

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

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Dietrich

Molekulare Ursachen interstitieller Lungenerkrankungen



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

vorgelegt von
Christiane Alexandra Sparr

aus
München
2009

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Griese

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Dorit Nägler
Priv. Doz. Dr. Martin Kohlhäufel

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Markus Woischnik

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2009

Diese Arbeit widme ich meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung	4
1.1 Interstitielle Lungenerkrankungen	4
1.2 Zusammensetzung und physiologische Rolle von Surfactant.....	5
1.2.1 Proteinanteil des Surfactants	6
1.2.2 Lipidanteil des Surfactants	7
1.3 Prozessierung der Surfactantproteine.....	10
1.4 Struktur und Funktion von Surfactantprotein C	12
1.5 Prozessierung von Surfactantprotein C	12
1.6 Surfactantprotein-C-Mutationen und ihre Auswirkungen.....	13
2 Zielsetzung	17
2.1 Analyse der Prozessierungsintermediate.....	17
2.2 Morphologie der Lamellarkörperchen	18
2.3 Intrazelluläre Lokalisierung von proSP-C.....	18
2.4 Verhalten gegenüber exogenem Stress.....	18
2.5 Einfluss der proSP-C-Expression auf die Hitzeschockproteinexpression	19
2.6 Zelluläre Lipidzusammensetzung.....	20
2.7 Stimulation der Rezeptorexpression auf Immunzellen durch lösliche Faktoren im Kulturüberstand.....	20
3 Material und Methoden	21
3.1 Material	21

3.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterial	21
3.1.2	Fertiggebinde	22
3.1.3	Chemikalien	23
3.1.4	Sonstige Reagenzien	24
3.1.5	Zellkulturmedien.....	25
3.1.6	Puffer und Lösungen.....	25
3.1.7	Verwendete Zelltypen	26
3.1.8	Antikörper	27
3.1.9	Vektoren	28
3.1.9.1	pcDNA3/HA-hSP-C ^{Wt}	29
3.1.9.2	pEGFP-C1/hSP-C ^{Wt} und pEGFP-N1/hSP-C ^{Wt}	30
3.1.9.3	Erzeugte Vektoren	31
3.1.10	Oligonukleotide	32
3.2	Methoden	33
3.2.1	Kultivierung und Aufbewahrung von E.coli.....	33
3.2.1.1	Vorbereitung der Kulturschalen für E.coli-Kulturen	33
3.2.1.2	E.coli-Zellkultur	33
3.2.1.3	Herstellung rubidiumchloridkompetenter E.coli-Zellen.....	33
3.2.1.4	Transformation von Plasmid-DNA in E.coli-Zellen	34
3.2.2	Allgemeine Zellkulturtechniken	35
3.2.2.1	Einfrieren der Zellen	35
3.2.2.2	Auftauen der Zellen	35
3.2.2.3	Viabilitätstestung.....	35
3.2.2.4	Mykoplasmentest.....	36
3.2.2.5	Zelllysat	37
3.2.2.6	Selektionskonzentration des Antibiotikums.....	37
3.2.2.7	Transfektion	38
3.2.2.8	Arzneimittel-Vorbehandlung der Kulturen	39
3.2.2.9	Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation der Lamellarkörperchen	39
3.2.2.10	Isolation der Large Aggregates.....	40
3.2.2.11	Lymphozyten- / Neutrophilenisolation	41
3.2.3	DNA-Methoden	42
3.2.3.1	Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus E.coli.....	42
3.2.3.2	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus E.coli.....	42
3.2.3.3	Restriktionsanalyse von DNA	43
3.2.3.4	Agarosegelelektrophorese von DNA.....	43
3.2.3.5	Quantifizierung von DNA	44
3.2.3.6	Polymerase-Kettenreaktion	44
3.2.3.7	Punktmutagenese mittels PCR.....	45
3.2.3.8	DNA-Sequenzierung.....	46
3.2.4	Biochemische Methoden.....	46
3.2.4.1	Quantitative Proteinbestimmung.....	46
3.2.4.2	LDH-Assay	46

3.2.5	Zellbiologische Methoden	47
3.2.5.1	Austestung der verträglichen Arzneimittelkonzentration	47
3.2.5.2	Elektronenmikroskopie	48
3.2.5.3	Analyse der Phospholipide mittels Massenspektrometrie	49
3.2.6	Immunologische Methoden	50
3.2.6.1	1D-SDS-PAGE	50
3.2.6.2	Coomassie-Färbung des SDS-Gels.....	50
3.2.6.3	Silberfärbung des SDS-Gels.....	51
3.2.6.4	Immunodetektion mittels Westernblot.....	51
3.2.6.5	Immunohistochemie.....	52
3.2.6.6	Durchflusszytometrie	53
3.2.7	Statistik	55
4	Ergebnisse.....	56
4.1	Allgemeine Vorarbeiten.....	56
4.1.1	Erzeugung verschiedener Zielvektoren.....	56
4.1.2	Transfektion	61
4.1.2.1	Optimierung der Transfektionseffizienz	61
4.1.2.2	Stabile Transfektion	62
4.1.3	Austestung der verträglichen Arzneimittelkonzentration	63
4.1.4	LDH-Assay zum Toxizitätsausschluss	65
4.2	Prozessierung von Wildtyp proSP-C im Vergleich zu mutiertem proSP-C	66
4.2.1	Entwicklung eines Modells zur Identifizierung verschiedener SP-C Prozessierungsstufen	66
4.2.2	Analyse der Prozessierungsintermediate bei I73T-mutiertem proSP-C im Vergleich zu Wildtyp proSP-C.....	69
4.2.3	Analyse der Prozessierungsintermediate bei I73T-mutiertem proSP-C im Vergleich zu Prozessierungsintermediaten, die in der Lungenflüssigkeit von Patienten gefunden wurden	72
4.2.4	Analyse der Prozessierungsintermediate bei A116D-mutiertem proSP-C im Vergleich zu Wildtyp proSP-C.....	73
4.2.5	Analyse der Prozessierungsintermediate bei P30L-, L110R-, P115L- oder L188Q-mutiertem proSP-C im Vergleich zu Wildtyp proSP-C.....	75
4.3	Morphologie der Lamellarkörperchen	77
4.3.1	Morphologie der Lamellarkörperchen bei Wildtyp proSP-C und I73T- oder A116D-mutiertem pro SP-C	78
4.3.2	Morphologie der Lamellarkörperchen bei P30L-, L110R-, P115L- oder L188Q-mutiertem proSP-C	80
4.4	Intrazelluläre Lokalisierung der Zwischenformen von proSP-C	82

4.5	Verhalten von transfizierten MLE-12-Zellen gegenüber exogenem Stress.....	85
4.6	Einfluss der proSP-C-Expression auf die Hitzeschockproteinexpression	86
4.6.1	Expression der Hitzeschockproteine bei Wildtyp proSP-C, I73T- und A116D-mutiertem proSP-C	86
4.6.2	Expression der Hitzeschockproteine bei Wildtyp proSP-C, P30L-, L110R-, P115L- und L188Q-mutiertem proSP-C.....	88
4.7	Zelluläre Lipidzusammensetzung.....	90
4.7.1	Analyse der Lipidzusammensetzung des Zelllysates.....	91
4.7.1.1	Darstellung der Unterschiede innerhalb der einzelnen Lipidklassen des Zelllysates.....	94
4.7.1.2	Betrachtung der Auffälligkeiten der einzelnen Fettsäuren der jeweiligen Lipidklassen des Zelllysates	97
4.7.2	Analyse der Lipidzusammensetzung des Kulturüberstandes.....	99
4.7.2.1	Darstellung der Unterschiede innerhalb der einzelnen Lipidklassen des Kulturüberstandes.....	102
4.7.2.2	Betrachtung der Auffälligkeiten der einzelnen Fettsäuren der jeweiligen Lipidklassen des Kulturüberstandes	105
4.7.3	Korrektives Potential von Methylprednisolon und Hydroxychloroquin.....	107
4.7.4	Gegenüberstellung Lipidmessung von Zelllysat und Kulturüberstand.....	108
4.8	Analyse der Rezeptorexpression auf Immunzellen	110
4.8.1	Oberflächenexpression von CCR-2 auf Lymphozyten	110
4.8.2	Oberflächenexpression von CXCR-1 auf Lymphozyten.....	111
4.8.3	Oberflächenrezeptorexpression von CXCR-1 und CD11b auf Neutrophilen...	111
5	Diskussion.....	113
5.1	Prozessierungsmuster	113
5.2	Morphologie der Lamellarkörperchen	116
5.3	Intrazelluläre Lokalisierung der Zwischenformen von proSP-C	116
5.4	Verhalten gegenüber exogenem Stress.....	117
5.5	Einfluss der proSP-C-Expression auf die Hitzeschockproteinexpression	118
5.6	Zelluläre Lipidzusammensetzung.....	119
5.7	Stimulation der Rezeptorexpression auf Immunzellen	120

6	Zusammenfassung	122
7	Anhang	124
7.1	Datenverzeichnis	124
7.1.1	Viabilitätstests	124
7.1.2	Zelluläre Lipidzusammensetzung.....	130
7.1.2.1	Originalmessdaten Lipide - Vorversuch	131
7.1.2.2	Originalmessdaten Lipide - Hauptversuch	134
7.1.2.3	Originalmessdaten der Fettsäurekomponenten von Phosphatidylcholin	139
7.1.2.4	Originalmessdaten der Fettsäurekomponenten von Lysophosphatidylcholin.....	144
7.1.2.5	Originalmessdaten der Fettsäurekomponenten von Phosphatidylglycerol.....	147
7.1.2.6	Originalmessdaten der Fettsäurekomponenten von Sphingomyelin.....	149
7.1.2.7	Originalmessdaten der Fettsäurekomponenten von Ceramid und Glucosylceramid	151
7.1.2.8	Ergebnisse des Vorversuches	153
7.2	Literaturverzeichnis	159
7.3	Tabellenverzeichnis	166
7.4	Abbildungsverzeichnis	167
7.5	Danksagung.....	170
7.6	Lebenslauf	171

Abkürzungsverzeichnis

AUC	Area under the curve
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
bp	base pairs
BSA	Bovines Serumalbumin
Cb	Composit body
CCR	Chemokinrezeptor
CD	Cluster of differentiation
Cer	Ceramid
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CS	Cloning site
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DihSPM	Dihydro-Sphingomyelin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DPPG	Dipalmitoylphosphatidylglycerol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FSC	Forward scatter
GFP	Green fluorescent protein
GluCer	Glucosylceramid
GM-CSF	Granulozytes makrophages – colony stimulating factor
Hsc	Heat shock cognate
Hsp	Heat shock protein
IEP	Isoelektrischer Punkt
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin

ILD	Interstitial lung disease
IPF	Interstitial pulmonary fibrosis
kDa	Kilodalton
LA	Large Aggregates
Lb	Lamellar body / Lamellarkörperchen
LB-Medium	Lysogeny broth medium
LDH	Laktatdehydrogenase
LPC	Lysophosphatidylcholin
MCS	Multiple Cloning Site
MEM	Minimal essential medium
MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
Mvb	Multivesicular body / multivesikuläre Körperchen
OD	optische Dichte
PAP	Pulmonale Alveolarproteinose
PE	Phosphatidylethanolamin
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PFC	Perfluorcarbon
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipide
Pla	Plasmalogen
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ROC	Responder Operator Curve
RPM	Round per minut
RSD	Relative Standardabweichung
RT	Raumtemperatur
SA	Small Aggregates
SDS-PAGE	Sodiumdocecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

SEM	Standard Error of Mean
SFTPb	Surfactantprotein B
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
SP-A, B, C, D	Surfactantprotein A, B, C, D
SPM	Sphingomyelin
SSC	Side scatter
TBS	Tris buffered saline
UV	Ultraviolett
Wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Interstitielle Lungenerkrankungen

Interstitielle Lungenerkrankungen umfassen ein weites Spektrum von Krankheiten, die vor allem das Interstitium und die Alveolen der Lunge betreffen. Sie stellen eine heterogene Gruppe dar, die durch Entzündungsprozesse und fibrotische Vorgänge im Lungenparenchym und in den kleineren Atemwegen gekennzeichnet ist. Klinisch bemerkbar machen sich interstitielle Lungenerkrankungen durch unproduktiven Husten, Dyspnoe, Tachypnoe und Gedeihstörungen. Es liegen restriktive, teilweise auch obstruktive Ventilationsstörungen und latente Gasaustauschstörungen vor. Im Röntgenbild finden sich diffuse Infiltrate in der Lunge. Bei Kindern treten interstitielle Lungenerkrankungen seltener auf als bei Erwachsenen, aber das Vorkommen ist klinisch relevant, da es eine hohe Todesrate gibt [1].

Es gibt zahlreiche Versuche interstitielle Lungenerkrankungen zu klassifizieren. Eine mögliche Einteilung ist nach Ereignissen, die als Inflammationsbeginn identifiziert werden können. Hierzu zählen unter anderem inhalative Noxen, wie das Einatmen bestimmter Partikel oder Gase. Im Volksmund wird diese Art von interstitiellen Lungenerkrankungen beispielsweise als Staublunge, Waschmittellunge oder Asbestlunge bezeichnet. Ein Inflammationsbeginn kann auch nicht-inhalativ ausgelöst werden, zum Beispiel bei einer Strahlenpneumonitis. Interstitielle Lungenerkrankungen können aber auch in Verbindung mit einer Systemerkrankung einhergehen, wie bei der Kollagenose oder Sarkoidose.

Zumeist sind die Ursachen für interstitielle Lungenerkrankungen jedoch unbekannt [2]. Diese Gruppe wird unter idiopathische interstitielle Lungenerkrankungen (IIP) zusammengefasst. Die weitere Unterteilung idiopathischer Lungenerkrankungen beruht daher auf histologischen Kriterien. So hat die *Usual interstitial pneumonia* (UIP) ein histologisch auffälliges Bienenwabenmuster, bei dem sich fibrotische, entzündete und normale Bereiche abwechseln. Bei der *Desquamative interstitial pneumonia* (DIP) findet man eine Akkumulation von Makrophagen vor. Die *Non-specific interstitial pneumonia* (NSIP) ist durch variierende Stufen der Inflammation und Fibrose gekennzeichnet [1]. Die *Pulmonary alveolar proteinosis* (PAP) ist charakterisiert durch eine Anhäufung von Surfactantproteinen und -phospholipiden in den Lungenalveolen [3].

Erst vor wenigen Jahren wurde eine molekulare Ursache der idiopathischen interstitiellen Lungenerkrankungen entdeckt, die Beeinträchtigung des Surfactantsystems. Hierzu zählen Mutationen in den Surfactantproteinen B und C sowie dem putativen Phospholipid-Transporter ABCA3. Diese Mutationen haben Auswirkungen auf Surfactantsynthese, -homöostase und -sekretion. Sind Defekte im GM-CSF-Rezeptor vorhanden, wird das Surfactantrecycling bei pulmonaler Alveolarproteinose gehemmt [4-8]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Defekte im Surfactantprotein C näher untersucht, die offenbar ursächlich die Stabilisation von Surfactant stören. Denn auffällig ist, dass SP-C im Gegensatz zu SP-B nicht essentiell für die Synthese oder Sekretion von pulmonalem Surfactant zu sein scheint, sondern, dass seine Hauptfunktion bei der Stabilisation von pulmonalem Surfactant liegt [9].

Die Behandlungsstrategie beruht auf empirischen Daten. Im Vordergrund stehen die Kontrolle der Entzündungsreaktion und die Verhinderung einer fibrotischen Entwicklung. Hierzu werden hauptsächlich Corticosteroide verwendet [1;10]. Behandlungserfolge haben auch der Einsatz von Chloroquin und dem weniger toxischen Derivat Hydroxychloroquin gezeigt [10-13]. Neben der anerkannt anti-inflammatorischen Wirkung dieser Substanzen sind die molekularen Mechanismen, die über die bekannte Erhöhung der Surfactantproteintranskription [14;15] hinausgehen, unbekannt. Seltenen Einsatz finden auch Immunsuppressiva wie Azathioprin, Cyclophosphamid und Methotrexat [16]. Die postulierte Aktivität von Chloroquin auf die lysosomale Funktion, in Form von reduzierter Vesikelfunktion, Exozytose und proteolytischer Aktivität könnte einen Hinweis auf den Wirkungsmechanismus bei interstitieller Lungenerkrankungen geben [17;18]. Bedeutsam ist auch, dass Chloroquin die Fähigkeit hat, die Bildung von Lamellarkörperchen anzuregen [19].

Die Erforschung von Surfactantdefekten ist ein Beispiel, wie durch die Entdeckung einer Krankheitsursache am Patienten durch intensive klinische Forschung Stück für Stück die Todeszahlrate gesenkt und sinnvolle Therapieoptionen ausgearbeitet werden können.

1.2 Zusammensetzung und physiologische Rolle von Surfactant

Pulmonales Surfactant ist ein homogenes Gemisch aus Proteinen, Phospholipiden und neutralen Lipiden [20], das sich in dem Flüssigkeitsfilm befindet, der die Oberfläche des Alveolarraumes der Lunge benetzt. Seine physiologische Aufgabe besteht vor allem in der Senkung der Oberflächenspannung und der daraus resultierenden Stabilisierung der

Alveolen während der Atmung [21]. Diese oberflächenaktive Wirkung beruht hauptsächlich auf der amphiphilen Struktur der Phospholipide Phosphatidylcholin und Phosphatidylglycerol. Eine korrekte Zusammensetzung und Homöostase des Surfactants sind notwendig für die adäquate Funktion und den Gasaustausch in den Lungenalveolen. Zudem ist Surfactant, insbesondere mit den Surfactantproteinen A und D, an der lokalen Immunmodulation und pulmonalen Infektabwehr beteiligt [22-24].

1.2.1 Proteinanteil des Surfactants

Der Proteinanteil des Surfactants beträgt etwa 10%. Nur ungefähr die Hälfte der Proteine sind spezifische Surfactantproteine, der Rest sind Plasmaproteine. Bisher sind vier surfactantspezifische Proteine beschrieben worden: SP-A, SP-B, SP-C und SP-D (Abbildung 1) [20].

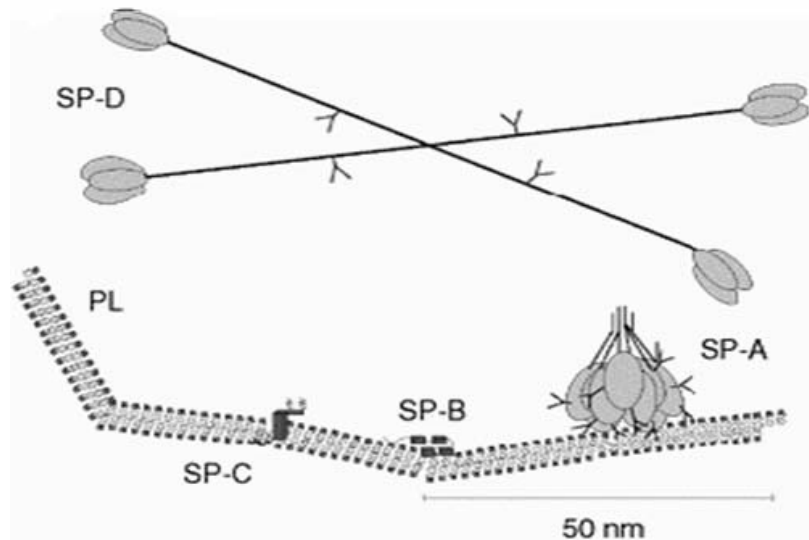


Abbildung 1: Wesentliche Proteinanteile des Surfactants. Abgebildet sind die räumliche Anordnung und relative Größe der Surfactantproteine A (SP-A), B (SP-B), C (SP-C), D (SP-D) zu den Phospholipiden (PL).

Das hydrophile Surfactantprotein A (SP-A) ist das Größte der Surfactantproteine und wird von Typ-II-Pneumozyten und Clarazellen gebildet [21;25]. Es beeinflusst zusammen mit SP-B den Surfactantmetabolismus [26;27], erhöht die oberflächenaktiven Eigenschaften des Surfactants und trägt durch die Aktivierung von Makrophagen zur Immunantwort bei [28].

Surfactantprotein B ist ein sehr hydrophobes Protein und wird in Typ-II-Pneumozyten und Clarazellen gebildet [21], kann aber nur in Typ-II-Pneumozyten zur reifen Form prozessiert

werden [29]. Es beschleunigt die Formierung eines oberflächenaktiven Filmes, indem es die Adsorption der Lipide um den Faktor >150 erhöht [20;30]. Darüber hinaus spielt SP-B eine große Rolle bei der Bildung und Speicherung des Surfactants. Unter anderem ist es für die korrekte Lagerung der Phospholipide in Form von konzentrischen Lamellen in den Lamellarkörperchen verantwortlich [31].

SP-C ist das Lipophilste der Surfactantproteine. Wie SP-B stabilisiert auch SP-C die Oberflächenaktivität des Surfactantfilms. Unter anderem erhöht es die Aufnahme der Phospholipide in Typ-II-Pneumozyten. Es wird ausschließlich von Typ-II-Pneumozyten gebildet [20;32].

SP-D hat vor allem immunologische Funktionen. Über seine biophysikalischen Funktionen ist wenig bekannt. Es ist wie SP-A ein hydrophiles Protein [33].

1.2.2 Lipidanteil des Surfactants

Zu 90% besteht Surfactant aus Lipiden, deren genauere Zusammensetzung Tabelle 1 zeigt [21;34]. Der Lipidanteil des Surfactants einer bronchoalveolären Lavage besteht zu etwa 83% aus Phospholipiden, zu 15% aus Cholesterin und zu einem sehr geringen Teil, etwa 2%, aus Neutrallipiden.

Lipide	90%
Phospholipide	83%
Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC)	36%
Ungesättigtes Phosphatidylcholin (PC)	27%
Phosphatidylglycerol (PG)	8%
Phosphatidylethanolamin (PE)	2%
Phosphatidylinositol (PI)	2%
Phosphatidylserin (PS)	2%
Lysophosphatidylcholin (LPC)	2%
Sphingomyelin (SPM)	2%
Ceramid (Cer)	2%
Cholesterin	15%
Neutrallipide	2%

Tabelle 1: Bestandteile der Surfactantlipide

Bei den Phospholipiden ist Phosphatidylcholin die Hauptkomponente (etwa 70 bis 80%), von dem ungefähr die Hälfte bis zwei Drittel in gesättigter Form als Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) vorliegt. DPPC adsorbiert allein nur sehr langsam an der Luft-Wasser-Grenzfläche. Calcium und die Surfactantproteine A, B und C beschleunigen die Ausbildung des oberflächenaktiven Surfactantfilms erheblich [35]. Phosphatidylglycerol ist das zweithäufigste Phospholipid (etwa 10%). In geringeren Anteilen kommen Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylserin, Lysophosphatidylcholin, Sphingomyelin und Ceramid vor.

Strukturell werden die Phospholipide in drei Hauptgruppen unterteilt. Es gibt die Phosphoglyceride, zu denen Phosphatidylcholin, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol und Phosphatidylserin zählen. Eine weitere Gruppe bilden die Lysophospholipide, denen das Lysophosphatidylcholin angehört. Die dritte Gruppe besteht aus den Sphingolipiden, zu denen Ceramid und Sphingomyelin zugeordnet sind. Die charakteristische Struktur der Phosphoglyceride und Lysophospholipide bildet ein Glycerolgrundkörper mit einer polaren Kopfgruppe am C3-Atom, die meist über einen Phosphatrest gebunden ist, und zwei apolaren Fettsäureresten an den beiden anderen Kohlenstoffatomen (Abbildung 2).

Das Grundgerüst der polaren Kopfgruppe dient als Namensgeber bei der Endung des Phospholipids, die Fettsäuren bestimmen das Präfix.

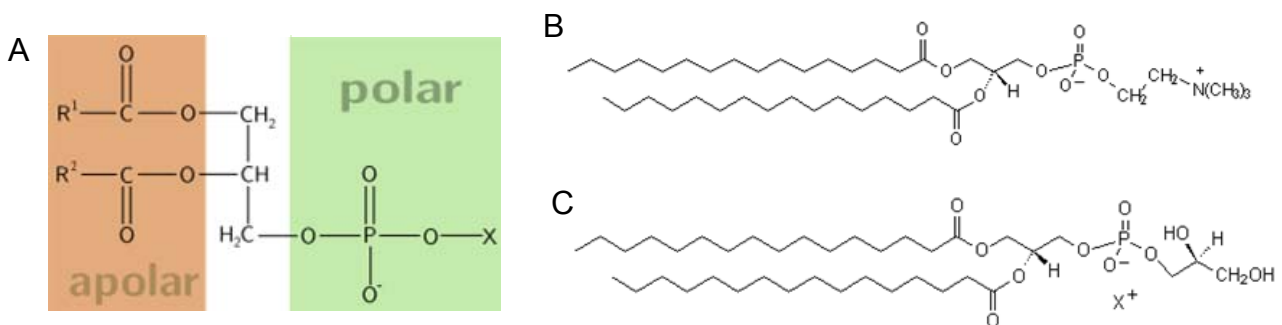


Abbildung 2: Allgemeine Grundstruktur der Phosphoglyceride. In Abbildung A ist die allgemeine Grundstruktur der Phosphoglyceride dargestellt. Sie gliedert sich in den Glycerolgrundkörper, an dem zwei Fettsäuren verestert sind (R1 und R2) und eine über einen Phosphatrest gebundene polare Kopfgruppe. Die Struktur der Kopfgruppe ist der Namensgeber des Phospholipids und wird über den Rest X definiert. Die Reihenfolge des Namens besteht also aus R1-R2-Phosphatidyl-X. Falls eine der Fettsäuren durch ein Wasserstoffatom ersetzt wird, nennt man die Struktur Lysophosphatidyl-X. In Abbildung B ist Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) dargestellt. In der Nomenklatur taucht es auch als Phosphatidylcholin 32:0 auf (PC 32:0). Das heißt, es herrscht ein Phosphatidylcholin Grundgerüst vor mit Fettsäureketten, die insgesamt 32 C-Atome und keine Doppelbindung aufweisen. In Abbildung C ist analog die Struktur von Dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG) (PG 32:0) dargestellt.

Zwei typische Beispiele für Phospholipide sind Phosphatidylcholin und Phosphatidylglycerol. Besitzen sie als Fettsäurereste je zwei Palmitinsäuren, entsteht Dipalmitoylphosphatidylcholin (Abbildung 2 B) und Dipalmitoylphosphatidylglycerol (Abbildung 2 C).

Die Struktur der Sphingolipide (Abbildung 3) wird durch Sphingosin, einen langkettigen, ungesättigten C₁₈-Aminoalkohol dominiert, der über eine Amidbindung mit einer Fettsäure das Grundgerüst der Sphingolipide darstellt. Diese Zwischenstufe bezeichnet man als Ceramid. Wird der Alkohol verestert, bildet sich das Sphingomyelin, geht er eine Etherbindung mit einem Zuckerrest ein, bilden sich Glycolipide.

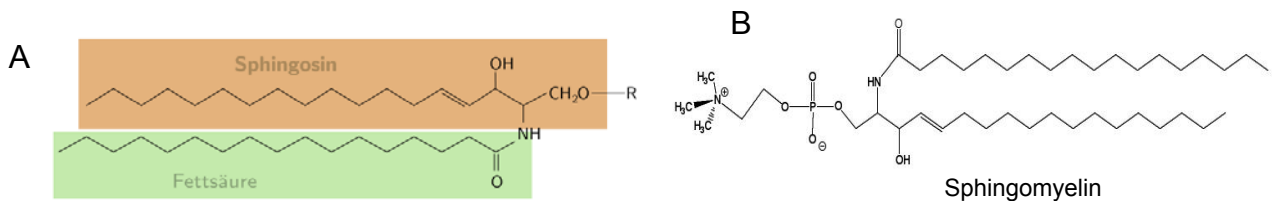


Abbildung 3: Struktur der Sphingolipide. In Abbildung A ist die allgemeine Grundstruktur der Sphingolipide dargestellt. Sie besteht aus einem ungesättigten C₁₈-Aminoalkohol, der über eine Amidbindung mit einer Fettsäure verbunden ist. Liegt der freie Alkohol vor, in diesem Fall ist der Rest in der Abbildung A ein Wasserstoffatom, nennt sich die Struktur Ceramid. In Abbildung B ist Sphingomyelin dargestellt. Hier wurde der Alkohol mit Phosphatidylethanolamin verestert, in diesem Fall ist der Rest in Abbildung A Phosphoethanolamin. Geht der Alkohol eine Etherbindung mit einem Zucker ein, in diesem Fall ist der Rest in Abbildung A ein Saccharid, bezeichnet man die Struktur als Glycolipid.

Neben den Phospholipiden ist Cholesterin (Abbildung 4) ein weiterer Bestandteil des Surfactants und hat vor allem strukturgebende Eigenschaften.

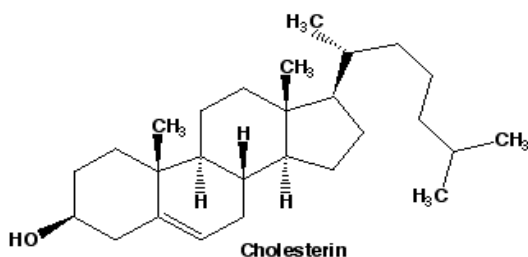


Abbildung 4: Struktur von Cholesterin

1.3 Prozessierung der Surfactantproteine

Typ-II-Pneumozyten sind der Ort der Surfactanthomöostase. Neben den auf den Gasaustausch spezialisierten, flachen, weit ausgedehnten Typ-I-Zellen kleiden sie als Epithelzellen etwa 10% der Oberfläche der Alveolen aus [36]. Sie sind weitaus größer als Typ-I-Zellen und von kubischer Gestalt.

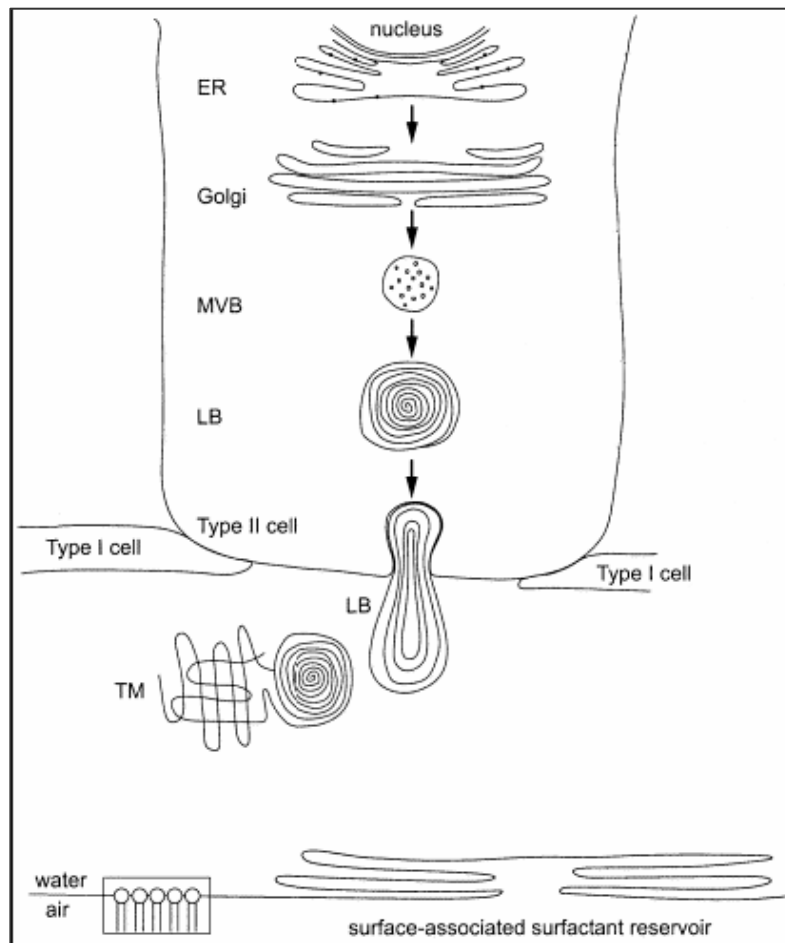


Abbildung 5: Ablauf des Surfactantmetabolismus (Ten Brinke et al.). Dargestellt ist die Prozessierung der Surfactantproteine. Ihre Synthese findet im Endoplasmatischen Retikulum (ER) von Typ-II-Pneumozyten statt. Anschließend werden sie am Golgi-Apparat und den multivesikulären Körperchen (Mvb) modifiziert, um letztendlich intrazellulär in Form von Lamellarkörperchen (LB) gespeichert zu werden. Diese werden dann über Exozytose in den Alveolarraum abgegeben.

Wie in Abbildung 5 schematisch dargestellt, geschieht die Synthese der Surfactantproteine im endoplasmatischen Retikulum der Typ-II-Pneumozyten. Anschließend werden sie am Golgi-Apparat und an multivesikulären Körperchen modifiziert, um dann intrazellulär in Form von Lamellenkörperchen gespeichert zu werden [37;38]. Die Lamellenkörperchen sind in mehreren Lipidschichten um den proteinreichen Kern angeordnet und stellen die

charakteristischen Speicherorganellen für das Surfactant dar [29]. Sie werden durch Exozytose in die wässrige Subphase, die den Alveolarraum auskleidet, sezerniert. Hierbei bilden sie die typischen Strukturen des Surfactants aus, bekannt als tubuläres Myelin und *large aggregates*. Sie besitzen oberflächenaktive Eigenschaften. Phospholipide extrazellulärer Surfactantstrukturen bilden kontinuierliche Mono- und Multilayers, die als Abgrenzung zwischen Luft- und Wasserphase dienen. Hierbei zeigen die polaren Köpfe der Phospholipide zur wässrigen Phase und der hydrophobe Schwanz zur Gasphase. Durch mechanische und biologische Prozesse wird das Surfactant inaktiviert und konvertiert zu kleinen, oberflächeninaktiven Aggregaten, den *small aggregates*. Etwa 70 bis 80 % dieser kleinen Aggregate werden durch alveolare Typ-II-Zellen aufgenommen und dort entweder recycelt oder zum Phagolysosom transportiert und dort abgebaut (Abbildung 6) [39;40]. Die Wiederaufnahme in Typ-II-Pneumozyten wird durch alle Surfactantproteine und Calcium gefördert. Der übrig bleibende Teil wird durch Makrophagen phagozytiert und abgebaut. Dieser Prozess ist stark abhängig von GM-CSF, was allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte [41].

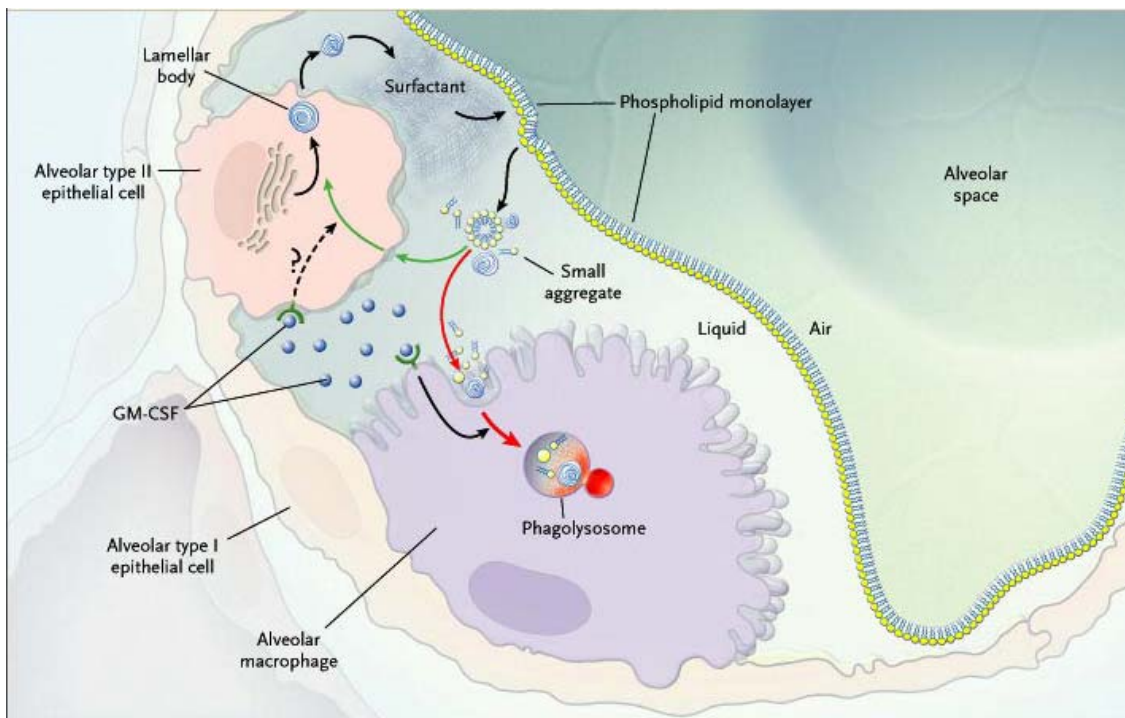


Abbildung 6: Darstellung der Surfactanthomöostase (Trapnell, BC, New England Journal Medicine (2003)). Die Surfactantproteine A, B, C und D werden in alveolaren Typ-II Epithelzellen produziert und entlang des Golginetzwerkes prozessiert, um anschließend in Lamellarkörperchen gespeichert und dann exozytiert zu werden (schwarze Pfeile). Nach mechanischen und biologischen Prozessen wird das Surfactant inaktiviert und zerfällt in small aggregates, von denen ein Teil wieder in Typ-II-Zellen aufgenommen und recycelt (grüne Pfeile) oder über das Phagolysosom abgebaut wird (rote Pfeile). Vermutlich steuert der GM-CSF-Rezeptor das Recycling und den Abbau (gestrichelte Pfeile).

1.4 Struktur und Funktion von Surfactantprotein C

Surfactantprotein C (SP-C) ist ein sehr hydrophobes Polypeptid mit einer Größe von 4kDa. Das Gen mit 3500bp ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 8 zu finden. Es besteht aus sechs Exons, wobei das reife SP-C auf Exon 2 kodiert ist [42;43]. SP-C stabilisiert die Oberflächenaktivität des Surfactantfilms und erhöht die Aufnahme der Phospholipide in Typ-II-Pneumozyten [20;32]. Das Lipopeptid enthält 35 Aminosäuren, von denen 69% hydrophob sind. Die daraus resultierende Gesamthydrophobizität wird durch die doppelte Palmylierung noch verstärkt [32]. Der mittlere Teil des Proteins bildet eine die Phospholipid-Doppelmembran durchspannende Helix [44;45]. Diese α -helikale Struktur ist nur metastabil, und ihre Entfernung aus der Membran kann zur Umwandlung in die energetisch günstigere β -Faltblatt-Struktur führen [46]. Mehrere Proteine in β -Faltblatt-Struktur können zu so genannten amyloiden Fibrillen aggregieren.

1.5 Prozessierung von Surfactantprotein C

SP-C wird von alveolaren Typ-II-Pneumozyten als 21kDa großes Propeptid (proSP-C) synthetisiert, das proteolytisch zum reifen 4,2kDa großen SP-C prozessiert wird [47]. Das reife Protein ist dipalmitoyliert und wird in Lamellarkörperchen gespeichert. Die Prozessierung von proSP-C (21kDa) zu reifem SP-C (4,2kDa) erfolgt in vier proteolytischen Schritten (Abbildung 7).

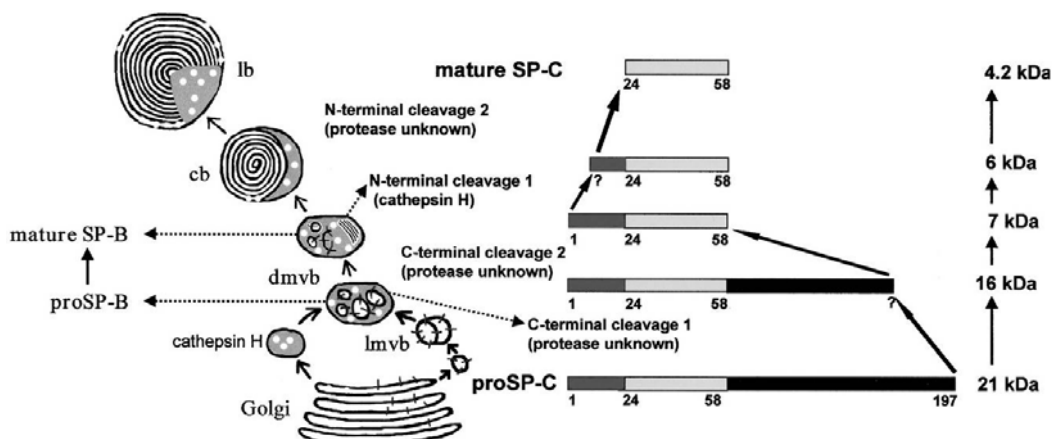


Abbildung 7: Prozessierung von SP-C (Brasch, F., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.(2002)). Dargestellt ist die Synthese von proSP-C (21kDA) in Typ-II-Pneumozyten, das über vier proteolytische Prozesse zum reifen SP-C (4kDA) prozessiert wird. Das Modell zeigt den Zusammenhang zwischen intrazellulärer Lokalisation und Prozessierungsstatus des SP-C.

Hierbei finden zwei C-terminale Abspaltungen statt, gefolgt von zwei N-terminalen [15;48]. Zunächst wird C-terminal eine 16kDa große Form mit einer bisher noch unbekanntem Protease heraus geschnitten. Anschließend erfolgt ein weiterer C-terminaler Schnitt mit einer ebenfalls unbekanntem Protease zu einer 7kDa großen Form. Cathepsin H ist als Protease bei der ersten N-terminalen Abspaltung involviert, was zur Bildung der *composit bodies* führt. Die Abspaltung des 6kDa großen Intermediates erfolgt in schweren multivesikulären Körperchen, die aus der Fusion von Cathepsin H enthaltenden Vesikeln mit leichten, proSP-C enthaltenden, multivesikulären Körperchen entstehen [47]. Die letzte Spaltung, die auch N-terminal stattfindet und zum reifen SP-C führt, wird durch eine ebenfalls noch unbekanntem Protease bewirkt [37;38]. Ohne die Anwesenheit von SP-B kann der N-Terminus von proSP-C nicht vollständig entfernt werden [49].

Reifes SP-C wird dann in einem komplexen Gemisch aus Lipiden und anderen Surfactant Komponenten sekretiert [48;50]. Die Sekretion wird durch die Verschmelzung der Lamellarkörperchen, den Surfactant-Aufbewahrungsvesikeln, mit der Plasmamembran ermöglicht [51;52]. SNARE-Proteine, besonders Syntaxin-2 und SNAP-23, sind bei diesem zellulären Prozess der Exozytose involviert [53;54].

1.6 Surfactantprotein-C-Mutationen und ihre Auswirkungen

Einige interstitielle Lungenerkrankungen beruhen auf dem Vorkommen von Mutationen im SP-C-Gen. Abbildung 8 zeigt die Verteilung der Mutationen im proSP-C-Molekül, die mit interstitiellen Lungenerkrankungen assoziiert sind. Die Mehrheit der SP-C-Mutationen, die chronische Lungenerkrankungen auslösen, liegen auf der C-terminalen Seite des Propeptides, der so genannten BRICHOS-Domäne. Diese weist eine Homologie zur Familie der BRI-Proteine auf, die bei familiärer Demenz nachgewiesen wurden [55-59]. BRI steht als Abkürzung für eine Proteinfamilie, die bei *Familial British Dementia* nachgewiesen werden konnten. Allen Proteinen gemeinsam ist die Strukturverwandheit am C-terminalen Ende.

Außerhalb der BRICHOS-Domäne befinden sich C-terminal Mutationen im Bereich H59 bis T93. Nur eine einzige Mutation wurde bisher auf der N-terminalen Seite des proSP-C gefunden (hSP-C^{P30L}). Das reife SP-C befindet sich im Bereich F23 bis L58.

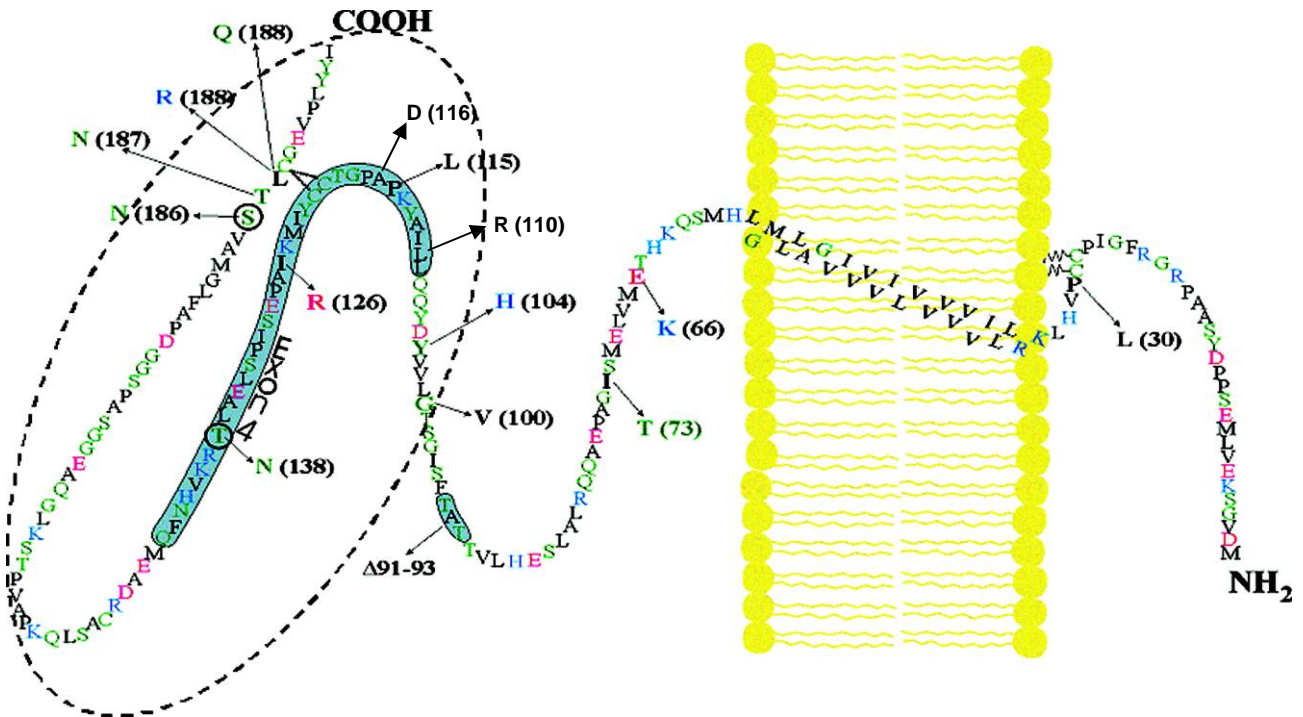


Abbildung 8: Darstellung des proSP-C Moleküls mit ausgewiesenen Mutationen (Beers, F., *Annu. Rev. Physiol.*(2005)). Die Pfeile zeigen die Lokalisation der bisher bekannten Mutationen im proSP-C-Molekül an. Jeweils an der Spitze des Pfeils ist dargestellt, welche Aminosäure an welcher Position ausgetauscht ist. Der gestrichelter Kreis stellt die BRICHOS-Domäne dar, der gelbe Bereich deutet die Phospholipidschicht an.

Je nach Position der Mutation im Protein erfolgen unterschiedliche Effekte [60]. Dies ist in Tabelle 2 dargestellt.

Die komplette C-terminale Region ab Position 94 wird als BRICHOS-Domäne bezeichnet, deren Funktion allerdings noch unklar ist [55]. Hier sind die meisten Mutationen gefunden worden. Diese führen zu Fehlfaltung und Fehlprozessierung von proSP-C, was zu einer Anhäufung aberranter Vorstufen in den so genannten Aggresomen führt [8;61]. Histologisch präsentieren sich die Lungenschäden als NSIP, DIP und UIP [62;63]. Für den mittleren Bereich sind eine Deletion $\Delta 91-93$ [64] sowie die Punktmutation I73T [65-67] und E66K [6] bekannt. Mutationen in diesem Bereich führen zur intrazellulären Anhäufung des aberranten Proteins im frühen Endosom und zu erhöhten Mengen an Phospholipiden, SP-A und SP-B im Alveolarraum. Klinisch betrachtet haben die Patienten eine Alveolarproteinose und oft auch eine nicht spezifische interstitielle Pneumonie. Der N-terminale Teil ist vor allem für das intrazelluläre Targeting notwendig. Hier ist erst eine Mutation, P30L, beschrieben worden [63]. Diese Mutante verbleibt im endoplasmatischen Retikulum und ist nicht palmitoyliert [68;69].

Ort der Mutation	SP-C-Mutationen	Zellbiologie	Histologie
BRICHOS-Domäne	L188Q, L188R, ΔExon 4, 140ΔA, I126R, P115L, Y104H, G100V, A116D, L110R	Aggresomenbildung, kein reifes SP-C	NSIP, DIP, UIP
Non-BRICHOS, C-terminal	Δ91–93, I73T, E66K	frühes Endosom, nicht-ubiquitinierte Aggregate Viel PL, SP-A, SP-B	PAP, NSIP
N-terminal	P30L	ER-Retention, SP-C nicht palmitoyliert	DIP, NSIP
DIP=desquamative interstitial pneumonitis; PAP=pulmonary alveolar proteinosis; UIP=usual interstitial pneumonitis; NSIP=non-specific interstitial pneumonitis			

Tabelle 2: Histologische und zellbiologische Auswirkungen je nach Art und Lage der SP-C-Mutationen

Bei der Mutation I73T handelt es sich um die Substitution von Threonin durch Isoleucin an der Stelle 73 des proSP-C-Proteins [65]. Diese Mutation ist die am häufigsten vorkommende Mutation von SFTPC [70], und es gibt eine große Variabilität im Erscheinungsbild des Phänotyps, was von einem asymptomatischen Verlauf bis hin zum Tod reicht [66]. Ähnliches wird auch über L188Q beschrieben, eine weitere bekannte Mutation im SFTPC [7]. Wichtige klinische Manifestationen der Patienten mit einer I73T-Mutation sind die Präsenz von abnormal prozessierten proSP-C-Zwischenstufen im Alveolarraum und die Einwanderung von inflammatorischen CD3+ und CD4+ Lymphozyten in den Alveolarraum [65].

Mutationen von SP-C können zu Konformationserkrankungen führen, daher ist ihre Untersuchung von besonderer Bedeutung. Die heterozygote Expression ist hierbei ausreichend für einen pathologischen Phänotyp, während ein vollständiges Fehlen des Proteins klinisch zunächst unauffällig sein kann. Zu Konformationskrankheiten zählen auch Alzheimer, Parkinson und Huntington [71;72].

Abbildung 9 stellt ein Modell dar, wie aberrante proSP-C Formen zu Konformationserkrankungen führen können.

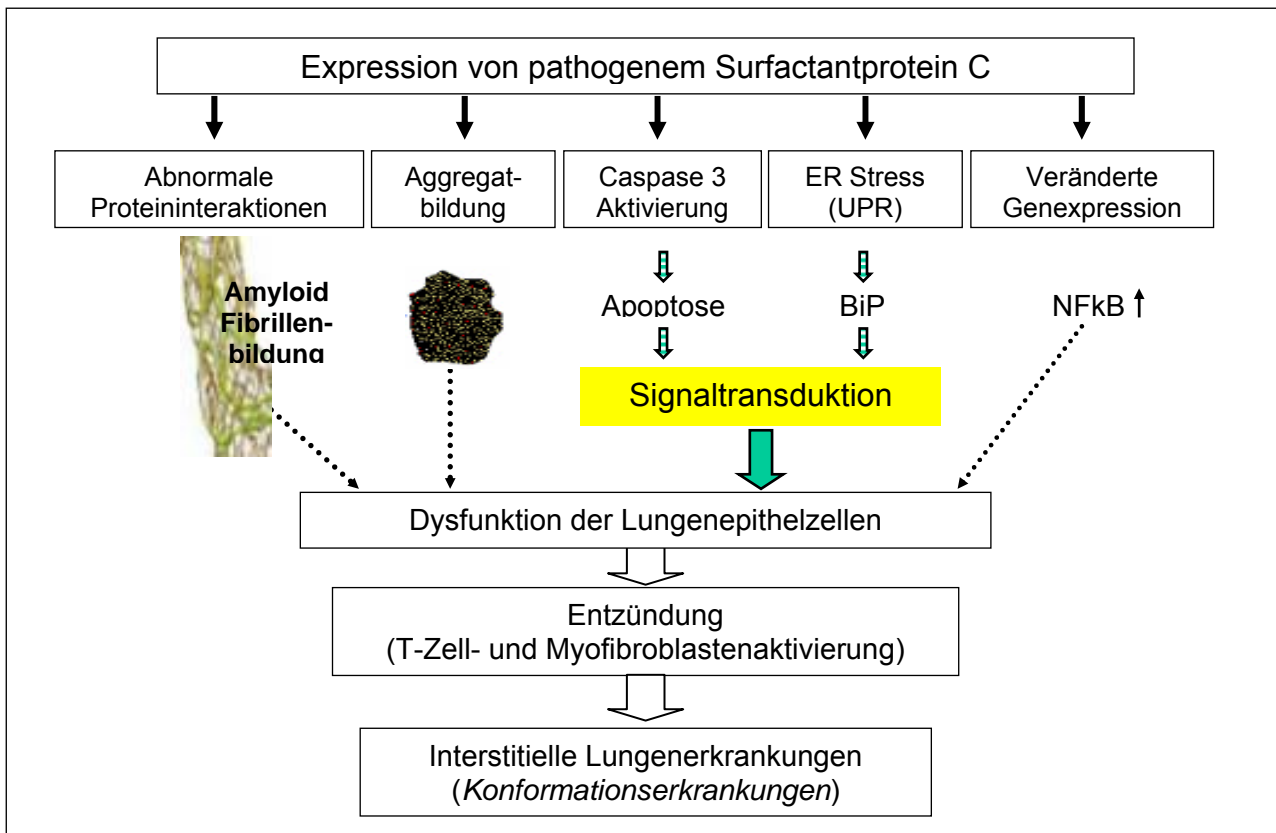


Abbildung 9: Surfactantprotein-C-Mutationen als Ursache interstitieller Lungenerkrankungen (Beers, F., Annu. Rev. Physiol.(2005)). Dargestellt sind Prozesse, durch die aberrante proSP-C Moleküle zu den so genannten Konformationserkrankungen führen können.

SP-C-Mutationen verursachen eine intrazelluläre Anhäufung von fehl gefalteten Surfactantproteinformen, die teilweise in die BAL-Flüssigkeit gelangen. Dieser unphysiologische Zustand kann eine Dysfunktion der Lungenepithelzellen zur Folge haben. Die dadurch ausgelöste Entzündungsreaktion kann eine interstitielle Lungenerkrankung hervorrufen, die zu einer Fibrotisierung des Gewebes und im Endstadium zu einer Lungenfibrose führt.

Über die Prozesse und Signalwege, die von der aberranten Proteinproduktion zu einer T-Zell-vermittelten Entzündungsreaktion in der Lunge und der Aktivierung von Myofibroblasten führen, ist kaum etwas bekannt. So ist insbesondere unklar, ob die aberranten Proteine selbst, die Sekretionsprodukte von geschädigten Typ-II-Pneumozyten oder die Bestandteile weiterer in Mitleidenschaft gezogener pulmonaler Zellen die Entzündungsreaktion initiieren.

2 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit werden, auf Grundlage der an Patienten beschriebenen Mutationen im SP-C-Gen, *in vitro* die zellulären Auswirkungen von SP-C-Mutationen im Vergleich zu Wildtyp SP-C genauer untersucht, die zu den beobachteten interstitiellen Inflammationsreaktionen und damit zu dem pulmonalen Phänotyp führen. Es werden die Hypothesen aufgestellt, dass sich die Mutationen im SP-C-Gen auf das Prozessierungsverhalten, die Morphologie der Lamellarkörperchen, die intrazelluläre Lokalisation von proSP-C-Intermediaten, das Verhalten gegenüber exogenem Stress und die Lipidzusammensetzung von Surfactant auswirken. Des Weiteren wird vermutet, dass aberrante SP-C-Formen eine Expression bestimmter Hitzeschockproteine hervorrufen. Auch wird postuliert, dass bei der Expression von mutiertem SP-C lösliche Faktoren in das Lumen abgegeben werden, welche die Immunzellen stimulieren.

2.1 Analyse der Prozessierungsintermediate

Laut Brasch et al. wird Surfactantprotein C über drei Zwischenformen vom proSP-C zum reifen SP-C prozessiert. Die so entstehenden Intermediate sind in Abbildung 10 schematisch dargestellt.

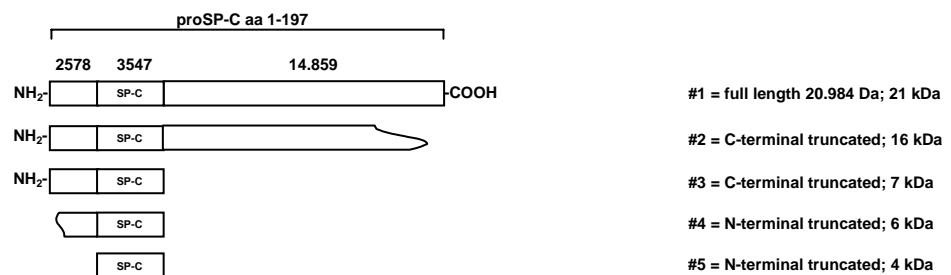


Abbildung 10: Postulierte Prozessierungsprodukte nach Brasch et al. Dargestellt ist proSP-C mit 21kDa (#1), das erste Intermediat nach C-terminaler proteolytischer Abspaltung mit 16kDa (#2), das zweite Intermediat nach einer weiteren C-terminalen proteolytischen Abspaltung mit 7kDa (#3), das dritte Intermediat nach N-terminaler proteolytischer Abspaltung mit 6kDa (#4) und nach einer letzten N-terminalen proteolytischen Abspaltung das reife SP-C mit 4kDa (#5).

In der vorliegenden Arbeit soll nun zum einen untersucht werden, ob Wildtyp SP-C, das in MLE-12-Zellen exprimiert wird, diese Prozessierungsintermediate bestätigen kann. Zum anderen sollen die Prozessierungsintermediate von mutiertem proSP-C mit Wildtyp proSP-C verglichen werden. Hierbei ist dann zu untersuchen, welche

Prozessierungszwischenstufen identifiziert werden können und welche relative Mengenverteilung zwischen den einzelnen Intermediaten vorliegt.

2.2 Morphologie der Lamellarkörperchen

Lamellarkörperchen stellen die letzte intrazelluläre Stufe der Surfactantproduktion dar. Störungen der Biogenese und / oder Exozytose dieser Lysosomen-ähnlichen Organellen sind potentiell pathognomonisch für Lungenerkrankungen. Um die Ursachen und die Auswirkung fehl geformter Lamellarkörperchen auf molekularer Ebene klarer zu charakterisieren, wird im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* der Einfluss von Surfactantprotein-C-Mutationen im Vergleich zu Wildtyp SP-C auf die Morphologie der Lamellarkörperchen untersucht.

2.3 Intrazelluläre Lokalisierung von proSP-C

Brasch et al. und Beers et al. haben bereits einige Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisierung von Wildtyp proSP-C und einigen Mutationen durchgeführt. Diese Arbeit trägt zur Vervollständigung der bestehenden Erkenntnisse bei. Es sollen die Lokalisierungsmuster von I73T- oder A116D-mutiertem proSP-C im Vergleich zu Wildtyp proSP-C bestimmt werden. Mit Hilfe von Fusionsproteinen, wie HA oder EGFP, können diese und spezielle Kompartimentmarker gleichzeitig farbig markiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie Kollokalisationsstudien durchgeführt werden.

2.4 Verhalten gegenüber exogenem Stress

Bislang noch nicht untersucht wurde, ob Zellen, die mutiertes SP-C exprimieren, gegenüber äußeren Einflüssen empfindlicher reagieren oder nicht. In der vorliegenden Arbeit soll nun die Laktatdehydrogenase-Freisetzung dieser Zellen im Vergleich zu Zellen, die Wildtyp SP-C exprimieren, untersucht werden. Die Laktatdehydrogenase ist ein Marker für die Intaktheit der Zelle. Ein weiteres Ziel ist es, zu untersuchen, ob die bisher zur Behandlung bei ILD eingesetzten Medikamente, wie Hydroxychloroquin, Azathioprin, Cyclophosphamid und Methylprednisolon, die Freisetzung von LDH positiv oder negativ beeinflussen.

2.5 Einfluss der proSP-C-Expression auf die Hitzeschockproteinexpression

Um die Wirkungsweise bisher eingesetzter Pharmaka (Hydroxychloroquin, Azathioprin, Cyclophosphamid und Methylprednisolon) auf die Surfactanthomöostase zu verstehen, sollen in der vorliegenden Arbeit die Substanzen *in vitro* in ihrer molekularen Wirkung auf Typ-II-Zellen, die unterschiedliche SP-C-Mutationen exprimieren, charakterisiert werden.

Forschungsergebnisse im Bereich der Cystischen Fibrose erbrachten folgende Informationen. 4-Phenylbutyrat (4-PBA) ist in einer klinischen Pilotstudie bei Patienten mit Cystischer Fibrose erfolgreich getestet worden [73]. 4-PBA bewirkt über Hsp70 eine vermehrte Bildung von mRNA des Zielproteins. Es verhindert den Abbau des Zielproteins [74] und verbessert dessen Faltung [75].

In Anlehnung an diese Erkenntnisse ist die Hypothese aufgestellt worden, dass die eingesetzten Pharmaka Einfluss auf die Expression der Chaperone nehmen. Chaperone spielen eine wichtige Rolle bei Transport, Translokation, Faltung und Zusammenbau von Proteinen. Sie enthalten keine Information für die korrekte Konformation eines Proteins, sondern erleichtern und beschleunigen den Faltungsprozess, indem sie durch eine Bindung an diese Proteine eine Aggregation oder fehlerhafte intraspezifische Interaktionen verhindern. Sie beeinflussen auch die Ausbeute und Kinetik während der Proteinfaltung. Ebenfalls sind sie am Abbau von Proteinen beteiligt [76;77]. Chaperone werden unter Stress verstärkt gebildet, unter anderem auch dann, wenn vermehrt fehlgefaltete Proteine in der Zelle auftreten. Ziel ist es daher, die mit fehlgefaltetem SP-C assoziierten Chaperone zu identifizieren und durch Einflussnahme auf deren Expression durch Pharmaka den Anteil von reifem SP-C zu erhöhen.

In der vorliegenden Arbeit soll auch die Auswirkung der Expression von mutiertem proSP-C im Vergleich zu Wildtyp proSP-C auf die Chaperone Hsp70, Hsp90, Calreticulin und Calnexin untersucht werden. Hsp70 soll untersucht werden, da es bereits bei Cystischer Fibrose als Faltungshelfer identifiziert wurde. Über Hsp90 ist bekannt, dass es die letzten Schritte der Faltung aufhält, um eine frühzeitige Aggregation zu verhindern [78]. Calreticulin und Calnexin sind zusammen am so genannten *calreticulin-calnexin cycle* beteiligt, der für die Qualitätskontrolle und die Faltung der neu synthetisierten Proteine verantwortlich ist. Er dient zur Erkennung fehlgefalteter Proteine, diese werden im ER zurück gehalten und degradiert. So können nur korrekt gefaltete Proteine das ER verlassen und am sekretorischen Pathway entlang weiter prozessiert werden [79].

2.6 Zelluläre Lipidzusammensetzung

Die Zusammensetzung der Surfactantlipide ist ein zentraler Indikator für eine korrekte Surfactanthomöostase oder aber Störungen derselben. Daher ist die Bestimmung der Zusammensetzung der Surfactantlipide eine zentrale Zielgröße dieser Arbeit. Es sollen Zellen untersucht werden, die mutiertes SP-C exprimieren im Vergleich zu Zellen, die Wildtyp SP-C exprimieren. Zum einen soll die Zusammensetzung innerhalb der Zelle analysiert werden, aber auch diejenige des Kulturüberstandes.

2.7 Stimulation der Rezeptorexpression auf Immunzellen durch lösliche Faktoren im Kulturüberstand

In der vorliegenden Arbeit soll die Expression der Oberflächenrezeptoren CXCR-1, CCR-2 und CD11b auf Neutrophilen und Lymphozyten untersucht werden. Da interstitielle Lungenerkrankungen letztendlich zu einer Fibrose im Lungenparenchym führen, wird die Hypothese aufgestellt, dass als mögliche Ursache lösliche Faktoren in Frage kommen, die von den Zellen, die mutiertes SP-C exprimieren, in das Lumen abgegeben werden. Diese Faktoren können zur Aktivierung bestimmter Immunzellen führen, die über Entzündungsherde die fibrotische Entwicklung vorantreiben.

CXCR-1 ist ein hochaffiner IL-8-Rezeptor, der über IL-8 Zellen zu Entzündungsherden führt und die Entzündung weiter in Gang hält [80].

Der Chemokinrezeptor CCR-2 wird hauptsächlich auf Monozyten und T-Zellen exprimiert. Sein Hauptligand ist das *Monozyten Chemoattractant Protein* (MCP-1), von dem gezeigt wurde, dass es in der Lage ist TGF-beta und Typ-I-Kollagen zu produzieren, was wiederum inflammatorische Zellen anlockt und aktiviert, was letztlich zu Fibrose führt [81;82].

CD11b wird als Vertreter der Integrine untersucht, der die Zelladhäsion von Leukozyten an Endothelzellen bewirkt und auf diese Weise das Einschleusen von Phagozyten an den Ort der Entzündung erleichtert.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Geräte	Hersteller
Bio Photometer mit DPU 414 Thermal Printer	Eppendorf
Durchflusszytometer FACS Calibur	Becton & Dickinson
Elektrophorese Power Supply und Laufkammer	Owi
Entwicklungskassette RPN11646	Amersham
Entwicklungsmaschine CP 1000	AGFA
FACS Auswertestation (Macintosh Power PC)	Apple
FACS Auswertesoftware (Cell Quest 3.1f)	Becton & Dickinson
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135	Zeiss
Filterschlitten R/B/G (I =Red, II = Blue, III = Green)	
Filterschlitten FRET (I = CFP, II = YFP, III = CY3)	
High Performance Centrifuge Avanti J-30I	Beckmann
Megafuge 1.0 R	Heraeus
Mikrotiterplattenleser Ht III Typ 12600	Anthos Labtec
PowerEase 500 Power Supply EI8700	Invitrogen
Software AxioVS 40 LE V 4.5.0.0	Zeiss
Thermocycler für PCR	Biometra
Vacuum Concentrator	Bachhofer
Wasserbad Paratherm S100	Julabo
Xcell SureLock Minicell Kammer (EI 0001)	Invitrogen
Xcell II Blot Module EI9051	Invitrogen

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96-Well-Mikrotiterplatten (niedrigaffin, transparent)	Greiner
Eppendorf-Tube (1,5ml, 2ml)	Eppendorf
Gewebekulturschale (100mm)	NUNC
Gewebekulturflasche (25cm ² , 75cm ²)	BD
Multiwell-Zellkulturplatte (6-Well, 12-Well, 24-Well)	NUNC
Nitrocellulosemembran Immobilon IPVH 00010	Millipore
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf
Röntgenfilme RPN 2103	Amersham
Serologische Pipette (2, 5, 10, 25ml)	NUNC

3.1.2 Fertiggebilde

Typ	Hersteller
NucleoBond® Plasmid DNA Purification Endotoxinfree	Macherey-Nagel
NuPAGE Elektrophorese Set:	Invitrogen
NuPAGE MES Running Buffer (NP0002)	
NuPAGE LDS Sample Buffer (NP0007)	
NuPAGE Reducing Agent (NP0004)	
NuPAGE Novex 10% Bis-Tris Gel (NP0315)	
NuPAGE Antioxidant (NP0005)	
NuPAGE Transfer Buffer (NP0006)	
QIAquick® Gel Extraction Kit 50 (No. 28704)	QIAGEN
QIAquick® PCR Purification Kit 50 (No. 28104)	QIAGEN
QIAprep® Spin Miniprep Kit 50 (No. 27104)	QIAGEN
QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (No 200518)	Stratagene
VenorGeM® Mycoplasmen-Nachweis (No. 11-1025)	Minerva Biolabs

3.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochloride (DAPI)	Sigma
Aqua ad injectabilia (No. 3703452)	Braun
Birboim-Acetat (5M Kaliumacetat)	Merck
Complete Protease Inhibitor Cocktail (No. 1697498)	Roche
EDTA-Lösung (0,5M, pH 8,0)	Merck
Elugent (No. 324707)	Calbiochem
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid (10mg/mL, No. 46067)	Fluka
Glutaraldehyd	Merck
Iodonitrotetrazolium chloride (INT) (No. I8377-250MG)	Sigma
Natriumacetat-Lösung (3M, pH 5,2)	Merck
NaOH-Lösung (0,34M, steril filtriert)	Merck
OptiPrep™	Axis Shield
Osmiumtetroxid	Merck
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
Trypanblau	Merck
Uranylacetat	Merck

3.1.4 Sonstige Reagenzien

Reagenz	Hersteller
β -Nicotinamide adenine dinucleotide (No. N1511-250MG)	Sigma
Agarose GTQ (No. 6352.2)	Roth
Ampicillin (100 μ g/ml)	Sigma
Bovine serum albumin (BSA V, No. 42160223)	Paesel+Lorei
Collagen R (2 mg/ml, steril)	Serva
Diaphorase (No. D5540-100UN)	Sigma
ECL Chemilumineszenzlösung (RPN2106)	Amersham
ExGen500 in vitro Transfection Reagent (No. R0511)	Fermentas
FCS Gold (No. A11-649)	PAA
FICOLL	Amersham
Geneticin G418 (No. A1720)	Sigma
Kanamycin (30 μ g/ml)	Sigma
Lambda DNA/HindIII Marker (No.G1711)	Promega
L-Lactic Dehydrogenase (No. L2500-5KU)	Sigma
MB Taq DNA-Polymerase	Minerva
MultiMark Multi-Colored Standard (LC5725)	Invitrogen
Neomycin G418 (50mg/ml in H ₂ O, steril filtriert)	Sigma
Penicillin-Streptomycin / Glutamin 100x (No. 10378-016)	GIBCO
Proteinassay Farbstoffreagenz (No. 500-0006)	Bio-Rad
RNase-Lösung (10mg /ml RNase A in DEPC-H ₂ O)	BD
Sodium L-lactate (No. 71718-10G)	Fluka
Sucrose	Merck
Trypsin-EDTA 1x (No. 25200-056)	GIBCO
Vecta Shield® Mounting Medium	Vector Labs

3.1.5 Zellkulturmedien

Medium	Hersteller
LB-Agar (Miller) (37g auf 1l Aqua ad injectabilia)	Merck
LB-Bouillon (Miller) (25g auf 1l Aqua ad injectabilia)	Merck
MEM (No. 41090-028)	GIBCO
10x MEM	Sigma
D-MEM (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium No. 41966-029)	GIBCO
RPMI 1640 Medium (No. 72400-021)	GIBCO

3.1.6 Puffer und Lösungen

- Homogenisierungspuffer (250mM Sucrose, 20mM Tris-HCl, 1mM EDTA)
- Hypotonische Ammoniumchloridlösung nach Miltenyi zur Erythrozytenlyse (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0,1mM EDTA, pH 7,5)
- Kakodylatpuffer (0,1M Kakodylatpuffer, pH 7,35)
- Lysispuffer (20mM EDTA, 1%vol Elugent, Protease Inhibitor in D-PBS)
- PBS-Puffer (137mM NaCl, 2,68mM KCl, 5,36mM Na₂HPO₄, 1,76mM KH₂PO₄, pH 7,4)
- PBS-T-Puffer (PBS-Puffer, 0,05% Tween 20)
- Probenpuffer (5x) für Agarosegelelektrophorese (40% Sucrose, 25mg Bromphenolblau, 10mM Tris-HCl, 50mM EDTA, pH 7,5)
- TAE-Puffer (40mM Tris-HCl, 2mM EDTA, pH 8)
- TfbI-Puffer (30mM CH₃COOK, 100mM RbCl, 10mM CaCl₂, 50mM MgCl₂, 15% v/v Glycerol, pH 5,8 (einstellbar mit Essigsäure), steril filtriert)
- TfbII-Puffer (10mM MOPS, 75mM CaCl₂, 10mM RbCl, 15% v/v Glycerol, pH 6,5 (einstellbar mit Natronlauge), steril filtriert)

- TBS-Puffer (4mM Tris-HCl, 100mM NaCl, pH 7,4)
- TBS-T-Puffer (TBS-Puffer, 0,05 % Tween 20)
- TE-Puffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,5)
- Te-Puffer (10mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,5)
- TENS-Puffer (10mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA pH 8,0, 0,1 N NaOH, 0,5% SDS)

3.1.7 Verwendete Zelltypen

Zelltyp	Charakteristika	Herkunft
A549	humane Typ-II-Lungenepithelzellen (No. CCL-185)	ATCC
DH5 α	<i>Escherichia coli</i> -Stamm	GIBCO
MLE-12	murine Typ-II-Lungenepithelzellen (No. CRL-2110)	ATCC

3.1.8 Antikörper

Für die Detektion von Proteinen mittels Westernblot oder Immunfluoreszenz wurden folgende Antikörper verwendet:

Primäre Antikörper	Hersteller	Typ, Host	verwendete Konzentration (Westernblot (WB), Immunfluoreszenz (IF))
anti- β -Actin – HRP conjugate	Santa Cruz	monoclonal, mouse	WB 1:10000
anti- α -Tubulin	Acris	polyclonal, mouse	WB 1:5000, IF 1:200
anti-Calnexin	Santa Cruz	polyclonal, goat	WB 1:500, IF 1:200
anti-Calregulin (C-17)	Santa Cruz	polyclonal, goat	WB 1:500, IF 1:200
anti-HA (High Affinity)	Roche	monoclonal, rat	WB 1:1000, IF 1:200
anti-Hsp70	Santa Cruz	polyclonal, goat	WB 1:500, IF 1:200
anti-Hsp90	Santa Cruz	monoclonal, mouse	WB 1:500, IF 1:200
anti-Lamp-3	Santa Cruz	polyclonal, goat	WB 1:200, IF 1:200
anti-EEA-1	Santa Cruz	polyclonal, rabbit	IF 1:200
anti-Synthaxin-2	Santa Cruz	polyclonal, rabbit	IF 1:200
anti-Snap-23	Santa Cruz	polyclonal, rabbit	IF 1:200
anti-NproSP-C 10-23	Beers	polyclonal, rabbit	WB 1:5000, IF 1:200
anti-rSP-C 22/96	Altana	polyclonal, rabbit	WB 1:10000
Sekundäre Antikörper	Hersteller	Typ, Host	Westernblot
anti-Goat IgG – HRP conjugate	Biozol	polyclonal, rabbit	WB 1:10000
anti-Mouse IgG – HRP conjugate	Chemicon	goat	WB 1:10000
anti-Rabbit IgG – HRP conjugate	Sigma	goat	WB 1:10000
anti-Rat IgG – HRP conjugate	Dako	rabbit	WB 1:10000

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Antikörper für Westernblot und Immunfluoreszenz. Alle primären Antikörper sind spezifisch gegen humane Epitope.

AntikörperTyp-Immunfluoreszenz	Excitation (nm)	Emission (nm)	Filter	Antikörpertyp
anti-Goat IgG – HRP conjugate (rabbit)	495	519	III (green)	Alexa 488
anti-Goat IgG – HRP conjugate (donkey)	555	565	III (CY3)	Alexa 555
anti-Mouse IgG – HRP conjugate (goat)	495	519	III (green)	Alexa 488
anti-Mouse IgG – HRP conjugate (goat)	555	565	III (CY3)	Alexa 555
anti-Rabbit IgG – HRP conjugate (goat)	495	519	III (green)	Alexa 488
anti-Rabbit IgG – HRP conjugate (goat)	365	460	II (blue)	Marina Blue
anti-Rabbit IgG – HRP conjugate (goat)	555	565	III (CY3)	Alexa 555
anti-Rat IgG – HRP conjugate (donkey)	495	519	III (green)	Alexa 488

Tabelle 4: Optische Eigenschaften der verwendeten Sekundärantikörper (Invitrogen) für die Immunfluoreszenz. Verwendet wurde eine Verdünnung von 1:200.

Die Detektion verschiedener Zellmorphologien mittels FACS erfolgte mit folgenden Antikörpern:

Antikörper	Hersteller	Typ, Host	Markierung
CCR-2 #FAB151p	R&D	monoclonal, mouse	PE
CD4 #345768	BD	monoclonal, mouse	FITC
CD11b #555388	BD	monoclonal, mouse	PE
CD8 #555366	BD	monoclonal, mouse	FITC
CXCR-1 #555940	BD	monoclonal, mouse	PE
anti-IgG1	BD	monoclonal, mouse	PE
anti-IgG1	R&D	monoclonal, mouse	FITC
anti-IgG1	BD	monoclonal, mouse	FITC
anti-IgG2	BD	monoclonal, mouse	PE
anti-IgG2	BD	monoclonal, mouse	PE

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Antikörper für die Durchflusszytometrie. Alle FACS-Antikörper sind spezifisch gegen humane Epitope.

3.1.9 Vektoren

Die in Tabelle 6 aufgelisteten Vektoren wurden für die Transformations- und Transfektionsversuche verwendet.

Vektorname	Quelle	Resistenz E.coli	Resistenz Zelllinie	Größe
pcDNA3	Invitrogen	Ampicillin	Neomycin	6433bp
pcDNA3/HA-hSP-C ^{WT}	M. Beers	Ampicillin	Neomycin	6433bp
pcDNA3/HA-hSP-C ^{P30L}	C. Sparr	Ampicillin	Neomycin	6433bp
pcDNA3/HA-hSP-C ^{I73T}	C. Sparr	Ampicillin	Neomycin	6433bp
pcDNA3/HA-hSP-C ^{L110R}	C. Sparr	Ampicillin	Neomycin	6433bp
pcDNA3/HA-hSP-C ^{P115L}	C. Sparr	Ampicillin	Neomycin	6433bp
pcDNA3/HA-hSP-C ^{A116D}	C. Sparr	Ampicillin	Neomycin	6433bp
pcDNA3/HA-hSP-C ^{L188Q}	C. Sparr	Ampicillin	Neomycin	6433bp
pEGFP-N1	Clontech	Kanamycin	Neomycin	4737bp
pEGFP-N1/hSP-C ^{WT}	M. Beers	Kanamycin	Neomycin	5371bp
pEGFP-N1/hSP-C ^{P30L}	C. Sparr	Kanamycin	Neomycin	5371bp
pEGFP-N1/hSP-C ^{I73T}	C. Sparr	Kanamycin	Neomycin	5371bp
pEGFP-N1/hSP-C ^{L110R}	C. Sparr	Kanamycin	Neomycin	5371bp
pEGFP-N1/hSP-C ^{P115L}	C. Sparr	Kanamycin	Neomycin	5371bp
pEGFP-N1/hSP-C ^{A116D}	C. Sparr	Kanamycin	Neomycin	5371bp
pEGFP-N1/hSP-C ^{L188Q}	C. Sparr	Kanamycin	Neomycin	5371bp
pEGFP-C1	Clontech	Kanamycin	Neomycin	4737bp
pEGFP-C1/hSP-C ^{WT}	M. Beers	Kanamycin	Neomycin	5371bp
pEGFP-C1/hSP-C ^{P30L}	C. Sparr	Kanamycin	Neomycin	5371bp
pEGFP-C1/hSP-C ^{I73T}	C. Sparr	Kanamycin	Neomycin	5371bp
pEGFP-C1/hSP-C ^{L110R}	C. Sparr	Kanamycin	Neomycin	5371bp
pEGFP-C1/hSP-C ^{P115L}	C. Sparr	Kanamycin	Neomycin	5371bp
pEGFP-C1/hSP-C ^{A116D}	C. Sparr	Kanamycin	Neomycin	5371bp
pEGFP-C1/hSP-C ^{L188Q}	C. Sparr	Kanamycin	Neomycin	5371bp

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Vektoren

3.1.9.1 pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt}

Der kommerziell erhältliche Vektor mit dem Grundgerüst pcDNA3 (Abbildung 11) wurde für die stabile und transiente Transfektion in Säugetierzellen entwickelt. Er ist 5400bp groß und enthält unter anderem einen *Human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter*, der für eine hohe Expressionsrate der geklonten Gene sorgt. Der Vektor besitzt Resistenzgene gegen Neomycin und Ampicillin, was eine Selektion auf spezifischem Medium erlaubte.

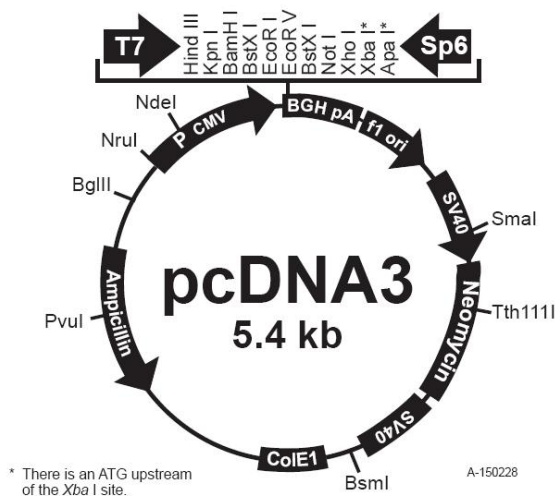


Abbildung 11: Vektor pcDNA3 (Invitrogen). Wichtige Elemente sind der *Human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter* für eine hohe Expressionsrate der geklonten Gene, die Cloning site (CS) zur Insertion von PCR-Produkten, sowie die Resistenzgene gegen Neomycin und Ampicillin zur Selektion. Weiterhin dargestellt sind die verschiedenen möglichen Restriktions-Schnittstellen.

Der Vektor pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt} (Abbildung 12) wurde von unserem Kooperationspartner Michael Beers, University of Pennsylvania Medical Center Pulmonary, Allergy & Critical Care Division Abramson Research Center, zur Verfügung gestellt. Das SP-C-Gen, kodierend für Surfactantprotein C (Wildtyp), wurde in die *Cloning Site* einkloniert. Zusätzlich wurde N-terminal ein HA-Tag (1229 Da) zur erleichterten Identifikation im Westernblot angefügt.

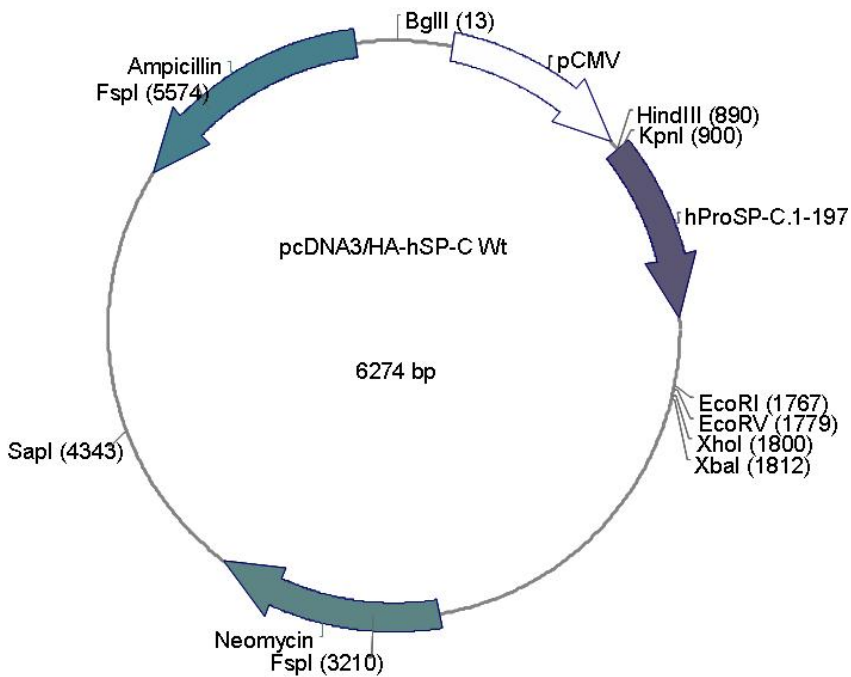


Abbildung 12: pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt}. In die CS des Vektors wurde das proSP-C-Gen integriert. Neben den Standardelementen eines pcDNA3-Vektors enthält dieser Typ zusätzlich ein an das proSP-C-Gen fusioniertes HA-Tag, das als Identifikationsmerkmal dient und bei Westernblotanalysen oder immunochemischen Untersuchungen detektiert wird.

3.1.9.2 pEGFP-C1/hSP-C^{Wt} und pEGFP-N1/hSP-C^{Wt}

Die kommerziell erhältlichen Vektoren pEGFP-C1 und pEGFP-N1 der Firma Clontech (Abbildung 13) enthielten das *Green Fluorescent Protein* (GFP) der Meeresqualle *Aequorea victoria*. Im Gegensatz zum Wildtyp GFP handelte es sich jedoch um eine ins Rote verschobene Variante. Bei der Anregung mit Licht der Wellenlänge 488nm lag das Emissionsmaximum bei 507nm. Die je 4700bp großen Plasmide waren für die stabile und transiente Transfektion generiert und enthielten neben dem GFP-Gen einen *Human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter* für eine hohe Expressionsrate der geklonten Gene. Resistenzen waren gegenüber Kanamycin und Neomycin zur Selektion stabiler Zelllinien vorhanden. Die PCR-Produkte wurden in die *Multiple Cloning Site (MCS)* integriert.

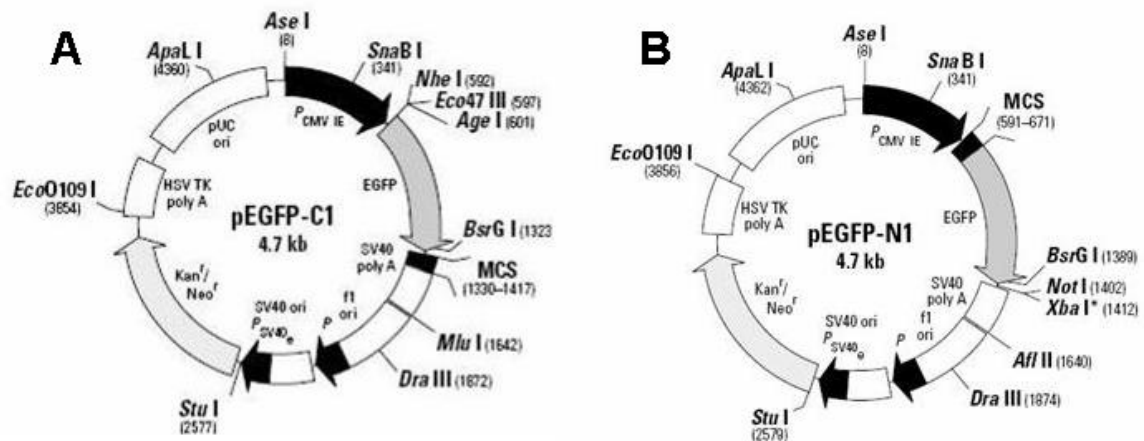


Abbildung 13: Transfektionsvektoren pEGFP-C1 (A, Clontech) und pEGFP-N1 (B, Clontech). Wichtige Elemente sind der humane Cytomegalovirus (CMV) als *immediate early promoter* für eine hohe Expressionsrate der geklonten Gene, die *Cloning Site* (CS) zur Insertion von PCR-Produkten, das Neomycin-Resistenzgen zur Selektion stabiler Zelllinien, das Kanamycin-Resistenzgen zur Selektion und Vermehrung in *E. coli*, die Schnittstellen diverser Restriktionsenzyme und das Enhanced-green-fluorescent-protein-Gen zur Eigenfluoreszenz des Vektors

Beide Vektoren konnten für sich als Transfektionskontrolle benutzt werden oder mit Proteinen (C-terminal oder N-terminal) fusioniert werden, um diese mit Fluoreszenz zu markieren.

Sowohl pEGFP-C1/hSP-C^{Wt} als auch pEGFP-N1/hSP-C^{Wt} wurden von unserem Kooperationspartner Michael Beers, University of Pennsylvania Medical Center Pulmonary, Allergy & Critical Care Division Abramson Research Center, zur Verfügung gestellt. Das SP-C-Gen, kodierend für Surfactantprotein C (Wildtyp), wurde in die *Multiple Cloning Site* einkloniert. Um die Prozessierungsschritte von proSP-C zu SP-C besser verfolgen zu können, wurden sowohl eine C1-EGFP- als auch eine N1-EGFP-Fusion vorgenommen.

3.1.9.3 Erzeugte Vektoren

Mit Hilfe des Fertigkits *QuikChange® Site - directed Mutagenesis Kit* (siehe Methoden) wurden weitere Vektoren erstellt. Hierbei wurde das Wildtypgen durch eine Punktmutation verändert (siehe Methoden).

Es entstanden dabei die Vektoren pcDNA3/HA-hSP-C^{P30L, I73T, L110R, P115L, A116D, L188Q} und pEGFP-C1 bzw. -N1/hSP-C^{P30L, I73T, L110R, P115L, A116D, L188Q}.

3.1.10 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotidprimer wurden alle von der Firma Metabion bezogen.

Oligonukleotid	Sequenz	Länge	Target (in SP-C auf Zielvektor)
hSP-C.P30L.For.1	5'-GCA TTC CCT GCT GCC TAG TGC ACC TG-3'	26-mer	Punktmutation P30L
hSP-C.P30L.Rev.1	5'-CAG GTG CAC TAG GCA GCA GGG AAT GC-3'	26-mer	Punktmutation P30L
hSP-C.I73T.For.1	5'-GGT TCT GGA GAT GAG CAC TGG GGC GC-3'	26-mer	Punktmutation I73T
hSP-C.I73T.Rev.1	5'-GCG CCC CAG TGC TCA TCT CCA GAA CC-3'	26-mer	Punktmutation I73T
hSP-C.L110R.For.1	5'-CCA GCA GCT GCG GAT CGC CTA CAA GC-3'	26-mer	Punktmutation L110R
hSP-C.L110R.Rev.1	5'-GCT TGT AGG CGA TCC GCA GCT GCT GG-3'	26-mer	Punktmutation L110R
hSP-C.P115L.For.1	5'-GAT CGC CTA CAA GCT AGC CCC TGG CAC-3'	27-mer	Punktmutation P115L
hSP-C.P115L.Rev.1	5'-GTG CCA GGG GCT AGC TTG TAG GCG ATC-3'	27-mer	Punktmutation P115L
hSP-C.A116D.For.1	5'-GCC TAC AAG CCA GAC CCT GGC ACC TGC-3'	27-mer	Punktmutation A116D
hSP-C.A116D.Rev.1	5'-GCA GGT GCC AGG GTC TGG CTT GTA GGC-3'	27-mer	Punktmutation A116D
hSP-C.L188Q.For.1	5'-CGT GAG CAC CCA GTG TGG CGA GGT GCC G-3'	28-mer	Punktmutation L188Q
hSP-C.L188Q.Rev.1	5'-CGG CAC CTC GCC ACA CTG GGT GCT CAC G-3'	28-mer	Punktmutation L188Q

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotidprimer. Dargestellt sind die verwendeten Sequenzen, wobei das Basentriplett grau unterlegt ist, welches die veränderte Base für den Aminosäureaustausch enthält.

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung und Aufbewahrung von E.coli

3.2.1.1 Vorbereitung der Kulturschalen für E.coli-Kulturen

LB-Agar (Miller) wurde autoklaviert und in Portionen zu 20ml in sterile Kunststoff-Petrischalen (\varnothing 90mm) gegossen. Bouillonmedium LB-Bouillon (Miller) wurde in Glasgefäße mit Steckdeckeln abgefüllt und autoklaviert.

Je nach Selektionsbedingungen wurden nach dem Autoklavieren Antibiotika (Ampicillin 100 μ g/ml oder Kanamycin 30 μ g/ml) zu den Medien hinzugefügt.

3.2.1.2 E.coli-Zellkultur

Die Anzucht und Passage des E.coli-Wildtypstamms erfolgte auf LB-Agar. Die plasmidhaltigen E.coli (mit oben aufgeführten Vektoren) wurden auf LB-Agar angezüchtet, der mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum versetzt war. Für DNA-Präparationen aus diesen Stämmen wurden Übernachtskulturen für maximal 14 Stunden in LB-Bouillon, je nach Bedarf versetzt mit Antibiotikum, bei 37°C unter Schütteln aerob bebrütet. Bei Verwendung eines Fertiggebundes wurde entsprechend den Herstellerangaben vorgegangen.

Die Platten wurden bei 4°C gelagert und alle vier Wochen neu ausgesät. Zur längerfristigen Lagerung in einer Stammsammlung wurden von den verschiedenen Stämmen 1ml Übernachtskulturen angesetzt. Diese wurden mit sterilem Glycerin (33%) versetzt und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.1.3 Herstellung rubidiumchloridkompetenter E.coli-Zellen

Bakterien können mit verschiedenen Methoden in die Lage versetzt werden, Fremd-DNA aufzunehmen. Eine Möglichkeit stellt dabei die Destabilisierung der Zellwand durch Behandlung mit Rubidiumchlorid und anschließendem Kälteschock dar. Diese Methode ist besonders zur effizienten Transformation mit Plasmid-DNA geeignet.

Aus einer Übernachtskultur von E.coli (DH5 α) in LB-Bouillon wurden 500 μ l entnommen, mit 250ml frischer LB-Bouillon vermengt und bei 37°C unter Schütteln aerob inkubiert. Mittels

Messung der optischen Dichte bei 600nm wurde so lange bebrütet, bis eine Dichte von $A_{600} = 0,7$ erreicht war. Anschließend wurde die Suspension für 15 Minuten auf Eis gehalten. Im weiteren Verlauf wurde darauf geachtet, die Zellen bei 4°C oder auf Eis zu bearbeiten.

Die Kultur wurde zweimal fünf Minuten lang bei 5000xg und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde jeweils dekantiert und verworfen. Das Pellet wurde in 100ml TfbI-Puffer resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis gehalten. Zur Gewinnung des Pellets aus dieser Suspension wurde zweimal für fünf Minuten bei 10000xg und 4°C zentrifugiert, wobei jedes Mal der Überstand dekantiert und verworfen wurde. Das Pellet wurde in 10ml TfbII-Puffer von ca. 4°C resuspendiert und zu 100µl in Eppendorfgefäße aliquotiert, in denen die Suspension mit Trockeneis in Ethanol schockgefrostet wurde. Die Lagerung der auf diese Weise kompetent gemachten Zellen erfolgte bei -80°C.

3.2.1.4 Transformation von Plasmid-DNA in E.coli-Zellen

Bei der Transformation werden Plasmide in kompetente Zellen übertragen. Plasmide werden auch als Autosomen bezeichnet, da sie sich in einer geeigneten Wirtszelle autonom replizieren können.

Zu 100µl auf Eis aufgetauter kompetenter Zellsuspension wurden 10µl der isolierten Plasmid-DNA gegeben. Anschließend wurde das Gemisch für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nun wurden die Zellen für zwei Minuten in einem auf 42°C temperierten Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt. Direkt danach wurden die Zellen wieder für zwei Minuten auf Eis gekühlt und dann mit 890µl LB-Bouillon von 37°C versetzt. Nach vorsichtigem Vermischen der Zellen mit Nährmedium wurde das Gemisch für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen bei 3000xg für zwei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 5 bis 10µl isotonischer, steriler Kochsalzlösung resuspendiert und auf getrocknete, vorgewärmte Agarplatten verteilt. Über Nacht wurden die Zellen bei 37°C unter aeroben Bedingungen bebrütet.

Transformierte Zellen wuchsen auf Grund der durch das Plasmid erworbenen Antibiotikaresistenz als Kolonien auf der Agarplatte. Zur genauen Überprüfung der Transformation wurde eine Plasmid-Mini-Präparation durchgeführt und die DNA analysiert.

3.2.2 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle humanen (A549) und murinen (MLE-12) Lungenepithelzelllinien wurden bei 37°C unter 5% CO₂-Atmosphäre in MEM- oder RPMI-Medium in Kultur gehalten, das mit 10% FBS versetzt wurde.

3.2.2.1 Einfrieren der Zellen

Die Zellen einer T₇₅-Zellkulturflasche wurden mit D-PBS gewaschen und trypsinisiert, wobei anschließend das Trypsin abgesaugt wurde. Im Anschluss wurden die Zellen in 1,5ml Einfriermedium (50% FCS, 10% DMSO, 40% Medium) resuspendiert und in ein 1,8ml Cryotube überführt, welches für mindestens 90 Minuten in einer Einfrierbox bei –80°C gefrostet wurde. Die Einfrierbox gewährte eine Abkühlung von 1°C pro Minute. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (–196°C) gelagert.

3.2.2.2 Auftauen der Zellen

Das Cryotube mit den Zellen wurde aus dem Stickstofftank entnommen, auf Eis transportiert und bei 37°C im Wasserbad rasch aufgetaut. Anschließend wurde der Inhalt des Cryotubes mittels einer sterilen Plastik-Pasteurpipette gleichmäßig resuspendiert und langsam in eine T₂₅-Zellkulturflasche mit vorgewärmtem Medium gegeben. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und gegebenenfalls die Zellen gesplittet.

3.2.2.3 Viabilitätstestung

Die Bestimmung der Viabilität erfolgte mit Trypanblau. Nur tote Zellen absorbieren den Farbstoff auf Grund ihrer geschädigten Zellmembran und erscheinen blau. Im Gegensatz dazu bleibt eine Absorption bei gesunden lebenden Zellen aus. Das Verhältnis blau gefärbter Zellen zur Gesamtzellzahl ist somit ein Maß für die Viabilität in der Kultur.

Die Zellen wurden trypsinisiert und in 1ml D-PBS aufgenommen. Hiervon wurden 20µl in ein 1,5ml-Eppendorfgefäß gegeben, mit 30µl D-PBS und 50µl einer 0,4-prozentigen Lösung von Trypanblau in D-PBS versetzt. Von dieser Menge wurden 10µl in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt und im Anschluss daran die Gesamtzellzahl ermittelt.

3.2.2.4 Mykoplasmentest

Eine kontaminierte Zellkultur enthält ca. 10^6 Mykoplasmen/ml. Auch wenn die jeweilige Mykoplasmenart an der Zelloberfläche anhaften kann, steht ausreichend Mykoplasmen-DNA im Zellkulturüberstand für einen positiven Nachweis zur Verfügung. Dieser Nachweis von Mykoplasmen in der Kultur erfolgte mit Hilfe des VenorGeM® Mykoplasmen-Nachweis durch PCR.

Der VenorGeM®-Mykoplasmen-Detektionskit ist ein Nukleinsäure-Amplifikationstest auf Basis der Polymerase-Kettenreaktion. Die PCR-Methode erlaubt eine schnelle und sehr sensitive Detektion von Mykoplasmenkontaminationen in biologischen Proben. Mit VenorGeM® sind 1 bis 5fg Mykoplasmen-DNA, entsprechend zwei bis fünf Mykoplasmen pro Probenvolumen, detektierbar. Die mitgelieferten Primer erlauben der DNA-Polymerase die Vervielfältigung eines Abschnitts der 16S-rRNA-Region des Mykoplasmen-genoms. Das amplifizierte PCR-Produkt hat eine Größe von ca. 270bp und kann direkt im Agarosegel sichtbar gemacht werden. Dadurch können neben den typischerweise als Kontaminanten in Zellkulturen auftretenden Mykoplasmen-spezies *M. orale*, *M. hyorhinis*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. salivarium* und *M. hominis* auch *M. pneumoniae*, *Acholeplasma laidlawii*, *M. synoviae* und verschiedene Ureaplasma-Spezies detektiert werden. Die interne Kontrolle liefert in einer erfolgreich durchgeführten PCR ein 191bp großes Produkt, welches im Agarosegel kurz unterhalb der Bande einer Mykoplasmen-positiven Probe erscheint. Abbildung 14 zeigt einen negativen Mykoplasmentest.

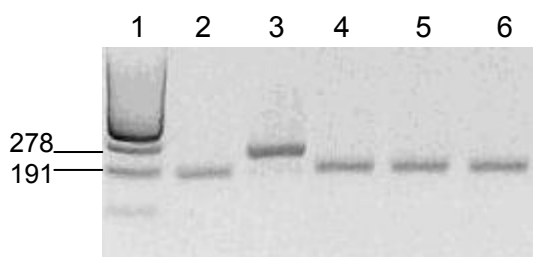


Abbildung 14: Agarosegel des Mykoplasmentests. Spur 1: Molekulargewichtsmarker, Spur 2: Negativkontrolle, Spur 3: Positivkontrolle, Spur 4: A549-Zellen, Spur 5: MLE-12-Zellen, Spur 6: MLE-15-Zellen, Agarosegel 0,8% in TAE-Puffer.

Für die Untersuchung wurden 500µl Zellkulturüberstand in ein steriles Eppendorfgefäß gegeben und dicht verschlossen. Der Überstand wurde fünf Minuten gekocht und anschließend für fünf Sekunden bei 13000rpm zentrifugiert. Für den PCR-Test wurden 2µl

dieses Überstandes eingesetzt. Der Test erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Der Test wurde routinemäßig etwa alle sechs Monate wiederholt. Ebenfalls wurden die stabil transfizierten Zelllinien untersucht. Während der Versuchsphase konnte in keiner Kultur eine Kontamination mit Mykoplasmen festgestellt werden.

3.2.2.5 Zelllysate

Zur Präparation eines Zelllysates wurden die Zellen trypsiniert und anschließend auf 100mM Petrischalen ausgesät. Die Zellernte erfolgte bei 80% bis 90% Konfluenz. Um vergleichbare Zelllysate zu erhalten wurde stets die gleiche Zellzahl ausgesät und die gleiche Wachstumszeit eingehalten.

Zur Lysierung wurden die Zellen zweimal mit je ca. 5ml D-PBS gewaschen, hierauf mit 1ml kaltem Lysispuffer überschichtet und 15 Minuten lang bei 4°C inkubiert. Die nun lysierten Zellen wurden von der Schale gelöst und in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Um störende Zellfragmente zu entfernen, wurde das Gemisch bei 4°C 20 Minuten lang bei 12000xg zentrifugiert. Nach der Überführung des Überstands in ein neues Gefäß wurde mittels Bradford-Assay (siehe unten) eine Proteinbestimmung durchgeführt.

3.2.2.6 Selektionskonzentration des Antibiotikums

Mit Hilfe dieses Tests wurde untersucht, welche Neomycinkonzentrationen für die Viabilität der Zellen limitierend waren. Diese konnten dann mit Erfolg zur Selektion von stabilen Transfektionen eingesetzt werden.

Es wurden MLE-12-Zellen und A549-Zellen auf sechs verschiedene 100mM Petrischalen ausgesät. Als Kontrollschale blieb eine Petrischale unbehandelt. Die restlichen fünf wurden mit fünf verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums versetzt. Unter diesen Bedingungen wurden die Zellen etwa zehn Tage lang in Kultur gehalten.

Für jede Zellart wurden unterschiedliche Konzentrationen getestet. Für A549 waren das 700, 800, 900, 1000 und 1100µg/ml an Neomycin G418. Bei MLE-12 wurde Neomycin G418 in Konzentrationen von 300, 400, 500, 600 und 700µg/ml verwendet. Es zeigte sich, dass A549-Zellen bei einer Neomycin Konzentration von 1000µg/ml nach zehn Tagen abstarben. MLE-12-Zellen hingegen bereits bei einer Konzentration von 600µg/ml .

3.2.2.7 Transfektion

Die Transfektion erfolgte mit Hilfe des ExGen500 *in vitro* Transfektionsreagenz. ExGen500 interagiert mit DNA zu kleinen, stabilen Komplexen, die leicht diffundieren und somit schnell mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen werden können. Das so entstehende Endosom wird durch die chemischen Eigenschaften von ExGen500 mit Protonen angereichert. Weiterhin diffundieren Chlorid-Ionen passiv in das Endosom. Die entstehenden Ionenkonzentrationen lösen einen zunehmenden osmotischen Druck aus, der durch die Aufnahme von Wasser die endosomale Membran zum Platzen bringt, was eine Translokation der DNA in den Kern ohne Degradation erlaubt (Abbildung 15).

Zu 100µl 150-millimolarer NaCl-Lösung wurde 1µg DNA gegeben und anschließend mit 3,3µl ExGen500 (entspricht sechs Äquivalenten) versetzt. Das Gemisch wurde zehn Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend in ein Well einer 12-Well-Platte zu 1ml Zellsuspension, die ca. 300000 Zellen enthielt, pipettiert. Die Zellen waren entweder MLE-12-Zellen in RPMI-Medium oder A549-Zellen in MEM-Medium. Nach 24 Stunden konnten die Zellen je nach Ziel weiter verarbeitet werden.

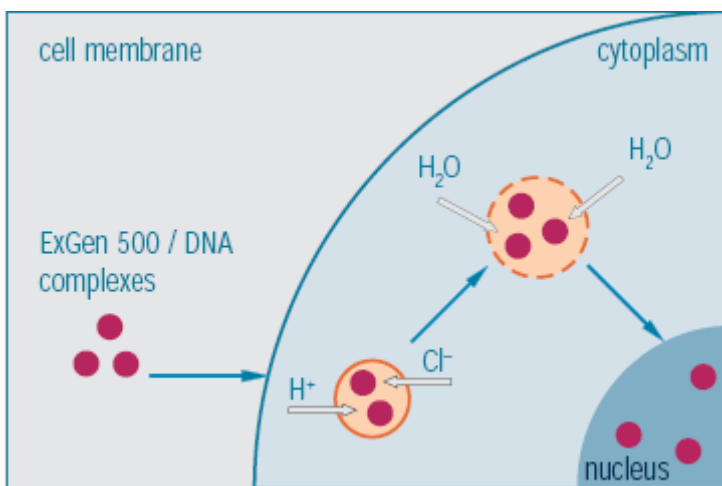


Abbildung 15: Funktionsweise von ExGen500[®] Fermentas. ExGen500 interagiert mit DNA zu Komplexen, die mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen werden können. Das so entstehende Endosom wird durch die chemischen Eigenschaften von ExGen500 mit Protonen angereichert. Weiterhin diffundieren Chlorid-Ionen passiv in das Endosom. Die entstehenden Ionenkonzentrationen lösen einen zunehmenden osmotischen Druck aus, der durch die Aufnahme von Wasser die endosomale Membran zum Platzen bringt, was eine Translokation der DNA in den Kern ohne Degradation erlaubt.

3.2.2.8 Arzneimittel-Vorbehandlung der Kulturen

Da die Wirkung bestimmter Pharmaka auf die Zellkulturen untersucht werden sollte, mussten vorher bestimmte Arzneimittel-Kulturen generiert werden. Im Versuch sollten dabei stabil transfizierte MLE-12-Zellen miteinander verglichen werden.

In fünf Wells einer 6-Well-Platte wurden dazu je 300000 Zellen pro Well ausgesät. Pro 6-Well-Platte wurde nur eine Zellart verwendet. Die Zellen wuchsen bis 70% Konfluenz an und wurden anschließend mit je 10µM aus jeder der vier verschiedenen Arzneimittellösungen (Cyclophosphamid, Azathioprin, Methylprednisolon oder Hydroxychloroquin) für eine Zeit von 24 Stunden inkubiert. Ein Well wurde unbehandelt belassen und als Kontrolle verwendet. Anschließend wurden die Zelllysate geerntet.

Die verwendeten Zellen waren MLE-12-Zelllinien, stabil transfiziert mit pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt}, pcDNA3/HA-hSP-C^{P30L}, pcDNA3/HA-hSP-C^{I73T}, pcDNA3/HA-hSP-C^{P115L}, pcDNA3/HA-hSP-C^{A116D}, pcDNA3/HA-hSP-C^{L110R} oder pcDNA3/HA-hSP-C^{L188Q}.

3.2.2.9 Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation der Lamellarkörperchen

Zur spezifischen Charakterisierung der Lamellarkörperchen wurden diese mittels Dichtezentrifugation aus den Zellen isoliert.

Die Zellen konnten in einer T₇₅-Zellkulturflasche auf eine Konfluenz von 90% anwachsen. Sie wurden mit D-PBS zweimal gewaschen und anschließend trypsinisiert. Das Trypsin wurde abgesaugt, die Zellen mittels D-PBS vom Flaschenboden abgelöst und als Suspension in ein 15ml-Greiner-Röhrchen überführt. Um die Zellen zu pelletieren, wurde die Suspension für zehn Minuten bei 300xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in D-PBS resuspendiert und anschließend erneut bei 300xg zentrifugiert.

Nach dem Waschvorgang wurde das Pellet in 1ml Homogenisierungspuffer, der bereits mit Proteaseinhibitor versetzt war, aufgenommen. Als Proteaseinhibitor wurde eine Verdünnung von 1:50 einer in 1ml D-PBS frisch gelösten Tablette (Complete Protease Inhibitor Cocktail) zugegeben. Um die Zellwand aufzubrechen, wurde das Gemisch zehn Sekunden lang bei 10Hz viermal sonifiziert. Zwischen den einzelnen Sonifikationen wurde das Gemisch für eine Minute auf Eis gehalten.

Um Zelldebris zu entfernen, wurde zehn Minuten lang bei 500xg zentrifugiert. Der Überstand wurde auf 500µl eingengt und anschließend auf einen

OptiPrep™-Dichtegradienten aufgetragen. Da Lamellarkörperchen eine ähnliche Dichte wie Lysosomen aufweisen, erwies sich die Zusammensetzung des Dichtegradienten nach Tabelle 8 als sinnvoll. Das Zentrifugenröhrchen wurde dann nach der vorher beschriebenen Zusammensetzung befüllt und für eine Stunde bei 100000xg zentrifugiert. Im Anschluss daran wurden die einzelnen Fraktionen gewonnen (fünf Stück). Jede Fraktion wurde mit 4ml Homogenisierungspuffer verdünnt und wiederum für eine Stunde bei 100000xg zentrifugiert.

Konzentration der Gradientenschicht [% w/v]	Volumen an WS [mL]	Volumen an HM [mL]
8	1,6	8,4
16	3,2	6,8
24	4,8	5,2
32	6,4	3,6

Tabelle 8: Zusammensetzung der Stufen des Dichtegradienten. Homogenisierungspuffer HM (Sucrose 0,25M; EDTA 1mM; Tris-HCl 10mM; pH = 7,4), Verdünnungslösung (Sucrose 0,25M; EDTA 6mM; Tris-HCl 60mM; pH = 7,4), Working Solution WS (fünf Volumenanteile OptiPrep™ + ein Volumenanteil Verdünnungslösung)

Die gewonnenen Pellets wurden in 100µl 20-millimolarer Phosphatpuffer (pH 7,0), der mit Proteaseinhibitor versetzt war, resuspendiert und in Eppendorfgefäße überführt. Im Anschluss wurde ein Bradford-Proteinassay zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts durchgeführt und Portionen zu je 20µg Gesamtprotein lyophilisiert. Zur genauen Charakterisierung wurde anschließend ein Westernimmunoblot durchgeführt.

3.2.2.10 Isolation der Large Aggregates

Surfactant muss von den Zellen sezerniert werden, um seine Wirkung im Alveolarraum entfalten zu können. Es kann in Form der so genannten *Large Aggregates* (LAs) aus dem Umgebungsmedium isoliert werden. Zu den *Large Aggregates* zählen Lamellarkörperchen und tubuläres Myelin, also die biophysikalisch hochaktiven Vorläufer des interfacialen Surfactantfilms.

Die Menge und Zusammensetzung des sezernierten Surfactants wurde mittels semi-quantitativer Immunoblots ermittelt und mit den Daten der intrazellulären Messungen verglichen. Um Surfactant aus dem Kulturüberstand besser zu charakterisieren, wurden die *Large Aggregates* isoliert. Hierbei wurde der Kulturüberstand bei 40000xg für eine Stunde zentrifugiert. Das gewonnene Pellet enthielt die *Large Aggregates*.

3.2.2.11 Lymphozyten- / Neutrophilenisolation

Um die Neutrophilen und die Lymphozyten aus Vollblut zu untersuchen, mussten diese zunächst nach der Ficoll-Methode isoliert werden. Es wurden ca. 1 Million Lymphozyten und 3 Millionen Neutrophile pro ml Blut gewonnen.

In zwei 50ml-Falconröhrchen wurden je 20ml Ficoll vorgelegt. Nach Abnahme von 30ml Blut wurde dieses im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt und auf die zwei Falconröhrchen verteilt (Abbildung 16 A). Anschließend wurde 20 Minuten lang bei 20°C und 800xg ohne Bremse zentrifugiert. Durch die Zentrifugation des Gradienten erhielt man von oben nach unten vier Phasen, die klare Serumfraktion, einen weißen Lymphozytenring, die Ficollsche Lösung und ein rotes Gemisch aus Erythrozyten und Granulozyten (Abbildung 16 B).

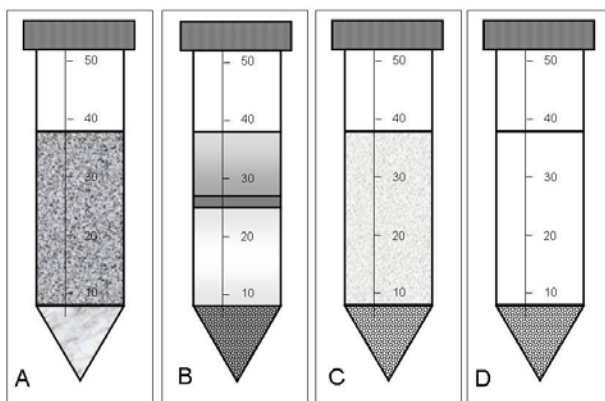


Abbildung 16: Ficoll-Gradient. A: Überschichtung von Ficoll mit Vollblut, B: Ficoll'scher Gradient von oben nach unten: Serum, Lymphozyten, Ficoll, Erythrozyten- / Granulozytengemisch, C: Hypotone Lyse der Erythrozyten, D: aufbereitete Neutrophile in PBS

Zur Isolation der Lymphozyten wurde die oberste Phase verworfen und der Lymphozytenring vorsichtig in ein neues 50ml-Falconröhrchen überführt und mit PBS auf 50ml aufgefüllt. Anschließend wurde für zehn Minuten bei 600xg und 20°C mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Röhrchen erneut mit PBS auf 50ml aufgefüllt und diesmal für 15 Minuten bei 300xg und 20°C mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in RPMI aufgenommen.

Um das Erythrozyten- / Granulozytengemisch zu gewinnen, wurde der Überstand bis zu dieser Phase verworfen und das Gemisch mit PBS versetzt und mittels Zentrifugation bei 1000rpm und 4°C gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen. Danach erfolgte die

Erythrozytenlyse. Das Zellpellet wurde mit kaltem Ammoniumchlorid-Puffer resuspendiert und 30 Minuten lang auf Eis gehalten. Anschließend wurde die Suspension bei 1000rpm und 4°C zentrifugiert (Abbildung 16 C). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet (=Neutrophile) in RPMI resuspendiert, auf 2ml-Eppendorfgefäße verteilt und bei 37°C bebrütet. Um die Neutrophilen zu waschen, wurde mittels Zentrifugation bei 1000rpm und 4°C wieder ein Pellet gewonnen, dieses in PBS resuspendiert (Abbildung 16 D) und wieder zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in frischem RPMI resuspendiert.

3.2.3 DNA-Methoden

3.2.3.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus E.coli

Für die Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus transformierten E.coli-Kolonien wurde die alkalischen Lyse nach der Methode Zhou et al. angewendet. Eine Bakterienkolonie wurde mittels steriler Impföse von einer LB-Agar-Platte abgenommen und in 1,5ml LB-Bouillon suspendiert. Über Nacht wurden die Bakterien aerob bei 37°C unter Schütteln bebrütet. Die Bakteriensuspension wurde in ein 1,5ml-Eppendorfgefäß überführt und zehn Sekunden lang bei 20000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf einen größeren Tropfen abgekippt. Das Zellpellet wurde in diesem Tropfen resuspendiert, mit 300µl TENS-Puffer versetzt und zwei bis fünf Sekunden gevortext. Anschließend wurde die Lysereaktion mit der Zugabe von 150µl Birnboim-Acetat gestoppt. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 4000xg blieb die DNA im Überstand erhalten. Dieser wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 900µl 96%igem EtOH von -20°C vermischt. Im Anschluss wurde bei 20000xg fünf Minuten lang zentrifugiert, das EtOH komplett abgegossen und die gefällte Plasmid-DNA getrocknet. Das Pellet wurde in 20 bis 40µl TE-Puffer aufgenommen. Um die RNA zu verdauen, wurde RNase-Lösung zugegeben.

Falls besonders gereinigte Plasmid-DNA benötigt wurde, wurde das Fertiggebilde QIAprep® Spin Miniprep Kit 50 (QIAGEN, No. 27104) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

3.2.3.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus E.coli

Für die Präparation größerer Mengen an Plasmid-DNA wurden Fertiggebilde verwendet. Da die DNA für die Präparation für Transfektionen endotoxinfrei sein musste, wurde

NucleoBond® Plasmid DNA Purification Endotoxinfree (Macherey-Nagel) eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

3.2.3.3 Restriktionsanalyse von DNA

Die Restriktionsanalyse dient zur Erstellung klonierfähiger DNA-Fragmente und zur Identifizierung spezifischer Fragmente.

Für einen vollständigen Restriktionsverdau wurden 500ng DNA eingesetzt. Die Spaltung von 1µg DNA erforderte 1U des entsprechenden Enzyms und 1/10 des Endvolumens an passendem Zehnfachrestriktionspuffer. Für den Verdau wurde die Reaktionsmischung eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Nach dem Restriktionsverdau wurde die DNA auf einem Agarosegel analysiert.

Für einen Verdau mit zwei Enzymen war auf die richtige Pufferauswahl zu achten, um eine maximal mögliche Leistung der beiden Enzyme zu ermöglichen.

3.2.3.4 Agarosegelelektrophorese von DNA

DNA lässt sich auf Grund ihrer negativen Ladung mittels Agarosegelelektrophorese auftrennen. Im elektrischen Feld wandert sie Richtung Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von Größe und Konformation des DNA-Moleküls, der Agarosegelkonzentration, der Stromstärke und verschiedenen Pufferbedingungen. Durch Optimierung dieser Faktoren ist eine deutliche Auftrennung verschieden großer DNA-Moleküle möglich.

Da in dieser Arbeit DNA-Fragmente im Größenbereich von 1 bis 7kbp analysiert wurden, wurde ein niederprozentiges Gel mit 0,8% Agarose verwendet. Es wurden 0,64mg Agarose in 80ml TAE-Puffer durch Erhitzen im Mikrowellenherd vollständig gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurden 5µl Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml) hinzugegeben und die Mischung in eine Formschale gegossen, die mit Spacern und einem Kamm versehen war. Nach dem Erstarren des Gels wurden die Spacer und der Kamm entfernt, das Gel in eine Horizontal-Elektrophoresekammer eingesetzt und mit TAE-Puffer als Laufpuffer bedeckt. Die Proben wurden mit 2µl Fünffachprobenpuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Proben liefen für fünf Minuten bei 25V aus den Taschen in das Gel und trennten sich anschließend nach einer Spannungserhöhung auf 100V eine Stunde lang auf. Durch die Interkalation des im Gel vorhandenen Ethidiumbromids mit der DNA

konnten die DNA-Fragmente als fluoreszierende Linien bei Durchleuchtung mit UV-Licht (305nm) visualisiert und auf einem Film aufgenommen werden.

Als Längenstandard wurde auf eine Spur die mit HindIII geschnittene DNA des Phagen Lambda aufgetragen, an Hand derer Fragmentgrößen zwischen 125bp und 23,1kbp bestimmt werden konnten.

3.2.3.5 Quantifizierung von DNA

Die DNA-Konzentration einer wässrigen Lösung in einer Quarzküvette der Schichtdicke 1cm kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt werden. Unter diesen Bedingungen entspricht eine Extinktion von 1 ($OD_{260} = 1$) einer Konzentration von 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA. Bei einer Wellenlänge von 280nm liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen vor. Um den Reinheitsgrad der DNA-Lösungen zu ermitteln, wird der Quotient aus OD_{260} / OD_{280} ermittelt. Ist das Ergebnis des Quotients eine Zahl größer 1,8, weist dies darauf hin, dass die Lösung nur gering bis gar nicht durch Proteine kontaminiert ist.

Zur Einstellung des Nullwerts am Photometer wurde die Absorption von TE-Puffer in einer Quarzküvette mit 1cm Schichtdicke bei 260nm verwendet. Die DNA-Lösung wurde im Verhältnis 1:200 in TE-Puffer verdünnt und in eine Quarzküvette überführt. Die Absorption bei Licht der Wellenlänge 260nm wurde im Vergleich zum Nullwert vermessen. Ebenfalls wurde die Absorption bei Licht der Wellenlänge 280nm im Vergleich zum Nullwert vermessen. Um den Reinheitsgrad der DNA-Lösungen zu ermitteln, wurde der Quotient aus OD_{260} / OD_{280} ermittelt.

3.2.3.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der enzymatischen Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen *in vitro*. Es werden zwei Oligonukleotide als Primer ausgewählt, die das DNA-Stück, das amplifiziert werden soll, flankieren und dort auf Grund ihrer Komplementarität binden können. Mittels zugefügter DNA-Polymerase werden Amplifikate gebildet, die in den folgenden Reaktionszyklen ebenfalls als Ziel-DNA fungieren. Die Amplifizierung erfolgt in drei Schritten. Zunächst wird die Ziel-DNA denaturiert, anschließend lagern sich die Primer an („annealing“) und danach erfolgt die Extension. Diese Schritte werden nacheinander in mehreren Zyklen durchgeführt, so dass es zu einer exponentiellen Vermehrung der Zielsequenz kommt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR zur Punktmutagenese und zum hochsensitiven Nachweis von Mykoplasmen verwendet.

3.2.3.7 Punktmutagenese mittels PCR

Zur Erzeugung ortsspezifischer Punktmutationen wurde der QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit verwendet. Die Zielvektoren waren pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt}, pEGFP-C1/hSP-C^{Wt} und pEGFP-N1/hSP-C^{Wt}. Als DNA-Polymerase wurde PfuTurbo benutzt, welche beide Stränge der Plasmid-DNA mit hoher Genauigkeit repliziert (sechsmal genauer als Taq-Polymerase), ohne die mutierten Oligonucleotidprimer zu versetzen. So wurde doppelsträngige *supercoiled* Plasmid-DNA, die das zu verändernde Insert enthielt (SP-C-Gen), zusammen mit zwei synthetischen Oligonucleotidprimern mit der gewünschten Mutation verwendet. Die Oligonucleotidprimer waren jeweils komplementär zu einem Strang der Plasmid-DNA und wurden mittels der Pfu-DNA-Polymerase in der PCR verlängert. Durch die Eingliederung der Oligonucleotide entstand ein lineares, mutiertes Plasmid. Im Unterschied zur „normalen“ PCR fand bei dieser Methode keine Vermehrung des Templates statt, so dass keine exponentielle, sondern eine lineare Vermehrung der Ziel-DNA erfolgte.

Der PCR-Reaktionsansatz enthielt je 10ng Template (pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt}), 125ng Forward Primer, 125ng Reverse Primer, 5,0µl Zehnfach-PCR-Puffer, 1µl dNTP Mix, 1µl Pfu-Polymerase. Das Gesamtvolumen von 50µl wurde durch die Zugabe von Wasser erreicht. Durch verschiedene Versuche konnten die Angaben in Tabelle 9 als optimale Einstellungen für das PCR-Gerät definiert werden. Die verwendeten Oligonucleotidprimer sind im Materialteil abgebildet.

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	95°C	30 s
15	95°C	30 s
	55°C	1 min
	68°C	10 min
1	4°C	bis zur Entnahme

Tabelle 9: Optimale Geräte-Einstellungen für den PCR-Ablauf

Im Anschluss an die PCR erfolgte ein Verdau des Produktes mit der Endonuclease DpnI bei 37°C für eine Stunde. Diese Endonuclease verdaute spezifisch methylierte oder hemimethylierte DNA. Auf diese Weise war es möglich, zwischen der Template-DNA (aus E.coli und daher methyliert) und der synthetisierten mutierten DNA zu unterscheiden.

Nachfolgend wurde die gewonnene mutierte DNA in E.coli transformiert und anschließend sequenziert.

3.2.3.8 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach dem Kettenabbruchsverfahren von Sanger et al. (1977). Es wurde nach der modernisierten Variante der halbautomatischen, nicht-radioaktiven Sequenzierung vorgegangen, bei der die Detektion der Sequenzierungsprodukte auf dem Einbau von vier verschiedenfarbigen fluoreszierenden Didesoxynukleotiden beruht. Die Bestimmung wurde von der Firma Eurofins Medigenomix GmbH, Fraunhoferstraße 22, D-82152 Martinsried durchgeführt. Alle Sequenzen der oben genannten Vektoren wurden bestätigt.

3.2.4 Biochemische Methoden

3.2.4.1 Quantitative Proteinbestimmung

Die Gesamtproteinkonzentration in den Proben wurde nach der Methode von Bradford et al. [83] bestimmt.

Das Bio-Rad-Farbstoff-Konzentrat wurde zunächst mit Aqua ad injectabilia im Verhältnis 1:5 verdünnt und anschließend durch einen Papierfilter filtriert, um es von Präzipitaten zu befreien. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe mit abnehmenden Konzentrationen von BSA in PBS-Puffer hergestellt (5000µg/ml, 2500µg/ml, 1250µg/ml, 625µg/ml, 312,5µg/ml, 156,3µg/ml, 78,15µg/ml). Es erfolgte eine Doppelbestimmung der einzelnen Standardkonzentrationen und Proben mit jeweils 5µl Probenvolumen. Die Proben und Standardlösungen wurden zum Anfärben mit jeweils 100µl des Farbstoffreagenzes versetzt. Im Photometer wurde die Absorption bei 600nm abzüglich des Blindwerts (Bio-Rad-Reagenz + BSA) gemessen und mit Hilfe der Standardreihe in Proteinkonzentrationen umgerechnet.

3.2.4.2 LDH-Assay

Mit Hilfe des LDH-Assays war es möglich die Menge toter A549- oder MLE-12-Zellen in Kultur zu messen. Tote Zellen setzen aufgrund ihrer beschädigten Zellmembran Laktatdehydrogenase in die Umgebung frei. Diese kann mit dem Assay gemessen

werden. Auf diese Weise ist auch eine Aussage über die Toxizität bestimmter Kulturzusätze, wie verschiedener Arzneimittel, zu machen.

Vor dem Start des Assays wurden die verschiedenen Reagenzien vorbereitet. Für die *Dye Solution* wurden 50mg INT und 900mg *L-lactate* unter leichtem Erwärmen und Ultraschall in 50ml PBS gelöst. Jede *Dye Catalyst Solution* wurde aus 26,10mg NAD⁺ und 104mg Sucrose in 8,7ml Wasser unter leichtem Erwärmen gelöst. Nach dem Abkühlen wurde das Diaphorase-Gemisch (20mg) und 2,6mg BSA darin aufgelöst.

Zunächst wurde der LDH-Standard frisch angesetzt. Es wurden für 1ml Stammlösung (50units/ml) 5,2µl LDH-Suspension (9644,4 units/ml) zu 1ml PBS gegeben. Die Ausgangslösung für die Standardreihe wurde durch 1:10-Verdünnung der Stammlösung erstellt, womit man eine Lösung mit 5000U/L LDH-Suspension erhielt. Zur Erstellung der Standardreihe wurde die Ausgangslösung jeweils 1:1 mit PBS verdünnt, wodurch man folgende LDH-Standard-Werte erhielt: 5000U/L - 2500U/L - 1250U/L - 625U/L - 312U/L - 156U/L - 78U/L . Als Blindprobe (0U/L) wurde reines PBS verwendet.

Es wurden jeweils 100µl Standard und 100µl Probe (Kulturüberstand oder Zelllysate) in PBS pro Mikrotiterplattenvertiefung pipettiert. Die Messung erfolgte als Doppelbestimmung. Daraufhin wurde der Farbstoff zugegeben. Zu jedem Ansatz wurden 30µl *Dye solution* pipettiert. Nun wurden zu jedem Ansatz 20µl *Catalyst solution* pipettiert. Dies musste schnell erfolgen, da die Reaktion auch bei Raumtemperatur sofort einsetzte. Anschließend wurde die Platte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 492nm für 15 Minuten im Kinetikmodus ausgelesen, wobei jede Minute eine Messung erfolgte.

Zur Auswertung wurde die Steigung der Kurve im linearen Bereich (Mean V; zwei bis zehn Minuten) gegen den Standard aufgetragen, um die unbekannt Werte daraus zu berechnen.

3.2.5 Zellbiologische Methoden

3.2.5.1 Austestung der verträglichen Arzneimittelkonzentration

In diesem Test wurde die Verträglichkeit der Arzneimittel Hydroxychloroquinsulfat (in Wasser gelöst), Methylprednisolon (in Ethanol gelöst), Azathioprin (in DMSO gelöst) und Cyclophosphamid (in Wasser gelöst) untersucht. Diese Lösungen wurden auf einen Arzneimittelgehalt von 1000µM eingestellt.

Zur Konzentrationsbestimmung wurden MLE-12-Zellen zunächst sechs Stunden, dann 24 Stunden und schließlich 30 Stunden lang mit einer Konzentration von je 0,5µM, 10µM und 100µM der Arzneimittellösung inkubiert. Dazu wurden in 6-Well-Platten je 300000 MLE-12-Zellen pro Vertiefung ausgesät, mit RPMI-Medium versetzt und auf die entsprechenden Arzneimittelkonzentrationen eingestellt. Nach Erreichen der jeweiligen Inkubationszeit wurden Zelllysate präpariert, der Gesamtproteingehalt nach der Bradford-Methode gemessen und 20µg Gesamtprotein lyophilisiert. Mit diesen Lyophilisaten wurde eine Westernblotanalyse zur Quantifizierung der Hitzeschockproteine Calreticulin, Calnexin, Hsp70 und Hsp90 durchgeführt.

3.2.5.2 Elektronenmikroskopie

Die Morphologie der Lamellarkörperchen wurde elektronenmikroskopisch durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Welsch der Anatomischen Anstalt der LMU untersucht. Bei dem Gerät handelte es sich um ein CM 10 von Phillips. Die Schnittdicke betrug 70nm.

Zur Probenvorbereitung wurden Collagengele in 12-Well-Platten gegossen. Pro Well wurden 170µl Collagenlösung auf dem Boden des Wells gleichmäßig verteilt. Dazu fügte man ein Gemisch aus je 20µl Zehnfachmedium und NaOH-Lösung und bewegte die 12-Well-Platte 15 Sekunden lang kreisförmig. Das Gel verfestigte sich innerhalb von 15 Minuten und haftete am Boden des Wells. Nach dem Aushärten wurden die Zellen auf dem Gel ausgesät. Sie wuchsen bis zu einer Konfluenz von 70 bis 80% an.

Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 3,5% Glutaraldehyd in Kakodylatpuffer bei 4°C über einen Zeitraum von 24 Stunden. Anschließend wurden die Zellen in 1% Glutaraldehyd in Kakodylatpuffer bei 4°C aufbewahrt. Nach der Fixierung erfolgten innerhalb einer Stunde drei Waschgänge mit Kakodylatpuffer bei 4°C und zwar einmal zehn Minuten, einmal 20 Minuten und einmal 30 Minuten lang. Die Zellen wurden mit 2% Osmiumtetroxid in Aqua ad injectabilia bei 4°C nachfixiert und kontrastiert. Schließlich erfolgte ein weiterer Waschgang mit Kakodylatpuffer, jeweils für fünf und für zehn Minuten. Nun wurden die Zellen in eine halbgesättigte vierprozentige wässrige Uranylacetatlösung mit einer Temperatur von 4°C überführt und dort 24 Stunden im Block kontrastiert. Schließlich erfolgte erneut ein Waschgang mit Kakodylatpuffer, jeweils für fünf und für zehn Minuten. Die Entwässerung geschah mit Hilfe einer Alkoholverdünnungsreihe. Dann wurden die Zellen in zwei- bis vierprozentigem Agar-Agar zur nachfolgenden Untersuchung eingebettet.

3.2.5.3 Analyse der Phospholipide mittels Massenspektrometrie

Die Phospholipidzusammensetzung der transfizierten Zellen wurde mittels Elektrospray-Ionisation-Doppelmassenspektrometrie (ESI-MS/MS) analysiert. Phospholipide lassen sich gut durch ESI-MS/MS untersuchen, da sie sich in ihrer polaren Kopfgruppe eindeutig voneinander unterscheiden. Bei der ESI-MS/MS im Positivmodus steigt die Ionenintensität in der Reihenfolge PS < PG < PE << PC. Die Kopfgruppen werden bei den unterschiedlichen PL vollständig oder ohne Phosphat abgespalten.

Ziel des Versuchs war es, den Wildtyp in seiner Zusammensetzung mit zwei verschiedenen Mutationen zu vergleichen. Weiterhin sollten die unbehandelten Zellen den mit Methylprednisolon und Hydroxychloroquin behandelten Zellen gegenüber gestellt werden. Zielgrößen waren hierbei die Zusammensetzung der Zelle und des Kulturüberstandes.

Die drei stabil transfizierten MLE-12-Zellkulturen (pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt}, pcDNA3/HA-hSP-C^{I73T} und pcDNA3/HA-hSP-C^{A116D}) wurden in 6-Well-Platten zu je 300000 Zellen pro Well ausgesät und mit 1ml serumfreiem RPMI-Medium bedeckt. Diese wuchsen zunächst auf 70% Konfluenz an und wurden anschließend unbehandelt oder mit 10µM Arzneimittellösung behandelt für 24 Stunden inkubiert. Als Arzneimittellösungen wurden Methylprednisolon und Hydroxychloroquin verwendet. Der Ansatz wurde als Mehrfach-Bestimmung durchgeführt. Nach der 24-stündigen Inkubationszeit wurde der Kulturüberstand abgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nun wurde bei 12000xg fünf Minuten lang zentrifugiert, um eventuell im Überstand schwimmende Zellen abzutrennen. Der daraus resultierende Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß gefüllt, vollständig lyophilisiert und in 1ml 0,1-prozentigem SDS aufgenommen. Der Zellrasen wurde mit 0,5ml 0,2-prozentigem SDS lysiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurde mit 0,5ml Aqua ad injectabilia nachgewaschen und diese Lösung in dasselbe Eppendorfgefäß überführt. Somit betrug die Endkonzentration im Eppendorfgefäß 0,1% SDS. Um überschüssige Zellfragmente abzutrennen, wurde mit 12000xg 20 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Die Zellysate wurden auf ihren Gesamtproteingehalt bestimmt.

Die Proben wurden zur Analyse an die Kooperationsarbeitsgruppe Prof. Dr. Schmitz, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg, auf Trockeneis verschickt. Dort wurde die Phospholipidzusammensetzung der

Proben mittels Elektrospray-Ionisation-Doppelmassenspektrometrie (ESI-MS/MS) analysiert.

3.2.6 Immunologische Methoden

3.2.6.1 1D-SDS-PAGE

Mit Hilfe einer SDS-PAGE ist es möglich, die verschiedenen Proteinbestandteile einer Probe nach ihrer Größe aufzutrennen. Bei dieser Art der Elektrophorese werden die Proben in einem Polyacrylamidgel untersucht. SDS wirkt dabei als Detergens und zerstört alle Disulfidbrücken im Protein. Im elektrischen Feld werden die Proben getrennt, aufgrund ihrer negativen Ladung wandern sie im Gel. Kleine Proteine laufen dabei schneller durch das Gel als große Proteine.

Zur Probenvorbereitung wurde nach einer Bestimmung des Gesamtproteingehalts der Proben die gewünschte Menge aliquotiert, in der Vakuumzentrifuge lyophilisiert und in jeweils 1µl Probenpuffer pro 1µg Gesamtprotein aufgenommen. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren bei 1000xg wurden die Proben zehn Minuten lang bei 70°C im Wasserbad inkubiert. Nach erneutem Vortexen und Zentrifugieren wurden die Proben auf das Gel aufgetragen, jeweils 20µg Gesamtprotein pro Spur.

Die Proben wurde mit Hilfe von 1D-SDS-PAGE aufgetrennt. Für die Untersuchungen wurde MES-Laufpuffer (LDS-Sample-Buffer 25%, Reducing-Agent 10%, H₂O 65%) verwendet. Als Molekulargewichtsmarker diente MultiMark-12 von Invitrogen. Für stabile reduzierende Bedingungen sorgte die Zugabe von NuPAGE Antioxidant zum Laufpuffer. Die Elektrophorese erfolgte in den Xcell SureLock Minicell Kammern bei 200V, 100mA für 35 Minuten. Nach dem Elektrophoreselauf wurde das Gel mit Coomassie bzw. Silberlösung gefärbt oder mittels Westernblot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen.

3.2.6.2 Coomassie-Färbung des SDS-Gels

Das Gel wurde zur Färbung nach Coomassie et al. für mindestens fünf Minuten in der Färbelösung inkubiert, je nach erwünschter Bandenintensität. Die Färbelösung setzte sich aus 500mg Coomassie-Reagenz, 100ml destilliertem Wasser, 100ml Methanol und 20ml Essigsäure zusammen. Zur Fixierung wurde ein Gemisch aus 100ml destilliertem Wasser, 80ml Methanol und 20ml Essigsäure verwendet. Die Lagerung des Gels erfolgte in 25% Methanol.

3.2.6.3 Silberfärbung des SDS-Gels

Für die Silberfärbung wurde die Methode nach Heukeshoven/Dernick (1985) angewendet, wobei das Gel 30 Minuten lang in der Fixierungslösung (30% Ethanol, 10% konzentrierte Essigsäure, 60% H₂O) fixiert und anschließend für weitere 30 Minuten in der Inkubationslösung (68g Natriumacetat, 300ml Ethanol, 2g Natriumthiosulfat, auf 1000ml mit H₂O) inkubiert wurde. Anschließend wurde es dreimal 15 Minuten lang mit Aqua ad injectabilia gewaschen und dann für 20 Minuten in der Silberlösung (2g Silbernitrat, 37% Formaldehyd, auf 1000ml mit H₂O) versilbert. Nach Zugabe der Entwicklerlösung (25g Natriumcarbonat, 37% Formaldehyd, auf 1000ml mit H₂O) wurde zwischen drei bis zehn Minuten gewartet, je nach Farbintensität der Banden, und dann die Färbereaktion durch Zugabe von fünfprozentiger Essigsäure gestoppt. Die Lagerung des Gels erfolgte in einprozentiger Essigsäure.

3.2.6.4 Immunodetektion mittels Westernblot

Mit Hilfe des Westernblot-Verfahrens ist es möglich, in einem SDS-Page aufgetrennte Proteinproben auf eine Membran zu übertragen und diese weiter zu untersuchen. Dabei können verschiedene Proteinbanden mit unterschiedlichen spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden.

Der Proteintransfer erfolgte im vertikalen „SemiDry“-Verfahren unter Nutzung des Xcell II Blot Modules auf eine PVDF-Membran für 60 Minuten bei 30V und 170mA im Transferpuffer (5% NuPAGE-Transfer-Buffer, 20% Methanol, 75% Wasser). Die PVDF-Membran wurde vor Gebrauch mit Methanol für eine Minute aktiviert, in Aqua ad injectabilia für eine Minute equilibriert und anschließend zehn Minuten lang im Transferpuffer gelagert.

Zur Detektion wurde die Membran drei Stunden lang in Blocking-Puffer (5% Milchpulver + TBS-T-Puffer = Blotto A) inkubiert, um eine Absättigung der freien Bindungsstellen zu erreichen. Das Verdünnungsschema für die verschiedenen Antikörperlösungen ist Tabelle 3 des Materialteils zu entnehmen. Als Verdünnungslösung diente Blotto A. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit der ersten Antikörperlösung. Nach Entfernen von überschüssigen, nicht gebundenen Antikörpern durch dreimaliges Waschen mit TBS-T-Puffer für jeweils zehn Minuten wurde mit der zweiten Antikörperlösung (zweiter Antikörper IgG-HRP-Konjugat) für eine Stunde inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal mit TBS-T gewaschen und schließlich nach Aktivierung mit der ECL-

Chemilumineszenzlösung auf einem Röntgenfilm entwickelt. Die fertigen Filme wurden anschließend mit dem FluorS Multi Imager eingelesen.

Die Auswertung der Schwärzungsintensität der Banden auf dem Röntgenfilm wurde mit der Software Aida von Raytest durchgeführt. Für die Zuordnung des Molekulargewichts an Hand des Molekulargewichtsmarkers wurde das Programm QuantiOne von Biorad verwendet.

3.2.6.5 Immunohistochemie

Mittels Immunohistochemie ist es möglich, Zellen bzw. bestimmte Zellkompartimente genauer zu untersuchen. Durch die Anfärbung mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die spezifisch gegen bestimmte Antigene der Zelle sind, ist eine Beobachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop möglich. Dabei können die verschiedenen Lokalisationen dieser Antigene in der Zelle sichtbar gemacht werden.

Es wurden Zellen in 6-Well-Platten auf Glas-Coverslips ausgesät, die man bis zu einer Konfluenz von 60 bis 80% anwachsen ließ. Bei Bedarf wurden die Zellen gleichzeitig auf Coverslips transfiziert.

Zum Fixieren wurden die Zellen mit D-PBS gewaschen und anschließend mit vierprozentigem Paraformaldehyd (PFA) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das vierprozentige PFA wurde vor Gebrauch in der nötigen Menge durch Verdünnung einer zwanzigprozentigen PFA-Stammlösung mit D-PBS im Verhältnis 1:5 frisch hergestellt. Für die Stammlösung wurden 2g Paraformaldehyd in D-PBS durch Zugabe von 100µl 5N-NaOH und Erhitzen auf 80°C in Lösung gebracht. Die Lösung wurde anschließend auf 10ml aufgefüllt und bei 4°C gelagert. Im Anschluss an die Fixierung wurde das PFA entfernt, die Probe dreimal mit D-PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung mit D-PBS überschichtet bei 4°C aufbewahrt. Die Coverslips wurden zur weiteren Behandlung in der 6-Well-Platte belassen und jeder mit 1ml der jeweiligen Arbeitslösung überschichtet.

Zur Permeabilisierung wurden die fixierten Zellen zehn Minuten lang in 0,5% Triton X-100 in D-PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Immunfärbung wurde 30 Minuten lang bei Raumtemperatur mit 3% BSA, 10% FBS in D-PBS geblockt. Zunächst wurde der erste Antikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer Verdünnung von 1:100 in 3% BSA, 10% FBS in D-PBS inkubiert. Daraufhin wurde dreimal mit D-PBS jeweils fünf Minuten

lang gewaschen. Nun wurde der zweite Antikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer Verdünnung von 1:200 (Alexa-Konjugate) in 3% BSA, 10% FBS in D-PBS inkubiert. Von nun an mussten die Proben vor Licht geschützt werden. Nach der Inkubationszeit wurde dreimal mit D-PBS jeweils fünf Minuten lang gewaschen. Zur Blau-Färbung der Zellkerne wurden die Coverslips mit DAPI (Excitation: 360 nm, Emission: 460 nm, Filter II blue) behandelt. Dazu wurden sie für zehn Minuten mit 1µg/ml DAPI-Lösung inkubiert. Die DAPI-Lösung wurde aus der DAPI-Stammlösung (5mg/ml in DMF) mit D-PBS im Verhältnis 1:5000 verdünnt. Hiernach wurde dreimal mit D-PBS jeweils fünf Minuten lang gewaschen.

Die Coverslips wurden aus der 6-Well-Platte herausgelöst und mit VECTASHIELD® luftblasenfrei auf den Objektträgern befestigt. Nach 15 Minuten Trocknung bei Raumtemperatur wurden die Coverslips mit klarem Nagellack abgedichtet. Nun konnten die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und Bilder aufgenommen werden.

3.2.6.6 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine Zellanalysetechnik zur Bestimmung bestimmter Parameter der Zellen. Die benutzten Geräte werden „fluorescence activated cell sorter“ (FACS) genannt. Das Prinzip bei der Durchflusszytometrie basiert darauf, dass Fluorophor-Antikörper, die an einer Zelle befestigt sind beim Passieren eines Laserstrahls angeregt werden und bestimmte Wellenlängen wieder emittieren. Dazu werden die Zellen in Lösung durch eine Kapillare gesaugt. Sie passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Die Zelle emittiert dabei Streulicht und Fluoreszenzimpulse, sofern Antikörper gebunden haben. Aus diesen Emissionen kann man verschiedene Eigenschaften der Zelle ableiten. Der Forward Scatter gibt durch die Beugung des Lichts die Zellgröße, der Side Scatter durch die Brechung des Lichts die Granularität an. Markiert man die Zellen vorher mit fluoreszierenden Antikörpern, die mit verschiedenen Oberflächenantigenen reagieren, kann man sie zusätzlich auch nach diesen Merkmalen unterscheiden.

Es wurde ein Vier-Farben-Durchflusszytometer verwendet, das die Simultanmessung von vier Fluorochromen in einer Probe erlaubte. Die Fluorochrome wurden mit einem Argonlaser angeregt und wiesen so ein detektierbares Emissionsspektrum auf. Es wurden die Fluorochrome PE (Maximale Anregung: 488nm, Emission: 575nm, Farbe: Rot-Orange) und FITC (Maximale Anregung: 488nm, Emission: 520nm, Farbe: grün) verwendet.

Zur Probenvorbereitung wurde 500µl der jeweiligen Zellsuspension für sechs Stunden (Neutrophile) bzw. 24 Stunden (Lymphozyten) bei 37°C mit 500µl Kulturüberstand stimuliert. Zur Erzielung besserer Ergebnisse wurde der Kulturüberstand bei nachfolgenden Versuchen einkonzentriert. Hierfür wurden Mikrokonzentratoren verwendet, die den Kulturüberstand von allen Substanzen < 1kDa reinigten (Abbildung 17). Der Kulturüberstand wurde oberhalb des Filters eingefüllt und anschließend für drei Stunden bei 7000xg und 8°C zentrifugiert. Auf diese Weise wurde das Volumen von 3,5ml auf 500µl eingengt. Dieses Konzentrat wurde dann auf die isolierten Neutrophilen bzw. Lymphozyten gegeben.

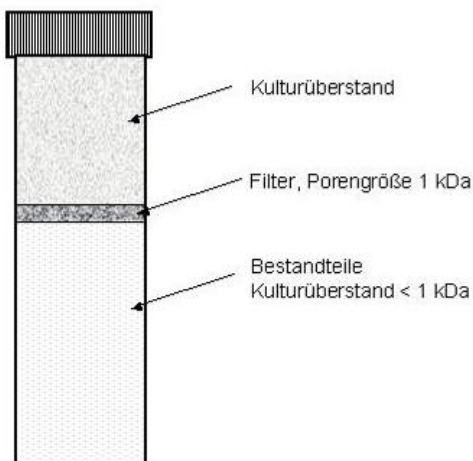


Abbildung 17: Darstellung des Konzentrators

Die Proben wurden mit der Methode der direkten Fluoreszenzfärbung gefärbt, bei der die Antikörper direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind. Die optimale Antikörperkonzentration wurde von unserem Kooperationspartner Dr. med. Dominik Hartl ausgetestet. Die Originallösung der Antikörper und Isotypenkontrollen wurde immer im Verhältnis 1:4 mit Aqua ad injectabilia verdünnt.

Die stimulierten Neutrophilen/Lymphozyten wurden bei 300xg pelletiert und anschließend in D-PBS resuspendiert, um die Zellen zu waschen. Nach dreimaligem Waschen wurde die in PBS resuspendierte Zellsuspension im Falle der Neutrophilen auf zwei Eppendorfgefäße, im Falle der Lymphozyten auf vier Eppendorfgefäße verteilt. Pro Eppendorfgefäß wurden 10µl Antikörperlösung und Isotypenkontroll-Lösung dazu gegeben (Tabelle 10). Die Originallösung der Antikörper und Isotypenkontrollen wurde immer im Verhältnis 1:4 mit Aqua ad injectabilia verdünnt.

Zellart	Antikörper	Isotypenkontrolle
Neutrophilenzellsuspension, stimuliert durch Kulturüberstand X	CD11b - PE	IgG 1 - PE
	CXCR-1 - PE	IgG 2 - PE
Lymphozytenzellsuspension, stimuliert durch Kulturüberstand X	CXCR-1 - PE + CD4 - FITC	IgG 2 - PE + IgG 1 - FITC
	CCR-2 - PE + CD4 - FITC	IgG 2 - PE + IgG 1 - FITC
	CXCR-1 - PE + CD8 - FITC	IgG 2 - PE + IgG 1 - FITC
	CCR-2 - PE + CD8 - FITC	IgG 2 - PE + IgG 1 - FITC

Tabelle 10: Pipetierschema bei der Antikörperzugabe beim FACS

Nach kurzem Vortexen wurden die Proben 15 Minuten lang bei Raumtemperatur ohne Licht (Ausnahme CCR-2: 1 h) inkubiert. Danach wurden 100µl Reagenz 1 (Formaldehyd 5,5%) zugegeben und die Proben erneut gevortext. Die Proben wurden wieder bei Raumtemperatur für 15 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Nun wurde 1ml PBS hinzugemischt. Bei 300xg wurde danach für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 300µl PBS aufgenommen. Die Messung erfolgte in einem FACS-Röhrchen. Für die Aufnahme und Auswertung der Daten wurde das Programm Cell Quest 3.1f von Becton & Dickinson verwendet.

3.2.7 Statistik

Der Mann-Whitney-Test wurde bei parameterfreien statistischen Experimenten für den Vergleich zweier ungepaarter Gruppen verwendet. Als Signifikanztest zeigte er den Unterschied der zentralen Tendenz zweier unabhängiger Gruppen an. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung verschiedener Stichproben angegeben, wobei sich jede Stichprobe aus drei bis vier Einzelmessungen zusammensetzt.

Wurden mehr als zwei ungepaarte Gruppen miteinander verglichen, wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet, ebenfalls ein parameterfreier statistischer Test.

Für die Korrelationsanalyse wurde nach Spearmans parameterfreiem Test vorgegangen. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert kleiner 0,05 festgelegt.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei der SP-C-Mutationen näher untersucht, I73T als Vertreter der Non-BRICHOS-Domänen-Mutationen und A116D als Vertreter der BRICHOS-Domänen-Mutationen. Es wurden diverse Aspekte des mutierten proSP-C im Vergleich zum Wildtyp proSP-C dargestellt.

Einige der dargestellten Aspekte wurden als Screeningversuch auf die SP-C-Mutationen P30L, L110R, P115L und L188Q ausgedehnt. Die Ergebnisse sind als Unterpunkt bei den jeweiligen Kapiteln aufgeführt.

4.1 Allgemeine Vorarbeiten

4.1.1 Erzeugung verschiedener Zielvektoren

Mittels QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit wurden die Vektoren pcDNA3/HA-hSP-C, pEGFP-C1/hSP-C, pEGFP-N1/hSP-C^{I73T, L110R, P115L, A116D, L188Q} aus pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt}, pEGFP-C1/hSP-C^{Wt}, pEGFP-N1/hSP-C^{Wt} generiert. Hierbei wurden jeweils Punktmutationen an bestimmten Stellen des SP-C-Gens eingeführt. Die mutierten Vektoren wurden in E.coli-Zellen transformiert.

Die transformierten E.coli-Zellen wurden auf die Aufnahme der Plasmid-DNA mit Hilfe der nun vorhandenen Antibiotikaresistenz gescreent. Nach Vermehrung der positiven Kolonien wurde Plasmid-DNA extrahiert und mittels Restriktionsverdau und anschließender Agarosegelelektrophorese auf die richtige Größe getestet. Wie in Abbildung 18, Abbildung 19 und Abbildung 20 ersichtlich, enthielten alle E.coli-Zellen die gewünschte Plasmid-DNA. Die linearisierte Plasmid-DNA wies die richtige Größe auf.

Ungeschnittene Plasmid-DNA, die in den Abbildungen den linken Bereich einnimmt, kann unterschiedliche Konformationen einnehmen, daher wurden im Gel mehrere Banden detektiert. Plasmid-DNA kann einen Einzelstrangbruch aufweisen, in der entspannt zirkulären oder in der superspiralisierten Form vorliegen. Mit der eben genannten Reihenfolge wurde die Kompaktheit der Plasmid-DNA und damit die Laufgeschwindigkeit im Gel wiedergespiegelt. Somit entspricht die oberste Bande der Plasmid-DNA, die einen Einzelstrangbruch aufweist, die mittlere Bande der entspannt zirkulären Form und die

unterste Bande der superspiralisierten. Im rechten Bereich der Abbildungen ist Plasmid-DNA dargestellt, die mittels eines Restriktionsenzym linearisiert wurde.

In Abbildung 18 wurde der Vektor pcDNA3/HA-hSP-C vorliegend als Wildtyp oder Mutante untersucht. Offenbar wurde bei den Mutationen P30L, I73T und L110R keine superspiralisierte Form der ungeschnittenen Plasmid-DNA ausgebildet. Die Größe eines linearen DNA-Fragmentes lässt sich über einen Größenstandard im Agarose-Gel berechnen. Die isolierte Plasmid-DNA wurde mittels des Restriktionsenzym XhoI linearisiert. Man sieht, dass pro Spur nur eine Bande in der erwarteten Größe erscheint.

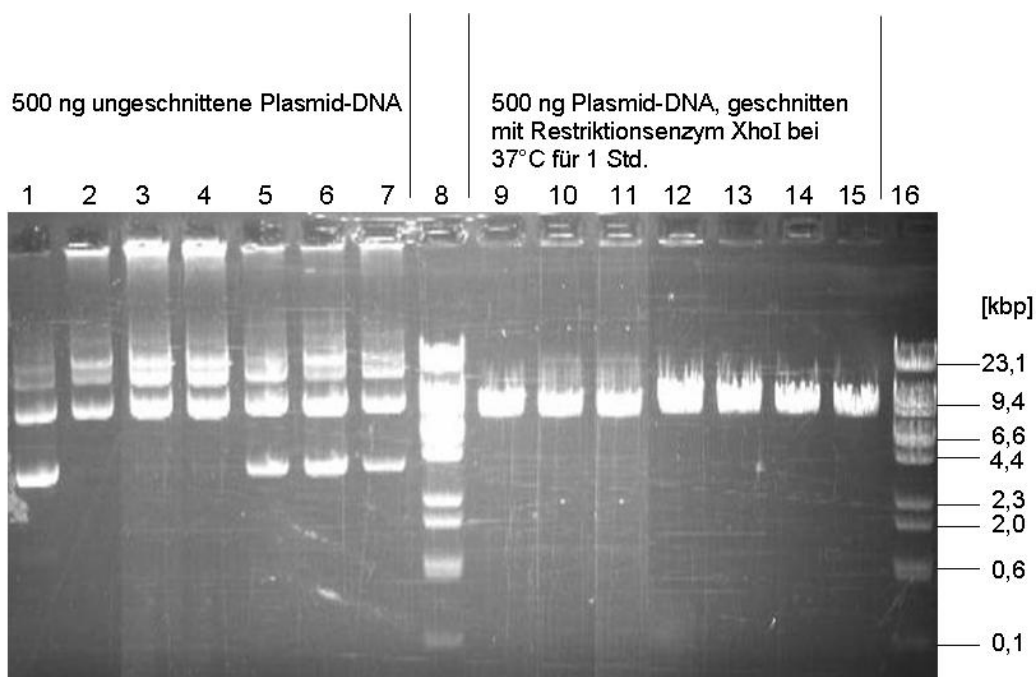


Abbildung 18: Agarosegelelektrophorese von Plasmid-DNA (pcDNA3/HA-hSP-C). Spur 1/9: Wt, Spur 2/10: P30L, Spur 3/11: I73T, Spur 4/12: L110R, Spur 5/13: P115L, Spur 6/14: A116D, Spur 7/15: L188Q, Spur 8/16: Molekulargewichtsmarker, Agarosegel 0,8% in TAE-Puffer. Die linke Seite des Gels zeigt ungeschnittene Plasmid-DNA, die in mehreren Konformationen vorliegt. Von oben nach unten betrachtet, erscheint zuerst Plasmid-DNA, die einen Einzelstrangbruch aufweist, dann die entspannt zirkuläre Form und anschließend die superspiralisierte. Auf der rechten Seite des Gels ist die mit XhoI linearisierte Plasmid-DNA zu sehen. Wie erwartet, weisen alle Banden die gleiche Größe auf.

Als erster Vertreter der fluoreszierenden Vektoren wurde pEGFP-C1/hSP-C in Abbildung 19 wiedergegeben. Im Unterschied zu pcDNA3/HA-hSP-C wurde hier nur bei Wt, P30L und L188Q eine superspiralisierte Plasmid-DNA-Form ausgebildet. Als Restriktionsenzym wurde KpnI verwendet.

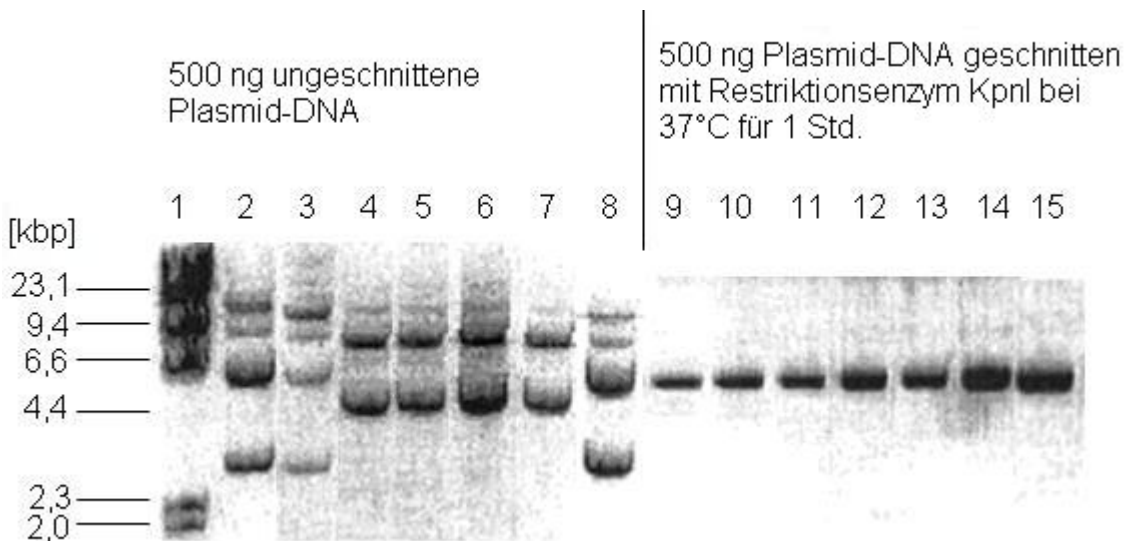


Abbildung 19: Übersicht über die aus transformierten E.coli-Zellen isolierte Plasmid-DNA (pEGFP/C1-hSP-C). Spur 1: Molekulargewichtsmarker, Spur 2/9: Wt, Spur 3/10: P30L, Spur 4/11: I73T, Spur 5/12: L110R, Spur 6/13: P115L, Spur 7/14: A116D, Spur 8/15: L188Q. Agarosegel 0,8% mit TAE-Puffer. Die linke Seite des Gels zeigt ungeschnittene Plasmid-DNA, die in mehreren Konformationen vorliegt. Von oben nach unten betrachtet, erscheint zuerst Plasmid-DNA, die einen Einzelstrangbruch aufweist, dann die entspannt zirkuläre Form und anschließend die superspiralisierte. Auf der rechten Seite des Gels ist die mit KpnI linearisierte Plasmid-DNA zu sehen. Wie erwartet, weisen alle Banden die gleiche Größe auf.

Ein weiterer Vertreter der fluoreszierenden Vektoren ist pEGFP-N1/hSP-C (Abbildung 20). Hier ist im Vergleich zu pEGFP-C1/hSP-C das Surfactantprotein-C-Gen N-terminal verknüpft. Daher wurde bei der linearisierten Form der Plasmid-DNA kein Größenunterschied zu pEGFP-C1/hSP-C gefunden. Als Restriktionsenzym wurde ECoRI verwendet.

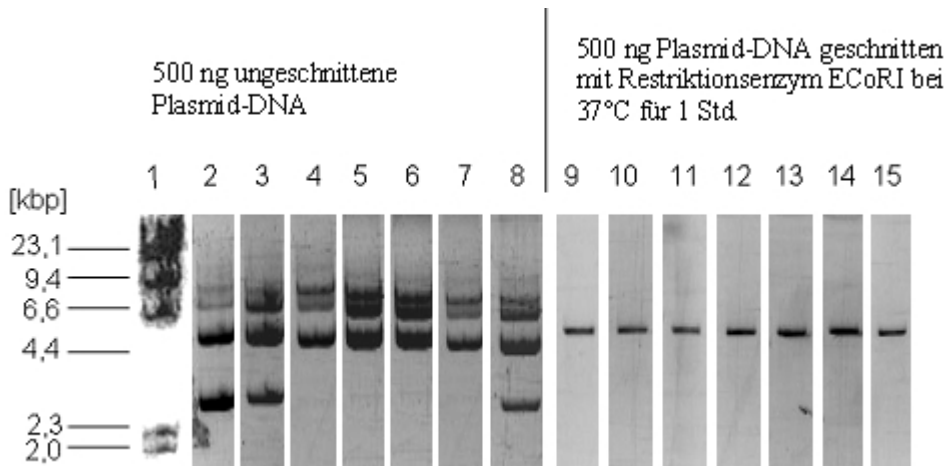


Abbildung 20: Übersicht über die aus transformierten E.coli-Zellen isolierte Plasmid-DNA (pEGFP/N1-hSP-C). Spur 1: Molekulargewichtsmarker, Spur 2/9: Wt, Spur 3/10: P30L, Spur 4/11: I73T, Spur 5/12: L110R, Spur 6/13: P115L, Spur 7/14: A116D, Spur 8/15: L188Q. Agarosegel 0,8% mit TAE-Puffer. Die linke Seite des Gels zeigt ungeschnittene Plasmid-DNA, die in mehreren Konformationen vorliegt. Von oben nach unten betrachtet, erscheint zuerst Plasmid-DNA, die einen Einzelstrangbruch aufweist, dann die entspannt zirkuläre Form und anschließend die superspiralisierte. Auf der rechten Seite des Gels ist die mit ECoRI linearisierte Plasmid-DNA zu sehen. Wie erwartet, weisen alle Banden die gleiche Größe auf.

Im Anschluss an die Größenüberprüfung wurde die Plasmid-DNA sequenziert, um den korrekten Nukleotidaustausch zu bestätigen. In Abbildung 21 sind die Sequenzierungsergebnisse am Beispiel von Vektor pEGFP/C1-hSP-C dargestellt. Durch das schwarz umrandete Rechteck wurden die ausgetauschten Banden hervorgehoben. Die Vektoren pEGFP/N1-hSP-C und pcDNA3/HA-hSP-C wurden analog untersucht. Für alle Vektoren wurde ein korrekter Nukleotidaustausch bestätigt.

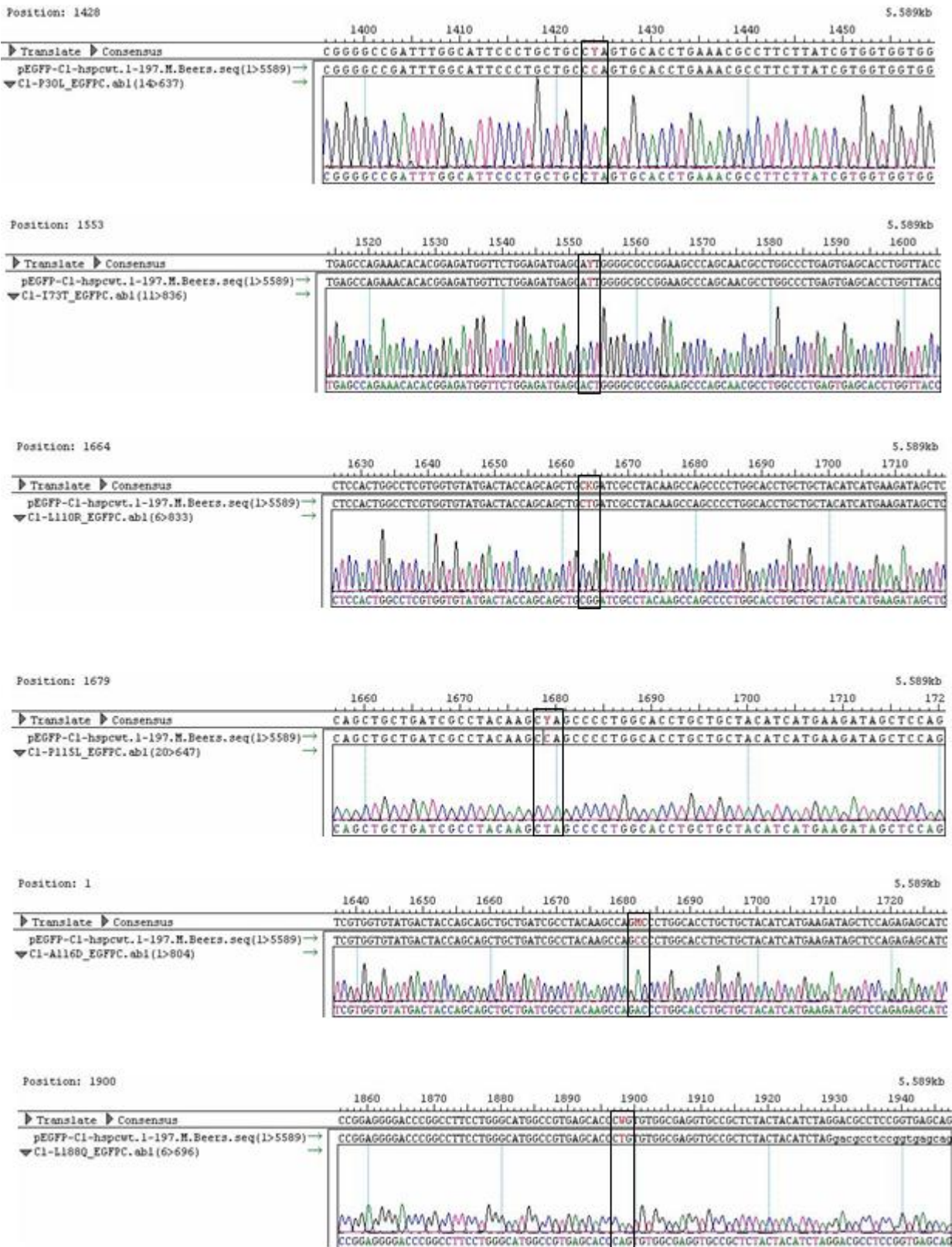


Abbildung 21: Übersicht der Sequenzierungsergebnisse von pEGFP/C1-hSP-C. Es wurde jede Mutation in ihrer Sequenz (untere Zeile) dargestellt und mit dem Wildtyp (obere Zeile) verglichen. Die schwarz markierten Kästchen zeigen die Veränderung auf. P30L: CCA (P) → CTA (L), I73T: ATT (I) → ACT (T), L110R: CTG (L) → CGG (R), P115L: CCA (P) → CTA (L), A116D: GCC (A) → GAC (N), L188Q: CTG (L) → CAG (Q)

4.1.2 Transfektion

4.1.2.1 Optimierung der Transfektionseffizienz

Die Transfektionseffizienz wurde durch Austestung verschiedener Verhältnisse von DNA zum Transfektionsreagenz ExGen500 optimiert. Es wurde 1µg DNA von pEGFP/C1 eingesetzt und jeweils mit 3,3µl (sechs Äquivalente) oder 5,5µl (zehn Äquivalente) Reagenz versetzt. In der Abbildung 22 sind auf der linken Seite die mit GFP transfizierten Zellen zu sehen und auf der rechten Seite alle Zellen im Durchlicht. Die höchste Transfektionsrate wurde mit sechs Äquivalenten ExGen500 erreicht. Alle weiteren Transfektionen wurden mit diesem Verhältnis durchgeführt.

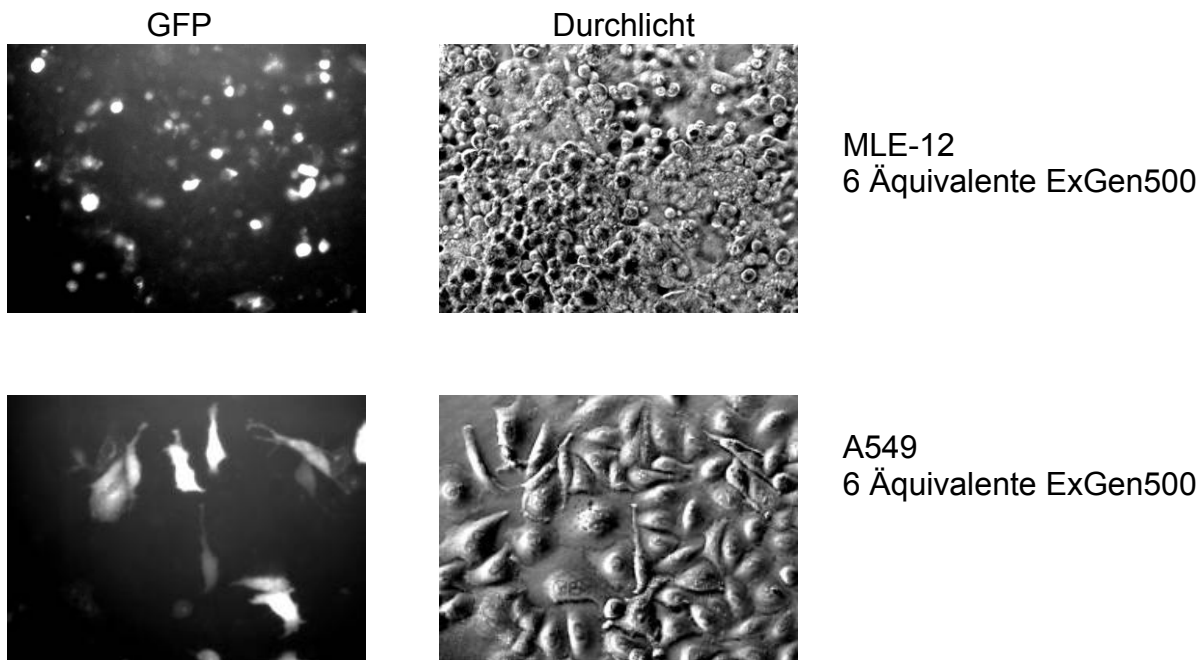


Abbildung 22: Auswertung der Transfektionseffizienztestung. Es wurde zu 100µl 150-millimolarer NaCl-Lösung 1µg DNA gegeben und anschließend mit 3,3µl ExGen500 (entspricht sechs Äquivalenten) versetzt. Das Gemisch wurde zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend in ein Well einer 12-Well-Platte zu 1ml Zellsuspension (entweder MLE-12-Zellen in RPMI-Medium oder A549-Zellen in MEM-Medium), welche ca. 300000 Zellen enthielt, pipettiert. Im Fluoreszenzmikroskop erscheinen GFP-transfizierte Zellen grün, im Durchlicht sind alle Zellen erkennbar.

4.1.2.2 Stabile Transfektion

Es gelang, folgende Vektoren stabil in MLE-12-Zellen zu transfizieren:

- MLE-12-Zellen transfiziert mit pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt}
- MLE-12-Zellen transfiziert mit pcDNA3/HA-hSP-C^{P30L}
- MLE-12-Zellen transfiziert mit pcDNA3/HA-hSP-C^{I73T}
- MLE-12-Zellen transfiziert mit pcDNA3/HA-hSP-C^{P115L}
- MLE-12-Zellen transfiziert mit pcDNA3/HA-hSP-C^{A116D}
- MLE-12-Zellen transfiziert mit pcDNA3/HA-hSP-C^{L110R}
- MLE-12-Zellen transfiziert mit pcDNA3/HA-hSP-C^{L188Q}

Als Selektionsmittel wurde Neomycin (G418) in einer Konzentration von 600µg/ml dem Vollmedium zugefügt. Zur Überprüfung, ob das Protein exprimiert wurde, wurde eine Westernblotanalyse von Gesamtzell-Lysaten durchgeführt, bei der das Fusionsprotein HA detektiert wurde (Abbildung 23). Man sieht, dass im Vergleich zu untransfizierten Zellen (Spur 1) der HA-Tag detektiert werden konnte. Es sind mehrere Banden zu sehen, da HA an proSP-C gebunden wurde und je nach Prozessierungsstufe unterschiedliche Größen von proSP-C vorliegen, die alle mit HA sichtbar gemacht werden konnten.

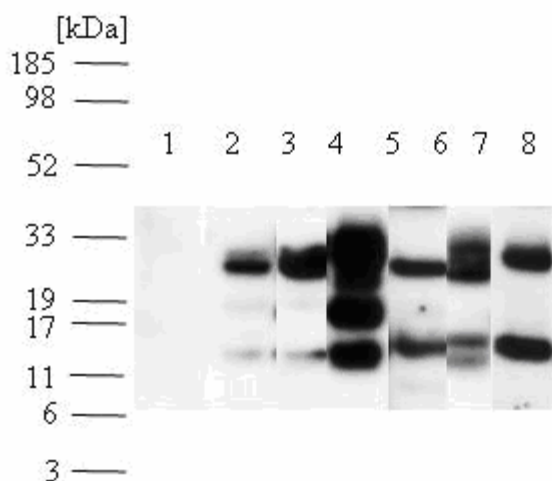


Abbildung 23: Westernblotanalyse der HA-Fusionsproteine. Dargestellt sind MLE-12-Zellen, die stabil mit pcDNA3/HA-hSP-C transfiziert sind. Spurbelegung: 1: MLE-12, 2: Wt, 3: P30L, 4: I73T, 5: L110R, 6: A116D, 7: P115L, 8: L188Q. Geltyp: NuPage Bis-Tris 10% Midi, Puffer: NuPage MES Puffer, RedAge: reduzierend, Lauf: 50min, Blot: 60min, Spurbeladung: 20µg Gesamtprotein, Blocking-Lösung: 5% Milchpulver in TBS-T. 1.AK: HA-Tag von Roche, 1:1000, O/N 4°C, in Blocking-Lösung, 2.AK: anti-rat, 1:10000, Raumtemperatur 60min, in Blocking-Lösung.

4.1.3 Austestung der verträglichen Arzneimittelkonzentration

Es wurde nach der minimalen Arzneimittelkonzentration gesucht, die zu einer signifikanten Änderung in der Expression bestimmter Hitzeschockproteine führt, die in die Faltungsprozesse aberrant prozessierter Proteine involviert sind. Die Viabilität der Zellen sollte nicht beeinflusst werden. Hierbei wurden Arzneimittel verwendet, die zur Zeit bei der Behandlung von an ILD erkrankten Patienten eingesetzt werden. Es handelt sich um Hydroxychloroquin, Cyclophosphamid, Azathioprin und Methylprednisolon.

Mit einer Arzneimittelkonzentration von 10 μ M und einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde mittels Westernblotanalyse eine Änderung in der Expression der Hitzeschockproteine im Vergleich zu Basalexpression festgestellt. Hierbei wurden Hsp70, Hsp90, Calnexin und Calreticulin untersucht. Eine niedrigere Arzneimittelkonzentration (0,5 μ M) zeigte kein genügend starkes und eine höhere (100 μ M) kein stärkeres Signal auf dem Westernblot im Vergleich zu 10 μ M Arzneimittelkonzentration. Ähnlich verhielt es sich mit der Länge der Inkubationszeit. Nach sechs Stunden war kaum ein Signal auf dem Westernblot zu erkennen, nach 24 Stunden erschien ein sehr gutes Signal, das durch die Inkubationszeit von 30 Stunden nicht verbessert werden konnte. Zur deutlichen Übersicht wurden nicht alle durchgeführten Westernblots inklusive Standard abgebildet, sondern nur die Banden ausgeschnitten, um ihre Intensitäten besser vergleichen zu können. Dies ist in Abbildung 24 veranschaulicht.

Es kann festgehalten werden, dass alle weiteren Versuche mit einer Arzneimittelkonzentration von 10 μ M und einer Inkubationszeit von 24 Stunden durchgeführt wurden. Die Viabilität der Zellen nahm durch die Behandlung mit den Medikamenten keinen Schaden. Dies wurde bei den jeweiligen Versuchen mittels Färbung mit Trypanblau (siehe Methoden) kontrolliert. Die durchgeführten Zählungen der Zellen sind im Anhang (7.1.1 „Viabilitätstests“) aufgeführt.

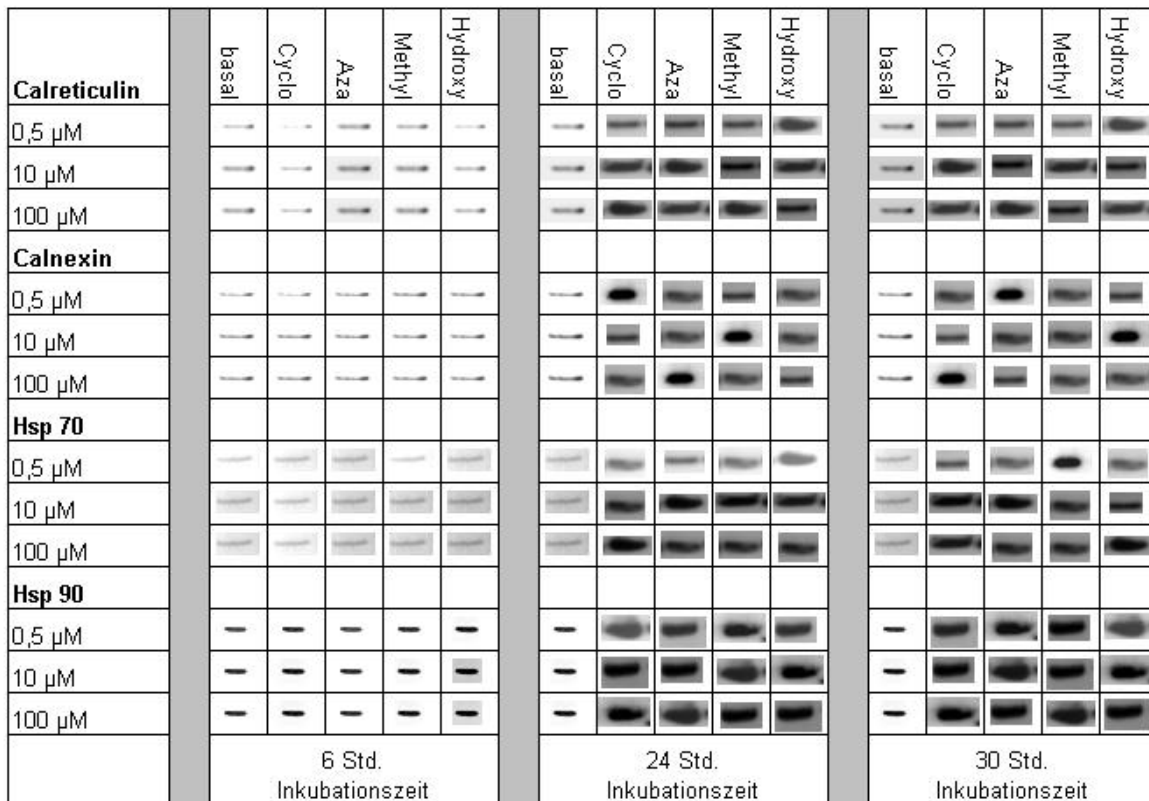


Abbildung 24: Auswirkungen von Inkubationszeit und Arzneimittelkonzentration auf die Hitzeschockexpression. Dargestellt sind MLE-12-Zellen, die unbehandelt (basal), mit Cyclophosphamid (Cyclo), Azathioprin (Aza), Methylprednisolon (Methyl) oder Hydroxychloroquin (Hydroxy) unterschiedlicher Konzentrationen behandelt und unterschiedlich lang inkubiert wurden. In der ersten Spalte ist dargestellt, welches Hitzeschockprotein untersucht wurde und mit welcher Arzneimittelkonzentration die Zellen behandelt wurden. Die oberste Zeile zeigt auf, ob und mit welchem Arzneimittel die Zellen behandelt wurden. Die unterste Zeile gibt Auskunft über die Inkubationsdauer. Nach der Inkubationszeit wurden Zelllysate gewonnen und der Gesamtproteingehalt für den anschließenden Westernblot bestimmt. Geltyp: NuPage Bis-Tris 10% Midi, Puffer: NuPage MES Puffer, RedAge: reduzierend, Lauf: 50min, Blot: 60min, Spurbeladung: 20µg Gesamtprotein, Blocking-Lösung: 5% Milchpulver in TBS-T. Verwendete Antikörper, alle in Blocking-Lösung (1.AK 1:200, 2.AK 1:10000): Calreticulin [60 kDa]: 1. AK: anti-Calregulin (C-17), Santa Cruz; 2. AK: anti-Goat IgG-HRP conjugate, Biozol; Calnexin [90 kDa]: 1. AK: anti-Calnexin, Santa Cruz; 2. AK: anti-Goat IgG-HRP conjugate, Biozol; Hsp70 [70 kDa]: 1. AK: anti-Hsp70, Santa Cruz; 2. AK: anti-Goat IgG-HRP conjugate, Biozol; Hsp90 [90 kDa]: 1. AK: anti-Hsp 90, Santa Cruz; 2. AK: anti-Mouse IgG-HRP conjugate, Chemicon. n=5.

4.1.4 LDH-Assay zum Toxizitätsausschluss

Um auszuschließen, dass die Arzneimittel toxische Einflüsse auf die Zellen haben könnten, wurde ein LDH-Assay durchgeführt. Dieser wurde an untransfizierten MLE-12-Zellen durchgeführt.

Abbildung 25 zeigt, dass der Anteil toter Zellen unterhalb von 4% blieb. Daher wurde ausgeschlossen, dass die Arzneimittel Einfluss auf die Viabilität nehmen.

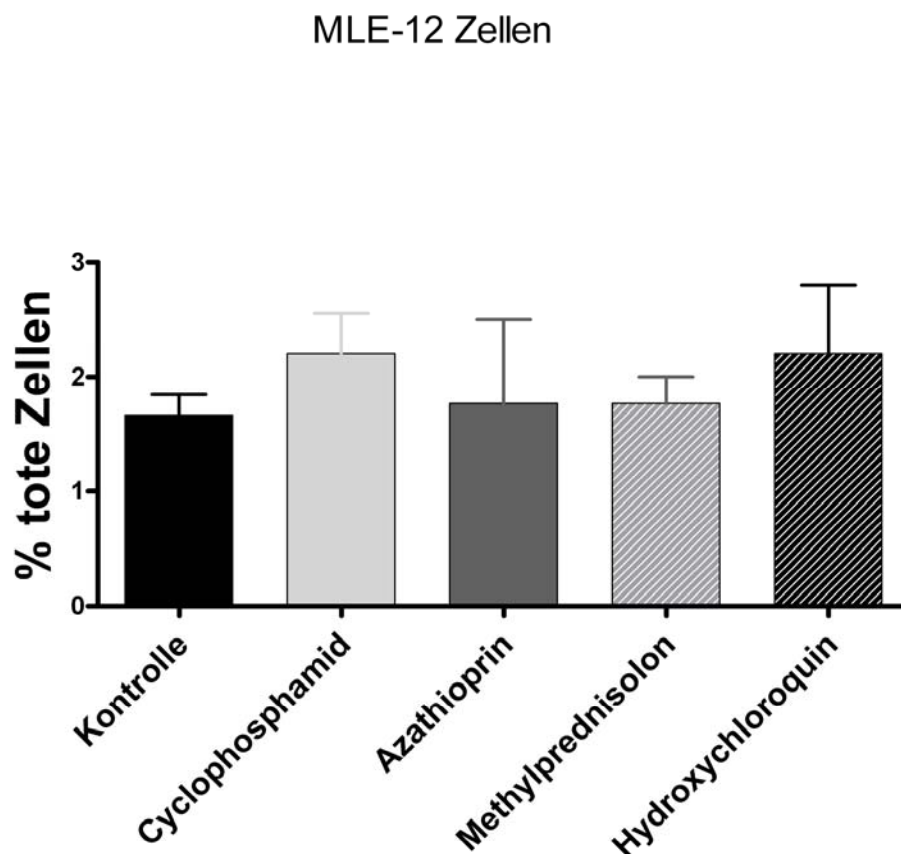


Abbildung 25: Messung der LDH-Aktivität im Zellysate und im zugehörigen Kulturüberstand.

Das Verhältnis umgesetzte LDH im Überstand zu Zellysate dient als Ausdruck für den Anteil toter Zellen. Unter Kontrolle sind unbehandelte MLE-12-Zellen zu verstehen. Die mit Cyclophosphamid, Azathioprin, Methylprednisolon oder Hydroxychloroquin bezeichneten Balken sind MLE-12-Zellen, die für 24 Stunden mit 10µM des bezeichneten Arzneimittels inkubiert wurden.

4.2 Prozessierung von Wildtyp proSP-C im Vergleich zu mutiertem proSP-C

4.2.1 Entwicklung eines Modells zur Identifizierung verschiedener SP-C Prozessierungsstufen

Um die intrazellulären Prozessierungszwischenstufen von proSP-C zu identifizieren, sollen MLE-12-Zellen mit eukaryotischen Expressionsvektoren transfiziert werden, die eine Expression von Fusionsproteinen zwischen proSP-C und entweder EGFP- oder HA-Tag erlauben. Nach Brasch et al. würde man bei pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt} die in Abbildung 26 dargestellten intrazellulären Zwischenformen erwarten. Das Modell berücksichtigt die Größenveränderung der Zwischenformen auf Grund der angehängten Fusionsproteine HA (1,3kDa) oder EGFP (27kDa). Des Weiteren wird auch die bisher angenommene proteolytische Abspaltungsreihenfolge berücksichtigt, die Auswirkungen auf die Detektierbarkeit der Fusionsproteine hat.

So sollten bei dem Fusionsprotein proSP-C mit HA zunächst eine Bande der Größe 22,3kDa, was der vollen Länge der pro-Form entspräche, zu detektieren sein. Das erste Intermediat nach C-terminaler proteolytischer Abspaltung müsste 17,3kDa groß, das zweite Intermediat nach einer weiteren C-terminalen proteolytischen Abspaltung 8,3kDa sein. Bei der ersten N-terminalen proteolytischen Abspaltung wird der HA-Tag von proSP-C abgetrennt. Dieses Abspaltungsprodukt sollte eine Größe von 2,3kDa haben. Das ergibt sich rein rechnerisch, wenn man davon ausgeht, dass nach Brasch et al. ein 6kDa großes proSP-C-Intermediat nach der ersten N-terminalen Abspaltung gefunden wurde. Zieht man diese Größe von 8,3kDa ab, was der Größe vor der ersten N-terminalen Abspaltung entspricht, ergibt sich das 2,3kDa große Abspaltungsprodukt inklusive HA.

Bei dem Fusionsprotein proSP-C mit N-terminal verknüpftem EGFP sollte zunächst eine Bande der Größe 48kDa, was der vollen Länge der pro-Form entspräche, zu detektieren sein. Das erste Intermediat nach C-terminaler proteolytischer Abspaltung müsste 43kDa groß, das zweite Intermediat nach einer weiteren C-terminalen proteolytischen Abspaltung 34kDa sein. Bei der ersten N-terminalen proteolytischen Abspaltung wird der EGFP-Tag von proSP-C abgetrennt. Dieses Abspaltungsprodukt sollte eine Größe von 28kDa haben. Das ergibt sich rein rechnerisch, wenn man davon ausgeht, dass nach Brasch et al. ein 6kDa großes proSP-C-Intermediat nach der ersten N-terminalen Abspaltung gefunden

wurde. Zieht man diese Größe von 34kDa ab, was der Größe vor der ersten N-terminalen Abspaltung entspricht, ergibt sich das 28kDa große Abspaltungsprodukt inklusive EGFP.

Bei dem Fusionsprotein proSP-C mit C-terminal verknüpftem EGFP sollte zunächst auch eine Bande der Größe 48kDa, was der vollen Länge der pro-Form entspräche, zu detektieren sein. Bei der ersten C-terminalen proteolytischen Abspaltung wird der EGFP-Tag schon abgetrennt. Dieses Abspaltungsprodukt sollte eine Größe von 32kDa haben. Das ergibt sich rein rechnerisch, wenn man davon ausgeht, dass nach Brasch et al. ein 16kDa großes proSP-C-Intermediat nach der ersten C-terminalen Abspaltung gefunden wurde. Zieht man diese Größe von 48kDa ab, was der Größe der vollen Länge der pro-Form entspräche, ergibt sich das 32kDa große Abspaltungsprodukt inklusive EGFP.

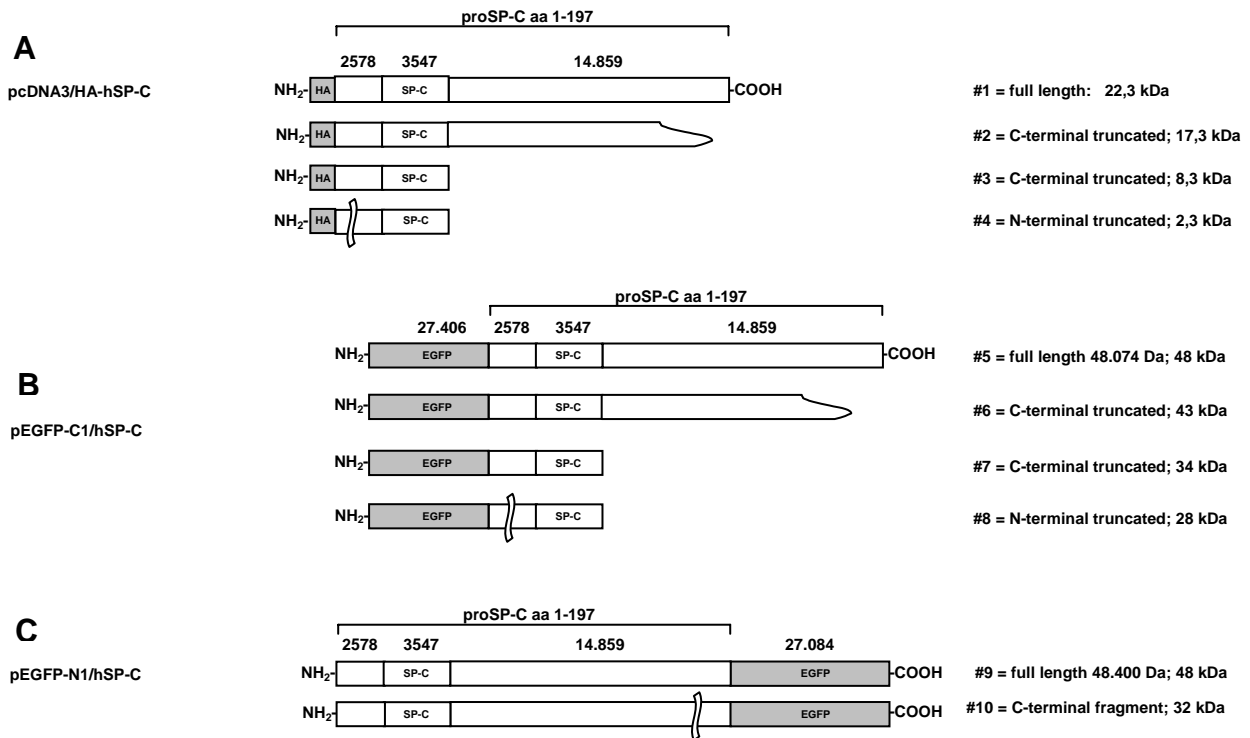


Abbildung 26: Postulierte intrazelluläre Prozessierungsintermediate der Fusionsproteine zwischen proSP-C und HA oder EGFP. In *Abbildung A* ist das Fusionsprotein proSP-C mit HA dargestellt. Mit 22,3kDa (#1) ist die volle Länge der pro-Form gezeigt. Das erste Intermediat nach C-terminaler proteolytischer Abspaltung ist 17,3kDa (#2) groß, das zweite Intermediat nach einer weiteren C-terminalen proteolytischen Abspaltung weist 8,3kDa (#3) auf und die dritte Zwischenform, die nach der ersten N-terminalen proteolytischen Abspaltung detektierbar ist, hat eine Größe von 2,3kDa (#4). Bei dieser Spaltung wird der HA-Tag abgetrennt. In *Abbildung B* ist das Fusionsprotein proSP-C mit N-terminal verknüpftem EGFP dargestellt. Mit 48kDa (#5) ist die volle Länge der proForm gezeigt. Das erste Intermediat nach C-terminaler proteolytischer Abspaltung ist 43kDa (#6) groß, das zweite Intermediat nach einer weiteren C-terminalen proteolytischen Abspaltung weist 34kDa (#7) auf und die dritte Zwischenform, die nach der ersten N-terminalen proteolytischen Abspaltung detektierbar ist, hat eine Größe von 28kDa (#8). Bei dieser Spaltung wird der EGFP-Tag abgetrennt. In *Abbildung C* ist das Fusionsprotein proSP-C mit C-terminal verknüpftem EGFP dargestellt. Mit 48kDa (#9) ist die volle Länge der pro-Form gezeigt. Bei der zweiten Form, die nach der ersten C-terminalen proteolytischen Abspaltung mit 32kDa (#10) detektierbar sein sollte, ist der EGFP-Tag schon abgetrennt.

4.2.2 Analyse der Prozessierungsintermediate bei I73T-mutiertem proSP-C im Vergleich zu Wildtyp proSP-C

Um die aufgestellten postulierten intrazellulären Prozessierungszwischenstufen von proSP-C zu identifizieren, wurden MLE-12-Zellen mit eukaryotischen Expressionsvektoren transfiziert, die eine Expression von Fusionsproteinen zwischen proSP-C und entweder EGFP- oder HA-Tag erlauben. Hierzu wurden vergleichende Untersuchungen zwischen Wildtyp proSP-C und mutiertem proSP-C angestellt. Mittels Auftrennung der Proteine durch das Westernblot-Verfahren und anschließender immunochemischer Detektion der einzelnen Banden konnte die Größe der Prozessierungsstufen ermittelt werden. Diese wurden dann mit dem theoretischen Modell verglichen. Zunächst wurden die Prozessierungsstufen von Wildtyp proSP-C I73T-mutiertem proSP-C gegenübergestellt.

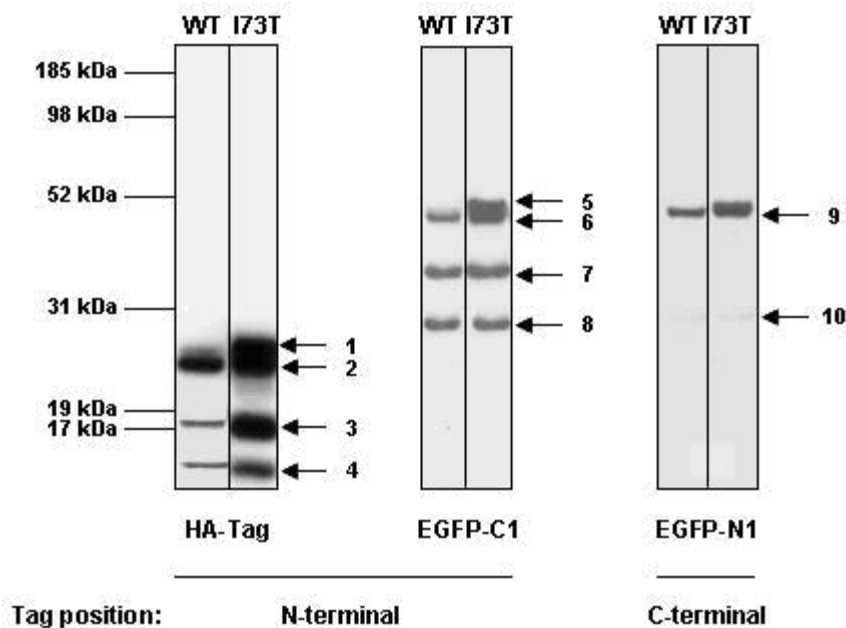


Abbildung 27: Westernimmunoblotanalysen von MLE-12-Zellen, Wt und I73T. Dargestellt sind links MLE-12-Zellen, die stabil mit pcDNA3/HA-hSP-C transfiziert wurden. Der mittlere Bereich zeigt MLE-12-Zellen, die transient mit pEGFP-C1/hSP-C transfiziert wurden. Rechts sind MLE-12-Zellen gezeigt, die transient mit pEGFP-N1/h-SP-C transfiziert wurden. Das Immunoblotten der Zelllysate mit Tag spezifischen Antikörpern zeigt Banden, die die verschiedenen prozessierten intrazellulären Zwischenstufen aufzeigen, in denen die Tagsequenz beibehalten wurde.

Auffällig war, dass sich die Größe der detektierten Banden zwischen Wildtyp proSP-C und I73T-mutiertem proSP-C nicht unterschied. Die stabile Expression von HA-proSP-C^{Wt} resultierte in der Erscheinung einer starken Bande bei ungefähr 21kDa und drei weiteren

(22kDa, 17kDa, 8kDa), jedoch schwächeren Banden. HA-proSP-C^{I73T} hingegen zeigte dieselben vier Banden mit gleicher Intensität (Abbildung 27 links).

Die transiente Expression von N-terminalen und C-terminalen EGFP Fusionsprodukten war 24 Stunden nach Transfektion detektierbar. Hier differierten die Prozessierungszwischenprodukte (48kDa, 43kDa, 34kDa, 28kDa) der N-terminal getagten Fusionsproteine zwischen Wildtyp und I73T-mutiertem proSP-C kaum in ihrer Intensität (Abbildung 27 mitte). Bei C-terminal verbundenem EGFP ergaben sich zwei Prozessierungsstufen. Die erste Bande mit 48kDa war bei Wildtyp proSP-C etwas schwächer ausgeprägt als bei I73T-mutiertem. Die zweite Bande mit 32kDa ist bei beiden kaum erkennbar (Abbildung 27 rechts).

Die gefundenen Prozessierungsprodukte sind in Abbildung 28 schematisch abgebildet, basierend auf ihrer Größe und der Tatsache, dass der jeweilige Tag (HA oder EGFP) in dem nachgewiesenen Fragment vorhanden ist.

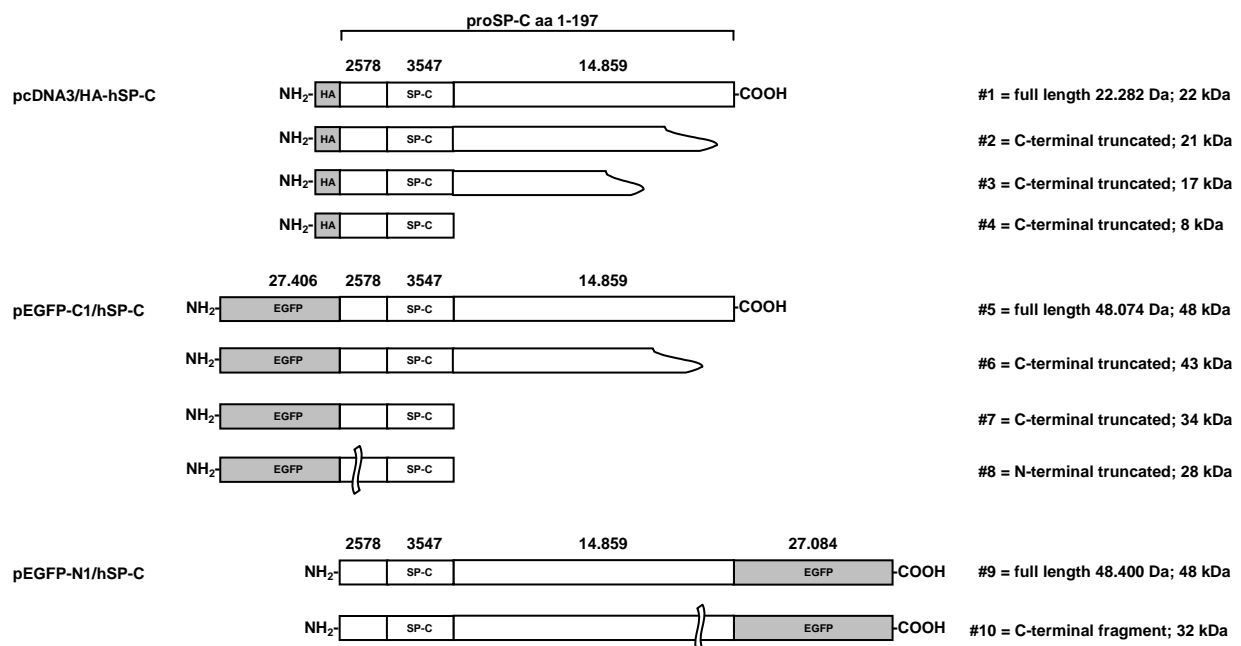


Abbildung 28: Nachgewiesene intrazelluläre Prozessierungsintermediate, Wt und I73T. Dargestellt sind Fusionsprodukte von Wildtyp oder I73T-mutiertem proSP-C. Basierend auf der Bandengröße wurden die Zwischenformen aufgezeigt. Die Schnittstellen sind nur Abschätzungen auf Grund der begrenzten Auflösung der Technik. Es gab in der Bandengröße keinen Unterschied zwischen Wildtyp proSP-C und I73T-mutiertem. HA-proSP-C (Bande #1) mit einer Größe von 22kDa, EGFP-C1-proSP-C (Bande #5) und EGFP-N1-proSP-C (Bande #9) mit 48kDa wurden in voller Länge exprimiert. Die Intermediate nach den Abspaltungen sind in den Banden #3, 4, 6, 7, 8 und 10 dargestellt. Bande #2 passt nicht in das erwartete Schema. Sie wurde neu gefunden.

Die unreife Form (Bande #1, 5, 9) des Proteins wurde bei Wildtyp wie bei I73T-mutiertem proSP-C nachgewiesen. Die Größe der Formen passt auch zu den postulierten Modellen. Nach den ersten beiden C-terminalen Abspaltungen wurden zwei kleinere Zwischenformen bei den N-terminal angehängten Fragmenten (HA und EGFP-C1) gefunden (Bande #3, 4, 6, 7), die auch zu den postulierten Größen passen und nicht beim C-terminal angehängten EGFP festgestellt wurden. Ebenso erwartet kam, dass beim N-terminal angehängten EGFP nach der ersten C-terminalen proteolytischen Spaltung die Größe von 32kDa (Bande #10) detektiert wurde. Nicht einzuordnen war Bande #2. Hier trat ebenfalls eine C-terminale proteolytische Abspaltung auf, da dieses Intermediat wohl bei dem N-terminal angehängten Fragment HA zu finden ist, aber nicht bei dem C-terminal angehängten EGFP. Dieses Intermediat wurde nur bei HA fusioniertem proSP-C gefunden.

Auf die zwei ersten C-terminalen Abspaltungen folgen zwei N-terminale proteolytische Abspaltungen [47]. Auf Grund der Besonderheit, dass das jeweilige angehängte Fragment (HA oder EGFP) detektiert wurde, konnte bei den C-terminal angehängten Fragmenten maximal eine Bande erwartet werden. Diese wurde bei HA fusioniertem proSP-C nicht ermittelt, da die Größe von 2,3kDa auf dem Westernblot technisch nicht detektierbar war. Bei dem EGFP fusioniertem proSP-C wurde die Bande in der erwarteten Größe nachgewiesen (Bande #8).

4.2.3 Analyse der Prozessierungsintermediate bei I73T-mutiertem proSP-C im Vergleich zu Prozessierungsintermediaten, die in der Lungenflüssigkeit von Patienten gefunden wurden

Es kann festgehalten werden, dass die Expression des mutierten proSP-C in MLE-12-Zellen zum Auftreten und zu einer intrazellulären Akkumulation von intermediären Prozessierungsprodukten führt, die im Fall von I73T in ihrer Größe zu Formen passen, die man in der Lungenflüssigkeit von Patienten mit dieser Mutation gefunden hat (siehe Abbildung 29). Der Vergleich zwischen Patientenlavage und Zelllysate ergibt bei den Prozessierungsintermediaten einen Größenunterschied von ungefähr 2kDa. Das entspricht der Größe des HA-Tags, der an proSP-C fusioniert ist und als Antigen beim Zelllysate fungiert. Dieses Modell ist daher ein angemessenes *in vitro* System zur Untersuchung von Surfactantprotein-C-Mutationen.

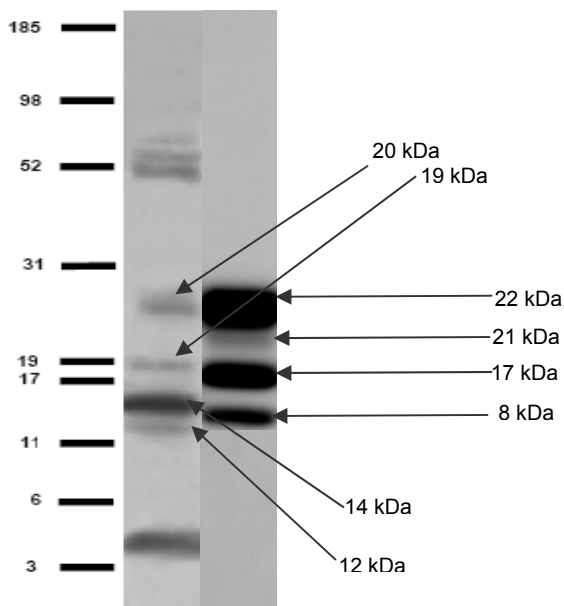


Abbildung 29: Vergleich zwischen Patient mit Mutation I73T in SP-C zu MLE-12-Zellen, die I73T-mutiertes SP-C exprimieren. Dargestellt ist auf der linken Seite native Lavage eines Patienten, bei dem die Mutation I73T nachgewiesen wurde. Auf der rechten Seite ist das Zelllysate von MLE-12-Zellen abgebildet, die stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C^{I73T} transfiziert wurden. Es wurde 5µg Gesamtprotein nativer Lavage auf einem NuPAGE Bis-Tris 10% Gel aufgetrennt im Vergleich zu 20µg Gesamtprotein Zelllysate. Als Molekulargewichtsmarker wurde MultiMark® verwendet. Nach dem Blotting wurde die Membran mit Lavage zuerst mit polyklonalem r-SP-C-Antikörper vom Kaninchen von Byk Gulden inkubiert. Nach deren Auswertung wurde die Membran mit N-ProSP-C-10-23 Antikörper inkubiert. Der Antikörper ist polyklonal, vom Kaninchen und von Byk Gulden. Als zweiter Antikörper wurde Peroxidase konjugierter AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) verwendet. Die Membran mit dem aufgetrennten Zelllysate wurde zunächst mit Anti-HA von Roche inkubiert und anschließend mit dem Peroxidase konjugierten Anti-Rat IgG. In der Lavage wurden Prozessierungsintermediate von 12, 14, 19 und 20kDa gefunden im Vergleich zum Zelllysate mit 8, 17, 21 und 22kDa.

4.2.4 Analyse der Prozessierungsintermediate bei A116D-mutiertem proSP-C im Vergleich zu Wildtyp proSP-C

Als zweiter Vergleich wurden die Prozessierungsintermediate von Wildtyp proSP-C und A116D-mutiertem proSP-C untersucht. Mittels Auftrennung der Proteine durch das Westernblot-Verfahren und anschließender immunochemischer Detektion der einzelnen Banden konnte die Größe der Prozessierungsstufen ermittelt werden. Diese wurden dann mit dem theoretischen Modell verglichen. Zunächst wurden die Prozessierungsstufen von Wildtyp proSP-C mit A116D-mutiertem proSP-C gegenübergestellt.

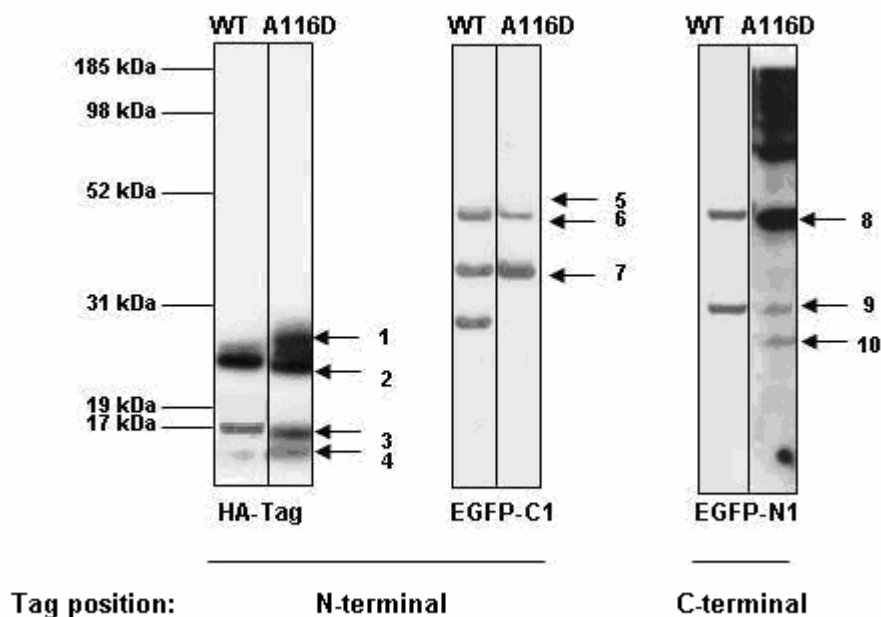


Abbildung 30: Westernimmunoblotanalysen von MLE-12-Zellen, Wt und A116D. Dargestellt sind links MLE-12-Zellen, die stabil mit pcDNA3/HA-hSP-C transfiziert wurden. Der mittlere Bereich zeigt MLE-12-Zellen, die transient mit pEGFP-C1/hSP-C transfiziert wurden. Rechts sind MLE-12-Zellen gezeigt, die transient mit pEGFP-N1/h-SP-C transfiziert wurden. Das Immunoblotten der Zelllysate mit Tag spezifischen Antikörpern zeigt Banden, die die verschiedenen prozessierten intrazellulären Zwischenstufen aufzeigen, in denen die Tagesequenz beibehalten wurde.

HA-proSP-C^{A116D} zeigte im Vergleich zum Wildtyp vier Banden mit ähnlicher Intensität (22kDa, 21kDa, 15kDa, 8kDa). Allerdings lag Bande #3 bei 15kDa im Gegensatz zu HA-proSP-C^{Wt} mit 17kDa (Abbildung 30 links).

Die transiente Expression von N-terminalen (C1) und C-terminalen (N1) EGFP Fusionsprodukten war 24 Stunden nach Transfektion detektierbar. Die oberste Bande (48 kDa) von A116D-mutiertem proSP-C bei dem N-terminal getagten Fusionsprotein war,

ebenso wie beim Wildtyp, kaum erkennbar. Die zweite Bande (43kDa) fiel bei A116D schwächer aus als beim Wildtyp. Die dritte Bande (34kDa) war sowohl bei A116D wie auch beim Wildtyp gleich intensiv ausgeprägt. Die unterste Bande (28kDa), die bei Wildtyp proSP-C zu sehen war, konnte bei A116D-mutiertem proSP-C nicht detektiert werden (Abbildung 30 mitte). Beim C-terminal verbundenem EGFP wurde die oberste Bande (48kDa) von A116D-mutiertem proSP-C intensiver ausgeprägt als bei Wildtyp proSP-C. Dafür fiel die zweite Bande (32kDa) schwächer aus. Ein Unterschied zu Wildtyp proSP-C wurde gefunden. Bei A116D-mutiertem proSP-C konnte eine zusätzliche Bande mit 27kDa detektiert werden (Abbildung 30 rechts).

Die schematisch dargestellten Prozessierungsprodukte sind in Abbildung 31 zu sehen.

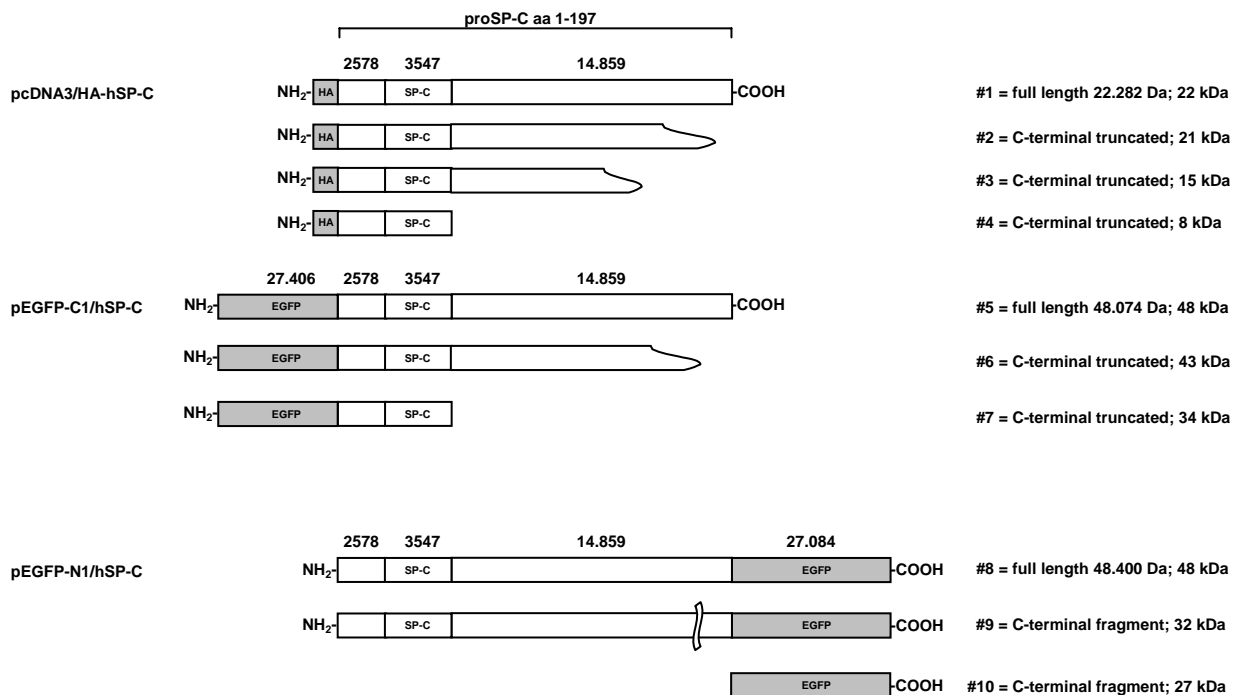


Abbildung 31: Nachgewiesene intrazelluläre Prozessierungsintermediate, Wt und A116D. Dargestellt sind Fusionsprodukte von A116D-mutiertem proSP-C. Basierend auf der Bandengröße wurden die Zwischenformen aufgezeigt. Die Schnittstellen sind nur Abschätzungen auf Grund der begrenzten Auflösung der Technik. HA-proSP-C (Bande #1) mit einer Größe von 22kDa, EGFP-C1-proSP-C (Bande #5) und EGFP-N1-proSP-C (Bande #8) mit 48kDa wurden in voller Länge exprimiert. Die Intermediate nach den Abspaltungen sind in den Banden #3, 4, 6, 7, 9 und 10 dargestellt. Bande #2 passt nicht in das erwartete Schema. Sie wurde neu gefunden.

Die unreife Form (Bande #1, 5, 8) des Proteins wurde bei Wildtyp, I73T-mutiertem und jetzt auch bei A116D-mutiertem proSP-C nachgewiesen. Die Größe der Formen passt

auch zu den postulierten Modellen. Nach den ersten beiden C-terminalen Abspaltungen wurden zwei kleinere Zwischenformen bei den N-terminal angehängten Fragmenten (HA und EGFP-C1) gefunden (Bande #3, 4, 6, 7), die auch zu den postulierten Größen passen und nicht beim C-terminal angehängten EGFP ermittelt wurden. Ebenso erwartet kam, dass beim N-terminal angehängten EGFP nach der ersten C-terminalen proteolytischen Spaltung die Größe von 32kDa (Bande #9) detektiert wurde. Allerdings wurde bei A116D-mutiertem proSP-C noch eine zusätzliche Bande (Bande #10) in der Größe von 27kDa gefunden, die zur Größe von EGFP an sich passt, was vermuten lässt, dass bei A116D-mutiertem proSP-C der EGFP Tag ganz abgespalten wird. Nicht einzuordnen war Bande #2. Hier trat ebenfalls eine C-terminale proteolytische Abspaltung auf, da dieses Intermediat wohl bei dem N-terminal angehängten Fragment HA zu finden ist, aber nicht bei dem C-terminal angehängten EGFP. Dieses Intermediat wurde nur bei HA fusioniertem proSP-C bestimmt.

Auf die zwei ersten C-terminalen Abspaltungen folgen zwei N-terminale proteolytische Abspaltungen [47]. Auf Grund der Besonderheit, dass das jeweilige angehängte Fragment (HA oder EGFP) detektiert wurde, konnte bei den C-terminal angehängten Fragmenten maximal eine Bande erwartet werden. Diese wurde bei HA fusioniertem proSP-C nicht gefunden, da die Größe von 2,3kDa auf dem Westernblot technisch nicht detektierbar war. Bei dem EGFP fusioniertem proSP-C wurde die Bande im Gegensatz zu Wildtyp proSP-C nicht detektiert.

4.2.5 Analyse der Prozessierungsintermediate bei P30L-, L110R-, P115L- oder L188Q-mutiertem proSP-C im Vergleich zu Wildtyp proSP-C

Es wurden stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C transfizierte MLE-12-Zellen untersucht, die P30L-, L110R-, P115L- oder L188Q-mutiertes proSP-C exprimieren. Bei der Untersuchung mittels Westernimmunoblot konnten folgende Größen von proSP-C, das mit dem HA-Tag verbunden ist, detektiert werden. Ebenso wie bei Wildtyp proSP-C wurde die volle Länge (22kDa) von proSP-C bei allen Mutanten detektiert. Auch hier war die bisher noch nicht einzuordnende Bande von 21kDa zu finden. Die dritte Bande zeigte sich bei P30L- und L188Q-mutiertem proSP-C mit 17kDa. Diese Bandengröße wurde auch bei Wildtyp proSP-C und bei I73T-mutiertem proSP-C gefunden. L110R- und P115L-mutiertes proSP-C wies dagegen eine Bandengröße von 15kDa vor, die auch bei A116D-mutiertem proSP-C detektiert wurde. Die unterste Bande war bei P30L-mutiertem proSP-C mit 8kDa vorzufinden, ebenso wie bei Wildtyp proSP-C, I73T- und A116D-mutiertem. Bei L110R-,

P115L- und L188Q-mutiertem proSP-C wurde die unterste Bande mit 12kDa detektiert. Das Bandenmuster ist in Abbildung 32 dargestellt.

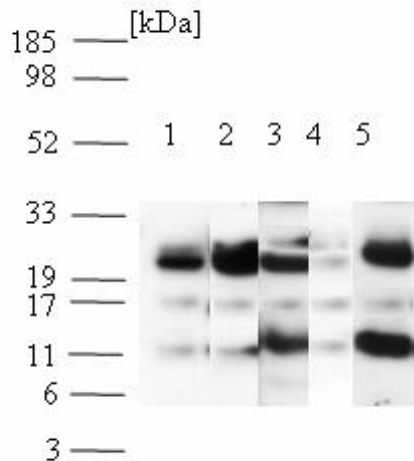


Abbildung 32: Westernimmunoblotanalysen von MLE-12-Zellen, Wt und P30L, L110R, P115L, L188Q. Dargestellt sind MLE-12-Zellen, die stabil mit pcDNA3/HA-hSP-C transfiziert wurden. Spur 1: Wt, Spur 2: P30L, Spur 3: L110R, Spur 4: P115L, Spur 5: L188Q. Geltyp: NuPage Bis-Tris 10% Midi, Puffer: NuPage MES Puffer, RedAge: reduzierend, Lauf: 50min, Blot: 60min, Spurbeladung: 20µg Gesamtzell-Lysat, Blockinglösung: 5% Milchpulver in TBS-T; 1.AK: HA-Tag von Roche, 1:1000, O/N 4°C, in Blockinglösung, 2.AK: anti-rat, 1:10000, Raumtemperatur 60min, in Blocking-Lösung.

Um vorliegende Ergebnisse noch besser zu untermauern, ist es erforderlich, auch bei diesen vier Mutationen die EGFP-Fusionsprodukte noch zu untersuchen. Dies war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr durchführbar.

4.3 Morphologie der Lamellarkörperchen

Lamellarkörperchen stellen die letzte intrazelluläre Stufe der Surfactantproteinproduktion dar. Störungen der Biogenese oder Exozytose dieser Lysosomen-ähnlichen Organellen sind potentiell pathologisch.

Zur Darstellung morphologischer Veränderungen wurden die Zellen elektronenmikroskopisch untersucht. Zunächst wurden untransfizierte Zellen auf das Vorhandensein von Lamellarkörperchen überprüft. Wie bei Abbildung 33 zu sehen, enthielten untransfizierte A549- und MLE-12-Zellen morphologisch normal aussehende Lamellarkörperchen mit der charakteristischen Lamellenstruktur. Humane A549-Zellen wurden zum Vergleich herangezogen, um zu sehen, ob murine Lamellarkörperchen ein andersartiges Aussehen haben. Dies war nicht der Fall. Der Gehalt an Lamellarkörperchen fiel geringer als erwartet aus.

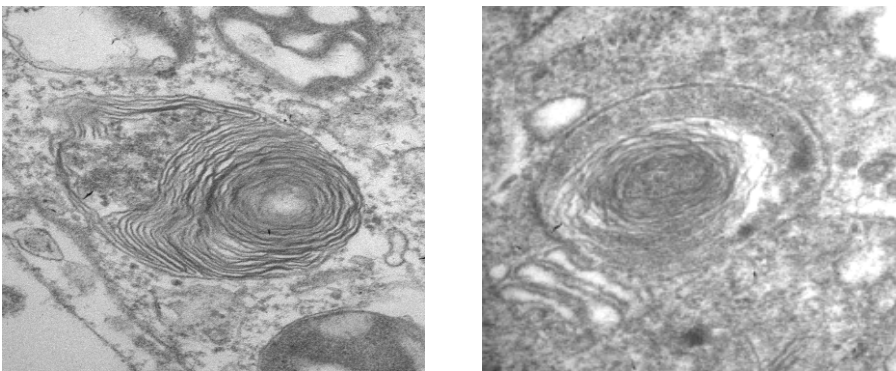


Abbildung 33: Elektronenmikroskopische Aufnahmen alveolärer Typ-II-Zelllinien. Die linke Abbildung zeigt eine A549-Zelle, die rechte eine MLE-12-Zelle. Beide sind jeweils 59800-fach vergrößert.

4.3.1 Morphologie der Lamellarkörperchen bei Wildtyp proSP-C und I73T- oder A116D-mutiertem pro SP-C

Nun wurden stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt} transfizierte MLE-12-Zellen untersucht. Es wurden ebenfalls morphologisch unveränderte Lamellarkörperchen aufgefunden (Abbildung 34). Durch die Expression von Wildtyp proSP-C konnte der Gehalt an Lamellarkörperchen nicht gesteigert werden.

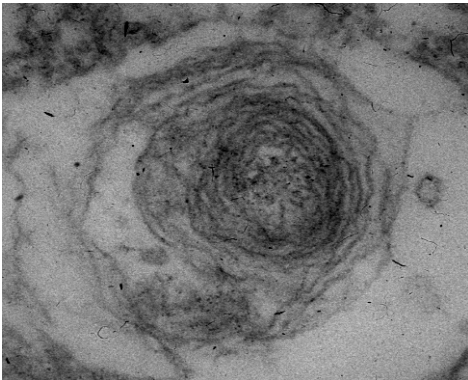


Abbildung 34: Elektronenmikroskopie von MLE-12-Zellen, die Wildtyp SP-C exprimieren. Die MLE-12-Zellen sind stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt} transfiziert. Sie sind 109200-fach vergrößert.

Bei der Aufnahme stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C^{I73T} oder A116D transfizierter MLE-12-Zellen wurden allerdings jeweils zwei unterschiedliche Arten von Lamellarkörperchen entdeckt. Einige der Lamellarkörperchen wiesen eine transparentere und mit weniger Lamellen versehene Struktur auf (Abbildung 35).

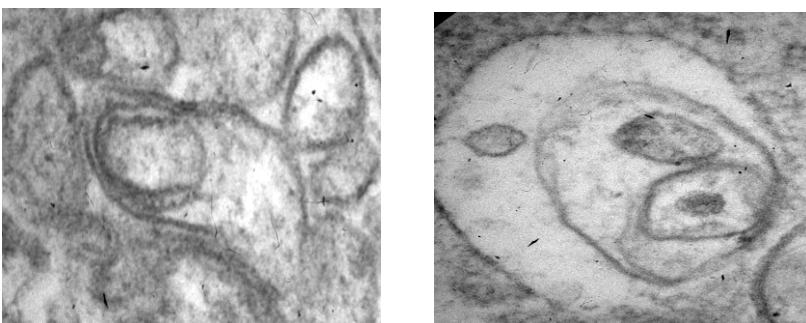


Abbildung 35: Elektronenmikroskopie von MLE-12-Zellen, die I73T-mutiertes proSP-C exprimieren. Dargestellt sind MLE-12-Zellen, die stabil mit pcDNA3/HA-hSP-C transfiziert sind. Links ist I73T, rechts A116D abgebildet, je mit 148200-facher Vergrößerung.

Alle weiter vorhandenen Lamellarkörperchen hatten eine kompakte und dichte Struktur, in der Literatur als *dense bodies* beschrieben [84], siehe Abbildung 36.

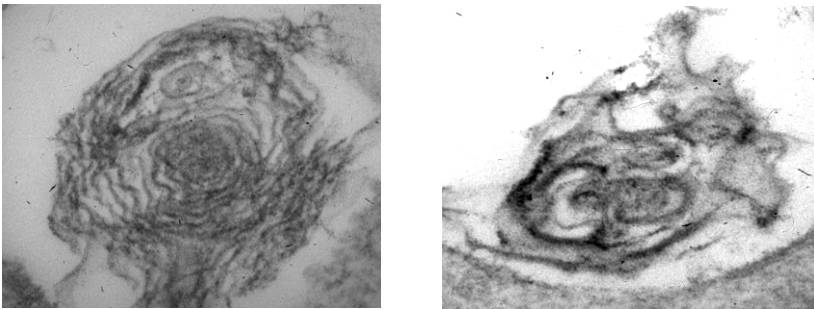


Abbildung 36: Elektronenmikroskopie von MLE-12-Zellen, die I73T- oder A116D-mutiertes proSP-C exprimieren. Dargestellt sind MLE-12-Zellen, die stabil mit pcDNA3/HA-hSP-C transfiziert sind. Links ist I73T, rechts A116D abgebildet, je mit 148200-facher Vergrößerung.

Eine Isolierung der intrazellulären Lamellenkörperchen aus den Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation [85] (siehe Methoden) ist bislang nicht gelungen. Fraktionen der Dichtegradientenzentrifugation wurden unter dem Elektronenmikroskop analysiert, doch wurden keine Lamellenkörperchen gefunden (Abbildung 37). Zur Sicherheit wurde das Ergebnis mit humanen Zellen (A549) abgeglichen, um auszuschließen, dass diese Methode nur bei murinen Zellen nicht anwendbar ist.

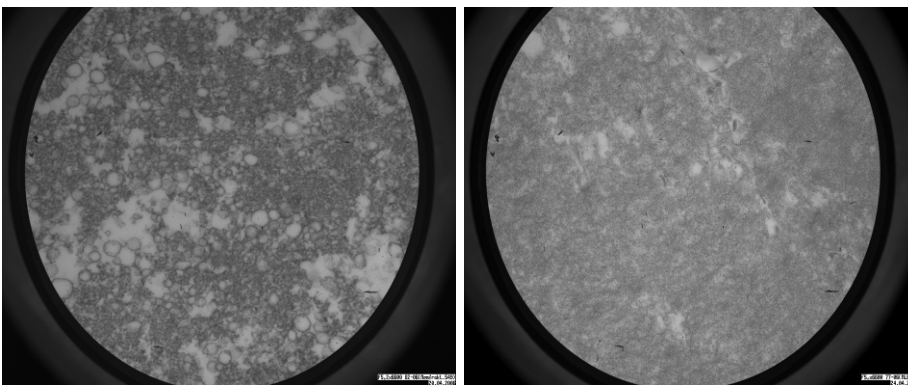


Abbildung 37: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Large aggregates. Nach einer durchgeführten Membranpräparation untransfizierter alveolärer Typ-II-Zellen wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dargestellt sind Isolationsprodukte der A549-Zellen (links) und der MLE-12-Zellen (rechts), jeweils mit 34320-facher Vergrößerung. Large aggregates sind nicht erkennbar.

Zusammenfassend kann folgende Aussage getroffen werden. Die Expression von Wildtyp proSP-C hat keinen Einfluss auf die Morphologie und den Gehalt der Lamellarkörperchen im Vergleich zu untransfizierten Typ-II-Alveolarzelllinien. Aber bei Zellen, die I73T- oder A116D-mutiertes proSP-C exprimieren, im Vergleich zu Zellen, die Wildtyp proSP-C exprimieren, sind die Lamellarkörperchen entweder transparenter und haben weniger Lamellen oder sie sind wesentlich dichter, ähnlich den *dense bodies*.

4.3.2 Morphologie der Lamellarkörperchen bei P30L-, L110R-, P115L- oder L188Q-mutiertem proSP-C

Es wurde die Morphologie der Lamellarkörperchen bei stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C transfizierten MLE-12-Zellen untersucht. Hierbei wurden die Mutationen P30L, L110R, P115L und L188Q betrachtet. Der Gehalt an Lamellarkörperchen war insgesamt auch bei diesen Zellen geringer als erwartet. Es wurden genauso wie bei I73T und A116D rudimentäre, wenig lamellierte Körperchen gefunden (Abbildung 38 A, B, D, E). Eine Ausnahme trat bei L110R auf, wo analog zu I73T und A116D auch dicht gepackte Lamellarkörperchen auftraten (Abbildung 38 C).

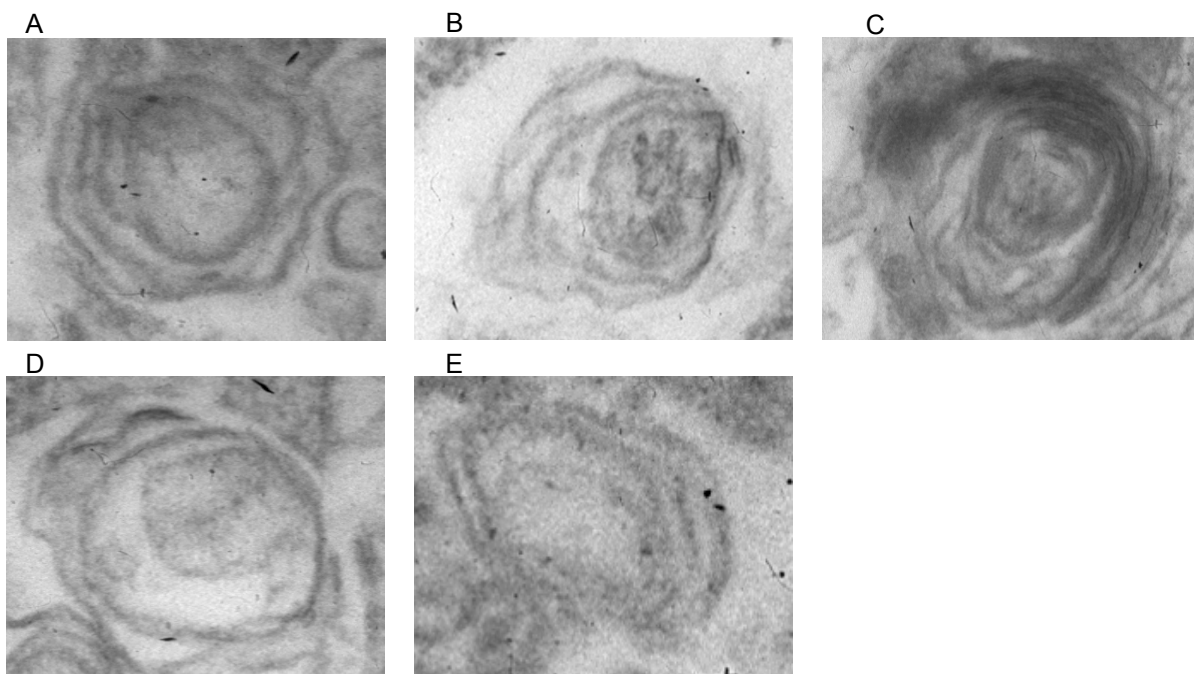


Abbildung 38: Elektronenmikroskopie von MLE-12-Zellen, die P30L-, L110R-, P115L- oder L188Q-mutiertes proSP-C exprimieren. Dargestellt sind MLE-12-Zellen, die stabil mit pcDNA3/HA-hSP-C transfiziert sind. Abbildung A zeigt P30L, 109200-fach vergrößert. Abbildung B stellt L110R, 148000-fach vergrößert, dar. Abbildung C zeigt L110R, 109200-fach vergrößert. Abbildung D präsentiert P115L, 148200-fach vergrößert. Abbildung E stellt L188Q, 109200-fach vergrößert, dar.

Eine zusammenfassende Übersicht der untransfizierten und transfizierten Zellen gibt Abbildung 39 wieder. Es wurden folgende Zellen auf die Anzahl und Morphologie ihrer Lamellarkörperchen untersucht. Um Vergleiche zu humanen Typ-II-Zellen durchführen zu können, wurden A549-Zellen analysiert. Dies sollte zur Absicherung dienen, dass murine Zellen keine „andersartigen“ Lamellarkörperchen produzieren. Als nächstes wurden untransfizierte MLE-12-Zellen analysiert. Nun wurden noch stabil mit dem Vektor

pcDNA3/HA-hSP-C transfizierte Zellen der Zelllinie MLE-12 analysiert. Hierbei wurden Zellen verglichen, die zum einen Wildtyp proSP-C exprimieren und zum anderen P30L-, I73T-, L110R-, P115L- oder L188Q-mutiertes proSP-C.

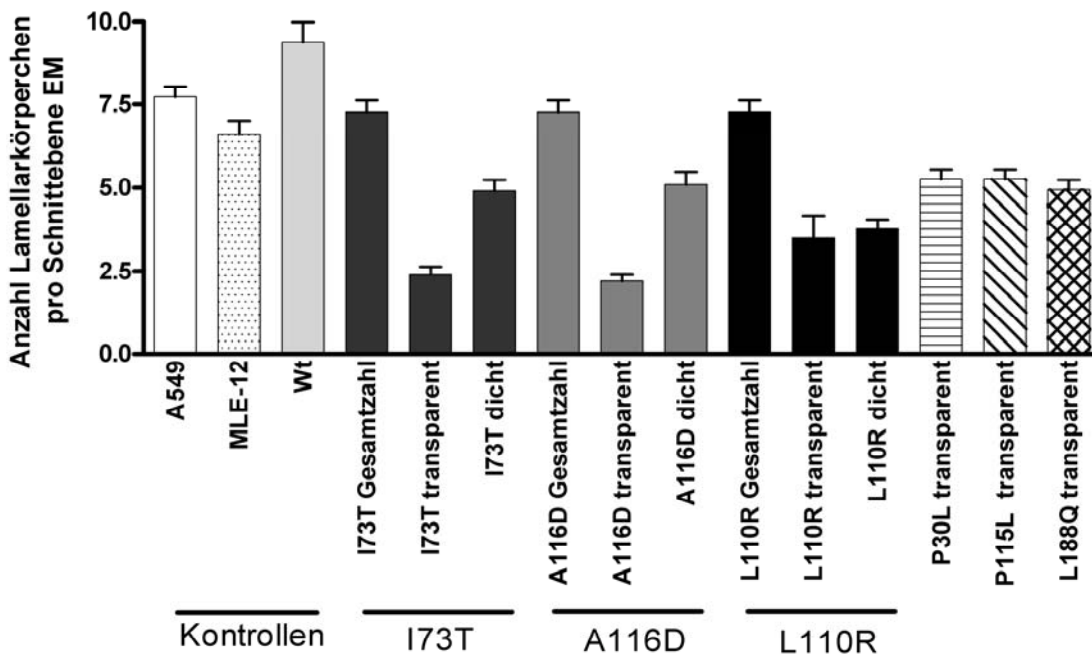


Abbildung 39: Anzahl der Lamellarkörperchen pro Schnittebene im Elektronenmikroskop. A549 und MLE-12 stehen für die untransfizierte Typ-II-Lungenzelllinien. Wt, I73T, A116D, P30L, L110R, P115L und L188Q steht als Abkürzung für stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C transfizierte MLE-12-Zellen. „Transparent“ bezeichnet diejenigen Lamellarkörperchen, die von ihrer Struktur her weniger Lamellen aufzeigen und „dicht“ steht für die dichte und kompakte Struktur der dense bodies. Bei A549, MLE-12 und Wt wurden „normale“ Lamellarkörperchen gefunden. I73T, A116D und L110R untergliedert sich in Gesamtlamellarkörperchenzahl, Anteil transparente und dichte Lamellarkörperchen. Bei P30L, P115L und L188Q fanden sich nur transparente Lamellarkörperchen. Es wurden je drei Zellpräparationen durchgeführt und dabei jeweils fünf Zellen genauer untersucht.

Es traten bei A549-, MLE-12-Zellen und MLE-12-Zellen, die stabil mit pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt} transfiziert waren, „normale“ Lamellarkörperchen auf. Bei MLE-12-Zellen, die stabil mit pcDNA3/HA-hSP-C^{I73T, A116D und L110R} transfiziert waren, wurden transparente und dichte Lamellarkörperchen festgestellt, wobei der Anteil der *dense bodies* größer war. Bei MLE-12-Zellen, die stabil mit pcDNA3/HA-hSP-C^{P30L, P115L und L188Q} transfiziert waren, fanden sich nur transparente Lamellarkörperchen.

4.4 Intrazelluläre Lokalisierung der Zwischenformen von proSP-C

Die intrazelluläre Lokalisierung der Zwischenformen von Wildtyp und mutiertem proSP-C Fusionsproteinen wurde mittels Immunfluoreszenz von stabil und transient transfizierten MLE-12- und A549-Zellen untersucht (Übersicht in Tabelle 11). Hierbei wurden Kompartimentmarker rot gefärbt und das HA-Fusionsprotein grün. EGFP als Fusionsprotein leuchtete von sich aus grün. Überlagerungen erscheinen gelb. Die humanen Zellen sollten als Absicherung dienen, dass in murinen Zellen nicht andere intrazelluläre Lokalisierungen statt finden.

Marker	Subzelluläres Kompartiment	Wt	I73T	A116D	Modell
LAMP-3	Lysosom, Lamellarkörperchen	-	-	(+)	MLE-12 stabil; HA-SP-C
		+	n.d.	(+)	A549 transient; HA-SP-C
		-	-	-	A549 transient; N1-EGFP
		+	-	n.d.	A549 transient; C1-EGFP
EEA-1	Frühes Endosom	-	-	-	MLE-12 stabil; HA-SP-C
		(+)	-	n.d.	A549 transient; HA-SP-C
		-	(+)	(+)	A549 transient; N1-EGFP
		n.d.	n.d.	n.d.	A549 transient; C1-EGFP
Calnexin	Endoplasmatisches Retikulum	-	n.d.	n.d.	MLE-12 stabil; HA-SP-C
		-	n.d.	n.d.	A549 transient; HA-SP-C
		-	-	-	A549 transient; N1-EGFP
		-	-	n.d.	A549 transient; C1-EGFP
Hsp90	Zytoplasma	+	+	n.d.	A549 transient; HA-SP-C
Syntaxin-2	Exozytotischer Fusionskomplex	(+)	-	-	MLE-12 stabil; HA-SP-C
		(+)	-	-	A549 transient; N1-EGFP
SNAP-23	Exozytotischer Fusionskomplex	-	-	-	MLE-12 stabil; HA-SP-C
Ubiquitin	Ubiquitinylierte Proteine	(+)	(+)	n.d.	A549 transient; HA-SP-C

Tabelle 11: Kolokalisation zellulärer Markerproteine mit proSP-C-Prozessierungsintermediaten in MLE-12- und A549-Zellen. Dargestellt sind die verwendeten Marker, die für ein Kompartiment spezifisch sind, und die festgestellten Überlagerungen, wobei - für nicht kolokalisiert, + für kolokalisiert, (+) für teilweise kolokalisiert und n.d. für nicht durchgeführt steht. Es wird zwischen Wildtyp proSP-C, I73T- oder A116D-mutiertes proSP-C exprimierenden Zellen unterschieden. Die Spalte Modell zeigt die verwendete Zelllinie, den darin eingebrachten Tag und ob dieser transient oder stabil eingeführt wurde. Es wurden jeweils drei Versuchsansätze durchgeführt, bei denen je zehn Zellen auf die oben aufgeführten Merkmale untersucht wurden.

N-terminal verbundene Wildtyp-proSP-C-Formen wurden in Lamp-3-positiven Vesikeln in A549 gefunden, während weder die mutierten noch eine der C-terminal verbundenen Formen mit Lamp-3 kolokalisierten.

Wildtyp proSP-C war nicht in EEA-1-positiven Vesikeln präsent, jedoch einige der mutierten proSP-C Zwischenstufen konnten in EEA-1-positiven Vesikeln gefunden werden (Abbildung 40).

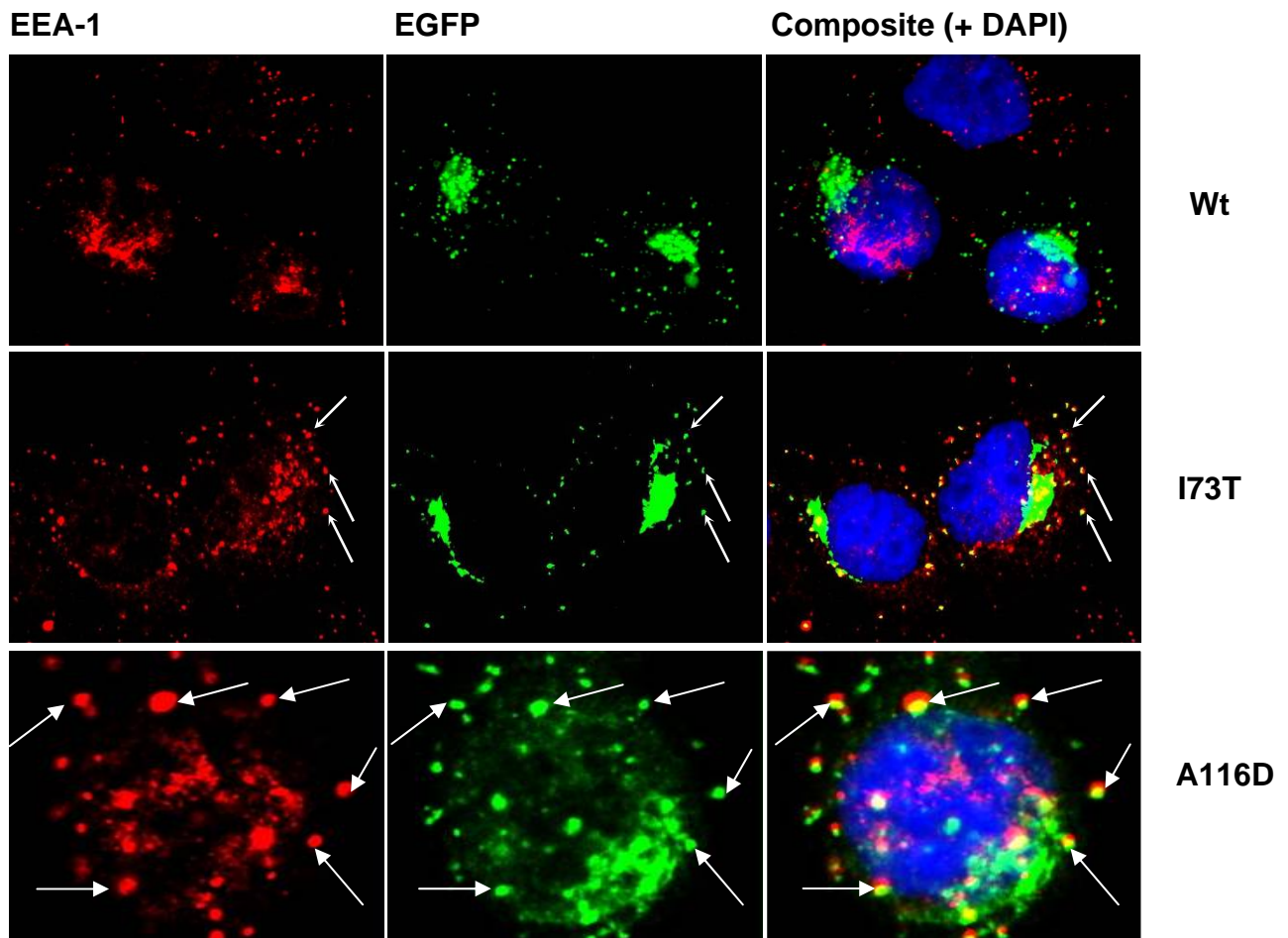


Abbildung 40: Immunfluoreszenz von transient mit pEGFP-N1/hSP-C transfizierten A549-Zellen. Dargestellt sind der Wildtyp (Wt), sowie die Mutanten I73T und A116D, die jeweils mit EEA-1-sensitiven Antikörpern gefärbt wurden (rot) und selbstleuchtend durch EGFP (grün) sind. In der Überlagerung (Composite) erscheinen Übereinstimmungen gelb. Der Kern erscheint durch DAPI Färbung blau.

Das frühe Endosom enthält normalerweise endozytiertes Material, das zum Recycling oder für die Degradation bestimmt ist. Keine der proSP-C Formen lokalisierte zu Calnexin-positiven Bereichen. Wildtyp und I73T-mutiertes proSP-C kolokalisierten mit dem Chaperon Hsp90. Hsp90 verhindert in der Zelle die Aggresomenbildung.

Die Surfactantsekretion ist von der Fusion der Lamellarkörperchen mit der Plasmamembran abhängig. Dazu werden so genannten SNARE-Proteine benötigt, wie Syntaxin-2 und SNAP-23, von denen bekannt ist, dass sie eine Rolle bei der Surfactantsekretion spielen [54]. Es gab allerdings weder eine Kolo-kalisation von SNAP-23 mit dem Wildtyp noch mit dem mutierten proSP-C. Jedoch zeigten einige Wildtyp proSP-C Formen eine Kolo-kalisation mit Syntaxin-2, wohingegen mutiertes proSP-C nicht damit kolo-kalisierte (Abbildung 41).

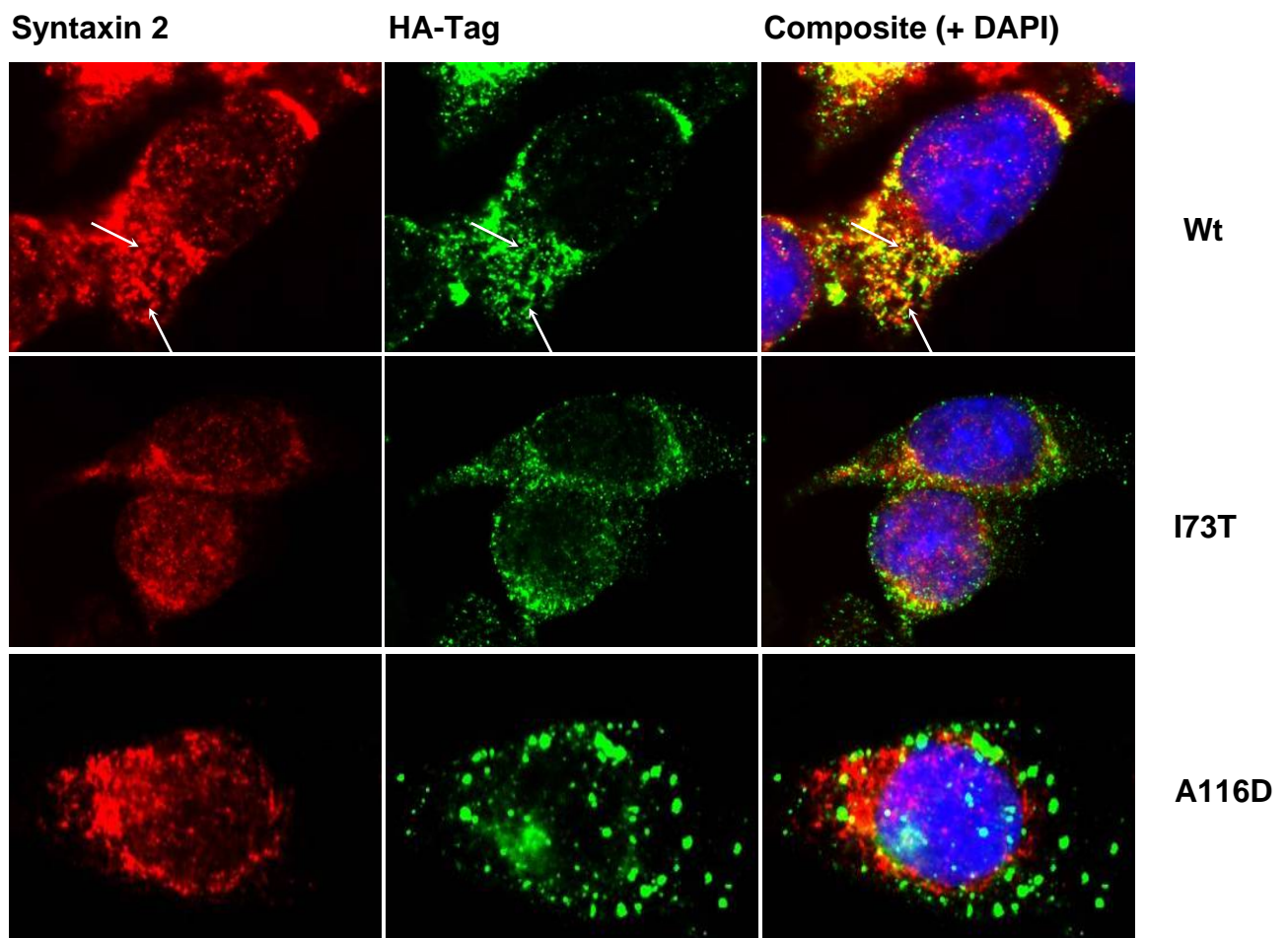


Abbildung 41: Immunfluoreszenz von stabil mit pcDNA3/HA-hSP-C transfizierten MLE-12-Zellen. Dargestellt sind der Wildtyp (Wt), sowie die Mutanten I73T und A116D, die jeweils mit Synthaxin-2 sensitiven Antikörpern gefärbt wurden (rot) und selbstleuchtend durch EGFP (grün) sind. In der Überlagerung (Composite) erscheinen Übereinstimmungen gelb. Der Kern erscheint durch DAPI Färbung blau.

Wildtyp und I73T-mutiertes proSP-C kolo-kalisiert partiell mit Ubiquitin. Ubiquitin ist ein Markerprotein, das Zellen für die Degradation markiert.

Zusammenfassend kann man daraus schließen, dass ein oder mehrere Prozessierungsintermediate von Wildtyp und mutiertem proSP-C unterschiedlich

positioniert werden und mutiertes proSP-C nicht in LAMP-3-positive Vesikel, die Lamellarkörperchen, gelangt.

4.5 Verhalten von transfizierten MLE-12-Zellen gegenüber exogenem Stress

Mit dem Ziel, die Integrität der Zellen zu untersuchen, die mutiertes proSP-C exprimieren, wurde die LDH-Abgabe von stabil mit pcDNA3/HA-hSP-C transfizierten Zellen ermittelt. Gleichzeitig wurden die Auswirkungen der Arzneimittelbehandlung mit Cyclophosphamid, Azathioprin, Methylprednisolon oder Hydroxychloroquin analysiert (Abbildung 42). Diese werden zurzeit zur Behandlung von an ILD erkrankten Patienten verwendet.

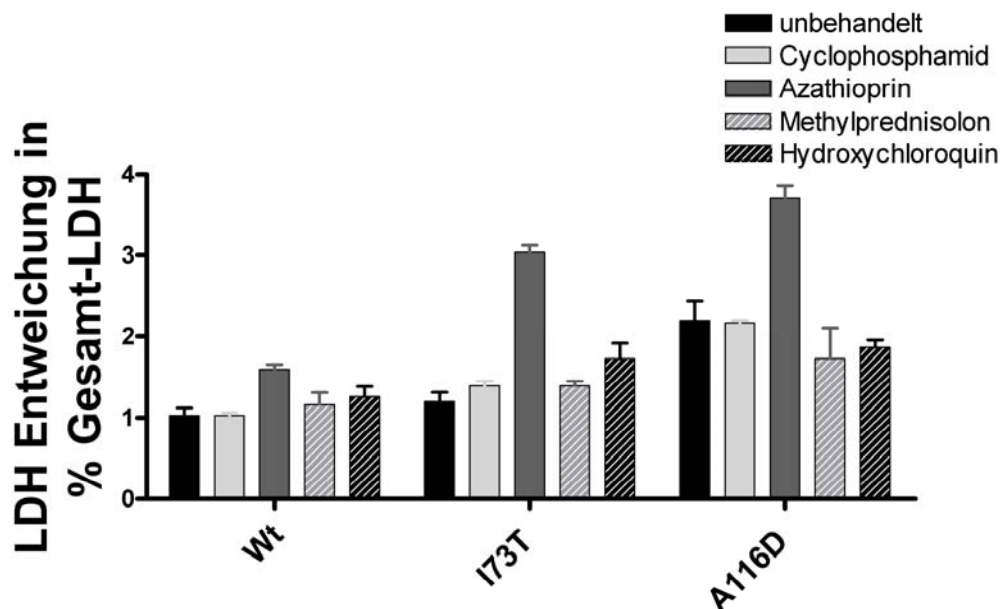


Abbildung 42: LDH-Freisetzung von stabil transfizierten MLE-12-Zellen. Dargestellt sind MLE-12-Zellen, die stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C transfiziert wurden. MLE-12-Zellen, die Wildtyp oder I73T-mutiertes proSP-C exprimieren, wurden mit jeweils vier Medikamenten inkubiert (10µM für 24 Stunden), um ihre Stressantwort zu analysieren. Es wurde der Level von LDH, der aus den Zellen freigesetzt wurde als prozentualer Anteil vom Gesamt-LDH der Zellen gezeigt. LDH entweicht aus toten oder sterbenden Zellen. Höhere Level drücken einen größeren Zellschaden aus.

Wurden die unbehandelten Zellen miteinander verglichen, wiesen A116D-mutiertes proSP-C exprimierende Zellen eine erhöhte LDH-Abgabe im Vergleich zu Wildtyp oder I73T-mutiertes proSP-C exprimierenden Zellen auf. Durch die Behandlung mit Azathioprin wurde bei allen transfizierten MLE-12-Zellen die LDH-Freisetzung erhöht. Jedoch trat

dieser Effekt bei den Zellen verstärkt auf, die mutiertes proSP-C exprimieren. Hydroxychloroquin vergrößerte nur bei Zellen, die I73T-mutiertes proSP-C exprimieren, die Freisetzung von LDH. Methylprednisolon nahm keinen Einfluss auf die LDH-Freisetzung.

Es kann festgehalten werden, dass die Expression von mutiertem proSP-C ein Stressfaktor für die Zellen ist, der ihre Verletzbarkeit und Anfälligkeit gegenüber exogenem Stress möglicherweise erhöht.

4.6 Einfluss der proSP-C-Expression auf die Hitzeschockproteinexpression

In der vorliegenden Arbeit wurden Proteinlevel von endogenen Hitzeschockproteinen bestimmt, die in den Faltungsprozess aberrant prozessierter Proteine involviert sind. Auf der einen Seite wurde untersucht, wie sich die Expression der Hitzeschockproteine zwischen Wildtyp proSP-C und mutiertem proSP-C unterscheidet. Andererseits wurde die Reaktion auf die Behandlung mit pharmakologischen Substanzen bezüglich der Hitzeschockproteinexpression untersucht. Die Versuche wurden mit MLE-12-Zellen durchgeführt, die stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C transfiziert wurden.

4.6.1 Expression der Hitzeschockproteine bei Wildtyp proSP-C, I73T- und A116D-mutiertem proSP-C

Abbildung 43 zeigt einen Überblick über die Expression der Hitzeschockproteine. Es wurde der Unterschied zwischen Wildtyp proSP-C, mutiertem proSP-C und der Auswirkung der Medikamentenbehandlung dargestellt.

Die Expression von Calnexin, einem ER zugehörigen Chaperon, wurde durch die Behandlung mit einer der vier Substanzen nicht verändert, und es gab keine Unterschiede zwischen Zellen, die mutiertes proSP-C und Wildtyp proSP-C exprimieren. Calreticulin, ein weiteres ER zugehöriges Chaperon, wurde in mutierten Zellen vermehrt exprimiert, während es in Wildtyp-Zellen weniger stark im Vergleich zu unbehandelten Zellen exprimiert wurde. Eine Ausnahme stellte die Behandlung mit Azathioprin dar. Hier war kein Unterschied in der Calreticulin Expression zwischen den Zellen zu sehen, die Wildtyp proSP-C oder mutiertes exprimieren. Die Hsp70-Expression wurde durch die Behandlung mit Cyclophosphamid bei mutierten Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen erhöht. Sonst hatte die Medikamentenbehandlung keinen Einfluss auf die Expression von Hsp70. Die

Expression von Hsp90 wurde durch alle vier pharmakologischen Substanzen, die getestet wurden, verändert. Es ergab sich eine Steigerung der Expression bei den mutierten Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen.

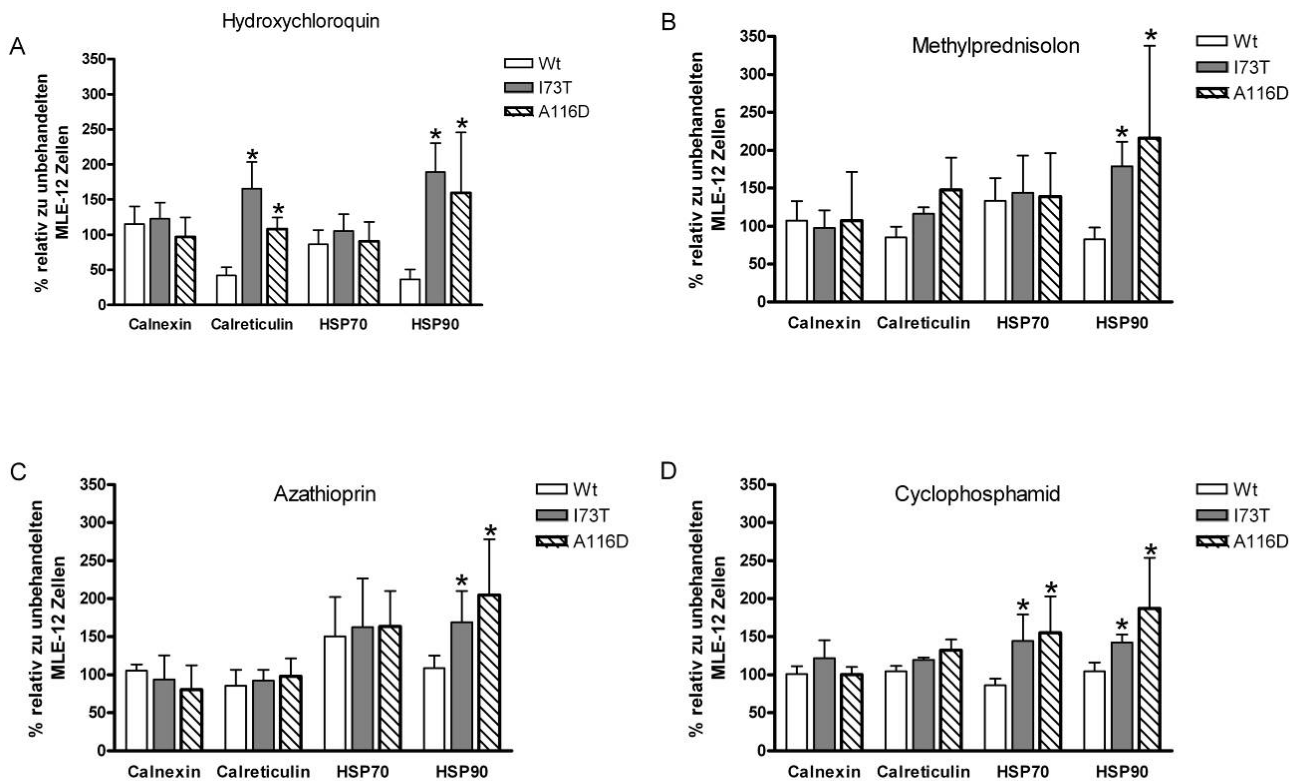


Abbildung 43: Übersicht über die Expression der Hitzeschockproteine; Wt, I73T und A116D. Die zelluläre Hitzeschockproteinexpression von behandelten Zellen wurde durch semi-quantitatives Immunoblotten ausgewertet. Die Abbildung zeigt die Expression der Hitzeschockproteine als Antwort auf die Medikamentenbehandlung. Jede Säule beschreibt die prozentuale Proteinmenge im Vergleich zu unbehandelten Zellen, die auf 100% gesetzt wurden. Sternchen markieren den signifikanten Unterschied. Es handelt sich um MLE-12-Zellen, die stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt, I73T oder A116D} transfiziert wurden.

Tabelle 12 gibt einen Überblick über die prozentualen Änderungen der Hitzeschockproteinexpression bei mutierten Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen nach der Behandlung mit den vier pharmakologischen Substanzen. Hydroxychloroquin hat den stärksten Effekt auf alle Hitzeschockproteine in mutierten Zellen, gefolgt von Methylprednisolon und Cyclophosphamid. Azathioprin beeinflusst nur Hsp90 in einem signifikanten Ausmaß.

	Calreticulin		Calnexin		Hsp 90		Hsp70	
	I73T	A116D	I73T	A116D	I73T	A116D	I73T	A116D
Cyclophosphamid	+13% *	+21% *	+16%	-1%	+30% *	+45% *	+41% *	+45% *
Azathioprin	+8%	+12%	-13%	-31%	+36% *	+48% *	+7%	+7%
Hydroxychloroquin	+75% *	+61% *	+6%	-18%	+81% *	+78% *	+18%	+3%
Methylprednisolon	+26% *	+42% *	-9%	-2%	+55% *	+63% *	+8%	+5%

Tabelle 12: Hitzeschockproteinexpression in MLE-12-Zellen, die mutiertes SP-C exprimieren

Die Daten stellen prozentuale Änderungen der Proteinmenge bei mutiertes SP-C exprimierenden Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen dar als Antwort auf die Behandlung mit Arzneimitteln, die zur Zeit bei an ILD erkrankten Patienten verwendet werden. Veränderungen, die mit "*" gekennzeichnet sind, sind signifikant unterschiedlich zu den Kontrollbedingungen.

4.6.2 Expression der Hitzeschockproteine bei Wildtyp proSP-C, P30L-, L110R-, P115L- und L188Q-mutiertem proSP-C

Ein einmaliger Screeningversuch mit den Mutationen P30L, L110R, P115L und L188Q wurde mit MLE-12-Zellen durchgeführt, die stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C transfiziert wurden (Abbildung 44).

Die Expression von Calnexin wurde durch die Behandlung der Zellen mit Hydroxychloroquin nur bei P115L-mutierten Zellen leicht gesteigert, wohingegen bei L188Q-mutierten Zellen der gegenteilige Effekt erzielt wurde. Bei der Behandlung der Zellen mit Methylprednisolon konnte die Expression von Calnexin erniedrigt werden im Vergleich zu Wildtyp-Zellen. Dies traf nicht für L110R-mutierte Zellen zu. Azathioprin bewirkte keinen Einfluss auf die Expressionsrate von Calnexin. Bei der Inkubation der Zellen mit Cyclophosphamid wurde die Expression von Calnexin bei P115L- und L188Q-mutierten Zellen erniedrigt.

Calreticulin wurde in mutierten Zellen unter der Behandlung von Hydroxychloroquin, Methylprednisolon und Azathioprin vermehrt exprimiert. Dieser Effekt trat bei P115L am stärksten auf. Nur bei Zellen, die mit Cyclophosphamid behandelt wurden, traten keine

Unterschiede in der Expression auf. In Wildtyp-Zellen wurde es weniger stark exprimiert im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Die Expression von Hsp70 wurde durch die Behandlung der Zellen mit den Pharmaka erniedrigt. Dieser Effekt war bei L110R am ausgeprägtesten. Am wenigsten Einfluss nahm Cyclophosphamid.

Die Expression von Hsp90 wurde durch alle pharmakologischen Substanzen, bis auf Azathioprin, verändert. Es ergab sich eine Steigerung der Expression bei den mutierten Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen.

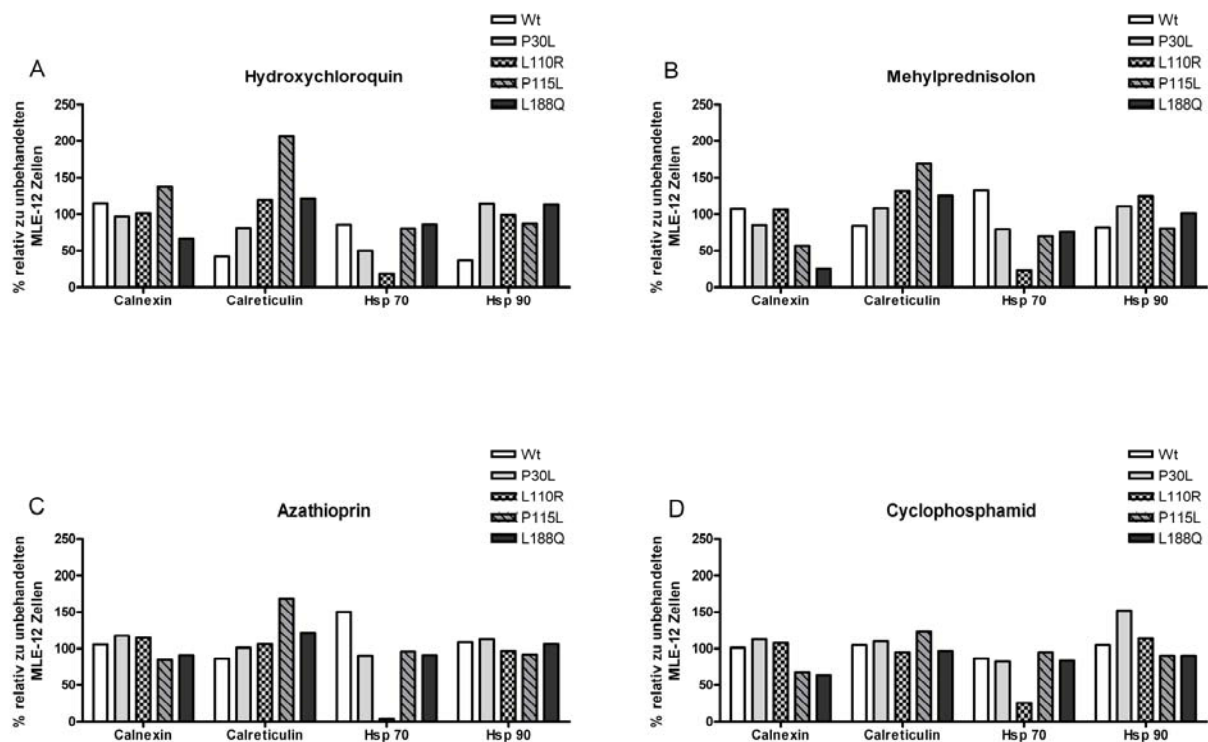


Abbildung 44: Übersicht über die Expression der Hitzeschockproteine; Wt, P30L, L110R, P115L und L188Q. Die Menge an prozessierten Hitzeschockproteinen sind dargestellt als prozentuale Änderungen der Proteinmenge bei mutiertes SP-C exprimierenden Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen als Antwort auf die Behandlung mit Arzneimitteln, die zur Zeit bei an ILD erkrankten Patienten verwendet werden. Es handelt sich um MLE-12-Zellen, die stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt, P30L, L110R, P115L oder L188Q} transfiziert wurden.

4.7 Zelluläre Lipidzusammensetzung

Die Verpackung und Sekretion der Lungensurfactantlipide in alveolaren Typ-II-Zellen ist eng gekoppelt an die Expression der Surfactantproteine in alveolaren Typ-II-Zellen. Um den Einfluss von mutiertem proSP-C auf die Lipidhomöostase zu charakterisieren, wurde die Lipidzusammensetzung stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C transfizierter MLE-12-Zellen untersucht. Dabei wurde auch das korrektive Potential von Methylprednisolon und Hydroxychloroquin auf die Lipidzusammensetzung evaluiert.

Die zellulären Lipide der Zellen wurden mittels Massenspektrometrie quantifiziert. Die Zellen wurden unbehandelt, mit 10µM Methylprednisolon oder mit 10µM Hydroxychloroquin für 24 Stunden inkubiert und anschließend lysiert. Der zugehörige serumfreie Überstand wurde ebenfalls untersucht. Ziel war es, die Lipidzusammensetzung der Zellen und des Kulturüberstandes festzustellen.

Alle untersuchten Lipide werden als Gesamtphospholipide zusammengefasst. Diese untergliedern sich in die einzelnen Lipidklassen (Phosphatidylcholin, Lysophosphatidylcholin, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin, Sphingomyelin, Ceramid und Glucosylceramid). Jede einzelne Lipidklasse wiederum setzt sich aus verschiedenen Fettsäuren zusammen.

Phosphatidylinositol konnte auf Grund technischer Probleme nicht gemessen werden. Wegen eines Gerätedefektes unserer Kooperationsgruppe konnte die Messung von Cholesterol und freiem Cholesterin nicht durchgeführt werden. Da sich aber im Vorversuch (siehe Anhang) bei diesen Kategorien keine Änderungen zeigten, wurde wegen der zu erwartenden längeren Reparaturphase auf die Untersuchung verzichtet. Daher beziehen sich die folgenden Werte nicht auf die Gesamtlipide, sondern auf die Gesamtphospholipide.

Die massenspektrometrischen Messdaten und Vorauswertungen sind im Anhang 7.1.2 „Zelluläre Lipidzusammensetzung“ einzusehen.

4.7.1 Analyse der Lipidzusammensetzung des Zelllysates

Einen Überblick über die durchgeführten Messungen gibt nachfolgende Tabelle wieder.

	Wt (mean ± SD)	A116D (mean ± SD)	I73T (mean ± SD)	P A116D (Anova)	P I73T (Anova)
Total phospholipids (nmol/mg protein)	152,80± 9,6	126,50±10,6	153,10±10,0	< 0,05	> 0,05
Phosphatidylcholin (% of total PL)	57,80 ± 1,0	52,80 ± 0,2	53,70 ± 0,8	< 0,001	< 0,001
PC 32:1 (% of PC)	22,92 ± 2,4	25,06 ± 0,5	22,21 ± 2,4	> 0,05	> 0,05
PC 34:1 (% of PC)	14,65 ± 0,3	13,12 ± 0,2	14,54 ± 0,6	< 0,001	> 0,05
PC 34:2 (% of PC)	7,30 ± 0,1	8,37 ± 0,1	7,82 ± 0,5	< 0,001	> 0,05
PC 30:0 (% of PC)	5,69 ± 0,2	6,49 ± 0,0	7,16 ± 0,1	> 0,05	< 0,001
PC 36:2 (% of PC)	5,19 ± 0,2	6,10 ± 0,1	6,01 ± 0,1	< 0,001	< 0,01
PC 32:0 (% of PC)	5,18 ± 0,8	3,71 ± 0,0	4,61 ± 0,6	< 0,05	> 0,05
PC 32:2 (% of PC)	3,30 ± 0,2	4,43 ± 0,1	3,81 ± 0,6	< 0,001	> 0,05
PC 30:1 (% of PC)	2,65 ± 0,4	4,65 ± 0,0	3,54 ± 0,7	< 0,001	> 0,05
PC 36:1 (% of PC)	1,51 ± 0,0	1,15 ± 0,0	1,04 ± 0,1	< 0,001	< 0,001
Lyso-Phosphatidylcholin (% of total PL)	0,60 ± 0,1	0,90 ± 0,2	1,00 ± 0,8	< 0,001	< 0,001
LPC 16:0 (% of LPC)	53,40 ± 2,2	49,80 ± 0,9	51,37 ± 1,0	< 0,05	> 0,05
LPC 18:1 (% of LPC)	17,73 ± 0,5	19,57 ± 1,1	20,03 ± 0,6	< 0,05	< 0,001
LPC 16:1 (% of LPC)	10,50 ± 0,8	12,70 ± 0,4	12,73 ± 2,0	< 0,01	> 0,05
LPC 18:0 (% of LPC)	8,53 ± 1,0	8,57 ± 0,2	6,67 ± 1,3	> 0,05	> 0,05
LPC 15:0 (% of LPC)	3,83 ± 0,4	2,73 ± 0,3	2,93 ± 0,1	< 0,05	> 0,05

	Wt (mean ± SD)	A116D (mean ± SD)	I73T (mean ± SD)	P A116D (Anova)	P I73T (Anova)
Phosphatidylglycerol (% of total PL)	0,30 ± 0,0	0,30 ± 0,0	0,20 ± 0,1	> 0,05	> 0,05
PG 34:1 (% of PG)	71,47 ± 0,7	66,90 ± 1,3	64,22 ± 0,8	< 0,01	< 0,001
PG 34:2 (% of PG)	6,50 ± 0,9	6,70 ± 0,1	9,49 ± 0,3	> 0,05	< 0,001
PG 36:2 (% of PG)	5,87 ± 0,7	7,88 ± 0,7	9,89 ± 0,5	< 0,01	< 0,001
PG 32:1 (% of PG)	5,57 ± 0,5	6,17 ± 0,2	4,96 ± 0,6	> 0,05	> 0,05
PG 36:1 (% of PG)	5,27 ± 0,5	5,05 ± 0,1	5,14 ± 0,1	> 0,05	> 0,05
PG 32:2 (% of PG)	1,36 ± 0,0	1,65 ± 0,3	1,56 ± 0,2	> 0,05	> 0,05
PG 30:0 (% of PG)	1,56 ± 0,3	2,13 ± 0,3	1,54 ± 0,1	> 0,05	> 0,05
PG 36:3 (% of PG)	0,97 ± 0,2	1,22 ± 0,1	1,57 ± 0,4	> 0,05	> 0,05
PG 32:0 (% of PG)	1,26 ± 0,2	1,28 ± 0,2	0,87 ± 0,1	> 0,05	> 0,05
Sphingomyelin (% of total PL)	6,20 ± 0,3	6,90 ± 0,3	5,50 ± 0,2	< 0,05	< 0,05
SPM 16:0 (% of SPM)	56,32 ± 1,1	49,45 ± 0,2	44,11 ± 0,2	< 0,001	< 0,001
SPM 24:1 (% of SPM)	14,43 ± 0,6	17,50 ± 0,2	19,06 ± 0,3	< 0,001	< 0,001
SPM 16:1 (% of SPM)	7,47 ± 0,3	7,38 ± 0,0	7,10 ± 0,2	> 0,05	> 0,05
SPM 24:0 (% of SPM)	6,20 ± 0,1	5,68 ± 0,0	4,81 ± 0,3	> 0,05	< 0,001
SPM 24:2 (% of SPM)	3,16 ± 0,3	5,11 ± 0,1	6,02 ± 0,3	< 0,001	< 0,001
SPM 22:1 (% of SPM)	2,02 ± 0,1	4,17 ± 0,1	6,10 ± 0,3	< 0,001	< 0,001
SPM 22:0 (% of SPM)	1,98 ± 0,3	2,58 ± 0,2	3,10 ± 0,2	< 0,05	< 0,01
Ceramid and Glucosyl-Ceramid (% of total PL)	1,80 ± 0,1 0,10 ± 0,0	1,60 ± 0,1 0,20 ± 0,0	1,80 ± 0,1 0,10 ± 0,0	< 0,05 < 0,001	> 0,05 > 0,05
Cer 16:0 (% of Cer)	58,73 ± 0,4	52,57 ± 0,5	49,43 ± 0,5	< 0,001	< 0,001
Cer 24:1 (% of Cer)	21,53 ± 0,8	26,27 ± 0,3	30,23 ± 0,4	< 0,001	< 0,001
Cer 24:0 (% of Cer)	13,67 ± 0,4	13,53 ± 0,6	11,20 ± 0,2	> 0,05	< 0,001
Cer 22:0 (% of Cer)	4,27 ± 0,2	5,50 ± 0,2	6,67 ± 0,1	< 0,001	< 0,001
Glu Cer 16:0 (% of GluCer)	3,20 ± 0,3	6,30 ± 0,3	3,03 ± 0,4	< 0,001	> 0,05
Glu Cer 24:1 (% of GluCer)	1,77 ± 0,1	3,87 ± 0,1	3,00 ± 0,1	< 0,001	< 0,01

	Wt (mean ± SD)	A116D (mean ± SD)	I73T (mean ± SD)	P A116D (Anova)	P I73T (Anova)
Phosphatidylethanolamin (% of total PL)	11,20 ± 0,5	14,50 ± 0,1	14,70 ± 0,8	< 0,001	< 0,001
PE 34:1 (% of PE)	25,91 ± 0,2	22,83 ± 0,1	24,02 ± 0,7	< 0,001	< 0,05
PE 34:2 (% of PE)	24,49 ± 0,2	25,71 ± 0,2	25,24 ± 1,0	< 0,001	> 0,05
PE 32:1 (% of PE)	17,38 ± 1,3	16,32 ± 0,3	13,68 ± 1,7	> 0,05	< 0,05
PE 36:2 (% of PE)	11,31 ± 0,5	12,94 ± 0,3	14,12 ± 0,7	< 0,01	< 0,01
PE 32:2 (% of PE)	6,83 ± 0,2	6,42 ± 0,2	6,07 ± 0,7	> 0,05	> 0,05
PE 36:1 (% of PE)	4,42 ± 0,2	3,84 ± 0,1	3,90 ± 0,4	< 0,001	> 0,05
PE 34:3 (% of PE)	1,37 ± 0,1	1,69 ± 0,0	1,81 ± 0,1	< 0,05	< 0,001
PE 32:0 (% of PE)	0,63 ± 0,1	0,41 ± 0,0	0,51 ± 0,1	< 0,01	> 0,05
Phosphatidylserin (% of total PL)	6,50 ± 0,1	7,70 ± 0,1	6,60 ± 0,3	< 0,05	> 0,05
PS 36:1 (% of PS)	26,97 ± 0,3	25,65 ± 0,4	24,05 ± 0,9	< 0,01	< 0,05
PS 34:1 (% of PS)	22,61 ± 1,3	18,72 ± 0,4	18,40 ± 1,0	< 0,01	< 0,01
PS 36:2 (% of PS)	15,51 ± 0,3	17,33 ± 0,4	18,62 ± 0,1	< 0,001	< 0,001
PS 32:1 (% of PS)	6,07 ± 0,2	5,21 ± 0,3	5,79 ± 0,5	< 0,01	> 0,05
PS 34:2 (% of PS)	5,42 ± 0,5	5,54 ± 0,1	5,19 ± 0,8	> 0,05	> 0,05
PS 40:6 (% of PS)	4,40 ± 0,3	4,05 ± 0,1	3,15 ± 0,1	> 0,05	< 0,001
PS 38:2 (% of PS)	4,09 ± 0,3	5,67 ± 0,2	6,52 ± 0,1	< 0,001	< 0,001
PS 40:5 (% of PS)	2,99 ± 0,1	3,20 ± 0,1	2,76 ± 0,2	> 0,05	> 0,05
PS 40:7 (% of PS)	2,33 ± 0,3	2,20 ± 0,1	2,41 ± 0,0	> 0,05	> 0,05
PS 38:3 (% of PS)	2,46 ± 0,2	4,14 ± 0,1	3,65 ± 0,4	< 0,001	< 0,001

Tabelle 13: Lipidverteilung bei unbehandelten MLE-12-Zellen, die stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt, I73T und A116D} transfiziert wurden, Zelllysate. Die erste Zeile zeigt die Messung der Gesamtphospholipide (gesamt) in nmol lipid /mg Protein. Darunter jeweils grau unterlegt sind die Lipidklassen, die als prozentualer Anteil der Gesamtphospholipide ausgedrückt sind. Unterhalb der grau unterlegten Zeilen, befinden sich die Fettsäuren der jeweiligen Lipidklassen, die als prozentualer Anteil der Lipidklassen festgehalten sind. Die erste Spalte dient zur Namensbezeichnung der Lipide, die zweite Spalte beschreibt die Lipidverteilung bei Wildtyp exprimierenden Zellen, die dritte Spalte bei A116D-mutierten Zellen, die vierte zeigt die Lipidverteilung bei I73T-mutierten Zellen auf. Die fünfte und sechste Spalte zeigen die P-Werte der Signifikanzberechnung zwischen Wildtyp und der Mutation exprimierenden Zellen. Es wurden die Mittelwerte aus drei Messungen mit ihrer jeweiligen Standardabweichung berechnet. Signifikanzen wurden mittels Anova berechnet. Bei einem P<0,05 wurden die Unterschiede als signifikant gewertet.

4.7.1.1 Darstellung der Unterschiede innerhalb der einzelnen Lipidklassen des Zelllysates

Die Gesamtlipidmenge blieb bei I73T-transfizierten im Vergleich zu Wildtyp transfizierten MLE-12-Zellen unverändert. Bei A116D-transfizierten MLE-12-Zellen hingegen sank die Gesamtlipidmenge um 17% (Abbildung 46 A).

Die Phospholipidzusammensetzung war bei beiden Mutationen signifikant unterschiedlich. Phosphatidylcholin war bei I73T- um 9% (Abbildung 45 A) und bei A116D-mutierten Zellen um 7% (Abbildung 46 B) erniedrigt. Lysophosphatidylcholin hingegen war bei I73T- um 67% (Abbildung 45 B) und bei A116D-mutierten Zellen um 50% (Abbildung 46 C) erhöht. Ebenso war Phosphatidylethanolamin bei I73T- um 31% (Abbildung 45 C) und bei A116D-mutierten Zellen um 29% (Abbildung 46 D) gestiegen.

Bei Sphingomyelin bewirkte die Mutation I73T eine Senkung um 11% (Abbildung 45 D) im Vergleich zum Wildtyp, wohingegen die Mutation A116D eine Steigerung um 11% (Abbildung 46 E) hervorrief.

Ceramid war nur bei A116D-transfizierten Zellen um 11% (Abbildung 46 F) vermindert, wobei im gleichen Zuge Glucosylceramid um 100% bei A116D-transfizierten Zellen anstieg (Abbildung 46 G).

Phosphatidylserin war bei A116D-transfizierten Zellen um 18% (Abbildung 46 H) erhöht.

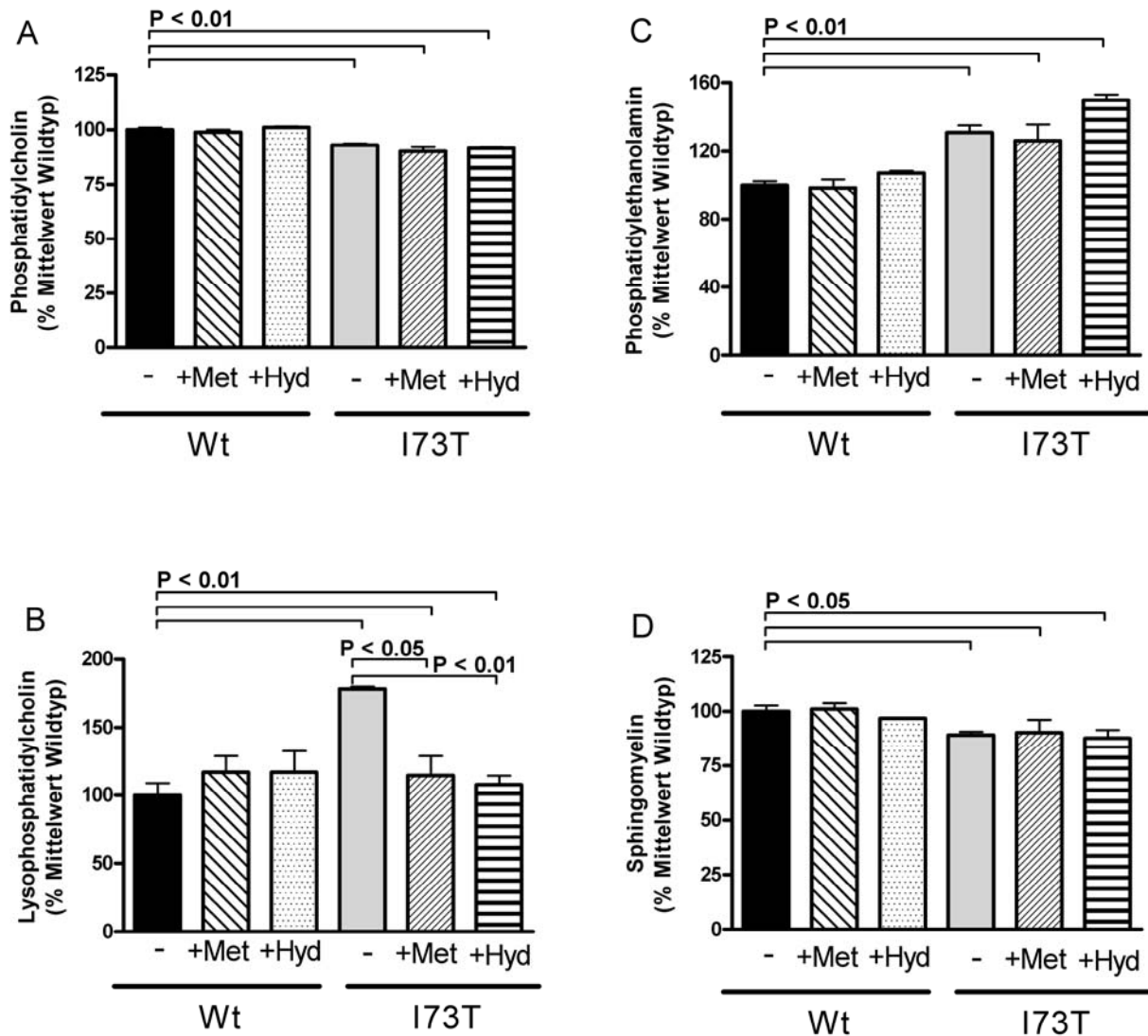


Abbildung 45: Lipidverteilung bei Wt und I73T, Zellysat. Der Gehalt an Phospholipid wurde als % des Mittelwertes von unbehandelten Wildtyp-Werten angegeben. Die Grafiken zeigen die relative Menge von Phosphatidylcholin (A), Lysophosphatidylcholin (B), Phosphatidylethanolamin (C) und Sphingomyelin (D). n=3. -: unbehandelt, +Met: mit 10µM Methylprednisolon für 24 Std. inkubiert, +Hyd: mit 10µM Hydroxychloroquin für 24 Std. inkubiert. Die Klammern über den Säulen geben an, welche Werte zueinander signifikant unterschiedlich sind.

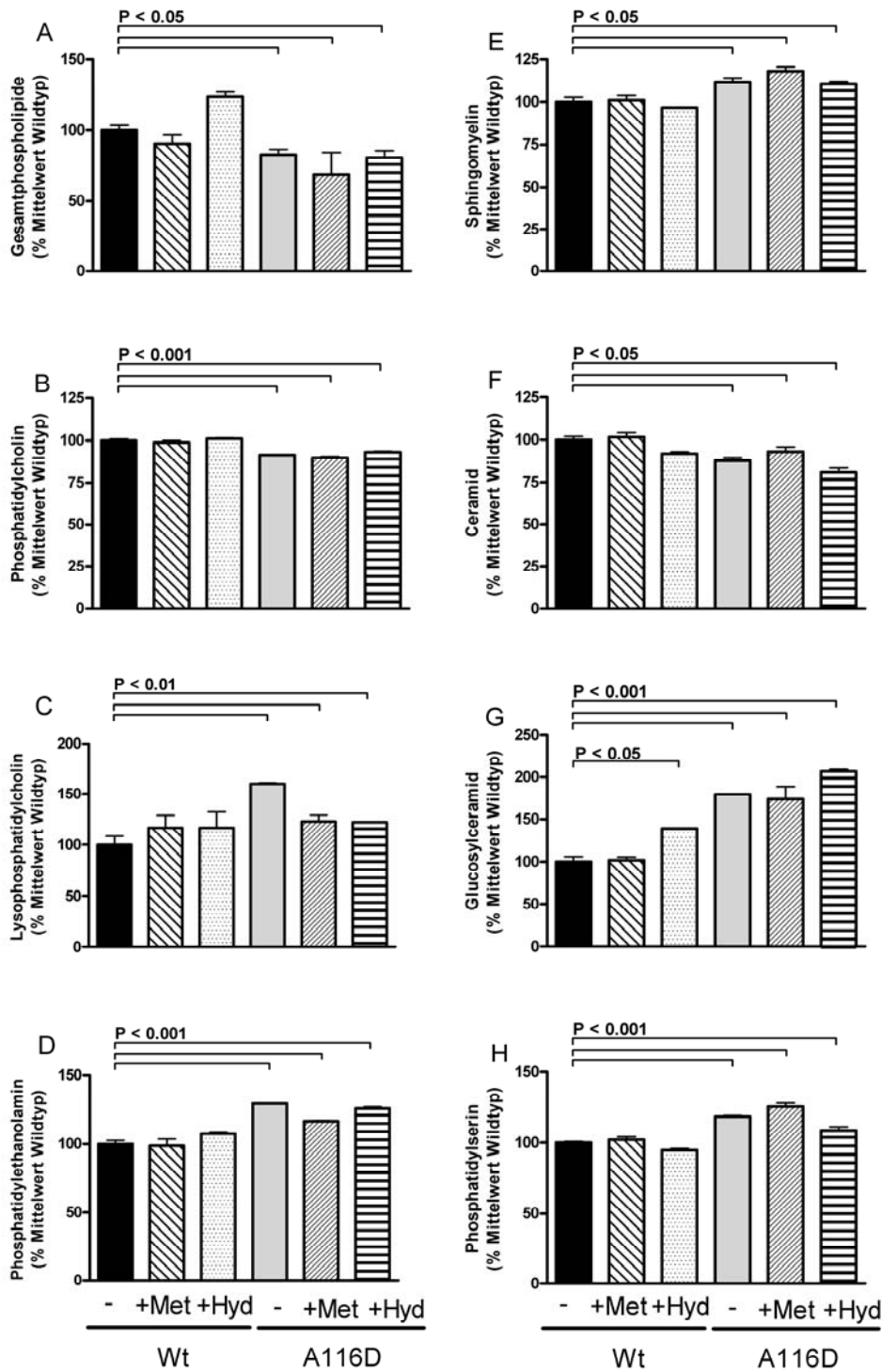


Abbildung 46: Lipidverteilung bei Wt und A116D, Zelllysate. Der Gehalt an Phospholipid wurde als % des Mittelwertes von unbehandelten Wildtyp-Werten angegeben. Die Grafiken zeigen die relative Menge von Gesamtphospholipide (A), Phosphatidylcholin (B), Lysophosphatidylcholin (C), Phosphatidylethanolamin (D), Sphingomyelin (E), Ceramid (F), Glucosylceramid (G) und Phosphatidylserin (H). n=3. -: unbehandelt, +Met: mit 10µM Methylprednisolon für 24 Std. inkubiert, +Hyd: mit 10µM Hydroxychloroquin für 24 Std. inkubiert. Die Klammern über den Säulen geben an, welche Werte zueinander signifikant unterschiedlich sind.

4.7.1.2 Betrachtung der Auffälligkeiten der einzelnen Fettsäuren der jeweiligen Lipidklassen des Zelllysates

Es konnten einige signifikante Änderungen auf der Ebene der Fettsäuren der verschiedenen Phospholipidklassen festgestellt werden. Allerdings können im Rahmen dieser Arbeit nur Tendenzen festgehalten werden, da eine Absicherung dieser Tendenzen einer größeren Stichprobenzahl bedarf. Die angegebene statistische Auswertung ist daher nur orientierend zu sehen.

Umfangreicher ausgewertet wurden Phosphatidylcholin und Lysophosphatidylcholin. Bei diesen Lipidklassen wurde nicht nur die prozentuale Veränderung der Fettsäuren betrachtet, sondern auch die tatsächlichen Mengenabsolutwerte in nmol lipid/mg Protein. Normalerweise sollten sich prozentuale Änderungen in den Absolutwerten widerspiegeln. So sollte einem prozentualen Anstieg einer Fettsäure bei mutierten Zellen im Vergleich zum Wildtyp auch absolut dieser Anstieg folgen.

Bei näherer Untersuchung der Fettsäurespezies von Phosphatidylcholin ist nicht DPPC die vorherrschende Fettsäurespezies, sondern eine ungesättigte Variante 32:1. Die Spezies 32:1 ist bei I73T- und A116D-mutiertem proSP-C noch mehr erhöht als bei Wildtyp proSP-C.

Bei Phosphatidylcholin fielen noch einige weitere Fettsäuren auf. Bei A116D-mutierten Zellen waren die Fettsäuren 32:1, 34:2, 30:0 und 36:2 prozentual höher gewichtet als beim Wildtyp. Die tatsächlichen absoluten Mengen sanken aber ab. Bei der Fettsäure 34:2 verhielt es sich bei I73T-mutierten Zellen genauso (siehe Tabelle 14).

Bei Lysophosphatidylcholin hingegen sanken sowohl bei A116D-mutierten wie auch bei I73T-mutierten Zellen die prozentualen Werte von der Fettsäure 16:0 im Vergleich zu Wildtyp ab, stiegen aber bei den absoluten Mengen real an (siehe Tabelle 14).

		Wt	A116D	I73T	Wt	A116D	I73T	
Total PL	nmol lipid/mg Protein	152,80	126,50	153,10	152,80	126,50	153,10	nmol lipid /mg Protein
PC	% of total PL	57,80	52,80	53,70	88,32	66,79	82,21	nmol lipid /mg Protein
LPC	% of total PL	0,60	0,90	1,00	0,92	1,14	1,53	nmol lipid /mg Protein

		Wt	A116D	I73T	Wt	A116D	I73T	
PC	%	100	100	100	88,3184	66,792	82,2147	nmol lipid /mg Protein
PC 32:1	% of PC	22,92	25,06	22,21	20,24	16,74	18,26	nmol lipid /mg Protein
PC 34:1	% of PC	14,65	13,12	14,54	12,94	8,76	11,95	nmol lipid /mg Protein
PC 34:2	% of PC	7,30	8,37	7,82	6,45	5,59	6,43	nmol lipid /mg Protein
PC 30:0	% of PC	5,69	6,49	7,16	5,03	4,33	5,89	nmol lipid /mg Protein
PC 36:2	% of PC	5,19	6,10	6,01	4,58	4,07	4,94	nmol lipid /mg Protein
PC 32:0	% of PC	5,18	3,71	4,61	4,57	2,48	3,79	nmol lipid /mg Protein
PC 32:2	% of PC	3,30	4,43	3,81	2,91	2,96	3,13	nmol lipid /mg Protein
PC 30:1	% of PC	2,65	4,65	3,54	2,34	3,11	2,91	nmol lipid /mg Protein
PC 36:1	% of PC	1,51	1,15	1,04	1,33	0,77	0,86	nmol lipid /mg Protein

		Wt	A116D	I73T	Wt	A116D	I73T	
LPC	%	100	100	100	0,9168	1,1385	1,531	nmol lipid /mg Protein
LPC 16:0	% of LPC	53,40	49,80	51,37	0,49	0,57	0,79	nmol lipid /mg Protein
LPC 18:1	% of LPC	17,73	19,57	20,03	0,16	0,22	0,31	nmol lipid /mg Protein
LPC 16:1	% of LPC	10,50	12,70	12,73	0,10	0,14	0,19	nmol lipid /mg Protein
LPC 18:0	% of LPC	8,53	8,57	6,67	0,08	0,10	0,10	nmol lipid /mg Protein
LPC 15:0	% of LPC	3,83	2,73	2,93	0,04	0,03	0,04	nmol lipid /mg Protein

Tabelle 14: Fettsäureübersicht von PC und LPC, Zelllysate. Die Tabelle ist in zwei Hälften aufgeteilt. Auf der linken Seite sind relative Werte in Form prozentualer Anteile angegeben und auf der rechten Seite befinden sich die Absolutwerte in nmol lipid/mg Protein. Die Spalten zeigen die Vergleichswerte zwischen Wildtyp exprimierenden und Mutation A116D oder I73T exprimierenden Zellen an. Türkis unterlegte Kompartimente verdeutlichen, dass prozentual Mutation exprimierende Zellen höhere Fettsäureanteile haben als Wildtyp exprimierende, dass allerdings absolut gesehen die Werte abfallen. Bei rosa hinterlegten Kompartimenten ist es genau umgekehrt. Die angegebenen Werte sind die Mittelwerte aus drei Messungen.

4.7.2 Analyse der Lipidzusammensetzung des Kulturüberstandes

Von den Zellen sekretierte Phospholipide werden in den Kulturüberstand sezerniert. Um einen Überblick über die durchgeführten Messungen zu bekommen, ist nachfolgende Tabelle aufgeführt.

	Wt (mean ± SD)	A116D (mean ± SD)	I73T (mean ± SD)	P A116D (Anova)	P I73T (Anova)
Total phospholipids (nmol/mg protein)	20,57 ± 3,8	12,90 ± 6,2	19,35 ± 6,2	> 0,05	> 0,05
Phosphatidylcholin (% of total PL)	44,70 ± 0,1	38,73 ± 0,6	35,10 ± 0,0	< 0,001	< 0,001
PC 32:1 (% of PC)	14,21 ± 1,5	14,21 ± 0,5	14,32 ± 0,9	> 0,05	> 0,05
PC 34:1 (% of PC)	14,85 ± 0,2	15,74 ± 0,7	16,48 ± 1,1	< 0,01	> 0,05
PC 36:2 (% of PC)	4,93 ± 0,3	5,74 ± 0,5	5,36 ± 0,3	< 0,001	< 0,05
PC 34:2 (% of PC)	4,90 ± 0,1	5,17 ± 0,3	5,05 ± 0,4	> 0,05	> 0,05
PC 36:1 (% of PC)	3,50 ± 0,2	5,27 ± 1,2	3,85 ± 0,6	< 0,001	> 0,05
PC 32:0 (% of PC)	3,46 ± 0,3	3,78 ± 0,3	3,54 ± 0,2	> 0,05	< 0,001
PC 30:0 (% of PC)	3,12 ± 0,2	3,19 ± 0,5	3,86 ± 0,5	< 0,001	< 0,001
PC 32:2 (% of PC)	1,58 ± 0,2	1,78 ± 0,2	1,67 ± 0,2	< 0,01	> 0,05
PC 30:1 (% of PC)	1,43 ± 0,2	1,75 ± 0,2	1,58 ± 0,1	> 0,05	> 0,05
Lyso-Phosphatidylcholin (% of total PL)	5,90 ± 0,4	16,78 ± 1,3	10,36 ± 2,5	< 0,01	< 0,05
LPC 16:0 (% of LPC)	56,81 ± 2,0	57,17 ± 0,4	58,28 ± 2,3	> 0,05	> 0,05
LPC 16:1 (% of LPC)	15,69 ± 1,7	16,48 ± 0,6	15,43 ± 2,0	> 0,05	> 0,05
LPC 18:1 (% of LPC)	11,06 ± 0,4	10,61 ± 0,4	11,32 ± 0,2	> 0,05	> 0,05
LPC 18:0 (% of LPC)	8,85 ± 0,4	9,07 ± 0,4	8,65 ± 0,4	> 0,05	> 0,05
LPC 15:0 (% of LPC)	2,44 ± 0,1	1,71 ± 0,5	1,79 ± 0,5	< 0,05	< 0,001

	Wt (mean ± SD)	A116D (mean ± SD)	I73T (mean ± SD)	P A116D (Anova)	P I73T (Anova)
Phosphatidylglycerol (% of total PL)	0,20 ± 0,1	0,10 ± 0,0	0,20 ± 0,0	< 0,01	> 0,05
PG 34:1 (% of PG)	48,71 ± 5,8	75,19 ± 3,8	49,98 ± 3,6	< 0,01	> 0,05
PG 36:2 (% of PG)	15,74 ± 2,8	0,00 ± 0,0	13,61 ± 1,4	< 0,05	> 0,05
PG 34:2 (% of PG)	13,19 ± 0,9	24,81 ± 3,8	18,21 ± 2,3	> 0,05	> 0,05
PG 36:1 (% of PG)	9,20 ± 1,6	0,00 ± 0,0	2,26 ± 3,9	> 0,05	> 0,05
PG 32:0 (% of PG)	9,25 ± 1,1	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	< 0,001	< 0,001
PG 30:0 (% of PG)	2,12 ± 3,7	0,00 ± 0,0	8,78 ± 2,8	> 0,05	> 0,05
PG 32:1 (% of PG)	1,79 ± 3,1	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	> 0,05	> 0,05
PG 32:2 (% of PG)	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	5,02 ± 4,6	-	-
PG 36:3 (% of PG)	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	2,10 ± 3,7	-	-
Sphingomyelin (% of total PL)	8,00 ± 0,2	11,17 ± 0,2	8,00 ± 0,8	< 0,01	> 0,05
SPM 16:0 (% of SPM)	44,83 ± 1,4	36,91 ± 0,4	35,05 ± 1,1	< 0,001	< 0,001
SPM 24:1 (% of SPM)	17,53 ± 1,0	20,35 ± 0,5	20,12 ± 0,3	< 0,01	< 0,05
SPM 24:0 (% of SPM)	7,87 ± 0,2	7,03 ± 0,3	5,70 ± 0,2	< 0,05	< 0,001
SPM 16:1 (% of SPM)	7,62 ± 0,3	7,59 ± 0,2	7,09 ± 0,3	> 0,05	> 0,05
SPM 24:2 (% of SPM)	4,75 ± 0,4	7,26 ± 0,3	7,22 ± 0,6	< 0,001	< 0,001
SPM 22:0 (% of SPM)	3,70 ± 0,2	4,69 ± 0,4	5,82 ± 0,3	> 0,05	< 0,001
SPM 22:1 (% of SPM)	3,24 ± 0,2	4,67 ± 0,2	6,08 ± 0,2	< 0,001	< 0,001
Ceramid and Glucosyl-Ceramid (% of total PL)	3,30 ± 0,3 0,10 ± 0,0	2,10 ± 0,2 0,10 ± 0,0	3,00 ± 0,3 0,10 ± 0,0	< 0,01 > 0,05	> 0,05 > 0,05
Cer 16:0 (% of Cer)	51,20 ± 4,5	45,50 ± 1,7	44,30 ± 0,8	< 0,05	< 0,05
Cer 14:1 (% of Cer)	19,90 ± 1,0	24,47 ± 0,9	28,70 ± 0,8	< 0,001	< 0,001
Cer 24:0 (% of Cer)	17,87 ± 2,0	16,83 ± 0,5	13,37 ± 0,3	> 0,05	< 0,001
Cer 22:0 (% of Cer)	6,40 ± 0,2	7,60 ± 0,3	9,03 ± 0,7	< 0,05	< 0,001
Glu Cer 16:0 (% of GluCer)	1,70 ± 0,4	2,60 ± 0,1	1,40 ± 0,3	< 0,01	> 0,05
Glu Cer 24:1 (% of GluCer)	0,93 ± 0,1	1,83 ± 0,3	1,03 ± 0,1	< 0,01	> 0,05

	Wt (mean ± SD)	A116D (mean ± SD)	I73T (mean ± SD)	P A116D (Anova)	P I73T (Anova)
Phosphatidylethanolamin (% of total PL)	6,50 ± 0,2	6,50 ± 0,1	7,80 ± 0,9	> 0,05	> 0,05
PE 34:1 (% of PE)	26,05 ± 0,7	21,77 ± 0,9	24,61 ± 1,3	< 0,01	> 0,05
PE 34:2 (% of PE)	20,40 ± 0,4	20,97 ± 0,1	21,56 ± 1,1	> 0,05	> 0,05
PE 32:1 (% of PE)	13,74 ± 1,2	11,92 ± 1,3	11,31 ± 0,6	> 0,05	< 0,05
PE 36:2 (% of PE)	12,58 ± 0,0	13,93 ± 0,3	15,42 ± 0,1	< 0,05	< 0,001
PE 36:1 (% of PE)	5,65 ± 0,6	4,44 ± 0,4	4,90 ± 0,5	< 0,05	> 0,05
PE 32:2 (% of PE)	4,93 ± 0,3	4,14 ± 0,4	3,83 ± 0,1	> 0,05	< 0,05
PE 34:3 (% of PE)	1,59 ± 0,1	1,94 ± 0,2	1,54 ± 0,1	> 0,05	> 0,05
PE 32:0 (% of PE)	0,79 ± 0,3	0,63 ± 0,3	0,68 ± 0,2	> 0,05	> 0,05
Phosphatidylserin (% of total PL)	11,70 ± 0,8	8,60 ± 0,1	8,00 ± 0,9	< 0,01	< 0,01
PS 36:1 (% of PS)	25,89 ± 0,7	25,78 ± 0,4	27,23 ± 0,8	> 0,05	> 0,05
PS 34:1 (% of PS)	18,98 ± 0,9	12,04 ± 0,5	14,46 ± 0,5	< 0,001	< 0,001
PS 36:2 (% of PS)	14,81 ± 0,2	13,63 ± 0,4	14,01 ± 0,8	> 0,05	> 0,05
PS 40:6 (% of PS)	5,45 ± 0,3	5,10 ± 0,5	4,57 ± 0,3	> 0,05	> 0,05
PS 32:1 (% of PS)	5,30 ± 0,2	3,17 ± 0,3	3,94 ± 0,3	< 0,001	< 0,01
PS 40:7 (% of PS)	4,70 ± 0,2	9,36 ± 0,5	7,95 ± 1,7	< 0,001	< 0,05
PS 38:2 (% of PS)	3,82 ± 0,0	4,48 ± 0,1	5,13 ± 0,6	> 0,05	< 0,05
PS 34:2 (% of PS)	3,57 ± 0,3	3,00 ± 0,2	2,87 ± 0,4	< 0,05	< 0,05
PS 40:5 (% of PS)	3,24 ± 0,2	4,16 ± 0,4	3,17 ± 0,3	< 0,05	> 0,05
PS 38:3 (% of PS)	3,14 ± 0,0	5,64 ± 0,3	3,86 ± 0,2	< 0,001	< 0,05

Tabelle 15: Lipidverteilung bei unbehandelten MLE-12-Zellen, die stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt, I73T und A116D} transfiziert wurden, Kulturüberstand. Die erste Zeile zeigt die Messung der Gesamphospholipide (gesamt) in nmol lipid/mg Protein. Darunter jeweils grau unterlegt sind die Lipidklassen, die als prozentualer Anteil der Gesamphospholipide ausgedrückt sind. Unterhalb der grau unterlegten Zeilen, befinden sich die Fettsäuren der jeweiligen Lipidklassen, die als prozentualer Anteil der Lipidklassen festgehalten sind. Die erste Spalte dient zur Namensbezeichnung der Lipide, die zweite Spalte beschreibt die Lipidverteilung bei Wildtyp exprimierenden Zellen, die dritte Spalte bei A116D-mutierten Zellen, die vierte zeigt die Lipidverteilung bei I73T-mutierten Zellen auf. Die fünfte und sechste Spalte zeigen die P-Werte der Signifikanzberechnung zwischen Wildtyp und Mutation exprimierenden Zellen. Es wurden die Mittelwerte aus drei Messungen mit ihrer jeweiligen Standardabweichung berechnet. Signifikanzen wurden mittels Anova berechnet. Bei einem P<0,05 wurden die Unterschiede als signifikant gewertet.

4.7.2.1 Darstellung der Unterschiede innerhalb der einzelnen Lipidklassen des Kulturüberstandes

Die Gesamtpospholipidmenge blieb bei transfizierten MLE-12-Zellen unverändert. Die Phospholipidzusammensetzung war hingegen bei beiden Mutationen signifikant unterschiedlich.

Phosphatidylcholin war bei I73T- um 21% (Abbildung 47 A) und bei A116D-mutierten Zellen um 13% (Abbildung 48 A) erniedrigt. Ebenso war Phosphatidylserin bei I73T- um 32% (Abbildung 47 C) und bei A116D-mutierten Zellen um 26% (Abbildung 48 C) gesunken. Lysophosphatidylcholin hingegen war bei I73T- um 76% (Abbildung 47 B) und bei A116D-mutierten Zellen um 184% (Abbildung 48 B) erhöht.

Ceramid war nur bei A116D-transfizierten Zellen um 36% (Abbildung 48 D) vermindert, wohingegen bei Sphingomyelin die Mutation A116D eine Steigerung um 40% (Abbildung 48 E) bewirkte.

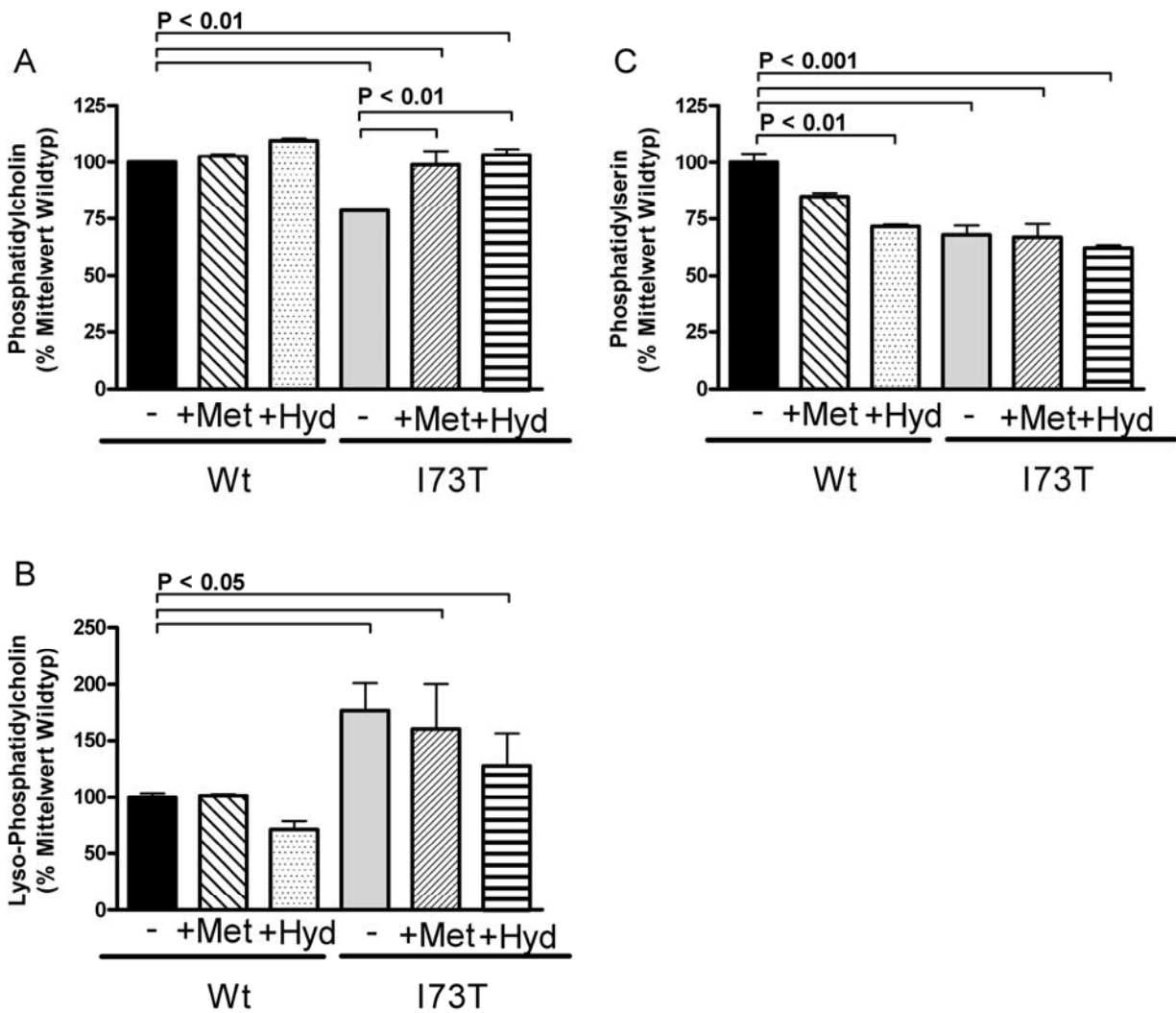


Abbildung 47: Lipidverteilung bei Wt und I73T, Kulturüberstand. Der Gehalt an Phospholipid wurde als % des Mittelwertes von unbehandelten Wildtyp Werten angegeben. Die Grafiken zeigen die relative Menge von Phosphatidylcholin (A), Lyso-Phosphatidylcholin (B) und Phosphatidylserin (C). n=3. -: unbehandelt, +Met: mit 10µM Methylprednisolon für 24 Std. inkubiert, +Hyd: mit 10µM Hydroxychloroquin für 24 Std. inkubiert. Die Klammern über den Säulen geben an, welche Werte zueinander signifikant unterschiedlich sind.

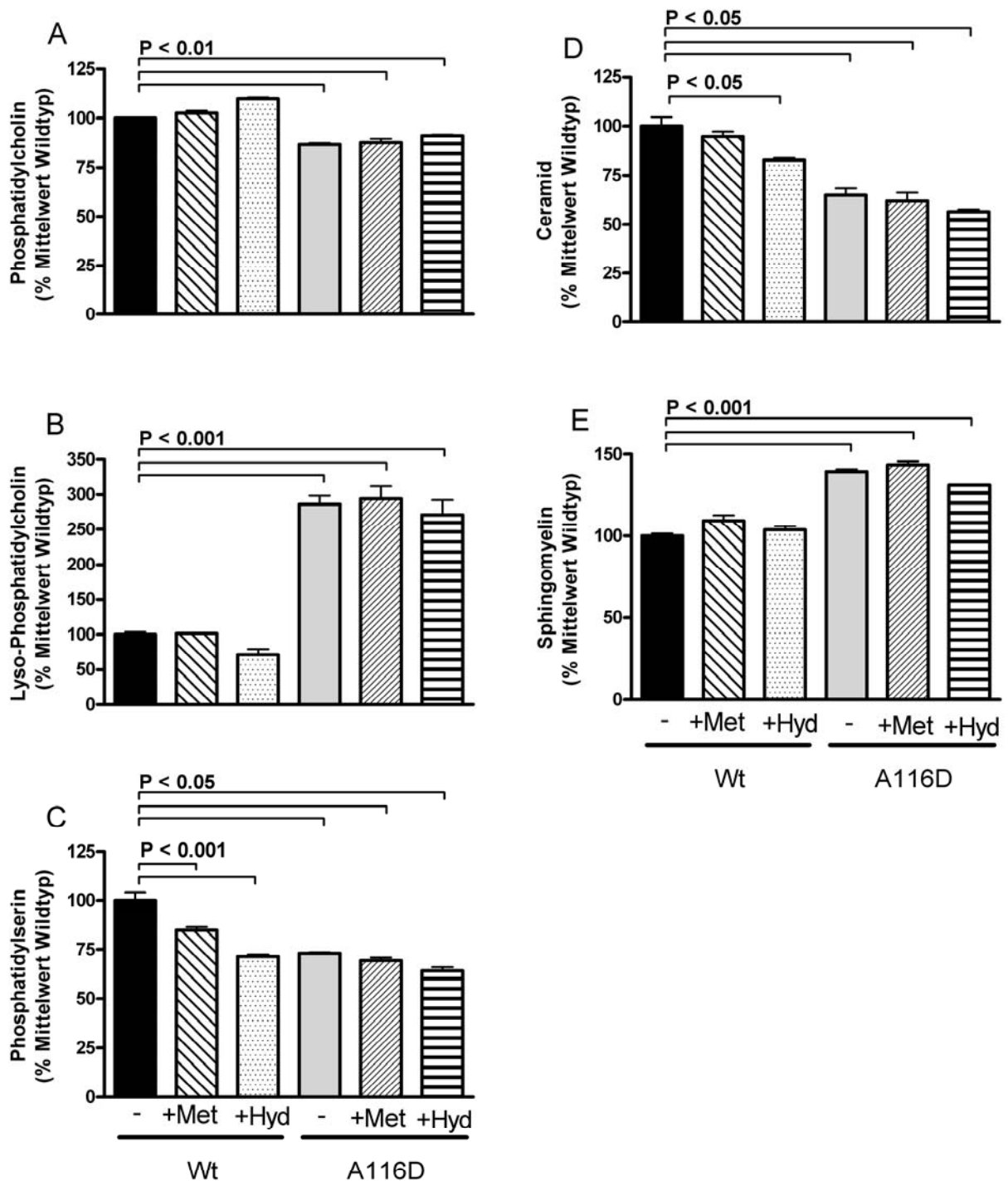


Abbildung 48: Lipidverteilung bei Wt und A116D, Kulturüberstand. Der Gehalt an Phospholipid wurde als % des Mittelwertes von unbehandelten Wildtyp Werten angegeben. Die Grafiken zeigen die relative Menge von Phosphatidylcholin (A), Lyso-Phosphatidylcholin (B), Phosphatidylserin (C), Ceramid (D) und Sphingomyelin (E). n=3. -: unbehandelt, +Met: mit 10µM Methylprednisolon für 24 Std. inkubiert, +Hyd: mit 10µM Hydroxychloroquin für 24 Std. inkubiert. Die Klammern über den Säulen geben an, welche Werte zueinander signifikant unterschiedlich sind.

4.7.2.2 Betrachtung der Auffälligkeiten der einzelnen Fettsäuren der jeweiligen Lipidklassen des Kulturüberstandes

Es konnten einige signifikante Änderungen auf der Ebene der Fettsäuren der verschiedenen Phospholipidklassen festgestellt werden. Allerdings können im Rahmen dieser Arbeit nur Tendenzen festgehalten werden, da eine Absicherung dieser Tendenzen einer größeren Stichprobenzahl bedarf. Die angegebene statistische Auswertung ist daher nur orientierend zu sehen.

Umfangreicher ausgewertet wurden Phosphatidylcholin und Lysophosphatidylcholin. Bei diesen Lipidklassen wurde nicht nur die prozentuale Veränderung der Fettsäuren betrachtet, sondern auch die tatsächlichen Mengenabsolutwerte in nmol lipid/mg Protein. Normalerweise sollten sich prozentuale Änderungen in den Absolutwerten widerspiegeln. So sollte einem prozentualen Anstieg einer Fettsäure bei mutierten Zellen im Vergleich zum Wildtyp auch absolut dieser Anstieg folgen.

Bei genauerer Untersuchung der Fettsäurespezies von Phosphatidylcholin ist nicht DPPC die vorherrschende Fettsäurespezies, sondern eine ungesättigte Variante 34:1, dicht gefolgt von 32:1.

Bei Phosphatidylcholin fielen noch einige weitere Fettsäuren auf. Bei A116D- und I73T-mutierten Zellen waren die Fettsäuren 34:1, 34:2, 30:0 und 32:0 und 30:1 prozentual höher gewichtet als beim Wildtyp. Die tatsächlichen absoluten Mengen sanken aber ab. Bei der Fettsäure 36:1 verhielt es sich nur bei A116D-mutierten Zellen genauso. Die Fettsäure 32:1 war sowohl bei A116D- wie auch bei I73T-mutierten Zellen prozentual unverändert, fiel aber bei den absoluten Mengenangaben ab (siehe Tabelle 16).

Bei Lysophosphatidylcholin blieb die Fettsäure 18:0 bei I73T-mutierten Zellen prozentual unverändert, fiel aber absolut im Vergleich zu Wildtyp exprimierenden Zellen ab. Die Fettsäure 18:1 war bei I73T-mutierten Zellen prozentuell erniedrigt, aber absolut erhöht im Vergleich zu Wildtyp exprimierenden Zellen. Bei A116D-mutierten Zellen war nur die Fettsäure 16:1 auffällig. Sie war gegenüber Wildtyp prozentuell erhöht, fiel aber absolut ab (siehe Tabelle 16).

		Wt	A116D	I73T	Wt	A116D	I73T	
Total PL	nmol lipid /mg Protein	152,8	126,5	153,1	152,8	126,5	153,1	nmol lipid /mg Protein
PC	% of total PL	44,70	38,73	35,10	68,30	48,99	53,74	nmol lipid /mg Protein
LPC	% of total PL	5,90	16,78	10,36	9,02	21,23	15,86	nmol lipid /mg Protein

		Wt	A116D	I73T	Wt	A116D	I73T	
PC	%	100	100	100	88,3184	66,792	82,2147	nmol lipid /mg Protein
PC 32:1	% of PC	14,21	14,21	14,32	12,55	9,49	11,77	nmol lipid /mg Protein
PC 34:1	% of PC	14,85	15,74	16,48	13,12	10,51	13,55	nmol lipid /mg Protein
PC 34:2	% of PC	4,93	5,74	5,36	4,35	3,83	4,41	nmol lipid /mg Protein
PC 30:0	% of PC	4,90	5,17	5,05	4,33	3,45	4,15	nmol lipid /mg Protein
PC 36:2	% of PC	3,50	5,27	3,85	3,09	3,52	3,17	nmol lipid /mg Protein
PC 32:0	% of PC	3,46	3,78	3,54	3,06	2,52	2,91	nmol lipid /mg Protein
PC 32:2	% of PC	3,12	3,19	3,86	2,76	2,13	3,17	nmol lipid /mg Protein
PC 30:1	% of PC	1,58	1,78	1,67	1,40	1,19	1,37	nmol lipid /mg Protein
PC 36:1	% of PC	1,43	1,75	1,58	1,26	1,17	1,30	nmol lipid /mg Protein

		Wt	A116D	I73T	Wt	A116D	I73T	
LPC	%	100	100	100	0,9168	1,1385	1,531	nmol lipid /mg Protein
LPC 16:0	% of LPC	56,81	57,17	58,28	0,52	0,65	0,89	nmol lipid /mg Protein
LPC 18:1	% of LPC	15,69	16,48	15,43	0,14	0,19	0,24	nmol lipid /mg Protein
LPC 16:1	% of LPC	11,06	10,61	11,32	0,10	0,12	0,17	nmol lipid /mg Protein
LPC 18:0	% of LPC	8,85	9,07	8,65	0,08	0,10	0,13	nmol lipid /mg Protein
LPC 15:0	% of LPC	2,44	1,71	1,79	0,02	0,02	0,03	nmol lipid /mg Protein

Tabelle 16: Fettsäureübersicht von PC und LPC, Kulturüberstand. Die Tabelle ist in zwei Hälften aufgeteilt. Auf der linken Seite sind relative Werte in Form prozentualer Anteile angegeben und auf der rechten Seite befinden sich die Absolutwerte in nmol lipid/mg Protein. Die Spalten zeigen die Vergleichswerte zwischen Wildtyp und Mutation A116D oder I73T exprimierenden Zellen an. Türkis unterlegte Kompartimente verdeutlichen, dass prozentual Mutation exprimierende Zellen höhere Fettsäureanteile haben als Wildtyp exprimierende, dass allerdings absolut gesehen die Werte abfallen. Bei rosa hinterlegten Kompartimenten ist es genau umgekehrt. Bei lila hervorgehobenen Kompartimenten ist prozentual kein Unterschied zwischen der Fettsäuremenge bei WildTyp-Im Vergleich zu Mutation exprimierenden Zellen zu sehen, die Absolutwerte fallen allerdings bei Mutation exprimierenden Zellen ab. Die angegebenen Werte sind die Mittelwerte aus drei Messungen.

4.7.3 Korrektives Potential von Methylprednisolon und Hydroxychloroquin

Durch die Behandlung der I73T-mutierten Zellen mit Methylprednisolon oder Hydroxychloroquin konnte der niedrige Phosphatidylcholinspiegel zwar angehoben, aber nicht auf Normalniveau erhöht werden. Allerdings konnte der Anstieg von Lyso-PC immerhin verringert, wenn auch nicht komplett aufgehoben werden.

Auf A116D-mutierte Zellen hatten Methylprednisolon und Hydroxychloroquin keinen Einfluss.

4.7.4 Gegenüberstellung Lipidmessung von Zelllysate und Kulturüberstand

In nachfolgender Auflistung sind die Phospholipidmengen des Zelllysates mit den Phospholipidmengen des Kulturüberstandes verglichen.

Wt ↔ I73T Zelle	Einfluss der Medikamente	Wt ↔ I73T Kulturüberstand	Einfluss der Medikamente
PC ↓ 7%		PC ↓ 21%	Bei I73T durch Met und Hyd ↑
LPC ↑ 67%	Bei I73T durch Met und Hyd ↓	LPC ↑ 76%	
SPM ↓ 11%			
PE ↑ 31%			
		PS ↓ 32%	
Wt ↔ A116D Zelle	Einfluss der Medikamente	Wt ↔ A116D Kulturüberstand	Einfluss der Medikamente
PC ↓ 9%		PC ↓ 13%	
LPC ↑ 50%		LPC ↑ 184%	
PE ↑ 29%			
PS ↑ 18%		PS ↓ 26%	
SPM ↑ 11%		SPM ↑ 40%	
Cer ↓ 11%		Cer ↓ 36%	Bei Wt durch Hyd ↓
GluCer ↑ 100%	Bei Wt durch Hyd ↑		
		PG ↓ 50%	
Total PL ↓ 17%			

Tabelle 17: Unterschiede in der Lipidzusammensetzung. Analysiert wurden Phosphatidylcholin (PC), Lysophosphatidylcholin (LPC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylglycerol (PG), Sphingomyelin (SPM), Dihydro-Sphingomyelin (DihSPM), Ceramid (Cer), Glucosylceramid (GluCer), Plasmalogen (Pla) und Gesamtphospholipid (Total PL). Bei „Wt ↔ I73T“ sind die Veränderungen von mit I73T-transfizierten Zellen im Vergleich zu Wildtyp transfizierten dargestellt. Bei „Wt ↔ A116D“ sind die Veränderungen von mit A116D-transfizierten Zellen im Vergleich zu Wildtyp transfizierten dargestellt. Fett dargestellt sind übereinstimmende Tendenzen, die bei I73T- und A116D-transfizierten Zellen im Vergleich zum Wildtyp auftreten. Met steht für Methylprednisolon, Hyd für Hydroxychloroquin.

Graphisch dargestellt ist die Gegenüberstellung der Lipidmessung von Zelllysate und Kulturüberstand in Abbildung 49.

Es kann festgehalten werden, dass die Expression von mutiertem proSP-C alveolare Typ-II-Zellen in ihrer Lipidzusammensetzung tiefgründig stört. Das am meisten surfactant spezifische Phospholipid, Phosphatidylcholin, wurde reduziert, einhergehend mit einer Steigerung von Lysophosphatidylcholin, die durch eine gesteigerte Aktivität der Phospholipase erklärt werden könnte.

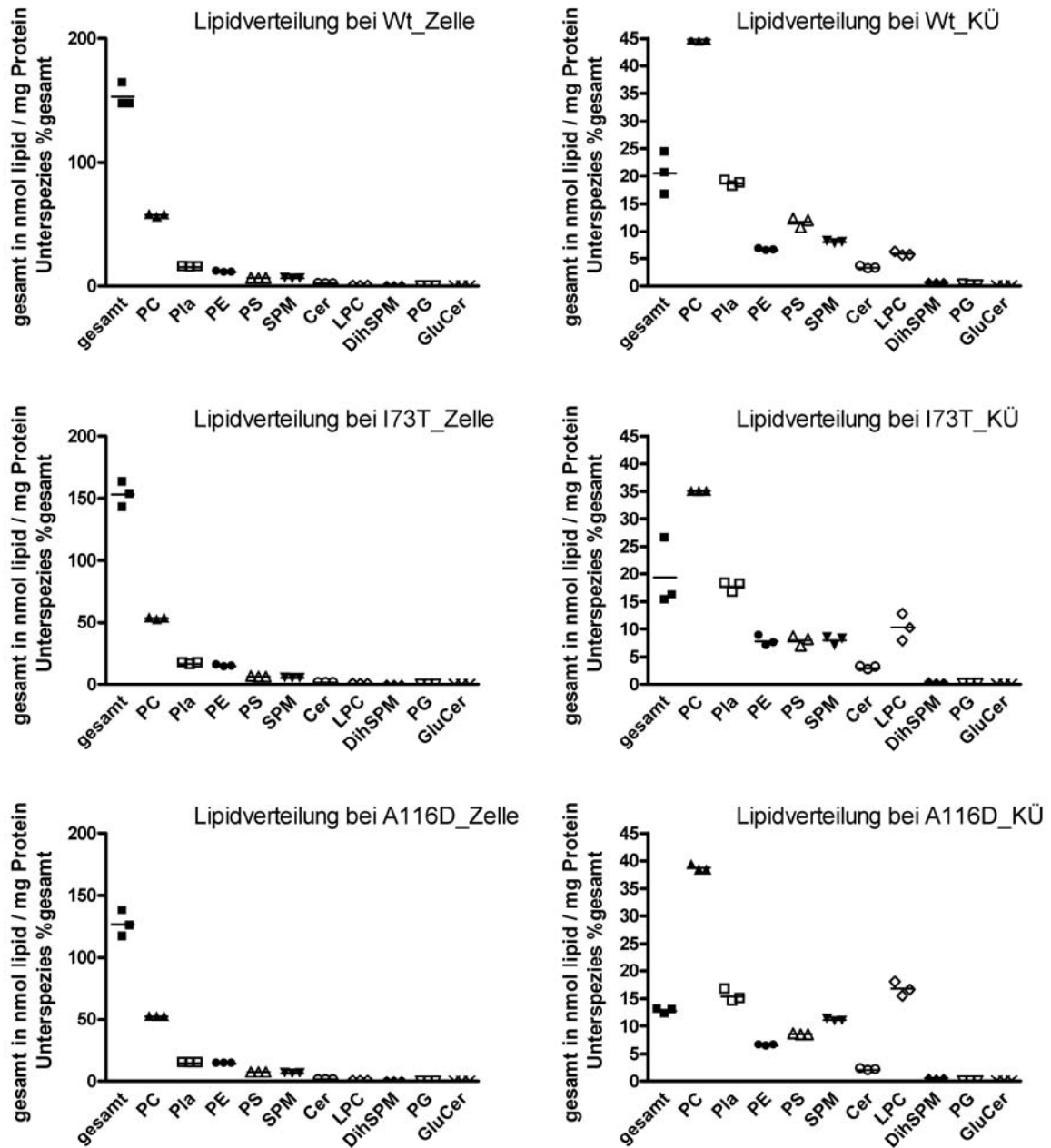


Abbildung 49: Grafische Darstellung der drei massenspektrometrischen Messungen zur Lipidverteilung. Es wurden die unbehandelten MLE-12-Zellen gemessen, die stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt, I73T und A116D} transfiziert sind. Dabei wurden die Gesamtphospholipide (gesamt) in nmol lipid/mg Protein gemessen und die Unterspezies als % der Gesamtphospholipide ausgedrückt. Zum einen wurde das Zelllysät (Zelle) und zum anderen der zugehörige Kulturüberstand (KÜ) vermessen.

4.8 Analyse der Rezeptorexpression auf Immunzellen

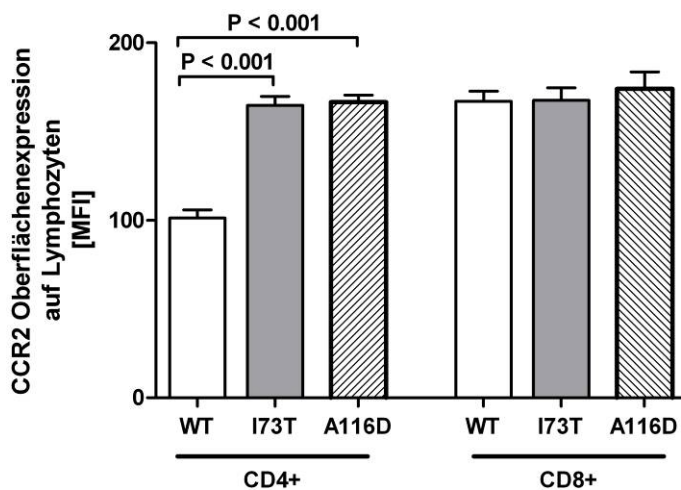
Zellstress wird über Signalmoleküle, die von den betreffenden Zellen abgesondert werden, den umgebenden Zellen und Geweben mitgeteilt. Die Stärke der Expression dieser Oberflächenrezeptoren ist proportional zum vorliegenden Zellstress.

Es wurde untersucht, ob der Kulturüberstand von Wildtyp proSP-C exprimierenden MLE-12-Zellen eine abweichende Expression bestimmter Zytokinoberflächenrezeptoren auf Lymphozyten und Neutrophilen hervorruft im Vergleich zum Kulturüberstand von MLE-12-Zellen, die I73T- oder A116D-mutiertes proSP-C exprimieren.

Neutrophile und Lymphozyten wurden aus humanem Vollblut verschiedener Spender isoliert und mit siebenfach einkonzentrierten Kulturüberständen von MLE-12-Zellen, die Wildtyp oder mutiertes Pro-SP-C exprimieren, inkubiert. Nicht einkonzentrierte Proben zeigten weniger ausgeprägte Effekte.

4.8.1 Oberflächenexpression von CCR-2 auf Lymphozyten

Die Oberflächenexpression von CCR-2 auf Lymphozyten wurde näher betrachtet.



Während CD8⁺ Lymphozyten keine unterschiedliche Expression bei Wildtyp und Mutante zeigten, stieg bei CD4⁺ Lymphozyten die Menge der exprimierten Oberflächenrezeptoren von CCR-2 als Antwort auf die Inkubation mit Kulturüberstand von proSP-C^{mut} exprimierenden Zellen signifikant an (Abbildung 50).

Abbildung 50: CCR-2-Oberflächenexpression auf Lymphozyten. Dargestellt sind Lymphozyten, bei denen die Oberflächenexpression von CCR-2 gemessen wurde, nachdem sie mit Kulturüberstand von MLE-12-Zellen inkubiert worden waren. Die MLE-12-Zellen selbst waren stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt, I73T oder A116D} transfiziert worden. Die Lymphozyten wurden in CD4⁺ und CD8⁺ unterschieden.

4.8.2 Oberflächenexpression von CXCR-1 auf Lymphozyten

Der gleiche Effekt war für CXCR-1 nachzuweisen. Die Rezeptorexpression stieg bei CD4+ Lymphozyten nach Inkubation mit mutiertem Kulturüberstand an, wohingegen sie bei CD8+ Lymphozyten unverändert blieb (Abbildung 51).

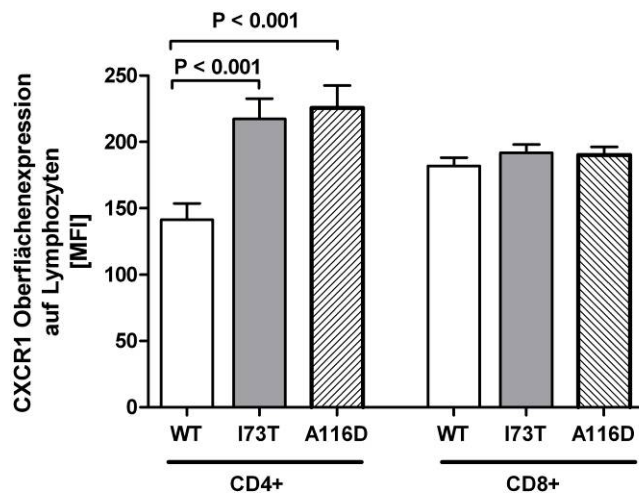


Abbildung 51: CXCR-1-Oberflächenexpression auf Lymphozyten. Dargestellt sind Lymphozyten, bei denen die Oberflächenexpression von CXCR-1 gemessen wurde, nachdem sie mit dem Kulturüberstand von MLE-12-Zellen inkubiert worden waren. Die MLE-12-Zellen selbst waren stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt, I73T oder A116D} transfiziert worden. Die Lymphozyten wurden in CD4+ und CD8+ unterschieden.

4.8.3 Oberflächenrezeptorexpression von CXCR-1 und CD11b auf Neutrophilen

Weiterhin wurde die Oberflächenrezeptorexpression auf Neutrophilen betrachtet. Der Kulturüberstand der mutierten Zellen führte zu einem Anstieg von CXCR-1, zeigte jedoch keinen Effekt auf die Expression von CD11b (Abbildung 52).

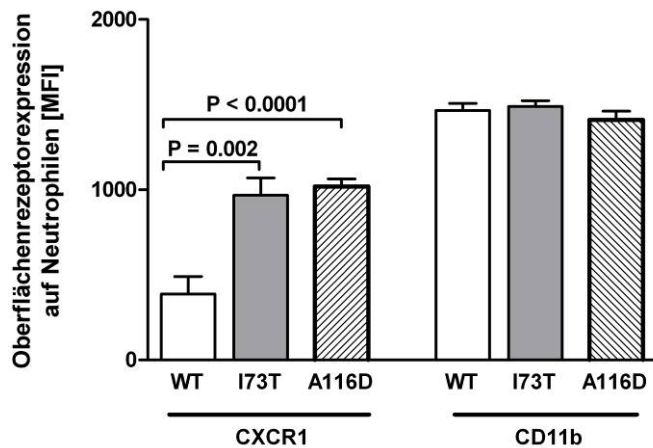


Abbildung 52: Oberflächenrezeptorexpression auf Neutrophilen. Dargestellt sind Neutrophile, bei denen die Oberflächenexpression von CXCR-1 und CD11b gemessen wurde, nachdem sie mit dem Kulturüberstand von MLE-12-Zellen inkubiert worden waren. Die MLE-12-Zellen selbst waren stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt, I73T oder A116D} transfiziert worden.

Als wesentliche Aussage ist festzuhalten, dass MLE-12-Zellen, die I73T- oder A116D-mutiertes proSP-C exprimieren, lösliche Faktoren in den Kulturüberstand zu sezernieren, die in der Lage sind, die Oberflächenrezeptorexpression auf für die Immunantwort wichtigen Zellen zu modulieren.

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit soll die zellulären Auswirkungen von Mutationen im Surfactantprotein-C-Gen intensiver beleuchten. Bisher gab es noch keine genaueren Untersuchungen darüber, welche Abläufe in der Zelle durch die verschiedenen Mutationen gestört werden.

Als Untersuchungsmodell wurde eine murine Typ-II-Pneumozyten-Zelllinie (MLE-12) gewählt, in der mittels eingebrachter Vektoren Wildtyp proSP-C und mutiertes proSP-C exprimiert und prozessiert wurden.

Eine Beeinflussung der Ergebnisse war, dass das für die Untersuchungen gewählte Modell mehr einer homozygoten Mutation im SFTPC-Gen entsprach. Zwar wird endogenes SP-C von MLE-12-Zellen exprimiert [86], aber die Expression des durch den Vektor definierten SP-C war durch den CMV-Promotor des eingebrachten Vektors wesentlich höher. Somit ist dieses Modell weniger gut auf Patienten übertragbar, bei denen eine heterozygote Mutation im SFTPC-Gen vorliegt. Allerdings ist zu beachten, dass bei Patienten die Mutationen auch nur heterozygot vorliegen, da sie sich dominant negativ auswirken. Insofern ist die Vergleichbarkeit zur menschlichen Situation insgesamt gut.

5.1 Prozessierungsmuster

Alle bisher durchgeführten Untersuchungen galten der Prozessierungsaufklärung von Wildtyp proSP-C [47;48;87]. In dieser Arbeit wurde das Prozessierungsmuster von proSP-C-Mutationen untersucht, in der Annahme, dass diese verändert seien.

Bei der Untersuchung von Wildtyp proSP-C bestätigte sich die bisherige Prozessierungstheorie nach Brasch et al. [47]. Es wurden drei verschiedene Fusionsproteine detektiert, von denen zwei N-terminal mit proSP-C verbunden waren (HA und EGFP) und eines C-terminal (EGFP). So konnte die Proform mit 21kDa (Abbildung 28 #1, 5, 9) detektiert werden, die beiden Intermediate nach C-terminal proteolytischer Spaltung mit 16kDa (Abbildung 28 #3, 6, 10) und 7kDa (Abbildung 28 #7) sowie das Intermediat nach erster N-terminaler Abspaltung mit 6kDa (Abbildung 28 #8). Das Intermediat nach der zweiten N-terminalen Abspaltung konnte nicht detektiert werden, da das Fusionsprotein bereits abgespalten worden war. Auf die Reihenfolge der

proteolytischen Abspaltungsprozesse konnte durch die Lage des Fusionsproteins zu proSP-C rückgeschlossen werden. Die beiden N-terminalen Fusionsproteine blieben durch die ersten beiden Abspaltungen unberührt. Bei der dritten proteolytischen Abspaltung konnte die Größe eines Proteins detektiert werden, das genau der Differenz aus voller Länge von proSP-C (21kDa) und der dritten Zwischenform (6kDa) entspricht und somit auf eine N-terminale Abspaltung hinweist. Allerdings konnte diese Form nur bei dem mit EGFP verbundenen proSP-C gefunden werden, da die technische Auflösung der Methode nicht für die Detektion eines 2,3kDa großen Fragmentes ausreichte, das bei dem mit HA verbundenem proSP-C zu erwarten gewesen wäre. Umgekehrt wurde beim C-terminal verbundenen Fusionsprotein EGFP nach der ersten Abspaltung ein Protein gefunden, das der Größe nach der Differenz aus voller Länge von proSP-C (21kDa) und erster Zwischenform (16kDa) entspricht und somit auf eine C-terminale Abspaltung hinweist.

Eine bisher in der Literatur nicht erwähnte Bande wurde zusätzlich gefunden (Abbildung 28, Abbildung 30, Abbildung 32 #2). Sie taucht allerdings nur bei dem Fusionsprotein aus HA mit proSP-C auf. Hierbei wird von der vollen Länge des proSP-C ein 1kDa großes Stück C-terminal abgespalten. Diese Bande ist am stärksten von allen vertreten. Sie tritt auch bei allen mutierten proSP-C-Formen auf. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass in Mauszellen die Proform von SP-C als Doppelbande auftritt. Dem widerspricht, dass die Doppelbande nicht bei EGFP verbundenem proSP-C auftaucht. Um auszuschließen, dass es an der Prozessierung in Mauszellen liegt, müsste der Versuch in A549-Zellen wiederholt werden, was für den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht vorgesehen war. Es könnte auch sein, dass der HA-Antikörper unspezifisch eine Bande mit genau dieser Größe färbt. Dafür spräche, dass die Bande nur bei dem HA-Fusionsprotein auftaucht und ungewöhnlich intensiv gefärbt ist.

Die Expression von I73T-mutiertem proSP-C in MLE-12-Zellen führte nicht zur Erscheinung neuer intrazellulärer Prozessierungszwischenstufen von proSP-C im Vergleich zu Wildtyp proSP-C, aber zu einer unterschiedlich starken Gewichtung der gefundenen Intermediate. Aberrant prozessiertes I73T-mutiertes Protein erlaubt immer noch eine Produktion von reifem SP-C [65]. Dies könnte erklären, warum alle bei Wildtyp proSP-C gefundenen Intermediate auftreten, die allerdings unterschiedlich gewichtet nachweisbar sind.

Da der erste Abspaltungsschritt nicht durch die Mutation beeinflusst wurde, interferiert I73T-mutiertes proSP-C nicht mit dem Export des SP-C-Proteins aus ER und Golgi, da

die erste Abspaltung nach dem Transport durch diese Kompartimente statt zu finden scheint [47;60]. Diese Ergebnisse stützen die Entdeckung, dass nur Mutationen im ER zurück gehalten werden, die sich N-terminal befinden [60].

Im Fall von I73T-mutiertem proSP-C stimmten die Prozessierungszwischenstufen mit denen überein, die in der diagnostischen BAL von Patienten mit dieser Mutation nachgewiesen wurden (Abbildung 29) [65], was die Übertragbarkeit des gewählten Modells auf *in vivo* Untersuchungen bestätigt.

Die Expression von A116D-mutiertem proSP-C zeigte im Vergleich zu Wildtyp proSP-C nach der C-terminalen proteolytischen Spaltung ein verändertes 14kDa großes Intermediat statt 16 kDa. Ob es sich hierbei um eine andere Protease als beim Wildtyp handelt oder ob die Mutation A116D die Schnittstelle verschiebt, muss noch genauer aufgeklärt werden. Nicht detektierbar war die 6kDa große Zwischenform, die mit Hilfe des Fusionsproteins proSP-C und EGFP N-terminal hätte auftauchen müssen. Dies deutet darauf hin, dass die erste N-terminale Spaltung nicht mehr statt findet. Es bestätigt auch die Theorie, dass A116D zu den Konformationskrankheiten gehört und somit die Produktion von reifem SP-C verhindert wird [65].

Bei der Expression von P30L-mutiertem proSP-C wurden im Vergleich zu Wildtyp proSP-C keine veränderten Zwischenformen aufgefunden. Die Mengenverteilung der Intermediate zeigte auch keinen Unterschied zu Wildtyp proSP-C. Offenbar nimmt die Mutation keinen Einfluss auf die Prozessierung. Dies widerspricht der Theorie, dass N-terminal gelegene Mutationen im ER zurück gehalten werden [60].

L188Q-mutiertes proSP-C zeigte bei seiner Expression ebenfalls eine 16kDa große Zwischenform, wie Wildtyp proSP-C. Allerdings fand sich statt einer 7kDa großen ein 11kDa großes Intermediat. Somit verändert diese Mutation den Angriffspunkt für die Protease, die für die erste N-terminale proteolytische Spaltung zuständig ist.

Bei der Prozessierung von L110R- und P115L-mutiertem proSP-C wurden außer dem 21kDa-Propeptid keine Übereinstimmungen zu Wildtyp proSP-C gefunden. Hier war eine 14kDa statt der 16kDa große Zwischenform zu detektieren und eine 11kDa statt des 7kDa großen Intermediates. Bei diesen beiden Mutationen ist die Schnittstelle für die C- und N-terminal angreifende Protease verändert.

Die Expression von Wildtyp und mutiertem proSP-C in diesem Modell liegt unter der Kontrolle des CMV-Promotors, nicht des nativen Promotors. Es ist daher

unwahrscheinlich, dass ein Feedback-Mechanismus für eine Regulation der Transkription verantwortlich ist. Eine Erklärung für die unterschiedliche Gewichtung der Intermediate bei mutiertem proSP-C im Vergleich zu Wildtyp proSP-C exprimierenden Zellen wäre, dass eine langsamere Prozessierung oder der Transport des mutierten proSP-C zu einer Akkumulation von unprozessiertem proSP-C führen könnte. Alternativ könnten kleine Veränderungen in der Konformation des mutierten proSP-C diesen beobachteten Effekt auslösen.

5.2 Morphologie der Lamellarkörperchen

MLE-12-Zellen, die stabil mit I73T-, A116D- oder L110R-mutiertem proSP-C transfiziert sind, weisen Besonderheiten in der Morphologie ihrer Lamellarkörperchen auf. Zum einen finden sich rudimentäre Lamellarkörperchen, die eine transparentere und mit wenigen Lamellen versehene Struktur aufweisen (Abbildung 35, Abbildung 38 B), und zum anderen tauchen besonders eng lamellierte Körperchen auf (Abbildung 36, Abbildung 38 C). Bei den MLE-12-Zellen, die stabil mit P30L-, P115L- oder L188Q-mutiertem proSP-C transfiziert sind, finden sich nur rudimentäre Lamellarkörperchen (Abbildung 38 A, D, E). Brasch et al. [84] fanden beide Strukturarten bei Patienten, die an ILD erkrankt sind. Somit wird die Lamellarkörperchengenese durch Mutationen gestört. Offensichtlich bewirkt eine N-terminale Lage der Mutation (P30L) eine rudimentäre Ausbildung der Lamellarkörperchen und bei einer Non-BRICHOS Mutation (I73T) können beide Arten, rudimentäre und besonders dichte, ausgebildet werden. Mutationen der BRICHOS-Domäne können zum Teil beide Sorten (A116D, L110R), oder nur rudimentäre Lamellarkörperchen (P115L, L188Q) hervorrufen.

5.3 Intrazelluläre Lokalisierung der Zwischenformen von proSP-C

Immunfluoreszenz transfizierter A549-Zellen zeigt, dass I73T- und A116D-mutiertes proSP-C mit EEA-1-positiven Vesikeln kolokalisiert (Abbildung 40), was vorangegangene Berichte bestätigen [65]. Das frühe Endosom enthält normalerweise Material, das durch Endozytose aus der Umgebung aufgenommen und entweder recycelt oder abgebaut wird. Mehr als 80% des verwendeten Lungensurfactant wird durch Typ-II-Zellen recycelt [88;89]. Obwohl die Immunfluoreszenz keine Unterscheidung zwischen den verschiedenen EGFP-positiven Spezies erlaubt (Abbildung 28 und Abbildung 31), liegt die Vermutung nahe,

dass die proSP-C Spezies in den EEA-1-positiven Kompartimenten vorwiegend die zusätzlichen Spezies sind, die bei den Mutanten gefunden wurden.

Bei der Untersuchung der Proteine, die in die Sekretion des Lungensurfactant involviert sind [54], konnte gezeigt werden, dass Wildtyp proSP-C mit dem SNARE-Protein Syntaxin-2 kolokalisiert, im Gegensatz zum mutierten proSP-C (Abbildung 41). Allerdings kolokalisierte SNAP-23, ein anderes SNARE-Protein, mit keiner proSP-C-Spezies (Tabelle 11). SNAP-23 und Syntaxin-2 werden normalerweise an der Plasmamembran und in Lamellarkörperchen von Typ-II-Pneumozyten gefunden [54]. Bei der proSP-C-Prozessierung wurde die Anwesenheit von proSP-C-Zwischenformen in Lamellarkörperchen, den Aufbewahrungskompartimenten für Lungensurfactant, bevor es sekretiert wird gefunden [47;48;87]. Daher können HA-Tag-positive Fragmente, die von HA getagtem proSP-C abgespalten werden, die Lamellarkörperchen gemeinsam mit dem reifen SP-C erreichen. Dies tritt nicht bei I73T- oder A116D-mutiertem proSP-C ein.

Weitere Analysen haben gezeigt, dass weder der Wildtyp noch das mutierte proSP-C im Calnexin positiven ER zurück gehalten werden (Tabelle 11). Dies erhärtet die Rückschlüsse, die aus den immunochemischen Daten (siehe Prozessierungsmuster) gezogen werden konnten. In der Anfärbung mit Antikörpern gegen ubiquitinylierte Proteine oder das Chaperon Hsp90 gab es keine detektierbaren Unterschiede zwischen Wildtyp und mutiertem proSP-C (Tabelle 11). Beide Proteine sind Teil des Qualitätskontrollsystems, das der Zelle bei der Proteinfaltung hilft oder falsch gefaltete Proteine markiert und sie zur Degradation frei gibt. Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass mutiertes proSP-C nicht in einem größeren Ausmaß für die Degradation markiert wird als Wildtyp proSP-C.

5.4 Verhalten gegenüber exogenem Stress

Die Expression mutierter proSP-C-Formen resultiert häufig in vermehrtem Stress für die Zelle. Dies wurde für die BRICHOS-Domänen-Mutationen L188Q und Δ exon4 von SP-C gezeigt [4;7]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Mutationen I73T und A116D die Zelldurchlässigkeit unter normalen Wachstumsbedingungen moderat erhöhen (Abbildung 42). Die Behandlung der Zellen mit Azathioprin verdoppelte beinahe die Anzahl der sterbenden mutierten Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen. Diese erhöhte Sterberate war bei Hydroxychloroquin oder Cyclophosphamid weniger stark ausgeprägt. Die konstitutive Expression von mutiertem proSP-C scheint den Zellen

leichten, sichtbaren Stress aufzuerlegen, aber letztendlich kann das zelluläre System diesen Stress über Adaptionsprozesse tolerieren, wie Bridges et al. berichtet haben [90]. Der zusätzliche Stress, hervorgerufen durch pharmakologische Substanzen, denen die Zellen ausgesetzt sind, kann diese Balance aus dem tolerierten Bereich hinaus schieben, so dass die Zellen durch Apoptose absterben.

5.5 Einfluss der proSP-C-Expression auf die Hitzeschockproteinexpression

Zellulärer Stress wird teilweise über endogene Chaperone reguliert. Dies bestätigten Untersuchungen zu $\Delta F508$ CFTR, einer Mutation bei Cystischer Fibrose, die zu einer Fehlfaltung des Regulatorproteins des Chloridtransports durch die Zellmembran führt [91]. Zum einen können Chaperone hoch reguliert werden, um die massive Ansammlung aberrant gefalteter Proteine und die damit verbundene Toxizität für die Zelle zu verringern. Zum anderen können sie reduziert werden, um Proteine, die trotz Fehlfaltung eine Restaktivität besitzen, der Degradation zu entreißen und der physiologischen Prozessierung zuzuführen.

Über Hsp90 ist bekannt, dass es die letzten Schritte der Faltung aufhält, um eine frühzeitige Aggregation zu verhindern [78]. In der vorliegenden Arbeit bildet Hsp90 eine Zielstruktur aller getesteten Medikamente. Der Einfluss von Hydroxychloroquin ruft hierbei die stärkste Hochregulation hervor, nämlich 81% bei I73T und 78% bei A116D.

Calnexin hingegen ist offenbar immun gegenüber der Stimulation mit Arzneimitteln. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit Hydroxychloroquin zu einer Erhöhung von 75% (I73T) bzw. 61% (A116D) der Expression von Calreticulin bei Zellen, die mutiertes proSP-C exprimierten im Vergleich zu Wildtyp exprimierenden Zellen (Tabelle 12). Diese Hochregulation wird auch von den übrigen Pharmaka hervorgerufen. Calreticulin und Calnexin sind zusammen am so genannten *calreticulin-calnexin cycle* beteiligt, der für die Qualitätskontrolle und die Faltung der neu synthetisierten Proteine verantwortlich ist. Er dient zur Erkennung fehlgefalteter Proteine, diese werden im ER zurück gehalten und degradiert. So können nur korrekt gefaltete Proteine das ER verlassen und dem sekretorischen Pathway entlang weiter prozessiert werden [79]. Bei A116D- und I73T-mutiertem proSP-C wird demnach die Faltungskontrolle über Calreticulin reguliert. Anscheinend müssen Proteine nicht immer die gleiche Affinität zu Calreticulin und Calnexin haben, da $\Delta F508$ CFTR im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten wird,

wo es durch die längere Verbindung zu Calnexin [92] und der 70kDa-Hitzeschockproteinfamilie [93] zu einem funktionellen Protein geformt wird [94].

Als Ergebnis zeigt sich, dass Hsp70 am stärksten über Cyclophosphamid aktiviert wird, was den Zellen vermutlich hilft das mutierte Protein funktionell zu falten. Methylprednisolon, Hydroxychloroquin und Azathioprin haben ebenfalls eine leichte Erhöhung der Hsp70-Level bewirkt, aber nicht in demselben Ausmaß wie Cyclophosphamid. Ähnliche Beobachtungen sind bei $\Delta F508$ CFTR gemacht worden, wo 4-PBA die Menge an Hsp70 erhöht, was zu einer verstärkten CFTR-Hsp70-Komplexbildung und damit besseren Faltung von CFTR führt [75].

Der Einfluss von Azathioprin auf die Chaperone ist beinahe identisch bei Wildtyp im Vergleich zu I73T- oder A116D-mutierten Zellen, so dass kein Schutz für zusätzlichen Stress vorhanden war.

Für eine Berechnung, wie viel mehr reifes SP-C durch die Hochregulation der Hitzeschockproteine an seinen Bestimmungsort gelangt, müssen weitere spezifische Untersuchungen durchgeführt werden.

5.6 Zelluläre Lipidzusammensetzung

Die Funktion des Lungensurfactants hängt von einer korrekten Lipidzusammensetzung in den Lamellarkörperchen ab. Da aber der Gesamtlipidgehalt der Zellen und des Kulturüberstandes untersucht wurde, stellt dieser Ansatz eine Einschränkung dar, weil der zelluläre Lipidgehalt eine andere Zusammensetzung aufweist als die in den Lamellarkörperchen. Daher könnten Veränderungen in der Lipidzusammensetzung der Lamellarkörperchen maskiert werden, wenn man die Gesamtlipide der Zelle untersucht.

Die Lipidzusammensetzung der untersuchten Zellen gleicht der Zusammensetzung, die kürzlich in humanen fetalen Typ-II-Lungenepithelzellen beschrieben wurde, insbesondere hinsichtlich der PC-Zusammensetzung [95]. Die Mutationen I73T und A116D führen zu einem erniedrigten Level von Phosphatidylcholin, wohingegen Lysophosphatidylcholin ansteigt. Es ist bekannt, dass PC über eine intrinsische Phospholipase-A2 zu LPC degradiert wird und LPC für viele Zellen toxisch ist [96;97]. LPC ist ein bekannter Inhibitor der Lungensurfactant-Aktivität. Es hat die Fähigkeit sich berührende Filme zu penetrieren und auf diese Weise die Verminderung der Oberflächenspannung während der dynamischen Kompression zu erniedrigen [98;99].

Die ermittelten LPC-Level der mutierten Zelllinien könnten eine Ursache für die erhöhte Sensitivität gegenüber exogenem Stress sein. Werden die Zellen mit Methylprednisolon oder Hydroxychloroquin behandelt, werden die beobachteten Effekte gemildert, aber nicht komplett aufgehoben.

Der großen Erniedrigung der Masse von PC bei mutierten Zellen steht nur ein geringer Anstieg von LPC gegenüber. Daher müssen zusätzliche Faktoren, die direkt mit der Synthese und der Verpackung von PC in Zusammenhang stehen, eine Rolle spielen. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Prozesse der Lipid Auswahl tiefgreifender gestört sein müssen, da es sehr viele signifikante Änderungen innerhalb der Fettsäuren der jeweiligen Lipidklassen gibt.

Die Typ-II-Lungenepithelzellen sekretieren Surfactant-Phospholipide in den Alveolarraum, wo sie die Oberflächenspannung erniedrigen. Bei Phospholipiden, die von mutierten Zellen sekretiert wurden, war PC um 27% reduziert und LPC um 57% angestiegen, gekoppelt mit einer reduzierten Funktion [95;98;99]. Auffällig war hierbei der korrigierende Effekt von Methylprednisolon oder Hydroxychloroquin. Dies könnte als mögliche Erklärung gelten, warum diese Medikamente bei einigen Patienten mit einer I73T-Mutation wirken, was wir aus Erfahrung bestätigen können (eigene nicht publizierte Beobachtungen).

Eine nähere Betrachtung der Fettsäurespezies von Phosphatidylcholin zeigt, dass nicht DPPC die vorherrschende Fettsäurespezies ist, sondern eine ungesättigte Variante 32:1. Allerdings ist mittlerweile durch massenspektrometrische Untersuchungen belegt, dass DPPC auch tatsächlich beim Menschen nicht die häufigst vorkommende Variante ist [95]. Es ist auch bekannt, dass bestimmte Tierarten unterschiedliche PC-Zusammensetzungen haben, bei denen grundsätzlich eine Mischung aus 16:0/16:0, 16:0/16:1 und 16:0/14:0 mit unterschiedlicher Gewichtung je nach Art vorliegt [100].

Die Spezies 32:1 ist bei I73T- und A116D-mutiertem proSP-C noch mehr erhöht als bei Wildtyp proSP-C. Diese Phänomene sind in der Literatur bisher nicht beschrieben. Daher ist nicht bekannt, ob die gefundenen Veränderungen in Zusammenhang mit interstitiellen Lungenerkrankungen stehen.

5.7 Stimulation der Rezeptorexpression auf Immunzellen

Die aufgestellte Hypothese besagte, dass epitheliale Zelllinien mit I73T- oder A116D-mutiertem proSP-C Mediatoren sekretieren, die zu einer Aktivierung des CCR-2-Pathways

führen, der in einer Fibrose gipfelt [82]. In der Literatur wurde ein Patient mit der Mutation I73T beschrieben, der eine milde interstitielle chronische Inflammation aufwies und bei dem die meisten der infiltrierten Leukozyten CD3⁺ und CD4⁺ T-Lymphozyten waren [65]. In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass Zellen, die eine Mutation exprimieren, lösliche Faktoren in das umgebende Medium sezernieren, was die Expression von CCR-2 und CXCR-1 auf der Oberfläche von CD4⁺ Lymphozyten und CXCR-1 auf der Oberfläche von Neutrophilen ansteigen lässt (Abbildung 51). CXCR-1, als hochaffiner IL-8 Rezeptor, führt Zellen zu Entzündungsherden. Die gefundenen CXCR-1 Level auf CD4⁺ Lymphozyten erlauben Cytokinen eine erhöhte Immunantwort im alveolaren Raum [80]. Der Chemokinrezeptor CCR-2 wird hauptsächlich auf Monozyten und T-Zellen exprimiert. Sein Hauptligand ist das Monozyten Chemoattractant Protein (MCP-1), von dem gezeigt wurde, dass es in Epithelzellen, Fibroblasten und Monozyten / Makrophagen synthetisiert wird [101;102]. Bei der Aktivierung des CCR-2-Signalpathways spielt MCP-1 eine große Rolle. Es wurde nachgewiesen, dass die Level von MCP-1 bei der idiopathischen pulmonalen Fibrose (IPF) in Zusammenhang mit der Schwere der Erkrankung stehen [103]. Kürzlich wurde gezeigt, dass Monozyten und Makrophagen in der Lage sind TGF-beta und Typ-I-Kollagen zu produzieren, genauso wie MCP-1 in einer autokrinen / parakrinen Weise durch MCP-1 selbst. Dies wiederum lockt inflammatorische Zellen an und aktiviert sie, was letztlich zu Fibrose führt [81;82]. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese Theorie.

6 Zusammenfassung

Mutationen des Surfactantprotein-C-Gens, SFTPC, stehen mit interstitiellen Lungenerkrankungen (ILD) in Zusammenhang. Eine Mutation im SFTPC-Gen verursacht vielfältige Erscheinungsbilder in Phänotyp und klinischen Erkrankungsmerkmalen. Dies war Anlass zur Untersuchung intra- und interzellulärer Veränderungen bestimmter Mutationen, die mittels einer alveolaren Typ-II-Zelllinie durchgeführt wurde, die Wildtyp proSP-C wie auch verschiedene mutierte proSP-C-Formen exprimierte.

Insgesamt ist festzuhalten, dass sowohl bei Wildtyp wie auch bei allen mutierten proSP-C Formen das Propeptid mit 21kDa detektiert werden konnte. Alle Fusionsproteine aus HA und proSP-C wiesen ein zusätzliches Abspaltungsprodukt von 1kDa auf. Die Mutationen P30L und I73T hatten keinen Einfluss auf die Größe der gefundenen Intermediate. Bei ihnen wurden genauso wie bei Wildtyp proSP-C eine 16kDa und eine 7kDa große Zwischenform nachgewiesen. L110R, P115L und A116D hatten eine 14kDa statt 16kDa große Zwischenform. L110R, P115L und L188Q hatten ein 11kDa statt 7kDa großes Intermediat.

Bei der Morphologie der Lamellarkörperchen bewirkt eine N-terminale Lage der Mutation (P30L) eine rudimentäre Ausbildung. Eine Non-BRICHOS-Mutation (I73T) kann zwei Arten, rudimentäre und besonders dichte Lamellarkörperchen, ausbilden. Die Mutationen der BRICHOS-Domäne können zum einen beide Sorten produzieren (A116D, L110R), zum anderen bilden sie nur rudimentäre Lamellarkörperchen (P115L, L188Q).

Die Expression von I73T und A116D führte zu einer intrazellulären Akkumulierung von proSP-C-Zwischenstufen. Es wurden mutierte proSP-C-Formen im frühen Endosom gefunden, was auf ein Wiederaufnehmen dieser proSP-C-Zwischenstufen aus dem umgebenden Medium schließen lässt.

I73T- oder A116D-exprimierende Zellen waren gegenüber exogenem Stress anfälliger. Wurden diese Zellen mit Medikamenten behandelt, die zur Zeit zur Behandlung von interstitiellen Lungenerkrankungen verwendet werden, konnte eine Hochregulation der Chaperone Hsp90 und Calreticulin beobachtet werden.

Lipidanalysen zeigten, dass Zellen mit der I73T- oder A116D-Mutation verminderte Level von Phosphatidylcholin (PC) aufwiesen, während die Menge an toxischem Lysophosphatidylcholin (LPC) anstieg. Die Behandlung der I73T-mutierten Zellen mit

Methylprednisolon oder Hydroxychloroquin konnte niedrige Phosphatidylcholinspiegel zwar anheben, aber nicht auf Normalniveau erhöhen. Der Anstieg von Lyso-PC konnte verringert, wenn auch nicht komplett aufgehoben werden. Auf A116D-mutierte Zellen hatten Methylprednisolon und Hydroxychloroquin keinen Einfluss. Insgesamt sezernierten die Mutanten weniger Lipide in den Kulturüberstand als der Wildtyp. Auf Ebene der Fettsäuren konnten ebenfalls signifikante Änderungen festgestellt werden. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass die Prozesse der Lipidauswahl tiefgreifender gestört sind.

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass I73T- und A116D-exprimierende Zellen lösliche Faktoren in das umliegende Medium absondern, die zu einem Anstieg der Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren CCR-2 und CXCR-1 auf CD4+ Lymphozyten und CXCR-1 auf Neutrophilen führten.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass murine alveolare Typ-II-Zelllinien ein mögliches Modellsystem zur Untersuchung verschiedener Effekte von mutiertem proSP-C *in vitro* sind. Es wurden gegenüber Wildtyp exprimierenden Zellen bei Mutation exprimierenden Zellen Unterschiede in der Prozessierung, der Lamellarkörperchenmorphologie, der intrazellulärer Lokalisierung, der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber exogenen Stressfaktoren, der Hitzeschockproteinexpression, der Lipidzusammensetzung und der Produktion von löslichen Faktoren, die die Oberflächenrezeptorexpression auf Immunsystem-relevanten Zellen modulieren, identifiziert.

7 Anhang

7.1 Datenverzeichnis

7.1.1 Viabilitätstests

Vor der Weiterverarbeitung der Zellen wurde jedes Mal die Vitalität mit Trypanblau getestet. Tabelle 18 zeigt einen Überblick über die durchgeführten Auszählungen. Da der Umfang dieser Untersuchungen den Rahmen der Tabelle sprengt, werden Stichproben aufgeführt. War der Anteil toter Zellen unterhalb von 4 %, wurden die Zellen verwertet. Zum Teil wurde die Methode auch angewendet, um an die Lebendzellzahl zu gelangen. Ausgezählt wurden die Zellen mittels einer Neubauer Zählkammer (siehe Methoden).

	ausgezählte Gesamtzellzahl	davon lebende Zellen	Anteil tote Zellen [%]	behandelt mit 10µM
MLE-12	325000	317200	2,4	
	412000	399228	3,1	
A549	510000	490620	3,8	
	370000	361860	2,2	
MLE-12 pcDNA3/HA-hSP-C ^{Wt}	450000	437850	2,7	
transient transfiziert	361000	349448	3,2	
MLE-12 pcDNA3/HA-hSP-C ^{P30L}	490000	479710	2,1	
transient transfiziert	510000	497250	2,5	
MLE-12 pcDNA3/HA-hSP-C ^{I73T}	377000	366067	2,9	
transient transfiziert	455000	444080	2,4	
MLE-12 pcDNA3/HA-hSP-C ^{L110R}	337000	329923	2,1	
transient transfiziert	424000	412128	2,8	
MLE-12 pcDNA3/HA-hSP-C ^{P115L}	522000	503730	3,5	
transient transfiziert	382000	374742	1,9	
MLE-12 pcDNA3/HA-hSP-C ^{A116D}	462000	450912	2,4	
transient transfiziert	373000	362183	2,9	

	ausgezählte Gesamtzellzahl	davon lebende Zellen	Anteil tote Zellen [%]	behandelt mit 10 µM
MLE-12 pcDNA3/HA-hSP-C ^{L188Q}	502000	492964	1,8	
transient transfiziert	522000	510516	2,2	
MLE-12 pcDNA3/HA-hSP-C ^{Wt}	389000	378886	2,6	
stabil transfiziert	467000	456726	2,2	
MLE-12 pcDNA3/HA-hSP-C ^{P30L}	312000	302952	2,9	
MLE-12 pcDNA3/HA-hSP-C ^{I73T}	497000	487060	2,0	
stabil transfiziert	357000	348075	2,5	
MLE-12 pcDNA3/HA-hSP-C ^{L110R}	437000	423890	3,0	
stabil transfiziert	348000	341388	1,9	
MLE-12 pcDNA3/HA-hSP-C ^{P115L}	477000	466029	2,3	
stabil transfiziert	497000	483581	2,7	
MLE-12 pcDNA3/HA-hSP-C ^{A116D}	364000	355992	2,2	
stabil transfiziert	442000	433602	1,9	
MLE-12 pcDNA3/HA-hSP-C ^{L188Q}	324000	315576	2,6	
stabil transfiziert	411000	397437	3,3	
A549 pcDNA3/HA-hSP-C ^{Wt}	509000	500347	1,7	
transient transfiziert	369000	360882	2,2	
A549 pcDNA3/HA-hSP-C ^{P30L}	449000	436877	2,7	
transient transfiziert	360000	354240	1,6	
A549 pcDNA3/HA-hSP-C ^{I73T}	489000	479220	2,0	
transient transfiziert	509000	496784	2,4	
A549 pcDNA3/HA-hSP-C ^{L110R}	376000	368480	2,0	
transient transfiziert	454000	441742	2,7	
A549 pcDNA3/HA-hSP-C ^{P115L}	299000	288834	3,4	
transient transfiziert	386000	379052	1,8	
A549 pcDNA3/HA-hSP-C ^{A116D}	484000	472868	2,3	
transient transfiziert	344000	334368	2,8	
A549 pcDNA3/HA-hSP-C ^{L188Q}	424000	416792	1,7	
transient transfiziert	335000	327965	2,1	
MLE-12 pEGFP-N1/hSP-C ^{Wt}	464000	452400	2,5	
transient transfiziert	484000	474320	2,0	
MLE-12 pEGFP-N1/hSP-C ^{P30L}	351000	345033	1,7	
transient transfiziert	429000	418704	2,4	
MLE-12 pEGFP-N1/hSP-C ^{I73T}	349000	338181	3,1	

	ausgezählte Gesamtzellzahl	davon lebende Zellen	Anteil tote Zellen [%]	behandelt mit 10µM
transient transfiziert	478000	470830	1,5	
MLE-12 pEGFP-N1/hSP-C ^{L110R}	498000	488040	2,0	
transient transfiziert	365000	355875	2,5	
MLE-12 pEGFP-N1/hSP-C ^{P115L}	443000	436798	1,4	
transient transfiziert	363000	356466	1,8	
MLE-12 pEGFP-N1/hSP-C ^{A116D}	492000	481176	2,2	
transient transfiziert	512000	502784	1,8	
MLE-12 pEGFP-N1/hSP-C ^{L188Q}	379000	369525	2,5	
transient transfiziert	457000	442376	3,2	
A549 pEGFP-N1/hSP-C ^{Wt}	377000	370968	1,6	
transient transfiziert	506000	495374	2,1	
A549 pEGFP-N1/HSP-C ^{P30L}	526000	512324	2,6	
transient transfiziert	393000	387105	1,5	
A549 pEGFP-N1/hSP-C ^{I73T}	471000	462051	1,9	
transient transfiziert	391000	382007	2,3	
A549 pEGFP-N1/hSP-C ^{L110R}	520000	510640	1,8	
transient transfiziert	540000	531900	1,5	
A549 pEGFP-N1/hSP-C ^{P115L}	407000	398046	2,2	
transient transfiziert	485000	470935	2,9	
A549 pEGFP-N1/hSP-C ^{A116D}	405000	399735	1,3	
transient transfiziert	534000	524388	1,8	
A549 pEGFP-N1/hSP-C ^{L188Q}	554000	541258	2,3	
transient transfiziert	421000	415948	1,2	
MLE-12 pEGFP-C1/hSP-C ^{Wt}	499000	491016	1,6	
transient transfiziert	419000	410620	2,0	
MLE-12 pEGFP-C1/hSP-C ^{P30L}	548000	539232	1,6	
transient transfiziert	568000	554936	2,3	
MLE-12 pEGFP-C1/hSP-C ^{I73T}	435000	421950	3,0	
transient transfiziert	513000	505818	1,4	
MLE-12 pEGFP-C1/hSP-C ^{L110R}	484000	467060	3,5	
transient transfiziert	404000	396324	1,9	
MLE-12 pEGFP-C1/hSP-C ^{P115L}	533000	520208	2,4	
transient transfiziert	553000	536963	2,9	

	ausgezählte Gesamtzellzahl	davon lebende Zellen	Anteil tote Zellen [%]	behandelt mit 10µM
MLE-12 pEGFP-C1/hSP-C ^{A116D}	420000	412440	1,8	
transient transfiziert	498000	487044	2,2	
MLE-12 pEGFP-C1/hSP-C ^{L188Q}	469000	456806	2,6	
transient transfiziert	389000	380831	2,1	
A549 pEGFP-N1/hSP-C ^{Wt}	518000	508676	1,8	
transient transfiziert	538000	524550	2,5	
A549 pEGFP-N1/hSP-C ^{P30L}	405000	392040	3,2	
transient transfiziert	483000	475272	1,6	
A549 pEGFP-N1/hSP-C ^{I73T}	454000	444466	2,1	
transient transfiziert	374000	364276	2,6	
A549 pEGFP-N1/hSP-C ^{L110R}	503000	495455	1,5	
transient transfiziert	523000	513063	1,9	
A549 pEGFP-N1/hSP-C ^{P115L}	390000	381030	2,3	
transient transfiziert	468000	459108	1,9	
A549 pEGFP-N1/hSP-C ^{A116D}	439000	427586	2,6	
transient transfiziert	359000	347153	3,3	
A549 pEGFP-N1/hSP-C ^{L188Q}	488000	479704	1,7	
transient transfiziert	508000	488696	3,8	
MLE-12 pcDNA3/HA-hSP-C ^{Wt}	466000	457612	1,8	Cyclophosphamid
stabil transfiziert	386000	379824	1,6	
	405000	394065	2,7	Azathioprin
	483000	466578	3,4	
	403000	395746	1,8	Methylprednisolon
	532000	511252	3,9	
	552000	539304	2,3	Hydroxychloroquin
	419000	407268	2,8	

	ausgezählte Gesamtzellzahl	davon lebende Zellen	Anteil tote Zellen [%]	behandelt mit 10µM
MLE-12 pcDNA3/HA-hSP-C ^{P30L}	497000	480599	3,3	Cyclophosphamid
stabil transfiziert	417000	407826	2,2	
	546000	531804	2,6	Azathioprin
	566000	549020	3,0	
	433000	422175	2,5	Methylprednisolon
	511000	499758	2,2	
	431000	418501	2,9	Hydroxychloroquin
	560000	539840	3,6	
MLE-12 pcDNA3/HA-hSP-C ^{I73T}	580000	568400	2,0	Cyclophosphamid
stabil transfiziert	447000	435825	2,5	
	525000	509250	3,0	Azathioprin
	496000	486576	1,9	
	416000	406432	2,3	Methylprednisolon
	545000	530285	2,7	
	565000	552005	2,3	Hydroxychloroquin
	432000	419040	3,0	
MLE-12 pcDNA3/HA-hSP-C ^{L110R}	510000	491130	3,7	Cyclophosphamid
stabil transfiziert	481000	470899	2,1	
	401000	387767	3,3	Azathioprin
	530000	518340	2,2	
	550000	539000	2,0	Methylprednisolon
	417000	404073	3,1	
	495000	476190	3,8	Hydroxychloroquin
	466000	455748	2,2	
MLE-12 pcDNA3/HA-hSP-C ^{P115L}	386000	373262	3,3	Cyclophosphamid
stabil transfiziert	515000	501095	2,7	
	535000	517880	3,2	Azathioprin
	402000	387126	3,7	
	480000	467520	2,6	Methylprednisolon
	451000	437470	3,0	
	371000	358386	3,4	Hydroxychloroquin
	500000	485500	2,9	

	ausgezählte Gesamtzellzahl	davon lebende Zellen	Anteil tote Zellen [%]	behandelt mit 10µM
MLE-12 pcDNA3/HA-hSP-C ^{A116D}	520000	506480	2,6	Cyclophosphamid
stabil transfiziert	478000	462226	3,3	
	398000	384866	3,3	Azathioprin
	417000	406992	2,4	
	495000	480645	2,9	Methylprednisolon
	415000	400890	3,4	
	544000	531488	2,3	Hydroxychloroquin
	564000	548772	2,7	
MLE-12 pcDNA3/HA-hSP-C ^{L188Q}	431000	417639	3,1	Cyclophosphamid
stabil transfiziert	509000	495257	2,7	
	429000	414414	3,4	Azathioprin
	558000	540144	3,2	
	578000	563550	2,5	Methylprednisolon
	445000	428535	3,7	
	523000	509402	2,6	Hydroxychloroquin
	443000	432368	2,4	

Tabelle 18: Vitalitätstests, durchgeführt mittels Trypanblaufärbung. Tote Zellen unterscheiden sich von lebenden Zellen dadurch, dass sie sich mit Trypanblau anfärben lassen. Zur Auszählung wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet.

7.1.2 Zelluläre Lipidzusammensetzung

Es wurden stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C transfizierte MLE-12-Zellen untersucht. Die Zellen wurden unbehandelt (-), mit 10µM Methylprednisolon (+Met) oder mit 10µM Hydroxychloroquin (+Hyd) für 24 Stunden inkubiert und anschließend lysiert. Der zugehörige serumfreie Kulturüberstand (KÜ) wurde ebenfalls untersucht. Es wurde ein Vorversuch durchgeführt, bei dem nur das Zelllysate ohne Abgleich auf das Gesamtprotein gemessen wurde. Beim Hauptversuch wurden Zelllysate und Kulturüberstand jeweils auf den Gesamtproteingehalt bezogen und vermessen (siehe Tabelle 19).

Verwendeter Vektor in stabil transfizierten MLE-12-Zellen	Behandlung mit	Gesamtprotein [µg/ml]
pcDNA3/HA-hSP-C ^{Wt}	-	343
pcDNA3/HA-hSP-C ^{Wt}	-	416
pcDNA3/HA-hSP-C ^{Wt}	-	324
pcDNA3/HA-hSP-C ^{Wt}	+ Hyd	419
pcDNA3/HA-hSP-C ^{Wt}	+ Hyd	321
pcDNA3/HA-hSP-C ^{Wt}	+ Hyd	308
pcDNA3/HA-hSP-C ^{Wt}	+ Met	264
pcDNA3/HA-hSP-C ^{Wt}	+ Met	355
pcDNA3/HA-hSP-C ^{Wt}	+ Met	647
pcDNA3/HA-hSP-C ^{I73T}	-	334
pcDNA3/HA-hSP-C ^{I73T}	-	321
pcDNA3/HA-hSP-C ^{I73T}	-	336
pcDNA3/HA-hSP-C ^{I73T}	+ Hyd	266
pcDNA3/HA-hSP-C ^{I73T}	+ Hyd	320
pcDNA3/HA-hSP-C ^{I73T}	+ Hyd	691
pcDNA3/HA-hSP-C ^{I73T}	+ Met	395
pcDNA3/HA-hSP-C ^{I73T}	+ Met	338
pcDNA3/HA-hSP-C ^{I73T}	+ Met	348
pcDNA3/HA-hSP-C ^{A116D}	-	385
pcDNA3/HA-hSP-C ^{A116D}	-	411
pcDNA3/HA-hSP-C ^{A116D}	-	399
pcDNA3/HA-hSP-C ^{A116D}	+ Hyd	688
pcDNA3/HA-hSP-C ^{A116D}	+ Hyd	529
pcDNA3/HA-hSP-C ^{A116D}	+ Hyd	423
pcDNA3/HA-hSP-C ^{A116D}	+ Met	402
pcDNA3/HA-hSP-C ^{A116D}	+ Met	607
pcDNA3/HA-hSP-C ^{A116D}	+ Met	331

Tabelle 19: Verwendete MLE-12-Zellen für die Lipiduntersuchung, Hauptversuch. Linke Spalte: Vektor mit dem die MLE-12-Zellen stabil transfiziert wurden. Mittlere Spalte: - steht für unbehandelte Zellen, +Met steht für eine 24 Std. Inkubation mit 10µM Methylprednisolon, +Hyd steht für eine 24 Std. Inkubation mit 10µM Hydroxychloroquin. Rechte Spalte: Gesamtprotein des Zelllysats und des zugehörigen serumfreien Kulturüberstandes.

7.1.2.1 Originalmessdaten Lipide - Vorversuch

In Tabelle 20 sind die Originalmessdaten der massenspektrometrischen Untersuchung der Lipide aufgeführt. Beim Vorversuch wurden die Gesamtphospholipide in nmol lipid gemessen. Alle anderen Unterspezies sind als prozentualer Anteil der Gesamtphospholipide wiedergegeben. Aus technischen Gründen wurden Phosphatidylglycerol und Phosphatidylinositol nicht gemessen.

	[nmol lipid/mg Protein]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]
File Name	Total Lipids	PC	SPM	DihSPM	PE	Pla	PS	LPC	Cer	GluCer	CE	FC
Zelle_Wt_basal	58,91	17,42%	1,42%	0,17%	10,36%	1,23%	6,76%	22,48%	5,37%	1,60%	10,90%	22,29%
Zelle_Wt_basal	62,68	17,61%	1,36%	0,15%	11,03%	1,96%	5,91%	18,36%	7,74%	1,25%	10,77%	23,86%
Zelle_Wt_basal	55,12	16,42%	1,22%	0,11%	9,18%	1,30%	5,85%	24,09%	6,89%	1,67%	10,12%	23,16%
Zelle_Wt_basal	66,99	16,55%	1,42%	0,15%	10,65%	1,24%	4,71%	20,21%	9,61%	1,14%	9,74%	24,58%
Zelle_Wt_basal	60,16	18,04%	1,49%	0,10%	11,49%	1,02%	5,82%	19,17%	7,67%	1,69%	8,17%	25,34%
Zelle_Wt_Hyd	59,91	16,44%	1,34%	0,22%	9,71%	2,07%	3,58%	29,84%	5,56%	1,78%	9,92%	19,55%
Zelle_Wt_Hyd	54,53	19,20%	1,44%	0,16%	12,39%	2,24%	4,79%	25,39%	0,00%	0,00%	12,14%	22,25%
Zelle_Wt_Hyd	59,94	16,22%	1,27%	0,20%	10,86%	1,29%	4,31%	28,31%	7,07%	2,18%	10,30%	18,00%
Zelle_Wt_Hyd	45,92	18,57%	1,30%	0,13%	11,84%	1,24%	4,89%	22,86%	8,31%	1,88%	9,67%	19,31%
Zelle_Wt_Hyd	57,50	16,16%	1,10%	0,14%	9,87%	0,92%	3,95%	25,21%	6,38%	1,87%	10,01%	24,40%
Zelle_Wt_Met	58,27	16,44%	1,39%	0,21%	12,13%	1,98%	4,67%	18,14%	6,72%	1,57%	12,83%	23,92%
Zelle_Wt_Met	63,00	15,85%	1,37%	0,26%	10,56%	2,13%	5,07%	23,44%	6,00%	1,66%	10,62%	23,03%
Zelle_Wt_Met	58,99	17,82%	1,53%	0,25%	10,70%	2,65%	5,13%	17,92%	7,12%	2,10%	9,40%	25,38%
Zelle_Wt_Met	60,69	15,45%	1,33%	0,20%	11,37%	2,11%	4,79%	21,87%	7,04%	1,83%	10,51%	23,50%
Zelle_Wt_Met	62,38	15,14%	1,40%	0,24%	8,17%	1,78%	4,45%	28,16%	6,47%	1,56%	10,89%	21,74%

	[nmol lipid/mg Protein]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]
File Name	Total Lipids	PC	SPM	DihSPM	PE	Pla	PS	LPC	Cer	GluCer	CE	FC
Zelle_I73T_basal	22,94	14,65%	1,21%	0,28%	8,52%	0,86%	3,15%	30,62%	9,31%	1,53%	10,96%	18,89%
Zelle_I73T_basal	30,18	16,02%	1,22%	0,17%	10,88%	0,63%	3,64%	21,85%	11,70%	2,58%	11,52%	19,78%
Zelle_I73T_basal	20,44	16,54%	1,42%	0,25%	10,12%	1,07%	4,23%	16,87%	10,94%	1,91%	14,31%	22,35%
Zelle_I73T_basal	19,59	13,74%	1,19%	0,12%	8,25%	1,78%	3,26%	17,78%	10,22%	1,74%	18,34%	23,57%
Zelle_I73T_basal	15,85	14,11%	1,17%	0,11%	7,57%	1,01%	3,59%	22,92%	9,65%	0,00%	17,64%	22,23%
Zelle_I73T_basal	19,91	17,14%	1,32%	0,17%	9,98%	0,69%	3,53%	30,37%	5,78%	0,00%	6,38%	24,63%
Zelle_I73T_basal	21,81	14,45%	1,30%	0,20%	10,04%	0,72%	3,89%	33,84%	7,62%	0,00%	5,54%	22,40%
Zelle_I73T_basal	17,18	13,97%	1,18%	0,26%	9,70%	0,89%	3,63%	34,97%	5,56%	0,00%	6,45%	23,39%
Zelle_I73T_basal	14,84	13,35%	1,08%	0,14%	7,45%	0,69%	3,11%	41,83%	4,35%	0,00%	5,21%	22,80%
Zelle_I73T_basal	15,60	13,79%	0,94%	0,09%	6,77%	0,42%	3,33%	40,26%	5,97%	0,00%	5,54%	22,90%
Zelle_I73T_Hyd	17,90	13,21%	0,58%	0,19%	7,08%	1,22%	2,58%	28,53%	10,69%	1,39%	12,66%	21,87%
Zelle_I73T_Hyd	18,67	15,57%	0,85%	0,21%	8,15%	1,18%	2,48%	24,38%	12,52%	1,08%	13,14%	20,45%
Zelle_I73T_Hyd	16,89	13,29%	0,76%	0,08%	7,55%	0,89%	3,66%	30,48%	12,88%	0,00%	12,35%	18,05%
Zelle_I73T_Hyd	20,67	12,13%	0,84%	0,10%	7,38%	0,94%	2,65%	37,46%	9,25%	1,26%	10,59%	17,39%
Zelle_I73T_Hyd	16,51	14,52%	1,02%	0,06%	10,13%	0,99%	3,41%	30,01%	11,24%	0,00%	11,28%	17,34%
Zelle_I73T_Hyd	20,45	13,31%	0,95%	0,18%	7,35%	0,30%	2,22%	45,81%	7,22%	0,00%	5,01%	17,66%
Zelle_I73T_Hyd	19,19	15,53%	1,13%	0,25%	8,30%	0,66%	3,68%	39,70%	5,16%	0,00%	5,53%	20,08%
Zelle_I73T_Hyd	13,32	14,86%	1,19%	0,05%	7,67%	0,74%	3,25%	36,57%	7,32%	0,00%	5,58%	22,78%
Zelle_I73T_Hyd	15,25	13,57%	1,05%	0,08%	7,98%	1,14%	3,46%	40,62%	6,15%	0,00%	5,96%	20,00%
Zelle_I73T_Hyd	27,36	17,75%	1,19%	0,17%	11,28%	1,26%	3,63%	27,15%	8,46%	2,35%	5,95%	20,82%
Zelle_I73T_Met	25,54	14,77%	1,26%	0,19%	8,66%	0,96%	3,37%	27,52%	10,31%	1,06%	11,53%	20,38%
Zelle_I73T_Met	29,20	13,61%	1,08%	0,11%	7,96%	0,79%	3,20%	30,15%	10,80%	2,43%	12,68%	17,19%
Zelle_I73T_Met	26,64	10,70%	1,07%	0,15%	7,59%	0,80%	3,12%	39,91%	9,63%	1,22%	9,68%	16,12%
Zelle_I73T_Met	24,11	13,03%	1,21%	0,23%	9,06%	0,84%	3,20%	27,70%	9,10%	1,66%	13,27%	20,70%
Zelle_I73T_Met	24,67	14,93%	1,34%	0,28%	10,78%	0,96%	3,59%	24,86%	9,57%	1,88%	12,37%	19,44%
Zelle_I73T_Met	20,28	15,00%	1,16%	0,18%	11,15%	0,78%	3,89%	32,40%	7,09%	0,00%	5,56%	22,79%
Zelle_I73T_Met	21,61	16,32%	1,18%	0,21%	9,62%	1,01%	3,45%	29,40%	7,03%	1,77%	5,34%	24,66%
Zelle_I73T_Met	17,40	13,64%	1,00%	0,21%	6,81%	0,50%	3,05%	35,82%	7,50%	1,62%	5,25%	24,62%
Zelle_I73T_Met	17,68	15,14%	1,11%	0,21%	9,61%	0,85%	3,83%	31,60%	7,21%	0,00%	5,21%	25,24%
Zelle_I73T_Met	18,84	14,46%	1,22%	0,14%	10,09%	0,61%	2,49%	35,16%	5,57%	0,00%	6,10%	24,16%

	[nmol lipid/mg Protein]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]	[% Total L]
File Name	Total Lipids	PC	SPM	DihSPM	PE	Pla	PS	LPC	Cer	GluCer	CE	FC
Zelle_A116D_basal	6,38	12,17%	1,28%	0,15%	8,27%	0,00%	8,67%	23,46%	7,61%	0,00%	12,56%	25,82%
Zelle_A116D_basal	6,21	26,78%	2,61%	0,13%	8,04%	1,14%	5,50%	10,82%	6,29%	0,00%	10,01%	28,69%
Zelle_A116D_basal	8,26	8,07%	0,97%	0,11%	4,90%	0,00%	2,52%	43,58%	4,67%	0,00%	10,15%	25,02%
Zelle_A116D_basal	6,79	7,71%	0,61%	0,09%	4,27%	0,00%	3,78%	47,33%	5,89%	0,00%	10,63%	19,69%
Zelle_A116D_basal	6,65	7,61%	0,97%	0,00%	4,64%	0,68%	3,98%	42,61%	6,76%	0,00%	11,67%	21,08%
Zelle_A116D_Hyd	6,72	7,24%	0,71%	0,16%	5,23%	0,00%	8,57%	36,24%	7,41%	0,00%	8,94%	25,50%
Zelle_A116D_Hyd	6,23	11,28%	1,18%	0,18%	5,89%	0,00%	5,74%	27,62%	7,29%	0,00%	12,48%	28,34%
Zelle_A116D_Hyd	5,51	9,59%	1,18%	0,32%	3,14%	0,00%	5,56%	26,64%	11,91%	3,77%	13,35%	24,54%
Zelle_A116D_Hyd	6,39	13,32%	0,91%	0,12%	8,99%	0,00%	4,80%	19,39%	11,70%	0,00%	13,19%	27,57%
Zelle_A116D_Hyd	6,57	15,82%	0,84%	0,27%	9,47%	0,85%	3,05%	29,56%	7,84%	0,00%	11,26%	21,04%
Zelle_A116D_Met	10,25	10,52%	1,11%	0,13%	8,11%	0,95%	6,58%	29,08%	5,23%	0,00%	12,53%	25,76%
Zelle_A116D_Met	8,81	9,23%	1,33%	0,15%	6,90%	0,67%	5,32%	32,30%	9,19%	0,00%	11,46%	23,46%
Zelle_A116D_Met	10,43	9,24%	1,28%	0,08%	7,39%	0,58%	4,13%	34,79%	8,11%	2,31%	9,53%	22,56%
Zelle_A116D_Met	8,11	8,21%	0,93%	0,08%	6,52%	0,00%	3,89%	39,95%	7,81%	0,00%	10,59%	22,02%
Zelle_A116D_Met	9,51	8,08%	1,22%	0,08%	6,61%	1,20%	3,77%	39,02%	5,09%	0,00%	11,01%	23,93%

Tabelle 20: Massenspektrometrische Auswertung der Lipidzusammensetzung, Vorversuch. Gemessen wurden stabil mit pcDNA3/HA-hSP-C transfizierte MLE-12-Zellen (Zelle) und der zugehörige Kulturüberstand (KÜ), unbehandelt (basal), mit 10µM Methylprednisolon (Met) oder 10µM Hydroxychloroquin (Hyd) behandelt. Zielparameter der Messung waren die Gesamtlipide (Total L), Phosphatidylcholin (PC), Sphingomyelin (SPM), Dihydro-Sphingomyelin (DihSPM), Phosphatidylethanolamin (PE), Plasmalogen (Pla), Phosphatidylserin (PS), Lysophosphatidylcholin (LPC), Ceramid (Cer), Glucosylceramid (GluCer), Cholesterolester (CE) und Freies Cholesterol (FC).

7.1.2.2 Originalmessdaten Lipide - Hauptversuch

Beim Hauptversuch wurden die Gesamphospholipide in nmol lipid gemessen und auf mg Gesamtprotein des Zelllysates oder des zugehörigen Kulturüberstandes bezogen. Alle anderen Unterspezies sind als prozentualer Anteil der Gesamphospholipide wiedergegeben (siehe Tabelle 21). Aus technischen Gründen wurden Cholesterin, Cholesterolester und Phosphatidylinositol nicht gemessen.

	[nmol lipid/mg Protein]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]
File Name	Total Phospholipids	PC	SPM	DihSPM	PE	Pla	PS	PG	LPC	Cer	GluCer
Zelle_Wt_basal	147,32	58,20%	6,21%	0,46%	10,96%	15,30%	6,50%	0,29%	0,47%	1,81%	0,09%
Zelle_Wt_basal	147,25	56,71%	6,51%	0,71%	11,79%	15,01%	6,61%	0,31%	0,64%	1,91%	0,10%
Zelle_Wt_basal	163,95	58,49%	5,92%	0,40%	10,90%	15,43%	6,42%	0,28%	0,56%	1,80%	0,09%
Zelle_Wt_Hyd	191,34	58,49%	5,99%	0,57%	12,34%	14,25%	6,10%	0,30%	0,48%	1,65%	0,13%
Zelle_Wt_Hyd	177,75	58,30%	6,03%	0,55%	11,98%	14,32%	6,27%	0,28%	0,70%	1,73%	0,13%
Zelle_Wt_Hyd	197,04	58,46%	6,02%	0,54%	11,91%	14,33%	6,15%	0,30%	0,77%	1,69%	0,13%
Zelle_Wt_Met	147,20	57,64%	6,06%	0,54%	10,16%	15,99%	6,87%	0,31%	0,78%	1,87%	0,10%
Zelle_Wt_Met	148,17	57,95%	6,08%	0,55%	10,90%	15,45%	6,62%	0,29%	0,56%	1,79%	0,09%
Zelle_Wt_Met	119,97	55,89%	6,58%	0,93%	12,07%	15,46%	6,42%	0,35%	0,61%	1,95%	0,09%
Zelle_I73T_basal	142,95	52,76%	5,69%	0,36%	15,61%	16,05%	6,86%	0,27%	0,98%	1,76%	0,12%
Zelle_I73T_basal	162,98	53,99%	5,50%	0,23%	14,48%	17,08%	6,35%	0,24%	1,01%	1,70%	0,10%
Zelle_I73T_basal	153,26	54,23%	5,38%	0,23%	14,01%	17,19%	6,41%	0,24%	0,99%	1,83%	0,10%
Zelle_I73T_Hyd	193,26	53,28%	5,13%	0,25%	16,19%	17,01%	5,87%	0,26%	0,55%	1,56%	0,17%
Zelle_I73T_Hyd	187,39	52,72%	5,27%	0,28%	16,91%	16,68%	5,86%	0,25%	0,58%	1,55%	0,16%
Zelle_I73T_Hyd	105,67	52,80%	5,94%	0,46%	17,36%	15,17%	5,63%	0,26%	0,67%	1,79%	0,17%
Zelle_I73T_Met	158,05	53,69%	5,11%	0,25%	13,00%	19,60%	5,90%	0,30%	0,49%	1,86%	0,10%
Zelle_I73T_Met	148,43	49,86%	6,30%	0,45%	16,29%	18,00%	6,47%	0,27%	0,77%	1,72%	0,14%
Zelle_I73T_Met	135,75	52,71%	5,39%	0,27%	13,22%	19,49%	6,41%	0,27%	0,65%	1,76%	0,11%

	[nmol lipid/mg Protein]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]
Zelle_A116D_basal	125,40	52,65%	7,24%	0,52%	14,53%	15,08%	7,70%	0,26%	0,90%	1,56%	0,16%
Zelle_A116D_basal	116,50	52,84%	6,92%	0,48%	14,55%	14,98%	7,83%	0,26%	0,89%	1,60%	0,16%
Zelle_A116D_basal	137,64	52,96%	6,74%	0,47%	14,60%	15,17%	7,56%	0,27%	0,88%	1,68%	0,16%
Zelle_A116D_Hyd	108,96	54,40%	6,69%	0,66%	14,25%	14,78%	6,90%	0,29%	0,68%	1,45%	0,19%
Zelle_A116D_Hyd	126,72	53,75%	6,86%	0,66%	13,88%	15,53%	6,86%	0,27%	0,68%	1,58%	0,19%
Zelle_A116D_Hyd	134,47	53,31%	7,02%	0,67%	14,17%	15,14%	7,39%	0,27%	0,68%	1,43%	0,18%
Zelle_A116D_Met	121,70	51,25%	7,64%	0,74%	13,06%	16,78%	7,97%	0,30%	0,62%	1,76%	0,19%
Zelle_A116D_Met	56,78	52,36%	7,31%	0,47%	13,03%	15,90%	8,49%	0,27%	0,69%	1,61%	0,15%
Zelle_A116D_Met	135,73	52,39%	7,07%	0,45%	13,24%	16,16%	8,04%	0,31%	0,74%	1,77%	0,14%

	[nmol lipid/mg Protein]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]
File Name	Total Phospholipids	PC	SPM	DihSPM	PE	Pla	PS	PG	LPC	Cer	GluCer
KÜ_Wt_basal	20,68	44,60%	8,02%	0,55%	6,42%	18,09%	12,38%	0,23%	6,27%	3,60%	0,09%
KÜ_Wt_basal	16,68	44,70%	8,24%	0,75%	6,74%	18,71%	11,95%	0,21%	5,72%	3,11%	0,09%
KÜ_Wt_basal	24,35	44,80%	7,83%	0,60%	6,47%	19,25%	10,79%	0,26%	5,60%	3,20%	0,07%
KÜ_Wt_Hyd	42,48	49,52%	8,01%	0,63%	8,56%	18,36%	8,57%	0,30%	3,45%	2,80%	0,12%
KÜ_Wt_Hyd	40,59	49,26%	8,33%	0,65%	8,37%	18,24%	8,22%	0,24%	4,08%	2,73%	0,12%
KÜ_Wt_Hyd	34,25	48,25%	8,62%	0,70%	8,18%	18,02%	8,43%	0,21%	5,00%	2,68%	0,13%
KÜ_Wt_Met	21,49	46,46%	8,64%	0,63%	6,24%	18,63%	10,20%	0,18%	6,08%	3,03%	0,09%
KÜ_Wt_Met	19,45	46,32%	8,43%	0,70%	6,44%	19,04%	10,13%	0,23%	5,80%	3,06%	0,07%
KÜ_Wt_Met	9,38	44,77%	9,28%	0,87%	6,37%	19,78%	9,61%	0,21%	5,93%	3,30%	0,09%
KÜ_I73T_basal	16,17	35,10%	8,31%	0,46%	7,46%	18,33%	8,72%	0,19%	10,30%	3,14%	0,09%
KÜ_I73T_basal	26,52	35,12%	7,09%	0,32%	8,79%	18,06%	6,99%	0,25%	7,92%	3,18%	0,06%
KÜ_I73T_basal	15,35	35,12%	8,47%	0,40%	6,96%	16,65%	8,20%	0,24%	12,87%	2,71%	0,07%
KÜ_I73T_Hyd	32,80	47,59%	6,39%	0,39%	11,23%	19,17%	7,02%	0,28%	5,10%	2,99%	0,11%
KÜ_I73T_Hyd	25,40	47,07%	6,86%	0,43%	10,38%	18,19%	7,51%	0,20%	6,61%	2,82%	0,13%
KÜ_I73T_Hyd	11,86	44,03%	8,88%	0,51%	8,78%	16,84%	7,38%	0,13%	10,76%	2,67%	0,15%
KÜ_I73T_Met	17,94	46,59%	7,23%	0,35%	8,16%	19,74%	7,48%	0,26%	6,93%	3,44%	0,08%
KÜ_I73T_Met	13,53	38,52%	8,90%	0,61%	6,91%	18,50%	9,20%	0,13%	14,09%	3,13%	0,13%
KÜ_I73T_Met	20,24	47,42%	6,81%	0,40%	7,74%	20,30%	6,77%	0,28%	7,18%	3,30%	0,09%

	[nmol lipid/mg Protein]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]	[% Total PL]
KÜ_A116D_basal	13,08	39,40%	10,99%	0,57%	6,63%	15,00%	8,50%	0,11%	16,68%	2,14%	0,09%
KÜ_A116D_basal	13,17	38,40%	11,36%	0,58%	6,36%	14,64%	8,51%	0,10%	18,09%	1,96%	0,09%
KÜ_A116D_basal	12,32	38,43%	11,08%	0,50%	6,61%	16,67%	8,71%	0,09%	15,56%	2,34%	0,10%
KÜ_A116D_Hyd	10,24	41,10%	10,54%	0,59%	7,79%	15,24%	7,49%	0,15%	15,31%	1,82%	0,13%
KÜ_A116D_Hyd	13,00	40,82%	10,46%	0,68%	7,84%	16,06%	7,88%	0,17%	14,19%	1,95%	0,14%
KÜ_A116D_Hyd	16,42	40,18%	10,55%	0,55%	7,25%	14,10%	7,17%	0,16%	18,25%	1,83%	0,12%
KÜ_A116D_Met	12,48	39,51%	11,24%	0,55%	6,54%	15,75%	8,35%	0,18%	15,62%	2,32%	0,12%
KÜ_A116D_Met	9,32	40,53%	11,52%	0,46%	6,32%	14,53%	7,78%	0,16%	16,81%	1,97%	0,09%
KÜ_A116D_Met	13,50	37,65%	11,79%	0,55%	5,94%	14,63%	8,21%	0,11%	19,27%	1,86%	0,10%

Tabelle 21: Massenspektrometrische Auswertung der Lipidzusammensetzung, Hauptversuch. Gemessen wurden stabil mit pcDNA3/HA-hSP-C transfizierte MLE-12-Zellen (Zelle) und der zugehörige Kulturüberstand (KÜ), unbehandelt (basal), mit 10µM Methylprednisolon (Met) oder 10µM Hydroxychloroquin (Hyd) behandelt. Zielparameter der Messung waren die Gesamtlipide (Total PL), Phosphatidylcholin (PC), Sphingomyelin (SPM), Dihydro-Sphingomyelin (DihSPM), Phosphatidylethanolamin (PE), Plasmalogen (Pla), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylglycerol (PG), Lysophosphatidylcholin (LPC), Ceramid (Cer) und Glucosylceramid (GluCer).

Um den komplexen Datenbestand besser verarbeiten zu können, wurden alle Werte auf den Mittelwert von unbehandeltem Wildtyp proSP-C bezogen. Als Beispiel ist nachfolgend der Hauptversuch dargestellt.

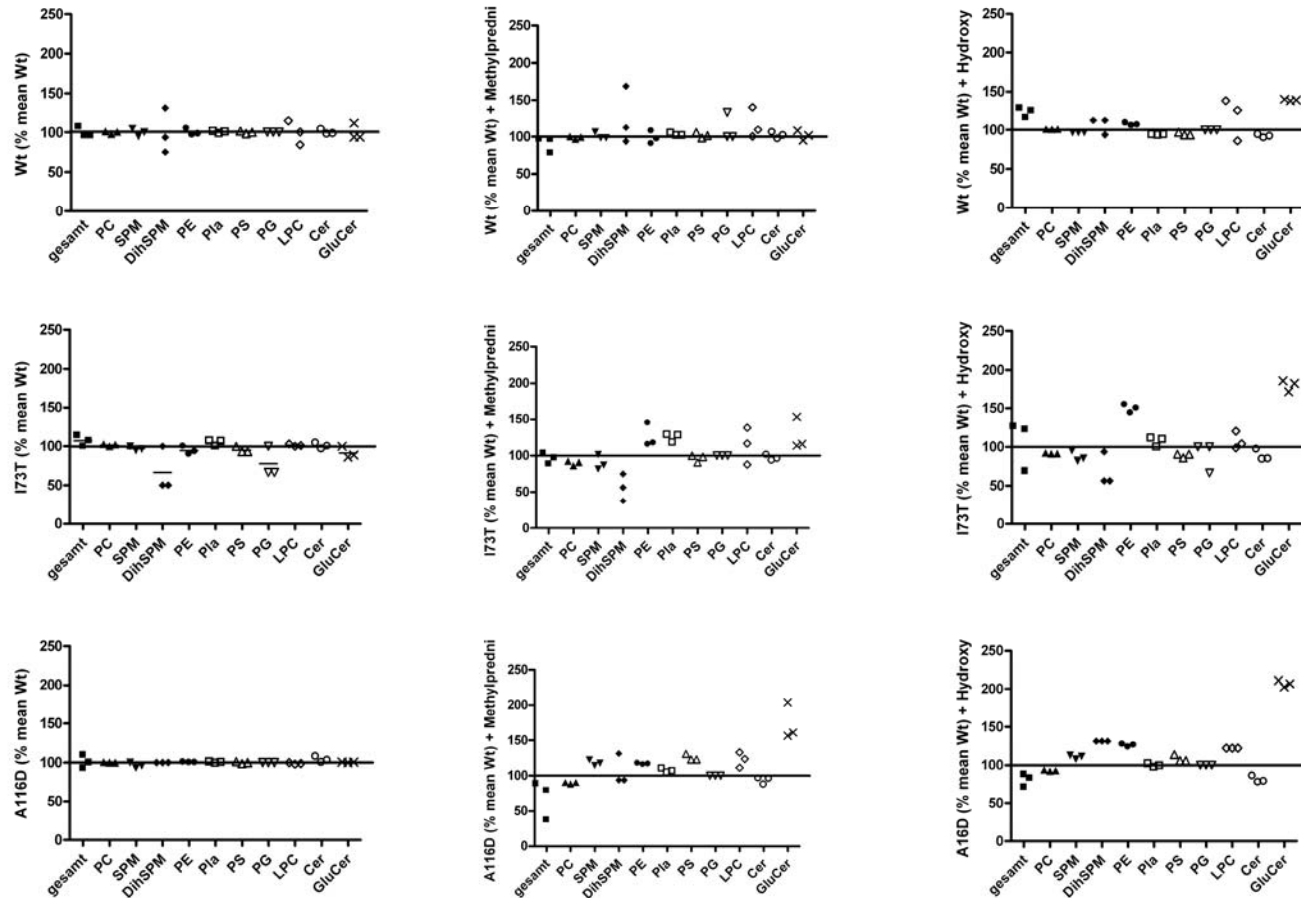


Abbildung 53: Darstellung der massenspektrometrischen Daten der Zelllysate, die sich auf den Mittelwert von Wildtyp proSP-C beziehen, Hauptversuch. Es wurden stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt}, 173T und A116D transfizierte MLE-12-Zellen gemessen. Dabei wurden die Gesamthospholipide (gesamt) in nmol lipid /mg Protein gemessen und die Unterspezies in % der Gesamthospholipide angegeben und dabei jeweils auf den Mittelwert von Wildtyp proSP-C bezogen. Die Zellen wurden 24 Stunden mit 10 μ M Methylprednisolon (+Methylpredni) oder 10 μ M Hydroxychloroquin (+Hydroxy) behandelt.

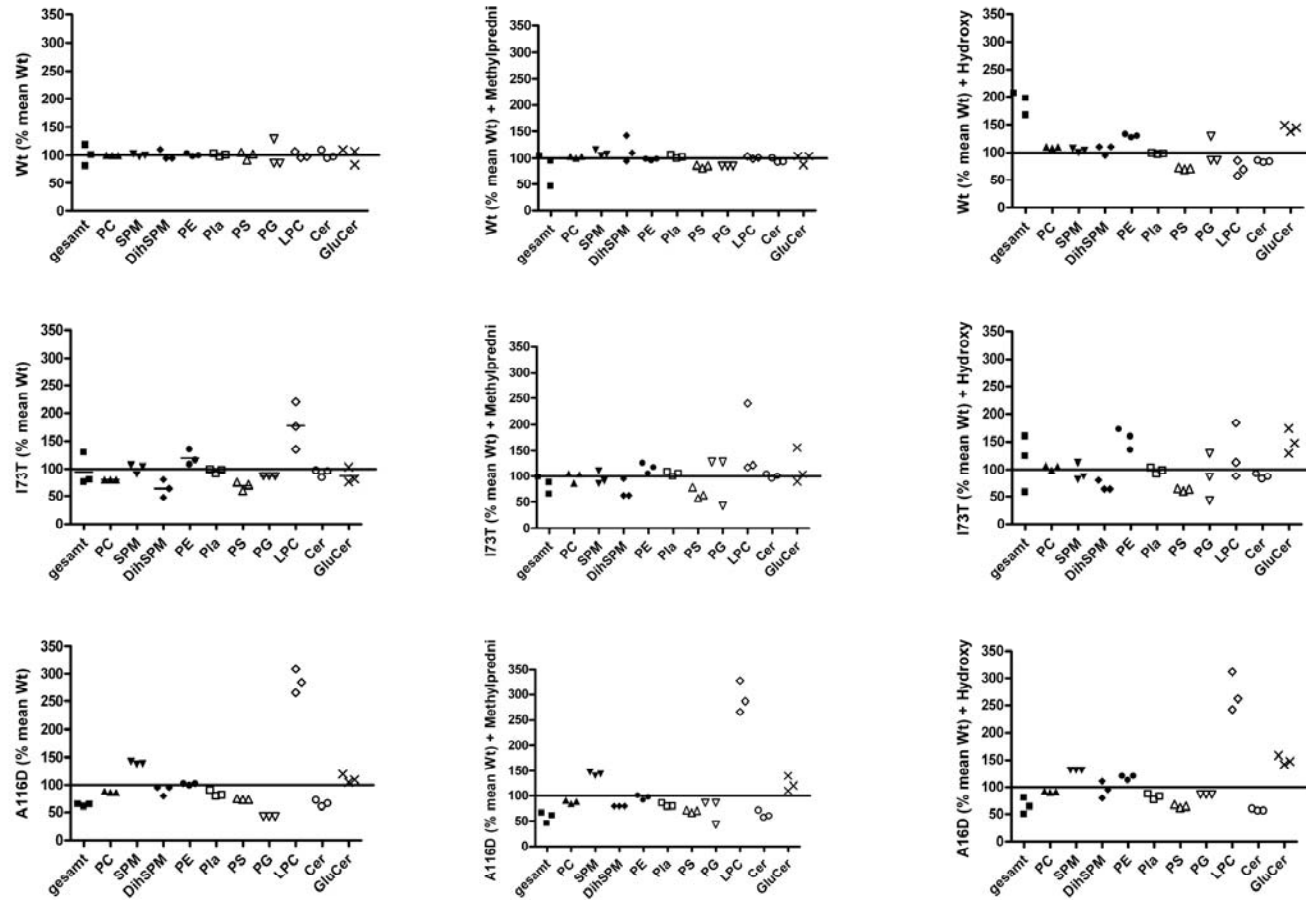


Abbildung 54: Darstellung der massenspektrometrischen Daten der Kulturüberstände, die sich auf den Mittelwert von Wildtyp proSP-C beziehen, Hauptversuch. Es wurde der Kulturüberstand von stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt, 173T und A116D} transfizierte MLE-12-Zellen gemessen. Dabei wurden die Gesamtphospholipide (gesamt) in nmol lipid /mg Protein gemessen und die Unterspezies in % der Gesamtphospholipide angegeben und dabei jeweils auf den Mittelwert von Wildtyp proSP-C bezogen. Die Zellen wurden 24 Stunden mit 10µM Methylprednisolon (+Methylpredni) oder 10µM Hydroxychloroquin (+Hydroxy) behandelt.

Die dargestellten Unterschiede wurden statistisch auf ihre Signifikanz geprüft und sind im Ergebnisteil näher beschrieben.

7.1.2.3 Originalmessdaten der Fettsäurekomponenten von Phosphatidylcholin

Dargestellt sind die Fettsäuren als prozentualer Anteil von Phosphatidylcholin. Von allen gemessenen Fettsäuren sind hier diejenigen gelistet, die einen relevanten Anteil ausmachen.

File Name	PC O 30:0	PC 30:1	PC 30:0	PC O 32:1	PC O 32:0	PC 32:2	PC 32:1	PC 32:0	PC O 34:1	PC 34:2	PC 34:1	PC 36:2	PC 36:1
Zelle_Wt_basal	1,75%	3,90%	4,19%	8,69%	2,96%	8,66%	30,89%	4,55%	3,77%	8,47%	11,58%	3,98%	1,22%
Zelle_Wt_basal	1,66%	4,06%	3,59%	8,30%	2,72%	8,95%	30,97%	4,40%	3,64%	9,21%	12,30%	3,92%	1,02%
Zelle_Wt_basal	1,94%	4,14%	3,58%	9,13%	2,97%	9,49%	30,75%	3,48%	3,98%	8,65%	11,08%	4,24%	1,12%
Zelle_Wt_basal	1,79%	4,01%	3,87%	9,09%	2,62%	8,55%	31,16%	3,81%	4,13%	8,81%	11,77%	3,62%	1,24%
Zelle_Wt_basal	2,13%	4,45%	3,95%	9,47%	2,92%	8,84%	31,29%	3,73%	3,75%	8,61%	10,86%	3,37%	1,06%
Zelle_A116D_basal	2,74%	3,00%	3,93%	7,49%	3,58%	3,72%	22,35%	3,46%	6,60%	8,76%	18,22%	5,89%	2,99%
Zelle_A116D_basal	1,36%	1,64%	1,19%	3,45%	0,96%	1,51%	10,78%	1,25%	2,05%	12,39%	27,61%	14,17%	3,11%
Zelle_A116D_basal	4,27%	4,08%	5,35%	8,42%	2,47%	4,76%	22,58%	2,69%	7,46%	8,16%	20,29%	5,72%	1,83%
Zelle_A116D_basal	3,01%	4,44%	4,17%	9,86%	3,16%	4,41%	22,65%	1,88%	6,60%	9,22%	15,42%	7,24%	2,29%
Zelle_A116D_basal	4,52%	6,98%	5,79%	9,41%	2,37%	3,85%	21,29%	2,86%	5,72%	6,92%	16,27%	6,68%	0,00%
Zelle_I73T_basal	2,70%	4,46%	5,47%	7,57%	3,15%	3,75%	28,69%	3,52%	3,94%	7,21%	18,08%	4,32%	1,86%
Zelle_I73T_basal	2,84%	3,77%	6,03%	7,34%	3,14%	2,87%	30,45%	4,32%	4,22%	5,99%	18,41%	4,36%	1,90%
Zelle_I73T_basal	2,97%	3,89%	6,88%	7,46%	3,16%	3,56%	28,83%	5,42%	3,63%	6,32%	17,89%	4,37%	1,07%
Zelle_I73T_basal	3,36%	4,01%	7,08%	6,65%	3,83%	2,98%	25,43%	5,64%	4,45%	6,05%	18,29%	4,23%	2,35%
Zelle_I73T_basal	3,04%	4,16%	6,97%	6,44%	3,52%	2,77%	24,37%	5,62%	4,38%	6,47%	18,95%	5,49%	2,09%
Zelle_I73T_basal	3,72%	4,63%	8,12%	5,60%	3,75%	4,37%	27,10%	5,45%	4,40%	7,13%	13,72%	4,54%	1,11%
Zelle_I73T_basal	3,42%	4,29%	9,17%	5,74%	4,14%	3,82%	25,89%	5,69%	4,19%	6,77%	14,65%	4,59%	1,13%
Zelle_I73T_basal	3,90%	3,98%	8,98%	7,23%	3,75%	3,96%	26,07%	5,30%	4,81%	6,33%	13,99%	4,59%	1,55%
Zelle_I73T_basal	3,36%	4,14%	8,33%	6,44%	4,60%	3,65%	25,77%	6,67%	4,29%	7,58%	15,03%	4,24%	1,49%
Zelle_I73T_basal	3,65%	4,25%	8,66%	6,87%	3,46%	4,14%	23,91%	6,32%	4,96%	5,83%	16,00%	5,13%	1,34%

Tabelle 22: Massenspektrometrische Auswertung der Fettsäurekomponenten von PC, Vorversuch. Gemessen wurden stabil mit pcDNA3/HA-hSP-C transfizierte MLE-12-Zellen (Zelle), unbehandelt (basal).

File Name	PC O 30:0	PC 30:1	PC 30:0	PC O 32:1	PC O 32:0	PC 32:2	PC 32:1	PC 32:0	PC O 34:1	PC 34:2	PC 34:1	PC 36:2	PC 36:1
Zelle_Wt_basal	3,93%	2,46%	5,74%	8,59%	5,73%	3,17%	21,79%	5,49%	5,83%	7,23%	14,67%	5,31%	1,49%
Zelle_Wt_basal	3,24%	3,06%	5,51%	8,79%	4,26%	3,55%	25,67%	4,32%	5,06%	7,39%	14,93%	5,02%	1,53%
Zelle_Wt_basal	4,05%	2,44%	5,81%	8,62%	6,01%	3,17%	21,30%	5,74%	5,87%	7,27%	14,34%	5,25%	1,51%
Zelle_Wt_Hyd	3,50%	2,66%	5,51%	9,80%	5,02%	3,69%	25,01%	4,72%	5,68%	7,28%	13,81%	4,47%	1,34%
Zelle_Wt_Hyd	3,53%	2,67%	5,52%	9,64%	5,21%	3,66%	24,79%	4,76%	5,66%	7,32%	13,75%	4,49%	1,37%
Zelle_Wt_Hyd	3,50%	2,62%	5,47%	9,72%	5,12%	3,59%	24,63%	4,79%	5,81%	7,24%	13,91%	4,50%	1,36%
Zelle_Wt_Met	4,47%	2,53%	5,46%	10,26%	5,63%	2,86%	21,68%	4,23%	6,42%	6,70%	14,66%	4,88%	1,58%
Zelle_Wt_Met	4,40%	2,62%	5,72%	9,77%	5,48%	3,04%	22,21%	4,32%	6,01%	6,86%	14,74%	4,94%	1,51%
Zelle_Wt_Met	3,48%	3,28%	5,35%	9,84%	3,95%	3,36%	26,33%	3,49%	5,27%	6,86%	15,12%	4,55%	1,60%
Zelle_I73T_basal	3,49%	4,33%	7,11%	6,96%	3,21%	4,53%	24,40%	3,93%	3,93%	8,41%	13,86%	5,91%	0,93%
Zelle_I73T_basal	4,20%	3,18%	7,22%	7,09%	4,33%	3,50%	21,09%	4,99%	4,88%	7,54%	14,70%	6,06%	1,09%
Zelle_I73T_basal	4,27%	3,12%	7,16%	7,16%	4,30%	3,40%	21,15%	4,91%	4,90%	7,52%	15,06%	6,07%	1,11%
Zelle_I73T_Hyd	4,28%	3,28%	6,13%	8,66%	3,99%	4,10%	23,55%	3,52%	4,88%	8,16%	13,47%	5,95%	0,97%
Zelle_I73T_Hyd	4,29%	3,47%	6,24%	8,67%	3,97%	4,17%	23,90%	3,46%	4,80%	8,12%	13,21%	5,75%	0,93%
Zelle_I73T_Hyd	3,74%	4,62%	6,71%	7,74%	3,41%	5,40%	25,24%	3,59%	3,79%	8,79%	12,53%	5,27%	0,83%
Zelle_I73T_Met	5,33%	2,41%	4,86%	10,91%	4,54%	2,67%	19,83%	2,98%	6,31%	6,98%	14,87%	6,40%	1,19%
Zelle_I73T_Met	3,51%	4,31%	4,87%	9,41%	2,63%	4,19%	24,60%	1,93%	4,55%	8,42%	14,18%	6,48%	1,04%
Zelle_I73T_Met	5,11%	2,68%	4,96%	10,39%	4,25%	2,87%	20,27%	2,75%	6,05%	7,30%	15,00%	6,51%	1,20%
Zelle_A116D_basal	2,92%	4,67%	6,52%	7,63%	3,34%	4,42%	25,38%	3,68%	3,97%	8,23%	12,99%	6,08%	1,12%
Zelle_A116D_basal	2,93%	4,68%	6,47%	7,60%	3,21%	4,49%	25,36%	3,73%	3,93%	8,37%	13,01%	5,97%	1,19%
Zelle_A116D_basal	2,99%	4,59%	6,49%	7,62%	3,27%	4,39%	24,45%	3,73%	4,04%	8,50%	13,35%	6,26%	1,15%
Zelle_A116D_Hyd	2,99%	4,32%	5,39%	9,82%	3,56%	4,47%	27,44%	3,22%	4,07%	7,96%	12,31%	5,24%	1,09%
Zelle_A116D_Hyd	3,05%	4,40%	5,45%	9,80%	3,52%	4,44%	27,04%	3,09%	4,16%	7,99%	12,33%	5,36%	1,10%
Zelle_A116D_Hyd	3,02%	4,56%	5,67%	9,55%	3,49%	4,68%	27,37%	3,17%	4,03%	7,88%	12,09%	5,16%	1,04%
Zelle_A116D_Met	3,27%	4,50%	5,00%	10,17%	3,33%	3,59%	26,43%	2,33%	4,52%	7,25%	13,50%	5,74%	1,28%
Zelle_A116D_Met	3,99%	4,10%	6,53%	8,45%	4,21%	3,96%	23,10%	3,83%	4,59%	7,53%	13,30%	5,78%	1,25%
Zelle_A116D_Met	4,11%	3,93%	6,50%	8,72%	4,28%	3,79%	22,57%	3,76%	4,87%	7,48%	13,30%	5,76%	1,27%

File Name	PC O 30:0	PC 30:1	PC 30:0	PC O 32:1	PC O 32:0	PC 32:2	PC 32:1	PC 32:0	PC O 34:1	PC 34:2	PC 34:1	PC 36:2	PC 36:1
KÜ_Wt_basal	3,77%	1,37%	3,02%	12,20%	5,94%	1,42%	13,23%	3,31%	9,78%	4,77%	15,12%	4,95%	3,70%
KÜ_Wt_basal	3,67%	1,69%	3,40%	12,31%	5,66%	1,75%	15,89%	3,81%	9,06%	5,05%	14,78%	4,64%	3,24%
KÜ_Wt_basal	3,71%	1,22%	2,94%	12,28%	5,73%	1,56%	13,50%	3,27%	9,87%	4,87%	14,66%	5,20%	3,55%
KÜ_Wt_Hyd	2,96%	1,68%	3,79%	11,28%	5,36%	1,89%	18,96%	4,35%	8,20%	5,49%	15,24%	4,43%	2,82%
KÜ_Wt_Hyd	3,11%	1,78%	3,96%	10,77%	5,38%	1,86%	19,08%	4,64%	8,10%	5,57%	15,17%	4,23%	2,81%
KÜ_Wt_Hyd	2,97%	1,54%	3,89%	10,80%	5,31%	1,80%	18,49%	4,57%	7,89%	5,45%	15,78%	4,50%	3,14%
KÜ_Wt_Met	4,02%	1,30%	2,91%	13,23%	5,92%	1,36%	13,32%	2,86%	9,82%	4,72%	14,97%	4,72%	3,66%
KÜ_Wt_Met	4,03%	1,38%	2,99%	13,16%	5,81%	1,32%	13,82%	3,10%	9,89%	4,69%	14,91%	4,69%	3,56%
KÜ_Wt_Met	3,78%	1,58%	3,22%	13,56%	5,38%	1,33%	14,78%	3,06%	9,81%	4,55%	15,08%	4,53%	3,54%
KÜ_I73T_basal	3,87%	1,63%	3,96%	9,22%	4,31%	1,59%	14,59%	3,29%	7,19%	4,93%	17,07%	5,36%	4,14%
KÜ_I73T_basal	4,09%	1,77%	4,32%	8,88%	4,55%	1,96%	15,25%	3,57%	6,94%	5,60%	16,78%	5,62%	3,25%
KÜ_I73T_basal	3,90%	1,51%	4,02%	8,32%	4,52%	1,54%	13,21%	3,85%	6,85%	4,76%	17,22%	5,51%	4,52%
KÜ_I73T_Hyd	3,90%	2,10%	4,54%	10,27%	4,42%	2,25%	19,81%	3,29%	6,78%	6,12%	15,68%	5,42%	2,24%
KÜ_I73T_Hyd	3,75%	1,83%	4,20%	10,04%	4,47%	2,18%	18,16%	3,29%	6,96%	5,96%	15,88%	5,62%	2,77%
KÜ_I73T_Hyd	3,44%	2,00%	4,39%	8,68%	4,01%	2,16%	17,79%	3,52%	6,07%	5,59%	16,74%	5,35%	3,79%
KÜ_I73T_Met	5,14%	1,46%	3,10%	13,00%	5,13%	1,38%	14,52%	2,36%	8,76%	4,86%	15,76%	5,54%	2,95%
KÜ_I73T_Met	3,54%	1,74%	2,94%	11,26%	3,95%	1,53%	15,31%	2,26%	7,57%	4,95%	16,72%	5,69%	4,21%
KÜ_I73T_Met	5,09%	1,23%	2,89%	13,22%	5,08%	1,47%	14,26%	2,14%	8,97%	4,97%	15,74%	5,39%	2,79%
KÜ_A116D_basal	2,51%	1,97%	4,20%	7,04%	3,15%	2,10%	14,87%	3,63%	5,41%	5,58%	15,54%	6,06%	5,67%
KÜ_A116D_basal	2,50%	1,73%	4,22%	6,40%	3,23%	1,93%	13,75%	3,94%	4,98%	5,04%	16,09%	5,92%	6,26%
KÜ_A116D_basal	2,65%	1,87%	4,10%	7,11%	3,36%	1,86%	14,00%	4,08%	5,38%	5,15%	16,46%	6,03%	5,67%
KÜ_A116D_Hyd	2,50%	2,10%	4,21%	7,57%	3,53%	2,04%	18,00%	4,28%	5,27%	5,94%	16,04%	5,50%	4,41%
KÜ_A116D_Hyd	2,42%	1,89%	4,14%	7,98%	3,79%	2,20%	18,01%	4,10%	5,34%	6,28%	16,02%	5,66%	4,12%
KÜ_A116D_Hyd	2,42%	1,88%	4,05%	7,10%	3,20%	2,17%	16,94%	3,92%	5,08%	6,00%	16,29%	5,81%	5,03%
KÜ_A116D_Met	2,89%	2,31%	3,64%	8,35%	3,50%	1,76%	14,93%	3,07%	5,44%	5,35%	16,69%	5,88%	5,28%
KÜ_A116D_Met	2,76%	1,96%	3,94%	6,73%	3,35%	1,80%	13,49%	3,40%	5,17%	5,24%	16,50%	5,91%	5,90%
KÜ_A116D_Met	2,68%	1,27%	3,77%	6,28%	3,53%	1,57%	12,49%	3,99%	5,07%	5,04%	17,17%	5,98%	6,69%

Tabelle 23: Massenspektrometrische Auswertung der Fettsäurekomponenten von PC, Hauptversuch. Gemessen wurden stabil mit pcDNA3/HA-hSP-C transfizierte MLE-12-Zellen (Zelle) und der zugehörige Kulturüberstand (KÜ), unbehandelt (basal), mit 10µM Methylprednisolon (Met) oder 10µM Hydroxychloroquin (Hyd) behandelt.

Um den komplexen Datenbestand besser vergleichen zu können, wurden alle Werte auf den Mittelwert von unbehandeltem Wildtyp proSP-C bezogen. Dies ist hier an Hand des Hauptversuches dargestellt.

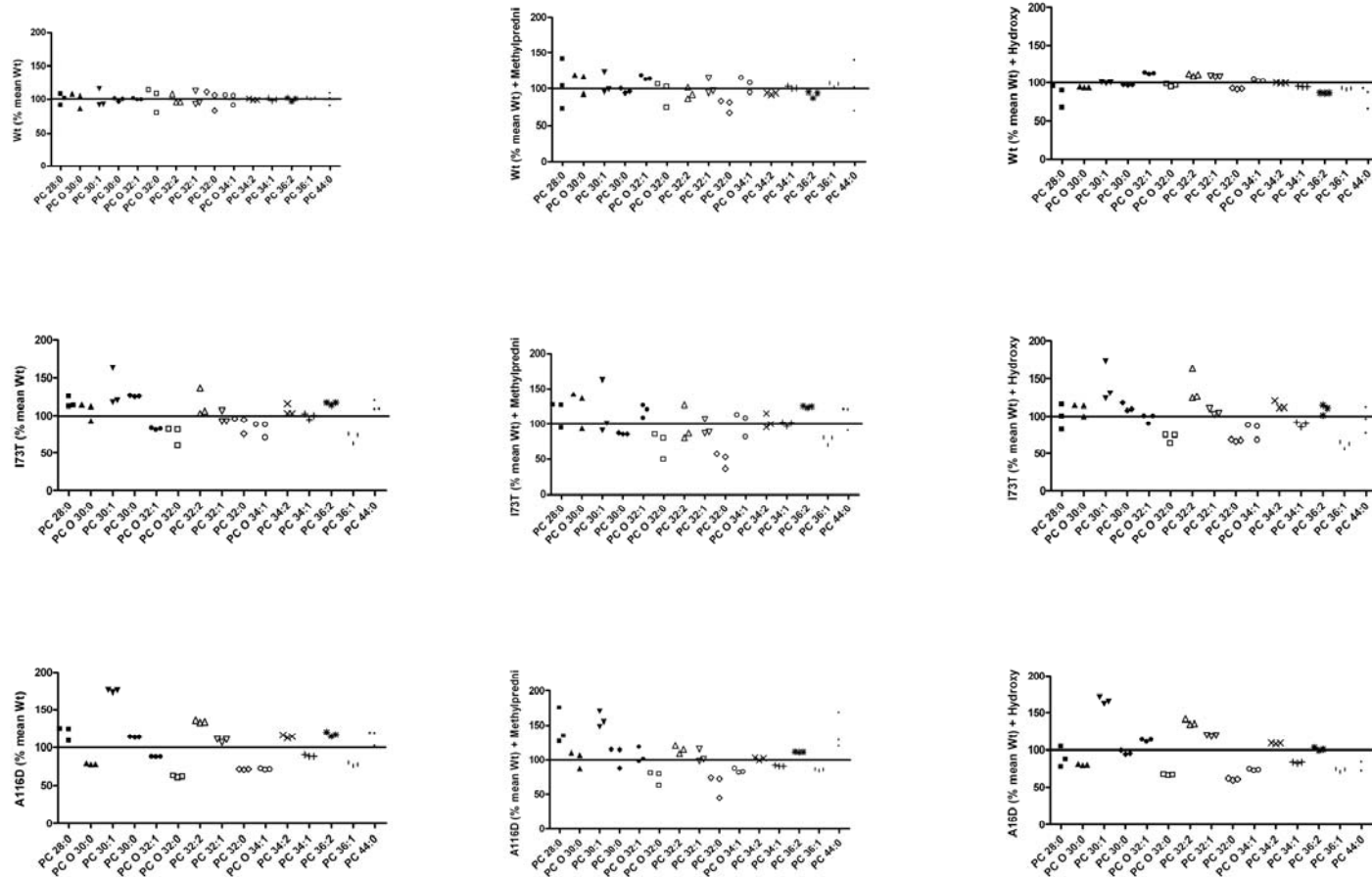


Abbildung 55: Darstellung der massenspektrometrischen Daten der Zelllysate, die sich auf den Mittelwert von Wildtyp proSP-C beziehen, Hauptversuch. Es wurden stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt}, I73T und A116D transfierte MLE-12-Zellen gemessen. Dabei wurden die Fettsäurespezies in % von PC angegeben und jeweils auf den Mittelwert von Wildtyp proSP-C bezogen. Die Zellen wurden 24 Stunden mit 10µM Methylprednisolon (+Methylpredni) oder 10µM Hydroxychloroquin (+Hydroxy) behandelt.

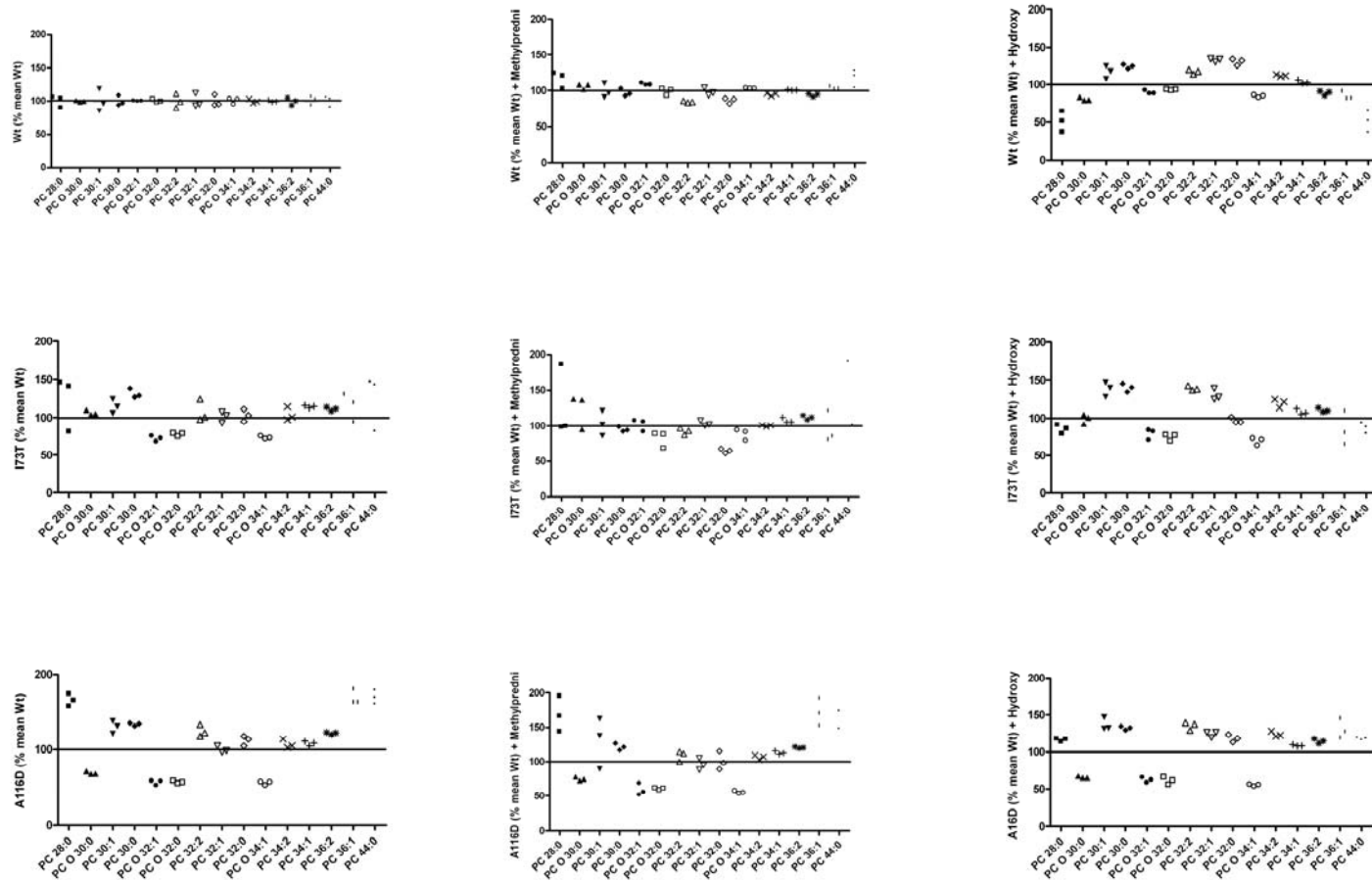


Abbildung 56: Darstellung der massenspektrometrischen Daten der Kulturüberstände, die sich auf den Mittelwert von Wildtyp proSP-C beziehen, Hauptversuch. Es wurde der Kulturüberstand von stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt, I73T} und A116D transfizierte MLE-12-Zellen gemessen. Dabei wurden die Fettsäurespezies in % von PC angegeben und jeweils auf den Mittelwert von Wildtyp proSP-C bezogen. Die Zellen wurden 24 Stunden mit 10 μ M Methylprednisolon (+Methylpredni) oder 10 μ M Hydroxychloroquin (+Hydroxy) behandelt.

Die dargestellten Unterschiede wurden statistisch auf ihre Signifikanz geprüft und sind im Ergebnisteil näher beschrieben.

7.1.2.4 Originalmessdaten der Fettsäurekomponenten von Lysophosphatidcholin

Dargestellt sind die Fettsäuren als prozentualer Anteil von Lysophosphatidcholin. Von allen gemessenen Fettsäuren sind hier diejenigen aufgelistet, die einen relevanten Anteil ausmachen.

File Name	LPC 13:0	LPC 16:1	LPC 16:0	LPC 18:1	LPC 19:0	LPC 22:0
Zelle_Wt_basal	30,21%	40,13%	27,59%	32,28%	39,43%	0,00%
Zelle_Wt_basal	34,76%	37,36%	28,45%	34,20%	45,13%	0,00%
Zelle_Wt_basal	30,13%	40,83%	24,61%	27,53%	24,91%	7,03%
Zelle_Wt_basal	29,55%	41,34%	28,11%	30,55%	26,57%	0,00%
Zelle_Wt_basal	34,69%	43,86%	26,73%	29,41%	40,12%	0,00%
Zelle_A116D_basal	267,39%	0,00%	52,50%	47,50%	329,68%	0,00%
Zelle_A116D_basal	595,30%	0,00%	0,00%	100,00%	680,96%	0,00%
Zelle_A116D_basal	111,13%	0,00%	18,60%	32,96%	136,37%	48,44%
Zelle_A116D_basal	124,52%	18,47%	19,64%	22,39%	143,05%	39,51%
Zelle_A116D_basal	141,13%	0,00%	23,87%	42,44%	178,12%	33,69%
Zelle_I73T_basal	56,93%	28,16%	25,83%	27,83%	72,61%	18,18%
Zelle_I73T_basal	60,65%	23,80%	40,31%	23,65%	53,87%	12,24%
Zelle_I73T_basal	116,02%	30,40%	40,94%	28,66%	108,49%	0,00%
Zelle_I73T_basal	114,84%	19,10%	53,04%	27,86%	130,43%	0,00%
Zelle_I73T_basal	110,11%	16,81%	55,86%	27,33%	112,47%	0,00%
Zelle_I73T_basal	66,15%	19,30%	44,42%	23,87%	71,69%	12,41%
Zelle_I73T_basal	54,21%	22,60%	34,32%	29,34%	61,05%	13,73%
Zelle_I73T_basal	66,58%	20,45%	42,75%	22,14%	69,40%	14,66%
Zelle_I73T_basal	64,43%	23,23%	38,37%	27,37%	74,42%	11,02%
Zelle_I73T_basal	63,69%	14,24%	37,21%	32,26%	102,59%	16,30%

Tabelle 24: Massenspektrometrische Auswertung der Fettsäurekomponenten von LPC, Vorversuch. Gemessen wurden stabil mit pcDNA3/HA-hSP-C transfizierte MLE-12-Zellen (Zelle), unbehandelt (basal).

File Name	LPC 15:0	LPC 16:1	LPC 16:0	LPC 18:1	LPC 18:0
Zelle_Wt_basal	4,3%	10,1%	51,4%	17,6%	9,0%
Zelle_Wt_basal	3,7%	11,4%	55,7%	17,3%	7,4%
Zelle_Wt_basal	3,5%	10,0%	53,1%	18,3%	9,2%
Zelle_Wt_Hyd	4,3%	11,9%	55,0%	17,0%	7,0%
Zelle_Wt_Hyd	3,7%	11,9%	55,9%	15,8%	7,5%
Zelle_Wt_Hyd	3,2%	11,5%	57,3%	16,1%	7,5%
Zelle_Wt_Met	3,7%	11,0%	54,8%	17,4%	7,5%
Zelle_Wt_Met	4,0%	10,8%	53,0%	17,1%	8,8%
Zelle_Wt_Met	4,1%	11,4%	55,1%	17,4%	8,0%
Zelle_I73T_basal	3,0%	15,0%	51,9%	19,5%	5,7%
Zelle_I73T_basal	3,0%	11,7%	50,2%	19,9%	8,2%
Zelle_I73T_basal	2,8%	11,5%	52,0%	20,7%	6,1%
Zelle_I73T_Hyd	4,1%	12,5%	52,1%	19,0%	6,3%
Zelle_I73T_Hyd	3,4%	12,0%	51,0%	20,1%	7,8%
Zelle_I73T_Hyd	3,1%	15,2%	52,7%	19,4%	4,3%
Zelle_I73T_Met	4,1%	10,0%	49,8%	21,0%	8,7%
Zelle_I73T_Met	2,9%	15,2%	49,2%	20,9%	6,3%
Zelle_I73T_Met	3,3%	11,1%	51,0%	20,8%	8,2%
Zelle_A116D_basal	2,7%	13,0%	49,2%	19,9%	8,4%
Zelle_A116D_basal	2,5%	12,9%	49,4%	20,5%	8,8%
Zelle_A116D_basal	3,0%	12,2%	50,8%	18,3%	8,5%
Zelle_A116D_Hyd	3,1%	14,2%	52,1%	18,0%	7,9%
Zelle_A116D_Hyd	3,3%	14,2%	52,3%	17,8%	7,5%
Zelle_A116D_Hyd	2,8%	14,1%	52,1%	17,9%	8,2%
Zelle_A116D_Met	3,6%	12,2%	50,4%	18,0%	9,7%
Zelle_A116D_Met	3,0%	13,6%	49,5%	17,9%	8,4%
Zelle_A116D_Met	2,6%	12,8%	51,4%	17,5%	9,0%
KÜ_Wt_basal	2,39%	15,26%	57,23%	10,78%	9,32%
KÜ_Wt_basal	2,56%	17,61%	54,55%	11,53%	8,51%
KÜ_Wt_basal	2,37%	14,20%	58,66%	10,86%	8,71%

File Name	LPC 15:0	LPC 16:1	LPC 16:0	LPC 18:1	LPC 18:0
KÜ_Wt_Hyd	2,56%	13,64%	62,11%	9,94%	7,82%
KÜ_Wt_Hyd	2,72%	14,47%	61,05%	9,57%	7,75%
KÜ_Wt_Hyd	2,51%	13,98%	61,11%	9,75%	8,24%
KÜ_Wt_Met	2,72%	14,88%	54,85%	11,72%	9,71%
KÜ_Wt_Met	2,57%	14,25%	58,67%	10,35%	9,29%
KÜ_Wt_Met	2,18%	19,32%	54,98%	11,47%	7,12%
KÜ_I73T_basal	1,33%	18,25%	55,86%	11,36%	8,88%
KÜ_I73T_basal	1,60%	13,88%	60,62%	11,62%	8,11%
KÜ_I73T_basal	1,80%	13,90%	59,82%	11,24%	8,75%
KÜ_I73T_Hyd	2,15%	16,79%	60,01%	10,59%	6,20%
KÜ_I73T_Hyd	2,05%	16,75%	58,98%	10,32%	7,38%
KÜ_I73T_Hyd	1,89%	21,49%	56,68%	9,40%	7,19%
KÜ_I73T_Met	2,58%	13,70%	57,43%	12,54%	9,00%
KÜ_I73T_Met	1,68%	21,72%	53,30%	12,18%	7,05%
KÜ_I73T_Met	2,22%	15,05%	56,98%	12,75%	8,06%
KÜ_A116D_basal	1,49%	16,63%	57,53%	10,66%	9,00%
KÜ_A116D_basal	1,45%	16,35%	57,40%	10,22%	9,67%
KÜ_A116D_basal	1,48%	17,23%	56,93%	10,50%	8,76%
KÜ_A116D_Hyd	1,69%	15,35%	62,17%	9,16%	7,76%
KÜ_A116D_Hyd	1,50%	15,87%	61,27%	9,80%	7,69%
KÜ_A116D_Hyd	1,50%	14,87%	63,59%	8,81%	7,76%
KÜ_A116D_Met	1,47%	16,58%	57,36%	10,62%	9,49%
KÜ_A116D_Met	1,33%	15,14%	57,47%	11,13%	9,98%
KÜ_A116D_Met	1,38%	14,75%	58,50%	10,81%	9,33%

Tabelle 25: Massenspektrometrische Auswertung der Fettsäurekomponenten von LPC, Hauptversuch. Gemessen wurden stabil mit pcDNA3/HA-hSP-C transfizierte MLE-12-Zellen (Zelle) und der zugehörige Kulturüberstand (KÜ), unbehandelt (basal), mit 10µM Methylprednisolon (Met) oder 10µM Hydroxychloroquin (Hyd) behandelt.

7.1.2.5 Originalmessdaten der Fettsäurekomponenten von Phosphatidylglycerol

Dargestellt sind die Fettsäuren als prozentualer Anteil von Phosphatidylglycerol. Von allen gemessenen Fettsäuren sind hier diejenige aufgelistet, die einen relevanten Anteil ausmachen.

File Name	PG 30:0	PG 32:2	PG 32:1	PG 32:0	PG 34:2	PG 34:1	PG 36:3	PG 36:2	PG 36:1
Zelle_Wt_basal	1,86%	1,31%	5,42%	1,44%	6,54%	71,11%	1,07%	5,97%	5,29%
Zelle_Wt_basal	1,33%	1,38%	6,15%	1,15%	5,61%	72,24%	0,71%	5,10%	5,80%
Zelle_Wt_basal	1,48%	1,39%	5,14%	1,18%	7,34%	71,07%	1,13%	6,54%	4,72%
Zelle_Wt_Hyd	1,25%	1,57%	6,37%	1,25%	7,53%	65,23%	1,36%	6,52%	7,89%
Zelle_Wt_Hyd	1,49%	2,04%	5,83%	1,95%	8,11%	63,82%	1,16%	6,61%	8,17%
Zelle_Wt_Hyd	1,51%	2,09%	6,18%	1,23%	7,47%	64,12%	1,49%	6,65%	7,85%
Zelle_Wt_Met	1,57%	1,38%	4,80%	1,34%	5,98%	71,38%	1,12%	6,54%	5,89%
Zelle_Wt_Met	1,49%	1,19%	5,56%	1,06%	6,22%	70,09%	0,94%	6,95%	6,50%
Zelle_Wt_Met	1,35%	1,10%	6,01%	1,13%	5,58%	71,42%	0,64%	5,77%	6,51%
Zelle_I73T_basal	1,43%	1,74%	5,60%	0,75%	9,71%	64,96%	1,17%	9,38%	5,26%
Zelle_I73T_basal	1,66%	1,31%	4,46%	0,94%	9,17%	63,37%	1,95%	10,45%	5,09%
Zelle_I73T_basal	1,52%	1,64%	4,83%	0,92%	9,59%	64,32%	1,61%	9,83%	5,06%
Zelle_I73T_Hyd	1,81%	2,28%	5,69%	1,25%	11,38%	54,93%	2,18%	12,45%	7,29%
Zelle_I73T_Hyd	1,64%	1,93%	5,37%	0,92%	11,01%	57,62%	1,59%	11,14%	7,48%
Zelle_I73T_Hyd	1,56%	2,64%	7,09%	0,88%	12,20%	57,72%	1,37%	10,08%	4,92%
Zelle_I73T_Met	1,32%	1,83%	3,64%	0,86%	9,92%	60,73%	1,81%	11,90%	7,19%
Zelle_I73T_Met	1,45%	1,27%	5,00%	0,61%	8,42%	65,00%	1,20%	11,82%	5,23%
Zelle_I73T_Met	1,62%	1,69%	3,76%	0,00%	8,93%	63,25%	2,01%	11,50%	6,42%
Zelle_A116D_basal	2,43%	1,38%	6,23%	1,08%	6,62%	68,35%	1,14%	7,14%	4,99%
Zelle_A116D_basal	2,01%	1,64%	5,99%	1,50%	6,82%	66,21%	1,18%	8,00%	4,99%
Zelle_A116D_basal	1,95%	1,93%	6,28%	1,27%	6,66%	66,15%	1,33%	8,51%	5,17%
Zelle_A116D_Hyd	1,46%	1,66%	7,03%	1,49%	7,60%	65,77%	1,13%	6,94%	5,50%
Zelle_A116D_Hyd	1,42%	1,76%	7,57%	1,34%	7,99%	63,09%	1,41%	7,63%	5,76%
Zelle_A116D_Hyd	1,92%	1,83%	8,36%	1,20%	8,03%	63,35%	1,10%	7,40%	5,91%
Zelle_A116D_Met	1,77%	1,23%	6,08%	1,15%	5,42%	67,45%	1,02%	7,56%	6,88%
Zelle_A116D_Met	2,12%	1,39%	5,68%	1,14%	6,36%	67,32%	1,27%	8,41%	5,57%
Zelle_A116D_Met	1,68%	1,80%	5,63%	1,02%	7,71%	64,59%	1,48%	8,62%	5,70%

File Name	PG 30:0	PG 32:2	PG 32:1	PG 32:0	PG 34:2	PG 34:1	PG 36:3	PG 36:2	PG 36:1
KÜ_Wt_basal	0,00%	0,00%	0,00%	10,51%	13,94%	48,02%	0,00%	18,75%	8,77%
KÜ_Wt_basal	0,00%	0,00%	0,00%	8,52%	13,44%	54,83%	0,00%	15,37%	7,83%
KÜ_Wt_basal	6,35%	0,00%	5,37%	8,71%	12,19%	43,28%	0,00%	13,09%	11,02%
KÜ_Wt_Hyd	2,56%	4,66%	6,39%	4,60%	15,63%	39,60%	4,30%	10,08%	9,29%
KÜ_Wt_Hyd	0,00%	0,00%	10,71%	0,00%	15,56%	45,43%	6,11%	10,90%	11,29%
KÜ_Wt_Hyd	0,00%	6,88%	8,28%	0,00%	14,79%	48,72%	0,00%	11,48%	9,84%
KÜ_Wt_Met	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	16,19%	68,86%	0,00%	14,96%	0,00%
KÜ_Wt_Met	10,57%	0,00%	0,00%	0,00%	16,00%	53,37%	0,00%	9,59%	10,47%
KÜ_Wt_Met	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	16,82%	59,62%	0,00%	12,45%	11,11%
KÜ_I73T_basal	11,65%	0,00%	0,00%	0,00%	20,70%	53,63%	0,00%	14,02%	0,00%
KÜ_I73T_basal	6,00%	6,09%	0,00%	0,00%	16,18%	46,42%	6,43%	12,09%	6,79%
KÜ_I73T_basal	8,70%	8,96%	0,00%	0,00%	17,75%	49,88%	0,00%	14,71%	0,00%
KÜ_I73T_Hyd	0,00%	7,84%	8,33%	0,00%	19,41%	44,18%	0,00%	12,48%	7,76%
KÜ_I73T_Hyd	0,00%	10,44%	0,00%	0,00%	26,66%	48,28%	0,00%	14,62%	0,00%
KÜ_I73T_Hyd	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	27,07%	57,00%	0,00%	15,94%	0,00%
KÜ_I73T_Met	8,32%	7,92%	0,00%	0,00%	17,51%	50,87%	0,00%	15,38%	0,00%
KÜ_I73T_Met	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	30,85%	69,15%	0,00%	0,00%	0,00%
KÜ_I73T_Met	7,34%	8,77%	0,00%	0,00%	19,49%	42,53%	0,00%	14,55%	7,31%
KÜ_A116D_basal	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	22,31%	77,69%	0,00%	0,00%	0,00%
KÜ_A116D_basal	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	29,20%	70,80%	0,00%	0,00%	0,00%
KÜ_A116D_basal	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	22,91%	77,09%	0,00%	0,00%	0,00%
KÜ_A116D_Hyd	0,00%	0,00%	13,31%	0,00%	17,00%	56,86%	0,00%	12,84%	0,00%
KÜ_A116D_Hyd	11,73%	0,00%	0,00%	0,00%	18,28%	44,86%	0,00%	12,90%	12,23%
KÜ_A116D_Hyd	10,46%	0,00%	8,99%	0,00%	18,34%	43,79%	0,00%	9,21%	9,20%
KÜ_A116D_Met	13,39%	0,00%	0,00%	0,00%	15,42%	59,27%	0,00%	11,91%	0,00%
KÜ_A116D_Met	11,00%	0,00%	0,00%	0,00%	16,02%	52,78%	0,00%	11,33%	8,87%
KÜ_A116D_Met	20,90%	0,00%	0,00%	0,00%	22,28%	56,82%	0,00%	0,00%	0,00%

Tabelle 26: Massenspektrometrische Auswertung der Fettsäurekomponenten von PG, Hauptversuch. Gemessen wurden stabil mit pcDNA3/HA-hSP-C transfizierte MLE-12-Zellen (Zelle) und der zugehörige Kulturüberstand (KÜ), unbehandelt (basal), mit 10µM Methylprednisolon (Met) oder 10µM Hydroxychloroquin (Hyd) behandelt.

7.1.2.6 Originalmessdaten der Fettsäurekomponenten von Sphingomyelin

Dargestellt sind die Fettsäuren als prozentualer Anteil von Sphingomyelin. Von allen gemessenen Fettsäuren sind hier diejenigen aufgelistet, die einen relevanten Anteil ausmachen.

File Name	SPM 16:1	SPM 16:0	SPM 22:1	SPM 22:0	SPM 24:2	SPM 24:1	SPM 24:0
Zelle_Wt_basal	7,66%	55,75%	2,02%	1,81%	3,14%	14,88%	6,08%
Zelle_Wt_basal	7,10%	57,59%	2,09%	2,30%	2,89%	13,73%	6,35%
Zelle_Wt_basal	7,65%	55,63%	1,94%	1,83%	3,45%	14,68%	6,16%
Zelle_Wt_Hyd	6,68%	60,08%	1,68%	1,87%	2,70%	12,95%	5,93%
Zelle_Wt_Hyd	6,94%	59,20%	1,76%	2,03%	2,79%	13,15%	6,02%
Zelle_Wt_Hyd	6,80%	59,25%	1,74%	2,01%	2,75%	12,72%	6,21%
Zelle_Wt_Met	7,47%	57,10%	1,93%	2,18%	3,05%	13,94%	6,01%
Zelle_Wt_Met	7,37%	56,70%	1,77%	2,06%	3,17%	14,27%	6,08%
Zelle_Wt_Met	7,20%	59,61%	1,90%	2,30%	2,49%	12,65%	6,04%
Zelle_I73T_basal	6,91%	44,26%	6,51%	3,22%	5,68%	18,74%	4,99%
Zelle_I73T_basal	7,20%	44,15%	5,95%	3,17%	6,06%	19,33%	4,51%
Zelle_I73T_basal	7,20%	43,92%	5,94%	2,87%	6,32%	19,12%	4,93%
Zelle_I73T_Hyd	6,61%	47,58%	5,75%	2,74%	5,17%	18,06%	4,67%
Zelle_I73T_Hyd	6,92%	47,43%	5,81%	2,81%	5,06%	18,06%	4,55%
Zelle_I73T_Hyd	6,69%	45,97%	6,04%	3,39%	5,04%	18,91%	4,84%
Zelle_I73T_Met	7,86%	45,82%	5,80%	2,80%	5,55%	18,27%	4,33%
Zelle_I73T_Met	6,78%	47,10%	6,56%	3,43%	5,09%	17,45%	4,24%
Zelle_I73T_Met	7,63%	45,61%	5,87%	2,88%	5,69%	18,13%	4,42%
Zelle_A116D_basal	7,34%	49,38%	4,13%	2,76%	5,16%	17,52%	5,62%
Zelle_A116D_basal	7,43%	49,71%	4,11%	2,41%	5,13%	17,26%	5,78%
Zelle_A116D_basal	7,37%	49,26%	4,27%	2,57%	5,03%	17,71%	5,63%
Zelle_A116D_Hyd	7,13%	53,48%	3,21%	2,36%	4,07%	15,82%	5,89%
Zelle_A116D_Hyd	6,81%	53,01%	3,30%	2,62%	4,09%	16,08%	6,03%
Zelle_A116D_Hyd	7,11%	52,53%	3,35%	2,71%	4,08%	16,31%	6,02%
Zelle_A116D_Met	6,90%	51,05%	3,69%	2,86%	4,56%	17,13%	6,18%
Zelle_A116D_Met	7,34%	49,78%	3,79%	2,32%	5,58%	17,82%	5,58%
Zelle_A116D_Met	7,59%	49,79%	3,75%	2,45%	5,38%	17,49%	5,39%

File Name	SPM 16:1	SPM 16:0	SPM 22:1	SPM 22:0	SPM 24:2	SPM 24:1	SPM 24:0
KÜ_Wt_basal	7,34%	43,80%	3,39%	3,94%	5,18%	17,95%	7,59%
KÜ_Wt_basal	7,91%	46,36%	3,35%	3,60%	4,40%	16,34%	7,95%
KÜ_Wt_basal	7,61%	44,32%	2,98%	3,56%	4,68%	18,31%	8,06%
KÜ_Wt_Hyd	7,12%	49,36%	2,73%	3,39%	3,94%	16,29%	7,97%
KÜ_Wt_Hyd	6,85%	48,64%	2,78%	4,24%	4,31%	16,37%	7,71%
KÜ_Wt_Hyd	6,73%	48,19%	2,95%	3,94%	4,53%	16,74%	7,90%
KÜ_Wt_Met	7,45%	43,62%	3,46%	4,26%	5,09%	18,72%	7,16%
KÜ_Wt_Met	7,51%	45,25%	2,86%	4,68%	4,90%	16,78%	7,67%
KÜ_Wt_Met	8,54%	47,71%	2,91%	3,69%	4,62%	15,94%	7,60%
KÜ_I73T_basal	7,03%	35,30%	6,15%	5,73%	6,97%	20,12%	5,84%
KÜ_I73T_basal	6,82%	35,98%	6,24%	5,62%	6,82%	20,44%	5,52%
KÜ_I73T_basal	7,43%	33,88%	5,85%	6,10%	7,88%	19,80%	5,75%
KÜ_I73T_Hyd	6,34%	39,78%	5,74%	4,94%	6,68%	19,34%	5,72%
KÜ_I73T_Hyd	6,18%	38,96%	5,73%	4,50%	6,69%	20,24%	6,05%
KÜ_I73T_Hyd	7,52%	37,44%	5,94%	5,30%	6,76%	19,63%	6,24%
KÜ_I73T_Met	7,36%	36,93%	5,91%	4,95%	7,23%	19,41%	6,15%
KÜ_I73T_Met	7,63%	38,29%	6,32%	5,29%	6,10%	19,13%	5,61%
KÜ_I73T_Met	6,96%	37,55%	6,15%	4,79%	6,66%	20,00%	5,99%
KÜ_A116D_basal	7,46%	37,15%	4,79%	4,77%	7,25%	20,28%	7,26%
KÜ_A116D_basal	7,84%	36,44%	4,81%	5,03%	6,95%	19,86%	6,71%
KÜ_A116D_basal	7,48%	37,15%	4,40%	4,26%	7,59%	20,90%	7,13%
KÜ_A116D_Hyd	7,25%	40,56%	4,00%	4,75%	6,28%	19,45%	7,42%
KÜ_A116D_Hyd	7,57%	41,16%	3,87%	4,30%	6,59%	19,12%	7,08%
KÜ_A116D_Hyd	7,76%	39,26%	4,31%	5,11%	6,51%	19,44%	7,05%
KÜ_A116D_Met	8,26%	38,32%	4,48%	4,77%	7,01%	19,29%	7,19%
KÜ_A116D_Met	9,10%	36,64%	4,12%	5,06%	6,71%	19,21%	6,72%
KÜ_A116D_Met	8,81%	36,87%	4,37%	4,91%	7,14%	19,80%	6,39%

Tabelle 27: Massenspektrometrische Auswertung der Fettsäurekomponenten von SPM, Hauptversuch. Gemessen wurden stabil mit pcDNA3/HA-hSP-C transfizierte MLE-12-Zellen (Zelle) und der zugehörige Kulturüberstand (KÜ), unbehandelt (basal), mit 10µM Methylprednisolon (Met) oder 10µM Hydroxychloroquin (Hyd) behandelt.

7.1.2.7 Originalmessdaten der Fettsäurekomponenten von Ceramid und Glucosylceramid

Dargestellt sind die Fettsäuren als prozentualer Anteil von Ceramid und Glucosylceramid. Von allen gemessenen Fettsäuren sind hier diejenigen aufgelistet, die einen relevanten Anteil ausmachen.

File Name	C16:0	C22:0	C24:1	C24:0	Glu C16:0	Glu C24:1
Zelle_Wt_basal	58,8%	4,1%	21,8%	13,5%	3,0%	1,8%
Zelle_Wt_basal	59,1%	4,5%	20,6%	14,1%	3,6%	1,8%
Zelle_Wt_basal	58,3%	4,2%	22,2%	13,4%	3,0%	1,7%
Zelle_Wt_Hyd	62,4%	4,2%	18,9%	12,9%	5,4%	2,3%
Zelle_Wt_Hyd	62,1%	4,3%	18,6%	13,1%	5,2%	2,1%
Zelle_Wt_Hyd	61,8%	4,0%	18,5%	14,0%	5,3%	2,2%
Zelle_Wt_Met	61,5%	3,9%	20,9%	11,7%	3,5%	1,8%
Zelle_Wt_Met	61,9%	3,7%	20,4%	12,2%	3,1%	1,7%
Zelle_Wt_Met	64,1%	4,1%	18,1%	12,0%	3,4%	1,3%
Zelle_I73T_basal	50,0%	6,7%	29,8%	11,1%	3,5%	3,1%
Zelle_I73T_basal	49,1%	6,7%	30,5%	11,4%	2,9%	3,0%
Zelle_I73T_basal	49,2%	6,6%	30,4%	11,1%	2,7%	2,9%
Zelle_I73T_Hyd	52,8%	6,5%	27,3%	11,0%	6,0%	4,7%
Zelle_I73T_Hyd	52,6%	6,5%	27,7%	11,0%	5,7%	4,4%
Zelle_I73T_Hyd	53,4%	6,2%	28,3%	10,2%	5,4%	4,1%
Zelle_I73T_Met	53,3%	6,3%	27,6%	10,3%	3,2%	2,4%
Zelle_I73T_Met	54,1%	6,7%	27,1%	9,8%	4,7%	3,5%
Zelle_I73T_Met	52,9%	6,6%	27,8%	10,2%	3,3%	2,7%
Zelle_A116D_basal	52,3%	5,4%	26,3%	13,9%	6,6%	3,8%
Zelle_A116D_basal	52,3%	5,7%	26,0%	13,8%	6,3%	4,0%
Zelle_A116D_basal	53,1%	5,4%	26,5%	12,9%	6,0%	3,8%
Zelle_A116D_Hyd	57,9%	5,2%	21,8%	13,2%	8,7%	4,4%
Zelle_A116D_Hyd	57,0%	5,1%	22,7%	13,3%	8,2%	4,1%
Zelle_A116D_Hyd	56,0%	5,2%	23,1%	13,7%	8,3%	4,6%
Zelle_A116D_Met	55,0%	5,4%	23,9%	13,6%	6,7%	3,9%
Zelle_A116D_Met	54,3%	5,0%	26,2%	12,4%	5,5%	3,7%
Zelle_A116D_Met	54,8%	4,8%	26,2%	12,0%	4,9%	3,2%

File Name	C14:0	C16:0	C17:0	C22:0	C24:1	C24:0	Glu C16:0	Glu C24:1
KÜ_Wt_basal	38,2%	46,3%	33,5%	6,6%	20,6%	20,0%	1,6%	1,0%
KÜ_Wt_basal	43,6%	55,2%	39,7%	6,5%	18,7%	16,0%	2,1%	0,9%
KÜ_Wt_basal	38,3%	52,1%	33,9%	6,2%	20,4%	17,6%	1,4%	0,9%
KÜ_Wt_Hyd	19,5%	55,7%	17,2%	5,9%	18,2%	17,1%	2,9%	1,3%
KÜ_Wt_Hyd	27,1%	56,4%	24,1%	6,1%	17,7%	16,8%	3,0%	1,5%
KÜ_Wt_Hyd	32,3%	56,1%	30,2%	6,4%	18,1%	16,4%	3,1%	1,6%
KÜ_Wt_Met	52,4%	55,9%	49,7%	6,8%	18,6%	15,0%	2,0%	0,9%
KÜ_Wt_Met	45,3%	55,2%	40,5%	5,8%	19,5%	16,2%	1,6%	0,9%
KÜ_Wt_Met	44,4%	55,9%	42,8%	5,8%	18,9%	15,2%	1,6%	1,1%
KÜ_I73T_basal	57,5%	44,2%	50,5%	9,8%	28,1%	13,0%	1,7%	1,1%
KÜ_I73T_basal	34,9%	45,1%	31,6%	8,8%	28,4%	13,6%	1,1%	0,9%
KÜ_I73T_basal	69,7%	43,6%	61,1%	8,5%	29,6%	13,5%	1,4%	1,1%
KÜ_I73T_Hyd	34,2%	46,8%	32,8%	8,5%	27,6%	12,9%	2,3%	1,4%
KÜ_I73T_Hyd	39,0%	45,6%	37,3%	9,4%	27,2%	13,6%	2,7%	1,8%
KÜ_I73T_Hyd	43,8%	45,3%	39,1%	9,2%	27,1%	13,9%	3,5%	2,1%
KÜ_I73T_Met	40,2%	52,2%	35,1%	7,2%	24,9%	11,4%	1,2%	1,0%
KÜ_I73T_Met	69,5%	51,5%	59,8%	8,7%	23,6%	11,1%	2,5%	1,8%
KÜ_I73T_Met	41,0%	49,3%	36,8%	7,5%	27,1%	12,4%	1,5%	1,2%
KÜ_A116D_basal	88,9%	47,4%	79,4%	7,6%	23,4%	16,4%	2,5%	1,6%
KÜ_A116D_basal	86,9%	44,9%	80,8%	7,4%	25,1%	16,7%	2,7%	2,1%
KÜ_A116D_basal	84,2%	44,2%	74,4%	7,9%	24,9%	17,4%	2,6%	1,8%
KÜ_A116D_Hyd	67,7%	45,3%	66,8%	7,9%	23,9%	17,6%	4,2%	2,8%
KÜ_A116D_Hyd	68,1%	46,1%	63,9%	8,4%	23,5%	17,5%	4,4%	2,5%
KÜ_A116D_Hyd	69,5%	46,1%	67,4%	8,0%	22,3%	18,5%	4,0%	2,7%
KÜ_A116D_Met	81,9%	46,0%	73,5%	7,9%	24,7%	16,7%	2,9%	2,2%
KÜ_A116D_Met	86,7%	46,3%	76,9%	7,4%	25,8%	15,3%	2,7%	2,1%
KÜ_A116D_Met	109,4%	45,7%	103,0%	7,1%	25,1%	16,2%	2,9%	2,7%

Tabelle 28: Massenspektrometrische Auswertung der Fettsäurekomponenten von Cer und GluCer, Hauptversuch. Gemessen wurden stabil mit pcDNA3/HA-hSP-C transfizierte MLE-12-Zellen (Zelle) und der zugehörige Kulturüberstand (KÜ), unbehandelt (basal), mit 10µM Methylprednisolon (Met) oder 10µM Hydroxychloroquin (Hyd) behandelt.

7.1.2.8 Ergebnisse des Vorversuches

Es wurden Zellen, die Wildtyp proSP-C exprimieren mit Zellen verglichen, die mutiertes proSP-C exprimieren. Die Zusammensetzung des Zelllysats wurde bestimmt (Tabelle 29).

	Mittelwert			Standardabweichung		
	Wt_Zelle	I73T_Zelle	A116D_Zelle	Wt_Zelle	I73T_Zelle	A116D_Zelle
gesamt	40,2	13,4	4,5	2,6	13,4	0,6
PC	26,0	22,0	19,7	1,1	22,0	13,9
SPM	2,1	1,8	2,0	0,2	1,8	1,3
DihSPM	0,2	0,3	0,1	0,0	0,3	0,1
PE	15,9	13,3	9,4	1,4	13,3	3,5
Pla	2,0	1,4	0,6	0,6	1,4	0,9
PS	8,8	5,3	7,7	1,0	5,3	4,1
LPC	31,5	42,6	50,9	3,4	42,6	22,3
Cer	11,3	12,3	9,7	2,4	12,3	2,0
GluCer	2,2	1,2	0,0	0,4	1,2	0,0

Tabelle 29: Lipidverteilung bei unbehandelten MLE-12-Zellen, die stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt, I73T und A116D} transfiziert wurden, Vorversuch. Es wurden die Mittelwerte aus fünf (Wt, A116D) bzw. zehn (I73T) Messungen mit ihrer jeweiligen Standardabweichung berechnet. Die Gesamtphospholipide (gesamt) wurden in nmol lipid gemessen und die Unterspezies in % der Gesamtphospholipide angegeben. Die Daten sind in Abbildung 57 grafisch dargestellt.

Graphisch dargestellt sind die Daten in Abbildung 57.

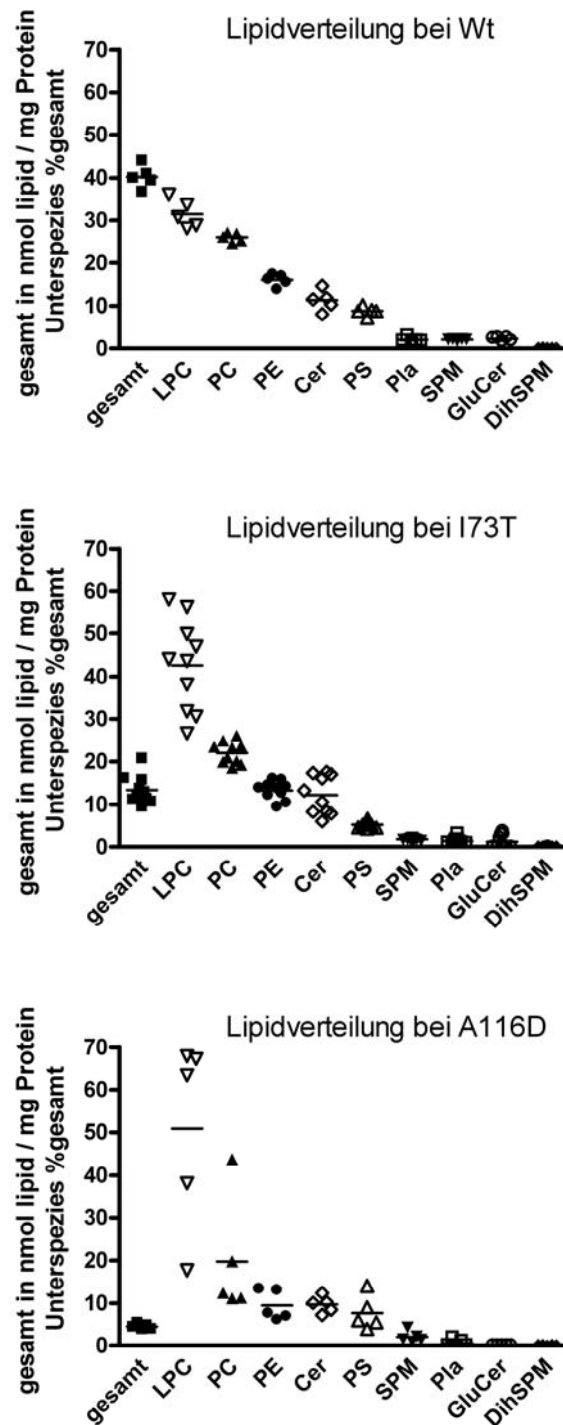


Abbildung 57: Grafische Darstellung der massenspektrometrischen Messungen zur Lipidverteilung des Zelllysates, Vorversuch. Es wurden die unbehandelten MLE-12-Zellen gemessen, die stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C^{Wt, I73T und A116D} transfiziert sind. Dabei wurden die Gesamtphospholipide (gesamt) in nmol lipid gemessen und die Unterspezies in % der Gesamtphospholipide angegeben. Die grafische Darstellung basiert auf den Daten der Tabelle 29.

Vergleicht man die Reihenfolge der verschiedenen Lipidspezies bezogen auf die prozentuale Mengenverteilung, so kann festgehalten werden, dass sich diese beim Zelllysate nicht zwischen Wildtyp proSP-C und I73T- oder A116D-mutiertem proSP-C unterscheidet. So kann festgehalten werden, dass bei der ersten Analyse LPC am stärksten vertreten war, gefolgt von PC, PE, Cer, PS, Pla, SPM und GluCer. Am wenigsten häufig kam DihSPM vor.

Die prozentuale Mengenverteilung unterscheidet sich zwischen Wildtyp proSP-C und mutiertem proSP-C. In Tabelle 30 sind die Unterschiede aufgelistet.

	gesamt	PC	SPM	DihSPM	PE	Pla	PS	LPC	Cer	GluCer
I73T_Zelle_1	33,32%	84,76%	86,06%	122,73%	83,38%	66,83%	60,02%	135,28%	108,70%	53,87%
A116D_Zelle_1	11,08%	75,67%	98,08%	63,64%	59,10%	28,71%	87,24%	161,48%	85,75%	0,00%

Tabelle 30: Lipidverteilung bei mutiertem proSP-C im Vergleich zu Wildtyp proSP-C, Vorversuch. Dargestellt sind die anteiligen Mengen von mutiertem proSP-C im Vergleich zu Wildtyp proSP-C, das als 100% angenommen wird.

So kann man erkennen, dass bei mutiertem proSP-C ein geringerer Anteil an Gesamtlipiden in den Zellen vorhanden war als bei Wildtyp proSP-C. Die Menge an LPC ist wesentlich höher als bei Wildtyp proSP-C.

Analyse der Lipidzusammensetzung des Zellysates von MLE-12-Zellen, die mutiertes proSP-C im Vergleich zu Wildtyp proSP-C exprimieren

Phosphatidylcholin (PC), das Hauptphospholipid des Surfactants, war in I73T-mutierten Zellen erniedrigt (Abbildung 58 A). Diese Erniedrigung konnte durch die Behandlung der Zellen mit Methylprednisolon oder Hydroxychloroquin nicht ausgeglichen werden. Bemerkenswerterweise stieg Lyso-phosphatidylcholin (Lyso-PC) um etwa 25% an (Abbildung 58 B). Sphingomyelin (SPM) und Ceramid sind wichtige Precursor Moleküle für die intrazelluläre Signalwirkung. Die Menge von SPM war bei I73T-mutiertem proSP-C exprimierenden Zellen erniedrigt. Dies konnte durch die Behandlung mit Methylprednisolon oder Hydroxychloroquin nicht verändert werden (Abbildung 58 C). Die Level von Ceramid waren bei I73T-mutierten Zellen unverändert, allerdings konnte Hydroxychloroquin die Ceramidlevel bei den mutierten Zellen signifikant senken (Abbildung 58 D).

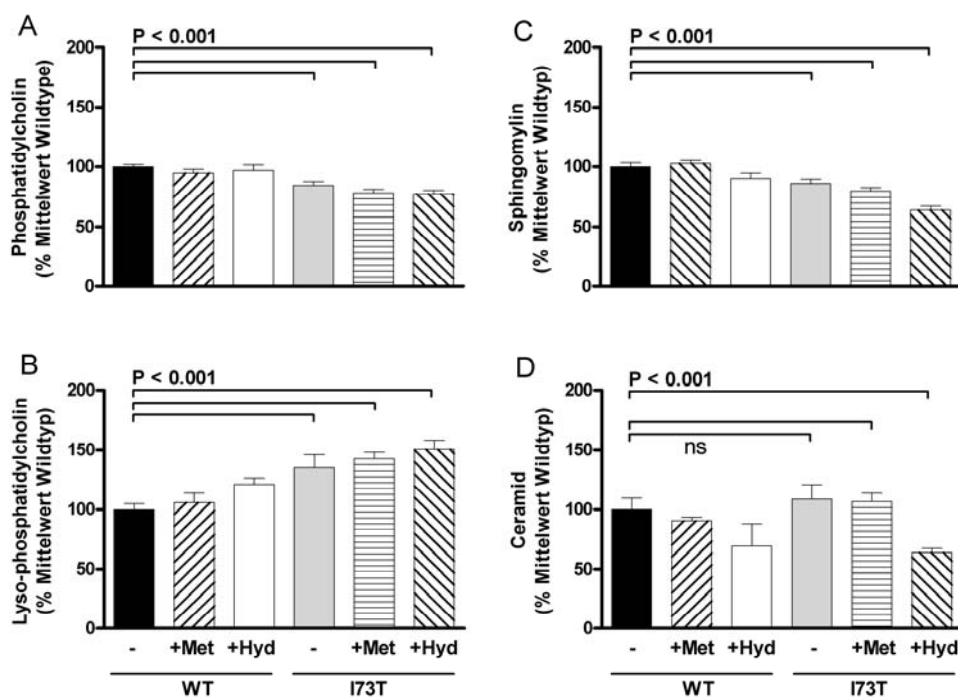


Abbildung 58: Lipidverteilung bei Wt und I73T, Zelle, Vorversuch. Der Gehalt an Phospholipid wurde als % des Mittelwertes von unbehandelten Wildtyp Werten angegeben. Die Grafiken zeigen die relative Menge von Phosphatidylcholin (A), Lyso-phosphatidylcholin (B), Sphingomyelin (C) und Ceramid (D). „ns“ = nicht signifikant. n=6. -: unbehandelt, +Met: mit 10µM Methylprednisolon für 24 Std. inkubiert, +Hyd: mit 10µM Hydroxychloroquin für 24 Std. inkubiert. Die Klammern über den Säulen geben an, welche Werte zueinander signifikant unterschiedlich sind.

Bei I73T-mutierten Zellen konnten keine Veränderungen in der Zusammensetzung von Phosphatidylethanolamin, Plasmalogen, Phosphatidylserin, Glucosylceramid, Cholesterol und freiem Cholesterol festgestellt werden.

Ebenso wie bei I73T-mutiertem proSP-C wurde bei A116D-mutiertem proSP-C der Phosphatidylcholinanteil im Vergleich zum Wildtyp proSP-C gesenkt (Abbildung 59 A) und der Lysophosphatidylcholinanteil erhöht (Abbildung 59 B). Gleichfalls hatte die Behandlung der Zellen mit Methylprednisolon oder Hydroxychloroquin darauf keinen Einfluss.

Allerdings erniedrigte sich Phosphatidylethanolamin bei A116D-mutiertem proSP-C im Vergleich zu Wildtyp proSP-C (Abbildung 59 C). Dies konnte durch eine Inkubation mit Methylprednisolon oder Hydroxychloroquin nicht rückgängig gemacht werden.

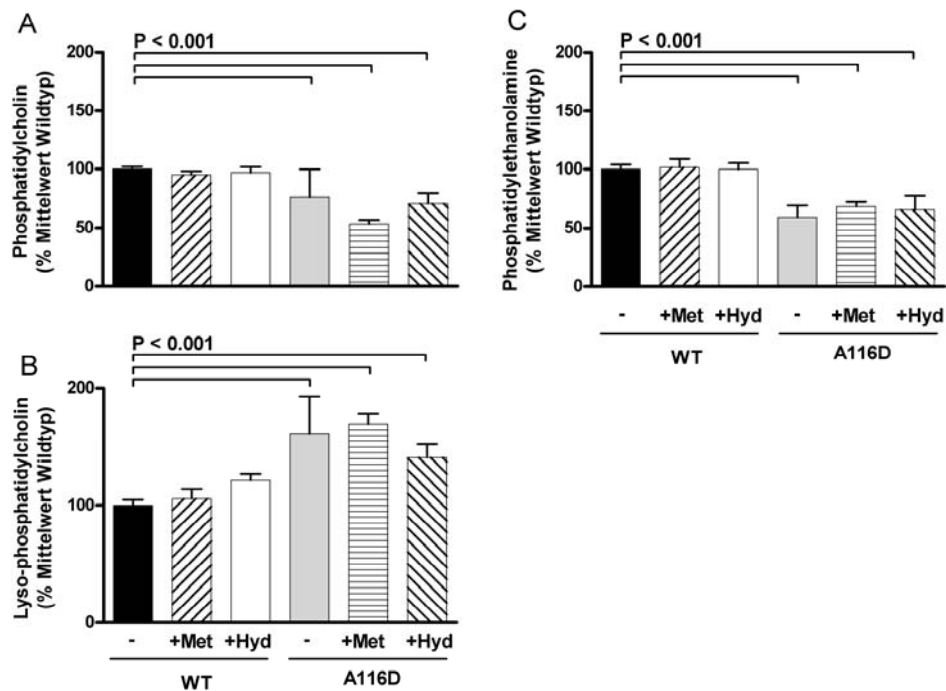


Abbildung 59: Lipidverteilung bei Wt und A116D, Zelle, Vorversuch. Der Gehalt an Phospholipid wurde als % des Mittelwertes von unbehandelten Wildtyp Werten angegeben. Die Grafiken zeigen die relative Menge von Phosphatidylcholin (A), Lyso-phosphatidylcholin (B), Phosphatidylethanolamin (C). n=6. -: unbehandelt, +Met: mit 10µM Methylprednisolon für 24 Std. inkubiert, +Hyd: mit 10µM Hydroxychloroquin für 24 Std. inkubiert. Die Klammern über den Säulen geben an, welche Werte zueinander signifikant unterschiedlich sind.

Bei A116D-mutierten Zellen konnten keine Veränderungen in der Zusammensetzung von Sphingomyelin, Ceramid, Plasmalogen, Phosphatidylserin, Glucosylceramid, Cholesterol und freiem Cholesterol festgestellt werden.

7.2 Literaturverzeichnis

References

1. Barbato A, Panizzolo C. Chronic interstitial lung disease in children. *Paediatr Respir Rev* 2000; **1**: 172-8.
2. Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, Sobonya RE. The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; **150**: 967-72.
3. Venkateshiah SB, Thomassen MJ, Kavuru MS. Pulmonary alveolar proteinosis : clinical manifestations and optimal treatment strategies. *Treat Respir Med* 2004; **3**: 217-27.
4. Mulugeta S, Maguire JA, Newitt JL, Russo SJ, Kotorashvili A, Beers MF. Misfolded BRICHOS SP-C mutant proteins induce apoptosis via caspase-4- and cytochrome c-related mechanisms. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2007; **293**: L720-L729.
5. Shulenin S, Nogee LM, Annilo T, Wert SE, Whitsett JA, Dean M. ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *N Engl J Med* 2004; **350**: 1296-303.
6. Stevens PA, Pettenazzo A, Brasch F *et al.* Nonspecific Interstitial Pneumonia, Alveolar Proteinosis, and Abnormal Proprotein Trafficking Resulting from a Spontaneous Mutation in the Surfactant Protein C Gene. *Pediatr Res* 2004.
7. Thomas AQ, Lane K, Phillips J3 *et al.* Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; **165**: 1322-8.
8. Wang WJ, Mulugeta S, Russo SJ, Beers MF. Deletion of exon 4 from human surfactant protein C results in aggresome formation and generation of a dominant negative. *J Cell Sci* 2003; **116**: 683-92.
9. Hartl D, Griese M. Interstitial lung disease in children -- genetic background and associated phenotypes. *Respir.Res.* 2005; **6**: 32.
10. de Benedictis FM, Canny GJ, Levison H. The role of corticosteroids in respiratory diseases of children. *Pediatr Pulmonol* 1996; **22**: 44-57.
11. Avital A, Godfrey S, Maayan C, Diamant Y, Springer C. Chloroquine treatment of interstitial lung disease in children. *Pediatr Pulmonol* 1994; **18**: 356-60.
12. Balasubramanyan N, Murphy A, O'Sullivan J, O'Connell EJ. Familial interstitial lung disease in children: response to chloroquine treatment in one sibling with desquamative interstitial pneumonitis. *Pediatr Pulmonol* 1997; **23**: 55-61.

13. Sharief N, Crawford OF, Dinwiddie R. Fibrosing alveolitis and desquamative interstitial pneumonitis. *Pediatr Pulmonol* 1994; **17**: 359-65.
 14. Fisher JH, McCormack F, Park SS, Stelzner T, Shannon JM, Hofmann T. In vivo regulation of surfactant proteins by glucocorticoids. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; **5**: 63-70.
 15. Solarin KO, Ballard PL, Guttentag SH, Lomax CA, Beers MF. Expression and glucocorticoid regulation of surfactant protein C in human fetal lung. *Pediatr Res* 1997; **42**: 356-64.
 16. Müller-Quernheim J. *Interstitielle Lungenerkrankungen*. 2003.
 17. Kalina M, Socher R. Endocytosis in cultured rat alveolar type II cells: effect of lysosomotropic weak bases on the processes. *J Histochem Cytochem* 1991; **39**: 1337-48.
 18. Meshnick SR. Chloroquine as intercalator: a hypothesis revived. *Parasitol Today* 1990; **6**: 77-9.
 19. Reasor MJ. A review of the biology and toxicologic implications of the induction of lysosomal lamellar bodies by drugs. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989; **97**: 47-56.
 20. Griesse M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J* 1999; **13**: 1455-76.
 21. Creuwels LA, Van Golde LM, Haagsman HP. The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects. *Lung* 1997; **175**: 1-39.
 22. Bridges JP, Davis HW, Damodarasamy M *et al*. Pulmonary surfactant proteins A and D are potent endogenous inhibitors of lipid peroxidation and oxidative cellular injury. *J Biol Chem* 2000; **275**: 38848-55.
 23. Mason RJ, Greene K, Voelker DR. Surfactant protein A and surfactant protein D in health and disease. *Am J Physiol* 1998; **275**: 1-13.
 24. Vaandrager AB, Van Golde LM. Lung surfactant proteins A and D in innate immune defense. *Biol Neonate* 2000; **77 Suppl 1**: 9-13.
 25. Auten RL, Watkins RH, Shapiro DL, Horowitz S. Surfactant apoprotein A (SP-A) is synthesized in airway cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1990; **3**: 491-6.
 26. Jobe AH. Pulmonary surfactant therapy. *N.Engl.J.Med.* 1993; **328**: 861-8.
 27. Robertson, B., Van Golde, L. G., and Batenburg, J. J. *Pulmonary Surfactant: from molecular biology to clinical practice* Elsevir, Amsterdam. 12-12-1992.
- Ref Type: Unpublished Work
28. Wright JR. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**: 58-68.
 29. Weaver TE. Synthesis, processing and secretion of surfactant proteins B and C. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1408**: 173-9.

30. Crouch EC. Collectins and pulmonary host defense. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1998; **19**: 177-201.
31. Stahlman MT, Gray MP, Falconieri MW, Whitsett JA, Weaver TE. Lamellar body formation in normal and surfactant protein B-deficient fetal mice. *Lab Invest* 2000; **80**: 395-403.
32. Weaver TE, Conkright JJ. Function of surfactant proteins B and C. *Annu Rev Physiol* 2001; **63**: 555-78.
33. Holmskov U, Lawson P, Teisner B *et al.* Isolation and characterization of a new member of the scavenger receptor superfamily, glycoprotein-340 (gp-340), as a lung surfactant protein-D binding molecule. *J.Biol.Chem.* 1997; **272**: 13743-9.
34. Adachi H, Hayashi H, Sato H, Dempo K, Akino T. Characterization of phospholipids accumulated in pulmonary-surfactant compartments of rats intratracheally exposed to silica. *Biochem.J.* 1989; **262**: 781-6.
35. Jobe AH. Pulmonary surfactant therapy. *N.Engl.J.Med.* 1993; **328**: 861-8.
36. Mason RJ, Dobbs LG, Greenleaf RD, Williams MC. Alveolar type II cells. *Fed.Proc.* 1977; **36**: 2697-702.
37. Beers MF, Lomax C. Synthesis and processing of hydrophobic surfactant protein C by isolated rat type II cells. *Am J Physiol* 1995; **269**: 744-53.
38. Vorbroker DK, Voorhout WF, Weaver TE, Whitsett JA. Posttranslational processing of surfactant protein C in rat type II cells. *Am J Physiol* 1995; **269**: 727-33.
39. Griese M, Beck J, Feuerhake F. Surfactant lipid uptake and metabolism by neonatal and adult type II pneumocytes. *Am J Physiol* 1999; **277**: 901-9.
40. Johansson J, Curstedt T, Robertson B. The proteins of the surfactant system. *Eur Respir J* 1994; **7**: 372-91.
41. Trapnell BC, Whitsett JA, Nakata K. Pulmonary alveolar proteinosis. *N.Engl.J.Med.* 2003; **349**: 2527-39.
42. Glasser SW, Korfhagen TR, Perme CM, Pilot-Matias TJ, Kister SE, Whitsett JA. Two SP-C genes encoding human pulmonary surfactant proteolipid. *J Biol Chem* 1988; **263**: 10326-31.
43. Warr RG, Hawgood S, Buckley DI *et al.* Low molecular weight human pulmonary surfactant protein (SP5): isolation, characterization, and cDNA and amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**: 7915-9.
44. Johansson J. Structure and properties of surfactant protein C. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1408**: 161-72.
45. Ten Brinke A, Van Golde LM, Batenburg JJ. Palmitoylation and processing of the lipopeptide surfactant protein C. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1583**: 253-65.

46. Wustneck N, Wustneck R, Perez-Gil J, Pison U. Effects of oligomerization and secondary structure on the surface behavior of pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C. *Biophys J* 2003; **84**: 1940-9.
47. Brasch F, Ten Brinke A, Johnen G *et al.* Involvement of cathepsin H in the processing of the hydrophobic surfactant-associated protein C in type II pneumocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; **26**: 659-70.
48. Beers MF, Kim CY, Dodia C, Fisher AB. Localization, synthesis, and processing of surfactant protein SP-C in rat lung analyzed by epitope-specific antipeptide antibodies. *J Biol Chem* 1994; **269**: 20318-28.
49. Vorbroker DK, Profitt SA, Nogee LM, Whitsett JA. Aberrant processing of surfactant protein C in hereditary SP-B deficiency. *Am J Physiol* 1995; **268**: 647-56.
50. Brasch F, Ochs M, Kahne T *et al.* Involvement of napsin A in the C- and N-terminal processing of surfactant protein B in type-II pneumocytes of the human lung. *J Biol Chem* 2003; **278**: 49006-14.
51. Dietl P, Haller T, Mair N, Frick M. Mechanisms of surfactant exocytosis in alveolar type II cells in vitro and in vivo. *News Physiol Sci* 2001; **16**: 239-43.
52. Dietl P, Haller T. Exocytosis of Lung Surfactant: From the Secretory Vesicle to the Air-Liquid Interface. *Annu Rev Physiol* 2004.
53. Abonyo BO, Wang P, Narasaraju TA *et al.* Characterization of alpha-soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein in alveolar type II cells: implications in lung surfactant secretion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; **29**: 273-82.
54. Abonyo BO, Gou D, Wang P, Narasaraju T, Wang Z, Liu L. Syntaxin 2 and SNAP-23 Are Required for Regulated Surfactant Secretion. *Biochemistry* 2004; **43**: 3499-506.
55. Sanchez-Pulido L, Devos D, Valencia A. BRICHOS: a conserved domain in proteins associated with dementia, respiratory distress and cancer. *Trends Biochem Sci* 2002; **27**: 329-32.
56. Ghiso J, Vidal R, Rostagno A *et al.* Amyloidogenesis in familial British dementia is associated with a genetic defect on chromosome 13. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2000; **920**: 84-92.
57. Vidal R, Frangione B, Rostagno A *et al.* A stop-codon mutation in the BRI gene associated with familial British dementia. *Nature* 1999; **399**: 776-81.
58. Vidal R, Revesz T, Rostagno A *et al.* A decamer duplication in the 3' region of the BRI gene originates an amyloid peptide that is associated with dementia in a Danish kindred. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000; **97**: 4920-5.
59. Vidal R, Calero M, Revesz T, Plant G, Ghiso J, Frangione B. Sequence, genomic structure and tissue expression of Human BRI3, a member of the BRI gene family. *Gene* 2001; **266**: 95-102.

60. Beers MF, Mulugeta S. Surfactant Protein C Biosynthesis and Its Emerging Role in Conformational Lung Disease. *Annu Rev Physiol* 2004.
61. Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* 1998; **143**: 1883-98.
62. Nogee LM, Dunbar AE3, Wert SE, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N Engl J Med* 2001; **344**: 573-9.
63. Nogee LM, Dunbar AE3, Wert S, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA. Mutations in the surfactant protein C gene associated with interstitial lung disease. *Chest* 2002; **121**: 20S-1S.
64. Hamvas A, Nogee LM, White FV *et al.* Progressive lung disease and surfactant dysfunction with a deletion in surfactant protein C gene. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; **30**: 771-6.
65. Brasch F, Griese M, Tredano M *et al.* Interstitial lung disease in a baby with a de novo mutation in the SFTPC gene. *Eur Respir J* 2004; **24**: 30-9.
66. Percopo S, Cameron HS, Nogee LM, Pettinato G, Montella S, Santamaria F. Variable phenotype associated with SP-C gene mutations: fatal case with the I73T mutation. *Eur Respir J* 2004; **24**: 1072-3.
67. Tredano M, Griese M, Brasch F *et al.* Mutation of SFTPC in infantile pulmonary alveolar proteinosis with or without fibrosing lung disease. *Am J Med Genet* 2004; **126A**: 18-26.
68. Johansson J, Weaver TE, Tjernberg LO. Proteolytic generation and aggregation of peptides from transmembrane regions: lung surfactant protein C and amyloid beta-peptide. *Cell Mol Life Sci* 2004; **61**: 326-35.
69. Ten Brinke A, Batenburg JJ, Haagsman HP, Van Golde LM, Vaandrager AB. Differential effect of brefeldin A on the palmitoylation of surfactant protein C proprotein mutants. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **290**: 532-8.
70. Cameron HS, Somaschini M, Carrera P *et al.* A common mutation in the surfactant protein C gene associated with lung disease. *J Pediatr* 2005; **146**: 370-5.
71. Thompson AJ, Barrow CJ. Protein conformational misfolding and amyloid formation: characteristics of a new class of disorders that include Alzheimer's and Prion diseases. *Curr Med Chem* 2002; **9**: 1751-62.
72. Trzesniewska K, Brzyska M, Elbaum D. Neurodegenerative aspects of protein aggregation. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2004; **64**: 41-52.
73. Rubenstein RC, Lyons BM. Sodium 4-phenylbutyrate downregulates HSC70 expression by facilitating mRNA degradation. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2001; **281**: L43-L51.

74. Rubenstein RC, Zeitlin PL. Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2000; **278**: C259-C267.
75. Choo-Kang LR, Zeitlin PL. Induction of HSP70 promotes DeltaF508 CFTR trafficking. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2001; **281**: L58-L68.
76. Hampton RY. ER stress response: getting the UPR hand on misfolded proteins. *Curr Biol* 2000; **10**: 518-21.
77. Hampton RY. ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2002; **14**: 476-82.
78. Wandinger SK, Richter K, Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery. *J.Biol.Chem.* 2008.
79. Buck TM, Wright CM, Brodsky JL. The activities and function of molecular chaperones in the endoplasmic reticulum. *Semin.Cell Dev.Biol.* 2007; **18**: 751-61.
80. Hartl D, Latzin P, Hordijk P *et al.* Cleavage of CXCR1 on neutrophils disables bacterial killing in cystic fibrosis lung disease. *Nat.Med.* 2007; **13**: 1423-30.
81. Sakai N, Wada T, Furuichi K *et al.* MCP-1/CCR2-dependent loop for fibrogenesis in human peripheral CD14-positive monocytes. *J.Leukoc.Biol.* 2006; **79**: 555-63.
82. Hartl D, Griese M, Nicolai T *et al.* A role for MCP-1/CCR2 in interstitial lung disease in children. *Respir.Res.* 2005; **6**: 93.
83. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248-54.
84. Brasch F, Schimanski S, Muhlfeld C *et al.* Alteration of the pulmonary surfactant system in full-term infants with hereditary ABCA3 deficiency. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2006; **174**: 571-80.
85. Duck-Chong CG. The isolation of lamellar bodies and their membranous content from rat lung, lamb tracheal fluid and human amniotic fluid. *Life Sci* 1978; **22**: 2025-30.
86. Wikenheiser KA, Vorbroker DK, Rice WR *et al.* Production of immortalized distal respiratory epithelial cell lines from surfactant protein C/simian virus 40 large tumor antigen transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**: 11029-33.
87. Brasch F, Johnen G, Schauer-Vukasinovic V, Ten Brinke A, Kapp N. Napsin A is involved in the processing of proSP-C. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 2001; **163**: A560.
88. Ikegami M, Jobe AH. Surfactant protein metabolism in vivo. *Biochim.Biophys.Acta* 1998; **1408**: 218-25.
89. Jobe AH, Ikegami M. Surfactant metabolism. *Clin.Perinatol.* 1993; **20**: 683-96.

90. Bridges JP, Xu Y, Na CL, Wong HR, Weaver TE. Adaptation and increased susceptibility to infection associated with constitutive expression of misfolded SP-C. *J.Cell Biol.* 2006; **172**: 395-407.
91. Denning GM, Anderson MP, Amara JF, Marshall J, Smith AE, Welsh MJ. Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* 1992; **358**: 761-4.
92. Pind S, Riordan JR, Williams DB. Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J.Biol.Chem.* 1994; **269**: 12784-8.
93. Yang Y, Janich S, Cohn JA, Wilson JM. The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993; **90**: 9480-4.
94. Pasyk EA, Foskett JK. Mutant (delta F508) cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel is functional when retained in endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J.Biol.Chem.* 1995; **270**: 12347-50.
95. Postle AD, Gonzales LW, Bernhard W *et al.* Lipidomics of cellular and secreted phospholipids from differentiated human fetal type II alveolar epithelial cells. *J.Lipid Res.* 2006; **47**: 1322-31.
96. Hiraoka M, Abe A, Lu Y *et al.* Lysosomal phospholipase A2 and phospholipidosis. *Mol.Cell Biol.* 2006; **26**: 6139-48.
97. Hite RD, Seeds MC, Safta AM *et al.* Lysophospholipid generation and phosphatidylglycerol depletion in phospholipase A2-mediated surfactant dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004.
98. Holm BA, Wang Z, Notter RH. Multiple mechanisms of lung surfactant inhibition. *Pediatr.Res.* 1999; **46**: 85-93.
99. Wang Z, Notter RH. Additivity of protein and nonprotein inhibitors of lung surfactant activity. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1998; **158**: 28-35.
100. Lang CJ, Postle AD, Orgeig S *et al.* Dipalmitoylphosphatidylcholine is not the major surfactant phospholipid species in all mammals. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 2005; **289**: R1426-R1439.
101. Abe A, Hiraoka M, Wild S, Wilcoxon SE, Paine P3, Shayman JA. Lysosomal phospholipase A2 is selectively expressed in alveolar macrophages. *J Biol Chem* 2004.
102. Wang JM, Sica A, Peri G *et al.* Expression of monocyte chemotactic protein and interleukin-8 by cytokine-activated human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler.Thromb.* 1991; **11**: 1166-74.
103. Moore BB, Paine R, III, Christensen PJ *et al.* Protection from pulmonary fibrosis in the absence of CCR2 signaling. *J.Immunol.* 2001; **167**: 4368-77.

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Bestandteile der Surfactantlipide	7
Tabelle 2:	Histologische und zellbiologische Auswirkungen je nach Art und Lage der SP-C-Mutationen	15
Tabelle 3:	Übersicht über die verwendeten Antikörper für Westernblot und Immunfluoreszenz.....	27
Tabelle 4:	Optische Eigenschaften der verwendeten Sekundärantikörper (Invitrogen) für die Immunfluoreszenz.....	27
Tabelle 5:	Übersicht über die verwendeten Antikörper für die Durchflusszytometrie	28
Tabelle 6:	Übersicht über die verwendeten Vektoren	28
Tabelle 7:	Übersicht über die verwendeten Oligonukleotidprimer.....	32
Tabelle 8:	Zusammensetzung der Stufen des Dichtegradienten	40
Tabelle 9:	Optimale Geräte-Einstellungen für den PCR-Ablauf.....	45
Tabelle 10:	Pipetierschema bei der Antikörperzugabe beim FACS	55
Tabelle 11:	Kolokalisation zellulärer Markerproteine mit proSP-C-Prozessierungsintermediaten in MLE-12- und A549-Zellen.....	82
Tabelle 12:	Hitzeschockproteinexpression in MLE-12-Zellen, die mutiertes SP-C exprimieren	88
Tabelle 13:	Lipidverteilung bei unbehandelten MLE-12-Zellen, die stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C ^{Wt, I73T und A116D} transfiziert wurden, Zellysat.....	93
Tabelle 14:	Fettsäureübersicht von PC und LPC, Zellysat	98
Tabelle 15:	Lipidverteilung bei unbehandelten MLE-12-Zellen, die stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C ^{Wt, I73T und A116D} transfiziert wurden, Kulturüberstand	101
Tabelle 16:	Fettsäureübersicht von PC und LPC, Kulturüberstand	106
Tabelle 17:	Unterschiede in der Lipidzusammensetzung	108
Tabelle 18:	Vitalitätstests, durchgeführt mittels Trypanblaufärbung	129
Tabelle 19:	Verwendete MLE-12-Zellen für die Lipiduntersuchung, Hauptversuch.....	130
Tabelle 20:	Massenspektrometrische Auswertung der Lipidzusammensetzung, Vorversuch.....	133
Tabelle 21:	Massenspektrometrische Auswertung der Lipidzusammensetzung, Hauptversuch.....	136
Tabelle 22:	Massenspektrometrische Auswertung der Fettsäurekomponenten von PC, Vorversuch.....	139

Tabelle 23:	Massenspektrometrische Auswertung der Fettsäurekomponenten von PC, Hauptversuch	141
Tabelle 24:	Massenspektrometrische Auswertung der Fettsäurekomponenten von LPC, Vorversuch	144
Tabelle 25:	Massenspektrometrische Auswertung der Fettsäurekomponenten von LPC, Hauptversuch	146
Tabelle 26:	Massenspektrometrische Auswertung der Fettsäurekomponenten von PG, Hauptversuch	148
Tabelle 27:	Massenspektrometrische Auswertung der Fettsäurekomponenten von SPM, Hauptversuch	150
Tabelle 28:	Massenspektrometrische Auswertung der Fettsäurekomponenten von Cer und GluCer, Hauptversuch	152
Tabelle 29:	Lipidverteilung bei unbehandelten MLE-12-Zellen, die stabil mit dem Vektor pcDNA3/HA-hSP-C ^{Wt} , I73T und A116D transfiziert wurden, Vorversuch	153
Tabelle 30:	Lipidverteilung bei mutiertem proSP-C im Vergleich zu Wildtyp proSP-C, Vorversuch	155

7.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Wesentliche Proteinanteile des Surfactants	6
Abbildung 2:	Allgemeine Grundstruktur der Phosphoglyceride	8
Abbildung 3:	Struktur der Sphingolipide	9
Abbildung 4:	Struktur von Cholesterin	9
Abbildung 5:	Ablauf des Surfactantmetabolismus	10
Abbildung 6:	Darstellung der Surfactanthomöostase	11
Abbildung 7:	Prozessierung von SP-C	12
Abbildung 8:	Darstellung des proSP-C Moleküls mit ausgewiesenen Mutationen	14
Abbildung 9:	Surfactantprotein-C-Mutationen als Ursache interstitieller Lungenerkrankungen	16
Abbildung 10:	Postulierte Prozessierungsprodukte nach Brasch et al.	17
Abbildung 11:	Vektor pcDNA3	29
Abbildung 12:	pcDNA3/HA-hSP-C ^{Wt}	30
Abbildung 13:	Transfektionsvektoren pEGFP-C1 und pEGFP-N1	31
Abbildung 14:	Agarosegel des Mykoplasmentests.	36
Abbildung 15:	Funktionsweise von ExGen500 [®] Fermentas	38
Abbildung 16:	Ficoll-Gradient	41
Abbildung 17:	Darstellung des Konzentrators	54
Abbildung 18:	Agarosegelelektrophorese von Plasmid-DNA (pcDNA3/HA-hSP-C)	57

Abbildung 19: Übersicht über die aus transformierten E.coli-Zellen isolierte Plasmid-DNA (pEGFP/C1-hSP-C).....	58
Abbildung 20: Übersicht über die aus transformierten E.coli-Zellen isolierte Plasmid-DNA (pEGFP/N1-hSP-C).....	59
Abbildung 21: Übersicht der Sequenzierungsergebnisse von pEGFP/C1-hSP-C	60
Abbildung 22: Auswertung der Transfektionseffizienztestung	61
Abbildung 23: Westernblotanalyse der HA-Fusionsproteine.....	62
Abbildung 24: Auswirkungen von Inkubationszeit und Arzneimittelkonzentration auf die Hitzeschockexpression	64
Abbildung 25: Messung der LDH-Aktivität im Zelllysat und im zugehörigen Kulturüberstand	65
Abbildung 26: Postulierte intrazelluläre Prozessierungsintermediate der Fusionsproteine zwischen proSP-C und HA oder EGFP	68
Abbildung 27: Westernimmunoblotanalysen von MLE-12-Zellen, Wt und I73T	69
Abbildung 28: Nachgewiesene intrazelluläre Prozessierungsintermediate, Wt und I73T	70
Abbildung 29: Vergleich zwischen Patient mit Mutation I73T in SP-C zu MLE-12-Zellen, die I73T-mutiertes SP-C exprimieren.....	72
Abbildung 30: Westernimmunoblotanalysen von MLE-12-Zellen, Wt und A116D	73
Abbildung 31: Nachgewiesene intrazelluläre Prozessierungsintermediate, Wt und A116D.....	74
Abbildung 32: Westernimmunoblotanalysen von MLE-12-Zellen, Wt und P30L, L110R, P115L, L188Q	76
Abbildung 33: Elektronenmikroskopische Aufnahmen alveolärer Typ-II-Zelllinien.....	77
Abbildung 34: Elektronenmikroskopie von MLE-12-Zellen, die Wildtyp SP-C exprimieren	78
Abbildung 35: Elektronenmikroskopie von MLE-12-Zellen, die I73T-mutiertes proSP-C exprimieren	78
Abbildung 36: Elektronenmikroskopie von MLE-12-Zellen, die I73T- oder A116D-mutiertes proSP-C exprimieren.....	79
Abbildung 37: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Large aggregates.....	79
Abbildung 38: Elektronenmikroskopie von MLE-12-Zellen, die P30L-, L110R-, P115- oder L188Q-mutiertes proSP-C exprimieren	80
Abbildung 39: Anzahl der Lamellarkörperchen pro Schnittebene im Elektronenmikroskop	81
Abbildung 40: Immunfluoreszenz von transient mit pEGFP-N1/hSP-C transfizierten A549-Zellen	83
Abbildung 41: Immunfluoreszenz von stabil mit pcDNA3/HA-hSP-C transfizierten MLE-12-Zellen	84
Abbildung 42: LDH-Freisetzung von stabil transfizierten MLE-12-Zellen.....	85

Abbildung 43: Übersicht über die Expression der Hitzeschockproteine; Wt, I73T und A116D	87
Abbildung 44: Übersicht über die Expression der Hitzeschockproteine; Wt, P30L, L110R, P115L und L188Q	89
Abbildung 45: Lipidverteilung bei Wt und I73T, Zelllysate	95
Abbildung 46: Lipidverteilung bei Wt und A116D, Zelllysate.....	96
Abbildung 47: Lipidverteilung bei Wt und I73T, Kulturüberstand	103
Abbildung 48: Lipidverteilung bei Wt und A116D, Kulturüberstand	104
Abbildung 49: Grafische Darstellung der drei massenspektrometrischen Messungen zur Lipidverteilung	109
Abbildung 50: CCR-2-Oberflächenexpression auf Lymphozyten.....	110
Abbildung 51: CXCR-1-Oberflächenexpression auf Lymphozyten	111
Abbildung 52: Oberflächenrezeptorexpression auf Neutrophilen.....	112
Abbildung 53: Darstellung der massenspektrometrischen Daten der Zelllysate, die sich auf den Mittelwert von Wildtyp proSP-C beziehen, Hauptversuch.....	137
Abbildung 54: Darstellung der massenspektrometrischen Daten der Kulturüberstände, die sich auf den Mittelwert von Wildtyp proSP-C beziehen, Hauptversuch	138
Abbildung 55: Darstellung der massenspektrometrischen Daten der Zelllysate, die sich auf den Mittelwert von Wildtyp proSP-C beziehen, Hauptversuch.....	142
Abbildung 56: Darstellung der massenspektrometrischen Daten der Kulturüberstände, die sich auf den Mittelwert von Wildtyp proSP-C beziehen, Hauptversuch	143
Abbildung 57: Grafische Darstellung der massenspektrometrischen Messungen zur Lipidverteilung des Zelllysates, Vorversuch	154
Abbildung 58: Lipidverteilung bei Wt und I73T, Zelle, Vorversuch.....	156
Abbildung 59: Lipidverteilung bei Wt und A116D, Zelle, Vorversuch	158

7.5 Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. M. Griese ganz herzlich für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung, die Anregungen und Hilfestellungen und die viele Zeit, die er für mich aufgebracht hat.

Des Weiteren möchte ich meinem Betreuer, Herrn Dr. Markus Woischnik, für seine Geduld, Nervenstärke und ausgiebige, kompetente Unterstützung bei sämtlichen labortechnischen Auswertungen und Methoden danken. Er konnte mir nicht nur fachlich immer weiterhelfen, sondern stand mir auch bei so manchen Computerproblemen helfend zur Seite.

Besonders herzlich möchte ich mich bei unserer MTA, Frau Stefanie Gruschka, für ihre immer freundliche Art, ihre Hilfsbereitschaft und ihre tatkräftige Unterstützung bei meiner Doktorarbeit bedanken. Sie entlastete mich besonders, indem sie mir einige Routinearbeiten abnahm.

Bei meinen Mitdoktoranden Maria Wassilewa, Asli Pamir, Nina Weichert, Anette Bauer, Jan Ripper, Marcus Schreiner, Steffi Heinrich, Veronica Marcos und unserer technischen Assistentin Andrea Schams möchte ich mich für Ihre Hilfestellungen und die gute Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Vielen Dank auch an unsere beiden Postdocs Herrn Dr. Dominic Hartl und Herrn Dr. Aki Hector, die immer gut gelaunt waren und unterstützende und hilfreiche Ratschläge für mich parat hatten. Ihre Betreuung, vor allem durch Herrn Dr. Aki Hector, bei der Bedienung des FACS-Gerätes war sehr förderlich.

Prof. Beers danke ich für die Vorarbeit bei der Erstellung der Vektoren.

Prof. Welsch danke ich für die Ermöglichung meiner elektronenmikroskopischen Arbeiten und die Überlassung seiner TA Frau Tost für die technische Hilfestellung.

Prof. Schmitz danke ich für die Analyse meiner Proben mittels ESI-MS/MS.

Florian Sulzmaier danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Zu guter Letzt möchte ich meinem Freund Bertram Herzog und meiner Familie danken, deren Motivation und Unterstützung einen sehr großen Teil zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

7.6 Lebenslauf

Angaben zur Person Name: Christiane Alexandra Sparr

Staatsangehörigkeit: deutsch

Geburtsdatum: 01.10.1978

Geburtsort: München

Konfession: römisch katholisch

Schulbildung	1985 – 1989	Grundschule Gebeleschule, Gebelestr. 2, 81679 München
	1989 – 1998	Gymnasium Max-Josef-Stift, Staatliches Neusprachliches und Musisches Gymnasium für Mädchen Mühlbaurstr. 15, 81677 München Abitur (Allgemeine Hochschulreife) (Abschluss 1,7)
Studium	10/1998 – 07/2004	Ludwigs-Maximilians-Universität München Studienfach: Pharmazie
	25.08.2000	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
	10.04.2003	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
	06/2003 – 11/2003	Praktische Ausbildung nach § 4 AAppO / Erste Hälfte: BKH Haar, Krankenhausapotheke
	12/2003 – 05/2004	Praktische Ausbildung nach § 4 AAppO / Zweite Hälfte: Nibelungen Apotheke München
	01.07.2004	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung (Abschluss 2,25)
	07/2004	Approbation als Apothekerin
Promotion	Seit 01.12.2004	Ludwig-Maximilians-Universität München, Haunersches Kinderspital „Molekulare Ursachen Interstitieller Lungenerkrankungen“ Doktorvater: Prof. Dr. med. Matthias Griese
Nebentätigkeit als Apothekerin	08/2004 – 09/2004	Urlaubsvertretung in der Nibelungen Apotheke München
	12/2004 – 04/2007	Kronen Apotheke, München
	12/2004 – 09/2005	Sendlinger Apotheke, München
	10/2005 – 06/2006	St. Antonius Apotheke, Berchtesgaden
	08/2006 – 11/2008	St. Bernhard Apotheke, München
	seit 05/2007	Arnika Apotheke, München