschluss 5 min 6000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet in 20 µl PBS lösen und mit 200 µl 4 % low melt agarose (40°C) mischen im Deckel eines 1,5 ml Reaktionsgefäßes
- nach dem Erkalten in 70 %-igen ETOH überführen, ÜN Schüttelinkubation 150 rpm RT
- 6 Tag: - Agarpellet zerteilen, in frischen 70 %-igen ETOH überführen, 3 Tage Schüttelinkubation 150 rpm bei RT für 3 Tage
- 9 Tag: Eponeinbettung:
  - Pellets in aufsteigende Alkoholreihe in 80 %-igen, 90 %-igen, und 100 %-igen ETOH (2-5 ml) überführen, Inkubation je 1 h bei RT
  - Pellets in frisches Aceton/ETOH-Gemisch überführen (100 %-ig, 1:1, 2-5 ml), Inkubation für 45 min bei RT
  - Gemisch absaugen und 100 % Aceton (2-5 ml) zugeben, Inkubation 30 min bei RT
  - Flüssigkeit entfernen und Epon/Aceton-Gemisch (2-5 ml) zugeben (100 %-ig, 1/3 Epon + 2/3 Aceton), Inkubation für 3 h bei RT
  - Flüssigkeit entfernen und neues Epon/Aceton-Gemisch (2-5 ml) zugeben (100 %-ig, 2/3 Epon + 1/3 Aceton), Inkubation ÜN bei RT
- 10 Tag: Flüssigkeit entfernen und reines Epon (2-5 ml) zugeben, Inkubation für 48 h bei RT
- 12 Tag: Einbettung:
  - erfolgt in Alu-Schälchen
  - Inkubation für 24 h bei 60 °C
  - Inkubation für 48 h bei 90 °C
- 15 Tag: - Schneiden am Ultradünnschnittmikrotom

### 7.2 Elektroporation - Transfektion der Plasmide in *Leishmania tarentolea*

- 1. Tag: - aus der Vorkultur ( $6 \times 10^7$  Zellen/ml) wird eine frische 10 ml Kultur angesetzt
- unter der Betrachtung der Morphologie wird eine  $1 \times 10^7$  ml Kultur angesetzt
- 3. Tag: - eine neue  $1 \times 10^7$  ml Kultur
- 5. Tag: - Wachstumskultur mindestens  $6 \times 10^7$  Zellen/ml
- *L. tarentolea* sollten rundlich und vital erscheinen
- Zellen 5 min 2000 g bei RT zentrifugieren und im halben Volumen vom Überstand resuspendieren (d.h. 5 ml Kultur zentrifugieren und in 2,5 ml lösen, entspricht  $12 \times 10^7$  Zellen/ml Suspension von *L. tarentolea*)
- Lexsy auf Eis für 10 min kühlen → parallel das Plasmid fertig machen
- 0,1µg – 5 µg Plasmid in max. 50 µl dest. H<sub>2</sub>O lösen
- Plasmid und 350 µl Lexsy-Lösung gut mischen und in gekühlte Elektroporation-Küvetten überführen → Achtung Luftblasen bleiben!!!!
- Elektroporation mit 450 V, 450 µF

