

Aus der Kinderklinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. D. Reinhardt

**Immunmodulatorische Funktion der Surfactant-assoziierten  
Proteine A und D im Rahmen der lokalen  
Immunabwehr in der Lunge**

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

vorgelegt von  
Bettina Schmidt  
aus  
München

2003

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

Berichterstatter: Prof. Dr. M. Griese

\_\_\_\_\_

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. M. Huber

Priv. Doz. Dr. K. Radon

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. P. Bufler

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2003

Meiner Familie

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>6</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
3.1 Substanzen.....	15
3.2 Bakterien.....	15
Verwendete Bakterienstämme und Charakterisierung .....	15
Bakterienkultur .....	15
Fluoreszenzfärbung der Bakterien.....	16
3.3 Surfactantproteine A und D.....	16
Reinheit der Surfactantprotein Präparationen.....	17
3.4 Agglutinationsversuche .....	18
3.5 Bindungsassay .....	19
3.6 Proliferation der Bakterien unter Einfluss von SP-A und SP-D.....	20
3.7 Phagozytose.....	21
Zellkultur .....	21
Phagozytoseversuche.....	21
Löschen der extrazellulären Fluoreszenz mit Trypanblau.....	22
Fluoreszenzmessung mit fluoreszenzaktiviertem Zellsorter .....	22
Fluoreszenzmikroskopie.....	22
3.8 Gemessene und berechnete Größen.....	23
Statistik.....	23
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>24</b>
4.1 Agglutination CF-assoziiertes Bakterien mit SP-A oder SP-D.....	24
SP-D agglutiniert im Gegensatz zu SP-A <i>P. aeruginosa</i> und <i>X. maltophilia</i> .....	24
Keine Korrelation zu LPS-Serotyp, Pyozintyp und Alginatebildung .....	26
4.2 SP-A und SP-D binden spezifisch plastikadhärente <i>P. aeruginosa</i> .....	27
4.3 Proliferation CF-assoziiertes Keime in Anwesenheit von SP-A und SP-D.....	29
SP-D moduliert das Wachstum CF-assoziiertes Keime .....	29
Die Hemmung der Proliferation von Bakterien durch SP-D ist konzentrationsabhängig.....	31
Keine Korrelation zu Agglutinationsverhalten und Keimtypisierung.....	31

4.4	Phagozytose .....	32
	SP-D aber nicht SP-A stimuliert die Phagozytose von P. aeruginosa durch MM6.	32
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>35</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>42</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>48</b>
7.1	Häufig verwendete Abkürzungen.....	48
7.2	Danksagung .....	49
7.3	Publikationen.....	50
7.4	Lebenslauf .....	52

## 1. Zusammenfassung

Die hydrophilen pulmonalen Surfactantproteine A und D (SP-A, SP-D) gehören zur Gruppe der C-Typ Lektine und spielen bei der angeborenen, primären Immunantwort der Lunge eine Rolle. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass SP-A und SP-D mit einer Reihe von Mikroorganismen und pulmonalen Entzündungszellen interagieren. In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von SP-A und SP-D bei der Immunabwehr Mukoviszidose-assoziiierter Keime wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas maltophilia*, *Burgholderia cepacia* und *Staphylococcus aureus* untersucht. Hierzu wurden zunächst insgesamt 57 klinische Isolate der Bakterien, darunter 35 *P. aeruginosa* Stämme, durch Sero- beziehungsweise Pyozintypisierung, Alginatebildung oder Kollagenaseaktivität charakterisiert. Wir untersuchten, inwiefern Agglutination und Proliferation der Bakterien sowie die Phagozytose speziell von *P. aeruginosa* durch SP-A und SP-D beeinflusst werden können. Die hier gezeigten Ergebnisse demonstrieren, dass SP-A und SP-D an *P. aeruginosa* binden. Die Interaktion mit den Bakterien ist kalziumabhängig, wird durch einfache Kohlehydrate gehemmt und somit über die Lektin/Kohlehydrat-Bindungsstellen der Surfactantproteine vermittelt. Trotz Bindung an plastikadhärente *P. aeruginosa* induziert SP-A keine Agglutination der Bakterien. SP-D hingegen agglutiniert *P. aeruginosa*. Darüber hinaus hemmt SP-D unabhängig von der Agglutination konzentrationsabhängig das Wachstum von *P. aeruginosa*. SP-D stimuliert die Phagozytose von Bakterien, indem es als Opsonin die Aufnahme der Keime durch eine humane Makrophagen Zelllinie verstärkt. SP-A beeinflusste die Phagozytose der untersuchten Keime dagegen nicht.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass SP-A und SP-D unterschiedliche immunmodulatorische Funktionen haben. SP-D stimuliert durch verstärkte Phagozytose unabhängig vom LPS Serotyp die Abwehr Mukoviszidose-assoziiierter Keime, speziell nicht mukoider *P. aeruginosa*. Beide Surfactantproteine binden spezifisch *P. aeruginosa*, aber nur SP-D induziert deren Agglutination und führt durch die Bildung von größeren Aggregaten möglicherweise zur Steigerung der pulmonalen Clearance der Bakterien.

## 2. Einleitung

Das respiratorische System ist durch die Atmung kontinuierlich inhalativen toxischen Substanzen und infektiösen Partikeln ausgesetzt. Daher musste sich im Laufe der Evolution im Respirationstrakt ein komplexes System der Immunabwehr entwickeln, um den Körper vor dem Eindringen von Pathogenen zu schützen. In den oberen Atemwegen wird die Ansiedlung von Mikroorganismen vor allem durch Luftfiltration im Nasopharynxbereich, aerodynamische Filtrationsmechanismen im Tracheo-Bronchialsystem, Sekretionsfluss über der Schleimhautoberfläche durch Bewegung der Zilien und mechanische Reflexe wie den Hustenreiz verhindert. Damit werden die unteren Abschnitte des Tracheobronchialbaumes mit der alveolären Gasaustauschfläche hocheffizient vor dem Eindringen jeglicher Partikel, sowie Mikroorganismen bis zu einer Größe von 2-3  $\mu\text{m}$  geschützt (Pison et al., 1994). Noch kleinere Partikel und Mikroben, die trotzdem in die unteren Atemwege gelangen, werden durch ein Zusammenspiel zellulärer und humoraler Abwehrmechanismen bekämpft. Unser Immunsystem koordiniert und kontrolliert mit Hilfe von angeborenen (unspezifischen oder vorgebildeten) und erworbenen (spezifischen) Abwehrmechanismen die Abwehr von Krankheitserregern. Unter spezifischer Immunität versteht man die Fähigkeit des Immunsystems, eine spezifische Abwehrreaktion gegen körperfremde Stoffe (Antigene) zu entwickeln. Träger dieses Systems sind B-Lymphozyten und Plasmazellen, die antigenspezifische Antikörper produzieren, sowie T-Zellen. Nach durchlaufenen Infektionen werden Gedächtniszellen gebildet, die im Rahmen von Reinfektionen mit dem gleichen Pathogen eine rasche Reaktivierung der spezifischen Immunantwort ermöglichen. Die unspezifische Immunität ist angeboren und verleiht dem Körper die Möglichkeit, sofort auf eingedrungene Pathogene zu reagieren und somit die Zeit bis zum Eintreten einer effektiven spezifischen Immunantwort zu überbrücken. Dies ist besonders bei Kindern zwischen 6 Monaten und 2 Jahren wichtig, da in diesem Alter der mütterliche Antikörperschutz kaum mehr verfügbar ist und das unreife Immunsystem noch keine voll effiziente spezifische Abwehr entwickelt hat (van Golde, 1995). Wesentliche Effektormechanismen der angeborenen Immunität sind zum Beispiel Phagozytose durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten, Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie Zytokine durch Monozyten und Makrophagen und das Komplementsystem mit Plasmaproteinen, die eine kaskadenartige Abwehrreaktion auslösen können (Bühlin et al., 2000; Gemsa et al., 1997) (Abb. 1).

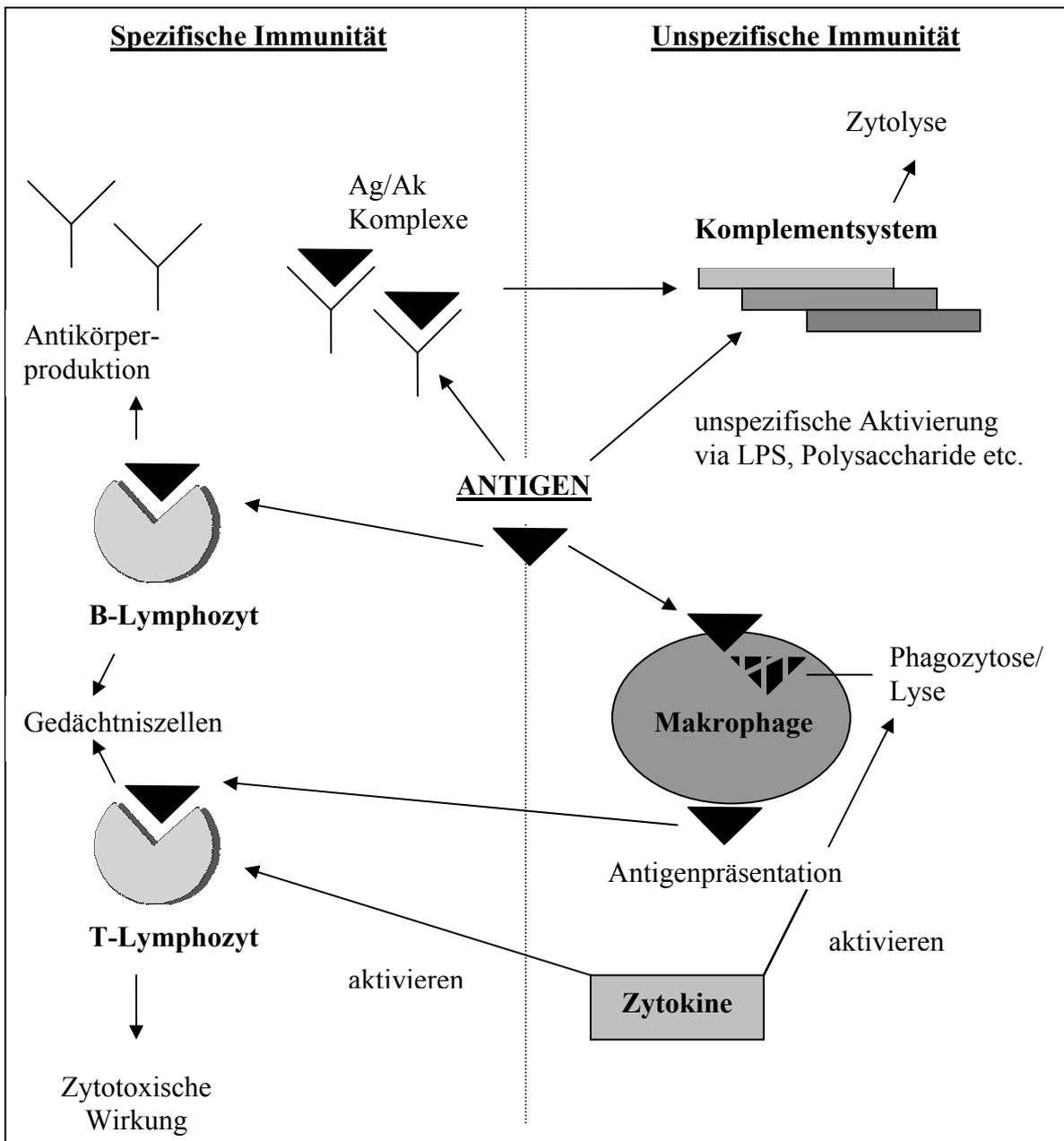


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Reaktion des Organismus auf Pathogene. Ein Pathogen (hier „Antigen“) wird primär von Makrophagen phagozytiert, bevor durch Antigenpräsentation unter Beteiligung insbesondere von dendritischen Zellen das spezifische Immunsystem aktiviert wird. Hierbei spielen Zytokine eine wichtige Rolle. Zusätzlich kann das Komplementsystem nach Bindung von Antikörpern an die Erreger über eine unspezifische Aktivierung von Plasmaproteinen eine kaskadenartige Reaktion hervorrufen, die in der Zytolyse endet.

Vor dem direkten Kontakt mit den immunen Effektorzellen der Lunge interagiert das inhalierte Pathogen mit einem Oberflächenfilm, der die gesamte Alveolarfläche bedeckt, dem pulmonalen „Surfactant“ (**surface active agent**). Surfactant besteht in erster Linie aus Phospholipiden und verschiedenen Proteinen (Magoon et al., 1983). Neben der Stabilisierung der Oberflächenspannung der Lungenbläschen während der Atmung, spielt

Surfactant eine wichtige Rolle bei der Abwehr infektiöser Erreger. Bisher wurden vier spezifische Surfactant Proteine (SP-A, SP-B, SP-C und SP-D) entdeckt. SP-B und SP-C sind hydrophobe Proteine, die eine Verteilung der Oberflächenlipide erleichtern und somit die Lipidfilmformation während der Atemdynamik beeinflussen (McIntosh et al., 1996; Pison et al., 1994). Neben Reorganisation und Metabolismus von Surfactant durch SP-A haben SP-A und SP-D eine Funktion in der Immunabwehr von Mikroorganismen (Pison et al., 1994; Crouch, 2001). SP-A und -D werden in den Lungen in Typ II Alveolarzellen und Clara Zellen gebildet und in die Alveolen beziehungsweise die unteren Atemwege sezerniert. Als hydrophile, kollagenähnliche Glykoproteine werden sie der Familie der C-Typ-Lektine zugeordnet.

Zu den „Kollektinen“ gehören neben SP-A und SP-D auch Mannose bindendes Protein (MBP), Rinderkonglutinin und -collektin-43 (CL43) (Hoppe und Reid, 1994). Diese Proteine haben einen ähnlichen charakteristischen Aufbau. Sie bestehen aus N-terminaler Region, kollagenähnlicher Domäne,  $\alpha$ -helikaler Peptid-Region und einer C-Typ-Lektindomäne. SP-A und SP-D sind komplexe Proteine bestehend aus mehreren Monomeren mit einem Molekulargewicht von 30-35 kD (SP-A) beziehungsweise 43 kD (SP-D) durch unterschiedliche Länge der Kollagenregion (Abb. 2).

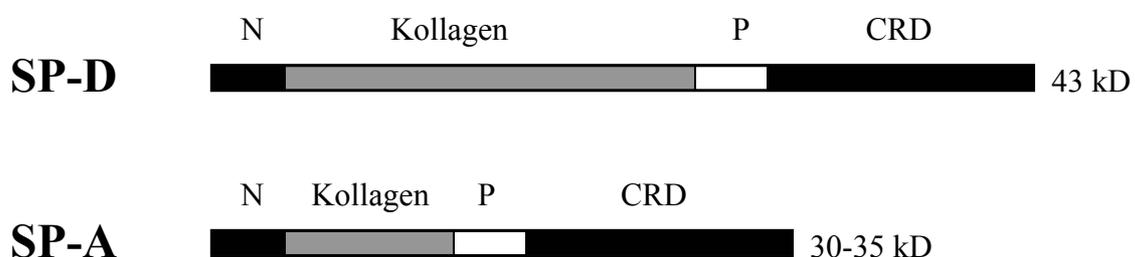


Abbildung 2: **Monomere Struktur der Kollektine SP-A und SP-D.** Zu beachten sind die ähnliche Größe und Verteilung im Bereich der N-terminalen Region, Peptid und Lektindomäne (CRD = carbohydrate recognition domain). Unterschiede in der Monomergröße resultieren vor allem aus der unterschiedlichen Länge des kollagenen Anteils (Modifiziert nach Crouch, 1998).

Sie formen Oligomere, die sich im Grad der Multimerisation unterscheiden. Kollektine werden als Brücke zwischen Pathogenen und dem Immunsystem betrachtet und spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der angeborenen direkten Immunabwehr (Crouch, 1998; Wright, 1997; van Golde, 1995; Hoppe und Reid, 1994). Ihre C-Typ-Lektindomäne bindet Kohlehydratliganden auf der Zelloberfläche von Pathogenen und erfüllt damit eine Erkennungsfunktion. Die Kohlehydratbindungsspezifität der Kollektine ist unterschiedlich und man vermutet, dass dies eine Erklärung dafür ist, dass verschiedene Kollektine

unterschiedliche Pathogene binden (Wright, 1997). Die Bindung von Kohlehydraten an Kollektine kann neben Aggregation auch bestimmte Effektorfunktionen über die Kollagenregion auslösen. Es kann zu einer Bindung an Zelloberflächenrezeptoren kommen, die Phagozytose und Elimination der Pathogene durch toxische Sauerstoffmetabolite induzieren oder es folgt eine Komplementaktivierung (im Fall von MBP) (Hoppe und Reid, 1994). Auch die Multimerisation der Kollektine spielt bei der Interaktion zwischen immunkompetenten Zellen des Körpers und den Pathogenen eine Rolle. Aus der Kristallstruktur von MBP konnte zum Beispiel eine ideale Geometrie von Zuckerbindungsstellen für den Kontakt zu Kohlehydraten auf der Oberfläche von Mikroorganismen abgeleitet werden (Wright, 1997). Die beschriebenen Effektormechanismen der Kollektine ähneln stark der Funktion von Komplementaktivatoren wie C1q, das auch eine Kollagendomäne enthält und an Immunkomplexe bindet, beziehungsweise mit Zelloberflächenrezeptoren interagiert. Erste Hinweise auf Ähnlichkeiten zwischen der Funktion von C1q und SP-A durch Stimulation von Phagozytose wurden vor circa 10 Jahren von Tenner und Mitarbeitern beschrieben (Tenner et al., 1989). Seitdem konnte die Rolle von SP-A bei der Immunabwehr immer genauer beschrieben werden. 1992 wurde erstmals nachgewiesen, dass SP-D die Immunantwort auf gramnegative Bakterien beeinflussen kann. Bei diesen Versuchen wurde mikro- und makroskopisch nachgewiesen, dass fluoreszenzmarkierte *Escherichia coli* kalziumabhängig durch SP-D agglutiniert werden und radioaktivmarkiertes SP-D die Keime binden kann.

Die Abwehrfunktion von SP-A und SP-D wurde im Zusammenhang mit einer Vielzahl pulmonaler Pathogene untersucht. Die Kollektine binden an gramnegative Bakterien (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*), grampositive Bakterien (*Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus*), *Mycobacterium tuberculosis*, Viren (*Influenza A*), Pilze (*Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*) und Protozoen (*Pneumozystis carinii*). Die direkte Interaktion von SP-A und SP-D mit Mikroben kommt über die Lektindomänen zustande und ist von der Anwesenheit freien Kalziums abhängig. Die Multimerisation von SP-D als kreuzförmiges Oligomer scheint ideal für Agglutinationsreaktionen zu sein (van Golde, 1995).

Neben der Interaktion mit Bakterien binden SP-A und SP-D auch an Alveolarmakrophagen und periphere Leukozyten im Blut. Anders als die lektinvermittelte Bindung von SP-A und SP-D an Bakterien ist die Bindung an Alveolarmakrophagen abhängig von spezifischen, membranständigen Rezeptoren für SP-A und -D auf den Alveolarmakrophagen (Tenner

et al., 1989; Crouch, 1998). In einigen Fällen kann dies mit kooperierenden Kohlehydratrezeptoren zum Beispiel Mannose auf den Alveolarmakrophagen und Bindung an die Lektindomänen der Kollektine verbunden sein (Gaynor et al., 1995) (Abb. 3).

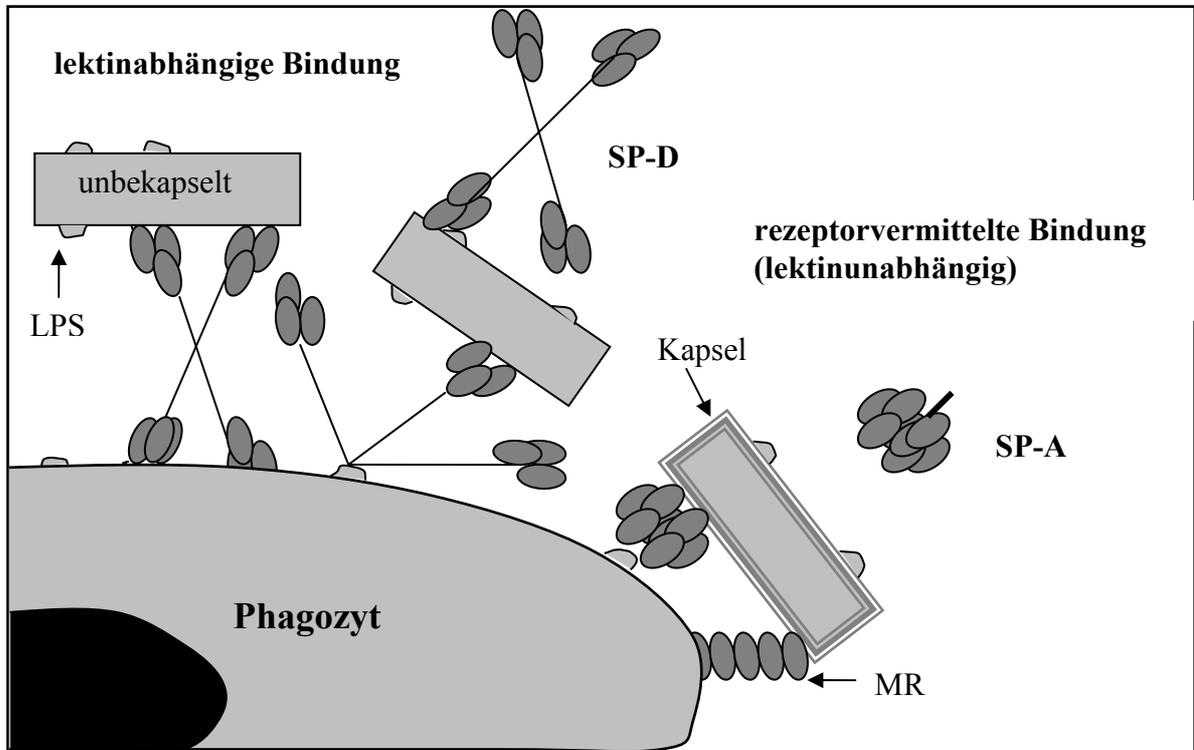


Abbildung 3: **Interaktion mit gramnegativen Bakterien.** Schematische Darstellung der Partikelopsonisierung von SP-A und SP-D. SP-A kann direkt mit bekapselten Organismen interagieren und verstärkt die Interaktion mit Phagozyten durch Bindung an spezifische Rezeptoren. In einigen Fällen kann dies mit kooperierenden Mannose Rezeptoren (MR) auf den Alveolarmakrophagen verbunden sein. SP-D kann direkt mit unbekapselten oder schwach bekapselten Organismen in Kontakt treten und die Interaktion mit Leukozyten durch lektinabhängige und -unabhängige Mechanismen verstärken (Modifiziert nach Crouch, 1998).

Man vermutet mehr als einen Rezeptortyp für SP-A auf Alveolarmakrophagen, des Weiteren bindet ein Rezeptor sowohl C1q als auch SP-A (Wright, 1997). Chronos und Mitarbeiter beschrieben ein Protein auf Makrophagen, Clara Zellen und der humanen monozytären Zelllinie U-937, welches neben SP-A auch MBP bindet, sich aber vom Mannose-Rezeptor unterscheidet (Chronos et al., 1996). Auf der Basis von Inhibitionsstudien mit C1q und Kollagen wurde vermutet, dass die Interaktion zwischen SP-A und Makrophagen über die Kollagendomänen zustande käme (Pison, Wright, and Hawgood, 1992). Ohmer-Schrock und Mitarbeiter beobachteten eine partielle Hemmung der SP-A Bindung durch Kollagenase resistente SP-A Fragmente und vermuteten daher zwei Bindungsstellen zwischen SP-A und Alveolarmakrophagen, nämlich eine über die Kohlehydratregion und die andere über die Kollagenregion des SP-A (Ohmer-Schrock et

al., 1993). Einen Hinweis für SP-D Rezeptoren auf Makrophagen erbrachten Miyamura und Mitarbeiter in Bindungsstudien mit humanem SP-D und Alveolarmakrophagen (Miyamura et al., 1994). Die Interaktion war unabhängig von Kalzium und ließ sich nicht durch C1q hemmen, wodurch auf eine C1q-Rezeptor- und lektinunabhängige Bindungsstelle geschlossen wurde. Gleichzeitig wurde aber auch berichtet, dass SP-D kalziumabhängig an Makrophagen bindet und dass diese Bindung durch Zucker gehemmt wird (Kuan et al., 1994). Aufgrund dieser Studien wird davon ausgegangen, dass Alveolarmakrophagen wahrscheinlich mehr als eine spezifische Bindungsstelle für SP-D haben.

In Studien zur Funktion von SP-A und SP-D wurde beschrieben, dass durch die Bindung der Surfactantproteine an Alveolarmakrophagen die Phagozytose und Elimination von Pathogenen stimuliert wird. Andererseits können SP-A und SP-D auch direkt an Bakterien oder Viren binden. Dadurch werden die Krankheitserreger effektiver den Effektor-Immunezellen (Makrophagen, dendritische Zellen) zur Aufnahme und Elimination präsentiert (Crouch, 1998; Wright, 1997; Tenner et al., 1989). So wurde in zwei Studien berichtet, dass SP-A, gewonnen aus der bronchialen Spülflüssigkeit von Patienten mit Alveolarproteinose, zum Beispiel die Phagozytose von *Haemophilus influenza* (Tino und Wright, 1996) und *E. coli* (Manz-Keinke et al., 1992) verstärkt. Im Gegensatz dazu wurde von McNeely und Mitarbeiter (McNeely et al., 1993) berichtet, dass SP-A zwar die Bindung, aber nicht die Aufnahme von *S. aureus* an Alveolarmakrophagen vermittelt. Diese Unterschiede in der Fähigkeit von SP-A die Phagozytose verschiedener Bakterien zu stimulieren, könnten mit den unterschiedlichen Wachstumsphasen der Bakterien in Verbindung stehen (Wright, 1997). Denn in den Versuchen von Manz-Keinke und Mitarbeitern wurde nachgewiesen, dass SP-A die Phagozytose in Abhängigkeit von der Wachstumsphase der Bakterien unterschiedlich beeinflusst (Manz-Keinke et al., 1992). Untersuchungen zum Effekt von SP-A oder SP-D direkt auf das Wachstum von Bakterien wurden bisher noch nicht publiziert.

Bei der Opsonisierung der Pathogene durch SP-A und SP-D werden die Partikel so modifiziert, dass sie durch Phagozyten effizienter internalisiert werden können. SP-A opsoniert und verstärkt die Elimination zum Beispiel von *H. influenza A* (McNeely und Coonrod, 1994), bekapselten *K. pneumoniae* (Kabha et al., 1997) und *S. aureus* (van Iwaarden et al., 1990) durch Alveolarmakrophagen, wenn SP-A mit den Bakterien vorinkubiert wurde. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass die Vorinkubation der Bakterien mit SP-A den gleichen Effekt auf die Phagozytose hatte wie eine gemeinsame

Inkubation von SP-A, Bakterien und den Makrophagen. Weiterhin wurde gezeigt, dass die beiden Proteine Chemotaxis stimulieren können (Wright, 1997). Bei SP-D scheint diese Stimulation über die Kohlehydratstruktur auf der Phagozytenoberfläche zustande zu kommen (Crouch et al., 1995), da der Effekt durch Zugabe von Monosacchariden spezifisch gehemmt werden konnte. SP-A stimuliert die Chemotaxis lektinunabhängig und es wurde spekuliert, dass eventuell die Kollagendomäne und nicht wie bei SP-D die Lektinbindungsstelle eine Rolle spielt (Wright und Youmans, 1993). Kontrovers wird die Rolle beider Surfactantproteine bei der durch Bakterien stimulierten Ausschüttung von Zytokinen, zum Beispiel von TNF- $\alpha$  aus Leukozyten, diskutiert. Verschiedene Autoren berichteten, dass SP-A die Zytokinausschüttung humaner Alveolarmakrophagen (McIntosh et al., 1996), humaner „buffy coat cells“ (Hickling et al., 1998) und der humanen Makrophagen Zelllinie U-937 (Sano et al., 1999) nach Stimulation mit *smooth* LPS (siehe weiter unten) hemmt. Diese Daten wurden bei *in vivo* Experimenten mit Mäusen, in denen das Gen für SP-A eliminiert worden war („knockout“-Mäuse) bestätigt. Sie zeigten, dass diese Mäuse, denen intratracheal *E. coli* 026:B6 LPS zugeführt worden war, signifikant mehr TNF- $\alpha$  als Wildtyp-Mäuse produzierten (Borron et al., 2000). Von Phelps und Mitarbeitern wurde dagegen berichtet, dass SP-A direkt die TNF- $\alpha$ -Sekretion über Zellen der humanen monozytären Zelllinie THP-1 stimulieren kann (Koptides et al., 1997; Song und Phelps, 2000). In anderen Studien wurde außerdem gezeigt, dass SP-A stimulierende Effekte auf die T-Lymphozytenproliferation hat (Kremlev et al., 1994), während für SP-D eine Hemmung der Lymphozytenproliferation (Borron et al., 1997 Abstr.) nachgewiesen wurde. Der genaue Mechanismus wurde noch nicht geklärt (Crouch, 1998).

Neuere Untersuchungen beschäftigen sich spezifisch mit der Funktion von SP-A und SP-D bei der Immunabwehr von *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* ist ein opportunistischer Keim, der vor allem bei Patienten mit Mukoviszidose, im Rahmen nosokomialer Infektionen oder bei immunsupprimierten Patienten gefunden wird (Craven und Steger, 1996). Bei Patienten mit Mukoviszidose (Cystischer Fibrose = CF) kolonisieren *P. aeruginosa* vorwiegend die Atemwege (Govan und Deretic, 1996; Hoiby, 1998). Bei chronischen Infektionen können *P. aeruginosa* eine Schleimhülle produzieren, die dem Seetang-Alginat ähnelt und aus Exopolysacchariden besteht, die sich als Biofilm um die Bakterien legen (Pedersen et al., 1990). Ähnlich wie die Polysaccharidkapsel bei anderen Bakterien erhöht dieser Biofilm die Virulenz von *P. aeruginosa* (Mathee et al., 1997; Gemsa et al., 1997; Stewart et al., 2001). Sowohl SP-A als auch SP-D können die Aufnahme von *P. aeruginosa* durch Alveolarmakrophagen stimulieren. Es wurde demonstriert, dass SP-A die Phagozytose von

lebenden mukoiden *P. aeruginosa* durch Opsonisierung (Mariencheck et al., 1999) erhöht und auch nicht opsoniert die Aufnahme in Alveolarmakrophagen steigert (Manz-Keinke et al., 1992). Restrepo und Mitarbeiter veröffentlichten eine Studie, bei der SP-D die Elimination eines mukoiden *P. aeruginosa* Stammes durch Makrophagen erhöhte (Restrepo et al., 1999). Die Immunabwehr intratracheal applizierter *P. aeruginosa* war signifikant in SP-A knockout-Mäusen vermindert (LeVine et al., 1998). Ein ähnlicher Zusammenhang wird bei CF Patienten vermutet. Es konnte nachgewiesen werden, dass die SP-A- und SP-D-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage (BAL) von CF Kindern erniedrigt waren (Postle et al., 1999; Griese et al., 1997). Die Änderungen des SP-A Gehaltes sind sekundärer Natur und stark vom Ausprägungsgrad der Lungenerkrankung abhängig. Bei Säuglingen und Kleinkindern mit CF wurde im Gegensatz hierzu von Hull und Mitarbeitern (Hull et al., 1997) ein erhöhter SP-A Gehalt in der BAL beschrieben. Ein weiterer Virulenzfaktor, der die Abwehr von *P. aeruginosa* erschwert ist die Fähigkeit, im Verlauf einer Infektion das Antigenprofil zu verändern und somit die Immunantwort zu umgehen. Hancock und Mitarbeiter demonstrierten durch Serotypisierung von *P. aeruginosa* bei CF Patienten, dass einige Stämme im Zeitverlauf veränderte Lipopolysaccharidstrukturen entwickelten (Hancock et al., 1983). Lipopolysaccharid (LPS) besteht aus einer Endotoxinregion dem Lipid A, einem Oligosaccharidanteil und einem langkettigen Polysaccharid O-Antigen. Es ist in der Zellwand von gramnegativen Bakterien wie *P. aeruginosa* zu finden. Der veränderten Lipopolysaccharidstruktur liegt eine Variation oder ein Verlust des O-Antigens zugrunde (Goldberg and Pler, 1996). Wenn das O-Antigen durch Mutationen während einer chronischen Infektion eliminiert wird, entsteht aus der phänotypisch glatten (*smooth*) LPS Struktur eine raue (*rough*) (Hitchcock et al., 1986). Somit wird durch Änderung der O-Antigen Determinante aus dem *smooth* LPS eine polyagglutinierbare *rough* Variante, die eine höhere Virulenz hat als monoagglutinierbare Stämme (Ojeniyi, 1994). SP-A bindet über den Lipid A-Anteil des LPS an gramnegative Bakterien (Van Iwaarden et al., 1994; Kalina et al., 1995). SP-D interagiert im Gegensatz dazu über die Polysaccharide und/oder das O-Antigen mit gramnegativen Bakterien (Kuan et al., 1992).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, unter Verwendung einer größeren Zahl verschiedener Bakterienstämme detailliert die immunmodulatorische Funktion der Surfactantproteine A und D im Rahmen der Immunabwehr CF-assoziiierter Keime wie *P. aeruginosa*, *X. maltophilia*, *S. aureus* und *B. cepacia* zu analysieren.

Der Schwerpunkt wurde hierbei auf *P. aeruginosa* gelegt. Folgende Aspekte der Immunabwehr wurden hierzu bearbeitet:

1. Erleichtern der physikalischen Clearance von Bakterien, zum Beispiel durch Agglutination.
2. Bindung von Bakterien.
3. Eingreifen in bakterielle Proliferationsmechanismen.
4. Herstellen einer Brücke zwischen Bakterien und Effektorzellen durch Opsonisierung von Keimen und Verstärken der Phagozytose und/oder direkte Aktivierung der Effektorzellen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Substanzen

Soweit nicht anders vermerkt stammen die verwendeten Reagenzien von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland). LPS von *Salmonella minnesota* (Serotyp *rough*, Produktnummer L6261) wurde von der Sigma Aldrich Vertriebs-GmbH (Deisenhofen, Deutschland) erworben.

Humanes Normalserum wurde aus einem gesunden Probandenkollektiv von fünf Personen gewonnen, aliquotiert und bei  $-60\text{ °C}$  aufbewahrt.

#### 3.2 Bakterien

##### *Verwendete Bakterienstämme und Charakterisierung*

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurden von Patienten mit Mukoviszidose isoliert. Es wurden 35 Stämme von *P. aeruginosa*, jeweils neun von *X. maltophilia* und *S. aureus* und vier von *B. cepacia* verwendet. Die Charakterisierung der Bakterien wurde von Herrn Prof. Dr. A. Bauernfeind (Max-von-Pettenkofer Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie, Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München) vorgenommen. 21 *P. aeruginosa* Stämme wurden mittels spezifischer Antiseren (monovalente *P. aeruginosa* Mischung, BioRad, München) serotypisiert beziehungsweise pyozintypisiert und phänotypisch die Fähigkeit zur Alginatbildung (mukoid/nicht mukoid) beurteilt. *S. aureus* wurde durch den Virulenzfaktor Koagulasebildung spezifiziert.

##### *Bakterienkultur*

Zur Bakterienkultur wurde Tryptone Soya Agar (CASO-Agar = Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar, Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England) verwendet, der nach Hitzesterilisierung in Petrischalen (Greiner Labortechnik GmbH, Kremsmünster, Österreich) gegossen wurde. Die für die Wachstumsversuche verwendeten Agarplatten wurden vor dem Experiment möglichst eine Woche lang im Kühlschrank bei  $4\text{ °C}$  gelagert, um durch trockeneren Agar die Aufnahme der  $100\text{ }\mu\text{l}$  Suspension zu erleichtern. Die Bakterienstämme wurden für die jeweiligen Experimente frisch auf den CASO-Agarplatten ausgestrichen und nach einer Inkubation von mindestens 24 h (*Pseudomonas* bis 48 h) durch Abschaben geerntet.

Für die jeweiligen Experimente wurden die Bakterien in Suspension aufgenommen und mit Hilfe eines Photometers (Eppendorf Gerätebau GmbH, Hamburg, Deutschland) bei

623 nm die Optische Dichte (OD) bestimmt. Durch Korrelation der OD mit gewachsenen Kolonien (colony forming units = CFU) pro Milliliter konnte so eine Bakterienzahl von  $10^9$  CFU/ml einer  $OD_{623nm}$  von 1 zugeordnet werden. Die Bakterien wurden entweder zum Teil zur Aufbewahrung bei  $-60\text{ }^\circ\text{C}$  in einer CASO-Nährbouillon mit 30 % Glycerin oder auf Schrägagar (Nutrient Agar Slant, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD USA) bei  $-60\text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren. Zur erneuten Hochzüchtung wurde zuerst eine Nährbouillon aus Caseinpepton-Sojamehlpepton (Tryptone Soja Broth, Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England) inokuliert, bevor die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen wurden.

#### *Fluoreszenzfärbung der Bakterien*

Die Fluoreszenzfärbung der Bakterien wurde nach der teilweise modifizierten Methode von Tino und Wright (Tino und Wright, 1996) durchgeführt. Die Bakterienstämme wurden nach der angegebenen Inkubationszeit von den Agarplatten geerntet, in 5 ml PBS (phosphatgepufferte Salzlösung, 79,1 mM NaCl, 17,9 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 56,9 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in Aqua bidest, pH 7,2) gelöst und bei 228 g 1 min abzentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus Instruments GmbH, München, Deutschland), um größere Aggregate oder Agarreste zu eliminieren. Der abgenommene Überstand wurde auf eine  $OD_{623}$  von 1,5 eingestellt, bei maximaler Geschwindigkeit (3023 g) 5 min zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 M, pH 9,0 gelöst. Dann wurde FITC (Fluorescein Isothiocyanate, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) aus einer 10 mg/ml Ansatzlösung in endotoxinarmen DMSO (Dimethyl Sulphoxide, Sigma-Aldrich CO, Ltd, UK, Irvine) in einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml hinzugefügt und lichtgeschützt auf einer langsam rotierenden Drehscheibe bei Raumtemperatur 1 h inkubiert. Die gefärbten Bakterien wurden viermal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen und in kleinen Volumina von 50  $\mu\text{l}$  bei  $-60\text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren. Eine Probe der Suspension wurde zur Überprüfung der Vitalität der Bakterien verdünnt und zur Auszählung der Einzelkolonien auf Agar ausgestrichen.

### **3.3 Surfactantproteine A und D**

Rekombinantes, humanes Surfactantprotein A (SP-A) für die Agglutinationsversuche wurde freundlicherweise von W. Steinhilber, Bykgulden GmbH in Konstanz, Deutschland zur Verfügung gestellt. Das in allen übrigen Versuchen (Bindung, Wachstum der Bakterien und Phagozytose) verwendete SP-A wurde aus der BAL von Patienten mit pulmonaler

Alveolarproteinose gewonnen (mit SDS-PAGE auf Reinheit überprüft) und uns von H. P. Haagsman (Laboratory of Veterinary Biochemistry, Utrecht University, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Beide SP-A Präparationen wurden in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 gelöst und bei -60 °C eingefroren.

Professor Erika Crouch (Department of Pathology, Washington University Medicine School, St. Louis, MO, USA) stellte freundlicherweise Surfactantprotein D (SP-D) zur Verfügung. In TBS/EDTA 10 mM, pH 7,5 gelöst erhielten wir sowohl rekombinantes Ratten- als auch humanes SP-D, das in CHO Zellen (chinese ovary cells) produziert wurde. Ratten-SP-D wurde nur in den Agglutinationsversuchen verwendet und erzielte die gleichen Ergebnisse wie humanes SP-D im Vergleich (siehe 3.4 Agglutinationsversuche).

#### *Reinheit der Surfactantprotein Präparationen*

Sämtliche Surfactantprotein Präparationen wurden auf Kontamination durch bakterielles Endotoxin beziehungsweise LPS untersucht. Hierzu wurde primär ein semiquantitativer Test (E-TOXATE<sup>®</sup>, Sigma, St. Louis, MO, USA) verwendet, mit dem man den LPS-Gehalt einer Standardverdünnungsreihe mit Probenverdünnungen von SP-A und SP-D vergleichen kann. Unter Verwendung des sehr sensitiven LPS Indikators aus Limulus Amöbozyten Lysat, konnte am Grad der Eintrübung und Gelbildung der Suspension die Endotoxinkonzentration optisch ermittelt werden. Zur genaueren Bestimmung von Endotoxin wurde zusätzlich ein quantitativer Test (QCL-1000<sup>®</sup>, BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) durchgeführt, bei dem die SP-A- beziehungsweise SP-D-Verdünnungen ebenfalls mit Limulus Amöbozyten Lysat vermischt wurden. Nach Inkubation für 10 min bei 37 °C wurde eine Substratlösung zugefügt und weitere 6 min inkubiert. Nach Beenden dieser Katalysatorreaktion mit einer Stop-Reagenz entwickelte sich eine gelbe Färbung, wenn Endotoxin in der Probe nachweisbar war. Die Absorption der Probe konnte anschließend spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen werden. Da die Absorption direkt proportional zu der Endotoxinmenge in der Probe ist, konnte die Konzentration aus der Standardkurve berechnet werden.

Das verwendete humane SP-D enthielt minimal messbare Endotoxinwerte (<320 ng/ml), SP-A wies 364 ng/ml LPS auf. Bei den Präparationen des Ratten-SP-D lagen die Messwerte zwischen 6 µg/ml und 25 ng/ml. Die stärker mit LPS kontaminierten Proben wurden nur bei den Agglutinationsversuchen verwandt, da hierbei der LPS Gehalt im SP-D keine Rolle spielte (siehe 3.4 Agglutinationsversuche). Außerdem konnte in weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur Stimulation von Makrophagen (Bufler et al., 2003) ein Einfluss auf die TNF- $\alpha$  Produktion durch den LPS Gehalt der SP-D Präparation

ausgeschlossen werden. Es wurden dem Versuchssystem 500 pg LPS zusammen mit SP-D zugeführt. Diese Menge an gereinigtem *P. aeruginosa* LPS, das in dieser Studie verwendet wurde, hatte keinen Effekt auf die TNF- $\alpha$  Produktion, wenn es alleine getestet wurde. (Bufler et al., 2003).

### 3.4 Agglutinationsversuche

Frisch ausgestrichene Bakterien nach Kultivierung über Nacht wurden in TBS (Tris-gepufferte Salzlösung, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl in Aqua bidest, pH 7,5) aufgenommen und 10 min bei 2800 U zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes und erneutem Mischen mit TBS wurden die Bakterien durch entsprechende Pufferzugabe auf  $10^9$  CFU/ml ( $OD_{623} = 1$ ) eingestellt. Die Hälfte dieser Suspension wurde mit 2 mM  $CaCl_2$  versetzt. Zu den Bakterien mit und ohne Kalzium wurde SP-D beziehungsweise SP-A in maximaler Konzentration von 5  $\mu$ g/ml gegeben. Nach Mischen wurde die Suspension auf einen Objektträger (Elka<sup>®</sup>, Assistent, Sondheim, Deutschland) pipettiert und das Agglutinationsverhalten sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch beurteilt. Um eine spontane Verklumpung der Bakterien oder eine schon durch die Zugabe von Kalzium ausgelöste Aggregation auszuschließen, wurden die Ergebnisse immer auch mit nativen beziehungsweise nur kalziumhaltigen Proben verglichen. In einem weiteren Schritt wurde die zur Agglutination minimal benötigte SP-D Konzentration ermittelt. Unter gleichen Versuchsbedingungen wurden 5  $\mu$ g/ml, 3  $\mu$ g/ml, 2  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml und kein rekombinantes SP-D mit Bakteriensuspensionen von vier stark agglutinierenden Bakterienstämmen mit und ohne Kalzium vermischt und das Agglutinationsverhalten mikroskopisch beurteilt, sowie mit den Vorergebnissen verglichen. Abschließend wurden sämtliche Objektträger mit den eingetrockneten Suspensionen hitzefixiert und nach Gram gefärbt, um mittels inverser Lichtmikroskopie (IMT-2, Olympus, Hamburg, Deutschland) geeignete Bildausschnitte zur Dokumentation festzuhalten.

Im Folgenden wurde versucht, die entstandenen Aggregate mit verschiedenen Zuckern oder mit EDTA wieder zu lösen beziehungsweise die Agglutination zu hemmen. Dazu wurden verschiedene Zucker (Maltose, Mannose und Glukose) in Aqua bidest gelöst in einer Endkonzentration von 100 mM, sowie EDTA 10 mM zu der entsprechenden Bakteriensuspension mit und ohne Kalzium beziehungsweise mit und ohne Surfactantprotein auf den Objektträger gegeben. Direkt nach dem Auftragen und Vermischen wurde das Lösen der Agglutinate mikroskopisch beurteilt und mit den

Nativpräparaten verglichen. Die Suspensionen wurden ebenfalls auf den Objektträgern getrocknet, hitzefixiert und zur Fotodokumentation gramgefärbt.

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu bestimmen, wurden die Experimente zur Agglutination sowie deren Hemmung mehrfach unter leicht modifizierten Versuchsbedingungen mit Standard-II Nährlösung statt TBS Puffer für die späteren Versuche (siehe 3.6 Proliferation) getestet. Ebenso wurde die Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse nach dem Wechsel von Ratten-SP-D auf humanes SP-D überprüft und ein möglicher Einfluss der unterschiedlichen LPS Konzentration in den SP-D Präparationen ausgeschlossen.

### 3.5 Bindungsassay

Das Bindungsassay wurde in Anlehnung an die Methode von Hartshorn entwickelt, der die SP-D Bindung an *E. coli* und *S. pneumoniae* untersucht hat (Hartshorn et al., 1998). In Carbonatpuffer ( $\text{Na}_2\text{HCO}_3$  15 mM,  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$  35 mM, pH 9,6) gelöste *P. aeruginosa* ( $10^8$  CFU/ml) wurden auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte (Maxisorp<sup>®</sup>, Nunc, Kamstrup, Dänemark) aufgebracht (100  $\mu\text{l}$ /Vertiefung) und bei 37 °C eingetrocknet. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 1 % Gelatine in TBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  2 mM (TBS/Ca) 4 h bei Raumtemperatur (150  $\mu\text{l}$ /Vertiefung) geblockt. Nach Waschen mit TBS/Ca wurden die adhärenen Bakterien mit verschiedenen Lösungen mit SP-A beziehungsweise SP-D in TBS/Ca mit und ohne EDTA 10 mM inkubiert. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten dreimal mit TBS/Ca gewaschen und Glutaraldehyd 0,25 % in TBS/Ca für 15 min zugegeben. Reaktive Stellen wurden mit BSA 1 % in TBS/Ca geblockt. Zum Nachweis von gebundenem SP-A oder SP-D wurden polyklonale Antikörper gegen SP-A (W. Steinhilber, BykGulden, Konstanz, Deutschland) und SP-D (K. B. Reid, Department of Biochemistry, University of Oxford, Großbritannien) (Lu et al., 1992) in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in TBS/Ca/BSA 1 % zu jeder Vertiefung 100  $\mu\text{l}$  zugegeben und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS/Ca wurde zur Detektion ein polyklonaler gegen Ziegen IgG gerichteter Kaninchenantikörper (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland), der mit alkalischer Peroxidase inkubiert worden war, für 1 h bei Raumtemperatur zugefügt. Nach drei Waschgängen mit TBS/Ca wurde 100  $\mu\text{l}$ /Vertiefung ABTS Reagens (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland) zugefügt und bis zu einer ausreichenden Farbentwicklung inkubiert. Anschließend wurden die Platten bei einer Wellenlänge von 405 nm mit einem Elisa-

Messgerät (Anthos, Salzburg, Österreich) gemessen. Unter gleichen Versuchsbedingungen wurde die Bindung von SP-A und SP-D an *P. aeruginosa* durch Zugabe verschiedener Konzentrationen von Glucose, Maltose, Mannose (0 mM, 0,1 mM, 4 mM, 20 mM und 100 mM) und EDTA inkubiert, um die Hemmung der Bindung durch Kohlehydrate und unterschiedliche EDTA Konzentrationen zu testen.

#### 3.6 Proliferation der Bakterien unter Einfluss von SP-A und SP-D

In den Versuchen zum Wachstumsverhalten der Bakterien wurde die Zahl der auf Agarplatten gewachsenen Kolonien vor und nach 24 h Inkubationszeit mit vier verschiedenen SP-A/SP-D Konzentrationen beurteilt. Hierzu wurde ein frisch gewachsener Bakterienstamm in keimfreier Nährlösung (Standard-II-Nährbouillon mit Fleisch- und Caseinpepton, NaCl, Aqua bidest) mit  $\text{CaCl}_2$  2 mM aufgenommen und nach Mischen eine  $\text{OD}_{623 \text{ nm}}$  von 0,1 ( $10^8$  CFU/ml) eingestellt.

Diese Bakteriensuspension wurden in vier sterile Eppendorfgefäße (Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland) gefüllt und SP-A beziehungsweise SP-D in einer Konzentration von 20  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$  oder 0  $\mu\text{g/ml}$  zugegeben. Durch Zufügen von steriler NaCl 0,9 % (Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland) wurden gleiche Endvolumina (30  $\mu\text{l}$ ) pro Gefäß erreicht. 10  $\mu\text{l}$  der Lösung wurden anschließend nach Mischen und 2 min Inkubation mit 100 mM Glucose (in Aqua bidest, autoklaviert) zum Auflösen möglicher Aggregate in eine standardisierte Verdünnungsreihe eingebracht. Die verbleibenden 20  $\mu\text{l}$  Bakteriensuspension pro Ansatz wurden 24 h im Brutschrank (Firma Memmert, Deutschland) bei 37 °C inkubiert. Die Verdünnungsreihe wurde hergestellt unter keimarmen Bedingungen im Laminar-Flow (LAF BHA 48 von Faster) mit sterilem NaCl 0,9 % in Reagenzgläsern (Zentrifugengläser von Assistent) bei 180 °C 40 min sterilisiert (Heißluftsterilisator, Memmert, Deutschland). In vier Reihen entsprechend der Surfactantprotein Konzentration und vier Verdünnungsschritten konnten so die  $10^8$  Bakterien/ml auf  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$  exakt verdünnt werden. Den letzten beiden Verdünnungsstufen wurden jeweils zweimal 100  $\mu\text{l}$  (erwartete CFU bei  $10^{-5}$  circa 100 CFU/100  $\mu\text{l}$  und bei  $10^{-6}$  circa 10 CFU/100  $\mu\text{l}$ ) entnommen und auf Agarplatten mit einem keimfreien Glasspatel (abgeflammt mit Ethanol 70 %) gleichmäßig bis zur vollständigen Resorption der Restflüssigkeit aufgetragen. Nach 24 h Inkubation wurden aus den inkubierten Lösungen nach Mischen wieder jeweils 10  $\mu\text{l}$  entnommen, Glukose zugefügt und aufgrund der zu erwartenden höheren Koloniezahlen bis zu einem

zusätzlichen Verdünnungsschritt von  $10^{-7}$  verdünnt. Jeweils zweimal 100  $\mu$ l der Verdünnung  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  wurden wie zuvor ausgestrichen. Am Ende wurden pro Surfactantprotein und Bakterienstamm insgesamt zweimal 16 Agarplatten beurteilt, die alle bei 37 °C im Brutschrank mindestens über Nacht bis zur gut sichtbaren Koloniebildung bebrütet worden waren. Zur Differenzierung wurden die CFU ausgezählt und mögliche Veränderungen im Wachstum unter SP-A und SP-D Einfluss beziehungsweise eine Konzentrationsabhängigkeit überprüft.

