

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

MODULATION DER PSEUDOMONAS AERUGINOSA-INDUZIERTEN
IMMUNANTWORT DURCH PULMONALES SURFACTANT

Dissertation

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

vorgelegt von
Daniela Schikor
aus Augsburg
2006

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Griese

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. J. Heesemann
Prof. Dr. med. O. Adam

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv.-Doz. Dr. med. P. Bufler

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2006

WIDMUNG

Meinen Eltern und Freunden gewidmet, die mir stets zur Seite standen und Motivationsarbeit leisteten.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung und Fragestellung	3
1.1	Pulmonaler Surfactant	3
1.1.1	Surfactantlipide	4
1.1.2	Surfactantproteine	5
1.1.3	Interaktion von SP-A und SP-D mit pulmonalen Pathogenen	6
1.2	Zystische Fibrose	7
1.3	SP-A und SP-D bei Patienten mit Zystischer Fibrose und gesunden Probanden	8
1.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
1.5	Pulmonale Entzündungsreaktion	10
1.6	Mechanismen der primären Immunantwort	11
1.7	Modulation der Immunantwort durch SP-A und SP-D	13
2	Material und Methoden	16
2.1	Reagenzien und Labormaterial	16
2.2	Zellen und Gewebekultur	16
2.3	Stimulation von MonoMac 6-Zellen	17
2.4	Bestimmung der Tumornekrosefaktor α -Aktivität	19
2.5	Surfactant Protein A und D	19
2.6	Bakterienkultur	20
2.7	Agglutination der Bakterien	21
2.8	Präparation von Lipopolysaccharid	21
2.8.1	Präparation von rauem LPS	21
2.8.2	Präparation von glattem LPS	23
2.9	Quantifizierung von Lipopolysaccharid	24
2.10	Gelelektrophorese	25
2.11	Statistische Analyse	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Charakterisierung der verwendeten Isolate von <i>P. aeruginosa</i>	27
3.2	Stimulation von monozytären Zellen mit SP-A und SP-D	29
3.2.1	Rekombinantes SP-A stimuliert die TNF α -Ausschüttung nicht	29
3.2.2	TNF α -Stimulation durch SP-D ist bedingt durch LPS-Kontamination	30
3.3	Keine signifikante Beeinflussung der TNF α -Ausschüttung durch SP-A bei „smooth“ und „rough“ LPS von <i>E. coli</i> und <i>S. minnesota</i> auf MM6	31
3.4.	Keine signifikante Beeinflussung der TNF α -Ausschüttung durch SP-A bei „smooth“ und „rough“ LPS von <i>E. coli</i> und <i>S. minnesota</i> auf U937	32
3.5	Signifikante Beeinflussung der TNF α -Ausschüttung durch SP-A bei „smooth“ LPS von <i>E. coli</i> auf THP-1	33
3.6	Inhibition der TNF α -Ausschüttung durch SP-D bei „smooth“ LPS von <i>E. coli</i> auf MM6 und U937	33
3.7	Keine signifikante Beeinflussung der TNF α -Ausschüttung durch SP-D bei „rough“ LPS von <i>E. coli</i> auf MM6 und U937	34
3.8	Variation der TNF α -Sekretion nach Stimulation mit <i>P. aeruginosa</i>	35

3.9	Variation der TNF α -Sekretion nach Stimulation mit gereinigtem <i>P. aeruginosa</i> -LPS	36
3.10	Stimulation und Hemmung der <i>P. aeruginosa</i> induzierten TNF α -Sekretion monozytärer Zellen durch SP-A	37
3.11	SP-D stimuliert die <i>P. aeruginosa</i> induzierte TNF α -Sekretion monozytärer Zellen	39
3.12	SP-A moduliert die durch <i>P. aeruginosa</i> -LPS induzierte TNF α -Sekretion monozytärer Zellen nicht signifikant	41
3.13	SP-D moduliert die durch <i>P. aeruginosa</i> -LPS induzierte TNF α -Sekretion monozytärer Zellen signifikant	42
3.14	Surfactantlipide hemmen die durch <i>P. aeruginosa</i> induzierte Stimulation monozytärer Zellen und modulieren die Effekte von SP-A und SP-D	43
3.15	Surfactantlipide hemmen die durch <i>P. aeruginosa</i> -LPS induzierte Stimulation monozytärer Zellen und modulieren die Effekte von SP-A und SP-D	44
4	Diskussion	46
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	46
4.2	Variation des Effekts von SP-A und SP-D in Abhängigkeit von Extraktionsform und Zelllinie	46
4.3.	Vitale <i>P. aeruginosa</i> unterscheiden sich in ihrer TNF α -stimulierenden Kapazität	47
4.4.	Unterschiede im Vergleich von LPS und vitalen Bakterien	48
4.5.	Rekombinantes SP-A beeinflusst die Stimulation der monozytären Zellen nicht	48
4.6.	Beeinflussung des Stimulationsansatzes durch SP-D	49
4.7.	Modulation der TNF α -Sekretion von <i>P. aeruginosa</i> durch SP-A	49
4.8.	Signifikante Modulation der TNF α -Sekretion von <i>P. aeruginosa</i> durch SP-D	51
4.9.	SP-A moduliert die TNF α -Sekretion von <i>P. aeruginosa</i> -LPS nicht signifikant	52
4.10.	SP-D moduliert signifikant die TNF α -Sekretion von <i>P. aeruginosa</i> -LPS	53
4.11.	Signifikante Modulation und Hemmung der TNF α -Sekretion durch Surfactantlipide	54
	Literaturverzeichnis	57
	Danksagung	64
	Publikationen	65
	Lebenslauf	66

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CF	Zystische Fibrose
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
Surfactant	Surface active agent
SP-A/D	Surfactant Protein A/D
Kollektine	Kollagene kohlenhydratbindende Proteine
TNF α	Tumornekrosefaktor α
CFU	Colony forming unit
LPS	Lipopolysaccharid
BAL	Bronchoalveoläre Lavage

1. ZUSAMMENFASSUNG

Pulmonales Surfactant ist eine komplexe Mischung aus Phospholipiden und verschiedenen Proteinen. Neben der Stabilisierung der Oberflächenspannung der Lungenbläschen während der Atmung spielt Surfactant eine wichtige Rolle bei der primären Immunabwehr in der Lunge. An der immunmodulatorischen Funktion von Surfactant sind insbesondere die hydrophilen Surfactantproteine A und D beteiligt. Die Zystische Fibrose ist eine erbliche Erkrankung der exokrinen Drüsen, die auch die Lunge betrifft. Dort führt die Retention des zähen Sekrets durch den defekten Chloridkanal zu chronischer Besiedlung mit spezifischen Keimen. Einer der Hauptkeime, der die Prognose der Erkrankung beeinflusst, ist *Pseudomonas aeruginosa*. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Funktion von Surfactantprotein A und D bei der lokalen Immunabwehr von *Pseudomonas aeruginosa* in der Lunge von Patienten mit Zystischer Fibrose. Wir untersuchten den Effekt von Surfactantprotein A und D alleine und im Verbund mit Surfactantlipiden auf die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren durch monozytäre Zellen. Tumornekrosefaktor α ist ein wichtiger Mediator der Entzündungsreaktion in der Lunge. Es zeigte sich, dass Surfactantprotein D die Ausschüttung von Tumornekrosefaktor α durch monozytäre Zellen nach Stimulation verschiedener Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* signifikant steigert. Im Gegensatz dazu hat rekombinantes Surfactantprotein A keinen signifikanten Effekt auf die Freisetzung von Tumornekrosefaktor α nach Stimulation monozytärer Zellen durch vitale *Pseudomonas aeruginosa*. Wir untersuchten darüber hinaus den Effekt von Surfactantprotein A und D auf die Stimulation monozytärer Zellen mit gereinigtem Lipopolysaccharid von *Pseudomonas aeruginosa*. Dazu isolierten wir Lipopolysaccharid der in dieser Studie verwendeten Stämme von vitalen *Pseudomonas aeruginosa*. Auch hier zeigte Surfactantprotein A keinen signifikanten Effekt auf die Ausschüttung von Tumornekrosefaktor α . Surfactantprotein D hingegen stimuliert bei sechs von zwölf untersuchten Lipopolysaccharid-Präparationen die Tumornekrosefaktor α -Sekretion, bei fünf davon signifikant. Ein Surfactantpräparat (Alveofact[®]), das in der Klinik zur Behandlung des neonatalen Atemnotsyndroms verwendet wird, hemmte signifikant die Tumornekrosefaktor α -Freisetzung durch monozytäre Zelllinien nach Stimulation mit *Pseudomonas aeruginosa* und das zugehörige Lipopolysaccharid. In weiteren Experimenten wurde untersucht, welchen Einfluss die Kombination von Alveofact[®], das nur Surfactantlipide enthält, und Surfactantprotein A und D auf die Tumornekrosefaktor α -Ausschüttung stimulierter monozytärer Zellen hat. Es zeigte sich, dass Surfactantprotein A bei sechs von acht der vitalen *Pseudomonas aeruginosa*

Stämme und zwei von neun Lipopolysaccharid-Präparationen eine Umkehr des hemmenden Effekts von Alveofact[®] bewirkte. Surfactantprotein D hingegen zeigte bei vitalen *Pseudomonas aeruginosa* keine signifikante Beeinflussung der Tumornekrosefaktor α -Freisetzung durch Alveofact. Bei Stimulation mit *Pseudomonas aeruginosa*-Lipopolysaccharid führte Surfactantprotein D in Kombination mit Alveofact bei zwei von neun Lipopolysaccharid-Präparationen zu einer zusätzlichen Steigerung der Tumornekrosefaktor α -Sekretion durch monozytäre Zellen. Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die immunmodulatorische Funktion der Surfactantproteine sich je nach kolonisierendem Stamm von *Pseudomonas aeruginosa* unterscheidet. Die Wirkung von Surfactantprotein D ist dabei ausgeprägter als die von Surfactantprotein A. Darüber hinaus haben die Surfactantlipide einen wesentlichen Einfluss auf die Funktion der Surfactantproteine im Rahmen der primären Immunantwort.

1 Einleitung und Fragestellung

Die Lunge kommt durch die Atmung mit verschiedenen Toxinen und Infektionserregern in Kontakt. Die oberen Atemwege sind der erste Filter zur Elimination dieser Stoffe. Die mukoziliäre Clearance fördert durch Schleimsekretion und den nach außen gerichteten Zilienschlag des Flimmerepithels die Entfernung von Toxinen und Infektionserregern, die in weiter distal gelegene Abschnitte der Atemwege gelangen (Dockter and Lindemann, 2000). Pathogene, die dennoch in den unteren Respirationstrakt gelangen, werden dort durch die körpereigene Immunabwehr eliminiert. Die körpereigene Immunabwehr lässt sich in die zelluläre und humorale Immunantwort unterteilen, die unser Immunsystem unter Einbeziehung der angeborenen (unspezifischen) und der erworbenen (spezifischen) Immunität koordiniert. In der Lunge modulieren die Bestandteile des Surfactant zusammen mit der körpereigenen Immunabwehr die lokale humorale und zelluläre Immunantwort. „Surfactant“ ist ein Oberflächenfilm, der die Alveolen der Lunge bedeckt und die Oberflächenspannung aufrechterhält, aber auch die Immunabwehr beeinflusst. Durch komplexe Mechanismen, die bei CF-Patienten zu einer größeren Empfänglichkeit für pulmonale Infektionen führen, kommt es im Laufe der Erkrankung zur chronischen Besiedlung der Lunge mit spezifischen Erregern wie *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Diese Infektion induziert eine anhaltende Entzündungsreaktion und resultiert in der Zerstörung des Lungengewebes (Dockter and Lindemann, 2000). Die vorliegende Arbeit untersuchte die Funktion von Surfactantproteinen und Surfactantlipiden bei der lokalen Immunabwehr in der Lunge. Hierzu wurde zunächst die Zytokin-stimulierende Potenz verschiedener *P. aeruginosa*-Isolate und der isolierten Lipopolysaccharide (LPS) von Patienten mit CF untersucht. Anschließend wurde untersucht, inwieweit die Surfactantproteine A und D die Zytokinausschüttung und insbesondere die Sekretion von TNF α durch monozytäre Zellen beeinflussen. Zuletzt untersuchten wir die Modulation der Zytokin-Stimulation durch SP-A und SP-D im Verbund mit Surfactantlipiden.

1.1 Pulmonaler Surfactant

Das Wort Surfactant leitet sich aus der englischsprachigen Beschreibung seiner normalen Funktion als „surface active agent“ her. Die Hauptaufgabe von Surfactant besteht in der Reduktion der Oberflächenspannung in den Alveolen während der In- und Expiration. Surfactant ist eine komplexe Mischung aus verschiedenen Lipiden (ca. 90%) und Proteinen (van Golde, 1995). Sämtliche Komponenten des Surfactant werden durch Alveolarzellen Typ II

synthetisiert (Crouch, 1998). Die Surfactantproteine SP-A, SP-B und SP-D werden außerdem zusätzlich durch Clara Zellen des Bronchialepithels hergestellt (Crouch, 1998; Griese, 1999). Der Abbau bzw. Recycling des Surfactant geschieht ebenfalls über diese Zellen und zusätzlich durch Alveolarmakrophagen (Wright, 1997).

1.1.1 Surfactantlipide

Der Surfactant setzt sich zu 90% aus Lipiden und zu 10% aus Proteinen zusammen. Den größten Anteil der Lipide nimmt Dipalmitoylphosphatidylcholin (65%) zusammen mit ungesättigtem Phosphatidylcholin ein. Phosphatidylglycerol liegt in geringeren Mengen (ca. 5%) vor. Einen ähnlich geringen Anteil nehmen Phosphatidylethanolamin und andere Phospholipide ein. Zusätzlich findet sich noch Cholesterol (ca. 10%) unter den Surfactantlipiden (Griese, 1999; Wright, 1997).

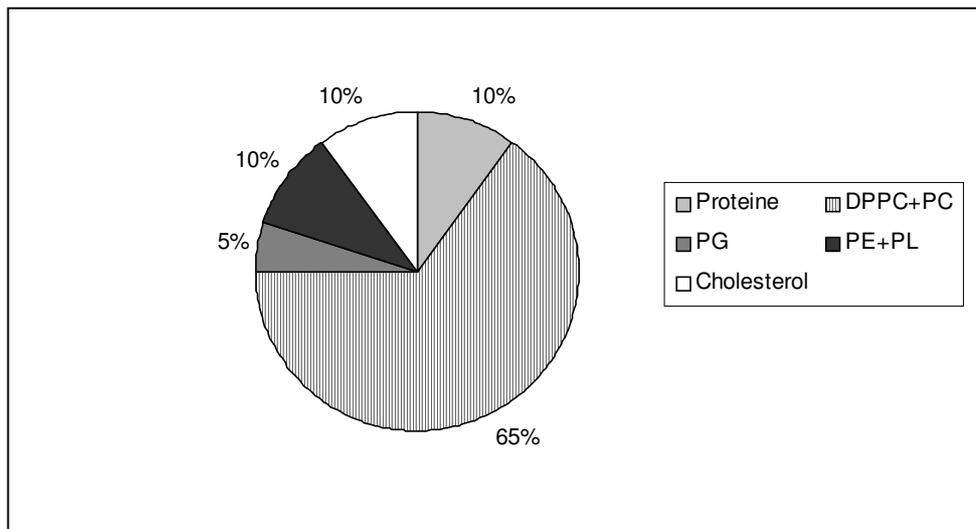


Abbildung 1: Verteilung der Surfactantlipide

1.1.2 Surfactantproteine

Bisher sind 4 verschiedene Surfactantproteine bekannt. Die hydrophoben Proteine SP-B und SP-C sind für die Surfactanthomöostase, das heißt für die Aufrechterhaltung des Surfactantfilms in seiner korrekten Zusammensetzung wichtig. SP-B beschleunigt vor allem die Ausbildung des Surfactant-Films und beeinflusst zusammen mit SP-A die Bildung von tubulärem Myelin. SP-C hingegen erhält vor allem die biophysikalische Oberflächenaktivität der Lipide im Surfactant aufrecht und stabilisiert die Oberflächenaktivität des Surfactant während des Atemzyklus (Wright, 1997).

Die hydrophilen Surfactantproteine SP-A und D spielen bei der lokalen Immunantwort in der Lunge eine Rolle. SP-A und SP-D gehören zur Familie der Kollektine. Der Name Kollektine steht für „*collagenous C-type lectins*“ (= kollagene, kohlenhydratbindende Proteine). Kollektine sind definiert als Proteine, die in Anwesenheit von zweiwertigen Kationen wie Kalzium an spezifische Kohlenhydrate binden (Hoppe and Reid, 1994). SP-A und SP-D haben eine viergeteilte Grundstruktur. Eine Untereinheit der Grundstruktur ist die NH₂-terminale, am Stickstoffende liegende vernetzende Domäne (N). An diese schließt sich die aus drei Windungen bestehende Kollagen-Domäne von variabler Länge an (C). Zwischen dem vierten Bestandteil, der C-terminalen am Kohlenhydratende liegenden Erkennungsregion für Kohlenhydratseitenketten (= C-Typ Lektindomäne) und der Kollagen-Domäne liegt die verbindende („linking“) Domäne. Surfactantproteine existieren nur im Verbund mehrerer Einheiten. SP-A setzt sich aus 18 Monomeren zusammen, und bildet damit ein Oktadekamer. SP-D setzt sich aus 12 Monomeren zusammen und nennt sich daher Dodekamer (Crouch, 1998; Crouch et al., 1994). Der Genlocus für SP-A liegt auf dem Chromosom 10 und besteht aus 2 funktionellen Genen, SP-A 1 und SP-A 2 (Wang et al., 2000). Der Genlocus für SP-D liegt ebenfalls auf Chromosom 10 und kodiert für ein funktionelles Gen (Crouch, 1998). Mit ihrer Lektindomäne können SP-A und SP-D an Kohlenhydratreste binden. SP-A zeigt hierbei eine Präferenz für N-Acetyl Mannosamin, während SP-D besser an Maltosereste bindet (Crouch et al., 2000; Crouch, 1998).

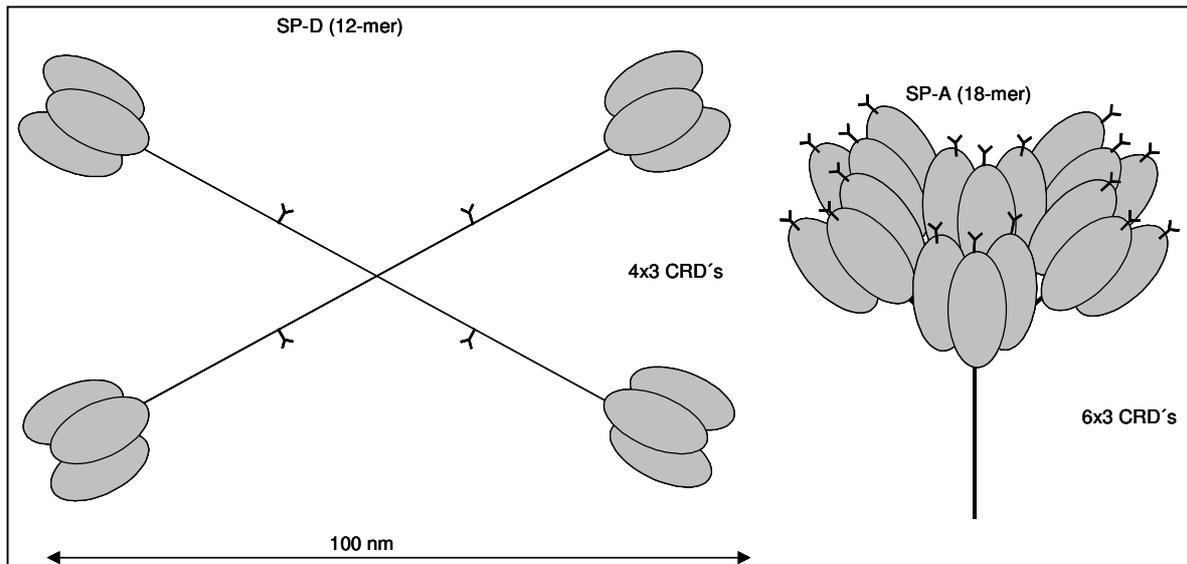


Abbildung 2: Struktur der Surfactantproteine SP-A und SP-D

1.1.3 Interaktion von SP-A und SP-D mit pulmonalen Pathogenen

SP-A und SP-D binden über die Lektindomäne an verschiedene Erreger. Dazu zählen bei SP-A und bei SP-D Viren wie *Influenza A*, gramnegative Bakterien wie *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Salmonella minnesota* (*S. minnesota*), grampositive Bakterien wie *Streptococcus pneumoniae* und *Staphylococcus aureus*, oder Pilze wie *Aspergillus fumigatus* (Madan et al., 1997a; Madan et al., 1997b; Crouch, 1998; Wright, 1997; van Iwaarden et al., 1994; Hartshorn et al., 1998). SP-A bindet zudem ebenfalls an *Hämophilus influenzae* und *Bacillus Calmette-Guérin* (Weikert et al., 1997; Wright, 1997). Die Bindung von SP-A an diese Bakterien geschieht vorwiegend an die Lipid A Komponente von „rough“ LPS, und ist kalziumabhängig (van Iwaarden et al., 1994). Kalina und Kollegen berichten zusätzlich über eine spezifische kalziumunabhängige Bindung von SP-A an „smooth“ LPS (Kalina et al., 1995). Zudem ist eine Bindung von SP-A an Exopolysaccharide von gramnegativen Bakterien bekannt (Kabha et al., 1997; Crouch, 1998). Dies konnten wir auch in Festphasen-Bindungs-Assays bestätigen. Die Bindung war kalziumabhängig, und erfolgt somit wahrscheinlich über die Lektin-Bindungsstelle. Dafür spricht auch, dass in unseren Experimenten die Bindung von SP-A an *P. aeruginosa* durch EDTA und Maltose hemmbar war (Bufler et al., 2003).

SP-D interagiert zusätzlich mit *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum* oder *Blastomyces dermatidis* und *Mykobakterium tuberculosis* (Crouch, 1998; Ferguson et al., 1999; Wright, 1997). Die Bindung von SP-D an Bakterien unterscheidet sich von der Bindung von SP-A insofern, dass es hauptsächlich mit „rough“ LPS und nur teilweise

mit „smooth“ LPS interagiert. SP-D bindet jedoch nicht an Lipid A, sondern an Kernpolysaccharide und/oder O-spezifische Antigene (Kuan et al., 1992; Crouch, 1998). Für diese Bindung ist die Lektin-Domäne von SP-D wichtig. Durch die Bindung induziert SP-D die Agglutination der Mikroorganismen. Die kreuzförmige Struktur von SP-D ist für die vernetzende Agglutination besonders günstig (van Golde, 1995). Die Bindungsstellen liegen jeweils an den äußeren Enden des Proteins. Durch die Bindung von Pathogenen bewirkt SP-D möglicherweise eine Steigerung der mukoziliären Clearance und Phagozytose im Sinne einer Opsonisierung (Kuan et al., 1992).

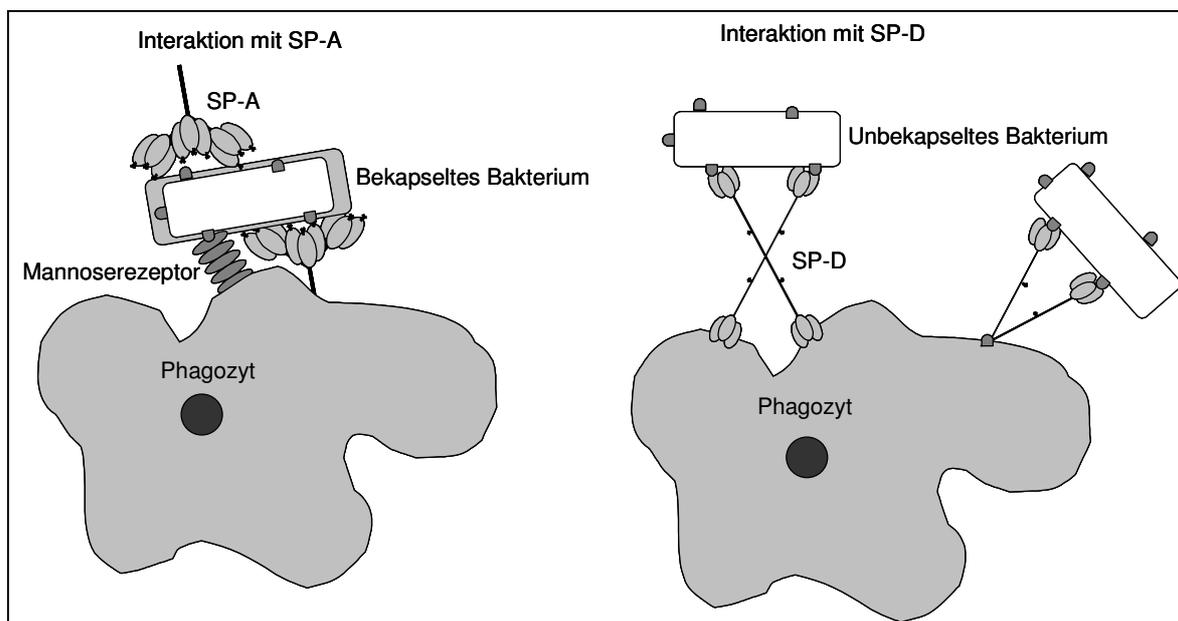


Abbildung 3: Mechanismen der Interaktion von SP-A und SP-D mit bekapselten und unbekapselten Organismen. SP-A bindet direkt an bekapselte Organismen und verstärkt die Interaktion mit Phagozyten. Dies kann die zusätzliche Interaktion mit Mannoserezeptoren auf den Phagozyten involvieren (Kabha et al., 1997). SP-D kann mit nicht bekapselten und leicht bekapselten Organismen interagieren und über lektinabhängige und -unabhängige Mechanismen die Interaktion mit Phagozyten zu verstärken (siehe auch Kapitel 1.6). Durch diese Interaktion kommt es zu einer Modulation der Zytokinausschüttung und Phagozytose.

1.2 Zystische Fibrose

Die Zystische Fibrose ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, und ist mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:2000-2500 die häufigste angeborene Stoffwechselerkrankung der weißen Bevölkerung. Der Gendefekt befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 7 (7q31.2) in der kodierenden Region des „Cystic Fibrosis Transmembran Regulator“ (CFTR)-Gens. Das CF-Gen besteht aus 230000 Basenpaaren und verteilt sich auf 27 Exons. Diese kodieren ein Protein aus 1480 Aminosäuren. Bisher wurden mehr als 900 Mutationen im

CFTR-Gen beschrieben. Diese Mutationen bewirken Veränderungen in der Prozessierung bzw. in der Expression und damit Funktion des CFTR-Proteins (Koch et al., 2001).

Die mit 70-75% häufigste Mutation in Mittel- und Nordeuropa wird „delta F508“ genannt. Sie besteht aus einer Deletion von drei Nukleotiden im Exon 10, aus der der Verlust eines Phenylalaninrestes in Position 508 resultiert (Dockter and Lindemann, 2000; Koch et al., 2001). Das Wildtyp-CFTR Genprodukt ist ein Chloridkanal, der in der Zellmembran exprimiert wird. Die verschiedenen Mutationen bewirken durch die Funktionseinschränkung des CFTR-Proteins eine Störung des nach außen gerichteten Chloridstroms. In Folge dessen kommt es zu einem vermehrten Einstrom von Natriumionen in die Zelle. Im Bronchialepithel, in den Gallenwegen, dem exokrinen Pankreas und in den Schweißdrüsen wird Wasser zusammen mit Chlorid sezerniert und mit Natrium reabsorbiert. Durch den defekten Chloridkanal wird den Sekreten Wasser entzogen und der Schleim wird pathologisch viskös (Dockter and Lindemann, 2000).

1.3 SP-A und SP-D bei Patienten mit Zystischer Fibrose und gesunden Probanden

Es stellt sich die Frage, ob die Zusammensetzung der Surfactantproteine, oder ihr Fehlen, Auswirkungen auf die Immunabwehr der Lunge hat. Für SP-A zeigte sich in einer Zusammenstellung der Ergebnisse mehrerer Studien ein Normalwert von $4,5 \pm 4,8$ $\mu\text{g/ml}$ und für SP-D von $1,1 \pm 0,3$ $\mu\text{g/ml}$ bei Lungengesunden in der bronchoalveolären Spülflüssigkeit (Griese, 1999). Im Rahmen der Entzündungsreaktion bei Zystischer Fibrose (CF) kommt es durch proteolytische Degradierung zu einer Abnahme der funktionsfähigen Surfactantproteine (Wiesener, 2002; Postle et al., 1999). Neugeborene, bei denen durch eine Screening-Untersuchung die Diagnose CF gestellt wurde, zeigten zunächst einen vermehrten Gehalt an SP-A. Bei älteren Kindern mit CF und chronischer pulmonaler Infektion fanden sich erniedrigte SP-A Werte (Griese, 1999; Hull et al., 1997). In einer klinischen Studie zeigte sich im Vergleich von gesunden Probanden und CF-Patienten eine deutliche Reduktion der Surfactantproteine A und D bei Patienten mit Zystischer Fibrose (Postle et al., 1999). Diese ausgeprägte Verringerung beider Surfactantproteine bei normaler Menge an Surfactantlipiden könnte eine der Ursachen für die ineffektive Erregerelimination in der Lunge von Patienten mit CF sein.

1.4 *Pseudomonas aeruginosa*

In der Lunge begünstigt die pathologische Schleimsekretion rezidivierende pulmonale Infektionen, da der retinierte Schleim einen idealen Nährboden für Bakterien bietet. Keime, die die Lunge schon früh chronisch besiedeln, sind neben *Staphylococcus aureus* und *Hämophilus influenzae* vor allem *P. aeruginosa* (Dockter and Lindemann, 2000).

P. aeruginosa sind gramnegative Stäbchenbakterien. Die Zellwand gramnegativer Bakterien enthält Lipopolysaccharide (LPS), die mit ihrem Lipid A in der äußeren Membran verankert sind. Am Lipid A, dem Grundgerüst des LPS sind die Kernpolysaccharide angeheftet, die zwischen verschiedenen *P. aeruginosa* Stämmen nur wenig variieren. An diese schließen sich Ketten repetitiver Oligosaccharideinheiten an (O-Antigene) (Wilms, 2001). Das LPS wird erst bei Zellyse freigesetzt und besitzt toxische Eigenschaften, weshalb es auch als Endotoxin bezeichnet wird. LPS selbst hat eine ausgeprägte immunstimulierende Fähigkeit (Goldberg and Pler, 1996; Kronborg et al., 1992). Man geht daher davon aus, dass die chronische Infektion mit *P. aeruginosa* und der Freisetzung des zugehörigen LPS zur Destruktion des Lungenparenchyms bei Patienten mit CF beiträgt (Kronborg et al., 1992).

Innerhalb der Lunge können die Erreger ihre Eigenschaften verändern. So kommt es zum Beispiel bei *P. aeruginosa* typischerweise zur Ausbildung mukoider Varianten. Darunter versteht man, dass *P. aeruginosa* innerhalb von 24 Stunden durch Sekretion von Exomukopolysacchariden Schleim bildet (Grobe et al., 1995; Wilms, 2001). Dieser Schleim besteht aus Alginat, das sich aus Kopolymeren der Monosaccharide Mannuronat und Guluronat zusammensetzt (Grobe et al., 1995). Durch Quervernetzung und Azetylierung sind die eingeschlossenen Bakterien vor enzymatischem Abbau geschützt. In diesem Schutzfilm aus Alginat wachsen *P. aeruginosa* in Mikrokolonien und sind für die körpereigene Abwehr erschwert zugänglich (Vogt, 2001).

Robert K. Ernst und Kollegen zeigten, dass es in der Lunge von Patienten mit CF trotz massiver Infiltration mit neutrophilen Granulozyten nicht zur Abtötung der Bakterien kommt. Auf molekularer Ebene zeigte sich, dass das Lipid A der *P. aeruginosa*-Isolate von CF-Patienten vermehrt Palmitinsäure und Aminoarabinose enthielt (Ernst et al., 1999). Dies bewirkt eine Resistenz der Bakterien gegenüber kationischen, antimikrobiellen Peptiden und anderen Komponenten des angeborenen Immunsystems. Ferner resultiert aus der Veränderung des Lipid

A eine vermehrte Synthese von Interleukin 8, das als stärkster chemotaktischer Faktor für die Migration neutrophiler Granulozyten gilt. Beides zusammen unterhält die Entzündungsreaktion in der Lunge, ohne jedoch *P. aeruginosa* als Keim zu eradizieren (Ernst et al., 1999).

Im Rahmen der chronischen pulmonalen Infektion kommt es außerdem durch Mutation zum Verlust der äußeren Seitenketten der O-Antigene des LPS. Dadurch ändern die Bakterien ihr Erscheinungsbild von glatten (S-Formen oder “*smooth*”-Formen) zu rauen (R-Formen, “*rough*”-Formen). Glatte Formen der Bakterien wachsen in runden, spiegelnden Kolonien. Wenn das Lipopolysaccharid seine variable lange O-Seitenkette, und eventuell auch Teile des Kernpolysaccharides verliert, wachsen sie in flachen, unregelmäßigen Kolonien, und werden daher als Rauform bezeichnet (Hitchcock et al., 1986). Diese Änderung der Wachstumseigenschaften wird durch die Umgebungsbedingungen, wie den pH-Wert oder hohe Elektrolytkonzentrationen beeinflusst (McGroarty and Rivera, 1990).

Die variablen Seitenketten des LPS sind bei den glatten Formen eine wichtige antigene Determinante, die im Körper die Bildung von spezifischen Antikörpern induziert. Dies bedeutet, dass ein Stamm nur mit einem spezifischem Antiserum reagiert (Ojeniyi, 1994). Durch den Verlust der Seitenketten sind die Bakterien serumempfindlich und polyagglutinierbar, wodurch sie nicht mehr nur mit einem O-Antiserum reagieren, sondern mit mehreren (Ojeniyi, 1994). Interessanterweise sind CF-Patienten mit Besiedlung durch polyagglutinierbare Stämme von *P. aeruginosa* durch die Erkrankung stärker beeinträchtigt und haben eine signifikant höhere Letalität als Patienten mit monoagglutinierbaren Stämmen (Penketh et al., 1983; Hoiby and Rosendal, 1980).

1.5 Pulmonale Entzündungsreaktion

Es sind weitere Mechanismen bekannt, die für die Aufrechterhaltung der pulmonalen Entzündungsreaktion bei Patienten mit CF verantwortlich sind: Erstens das Ungleichgewicht von Proteasen und Antiproteasen mit dem Überwiegen proteolytischer Enzyme aus neutrophilen Granulozyten. Die freigesetzten Proteasen führen zu einer Schädigung der Surfactantproteine und beeinträchtigen dadurch möglicherweise zusätzlich die primäre Immunabwehr in der Lunge (Wiesener, 2002). Zweitens die Störung im Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien. Ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien bedingt einen vermehrten Anfall toxischer Sauerstoffmetabolite. Dies begünstigt

durch Zerstörung der Lungenstrukturproteine die Ausbildung von Bronchiektasen und fibrotischen Veränderungen (Dockter and Lindemann, 2000). Drittens die Freisetzung der DNS aus zugrunde gegangenen Zellen, die die Viskosität des Schleimes zusätzlich erhöht. Dieser zähe Schleim kann nur unzureichend durch die mukoziliäre und die Husten-Clearance aus der Lunge entfernt werden und stellt einen idealen Nährboden für Bakterien dar (Dockter and Lindemann, 2000). Letztendlich mündet die chronische Inflammation in der pulmonalen Insuffizienz, da sich die genannten Mechanismen gegenseitig im Sinne eines Circulus vitiosus verstärken und die Entzündungsreaktion und fortschreitende Destruktion des Lungengerüsts unterhalten (Dockter and Lindemann, 2000).

1.6 Mechanismen der primären Immunantwort

Die Immunantwort des Menschen lässt sich in die primäre angeborene und die sekundäre, erworbene Immunität unterteilen.

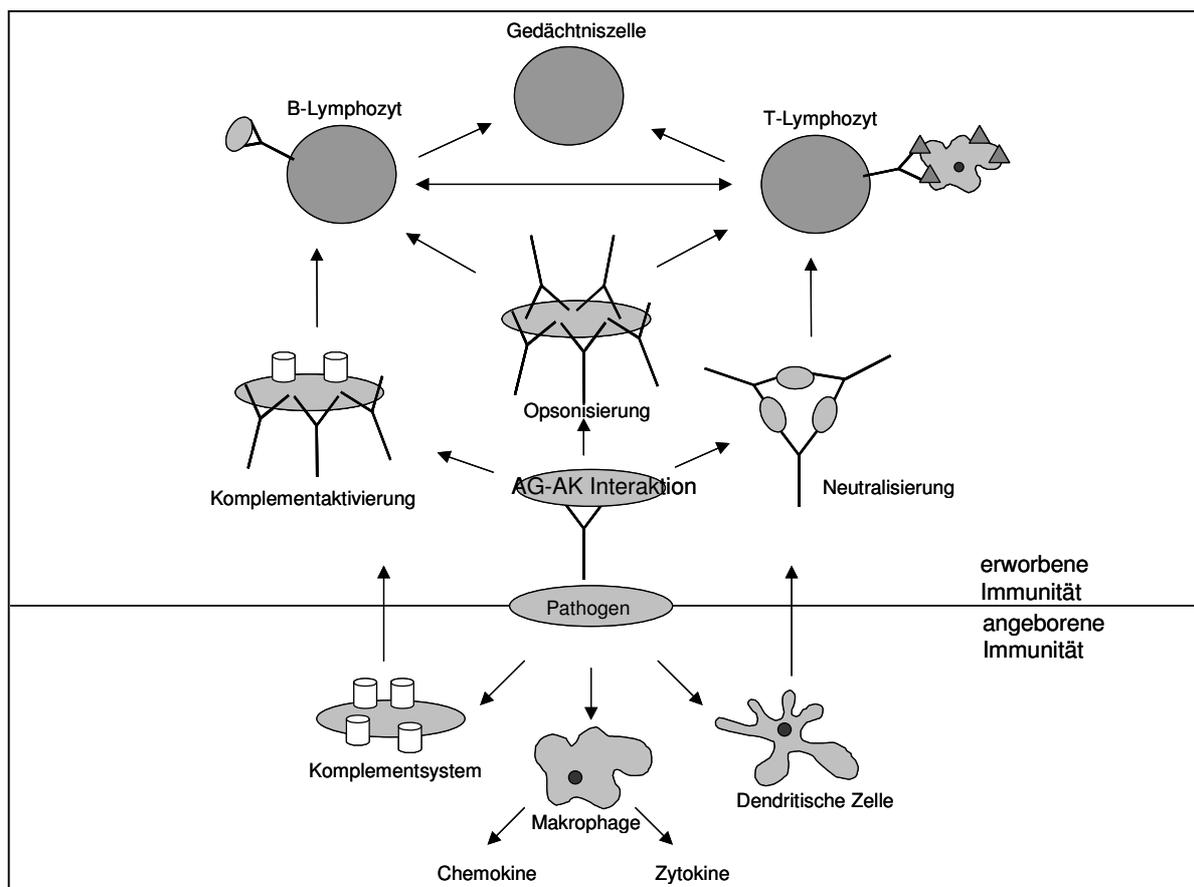


Abbildung 4: Abwehr eines Pathogens durch die angeborene und erworbene Immunität. Detaillierte Beschreibung im Text (Kap.1.6). Modifiziert nach Janeway und Travers und Crouch (Janeway et al., 2002; Crouch, 1998)

Die angeborene Immunität ist beim direkten Kontakt der Pathogene die erste Abwehrlinie des menschlichen Körpers, bis die spezifische erworbene Immunität aktiviert ist. Die erworbene Immunität umfasst die Bildung hochspezifischer Antikörpern durch B-Lymphozyten, die klonale Rekrutierung spezifischer T-Lymphozyten und die Ausbildung von Gedächtniszellen nach überstandener Infektion. Die gebildeten Antikörper binden die Pathogene und führen, wie in Abbildung 4 beschrieben, zur Komplementaktivierung und dadurch zur Neutralisierung der Pathogene, sowie zur Opsonisierung und der daraus folgenden vermehrten Aufnahme durch Phagozyten (Janeway et al., 2002; Roitt et al., 1995).

Makrophagen sind die Haupteffektorzellen der primären Immunantwort und eliminieren eingedrungene Erreger vor allem durch die Phagozytose. Sie kommen als langlebige Zellen der primären Immunantwort ortsständig in der Lunge vor und reifen kontinuierlich aus Monozyten heran (Janeway et al., 2002; Roitt et al., 1995).

Weitere zur Phagozytose befähigte Zellen sind polymorphkernige neutrophile Granulozyten. Sie sind kurzlebig und wandern nur bei Entzündung ins Gewebe ein. Bei der Phagozytose von Pathogenen entstehen Phagosomen, in welchen nach Verschmelzung mit Lysosomen die Krankheitserreger abgetötet werden. Außerdem erzeugen Phagozyten eine Reihe für Bakterien toxische Metabolite, z.B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Superoxidanion (O_2^-) und Stickstoffoxid (NO). Lysosomale Oxidasen und weitere Enzyme erzeugen diese im Vorgang der respiratorischen Entladung („respiratory burst“) (Janeway et al., 2002; Roitt et al., 1995).

Phagozyten haben die Fähigkeit Oberflächenstrukturen von Bakterien zu erkennen und nach Phagozytose Mediatoren freizusetzen. Zu diesen Mediatoren gehören Zytokine, die weitere Zellen der Immunantwort aktivieren und deren Einwanderung ins Entzündungsgebiet bewirken (Janeway et al., 2002; Roitt et al., 1995).

Als entscheidende Vermittler zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem wirken die dendritischen Zellen. Sie wandern nach Kontakt mit Bakterienbestandteilen in die Lymphknoten, fungieren dort als antigenpräsentierende Zellen und aktivieren über Zytokine die Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems (Janeway et al., 2002; Roitt et al., 1995).

Das Komplementsystem ist ein weiterer Bestandteil der angeborenen Immunantwort. Seine Hauptaufgabe ist die Vermittlung der Zellyse. Es kann über Anlagerung an Bakterien diese auch opsonisieren, d.h. über seine Bindung die Aufnahme von Bakterien durch Phagozyten erleichtern. Die Komplementkomponente C1q gehört aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit wie auch die Surfactantproteine zur Familie der Kollektine (Janeway and Travers, 1997; Roitt et al., 1995). Daher werden den Surfactantproteinen ebenfalls opsonisierende Eigenschaften zugeschrieben.

Wichtige Zytokine, die von Makrophagen sezerniert werden, sind der Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukin 1 (IL-1) und Interleukin 6 (IL-6), die für lokale und systemische Effekte verantwortlich sind. Die durch Bakterien induzierte Sekretion von TNF α ist bei der akuten Infektion wünschenswert, um Makrophagen zu aktivieren und die NO-Produktion anzuregen (Janeway and Travers, 1997). Durch eine Überproduktion kann es jedoch zu einer Zerstörung des umgebenden Gewebes kommen. Es ist bekannt, dass TNF α eine Rolle bei der Entstehung der Sepsis, des ARDS, der hämorrhagischen Nekrose von Tumoren und der Entzündungsreaktion bei rheumatischen Erkrankungen spielt (Tracey et al., 1988; Moo et al., 2001; Asher et al., 1987). Außerdem beeinflusst es Zellen wie Fibroblasten und Endothelzellen (Munker et al., 1986). Es induziert z.B. in der Lunge eine vermehrte Durchlässigkeit der Endothelzellen (Coyne et al., 2002; Ferro et al., 1997; Gamble et al., 1985). Durch weitere Beeinflussung von Eosinophilen, T- und B-Zellen leitet TNF α die spezifische Immunantwort ein (Ghiara et al., 1987). Speziell die Tatsache der chronischen Besiedlung der CF-Lunge mit *P. aeruginosa*, und die fehlende Eliminierung der Erreger, mit ihren Veränderungen zu mukoiden Typen und dem Verlust der R-Seitenketten, stellt einen andauernden Reiz zur Ausschüttung von TNF α dar. Daher untersuchten wir in unserer Studie die Beeinflussung der TNF α -Ausschüttung monozytärer Zellen durch pulmonales Surfactant.

1.7 Modulation der Immunantwort durch SP-A und SP-D

Die Interaktion der pulmonalen Kollektine SP-A und SP-D mit Mikroorganismen und Makrophagen führt großteils zu einer Steigerung der Abwehrleistung der Makrophagen durch vermehrte Opsonisierung und gesteigerte Phagozytose (Pikaar et al., 1995; Hartshorn et al., 1998; Mariencheck et al., 1999; Restrepo et al., 1999; Tino and Wright, 1996; Madan et al., 1997a). In wenigen Fällen bewirken sie jedoch das Gegenteil und führen zu einer reduzierten Phagozytoseleistung (Kozziel et al., 1998; Madan et al., 1997b). Durch Aktivierung der

Makrophagen bewirken die Surfactantproteine eine erhöhte NO-Produktion, initiieren die „respiratory burst“-Antwort in den Makrophagen und führen zu vermehrter Chemotaxis der Leukozyten (Wright et al., 1999; Hickman-Davis et al., 2001; van Golde, 1995; Korfhagen, 2001). Dafür ist die Interaktion mit zellständigen Rezeptoren notwendig. Die Bindung an Immunzellen erfolgt über spezifische Rezeptoren. Diese wurden zunächst für SP-A charakterisiert (Tenner, 1999; Crouch, 1998; Oosting and Wright, 1994; Pison et al., 1992). Es gibt für SP-A mehr als einen Rezeptortypen und ebenfalls verschiedene Arten der Rezeptorbindung, die einerseits über die Bindung an die Kohlenhydratregion und andererseits über die Kollagendomäne der Kollektine stattfindet (Pison et al., 1992; Ohmer-Schrock et al., 1995). In den letzten Jahren fand man auch einen spezifischen Rezeptor für SP-D auf Makrophagen (Holmskov et al., 1997; Hartshorn et al., 2003). In Studien war diese Bindung kalziumabhängig und daher wurde angenommen dass sie über die Kohlenhydratdomäne vermittelt wird (Holmskov et al., 1997). Es wird jedoch vermutet, dass es zusätzlich eine kalziumunabhängige Bindung an einen weiteren Rezeptor auf Makrophagen gibt (Miyamura et al., 1994). Für beide Surfactantproteine geht man also von lektinabhängigen und -unabhängigen Mechanismen der Bindung an Immunzellen aus.

SP-A und SP-D binden über die Lektindomäne an definierte Zuckermoleküle von Pathogenen (siehe Punkt 1.1.3). Über die auch bei der Taufliege *Drosophila* bekannten Toll-Like-Rezeptoren präsentiert SP-A die Pathogene an immune Effektorzellen (Guillot et al., 2002). Als Signalmoleküle in der Zellwand der Makrophagen initiieren sie zusammen mit CD14, dem Rezeptor für LPS, bei Kontakt mit Peptidoglykanen (Toll-like-Rezeptor 2) oder LPS (Toll-like-Rezeptor 4), die Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade und damit die Zytokinausschüttung (Guillot et al., 2002; Murakami et al., 2002).

Es gibt über die Modulation der Zytokinausschüttung von Makrophagen durch Interaktion der Kollektine mit vitalen Bakterien oder deren LPS gegensätzliche Aussagen. SP-A zeigte hemmende Effekte bei Stimulation von peripheren mononukleären Blutzellen durch *P. aeruginosa* (Hickling et al., 1998), bei Alveolarmakrophagen durch „smooth“ *E. coli*-LPS (McIntosh et al., 1996), bei Alveolarmakrophagen und Monozyten durch *Candida albicans* (Rosseau et al., 1999) und bei U937 (Makrophagenähnliche Zelllinie) durch „smooth“ LPS von *E. coli* (Sano et al., 1999). Murakami S. und Kollegen stellten fest, dass für die Hemmung der TNF α -Sekretion durch SP-A eine direkte Interaktion von SP-A mit Toll-like-Rezeptor 2 notwendig ist (Murakami et al., 2002). Toll-like-Rezeptor 2 bindet normalerweise an

Peptidoglykan, einen Bestandteil der Zellwand grampositiver Bakterien, und löst dadurch eine erhöhte Ausschüttung von TNF α aus. Durch kompetitive Bindung von SP-A an Toll-like-Rezeptor 2 wird möglicherweise die Entzündungsreaktion gehemmt.

“*Knockout*” Mäuse, denen das SP-A Gen fehlt, zeigten eine signifikant vermehrte Produktion von TNF α in der Lunge, nachdem intratracheal „*smooth*“ LPS von *E. coli* appliziert wurde (Borron et al., 2000). SP-A “*knockout*” Mäuse sind außerdem anfälliger für Infektionen mit *P. aeruginosa*, wobei der genaue Pathomechanismus noch nicht geklärt wurde (LeVine et al., 1998). Harrod K.S. und Kollegen zeigten erhöhte Werte für TNF α und weitere Zytokine in SP-A defizienten Mäusen, die mit dem *Adenovirus* infiziert waren (Harrod et al., 1999). Dies weist darauf hin, dass SP-A eine wichtige Rolle in der Elimination der pulmonalen Erreger einnimmt und die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie TNF α hemmt.

Im Gegensatz zu den inhibierenden Effekten des SP-A auf die Immunantwort zeigten Phelps und Mitarbeiter, daß SP-A die Zelllinie THP-1 ohne Zugabe von LPS stimuliert (Kremlev et al., 1997; Kremlev and Phelps, 1994). SP-A hat somit in den verschiedenen Versuchen, die mit unterschiedlichen Zelllinien und Pathogenen durchgeführt wurden teils stimulierenden und teils hemmenden Einfluß auf die Zytokinausschüttung.

Zu SP-D gibt es bezüglich der Beeinflussung der Zytokinausschüttung nur wenig Ergebnisse. Daher war dieses Surfactantprotein von besonderem Interesse für uns. Neuere Studien bestätigen unsere Ergebnisse, dass SP-D sehr wohl eine immunmodulierende Funktion besitzt. Liu und Kollegen zeigten in Ihrer Studie, dass SP-D ähnlich wie Budesonid in der allergischen Entzündungsreaktion der Lunge die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie TNF α reduziert (Liu et al., 2005).

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Labormaterial

Die Reagenzien für die Kultur der Zellen stammen, wenn nicht anders aufgeführt, von Seromed/Biochrom KG, Berlin. Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von Merck KG, Darmstadt, bezogen. Die Kulturflaschen für die Fibroblastenzellen (Gewebekulturflasche Cellstar steril, 250 ml und 50 ml) wurden von Greiner Labortechnik (Greiner GmbH, Frickenhaus) bezogen, die 24-well Platten zur Kultur der lymphomonozytären Zelllinien (Costar 3524 , 24 well cell culture cluster) von der Firma Costar (Costar Corning Incorporated, Corning, NY, USA).

2.2 Zellen und Gewebekultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in der folgenden Tabelle 1 aufgelistet:

Zellbezeichnung	Ursprung
A9	Murine Fibroblastenzelllinie
THP-1	Humane Zelllinie, akute monozytäre Leukämie (ATCC, TIB 202)
U937	Humane Zelllinie, histiozytäres Lymphom (ATCC CRL-1593.2)
MM6	Humane Zelllinie, akute monozytäre Leukämie (Prof. Dr. H.-L.Ziegler-Heitbrock, Institut für Immunologie, LMU München, Deutschland)

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Zelllinien für die Stimulationsexperimente

Die lymphomonozytären Zelllinien MM6, THP-1 und U937 wurden in LPS-armen Medium (VLE RPMI 1640 Medium, FG 1415) mit 10% hitzeinaktiviertem, fötalem Kälberserum (FBS, low endotoxin, S 0115), 1% Penicillin/Streptomycin (Penicillin/Streptomycin 10000U/10000µg/ml), 1% nichtessentielle Aminosäuren (100mM, K0293), 1% N-acetyl-L-alanyl-L-glutamin (200mM, K0202) und 1% OPI Media Supplement (Sigma, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) kultiviert. Vor Zugabe von FBS wurde das Kulturmedium zur Eliminierung von LPS ultrafiltriert (Gambro Ultrafilter U 2000, Gambro Dialysatoren GmbH & Co KG, Hechingen).

Alle Zellen wurden in einem Kulturschrank (Heraeus Instruments GmbH, Hanau) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37°C kultiviert. Nach ca. 48-72 Stunden wurden die Zellen geerntet und in einer Konzentration von 0,2x10⁶/ml (lymphomonozytäre Zellen), bzw. 0,1x10⁶/ml (Fibroblasten) weiter kultiviert.

Vor den Stimulationsexperimenten wurden MM6- und THP1-Zellen jeweils 48-72 Stunden mit 1 α ,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ (Vitamin D₃) (Calcitriol, Biomol GmbH, Hamburg) in einer Endkonzentration von 10⁻⁷M behandelt, um eine monozytäre Differenzierung zu induzieren (Frankenberger et al., 1997; Vey et al., 1992; Tsukamoto et al., 1992). Die U937-Zellen wurden zur monozytären Differenzierung in einer Konzentration von 0,3x10⁶ Zellen/ml für 24 Stunden mit Phorbol 12-myristat13-acetat (PMA) (10 nM) behandelt.

Die Kultur der murinen Fibroblasten erfolgte in RPMI 1640 Medium unter Zugabe von 5% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Natriumpyruvat (Sodiumpyruvate 100mM, L 0473), 1% N-acetyl-L-alanyl-L-glutamin in 5% CO₂ haltiger Atmosphäre bei 37°C. Vor Beginn der Experimente wurden die verwendeten Zelllinien expandiert, um Aliquots der Zellen bei -60°C bis -80°C zu konservieren (Nunc Basic Gefrierschrank (-80°C) und Cora UF 85-460T Gefrierschrank (-60°C)). Die Zellen wurden dazu in 10% Dimethylsulphoxid (Hybri Max, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) und fötalem Kälberserum in einer Konzentration von 1x10⁷ Zellen/ml eingefroren (Cryo S-sterile Röhrchen, 2ml, Greiner GmbH, Frickenhaus). Nach jeweils 10-15 Passagen wurden Aliquots der eingefrorenen Zellen aufgetaut und für die weiteren Experimente verwendet.

2.3 Stimulation von MonoMac 6-Zellen

MM6-Zellen wurden vor Beginn der Stimulationsexperimente für 48-72 Stunden mit Vitamin D₃ inkubiert, um eine monozytäre Differenzierung zu induzieren (Frankenberger et al., 1997). Die Differenzierung bewirkte bei Stimulation mit *Salmonella minnesota* im Vergleich zu nicht differenzierten Zellen eine gesteigerte (2,3-fach) TNF α -Sekretion. Daher verwendeten wir Vitamin D₃ um eine monozytäre Differenzierung und damit erhöhte TNF α -Sekretion zu erreichen (Frankenberger et al., 1997).

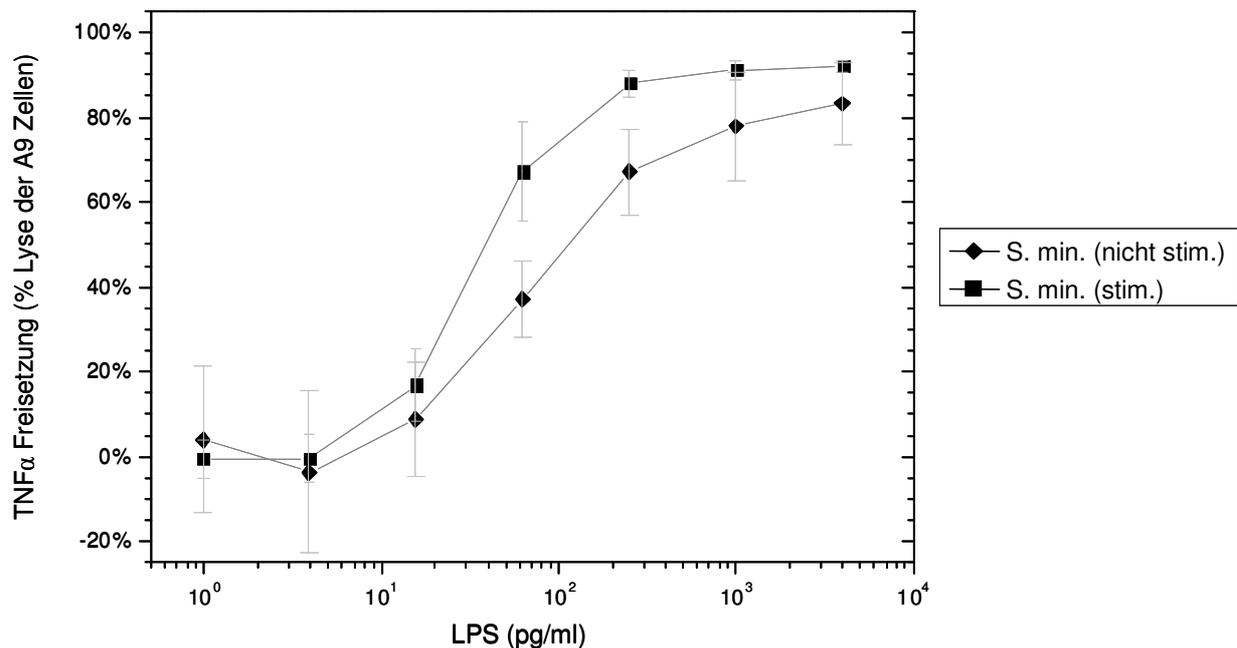


Abbildung 5: Stimulation ausdifferenzierter (mit Vitamin D3) und nativer MM6-Zellen mit LPS von *Salmonella minnesota*. MM6-Zellen (1×10^6 Zellen/ml) wurden mit Vit. D3 ausdifferenziert und mit ansteigender Menge von LPS stimuliert um die für die Versuche benötigte optimal stimulierende Konzentration zu bestimmen. Nach 8 Stunden wurde die TNF α -Konzentration im Überstand der Zellen bestimmt und in Prozent der Kontrolle (ohne Stimulation) angegeben. Die dargestellten Werte sind der Mittelwert vier unabhängiger Experimente.

Für jedes Experiment wurden die MM6-Zellen nach einmaligem Waschen mit Zellkultur-Medium in einer Konzentration von 1×10^6 /ml in 96-well Platten (60-100 μ l/well) (Gewebekulturplatte 96 K, U-Form, steril, Greiner Labortechnik, Greiner GmbH, Frickenhaus, Deutschland) ausgesät. Bei den Experimenten mit SP-D, das in 10 mM EDTA gelöst ist, wurde das Kulturmedium zusätzlich mit Kalzium versetzt, um eine Konzentration von 2 mM freiem, ionisierten Kalzium zu erhalten. Zu Beginn des Experiments wurde der Zellsuspension SP-A, SP-D, TBS, Alveofact[®] oder nur Medium zugefügt. Nach einer kurzen Vorinkubation mit SP-A, SP-D, bzw. Alveofact[®] für 15-30 Minuten wurde die LPS- oder Bakteriensuspension in der gewünschten Konzentration dazugegeben, so dass die Endkonzentration der Zellen nun $0,5 \times 10^6$ /ml in einem Volumen von 120 μ l betrug. Die Zellen wurden 6-8 Stunden stimuliert und anschließend bei 2000rpm für 15 min bei 21°C zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80°C eingefroren oder direkt im Anschluß der Gehalt an TNF α bestimmt.

Die weiteren in den Pilotexperimenten verwendeten Zelllinien (THP-1 und U937) wurden gemäß den gängigen Protokollen kultiviert.

2.4 Bestimmung der Tumornekrosefaktor α -Aktivität

Die Aktivität von TNF α im Zellkulturüberstand stimulierter MM6-Zellen wurde mittels Zytotoxizitätsassay (CTX) bestimmt. Für diesen Assay wurde die murine Fibroblasten-Zelllinie A9 verwendet. Vor Beginn der TNF α -Bestimmung wurden A9 Zellen über Nacht in einer Konzentration von $0,2-0,3 \times 10^6$ in einer 96-well Gewebekultur-Platte kultiviert. Dann wurde der Überstand dekantiert und 50 μ l Cycloheximid (CHX) (Fa. Sigma, C6679, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), in einer Konzentration von 50 μ g/ml RPMI Medium dazugegeben.

Der Überstand der stimulierten MM6-Zellen wurde wie angegeben verdünnt und in einem Volumen von 50 μ l auf die A9-Zellen gegeben. Parallel wurde eine TNF α -Standardverdünnung der Konzentrationen von 50 bis 0,012 TNF α U/ml absteigend aufgetragen. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen mit Neutralrot (Neutral Red Solution, Lot 50K2313, Sigma Cell Culture, Sigma Chemical Co; St. Louis, MO, USA) angefärbt. Dazu wurde der Überstand der Zellen dekantiert und Neutralrot in einer Verdünnung von 1:50 in RPMI Kulturmedium, dazugegeben. Nach 1-2 Stunden hatten die noch vitalen Zellen den Farbstoff aufgenommen. Nach Abschluß dieser Inkubationszeit wurde das Medium mit Neutralrot dekantiert und die festhaftenden Zellen dreimal mit 150 μ l eiskaltem PBS++ (17,9mM KH₂PO₄, 75mM NaCl, 56,9mM Na₂HPO₄, pH 7,0-7,5, CaCl 0,5mM, MgCl 0,25mM) gewaschen. Anschließend wurde der Farbstoff mit Sörensen-Citratpuffer (0,1M Na₂HH₅C₃OH(COOH)₃, 0,1N HCl, pH 4,2, 1:1 mit 95% Ethanol p.a. verdünnt) in Lösung gebracht. Nach 15 Minuten leichtem Schütteln (S/P Multi-Tube Vortexer, Baxter Scientific Products, Baxter Diagnostics Incorporated, Deerfield, IL, USA) wurde die Absorption bei 540 nm im BIOLISE Reader (Anthos htIII, anthos labtech Instruments, Salzburg, Österreich) bestimmt und durch Vergleich mit der TNF α -Standardkurve der Gehalt an TNF α berechnet.

2.5 Surfactant Protein A und D

Humanes rekombinantes SP-D wurde in chinesischen Hamster-Ovar-Zellen (CHO-K1) produziert und freundlicherweise von Frau Prof. E. Crouch (Department of Pathology, Washington University, School of Medicine, St. Louis, Missouri) zur Verfügung gestellt. Der LPS-Gehalt in diesen SP-D-Präparationen betrug zwischen 0,051-0,32 ngLPS/ μ gSP-D (SP-D in Lösung 93-100 μ g/ml). Natürliches humanes SP-D wurde in unserem Labor nach beschriebenem Protokoll aus der bronchoalveolären Lavage (BAL) von Patienten mit alveolärer

Proteinose (Strong et al., 1998) chromatographisch aufgereinigt (Äkta Purifier, Amersham Biosciences, Freiburg). Der LPS-Gehalt in diesen SP-D-Präparationen lag zwischen 0,005 ngLPS/ μ gSP-D und 0,023 ngLPS/ μ g SP-D (SP-D in Lösung 71,2-199 μ g/ml). Diese Konzentration zeigte keinen Einfluss auf die Baseline-TNF α -Ausschüttung der Zelllinien.

SP-A, welches rekombinant in CHO-Zellen hergestellt wurde, wurde freundlicherweise von W. Steinhilber (Byk Gulden, Konstanz, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Der LPS-Gehalt war mit 0,024 ngLPS/ μ g SP-A gering. Diese geringe Menge LPS zeigte in unseren Experimenten keinen stimulierenden Effekt (vgl. Abbildung 14: in den Konzentrationen von 1×10^1 - 1×10^3 pg LPS/ml zeigt sich kein Effekt auf die MM6-Stimulation). Aus der BAL von Patienten mit alveolärer Proteinose isoliertes natives SP-A wurde freundlicherweise von Prof. H. P. Haagsman (Departement of Biochemistry, Cell Biology and Histology and Graduate School of Animal Health, University Medical Center Utrecht, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Die Kontamination betrug im LPS-Assay 0,0016 ngLPS/ μ g SP-A. Diese Konzentration zeigte keinen Einfluss auf die Baseline-TNF α -Ausschüttung der Zelllinien.

2.6 Bakterienkultur

Alle in dieser Studie verwendeten Bakterienstämme wurden von Patienten mit CF isoliert und freundlicherweise von Herrn Prof. A. Bauernfeind (Max von Pettenkofer Institut, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt. Alle Stämme von *P. aeruginosa* wurden unter Verwendung spezifischer Antiseren bezüglich des Pyocin- und O-Serotyps charakterisiert. Die Typisierung nach der Alginat-/Mukusproduktion erfolgte durch makroskopische Beurteilung der Kulturen.

Von sämtlichen Bakterien wurden Kulturen auf Schrägagar (Nutrient Agar Slant, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) angelegt, die bei -60°C konserviert wurden. Von den eingefrorenen Kulturen wurden Agarplatten in Petrischalen (Greiner Labortechnik GmbH, Kremsmünster, Österreich) beimpft, die über 24 bis 48 Stunden bei 37°C im Bakterienkulturschrank (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) auf tryptischen Soja-Agar (Tryptic Soy Agar, Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) kultiviert wurden. Von diesen Kulturen wurde jeweils eine weitere Agarplatte beimpft und über Nacht bei 37°C bebrütet. Anschließend wurden die Bakterien durch Abschaben von der Agarplatte geerntet und in sterilem Wasser (Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen,

Deutschland)) resuspendiert. Nach kräftigem Aufschütteln (Vortex Genie 2 TM, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) der Suspension wurde bei 623 nm unter Hinzugabe von H₂O eine optische Dichte (OD_{623nm}) von 0,5 eingestellt. Diese optische Dichte entspricht einer Konzentration von 5x10⁸ Kolonie-bildenden Einheiten (CFU/ml). Die Bakteriendichte wurde durch Ausstreichen limitierter Verdünnungen der Suspensionen und Auszählung der Einzelkulturen bestätigt. Die entsprechenden Suspensionen wurden für die Stimulationsversuche mit vitalen Bakterien verwendet.

2.7 Agglutination der Bakterien

Die Agglutination durch SP-A oder SP-D wurde nach der Inkubation von gleichen Mengen der Bakteriensuspension (10⁹ CFU/ml (OD_{623nm} =1)) in TBS (Tris gepufferte Salzlösung; 150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl in Aqua bidest., pH 7,5) mit 2 mM CaCl₂ und SP-A oder SP-D (5-10 µg/ml) lichtmikroskopisch untersucht. Mikroskopische Agglutination wurde als Agglutination von fünf oder mehr Bakterien unter der 400-fachen Vergrößerung beschrieben, makroskopische Agglutination wurde als die ohne Mikroskop sichtbare Agglutination definiert. Es wurde jeweils ein Vergleich mit nativen Proben durchgeführt, um eine spontane Agglutinationsreaktion der Bakterien auszuschließen.

2.8 Präparation von Lipopolysaccharid

Für die Präparation von LPS aus „smooth“ *P. aeruginosa* wurden jeweils 10-20 Agarplatten (tryptischer Soja-Agar) von der Primärkulturplatte beimpft. Diese wurden dann wie im Folgenden beschrieben in tryptischer Soja-Brühe (Herstellerangaben siehe tryptischer Soja-Agar) in Suspension angezüchtet. Zur Herstellung der „rough“ LPS-Präparationen wurden die Stämme nur auf tryptischem Soja-Agar ausgestrichen und vermehrt (pro Stamm 10-20 Platten). Die Kultivierung in Soja-Brühe war nicht notwendig.

2.8.1 Präparation von rauem LPS

Die LPS-Extraktion für raues LPS wurde nach O. Westphal durchgeführt (Galanos et al., 1969). Zu Beginn wurden die von den Agarplatten geernteten Bakterien mit Aqua ad iniectabilia gewaschen, dann mit Ethanol, Aceton (Merck, Darmstadt) und zweimal mit Ether (Diethylether purum pH. Eur. >99%, Fluka) behandelt, um aus der wässrigen Lösung die

Polysaccharid/Nukleinsäure-Fraktion herauszulösen. Um vor der folgenden Extraktion freies Wasser zu entfernen, wurden sie in einem luftdicht verschlossenen Gefäß, unter Zugabe von Trockenperlen (KC-Trockenperlen blau, Kraemer & Martin GmbH, St. Augustin, Deutschland), über Nacht getrocknet. Zur LPS-Extraktion aus dieser Fraktion wurde eine Phenol-Wasser-Mischung (90g trockenes Phenol und 11 ml Wasser), Chloroform (Baker Chemikalien, Groß-Gerau, Deutschland) und Petroleumether (Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) im Verhältnis ihres Volumens 2:5:8 gemischt. Die getrockneten Bakterien wurden mit 30-40 ml des Gemisches extrahiert. Nach kräftigem Rühren wurde die Suspension anschließend im Ultraschallbad (Ultraschallbad, Bandelin Sonorex RK 100, Bandelin electronic, Berlin, Deutschland) für 2 min auf Eis homogenisiert. Danach wurden die Bakterien bei 5000 rpm für 15 min zentrifugiert, um die übrigen Zellbestandteile zu entfernen (Heraeus Sepatech Megafuge 1.0R, Heraeus Instruments GmbH, München, Deutschland). Daraufhin folgte die Filtration des Überstandes über Assistent Rundfilter-Filterpapier (No. 1255/12, 125 mm Durchmesser, Assistent Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland). Das Zell-Pellet wurde erneut mit dem Extraktionsgemisch behandelt. Aus der Lösung wurde Petroleumether und Chloroform über einen Rotationsverdampfer (Büchi Rotavapor R114, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz) im Wasserbad (Büchi Wasserbad B480) bei 30-40°C verdampft. Das raue LPS wurde dadurch in der Phenolphase angereichert (Galanos et al., 1969). Zur Isolierung des rauen LPS wurde das Phenolgemisch in ein Glas-Zentrifugenröhrchen (Zentrifugenglas mit Spitzboden, Duran-Glas mit Schott-Kappe und Teflondichtung) transferiert, und auf Eis gekühlt, tropfenweise Wasser bis zum Präzipitieren der Lösung zugefügt. Die präzipitierten Lipopolysaccharide wurden bei 3000 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die verbleibende Flüssigkeit durch Abtropfen entfernt. Anschließend wurde das Präzipitat insgesamt dreimal mit 80% Phenol gewaschen. Daraufhin wurde das präzipitierte LPS nochmals dreimal mit Ether gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet. Nach erneutem Aufnehmen in destilliertem Wasser (45°C) wurde die Lösung bei 100000 g für 4 Stunden zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das abzentrifugierte und präzipitierte LPS-Pellet wurde zuletzt in sterilem Aqua aufgelöst und gefriergetrocknet (Speed Vac Concentrator, (Savant Instruments, Inc. Farmingdale, NY, USA) mit Vakuumpumpe Wkf L05 (Vacuubrand GmbH & Co, Wertheim, Main, Deutschland)). Von jeder LPS-Präparation wurde eine Suspension mit einer Konzentration von 1 mg/ml H₂O eingewogen (Analysenwaage, Sartorius R-200, Göttingen, Deutschland) und bei 4°C gelagert.

2.8.2 Präparation von glattem LPS

Glattes, „smooth“ LPS wurde ebenfalls nach der Methode von O. Westphal isoliert. Dazu wurden die Bakterienstämme auf tryptischem Soja-Agar ausgestrichen und bei 35°C für 24 Stunden bebrütet (Westphal et al., 1952). Für die Vorkultur wurden 300 ml tryptische Soja-Brühe mit dem entsprechenden *P. aeruginosa*-Stamm beimpft und auf eine optische Dichte von 0,8 eingestellt (Photometer Eppendorf 1101M, Eppendorf Gerätebau, Netheler + Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland). Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 35°C und 180 rpm im Wasserbad (GFL 1083, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland) über 10 Stunden geschüttelt. Pro Stamm wurde eine Gesamtmenge von 1-3 l tryptischer Soja-Brühe benötigt, um die notwendige Menge für die Isolierung zu erhalten. Die Vorkultur wurde auf je einen Liter (OD 1,00) verteilt und erneut bei 35°C im Wasserbad bei 180 rpm für 16 Stunden geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien bei 9000 rpm über 20 min bei 10°C zentrifugiert und das Feuchtgewicht des Pellets bestimmt. Das Pellet von ca. 2 g Feuchtgewicht wurde in sterilem Aqua ad iniectabilia resuspendiert (1 ml Aqua pro 0,2 g Feuchtgewicht). Daraufhin wurde die Phenolextraktion bei 68°C im Wasserbad mit gleicher Menge an vorher auf 68°C erhitzten 90% Phenol (in Wasser) unter laufendem Schütteln für 1 Stunde durchgeführt. Dadurch liessen sich die Bakterien rascher aufschließen, und ein großer Teil des LPS ging in Lösung. Anschließend wurde das Extraktionsgemisch für weitere 5 min bei 68°C ohne Schütteln inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis bei 15°C, was zu einer besseren Trennung der Schichten führte, wurde die Suspension bei 3000 rpm für 60 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, in der sich bei glatten Bakterienstämmen vor allem LPS und Nukleinsäuren befinden, wurde abpipettiert und intensiv gegen Aqua dest. über 3 Tage dialysiert (Spectra/Por Dialyseschlauch, MWCO 100, Spectrum Laboratories Incorporated, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland). Zum Ausfällen der Nukleinsäuren wurde 6% Cetyltrimethylammoniumbromid (16530, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) zugesetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 30 minütigem Zentrifugieren bei 8000 rpm wurde der Überstand auf eine Endkonzentration von 1M NaCl gebracht und mit dem 10-fachen Volumen 96 % Ethanol über weitere 3 Tage im Kühlschrank ausgefällt. Nach erneuter Zentrifugation der Lösung bei 10000 rpm über 30 min wurde der Überstand dekantiert und das Sediment nochmals in 1M NaCl aufgenommen und mit 96% Ethanol ausgefällt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 10000 rpm für 45 min wurde das übrige Sediment in 7,5ml 1M NaCl aufgenommen und nochmals 12 Stunden gegen Aqua dest. dialysiert um NaCl aus der Lösung

zu entfernen. Das Dialysat wurde gefriergetrocknet und das isolierte „smooth“ LPS in einer Konzentration von 1 mg/ml H₂O eingewogen.

Die erhaltenen LPS-Präparationen waren möglicherweise mit Nukleinsäuren (DNS) kontaminiert, die Zellen unspezifisch stimulieren können. Wir bestimmten deshalb photometrisch den Gehalt an DNS in den LPS-Präparationen. Dazu wurde das LPS 1:100 in Aqua ad iniectabilia (Endvolumen 1 ml) verdünnt und die optische Dichte in einer Quarzküvette bei 260 nm gemessen. Der Nullabgleich wurde mit H₂O durchgeführt. Die Konzentration der DNS-Menge wurde mit folgender Formel bestimmt: $C \text{ (}\mu\text{g/ml)} = A \cdot 260/0,02$. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 auf Seite 37 abgebildet.

2.9 Quantifizierung von Lipopolysaccharid

Zur Bestimmung des Endotoxingehalts in unseren LPS-Präparationen wurde der Limulus Assay verwendet. Endotoxin bewirkt die Aktivierung eines Proenzym im Limulus Amebozyten Lysat. Das dadurch aktivierte Enzym spaltet p-Nitroanilin aus dem farblosen Substrat Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA. Im QCL 1000 Kit der Firma Bio-Whittaker (Walkersville, Md, USA) wird diese Reaktion durch Zugabe eines Stopreagenz angehalten und im Kinetischen QCL-Kit die Entwicklung des p-Nitroanilin über einen bestimmten Zeitraum, mit einem vorgegebenen Endpunkt, gemessen. Hierfür wurde die kinetische Messung verwendet, da sie genauere Ergebnisse über einen größeren Bereich (0,005 EU/ml bis 50 EU/ml (= 0,5 pg/ml - 5 ng/ml)) an Endotoxingehalt ermöglichte.

Um eine hemmende Wirkung evtl. vorhandener Proteine auf den Test zu vermeiden wurden die Proben vor Beginn des Assays bei 70°C zehn Minuten erhitzt und daraufhin auf Eis abgekühlt. Dann wurden die zu messenden Proben nach Schätzung des enthaltenen Endotoxin auf einen Gehalt von ~1 EU/ml eingestellt. Das Standard Endotoxin wurde aufgelöst und auf die Konzentrationen 50/5/0,5/0,05/0,005/0 EU verdünnt. Vom Standard und den Proben wurden jeweils 100 µl auf die 96-well-Form mit glattem Boden gegeben. Pro Probe wurden vier Vertiefungen belegt, zwei davon als Positivkontrolle. Zu diesen wurden als Spike 10 µl des 5 EU-Standard dazugegeben (Spike-Konzentration 0,5 EU/ml).

Die Platte wurde für 10 Minuten bei 37°C inkubiert (Wärmeplatten, Sanofi Pasteur IPS). Kurz vor Ablauf der Inkubationszeit wurde die entsprechende Anzahl der Kinetischen QCL

Lysat/Substrat Fläschchen mit 2,6 ml LAL-Reagent Wasser aufgelöst und vorsichtig gemischt. Mit einer Multipipette wurde darauf die Lysat-/Substrat-Lösung in alle Vertiefungen pipettiert und die kinetische Messung bei 405 nm durchgeführt. Gemessen wurde bei 37°C für ca. 90 min bei einem Messintervall von 150 sec. Endpunkt war das Erreichen einer Extinktion von 0,2 (entspricht der Reaktionszeit). Bei den vorgegebenen Konzentrationen des Endotoxinstandards aus *E. coli* O55:B5 (Bio Whittaker, Walkersville, Md, USA) konnte aus der Reaktionszeit eine Standardkurve berechnet und somit die Konzentration des Endotoxin in den Proben bestimmt werden. Für diesen Test wurde nur pyrogenfreies Material verwendet.

2.10 Gelelektrophorese

Um die verschiedenen charakteristischen Eigenschaften der LPS darzustellen, wurden sie in der Gelelektrophorese aufgetrennt. Die verwendeten Puffer wurden von der Firma Novex (Novex Electrophoresis GmbH, Frankfurt am Main) bezogen. Als Laufpuffer wurde MES (2-Morpholinoethan-Sulfonsäure-Monohydrat)/ SDS (Sodiumdodecylsulfat) Puffer verwendet. Während der Vorbereitung der Proben wurde das Wasserbad auf 70°C vorgeheizt. Von den LPS-Präparationen wurden für das denaturierte, reduzierte Gel 3 µl in 20 µl reduzierendem Puffer (10x red. Agent 10%, 4x Sample Buffer LDS 25%, Aqua dest. 65%) resuspendiert. Für das native Gel wurden 3 µl der Probe zu 20 µl des nicht reduzierenden Puffers hinzugefügt. Zur Denaturierung wurden die Proben für das denaturierte reduzierte Gel im Wasserbad bei 70°C für 15 min inkubiert. Die Gele (10x, 1mm, NuPage Gel, 10% BisTris Gel) wurden nach Herstellerangaben in die Gelapparatur eingebaut. MES Puffer wurde in das mittlere Fach gefüllt, so dass es die Kammern und das Plastik bedeckte. Auch die äußere Kammer wurde zur Kühlung mit MES-Puffer gefüllt. Nach dem Herausziehen der Kämme wurde der Laufpuffer mit einer Eppendorf Pipette über die Kammern gegeben sowie von den Proben (je 20 µl)/ 15 µl und vom Marker 7 µl dazugegeben. Vor Starten des NuPage-Gels (NOVEX, San Diego, CA, USA) wurden noch 500 µl des Antioxidans in den Laufpuffer gegeben.

2.11 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse wurde das Programm Prism 3.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) verwendet. Die Feststellung der Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte durch die Varianzanalyse (ANOVA). Mit diesem Test wird die Hypothese überprüft, dass Mittelwerte von zwei oder mehreren (aus Grundgesamtheiten mit demselben Mittelwert gezogene) Stichproben identisch sind. Zum nachfolgenden Vergleich der gepaarten Mittelwerte untereinander wurde der modifizierte t-Test nach Newman Keuls angewendet. Als signifikant galt ein p-Wert $< 0,05$.

Die statistische Analyse der Experimente mit Alveofact erfolgte mit Statview 512 (Brain Power, Calabas, CA, USA). Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen in diesen Experimenten wurden durch den Fisher-PLSD Post-Test berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der verwendeten Isolate von *P. aeruginosa*

Die Infektion von CF-Patienten mit *P. aeruginosa* bewirkt häufig eine dauerhafte Kolonisierung, während der sich die Eigenschaften der Bakterien verändern können. Die von Patienten isolierten *P. aeruginosa* wurden hinsichtlich ihres Serotyps, ihrer Kolonieeigenschaften, ihrer Agglutinierbarkeit durch SP-A und SP-D, sowie ihrer Fähigkeit, die TNF α -Ausschüttung zu beeinflussen, untersucht (Tab. 2).

Isolat ID	Pyocintyp	O-Serotyp	Mucusproduktion	Agglutination durch SP-D	Agglutination durch SP-A	TNF α U/10 ⁶ CFU
1	3e	O1	∅	∅	∅	n.d.
2	3e	O18	∅	+++	∅	122+/-49
3	0k	O1	∅	++	∅	n.d.
4	85f	O1	∅	+	∅	n.d.
5	9 β	O11	∅	∅	∅	303+/-258
6	9 β	P ²	∅	∅	∅	91+/-36
7	1h	O4	Mucoid	∅	∅	n.d.
8	3c	O11	∅	∅	∅	253+/-90
9	n.t.	O1	∅	∅	∅	n.d.
11	1q	O10	∅			83+/-32
12	1q	P ²	∅	+++	∅	165+/-147
13	1h	O11	∅	++	∅	42+/-13
14	1o	O10	Mucoid	∅	∅	51+/-32
15	1 δ	O10	Mucoid	++	∅	41+/-2
16	1q	P ²	∅	+++	∅	61+/-24
17	n.t.	O1	∅	+++	∅	n.d.
18	1b	O10	Mucoid	∅	∅	n.d.
19	1f	O11	∅	+	∅	96+/-40
20	5f	P ²	∅			12+/-9
21	5f	O11	∅	∅	∅	89+/-33
22	22g	P ²	∅	+	∅	40+/-0

Tabelle 2: Charakterisierung der isolierten *P. aeruginosa*-stämme der CF-Patienten. n.t. = nicht typisierbar, n.d. = nicht durchgeführt, p² = polyagglutinierbar = „rough“ LPS

Nur 4/21 Stämmen wachsen in mucoiden Kulturen. Alle mukoiden Stämme exprimieren glattes LPS.

Frühere Studien unseres Labors untersuchten die Agglutinationsfähigkeit der Bakterien durch die Surfactantproteine. SP-D bewirkte in 10/21 Fällen eine deutliche Agglutination, in den restlichen Fällen allerdings zeigte es keinen Effekt. Dabei ließ sich keine Korrelation zum Serotyp oder der Fähigkeit mukoide Kulturen zu bilden, nachweisen. SP-A bewirkte keine Agglutination der Bakterien. Die Agglutination war kalziumabhängig und war durch EDTA, sowie durch verschiedene Zucker wie Glucose, Maltose und Mannose hemmbar. Daraus wurde gefolgert, daß die Bindung über die Lektindomäne vermittelt wird.

Die Fähigkeit zur Stimulation der TNF α -Sekretion unterschied sich deutlich innerhalb der isolierten *P. aeruginosa*. Die verschiedenen *P. aeruginosa* zeigten bei einer Konzentration von 10^6 Kolonie bildenden Einheiten eine um den Faktor 21 unterschiedliche Stimulationsfähigkeit der TNF α -Ausschüttung. In einer Konzentration von 2×10^{-6} -20 Bakterien/Monozyt wurden die MM6-Zellen zur Sekretion von TNF α angeregt. In der Konzentration 1:1 von Bakterien zu Monozyten wurde eine halbmaximale Stimulation beobachtet (siehe Tabelle 2, Abbildung 13).

In Abbildung 6 sind die verschiedenen LPS-Präparationen der vitalen *P. aeruginosa* gelelektrophoretisch dargestellt. Die unterschiedlichen Banden entsprechen den Variationen in den Seitenketten des LPS.

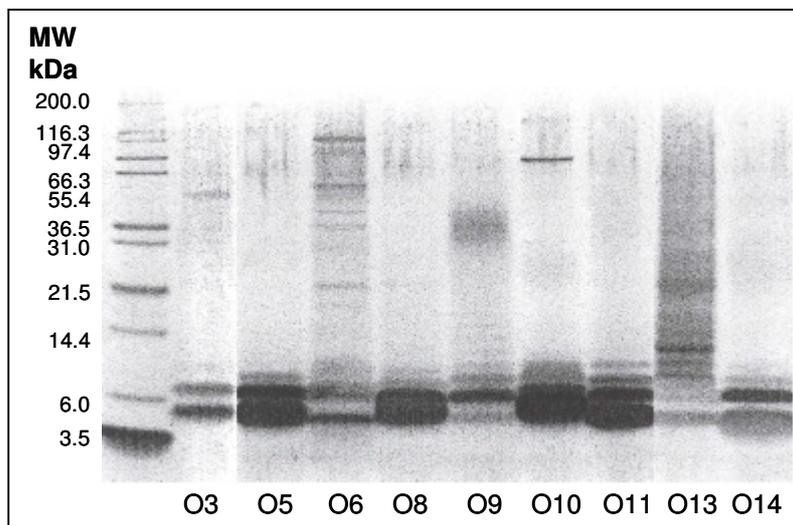


Abbildung 6: Darstellung verwendeter Serogruppen (O3-O14) in der Gelelektrophorese

3.2 Stimulation von monozytären Zellen mit SP-A und SP-D

3.2.1 Rekombinantes SP-A stimuliert die TNF α -Ausschüttung nicht

Um die einzelnen Bestandteile des Versuchsaufbaus, also die Surfactantproteine, Bakterien und ihre Lipopolysaccharide genau einschätzen zu können, testeten wir die verschiedenen Komponenten in Einzelversuchen aus. Dafür verwendeten wir zwei monozytäre Zelllinien. Gibt man SP-A alleine auf differenzierte MM6- oder THP-1-Zellen, so zeigt sich kein stimulierender Effekt auf die TNF α -Ausschüttung. Dies konnten wir für das rekombinant hergestellte SP-A zeigen, wie auch für das aus der BAL von Patienten mit Alveolärer Proteinose (PaP) isolierte SP-A. Das uns freundlicherweise von Reid zur Verfügung gestellte SP-A, welches ebenfalls aus BAL von PaP isoliert wurde, zeigte eine starke TNF α -stimulierende Aktivität (Abb. 7). Da eine TNF α -Stimulation durch Kontamination mit LPS bedingt sein kann, testeten wir diese aus. Es zeigte sich eine hohe LPS-Kontamination von 2,2 ng/ μ g SP-A. Diese SP-A Präparation wurde deshalb nicht für die weiteren Experimente verwendet. Das SP-A von Haagsman zeigte nur eine Kontamination von 0,0016 ngLPS/ μ g SP-A, das von Byk ebenfalls nur 0,024 ngLPS/ μ g SP-A. Solche geringen Mengen von LPS hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Baseline TNF α -Ausschüttung der Zelllinien, so dass es für die Experimente verwendet werden konnte.

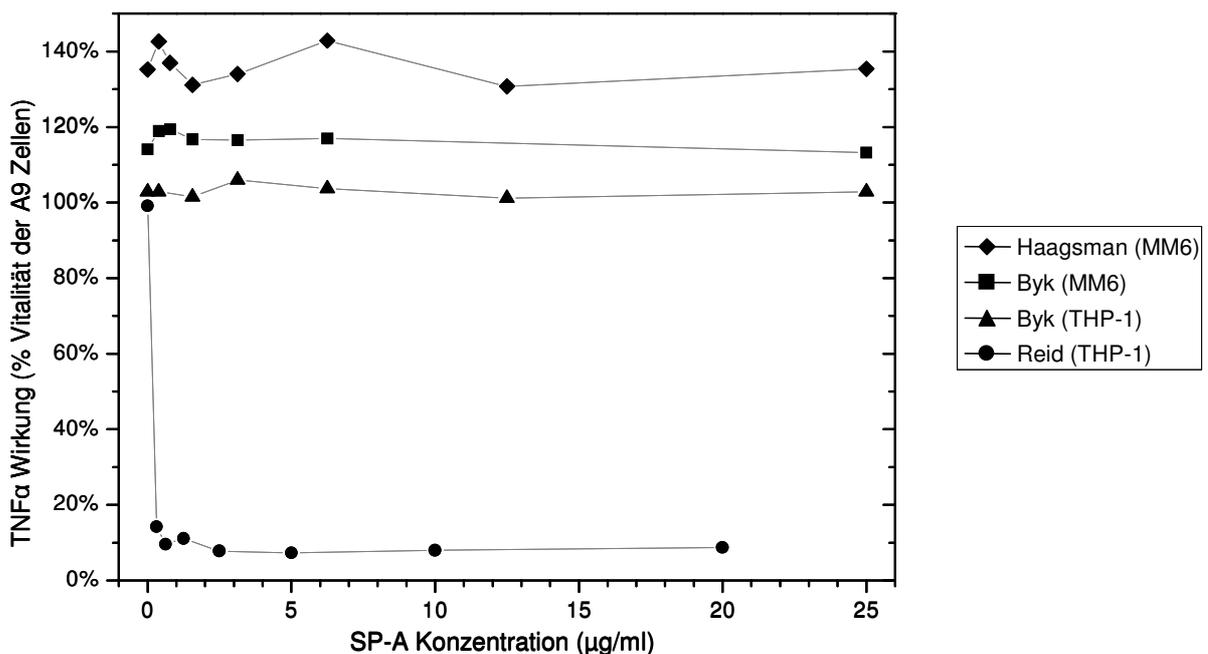


Abbildung 7: Stimulation der verschiedenen Zelllinien MM6 und THP-1 mit ansteigenden Konzentrationen von SP-A. MM6 (1×10^6 /ml) und THP-1 Zellen (1×10^6 /ml) wurden mit SP-A inkubiert. Nach 8 Stunden wurde die TNF α -Menge mit einem Bioassay (A9-Fibroblasten) bestimmt und in Prozent der Kontrolle (ohne Stimulation) angegeben. Die Titrationskurve bildet Einzelwerte ab.

3.2.2 TNF α -Stimulation durch SP-D ist bedingt durch LPS-Kontamination

SP-D welches von Prof. E. Crouch rekombinant hergestellt wurde, zeigte eine sehr starke stimulierende Fähigkeit zur TNF α -Ausschüttung. SP-D, welches von uns im Labor gelchromatografisch aufgetrennt wurde, zeigte in den verwendeten Konzentrationen eine geringere stimulierende Potenz (Abb. 8). Um festzustellen, ob die Stimulation durch Kontamination mit LPS zustande kam, bestimmten wir den LPS-Gehalt der verschiedenen Präparationen von SP-D im Limulus-Assay. Die Analyse des LPS-Gehaltes ergab für SP-D von E. Crouch eine LPS-Konzentration zwischen 0,16-0,32 ngLPS/ μ g SP-D Lösung (SP-D 100 μ g/ml), für eine weitere Präparation von E. Crouch (SP-D 93 μ g/ml) eine Konzentration von 0,051 ngLPS/ μ g SP-D Lösung. Die LPS-Kontamination der von uns hergestellten SP-D-Präparationen lag zwischen 0,005-0,023 ngLPS/ μ g SP-D. Diese Mengen von LPS hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Baseline TNF α -Ausschüttung der Zelllinien. Für die folgenden Experimente wurde deshalb ausschließlich SP-D von Crouch mit der niedrigeren Kontamination (SP-D 93 μ g/ml) und SP-D der Gelfiltrationsfraktionen 11 und 12 verwendet.

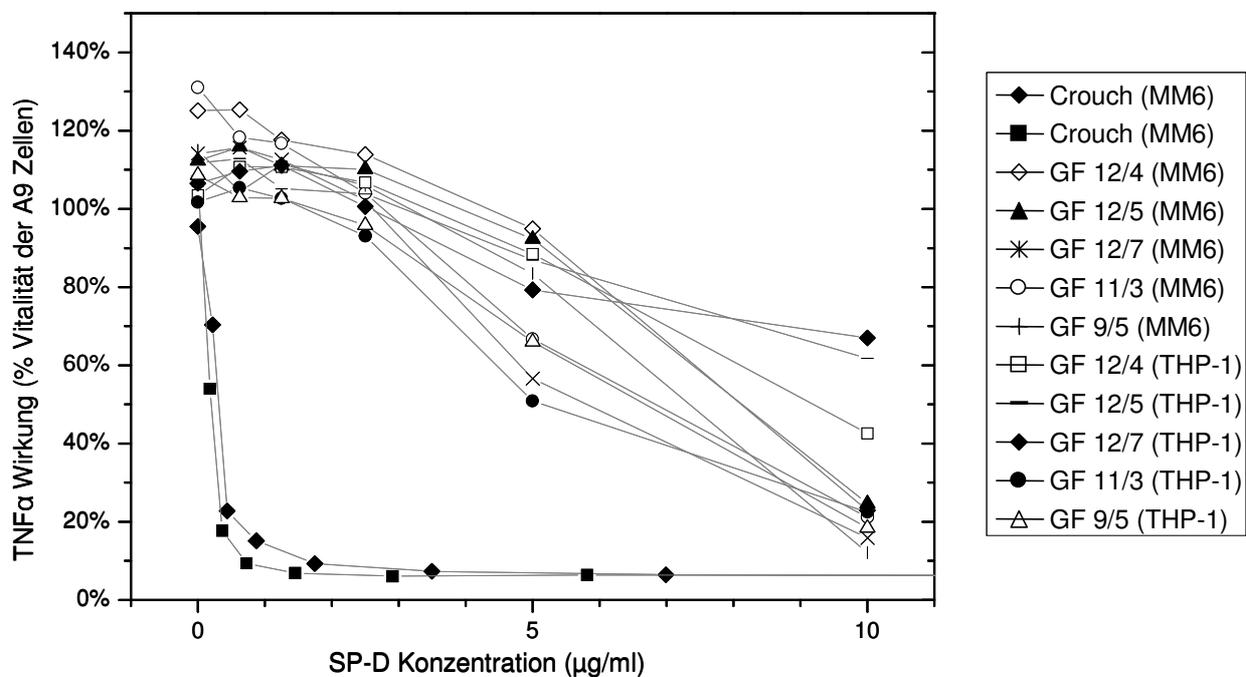


Abbildung 8: Stimulation der verschiedenen Zelllinien MM6 und THP-1 mit ansteigenden Konzentrationen von SP-D. MM6 (1×10^6 /ml) und THP-1 Zellen (1×10^6 /ml) wurden mit SP-D koinkubiert. Nach 8 Stunden wurde die TNF α -Menge mit einem Bioassay (A9-Fibroblasten) bestimmt und in Prozent der Kontrolle (ohne Stimulation) angegeben. Die Titrationskurve bildet Einzelwerte ab.

3.3 Keine signifikante Beeinflussung der TNF α -Ausschüttung durch SP-A bei „smooth“ und „rough“ LPS von *E. coli* und *S. minnesota* auf MM6

Wir untersuchten die verschiedenen Zelllinien MM6, U937 und THP-1 mit vier verschiedenen Standard-LPS unter Zugabe von SP-A, um auszutesten, welche am besten für die Stimulationsexperimente mit *P. aeruginosa* geeignet ist. MM6 wurde mit SP-A vor der Stimulation inkubiert und daraufhin mit „smooth“ LPS (*E. coli* O26:B6, O111:B4) stimuliert. Als Kontrolle verwendeten wir den Puffer TRIS (=TBS), in dem die Surfactantproteine gelöst sind. Dabei fanden wir keine signifikante Beeinflussung der TNF α -Ausschüttung durch SP-A. Der Puffer TRIS zeigt eine deutlichere Hemmung der TNF α -Ausschüttung. Werden die Zellen mit „rough“ LPS stimuliert (*S. min. Re 595* und *E. coli J5*), zeigte sich ebenfalls keine eindeutige Beeinflussung durch SP-A. Bei Stimulation durch das LPS von *S. min. Re 595* wurde die TNF α -Ausschüttung nicht signifikant stimuliert, bei *E. coli J5* wurde sie durch höhere Konzentrationen an SP-A nicht signifikant gehemmt (siehe Abb. 9).

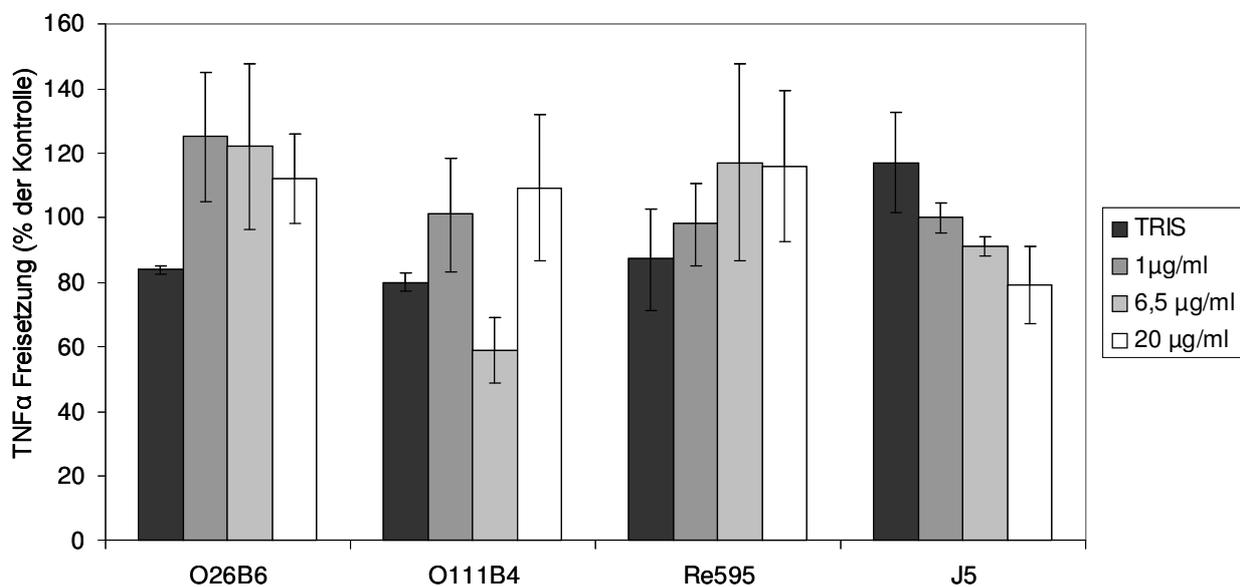


Abbildung 9: Stimulation der Zelllinie MM6 mit „smooth“ und „rough“ LPS unter Zugabe von SP-A. MM6 (1×10^6 /ml) wurden mit zwei verschiedenen „smooth“ (*E. coli* O26B6 und O111B4) und „rough“ LPS (*S. min. Re 595*, *E. coli J5*) stimuliert und der Effekt der Zugabe von SP-A untersucht. Nach 8 Stunden wurde die TNF α -Menge mittels Bioassay (A9- Fibroblasten) bestimmt und in Prozent der Kontrolle (ohne Stimulation) angegeben. Die Werte der Diagramme setzen sich aus den Mittelwerten von je 4-5 Versuchen zusammen. Die Kalkulation der Einzelwerte erfolgte aus bis zu 3 Werten einer Verdünnungsreihe der Überstände.

3.4 Keine signifikante Beeinflussung der TNF α -Ausschüttung durch SP-A bei „smooth“ und „rough“ LPS von *E. coli* und *S. minnesota* auf U937

Führt man dasselbe Experiment nun mit U937-Zellen durch, so ließ sich in der Präinkubation niedriger Konzentrationen von SP-A und „smooth“ LPS eine geringe Inhibition der TNF α -Ausschüttung, in der Vorinkubation höherer Konzentrationen von SP-A eher eine Stimulation durch das Surfactantprotein feststellen. Bei Präinkubation von SP-A und „rough“ LPS zeigte sich eine stimulierende Tendenz. Die Modulation der TNF α -Sekretion durch SP-A bei der Stimulation der Zelllinie U937 war jedoch nicht signifikant, da die Kontrolle mit TRIS als Lösungsmittel einen deutlich stärkere Hemmung aufwies (siehe Abb. 10).

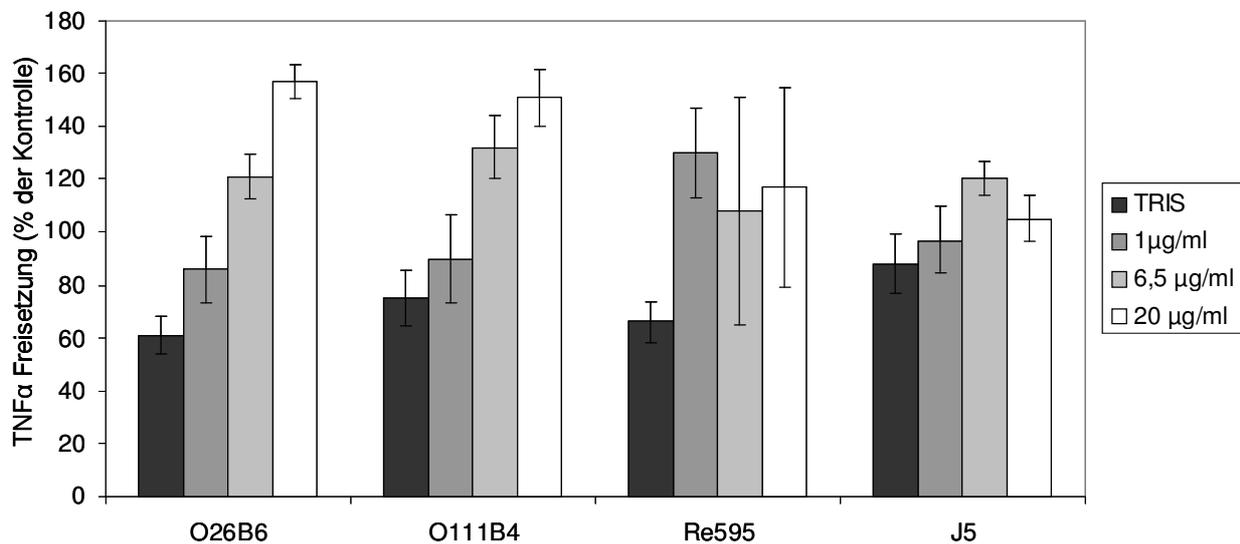


Abbildung 10: Stimulation der Zelllinie U937 mit „smooth“ und „rough“ LPS unter Zugabe von SP-A. U937 ($1 \times 10^6/\text{ml}$) wurden mit zwei verschiedenen „smooth“ (*E. coli* O26B6 und O111B4) und „rough“ LPS (*S. min. Re 595*, *E. coli* J5) stimuliert und der Effekt der Zugabe von SP-A untersucht. Nach 8 Stunden wurde die TNF α -Menge mit einem Bioassay (A9-Fibroblasten) bestimmt und in Prozent der Kontrolle (ohne Stimulation) angegeben. Die Werte der Diagramme setzen sich aus den Mittelwerten von je 4-5 Versuchen zusammen. Die Kalkulation der Einzelwerte erfolgte aus bis zu 3 Werten einer Verdünnungsreihe der Überstände.

3.5 Signifikante Beeinflussung der TNF α -Ausschüttung durch SP-A bei „smooth“ LPS von *E. coli* auf THP-1

Bei der Zelllinie THP-1 bewirkte die Zugabe von SP-A zur Stimulation mit demselben „smooth“ LPS von *E. coli* O111:B4 eine gering signifikante Zunahme ($p < 0,05$) der TNF α -Ausschüttung (Vergleich der Kontrolle mit 20 $\mu\text{g/ml}$), bei *E. coli* O26:B6 bestätigt sich diese Tendenz (Abb. 11). Dasselbe Experiment mit „rough“ LPS ergab keine eindeutige Beeinflussung durch die Zugabe von SP-A.

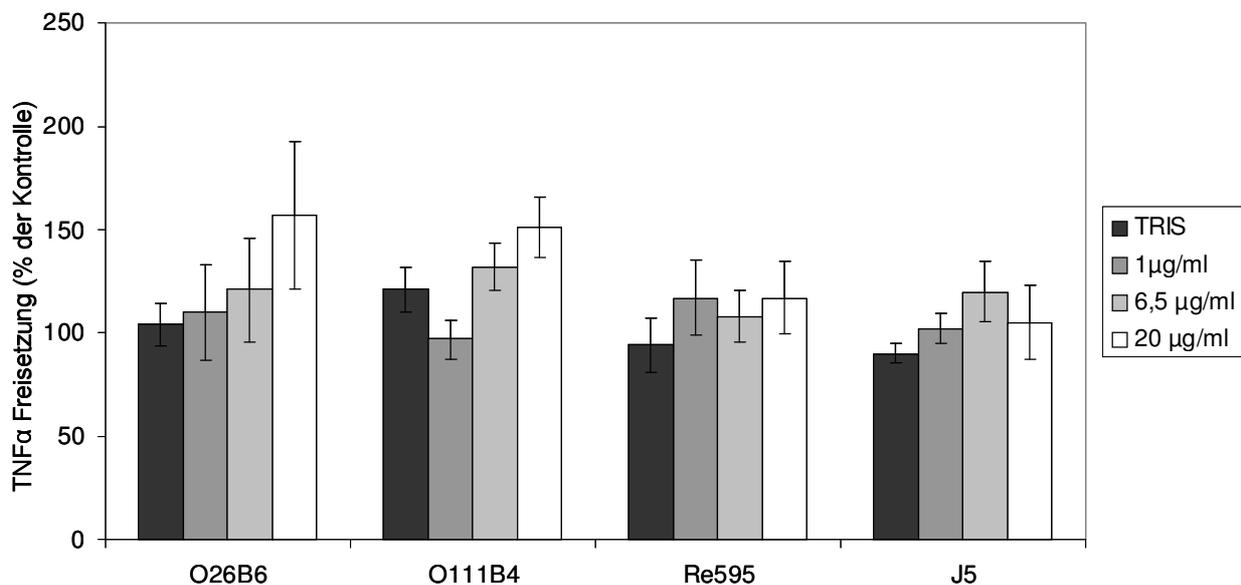


Abbildung 11: Stimulation der Zelllinie THP-1 mit „smooth“ und „rough“ LPS unter Zugabe von SP-A. THP-1 ($1 \times 10^6/\text{ml}$) wurden mit zwei verschiedenen „smooth“ (*E. coli* O26B6 und O111B4) und „rough“ LPS (*S. min. Re 595*, *E. coli* J5) stimuliert und der Effekt der Zugabe von SP-A untersucht. Nach 8 Stunden wurde die TNF α -Menge mit einem Bioassay (A9-Fibroblasten) bestimmt und in Prozent der Kontrolle (ohne Stimulation) angegeben. Die Werte der Diagramme setzen sich aus den Mittelwerten von je 4-5 Versuchen zusammen. Die Kalkulation der Einzelwerte erfolgte aus bis zu 3 Werten einer Verdünnungsreihe der Überstände.

3.6 Inhibition der TNF α -Ausschüttung durch SP-D bei „smooth“ LPS von *E. coli* auf MM6 und U937

Wir untersuchten als nächstes die Zelllinien MM6 und U937 mit zwei Standard-LPS unter Zugabe von SP-D, um auszutesten, welche am besten für die Stimulationsexperimente mit *P. aeruginosa* geeignet ist. Als Repräsentanten für „smooth“ LPS verwendeten wir das LPS von *E. coli* O26:B6, für „rough“ LPS das von *S. minnesota* Re 595.

Erstaunlicherweise zeigte die Präinkubation beider Zelllinien MM6 und U937 mit SP-D vor der LPS-Stimulation einen deutlich signifikanten inhibierenden Effekt von SP-D auf die TNF α -

Ausschüttung bei Stimulation mit „smooth“ LPS (*E. coli* O26:B6). Bei U937 zeigte sich der signifikant hemmende Effekt beim Vergleich der Konzentrationen 1, 5, 10 µg/ml gegenüber der Kontrolle (p<0,01-0,05). Für die Zelllinie MM6 zeigte SP-D in den Konzentrationen 5 und 10 µg/ml im Vergleich zur Kontrolle einen signifikanten inhibierenden Effekt (p<0,05) (siehe Abb. 12).

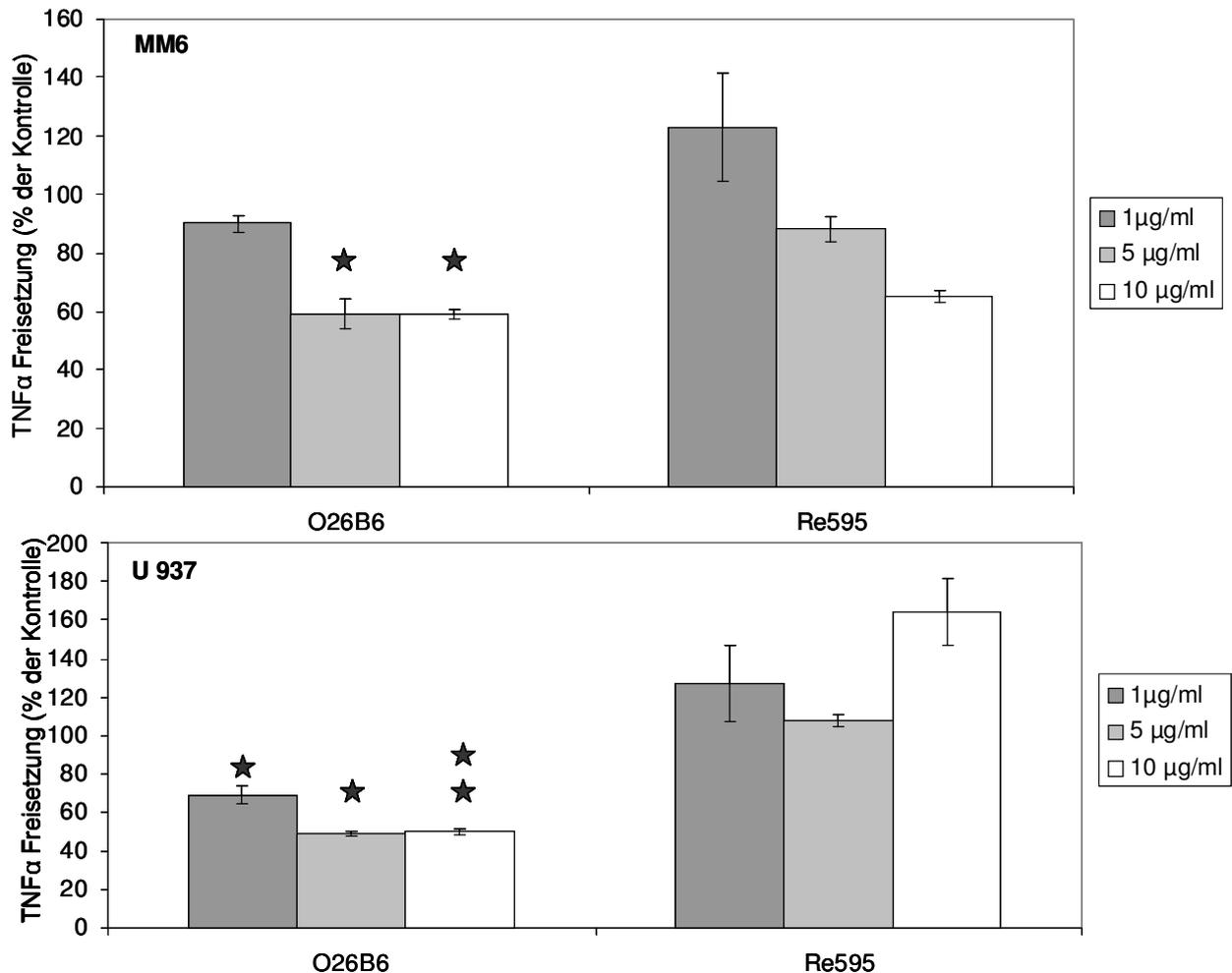


Abbildung 12: Stimulation der Zelllinien MM6 und U937 mit „smooth“ und „rough“ LPS unter Zugabe von SP-D. MM6, und U937 (1×10^6 /ml) wurden mit „smooth“ (*E. coli* O26B6) und „rough“ LPS (*S. min. Re 595*) stimuliert und der Effekt der Zugabe von SP-D untersucht. (s. Beschreibung Abb.10). Die Sterne geben die Signifikanz an (* =p < 0,05, ** =p < 0,01).

3.7 Keine signifikante Beeinflussung der TNF α -Ausschüttung durch SP-D bei „rough“ LPS von *E. coli* auf MM6 und U937

Die Vorinkubation der Zellen mit SP-D beeinflusste die TNF α -Ausschüttung bei Zugabe von „rough“ LPS von *S. minnesota* Re 595 auf MM6 tendenziell hemmend. Bei U937 zeigte die Zugabe von SP-D zum Versuchsansatz mit „rough“ LPS einen tendenziell stimulierenden Effekt (Abb. 12). Da wir mit MM6-Zellen bezüglich der Kultivierung und der Phagozytose in

früheren Experimenten (Ergebnisse nicht gezeigt) umfassende Erfahrung gesammelt hatten, und sie auch in unseren Vorexperimenten konstante Ergebnisse gezeigt hatten, verwendeten wir sie für die weiteren Experimente.

3.8 Variation der TNF α -Sekretion nach Stimulation mit *P. aeruginosa*

Die chronische Kolonisierung der Lunge mit *P. aeruginosa* bei Patienten mit CF unterhält eine andauernde Stimulation der lokalen Immunantwort. Um die unterschiedlich stimulierende Potenz der verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämme zu testen, wurden sie in ansteigender Konzentration (10^1 - 10^7 CFU/ml) auf den MM6 Zellen ausgetestet. MM6-Zellen wurden mit vitalen *P. aeruginosa* (14 klinische Isolate) verschiedener Sero- und Pyocintypen für 6 Stunden inkubiert und danach die Menge an TNF α im Überstand bestimmt. Die stimulierende Potenz der verschiedenen Stämme unterschied sich maximal um den Faktor 21. Am geringsten stimulierte der „raue“ Stamm *P. aeruginosa* 20 (12 TNF α U/ 10^6 CFU), die maximale Stimulation wurde mit dem „glatten“ Stamm *P. aeruginosa* 8 (253 TNF α U/ 10^6 CFU) erreicht (Abb. 13).

Betrachtet man die stimulatorische Potenz der unterschiedlichen *P. aeruginosa*-stämme, so existieren keine signifikanten Unterschiede zwischen „smooth“ und „rough“ LPS hinsichtlich ihrer Fähigkeit die TNF α -Sekretion zu steigern.

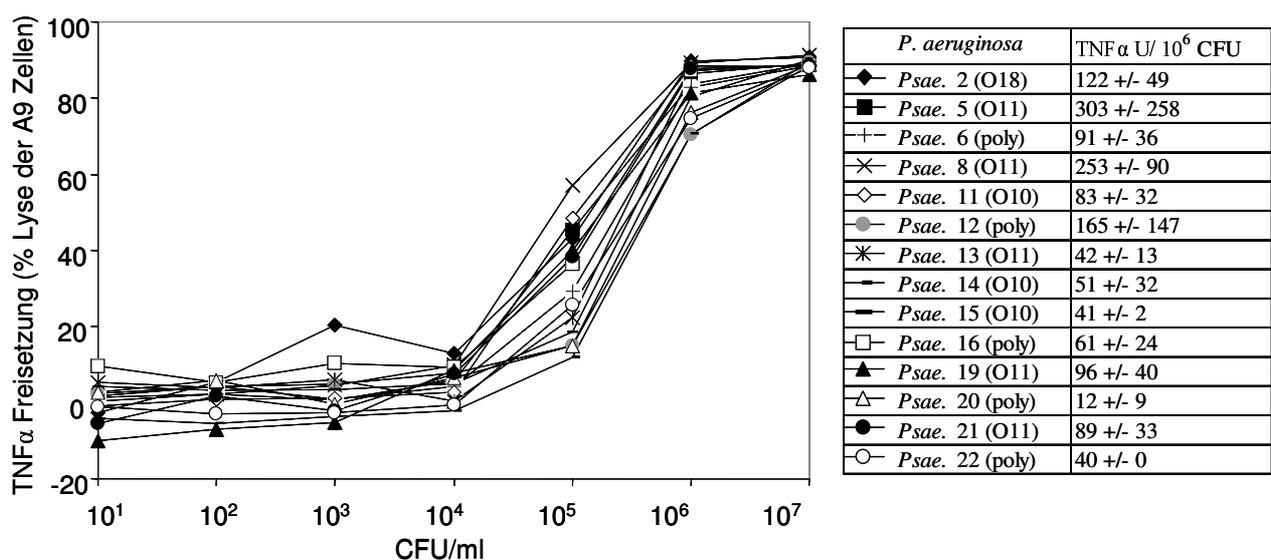


Abbildung 13: Stimulation der TNF α -Ausschüttung von MM6 durch verschiedene *P. aeruginosa*-stämme. Mit Vitamin D3 ausdifferenzierte MM6-Zellen (1×10^6 /ml) wurden mit ansteigenden Mengen Kolonie-bildender Einheiten (CFU) der verschiedenen *Pseudomonas*-Isolate der Patienten stimuliert. Nach 6 Stunden wurde die TNF α -Menge mittels Bioassay (A9-Fibroblasten) bestimmt und in Prozent Vitalität der Kontrolle (ohne Stimulation) angegeben. Die Werte der Titrationskurve setzen sich aus dem Mittelwert von je 3-5 Versuchen zusammen.

3.9 Variation der TNF α -Sekretion nach Stimulation mit gereinigtem *P. aeruginosa*-LPS

Da LPS einer der Hauptbestandteile der Bakterien ist, der die Immunabwehr stimuliert, testeten wir die Stimulationsfähigkeit von 10 verschiedenen LPS-Präparationen aus. Dafür wurden die MM6-Zellen mit *P. aeruginosa*-LPS für 6 Stunden inkubiert und danach die Menge an TNF α im Überstand bestimmt. Alle Präparationen zeigten eine deutliche Simulation der TNF α -Sekretion der MM6-Zellen, beginnend in einer Konzentration von kleiner 1 ngLPS/ml. Die stimulierende Fähigkeit der einzelnen LPS, die alle in der gleichen Konzentration (1 mg/ml) eingewogen wurden, unterschied sich um den Faktor 3000. Am stärksten stimulierte das LPS mit dem Serotyp O6 (9010 TNF α U/ μ g LPS), 3000-fach geringer stimulierte das LPS O18 (3 TNF α U/ μ g LPS) (Abb. 14).

Um auszuschließen, dass die stimulatorische Potenz, gemessen in der Zytotoxizität auf Fibroblastenzellen durch einen zu großen Anteil an DNS, welches ebenfalls eine eigene zytotoxische Aktivität besitzt, zustande kam, bestimmten wir den DNS-Gehalt in den LPS-Präparationen photometrisch. Er lag bis auf ein LPS unter 134,5 μ gDNS/ml (Tab. 3). Das bedeutet, daß wir keine signifikante Korrelation zur TNF α -Stimulation feststellen konnten.

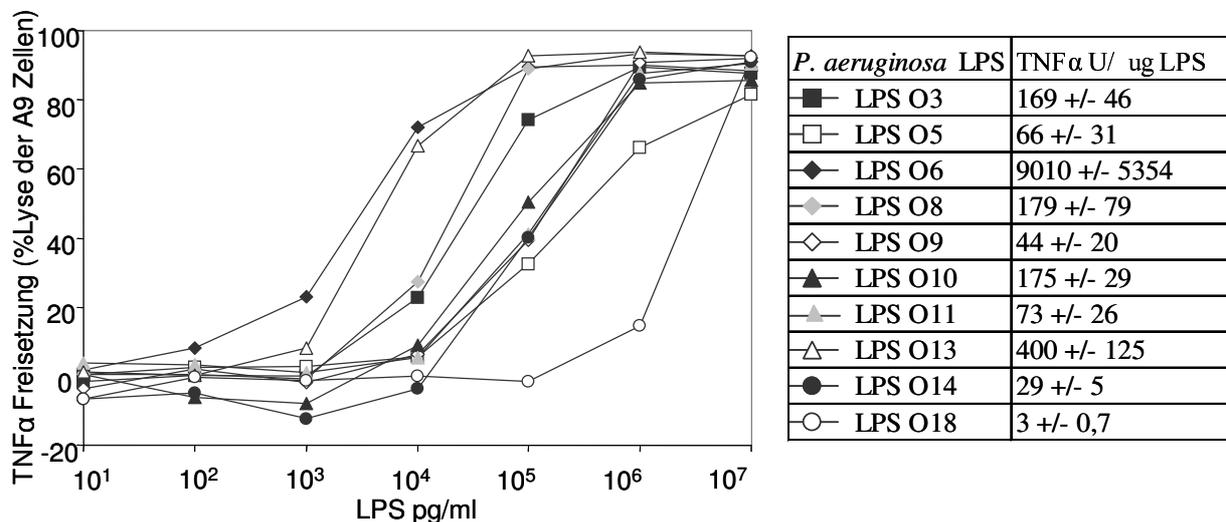


Abbildung 14: Stimulation der TNF α -Ausschüttung von MM6 durch verschiedene LPS-Präparationen von *P. aeruginosa*. LPS wurde aus klinischen Isolaten von *P. aeruginosa* isoliert. Mit Vitamin D3 ausdifferenzierte MM6-Zellen (1×10^6 /ml) wurden mit ansteigenden Mengen des aufgereinigten LPS stimuliert. Nach 6 Stunden wurde die TNF α -aktivität mittels Bioassay (A9-Fibroblasten) bestimmt und in Prozent Vitalität der Kontrolle angegeben. Die Werte der Titrationskurve setzen sich jeweils aus dem Mittelwert von je 3-5 Versuchen zusammen.

LPS	O3	O5	O6	O8	O9	O10	O11	O13	O14	O18
DNS ($\mu\text{g/ml}$)	57	12	n.m.	19,5	n.m.	73,5	48,5	n.m.	27	134,5

Tabelle 3: Bestimmung des DNS Gehaltes der LPS Präparationen. Die Berechnung erfolgte gemäß der in 2.8.2 beschriebenen Formel. n.m. = nicht messbar, n.d. = nicht durchgeführt

3.10 Stimulation und Hemmung der *P. aeruginosa* induzierten TNF α -Sekretion monozytärer Zellen durch SP-A

Um die Immunmodulation von SP-A auf die Stimulation von MM6-Zellen durch *P. aeruginosa* zu untersuchen, gaben wir SP-A zum Stimulationsexperiment in ansteigender Menge hinzu. Ein signifikanter modulierenden Effekt zeigte sich bei 2/14 Stämmen. Die Zugabe von SP-A zu den Zellen und die darauf folgende Stimulation mit vitalen *P. aeruginosa* führte nur bei *P. aeruginosa* 11 ($p < 0,05$) zu einer konzentrationsabhängigen signifikanten Hemmung. Beim Stamm *P. aeruginosa* 22 zeigte sich dagegen eine signifikante Stimulation der TNF α -Sekretion ($p < 0,05$). Eine hemmende Tendenz zeigt sich bei 7/14 Stämmen (*P. aeruginosa* 5, 8, 14, 15, 12, 13, 21). Eine eher stimulierende Tendenz zeigt sich bei 3/14 *P. aeruginosa* (Stamm 6, 19, 20). Je nach Konzentration der Zugabe von SP-A eine stimulierende oder inhibierende Tendenz zeigte sich bei 2/14 Stämmen (*P. aeruginosa* 2, 16) (Abb. 15).

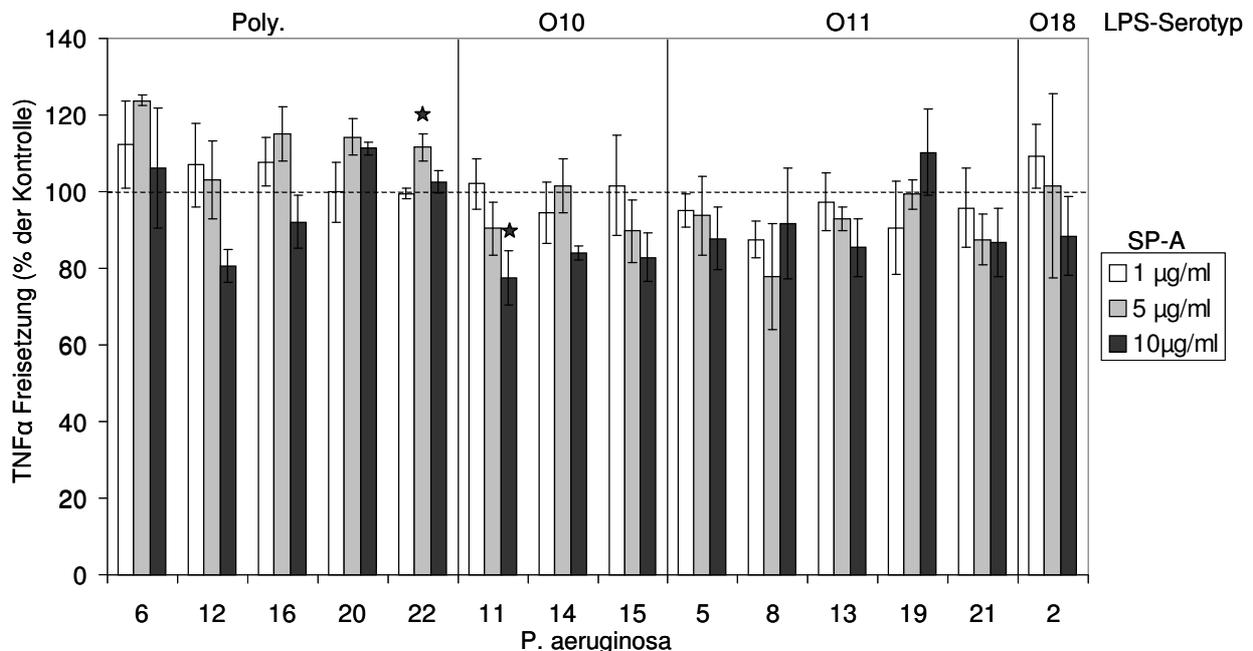


Abbildung 15: Effekte von SP-A auf die TNF α -Stimulation der verschiedenen *P. aeruginosa*-stämmen. Ausdifferenzierte MM6 Zellen wurden 6 Stunden mit vitalen *Pseudomonas* unter Zugabe von SP-A in aufsteigender Konzentration stimuliert. Danach wurde im Überstand der TNF α Gehalt mit einem Bioassay (A9-Fibroblasten) bestimmt. Die TNF α -Ausschüttung wurde in Prozent der Kontrolle (ohne SP-A Zugabe) angegeben. Die Werte der Balken setzen sich aus dem Mittelwert von je 3-4 Messungen zusammen. Die Sterne geben die Signifikanz an (* = $p < 0,05$).

Die Auswertung aller *P. aeruginosa*-Stämme nach dem Gesichtspunkt ihrer Koloniebeschaffenheit (rau oder glatt) ergab bei den rauen LPS einen signifikanten stimulierenden Effekt auf die TNF α -Sekretion im Vergleich der Konzentration von 5 μ g/ml SP-A mit der Kontrolle (Abb. 16). Außerdem zeigte sich bei der zusammenfassenden Auswertung der *P. aeruginosa* mit glattem Serotyp O10 ein signifikanter hemmender Effekt von SP-A in der Konzentration von 10 μ g/ml auf die TNF α -Ausschüttung der monozytären Zellen.

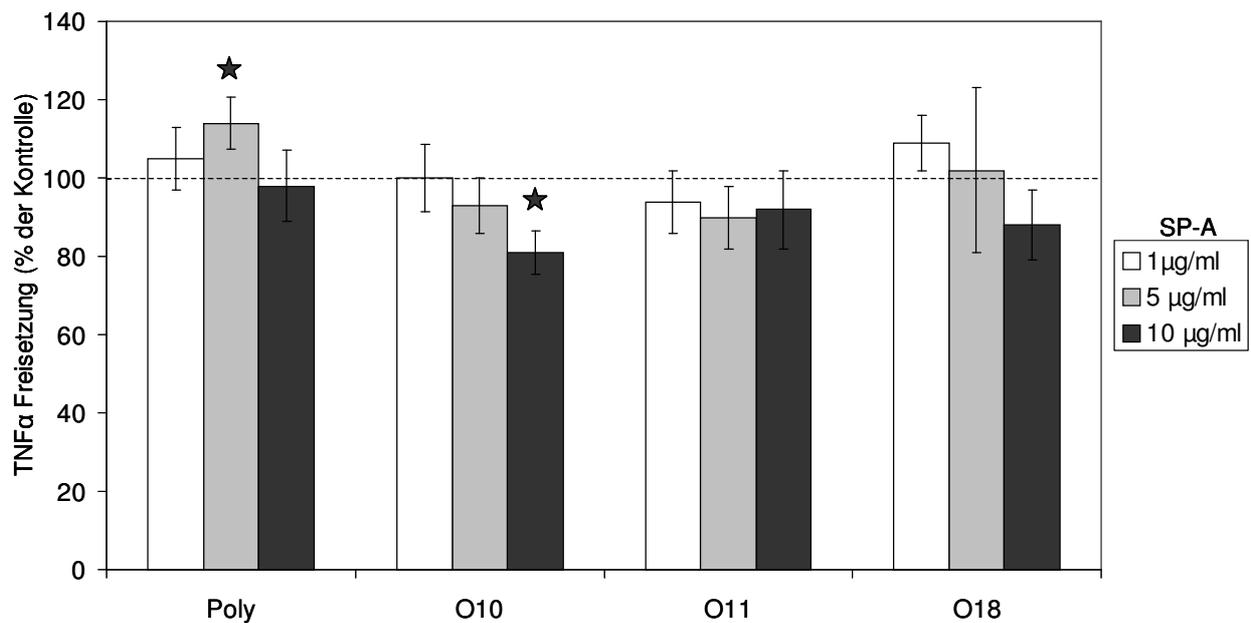


Abbildung 16: Zusammenfassung der MM6 Stimulation mit *P. aeruginosa*s und SP-A zu Untergruppen (unterteilt nach O-Serotypen). Die Balken der obigen Stimulation der MM6 wurden je nach O-Serotyp in Gruppen zusammengefasst. Die Gruppe der polyagglutinierenden Stämme setzt sich aus 4 Stämmen (*Pseudomonas* 6,12,16,22), die der Serogruppe O10 aus 3 Stämmen (*Pseudomonas* 11,14,15), die der Serogruppe O11 aus 5 Stämmen (*Pseudomonas* 5,8,13,19,21) die der Serogruppe O1 und O18 aus je einem Stamm (Aufzählung siehe Abb. 13) zusammen. Die Werte des Balken bilden den Mittelwert aus 3-17 Einzelmessungen ab. Die Sterne geben die Signifikanz an (* = $p < 0,05$).

3.11 SP-D stimuliert die *P. aeruginosa* induzierte TNF α -Sekretion monozytärer Zellen

Um die Immunmodulation von SP-D auf die TNF α -Sekretion von MM6-Zellen durch *P. aeruginosa* zu untersuchen, gaben wir SP-D in ansteigender Menge zum Stimulationsexperiment hinzu. SP-D stimuliert bei 5/14 *P. aeruginosa* die Ausschüttung von TNF α durch monozytäre Zellen signifikant (*P. aeruginosa* 2, 6, 11, 16, 21). Bei *P. aeruginosa* 2 zeigte sich im Vergleich aller Konzentrationen von SP-D mit der Kontrolle eine Signifikanz von mindestens $p < 0,05$. Bei *P. aeruginosa* 6 zeigte sich der stimulierende Effekt im Vergleich der Kontrolle mit 5 $\mu\text{g/ml}$ SP-D ($p < 0,01$). Der Stamm *P. aeruginosa* 11 zeigte beim Vergleich der Kontrolle mit 5 und 10 $\mu\text{g/ml}$ eine deutliche Signifikanz ($p < 0,01$ - $p < 0,001$). Bei *P. aeruginosa* 16 fand sich ein signifikanter Effekt bei Vergleich von 5 und 10 $\mu\text{g/ml}$ SP-D mit der Kontrolle ($p < 0,05$). Bei der Stimulation mit *P. aeruginosa* 21 zeigte sich ein signifikant stimulierender Effekt von SP-D im Vergleich der Kontrolle mit 5 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,05$). 6/14 Stämmen (*P. aeruginosa* 5, 8, 15, 19, 20, 22,) zeigten bei Zugabe von SP-D eine tendenziell vermehrte TNF α -Sekretion. Bei 1/14 Stämmen, *P. aeruginosa* 12, zeigte sich ein signifikant inhibierender Effekt bei Vergleich aller Mittelwerte ($p < 0,05$). Ein konzentrationsabhängiger hemmender Effekt von SP-D fand sich bei 1/14 Stämmen, *P. aeruginosa* 13 (Vergleich von 10 und 1 $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,05$). Auf *P. aeruginosa* 14 zeigte SP-D keine Modulation (Abb. 17).

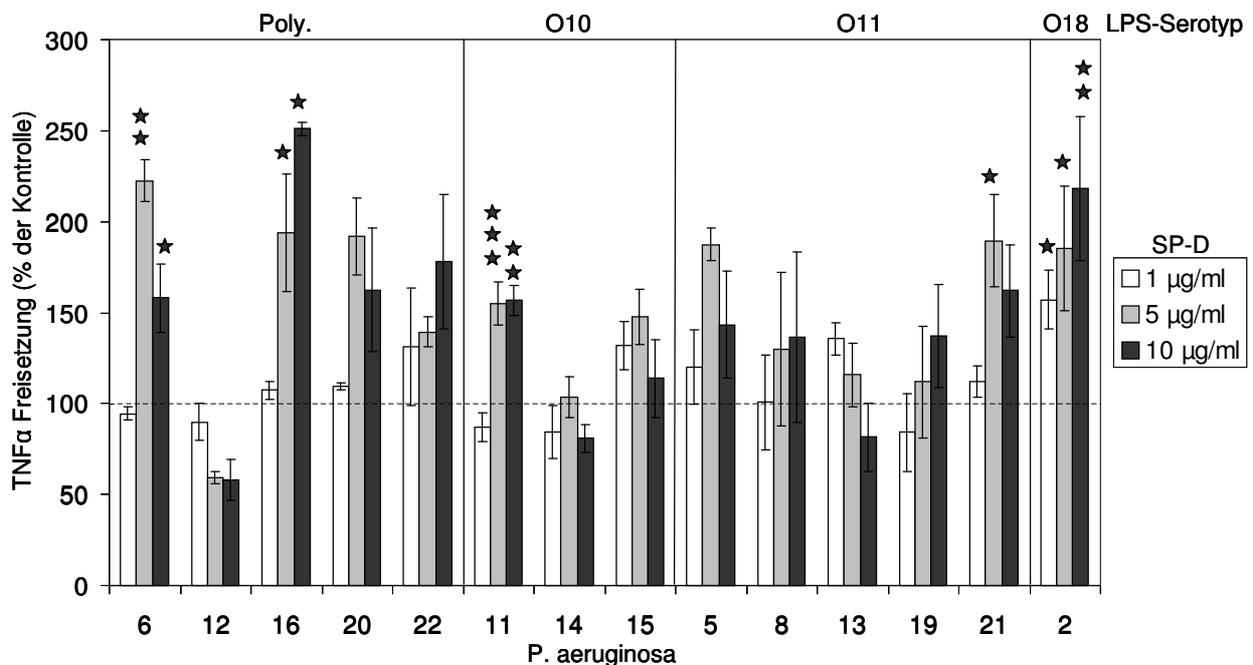


Abbildung 17: Effekte von SP-D auf die TNF α -Stimulation der verschiedenen *P. aeruginosa*-stämmen. Differenzierte MM6-Zellen wurden 6 Stunden mit vitalen *P. aeruginosa*-stämmen unter Zugabe von SP-D in aufsteigender Konzentration stimuliert. Danach wurde im Überstand der TNF α -Gehalt mit einem Bioassay (A9-Fibroblasten) bestimmt. Die TNF α -Ausschüttung wurde in Prozent der Kontrolle (ohne SP-D) angegeben. Der Einfluß des Lösungsmittels (TBS/EDTA) wurde herausgerechnet, indem die alleinige Stimulation durch Lösungsmittel als Bezugspunkt genommen wurde. Die Werte der Balken setzen sich aus dem Mittelwert von je 3-5 Messungen zusammen. Die Sterne geben die Signifikanz an (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$).

Eine statistische Auswertung nach Serotypen ergab bei der zusammenfassenden Betrachtung der polyagglutinierenden („*rough*“) Stämme keinen signifikanten Effekt von SP-D. Für die Stämme mit dem Serotyp O11 ergab sich im Vergleich der Konzentration von 5 µg/ml SP-D mit der Kontrolle ein signifikant stimulierender Effekt auf die TNF α -Ausschüttung der monozytären Zellen. Da in unseren Versuchen die Serogruppe O18 allein durch *P. aeruginosa* 2 repräsentiert wurde, ergab sich für einen weiteren „*smooth*“ Stamm ein signifikanter Effekt, wie schon zuvor beschrieben (Abb. 18)

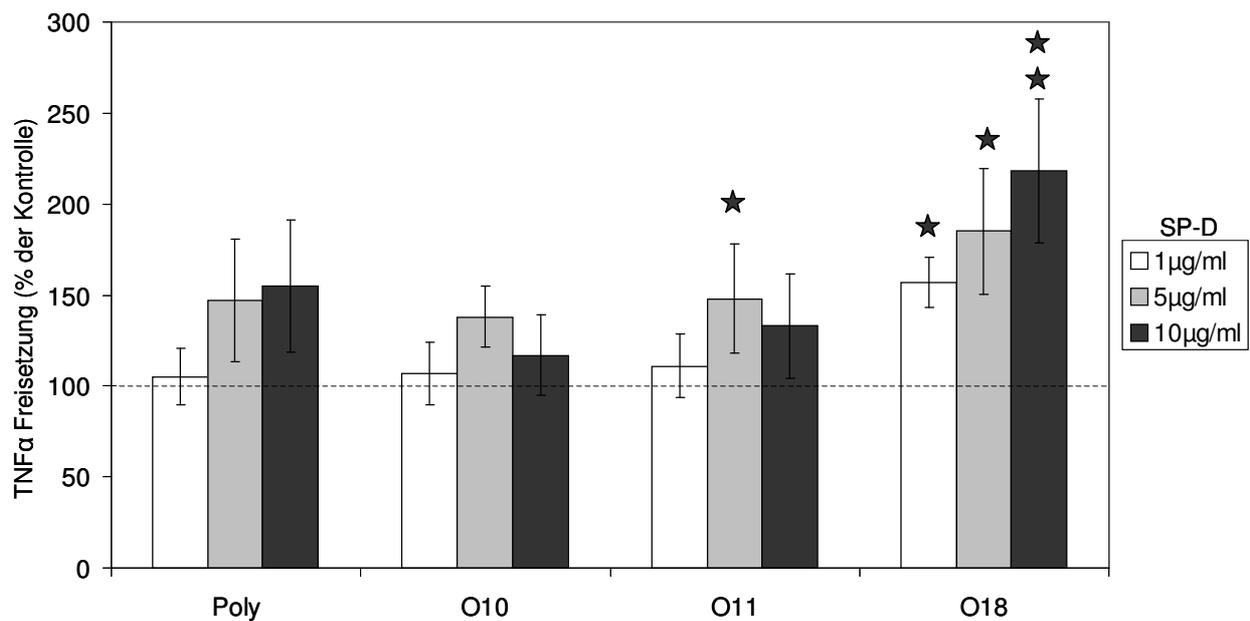


Abbildung 18: Zusammenfassung der MM6-Stimulation mit *P. aeruginosa* und SP-D zu Untergruppen (unterteilt nach O-Serotypen). Die Balken der obigen Stimulation der MM6 wurden je nach O-Serotyp in Gruppen zusammengefasst. Die Gruppe der polyagglutinierenden Stämme setzt sich aus 4 Stämmen (*P. aeruginosa* 6, 12, 16, 22), die der Serogruppe O10 aus 3 Stämmen (*P. aeruginosa* 11, 14, 15), die der Serogruppe O11 aus 5 Stämmen (*P. aeruginosa* 5, 8, 13, 19, 21) die der Serogruppe O1 und O18 aus je einem Stamm (Aufzählung siehe Abb. 10) zusammen. Die Werte des Balken bilden den Mittelwert aus 3-17 Einzelmessungen ab. Die Sterne geben die Signifikanz an (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$).

3.12 SP-A moduliert die durch *P. aeruginosa*-LPS induzierte TNF α -Sekretion monozytärer Zellen nicht signifikant

Um die modulierende Wirkung von SP-A auf die Stimulation monozytärer Zellen mit *P. aeruginosa*-LPS zu untersuchen, inkubierten wir MM6-Zellen vor dem Stimulationsexperiment mit SP-A. Wir konnten keinen signifikanten Effekt von SP-A auf die LPS induzierte TNF α -Ausschüttung feststellen (Abb. 19).

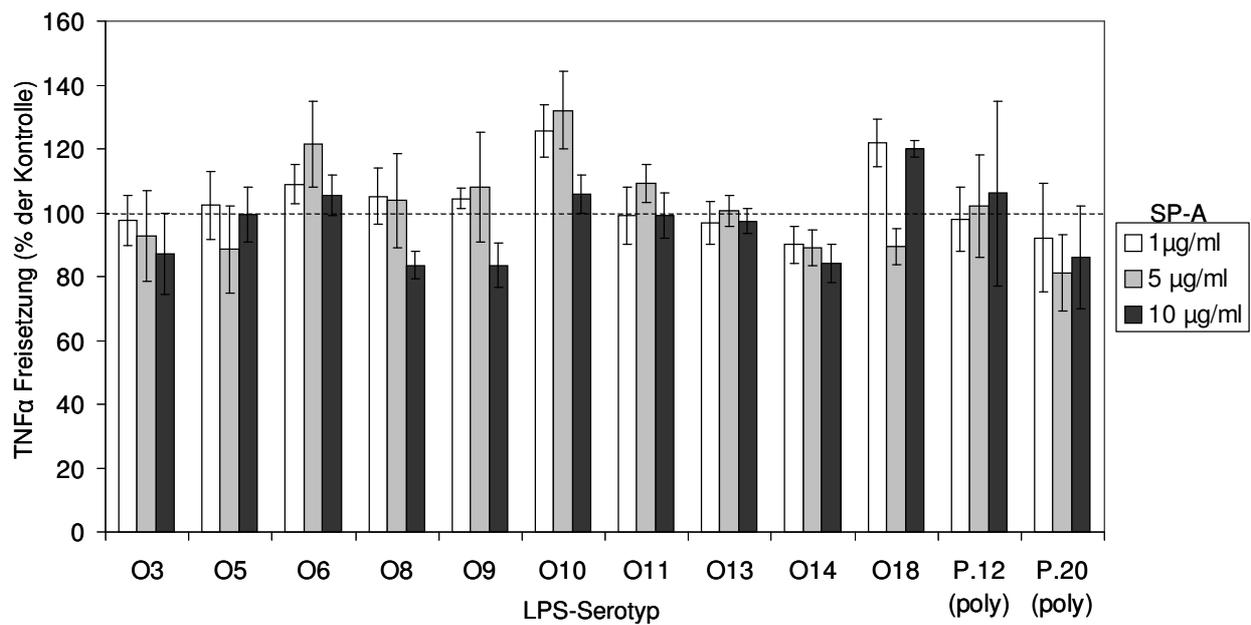


Abbildung 19: Effekte von SP-A auf die TNF α -Stimulation der verschiedenen LPS-Präparationen. Differenzierte MM6-Zellen wurden 6 Stunden mit aufgereinigten LPS-Präparationen unter Zugabe von SP-A in aufsteigender Konzentration stimuliert. Danach wurde im Überstand der TNF α -Gehalt mit einem Bioassay (A9-Fibroblasten) bestimmt. Die TNF α -Ausschüttung wurde in Prozent der Kontrolle (ohne SP-A) angegeben. Die Werte der Balken setzen sich aus dem Mittelwert von je 3-5 Messungen zusammen.

3.13 SP-D moduliert die durch *P. aeruginosa*-LPS induzierte TNF α -Sekretion monozytärer Zellen signifikant

Um die modulierende Wirkung von SP-D auf die Stimulation monozytärer Zellen mit *P. aeruginosa* LPS zu untersuchen, inkubierten wir die MM6-Zellen ebenfalls vor dem Stimulationsexperiment mit SP-D. SP-D zeigte bei Stimulation mit LPS der Serogruppe O3 einen konzentrationsabhängigen signifikanten stimulierenden Effekt im Vergleich von 5-10 $\mu\text{g/ml}$ mit der Kontrolle (Signifikanz von $p < 0,01$ bis $< 0,001$). Ebenso eine signifikante Stimulation zeigte sich bei dem LPS-Serotyp O9, O18, und rauem LPS von *P. aeruginosa* 12 und 20 (Signifikanzen von $p < 0,05$ - $< 0,001$). Untersucht man LPS O11, fand sich ein signifikant hemmender Effekt von SP-D auf die TNF α -Ausschüttung bei Vergleich aller eingesetzten Konzentrationen mit der Kontrolle ($p < 0,001$).

Einen ebenso hemmenden, jedoch nicht signifikanten Effekt auf die TNF α -Ausschüttung zeigte SP-D bei Zugabe zu LPS O6, O8. In einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ zeigt SP-D bei LPS O5 einen stimulierenden Effekt. Bei LPS O10, O13 und O14 beeinflusst die Zugabe von SP-D die TNF α -Ausschüttung nicht (Abb. 20).

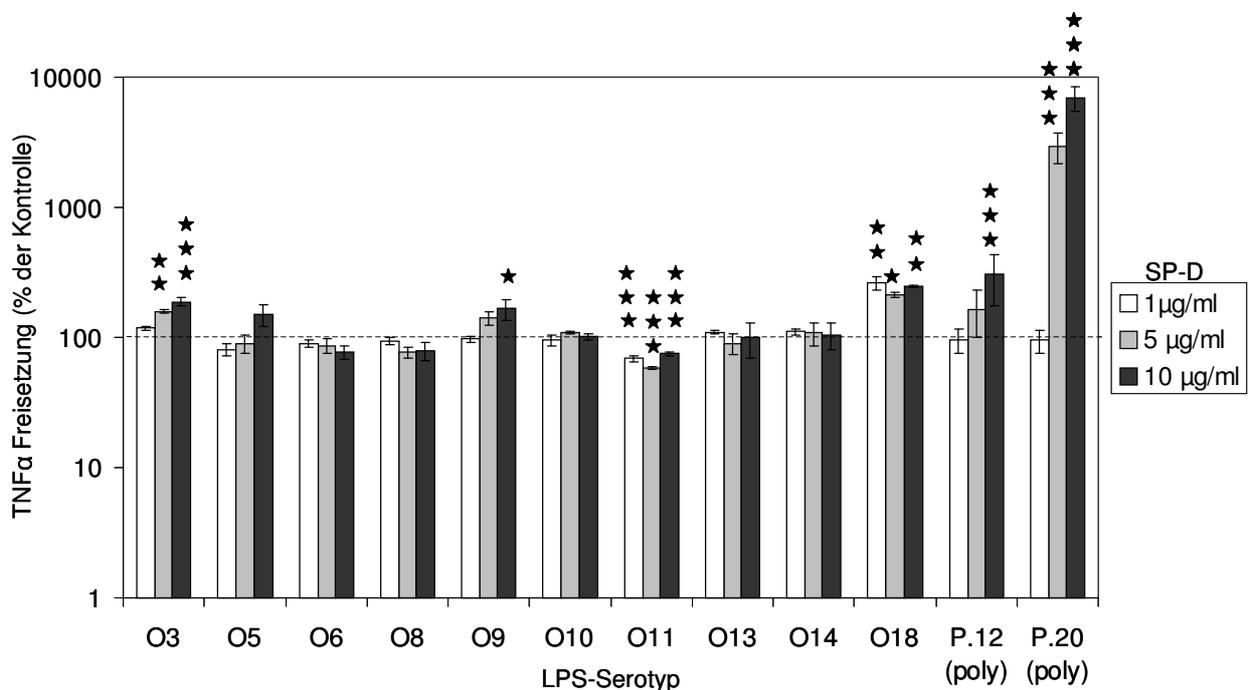


Abbildung 20: Effekte von SP-D auf die TNF α -Stimulation der verschiedenen LPS-Präparationen. Differenzierte MM6-Zellen wurden 6 Stunden mit aufgereinigten LPS-Präparationen unter Zugabe von SP-D in aufsteigender Konzentration stimuliert. Danach wurde im Überstand der TNF α -Gehalt mit einem Bioassay (A9-Fibroblasten) bestimmt. Die TNF α -Ausschüttung wurde in Prozent der Kontrolle (ohne SP-D) angegeben. Der Einfluß des Lösungsmittels (TBS/EDTA) wurde herausgerechnet indem die alleinige Stimulation durch Lösungsmittel als Bezugspunkt genommen wurde. Die Werte der Balken setzen sich aus dem Mittelwert von je 3-7 Messungen zusammen. Die Sterne geben die Signifikanz an (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$).

3.14 Surfactantlipide hemmen die durch *P. aeruginosa* induzierte Stimulation monozytärer Zellen und modulieren die Effekte von SP-A und SP-D

Der Surfactant setzt sich aus hydrophilen und hydrophoben Komponenten zusammen. Den Großteil der hydrophoben Bestandteile bilden die Surfactantlipide. Daher nahmen wir an, dass auch die unterschiedliche Zusammensetzung der Lipide und Proteine die Immunantwort entscheidend modulieren kann.

Hierfür untersuchten wir die Wirkung einer in der Klinik eingesetzten Phospholipidfraktion des natürlichen Surfactant aus Rinderlunge (Alveofact[®]) auf 8 vitale Stämme von *P. aeruginosa* und 9 Präparationen von glattem und rauem LPS aus *P. aeruginosa*. Die Freisetzung von TNF α durch MM6-Zellen bei sämtlichen Stämmen der vitalen *P. aeruginosa* wurde durch Alveofact[®] in einer Verdünnung von 4% im Kulturmedium gehemmt (entspricht einer Konzentration von 1,6 mg/ml). Dieser Effekt war dosisabhängig, beginnend bei einer Verdünnung von 0,5%. Zwischen den verschiedenen „smooth“ und „rough“ Stämmen zeigte sich darin kein Unterschied.

Durch die Zugabe von SP-A in der Konzentration 10 μ g/ml war der hemmende Einfluss von Alveofact[®] signifikant reversibel bei 3 Stämmen (*Psae.* 8, 12: $p < 0,05$; *Psae.* 11: $p < 0,001$), nur teils reversibel bei 4 Stämmen (*Psae.* 2, 5, 15, 20: nicht signifikant). Allein bei *P. aeruginosa* 14 wurde durch die Zugabe von SP-A sowohl mit als auch ohne Alveofact[®] die TNF α -Ausschüttung nicht beeinträchtigt (Abb. 21). Im Gegensatz dazu zeigten sich beim Zusatz von Alveofact[®] zum Versuchsansatz der mit vitalen *P. aeruginosa* stimulierten MM6-Zellen mit SP-D keine Beeinflussung der TNF α -Ausschüttung im Vergleich zur Alveofact[®]-Behandlung alleine (Abb. 21).

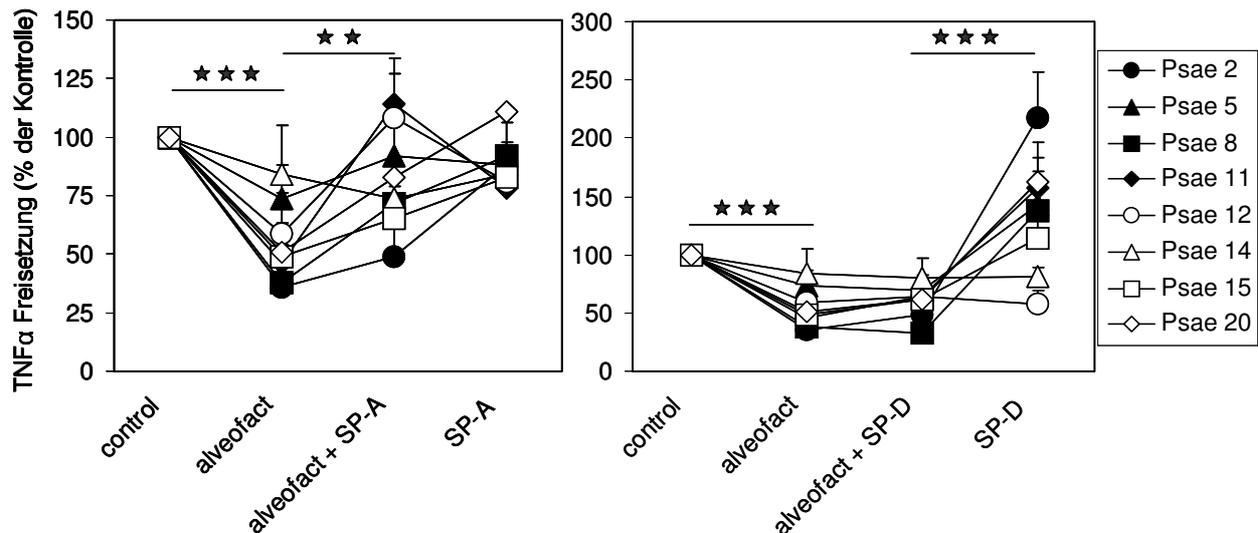


Abbildung 21: Surfactant und seine Lipide reduzieren die TNF α -Freisetzung durch vitale *P. aeruginosa* aus MM6-Zellen. Differenzierte MM6-Zellen wurden mit vitalen *P. aeruginosa* mit/ohne Zusatz von natürlichem Rindersurfactant (Alveofact®, endgültige Verdünnung 4%) kombiniert mit SP-A oder SP-D (10 μ g/ml) stimuliert. Nach 6 Stunden wurde der Überstand abgenommen, die TNF α -Aktivität im A9 Zellassay bestimmt und als Prozent der Kontrolle angegeben. Die verwendete Menge an Alveofact beeinträchtigte den A9 Zellassay nicht in seiner Sensitivität. Die statistische Analyse wurde über den Fisher-PLSD für alle Stämme einzeln und zusammen angewendet (*** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,05$).

3.15 Surfactantlipide hemmen die durch *P. aeruginosa*-LPS induzierte Stimulation monozytärer Zellen und modulieren die Effekte von SP-A und SP-D

Wie auch bei den vitalen Stämmen von *P. aeruginosa* zeigte die Zugabe von Alveofact® zur Stimulation der MM6-Zellen mit „smooth“ und „rough“ LPS einen signifikant hemmenden Effekt auf die TNF α -Freisetzung. Die statistische Auswertung aller LPS Präparationen zusammen zeigte keinen signifikanten stimulierenden oder hemmenden Effekt durch die Zugabe von SP-A auf die Ausschüttung von TNF α . Jedoch findet sich bei genauer Betrachtung der LPS Präparationen, bei zwei LPS-Präparationen von *P. aeruginosa* ein deutlich stimulierender Effekt durch die Zugabe von SP-A zum Versuchsansatz mit Alveofact® und LPS (LPS O10 und polyagglutinierendes, raues LPS von *P. aeruginosa* 20) (Abb. 22).

Bei Zugabe von SP-D zum Versuchsansatz mit Alveofact® zeigte sich eine deutliche Zunahme der TNF α -Ausschüttung durch polyagglutinierendes LPS des Stammes *P. aeruginosa* 20, außerdem eine weniger signifikante Steigerung der Freisetzung von TNF α bei der Präparation eines „smooth“ LPS vom Typ O10. Eine verwendete Herstellung eines „rough“ LPS von *P. aeruginosa* 12 wurde in ihrer TNF α -Ausschüttung durch den gleichzeitigen Zusatz von Alveofact® und SP-D gehemmt ($p=0,018$), durch die alleinige Zugabe von SP-D jedoch deutlich gesteigert (Abb. 22).

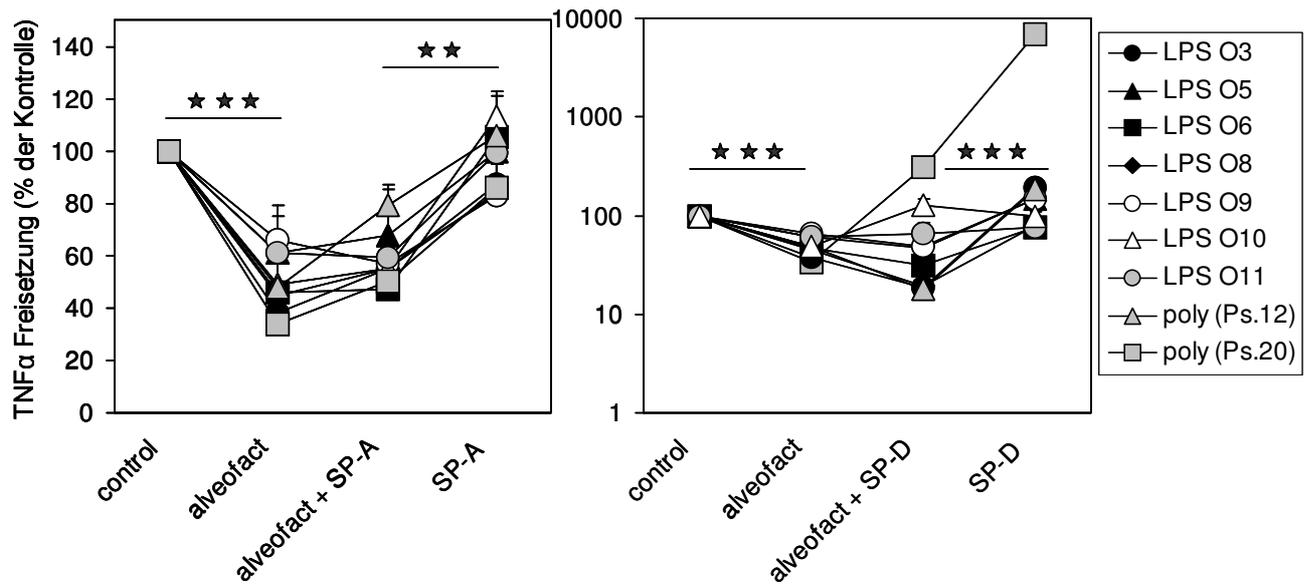


Abbildung 22: Surfactant und seine Lipide reduzieren die TNF α -Freisetzung durch *P. aeruginosa*-LPS aus MM6-Zellen. Differenzierte MM6-Zellen wurden mit *P. aeruginosa* LPS (Isolierung siehe Material und Methoden) mit/ohne Zusatz von natürlichem Rindersurfactant (Alveofact®, endgültige Verdünnung 4%) kombiniert mit SP-A oder SP-D (10 μ g/ml) stimuliert. Nach 6 Stunden wurde der Überstand abgenommen, die TNF- Aktivität im A9 Zellassay bestimmt und als Prozent der Kontrolle angegeben. Die verwendete Menge an Alveofact beeinträchtigte den A9 Zellassay nicht in seiner Sensitivität. Die statistische Analyse wurde über den Fisher-PLSD für alle LPS einzeln und zusammen angewendet (*** =p < 0,001, ** =p < 0,01).

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen der chronischen pulmonalen Infektion von Patienten mit CF kommt es häufig zur Besiedlung mit *P. aeruginosa*. Es gibt Hinweise darauf, dass die pulmonalen Surfactantproteine SP-A und SP-D die Immunantwort der Lunge auf verschiedenen Mikroorganismen modulieren können.

In dieser Studie wurde untersucht, wie *P. aeruginosa*, und aus der Zellwand von *P. aeruginosa* aufgereinigtes LPS, die monozytären Zelllinien zur Ausschüttung von TNF α anregen. Des weiteren untersuchten wir, welchen Einfluss SP-A und SP-D auf die Abwehr von *P. aeruginosa* haben. Wir konnten zeigen, daß die verschiedenen Bakterien und ihr LPS die monozytären Zellen unterschiedlich stark stimulieren. Außerdem konnten wir zeigen, dass SP-A und SP-D die *P. aeruginosa* induzierte TNF α -Sekretion durch humane monozytäre Zellen unterschiedlich modulieren. SP-D zeigt einen deutlicheren Effekt, der sich in einer zusätzlichen Stimulation der TNF α -Ausschüttung äußert. SP-A zeigt einen geringeren modulierenden Effekt auf die durch *P. aeruginosa* induzierte TNF α -Sekretion. Weiteren entscheidenden Einfluss auf die TNF α -Ausschüttung haben zudem die Surfactant assoziierten Lipide sowohl allein, als auch im Verbund mit den Surfactantproteinen.

4.2 Variation des Effekts von SP-A und SP-D in Abhängigkeit von Extraktionsform und Zelllinie

Sano und Kollegen zeigten, dass SP-A keinen Effekt auf die TNF α -Sekretion von U937-Zellen bei Stimulation durch „rough“ LPS hat, bei „smooth“ LPS die Sekretion von TNF α jedoch hemmt (Sano et al., 1999). Dies geschieht durch eine Hemmung der CD14-Bindung, des LPS-Rezeptors auf den Makrophagen, an „smooth“ LPS. Die CD14-Bindung an „rough“ LPS dagegen ist durch SP-A vermehrt. SP-D hingegen hemmt die CD14-Bindung von „smooth“ und „rough“ LPS (Sano et al., 2000). Für die entsprechenden Zell-Experimente wurde von Sano die humane monozytäre Zelllinie U937 verwendet. In unseren Vorversuchen stellten wir den Versuch mit den Zelllinien U937, MM6 und THP-1 nach, um die Allgemeingültigkeit für verschiedene Makrophagen-ähnliche-Zelllinien zu überprüfen. Wir verwendeten hierzu

ansteigende Konzentrationen von SP-A und SP-D, die wir jeweils mit der Kontrolle (ohne Zugabe von Surfactantprotein) verglichen. Wir konnten jedoch den Effekt von SP-A, so wie er in den Experimenten von Sano festgestellt wurde, nicht zeigen. Dies liegt am wahrscheinlichsten an der Art des verwendeten SP-A. In den Experimenten von Sano und Kollegen wurde SP-A aus der Lavage von Rattenlungen verwendet, welches mit Butanol extrahiert wurde. In unseren Experimenten verwendeten wir dagegen rekombinantes SP-A und SP-D, welches aus der Lavage humaner Patienten mit alveolärer Proteinose gewonnen wurde.

Die Ergebnisse unserer Vorversuche weisen außerdem darauf hin, daß der Effekt von SP-A und SP-D auch von der verwendeten Zelllinie abhängt. Je nach verwendeter Zelllinie, MM6, U937 und THP-1, zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse. Dies sahen wir auch in der Literatur bestätigt. Murakami und Sano zeigten unter Verwendung von U937-Zellen einen hemmenden Effekt von SP-A auf die durch LPS induzierte TNF α -Sekretion (Murakami et al., 2002; Sano et al., 1999). Auf THP-1-Zellen stimulierte SP-A die TNF α -Ausschüttung (Wang et al., 2000; Kremlev et al., 1997).

4.3 Vitale *P. aeruginosa* unterscheiden sich in ihrer TNF α -stimulierenden Kapazität

In unseren Hauptversuchen untersuchten wir mehrere Isolate von *P. aeruginosa* verschiedener Patienten. Wir betrachteten sie hinsichtlich ihrer Stimulationsfähigkeit, um die Variabilität der unterschiedlichen Stämme während der chronischen Infektion festzustellen. *P. aeruginosa* können im Rahmen der Besiedlung den Phänotyp von nicht-mukoid zu mukoid wechseln (Ojeniyi, 1994; Wilms, 2001; Goldberg and Pler, 1996). Außerdem ändern die *P. aeruginosa* die Zusammensetzung der O-Seitenketten und können dadurch in der Phase der chronischen Entzündung die Abwehrmechanismen des Patienten umgehen (Goldberg and Pler, 1996). Zudem wurde kürzlich beschrieben, daß die Mikroumgebung in der Lunge von Patienten mit CF die Ausbildung von *P. aeruginosa*-Varianten begünstigt, die eine stärkere Zytokin-stimulierende Aktivität haben (Ernst et al., 1999). Wir nahmen an, dass sich daher die Stämme in ihrer Stimulationsfähigkeit deutlich unterscheiden würden. Bei dem Vergleich verschiedener Präparationen vitaler *P. aeruginosa* auf MM6 zeigten sich Unterschiede in der Stimulation um den Faktor 21. In unserer Studie lässt sich kein direkter Zusammenhang zwischen der Stimulationsfähigkeit der TNF α -Ausschüttung und den serologischen Eigenschaften der vitalen *P. aeruginosa* („smooth“ oder „rough“) herstellen. Wir nehmen an, dass der stimulierende Bestandteil der vitalen Bakterien innerhalb der Zellmembran verborgen ist und erst bei Zelllyse

frei wird. Um die Stimulationsexperimente zu vereinheitlichen, verwendeten wir für die Stimulationsexperimente mit SP-A-Zugabe eine *P. aeruginosa*-Konzentration zwischen 10^6 und 10^7 CFU/ml, in der bei sämtlichen Stämmen eine ausreichend starke Stimulation vorhanden war.

4.4 Unterschiede im Vergleich von LPS und vitalen Bakterien

Um die variable Stimulationsfähigkeit der isolierten LPS von *P. aeruginosa* zu untersuchen, testeten wir sie allein auf monozytären Zellen aus. LPS aus der Zellwand gramnegativer Bakterien ist ein starker Stimulus auf monozytäre Zellen zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Die verschiedenen LPS-Präparationen zeigen eine deutlich unterschiedliche Fähigkeit zur Stimulation der TNF α -Ausschüttung durch MM6-Zellen. Sie unterschieden sich bis um den Faktor 3000, im Vergleich dazu unterschieden sich die Präparationen der vitalen *P. aeruginosa* nur um den Faktor 21 in ihrer Stimulationsfähigkeit. Die Hauptkomponente des LPS, welche die Zytokinausschüttung anregt, ist bei vitalen *P. aeruginosa* innerhalb der Zellmembran verborgen. Erst durch Lyse der Zelle und die damit verbundene Freisetzung von LPS wird die Zytokinausschüttung vermehrt angeregt. Wir gehen davon aus, daß wir deshalb keinen Zusammenhang zwischen vitalen *P. aeruginosa* und der dazugehörigen LPS-Präparation zeigen konnten. Ein weiterer Grund für die unterschiedliche Stimulationsfähigkeit könnte in der unterschiedlichen Interaktion der langen LPS-Seitenkette des „smooth“ und der trunkierten „rough“ Variante mit membranständigen Rezeptoren, sowie in der Interaktion mit Toll-like Rezeptoren, liegen (Guillot et al., 2002; Murakami et al., 2002).

4.5 Rekombinantes SP-A beeinflusst die Stimulation der monozytären Zellen nicht

In unseren Vorexperimenten untersuchten wir den Effekt von SP-A allein auf die TNF α -Sekretion durch monozytäre Zellen. Eine Erklärung für die fehlende Beeinflussung des Stimationsversuches durch SP-A alleine und die Unterschiede der verschiedenen SP-A Präparationen untereinander könnte die Art der Herstellung sein. SP-A wurde rekombinant hergestellt oder aus der Lavage von Patienten mit pulmonaler Alveolärer Proteinose (PAP) gewonnen. Des Weiteren gibt es verschiedene Isolationsmethoden um SP-A aus Lavage zu gewinnen. SP-A kann entweder durch isoelektrische Fokussierung oder durch Butanolextraktion isoliert werden. Während der Aufreinigung der Surfactantproteine kann zudem eine Verunreinigung durch LPS eintreten. Die stimulierende Potenz des von uns anfangs

verwendeten SP-A von Reid, das mittels Butanolextraktion aus Lavage von PAP Patienten isoliert wurde, liegt aller Wahrscheinlichkeit nach an der Kontamination mit LPS, insbesondere, da der nachgewiesene LPS-Anteil mit ca. 300 ng/ml sehr hoch lag. Im Widerspruch hierzu stehen die Experimente von Kremlev und Kollegen, die trotz nachgewiesenem niedrigen Gehalt an LPS einen stimulierenden Effekt des SP-A sahen (Kremlev and Phelps, 1994; Kremlev et al., 1997). Bei ihren Experimenten wurde als Isolierungstechnik für SP-A die isoelektrische Fokussierung verwendet.

Ein Grund für den nicht stimulatorischen Effekt der von uns verwendeten SP-A Präparation von Prof. Haagsman könnte die Extraktionsmethode durch Butanol sein. Van Iwaarden und Mitarbeiter stellten in Isolationsexperimenten fest, dass SP-A seine Makrophagen stimulierende Eigenschaft bei der Butanol-Extraktion verliert (van Iwaarden et al., 1995). Laut van Iwaarden könne man diese erhalten, wenn man SP-A in zwei Schritten isoliert, also zuerst mit N-octyl β -D-glucopyranoside extrahiert und dann durch Kationen-Austausch-Chromatographie aufreingt. Diese Ergebnisse decken sich auch mit den Resultaten von McIntosh und Sano, die in ihren Versuchen Butanol-Extrahiertes SP-A verwendeten, welches bei dessen alleiniger Zugabe zum Versuchsansatz keine signifikanten Effekte zeigte (McIntosh et al., 1996; Sano et al., 1999).

4.6 Beeinflussung des Stimulationsansatzes durch SP-D

In weiteren Vorexperimenten untersuchten wir den Effekt von SP-D allein auf die TNF α -Sekretion durch monozytäre Zellen. SP-D zeigte eine gewisse eigenstimulierende Potenz. In den von uns verwendeten SP-D Präparationen lag nur eine geringe LPS-Kontamination vor. Diese Menge korrelierte mit der TNF α stimulierenden Kapazität der einzelnen Chargen. Nur bei sehr hohen Konzentrationen stimulierte SP-D die TNF α -Ausschüttung durch MM6-Zellen. Dieser Effekt ist am ehesten auf die LPS-Kontamination zurückzuführen. In den von uns verwendeten Konzentrationen war die LPS-Kontamination jedoch vernachlässigbar, da sie mit 0,005 bis 0,32 ng/ μ g SP-D unterhalb des Bereichs lag, der die verwendeten monozytären Zellen stimulierte.

4.7 Modulation der TNF α -Sekretion von *P. aeruginosa* durch SP-A

Im Gegensatz zu in der Literatur beschriebenen Effekten von SP-A auf die durch Bakterien induzierte TNF α -Sekretion sahen wir in unseren Versuchen mit vitalen *P. aeruginosa* nur in

2/14 Fällen einen signifikanten Effekt von SP-A. Bei dem Stamm *P. aeruginosa* 11 mit glattem LPS vom Serotyp O10 sahen wir einen hemmenden Effekt. Bei *P. aeruginosa* 22, der zu den rauen Stämmen gehört, fand sich ein stimulierender Effekt. Dieser signifikante Effekt wird in der Zusammenschau etwas deutlicher. Hier findet sich beim zusammenfassenden Vergleich aller *P. aeruginosa* vom Serotyp O10 ein hemmender Effekt. Bei der Zusammenschau aller rauen *P. aeruginosa* ergab sich ein stimulierender Effekt. Dieser wenn auch nur geringe Effekt deckt sich mit den Ergebnissen von Sano und Kollegen. Sano präsentierte in Versuchen mit U937-Zellen und Ratten Makrophagen den inhibierenden Effekt des SP-A bei Versuchen mit „smooth“ LPS, und zeigte die Aufhebung dieses Effekts bei „rough“ LPS (Sano et al., 1999). Sie machten dafür die unterschiedliche Bindung an CD14, welches die Interaktion von LPS an immunkompetente Zellen vermittelt, verantwortlich. Aufgrund der Literaturstellen über SP-A und seine immunmodulierende Wirkung hätten wir einen eindeutigeren Effekt erwartet. Für den hemmenden Effekt von SP-A auf die Entzündungsreaktion durch vitale Erreger finden sich folgende Hinweise: Harrod und Kollegen fanden ebenfalls in vivo bei SP-A (+/+) Mäusen eine geringere Entzündungsreaktion nach *Adenovirus*-Infektion (Harrod et al., 1999). Das Vorhandensein von SP-A unterdrückte hier in vivo die Entzündungsreaktion. Rousseau und Kollegen wiesen den hemmenden Effekt von rekombinantem humanem SP-A und Kaninchen SP-A bei *Candida*-Infektion nach (Rousseau et al., 1999).

Im Gegensatz dazu finden sich in der Literatur auch Hinweise für einen stimulierenden Effekt von SP-A auf die TNF α -Ausschüttung der Makrophagen. Kremlev zeigte 1997 die stimulierende Potenz von SP-A alleine auf die Ausschüttung von TNF α durch THP-1-Zellen (Kremlev et al., 1997). Wang beschrieb in Experimenten mit THP-1-Zellen den stimulierenden Effekt von SP-A (Wang et al., 2000). In diesem Experiment wurden die verschiedenen Genprodukte SP-A 1 und SP-A 2, aus denen sich das SP-A in der Lunge zusammensetzt, gegen das SP-A von PAP-Patienten als Kontrolle getestet. Innerhalb dieser Gruppe variierte die Stimulationsfähigkeit je nach Zusammensetzung des Genprodukts. Weikert bewies in seinen Experimenten mit Mykobakterien, dass SP-A (von PAP-Patienten, Butanol-extrahiert) einen zusätzlichen stimulierenden Effekt auf die Ausschüttung von TNF α und Stickstoffmonoxid durch Ratten-Makrophagen hat (Weikert et al., 2000).

Zusammengetragen könnten diese Unterschiede in der beschriebenen Beeinflussung der Zytokinausschüttung durch SP-A im Vergleich zu unseren Ergebnissen verschiedene Gründe haben. Die verschiedenen Experimente wurden mit unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt.

Wir verwendeten für unsere Experimente MM6-Zellen die von anderen Gruppen zuvor nicht verwendet wurden. Sie ist die am stärksten differenzierte humane monozytäre Zelllinie, die hoch LPS-sensibel reagiert, und hatte sich in unseren Vorexperimenten bewährt (Bufler et al., 2003). Teils wurde in der Literatur rekombinantes, teils humanes SP-A von Patienten mit alveolärer Proteinose verwendet, welches unterschiedlich isoliert wurde und daher eine unterschiedliche biologische Aktivität zeigte (Kreutzer et al., 1979). Vor allem wurden verschiedene Bakterien und Viren zur Stimulation verwendet, die sich in ihren Oberflächenstrukturen unterscheiden. Bei den von uns verwendeten vitalen *P. aeruginosa* konnte die Tendenz der Beeinflussung, wie sie zuvor von Sano beschrieben wurde nur bei einigen Stämmen nachgewiesen werden. Bei den anderen *P. aeruginosa* könnten geringe Unterschiede in den Eigenschaften ihrer Typisierung wie z.B. der Pyocintyp, ihr geringes Ansprechen erklären. Pyocin ist ein von *P. aeruginosa* produziertes Protein, das sich gegen andere Bakterien richtet, und damit einen Überlebensvorteil sichert. Ausserdem könnten noch zusätzliche Proteine der äußeren Membran der Bakterien das Ansprechen der Makrophagen auf eine modulierende Wirkung von SP-A beeinflussen.

4.8 Signifikante Modulation der TNF α -Sekretion von *P. aeruginosa* durch SP-D

Die modulierende Potenz von SP-D untersuchten wir in Experimenten mit 14 verschiedenen Stämmen vitaler *P. aeruginosa*. Bei Versuchen mit 5/14 der *P. aeruginosa* Stämme zeigte SP-D eine signifikante stimulierende Potenz, bei 6/14 weiteren Stämmen zeigte SP-D nur eine tendenzielle Stimulation der TNF α -Sekretion. Bei 2/14 Stämmen bewirkte SP-D hingegen eine signifikante Inhibition der TNF α -Ausschüttung. Nur bei 1/14 Stämmen hatte SP-D keinen Effekt auf die TNF α -Freisetzung. In der Literatur finden sich zur Beeinflussung der TNF α -Sekretion durch SP-D nur wenige Aussagen. Bezüglich der Beeinflussung der Phagozytose durch SP-D liegen jedoch bereits verschiedene Ergebnisse vor. Restrepo beschrieb, dass SP-D stimulierend auf die Phagozytose von *P. aeruginosa* wirkt (Restrepo et al., 1999). Hingegen zeigte Ferguson, dass SP-D die Phagozytose von Mykobakterien hemmt (Ferguson et al., 1999).

Bisher wurde nicht konsequent untersucht, inwieweit sich die Wirkung von SP-D bei verschiedenen Stämmen von *P. aeruginosa* unterscheidet. Daher konzentrierten wir uns in unseren Versuchen auf diese Fragestellung. In der Zusammenschau zeigte sich, dass SP-D besonders bei den rauen Stämmen eine deutliche zusätzliche stimulierende Wirkung hat. Bei 2/5 „rough“ *P. aeruginosa* zeigte sich eine signifikant erhöhte TNF α -Ausschüttung, bei 2/5

weiteren war eine stimulierende Tendenz, und nur bei 1/5 rauhen Stämmen eine gering signifikante inhibierende Wirkung zu beobachten.

Raue *P. aeruginosa* sprechen also deutlicher auf eine modulierende Wirkung von SP-D an. Wie Kuan und Kollegen zeigten, bindet SP-D vor allem an Kern-terminale Glucose oder Heptose Reste (Kuan et al., 1992). Diese werden bei rauhen Stämmen vermehrt exponiert. Dies führte zu einer verstärkten Agglutination zwischen „rough“ Bakterien und SP-D. Bei glatten Bakterien sind diese Zuckerreste von den langen Polysaccharidketten der Bakterien maskiert. Wir nehmen an, dass SP-D durch seine Bindung als ein Antigen-präsentierendes Protein agiert, welches vor allem raues, aber auch glattes LPS dem LPS-Rezeptor-Komplex präsentiert und damit die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine verstärkt.

4.9 SP-A moduliert die TNF α -Sekretion von *P. aeruginosa*-LPS nicht signifikant

SP-A zeigte bei den verschiedenen LPS-Präparationen von *P. aeruginosa* keinen einheitlichen oder signifikanten Effekt auf die TNF α -Ausschüttung. Bei 5/12 LPS war die Tendenz der Beeinflussung der TNF α -Sekretion inhibierend, bei 2/12 stimulierend, auf 4/12 der LPS-Präparationen schien SP-A keinen Effekt zu haben, und bei 1/12 LPS war der Effekt konzentrationsabhängig inhibierend oder stimulierend. In der Arbeit von Sano und Kollegen wurde *E.coli*-LPS verwendet und gezeigt, dass SP-A die TNF α -Ausschüttung bei „smooth“ LPS hemmt, bei „rough“ LPS dagegen nicht. Die Autoren machten dafür die unterschiedliche Bindung an den CD14 verantwortlich. Bei vitalen *P. aeruginosa* sahen wir bei wenigen Stämmen eine Bestätigung der von Sano postulierten These. Bei *P. aeruginosa*-LPS bestätigt sich die These zur gegensätzliche Beeinflussung der Zytokinantwort bei „smooth“ und „rough“ LPS durch SP-A nicht (Sano et al., 1999).

Sano hatte für seine Experimente LPS von *E. coli* verwendet. Die Unterschiede im Aufbau, aber auch die unterschiedliche Isolierung von *E. coli*- und *P. aeruginosa*-LPS könnten der Grund für die fehlende Übereinstimmung unserer Ergebnisse mit denen von Sano sein. Nachdem die Interaktion von SP-A außerdem kritisch von der Bindung an die Lipid A-Komponente abhängt, könnte eine Maskierung oder Zerstörung dieser Komponente des LPS ebenfalls den fehlenden Einfluss von SP-A erklären (van Iwaarden et al., 1994; Hickling et al., 1998; Kalina et al., 1995). Bei rauem LPS ist dieser Bestandteil durch die kürzeren Glucosereste besser zugänglich als bei den von uns hauptsächlich verwendeten Präparationen von glattem LPS.

Im Gegensatz zu den von uns nur geringen Effekten von SP-A finden sich in der Literatur bezüglich der Beeinflussung der LPS induzierten Entzündungsreaktion Hinweise sowohl für hemmende als auch stimulierende Effekte des Surfactantproteins. Murakami und Kollegen wiesen in ihren Versuchen die hemmende Wirkung von SP-A auf die TNF α -Ausschüttung durch U937-Zellen mit SP-A von Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose nach, und zeigten eine direkte Interaktion mit dem löslichen Toll-like-Rezeptor 2 auf. Es wurde deshalb spekuliert, daß die Bindung von SP-A mit dem löslichen Toll-like-Rezeptor 2, aber auch an Peptidoglykan für diesen Effekt verantwortlich ist (Murakami et al., 2002). Borron und Kollegen wiesen die hemmenden Eigenschaften des SP-A in SP-A wildtyp (+/+) und SP-A (-/-) „knockout“-Mäusen nach, die sie intratracheal mit LPS von *E. coli* stimulierten (Borron et al., 2000). Diese SP-A-„knockout“-Mäuse, die kein SP-A besitzen, zeigten eine deutlich ausgeprägtere pulmonale Entzündungsreaktion. Hickling zeigte den inhibierenden Effekt von humanem SP-A (isoliert von Alveolärer Proteinose Patienten) auf die Stimulation von peripheren mononukleären Blut-Zellen durch LPS eines *P. aeruginosa*-stammes (Hickling et al., 1998), wie ihn schon McIntosh und Kollegen 1996 bei „smooth“ *E. coli* LPS und alveolären Makrophagen gesehen hatten (McIntosh et al., 1996). Für den stimulierenden Effekt von SP-A findet sich, zusätzlich zu den in Kapitel 4.7 genannten, folgende Literaturstelle zur Beeinflussung der Entzündungsreaktion bei Stimulation durch LPS. Guillot und Kollegen wiesen in Experimenten mit Makrophagen aus Knochenmark (BMDM) von Mäusen und U937-Zellen die Wichtigkeit des Toll-Like-Rezeptor 4 für die immunstimulierende Aktivität des SP-A nach (Guillot et al., 2002). Sie zeigten, dass SP-A alleine bei vorhandenem, funktionierendem Toll-like-Rezeptor 4 Komplex auf den Makrophagen diese konzentrationsabhängig aktiviert.

4.10 SP-D moduliert signifikant die TNF α -Sekretion von *P. aeruginosa*-LPS

SP-D zeigte im Vergleich zu SP-A eine deutlichere Beeinflussung der durch verschiedene „smooth“ LPS ausgelösten Zytokinausschüttung. Sie war bei 6/12 LPS-Präparationen signifikant. Bei 1/12 Präparationen fand sich eine signifikante Hemmung, bei 5/12 eine signifikante Stimulation. Bei 1/12 LPS Präparationen zeigte die Zugabe von SP-D zum Versuchsansatz tendenziell einen stimulierenden Effekt auf die TNF α -Sekretion, bei 2/12 eine inhibierende Tendenz, bei 3 LPS-Präparationen zeigte sich keine Beeinflussung. Interessanterweise zeigte SP-D auf beide verwendeten „rough“ LPS eine eindeutige stimulierende Wirkung. Der deutlichere Effekt von SP-D auf raues LPS wurde bereits in Punkt

4.8 diskutiert. Die Wirkung von SP-D auf das von uns verwendete „smooth“ LPS lässt keinen eindeutigen Schluß zu; es wirkt teils hemmend, teils stimulierend. Bei den Versuchen von Sano und Kollegen hatte SP-D die Bindung von CD 14 an „smooth“ und „rough“ LPS gehemmt (Sano et al., 2000). Möglicherweise liegt die unterschiedliche Beeinflussung von SP-D in unseren Versuchen an minimalen Veränderungen in der Zusammensetzung des O-Antigens von „smooth“ *P. aeruginosa*-LPS, zum Beispiel in den endständigen Zuckerresten. Um dieses Problem umfassend zu erklären müssen noch eine größere Anzahl an *P. aeruginosa*-Stämmen, aufgeschlüsselt nach dem Serotyp und weiteren Eigenschaften, untersucht werden.

Die unterschiedliche Stimulation durch vitale Bakterien, LPS und die Surfactanproteine könnte außerdem durch variable Interaktion der Bakterienbestandteile mit Toll-Like Rezeptoren bedingt sein. Toll-Like-Rezeptor 2 scheint für die inhibierenden Effekte verantwortlich zu sein und Toll-Like-Rezeptor 4 für die stimulierenden (Guillot et al., 2002; Murakami et al., 2002). Eventuell sind die dazu nötigen Zellbestandteile der Bakterien durch die Aufreinigung zerstört oder die Rezeptoren in mangelnder Expression auf den monozytären Zelllinien vorhanden.

4.11 Signifikante Modulation und Hemmung der TNF α -Sekretion durch Surfactantlipide

In vivo sind SP-A und SP-D Teil des Surfactant, der das Bronchoalveolarsystem auskleidet. Es ist bekannt, daß Surfactantlipide hemmend in die Immunmodulation der Entzündungsreaktion der Lunge eingreifen. Von verschiedenen Forschungsgruppen wurde unabhängig voneinander gezeigt, dass Surfactantlipide bei monozytären Zellen die TNF α -Sekretion hemmen, die durch Stimulation mit LPS oder vitalen *Staphylokokken*, *Pneumokokken* oder auch *Mykoplasmen* ausgelöst wurde (Antal et al., 1996; Thomassen et al., 1994; Allen et al., 1995; Baur et al., 1998; Talati et al., 1998). Dass Surfactantlipide teils den stimulierenden Effekt der Surfactantproteine aufheben können, zeigten bereits Kremlev und Kollegen (Kremlev et al., 1997). Diese Eigenschaft wurde auch bezüglich der Beeinflussung der Phagozytose von Streptokokken durch alveoläre Makrophagen bestätigt. Durch Surfactantlipide wurde der stimulierende Effekt von SP-A aufgehoben (Golioto and Wright, 2002). Diese Eigenschaft macht man sich nicht nur bei der Surfactantapplikation in der Klinik im Rahmen des kindlichen Atemnotsyndroms zu nutze. Um die Fähigkeiten der Modulation der Immunantwort durch SP-A und SP-D realitätsgetreuer zu betrachten, untersuchten wir die Surfactantproteine im Verbund mit Surfactanlipiden. In vivo liegt Surfactant immer als Verbund aus Surfactantlipiden und -

proteinen vor. In vitro ist es möglich die einzelnen Komponenten des Surfactant einzeln zu untersuchen.

Behalten die Surfactantproteine A und D ihre Funktion im Verbund mit den Surfactantlipiden? Für unsere Experimente verwendeten wir Alveofact[®], eine Aufbereitung von Rinder-Surfactant zur Anwendung bei IRDS. Alveofact[®] enthält selbst weder SP-A noch -D, jedoch die hydrophoben Surfactantproteine SP-B und -C. Für unsere Experimente verwendeten wir Alveofact[®] in einer Konzentration, die 25-75% der TNF α -Sekretion durch LPS oder vitale *P. aeruginosa* hemmte. Wir zeigten in unseren Experimenten, dass die Surfactantlipide signifikant die durch LPS oder vitale *P. aeruginosa* induzierte TNF α -Ausschüttung hemmen. Dies geschieht möglicherweise durch eine Hemmung der NF- κ B Aktivierung und die Herunterregulierung der Transkription spezifischer mRNA und scheint somit vom zugrunde liegenden Stimulus unabhängig zu sein (Antal et al., 1996; Baur et al., 1998).

Interessanterweise zeigte sich durch Zugabe von SP-A eine Umkehrung des inhibierenden Effekts von Alveofact[®] bei 7/8 Stämmen vitaler *P. aeruginosa* und - weniger signifikant - auch bei 7/9 LPS Präparationen von *P. aeruginosa*-LPS. Im Vergleich zu nicht behandelten Zellen blieb die TNF α -Sekretion jedoch trotzdem noch geringer. Surfactantlipide hemmen nicht die Bindung von LPS an SP-A, weshalb eine veränderte Interaktion von Surfactantproteinen und LPS keine Rolle zu spielen scheint (Kalina et al., 1995; Stamme and Wright, 1999). Dies wurde durch die Ergebnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen bestätigt, die die Beeinflussung der Zytokine auf der Ebene der Zytokinexpression und -regulierung sahen (Baur et al., 1998; Antal et al., 1996; Thomassen et al., 1994).

Der Effekt von SP-D, das die *P. aeruginosa* bzw. LPS-induzierte TNF α -Sekretion teils stimulierte, wurde durch den Zusatz der Surfactantlipide aufgehoben. Nur bei einer der Präparationen eines rauen LPS (LPS von *P. aer.* 20) und eines glatten LPS (LPS O10), konnte der stimulierende Effekt noch nach Zugabe der Surfactantlipide nachgewiesen werden. Da jedoch auch bei der Interaktion der Surfactantlipide mit SP-A die Bindung von Surfactantproteinen an LPS oder vitale Bakterien keine Rolle zu spielen scheint, ist dies bei SP-D ebenfalls anzunehmen.

Die Abwehr von Krankheitserregern in der Lunge ist abhängig von der balancierten Zusammensetzung des Surfactant aus Lipiden und Proteinen. Aufgrund unserer Ergebnisse

zeigt sich, dass die Wirkung von SP-A und SP-D nur im Zusammenhang mit den Surfactantlipiden gesehen werden kann.

Es muss sicher noch eine größere Anzahl von genauer differenzierten *P. aeruginosa* untersucht werden, um die stimulierende oder inhibierende Fähigkeit von SP-A und SP-D besser zu verstehen. Von weiteren Versuchen mit „knock-out“ Mäusen für SP-A, SP-D erwarten wir uns eine Bestätigung unserer Ergebnisse bezüglich der unterschiedlichen Beeinflussung der Immunmodulation abhängig vom vorhandenen *P. aeruginosa*stamm. Erst wenn wir die Interaktion der unterschiedlichen Bestandteile des Surfactant noch genauer untersuchen und verstehen, können wir sie in Zukunft eventuell auch therapeutisch zur Immunstimulation oder Inhibition nutzen.

Literaturverzeichnis

- Allen, J.N., Moore, S.A., Pope-Harman, A.L., Marsh, C.B., and Wewers, M.D. (1995). Immunosuppressive properties of surfactant and plasma on alveolar macrophages. *J. Lab. Clin. Med.* *125*, 356-369.
- Antal, J.M., Divis, L.T., Erzurum, S.C., Wiedemann, H.P., and Thomassen, M.J. (1996). Surfactant suppresses NF-kappa B activation in human monocytic cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *14*, 374-379.
- Asher, A., Mule, J.J., Reichert, C.M., Shiloni, E., and Rosenberg, S.A. (1987). Studies on the anti-tumor efficacy of systemically administered recombinant tumor necrosis factor against several murine tumors in vivo. *J. Immunol.* *138*, 963-974.
- Baur, F.M., Brenner, B., Goetze-Speer, B., Neu, S., and Speer, C.P. (1998). Natural porcine surfactant (Curosurf) down-regulates mRNA of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and TNF-alpha type II receptor in lipopolysacchride-stimulated monocytes. *Pediatric Research* *44*, 32-36.
- Borron, P., McIntosh, J.C., Korfhagen, T.R., Whitsett, J.A., Taylor, J., and Wright, J.R. (2000). Surfactant-associated protein A inhibits LPS-induced cytokine and nitric oxide production in vivo. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* *278*, L840-L847.
- Bufler, P., Schmidt, B., Schikor, D., Bauernfeind, A., Crouch, E.C., and Griese, M. (2003). Surfactant Protein A and D Differently Regulate the Immune Response to Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* and Its Lipopolysaccharide. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *28*, 249-256.
- Coyne, C.B., Vanhook, M.K., Gambling, T.M., Carson, J.L., Boucher, R.C., and Johnson, L.G. (2002). Regulation of airway tight junctions by proinflammatory cytokines. *Mol. Biol. Cell* *13*, 3218-3234.
- Crouch, E., Hartshorn, K., and Ofek, I. (2000). Collectins and pulmonary innate immunity. *Immunol. Rev.* *173*, 52-65.
- Crouch, E., Persson, A., Chang, D., and Heuser, J. (1994). Molecular structure of pulmonary surfactant protein D (SP-D). *J. Biol. Chem.* *269*, 17311-17319.
- Crouch, E.C. (1998). Collectins and pulmonary host defense. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *19*, 177-201.
- Dockter, G. and Lindemann, H. (2000). Mukoviszidose. (Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag), pp. 1-166.
- Ernst, R.K., Yi, E.C., Guo, L., Lim, K.B., Burns, J.L., Hackett, M., and Miller, S.I. (1999). Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* *286*, 1561-1565.

- Ferguson, J.S., Voelker, D.R., McCormack, F.X., and Schlesinger, L.S. (1999). Surfactant protein D binds to Mycobacterium tuberculosis bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages. *J. Immunol.* *163*, 312-321.
- Ferro, T.J., Gertzberg, N., Selden, L., Neumann, P., and Johnson, A. (1997). Endothelial barrier dysfunction and p42 oxidation induced by TNF-alpha are mediated by nitric oxide. *Am. J. Physiol* *272*, L979-L988.
- Frankenberger, M., Hofmann, B., Emmerich, B., Nerl, C., Schwendener, R.A., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (1997). Liposomal 1,25 (OH)₂ vitamin D₃ compounds block proliferation and induce differentiation in myelomonocytic leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* *98*, 186-194.
- Galanos, C., Luderitz, O., and Westphal, O. (1969). A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* *9*, 245-249.
- Gamble, J.R., Harlan, J.M., Klebanoff, S.J., and Vadas, M.A. (1985). Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *82*, 8667-8671.
- Ghiara, P., Boraschi, D., Nencioni, L., Ghezzi, P., and Tagliabue, A. (1987). Enhancement of in vivo immune response by tumor necrosis factor. *J. Immunol.* *139*, 3676-3679.
- Goldberg, J.B. and Pler, G.B. (1996). Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharides and pathogenesis. *Trends Microbiol.* *4*, 490-494.
- Golioto, A. and Wright, J.R. (2002). Effects of Surfactant Lipids and Surfactant Protein A on Host Defense Functions of Rat Alveolar Macrophages. *Pediatric Research* *51*, 220-227.
- Griese, M. (1999). Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur. Respir. J.* *13*, 1455-1476.
- Grobe, S., Wingender, J., and Truper, H.G. (1995). Characterization of mucoid Pseudomonas aeruginosa strains isolated from technical water systems. *J. Appl. Bacteriol.* *79*, 94-102.
- Guillot, L., Balloy, V., McCormack, F.X., Golenbock, D.T., Chignard, M., and Si-Tahar, M. (2002). Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* *168*, 5989-5992.
- Harrod, K.S., Trapnell, B.C., Otake, K., Korfhagen, T.R., and Whitsett, J.A. (1999). SP-A enhances viral clearance and inhibits inflammation after pulmonary adenoviral infection. *Am. J. Physiol* *277*, L580-L588.
- Hartshorn, K., White, M.R., Mogue, T., Ligtenberg, T., Crouch, E., and Holmskov, U. (2003). Lung and salivary scavenger receptor glycoprotein-340 contribute to the host defense against influenza A viruses. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* *285*, 1066-1076.
- Hartshorn, K.L., Crouch, E., White, M.R., Colamussi, M.L., Kakkanatt, A., Tauber, B., Shepherd, V., and Sastry, K.N. (1998). Pulmonary surfactant proteins A and D enhance neutrophil uptake of bacteria. *Am. J. Physiol* *274*, L958-L969.

Hickling,T.P., Sim,R.B., and Malhotra,R. (1998). Induction of TNF-alpha release from human buffy coat cells by *Pseudomonas aeruginosa* is reduced by lung surfactant protein A. *FEBS Lett.* 437, 65-69.

Hickman-Davis,J.M., Fang,F.C., Nathan,C., Shepherd,V.L., Voelker,D.R., and Wright,J.R. (2001). Lung surfactant and reactive oxygen-nitrogen species: antimicrobial activity and host-pathogen interactions. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 281, L517-L523.

Hitchcock,P.J., Leive,L., Makela,P.H., Rietschel,E.T., Strittmatter,W., and Morrison,D.C. (1986). Lipopolysaccharide nomenclature--past, present, and future. *J. Bacteriol.* 166, 699-705.

Hoiby,N. and Rosendal,K. (1980). Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients treated at a cystic fibrosis centre. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* [B] 88, 125-131.

Holmskov,U., Lawson,P., Teisner,B., Tornoe,I., Willis,A.C., Morgan,C., Koch,C., and Reid,K.B. (1997). Isolation and Characterization of a New Member of the Scavenger Receptor Superfamily, Glycoprotein-340 (gp-340), as a Lung Surfactant Protein-D Binding Molecule. *J. Biol. Chem.* 272, 13743-13749.

Hoppe,H.J. and Reid,K.B. (1994). Collectins--soluble proteins containing collagenous regions and lectin domains--and their roles in innate immunity. *Protein Sci.* 3, 1143-1158.

Hull,J., South,M., Phelan,P., and Grimwood,K. (1997). Surfactant composition in infants and young children with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 156, 161-165.

Janeway,C.A. and Travers,P. (1997). *Immunologie.* (Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, GmbH), pp. 1-597.

Janeway,C.A., Travers,P., Walport,M., and Shlomchik,M. (2002). *Immunologie.* (Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, GmbH), pp. 1-777.

Kabha,K., Schmegner,J., Keisari,Y., Parolis,H., and Schlepper-Schaeffer,J. (1997). SP-A enhances phagocytosis of *Klebsiella* by interaction with capsular polysaccharides and alveolar macrophages. *Am. J. Physiol* 272, L344-352.

Kalina,M., Blau,H., Riklis,S., and Kravtsov,V. (1995). Interaction of surfactant protein A with bacterial lipopolysaccharide may affect some biological functions. *Am. J. Physiol* 268, L144-L151.

Koch,C., Cuppens,H., Rainisio,M., Madessani,U., Harms,H., Hodson,M., Mastella,G., Navarro,J., Strandvik,B., and McKenzie,S. (2001). European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis (ERCF): comparison of major disease manifestations between patients with different classes of mutations. *Pediatr. Pulmonol.* 31, 1-12.

Korfhagen,T.R. (2001). Surfactant protein A (SP-A)-mediated bacterial clearance: SP-A and cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25, 668-672.

Koziel,H., Phelps,D.S., Fishman,J.A., Armstrong,M.Y., Richards,F.F., and Rose,R.M. (1998). Surfactant protein-A reduces binding and phagocytosis of *pneumocystis carinii* by human alveolar macrophages in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 18, 834-843.

Kremlev,S.G. and Phelps,D.S. (1994). Surfactant protein A stimulation of inflammatory cytokine and immunoglobulin production. *Am. J. Physiol* 267, L712-L719.

- Kremlev,S.G., Umstead,T.M., and Phelps,D.S. (1997). Surfactant protein A regulates cytokine production in the monocytic cell line THP-1. *Am. J. Physiol* 272, L996-1004.
- Kreutzer,D.L., Buller,C.S., and Robertson,D.C. (1979). Chemical characterization and biological properties of lipopolysaccharides isolated from smooth and rough strains of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 23, 811-818.
- Kronborg,G., Shand,G.H., Fomsgaard,A., and Hoiby,N. (1992). Lipopolysaccharide is present in immune complexes isolated from sputum in patients with cystic fibrosis and chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *APMIS* 100, 175-180.
- Kuan,S.F., Rust,K., and Crouch,E. (1992). Interactions of surfactant protein D with bacterial lipopolysaccharides. Surfactant protein D is an *Escherichia coli*-binding protein in bronchoalveolar lavage. *J. Clin. Invest* 90, 97-106.
- LeVine,A.M., Kurak,K.E., Bruno,M.D., Stark,J.M., Whitsett,J.A., and Korfhagen,T.R. (1998). Surfactant protein-A-deficient mice are susceptible to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19, 700-708.
- Liu,C.-F., Chen,Y.-L., Shieh,C.-C., Yu,C.-K., Reid,K.B.M., and Wang,J.-Y. (2005). Therapeutic effect of surfactant protein D in allergic inflammation of mite-sensitized mice. *Clinical & Experimental Allergy* 35, 515-521.
- Madan,T., Eggleton,P., Kishore,U., Strong,P., Aggrawal,S.S., Sarma,P.U., and Reid,K.B. (1997a). Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 65, 3171-3179.
- Madan,T., Kishore,U., Shah,A., Eggleton,P., Strong,P., Wang,J.Y., Aggrawal,S.S., Sarma,P.U., and Reid,K.B. (1997b). Lung surfactant proteins A and D can inhibit specific IgE binding to the allergens of *Aspergillus fumigatus* and block allergen-induced histamine release from human basophils. *Clin. Exp. Immunol.* 110, 241-249.
- Mariencheck,W.I., Savov,J., Dong,Q., Tino,M.J., and Wright,J.R. (1999). Surfactant protein A enhances alveolar macrophage phagocytosis of a live, mucoid strain of *P. aeruginosa*. *Am. J. Physiol* 277, L777-L786.
- McGroarty,E.J. and Rivera,M. (1990). Growth-dependent alterations in production of serotype-specific and common antigen lipopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infect. Immun.* 58, 1030-1037.
- McIntosh,J.C., Mervin-Blake,S., Conner,E., and Wright,J.R. (1996). Surfactant protein A protects growing cells and reduces TNF-alpha activity from LPS-stimulated macrophages. *Am. J. Physiol* 271, L310-L319.
- Miyamura,K., Leigh,L.E., Lu,J., Hopkin,J., Lopez,B.A., and Reid,K.B. (1994). Surfactant protein D binding to alveolar macrophages. *Biochem. J.* 300 (Pt 1), 237-242.
- Moo,V., Sieper,J., Herzog,V., and Muller,B.M. (2001). Regulation of expression of cytokines and growth factors in osteoarthritic cartilage explants. *Clin. Rheumatol.* 20, 353-358.
- Munker,R., Gasson,J., Ogawa,M., and Koeffler,H.P. (1986). Recombinant human TNF induces production of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor. *Nature* 323, 79-82.

- Murakami,S., Iwaki,D., Mitsuzawa,H., Sano,H., Takahashi,H., Voelker,D.R., Akino,T., and Kuroki,Y. (2002). Surfactant protein A inhibits peptidoglycan-induced tumor necrosis factor- α secretion in U937 cells and alveolar macrophages by direct interaction with toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* 277, 6830-6837.
- Ohmer-Schrock,D., Schlatterer,C., Plattner,H., and Schlepper-Schafer,J. (1995). Lung surfactant protein A (SP-A) activates a phosphoinositide/calcium signaling pathway in alveolar macrophages. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 12), 3695-3702.
- Ojeniyi,B. (1994). Polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. A survey. *APMIS Suppl* 46, 1-44.
- Oosting,R.S. and Wright,J.R. (1994). Characterization of the surfactant protein A receptor: cell and ligand specificity. *Am. J. Physiol* 267, L165-L172.
- Penketh,A., Pitt,T., Roberts,D., Hodson,M.E., and Batten,J.C. (1983). The relationship of phenotype changes in *Pseudomonas aeruginosa* to the clinical condition of patients with cystic fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 127, 605-608.
- Pikaar,J.C., Voorhout,W.F., van Golde,L.M., Verhoef,J., van Strijp,J.A., and van Iwaarden,J.F. (1995). Opsonic activities of surfactant proteins A and D in phagocytosis of gram-negative bacteria by alveolar macrophages. *J. Infect. Dis.* 172, 481-489.
- Pison,U., Wright,J.R., and Hawgood,S. (1992). Specific binding of surfactant apoprotein SP-A to rat alveolar macrophages. *Am. J. Physiol* 262, L412-L417.
- Postle,A.D., Mander,A., Reid,K.B., Wang,J.Y., Wright,S.M., Moustaki,M., and Warner,J.O. (1999). Deficient hydrophilic lung surfactant proteins A and D with normal surfactant phospholipid molecular species in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20, 90-98.
- Restrepo,C.I., Dong,Q., Savov,J., Mariencheck,W.I., and Wright,J.R. (1999). Surfactant protein D stimulates phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 21, 576-585.
- Roitt,I.M., Brostoff,J., and Male,D.K. (1995). *Kurzes Lehrbuch der Immunologie.* (Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag), pp. 1-399.
- Rosseau,S., Hammerl,P., Maus,U., Gunther,A., Seeger,W., Grimminger,F., and Lohmeyer,J. (1999). Surfactant protein A down-regulates proinflammatory cytokine production evoked by *Candida albicans* in human alveolar macrophages and monocytes. *J. Immunol.* 163, 4495-4502.
- Sano,H., Chiba,H., Iwaki,D., Sohma,H., Voelker,D.R., and Kuroki,Y. (2000). Surfactant proteins A and D bind CD14 by different mechanisms. *J. Biol. Chem.* 275, 22442-22451.
- Sano,H., Sohma,H., Muta,T., Nomura,S., Voelker,D.R., and Kuroki,Y. (1999). Pulmonary surfactant protein A modulates the cellular response to smooth and rough lipopolysaccharides by interaction with CD14. *J. Immunol.* 163, 387-395.
- Stamme,C. and Wright,J.R. (1999). Surfactant protein A enhances the binding and deacylation of *E. coli* LPS by alveolar macrophages. *Am. J. Physiol* 276, L540-L547.

- Strong,P., Kishore,U., Morgan,C., Lopez,B.A., Singh,M., and Reid,K.B. (1998). A novel method of purifying lung surfactant proteins A and D from the lung lavage of alveolar proteinosis patients and from pooled amniotic fluid. *J. Immunol. Methods* 220, 139-149.
- Talati,A.J., Crouse,D.T., English,B.K., Newman,C., Livingston,L., and Meals,E. (1998). Exogenous bovine surfactant suppresses tumor necrosis factor-alpha release by murine macrophages stimulated by genital mycoplasmas. *J. Infect. Dis.* 178, 1122-1125.
- Tenner,A.J. (1999). Membrane receptors for soluble defense collagens. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 34-41.
- Thomassen,M.J., Antal,J.M., Connors,M.J., and Meeker,D.P.W.H.P. (1994). Characterization of exosurf (surfactant)-mediated suppression of stimulated human alveolar macrophage cytokine responses. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 10, 399-404.
- Tino,M.J. and Wright,J.R. (1996). Surfactant protein A stimulates phagocytosis of specific pulmonary pathogens by alveolar macrophages. *Am. J. Physiol* 270, L677-L688.
- Tracey,K.J., Lowry,S.F., and Cerami,A. (1988). Cachetin/TNF-alpha in septic shock and septic adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138, 1377-1379.
- Tsukamoto,H., Nagasawa,K., Ueda,Y., Mayumi,T., Furugo,I., Tsuru,T., and Niho,Y. (1992). Effects of cell differentiation on the synthesis of the third and fourth component of complement (C3, C4) by the human monocytic cell line U937. *Immunology* 77, 621-623.
- van Golde,L.M. (1995). Potential role of surfactant proteins A and D in innate lung defense against pathogens. *Biol. Neonate* 67 *Suppl 1*, 2-17.
- van Iwaarden,J.F., Pikaar,J.C., Storm,J., Brouwer,E., Verhoef,J., Oosting,R.S., van Golde,L.M., and van Strijp,J.A. (1994). Binding of surfactant protein A to the lipid A moiety of bacterial lipopolysaccharides. *Biochem. J.* 303 (Pt 2), 407-411.
- van Iwaarden,J.F., Teding,v.B., Whitsett,J.A., Oosting,R.S., and van Golde,L.M. (1995). A novel procedure for the rapid isolation of surfactant protein A with retention of its alveolar-macrophage-stimulating properties. *Biochem. J.* 309 (Pt 2), 551-555.
- Vey,E., Zhang,J.H., and Dayer,J.M. (1992). IFN-gamma and 1,25(OH)2D3 induce on THP-1 cells distinct patterns of cell surface antigen expression, cytokine production, and responsiveness to contact with activated T cells. *J. Immunol.* 149, 2040-2046.
- Vogt, Michael. WASSERDIFFUSION IN BIOFILMEN VON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* UND POLYSACCHARID/WASSERSYSTEMEN: Eine PFG-NMR UNTERSUCHUNG. 1-173. 2001.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Wang,G., Phelps,D.S., Umstead,T.M., and Floros,J. (2000). Human SP-A protein variants derived from one or both genes stimulate TNF-alpha production in the THP-1 cell line. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 278, L946-L954.
- Weikert,L.F., Edwards,K., Chroneos,Z.C., Hager,C., Hoffman,L., and Shepherd,V.L. (1997). SP-A enhances uptake of bacillus Calmette-Guerin by macrophages through a specific SP-A receptor. *Am. J. Physiol* 272, L989-L995.

Weikert,L.F., Lopez,J.P., Abdolrasulnia,R., Chroneos,Z.C., and Shepherd,V.L. (2000). Surfactant protein A enhances mycobacterial killing by rat macrophages through a nitric oxide-dependent pathway. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 279, L216-L223.

Westphal,O., Lüderitz,O., and Bister,F. (1952). Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Z. Naturforschg. 7b*, 148-155.

Wiesener, A. Proteolytische Degradation von Surfactant Protein D. 2002.
Ref Type: Thesis/Dissertation

Wilms, A. Charakterisierung von Lipopolysacchariden in Biofilmen von *Pseudomonas aeruginosa*. 1-78. 2001.
Ref Type: Thesis/Dissertation

Wright,J.R. (1997). Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiol Rev.* 77, 931-962.

Wright,J.R., Zlogar,D.F., Taylor,J.C., Zlogar,T.M., and Restrepo,C.I. (1999). Effects of endotoxin on surfactant protein A and D stimulation of NO production by alveolar macrophages. *Am. J. Physiol* 276, L650-L658.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. med. D. Reinhard für die Möglichkeit an seiner Klinik die Forschung für meine Dissertation durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. med. M. Griese, dem Leiter der Forschungsgruppe Lunge für seine Unterstützung und fachliche Kompetenz.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. P. Bufler für die gute Betreuung und Motivation.

Frau A. Schams und Y. Wüst für die gute Zusammenarbeit und fachliche Ratschläge.

Herrn Prof. Dr. med. A. Bauernfeind und den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe für die Bereitstellung und Typisierung der *P. aeruginosa*-Stämme und einen Teil der verwendeten LPS-Präparationen.

PUBLIKATIONEN

1. Bufler, P.; Schikor, D.; Schmidt, B.; Griese, M. (2004): „Cytokine stimulation by *Pseudomonas aeruginosa*-strain variation and modulation by pulmonary surfactant.“ *Exp Lung Res.* 2004 Apr-May; 30 (3): 163-79
2. Bufler, P.; Schmidt, B.; Schikor, D.; Bauernfeind, A.; Crouch, E.C.; Griese, M. (2003): „Surfactant Protein A and D differently regulate the immune response to nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* and its lipopolysaccharide.“ *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003 Feb; 28 (2): 249-56
3. Bufler, P.; Schmidt, B.; Schikor, D.; Griese, M. (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
4. Schikor, D.; Bufler, P.; Bauernfeind, A.; Griese, M. (2001): „Surfactant Protein A und D modulieren die *P. aeruginosa* induzierte TNF α -Sekretion monozytärer Zellen.“ Posterpräsentation auf der 23. Jahrestagung der Gesellschaft für pädiatrische Pneumologie 03/02 in Bern.
5. Bufler, P.; Schmidt, B.; Schikor, D.; Griese, M. (2000): „Surfactant Protein A and 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. Bufler, P.; Schikor, D.; Wüst, Y.; Griese, M. (2000): „Surfactant Protein D moduliert die Stimulation monozytärer Zellen durch LPS in Abhängigkeit vom LPS-Serotyp.“ Poster bei der 22. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie in Bochum 04/00

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Daniela Schikor
Geburtsdatum: 02.02.1976
Geburtsort: Augsburg
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Ledig

Schulbildung:

Juni 1995 Abitur (1,4)

Studium:

Examen: Mai 2002 3. Staatsexamen (Gesamtnote 2,16)

Promotion: Beginn 1999 in der Lungenforschungsgruppe der Kinderpoliklinik der LMU München: "Modulation der Pseudomonas Aeruginosa-Induzierten Immunantwort durch Pulmonales Surfactant"

Beruf:

Praktisches Jahr: 2001/2002
1. Terial Pädiatrie Klinik für Kinder und Jugendliche, Augsburg
2. Terial Chirurgie Städt. Krankenhaus München Harlaching
Kinderchirurgie Hospital Nacional Cayetano Heredia, Lima, Peru
3. Terial Städt. Krankenhaus München Harlaching
Innere Medizin Yale New Haven Hospital (Pulmonologie, Hämatologie)

Ärztin im Praktikum:

Oktober 2002-
März 2004 Josefinum, Krankenhaus für Kinder und Jugendliche,
Augsburg

Assistenzärztin:

Seit Mai 2004 Sana Klinikum Hof, Klinik für Kinder und Jugendliche