## Anhang

- die Pulszeit sollte 5-6 msec. betragen
  - zum Testen Kontrollkultur nutzen, um die Zeit zu ermitteln
  - anschließend die Küvette zurück auf das Eis für 10 min. (Zeit exakt einhalten)
  - anschließend die elektroporierten Zellen mit 10 ml Medium versetzen
  - Kultur stehen lassen bei 26°C, dunkel
- 6 Tag:
- nach ca. 20 Stunden, Selektionsmedium zugeben (100 µg/ml Lexsy NTC)
  - die Kultur 5 Tage stehen lassen bei 26°C, dunkel
- 11 Tag:
- Kulturansätze passagieren, max. 1:2 Verdünnung herstellen für 5 ml  
(bei einer 1:10 Verdünnung sterben die Zellen ab!!!)
  - Rest Zellen 5 min bei RT zentrifugieren (2000 g) und in 1 ml Überstand resuspendieren und ebenfalls frisches Medium zugeben (10 ml)
  - alle Ansätze erfolgen jetzt nur noch mit Selektionsmedium (100 µg/ml Lexsy NTC, 10 µl Stammlösung auf 10 ml Medium)
  - die Kultur 5 Tage stehen lassen bei 26°C, dunkel
- 16 Tag:
- Kulturansätze 5 min bei RT zentrifugieren (2000 g) und in 1 ml Überstand resuspendieren und frisches Medium zugeben (10 ml)
  - alle Ansätze erfolgen jetzt nur noch mit Selektionsmedium (100 µg/ml Lexsy NTC)
  - die Kultur 5 Tage stehen lassen bei 26°C, dunkel
- 21 Tag:
- Kulturansätze sollten eine hohe Dichte an Organismen zeigen, dann erste Verdünnungen herstellen (wenn sie wieder schnell eine hohe Dichte erreichen erste PCRs auf Konstrukte durchführen)
  - Kulturansätze passagieren, 1:5 und 1:10 Verdünnung herstellen für 10 ml
  - alle Ansätze erfolgen jetzt nur noch mit Selektionsmedium (100 µg/ml Lexsy NTC)
  - die Kultur stehen lassen bei 26°C, dunkel

### 7.3 Übersicht der für molekularbiologische Untersuchungen verwendeten Bakterienstämme

Organismus	Bakterienstamm	Name	weitere Informationen
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 35556	SA 113	Institut für Hygiene Martin-Luther-Universität, von NCTC 8325
	ATCC 12228	SA N315	Robert Koch-Institut Berlin, Patientenisolat 1982
	NCTC 8325		Robert Koch-Institut Berlin
		SA 8	Institut für Hygiene Martin-Luther-Universität, Patientenisolat
		SA 16	Institut für Hygiene Martin-Luther-Universität, Patientenisolat
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		PA 01
ATCC 14442			Institut für Hygiene Martin Luther-Universität
ATCC 27853			Institut für Hygiene Martin-Luther-Universität
		PA 154	Institut für Hygiene Martin-Luther-Universität, Umweltisolat
		PA 12	Institut für Hygiene Martin-Luther-Universität, Patientenisolat
<i>Escherichia coli</i>		ATCC 35218	

## 7.4 Übersicht der verwendeten Oligonukleotid-Primer

Gen	Primer	Sense primer, 5' → 3'	Antisense primer, 5' → 3'	Size, bp	Annealing-temp., °C
SP-A	strict	CACCATGTGGCTGTGCCCTCTGGCCCTCAA	TCACTAGATGGTCAGTCGGGAGTACA	744	60
	real2	CATTGCTGTCCCAAGGAATC	CCGTCTGAGTAGCGGAAGTC	125	60
	A2/A4	GATGGGCAGTGAATGACAGG	GGAATGAAGTGGCTAAGGGTG	212	56
SP-B	pre strict	CACCATGGCTGAGTCACACCTGCT	CTAGATGTAGTAGAGCGGCA	1146	60
	mature	CACCATGTTCCCCATTCTCT	TCATCCATGGAGCACCGGAGGACGA	239	60
	real2	CAAACGGCATCTGTATGCAC	CGGAGAGATCCTGTGTGTGA	194	52
SP-C	pre strict	CACCATGGATGTGGGCAGCAAAGA	CTAGATGTAGTAGAGCGGCA	594	60
	mature	CACCATGTTTGGCATTCCCTGCTG	CTATGGAGACCCATGAGCA	101	58
	real1	TCATCGTCGTGGTGATGGTG	ATGGAGAAGGTGGCAGTGGTAA	110	55
	real3	CTGGTTACCACTGCCACCTT	TCAAGACTGGGGATGCTCTC	142	57
SP-D	strict	CACCATGCTGCTTTCCTCCTCTCT	GAACTCGCAGACCACAAGA	1128	60
	real1	TGCTGCTTTCCTCCTCTCTGC	GGGCGTTGTTCTGTGGGAGTAG	95	55
	real3	AGGAGCAAAGGGAGAAAAGTGGG	CAGCTGTGCCTCCGTAATGG	199	55
SP-G	pre strict	AGCGTGAGCAGGAAGGTTCT	GCGCCATGTAAGAGAGCTCT	250	60
	SP-Gs unk	CTGAAGCTGAAGGAGTCT	ACACAGGCTTCAATGGCTGTC	190	54
	SP-G 3	AACAGGGCCGGGTATGAC	CGAACTTTTCTCGAGACGGA	110	54
SP-H	SP-H1	CACCATGAGAGCCGGGT	TCATGCAGTATGAATAATTAACATCTT	270	64
	SP-H2	AAGCCGGGTTTTCTGACTT	GTATCCGCTTTTCCCTCTCC	157	58
	SP-H3	GAGAGGGAAAAGCGGATACC	CGGATGAACTCCTGCTTTGT	112	58

## 7.5 Übersicht der verwendeten Antikörper

Protein	Molekulargewicht (kDa)	Methode	Antikörper	Konzentration	Firma, Katalog Nummer
SP-A	28-36; 66	WB / IHC	Mouse monoclonal anti human SP-A	1:500 / 1:100	Millipore; MAB3270
SP-A	28-36; 66	WB / IHC	Rabbit polyclonal anti human SP-A	1:500 / 1:100	Santa Cruz; sc-7700
SP-B	8; 18; 40	WB / IHC	Mouse monoclonal anti human SP-B	1:500 / 1:100	Acris; DM3204
SP-B	8; 18; 40	WB / IHC	Rabbit polyclonal anti human SP-B	1:500 / 1:100	Abcam; AB40786
SP-B	8; 18; 40	WB / IHC	Mouse monoclonal anti human SP-B	1:500 / 1:100	Millipore; MAB3276
SP-C	4-6; 6-12; 21; 26	WB / IHC	Rabbit polyclonal anti SP-C human	1:500 / 1:100	Chemicon; AB3786
SP-D	43	WB / IHC	Mouse monoclonal anti human SP-D	1:500 / 1:100	Acris; BM4083
SP-D	43	WB / IHC	Mouse monoclonal anti human SP-D	1:500 / 1:100	Acris; BM4005
SP-D	43	WB / IHC	Rabbit polyclonal anti human SP-D	1:500 / 1:100	Santa Cruz; sc-7708
SP-G	----	WB / IHC	Rabbit polyclonal anti human SP-G	1:200 / 1:100	SeqLab
SP-H	----	WB / IHC	Rabbit polyclonal anti human SP-G	1:200 / 1:100	SeqLab

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit „Humane Surfactant Proteine - Detektion und Charakterisierung“ erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Erlangen, den 15.11.2012



Martin Schicht

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name, Vorname: Schicht, Martin  
Anschrift: Jahnstraße 10  
91054 Erlangen  
Geburtsdatum: 06.10.1980 in Dessau  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

## Werdegang

Schulbildung:  
1987 - 1991 25. Oberschule Dessau  
1991 - 2000 Liborius-Gymnasium Dessau; Abitur 2000

Zivildienst:  
2000 - 2001 „Die Johanniter“, Ausbildung zum Rettungssanitäter

Studium:  
2001 – 2007 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
2006 - 2007 Diplomarbeit: „Die Molekulargenetische Analyse der Histone-demethylase LID in *Drosophila melanogaster*“ am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, AG Prof. G. Reuter  
03/2007 Abschluss Diplom-Biologe

Tätigkeit:  
09/2007 - 12/2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
01/2009 - 12/2011 Dissertation: „Humane Surfactant Proteine - Detektion und Charakterisierung“ am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
01/2012 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Anatomie LS II der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg