

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

**Einfluss von Surfactantprotein A und D
auf die ECP-Degranulation von
humanen eosinophilen Granulozyten**

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

Vorgelegt von Eva Brack
aus Frankfurt am Main

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Gries

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Oliver Eickelberg

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

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juli 2013

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	4
1.1 Surfactantprotein A und D	4
1.1.1 Surfactantproteinrezeptoren	8
1.2 Eosinophile Granulozyten	10
2 Zielsetzung und Fragestellung	13
3 Material	14
3.1 Probanden	14
3.2 Geräte und Software	15
3.3 Glas- und Plastikmaterial	15
3.4 Antikörper, Immunglobuline und Surfactantproteine	16
3.5 Chemikalien und Puffer	17
4 Methoden.....	19
4.1 Blutentnahme	19
4.2 Isolierung der eosinophilen Granulozyten	19
4.3 Anfertigung von Zytospin-Präparaten.....	20
4.4 Überprüfung der Vitalität	21
4.5 Degranulation von eosinophilen Granulozyten auf unbeschichteten Platten.....	21
4.6 Degranulation von eosinophilen Granulozyten auf mit Allergikerserum, sIgA und IgG beschichteten Platten.....	22
4.7 ECP-Messung.....	23
4.8 Auswertung und Statistik	23
5 Ergebnisse	24
5.1 Probanden und Reinheit der eosinophilen Granulozyten Isolierung.....	24
5.2 ECP-Degranulation auf verschiedene Stimuli.....	26
5.2.1 ECP-Degranulation bei verschiedenen Inkubationszeiten	27
5.3 Versuchsreihen auf beschichteten Platten	29
5.3.1 ECP-Degranulation unstimulierter Zellen auf PAP SP-D.....	29
5.3.2 Hemmung der Ca-Ionophore induzierten ECP-Degranulation durch PAP SP-D.....	30
5.3.3 ECP-Degranulation unstimulierter Zellen auf rek.SP-D.....	32

5.3.4	Hemmung der Ca-Ionophore induzierten ECP-Degranulation durch rek.SP-D	33
5.3.5	ECP-Degranulation unstimulierter Zellen auf SP-A	35
5.3.6	Hemmung der Ca-Ionophore induzierten ECP-Degranulation durch SP-A	36
5.4	ECP-Degranulation auf mit Allergikerserum, sIgA, IgG und Natrium-Carbonat beschichteten Platten	38
5.4.1	ECP-Degranulation auf sIgA beschichteten Platten	38
5.4.2	ECP-Degranulation auf IgG beschichteten Platten	39
5.4.3	ECP-Degranulation auf Allergikerserum beschichteten Platten	41
6	Diskussion	43
6.1	Zielparameter, Probanden und Reinheit der eosinophilen Granulozyten	43
6.2	ECP-Degranulation und verwendete Zellstimulanzen	44
6.3	Einfluss von Surfactantprotein A und D auf native eosinophile Granulozyten	47
6.4	Der Einfluss der Surfactantproteine auf stimulierte eosinophile Granulozyten	48
6.5	Der Einfluss der Surfactantproteine auf mit Allergikerserum, sIgA und IgG stimulierte eosinophile Granulozyten	50
7	Zusammenfassung	53
8	Literaturverzeichnis	54
9	Anhang	60
9.1	Fragebogen	60
9.2	Publikation (Originalarbeit)	62
9.3	Danksagung	63
9.4	Erklärung	64

Abkürzungsverzeichnis

*	Statistisch relevant
°C	Grad Celsius
ABPA	Allergische Bronchopulmonale Aspergillose
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
ECP	Eosinophiles kationisches Protein (engl. eosinophil cationic protein)
EDN	Eosinophil-derived Neurotoxin
EPO	Eosinophile Peroxidase
FMLP	Formylmethionyl Leucylphenylalanine
g	Zentrifugalkraft
HES	Hypereosinophiles Syndrom
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
Lc	Leukozyten
LPS	Lipopolysaccharide
MBP	Major Basic Protein
MFI	Mean Fluorescence Intensity
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
ns	Nicht statistisch relevant
PAP SP-A	Surfactantprotein A von Patienten mit Pulmonaler Alveolarproteinose
PAP SP-D	Surfactantprotein D von Patienten mit Pulmonaler Alveolarproteinose
PAP	Pulmonale Alveolarproteinose
PE	Phycoerythrine
PRN	Pattern-Recognition Receptor
Rek.SP-D	Rekombinant hergestelltes SP-D
Rpm	Rounds per minute
SIRP α	Signal-Regulatory Protein alpha
SP	Surfactantprotein
STE	Standarterror
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor-beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha

1 Einleitung

1.1 Surfactantprotein A und D

Surfactant ist ein oberflächenaktiver Flüssigkeitsfilm, bestehend zu ca. 90% aus Phospholipiden und zu ca. 10% aus Proteinen, welcher die Alveolen auskleidet. Die Funktion der Phospholipide besteht darin, die Oberflächenspannung herabzusetzen, um damit das endexpiratorische Kollabieren der Alveolen zu verhindern.

Die Surfactantproteine (SP) werden in die Gruppen A bis D unterteilt, wobei die hydrophoben lipidassoziierten Surfactantproteine B und C von den hydrophilen Surfactantproteinen A und D unterschieden werden. SP-A und SP-D gehören aufgrund ihrer Struktur zu der Familie der Kollektine, einer Gruppe von extrazellulär sekretierten Immunabwehrrezeptoren den sogenannten PRRs (Pattern-Recognition Rezeptoren). Zudem zeigen sie strukturelle Verwandtschaft zu C1q, der ersten Komponente des Komplementsystems.

SP-A besteht aus 18 einzelnen Monomeren mit einem Molekulargewicht zwischen 26 bis 36kD, die zu 6 Trimeren angeordnet sind. Jedes Monomer besteht aus einer kurzen aminoterminalen Domäne, einer Tripelhelix bildenden Kollagendomäne, einer α -helikalen Nackendomäne und einem Kohlenhydrat Erkennungsbereich (engl. CRD) (Abb. 1).

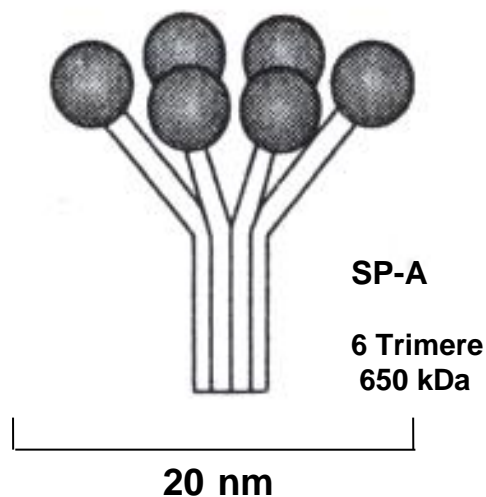


Abbildung 1 Struktur von Surfactantprotein A

SP-D hat ein monomeres Molekulargewicht von ca. 43 kDa. In seiner Quartärstruktur besteht es aus 12 Monomeren, die zu je 4 Trimeren angeordnet sind. Die Monomere sind - ähnlich wie bei SP-A - über kovalente und nicht-kovalente Bindungen untereinander verbunden. Neben einer kurzen aminoterminalen Domäne folgt eine im Vergleich zu SP-A sehr lange Tripelhelix bildende Kollagendomäne, eine α -helikale Nackendomäne und eine CRD (Abb.2). Die SP-D Dodekamäre können sich untereinander nochmals vernetzen und große kreuzförmige Strukturen bilden. Die Multimerisation der Moleküle hat großen Einfluss auf ihre Funktion (Holmskov 2003; Pérez-Gil 2008).

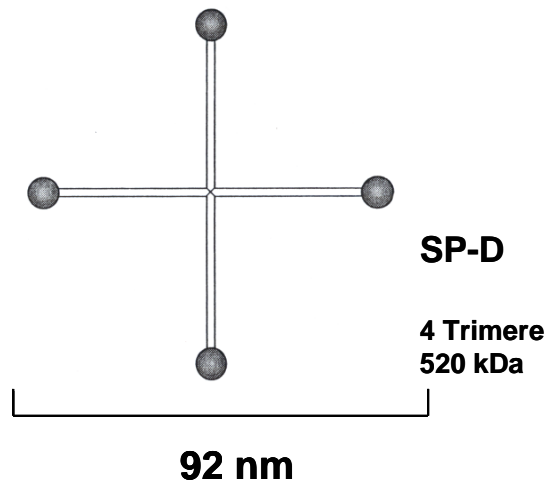


Abbildung 2 Struktur von Surfactantprotein D

Den Surfactantproteinen A und D werden bei der Elimination und Erkennung von Erregern in der Lunge eine wichtige Rolle zugeschrieben (Wright 2004). Die Lektindomäne dieser Moleküle kann in Anwesenheit von freiem Calcium an Kohlenhydratgruppen auf der Oberfläche von Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze und Hefen) binden.

SP-D kann zusätzlich an Makrophagen und neutrophile Granulozyten binden und so deren Funktion modulieren (Bochner 2000; Kuroki 2007; Madan 1997). Durch eine Erhöhung der Durchlässigkeit der Zellmembran von gram-negativen Bakterien, sowie auch von Hefepilzen können die Surfactantproteine A und D direkt und Makrophagen-unabhängig deren Proliferation reduzieren (McCormack 2003; Wu 2003). Des Weiteren konnte für eine

Vielzahl von Viren (Influenza A, RSV und Adenovirus) gezeigt werden, dass sie direkt durch die Surfactantproteine inhibiert werden (Hartshorn 2010). Studien mit SP-A und SP-D knock-out Mäusen zeigen, dass die beiden Kollektine die bakterielle und virale Clearance der Lunge fördern und den Rückgang des Entzündungsprozesses erleichtern (LeVine 2000). Außerdem stimulieren die beiden Kollektine die Phagozytose, die Chemotaxis und die Produktion freier Radikale von verschiedensten Immunzellen (Bochner 2000; Madan 1997). In neuen Studien von Douda et al. konnte an Mausmodellen gezeigt werden, dass SP-D an neutrophile-extrazelluläre Traps bindet und somit die Mikroagglutination und extrazelluläre Abtötung von *Pseudomonas aeruginosa* fördert (Douda 2011). Mukherjee et al. zeigten, dass SP-A eine wichtige regulierende Rolle einnimmt überschießende Immunantworten und chronische Entzündungsprozesse einzudämmen, indem SP-A die Einwanderung von regulatorischen T-Zellen via TGF- β induziert (Mukherjee 2012).

In den letzten Jahren veröffentlichte Untersuchungen lassen zusätzlich vermuten, dass die Surfactantproteine A und D neben der Immunabwehr auch eine wichtige Rolle bei der Regulation allergischer Reaktionen spielen. Eine aktuell veröffentlichte Studie von Ledford et al. zeigte diese Doppelfunktion erneut auf. Vorbekannt ist, dass eine Infektion mit *Mycoplasma pneumonia* in der Lunge von Patienten mit Typ-I-Allergien zu einer schweren Exazerbation führen kann. Die Autoren zeigten, dass SP-A zu einem zwar die mit *Mycoplasma pneumonia* infizierte asthmatische Lunge schützen kann, indem es die Entzündungsreaktion eindämmt. Andererseits wird aber auch die durch eosinophile Granulozyten induzierte Klärung von *Mycoplasma pneumonia* initiiert (Ledford 2012). Neben ihrer Fähigkeit, an verschiedene Allergene wie *Aspergillus fumigatus* und Hausstaubmilben (*Dermatophagoides pteronyssinus*) zu binden, können sie auch die Bindung von spezifischem IgE an diese Allergene und die damit verbundene Histaminfreisetzung aus sensibilisierten Granulozyten verhindern (Madan 1997; Wang 2007).

Die Arbeitsgruppe um Schleh und Hohlfeld konnte zeigen, dass SP-D die Bindung von Allergenpartikeln an bronchiale Epithelzellen, jedoch nicht ihre Internalisierung fördert. Daraufhin kommt es zur vermehrten IL-8 Sekretion der Epithelzellen, was den anti-inflammatorischen Effekt von SP-D in allergischen Reaktionen erklären könnte (Schleh 2010). IL-8 unterscheidet sich von anderen Chemokinen durch eine Doppelwirkung, es aktiviert spezifisch basophile Granulozyten und wirkt somit pro-entzündlich, hat jedoch bei allergischen Prozessen eine anti-entzündliche Wirkung, indem es die Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten inhibiert (Alam 1992). Zusätzlich wurde in-vitro gezeigt, dass SP-A und SP-D die Proliferation von CD4+ T-Zellen und die allergen-induzierte Degranulation von basophilen Granulozyten bei Patienten mit Asthma bronchiale hemmen können (Czech 1992). Es ist gut bekannt, dass bei Patienten mit Zystischer Fibrose im Vergleich zu gesunden Patienten, erniedrigte SP-A Konzentrationen in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) zu finden sind (Griese 1997). Darüber hinaus weiß man, dass Patienten mit COPD (engl. chronic obstructive pulmonary disease) erniedrigte Surfactantprotein-D-Level in der Lunge aufweisen, hingegen erhöhte SP-D Level im Serum (Winkler 2011). Koopmans et al. bestimmte SP-D Serumkonzentrationen und konnte zeigen, dass diese bei Patienten mit atopischen Erkrankungen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe erhöht sind (Koopmans 2004).

Bisher liegen nur wenige und teils auch widersprüchliche Daten über die Konzentrationen von SP-A und SP-D in der Lunge bei allergischen Lungenerkrankungen vor (Hartl 2006). Sowohl Hartl et al. als auch Denburg et al. berichten über erhöhte Werte von SP-A und SP-D in der Bronchoalveolären Lavage von Patienten mit mildem Asthma, im Vergleich zu Lungen-Gesunden (Denburg 1985; Hartl 2006). Erpenbeck und Hohlfeld et al. maßen nach Allergenexposition bei Patienten mit allergischem Asthma bronchiale erhöhte Spiegel von SP-B, SP-C und SP-D in der BAL jedoch erniedrigte Spiegel für SP-A (Erpenbeck 2006). In verschiedenen Mausmodellen, welche eine allergische pulmonale Entzündung simulieren,

wurden ebenfalls Alterationen für beide Surfactantproteine gefunden, diese waren jedoch ebenfalls widersprüchlich (Elsner 1999; Kapp 2001). Interessant in diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse zweier Studien, welche am Mausmodell einer Allergischen Bronchopulmonalen Aspergillose (ABPA) zeigen konnten, dass die Inhalation von SP-A und stärker noch von humanem und rekombinantem SP-D zu einer Verminderung der bronchialen Hyperreagibilität, der Th2-Zell Zytokin Antwort und auch der Blut- und Gewebeeosinophilie führten (Gardai 2003; Gleich 1990). Sowohl SP-D als auch SP-A unterdrücken die Histaminfreisetzung in der Frühphase der allergischen Reaktion, sowie die Lymphozytenproliferation in der Spätphase der allergischen Reaktion bei Patienten mit Asthma bronchiale (Czech 1992). In einem in-vitro-Modell konnte für SP-A eine hemmende Wirkung auf die Ausschüttung von IL-8 durch eosinophile Granulozyten gezeigt werden (Cheng 1998). Eine aktuell publizierte Studie von Schleh et al. zeigte zudem, dass SP-D die durch allergen-tragende Partikel ausgelöste inflammatorische Reaktion in den kleinsten Atemwegen positiv beeinflusst, indem es die Einwanderung von Makrophagen und Epithelzellen moduliert. Diese Zellen nehmen die Partikel auf und es kommt zu einer verminderten Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen (Schleh 2012).

1.1.1 Surfactantproteinrezeptoren

Wie bereits oben erwähnt, spielt SP-A eine wichtige Rolle in der Clearance von Surfactantlipiden aus den Alveolen. Neue Studien zeigen, dass vor allem der SP-A Rezeptor P63 eine wichtige Rolle in der Surfactanthomöostase spielt. Dieser Rezeptor wird vor allem auf den Typ II Pneumozyten exprimiert. Die Bindung von SP-A hat verschiedene Effekte: Sie führt zu einer Hemmung der Surfactantsekretion, zu einer Clathrin-vermittelten Aufnahme von SP-A und seinen Lipiden in die Pneumozyten und reguliert über die PI3 Kinase die Rezeptordichte auf der Plasmamembran. Über diese drei P63 vermittelten Mechanismen wird somit die extrazelluläre Menge von SP-A reguliert (Kazi 2010; Bates 2008).

Bei Surfactantprotein D sind vor allem, wie oben dargestellt dessen immunologische Funktionen gut erforscht. Über Rezeptorenbindungen im Bereich der biophysikalischen Funktionen, wie zum Beispiel der Surfactanthomöostase ist wenig bekannt.

Neuste Studien beschäftigen sich vor allem mit der Interaktion der beiden Surfactantproteine A und D auf zelluläre Immunrezeptoren (Wright 2004). Eine Reihe von Rezeptoren wird sowohl von SP-A als auch von SP-D aktiviert, dazu gehören der LPS-Rezeptor CD14, der Kollagen-bindende C1q Rezeptor Calreticulin, SIRP α oder Calreticulin/CD91 und die Toll-like-Rezeptoren TLR2, TLR4 und TLR4 Adaptor MD-2.

CD14, ein LPS-Rezeptor, bindet direkt an die Surfactantproteine A und D und modifiziert damit die LPS vermittelte zelluläre inflammatorische Antwort (Senft 2005). Des Weiteren zeigte sich, dass der kollagen-bindende C1q Rezeptor Calreticulin sowohl auf der Zelloberfläche normaler als auch maligner Zellen vorkommt und dass die Kollagen-ähnlichen-Domänen von SP-A, SP-D und MBL Calreticulin auf Makrophagen binden können (Stuart 1997). Gardai et al. konnten zeigen, dass Surfactantprotein A und D, je nachdem mit welcher Domäne sie an die Oberflächenrezeptoren SIRP α oder Calreticulin/CD91 von Alveolarmakrophagen binden sowohl als Unterdrücker als auch als Förderer einer Entzündungsreaktion agieren können. Durch eine Bindung von SP-D an SIRP α mittels seiner CR-Domäne, wird über die Aktivierung der Src-family Kinase und der p38 Kinase die pro-entzündliche Mediatorenproduktion von Granulozyten gehemmt (Gardai 2003).

Bereits mehrere Studien konnten zeigen, dass sowohl SP-A als auch SP-D die inflammatorische Wirkung von pathogenen Molekülen antagonisieren, indem sie die Toll-like-Rezeptoren TLR2, TLR4 und TLR4 Adaptor MD-2 direkt via ihrer CRD binden und somit die Interaktion der Pathogene mit den Rezeptoren stören (Resnick 1993; Sato 2003). Lediglich SP-A vorbehalten ist die direkte Bindung an den Toll-like-2-Rezeptor, woraufhin die TNF-alpha Freisetzung stimuliert wird (Yamada 2006). Als ein weiterer wichtiger solitärer SP-A Rezeptor sei SPR-210 erwähnt, welcher auf menschlichen Monozyten, Ratten

Typ II Epithelzellen und Rattenmakrophagen nachgewiesen werden kann. Durch eine Bindung von SP-A wird die Abtötung von SP-A opponierten Pathogenen durch Makrophagen erhöht und die Entzündungsreaktionen eingedämmt, indem zusätzlich die T-Lymphozyten Proliferation unterdrückt wird (Borron 1998; Weikert 2000).

Abschließend sei der spezifisch SP-D bindende gp-340 Rezeptor erwähnt, ein 340kDa großes Glycoprotein, welches vor allem in BALs und Speichelflüssigkeiten gefunden wird und gemeinsam mit SP-D Influenza A agglutiniert (Kishore 2006; Madan 1997; Madsen 2010).

1.2 Eosinophile Granulozyten

Eosinophile Granulozyten sind wichtige Effektorzellen bei allergischen Erkrankungen wie Asthma bronchiale, atopischer Dermatitis oder Rhinokonjunktivitis, aber auch bei Parasiteninfektionen und diversen Systemerkrankungen, wie dem Churg-Strauss-Syndrom, eosinophiler Pneumonie, eosinophiler Gastroenteritis, und bei den verschiedenen hypereosinophilen Syndromen (HES) (Rothenberg 2006). Die eosinophilen Granulozyten gehören zur Gruppe der Leukozyten, wobei sie einen Anteil von 1-4% an der Gesamtheit der Leukozyten ausmachen. Sie haben eine durchschnittliche Lebensdauer von 8-12 Tagen und eine intravasale Verweildauer von 4-12 Stunden. Dies bedeutet, dass sie sich die meiste Zeit in den lymphatischen Organen und Geweben aufhalten. Ihr Durchmesser im Ausstrichpräparat beträgt 12-15µm. Sie weisen einen zumeist zweigelappten Kern und die charakteristischen eosinophilen, relativ großen Granula auf.

Unter physiologischen Bedingungen, findet man eosinophile Granulozyten in lymphatischen Geweben, im Blut und im Gewebe des Gastrointestinaltraktes (Straumann 2004). Die Anzahl der im Blut zirkulierenden eosinophilen Granulozyten ist unter normalen Umständen nur gering. Sie nimmt im Rahmen der oben erwähnten Krankheitszustände jedoch deutlich zu. Zudem beobachtet man eine gewebespezifische Akkumulation in Abhängigkeit der zugrunde liegenden Erkrankung. Die Auswanderung der eosinophilen Granulozyten aus dem

Knochenmark in periphere Gewebe wird von einer Reihe von chemotaktisch wirkenden Molekülen gesteuert (Kita 1996; Straumann 2004). Zu diesen Molekülen gehören verschiedene Lipidmediatoren, wie Platelet-activating factor, Leukotriene, bakterielle Produkte (Formylmethionyl Leucylphenylalanine [FMLP]), und eine Reihe von Chemokinen wie RANTES (CC-Chemokin CCL5), Makrophagen Inflammatory Protein (MIP)-1 und das exklusiv auf eosinophile Granulozyten wirkende Eotaxin (Resnick 1993). Bei der Aktivierung der Eosinophilen sind Hämatopoetine wie IL-3, IL-5 und GM-CSF, sowie die Immunglobuline IgG, IgA und sekretorisches IgA beteiligt (Bochner 2000; Takafuji 1991).

Im betroffenen Gewebe verstärken die eosinophilen Granulozyten durch die weitere Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen die lokale Entzündungsreaktion (Kita 2011). Die vier wichtigsten Proteine in den Granula der eosinophilen Granulozyten sind das Major Basic Protein (MBP), das Eosinophil-derived Neurotoxin (EDN), das Eosinophile kationische Protein (engl. eosinophil cationic protein, ECP) und die eosinophile Peroxidase (EPO). Sie befinden sich in membran-umschlossenen Kompartimenten im Zytoplasma der Granulozyten (Svensson 2004). EDN und ECP sind homologe Proteine die in ihrer molekularen Größe, Immungenetik und biologischen Aktivität ähnlich sind. Ihre biologische Aktivität und Vorkommen sind sowohl durch genetische (Nachweis determinierender Polymorphismen im ECP-Gen (RNASE3)), als auch post-translationale Faktoren bestimmt (Topic 2011). Es hat sich gezeigt, dass die Degranulation der Granulaproteine aus aktivierten eosinophilen Granulozyten das Lungenepithel schädigen kann und zu einer bronchialen Überreaktion führen kann, welche für den chronischen Entzündungsprozess bei allergischem Asthma bronchiale in der Lunge mitverantwortlich ist (Gleich 1990). ECP kann Membranschäden bei den Zielzellen verursachen, durch die es dann zu einem Eintritt von zelltoxischen Substanzen und somit zum Untergang der Zelle kommt (Wright 2005).

ECP zeigt sich sowohl bei Patienten mit saisonaler und ganzjähriger Allergie im Vergleich zur Kontrollgruppe im Serum erhöht (Tomassini 1996). Aber nicht nur in der Pathogenese von Asthma spielen die Granulaproteine eine entscheidende Rolle, auch im Entzündungsprozess der atopischen Dermatitis und der allergischen Rhinitis sind sie maßgeblich beteiligt (Czech 1992; Klimek 1996; Tischendorf 2000).

Eosinophile Granulozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche unter anderem Fc-Rezeptoren, für IgG (FcγRII/CD32), für IgA (FcαR) und für IgE (FcεRII). Kaneko et al. konnten in-vitro zeigen, dass in erster Linie durch das im Serum enthaltene IgG2 eine signifikante eosinophile Degranulation ausgelöst wird, welche über den Rezeptor FcγRII vermittelt wird. IgG-depletiertes Serum dagegen konnte keine signifikante Degranulation von ECP auslösen (Kaneko 1995). Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe um Abu-Ghazaleh zeigen, dass es durch eine sIgA Stimulierung ebenfalls zu einer signifikanten eosinophilen Degranulation kommt (Abu-Ghazaleh 1989). Über die Interaktion von SP-A und SP-D mit eosinophilen Granulozyten liegen bisher kaum Untersuchungen vor.

2 Zielsetzung und Fragestellung

Oben genannte Untersuchungen demonstrieren die Rolle von Surfactantprotein A und D bei inflammatorischen Prozessen. Um mehr Daten zum Einfluss der Surfactantproteine auf eosinophile Granulozyten zu erhalten, haben wir in der vorliegenden Arbeit diese Rolle von SP-A und SP-D in-vitro näher untersucht. Als Zell-Effektor Modell wählten wir die ECP-Degranulation isolierter eosinophiler Granulozyten. Die eosinophilen Granulozyten wurden aus Spenderblut nicht-allergischer Spender gewonnen und mit verschiedenen Zellstimuli wie Ca-Ionophore, Eotaxin, IgG, sIgA und Serum eines an Allergien leidenden Probanden stimuliert.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet, um die Hypothese eines inhibitorischen Einflusses der Surfactantproteine A und D auf eosinophile Granulozyten zu testen:

- Können die Surfactantproteine A und D die ECP-Degranulation eosinophiler Granulozyten stimulieren oder hemmen?
- Haben Surfactantprotein A und D einen Einfluss auf die, durch den Calcium-abhängigen, unspezifischen Stimulus Ca-Ionophore hervorgerufene ECP-Degranulation? Bei welcher Konzentration der Surfactantproteine kommt es zu einer Wirkung?
- Können die Surfactantproteine A und D die ECP-Degranulation auf physiologisch relevante Stimuli wie Eotaxin, IgG, sIgA und Serum modifizieren?

3 Material

3.1 Probanden

Die eosinophilen Granulozyten wurden aus venösem Blut von freiwilligen, gesunden, nicht unter Allergien leidenden Spendern im Zeitraum von Oktober 2002 bis August 2004 gewonnen. Jeder Spender füllte vorab einen Fragebogen aus, bei dem Fragen zum Gesundheitszustand und zur Allergianamnese erhoben wurden (siehe Anhang). Bei allen Probanden wurde des Weiteren mindestens einmalig Gesamt-IgE im Serum bestimmt, um eine etwaige allergische Erkrankung oder Prädisposition sicher auszuschließen. Nach einer ausführlichen Aufklärung wurde von jedem Probanden noch eine Einverständniserklärung unterzeichnet.

Ausgeschlossen wurden Probanden mit positiver Allergianamnese, mit parasitären Erkrankungen, Patienten unter immunmodulatorischer Medikation in den vorherigen zwei Wochen oder erhöhten IgE-Werten im Serum ($> 30\text{IU/ml}$), welchen wir als cut-off für eine allergische Sensibilisierung festlegten. Es handelte sich bei den Spendern um fünf Frauen (23 ± 1.8 Jahre) und vierzehn Männer (24 ± 11 Jahre) im Alter von 23 bis 65 Jahren. Die Spender wurden teilweise auch mehrfach verwendet. Es wurden 20ml Blut zur Isolation der Zellen und Bestimmung der IgE-Werte abgenommen; die Auswertung der klinischen Daten erfolgte pseudoanonymisiert nach EK-Protokoll vom 16.5.2008.

3.2 Geräte und Software

Analysenwaage Satorius	Wägetechnik München
Brutschrank 37°C, 5% CO ₂	Uniequipe
Cytospin	Heraeus
Kühlschrank -20°C	Liebherr
Macs Zellseparator	Miltenyi Biotec
Prism 5	Graph Pad Software
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf
UniCap 100 In-vitro Sight	Pharmacia Diagnostics
Uniflow KR 130	Biohazard Uniequipe
Vaio Laptop	Sony
Windows XP	Microsoft
Zählkammer (0.0025mm ² , 0.1mm Tiefe)	Neubauer
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus

3.3 Glas- und Plastikmaterial

Disposable filter 0.45µm	Millipore
EDTA Microvette	Sarstedt
Einmalsterilpipetten 5ml, 10ml, 20ml	Greiner Cell.star
Falcon mit Shield (Leuco SEP)	Greiner bio-one
Falcons 15ml, 50ml	Greiner Cell.star
Glasreagenzgläser 100*16 mm	Assistent
ImmunoCAP™	Phadia AB
Maltose-Agarose Säule	Sigma
Multipipetten PD Tips 5ml	Plastibrand
Objekträger	Bender&Hoben
Perfusionsbesteck mit Flügeln (0.8*20 mm)	BD Infusion Therapy
Perkoll	Amersham Biosciences
Pipettenspitzen (zu 200µl, 1000µl)	Greiner bio-one
Plastik-Mikropasteurpipetten (zu 1µl, 10µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf, Gilson
Safe-Lock Tubes 0.5 ml, 1.5ml	Eppendorf
Spritze 50 ml	BD Perfusion
Superose 6	Amersham Pharmacia Biotech
TC-Platte 96 wells, U-shape	Greiner Cell.star

3.4 Antikörper, Immunglobuline und Surfactantproteine

Antikörper

ImmunoCap™ Anti-ECP	Phadia AB
CD3 MicroBeads	MiltenyiBiotec
CD16 MicroBeads	MiltenyiBiotec

Immunglobuline

Humanes IgG	Sigma
Humanes sIgA	Sigma

Allergikerserum

Proband (E.B.,*1979) mit
Hausstaubmilben- und Pollen-
allergie

Zellstimulatoren

Rekombinantes humanes Eotaxin Reinheit > 98%. Endotoxingehalt: < 1 EU/μg	PeptoTec Inc
---	--------------

Ca-Ionophore A23187 C 7522, Assay >98%; Molekulargewicht: 523.62 M	Sigma
---	-------

Surfactantproteine

Rekombinantes SP-D neck/CRD (Proteingehalt: 3.6μg/μl), (Batch: SPD/02-003); Endotoxingehalt: <0.6 EU/mg Protein	Altana Pharma AG
--	------------------

PAP SP-D (Proteingehalt: 5.38μg/μl)	Isolierung aus gepoolter BAL einer Patientin (U.B.,*1961) mit Alveolarproteinose nach der Methode Strong et al. 1998
-------------------------------------	---

PAP-SP-A (Proteingehalt: 5.5μg/μl)	Isolierung aus gepoolter BAL einer Patientin (U.B.,*1961) mit Alveolarproteinose nach der Methode Strong et al. 1998
------------------------------------	---

3.5 Chemikalien und Puffer

Phosphate-buffered saline (PBS)

NaCl	8.0 g	Fluka
KCl	0.2g	Merk
Na ₂ HPO ₄ wasserfrei	1.13 g	Merk
KH ₂ PO ₄	0.2g	Merk
Aqua ad inj	1000ml	Braun

ph 7.4

Tyrode Puffer

NaCl	8.0 g	Fluka
KCl	0.195g	Merk
Tris	0.121g	Pharmacia Biotec
CaCl ₂ H ₂ O	0.275g	Merk
Aqua ad inj	1000ml	Braun

ph 7.4

Tris-buffered-saline (TBS)

NaCl	140mM	Fluka
Tris-HCl	10mM	Pharmacia Biotec
Triton X 100	0.1%	Sigma

ph 7.4

BSA 0.4% & 3% in PBS

PBS	50ml	
BSA	0.2g & 1.5g	Paesel&Lorei

BSA 0.4% in Tyrode

Tyrode	50ml	
BSA	0.2g	Paesel&Lorei

Calcium Ionophore (523.6M)

Ca-Ionophore	5mg	Sigma
Dimethylsulfat (DMSO)	100 µl	Sigma
Verdünnung 5*10 ⁻⁶ M		
Ca Ionophore (523.6M)	1µl	
Tyrode/BSA 0.4%	99µl	

Citrat Puffer

Sodium Citrat	3.68g	Sigma
Aqua ad inj.	100 ml	Braun

Essigsäure 1%

Essigsäure	1ml	Merk
Aqua ad inj.	99 ml	Braun

Maltose 10mM/BSA

Maltose	0.45g	Merk
Tyrode/BSA 0.4%	125 µl	

Natrium Carbonat

Na ₂ CO ₃	15mM	Merk
NaHCO ₃	35mM	Merk
ph 9.6		

NaCl 0.2% & 1.6%

NaCl	2g & 16g	Fluka
Aqua ad inj.	1000ml	Braun

Perkoll-Lösung

Perkoll	27.57ml	GE Healthcare
1.5M NaCl	4.58ml	Fluka
Aqua ad inj.	17.85ml	Braun

Färbungen

May-Grünwald Färbung		Sigma
Giemsa-Färbung		Sigma
Trypan-Färbung		Sigma

4 Methoden

4.1 Blutentnahme

Na-Zitrat Puffer wurde im Verhältnis 1:10 in 20ml Spritzen vorgelegt. Mit 0.8*20mm-Butterfließ wurde den Spendern 80ml Blut ohne starken Unterdruck für die Isolierung der Granulozyten entnommen. Zusätzlich wurden pro Proband mindestens noch einmal 5ml Blut für das Blutbild, die IgE-Bestimmung und den Zellausstrich abgenommen.

4.2 Isolierung der eosinophilen Granulozyten

Zur Gewinnung des Buffy-Coats wurde das mit Na-Zitrat vermischte Blut unmittelbar nach der Entnahme auf Glasreagenzgläser verteilt und mit 300-350g 15 Min zentrifugiert und anschließend das zellreiche Pellet mit 6% HAES Puffer resuspendiert und erneut mit 16g vorsichtig für 10 Min ohne Bremse zentrifugiert. Das so gewonnene Pellet wurde in PBS resuspendiert. Es folgte eine Perkoll-Zentrifugierung zur Isolierung der Granulozyten. Die in PBS resuspendierten Zellen wurden sehr vorsichtig auf den Trennfilter über dem Perkoll 1.077 gelegt und anschließend für 25 Min bei 440g ohne Bremse zentrifugiert. Im Sediment befanden sich nun die Granulozyten und die Erythrozyten. Dieses Pellet wurde mit PBS resuspendiert und bei 340g für 10 Min zentrifugiert.

Nach der Entfernung der Überstände erfolgte die Lyse der Erythrozyten auf Eis. Dafür wurde das Pellet ein Minute mit 0.2% NaCl-Lösung und eine Minute mit 1.6% NaCl-Lösung inkubiert. Nach zehnmütiger Zentrifugierung bei 340g wurden die Überstände mit den geplatzen Erythrozyten über dem Pellet abgenommen. Das Pellet enthielt nun ausschließlich Granulozyten und gegebenenfalls wenige Lymphozyten.

Es folgte die immunmagnetische Negativ-Selektion der eosinophilen Granulozyten. Das Pellet wurde mit PBS/BSA 0.4%, CD16 und CD3 Microbeads entsprechend der Zellzahl (pro 10^6 Zellen 6 μ l CD16 Microbeads und pro 10^6 Zellen 3 μ l CD 3 Microbeads) für 30 Min bei 4°C inkubiert. Die Macs-Säule wurde währenddessen eingesetzt und mit PBS/0.4%BSA vorgespült. Die Zellsuspension ließ man dann durch die Säule tropfen. Durch die verwendeten Microbeads wurden die T-Zellen (Anti-CD3) und die neutrophilen Granulozyten (Anti-CD16) entfernt. Es folgte eine erneute Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer, bevor die gewonnenen eosinophilen Granulozyten bei 340g für 10 Min zentrifugiert und anschließend mit Tyrode/BSA 0.4% auf eine Konzentration von 500.000 eosinophile Granulozyten pro Milliliter resuspendiert wurden.

4.3 Anfertigung von Zytospin-Präparaten

Um die Reinheit der eosinophilen Granulozyten zu überprüfen, wurden am Ende jeder Isolation jeweils 20.000 Zellen in einer Zytospinzentrifuge langsam für 10 Min mit Bremse zentrifugiert. Nachdem die Zellen auf den Objektträgern an der Luft getrocknet waren, wurden sie nach Unna-Pappenheim, ein Farbgemisch nach May-Grünwald und Giemsa, gefärbt.

Eine Differentialzellzählung wurde an 100 Zellen durchgeführt. Betrug die Reinheit unter 85% galt die Isolierung als unbrauchbar und alle Zellen wurden verworfen. Die durchschnittliche Reinheit der Granulozyten Isolierung betrug 97.2% mit einer Standardabweichung von +/- 3.76.

4.4 Überprüfung der Vitalität

Um die Vitalität der Zellen zu überprüfen, wurden 20µl Zellen zusammen mit 1% Essigsäure und Trypanblau vermischt und auf die Neubauer Zählkammer gegeben. Die vitalen Zellen stellten sich ungefärbt, die Toten gefärbt dar. Die Vitalität der verwendeten Zellen betrug >95%.

4.5 Degranulation von eosinophilen Granulozyten auf unbeschichteten Platten

Die Höhe der ECP-Ausschüttung von eosinophilen Granulozyten wurde basal und nach Anregung durch verschiedenen Stimulanzien und unter dem Einfluss der Surfactantproteine SP-A, PAP-SP-D und rek.SP-D bestimmt. Die verwendeten Stimulanzien waren Eotaxin und Ca-Ionophore. Es wurde wie folgt vorgegangen:

Zur Vorbereitung der Degranulation wurden 96 Well Platten mit je 100µl PBS/BSA 3% pro Well beschichtet und für zwei Stunden bei 37°C und 5%-CO₂ inkubiert, um freie Bindungsstellen, die eventuell zu einer unspezifischen Stimulierung führen könnten, abzusättigen. Im Anschluss erfolgte die dreimalige Waschung mit PBS-Puffer. Die dann den Wells zugeführte Zellsuspension enthielt jeweils 50.000 Zellen, welche in einem Endvolumen von 100µl in Tyrode/BSA 0.4% vorlag. Dieser wurden entsprechend des jeweiligen Versuchsansatzes die verschiedenen Stimulanzien bzw. Surfactantproteine zugeführt. Zur Kontrolle wurden die Versuche analog mit einer Negativkontrolle (Tyrode/BSA 0,4%) und zusätzlich bei den Versuchen mit Surfactantproteinen mit einer Positivkontrolle (Ca-Ionophore) durchgeführt.

Nach erneuter Inkubation erfolgte die Zentrifugation bei 350g für 5 Min, der Überstand wurde bis zu Messung der ECP-Ausschüttung bei -20°C in einem 1,5ml Eppendorf Röhrchen asserviert.

Es wurden folgende Versuchsreihen angesetzt: Zur Optimierung der Methode verglichen wir zunächst die ECP-Ausschüttung nach Zellstimulation mit Eotaxin in je drei verschiedenen Konzentrationen (100, 500 und 750ng/ml) mit der ECP-Ausschüttung nach Stimulation mit Ca-Ionophore, in der oben genannten Konzentration (siehe 3.5). Ferner wurden zwei und vier Stunden Inkubationszeit verglichen. Der Einfluss von Surfactantproteinen A und D auf die ECP-Degranulation wurde in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von PAP SP-D, rek.SP-D und SP-A (0.05, 0.5, 5, 50, 500 und 5000ng/ml) gemessen.

4.6 Degranulation von eosinophilen Granulozyten auf mit Allergikerserum, sIgA und IgG beschichteten Platten

Zur Vorbereitung der Degranulation wurden auf 96 Well Platten verschiedene Stimuli in einem Volumen von 100µl beschichtet. Je nach Ansatz entweder Allergikerserum (1:10 in Natrium-Carbonat Puffer pH 7.4 verdünnt), IgG (100µg/ml in Natrium-Carbonat Puffer pH 7.4 verdünnt), sIgA (100µg/ml in Natrium-Carbonat Puffer pH 7.4 verdünnt) oder für die Negativkontrolle nur Na-Carbonat Puffer. Inkubation bei 4°C im Kühlschrank über Nacht. Am nächsten Tag dreimaliges Waschen der Platten mit TBS-Puffer und Absättigung der freien Bindungswerten durch Inkubation mit Tyrode/BSA 1% Puffer für zwei Stunden bei 37°C. Anschließend erneutes dreimaliges Waschen mit TBS.

Dann wurden je 50.000 isolierte eosinophile Granulozyten in die Wells zu einem Endvolumen von 100µl gegeben und abschließend noch, entsprechend dem gewünschten Ansatz die verschiedenen Surfactantproteine SP-A, SP-D und rek.SP-D (je 500ng/ml) hinzugefügt. In jeder Versuchsreihe wurde jeweils eine Negativkontrolle aus Tyrode Puffer angesetzt. Anschließend erneute zwei stündige Inkubation der Platten bei 37°C und 5%CO₂ Begasung und abschließende Zentrifugierung für fünf Minuten ohne Bremse bei 340g.

4.7 ECP-Messung

Die Höhe der ECP-Degranulation der eosinophilen Granulozyten wurde anhand eines halb-automatisierten Immunassays (UniCap 100 der Firma Pharmacia Diagnostics) in den im letzten Schritt der Stimulation gewonnenen Überständen nach erfolgtem Auftauen gemessen. Das Meßprinzip entspricht dem eines Sandwich Immunassays. Anti-ECP, welches kovalent an ImmunoCAP™ angekoppelt ist reagiert mit dem ECP der Proben. Anschließend werden Enzym-gekennzeichnete Antikörper gegen ECP hinzugefügt um Komplexe zu bilden. Nach Inkubation mit einem Entwicklungsgagens wird die Fluoreszenz des Eluats gemessen. Die Konzentrationen in den Überständen wurden anhand Eichkurven, durch Messwerte die zwischen zwei bis 200µg/l lagen, ermittelt. Werte über den genannten Grenzwerten können nicht quantifiziert werden.

4.8 Auswertung und Statistik

Für die Aufnahme und Auswertung der Daten sowie für die Erstellung der Graphen wurde das Programm Prism 5 von GraphPad Software Incorporate® verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standarderror angegeben. Da nicht immer von einer Normalverteilung der Ergebnisse ausgegangen werden konnte, wurde neben der graphischen Darstellung die univariate Varianzanalyse ANOVA und zur Überprüfung der Bonferroni Vergleichstest verwendet. Es wurden nach Berechnung der ANOVA bei den multiplen Vergleichen gezielt nur diejenigen ausgewählt und berechnet, aufgrund derer das Experiment angelegt worden war. Dies ist in der Legende der Tabellen mit den Ergebnissen der ANOVA angeben. Dabei wurde bei den Tests ein zweiseitiger p-Wert von <0.05 als statistisch signifikant angesehen.

5 Ergebnisse

5.1 Probanden und Reinheit der eosinophilen Granulozyten Isolierung

Es wurden 48 verschiedene Isolierungen durchgeführt, wobei einzelne Probanden auch mehrfach an verschiedenen Tagen als Blutspender dienten. Das mittlere Alter für das weibliche Geschlecht betrug 23 Jahre mit einer Standardabweichung von +/- 1.8 Jahren, für das männliche Geschlecht 24 Jahre mit einer Standardabweichung von +/- 11 Jahren. Fünf Probanden waren weiblich und vierzehn männlich. Die durchschnittliche Reinheit der Granulozyten Isolierung betrug 97.2%.

Datum	Geschlecht	Alter (J)	Initialen	% Granulozyten (zur Lc. Zahl / pro μl Blutvolumen)	Gesamt IgE	Reinheit der Isolierung
19.12.02	W	24	M.K.	66.3%, $5.2 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	61.0 kU/l	99%
23.01.03	M	23	M.H.	47.1%, $2.7 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	337 kU/l	k.A.
28.03.03	M	25	E.L.	s.u.	62.2 kU/l	99%
03.04.03	M	23	M.H.	s.u.	40.2 kU/l	95%
11.05.03	M	26	T.R.	30.2%, $1.5 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	8.90 kU/l	100%
01.06.03	M	64	H.R.B.	52.5%, $1.7 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	9.33 kU/l	100%
19.06.03	M	24	O.T.	66.2%, $3.9 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	54.4 kU/l	90%
15.07.03	W	26	E.B.	52.6%, $2.8 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	50.9 kU/l	98%
24.07.03	W	24	R.R.	54.6%, $2.3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	s.u.	99%
28.07.03	W	26	E.B.	45.6%, $2.0 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	53.8 kU/l	97%
05.08.03	M	24	O.T.	67.6%, $3.8 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	25.4 kU/l	100%
08.08.03	M	26	D.H.	61.3%, $2.6 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	36.5 kU/l	97%
13.08.03	M	24	J.L.	46.7%, $2.1 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	16.0 kU/l	90%
24.08.03	M	37	W.G.	63.7%, $3.6 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	40.2 kU/l	98.5%
28.08.03	W	24	R.R.	58.9%, $2.8 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	34.3 kU/l	99%
30.08.03	M	24	O.T.	53.5%, $2.5 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	57.5 kU/l	90%
04.09.03	M	24	F.S.	44.7%, $2.4 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	101 kU/l	89%
14.10.03	W	26	I.L.	71.8%, $6.0 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	19.0 kU/l	85%

Datum	Geschlecht	Alter (J)	Initialen	% Granulozyten (zur Lc. Zahl / pro μl Blutvolumen)	Gesamt IgE	Reinheit der Isolierung
26.10.03	M	26	T.G.	60.2%, $4.3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	50.0 kU/l	96%
31.10.03	W	26	E.B.	53.5%, $3.2 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	67.6 kU/l	98%
27.02.04	W	24	M.K.	62.6%, $2.6 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	81.6 kU/l	100%
29.02.04	W	26	E.B.	45.3%, $1.9 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	53.6 kU/l	99%
03.03.04	M	64	H.R.B.	60,0%, $3.0 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	s.o.	99%
04.03.04	M	24	F.S.	s.o.	s.o.	k.A.
12.05.04	M	25	E.L.	45,4%, $2.5 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	s.o.	98%
14.05.04	M	27	D.H.	58.3%, $2.3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	s.o.	100%
19.05.04	M	25	J.L.	58.4%, $2.6 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	s.o.	99%
25.05.04	M	28	C.P.	61.4%, $3.7 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	k.A.	k.A.
28.05.04	M	28	C.P.	52.2%, $3.1 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	k.A.	98%
01.06.04	M	24	F.S.	44.8%, $2.5 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	s.o.	100%
03.06.04	M	27	D.H.	52.1%, $2.6 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	s.o.	97%
07.06.04	M	27	M.P.	58.2%, $3.3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	15.4 kU/l	k.A.
24.06.04	M	28	C.P.	46.4%, $2.6 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	k.A.	98%
26.06.04	M	27	T.G.	59.6%, $4.4 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	s.o.	100%
28.06.04	M	27	T.G.	57.7%, $4.0 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	s.o.	100%
07.07.04	M	25	J.L.	48.6%, $2.2 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	s.o.	92%
15.07.04	M	28	M.P.	49.4%, $2.1 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	s.o.	96%
11.07.04	M	27	T.G.	55.5%, $3.4 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	s.o.	98%
16.07.04	M	35	F.N.	64,0%, $3.4 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	s.o.	100%
19.07.04	W	25	R.R.	46.5%, $3.6 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	s.o.	100%
22.07.04	M	28	C.P.	s.o.	k.A.	k.A.
29.07.04	M	35	F.N.	60.8%, $2.7 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	28.0 kU/l	98%
02.08.04	M	27	D.H.	68,0%, $2.5 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	s.o.	k.A.
05.08.04	M	65	H.R.B.	53.5%, $2.2 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	s.o.	k.A.
06.08.04	M	25	F.S.	41.2%, $2.0 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	s.o.	100%
10.08.04	W	30	K.S.	k.A.	k.A.	99%
18.08.04	M	25	F.S.	46.6%, $2.6 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	s.o.	k.A.
20.08.04	M	65	H.R.B.	52.8%, $2.1 \cdot 10^3/\mu\text{l}$	s.o.	k.A.

Tabelle 1 Liste der Probanden mit zugehörigem Blutbild und Reinheit der jeweiligen Isolation

5.2 ECP-Degranulation auf verschiedene Stimuli

In einer Reihe von Vorversuchen etablierten wir ein in-vitro Modell zur ECP-Degranulation eosinophiler Granulozyten. Die von uns verwendeten physiologischen (Eotaxin, IgG, sIgA und Serum eines Allergikers) und nicht physiologischen Stimuli (Ca-Ionophore) wurden in Konzentrationen eingesetzt (siehe 4.2), für die bereits eine signifikante ECP-Degranulation gezeigt werden konnte (Kampen 2000).

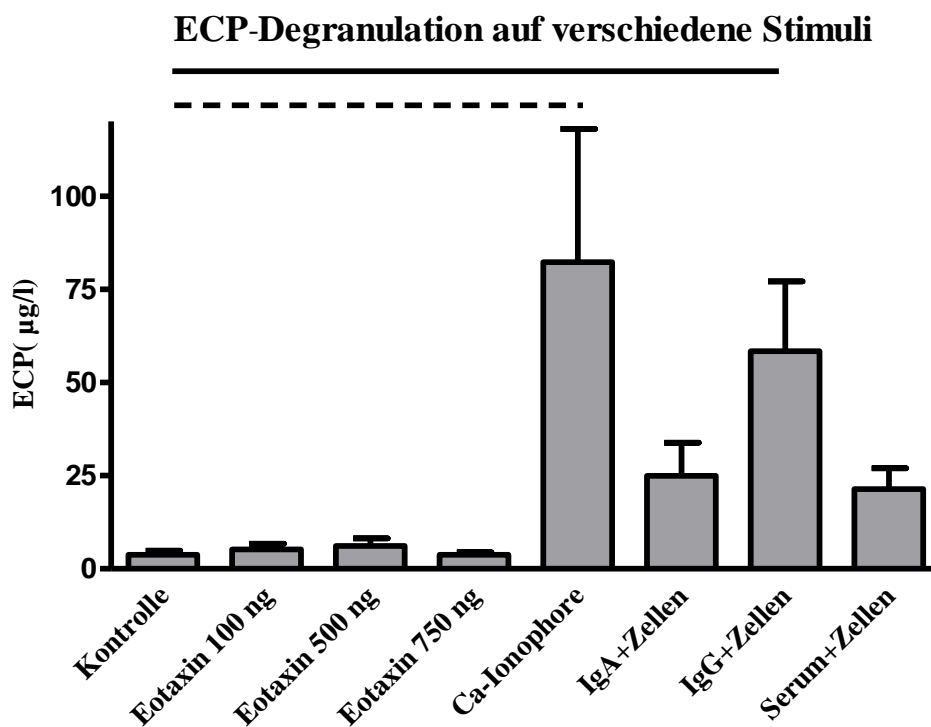


Abbildung 3 Dargestellt ist die Ausschüttung von Eosinophilem kationischem Protein (ECP) in µg/l nach Stimulierung mit verschiedenen Konzentrationen von Eotaxin im Vergleich zu einer Stimulierung mit Ca-Ionophore und sIgA, IgG und Allergikerserum. Als Negativkontrolle dienten nicht stimulierte Zellen. Die Signifikanzen $p < 0.05$, und $p < 0.01$ werden als durchgezogene, respektive gestrichelte Linie dargestellt

	n	Mittelwerte +/- STE	Bonferroni (p < 0.05)
Negativkontrolle	6	3.77 +/- 1.07	--
Eotaxin 100ng/ml	5	5.25 +/- 1.46	ns
Eotaxin 500ng/ml	6	6.14 +/- 2.04	ns
Eotaxin 750ng/ml	2	3.74 +/- 0.69	ns
Ca-Ionophore $5 \cdot 10^{-6}$ M	4	82.27 +/- 35.72	*
IgG 1g/ml	7	58.39 +/- 18.73	*
sIgA 1g/ml	6	24.92 +/- 8.95	ns
Serum 1g/ml	6	21.37 +/- 5.60	ns

Tabelle 2 Statistik ECP-Degranulation auf verschiedene Stimuli. Die p-Wert Analyse zeigt den Vergleich der Negativkontrolle mit den jeweiligen Stimulanzen

Die Versuche zeigten, dass Eotaxin nur eine geringe, nicht signifikante ECP-Degranulation der eosinophilen Granulozyten auslöste. Durch eine Stimulation mit Ca-Ionophore, sIgA, IgG und Allergikerserum konnten wir deutlich höhere ECP-Degranulationen auslösen, welche für Ca-Ionophore und IgG statistische Relevanz zeigten. Entsprechend wurden diese für die weiteren Stimulationsversuchsreihen eingesetzt.

5.2.1 ECP-Degranulation bei verschiedenen Inkubationszeiten

Anschließend optimierten wir die Inkubationszeit der Zellen mit den verschiedenen Stimuli. Die ECP-Degranulation auf Eotaxin in einer Konzentration von 500ng/ml, auf Ca-Ionophore $5 \cdot 10^{-6}$ M und auf nicht stimulierten Zellen wurde nach jeweils zweistündiger und vierstündiger Inkubationszeit im Vergleich gemessen.

Zeitreihe ECP-Degranulation

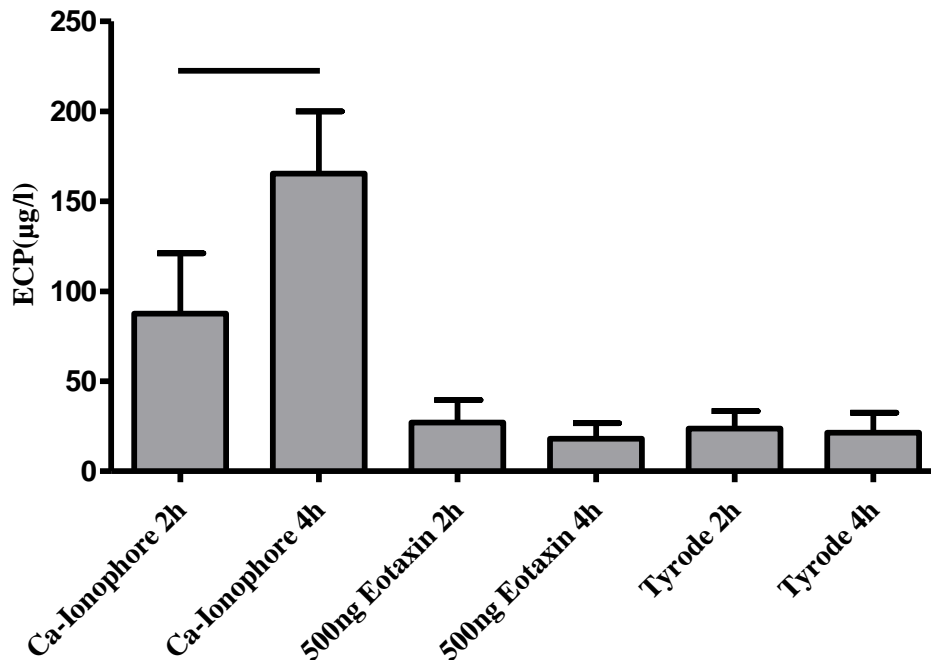


Abbildung 4 Dargestellt ist die Ausschüttung von ECP [$\mu\text{g/l}$] unstimulierter und stimulierter Zellen. Dabei wurden zwei Stunden Inkubationszeit mit vier Stunden Inkubationszeit verglichen. Die Signifikanzen $p < 0.05$, und $p < 0.01$ werden als durchgezogene, respektive gestrichelte Linie dargestellt

	n	Mittelwerte +/- STE	Bonferroni ($p < 0.05$)
Ca-Ionophore $5 \cdot 10^{-6}$ M 2h	3	87.61 +/- 33.43	*
Ca-Ionophore $5 \cdot 10^{-6}$ M 4h	2	165.5 +/- 34.53	
Eotaxin 500ng/ml 2h	3	27.10 +/- 12.55	ns
Eotaxin 500ng/ml 4h	2	18.14 +/- 8.51	
Negativkontrolle 2h	3	23.81 +/- 9.64	ns
Negativkontrolle 4h	2	21.35 +/- 11.25	

Tabelle 3 Statistik ECP-Degranulation auf verschiedene Stimuli. Verglichen wurden die einzelnen Stimuli jeweils untereinander zu zwei verschiedenen Zeitpunkten

Bei den nicht stimulierten Zellen zeigte die Verlängerung der Inkubationszeit keinen relevanten Einfluss auf die ECP-Degranulation, bei den mit Ca-Ionophore stimulierten Zellen kam es bereits nach zwei Stunden zu einer deutlichen Stimulation. Die Verlängerung der Inkubationszeit auf vier Stunden brachte eine signifikante Steigerung. Dennoch wurde, aus Praktikabilitäts-Gründen die Inkubationszeit in den folgenden Versuchen auf zwei Stunden

gesetzt. Eotaxin führte praktisch zu keiner ECP-Degranulation, es wurde somit als Stimulanz von den weiteren Versuchen ausgeschlossen.

5.3 Versuchsreihen auf beschichteten Platten

5.3.1 ECP-Degranulation unstimulierter Zellen auf PAP SP-D

Auf unbeschichteten Platten erfolgte zunächst die Inkubation der Zellen mit SP-D in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe und der Vergleich der ECP-Ausschüttung mit der Negativkontrolle.

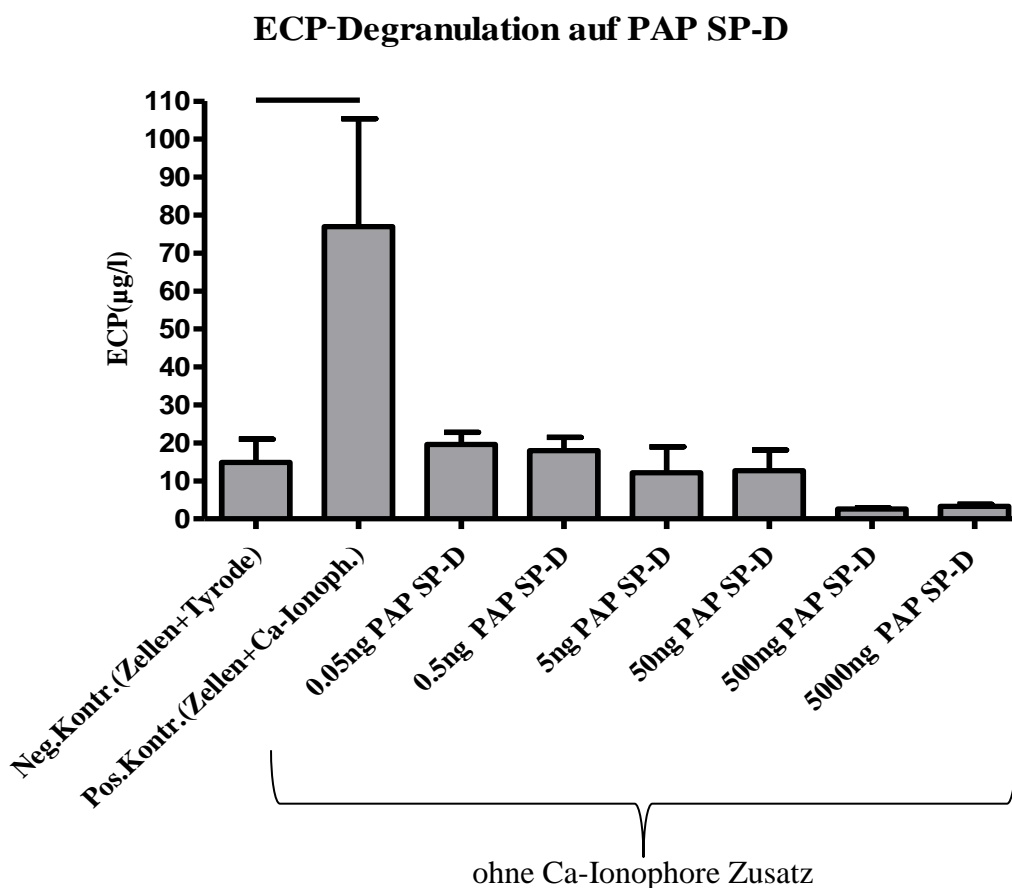


Abbildung 5 Dargestellt ist die Ausschüttung von ECP [$\mu\text{g/l}$] unstimulierter Zellen nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von PAP SP-D. Als Negativkontrolle wurden Zellen in Tyrode Puffer, als Positivkontrolle mit Ca-Ionophore $5 \cdot 10^{-6}$ M stimulierte Zellen verwendet. Die Signifikanzen $p < 0.05$, und $p < 0.01$ werden als durchgezogene, respektive gestrichelte Linie dargestellt

	n	Mittelwerte +/-STE	Bonferroni (p <0.05)
Negativkontrolle	7	14.85 +/- 6.14	
Positivkontrolle	6	76.97 +/- 28.41	*
0.05ng/ml	2	19.60 +/- 3.20	ns
0.5ng/ml	2	17.98 +/- 3.48	ns
5ng/ml	5	12.14 +/- 6.87	ns
50ng/ml	5	12.70 +/- 5.41	ns
500ng/ml	4	2.63 +/- 0.27	ns
5000ng/ml	3	3.30 +/- 0.51	ns

Tabelle 4 Statistik ECP-Degranulation auf unterschiedliche Konzentrationen von SP-D. Die p-Wert Analyse zeigt den Vergleich der Negativkontrolle mit den verschiedenen SP-D Konzentrationen und mit der Positivkontrolle

Wie in Abbildung 5 zu sehen, zeigt PAP SP-D selber keine relevante ECP-Ausschüttung. Unter Zugabe von SP-D in Konzentrationen von 5ng/ml, bis 5000ng/ml konnte eine niedrigere ECP-Ausschüttung festgestellt werden, im Sinne einer Hemmung der Degranulation.

5.3.2 Hemmung der Ca-Ionophore induzierten ECP-Degranulation durch PAP SP-D

Nachdem wir den Einfluss von PAP SP-D auf unstimulierte Zellen untersucht haben, interessierte uns als nächstes die Wirkung von PAP SP-D auf mit Ca-Ionophore stimulierte Zellen.

Hemmung der Ca-Ionophore induzierten ECP-Degranulation durch PAP SP-D

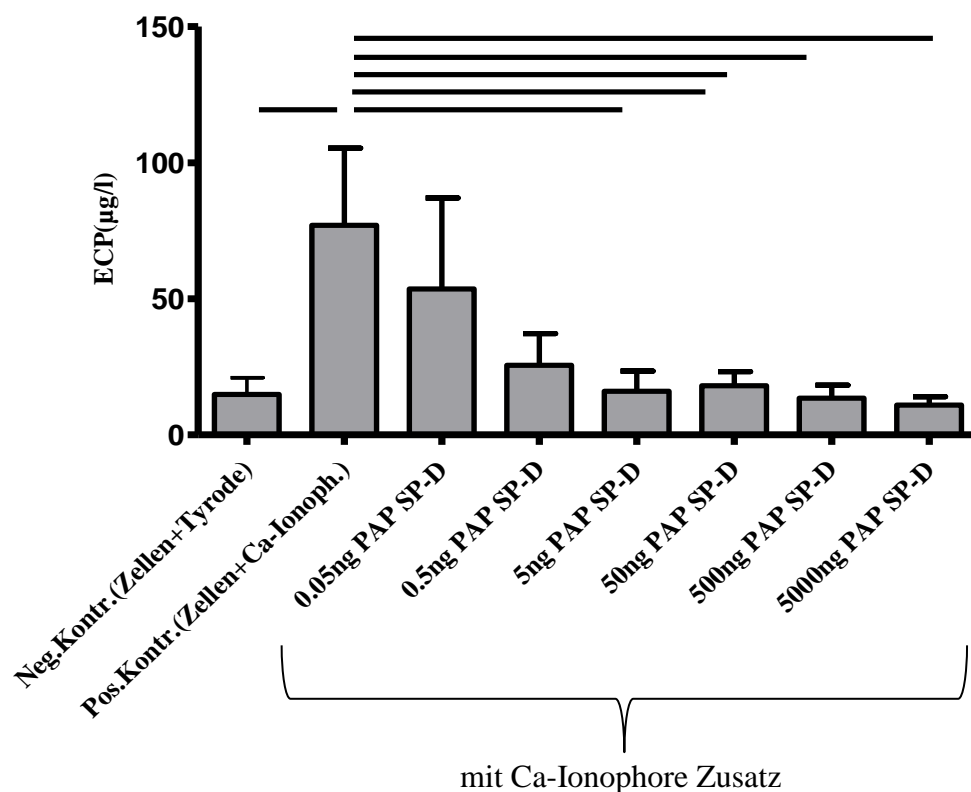


Abbildung 6 Dargestellt ist die Hemmung der Ausschüttung von ECP [$\mu\text{g/l}$] durch PAP SP-D bei Ca-Ionophore ($5 \cdot 10^{-6}$ M) stimulierter Zellen. Die Signifikanz $p < 0.05$, und $p < 0.01$ werden als durchgezogene, respektive gestrichelte Linie dargestellt

	n	Mittelwerte +/-STE	Bonferroni ($p < 0.05$)
Negativkontrolle	7	14.85 +/- 6.14	
Positivkontrolle	6	76.97 +/- 28.41	*
0.05ng/ml SP-D	3	53.61 +/- 33.43	ns
0.5ng/ml SP-D	3	25.57 +/- 11.68	ns
5ng/ml SP-D	6	16.01 +/- 7.41	*
50ng/ml SP-D	6	18.00 +/- 5.29	*
500ng/ml SP-D	5	13.54 +/- 4.75	*
5000ng/ml SP-D	5	10.99 +/- 3.01	*

Tabelle 5 Statistik Hemmung der Ca-Ionophore induzierten ECP-Degranulation durch PAP SP-D. Die Signifikanztestung vergleicht Negativkontrolle mit den verschiedenen SP-D Konzentrationen, sowie mit der Positivkontrolle

Wie man Abbildung 6 entnehmen kann, führt SP-D in steigender Konzentration zu einer Hemmung der durch Ca-Ionophore induzierten ECP-Degranulation, diese zeigt sich für alle

sechs Konzentrationsstufen. Signifikant zeigte sich diese in den Konzentrationen 5, 50, 500 und 5000ng/ml ($p < 0,05$).

5.3.3 ECP-Degranulation unstimulierter Zellen auf rek.SP-D

Anstelle von PAP SP-D verwendeten wir rekombinantes SP-D, bestehend aus Neck-CRD. Auch hier erfolgte zunächst die Untersuchung ob rekombinantes SP-D selbst zu einer Stimulation der eosinophilen Granulozyten führt.

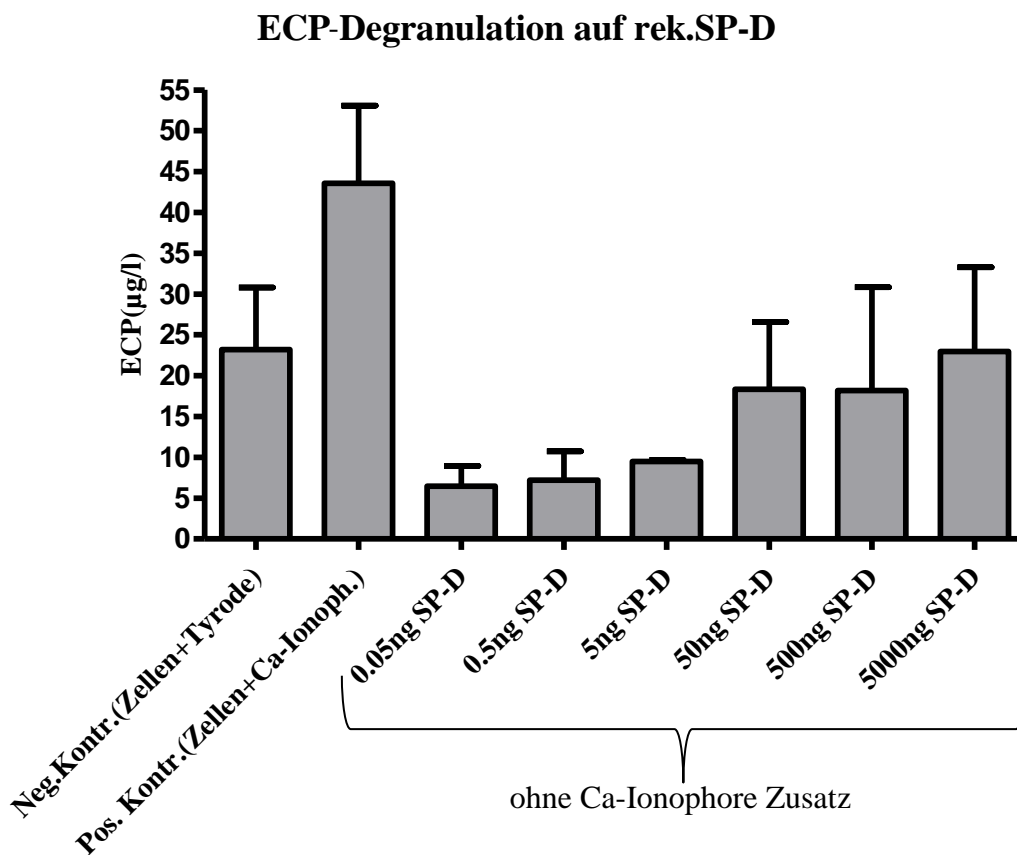


Abbildung 7 Dargestellt ist die Ausschüttung von ECP [$\mu\text{g/l}$] unstimulierter Zellen nach Zugabe von rekombinantem SP-D in unterschiedlichen Konzentrationen

	n	Mittelwerte +/-STE	Bonferroni (p <0.05)
Negativkontrolle	4	23.20 +/- 7.60	
Positivkontrolle	4	43.58 +/- 9.51	ns
0.05ng/ml	3	6.45 +/- 2.51	ns
0.5ng/ml	3	7.18 +/- 3.56	ns
5ng/ml	2	9.47 +/- 0.21	ns
50ng/ml	3	18.33 +/- 8.23	ns
500ng/ml	4	18.20 +/- 12.65	ns
5000ng/ml	4	22.95 +/- 10.34	ns

Tabelle 6 Statistik ECP-Degranulation auf unterschiedliche Konzentrationen von rek.SP-D. Die p-Wert Analyse zeigt den Vergleich der Negativkontrolle mit den verschiedenen rek.SP-D Konzentrationen und mit der Positivkontrolle

Die Positivkontrolle zeigte wie zu erwarten eine hohe Ausschüttung bis maximal 43.58ug/l. Das rekombinante SP-D selbst löste keine ECP-Degranulation aus (siehe Abbildung 7). Die bereits in den Vorversuchen gezeigte Tendenz einer geringeren ECP-Ausschüttung als bei den Kontrollen, zeigte sich hier ebenfalls. Eine signifikante Reduktion zeigte sich jedoch selbst bei der höchsten Konzentration (5000ng/ml) nicht.

5.3.4 Hemmung der Ca-Ionophore induzierten ECP-Degranulation durch rek.SP-D

Bei diesem Versuchsansatz wollten wir den Effekt von rekombinantem SP-D auf die ECP-Degranulation von Ca-Ionophore stimulierten eosinophilen Granulozyten untersuchen.

Hemmung der Ca-Ionophore induzierten ECP-Degranulation durch rek.SP-D

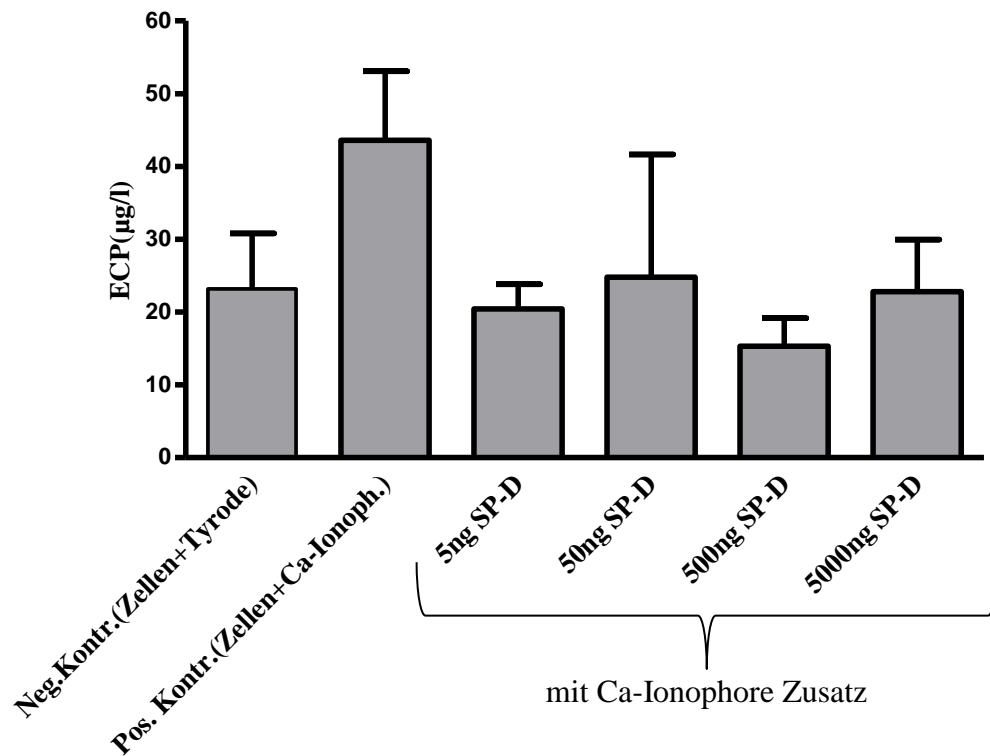


Abbildung 8 Hemmung der Ausschüttung von ECP [µg/l] durch rek.SP-D bei Ca-Ionophore ($5 \cdot 10^{-6}M$) stimulierter Zellen. Negativkontrolle, ECP-Ausschüttung ohne Stimulation mit Ca-Ionophore

	n	Mittelwerte +/-STE	Bonferroni (p < 0.05)
Negativkontrolle	4	23.20 +/- 7.60	
Positivkontrolle	4	43.58 +/- 9.51	ns
0.05ng/ml	3	27.03 +/- 17.30	ns
0.5ng/ml	2	10.87 +/- 5.64	ns
5ng/ml	3	20.43 +/- 3.39	ns
50ng/ml	3	24.79 +/- 16.86	ns
500ng/ml	4	15.31 +/- 3.84	ns
5000ng/ml	3	22.82 +/- 7.51	ns

Tabelle 7 Statistik Hemmung der Ca-Ionophore induzierten ECP-Degranulation durch rek.SP-D. Die p-Wert Analyse zeigt den Vergleich der Positivkontrolle mit den verschiedenen rek.SP-D Konzentrationen und mit der Negativkontrolle

Generell zeigen die ohne rek.SP-D inkubierten Zellen und die Positivkontrolle eine höhere ECP-Ausschüttung im Vergleich zu den mit rek.SP-D inkubierten Zellen. Eine Hemmung

konnten wir für alle Konzentrationsstufen größer als 0.05ng/ml nachweisen, signifikant zeigte sich diese jedoch in keiner Konzentrationsstufe.

5.3.5 ECP-Degranulation unstimulierter Zellen auf SP-A

Analog zur Versuchsreihe von PAP SP-D und rekombinatem SP-D erfolgte die Messung der ECP-Degranulation auch unter dem Einfluss von SP-A.

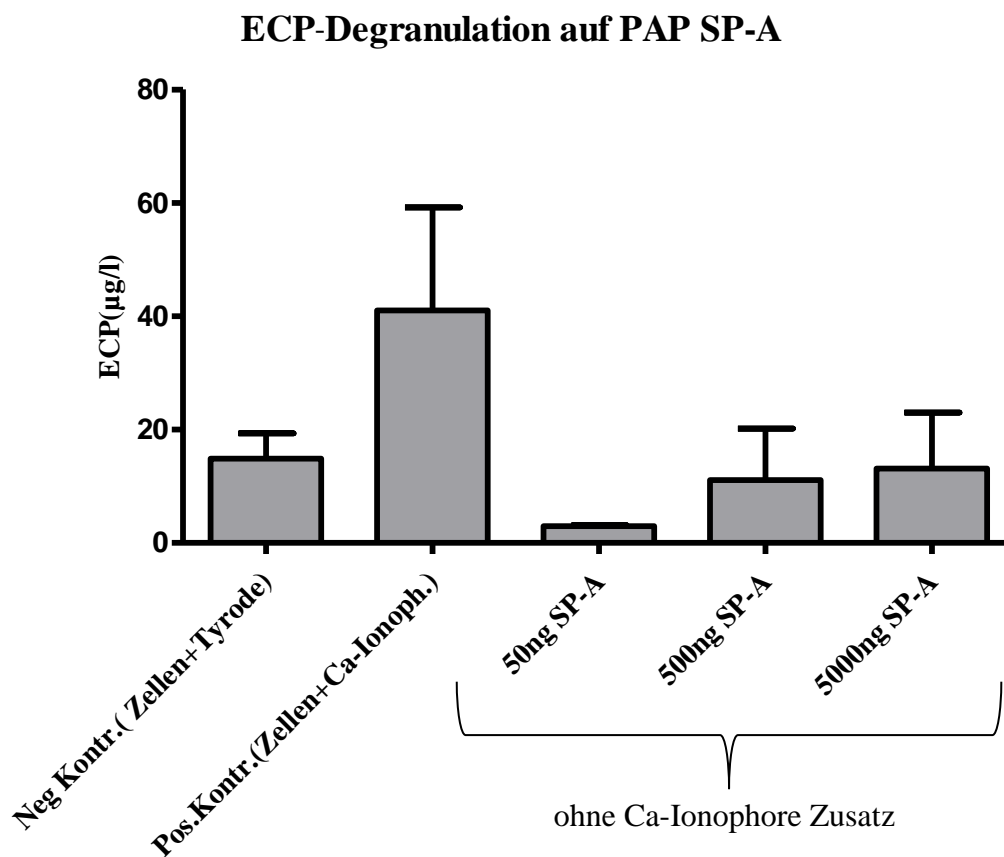


Abbildung 9 Dargestellt ist die Ausschüttung von ECP [$\mu\text{g/l}$] unstimulierter Zellen auf SP-A

	n	Mittelwerte +/- STE	Bonferroni (p < 0.05)
Negativkontrolle	4	14.89 +/- 4.47	
Positivkontrolle	4	41.04 +/- 18.17	ns
50 ng/ml	3	2.94 +/- 0.18	ns
500 ng/ml	3	11.11 +/- 9.10	ns
5000 ng/ml	3	13.13 +/- 9.86	ns

Tabelle 8 Statistik ECP-Degranulation auf unterschiedliche Konzentrationen von SP-A. Die p-Wert Analyse zeigt den Vergleich der Negativkontrolle mit den verschiedenen SP-A Konzentrationen und mit der Positivkontrolle

Wie in Abbildung 9 zu erkennen, zeigte SP-A in unterschiedlichen Konzentrationsstufen keine ECP-Degranulation bei unstimulierten Zellen. Die Tendenz einer geringeren ECP-Ausschüttung als bei den Negativkontrollen, also einer gewissen Hemmung der ECP-Degranulation zeigten alle Konzentrationsstufen.

5.3.6 Hemmung der Ca-Ionophore induzierten ECP-Degranulation durch SP-A

Nachdem wir unsere Beobachtungen von SP-A auf unstimulierte Zellen gemacht hatten, untersuchten wir Ca-Ionophore stimulierte Eosinophile die mit SP-A behandelt wurden.

Hemmung der Ca-Ionophore induzierten ECP-Degranulation durch PAP SP-A

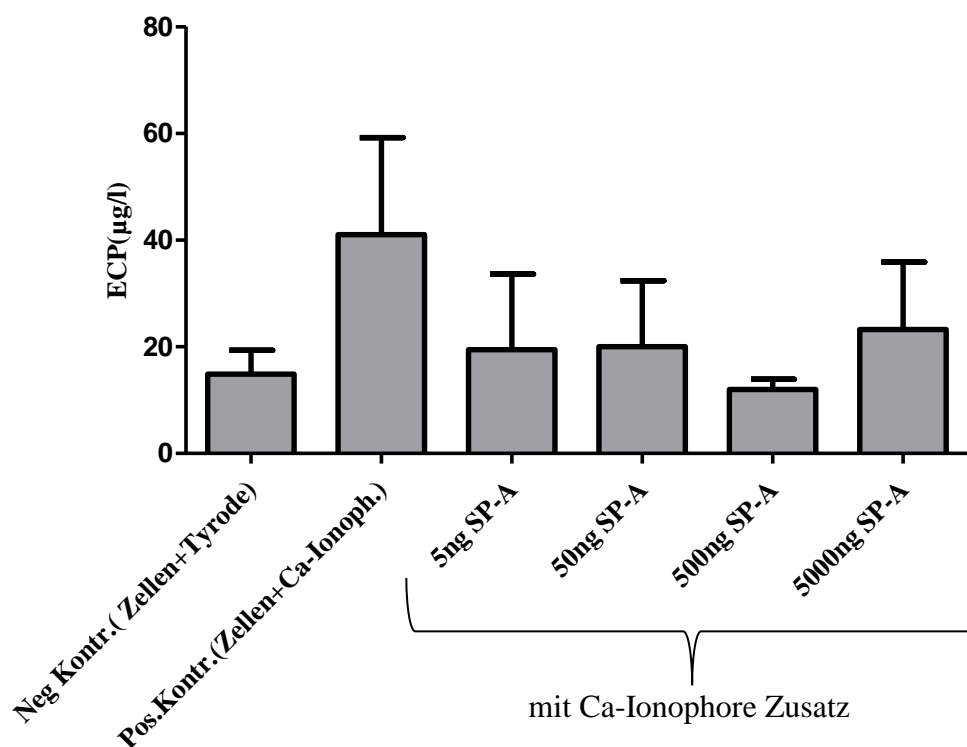


Abbildung 10 Dargestellt ist die Hemmung der Ausschüttung von ECP [$\mu\text{g/l}$] durch SP-A bei mit Ca-Ionophore ($5 \cdot 10^{-6}\text{M}$) stimulierten Zellen

	n	Mittelwerte +/- STE	Bonferroni ($p < 0.05$)
Negativkontrolle	4	14.89 +/- 4.47	
Positivkontrolle	4	41.04 +/- 18.17	ns
5 ng/ml SP-A	2	19.45 +/- 14.15	ns
50 ng/ml SP-A	2	20.02 +/- 12.39	ns
500 ng/ml SP-A	7	11.99 +/- 1.95	ns
5000 ng/ml SP-A	3	23.24 +/- 12.64	ns

Tabelle 9 Statistik Hemmung der Ca-Ionophore induzierten ECP-Degranulation durch SP-A. Die p-Wert Analyse zeigt den Vergleich der Positivkontrolle mit den verschiedenen SP-A Konzentrationen und mit der Negativkontrolle

Wie Abbildung 10 zeigt konnten wir in allen SP-A Konzentration eine Hemmung der Ca-Ionophore induzierten ECP-Degranulation beobachten, eine statistisch relevante Hemmung konnten wir jedoch nicht nachweisen.

5.4 ECP-Degranulation auf mit Allergikerserum, sIgA, IgG und Natrium-Carbonat beschichteten Platten

Beim zweiten großen Block unserer Versuche haben wir sekretorisches IgA, IgG und Serum eines unter Hausstaubmilben-, Pollen- und Katzenhaarallergie leidenden Probanden als Stimulus der ECP-Degranulation verwendet. Gemessen wurde der Einfluss von PAP SP-D, rek.SP-D und SP-A auf die ECP-Degranulation.

5.4.1 ECP-Degranulation auf sIgA beschichteten Platten

Stimulierung der Eosinophilen durch beschichtetes sIgA und Messung der ECP-Ausschüttung nach Zugabe der Surfactantproteine in einer Konzentration von 500ng/ml, da die Vorversuche (s.o.) bei dieser Konzentration eine gute Hemmung gezeigt hatten.

Hemmung der IgA induzierten ECP-Degranulation durch Surfactantproteine

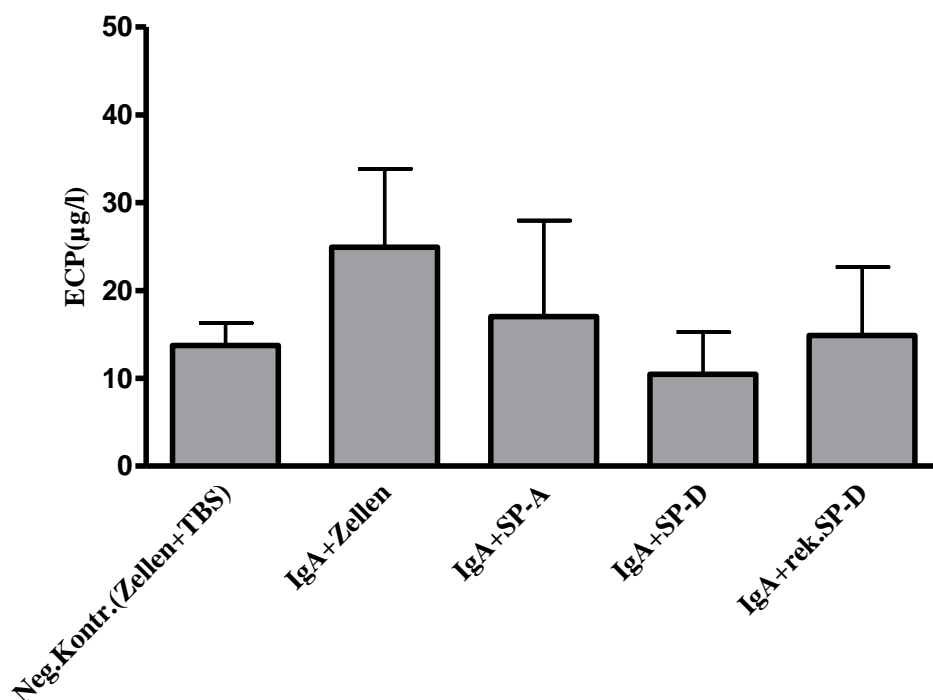


Abbildung 11 Dargestellt ist die Hemmung der Degranulation von ECP [$\mu\text{g/l}$] durch die Surfactantproteine SP-A, SP-D und rek.SP-D (alle in einer Konzentration von 500ng/ml) auf sIgA beschichteten Platten

	n	Mittelwerte +/- STE	Bonferroni (p < 0.05)
Negativkontrolle	7	13.74 +/- 2.56	
IgA (Positivkontrolle)	5	24,92 +/- 8.95	ns
500ng/ml SP-A	5	17.04 +/- 10.94	ns
500ng/ml SP-D	6	10.47 +/- 4.79	ns
500ng/ml rek.SP-D	5	14.87 +/- 7.81	ns

Tabelle 10 Statistik Hemmung der sIgA induzierten ECP-Degranulation durch SP-A, SP-D und rek.SP-D. Die p-Wert Analyse zeigt den Vergleich der Positivkontrolle mit den verschiedenen Surfactantproteinen und mit der Negativkontrolle

Wir konnten für alle Surfactantproteine (SP-A, SP-D und rek.SP-D) eine leichte, nicht statistisch relevante Hemmung der ECP-Degranulation beobachten (siehe Abbildung 11 und Tabelle 10). Die niedrigsten Werte ergaben sich bei einer SP-D Konzentration von 500ng/ml, hier lag der Mittelwert des ECPs bei 10.47 (+/-4.79)µg/l im Vergleich zu 24.92 (+/-6.91)µg/l der Positivkontrolle, das heißt fast um die Hälfte reduziert.

5.4.2 ECP-Degranulation auf IgG beschichteten Platten

Analog zum vorherigen Versuch mit sIgA, wurde nun IgG als Zellstimulus verwendet und die Hemmung der Stimulation durch PAP-SP-D, rek.SP-D und SP-A gemessen.

Hemmung der IgG induzierten ECP-Degranulation durch Surfactantproteine

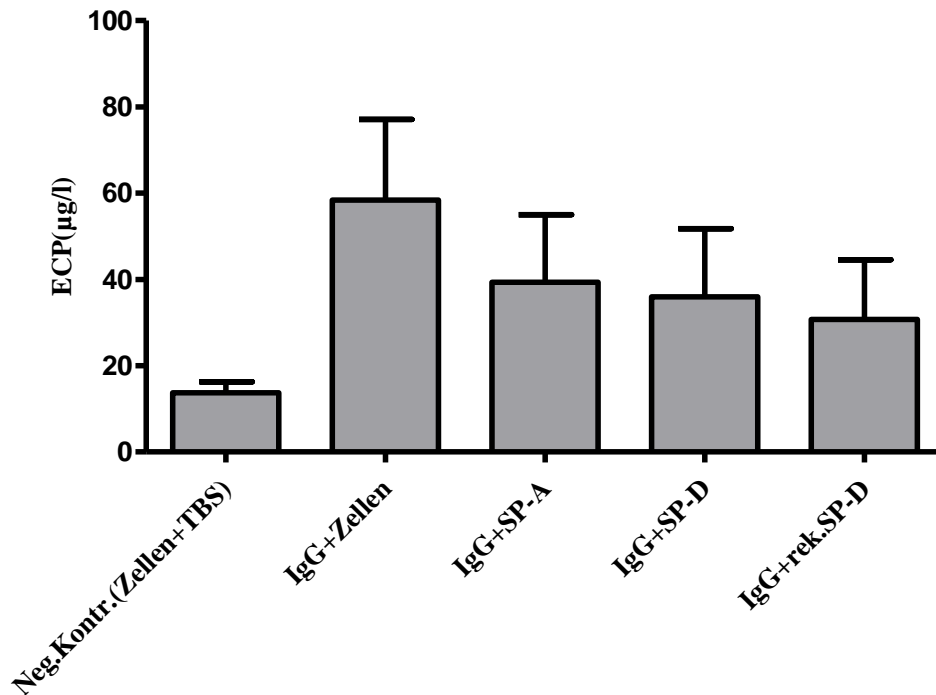


Abbildung 12 Dargestellt ist die Hemmung der Degranulation von ECP [$\mu\text{g/l}$] durch die Surfactantproteine SP-A, SP-D und rek.SP-D (alle in einer Konzentration von 500ng/ml) auf IgG beschichteten Platten

	n	Mittelwerte +/- STE	Bonferroni ($p < 0.05$)
Negativkontrolle	7	13.74 +/- 2.56	
IgG (Positivkontrolle)	7	58.39 +/- 18.73	ns
500ng/ml SP-A	5	39.35 +/- 15.68	ns
500ng/ml SP-D	6	35.98 +/- 15.78	ns
500ng/ml rek.SP-D	5	30.74 +/- 13.85	ns

Tabelle 11 Statistik Hemmung der IgG induzierten ECP-Degranulation durch SP-A, SP-D und rek.SP-D. Die p-Wert Analyse zeigt den Vergleich der Positivkontrolle mit den verschiedenen Surfactantproteinen und mit der Negativkontrolle

In allen Konzentrationsstufen fiel die Hemmung der ECP-Degranulation durch die Surfactantproteine ähnlich stark aus. Die Werte lagen zwischen 30.74 (+/- 13.85) und 39.35 (+/- 15.68). In diesem Ansatz hemmten die Surfactantproteine SP-D, SP-A und rek.SP-D die ECP-Degranulation, eine statistische Relevanz konnten wir jedoch nicht nachweisen.

5.4.3 ECP-Degranulation auf Allergikerserum beschichteten Platten

In der letzten Versuchsreihe wurde Allergiker Serum als Stimulanz der Zellen verwendet und erneut die Hemmung der ECP-Degranulation durch die Surfactantproteine gemessen.

Hemmung der Serum induzierten ECP-Degranulation durch Surfactantproteine

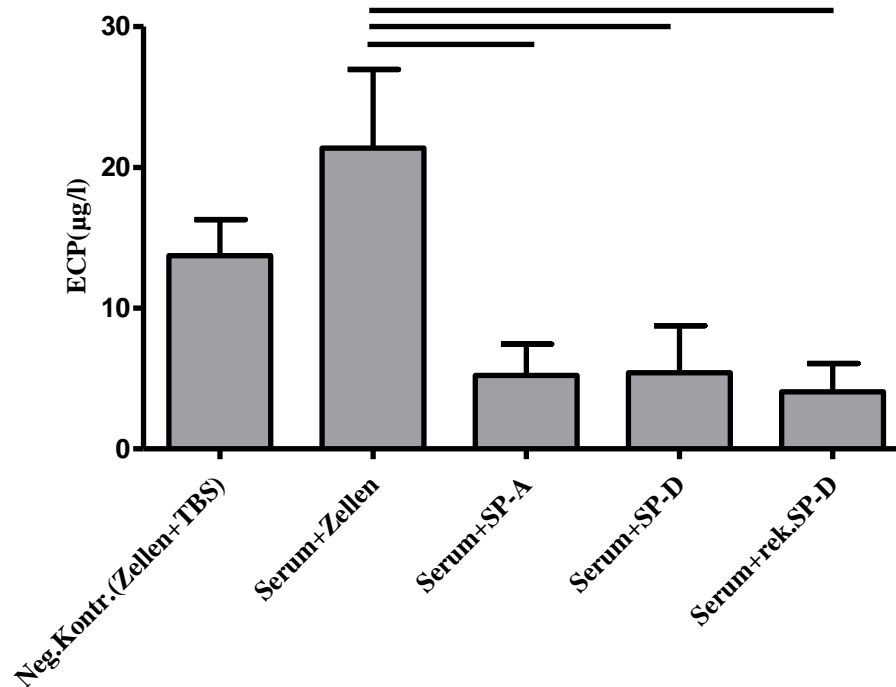


Abbildung 13 Dargestellt ist die Hemmung der Degranulation von ECP [$\mu\text{g/l}$] durch die Surfactantproteine SP-A, SP-D und rek.SP-D (alle in einer Konzentration von 500ng/ml) auf mit Allergikerserum beschichteten Platten. Die Signifikanzen $p < 0.05$, und $p < 0.01$ werden als durchgezogene, respektive gestrichelte Linie dargestellt

	n	Mittelwerte +/- STE	Bonferroni (p <0.05)
Negativkontrolle	7	13.74 +/- 2.56	
Serum (Positivkontrolle)	6	21.37 +/- 5.59	ns
500ng/ml SP-A	5	5.23 +/- 2.21	*
500ng/ml SP-D	6	5.40 +/- 3.36	*
500ng/ml rek.SP-D	4	4.06 +/- 2.01	*

Tabelle 12 Statistik Hemmung der Allergikerserum induzierten ECP-Degranulation durch SP-A, SP-D und rek.SP-D. Die p-Wert Analyse zeigt den Vergleich der Positivkontrolle mit den verschiedenen Surfactantproteinen und mit der Negativkontrolle

Auch hier zeigte sich eine deutliche Hemmung der ECP-Degranulation durch die Surfactantproteine. In diesem Ansatz hemmten die Surfactantproteine SP-A, SP-D und rek.SP-D die ECP-Degranulation sehr deutlich und betragen rund ein Viertel der Positivkontrolle. In diesem Ansatz konnte für alle drei Surfactantproteine eine statistische Signifikanz erreicht werden.

6 Diskussion

Bei der Immunantwort in der Lunge spielen viele verschiedenen Faktoren eine Rolle. Den Surfactantproteinen A und D wird neben ihrer Aufgabe die Lunge vor inhalierten Mikroorganismen zu schützen noch eine Bedeutung bei der Abwehr von Allergenen zugeschrieben. Aufgrund der stetig steigenden Inzidenz von allergischen Erkrankungen sind Untersuchungen zur Identifikation der genauen Pathogenese und damit der möglichen Evaluation neuer therapeutischer und präventiver Ansatzpunkte sehr wichtig. Es ist noch relativ wenig bekannt über die Interaktion und Wirkung der Surfactantproteine auf eosinophile Granulozyten. Um dies zu untersuchen führten wir verschiedene Versuchsreihen mit unterschiedlichen Zellstimuli in einem In-vitro-Modell durch. Die gewonnenen Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit dargestellt.

6.1 Zielparameter, Probanden und Reinheit der eosinophilen Granulozyten

Der erste wichtige Schritt zur Durchführung unserer Versuche war die Festlegung des Parameters, mit welchem wir die eosinophile Aktivierung messen wollten. Nach erfolgter Stimulation von eosinophilen Granulozyten kommt es zur Freisetzung von verschiedenen Granulaproteinen aus dem Zytoplasma. Eines der vier wichtigsten Proteine in den Granula der eosinophilen Granulozyten ist das eosinophile kationische Protein (engl. eosinophil cationic protein, ECP). Wir wählten ECP als unseren Zielparameter, da ECP bereits vielfach in-vitro eingesetzt worden ist und gezeigt werden konnte, dass ECP ein auch klinisch bei Asthma, allergischer Dermatitis, Heuschnupfen, allergischer Bronchitis, Entzündungsprozessen und anderen allergischen Reaktionen eingesetzter Parameter ist. ECP lässt sich mittels eines einfachen kommerziellen Immunassays messen (Czech 1992; Klimek 1996; Tischendorf 2000; Tomassini 1991).

Als nächstes galt es, die Ein- und Ausschlusskriterien für die Auswahl unserer Blutspender festzulegen. Hierbei ist es von großer Bedeutung, möglichst eine Voraktivierung der Zellen auszuschließen. Da ECP, wie bereits oben erwähnt, als sehr empfindlicher Parameter bei Patienten mit allergischen Reaktionen signifikant erhöht ist, war das Vorliegen einer allergischen Erkrankung somit das Hauptausschlusskriterium. Die Einnahme von Antihistaminikern, Cromoglicinsäure, Steroiden und Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten galt als weiteres Ausschlusskriterium, da bekannt ist, dass diese Medikamente den ECP-Spiegel im Serum beeinflussen (Basyigit 2004; Griffin 1991; Sadowska 2005). Zusätzlich wurden die Probanden ausgeschlossen, die unter Erkrankungen litten, die mit einer erhöhten Zahl von eosinophilen Granulozyten einhergehen, wie zum Beispiel Wurminfektionen, Gastroenteritis, Gastritis und Oesophagitis (Hogan 2004; Rothenberg 2006; Strausmann 2004). Kontrolliert wurden die anamnestisch erhobenen Angaben mittels Gesamt-IgE und Bestimmung der Granulozytenzahl im Serum der Probanden.

Nach erfolgter Isolation wurde die Reinheit der eosinophilen Granulozyten bestimmt um eine mögliche Verunreinigung unserer Proben mit anderen Zellen auszuschließen. Betrug die Reinheit weniger als 85% wurden die isolierten Zellen verworfen. Dies ist von Bedeutung, da ECP auch in neutrophilen Granulozyten vorkommt und somit die ECP-Werte falsch hoch gewesen wären (Sur 1999).

6.2 ECP-Degranulation und verwendete Zellstimulanzen

Am Anfang der Versuchsreihe stellte sich die Frage, welcher Zellstimulus die erwünschte ECP-Degranulation aus eosinophilen Granulozyten auslöst. Andere Arbeitsgruppen verwendeten zum Beispiel Iononmycin, PMA oder auch sIgA als Zellstimulus (Cheng 1998 & 2000). Als eines der wichtigsten Interleukine, das in-vitro auf eosinophile Granulozyten wirkt, ist Interleukin 5 bekannt. Es ist bei deren Ausbreitung im Knochenmark und Blut wesentlich beteiligt (Rothenberg 2006; Foster 2001).

Eine Rekrutierung aus dem Blut in die entzündeten Gewebe wird vor allem von den CC-Chemokinen ausgelöst, eine der vier Unterfamilien der Chemokine. Chemokine sind chemotaktische Proteine, die durch die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten eine zentrale Funktion bei immunologischen Prozessen haben (Foster 2001; Rothenberg 2006). Die meisten der CC-Chemokine aktivieren mehrere verschiedene Zellpopulationen. Das Chemokin CCL 11 oder auch Eotaxin genannt aktiviert jedoch ausschließlich eosinophile Granulozyten, da es exklusiv an den Chemokin Rezeptor 3 (CCR3) bindet, den nur diese Zellen exprimieren (Badewa 2002). Nach der Bindung kommt es über die intrazelluläre Aktivierung von ERK2 und p38 zur ECP-Degranulation (Kampen 2000; Kuroki 2007). In der Literatur kann man verschiedene Angaben über die einzusetzende Konzentration von Eotaxin finden. In unseren Vorversuchen wurden die Versuchsreihen mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt (siehe Punkt 5.2.1). Hierbei zeigte sich im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die gute Eotaxin-Stimulierungen zeigen konnten, dass selbst eine Konzentration von 500ng/ml Eotaxin nur eine geringe und wechselnd starke ECP-Degranulation bewirkte (Badewa 2002; Kampen 2000). Es wurden unterschiedliche Eotaxinchargen verwendet, jedoch konnte keine identifiziert werden, die zu einer konsistenteren ECP-Freisetzung führte. Als wahrscheinlichste Ursache für diese Ergebnisse sehen wir eine inter-individuell unterschiedliche Responsivität und möglicherweise auch präparativ induzierte Aktivierungsunterschiede der jeweils frisch isolierten eosinophilen Granulozyten. Verlässlichere ECP-Freisetzungen, die jedoch auch Schwankungen aufwiesen, ließen sich durch den unphysiologischen Zellstimulus Ca-Ionophore induzieren. Ca-Ionophore ist eine Substanz, die einen Calcium-Einstrom von extrazellulär in die Zellen bewirkt und so die zytoplasmatische, intrazelluläre Calcium Konzentration in Leukozyten erhöht und die Zellen damit aktiviert. Die eingesetzten Konzentrationen wurden wie von anderen Arbeitsgruppen vorgeschlagen und untersucht gewählt (Shaw 1985; Shimizu 1994). Diese hatten keine Ausirkung auf die Zellviabilität.

Seitens der zeitlichen Länge der Inkubation der Zellen mit den jeweiligen Stimulanzen finden sich in der Literatur unterschiedlichsten Zeitangaben. In unseren Versuchen zeigte sich eine gute ECP-Degranulation bereits nach zwei Stunden. Die Verlängerung der Inkubation zeigte keine statistisch relevante Veränderung, entsprechend führten wir die weiteren Versuche mit zweistündiger Inkubation durch.

Es sind weitere physiologische Stoffe bekannt, die vor allem im Gewebe zu einer Aktivierung von eosinophilen Granulozyten führen. Zu diesen gehören unter anderem das sekretorische Immunglobulin A (sIgA) und das immobilisierte Immunglobulin G (IgG). Die Immunglobuline G und A sind die zwei am häufigsten vorkommenden Immunglobuline im Körper, wobei Immunglobulin A vor allem in Körperflüssigkeiten zu finden ist.

Man unterscheidet zwei IgA Unterklassen, IgA1 und IgA2. Diese unterscheiden sich in der Molekülmasse der H-Kette und in der Konzentration im Serum. IgA kann sowohl als Monomer als auch als Dimer vorkommen. Bei den Dimeren handelt es sich um das sogenannte sekretorische IgA (sIgA). Es besteht insgesamt aus zwei IgA-Molekülen, einer sogenannten J-Kette und einem Polypeptid mit einer Molekülmasse von 70kDa, der sogenannten sekretorischen Komponente oder Sekretionsstück (SC-Kette). Die SC-Kette wird für den Transport auf Schleimhäuten und als Schutz vor Verdauungsenzymen benötigt (Snoeck 2006).

Im Blut bindet IgA an den Fc-Rezeptor Fc α RI (CD89), welcher auf Immuneffektorzellen, wie den eosinophilen Granulozyten exprimiert wird (Monteiro 1993). Abu-Ghazaleh konnte zeigen, dass eine Bindung von sIgA, im Vergleich zu IgA und IgG, die stärkste eosinophile Degranulation auslöst (Abu-Ghazaleh 1989). Darüber hinaus ist bekannt, dass IgA und IgG bei Patienten mit Erkrankungen aus dem allergischen Formenkreis in erhöhter Konzentration sowohl im Sputum als auch im Serum vorliegt (Kitani 1985; Nahm 1997).

IgG besteht aus zwei langen („schweren“) und zwei kurzen („leichten“) Proteinketten. Die schweren Ketten (Gamma) werden in vier isotypische Subklassen (Gamma 1-4) unterteilt. Die leichten Ketten kommen in zwei Arten (kappa und lambda) vor. Durch bestimmte Enzyme (z. B. Papain oder Pepsin) lassen sich die IgG-Antikörper in drei Fragmente aufspalten. Zwei Fab-Fragmente, welche eine einwertige Antigenbindungsstelle enthalten und ein Fc-Fragment das an Komplementproteine oder zelluläre Fc-Rezeptoren binden kann. Eosinophile Granulozyten exprimieren Fc-Rezeptoren für IgG (Fc_γRII/CD32) (Hartnell 1992). Bei Patienten mit atopischer Diathese kommt es nach einer Sensibilisierung und konsekutiver Bindung von IgG an diesen Rezeptor zu einer eosinophilen Degranulation (Abu-Ghazaleh 1989; Tomassini 1991).

Kaneko et al. konnte zeigen, dass nicht nur die Immunglobuline an sich, sondern auch Serum von Patienten mit Allergien eine Degranulation aus eosinophilen Granulozyten auslösen kann, was für das Vorliegen von allergie-spezifischen Molekülen im Serum von sensibilisierten Patienten spricht (Kaneko 1995). Somit wählten wir das Serum eines an Hausstaubmilben-, Katzenhaar- und Pollenallergie leidenden Patienten als Immunstimulanz für unsere isolierten Zellen. Die von uns eingesetzte Konzentration der Immunglobuline wählten wir in Anlehnung an die Literatur, modifizierten diese aber auf 100µg/ml, um eine möglichst gute Stimulation der eosinophilen Granulozyten durch die Immunglobuline zu bewirken (Tomassini 1991; Motegi 1998). Wie Abbildung 3 zeigt, sahen wir im Vergleich zur Negativkontrolle deutlich erhöhte ECP-Ausschüttungen nach Stimulierung durch sIgA, IgG und Allergikerserum, welche für IgG und Allergikerserum sogar statistische Relevanz erreichten.

6.3 Einfluss von Surfactantprotein A und D auf native eosinophile Granulozyten

Bis jetzt liegen wenige Studien und Daten über die Interaktion der Surfactantproteine A und D auf eosinophile Granulozyten und ihre potenziell protektive Rolle in allergischen Prozessen vor. Es konnte gezeigt werden, dass die Surfactantproteine die spezifische IgE-Bindung von

Aspergillen- und Hausstaubmilbenantigen und die Histamindegranulation aus neutrophilen Granulozyten inhibieren können (Madan 1997; Wang 2007). Singh und Wang konnten zeigen, dass rekombinantes SP-D nasal appliziert im Mausmodell bei auf Hausstaubmilben-sensibilisierten Mäusen das Level an spezifischem IgE, die Blut Eosinophilie und auch die pulmonale Zellinfiltration vermindert (Singh 2003; Wang 2007). All dies gibt Hinweise auf eine direkte Wirkung der Surfactantproteine auf eosinophile Granulozyten. Darüber hinaus ist jedoch nicht bekannt, wie genau, über welche Domäne (z.B. CRD-Domäne) und an welche Rezeptoren die Surfactantproteine an eosinophile Granulozyten binden und somit auf diese einen Einfluss haben. Unsere Arbeitsgruppe um Bredow et al. konnte die Bindung von SP-D an eosinophile Granulozyten in einer Calcium- und Kohlenhydrat-abhängigen Weise zeigen (von Bredow 2006). Diese Tatsache suggeriert die Beteiligung der CRD Region an dieser Bindung. Wir wollten in den ersten Versuchsreihen untersuchen, ob die Surfactantproteine eine ECP-Degranulation auslösen oder schon an sich einen protektiven, anti-allergischen Einfluss auf nicht-stimulierte Eosinophile haben und ob sich hierbei konzentrationsabhängige Unterschiede darstellen lassen.

Wie in Abbildung fünf, sieben und neun zu sehen ist, bewirkten die Surfactantproteine selbst keine relevante ECP-Ausschüttung. Im Gegenteil, wir konnten zeigen, dass unter Zugabe hoher SP-D Konzentrationen eine niedrigere ECP-Ausschüttung im Vergleich zu den Negativkontrollen festzustellen war. Wir werteten dies im Sinne einer gewissen Hemmung der ECP-Degranulation. Diese Ergebnisse geben uns Hinweise dafür, dass die Surfactantproteine eine stabilisierende Wirkung auf unser Immunsystem ausüben und so eine schützende Wirkung auf überschießende allergische Reaktionen einnehmen können.

6.4 Der Einfluss der Surfactantproteine auf stimulierte eosinophile Granulozyten

Nachdem wir zeigen konnten, dass die Surfactantproteine selber keine ECP-Degranulation auslösen, interessierte uns die Frage, welchen Effekt sie auf stimulierte eosinophile

Granulozyten haben. Verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits die Wirkung der Surfactantproteine auf unterschiedliche Zellreihen untersucht. Wang et al. konnte zeigen, dass die Surfactantproteine A, D und auch rekombinantes SP-D bei sensibilisierten Patienten mit Asthma bronchiale die Histamindegranulation aus Vollblut hemmen können (Wang 2007). Madan et al. zeigte das SP-A und SP-D die Histaminfreisetzung aus stimulierten basophilen Granulozyten hemmt (Madan 1997). Mit Iononmycin stimulierte eosinophile Granulozyten zeigen eine deutlich verminderte IL-8 Freisetzung, nachdem sie mit SP-A zusammen in-vitro inkubiert wurden (Cheng 1998).

Wir inkubierten eosinophile Granulozyten mit aufsteigenden Konzentrationen von SP-A, SP-D und rek.SP-D, nachdem wir sie zuvor mit Ca-Ionophore stimuliert hatten und maßen die ECP-Degranulation.

Die Ergebnisse für alle drei verwendeten Surfactantproteine zeigten Hinweise auf eine konzentrationsabhängige Hemmung der Calcium-Ionophore induzierten ECP-Freisetzung. Diese Hemmung war für Surfactantprotein D in den Konzentrationen von 50, 500 und 5000ng/ml und für rekombinantes Surfactantprotein D in einer Konzentration von 500ng/ml statistisch signifikant. Für SP-A konnten wir keine statistisch signifikante Hemmung der ECP-Degranulation im Vergleich zur Positivkontrolle zeigen. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass in diesen Experimenten die ECP-Ausschüttung bei den Positivkontrollen deutlich niedriger war. Die ECP-Werte in Gegenwart von SP-A waren vergleichbar denen der Versuchsreihen mit SP-D und rekombinatem SP-D. Da SP-A nicht im Fokus der Untersuchungen der in dieser Arbeit präsentierten Versuchsreihen lag, wurde auf eine Ausdehnung dieser Versuche verzichtet.

Zusammenfassend zeigen diese In-vitro-Ergebnisse eine konzentrationsabhängige Hemmung der ECP-Ausschüttung aus eosinophilen Granulozyten durch SP-D. Diese Daten können auf einen protektiven Effekt dieses Surfactantproteins bei allergischen Erkrankungen hindeuten.

Die Tatsache, dass rekombinantes Surfactantprotein D, welches wie oben erwähnt aus der Neck/CRD Region besteht ebenfalls eine Hemmung auslöst spricht dafür, dass die Hemmung über die CRD-Region der Surfactantproteine vermittelt wird.

6.5 Der Einfluss der Surfactantproteine auf mit Allergikerserum, sIgA und IgG stimulierte eosinophile Granulozyten

Abschließend wollten wir noch Hinweise darüber erlangen wie die Surfactantproteine ihren Einfluss auf die eosinophilen Granulozyten vermitteln und ob physiologische Zellstimuli durch die Surfactantproteine beeinflusst werden können.

Um potenzielle Rezeptorbindungsstellen für SP-D auf eosinophilen Granulozyten zu spezifizieren sind in unserer Arbeitsgruppe für verschiedene Rezeptoren, welche in Zusammenhang mit der eosinophilen Granulozyten Chemotaxis und Degranulation gebracht werden konnten, Flowzytometrie Analysen durchgeführt worden. Diese betrafen für Eotaxin CCR-3, für die IgG vermittelte Zelladhäsion CD11b/CD18 und für die Degranulation mittels IgG den Fc γ -II/CD32 (Kampen 2000) und SIRP α /CD172a Rezeptor. Letzterer Ligand wurde untersucht nachdem man zeigen konnte, dass SP-D sowohl als Verstärker als auch als Unterdrücker der Entzündungsmediatorproduktion fungieren kann. Dies je nach Ausrichtung während seiner Bindung an SIRP α /CD172a (Gardai 2003). Für den niedrig-affinen IgG-Fc-Rezeptor Fc-RII (CD32), konnten wir eine signifikante Hemmung der Maus IgG2b-anti-human-CD32-PE-Bindung an eosinophile Granulozyten zeigen, wenn die Zellen mit SP-D vorinkubiert wurden. Diese Beobachtung spricht für eine relevante SP-D-Rezeptorinteraktion mit CD32 auf eosinophilen Granulozyten. Darüber hinaus konnten wir SIRP α und CCR3 auf eosinophilen Granulozyten nachweisen, aber es zeigte sich, dass SP-D nur schwach mit der spezifischen Antikörperbindung an diesen Rezeptor interferierte. Eine Bindung von SP-D an CD11b/CD18 konnte nicht nachgewiesen werden (von Bredow 2006).

Somit vermuteten wir, dass CD32, der Haupt-IgG-Fc-Rezeptor auf eosinophilen Granulozyten, eine potenzielle Rolle in der inhibitorischen Wirkung von SP-D darstellt. CD32 wird auf verschiedenen Zellen wie Monozyten, Makrophagen, Thrombozyten, B-Zellen, neutrophilen- und eosinophilen Granulozyten exprimiert. Er ist an einer Vielzahl von immunologischen Prozessen beteiligt wie die Bindung von IgG-Immunkomplexen, der Clearance von Immunkomplexen, an der Antikörperproduktion und der Freisetzung von zytotoxischen Granulaproteinen (Gessner 1998).

Wie oben schon erwähnt, konnte gezeigt werden, dass eine Bindung von immobilisiertem IgG1 und IgG3 an den CD32-Rezeptor eine Granuladegranulation aus eosinophilen Granulozyten bei asthmatischen Allergikern auslösen kann (Kaneko 1995). Aber nicht nur IgG spielt bei der Aktivierung der Eosinophilen eine wichtige Rolle. Auch IgA und sekretorisches IgA sind bei einer Aktivierung und Auslösung einer Degranulation beteiligt (Abu-Ghazaleh 1989; Monteiro 1993). Als wichtiger IgA-Rezeptor auf eosinophilen Granulozyten ist Fc α R bekannt. Eine Bindung der Surfactantproteine an diesen wurde bisher nicht untersucht.

Wie bekannt, können sowohl SP-A als auch SP-D die Toll-like-Rezeptoren TLR2, TLR4 und TLR4 Adaptor MD-2 direkt via ihrer CRD binden und die entzündliche Wirkung von Pathogenen antagonisieren. Zudem bindet SP-A direkt an TLR2 und stimuliert damit eine TNF-alpha-Freisetzung (Resnick 1993; Sato 2003; Yamada 2006). SPR-210 ist ein weiterer wichtiger SP-A Rezeptor, welcher durch eine Bindung von SP-A die Abtötung von SP-A opponierten Pathogenen durch Makrophagen erhöht, und Entzündungsreaktionen eindämmen kann indem er die T-Lymphozytenproliferation unterdrückt (Borron 1998; Weikert 2000).

Es liegen jedoch bisher kaum Studien vor über welche Rezeptoren SP-D, SP-A und rek.SP-D an eosinophile Granulozyten binden und Einfluss auf die Degranulation nehmen könnten. Wir coateten somit Platten mit sIgA, IgG und Serum eines Allergikers und inkubierten eosinophile Granulozyten mit diesen um sie an die Immunglobuline zu binden. Anschließend

maßen wir die ECP-Degranulation und konnten eine deutliche Stimulierung der eosinophilen Granulozyten zeigen (siehe Abbildung 3). Mit dem Wissen, dass SP-D an CD32 bindet, untersuchten wir ob eine Vorinkubation der eosinophilen Granulozyten mit SP-D, SP-A und rek.SP-D die Wirkung der Immunglobuline beeinflussen kann. Wie die Abbildungen 11, 12 und 13 zeigen, sahen wir eine deutlich geringere ECP-Degranulation aus mit Serum und Immunglobulinen stimulierten eosinophilen Granulozyten, welche mit den Surfactantproteinen inkubiert wurden, als aus den eosinophilen Granulozyten die ohne Surfactantproteine inkubiert wurden.

Diese Ergebnisse könnten bedeuten, dass die Surfactantproteine vermutlich mittels ihrer CRD-Region an Immunglobulinrezeptoren binden, diese blockieren und die über sie vermittelte Wirkung unterdrücken. Da im Serum von Allergikern nicht nur IgG und sIgA vorhanden sind kommen natürlich noch weitere Rezeptoren in Frage, über die Surfactantproteine an eosinophilen Granulozyten binden könnten und somit ihren Einfluss vermitteln. Weitere Rezeptorbindungsstudien und die Anwendung spezifischer Inhibitoren sind notwendig, um diese Fragen weiter zu untersuchen.

7 Zusammenfassung

Die Rolle, die die hydrophoben Surfactantproteine SP-A und SP-D welche in den oberflächlichen Atemwegsflüssigkeiten zu finden sind spielen lässt sich wie folgt zusammenfassen. Zum einen, eine wichtige immunologische Funktion, indem sie zur Abwehr von Erregern beitragen. Zum anderen, bei der Regulation allergischer Reaktionen, bei welcher der eosinophile Granulozyt mit den von ihm freigesetzten Entzündungsmediatoren als wichtigste Effektorzelle zu nennen ist. Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss der Surfactantproteine A und D auf eosinophile Granulozyten in Bezug auf ihre ECP-Degranulation zu untersuchen.

In verschiedenen Versuchsreihen wurde die Freisetzung von Eosinophilem kationischem Protein (ECP) ohne (native Zellen) und nach Stimulation der Zellen mittels Fluoreszenzassay gemessen. Als Stimulanzen kamen Ca-Ionophore A23187 als eine potenter, wenn auch unphysiologischer Zellstimulus und die Immunglobuline A und G, sowie das Serum eines Allergikers als physiologische Stimuli zum Einsatz.

Die Ergebnisse zeigten, dass durch die Surfactantproteine selbst keine Aktivierung der ECP-Freisetzung aus nativen eosinophilen Zellen ausgelöst werden kann. Die Degranulation stimulierter Zellen hingegen kann durch natürliches SP-A, SP-D und rekombinantes SP-D reduziert werden. Die wirksamen SP-D Konzentrationen lagen zwischen 0,05 und 5000ng/ml, wenn die Zellen mit Ca-Ionophore stimuliert wurden. Wurden IgA und IgG als Stimuli verwendet, konnte die ECP-Degranulation durch SP-A, SP-D und rekombinantes SP-D ebenfalls gehemmt werden, zeigte sich jedoch in keiner Konzentration signifikant. Bei der Stimulation mit Allergikerserum zeigten sowohl SP-A, SP-D als auch rekombinantes SP-D eine hemmende Wirkung. Zusammenfassend zeigen unsere In-vitro-Ergebnisse eine inhibitorische Wirkung von SP-A und D auf die ECP-Degranulation aus stimulierten eosinophilen Granulozyten. Dies ist mit der Hypothese einer protektiven Wirkung dieser Surfactantproteine bei Erkrankung aus dem allergischen Formenkreis vereinbar.

8 Literaturverzeichnis

1. **Abu-Ghazaleh RI, Fujisawa T, Mestecky J, Kyle RA, Gleich GJ.** (1989) IgA-induced eosinophil degranulation. *J Immunol.* Apr 1; 142(7): 2393-400.
2. **Alam R, Forsythe PA, Lett-Brown MA, Grant JA.** (1992) Interleukin-8 and RANTES inhibit basophil histamine release induced with monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant peptide-1 and histamine releasing factor. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Oct; 7(4): 427-33.
3. **Badewa AP, Hudson CE, Heiman AS.** (2002) Regulatory effects of eotaxin, eotaxin-2, and eotaxin-3 on eosinophil degranulation and superoxide anion generation. *Exp Biol Med (Maywood).* Sep; 227(8): 645-51.
4. **Basyigit I, Yildiz F, Kacar Ozkara S, Boyaci H, Ilgazli A, Ozkarakas O.** (2004) Effects of different anti-asthmatic agents on induced sputum and eosinophil cationic protein in mild asthmatics. *Respirology.* Nov; 9(4): 514-20.
5. **Bates SR, Dodia C, Tao JQ, Fisher AB.** (2008) Surfactantprotein-A plays an important role in the lung surfactant clearance: evidence using the Surfactantprotein-A gene-targeted mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Feb; 294(2): L325-33.
6. **Bochner BS.** (2000) Systemic activation of basophils and eosinophils: markers and consequences. *J Allergy Clin Immunol.* Nov, 106(5 Suppl): S292-302.
7. **Borron P, McCormack FX, Elhalwagi BM, et al.** (1998) Surfactantprotein A inhibits T cell proliferation via its collagen-like tail and a 210-kDa receptor. *Am J Physiol.* Oct; 275(4 Pt 1): L679-86.
8. **Cheng G, Ueda T, Nakajima H, et al.** (1998) Suppressive effects of SP-A on ionomycin-induced IL-8 production and release by eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol.* Sep; 117 Suppl 1: 59-62.
9. **Cheng G, Ueda T, Numao T, et al.** (2000) Increased levels of Surfactantprotein A and D in bronchoalveolar lavage fluids in patients with bronchial asthma. *Eur Respir J.* Nov; 16(5): 831-5.
10. **Czech W, Krutmann J, Schöpf E, Kapp A.** (1992) Serum eosinophil cationic protein (ECP) is a sensitive measure for disease activity in atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* Apr. 126(4): 351-5.
11. **Denburg JA, Telizyn S, Messner H, et al.** (1985) Heterogeneity of human peripheral blood eosinophil-type colonies: evidence for a common basophil-eosinophil progenitor. *Blood.* Aug; 66(2): 312-8.
12. **Douda DN, Jackson R, Grasemann H, Palaniyar N.** (2011) Innate immune collectin Surfactantprotein D simultaneously binds both neutrophil extracellular traps and carbohydrate ligands and promotes bacterial trapping. *J Immunol.* Aug 15; 187(4): 1856-65.