### 3.7 Phagozytose

#### *Zellkultur*

Die für die Phagozytoseexperimente verwendete Monozyten-Makrophagen Zelllinie (MM6) ist eine humane Zelllinie von Patienten mit akuter monoblastischer Leukämie, die von Ziegler-Heitbrock und Mitarbeitern (Institut für Immunologie, LMU München, Deutschland) etabliert wurde (Ziegler-Heitbrock et al., 1988) und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Die Zellen wurden in RPMI Medium kultiviert (Biochrom KG, Berlin, Deutschland), versetzt mit 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin (Biochrom), 2 mM N-acetyl-L-alanyl-L-glutamine (Biochrom), 1 % nicht essentielle Aminosäuren (Biochrom), 1 Ampulle mit 10 ml/l Oxalat-, Pyruvat-, Insulin-Supplement (OPI-Media, Sigma-Aldrich GmbH) und 10 % hitzeinaktiviertem, fetalem Kälberserum (FCS, endotoxinarm 0,02 EU/ml, Biochrom). Um eine maximale Reaktivität der MM6 Zellen in den Phagozytoseexperimenten zu gewährleisten, musste eine Kontamination der Nährlösungen mit LPS absolut vermieden werden. Zur Elimination von LPS Verunreinigungen wurde deshalb das supplementierte Medium vor Zugabe des endotoxinarmen FCS ultrafiltriert (Ultrafilter U2000, Gambro Medizintechnik GmbH, Planegg-Martinsried, Deutschland). Die Zellen wuchsen in 24-Loch Kulturplatten (Costar steril, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre unter 6 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C.

#### *Phagozytoseversuche*

Vitale FITC markierte Bakterien wurden in einer 20-fachen Konzentration gegenüber den MM6 ( $1 \times 10^7$  pro Ansatz mit 50  $\mu$ l) lichtgeschützt in Plastikröhrchen (Eppendorf) mit SP-A beziehungsweise SP-D 10  $\mu$ g/ml oder Humanserum 2 % vorinkubiert (Opsonisierung). Zu den SP-D Präparationen mit TBS/EDTA 1 mM pro Ansatz wurde zusätzlich autoklaviertes CaCl<sub>2</sub> in dreifachem Überschuss (3 mM) gegeben, um eine freie

Kalziumkonzentration von 2 mM zu gewährleisten. Alle Ansätze wurden mit Aqua ad injectabile auf das gleiche Volumen angeglichen und schließlich 60 min bei 37 °C im Brutschrank vorinkubiert.

Zur Stimulation der Phagozytoseleistung der MM6 wurden die Zellen mit 10 ng/ml LPS von *Salmonella minnesota* gelöst in RPMI-Medium (FCS frei) 48 h vor Versuchsbeginn inkubiert. Stimulierte MM6 Zellen ( $0,5 \times 10^6$  Zellen pro Bakterienansatz) wurden auf ein Endvolumen von 50 µl unter vorsichtigem Mischen einpipettiert und unter 6 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C inkubiert. Nach 60-minütiger Inkubation wurde die Phagozytose mit 1 ml kaltem PBS/CaCl<sub>2</sub> 2 mM [sterilisiert durch einen Spritzenfilter der Porengröße 0,45 µm (Sartorius Minisart steril, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)] beendet und alle Ansätze auf Eis gelagert. Die Zellen wurden noch dreimal mit kaltem PBS/Ca gewaschen und schließlich mit 50 µl PBS/Ca resuspendiert.

#### *Löschen der extrazellulären Fluoreszenz mit Trypanblau*

Da die untersuchten Bakterien auch unspezifisch an die Oberfläche der MM6 binden können und somit eine Fluoreszenz außerhalb der Zellen mitgemessen werden könnte, wurde die extrazelluläre Fluoreszenz mit Hilfe von Trypanblau ausgelöscht [„Quenchen“ (Sahlin et al., 1983)]. Dazu wurde nach dem Waschen die Hälfte der auf Eis gelagerten Zellen in einem Verhältnis von 1:1 für 2 min mit 1 mg/ml kaltem Trypanblau behandelt, nochmals gewaschen und die Zellen in 50 µl PBS/Ca gelöst. Anschließend wurde die Fluoreszenz der Zellen mit und ohne Trypanblau sowohl mikroskopisch beurteilt als auch im Zellsorter bestimmt.

#### *Fluoreszenzmessung mit fluoreszenzaktiviertem Zellsorter*

In einem fluoreszenzaktivierten Zellsorter (FACS), dessen Benutzung uns freundlicherweise im Institut für Immunologie, LMU-München, Deutschland möglich war, wird die Fluoreszenz einzelner Zellen gemessen und quantifiziert. Der Zellstrom wird in einer Pufferlösung (PBS mit 0,01 % NaN<sub>3</sub>) an einem Laser vorbeigeleitet, wobei im Durchlicht die Größe jeder einzelnen Zelle, der Gehalt an Granula und ferner die Fluoreszenz gemessen werden kann. Durch Vibration wird der Zellstrom in feine Tröpfchen verteilt.

#### *Fluoreszenzmikroskopie*

Zur genaueren Überprüfung der Vitalität der FITC markierten Bakterien und der Evaluation der phagozytierten Bakterien in MM6 wurde ein inverses Fluoreszenzmikroskop (IMT-2 Mikroskop, Olympus, Hamburg, Deutschland; Filterblock XF 19, Instruments S. A. GmbH, Grasbrunn, Deutschland) verwendet. Hier wurde der

Unterschied zwischen fluoreszierenden Zellen vor und nach Quenchen mit Trypanblau verifiziert (Abb. 4). Zur Dokumentation wurden mit der angeschlossenen Digitalkamera (mit camera controller, Hamamatsu, Japan) und Videoanlage (Panasonic, Japan) Kurzaufnahmen repräsentativer Bildausschnitte verschiedener Zellen angefertigt.

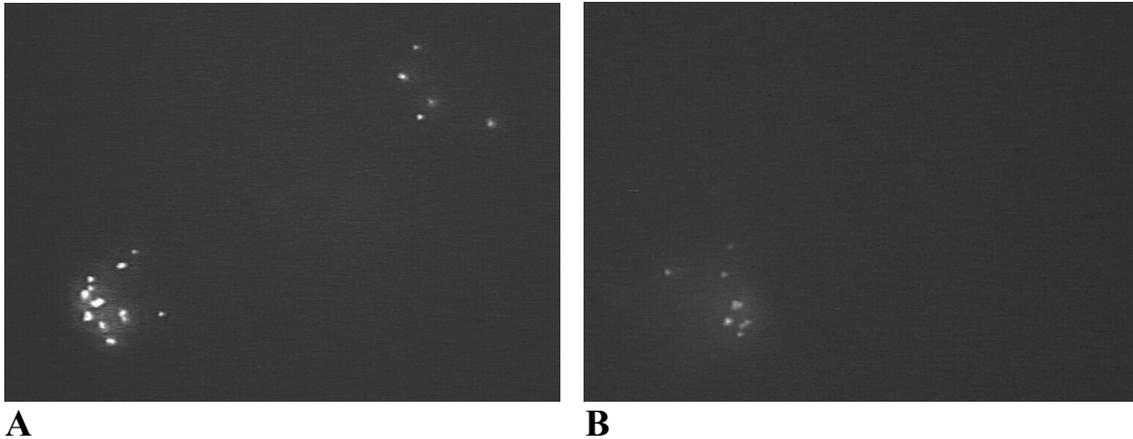


Abbildung 4: **MM6 mit extra- und intrazellulär fluoreszierenden Bakterien.** Vitale *S. aureus* 12 FITC markiert vor (A) und nach Löschen mit Trypanblau (B).

### 3.8 Gemessene und berechnete Größen

#### *Statistik*

Alle Tabellen und Graphiken zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) der Einzelergebnisse von  $n \geq 3$  bei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Die statistische Auswertung wurde mit GraphPad PRISM 3.0 Software (San Diego, USA) und Microsoft EXCEL durchgeführt und entsprechend Graphiken erstellt. Unterschiede zwischen experimentellen Gruppen wurden über Varianzanalysen (ANOVA) bestimmt. Gepaarte t-Tests nach Newman Keuls wurden für Vergleiche einzelner Paare angewendet. Ein p-Wert von  $< 0,05$  wurde als Signifikanzniveau angenommen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Agglutination CF-assoziiierter Bakterien mit SP-A oder SP-D

*SP-D agglutiniert im Gegensatz zu SP-A P. aeruginosa und X. maltophilia*

Für die vorliegende Studie wurde zunächst die Interaktion von Surfactantproteinen mit CF-assoziierten Keimen untersucht. Dazu wurden 57 unterschiedliche Bakterienstämme, die von Patienten mit Mukoviszidose isoliert worden waren, verwendet, davon 35 Stämme *P. aeruginosa*, jeweils neun *X. maltophilia* und *S. aureus* und vier *B. cepacia*. Wir testeten, inwieweit SP-A und SP-D die Fähigkeit besitzen, diese Keime zu agglutinieren. Zu den einzelnen Bakterien suspensionen mit und ohne Kalzium wurden SP-A und SP-D in Konzentrationen zwischen 0 µg/ml und maximal 20 µg/ml gegeben. Anschließend wurde die Agglutination mikroskopisch und makroskopisch auf Objektträgern beurteilt. Die Zugabe von SP-D (5 µg/ml) unter Anwesenheit von 2 mM Ca<sup>2+</sup> führte bei circa 50 % der Stämme von *P. aeruginosa* (43 %) und *X. maltophilia* (56 %) zu einer Agglutination. Weder *S. aureus* noch *B. cepacia* wurden unter identischen Versuchsbedingungen agglutiniert (Tab. I).

TABELLE I

#### Agglutination CF-assoziiierter Keime.

Die Surfactantproteine wurden in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> 2 mM zugegeben. Vier spontan agglutinierende Stämme wurden bei der Auswertung nicht mitgezählt.

Bakterienstamm	n	Agglutination der Bakterien mit 5µg/ml			
		SP-A	SP-D		
			insgesamt	makroskopisch	mikroskopisch
<i>P. aeruginosa</i>	35	0 %	45 %	14 %	31 %
<i>X. maltophilia</i>	9	0 %	55 %	22 %	33 %
<i>B. cepacia</i>	4	0 %	0 %	0 %	0 %
<i>S. aureus</i>	9	0 %	0 %	0 %	0 %

Die Aggregation war unterschiedlich stark ausgeprägt, teilweise makroskopisch sichtbar und konnte innerhalb von Minuten nach Zugabe von SP-D beobachtet werden. Die minimal benötigte SP-D Konzentration zur Aggregatbildung war 2 µg/ml. Vier Bakterienstämme agglutinierten spontan, beziehungsweise nach Zugabe von Kalzium, diese wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Rekombinantes Ratten-SP-D erzielte die gleiche Agglutination wie humanes SP-D. Eine SP-A vermittelte Agglutination

bis zu einer maximalen Konzentration von 20 µg/ml wurde bei keinem der untersuchten Bakterienstämme nachgewiesen (Abb. 5).

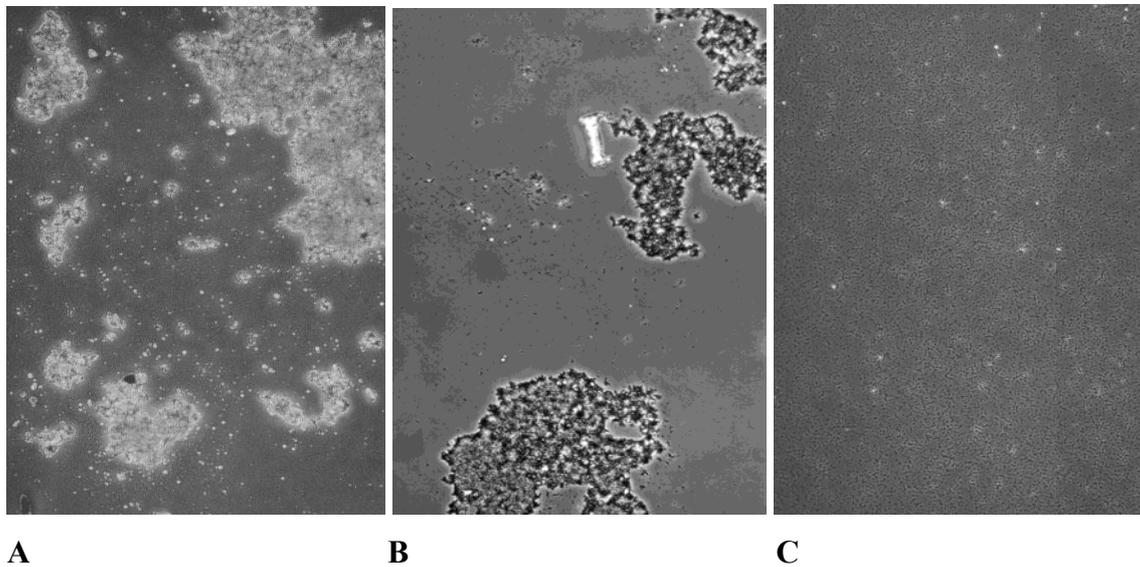


Abbildung 5: **SP-D agglutiniert unabhängig von der verwendeten Präparation *P. aeruginosa* im Gegensatz zu SP-A.** (A) Starke Agglutination von *P. aeruginosa* 12 mit rekombinantem Ratten-SP-D und (B) humanem SP-D 5 µg/ml+Ca<sup>2+</sup> 2 mM. (C) Keine Agglutination von *P. aeruginosa* 12 mit SP-A 5 µg/ml+Ca<sup>2+</sup> 2 mM. Lichtbildmikroskopie mit 40-facher Vergrößerung.

Die Agglutination war abhängig von der Anwesenheit freier Kalziumionen und konnte entsprechend durch Zugabe von EDTA vollständig gehemmt werden (Abb. 6). Die Agglutination wurde auch durch Zugabe von Glukose, Maltose oder Mannose gehemmt.

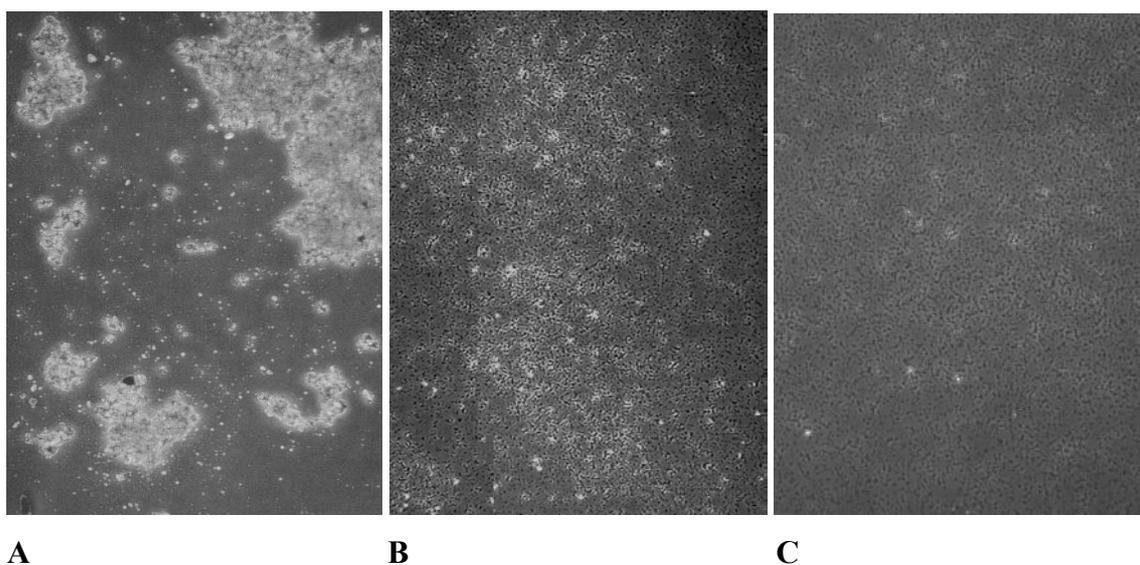


Abbildung 6: **SP-D vermittelte Agglutination von *P. aeruginosa* 12 ist vollständig reversibel durch Zugabe von Kalziumchelatbildnern oder Zuckern.** (A) *P. aeruginosa* 12 mit SP-D 5 µg/ml+Ca<sup>2+</sup> 2 mM, (B) mit EDTA 10 mM, (C) mit Glukose 100 mM. Lichtbildmikroskopie mit 40-facher Vergrößerung.

Daher kann man von einer kohlehydratspezifischen Interaktion zwischen SP-D und Bakterien ausgehen, die über die kalziumabhängigen Lektindomänen zustande kommt. Die bestehende Agglutination war reversibel und konnte vollständig durch Zugabe von EDTA, Glukose, Mannose oder Maltose aufgelöst werden.

*Keine Korrelation zu LPS-Serotyp, Pyozintyp und Alginatbildung*

21 der hier verwendeten *P. aeruginosa* Stämme wurden entsprechend des LPS-Serotyps (*rough/smooth*), Pyozintyps (toxische Proteine) und der Alginatbildungsfähigkeit (mukoid/nicht mukoid) differenziert. Die Gruppe der agglutinierenden Stämme wies sowohl *rough* als auch *smooth* LPS auf. Auch die Fähigkeit zur Alginatbildung zeigte keine Übereinstimmung mit dem Agglutinationsverhalten. Ebenso wenig ließ sich die Aufschlüsselung in Pyozintypen mit einem der anderen Parameter korrelieren (Tab. II).

TABELLE II

**Keine Korrelation zwischen Agglutination und Typisierung der Bakterien.**

<b>Pseudomonas Stamm ID</b>	<b>Pyozintyp</b>	<b>O-Serotyp (<i>smooth</i>)</b>	<b>Polyaggl. (<i>rough</i>)</b>	<b>Alginatbildung</b>	<b>Aggl. mit SP-D</b>	<b>Aggl. mit SP-A</b>
<i>P. aer. 1</i>	3e	O1		(+)	-	-
<i>P. aer. 2</i>	3e	O18		-	-	-
<i>P. aer. 3</i>	0h	O1		-	+++	-
<i>P. aer. 4</i>	85f	O1		(+)	++	-
<i>P. aer. 5</i>	9ß	O11		-	-	-
<i>P. aer. 6</i>	9ß		polyaggl.	-	+	-
<i>P. aer. 7</i>	1h	O4		mukoid	-	-
<i>P. aer. 8</i>	3c	O11		-	(+)	-
<i>P. aer. 9</i>	-	O1		(+)	(+)	-
<i>P. aer. 11</i>	1q	O10		-	+++	-
<i>P. aer. 12</i>	1q		polyaggl.	-	+++	-
<i>P. aer. 13</i>	1h	O11		-	++	-
<i>P. aer. 14</i>	1a	O10		mukoid	-	-
<i>P. aer. 15</i>	1a	O10		mukoid	(+)	-
<i>P. aer. 16</i>	1q		polyaggl.	-	+++	-
<i>P. aer. 17</i>	-	O1		-	+++	-
<i>P. aer. 18</i>	1b	O10		mukoid	-	-
<i>P. aer. 19</i>	1f	O11		-	+	-
<i>P. aer. 20</i>	5f		polyaggl.	(+)	-	-
<i>P. aer. 21</i>	5f	O11		(+)	-	-
<i>P. aer. 22</i>	22g		polyaggl.	(+)	+	-

Zusammenfassend ist die Agglutination von *P. aeruginosa* durch SP-D unabhängig vom LPS-Serotyp, Pyozintyp oder mukoidem Phänotyp und findet kalziumabhängig über eine lektinvermittelte Bindung statt.

#### 4.2 SP-A und SP-D binden spezifisch plastikadhärente *P. aeruginosa*

Um zu untersuchen, ob SP-A und SP-D auch unabhängig von der Agglutination an *P. aeruginosa* binden, wurden vier repräsentative Pseudomonasstämmen (zwei agglutinierende *P. aeruginosa* 11 und 12 und zwei nicht agglutinierende *P. aeruginosa* 5 und 20) auf Mikrotiterplatten aufgebracht und mit den beiden Surfactantproteinen inkubiert. SP-A und SP-D banden konzentrationsabhängig an alle plastikadhärenten *P. aeruginosae*. Die spezifische Bindung wurde durch Subtraktion der unspezifischen Bindung in Gegenwart von EDTA 10 mM von der gesamten Bindung berechnet. Die halbmaximale Bindung erforderte eine 10-fach höhere Konzentration an SP-A (150 ng/ml) als SP-D (15 ng/ml) (Abb. 7).

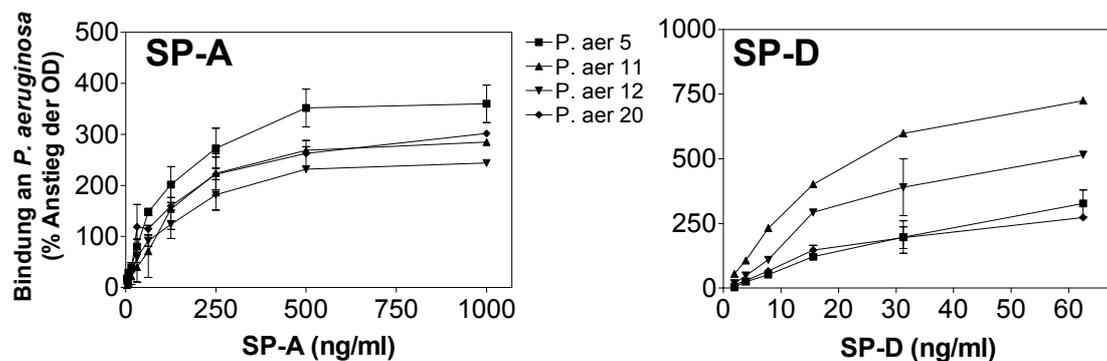


Abbildung 7: **Bindung an plastikadhärente *P. aeruginosa* durch SP-A und SP-D.** Vier repräsentative *P. aeruginosa* Stämme wurden auf Mikrotiterplatten aufgetragen und mit SP-A und SP-D inkubiert. *P. aeruginosa* 11 und *P. aeruginosa* 12 agglutinieren stark durch Zugabe von SP-D. Die halbmaximale Bindung erforderte eine 10-fach höhere Konzentration an SP-A als SP-D. Die unspezifische Bindung wurde durch Bindung in Gegenwart von EDTA 10 mM definiert. Die spezifische Bindung wurde durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der gesamten Bindung berechnet und als Prozent Anstieg gegenüber der Kontrolle angegeben.

Ein erhöhtes Bindungssignal von SP-D an *P. aeruginosa* korrelierte mit SP-D-vermittelter Agglutination. Aber auch nicht agglutinierende *P. aeruginosa* wurden gebunden. Eine Korrelation zwischen Bindung, Agglutination und LPS Serotyp der Keime konnte nicht festgestellt werden (Tab. III).

TABELLE III

**Vergleich zwischen Bindung, Agglutination und LPS Serotyp.**

Bindung von SP-A und SP-D an alle untersuchten *P. aeruginosa*, Agglutination nur bei zwei Stämmen mit SP-D. Zusammengefasste Daten aus jeweils drei unabhängigen Experimenten.

Bakterienstamm ID	LPS Serotyp	Agglutination durch		Binding von	
		SP-D	SP-A	SP-D	SP-A
<i>P. aer 5</i>	O11	-	-	+	+++
<i>P. aer 11</i>	O10	+++	-	+++	++
<i>P. aer 12</i>	<i>rough</i>	+++	-	++	+
<i>P. aer 20</i>	<i>rough</i>	-	-	+	++

Die Bindung wurde spezifisch durch Zugabe von Maltose, Mannose, Glukose oder Chelatbildner wie EDTA gehemmt. In Abbildung 8 ist repräsentativ die Hemmung der Bindung von SP-D und *P. aeruginosa* 167-10-1 gezeigt. Mit steigender Konzentration an Kohlehydraten beziehungsweise EDTA wurde die Bindung zwischen SP-D und dem verwendeten *P. aeruginosa* Stamm schwächer. In Gegenwart einer Konzentration von 100 mM Zucker war die spezifische Bindung vollständig gehemmt im Vergleich zur Hemmung durch EDTA 10 mM. Die Hemmung der spezifischen Bindung (Abb. 8) wurde in Prozent im Vergleich zur EDTA Kontrolle angegeben. Hierbei wird deutlich, dass die Kohlehydratspezifität unterschiedlich ausgeprägt ist und Maltose die Bindung effizienter antagonisiert als Glukose oder Mannose.

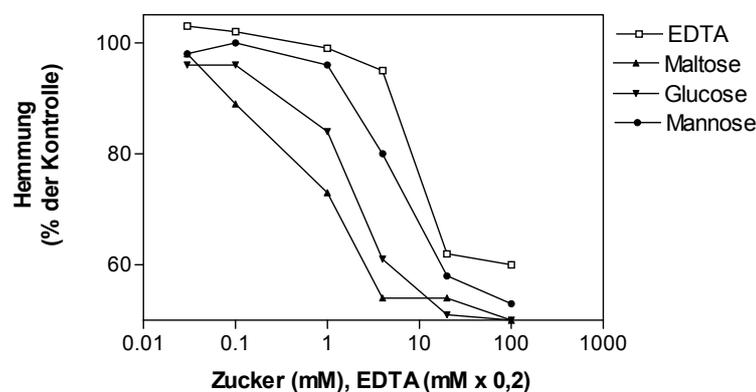


Abbildung 8: **Hemmung der Bindung durch verschiedene Zucker und EDTA.** *P. aeruginosa* 167-10-1 wurde wie in *Material und Methoden* beschrieben mit SP-D unter Zugabe von verschiedenen Zuckerkonzentrationen beziehungsweise EDTA inkubiert. Die unspezifische Bindung von SP-D in Gegenwart von EDTA ist mit der noch nachweisbaren Bindung nach Zugabe der Zucker vergleichbar. Maltose hemmt die Bindung effizienter als Mannose und Glukose.

### 4.3 Proliferation CF-assoziiierter Keime in Anwesenheit von SP-A und SP-D

#### *SP-D moduliert das Wachstum CF-assoziiierter Keime*

Bisher wurden noch keine Studien veröffentlicht, die das Wachstum von CF-assoziierten Bakterien unter Einfluss von Surfactantproteinen beurteilt haben. Um zu untersuchen, ob möglicherweise die Bindung der Bakterien durch SP-A und SP-D einen Einfluss auf die Proliferation der Keime hat, wurden in dieser Arbeit Studien zur Proliferation von CF-assoziierten Bakterien in Anwesenheit von SP-A oder SP-D durchgeführt. Es wurde untersucht, inwieweit die Proliferation der vier repräsentativen *P. aeruginosa* Stämme sowie je zwei *S. aureus* und *B. cepacia* Stämme nach 0 h und 24 h Inkubation mit SP-A beziehungsweise SP-D beeinflusst wird. Hierzu wurde jeweils eine definierte Menge Bakteriensuspension mit verschiedenen SP-A und SP-D Konzentrationen vermischt, ein Teil direkt und der andere nach 24 h Inkubation bei 37 °C in eine Verdünnungsreihe eingebracht. Die Suspension wurde auf Agarplatten ausgestrichen und nach Bebrüten die einzelnen Kolonien ausgezählt. Ein bakterizider Effekt der Surfactantproteine wurde mikroskopisch durch eine optische Kontrolle der Viabilität der Bakterien nach Inkubation ausgeschlossen. Wir konnten zeigen, dass einer von vier *P. aeruginosa* Stämmen (*P. aer* 11) nach 24 h Inkubation mit 20 µg/ml SP-D eine signifikant niedrigere Proliferation im Vergleich zur Probe ohne SP-D aufwies (Tab. IV).

TABELLE IV

Wachstum der untersuchten Bakterienstämme nach 24 h Inkubation ohne und mit 20 µg/ml SP-D.

Bakterienstamm	n	% Wachstum nach 24 h		p-Wert
		ohne	20µg/ml SP-D	
<i>P. aeruginosa 5</i>	3	2744 %	2213 %	ns
<i>P. aeruginosa 11</i>	3	<b>6379 %</b>	<b>1133 %</b>	<b>&lt; 0,05</b>
<i>P. aeruginosa 12</i>	3	3190 %	3591 %	ns
<i>P. aeruginosa 20</i>	3	3855 %	5346 %	ns
<i>S. aureus 12</i>	3	2260 %	3531 %	ns
<i>S. aureus 62</i>	3	2757 %	1643 %	ns
<i>B. cepacia ATCC</i>	3	409 %	846 %	ns
<i>B. cepacia 147-38</i>	3	1266 %	869 %	ns

Im Gegensatz hierzu wurde die Proliferation der untersuchten Bakterien durch Zugabe von SP-A nicht signifikant beeinflusst (Abb. 9).

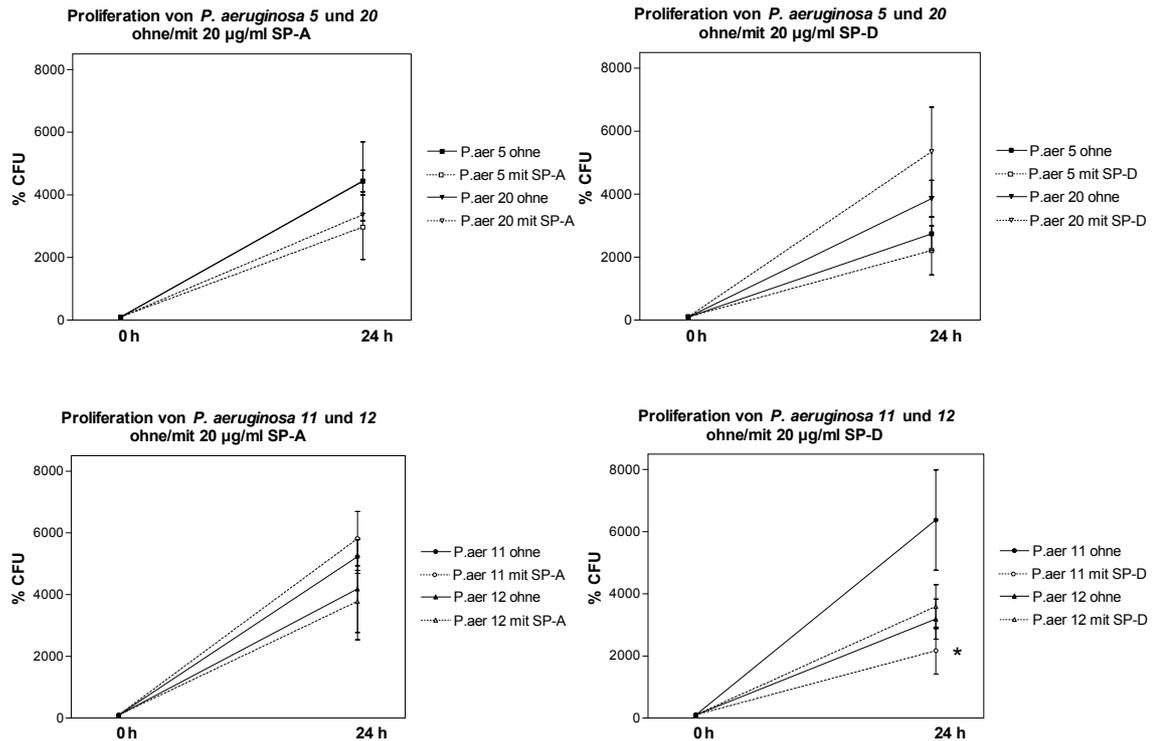


Abbildung 9: **Eingeschränkte Proliferation eines *P. aeruginosa* Stammes durch SP-D, kein Einfluss durch SP-A.** Koloniebildung von je zwei agglutinierenden (11, 12) und zwei nicht agglutinierenden (5, 20) *P. aeruginosa* Stämmen nach 0 h und 24 h Inkubation ohne und mit 20 µg/ml Surfactantprotein. SP-A zeigt keine signifikanten Veränderungen. SP-D hemmt signifikant das Wachstum von *P. aeruginosa* 11. Die CFU sind in % angegeben, bezogen auf jeweils 100 % zum Zeitpunkt 0 h. \* entspricht einem p-Wert von < 0,05.

Das Wachstum der untersuchten *S. aureus* Stämme wurde weder durch SP-A noch durch SP-D signifikant beeinflusst (Abb. 10).

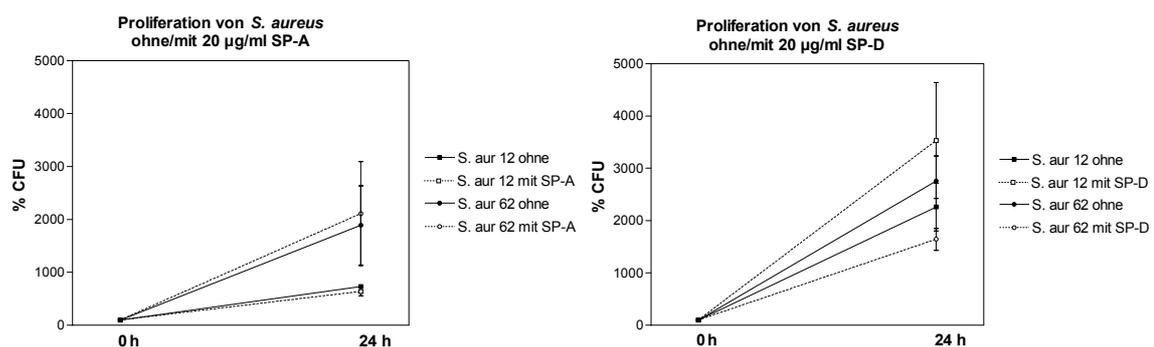


Abbildung 10: **Kein Einfluss auf die Proliferation von *S. aureus* durch SP-A oder SP-D.** Koloniebildung von einem Koagulase positiven (62) und einem Koagulase negativen (12) *S. aureus* Stamm nach 0 h und 24 h Inkubation ohne und mit 20 µg/ml Surfactantprotein. SP-A und SP-D zeigen keine signifikanten Veränderungen. Die CFU sind in Prozent angegeben, bezogen auf jeweils 100 % zum Zeitpunkt 0 h.

SP-D führte zu keiner signifikanten Veränderung der Proliferation von *B. cepacia*. Untersuchungen mit SP-A wurden bei *B. cepacia* nicht durchgeführt.

*Die Hemmung der Proliferation von Bakterien durch SP-D ist konzentrationsabhängig*

Wir konnten demonstrieren, dass die Zahl der gebildeten Kolonien von *P. aeruginosa* 11 nach 24 h Inkubation mit steigenden SP-D Konzentrationen (0 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml und 20 µg/ml) deutlich abnahm. Diese Ergebnisse waren reproduzierbar und hochsignifikant (Tab. V, Abb. 11).

TABELLE V

**Gebildete Kolonien von *P. aeruginosa* 11 mit verschiedenen SP-D Konzentrationen.**

Nach 24 h Inkubation mit verschiedenen SP-D Konzentrationen wurden die CFU x 10<sup>5</sup>/ml ausgezählt. Ohne SP-D entspricht 100%.

SP-D Konz. µg/ml	n	Inkubationszeit 24 h		
		CFU*10 <sup>5</sup> /ml	%	p
ohne	3	3.281	100	
5	3	2.166	66,0	< 0,05
10	3	1.524	46,5	< 0,001
20	3	1.133	34,5	< 0,001

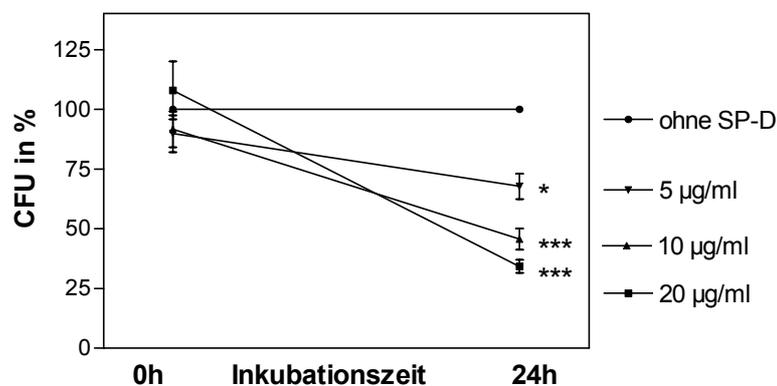


Abbildung 11: **Wachstum von *P. aeruginosa* 11 in Abhängigkeit von der SP-D Konzentration.** Signifikante Hemmung der Proliferation von *P. aeruginosa* 11 mit steigenden SP-D Konzentrationen. Die CFU wurden in % bezogen auf 100 % Wachstum ohne SP-D angegeben.

*Keine Korrelation zu Agglutinationsverhalten und Keimtypisierung*

Der stark agglutinierende *P. aeruginosa* 12 konnte im Vergleich zu dem stark agglutinierenden *P. aeruginosa* 11 nicht durch SP-D im Wachstum gehemmt werden. Es ist denkbar, dass die Aggregatbildung durch SP-D ein falsches Ergebnis bei der Auszählung der Bakterien bedingt. Deshalb wurden die Bakteriensuspensionen außerdem vor Einbringen in die Verdünnungsreihe mit Glukose 100 mM vermischt, um jegliche Agglutination aufzulösen. Auch die Charakterisierung des *P. aeruginosa* 11 als

gramnegativer Keim ohne Alginatbildung mit *rough* LPS und Pyozintyp 1q (siehe Tabelle II) ließ sich nicht mit dem Einfluss auf die Proliferation durch SP-D korrelieren.

#### 4.4 Phagozytose

Unter Verwendung der humanen Monozyten-Makrophagen Zelllinie 6 etablierten wir ein experimentelles System, um den Effekt von SP-A und SP-D auf die Phagozytose CF-assoziiierter Bakterien zu testen. Die MM6 Zellen wurden von Patienten mit akuter monoblastischer Leukämie etabliert und ähneln reifen Blutmonozyten oder Vorläuferzellen von Alveolarmakrophagen. Frühere Untersuchungen zeigten, dass die Vorinkubation von MM6 mit LPS oder TNF- $\alpha$  eine Differenzierung der Zellen induziert, die einer funktionellen Reifung zu CD14/CD16 positiven Monozyten entspricht. Differenzierte MM6 können effizient Bakterien phagozytieren (Aepfelbacher et al., 1992; Weber et al., 1993). Wir verwendeten LPS zur Differenzierung der MM6 in unseren Experimenten und die Zellen wurden mit 10 ng/ml LPS für 48 h vorbehandelt.

##### *SP-D aber nicht SP-A stimuliert die Phagozytose von P. aeruginosa durch MM6*

Um festzustellen, ob Unterschiede in der Aggregatbildung von *P. aeruginosa* durch SP-A and SP-D die Phagozytose steigern können, wurden die folgenden Experimente mit den vier repräsentativen, nicht mukoiden *P. aeruginosa* Stämmen und einen *S. aureus* Stamm zum Vergleich durchgeführt. Vitale, fluoreszenzmarkierte (FITC) Bakterien wurden für 60 min vor Beginn des Versuches mit 2 % Humanserum, 10  $\mu$ g/ml SP-D oder SP-A vorinkubiert. Danach wurden LPS-vorbehandelte MM6-Zellen für weitere 60 min hinzugegeben. Nach Waschen der Zellen mit Pufferlösung und Löschen der extrazellulären Fluoreszenz mit Trypanblau, wurden die MM6 in der Durchflusszytometrie (FACS) gemessen. Die durch phagozytierte fluoreszierende Bakterien entstandene Fluoreszenz der MM6 Zellen konnte im Vergleich zur gemessenen Gesamtzellzahl ermittelt werden. Die Ergebnisse sind ausgedrückt als Prozent der Zellen mit höherer Fluoreszenz als unbehandelte Zellen (Abb.12).

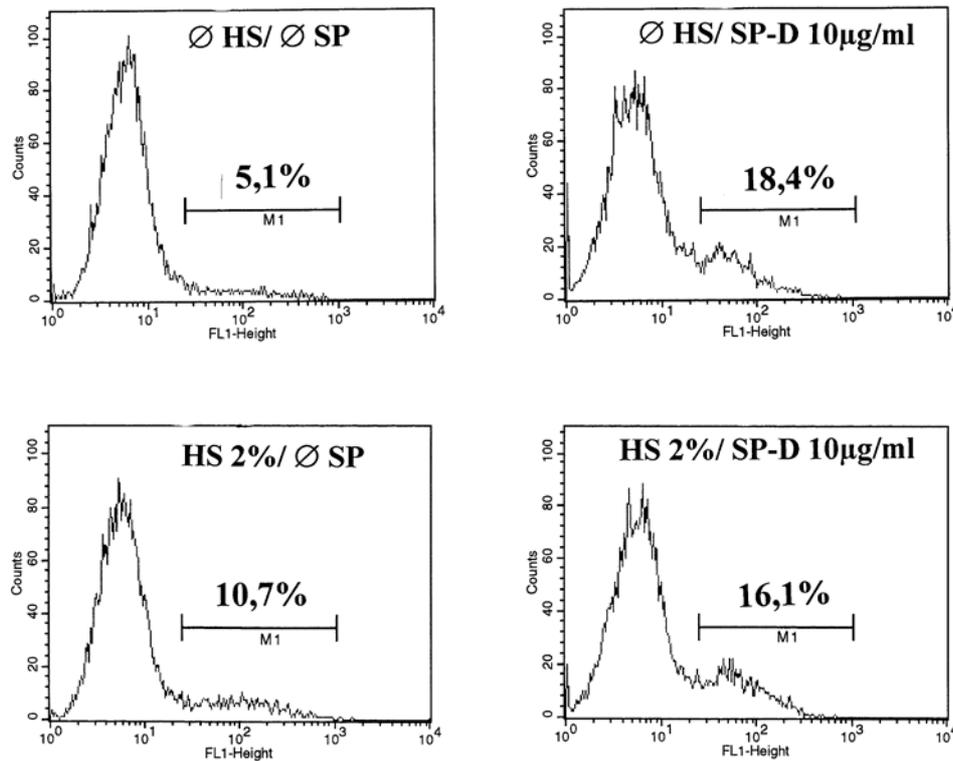


Abbildung 12: **Steigerung der Phagozytose durch SP-D und Humanserum am Beispiel von *P. aeruginosa* 5.** Durch MM6 Zellen phagozytierte FITC markierte Bakterien wurden nach Löschen der extrazellulären Fluoreszenz mit Trypanblau im FACS gemessen. Die Fluoreszenz wurde als Prozent der Zellen mit höherer Fluoreszenz als unbehandelte Zellen angegeben: ohne Humanserum (HS) oder Surfactantprotein (SP) 5,1 %, Steigerung durch Humanserum auf 10,7 % beziehungsweise durch SP-D auf 18,4 %, keine signifikante Änderung durch HS und SP-D.

Mit Humanserum konnten wir eine Steigerung der Phagozytose im Mittel von 5 % auf 11,9 % beobachten. Interessanterweise verdoppelte sich auch mit SP-D die Phagozytose aller getesteten Pseudomonasstämmen im Mittel von 5 % auf 10,6 %, während SP-A keine signifikanten Veränderungen aufwies. Der positive Effekt von SP-D wurde durch Humanserum nicht zusätzlich bestärkt (Abb. 13). Die Phagozytose war stark abhängig von der Anwesenheit von Kalzium. Agglutination von *P. aeruginosa* durch SP-D erhöhte die Phagozytose durch MM6 nicht.

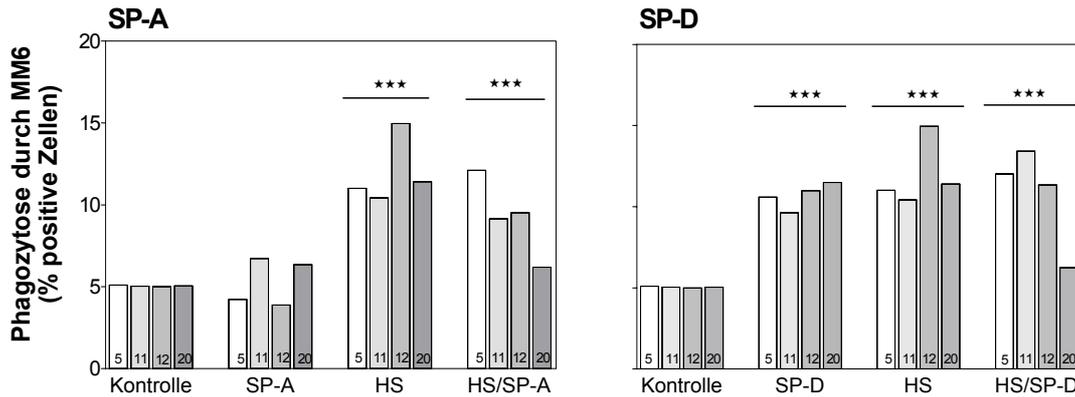


Abbildung 13: **SP-D aber nicht SP-A stimuliert die Phagozytose von *P. aeruginosa* durch MM6 Zellen.** LPS behandelte MM6 Zellen wurden jeweils mit den vitalen, nicht mukoiden, FITC markierten *P. aeruginosa* Stämmen 5, 11, 12 und 20 für 1 h bei einem Zell/Bakterien Verhältnis von 1:20 inkubiert. Die Bakterien wurden mit Humanserum (HS) 2 %, SP-A oder SP-D (10 µg/ml) vorbehandelt. Die extrazelluläre Fluoreszenz wurde mit Trypanblau gelöscht. Die Fluoreszenz wurde im FACS gemessen und als Prozent der Zellen mit höherer Fluoreszenz als unbehandelte Zellen angegeben. Jede Säule repräsentiert einen Mittelwert von 3-5 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung wurde durch ANOVA und Newman-Keuls post-hoc test berechnet im Vergleich zu den zusammengefassten Daten aller Pseudomonas Stämme. \*\*\* $p < 0.001$  im Vergleich zur Kontrolle.

*S. aureus* 12 wurde nach Inkubation der MM6 mit Humanserum wie die getesteten *P. aeruginosa* doppelt so viel wie in der Kontrolle phagozytiert. Im Gegensatz zu den Versuchen mit *P. aeruginosa* führte SP-D bei *S. aureus* zu keiner signifikanten Veränderung der Phagozytose. Bei allen untersuchten Bakterienstämmen wurde SP-A bis zu einer maximalen Konzentration von 20 µg/ml zugegeben ohne einen Einfluss auf die Phagozytose zu erzielen (Abb. 14).

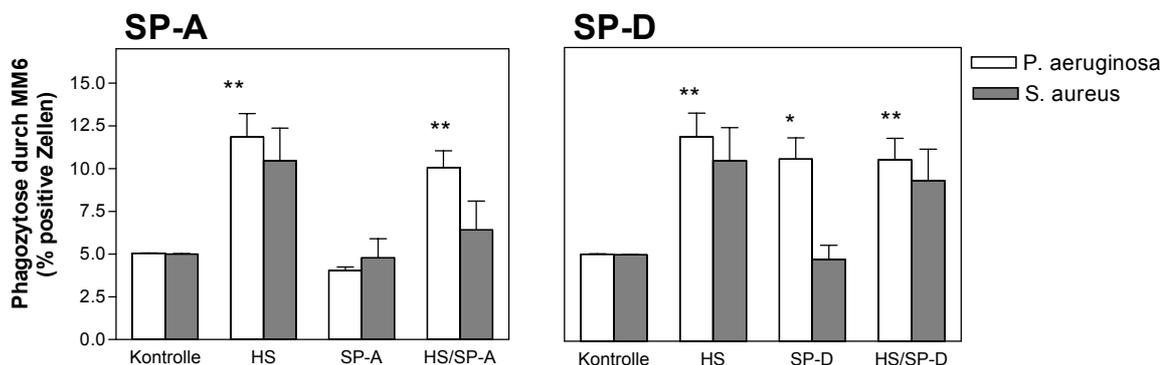


Abbildung 14: **Phagozytose von *P. aeruginosa* und *S. aureus* mit SP-A und SP-D im Vergleich.** Humanserum (HS) 2 % steigerte signifikant die Phagozytose von *P. aeruginosa*. SP-D 10 µg/ml erhöhte ebenfalls die gemessene Fluoreszenz phagozytierter Zellen ohne deutliche Veränderung durch zusätzliche HS Zugabe. *S. aureus* wurde nur mit HS Opsonisierung vermehrt phagozytiert nicht durch SP-D. SP-A steigerte die Phagozytose bei keinem der untersuchten Bakterienstämme. Gemessen im FACS als Prozent fluoreszierende MM6 nach Trypanblau. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  verglichen mit der Kontrolle unbehandelter Zellen.

## 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass SP-A und SP-D unterschiedlichen Einfluss auf die Immunabwehr CF-assoziiierter Keime haben und speziell bei *P. aeruginosa* unterschiedlich regulieren. Wir demonstrierten, dass SP-D *P. aeruginosa* und *X. maltophilia* Stämme agglutinieren kann, während SP-A keine derartige Wirkung hat. Unabhängig vom Agglutinationsverhalten binden SP-A und SP-D spezifisch an plastikadhärente *P. aeruginosa*. Agglutination und Bindung der Bakterien kommen über kalziumabhängige Lektin/Kohlehydrat-Bindungsstellen zustande. Weitere Versuche zeigten, dass SP-D das Wachstum von *P. aeruginosa* beeinflusst, während SP-A keinen Einfluss auf die Proliferation dieser Bakterien hat. Wir konnten außerdem nachweisen, dass SP-D aber nicht SP-A die Phagozytose nicht mukoider *P. aeruginosa* durch MM6 Zellen steigert. Ein Zusammenhang zwischen LPS Phänotyp von *P. aeruginosa* und der Interaktion mit SP-A und SP-D ließ sich nicht nachweisen.

Die SP-A und SP-D vermittelte Agglutination von Bakterien wurde bisher mehrfach beschrieben, jedoch nicht im Zusammenhang mit CF-assoziierten Keimen unter besonderer Berücksichtigung von *P. aeruginosa* (Kuan et al., 1992; McNeely und Coonrod, 1994; Restrepo et al., 1999; Tino und Wright, 1996). Man stellt sich vor, dass durch Agglutination von Bakterien sowohl die mukoziliäre Clearance erleichtert als auch die Phagozytose gesteigert wird. Am Beispiel von Influenza A Viren wurde gezeigt, dass sowohl SP-A als auch SP-D das Virus agglutinieren können und durch diese Präzipitation die Aufnahme in neutrophile Granulozyten über zelluläre Rezeptoren, die von den Viren erkannt werden, verstärkt werden kann (Hartshorn et al., 1997). Wie andere Autoren konnten wir keine Agglutination von *P. aeruginosa* durch SP-A nachweisen (Mariencheck et al., 1999; Tino und Wright, 1996). Es wurden ausschließlich vitale Bakterien verwendet, um Artefakte durch Hitzeinaktivierung zu vermeiden. Es wurde gezeigt, dass das Abtöten der Keime durch Hitze Veränderungen in der Bakterienstruktur hervorruft, die die Verfügbarkeit oder Zahl der bakteriellen Liganden mit denen zum Beispiel SP-A interagiert beeinflussen (Mariencheck et al., 1999). In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass SP-D vitale *P. aeruginosa* und *S. maltophilia* agglutiniert. Die Aggregation dieser Keime durch SP-D ist von der Anwesenheit von Kalzium abhängig und kommt über lektinvermittelte Bindungsstellen zustande. Die charakteristische Kreuzstruktur des SP-D-Moleküls, ein Tetramer bestehend aus vier identischen Polypeptiden, wird für die Fähigkeit zur Agglutination verantwortlich gemacht (Eda et al., 1997). Im Gegensatz zu

SP-A kann SP-D bei den hier verwendeten Bakterien auf diese Weise Brücken zwischen Distanzen der Organismen bilden. Diese Beobachtung wird auch durch eine Studie von Hartshorn und Kollegen unterstützt, die zeigt, dass der Grad der Multimerisation von SP-D eine wichtige Determinante der Aggregationsfähigkeit ist (Hartshorn et al., 1998). In Versuchen mit rekombinanten, humanen- und Ratten-SP-D Präparationen als Multimere, Dodecamere und Trimerstrukturen, wurde die Agglutination von *E. coli* untersucht. Je höher der Grad der Multimerisation von SP-D war, desto größere Agglutinate entstanden. In unseren Experimenten agglutinierte SP-D *P. aeruginosa* unabhängig von *rough* oder *smooth* LPS. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Kuan und Mitarbeitern, die beschreiben, dass SP-D bevorzugt an *rough* LPS bindet (Kuan et al., 1992). Andere Autoren wiederum beschreiben eine Bindung von Kollektinen (MBP) an O-Polysaccharide, zum Beispiel *smooth* LPS, aufgereinigt von *Salmonella montevideo* (Kuhlman et al., 1989). Unterschiede bei der Agglutination von Bakterien unter Verwendung der gleichen SP-D-Präparation kommen wahrscheinlich durch variierende Bakterienstämme zustande. Strukturelle Unterschiede des LPS, die Anzahl und Verteilung der bakteriellen Liganden oder sterische Effekte durch andere Oberflächenstrukturen wie Kapseln, Flagella und Pili könnten hier eine Rolle spielen (Kuan et al., 1992). Ein Zusammenhang zwischen Pyozintyp oder mukoidem Phänotyp von *P. aeruginosa* und der Agglutination durch SP-D konnte nicht festgestellt werden.

Interessanterweise banden SP-A und SP-D konzentrationsabhängig an alle untersuchten *P. aeruginosa*, auch wenn keine Agglutination vermittelt wurde. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Studien überein. In Versuchen zur Interaktion zwischen SP-A und Bakterien LPS konnte gezeigt werden, dass SP-A konzentrations- und kalziumabhängig *P. aeruginosa*-LPS bindet (Hickling et al., 1998). Auch Mariencheck und Mitarbeiter demonstrierten in Immunoblotanalysen, dass humanes Alveolarproteinose SP-A serumunabhängig an einen mukoiden *P. aeruginosa* Stamm konzentrationsabhängig bindet (Mariencheck et al., 1999). In Versuchen mit SP-D konnte man nachweisen, dass lebende mukoide *P. aeruginosa* konzentrations- und kalziumabhängig durch SP-D gebunden werden. Eine Aggregation der Bakterien durch SP-D wurde in diesen Experimenten nicht beobachtet (Restrepo et al., 1999). Auch in unseren Experimenten bedingte die Bindung von SP-A und SP-D nicht immer die Aggregation von Bakterien. Denkbar ist, dass andere Faktoren wie zum Beispiel unterschiedliche Oberflächenmoleküle, Dichte und Mikroorganisation von LPS auch hier eine Rolle spielen. Wie die Agglutination ist auch die Bindung kalziumabhängig und kommt über Lektin-Bindungsstellen zustande. Die

Hemmung der Bindung durch Zucker zeigte eine unterschiedliche Kohlehydratspezifität, die auch von Kuan und Mitarbeitern beschrieben wurde (Kuan et al., 1992). Maltose hatte hierbei den ausgeprägtesten Effekt, die Bindung zu blockieren. Dies unterstützt die Annahme, dass SP-D mit unterschiedlicher Spezifität Kohlehydratstrukturen auf der Oberfläche von Bakterien binden kann. Interessanterweise brauchte SP-A eine zehnfach höhere Proteinkonzentration als SP-D, um eine gesättigte Bindung zu erreichen. Betrachtet man mögliche Unterschiede im Ausmaß oder der Affinität der Antikörperbindung, sollte man bedenken, dass es mit den hier gezeigten Experimenten nicht möglich ist, die Bindungssignale der beiden Kollektine quantitativ zu vergleichen. Nimmt man aber wie bei den polyklonalen Seren gegen SP-A und SP-D in den Bindungsversuchen eine ähnliche Bindungskapazität an, kann man auf eine niedrigere Bindungsaffinität oder reduzierte Anzahl von Bindungsstellen für SP-A auf *P. aeruginosa* schließen, die nicht ausreichend für eine bakterielle Agglutination war. Die Ergebnisse von Sano und Mitarbeitern, die zeigen, dass SP-A nicht an *smooth* LPS (*E. coli* 026:B6) bindet (Sano et al., 1999), konnten wir unter Verwendung von vitalen Bakterien nicht bestätigen. Sowohl SP-A als auch SP-D banden an *rough* und *smooth* *P. aeruginosa*. Agglutinierende Bakterien zeigten jedoch ein erhöhtes Bindungssignal für SP-D. Möglicherweise modifiziert *P. aeruginosa* im Rahmen chronischer Infektionen nicht nur das Profil von Zuckerseitenketten des LPS und entgeht damit der Immunabwehr (McGroarty and Rivera, 1990), sondern verändert durch noch nicht bekannte Mechanismen auch die Bindungskapazität für SP-A/D und somit indirekt die Immunabwehr.

In einer Studie wurde bisher untersucht, ob die Inkubation mit SP-D das Abtöten von Bakterien in Anwesenheit von Alveolarmakrophagen steigert (Restrepo et al., 1999). Hierbei stellte sich heraus, dass die Koloniebildung (CFU) eines mukoiden *P. aeruginosa* Stammes nach 1 h Inkubation bei 37 °C in Anwesenheit von SP-D vermindert war, im Vergleich zu Versuchen mit einem nicht mukoiden Stamm oder ohne SP-D unter gleichen Versuchsbedingungen. Als Ursache für die reduzierte CFU Zahl wurde ein Makrophagenvermitteltes Abtöten des mukoiden *P. aeruginosa* Stammes interpretiert. Versuche in Abwesenheit der Makrophagen wurden hierzu nicht gemacht. Um herauszufinden, ob SP-D allein bakterizide oder bakterio-statische Wirkung hat oder das Wachstum von Bakterien beeinflussen kann, wurden in dieser Arbeit Experimente zum Proliferationsverhalten der Keime in Anwesenheit von SP-D gemacht. Hier zeigte sich, dass einer von vier *P. aeruginosa* Stämmen (nicht mukoid) nach Inkubation mit 20 µg/ml SP-D über 24 h eine signifikant reduzierte Proliferation aufwies. Um Fehler bei der

Quantifizierung der Bakterien durch Agglutination zu umgehen, wurden vorher sämtliche Bakterien mit Glukose behandelt. In den Agglutinationsexperimenten wurde vorher gezeigt, dass die Agglutination der untersuchten Bakterien vollständig durch die Zugabe von Glukose reversibel war. Außerdem wurde nur einer der beiden stark agglutinierenden *P. aeruginosa* Stämme im Wachstum beeinflusst. Daher schließen wir eine Korrelation zwischen Agglutinationsverhalten der Bakterien und Wachstumshemmung durch SP-D aus. Es wäre denkbar, dass SP-D durch die Bindung an *P. aeruginosa* eine Kontakthemmung hervorruft, die das Wachstum und die Generationszeit der Keime verlangsamt. Durch die höhere Bindungskapazität von SP-D zu *P. aeruginosa* als SP-A ließe sich so auch der fehlende Einfluss von SP-A auf das Wachstum erklären. Es ist nicht auszuschließen, dass SP-D durch die Bindung an LPS Veränderungen an der Bakterienmembran hervorrufen könnte und damit bakterizid wirken könnte. Da aber davon auszugehen ist, dass die nicht inkubierten *P. aeruginosa* auch durch die Zugabe von SP-D gebunden wurden und hier keine verminderte CFU Zahl auftrat, denken wir eher an eine Hemmung der Proliferation im Laufe der Inkubationszeit. Die untersuchten Stämme von *S. aureus* und *B. cepacia* wurden nicht signifikant im Wachstum gehemmt. Der genaue Mechanismus, wie SP-D das Wachstum von Bakterien beeinflussen kann, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Es gibt vielseitige Mechanismen, die Phagozytose von Bakterien zu steigern. Neben Opsonisierung von Partikeln gibt es eine Reihe direkter Effekte auf die Phagozytose, wie zum Beispiel auf die Leukozytenfunktion und indirekte Effekte, die Rezeptorliganden für Mikroorganismen auf der Phagozytenoberfläche benötigen (Crouch, 1998). Die Mechanismen können allein oder in Kombination bei der Phagozytose auftreten. SP-A, SP-D und andere Kollektine scheinen bei der Phagozytose vor allem als Opsonine, teilweise aber auch indirekt über Rezeptoren zu wirken. Genauso wie Immunglobuline oder Fragmente der Komplementkomponente C3 im Serum (Gemsa et al., 1997) können SP-A und SP-D durch Opsonisierung die Phagozytose von Bakterien oder Viren steigern (Crouch, 1998). Opsonisierung der Bakterien mit SP-D erhöhte in unserer Arbeit bei allen untersuchten *P. aeruginosa* die Phagozytose durch MM6 Zellen ähnlich wie durch Inkubation mit Humanserum. Von Restrepo und Mitarbeitern wurde eine erhöhte Phagozytose von *P. aeruginosa* durch SP-D mit Ratten-Alveolarmakrophagen beschrieben und übereinstimmend mit unseren Ergebnissen kein Unterschied zwischen mukoiden und nicht mukoiden Stämmen gesehen (Restrepo et al., 1999). Obwohl Aggregation durch SP-D für eine erhöhte Aufnahme von Influenzaviren in neutrophile Granulozyten

verantwortlich ist (Hartshorn et al., 1997), war in unseren Experimenten die erhöhte Phagozytose von *P. aeruginosa* durch SP-D unabhängig von der Agglutination. Ein spezifischer Rezeptor an der Makrophagenoberfläche könnte indirekt bei der Phagozytose eine Rolle zu spielen. Das zeigt, dass LPS nicht der einzige Oberflächenligand von *P. aeruginosa* sein muss, der in die SP-D-vermittelte Phagozytose involviert ist. Außerdem wurde bei der hier verwendeten Zelllinie MM6 bisher kein für Surfactantproteine spezifischer Oberflächenrezeptor erforscht. Es wäre also durchaus möglich, dass bei diesen Zellen auch eine direkte Stimulation durch Rezeptoren von SP-D eine Rolle spielt.

Im Gegensatz zu bereits veröffentlichten Daten unter Verwendung von Alveolarmakrophagen oder THP-1 Zellen hatte SP-A in unseren Experimenten keinen Einfluss auf die Phagozytose vitaler *P. aeruginosae*. Im Vergleich der Experimente untereinander fällt auf, dass Khubchandani und Mitarbeiter einen Einfluss der NaCl-Konzentration in der Zell-SP-A-Bakteriensuspension auf die Phagozytose von *P. aeruginosa* beschreiben (Khubchandani et al., 2001). Hier handelt es sich zwar im Gegensatz zu unseren Versuchen nicht um eine Vorinkubation mit SP-A, trotzdem könnte die NaCl-Konzentration, die bisher in keiner anderen Studie diskutiert wurde, durchaus eine Rolle spielen. Khubchandani und Mitarbeiter beschreiben eine NaCl-Konzentration von 100–150 mM als optimale Voraussetzung für die Phagozytose. In unseren Experimenten enthielten die Proben durch in TBS gelöstes SP-D mindestens 150 mM NaCl, während die SP-A Präparation selbst kein NaCl enthielt. Im Nährmedium der MM6 gehen wir von einer physiologischen NaCl-Konzentration aus. Insgesamt können wir jedoch in unseren Versuchen keine genaue NaCl-Konzentration angeben. Dennoch halten wir es durchaus für möglich, dass dieser Faktor eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen ist, und meinen, dass dieser Punkt in folgenden Experimenten berücksichtigt werden sollte.

Mariencheck und Mitarbeiter verwendeten in ihren Versuchen wiederum andere Zellen (Alveolarmakrophagen aus Rattenlungen) und demonstrierten eine gesteigerte Phagozytose durch 25 µg/ml SP-A (Mariencheck et al., 1999). Im Vergleich zu unseren Versuchen könnte neben der Verwendung anderer Zellen auch die höhere SP-A Konzentration eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. Auch andere Autoren berichten von einer Steigerung der Phagozytose von *P. aeruginosa* durch SP-A (Manz-Keinke et al., 1992). Allerdings wurde hier schon bei einer Konzentration von 3 µg/ml eine gesteigerte Phagozytoserate nachgewiesen. Außerdem demonstrierte diese Studie, dass unterschiedliche Surfactantprotein-Präparationen einen Einfluss auf die Phagozytose haben

können. Alveolarproteinose SP-A steigerte die Phagozytose zum Beispiel effektiver als rekombinantes SP-A. Aber auch wir verwendeten Alveolarproteinose SP-A in unseren Experimenten. Es zeigte zwar eine effektive Bindung an alle untersuchten *P. aeruginosa* jedoch keine gesteigerte Phagozytose. *In vivo* Experimente mit Mäusen demonstrierten wiederum, dass SP-A knockout-Mäuse eine verminderte Phagozytose und pulmonale Clearance eines mukoiden *P. aeruginosa* Stammes aufweisen (LeVine et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass die Phagozytose von *P. aeruginosa* durch SP-A unabhängig von der Wachstumsphase (stationär/logarithmisch) ist (Manz-Keinke et al., 1992), daher dürften die Unterschiede zu unseren Ergebnissen nicht auf Unterschieden in der Wachstumsphase der Keime beruhen. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Bakterien in gleicher Wachstumsphase für die Experimente geerntet wurden. Da aber die Bakterien in den genannten Studien meist bezüglich LPS-Serotyp, Pyozintyp, teilweise auch bezüglich der Alginatebildung nicht näher charakterisiert wurden, kann ein Einfluss dieser Phänotypen nicht ausgeschlossen werden. In keiner der bisher publizierten Studien wurden außerdem gezielt verschiedene klinische Isolate von *P. aeruginosa* in Modellsystemen zur Immunregulation durch SP-A oder SP-D miteinander verglichen.

Zusammenfassend konnten wir demonstrieren, dass SP-A und SP-D unterschiedliche Rollen bei der lokalen pulmonalen Immunabwehr CF-assoziierter Keime spielen. Vor allem SP-D scheint bei der Abwehr nicht mukoider *P. aeruginosa* zu fungieren. LPS-Phänotyp, Pyozintyp oder Alginatebildung der Keime spielen hierbei eher eine untergeordnete Rolle. Die Interaktion kommt zum einen über die Lektindomänen der Surfactantproteine zustande, die abhängig von der Kohlehydratstruktur das bakterielle LPS binden. Zum anderen ist LPS aber offenbar nicht der einzige Oberflächenligand von *P. aeruginosa*, der mit SP-D interagiert. Da SP-A und SP-D auf unterschiedlichste Weise die Immunabwehr modulieren, können sie mehrschichtig bei pulmonalen Infektionen mit *P. aeruginosa* und *X. maltophilia* fungieren. In neuesten Studien wurde gezeigt, dass SP-A durch chronische Infektionen und Proteasen aus neutrophilen Degranulationen inaktiviert wird (von Bredow et al., 2001). Diese proteolytische Degradierung von SP-A sowie signifikante Veränderungen der bronchoalveolären Lavage wurden bereits bei der Mukoviszidose nachgewiesen (von Bredow et al., 2001).

Für die Zukunft ist denkbar, dass der Einsatz eventuell gentechnisch produzierter Surfactantproteine neue Perspektiven in der Therapie von Mukoviszidose-assoziierten pulmonalen Infektionen eröffnen wird. So wäre es zum Beispiel durch die Inhalation Protease-resistenter Formen von SP-A und SP-D denkbar, dass im frühen

Krankheitsstadium dem strukturellen Umbau der Lunge durch Immunmodulation vorgebeugt werden kann.

**6. Literaturverzeichnis**

1. Aepfelbacher, M. et al. "Bacterial lipopolysaccharide up-regulates platelet-activating factor-stimulated  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization and eicosanoid release in human Mono Mac 6 cells." J.Immunol. 148.7 (1992): 2186-93.
2. Borron, P. et al. "Recombinant rat SP-D inhibits human T-lymphocyte proliferation in a manner comparable to recombinant rat, native human and native bovine SP-A." Am.J.Respir.Crit.Care Med. (1997): 155:A805. (Abstr.).
3. Borron, P. et al. "Surfactant-associated protein A inhibits LPS-induced cytokine and nitric oxide production in vivo." Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol 278.4 (2000): L840-L847.
4. Bühling, K. J., Lepenies, J. und K. Wit. "Allgemeine und spezielle Pathologie." Urban und Fischer Verlag (2000): 41-56.
5. Bufler, P., Schmidt, B., Schikor, D., Bauernfeind, A., Crouch, E. C. und M. Griese, "Surfactant Protein A and D differently regulate the immune response to nonmucoïd *Pseudomonas aeruginosa* and its lipopolysaccharide." Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 28 (2003): 249-256
6. Chroneos, Z. C. et al. "Purification of a cell-surface receptor for surfactant protein A." J.Biol.Chem. 271.27 (1996): 16375-83.
7. Craven, D. E. und K. A. Steger "Nosocomial pneumonia in mechanically ventilated adult patients: epidemiology and prevention in 1996." Semin.Respir.Infect. 11.1 (1996): 32-53.
8. Crouch, E. C. et al. "Interactions of pulmonary surfactant protein D (SP-D) with human blood leukocytes." Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 12.4 (1995): 410-15.
9. Crouch, E. C. "Collectins and pulmonary host defense." Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 19.2 (1998): 177-201.
10. Crouch, E. C. und J. R. Wright "Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense." Annu.Rev.Physiol. 63 (2001): 521-554.

11. Eda, S. et al. "Structure of a truncated human surfactant protein D is less effective in agglutinating bacteria than the native structure and fails to inhibit haemagglutination by influenza A virus." Biochem.J. 323 ( Pt 2) (1997): 393-99.
12. Gaynor, C. D. et al. "Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis by a direct interaction with human macrophages." J.Immunol. 155.11 (1995): 5343-51.
13. Gemsa, D., Kalden, J. R. und K. Resch „Immunologie." Thieme Verlag (1997): 159-174.
14. Goldberg, J. B. und G. B. Pler "Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharides and pathogenesis." Trends Microbiol. 4.12 (1996): 490-94.
15. Govan, J. R. und V. Deretic "Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia." Microbiol.Rev. 60.3 (1996): 539-74.
16. Griese, M., Birrer, P. und A. Demirsoy "Pulmonary surfactant in cystic fibrosis." Eur.Respir.J. 10.9 (1997): 1983-88.
17. Hancock, R. E. et al. "Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains." Infect.Immun. 42.1 (1983): 170-77.
18. Hartshorn, K. L. et al. "Pulmonary surfactant proteins A and D enhance neutrophil uptake of bacteria." Am.J.Physiol 274.6 Pt 1 (1998): L958-L969.
19. Hartshorn, K. L. et al. "Mechanisms of anti-influenza activity of surfactant proteins A and D: comparison with serum collectins." Am.J.Physiol 273.6 Pt 1 (1997): L1156-L1166.
20. Hickling, T. P., Sim, R. B. und R. Malhotra "Induction of TNF-alpha release from human buffy coat cells by Pseudomonas aeruginosa is reduced by lung surfactant protein A." FEBS Lett. 437.1-2 (1998): 65-69.
21. Hitchcock, P. J. et al. "Lipopolysaccharide nomenclature-past, present, and future." J.Bacteriol. 166.3 (1986): 699-705.

22. Hoiby, N. "Pseudomonas in cystic fibrosis: past, present, future." The Joseph Levy Memorial Lecture (1998): 1-23
23. Hoppe, H. J. und K. B. Reid "Collectins-soluble proteins containing collagenous regions and lectin domains-and their roles in innate immunity." Protein Sci. 3.8 (1994): 1143-58.
24. Hull, J., South, M., Phelan, P. und K. Grimwood "Surfactant Composition in Infants and Young Children with Cystic Fibrosis." Am.J.Respir.Crit.Care.Med. (1997): 156:161-165
25. Kabha, K. et al. "SP-A enhances phagocytosis of Klebsiella by interaction with capsular polysaccharides and alveolar macrophages." Am.J.Physiol 272.2 Pt 1 (1997): L344-L352.
26. Kalina, M. et al. "Interaction of surfactant protein A with bacterial lipopolysaccharide may affect some biological functions." Am.J.Physiol 268.1 Pt 1 (1995): L144-L151.
27. Khubchandani, K. R., Oberley, R. E. und J. M. Snyder "Effects of surfactant protein A and NaCl concentration on the uptake of Pseudomonas aeruginosa by THP-1 cells." Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 25.6 (2001): 699-706.
28. Koptides, M. et al. "Surfactant protein A activates NF-kappa B in the THP-1 monocytic cell line." Am.J.Physiol 273.2 Pt 1 (1997): L382-L388.
29. Kremlev, S. G., Umstead, T. M. und D. S. Phelps "Effects of surfactant protein A and surfactant lipids on lymphocyte proliferation in vitro." Am.J.Physiol 267.4 Pt 1 (1994): L357-L364.
30. Kuan, S. F. et al. "Lectin-mediated interactions of surfactant protein D with alveolar macrophages." Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 10.4 (1994): 430-36.
31. Kuan, S. F., Rust, K. und E. Crouch "Interactions of surfactant protein D with bacterial lipopolysaccharides. Surfactant protein D is an Escherichia coli-binding protein in bronchoalveolar lavage." J.Clin.Invest 90.1 (1992): 97-106.
32. Kuhlman, M., Joiner, K. and R. A. Ezekowitz "The human mannose-binding protein functions as an opsonin." J.Exp.Med. 169.5 (1989): 1733-45.

33. LeVine, A. M. et al. "Surfactant protein-A-deficient mice are susceptible to *Pseudomonas aeruginosa* infection." Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 19.4 (1998): 700-08.
34. Lu, J., Willis, A. C. und K. B. Reid "Purification, characterization and cDNA cloning of human lung surfactant protein D." Biochem.J. 284 ( Pt 3) (1992): 795-802.
35. Magoon, M. W. et al. "Subfractionation of lung surfactant. Implications for metabolism and surface activity." Biochim.Biophys.Acta 750.1 (1983): 18-31.
36. Manz-Keinke, Plattner, H., H. und J. Schlepper-Schafer "Lung surfactant protein A (SP-A) enhances serum-independent phagocytosis of bacteria by alveolar macrophages." Eur.J.Cell Biol. 57.1 (1992): 95-100.
37. Mariencheck, W. I. et al. "Surfactant protein A enhances alveolar macrophage phagocytosis of a live, mucoid strain of *P. aeruginosa*." Am.J.Physiol 277.4 Pt 1 (1999): L777-L786.
38. Mathee, K., McPherson, C. J. und D. E. Ohman "Posttranslational control of the algT (algU)-encoded sigma22 for expression of the alginate regulon in *Pseudomonas aeruginosa* and localization of its antagonist proteins MucA and MucB (AlgN)." J.Bacteriol. 179.11 (1997): 3711-20.
39. McGroarty, E. J. und M. Rivera "Growth-dependent alterations in production of serotype-specific and common antigen lipopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." Infect.Immun. 58.4 (1990): 1030-37.
40. McIntosh, J. C. et al. "Surfactant protein A protects growing cells and reduces TNF-alpha activity from LPS-stimulated macrophages." Am.J.Physiol 271.2 Pt 1 (1996): L310-L319.
41. McNeely, T. B. und J. D. Coonrod "Comparison of the opsonic activity of human surfactant protein A for *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* with rabbit and human macrophages." J.Infect.Dis. 167.1 (1993): 91-97.
42. McNeely, T. B. und J. D. Coonrod "Aggregation and Opsonization of Type A but Not Type B *Hemophilus influenzae* by Surfactant Protein A." Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 11.1 (1994): 114-22.

43. Miyamura, K. et al. "Surfactant protein D binding to alveolar macrophages." Biochem.J. 300 ( Pt 1) (1994): 237-42.
44. Ohmer-Schrock, D. et al. "Interaction of lung surfactant protein A with alveolar macrophages." Microsc.Res.Tech. 26.5 (1993): 374-80.
45. Ojeniyi, B. "Polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. A survey." APMIS Suppl. 46 (1994) 1-44.
46. Pedersen, S.S., Kharazmi, A., Espersen, F. und N. Hoiby "Pseudomonas aeruginosa alginate in cystic fibrosis sputum and the inflammatory response". Infect.Immun. 58 (1990) 3363-8.
47. Pison, U. et al. "Host defence capacities of pulmonary surfactant: evidence for 'non-surfactant' functions of the surfactant system." Eur.J.Clin.Invest 24.9 (1994): 586-99.
48. Pison, U., Wright, J. R. und S. Hawgood "Specific binding of surfactant apoprotein SP-A to rat alveolar macrophages." Am.J.Physiol 262.4 Pt 1 (1992): L412-L417.
49. Postle, A. D. et al. "Deficient hydrophilic lung surfactant proteins A and D with normal surfactant phospholipid molecular species in cystic fibrosis." Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 20.1 (1999): 90-98.
50. Restrepo, C. I. et al. "Surfactant protein D stimulates phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by alveolar macrophages." Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 21.5 (1999): 576-85.
51. Sahlin, S., Hed, J. und I. Rundquist „Differentiation between attached and ingested immune complexes by a fluorescence quenching cytofluorometric assay." J.Immunol.Methods 60 (1983): 115-24.
52. Sano, H. et al. "Pulmonary surfactant protein A modulates the cellular response to smooth and rough lipopolysaccharides by interaction with CD14." J.Immunol. 163.1 (1999): 387-95.
53. Song, M. und D. S. Phelps "Comparison of SP-A and LPS effects on the THP-1 monocytic cell line." Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol 279.1 (2000): L110-L117.

54. Stewart, R. S. und J. W. Costerton "Antibiotic resistance of bacteria in biofilms." Lancet 358: (2001) 135-38.
55. Tenner, A. J. et al. "Human pulmonary surfactant protein (SP-A), a protein structurally homologous to C1q, can enhance FcR- and CR1-mediated phagocytosis." J.Biol.Chem. 264.23 (1989): 13923-28.
56. Tino, M. J. und J. R. Wright "Surfactant protein A stimulates phagocytosis of specific pulmonary pathogens by alveolar macrophages." Am.J.Physiol 270.4 Pt 1 (1996): L677-L688.
57. van Golde, L. M. "Potential role of surfactant proteins A and D in innate lung defense against pathogens." Biol.Neonate 67 Suppl 1 (1995): 2-17.
58. van Iwaarden, F. et al. "Pulmonary surfactant protein A enhances the host-defense mechanism of rat alveolar macrophages." Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 2.1 (1990): 91-98.
59. van Iwaarden, J. F. et al. "Binding of surfactant protein A to the lipid A moiety of bacterial lipopolysaccharides." Biochem.J. 303 ( Pt 2) (1994): 407-11.
60. von Bredow, C., Birrer, P. und M. Griese "Surfactant protein A and other bronchoalveolar lavage fluid proteins are altered in cystic fibrosis." Eur.Respir.J. 17.4 (2001): 716-22.
61. Weber, C. et al. "Tumor necrosis factor induces enhanced responses to platelet-activating factor and differentiation in human monocytic Mono Mac 6 cells." Eur.J.Immunol. 23.4 (1993): 852-59.
62. Wright, J. R. "Immunomodulatory functions of surfactant." Physiol Rev. 77.4 (1997): 931-62.
63. Wright, J. R. und D. C. Youmans "Pulmonary surfactant protein A stimulates chemotaxis of alveolar macrophage." Am.J.Physiol 264.4 Pt 1 (1993): L338-L344.
64. Ziegler-Heitbrock, H. W. L., Thiel, E., Fütterer, A., Herzog, V., Wirtz, A. und G. Riethmüller "Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes." Int. J. Cancer 41 (1988): 456-461.

## 7. Anhang

### 7.1 Häufig verwendete Abkürzungen

Ag/Ak Komplexe	Antigen/Antikörper Komplexe
B. cep	Burholderia cepacia
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
CF	Cystische Fibrose
CFU	colony forming units
E. coli	Escherichia coli
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
H. influenza	Haemophilus influenza
HS	Humanserum
K. pneumonia	Klebsiella pneumonia
LPS	Lipopolysaccharid
MBP	Mannose bindendes Protein
MM6	Monozyten-Makrophagen Zelllinie 6
OD	optische Dichte
P. aer	Pseudomonas aeruginosa
S. aur	Staphylococcus aureus
S. pneumonia	Streptococcus pneumonia
SEM	Standardfehler
SP	Surfactantprotein
SP-A	Surfactantprotein A
SP-D	Surfactantprotein D
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
X. maltophilia	Xanthomonas maltophilia

## 7.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben. Dies gilt besonders für:

Herrn Prof. Dr. med. D. Reinhardt, Direktor des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Möglichkeit, meine Dissertation im Rahmen der Sufactantforschung an seinem Institut anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. med. M. Griese, Leiter der Forschungsgruppe Lunge der Kinderpoliklinik, für seine freundliche Unterstützung und die ständige Bereitschaft zu kritischen und fachkundlichen Diskussionen im Bereich der Surfactantforschung, durch die er wissenschaftliches Denken und Vorgehen vermittelte.

Herrn Dr. med. P. Bufler für dessen engagierte Betreuung, auch von den USA aus, während der gesamten Arbeit und die unermüdliche Unterstützung im Labor, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Er hat mich bei fachlichen und experimentellen Problemen stets unterstützt und motiviert.

Herrn Prof. Dr. med. A. Bauernfeind vom Max-von-Pettenkofer Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Bereitstellung und Typisierung der CF-assoziierten Keime.

Frau A. Schams, Frau Y. Wüst und den Angestellten des ehemaligen mikrobiologischen Labors der Kinderklinik für die nette und produktive Zusammenarbeit.

Das Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Möglichkeit, die FACS-Messungen der Phagozytoseexperimente in deren Einrichtungen vornehmen zu können.

Ganz besonderer Dank gilt Frau A. Groll für das Korrekturlesen der fachfremden Literatur und Herrn M. Weigang für die Motivation und geduldige Unterstützung bei der Arbeit mit dem Computer, so dass ein Gelingen dieser Dissertation erst möglich war.

### 7.3 Publikationen

1. Bufler, P., Schikor, D., **Schmidt, B.**, Crouch, E. C. und M. Griese (2003): "Strain to strain variability of *P. aeruginosa* and its lipopolysaccharide to stimulate the immune response - modulation by Surfactant and its components" *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* (eingereicht zur Publikation).
2. Bufler, P., **Schmidt, B.**, Schikor, D., Bauernfeind, A., Crouch, E. C. und M. Griese (2003): "Surfactant Protein A and D differently regulate the immune response to non-mucoid *P. aeruginosa* and its lipopolysaccharide." *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 28 (2003): 249-256
3. **Schmidt, B.**, Bufler, P., Bauernfeind, A. und M. Griese (2001): „SP-D aber nicht SP-A beeinflusst das Wachstum von Bakterien die mit cystischer Fibrose (CF) assoziiert sind.“ Posterpräsentation (Nr. 71) auf der 23. Jahrestagung der Gesellschaft für pädiatrische Pneumologie 03/02 in Bern.
4. Bufler, P., **Schmidt, B.**, Schikor, D. und M. Griese (2001): „Surfactant Protein A und D beeinflussen unterschiedlich die Immunantwort auf *Pseudomonas aeruginosa*.“ Posterpräsentation (Nr. 21) auf der 23. Jahrestagung der Gesellschaft für pädiatrische Pneumologie 03/02 in Bern.
5. Bufler, P., **Schmidt, B.**, Schikor, D. und M. Griese (2000): "Surfactant Protein A und D differently regulate the immune response to *P. aeruginosa* and its lipopolysaccharide." Posterpräsentation auf dem Emma Maler Symposium 10/00 in der Haunerschen Kinderklinik der LMU München.
6. **Schmidt, B.**, Bufler, P., Crouch, E. und M. Griese (1999): „SP-A stimuliert die Aufnahme von nicht opsonierten *Pseudomonas aeruginosa* durch die monozytäre Zelllinie Mono-Mac 6.“ Posterpräsentation (Nr. 47) auf der 21. Jahrestagung der Gesellschaft für pädiatrische Pneumologie 03/99 in Salzburg.
7. Bufler, P., **Schmidt, B.**, Crouch, E. und M. Griese (1999): „SP-A but not SP-D stimulates phagocytosis of non-opsonized pseudomonas aeruginosa by mono-mac 6 cells.“ Mitarbeit an der Vortragspräsentation für die ALA/ATS International Conference 04/99 in San Diego, Kalifornien, USA.

8. Bufler, P., **Schmidt, B.**, Bauernfeind, A. und M. Griese (1998):  
„Immunmodulatorische Funktion des Pulmonalen Surfactant Protein D und  
Interaktion mit CF-assoziierten Bakterien.“ Posterpräsentation (Nr. 69) auf der 20.  
Jahrestagung der Gesellschaft für pädiatrische Pneumologie 04/98 in Freiburg.

## 7.4 Lebenslauf

### Persönliche Daten

*Adresse* Bettina Schmidt  
Hansastraße 75 Rgb  
81373 München

*Geburtstag/-ort* 26.10.1972 in München

### Schulbildung

1979 - 1983 *Grundschule Enkirch/Mosel*  
1983 - 1992 *Gymnasium Traben-Trarbach*  
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

### Soziales Jahr

1992 - 1993 *Deutsches Herzzentrum München*  
Kinderkardiologie und Erwachsenen Chirurgie

### Studium

1993 - 2000 Studium der Humanmedizin  
*Ludwig-Maximilians-Universität München*  
Praktisches Jahr 1999/2000  
Chirurgie: *Hospital Clínico de la Universidad de Santiago de Chile*  
*Chirurgische Klinik, Klinikum Innenstadt, LMU München*  
Innere Medizin: *Spital Uster, Lehrkrankenhaus der Universität Zürich*  
Pädiatrie: *Kinderklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital, LMU München*

### Wissenschaftliche Arbeit

06/1997 – 11/1999 Experimentelle Arbeit im Forschungslabor Lunge/Prof. Dr. M. Griese, Kinderpoliklinik des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der LMU München (Direktor: Prof. Dr. D. Reinhardt)

### Beruf

12/2000 – 05/2002 Ärztin im Praktikum, *Kinderklinik St. Marien* in Landshut  
seit 06/2002 Assistenzärztin, *Kinderklinik St. Marien* in Landshut