13. **Elsner J, Kapp A.** (1999) Regulation and modulation of eosinophil effector functions. *Allergy*. Jan; (54)1: 15-26.
14. **Erpenbeck VJ, Schmidt R, Günther A, Krug N, Hohlfeld JM.** (2006) Surfactant protein levels in bronchoalveolar lavage after segmental allergen challenge in patients with asthma. *Allergy*. May; 61(5): 598-604.
15. **Foster PS, Mould AW, Yang M, et al.** (2001) Elemental signals regulating eosinophil accumulation in the lung. *Immunol Rev*. Feb; 179: 173–81.
16. **Gardai SJ, Xiao YQ, Dickinson M, et al.** (2003) By binding SIRP alpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell*. Oct 3; 115(1): 13-23.
17. **Gessner JE, Heiken H, Tamm A, Schmidt RE.** (1998) The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol*. Jun; 76(6): 231-48.
18. **Gleich GJ.** (1990) The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. *J Allergy Clin Immunol*. Feb; 85(2): 422-36.
19. **Griese M, Birrer P, Demirsoy A.** (1997) Pulmonary surfactant in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. Sep; 10(9): 1983-8.
20. **Griffin E, Håkansson L, Formgren H, Jörgensen K, Peterson C, Venge P.** (1991) Blood eosinophil number and activity in relation to lung function in patients with asthma and with eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol*. Feb; 87(2): 548-57.
21. **Hartl D, Griese M.** (2006) Surfactantprotein D in human lung diseases. *Eur J Clin Invest*. Jun; 36(6): 423-35.
22. **Hartnell A, Kay AB, Wardlaw AJ.** (1992) IFN- γ induces expression of Fc γ RIII (FcRIII, CD16) on human eosinophils. *J Immunol*. Mar 1; 148(5): 1471-8.
23. **Hartshorn KL.** (2010) Role of Surfactantprotein A and D (SP-A and SP-D) in human antiviral host defense. *Front Biosci (Schol Ed)*. Jan 1; 2: 527-46.
24. **Hogan SP, Rothenberg ME.** (2004) Review article: The eosinophil as a therapeutic target in gastrointestinal disease. *Aliment Pharmacol Ther*. Dec; 20(11-12): 1231-40.
25. **Holmskov U, Thiel S, Jensenius JC.** (2003) Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu. Rev. Immunol*. 21, 547–78.
26. **Kampen GT, Stafford S, Adachi T, et al.** (2000) Eotaxin induces degranulation and chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *Blood*. Mar 15; 95(6): 1911-7.
27. **Kaneko M, Swanson MC, Gleich GJ, Kita H.** (1995) Allergen-specific IgG1 and IgG3 through Fc gamma RII induce eosinophil degranulation. *J Clin Invest*. Jun; 95(6): 2813-21.

28. **Kapp A, Elsner J.** (2001) The chemokine network in eosinophil activation. *Allergy Asthma Proc.* May-Jun; 22(3): 139-48.
29. **Kazi AS, Tao JQ, Feinstein SI, Zhang L, Fisher AB, Bates SR.** (2010) Role of the PI3-kinase signaling pathway in trafficking of the Surfactantprotein A receptor P63 (CKAP4) on type II pneumocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Dec; 299(6): L794-807.
30. **Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, et al.** (2006) Surfactantproteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol Immunol.* Mar; 43(9): 1293-315.
31. **Kita H, Gleich GJ.** (1996) Chemokines active on eosinophils: potential roles in allergic inflammation. *J Exp Med.* Jun 1; 183(6): 2421-6.
32. **Kita H.** (2011) Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. *Immunol Rev.* Jul; 242(1): 161-77.
33. **Kitani S, Ito K, Miyamoto T.** (1985) IgG, IgA, and IgM antibodies to mite in sera and sputa from asthmatic patients. *Ann Allergy.* Oct; 55(4): 612-20.
34. **Klimek L, Rasp G.** (1996) Cell activation markers in rhinitis and rhinosinusitis. 1: Eosinophilic cationic protein (ECP). *Laryngorhinootologie.* Nov; 75(11): 665-70.
35. **Koopmans JG, van der Zee JS, Krop EJ, Lopuhaä CE, Jansen HM, Batenburg JJ.** (2004) Serum Surfactantprotein D is elevated in allergic patients. *Clin Exp Allergy.* Dec; 34(12): 1827-33.
36. **Kuroki Y, Takahashi M, Nishitani C.** (2007) Pulmonary collectins in innate immunity of the lung. *Cell Microbiol.* Aug; 9(8): 1871-9.
37. **Ledford JG, Mukherjee S, Kislan MM, Nugent JL, Hollingsworth JW, Wright JR.** (2012) Surfactantprotein-A Suppresses Eosinophil-Mediated Killing of Mycoplasma pneumoniae in Allergic Lungs. *PLoS One.* 7(2): e32436
38. **LeVine AM, Whitsett JA, Gwozdz JA, et al.** (2000) Distinct effects of Surfactantprotein A or D deficiency during bacterial infection on the lung. *J Immunol.* Oct 1; 165(7): 3934-40.
39. **Madan T, Eggleton P, Kishore U, et al.** (1997) Binding of pulmonary Surfactantproteins A and D to Aspergillus fumigatus conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. *Infect Immun.* Aug; 65(8): 3171-9.
40. **Madan T, Kishore U, Shah A, et al.** (1997) Lung Surfactantproteins A and D can inhibit specific IgE binding to the allergens of Aspergillus fumigatus and block allergen-in. *Clin. Exp. Immunol.* Nov; 110(2): 241-9.
41. **Madsen J, Mollenhauer J, Holmskov U.** (2010) Review: Gp-340/DMBT1 in mucosal innate immunity. *Innate Immun.* Jun; 16(3): 160-7.

42. **McCormack FX, Gibbons R, Ward SR, Kuzmenko A, Wu H, Deepe GS Jr.** (2003) Macrophage-independent fungicidal action of the pulmonary collectins. *J Biol Chem.* Sep 19; 278(38): 36250-6.
43. **Monteiro RC, Hostoffer RW, Cooper MD, Bonner JR, Gartland GL, Kubagawa H.** (1993) Definition of Immunoglobulin A receptors on Eosinophils and their enhanced expression in allergic individuals. *J.Clin.Invest.* Oct; 92(4): 1681-5.
44. **Motegi Y, Kita H.** (1998) Interaction with secretory component stimulates effector functions of human eosinophils but not of neutrophils. *J Immunol.* Oct 15; 161(8): 4340-6.
45. **Mukherjee S, Giamberardino C, Thomas JM, Gowdy K, Pastva AM, Wright JR.** (2012) Surfactantprotein A Modulates Induction of Regulatory T Cells via TGF- β . *The Journal of Immunology.* May 1; 188(9): 4376-84.
46. **Nahm DH, Park HS.** (1997) Correlation between IgA antibody and eosinophil cationic protein levels in induced sputum from asthmatic patients. *Clin Exp Allergy.* Jun; 27(6): 676-81.
47. **Pérez-Gil J.** (2008) Structure of pulmonary surfactant membranes and films: the role of proteins and lipid-protein interactions. *Biochim Biophys Acta.* Jul-Aug: 1778(7-8): 1676-95.
48. **Resnick MB, Weller PF.** (1993) Mechanisms of eosinophil recruitment. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Apr; 8(4): 349-55.
49. **Rothenberg ME, Hogan PH.** (2006) The Eosinophil. *Annu Rev Immunol.* 24: 147-74.
50. **Sadowska AM, van Overveld FJ, Górecka D, et al.** (2005) The interrelationship between markers of inflammation and oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: modulation by inhaled steroids and antioxidant. *Respir Med.* Feb; 99(2): 241-9.
51. **Sato M, Sano H, Iwaki D, et al.** (2003) Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin Surfactantprotein A. *J Immunol.* Jul 1; 171(1): 417-25.
52. **Schleh C, Erpenbeck VJ, Winkler C, et al.** (2010) Allergen particle binding by human primary bronchial epithelial cells is modulated by Surfactantprotein D. *Respir Res.* Jun 22; 11: 83.
53. **Schleh C, Rothen-Rutishauser BM, Blank F, et al.** (2012) Surfatant Protein D modulates allergen particle uptake and inflammatory response in a human epithelial airway modal. *Respir Res.* Feb 1; 13: 8.
54. **Senft AP, Korfhagen TR, Whitsett JA, Shapiro SD, LeVine AM.** (2005) Surfactantprotein-D regulates soluble CD14 through matrix metalloproteinase-12. *J Immunol.* Apr 15; 174(8): 4953-9.

55. **Shaw RJ, Walsh GM, Cromwell O, Moqbel R, Spry CJ, Kay AB.** (1985) Activated human eosinophils generate SRS-A leukotrienes following IgG-dependent stimulation. *Nature*. Jul 11-17; 316(6024): 150-2.
56. **Shimizu T, Kristjansson S, Wennergren G, Strannegård IL, Strandvik B.** (1994) Leukotriene B₄ and C₄ generation by blood leukocytes after ex vivo stimulation by Ca-ionophore and opsonized zymosan in children with atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol*. May; 5(2): 95-9.
57. **Singh M, Madan T, Waters P, Parida SK, Sarma PU, Kishore U.** (2003) Protective effects of a recombinant fragment of human Surfactantprotein D in a murine model of pulmonary hypersensitivity induced by dust mit allergens. *Immunology Letters*. May 1; 86(3): 299-307.
58. **Snoeck V, Peters IR, Cox E.** (2006) The IgA system: a comparison of structure and function in different species. *Vet Res*. May-Jun; 37(3): 455-67.
59. **Straumann A, Simon HU.** (2004) The physiological and pathophysiological roles of eosinophils in the gastrointestinal tract. *Allergy*. Jan; 59(1): 15-25.
60. **Strong P, Kishore U, Morgan C, Lopez Bernal A, Singh M, Reid KB.** (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*. Nov 1; 220(1-2): 139-49.
61. **Stuart GR, Lynch NJ, Day AJ, Schwaeble WJ, Sim RB.** (1997) The c1q and collectin binding site within c1q receptor (cell surface calreticulin). *Immunopharmacology*. Dec; 38(1-2): 73-80.
62. **Sur S, Glitz DG, Kita H, et al.** (1999) Localization of eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein in neutrotoxin and eosinophil cationic protein in neutrophilic leukocytes. *Int Arch Allergy Immunol*. Feb-Apr; 118(2-4): 255-8.
63. **Svensson L, Rudin A, Wennerås C.** (2004) Allergen extracts directly mobilize and activate human eosinophils. *Eur J Immunol*. Jun; 34(6): 1744-51.
64. **Takafuji S, Bischoff SC, De Weck AL, Dahinden CA.** (1991) IL-3 and IL-5 prime normal human eosinophils to produce leukotriene C₄ in response to soluble agonists. *J Immunol*. Dec 1; 147(11): 3855-61.
65. **Tischendorf FW, Brattig NW, Lintzel M, et al.** (2000) Eosinophil granule proteins in serum and urine of patients with helminth infections and atopic dermatitis. *Trop Med Int Health*. Dec; 5(12): 898-905.
66. **Tomassini M, Magrini L, De Petrillo G, et al.** (1996) Serum levels of eosinophil cationic protein in allergic diseases and natural allergen exposure. *J Allergy Clin Immunol*. Jun; 97(6): 1350-5.

67. **Tomassini M, Tsicopoulos A, Tai PC, et al.** (1991) Release of granule proteins by eosinophils from allergic and nonallergic patients with eosinophilia on immunoglobulin-dependent activation. *J Allergy Clin Immunol.* Sep; 88(3 Pt 1): 365-75.
68. **Topic RZ, Dodig S.** (2011) Eosinophil cationic protein - current concepts and controversies. *Biochem Med (Zagreb).* 21(2): 111-21.
69. **von Bredow C, Hartl D, Schmid K, et al.** (2006) Surfactantprotein D regulates chemotaxis und degranulation of human eosinophils. *Clinical and Experimental Allergy.* Dec; 36(12), 1566-74.
70. **Wang JY, Reid KB.** (2007) The immunoregulatory roles of lung surfactant collectins SP-A, and SP-D, in allergen-induced airway inflammation. *Immunobiology.* 212(4-5): 417-25.
71. **Weikert LF, Lopez JP, Abdolrasulnia R, Chroneos ZC, Shepherd VL.** (2000) Surfactantprotein a enhances mycobacterial killing by rat macrophages through a nitric oxide-dependent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Aug; 279(2): L216-23.
72. **Winkler C, Atochina-Vasserman EN, Holz O, et al.** (2011) Comprehensive characterisation of pulmonary and serum Surfactantprotein D in COPD. *Respiratory Reserarch.* Mar 11; 12: 29.
73. **Wright JR.** (2004) Host defense functions of pulmonary surfactant. *Biol Neonate.* 85(4): 326-32.
74. **Wright JR.** (2005) Immunoregulatory functions of Surfactantproteins. *Nat Rev Immunol.* Jan; 5(1): 58-68.
75. **Wu H, Kuzmenko A, Wan S, et al.** (2003) Surfactantproteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. *J Clin Invest.* May; 111(10): 1589-602.
76. **Yamada C, Sano H, Shimizu T, et al.** (2006) Surfactantprotein a directly interacts with tlr4 and md-2 and regulates inflammatory cellular response. Importance of supratrimeric oligomerization. *J Biol Chem.* Aug 4; 281(131): 21771-80.

9 Anhang

9.1 Fragebogen

Blutspende zur Isolierung eosinophiler Granulozyten

Anamnestiche Angaben zum Spender:

Name / Geburtsdatum / Nationalität

Geschlecht

♀
♂

Raucher

ja
nein
gelegentlich

Medikamenteneinnahme

Steroide: ja
nein
andere

Grunderkrankungen oder Allergien

Parasitäre Erkrankungen ja
nein

Neurodermitis ja
nein

Heuschnupfen ja
nein

Allergisches Asthma ja
nein

Allergien in der Familie ja
nein

Sportliche Aktivität

- nie
selten (3-4x/Monat)
häufig (1-2x/Woche)

Art der sportlichen Aktivität

- Krafttraining
Ausdauertraining (Laufen)

Laborparameter

- Anbei: 1. Blutbild mit Leukozyten Zählung und Differentialblutbild (vor jeder Spende)
2. IgE gesamt

Fragen zur aktuellen Blutspende

Name des Spenders:

Datum und Uhrzeit der Blutspende:

Zigarettenkonsum am Abend zuvor:

Sportliche Aktivität am Morgen: ja
nein

Allgemeinbefinden: gut
mäßig

Infekt: ja
nein

aktuelle Beschwerden:

9.2 Publikation (Originalarbeit)

von Bredow C, Hartl D, Schmid K, Schabaz F, Brack E, Reinhardt D, Griese M. Surfactant protein D regulates chemotaxis and degranulation of human eosinophils. *Clin Exp Allergy*. 2006. Dec; 36(12): 1566-74

From the Lung Research Group, Children's Hospital of Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany.

Abstract

The collectin surfactant protein D (SP-D) is an important component of the pulmonary innate host defence. Up to now, little is known about the regulation of eosinophil function by SP-D. Various murine models of pulmonary hypersensitivity suggest that SP-D may be a potent anti-allergic protein. We investigated the modulation of eosinophil chemotaxis and degranulation by human SP-D. SP-D markedly inhibited the chemotaxis of eosinophils triggered by eotaxin, a major tissue-derived CC-chemokine, as shown in a modified Boyden chamber assay. In addition, degranulation of ECP in response to Ca^{2+} ionophore, immobilized IgG and serum from allergic patients was inhibited by SP-D. In a fixed-cell enzyme linked immunosorbent assay and in flow cytometry, SP-D bound to eosinophils. This binding was saturable and was inhibited by the addition of maltose and ethylenediaminetetraacetic acid, suggesting the involvement of the carbohydrate recognition domain of SP-D. In addition, flow cytometry showed significant interaction of SP-D with CD32 (Fc γ II receptor) on eosinophils, which might explain the inhibitory effect of SP-D on the IgG and serum-triggered eosinophil cationic protein degranulation of eosinophils. Our data further support the concept of an anti-inflammatory function of SP-D in the lung of patients with allergic diseases.

9.3 Danksagung

An erster Stelle danke ich meiner Betreuerin Frau Dr. Tina von Bredow und meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Matthias Griese ganz herzlich für die Bereitstellung des Themas und die langjährige, geduldige und persönliche Betreuung meiner Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern im Labor der Forschungsgruppe Lunge bedanken, vor allem Frau Andrea Schams die stets mit ihren guten Tipps zur Laborarbeit die Zeit im Labor erleichtert hat.

Des Weiteren bei Stefan Zahler aus der Pharmakologie, LMU München für die Unterstützung bei der Zellisolation, bei Frau Ingrid Zatzkowski für die Unterstützung bei den IgE-Messungen und den Damen aus dem Allergologie/Immunologie Labor in der Dermatologie der LMU München für die Unterstützung bei den ECP-Messungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt all meinen Probanden und Blutspendern die sich freundlicherweise unzählige Male haben von mir Blutabnehmen lassen, ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Auch meinen Mitdoktoranden und Kollegen Eva Bielecki, Dominik Hartl, Christian Paschen, Farhad Schabaz, Kristina Schmid, Oliver Tafel, Vitaliy Starosta, Maria Wassilewa, Katinka Weckerle und Tobias Winter möchte ich für die Zusammenarbeit danken. Die aufmunternden Gespräche und die hilfreichen Tipps haben mir stets sehr gut getan.

Schließlich danke ich ganz besonders noch meiner Familie, meinem Freund und meinen Freund/innen, die mich immer wieder aufs Neue motiviert und unterstützt haben und so sehr zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

9.4 Erklärung

„Ich, Eva Brack, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss von Surfactantprotein A und D auf die ECP-Degranulation von humanen eosinophilen Granulozyten“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift