
SFTA2 -
Charakterisierung eines neuen lungenspezifischen Proteins

Katharina Maria Heschl



AUS DER KINDERKLINIK UND KINDERPOLIKLINIK IM DR. VON HAUNERSCHEN
KINDERSPITAL

DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROF. DR. MED. DR. SCI. NAT. CHRISTOPH KLEIN

SFTA2 –

Charakterisierung eines neuen lungenspezifischen Proteins

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades

der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Katharina Maria Heschl

aus Leoben

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. univ. Andreas Holzinger

Mitberichterstatter: PD Dr. Dieter E. Jenne

PD Dr. Anton Eberharter

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter:

Dr. Rashmi A. Mittal

Dr. rer. nat. Markus Hammel

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2018

Wesentliche Teile der Arbeit sind publiziert:

Mittal, R. A., M. Hammel, J. Schwarz, **K.M. Heschl**, N. Bretschneider, A. W. Flemmer, S. Herber-Jonat, M. Königshoff, O. Eickelberg and A. Holzinger (2012). "SFTA2-a novel secretory peptide highly expressed in the lung--is modulated by lipopolysaccharide but not hyperoxia." PLoS One 7(6): e40011.

Zusammenfassung

Genetische Defekte spielen eine wichtige Rolle bei einigen Lungenerkrankungen. Das Ziel dieser Arbeit war es, neue bislang unbekannte lungenspezifische Proteine zu identifizieren und zu charakterisieren, um einen Zusammenhang zu bereits bekannten Lungenerkrankungen herzustellen.

Zu Beginn wurde das Transkriptom der menschlichen Lunge durchsucht (in der Form verfügbarer Expressionsdatenbanken) und das bislang unbekannte Protein SFTA2 identifiziert. Durch in silico Analysen, biochemische Methoden, Fluoreszenzmikroskopie und Tierversuche konnte dieses Protein genauer beschrieben werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Gen für SFTA2 auf Chr. 6p21.33 lokalisiert ist und somit in einer Region liegt, die bereits für spezielle Lungenerkrankungen wie die diffuse Panbronchiolitis (Keicho, Ohashi et al. 2000) bekannt ist. In einer neuen Arbeit wurde SFTA2 als mitbeteiligtes Protein in der Lungenentwicklung in Mäusen beschrieben (George, Mitra et al. 2017). Mit Hilfe von RT-PCR konnte bestätigt werden, dass es sich um ein in der Lunge exprimiertes Protein handelt. SFTA2 verfügt über ein Sekretionssignal, sowie eine Glykosylierungsstelle. Es konnte keine Homologie zu anderen Proteinen gefunden werden, aber es zeigten sich orthologe Proteine in allen Säugetierarten. Durch Immunfluoreszenzfärbungen konnte gezeigt werden, dass SFTA2 vor allem im nicht-zilientragenden Bronchialepithel und Typ II Pneumozyten exprimiert wird. Wie bereits andere nicht hydrophile Surfactantproteine zeigt auch SFTA2 keine Kolokalisation mit Lamellarkörperchen, jedoch eine partielle Kolokalisation mit dem Golgiapparat und sekretorischen Vesikeln durch Färbung mit golgin97 und clathrin-markierten Vesikeln. Das gibt einen Hinweis darauf, dass SFTA2 den klassischen Sekretionsweg durchläuft. Durch einen mittels LPS induzierten Lungenschaden kommt es zu einer Herabregulation der Expression von SFTA2, durch Hyperoxie konnte kein Einfluss auf die Expression nachgewiesen werden. Eine Rolle von SFTA2 in der Immunabwehr ist daher eine mögliche Funktion dieses Proteins.

Zusammenfassend wurde SFTA2 als neues sekretorisches Protein identifiziert, welches vorwiegend in der Lunge von Typ II Pneumozyten exprimiert wird. Es zeigt keine Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Surfactantproteinen oder anderen Proteinen und gehört somit einer neuen Klasse an Proteinen an. Durch Lungenschädigung mittels LPS, jedoch nicht durch Hyperoxie kommt es zu einer Herabregulation der Proteinexpression. Eine Regulation der durch Makrophagen vermittelten Inflammation ist eine mögliche Funktion.

Abstract

Genetic defects are a common reason for lung diseases. The main aim of this thesis was to detect and characterize new unknown lung-specific proteins and to find out more about the correlation with inborn lung diseases.

A yet uncharacterized protein SFTA2 was identified by searching the transcriptome of the human lung for lung-specific proteins.

With the help of different programs und experiments the protein was specified. For the characterization of SFTA2, in silico analyses, biochemical methods, fluorescence imaging and animal challenge experiments were performed.

SFTA2 is located on Chromosom 6p21.33. This is a disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis (Keicho, Ohashi et al. 2000). A recently published study in mouse strains with different lung volumes and lung function identified SFTA2 as one of eight candidate genes responsible for this difference. SFTA2 may play a role in embryonic and postnatal lung development (George, Mitra et al. 2017).

RT-PCR verified that SFTA2 is predominantly a lung-specific protein. SFTA2 has a secretory signal and a glycosylation side. There are no recognizable homologies to other proteins. Orthologs are present in all mammals. With immunofluorescence staining we showed that SFTA2 is mainly expressed in nonciliated bronchiolar epithelium and type II pneumocytes. Like other hydrophilic surfactant proteins, SFTA2 did not colocalize with lamellar bodies. A partial colocalization with golgin97 coding for the Golgi complex and clathrin-labelled vesicles coding for secretory vesicles demonstrated the classic secretory pathway. Lung injury mediated by LPS showed a downregulation of the SFTA2 protein expression. Injury with hyperoxia did not show any changes in the expression levels. Therefore SFTA2 could have a function in the immune system.

To summarize, SFTA2 was identified as a new secretory protein with a high expression in the lung mainly in Typ II pneumocytes. There are no similarities to other known surfactant proteins or any other proteins. Therefore, SFTA2 belongs to a new group of proteins. Lung injury mediated by LPS but not by hyperoxia showed a downregulation of the protein expression level. Regulation of the macrophage-mediated inflammation could be a possible function.

SFTA2 –

Charakterisierung eines neuen lungenspezifischen Proteins

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	10
1.1 Lungenspezifische Proteine	11
1.1.1 Surfactant Proteine	11
1.1.1.1 SP-B	12
1.1.1.2 SP-C	13
1.1.2 ABCA3	14
1.1.3 TTF1	16
1.2 Identifizierung von SFTA2	17
1.3 Gencharakterisierung von menschlichem SFTA2	17
1.4 Sekretion von Proteinen	18
1.5 Mangel an lungenspezifischen Proteinen	19
1.5.1 Pulmonale Alveolarproteinose	19
1.5.2 SP-B Mangel	21
1.5.3 SP-C Mangel	22
1.5.4 ABCA3 Mangel	22
1.5.5 TFF-1 Mangel	23
2 Zielsetzung	24
3 Material und Methoden	25
3.1 Material	25
3.1.1 Geräte und Zubehör	25
3.1.2 Enzyme	26
3.1.3 Bakterien und Zellen	27
3.1.4 Kulturmedien	27
3.1.5 Antikörper	28
3.1.6 Chemikalien	28
3.2 Methoden	29
3.2.1 In Silico Identifizierung und Charakterisierung von SFTA2	29
3.2.1.1 GEO Profiles und GeneNote	29
3.2.1.2 BLAST	30
3.2.1.3 NetNGlyc 1.0 und SignalP 3.0	30
3.2.1.4 PSIPRED Protein Structure Prediction Server und DiANNA Software	30
3.2.2 Expressionanalyse	30
3.2.3 In Silico Promotor Analyse	31
3.2.4 Herstellung von Expressionskonstrukten	31
3.2.5 Molekularbiologische Standardmethoden	32
3.2.5.1 Westernblot	32
3.2.5.1.1 Westernblot mit Endo H für Glykosylierung	35
3.2.5.2 Polymerasekettenreaktion	35
3.2.5.3 Gelelektrophorese	37
3.2.5.4 DNA-Aufreinigung und Isolierung von Peptiden	38
3.2.5.5 Umklonierung SFTA2	38
3.2.5.6 Restriktion	38
3.2.5.7 Vektorverdau	39
3.2.5.8 Ligation	40
3.2.5.9 Transformation	40
3.2.5.10 Induktion	42
3.2.5.11 Herstellung MBP-SFTA2 Fusionsprotein	42
3.2.5.12 Herstellung GST-SFTA2 Fusionsprotein	42
3.2.5.12.1 Expressionstest GST-SFTA2 Fusionsprotein	43
3.2.5.13 Bradford Test	44
3.2.6 Zellkulturmethoden	45

3.2.6.1 Kultivierung von adhärenenten Zellen.....	45
3.2.6.2 Transiente Transfektion	45
3.2.6.3 Zelllysate.....	46
3.2.6.4 Sekretion von SFTA2	47
3.2.7 Immunofluoreszenzmikroskopie.....	47
3.2.7.1 Prinzip	47
3.2.7.2 Transfektion von A549- und MLE12-Zellen	48
3.2.7.3 Immunofluoreszenzfärbung.....	48
3.2.7.4 Immunofluoreszenzmikroskopie.....	49
3.2.7.5 Immunofluoreszenz mit SFTA2 transfizierten A549- und MLE12 Zellen.....	49
3.2.8 Erzeugung spezifischer Antikörper gegen menschliches SFTA2	50
3.2.9 Immunfärbung von menschlichem Lungengewebe.....	51
3.2.9.1 Kontrollexperiment zur Blockierung des Peptidantikörpers.....	51
3.2.10 Tierversuche.....	51
3.2.11 Isolierung von Alveolar Epithelzellen.....	52
3.2.12 RNA Extraktion von Mäuselungen und verschiedenen Zelllinien.....	53
3.2.14 Statistische Methoden.....	53
4 Ergebnisse.....	54
4.1 SFTA2 Expression in menschlichem und Mausgewebe.....	54
4.2 SFTA2 Promotor Analyse.....	55
4.3 Peptidantikörper	56
4.4 SFTA2 Protein Analyse.....	57
4.4.1 Größe von SFTA2.....	59
4.4.2 N-Glykosylierung und Endo H.....	60
4.5 Lokalisation von SFTA2.....	61
4.5.1 Lokalisation in intrazellulären Vesikeln	61
4.5.2 Kolokalisation mit Golgi Apparat.....	63
4.6 Sekretion von SFTA2.....	64
4.7 Proteinexpression.....	65
4.8 Immunofluoreszenz Mikroskopie an menschlichen Lungengeweben.....	67
4.8.1 Peptidantikörper Blockierung.....	67
4.9 LPS und Hyperoxieveruche	68
5 Diskussion.....	69
5.1 Eigenschaften von SFTA2 im Vergleich zu bekannte Surfactant Proteinen	69
5.2 Möglich Funktionen von SFTA2.....	72
5.3 Ausblick.....	73
6 Anhang.....	75
6.1 Abkürzungen	75
6.2 Abkürzung Bindungstellen von Transkriptionsfaktoren.....	77
6.3 Tabellenverzeichnis.....	78
6.4 Abbildungsverzeichnis	79
7 Literaturverzeichnis.....	81
8 Danksagung	94

1 Einleitung

Es gibt viele Lungenerkrankungen die durch Defekte lungenspezifischer Proteine (zum Beispiel SP-B, SP-C, ABCA3) entstehen. Viele Lungenerkrankungen und deren Ursachen sind jedoch gänzlich unverstanden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es nach neuen lungenspezifischen Proteinen zu suchen, und mögliche Kandidaten zu identifizieren. Dabei wurde SFTA2 als interessantes neues lungenspezifisches Protein identifiziert und im Rahmen dieser Arbeit weiter charakterisiert. Zum Abschluss widmet sich diese Arbeit noch der möglichen Funktion und Aufgabe von SFTA2.

Zuerst wird auf die Suche nach lungenspezifisch exprimierten Genen und deren Bedeutung anhand von bereits bekannten Beispielen wie SP-B, SP-C, ABCA-3 und TTF-1 eingegangen. Es folgt eine molekulare Beschreibung des neuentdeckten Proteins SFTA2 und dessen mögliche Funktion und Rolle in der Lunge.

Das offizielle Gen Symbol lautet SFTA2 (Surfactant associated 2) [HUGO Nomenclatur Committee] (White, McAlpine et al. 1997).

Die Arbeit „SFTA2 – A Novel Secretory Peptide Highly Expressed in the Lung – Is Modulated by Lipopolysaccharide but Not Hyperoxia“ von R. Mittal et al. (Mittal, Hammel et al. 2012), die als Teil dieser Arbeit entstanden ist, beschreibt zum ersten Mal das Protein SFTA2 genauer. Kurz nach dieser Veröffentlichung folgte eine weitere von F. Rausch et al. mit dem Titel "SP-G", a putative new surfactant protein--tissue localization and 3D structure. (Rausch, Schicht et al. 2012).

Bis im Jahre 2012 diese beiden Veröffentlichungen zum Thema SFTA2 erschienen, gab es keine spezifische Literatur zu diesem Thema. SFTA2 hatte aber bereits Erwähnung gefunden und eine Zuordnung zu Surfactantproteinen war bereits vorgenommen und in der Bezeichnung ausgedrückt worden.

M.G. Walker and P. Spiro (Incyte Genomic Inc. 2002) haben 2002 unter dem Titel „Genes co-expressed with pulmonary surfactants“ eine partielle mRNA Sequenz in die NCBI GenBank eingereicht und dies als surfactant associated protein G bezeichnet (GenBANK). Jedoch ist diesem Eintrag keine weitere Literatur zugehörig. Weitere Erwähnung findet SFTA2 2003 in Clark et al. (Clark, Gurney et al. 2003). In dieser Arbeit werden bei über 1000 Proteinen aus öffentlichen Datenbanken Sekretionssignale vorher gesagt, unter diesen Proteinen befand sich auch SFTA2. Eine weitere Arbeitsgruppe um Zhang und Henzel (Zhang and Henzel 2004) haben die Fähigkeiten und Zuverlässigkeit eines Computeralgorithmus getestet, der

Abspaltungsstellen von Sekretionssignalen in 270 sekretorischen Proteinen vorhersagt. Dabei wurde für SFTA2 die Abspaltung eines 19 Aminosäuren langen Signal vorhergesagt. Seitdem wurde SFTA2 durch verschiedene Arbeitsgruppen (Rausch, Schicht et al. 2012, Schroder, Sollfrank et al. 2016) unter verschiedenen Namen beschrieben. Heute wird vor allem der Name SFTA2 verwendet, weitere Namen wie vor allem SFTPG und SP-G sind jedoch in der Literatur auch vorhanden (GeneCards® 2018).

Da es bis auf diese wenigen und nicht sehr spezifischen Daten keine weiteren Informationen über SFTA2 gab und es als lungenspezifisches Protein womöglich eine Rolle in der Entstehung von Lungenerkrankungen eine Rolle spielt, wurde das Protein im Rahmen dieser Arbeit genauer charakterisiert.

In den folgenden Kapiteln wird durch verschiedene Versuche gezeigt, dass es sich bei SFTA2 um ein lungenspezifisches Protein handelt. Dies wurde nicht nur an menschlichen Geweben sondern an Geweben von verschiedenen Säugetierarten bestätigt. Außerdem werden detaillierte Expressionsdaten, sowie biochemische Daten und Daten zur möglichen Regulation von SFTA2 präsentiert.

1.1 Lungenspezifische Proteine

Nachdem etliche seltene Lungenerkrankungen noch unverstanden sind, kann die gezielte Suche nach weitgehend lungenspezifisch exprimierten Genen Kandidaten identifizieren, deren Defekte als Ursache in Frage kommen.

Es sind bereits einige lungenspezifische Beispiele in der Literatur bekannt, wie SP-B und SP-C. Deren besondere Funktion ist essentiell für die Funktion der Lunge, sodass Defekte in diesen lungenspezifischen Genen zu monogenen Lungenerkrankungen führen können. Nicht alle Beispiele in den folgenden Kapiteln sind lungenspezifischen, wie ABCA3 und TTF-1, jedoch werden diese nur in sehr wenigen Organen exprimiert und spielen vor allem in der Lunge eine wichtige Rolle. In den folgenden Kapiteln wird genauer auf deren Funktion und Mangel eingegangen. Die meisten gehören zu den Surfactant Proteinen.

1.1.1 Surfactant Proteine

Das Wort Surfactant ist ein zusammengesetztes Kunstwort und besteht aus den englischen Wörtern **surface active agent**. Ins Deutsche übersetzt bedeutet das „Oberflächenaktive Substanz“.

Surfactant Proteine werden von Pneumozyten Typ II produziert, bestehen aus einem Lipid-Protein Komplex und sind essentiell für die normale Lungenfunktion. Sie reduzieren die Oberflächenspannung der Alveolen und schützen somit die Lunge bei der Expiration vor einem Kollaps (Avery and Mead 1959, ChronEOS, Sever-Chroneos et al. 2010).

Es wurde gezeigt, dass Surfactant Proteine eine sehr wichtige Rolle bei der Funktion des pulmonalen Surfactants spielen und dass ein Mangel an Surfactant Protein in engem Zusammenhang mit Respiratory Distress Syndrome (RDS) steht (Orgeig, Hiemstra et al. 2010). Jedoch sind nicht alle Surfactant Proteine essentiell für die Funktion der Lunge. Für SP-A konnte gezeigt werden, dass ein Mangel nicht zu respiratorischen Problemen führt, sondern vor allem zu Problemen des Immunsystems und somit zu einer höheren Rate an bakteriellen Infektionen (Zaltash, Palmblad et al. 2000).

Wie bereits beschrieben besteht Surfactant aus einem Lipid-Protein Gemisch. Dabei besteht es zu 90% aus Lipiden, vor allem Phospholipiden und 10% aus Proteinen. Bislang sind vier Surfactant-spezifische Proteine bekannt. Beschrieben wurden SP-A, SP-B, SP-C und SP-D. Bei SP-A und SP-D handelt es sich um eher hydrophile Proteine die einen wichtigen Teil des Immunsystems darstellen. SP-B und SP-C hingegen sind eher hydrophobe Proteine und spielen eine wichtige Rolle für das Surfactantsystem (Wauer 2005).

1.1.1.1 SP-B

Bei SP-B, Surfactant Protein B, handelt es sich um ein amphipathisches Surfactant Protein, das essentiell für die Funktion der Lunge nach der Geburt ist. Pulmonales Surfactant ist ein oberflächenaktiver Komplex, der zu 90% aus Lipiden und 10% Proteinen besteht. Der Proteinanteil teilt sich auf in Plasmaproteine und Apolipoproteine SP-A, SP-B, SP-C und SP-D. Produziert wird das Surfactant wie bereits in Kapitel 1.1.1 beschrieben von den Alveolarzellen der Lunge und sorgt somit für eine Oberflächenspannungsreduktion der Lunge. SP-B sorgt vor allem dafür, dass die Stabilität von Surfactant verbessert wird.

Das für SP-B zuständige relativ kleine Gen ist auf Chromosom 2, Band 2p12 – p11.2 lokalisiert (Glasser, Korfhagen et al. 1987, Pilot-Matias, Kister et al. 1989). Die Synthese eines Proproteins von SP-B erfolgt im Endoplasmatischen Retikulum. Dieses enthält ein Signalpeptid sowie C- und N-terminale Propeptide, welche eine wichtige Rolle für die intrazelluläre Prozessierung spielen (Guttentag, Beers et al. 1998, Guttentag, Robinson et al. 2003). Die Signalpeptidsequenz wird kotranslational abgespalten, danach erfolgt die Abspaltung der C- und N-terminalen Enden wodurch das reife 8 kDa große SP-B entsteht und in

Lamellarkörperchen geschleust wird (Korimilli, Gonzales et al. 2000). Lamellarkörperchen sind spezialisierte Zellorganellen der Surfactantsynthese und leiten sich vermutlich von Lysosomen ab (Balis and Conen 1964).

Bislang sind zahlreiche Mutationen im SP-B Gen bekannt, diese führen zur Dysfunktion Typ 1 des pulmonalen Surfactants, der sogenannten Alveolarproteinose aufgrund von SP-B Mangel und stehen im Zusammenhang mit RDS in der Neugeborenenzeit.

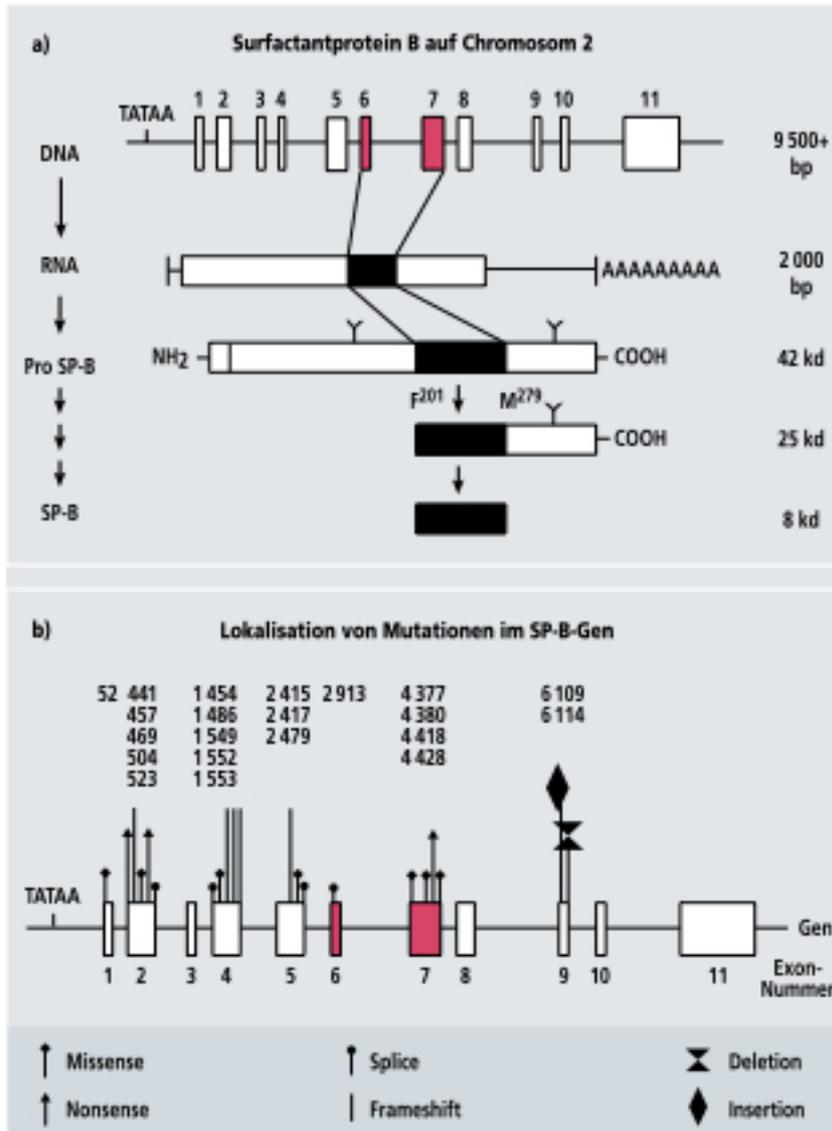


Abb. 1.1.1.1-1 SP-B

a) Synthese von SP-B

b) Lokalisation von Mutationen im SP-B Gen. Exons: Kästen, Introns: Linien. Durch die Mutation betroffene Nukleotide werden durch die Zahlen angegeben. (Griese 2002)

1.1.1.2 SP-C

Surfactant Protein C, SP-C, ist neben SP-B ein weiteres hydrophobes lungenspezifisches Protein, das eine wichtige Rolle bei der biophysikalischen Aktivität von Surfactant spielt. Den

extrem hydrophoben Charakter erhält das Protein durch posttranslationale Modifikationen (Beers and Mulugeta 2005).

Das zuständige Gen liegt auf Chromosom 8. Die Synthese durch Alveolarzellen Typ II erfolgt in mehreren Schritten, wobei zuerst ein großes Proprotein entsteht. Das Proprotein (proSP-C) umfasst 197 Aminosäuren und wird durch proteolytische Abspaltung zu einem 4.2 kDa reifen Protein (Brasch, Ten Brinke et al. 2002). Die Prozessierung ist abhängig vom korrekten Transport durch die Zelle. Am Ende wird das Protein in die Lamellarkörperchen transportiert und es erfolgt der letzte Prozessierungsschritt. Fehlen jedoch die Lamellarkörperchen, wie zum Beispiel bei SP-B Mangel, so wird eine abnormale SP-C Form freigesetzt (Wauer 2005).

Wie auch SP-B ist SP-C vor allem für die Reduktion der Oberflächenspannung zuständig.

Bislang sind viele verschiedene Mutationen im zuständigen Gen für SP-C bekannt, die zur Dysfunktion Typ 2 des pulmonalen Surfactants führen. Diese Dysfunktion wird auch als Alveolarproteinose bei SP-C Mangel bezeichnet. Die Ausprägung der Erkrankung ist sehr heterogen und umfasst ein breites Spektrum von interstitieller Lungenerkrankung, Alveolarproteinose, interstitieller Pneumonitis und Lungenfibrose. Mutationen im SP-C Gen sind jedoch meist weniger schwer also solche im SP-B Gen.

1.1.2 ABCA3

ABCA3 gehört zur Gruppe der ATP-binding cassette (ABC)-Transporter, die größte Gruppe von Transmembran-Transportern (Dean, Hamon et al. 2001). Sie vermitteln den Transport von spezifischen Substraten über Lipidmembranen mit Hilfe der Energie von ATP (Higgins 1992).

ABCA3 wurde 1996 erstmalig von Klugbauer et al. beschrieben und unter dem Namen ABC-C publiziert (Klugbauer and Hofmann 1996). Einige Jahre später wurde außerdem in der Ratte das Protein LBM180 (=lamellar body membrane protein) entdeckt (Zen, Notarfrancesco et al. 1998). Rasch wurde ersichtlich, dass sowohl ABC-C als auch LBM180 dem ABCA-3 Transporter entsprechen (Mulugeta, Gray et al. 2002). Der ABCA3-Transporter hat ein Molekulargewicht von 190kDa (Yamano, Funahashi et al. 2001) und besteht aus 1704 Aminosäuren. Das entsprechende Gen liegt auf Chromosom 16p13.3 (Connors, Van Raay et al. 1997).

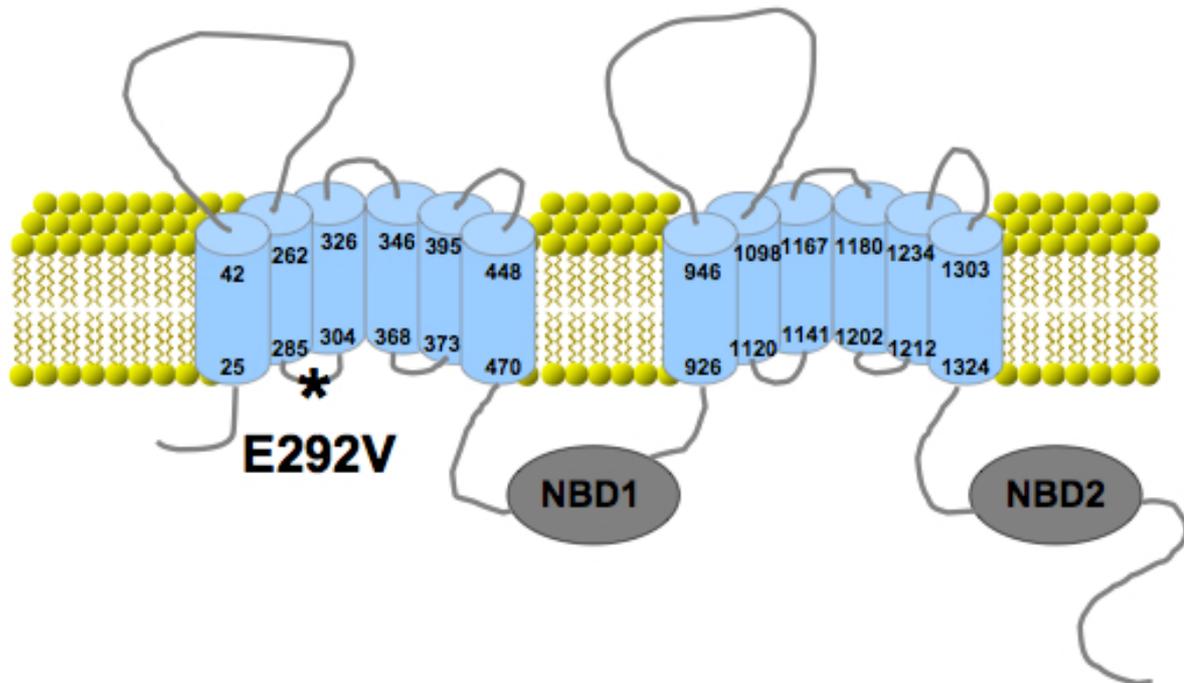


Abb. 1.1.2-1 Proteinstruktur von ABCA3

In blau dargestellt sind die beiden Transmembrandomänen bestehend aus je 6 Untereinheiten, in gelb die Lipiddoppelschicht, in grau mit NBD gekennzeichnet die beiden Nucleotid-bindenden Domänen. Der Stern markiert die Stelle der häufigsten Mutation in ABCA3. (Bullard, Wert et al. 2006)

ABCA3 wird wie die beiden beschriebenen Surfactant Proteine SP-B und SP-C vor allem in der Lunge exprimiert (Mulugeta, Gray et al. 2002), es konnte jedoch auch in extrapulmonalen Geweben, vor allem in Gehirn, Pankreas, Herz und Niere nachwiesen werden. In der Lunge wird es ausschließlich von Typ II Pneumozyten in den Lamellarkörperchen exprimiert.

Die Expression in der Lunge ist abhängig vom Gestationsalter und erreicht den Höhepunkt zum Zeitpunkt der Geburt. In vitro wird die Expression durch Glukokortikoide hochreguliert, was auf die wichtige Rolle von ABCA3 für die Lungenentfaltung und Atmung in der Neonatalperiode hinweist (Bullard, Wert et al. 2006).

Die genaue Funktion von ABCA3 ist noch nicht abschließend geklärt, es weist jedoch vieles darauf hin, dass ABCA3 eine wichtige Rolle im Transport von Surfactant spielt (Yamano, Funahashi et al. 2001, Mulugeta, Gray et al. 2002). Es sind mehrere Mutationen von ABCA3 bekannt, die vor allem in der Neonatalperiode zu einem schweren Atemnotsyndrom mit Surfactantmangel und veränderter Surfactantzusammensetzung führen (Hallman 2004, Shulenin, Noguee et al. 2004, Brasch, Schimanski et al. 2006, Hamvas 2010). Bei älteren Kindern führen Mutationen im ABCA3-Gen häufig zu interstitiellen Lungenerkrankungen (Bullard, Wert et al. 2005, Hartl and Griese 2005, Whitsett 2006, Flamein, Riffault et al. 2012).

1.1.3 TTF1

TTF1 steht für „Thyroidaler Transkriptionsfaktor 1“, auch bekannt als Nkx2.1, T/EBP (thyroid-specific-enhancer-binding-protein) und TTF1. Es handelt sich dabei um ein Protein, das vor allem in der Lunge exprimiert wird und eine wichtige Rolle in der Organogenese der Lunge und anderen Organen wie Schilddrüse, Vorderhirn und Hypophyse spielt (Kimura, Hara et al. 1996). TTF1 ist essentiell für die normale Entwicklung der Lunge und Schilddrüse. Eine verminderte Expression kann somit Hinweise auf kongenitale Fehlbildungen geben. Außerdem spielt TTF1 nicht nur in der Organogenese eine wichtige Rolle. Es wird in erwachsenen Geweben als gewebespezifischer Marker zur Unterscheidung von Primärtumoren von Metastasen verwendet. Der Nachweis von TTF1 weist dann auf einen Primärtumor der Lunge hin (Holzinger, Dingle et al. 1996).

In der Lunge kontrolliert TTF-1 die Expression von pulmonalem Surfactant. Codiert wird TTF1 von dem Gen Homöobox-Gen NK2 homeobox1, abgekürzt NKX2-1. TTF1 hat ein Molekulargewicht von 38kDa und besteht aus 371 Aminosäuren. Dabei besitzt es eine 60 Aminosäuren lange Homöodomäne, über die es an spezifische DNA-Sequenzabschnitte binden kann und somit die Transkription anderer Gene steuert (Scorer PW 2011).

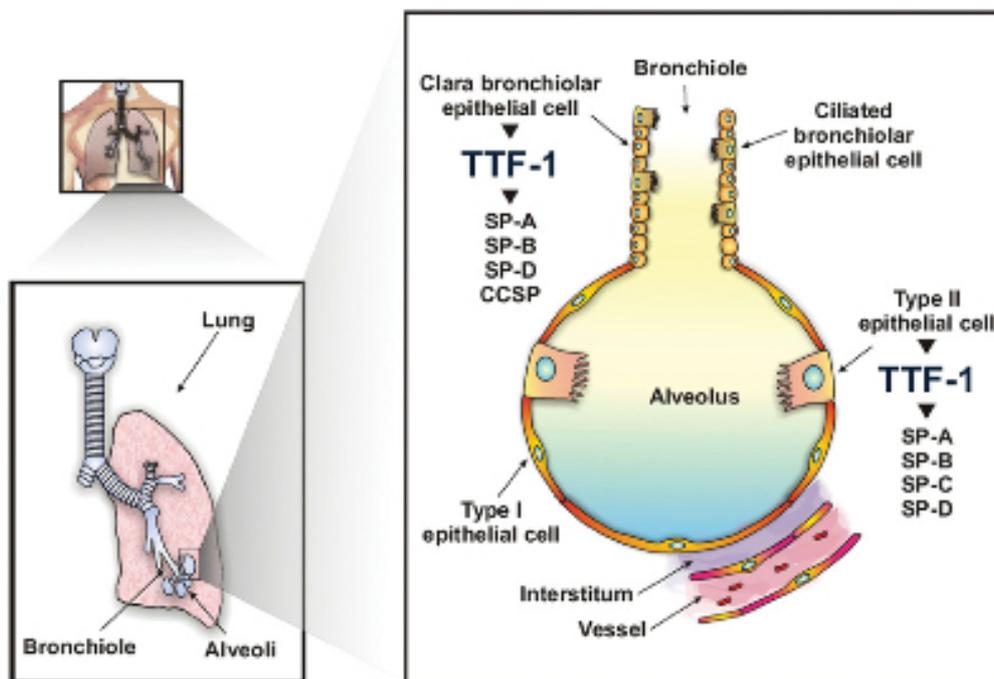


Abb. 1.1.3-1 Expression von TTF1 und TTF-1-abhängigen Genen in der Lunge

Schematische Darstellung von Alveolarzellen Typ I und Typ II sowie Clarazellen. TTF-1 wird von Alveolar Typ II und Clarazellen exprimiert und reguliert die Expression von Surfactantproteinen und CCSP durch diese Zellen. (Boggaram 2009)

1.2 Identifizierung von SFTA2

Mit Hilfe der beiden Programme GeneNote und GEO, war es einfach neue lungenspezifische Protein-kodierende Transkripte zu identifizieren. Unter den vielen bislang unbekanntem lungenspezifischen Proteinen wurde SFTA2 für weitere Analysen ausgewählt.

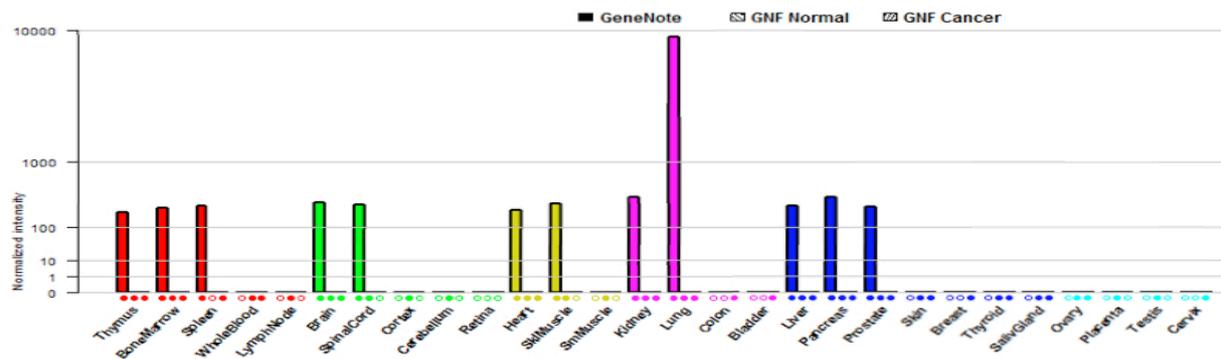


Abb. 1.2-1 SFTA2 in GeneNote
Darstellung von SFTA2 mittels GeneNote (GeneNote)

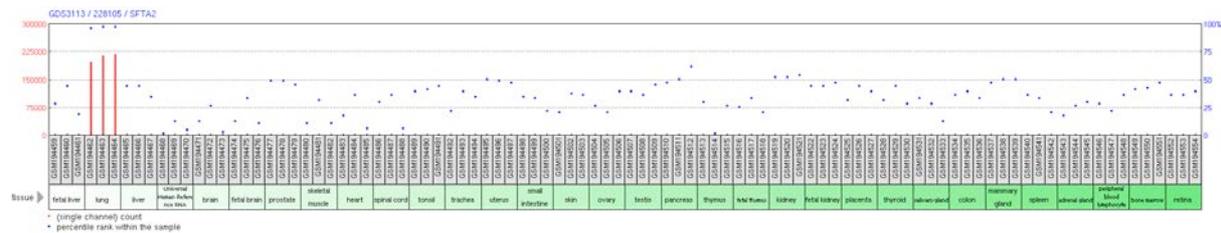


Abb. 1.2-2 SFTA2 in GEO
Expression in der Lunge im Vergleich mit anderen Organen. (GEOProfiles)

1.3 Gencharakterisierung von menschlichem SFTA2

SFTA2 ist ein sogenanntes single copy gene. SFTA2 liegt auf Chromosom 6 p21.33 zwischen HLA-A und HLA-B und besteht aus 3 Exons mit nur kleinen Introns. Insgesamt umfasst die entsprechende genomische Region 826 Basenpaare.

Die genaue genomische Lokalisation von SFTA2 ist nahe an DPCR1, MUC21 und PBMUCL1 (siehe Abb. 1.3-1).

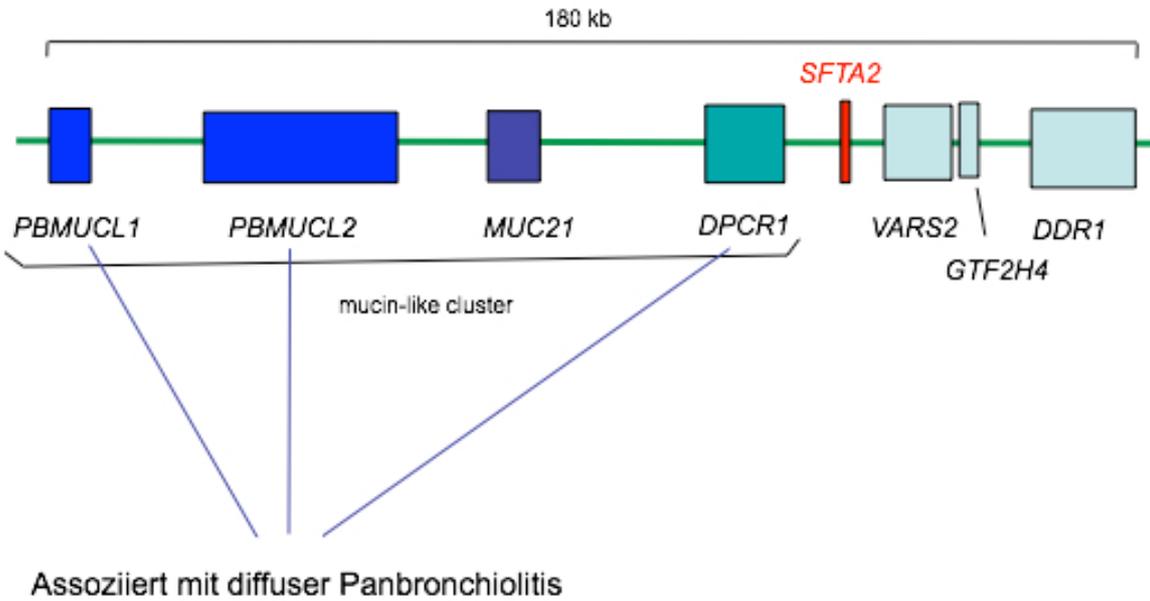


Abb. 1.3-1 Genomische Lokalisation von SFTA2
Lokalisation zwischen HLA-A und HLA-B auf Chromosom 6p21.33.

1.4 Sekretion von Proteinen

In Abb 1.4-1 zu sehen ist der klassische Sekretionsweg eines sezernierten Proteins. Das Protein wird am freien zytosolischen Ribosom synthetisiert. Das Sekretionssignal des Proteins wird vom Signal Recognition Particle, einem Protein-RNA-Komplex erkannt und es folgt der Transport zum Translocon. Bei dem Translocon handelt es sich um einen Proteinkomplex in der Membran des Endoplasmatischen Retikulum. Hier wird das Sekretionssignal abgespalten und das Protein in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulum importiert. Hier erfolgt eine weitere posttranslationale Modifikation am Protein, die Glykosilierung am N-terminalen Ende des Proteins. Vom Endoplasmatischen Retikulum wird das Protein weiter zum Golgi Apparat transportiert. Dieser Vorgang findet mit Hilfe von sogenannten Coated Vesicles, auch Stachelsaum Vesikel genannt, statt. Diese Vesikel verwenden das Coating Protein COP II. Im Golgi Apparat findet eine Modifikation der Zuckerketten statt und danach verlässt das Protein den Golgi Apparat. Typisch für Proteine, die unter einer regulierten Sekretion stehen ist die Aufbewahrung in Clathrin-coated Granulas. Die Sekretion wird dann durch einen intrazellulären Anstieg von Calcium ausgelöst und das Protein wird durch Fusion des Vesikels mit der Plasmamembran in den Extrazellularraum abgegeben.

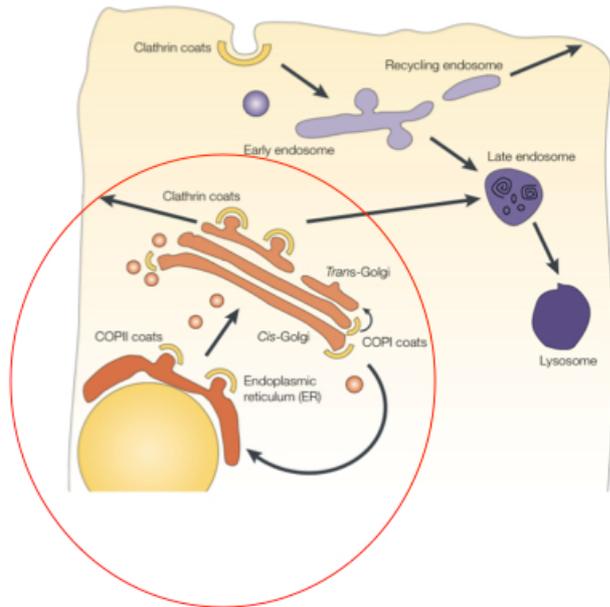


Abb. 1.4-1 Schematische Darstellung des Sekretionsweges in der Zelle

Neu synthetisierte Moleküle werden vom endoplasmatischen Retikulum aus zum Golgiapparat transportiert. Im Golgiapparat werden sie von einer Zisterne zur nächsten weitertransportiert, bis sie im trans-Golgi ankommen. Dort erfolgt ein Sortierungsschritt. Die Proteine werden entweder direkt zur Plasmamembran weitergeleitet oder zu den Endosomen (Kirchhausen 2000).

1.5 Mangel an lungenspezifischen Proteinen

1.5.1 Pulmonale Alveolarproteinose

Störungen im Surfactantmetabolismus führen häufig zur pulmonalen Alveolarproteinose. Es sind eine kindliche als auch eine adulte Form der Erkrankung bekannt und es können verschiedene Erkrankungen zugrunde liegen. In der Neugeborenen Phase liegt meist eine komplette oder partielle SP-B-Defizienz vor. Außerdem kommt es durch den Mangel an SP-B zu einer verminderten Produktion von reifem SP-C und zur Anhäufung von fehlerhaftem Pro-SP-C-Formen. Das Vorhandensein von Pro-SP-C in der Lungenlavage ist ein typisches Merkmal von Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose. Klinisch kommt es zur raschen Entwicklung eines Atemnotsyndroms bei ansonsten gesunden reifgeborenen Kindern (Griese 2002). Therapierversuche mit Surfactant, Glucocorticoiden, speziellen Beatmungsformen und inhalativer NO-Gabe haben kaum bzw. nur kurzfristig Einfluss auf die schlechte respiratorische Situation (Hamvas, Noguee et al. 1995). Als experimentelle Therapieform steht zur Zeit die Lungentransplantation zur Verfügung (Hamvas, Noguee et al. 1997).

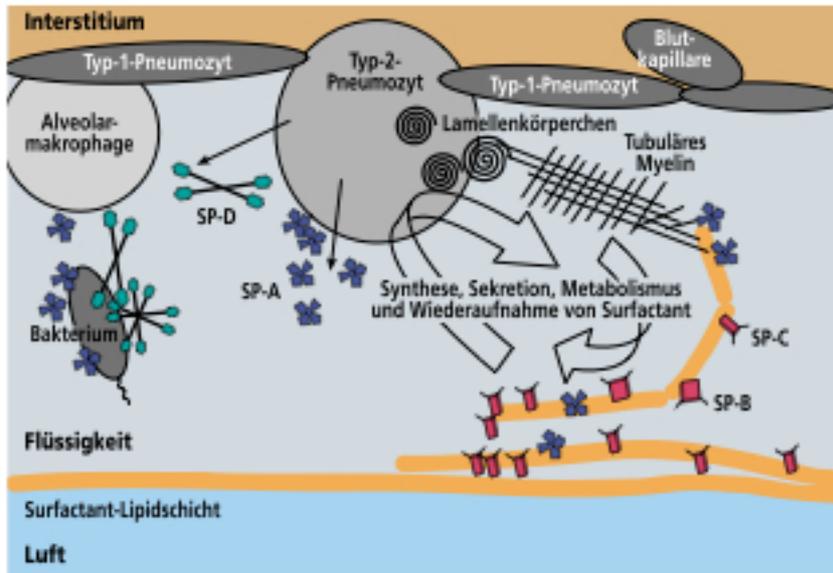


Abb. 1.5.1-1 Metabolismus der Surfactantbestandteile im Alveolarraum.

Durch Störungen im Surfactantmetabolismus kann es zur Anhäufung von Surfactantmaterial in den Alveolen kommen, zur sogenannten Alveolarproteinose (Griese 2002).

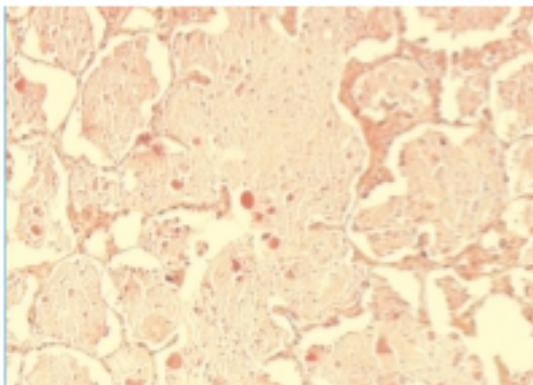


Abb. 1.5.1-2 Lungenbiopsie bei einem Patienten mit Alveolarproteinose.

Histopathologisches Bild, Darstellung des Alveolarraum ausgefüllt mit rötlichem Periodic-Acid-Schiff-positivem Material. Charakteristisch für alveoläres Füllungssyndrom (Griese 2002).



Abb. 1.5.1-3 Alveolarproteinose Röntgen-Thorax Übersichtsaufnahme
 Deutliche interstitielle Zeichnungsvermehrung, perihilär betont mit konsekutiver Transparenzminderung, Minderung des Gefäßbilds (C. Kroegel 2013).

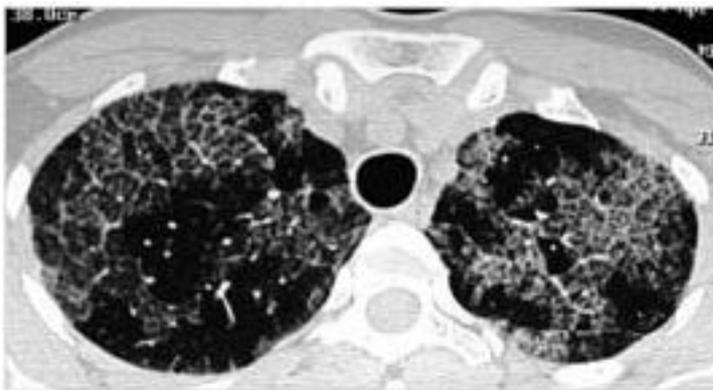


Abb. 1.5.1-4 Alveolarproteinose HRCT-Aufnahme
 Symmetrische milchglasartige Trübungsareale mit angedeuteter polygonaler Felderung nach Art des „Crazy Paving“ unter Aussparung der Peripherie (C. Kroegel 2013).

1.5.2 SP-B Mangel

Bei SP-B Mangel handelt es sich um eine seltene autosomal-rezessiv vererbte Krankheit. Bislang wurden keine Spontanmutationen beschrieben. Es sind bereits viele verschiedenartige rezessive Mutationen in der Literatur beschrieben, jedoch werden etwas 70% der Fälle von SP-B Mangel von der sogenannten „121ins2“-Mutation verursacht (Nogee, Garnier et al. 1994).

Klinisch tritt die Erkrankung bereits kurz nach Geburt in Erscheinung. Betroffen sind vor allem reifgeborene Neugeborene ohne sonstige klinische Auffälligkeiten, bei denen es zu einem schweren respiratorischen Versagen und einer Alveolarproteinose kommt und die Indikation zur Beatmung gestellt wird. Die Erkrankung weist Ähnlichkeiten mit dem RDS auf, wie zum

Beispiel im Thorax Röntgenbild ersichtlich ist. Dort zeigen sich Veränderungen mit intensiver diffuser beidseitiger Eintrübung und Luftbronchogramm. Die therapeutischen Möglichkeiten sind leider sehr begrenzt und zeigen kaum Wirkung. Durch die Gabe von exogenem Surfactant kommt es meist zu keiner Verbesserung der pulmonalen Situation. Auch die Applikation von Steroiden zeigt keinen positiven Effekt (Jorch G. 2010). Daher verstirbt der Großteil der Patienten bereits innerhalb der ersten Lebensmonate. Nur wenige Fälle von Überlebenden mit bestimmten Mutationen im SFTPB-Gen sind beschrieben (Jorch G. 2010).

1.5.3 SP-C Mangel

Bislang sind eine Vielzahl an autosomal-dominanten erblichen Mutationen im SP-C codierendem Gen (SFTPC) beschrieben, die in Verbindung mit verschiedenen akuten und chronischen Lungenerkrankungen stehen. Mehr als die Hälfte dieser Mutationen sind de novo Mutationen (Hamvas, Cole et al. 2007). Man geht davon aus, dass es durch Mutationen im SP-C Gen zur Produktion von fehlfunktionierenden Vorläufer-SP-C-Proteinen und somit Fehlen vom reifem SP-C in der Lunge kommt. Das falsch prozessierte Pro-SP-C schädigt die Zelle durch Akkumulation und löst somit die Apoptose aus (Jorch G. 2010). Ile73Thr ist die häufigste SP-C Mutation (Service 2014).

Das Patientengut ist sehr gemischt und reicht von Neugeborenen bis zu Erwachsenen, was am variablen Verlauf von SP-C assoziierten Lungenerkrankungen liegt.

Auch die klinische Symptomatik ist äußerst variabel. Einige Patienten präsentieren sich mit klinisch identischem Verlauf zum SP-B Mangel, andere zeigen eine langsame progrediente respiratorische Symptomatik mit teilweisen Remissionsphasen (Jorch G. 2010). Die Patienten zeigen eine interstitielle Lungenerkrankung, Alveolarproteinose, interstitielle Pneumonitis oder Lungenfibrose (Nogee, Dunbar et al. 2001, Tredano, Griese et al. 2004, van Moorsel, van Oosterhout et al. 2010).

1.5.4 ABCA3 Mangel

ABCA3 Mangel wird autosomal-rezessiv vererbt. Patienten sind entweder homozygot oder compound heterozygot für Mutationen die zu ABCA3 Mangel oder Störungen im Surfactantsystem führen (Brasch, Schimanski et al. 2006). Bei älteren Kindern mit chronischer interstitieller Lungenkrankheit ist Glu292Val die häufigste Mutation (Bullard, Wert et al. 2005, Nogee 2006).

ABCA3-Mangel kann in zwei Gruppen eingeteilt werden. Bei Typ I Mutationen kommt es zu gestörter intrazellulärer Prozessierung des Proteins, bei Typ II Mutationen zu einer verminderten Aktivität der ATP-Hydrolyse (Matsumura, Ban et al. 2006).

Typisch für ABCA3 Mangel sind kleine, dichte Lamellarkörperchen (Bullard, Wert et al. 2006, Doan, Guillerman et al. 2008).

Bei Neugeborenen führen Mutationen im ABCA3-Gen rasch zu einem respiratorischem Versagen und tödlichem Ausgang (Jorch G. 2010). Die Symptomatik ist ähnlich wie bei Patienten mit SP-B Mangel.

Ältere Kinder zeigen meist einen milderen Verlauf bei einer diffusen chronischen interstitiellen Lungenerkrankung (Bullard, Wert et al. 2005, Hartl and Griese 2005, Whitsett 2006, Flamein, Riffault et al. 2012).

1.5.5 TTF-1 Mangel

Mangel an TTF-1 wird autosomal-dominant vererbt und tritt zum größten Teil spontan auf. Die Krankheit äußert sich durch neurologische und pulmonale Funktionsstörungen, sowie Fehlfunktionen der Schilddrüse und wird als Brain-Thyroid-Lung Syndrom bezeichnet.

Die Kinder präsentieren sich bei Geburt mit unterschiedlich stark ausgeprägten respiratorischen Symptomen und versterben zum Teil innerhalb kurzer Zeit am Atemnotsyndrom. Die Krankheit kann aber auch erst in der späteren Kindheit in Erscheinung treten und verläuft dann meist chronisch (Galambos, Levy et al. 2010).

In der Literatur sind mehrere Fallberichte von Patienten mit heterozygoten Deletionen im TTF-1 Gen beschrieben die bei Neugeborenen zu Funktionsstörungen der Schilddrüse und respiratorischem Versagen führen (Devriendt, Vanhole et al. 1998, Iwatani, Mabe et al. 2000, Galambos, Levy et al. 2010, Kleinlein, Griese et al. 2011).

2 Zielsetzung

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Überlegung, dass weitgehend lungenspezifisch exprimierte Gene eine besondere Bedeutung in der Lunge haben müssen. Diese besondere Funktion ist oft essentiell für die Lunge, sodass Defekte in lungenspezifischen Genen zu monogenen Lungenerkrankungen führen können.

Nachdem etliche seltene Lungenerkrankungen noch unverstanden sind, kann die gezielte Suche nach lungenspezifisch exprimierten Genen Kandidaten identifizieren, deren Defekte als Ursache in Frage kommen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, SFTA2 als neues lungenspezifisches Protein zu identifizieren und experimentell zu definieren, sowie die biologische Bedeutung dieses Proteins zu erfassen.

Daraus ergaben sich folgende Ziele für diese Arbeit:

1. Die Identifizierung von SFTA2 als lungenspezifisches Protein
2. Die Charakterisierung von SFTA2
3. Die Untersuchung der mutmaßlichen Funktion von SFTA2

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Zubehör

Tabelle 1: Geräte und Zubehör

Gerät/Zubehör	Modell	Hersteller/Vertreiber
Agarosegelkammer	Easy-Cast™ Electrophoresis	Thermo Scientific, Rochester USA
Entwicklungsmaschine	CP 1000	AGFA, Köln
Film	Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Filterpapier	30mm	Bio-Rad, Laboratories GmbH, München
Geldokumentation	Gel iX Imager	INTAS Imaging Industries, GmbH, Göttingen
Gewebekulturflaschen	Cellstar Tissue Culture Flasks 75 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mikroskop	Axiovert 40 c	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Mikroskop	Axiovision 135	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Nitrozellulose	Hybond™-ECL	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
PCR-Cycler	peqSTAR 96X Universal Gradient Thermocycler	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Probenrad	L 28	Heidolph Instruments GmbH & CoKG, Schwabach

Roller Mixer	SRT2 Stuart	Bibby Scientific Limited, Staffordshire, USA
Schüttelgerät	Heidolph Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Schüttler/Inkubator	Excella E24	Eppendorf, Hamburg
SDS- Gelelektrophoresekammer	XCell4 SureLock™ Midi- Cell Electrophoresis System	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Sterilwerkbank	Lamin Air HBB 2472	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Tischzentrifuge	Microcentrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge	Microcentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Transfektion	Amaxa Nucleofector™ 2b Device	Lonza Köln GmbH, Köln
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Industrie, USA
Zellinkubator	Hera Cell 240	Thermo Fisher Scientific, USA
Zentrifuge	Avanti J-E	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifuge	Rotanta 460R	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

3.1.2 Enzyme

Tabelle 2: Enzyme

Enzymname	Funktion	Hersteller/Vertreiber
BAM HI	Restriktionsendonuklease	Roche GmbH, Mannheim

Endo H	Glycosidase	New England BioLabs, Frankfurt
T4-DNA Ligase	Ligase	Invitrogen GmbH, Heidelberg
Taq	DNA- Polymerase	Roche GmbH, Mannheim
Xba I	Restriktionsendonuklease	Roche GmbH, Mannheim

3.1.3 Bakterien und Zellen

Tabelle 3: Bakterien und Zellen

Name	Hersteller/Vertreiber
A 549	ATCC, Manassas, USA
COS 7	ATCC, Manassas, USA
E. coli DH5 α	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
MLE 12	ATCC, Manassas, USA

3.1.4 Kulturmedien

Tabelle 4: Kulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller/Vertreiber
Kulturmedium	500ml RPMI Media 1640+ GlutaMAX™ 5ml FBS Fetal Bovine Serum Penicillin/Streptomycin	GIBCO/Invitrogen GmbH, Darmstadt
LB- Medium	1% NaCl, 1% Pepton, 0,5% Hefeeextrakt	nach Sambrook et al. 1989
LB-Agar	LB-Medium mit 20g/L Agar	nach Sambrook et al. 1989

3.1.5 Antikörper

Tabelle 5: Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller/Vertreiber
Anti- Clathrin	Maus	Abcam, U.K
Anti- HA	Ratte	Roche GmbH, Mannheim
Anti- LAMP-1	Ratte	Development Studies Hybridoma Bank, USA
Anti- Maus	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti- Maus Alexa fluorophores	Ziege	Invitrogen, USA
Anti- Rat	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti- Rat Alexa fluorophores	Ziege	Invitrogen, USA
Anti-Clathrin	Maus	Abcam, Cambridge, U.K.
Golgin-97	Maus	Invitrogen, Life Technologies, USA
Peptid-Antikörper	Kaninchen	Primm, Mailand, Italien
TTF-1	Maus	Santa Cruz Biotachnology, USA

3.1.6 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien, Zellkulturmedien sowie Medienzusätze wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim), Invitrogen (Karlsruhe) und BD Biosciences (Heidelberg) bezogen. Die Herstellung von allgemein gebräuchlichen Puffern und Lösungen wurde mit H₂O bidest. durchgeführt.

3. 2 Methoden

3.2.1 In Silico Identifizierung und Charakterisierung von SFTA2

3.2.1.1 GEO Profiles und GeneNote

Zu Beginn dieser Arbeit wurden verschiedene öffentliche Datenbanken wie GEO Profiles (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles>) (GEOProfiles) und GeneNote (Yanai, Benjamin et al. 2005) durchsucht, mit dem Ziel Gene zu identifizieren, die vor allem in der Lunge exprimiert werden (Edgar, Domrachev et al. 2002).

GeneCards ist eine Datenbank die umfangreiche und aktuelle Daten von allen bekannten und vorhergesagten menschlichen Genen zur Verfügung stellt. Das bietet die Möglichkeit, eine große Menge an Informationen über ein Gen mit einer einzelnen Datenbank einholen zu können.

GEO Profiles ist eine weitere Datenbank die aktuelle Daten über Genexpressionmuster verwaltet. Bei der Suche wird eine individuelle Chart erstellt, die das Expressionslevel eines Genes darstellt. So kann man erkennen, ob ein Gen vor allem spezifisch in einem Organ exprimiert wird oder in vielen verschiedenen.

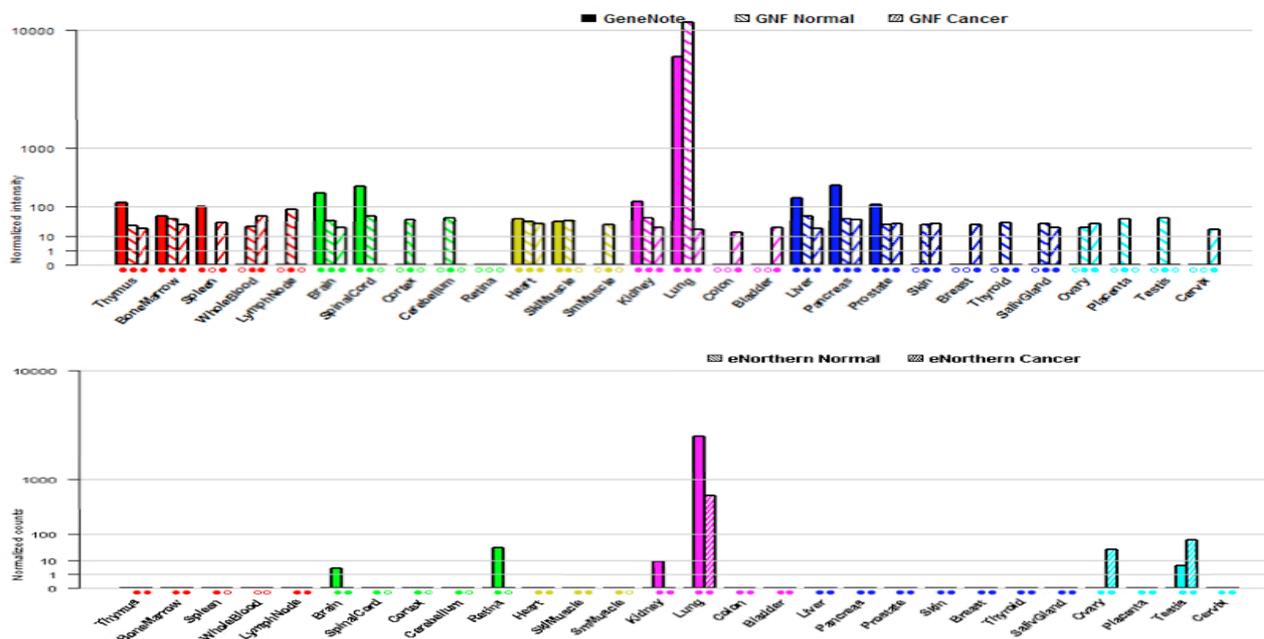


Abb. 3.2.1.1-1 SP-C in GeneNote

Darstellung des lungenspezifischen Proteins SP-C mittels GeneNote
Oberer Teil der Abbildung: Darstellung mittels Hybridisierungsverfahren
Unterer Teil der Abbildung: Darstellung in cDNA Bibliotheken (GeneNote)

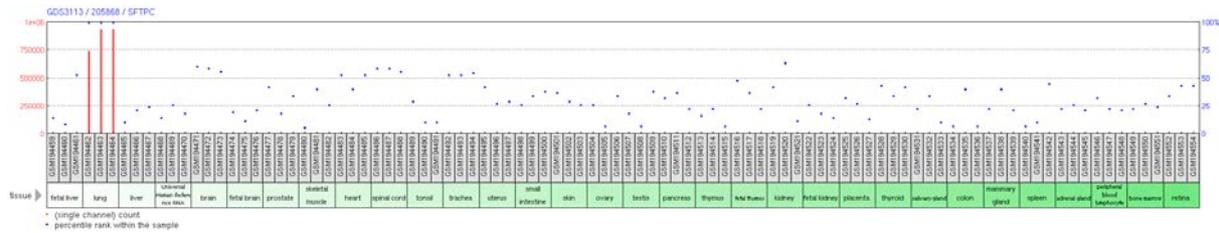


Abb. 3.2.1.1-2 SP-C in GEO

Expression in der Lunge im Vergleich mit anderen Organen. (GEOProfiles)

3.2.1.2 BLAST

Bei BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) handelt es sich um eine Zusammenfassung verschiedener Analyse Programme für biologische Sequenzdaten. Es wird dazu verwendet um DNA- oder Proteinsequenzen mit bereits in einer Datenbank vorhandenen Sequenzen abzugleichen und somit paraloge und orthologe Gene und Proteine innerhalb eines oder mehrere Organismen ausfindig zu machen. Bei der Suche liefert BLAST verschiedene Alignments, sogenannte Gegenüberstellungen von Stücken der gesuchten Sequenz mit ähnlichen Stücken aus der Datenbank und deren Signifikanz. In einem weiteren Schritt konnte dann die Suche nach Homologen und verschiedene Alignments durchgeführt werden.

3.2.1.3 NetNGlyc 1.0 und SignalP 3.0

Die beiden Programme NetNGlyc 1.0 und SignalP 3.0 wurden ebenfalls zur genaueren Identifizierung und Charakterisierung genutzt. Mit Hilfe der beiden Programme können Glykosylierungssignale vorhergesagt werden.

3.2.1.4 PSIPRED Protein Structure Prediction Server und DiANNA Software

Weitere Programme wie PSIPRED Protein Structure Prediction Server und die DiANNA Software wurden verwendet um unter anderem potenzielle Disulfidbrücken vorherzusagen. (Ferre and Clote 2005)

3.2.2 Expressionanalyse

Die Expressionsanalyse wurde mit Hilfe von TissueScan[®] (Origene, Rockville, MD, USA) durchgeführt. TissueScan[®] wird dazu verwendet um Gen-Expressionanalysen an verschiedenen menschlichen Geweben durchzuführen. Es bietet die Möglichkeit Daten innerhalb kurzer Zeit an einer großen Zahl an unterschiedlichen menschlichen Geweben zu gewinnen. Ein weiterer Vorteil des TissueScan[®] ist, dass kein Agarosegel benötigt wird und die hohe Sensitivität sowie Zuverlässigkeit des Produkts. Für die Durchführung der Expressionsanalyse wurden SFTA2-spezifische Primer laut Herstellerangaben verwendet. TissueScan[®] qPCR cDNA Array

Analyse wurde an 48 verschiedenen menschlichen Geweben durchgeführt und die damit gewonnenen Daten wurden auf Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) und Aktin normiert. Des Weiteren wurde RNA von 10 verschiedenen Geweben (Lunge, Leber, Herz, Niere, Milz, Uterus, Großhirn, Kleinhirn, Nebenniere und Dünndarm) aus der Maus extrahiert und damit eine qPCR Analyse durchgeführt. Dafür wurden folgende Primer verwendet (vorwärts: CACACGCAGGGCCAAAGGTG und rückwärts: GAGGAGGCAGATCTTTTGGAG).

3.2.3 In Silico Promotor Analyse

Die in Silico Promotor Analyse von SFTA2 wurden in Kooperation mit Bretschneider N. von Genomatix Software GmbH, München, durchgeführt. Dafür wurden unterschiedliche Programme der Genomatix Software verwendet (www.genomatix.de).

Unter anderem diente als Referenzdatenbank, um verschiedene homologe Promotor Sequenzen auffindig zu machen, die Datenbank von EIDorado. Darin sind die Gensequenzen von 33 verschiedenen Organismen annotiert. Für SFTA2 wurden homologe Promotor Sequenzen von 8 Spezien aus dieser Datenbank gewonnen, Rhesusaffe, Schimpanse, Mensch, Maus, Hund, Rind, Wildschwein und Pferd und die Daten mit DiAlign abgeglichen (Morgenstern 1999). Als weiteres Programm diente FrameWorker (Matrix library 8.3) bei der Identifizierung von konservierten Transkriptionsfaktoren Bindungsstellen. Dabei war es erforderlich, dass das gemeinsame Muster in mindestens 7 von 8 Promotor Sequenzen vorhanden waren, mit einem Abstand von 10 bis 200 Basenpaaren zwischen benachbarten Bindungsstellen und mit nicht mehr als 10 Basenpaaren Unterschied im Abstand. Ein weiteres Programm, ModelInspector, wurde verwendet um die SFTA2 Promotoren genauer zu untersuchen bezüglich bereits bekannter Promotoren Sequenzen.

3.2.4 Herstellung von Expressionskonstrukten

Als Grundlage für die Herstellung von Expressionskonstrukten von menschlichem SFTA2 diente ein cDNA Klon (IRATp970H02140D) der Firma Source BioScience Imagenes (Berlin). Mit Hilfe des cDNA Klones konnten mittels PCR Expressionsplasmide hergestellt werden. Als Vektor wurde pCDNA3.1 von Invitrogen verwendet und ein Expressionsplasmid hergestellt, das am C-terminalen Ende ein HA Epitop Tag enthielt (pCDNA-SFTA2-HA). HA (Human influenza hemagglutinin) und ist ein Oberflächenglycoprotein. Es wird häufig als Epitope Tag genutzt und ermöglicht damit die Detektion, Isolation oder Aufreinigung von spezifischen Proteinen. Die Induktion sowie Aufreinigung wurde mit Hilfe von DH5 α E. coli durchgeführt.

3.2.5 Molekularbiologische Standardmethoden

3.2.5.1 Westernblot

Der Westernblot dient zum spezifischen Nachweis von Proteinen. Nach der Auftrennung in einem Gel werden die Proteine mittels Immunoblot-Methode elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (Towbin, Staehelin et al. 1979) und durch einen spezifischen Antikörper nachgewiesen.

Zu Beginn wird die benötigte Pufferlösung, NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20X), in der entsprechenden Konzentration und die Gelkammer (s. Materialien 3.1.1) vorbereitet. Das Gel, NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Midi Protein Gels, 20 well, w/adapters, wird mit einem Standard Marker, SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard (Novex®) und danach mit den bereits fertigen Proben beladen. Die Proben wurden davor für 10 Minuten bei 95° Grad erhitzt, sonifiziert und für 5 Minuten zentrifugiert. In jedes well wurde 19 µl aufgetragen und zusätzlich wurde noch 400 µl Antioxidant in jede Kammer gegeben. Danach wurde der Vorgang bei 200V, 150Watt, 1000mA für 45 Minuten gestartet.

Nach der Auftrennung der Proteine im Gel erfolgt das Übertragen auf eine Nitrozellulose-Membran mittels Elektrophorese. Pro Gel werden 9 Filterpapiere und eine Nitrozellulose-Membran sowie Anoden- und Kathodenpuffer benötigt. Die Elektrophorese wurde bei einem 20 well Gel bei 137mA in einem optimalen Voltbereich von 8-10Volt für eine Stunde gestartet.

Die Nitrozellulose-Membran wurde im Anschluss über Nacht bei 4°C mit 5% TBS-Tween Milch geblockt und am nächsten Morgen durch mehrmalige Waschschrte mittels TBS-Tween gereinigt. Es folgte die Inkubation mit einem primären Antikörper in geeignet Verdünnung in 5% TBS-Tween Milch für eine Stunde. Nach erneutem viermaligen Waschen der Membran mittels TBS-Tween wurde der sekundäre Antikörper hinzugefügt und erneut für eine Stunde inkubiert. Vor Zugabe der Chemielumineszenz wurde die Membran abermals in vier Waschschrten gereinigt. Thermo Scientific™ SuperSignal™ West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, USA) wurde für eine Minute auf die Membran aufgetragen und danach diese in der Dunkelkammer auf Filmen entwickelt.

Die Belichtungszeit der Membran war abhängig von der Bindungsaffinität des Antikörpers zum Protein und lag zwischen 30 Sekunden bis 10 Minuten.

Die Antikörper wurden laut Herstellerangaben verwendet. Der HA-Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:1000 und die Peptid-Antikörper in einer Konzentration von 1:250 bis 1:500 verwendet. Die sekundären Antikörper wurden in einer Konzentration von 1:7500

verwendet.

Tabelle 6: Westernblot Materialien

Material	Menge	Hersteller/Vertrieb
Film	Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Filterpapier	30mm	Bio-Rad, Laboratories GmbH, München
Nitrozellulose	Hybond TM -ECL	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
NuPAGE [®] Antioxidant (Novex [®])	400 µl pro Gel	Life Technologies GmbH, Darmstadt
NuPAGE [®] LDS Sample Buffer (4X) (Novex [®])	10 µl je Probe	Life Technologies GmbH, Darmstadt
NuPAGE [®] MES SDS Running Buffer (20X), (Novex [®])	1 L	Life Technologies GmbH, Darmstadt
NuPAGE [®] MOPS SDS Running Buffer (20X) (Novex [®])	1 L	Life Technologies GmbH, Darmstadt
NuPAGE [®] Novex [®] 4-12% Bis-Tris Midi Protein Gels, 20 well, w/adapters	1 Gel	Life Technologies GmbH, Darmstadt
NuPAGE [®] Sample Reducing Agent (10X) (Novex [®])	4 µl je Probe	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Probe	26 µl je Probe	
SeeBlue [®] Plus2 Pre-stained	4 µl	Life Technologies GmbH,

Protein Standard (Novex®)		Darmstadt
Thermo Scientific™ SuperSignal™ West Femto Chemiluminescent Substrate	1 ml pro Gel	Thermo Scientific, Rockford, USA

Tabelle 7: Westernblot Lösungen

Lösungen	Zusammensetzung
5 % TBS-Tween Milch	TBS-Tween mit 5 % Trockenmilchpulver
Anodenpuffer I	0,3M Tris, 10% Methanol pH 10,4
Anodenpuffer II	25mM Tris, 10% Methanol, pH 10,4
Kathodenpuffer	25mM Tris, 10% Methanol, 40mM Glycin, pH 9,4
TBS-Tween	20mM Tris-HCL, 150mM NaCl, 0,05% Tween-20

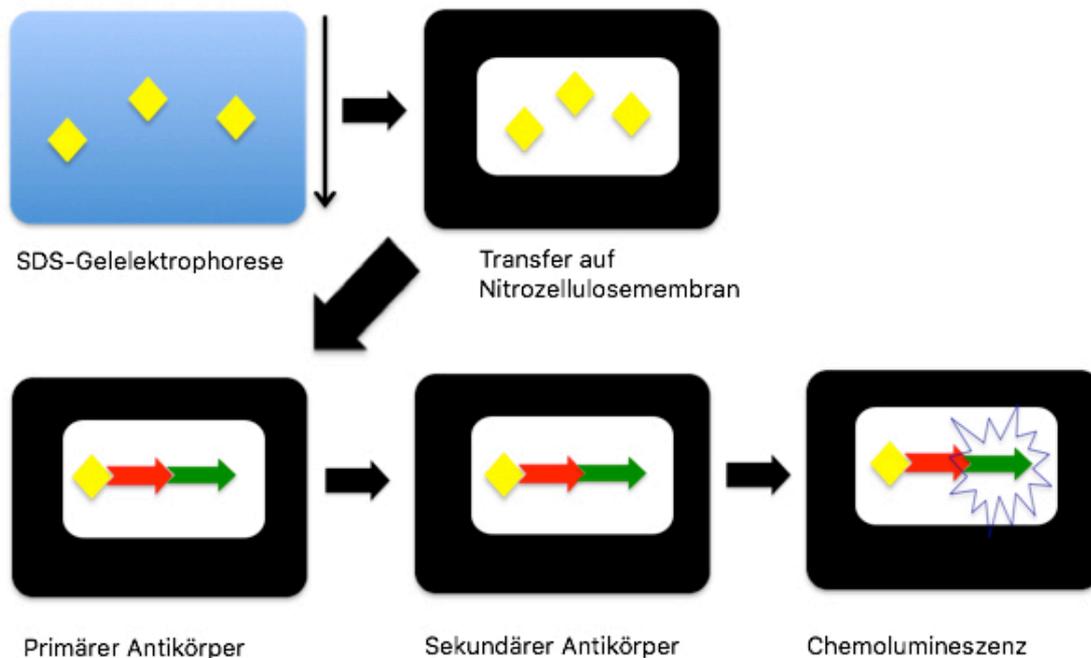


Abb. 3.2.5.1-1 Schematische Darstellung Westernblot

3.2.5.1.1 Westernblot mit Endo H für Glykosilierung

Um SFTA2 genauer bezüglich einer Glykosilierung zu testen wurde Endo H verwendet. Dabei handelt es sich um eine rekombinante Glykosidase die N-terminal schneidet. Endo H wurde laut Herstellerangaben in Zelllysaten von mit pcDNA-SFTA2-HA transfizierten Zellen eingesetzt. Dazu wurden 10 µl der Westernblot Probe und deren Zusätzen zugefügt und nach Standard Westernprotokoll weiter vorgegangen (s. Kap. 3.2.5.1.).

3.2.5.2 Polymerasekettenreaktion

Für die in vitro Vervielfältigung von DNA mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase wird die PCR verwendet (Mullis and Faloona 1987).

Dabei wird ein genau definierter Abschnitt eines DNA Stranges vervielfältigt. Der Prozess besteht aus 20-50 Zyklen und wird in einem Thermocycler durchgeführt.

Bei der Durchführung einer PCR werden mehrere Schritte durchlaufen. Zu Beginn erfolgt das sogenannte Melting oder auch Aufschmelzen oder Denaturierung genannt. Dabei wird die doppelsträngige Vorlage-DNA (=Template) auf eine Temperatur von 94°C erhitzt und somit aufgetrennt. Danach folgt eine Phase der Abkühlung um die Rückbildung der Doppelhelix zu verhindern. Der nächste Schritt wird als Annealing bezeichnet, dabei lagern sich Primer

(vorwärts und rückwärts), in vitro synthetisierte DNA-Einzelstränge mit einer Länge von 18-30 Basenpaaren jeweils am Anfang und Ende des zu vervielfältigenden DNA-Stranges an. Die Primer werden spezifisch für das zu vervielfältigende Template ausgewählt und bestimmen somit die Länge des zu amplifizierenden Fragmentes. Die genaue Temperatur während dieses Schrittes wird durch die Länge und Sequenz der Primer bestimmt und liegt normalerweise 5-10°C unter dem Schmelzpunkt der Primer bei 55-65°C. Der darauf folgende Schritt wird als Elongation oder Amplifikation bezeichnet. Am 3'-Ende des angelagerten Primers beginnend verlängert eine DNA-Polymerase in Richtung des DNA-Stranges das Template. Der Primer wird danach nicht abgelöst und bildet so den Anfang des neuen Einzelstranges. Die Temperatur während der Elongation ist abhängig vom Arbeitsoptimum der verwendeten DNA-Polymerase und liegt zwischen 68-74°C.

Insgesamt werden 20-30 Zyklen bestehend aus Denaturierung-Annealing-Elongation zwischen 20 und 50 Mal durchgeführt um am Ende vorwiegend DNA in gewünschter Länge und Sequenz zu erhalten.

Reaktionsansatz für eine 50 µl PCR Reaktion

5 µl 10x Reaktionspuffer

1 µl Template

1 µl Forward Primer

1 µl Reversed Primer

1 µl dNTP's

0,7 µl Taq-DNA-Polymerase

40,3 µl H₂O bidest.

Tabelle 8: PCR Protokoll für den Thermocycler

Schritt	Bezeichnung	Temperatur	Dauer	Zyklen
1	Denaturierung	94°C	2 Minuten	1x
2	Denaturierung	94°C	30 Sekunden	25-35x
3	Annealing	55-65 °C	30 Sekunden	
4	Elongation	72°C	50 Sekunden	
5	Schlussphase	72°C	7 Minuten	1x
6			Hold	∞

3.2.5.3 Gelelektrophorese

Das Prinzip der Gelelektrophorese ist es, die unterschiedliche Ionenbeweglichkeit zu nutzen um ionische Substanzen in einem elektrischen Feld nach ihrer relativen Größe aufzutrennen. Dabei wandern kleine Moleküle schneller als große.

Die zwei am häufigsten verwendeten Gele sind aus Agarose beziehungsweise aus Polyacrylamid. Da Agarosegele relativ großporig sind bieten sie guten Bedingungen für die Auftrennung von DNA. Polyacrylamidgele sind hingegen eher kleinporig und werden daher eher für die Auftrennung von Proteinen verwendet. Ein weiterer Faktor der die Größe der Pore des Gels mitbestimmt ist die Konzentration. Je höher die Konzentration an Agarose oder Polyacrylamid ist, desto kleiner werden die Poren.

Für die Versuche dieser Arbeit wurden 1%- und 3%-Agarosegele hergestellt und verwendet. Für die Herstellung wurden 100 ml TBE Puffer mit 1g Biozym LE Agarose Pulver (Biozym Diagnostics, Hessisch Oldendorf), für 1%-Agarosegele bzw. 3g Agarose, für 3% Agarosegele aufgeköcht. Danach wurde 5 µl Ethidiumbromid (10mg/ml; Sigma, Steinheim) hinzugefügt und zum Aushärten in einen Gelträger gegossen.

Nach einer Stunde konnte das Gel mit je 15 µl der Proben geladen werden. Davor wurde zu den Proben je 5 µl Gelloading Solution (Sigma, Steinheim) gegeben. Außerdem wurde als Längenstandard ein 100 Basenpaare oder 1kB Marker (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

Für die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde die Gelkammer mit TBE-Laufpuffer aufgefüllt und bei 120 V gestartet (Apelex PS 1006, Evry Cedex). Danach wurden die Gele bei 312 nm UV-Durchlicht (Gel iX Imager, Intas GmbH, Göttingen) angeschaut und dokumentiert.

3.2.5.4 DNA-Aufreinigung und Isolierung von Peptiden

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA für verschiedene weitere Versuchsschritte wie Restriktion, Ligation, Transformation und Transfektion wurde das Produkt QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden) verwendet. Hiermit lässt sich durch das sogenannte „bind-wash-eluting Prinzip“ einfach und schnell aufgereinigte DNA gewinnen. Zuerst erfolgt die Bindung der DNA mittels einem hochkonzentrierten salzhaltigen Puffers an einer Silikatmembran. Danach folgen mehrere Waschschrte zur Reinigung und im Anschluss die Elution mittels H₂O bidest. Bei der Aufreinigung können Primer, Nukleotide, Enzyme, Mineralöle, Salze, Agarose, Ethidiumbromid und andere Unreinheiten von der Plasmid-DNA entfernt werden. Die aufgereinigte DNA kann im Anschluss sofort für weitere Versuchsschritte verwendet werden.

Um spezifische Banden von unspezifischen Produkten zu trennen wurde das selbe Prinzip angewendet, jedoch das QIAquick Gel Extraction Protocol aus dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden) verwendet. Dabei wurde die entsprechende Bande direkt nach einer Auftrennung in der Gelelektrophorese aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels QIAquick PCR Purification (Qiagen GmbH, Hilden) aufgereinigt.

3.2.5.5 Umklonierung SFTA2

Für die Umklonierung von SFTA2 wurden 2,2 µg Ausgangs-Plasmid (MWG Operon/Eurofins Genomics, Ebersberg) verwendet. Das Plasmid wurde in 5 µl TE-Puffer gelöst und dieser davor zweimal filtriert. Vor Beginn der nächsten Schritte wurde das Plasmid abzentrifugiert.

3.2.5.6 Restriktion

Bei der Restriktion wird ein Plasmid mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen geschnitten. Diese Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die DNA an bestimmten Positionen schneiden können. Es gibt eine Vielzahl an verschiedenen Restriktionsendonukleasen und jede einzelne erkennt eine bestimmte DNA-Basensequenz aus 4 bis 8 Basenpaaren. Diese spezifischen Sequenzen sind häufig Palindrome (von vorne und hinten gleiche Zeichenkette). Dort spaltet das Enzym die DNA-Doppelhelix in glatte Enden (blunt ends) oder überhängende Enden (sticky ends). Bei den Versuchen für die vorliegende Arbeit wurden Enzyme verwendet,

die DNA-Doppelhelix in überhängende Enden spalten und somit vorteilhaft für die Weiterverarbeitung waren.

Die Restriktionsenzyme wurden nach den jeweiligen Herstellerangaben verwendet. Der Restriktionsverdau wurde für 2,5 Stunden bei der optimalen Arbeitstemperatur der Enzyme von 37°C durchgeführt.

30 µl Restriktionsverdau

3 µl Puffer A

0,5 µl BSA

0,7 µl BAM HI

0,7 µl Xba I

3 µl Template (gelöstes Plasmid)

22,1 µl H₂O bidest.

3.2.5.7 Vektorverdau

Der Vektorverdau von pcDNATM3.1 (-) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) erfolgte zeitgleich mit dem Restriktionsverdau.

Die Restriktionsenzyme wurde nach den jeweiligen Herstellerangaben verwendet. Der Vektorverdau wurde für 30 Minuten bei der optimalen Arbeitstemperatur der Enzyme von 37°C durchgeführt, gefolgt von einer 10-20 minutigen Inaktivierung bei 65°C.

30 µl Vektorverdau

0,5 µl BSA

0,7 µl BAM HI

0,7 µl Xba I

3 µl Template (Vektor pcDNATM3.1 (-))

22,1 µl H₂O bidest.

3.2.5.8 Ligation

Unter dem Begriff Ligation versteht man die enzymkatalysierte Verknüpfung eines DNA- und RNA-Segmentes an ihren Enden. Für diesen Schritt wird das Enzym Ligase benötigt. Es verbindet das 3'-Hydroxy-Ende mit dem 5'-Phosphat-Ende der Nukleinsäuresegmente. Mit Hilfe dieses Vorganges kann zuvor aufbereitete „fremd-DNA“ in ein ebenfalls zuvor aufbereitetes Plasmid eingebracht werden. Die Ligation wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt.

30 µl Ligation

+ Kontrolle

3 µl T4 Ligase Puffer

1 µl Vektor

15 µl SFTA2

1 µl T4-DNA Ligase

10 µl H₂O bidest.

- Kontrolle

3 µl T4 Ligase Puffer

1 µl Vektor

15 µl H₂O bidest.

1 µl T4-DNA Ligase

10 µl H₂O bidest.

3.2.5.9 Transformation

Neben der Transduktion und der Konjugation ist die Transformation eine von drei Möglichkeiten des Gentransfers bei Prokaryoten.

Bei der Transformation handelt es sich um die nicht-virale Übertragung von freier DNA in kompetente Bakterienzellen sowie Pilze, Algen, Hefen und Pflanzen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Transformation in Bakterienzellen durchgeführt und ist ein Teilschritt der Klonierung. Somit kann mit Hilfe der Transformation das gewünschte Plasmid sehr häufig vervielfältigt werden.

Jedoch besitzen nicht alle Bakterien die natürlich Kompetenz zur Aufnahme von Fremd-DNA. Für diese Arbeit wurden daher chemisch kompetente Zellen hergestellt. Dabei wird die Bakterienzellwand durch mehrere Schritte durchlässig gemacht. Dafür eignet sich die Behandlung mit Calciumchlorid oder Rubidiumchlorid sowie die Elektroporation. Nach

Aufnahme der Fremd-DNA in die Zelle wird die so transformierte Bakterienzellen auf Selektionsagar (Agar mit einem bestimmten Antibiotikum) ausgeplattet und angezüchtet.

Mit Hilfe eines Resistenzgens gegen ein bestimmtes Antibiotikum das nur das transformierte Plasmid enthält und nicht die DNA der Bakterienzellen, wachsen auf dem Selektionsagar nur transformierte Zellen.

Herstellung chemisch kompetenter E. coli DH5 α

1. 500 μ l einer Vorkultur mit E. coli DH5 α werden zu 25 ml LB-Medium gegeben und bei einer Temperatur von 37°C in einem Schüttler für 3 Stunden inkubiert, bis die optische Dichte bei 600 nm 0,6 bis 0,8 beträgt
2. Die Zellen werden bei 3000 U/min und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert
3. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet in 2 ml eisgekühltes CaCl₂ resuspendiert; danach wird mit CaCl₂ auf 10 ml aufgefüllt
4. Die Zellen werden erneut 15 Minuten lang bei 4°C und 3000 U/min zentrifugiert und das Pellet in 1ml CaCl₂ resuspendiert

Durchführung Transformation und Hitzeschock

DH5 wird auf Eis aufgetaut und in 2 Eppendorf Tubes zu je 50 μ l verteilt.

In das erste Eppendorf Tube werden 10 μ l der Ligation hinzugefügt.

In das zweite Eppendorf Tube, das als negativ Kontrolle dient, werden 10 μ l H₂O bidest. hinzugefügt.

Nun folgt eine Inkubtionsphase von 30 Minuten auf Eis.

Danach folgt der Hitzeschock bei 42°C für eine Minute um die Bakterienzellen für die Transformation permeabel zu machen.

Es folgt eine Abkühlungsphase von 2 Minuten auf Eis und eine Zugabe von 500 μ l LB Medium ohne Antibiotikum.

Um nun die Expression des Resistenzgens zu erhalten wird der Ansatz für 45 Minuten bei 37°C inkubiert.

Als nächster Schritt folgt das Ausplatten der Suspension auf LB-Medium mit Ampicillin und eine Inkubationsphase von 10-12 Stunden bei 37°C.

Nach der Inkubationsphase können die einzelnen Klone gepickt werden und je ein Klon in 10 ml Tubes mit je 3 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt werden.

Danach erfolgt eine erneute Inkubationsphase von 10-12 Stunden bei 37°C

3.2.5.10 Induktion

Die Expression von Genen wird meist auf Transkriptionsebene reguliert. Bei E. coli wird die Expression durch lac operon reguliert. Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Mechanismen der Regulation, die positive und die negative Regulation.

Bei der positiven Regulation ermöglicht ein Aktivatorprotein die Expression der Gene, ohne dieses Aktivatorprotein werden die Gene gar nicht oder nur in geringem Maße abgelesen. Bei der negativen Regulation verhindert ein Repressor die Transkription. Erst durch Entfernung des Repressor wird die Genexpression möglich. Ein Induktor, in dieser Arbeit IPTG, kann an den Repressor binden und ihn somit entfernen. Damit wird die Genexpression ermöglicht.

Die Induktion wurde in dieser Arbeit mit verschiedenen Konzentration von IPTG (0,1mM, 05mM und 1mM durchgeführt.

3.2.5.11 Herstellung MBP-SFTA2 Fusionsprotein

Maltose binding Protein (MBP) ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 42,5kDa.

Es wird häufig in Expressionsvektoren zur Herstellung von rekombinanten Proteinen verwendet. Bei der Expression des Vektors entsteht dabei ein MBP-Fusionsprotein.

Um ein MBP-SFTA2 Fusionsprotein herzustellen wurde das pMal-™ Protein Fusion and Purificatin System (NewEngland BioLabs GmbH, Frankfurt) verwendet. Dabei wurde das Genfragment SFTA2 in den Vektor pMal-c2 eingefügt und somit ein MBP-SFTA2 Fusionsprotein hergestellt. Dabei enthielt dieses Konstrukt keine Signalsequenz. Als Promotor dient tac, der mit Hilfe von IPTG kontrolliert werden kann und somit die Expression steuert. Das Fusionsprotein wurde in einem weiteren Schritt laut Herstellerangaben aufgereinigt und im Westernblot getestet. Die Induktion sowie Aufreinigung wurde mit Hilfe von DH5α E. coli durchgeführt.

3.2.5.12 Herstellung GST-SFTA2 Fusionsprotein

Glutathion S-transferase (GST) ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 26kDa, bestehend aus 211 Aminosäuren. Es wird häufig in Expressionsvektoren zur Herstellung von rekombinanten Proteinen verwendet. Bei der Expression des Vektors entsteht dabei ein GST-

Danach wurde ein Aliquot von 5ml Kultur zur SDS-Analyse abgenommen und bei 4000rpm für 10 Minuten abzentrifugiert.

Daraufhin erfolgte die Induktion mit 0,1mM, 0,5mM und 1mM IPTG

Die Inkubation erfolgte bei unterschiedlichen Temperaturen von 20°C und 28°C für verschiedene Zeiten von 2 und 4 Stunden.

Die hergestellten Pellets wurden anschließend in verschiedenen Lysepuffern gelöst und drei Mal für 15 Sekunden sonifiziert. Als Lysepuffer wurden Puffer mit verschiedenen Konzentrationen an Sarkosyl von 0,5%, 1%, 2% und 4% sowie Puffer mit NP-40, Tween 20 und Triton X-100 verwendet. Die sonifizierte Lösung wurde danach für 15 Minuten bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugiert, um lösliche und unlösliche Zellbestandteile voneinander zu trennen. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Tube überführt und das Pellet erneut in Lysepuffer resuspendiert. Vom Überstand und Pellet wurden daraufhin Gelproben angefertigt.

3.2.5.13 Bradford Test

Zur quantitativen Bestimmung von Protein wird der Bradford Test verwendet. Dabei handelt es sich um eine photometrische Methode um Protein im Mikrogramm pro Milliliter zu messen (Bradford 1976).

Mit Hilfe des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250m, der an Proteine in saurer Lösung bindet, verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 auf 595 nm. Der Farbstoff existiert in drei verschiedenen Formen. Kationisch (rot), neutral (grün) und anionisch (blau). Der blaue Farbstoff wird bei 595 nm in einem Spektrophotometer oder Mikroplattenanalysator gemessen.

So lässt sich anhand von Eichkurven die Proteinkonzentration in Flüssigkeiten bestimmen. Dabei ist die Farbreaktion abhängig vom Gehalt an aromatischen und an basischen Aminosäuren (Kruger 1994).

Für die Durchführung eines Bradford Tests wurde als Referenz eine Eichkurve erstellt. Als Eichlösung diente dabei BSA. Die Eichkurve wurde durch eine Verdünnungsreihe aus der Eichlösung hergestellt. Danach wurde das Protein aufgetragen. Das Bradfordreagenz wurde in einer Konzentration von 1:5 verdünnt und je 200µl in die wells vorgelegt. Danach wurden die Proben in unterschiedlichen Verdünnungen aufgetragen und die Messungen durchgeführt.

3.2.6 Zellkulturmethoden

3.2.6.1 Kultivierung von adhärennten Zellen

Die Kultivierung von adhärennten Zellen fand im S2-Bereich unter sterilen Arbeitsbanken statt und dabei wurde ausschließlich mit sterilen Medien, Lösungen und Geräten gearbeitet. Die Zellen A549 und MLE12 wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre in den entsprechenden Medien kultiviert. Beim Zellsplitting (=Passage der Zellen) wurde zuerst das Medium in der Kulturflasche abgesaugt und die Zellen mit 10ml PBS gewaschen. PBS wurde wieder abgesaugt und 2ml Trypsin wurden in die Kulturflasche gegeben und diese für 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Unter dem Mikroskop erfolgte die Kontrolle des Ablösevorgangs und durch Zugabe von 8 ml Medium wurde der Ablösevorgang gestoppt. Die Zellen wurden zusammen mit dem Medium in eine 50ml Tube überführt und bei 300rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung wurde mit einer Zählkammer, der sogenannten Neubauer Zählkammer (Carl Roth, Karlsruhe) durchgeführt

Zur Berechnung der Zellzahl wurde die Anzahl der Zellen in den vier Großquadraten mit 2,5 und 1000 multipliziert. Somit erhielt man die Zellzahl/ml und konnte die gewünschte Menge an Zellen für weitere Versuchsschritte wie Transfektion (s. Kap. 3.7.2) oder zur Langzeitaufbewahrung oder Neuaussaat verwenden.

Ein Teil der resuspendierten Zellen wurde dann in eine neue Kulturflasche überführt und angezüchtet. Der Rest wurde dann für die Langzeitlagerung nach erneutem Abzentrifugieren des Nährmedium in 6ml Einfriermedium (50% Nährmedium, 40% FBS, 10% DMSO) resuspendiert und für 24 bis 48 Stunden zuerst bei -80°C eingefroren und im Anschluss zur Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff gelagert. Bei Bedarf konnten die Zellen jederzeit aus dem flüssigen Stickstoff wieder aufgetaut und erneut kultiviert werden.

3.2.6.2 Transiente Transfektion

Bei der Transfektion wird fremde Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen eingebracht. Dafür wurden die Zellen laut Herstellerprotokoll bei einer Konfluenz von 70-80% mit Hilfe von Amaxa Nucleofector™ 2b Device transfiziert. Für die Transfektion wurde pro 2 Millionen Zellen 1 µg DNA verwendet. Der Standardansatz wurde auf die Fläche einer 6 Well-Platte (BD Falcon, Heidelberg) abgestimmt. Somit wurden 12 Millionen Zellen und 6 µg DNA pro Ansatz verwendet. In jedes der 6 wells wurde ein Deckgläschen (12 mm Ø, Superior Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) eingelegt und 1 ml vorgewärmtes RPMI Medium eingefüllt.

Die gewünschte Mengen an Zellen wurde in der entsprechenden Menge an Transfektionspuffer resuspendiert und dann zu der bereits vorbereitenden DNA gegeben (Standardansatz: 2 Millionen Zellen in 100 µl Amaxa-Puffer pro 1 µg DNA). Diese Suspension wurde dann in Transfektionsküvetten überführt und mittels des entsprechenden Elektroporations-Programmes transfiziert. Nach der Transfektion wurden 500 µl RPMI-Medium zu jeder Küvette hinzugefügt und mit den Zellen resuspendiert. 500 µl einer Küvette wurden dann in je ein well der 6 well Platte überführt und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Transfektionsansatz

1µg DNA

2 Millionen Zellen

100 µl Amaxa-Puffer

1 well/ 6 well-Platte

3.2.6.3 Zellysate

Um Gesamtzellysate herzustellen wurden die Zellen nach Transfektion mit 350 µl Lysispuffer (s.u) versetzt und mehrmals mit einer Pipette auf- und abpipetiert. Wichtig war dem Puffer einen Protease-Inhibitor beizusetzen. Dieser hemmt die zelleigenen Proteasen und verhindert, dass Proteine während der Aufbereitung abgebaut werden. Aus dem gleichen Grund erfolgten alle anderen Arbeitsschritte bei konstant 4°C. Das Zell-Lysispuffer-Gemisch wurde dann 15 Minuten auf Eis gelagert, danach sonifiziert und erneut 15 Minuten auf Eis gelagert. Anschließend wurde das Homogenat für 45 Minuten bei 1000rcf zentrifugiert. Ein Teil des Lysat wurde im Anschluss bei -20°C eingefroren und konnte somit für spätere Versuche wiederverwendet werden.

Tabelle 9: Zusammensetzung des Lysispuffers

Lysisbuffer	Zusammensetzung		
TNT+N-Ethylmaleimide (pH 8,5)	50	mM	Tris-HCl
	150	mM	NaCl
	1%	Triton	X-100
	0,02%		SDS
	1	mM	DTT
	Protease Inhibitor Cocktail	(1000x)	
	100	mg/ml	PMSF
	20mMN-Ethylmaleimide		

3.2.6.4 Sekretion von SFTA2

Um eine mögliche Sekretion von SFTA2 zu zeigen wurden MLE12 und A549 Zellen mit SFTA2 transfiziert. Die Transfektion erfolgte wie in Kapitel 3.2.5.5 beschrieben und die Zellen wurden auf mehrere Kulturflaschen aufgeteilt. Nach erfolgreicher Transfektion wurde in alle Kulturflaschen 5% FBS Medium hinzugefügt und die Zellen für 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Medium in den Kulturflaschen gewechselt und die Zellen wurden in verschiedenen Konzentrationen an FBS Medium für die nächsten 24 Stunden inkubiert. Es wurde Konzentrationen von 0% FBS-, 2% FBS- und 5% FBS-Medium verwendet. Nach 24 Stunden wurden die Zellen auf Vitalität geprüft und das Medium entsprechend der vorherigen Konzentration gewechselt. Das abgesaugte Medium wurde aufgefangen und für weitere Versuchsschritte bei 4°C gelagert. Nach 72 Stunden wurde das Medium erneut gewechselt, aufgefangen und für weitere Versuchsschritte bei 4°C gelagert. Die gewonnenen Medien wurde vor ihrer Weiterverwendung im Westernblot und Immunofluoreszenz mittels Filter konzentriert.

3.2.7 Immunofluoreszenzmikroskopie

3.2.7.1 Prinzip

Die Immunofluoreszenz ist eine Methode bei der ein bestimmtes Protein mit Hilfe eines primären Antikörpers markiert und dann mit Hilfe eines sekundären fluoreszenzhaltigen Antikörper unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht wird.

Mit dieser Methode lassen sich Proteine in Zellen und Geweben sehr genau lokalisieren. Bei der Durchführung der Immunofluoreszenz kann nur mit fixierten toten Zellen gearbeitet werden. Da aufgrund der Größe der Antikörper die Membranen der Zellen permeabilisiert werden müssen um somit das Eindringen zu ermöglichen.

Bei zwei verschiedenen Proteinen, die mit zwei Farben doppelt-gefärbt werden, müssen primäre Antikörper von zwei unterschiedlichen Spezies verwendet werden. Die für die Detektion verwendeten Antikörper stammen von einer dritten Spezies, deren Exzitations- und Emissionsspektrum weit genug auseinanderliegen.

3.2.7.2 Transfektion von A549- und MLE12-Zellen

A549- und MLE12 Zellen mit einer Konfluenz von 70-80% wurden für die Transfektion verwendet. Für die Immunofluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen in einem 6-well auf Deckplättchen ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

3.2.7.3 Immunofluoreszenzfärbung

Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wird das Medium aus den 6 well Platten abgesaugt und die Deckplättchen mit 1 ml PBS gewaschen und mit 3% Paraformaldehyde für 15 Minuten fixiert und im Anschluss mit 0,15% Triton X-100 für 15 Minuten permeabilisiert. Danach wurden die Coverslip bei Raumtemperatur 3 Mal mit PBS gewaschen bevor die einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper erfolgte. Diese wurden in einer Konzentration von 1:100 verwendet. Nach mehreren Waschsritten (s. Protokoll Immunofluoreszenzfärbung) erfolgte die lichtgeschützte Inkubation mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Darauf folgten erneut mehrere Waschschrte. Zur Färbung der Zellkerne wurden die Deckplättchen mit der Zellseite nach unten auf einen Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig) mit 18 µl Vectashield Mounting Medium mit DAPI (Vectorlabs Laboratories Inc, Burlingame, USA) gegeben und fixiert. Die Objektträger wurden lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Protokoll Immunofluoreszenz

Vorbereitung der Lösungen:

- PBS-Lösung
- PBS/Triton-Lösung: 0,15% Triton X-100 in PBS
- PFA-Lösung: 3% PFA in PBS

- PBS⁺-Lösung: 1% BSA in PBS
- Antikörper-Lösungen laut Herstellerangaben

Durchführung des Experimentes: (alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt)

- Medium aus Well absaugen und mit PBS waschen
- Fixierung mit 3% Paraformaldehyde für 15 Minuten
- Permeabilisierung mit 0,15% Triton X-100 für 15 Minuten
- Waschschrte: 3x für je 10 Minuten mit PBS⁺
- Inkubation mit primären Antikörper in einer Konzentration von 1:100 für 1 Stunde
- Waschschrte:
 - 5 Minuten mit PBS
 - 2 Mal für je 5 Minuten mit PBS/Triton
 - 2 Mal für je 5 Minuten mit PBS
 - 7 Minuten mit PBS⁺
- Lichtgeschützte Inkubation mit sekundärem Antikörper für 1 Stunde
- Waschschrte:
 - 2 Mal für je 5 Minuten mit PBS/Triton
 - 2 Mal für je 5 Minuten mit PBS
- 18 µl Vectashield mit DAPI auf Objektträger aufbringen und Deckgläschen mit der Zellseite nach unten darauflegen
- Fixierung des Objektträgers mit klarem Nagellack

3.2.7.4 Immunofluoreszenzmikroskopie

Für die Immunofluoreszenzmikroskopie wurde mit einem Zeiss Axiovert 135 invertierten Mikroskop (Carls Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen) und den entsprechenden Immunfluoreszenzfiltern gearbeitet. Zur Dokumentation wurde eine Digitalkamera der Firma Zeiss mit der Software Axiovision benutzt.

3.2.7.5 Immunofluoreszenz mit STFA2 transfizierten A549- und MLE12 Zellen

Für die Immunofluoreszenz wurde laut Protokoll (s. Kap. 3.2.7.3) vorgegangen.

Als primärer Antikörper wurde der HA-Antikörper in einer Konzentration von 1:100 verwendet. In dieser Arbeit wurden A549 Zellen und MLE 12 Zellen verwendet, da sie bereits in vorherigen Arbeiten genutzt wurden um subzelluläres Targeting zu Lamellarkörperchen

darzustellen (Sorokina, Feinstein et al. 2009, Weichert, Kaltenborn et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurden Lamellarkörperchen mittels eines anti-LAMP-1 Antikörpers in A549 Zellen dargestellt. In MLE12 Zellen wurden die Lamellarkörperchen mit Hilfe von Transfektion von ABCA3 cDNA mit einem C-terminalen HA-Epitop markiert. Wie bereits aus früheren Arbeiten bekannt ist codiert ABCA3 für einen Lipidtransporter in Lamellarkörperchen (Yamano, Funahashi et al. 2001).

Für die Markierung des Golgi Apparates wurde der Antikörper golgin-97 in einer Konzentration von 1:200 verwendet. Um weitere Strukturen in der Zelle zu markieren wurde unter anderem der Antikörper anti-Clathrin in einer Konzentration von 1:200 verwendet. Hiermit wurde mit Clathrin versehene Vesikel detektiert. Als sekundäre Antikörper wurde Fluoreszenzhaltige Antikörper verwendet. Für die Gegenfärbung der Zellkerne wurde DAPI-haltiges Vectashield Mounting Medium verwendet. Die anschließende Immunofluoreszenzmikroskopie wurde mit einem Zeiss Axiovert 135 invertiertem Mikroskop durchgeführt und mittels Digitalkamera der Firma Zeiss und der Software Axiovision dokumentiert.

3.2.8 Erzeugung spezifischer Antikörper gegen menschliches SFTA2

Das tierische Immunsystem verfügt über die Fähigkeit Antikörper zu produzieren, die spezifisch an Antigene binden. Für die Generierung von spezifischen Antikörpern gegen menschliches SFTA2 wurde diese Fähigkeit bei Kaninchen genutzt.

Antikörper werden vom Immunsystem, genauer gesagt von B-Lymphozyten, als Antwort auf ein fremdes Antigen produziert und sind ständig in der Blutbahn im Umlauf.

Für die Generierung von spezifischen Antikörpern gegen menschliches SFTA2 wurden drei überlappende Peptide, der menschlichen Sequenz entsprechend (LKLKESFLTNS^{Yc}, EKLCLLLHLPSGT^{Sc}, SGTSVTLHHARSQH^{Vc}) an KLH gekoppelt. Die Auswahl dieser Peptide erfolgte einerseits mittels mehrerer frei zugänglicher Online Programme, welches nach Antigen wirksamen Stellen die Sequenz absuchen, andererseits erfolgte die gleiche Suche durch die Firma. Nach Abgleich der Sequenzen wurden die drei oben genannten Peptide ausgewählt. Es folgte die Immunisierung zweier Kaninchen. Jedes der beiden erhielt eine Kombination aus allen drei Konjugaten. Das Serum konnte nach einiger Zeit gewonnen und mittels ELISA getestet werden. Dabei zeigte sich eine deutliche Antwort auf alle Peptide bei einem der beiden Kaninchen. Dieses Serum wurde affinitätsgereinigt und konnte für Versuche eingesetzt werden. Die Immunisierung der Tiere sowie die Titerbestimmung, ELISA Testung, Gewinnung des

Serums und Affinitätsreinigung wurden von der Firma Primm (PrimmBiotech, Mailand, Italien) durchgeführt.

3.2.9 Immunfärbung von menschlichem Lungengewebe

Für die Durchführung der Versuche wurden anonyme menschliche Lungengewebe von klinischen Eingriffen verwendet. Die Verwendung dieser Gewebe wurde durch die Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt (Referenznummer: EK15032011). Die Gewebestücke wurden während Bronchoskopien gewonnen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Vor Durchführung der Experimente wurden das gewonnene Lungenmaterial von endogener Peroxidase mittels 3% H₂O₂ für 15 Minuten gereinigt. Danach folgte die Inkubation mit den primären Antikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur. Als primäre Antikörper wurde TTF-1 in einer Konzentration von 1:50 und SFTA2-Peptidantikörper in einer Konzentration von 1:50 verwendet. Als sekundäre Antikörper wurden fluoreszierende Antikörper sowie DAPI für die Färbung von Zellkernen verwendet. Die fertigen Präparate wurden unter einem Zeiss Axio Imager Fluoreszenz Mikroskop betrachtet und analysiert. Durch Anwendung der Interferenzkontrast Mikroskopie konnte die Lungenmorphologie genauer untersucht werden.

Diese Versuche wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Johannes Schwarz durchgeführt.

3.2.9.1 Kontrollexperiment zur Blockierung des Peptidantikörpers

Zur Kontrolle des Peptidantikörpers wurde im Rahmen der Versuche an menschlichen Lungengewebe ein Blockexperiment durchgeführt. In der Immunofluoreszenz wurde zuerst das Gewebe nur mittels Peptidantikörper und sekundärem Fluoreszenzantikörper beurteilt. Als zweiten Schritt wurde der Peptidantikörper mittels der Peptide geblockt und das Gewebe erneut unter dem Mikroskop beurteilt.

3.2.10 Tierversuche

Um einen Effekt von LPS und Hyperoxie auf die Expression von SFTA2 zu zeigen wurden 9-11 Wochen alte weibliche C57BL/6 Mäuse verwendet.

Für die LPS Studie wurden die Mäuse in zwei Gruppen randomisiert. Eine Gruppe erhielt 1mg/kg Körpergewicht LPS und die andere Gruppe 80 µl Kochsalzlösung. Vor der intratrachealen Gabe der Substanzen wurden die Mäuse mittels intraperitonealer Injektion von Medetomidin, Midazolam und Fentanyl narkotisiert. Für die gleichmäßige Verteilung der

Substanzen in der Lunge wurden diese direkt nach Gabe mittels Beatmungsmaschine (Flexivent small animal ventilator, DMI, USA) ventiliert. Nach 18 Stunden wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Gabe von Pentobarbital getötet und eine Tracheotomie durchgeführt. Die Lungen wurden mit Kochsalzlösung gewaschen und danach in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Hyperoxie Studie wurden ebenfalls 9-11 Wochen alten Mäuse verwendet und in 2 Gruppen randomisiert. Eine Gruppe wurde bei normalem Sauerstoffgehalt in der Luft gehalten und die zweite bei 95% Sauerstoff für 72 Stunden. Um die Lungen dieser Tiere zu gewinnen wurden sie ebenfalls narkotisiert und getötet. Danach wurden die Lungen mit Kochsalzlösung gewaschen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Tierversuche wurden mit Hilfe von R. Mittal und S. Herber-Jonat durchgeführt.

Alle Tierversuche wurden vom Freistaat Bayern genehmigt und wurden gemäß des deutschen Gesetzes durchgeführt (Referenznummer: 55.2-1-54-2531-24-08).

3.2.11 Isolierung von Alveolar Epithelzellen

Die Isolierung von Alveolarepithelzellen wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Eickelberg O. durchgeführt und die Daten wurden mir für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Alveolarepithelzellen wurden wie bereits von Corti et al. beschrieben von Mäusen gewonnen. (Corti, Brody et al. 1996) Dazu wurden das Lungengewebe zweimal mit je 1ml sterilem PBS gewaschen und danach mit Dispase verdaut und zerkleinert. Die dabei entstandene Suspension wurde mehrmals gefiltert und bei 200xg für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in DMEM resuspendiert. Es folgten zwei Negativselektionen. Durch Inkubation auf CD16/32- und CD45-überzogenen Petrischalen für 30 Minuten bei 37°C erfolgte die Negativselektion für Lymphozyten und Makrophagen. Durch Haftung auf Zellkulturschalen für 45 Minuten erfolgte die Negativselektion von Fibroblasten.

Eine Analyse der Zellreinheit und Verwendbarkeit wurde direkt nach Isolation der ATII Zellen durchgeführt. Dabei wurde auf die Morphologie geachtet sowie eine Immunfluoreszenz Analyse durchgeführt. Die Lebensfähigkeit der ATII Zellen wurde mittels Trypan Blue kontrolliert.

Alle verwendeten ATII Zellen wiesen eine Reinheit von $95\pm 3\%$ und eine Vitalität von $>97\%$ auf.

3.2.12 RNA Extraktion von Mäuselungen und verschiedenen Zelllinien

Für die RNA Extraktion wurde RNazol laut Protokoll der Hersteller (WAK-Chemie Medical, Steinbach) verwendet.

RNazol ist eine Weiterentwicklung von RNA-Isolierungsreagenzien. (Chomczynski and Sacchi 1987) Mit Hilfe von RNazol ist es möglich RNA zu isolieren, die direkt ohne weitere Schritte wie DNase Zugabe für RT-PCR, qRT-PCR und viele weitere Methoden verwendet werden kann.

Nach der Isolierung von RNA wurde diese in einem weiteren Schritt erneut gereinigt. Dazu wurde das RNeasy protect minikit (Qiagen, USA) verwendet.

RNA wurde aus A549, Calu-3 und HEK-29 Zellen gewonnen.

cDNA wurde mittels First strand CDNA synthesis kit (GE healthcare, USA) hergestellt. Dabei wurde laut Herstellerprotokoll vorgegangen.

Mit den gewonnen Materialien wurden q-PCR Analysen, auf GAPDH normiert, durchgeführt.

Als Primer wurden folgende verwendet:

SFTA2-forward: GGAGTCTTTTCTGACAAATTCCTC

SFTA2-reverse: GGTGTTGAGATCTTGCATGGTGG

3.2.14 Statistische Methoden

Für die statistische Auswertung der einzelnen Untersuchungen wurden bei normalverteilten paarigen Wertpaaren der Student-t Test verwendet, bei mehrpaarigen Daten der ANOVA. Es wurde bei multipler Testung eine Bonferroni Korrektur durchgeführt. Nicht normalverteilte Datenreihen wurden mit dem Mann-Whitney U Test getestet. Das Signifikanzniveau wurde bei $p=0,05$ gesetzt. Alle statistischen Datenanalysen inklusive Mann-Whitney U Test wurden mithilfe des Statistikprogramms SPSS Version 18.0 (Chicago, USA) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 SFTA2 Expression in menschlichem und Mausgewebe

Wie bereits aus RNA Analysen bekannt ist wird SFTA sehr stark in der Lunge exprimiert. Diese RNA Analysen wurden mit Hilfe von Chip Hybridisation Methoden durchgeführt. Um diese Daten zu verifizieren wurde eine quantitative RT-PCR an 48 unterschiedlichen Geweben durchgeführt. Hierbei zeigte sich folgende Expression (s. Tabelle 10 und Abb 4.1-1) in den unterschiedlichen Gewebearten. In der Tabelle sind nur Gewebe mit einer Expression von SFTA2 aufgelistet die höher als 0,1% lag.

Tabelle 10: Relative SFTA2 mRNA Levels in menschlichen Geweben

Gewebe	Relative Menge an mRNA Normiert auf GAPDH
Lunge	100
Zervix	12.94
Ösophagus	12.85
Magen	3.42
Hoden	2.02
Niere	1.12
Rektum	1.02
Pankreas	0.81
Vagina	0.50
Lymphknoten	0.35
Uvula	0.34
Perikard	0.27
Schilddrüse	0.20
Haut	0.19
Leber	0.19
Zunge	0.19
Gebärmutter	0.18
Nebenniere	0.15
Milz	0.15

Von den 48 verwendeten Gewebearten werden in der Tabelle nur Gewebe mit eine Expression von mehr als 0,1% der Lunge dargestellt. Die relative Menge der Lunge wurde bei 100 festgelegt. Die Lunge ist der Hauptexpressionsort. Eine Expression von mehr als 1% zeigte sich auch in der Zervix, Ösophagus, Magen, Hoden, Nieren und Rektum. Die Normierung mit β -actin zeigte die selben Muster.

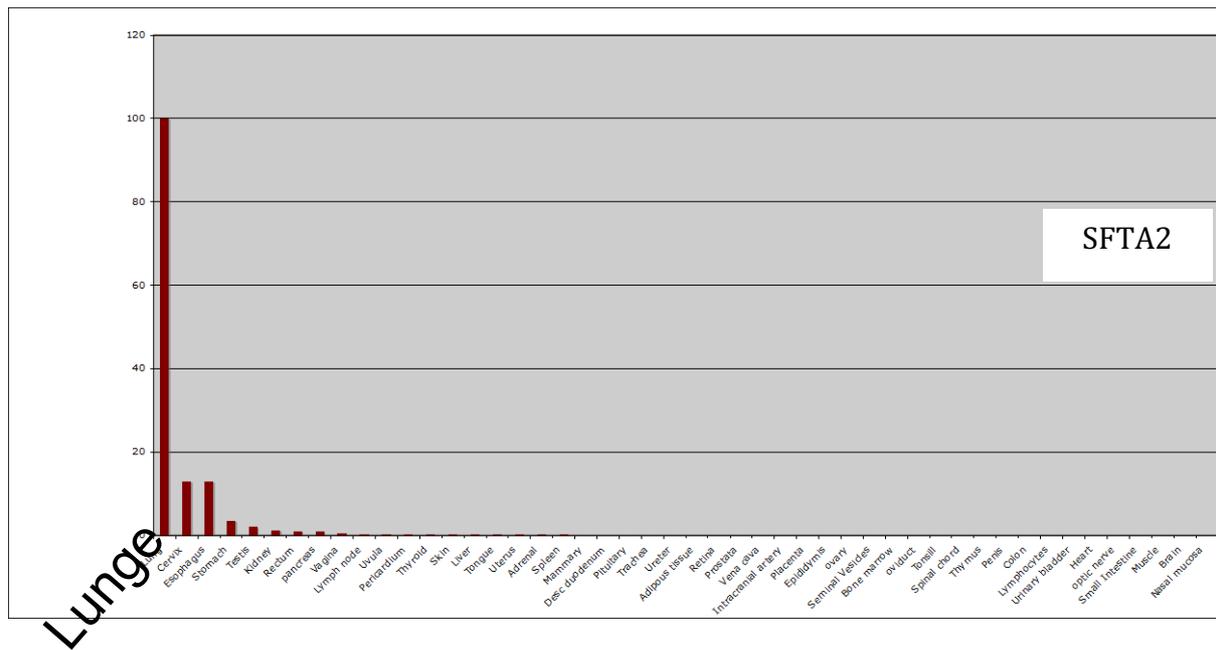


Abb. 4.1-1 Relative Expression von SFTA2 in menschlichen Geweben
 Quantitative PCR; Normalisierung auf GAPDH; Lunge = 100

Wie bereits angenommen, ist die Expression an SFTA2 in der Lunge am höchsten (siehe Tabelle 10 und Abb. 4.1-1) Jedoch zeigte sich auch, dass es sich bei SFTA2 nicht um ein rein lungenspezifisches Protein handelt. Es zeigte sich unter anderem eine erhöhte Expression von mehr als 1% in Zervix, Ösophagus, Magen, Hoden, Niere und Rektum.

Außerdem konnte mittels GeoProfiles festgestellt werden, dass SFTA2 bei einigen Tumoren exprimiert wird. Dabei handelt es sich um verschiedene Lungentumore sowie um Tumore der Brust, Ovarien und Zervix.

Zusätzlich zu dem menschlichen Gewebe wurde auch die Expression von SFTA2 in der Maus untersucht. Auch hier bestätigte sich die vorwiegende Expression in der Lunge. Alle anderen Gewebearten zeigte eine Expression von weniger als 1%.

4.2 SFTA2 Promotor Analyse

Bei der Überprüfung von Promotor Regionen für SFTA2 Orthologe die bereits bekannte Funktionen übernehmen, konnten zwei interessante Kombinationen gefunden werden. Die erste Kombination **VSETSF-VSSP1** (VSETSF: ETS1 factors; (EHF, ELF1through 3, ELF4, ELF5, ELK1, ELK3, ELK4, ERF, ERG, ETS1, ETS2, ETV1, ETV2, ETV3, ETV4, ETV5, ETV6, ETV7, FEV, FLI1, GABPA, GABPAP, GABPB1, GABPB2, SPDEF, SPI1, SPIB, SPIC), VSSP1: GC-Box factors SP1/GC; (SP1 through 7; KLF10, KLF11 KLF16 KLF5)) ist in

sieben Arten konserviert.

Die zweite Kombination lautet **V\$EVSF-V\$NFKB** (**V\$NFKB**: Nuclear factor kappa B/c-rel (HIVEP1, HIVEP2, HIVEP3, NFKB1, NFKB2, REL, RELA, RELB) und ist in fünf Arten konserviert.

Sehr interessant ist auch eine 80 Basenpaare umfassende hoch konservierte Region 300 Basenpaare des menschlichen SFTA2 vorgelagert. Diese Region umfasst mehrere potenzielle Bindungsstellen für Homöobox Faktoren. Dazu zählt auch NKX-2-1 das für TTF-1 codiert.

Diese Homöobox Faktor Bindestellen **V\$NKXH** (**V\$NKXH**: NKX Homöobox Faktor (HMX1, HMX2, HMX3, NKX2-1, NKX2-2, NKX2-3, NKX2-4, NKX2-5, NKX2-6, NKX2-8, NKX3-1, NKX3-2) sind in insgesamt 8 verschiedenen Arten zusammen mit Bindungsstellen für Myc assoziierte Zinkfinger Elemente (**V\$MAZF** MAZ, **PATZ1**), C2H2 Zinkfinger Transkriptionsfaktoren 2 (**V\$ZF02**: ZNF281, ZBTB7B, ZNF219, ZBTB7A, **ZNF148**, ZNF202, ZKSCAN3, ZNF300) und Krueppel assoziierte Transkriptionsfaktoren (**V\$KLFS**: KLF1, KLF2, KLF3, KLF4, **KLF6**, KLF7, KLF8, KLF9, KLF12, KLF13, KLF15) konserviert.

Diese drei Bindungsstellen (**PATZ1**, **KLF6**, **ZNF148**) spielen eine wichtige Rolle im Immunsystem.

In dieser Region konnten aus insgesamt 65 Mustern 3 Stellen identifiziert werden, die einen speziellen Abstand bezüglich des hohen Konservationsgrades aufweisen. Diese Varianten umfassen 16 Transkriptionsfaktoren Bindungsstellen. Mit Hilfe von ModelInspector konnten eine hohe Spezifität für diese Kombination und spezifischen Abstand an Transkriptionsfaktoren nachwiesen werden. Davon sind 35 nur im SFTA2 Promotor vorhanden und weniger als 25 Mal im gesamten menschlichen Genom. Die restlichen 30 Muster wurden auch in Promotoren anderer Gene gefunden, darunter befinden sich vor allem auch Gene, die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Lungenreife spielen (SHH, GABRA1, GABRA3) im Lipidstoffwechsel (LPL, CROT) und in der Immunabwehr (CD69, IL1RAP, BECN1). Keines der Muster wurde in einem anderen Surfactant Protein gefunden.

4.3 Peptidantikörper

Nach der Immunisierung zweier Kaninchen mit je 3 KLH-gekoppelten Peptiden (siehe Abb. 4.3-1) und Gewinnung des Serums erfolgte eine Testung mittels ELISA. Dabei zeigte eines der beiden Kaninchen eine deutliche Antwort auf alle drei Peptide. Dieses Serum wurde affinitäts-gereinigt und für alle weiteren Versuche verwendet.

Signal

ausgewählte Peptide

MGSGLPVLLLLTLLGSSHGTPGMDLQLKLEKESFLTNSSEYESSFLELLEKLCLLLHLPSGTSVTLHHARSQHHVVCNT

Abb. 4.3-1 Generierung des Peptidantikörpers gegen menschliches SFTA2

Rote Markierungen: 3 KLH gekoppelte Peptide

Grüne Markierung: Signal

Mit Hilfe des Peptidantikörpers konnte das rekombinante MBP-SFTA2 Fusionsprotein im Westernblot detektiert werden (siehe Kapitel 4.6.1, Abb. 4.6.1-1). Außerdem konnte die Transfektion von SFTA2 in A549 Zellen nachgewiesen werden. (siehe Kapitel 4.7, Abb. 4.7-1). Jedoch konnte mit Hilfe des Peptidantikörpers nicht das natürliche Protein in der Lunge und in A549 Zellen mittels Westernblot nachgewiesen werden. Hierfür scheint die Affinität des Peptidantikörpers zu gering zu sein.

4.4 SFTA2 Protein Analyse

Bei SFTA2 handelt es sich um ein kleines Protein das auf Chromosom 6p21.33 lokalisiert ist (siehe Abb. 4.4-1). Nach der Translation besteht es aus 78 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ungefähr 6,55 kDa (siehe Abb. 4.4-2). Durch Abspaltung eines 19 Aminosäuren langen N-terminalen Signalpeptid entsteht das fertige 59 Aminosäuren umfassende Protein mit einem Molekulargewicht von 6.55 kDa. Im Gegensatz zu den bereits bekannten Proteinen SP-B und SP-C handelt es sich bei SFTA2 nicht um ein hydrophobes Protein.

```
GGGGTGTAGAAACAGGCCTGTTAAGGAGAGGCCACCGGGACTTCAGTGTCT
CCTCCATCCCAGGAGCGCAGTGGCCACTATGGGGTCTGGGCTGCCCTTGTCCCTCCTTGACCCTCCTTGGCAGCTCAC
M G S G L P L V L L L T L L G S S
ATGGAACAGGTGAGGGCTAGAGGGCAGGACTCCTGGGTCCCTGTGGCAAGAAGAGGCCAGAGAAAAGGGTGGGACTTCA
H G T
TGGTCCCTGAGAGTGACAGAGACACCCAGTCCCTGAGCTTCCAAGAGGCTCTGGAGGGGCATTGCTGGGGAAGAGGAACT
GTGCCGGGAGCGTGAGCAGGAAGGTTCTGTGTCTCCGGAGGAATCAGCCCTGACTGCTGGGTCTAAGCTGTACTTCTG
GATCCGCAGGGCCGGGTATGACTTTGCAACTGAAGCTGAAGGAGTCTTTTCTGACAAATCCTCCTATGAGTCCAGCTTC
G P G M T L Q L K L K E S F L T N S S Y E S S F
CTGGAATTCCTGAAAAGGTACTTCTTTGGAAGGGGAAAGATGGGGCTGTGTGT'TGTGAGTCACTTTGGGCCTCTGCTG
L E L L E K
GGGTCTGGATGTCTCCGTGGTGGGAATGGAGAGCTCTCTTACATGGCGCCCTTTAACCCTTTGT'TCCAGCTCTGCCTCC
L C L
TCCTCCATCTCCCTTCAGGGACCAGCGTCACCCCTCCACCATGCAAGATCTCAACACCATGTTGTCTGCAACACATGACAG
L L H L P S G T S V T L H H A R S Q H H V V C N T
CCATTGAAGCCTGTGTCTTCTTGGCCCGGGCTTTTGGGCCGGGGATGCAGGAGGCAGGCCCCGACCCTGTCTTTCAGCA
GGCCCCACCCCTCTGAGCGGCAATAAAATAAAATTCGGTATGCTGAATTC AATAA
```

Abb. 4.4-1 Lokalisation auf Chr.6p21.33

Bestehend aus 3 Exons und nur kleinen Introns (NCBI 2012)

**MGSGLPVLLLLTLLGSSHGTPGGMTLQCLKKESFLTNS
YESSFLELLEKLCLLLHLPSGTSVTLHHARSQHVVVCNT**

Abb. 4.4-2 SFTA2, ein kleines 78 Aminosäuren umfassendes Protein

In allen Säugetieren sowie auch dem Beuteltier wurden korrespondierende Sequenzen mit einem hohen Grad an Konservierung gefunden. (siehe Abb 4.4-3) Die Synthese erleichterte das Auffinden von Genen durch Vergleich zwischen den Spezies und somit konnte die chromosomale Lokalisation der orthologen Gene bestätigt werden. Bei der Suche nach Proteinen mit ähnlichen Sequenzen in mehreren Datenbanken wurden keine ähnlichen Proteine gefunden.

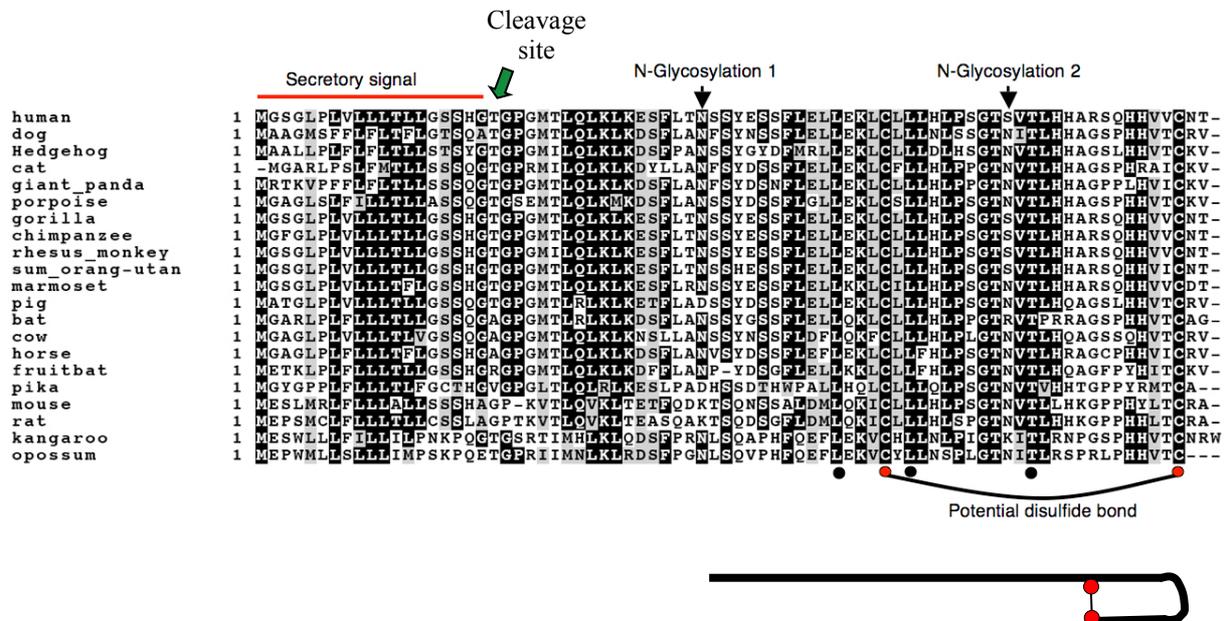


Abb. 4.4-3 Alignment der SFTA2 Aminosäuresequenz von 21 verschiedenen Säugetierarten. Sekretions- und Glykosylierungssignal werden in allen Arten gefunden. Schattierte Aminosäuren weisen einen Konservierungsgrad von mehr als 70% auf. Schwarze Schattierung: identisch, graue Schattierung: konserviert. All die Arten die kein Glykosylierungssignal an Position 37 aufweisen, haben ein Signal an Position 61. Dazu zählen Schwein, Pfeifenhase, Maus und Ratte. Mit den schwarzen und roten Punkten sind Aminosäuren markiert, die in allen Arten gleich sind. Die zwei roten Punkte markieren dabei Cysteine. Diese bilden eine mögliche Disulfidbrücke (BLAST).

Wie bereits beschrieben wurde ein N-terminales Signalpeptid mit einer Länge von 19 Aminosäuren gefunden, das ein Sekretionssignal darstellt. Zusätzlich wurden noch zwei interessante Regionen gefunden die einen hohen Grad an Konservierung aufweisen (siehe Abb. 4.6-3 AA 25-33 und AA 44-66). Zwischen AA44 und AA55 konnte außerdem eine helikale Struktur vorhergesagt werden.

Außerdem wurden zwei Glykosylierungsstellen gefunden. In der menschlichen Sequenz finden sich diese Stellen an Position 37 der Aminosäuresequenz, fehlt jedoch in einigen Säugetierarten wie Ratte, Maus und Pfeifhasen. Es zeigte sich jedoch auch eine zweite Glykosylierungsstelle, die bei diesen Arten an Position 62 der Aminosäuresequenz zu finden ist (siehe Abb. 4.4-3).

Bei der Betrachtung des Alignments der Aminosäuresequenz von 21 verschiedenen Arten zeigte sich, dass nur 5 Aminosäurestellen über alle Arten hinweg konserviert sind. Darunter befinden sich auch die zwei einzigen Cysteine. Daraus und aus der Vorhersage der DiANNA Software lässt sich schlussfolgern, dass sich zwischen den Stellen C51 und C76 eine Disulfidbrücke ausbilden könnte.

4.4.1 Größe von SFTA2

Um eine bessere Löslichkeit des rekombinanten Proteins zu erreichen wurde das Maltose-binding Protein, MBP, genutzt. MBP dient als affinity tag für die Aufreinigung. Es weist eine Größe von 42,5kDa auf, die vorhergesagte Größe von SFTA2 liegt bei 6,55kDa. Das rekombinant hergestellte Fusionsprotein MBP-SFTA2 aus einem Bakterienlysat wurde im Westernblot mittels des Peptidantikörpers gegen menschliches SFTA2 detektiert. Es zeigte sich eine deutliche Bande bei ca. 48,5 kDa. Somit konnte gezeigt werden, dass es sich hiermit um MBP-SFTA2 handelt.

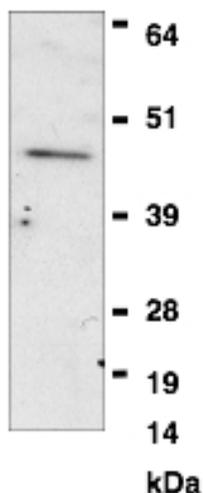


Abb. 4.4.1-1 Detektion des MBP-SFTA2-Fusionsproteins im Bakterienlysat mittels Peptidantikörper
Eine deutliche Bande bei ca. 48,5 kDa konnte mittels Westernblot dargestellt werden.

MLE 12 Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion mit pCDNA3-SFTA2-HA zur Analyse im Westernblot verwendet. Dabei konnten mit einem HA-spezifischen Antikörper zwei SFTA2-HA spezifische Banden nachwiesen werden. Eine Band bei 6,5 kDa, dabei handelt es

sich um die erwartete Größe des Proteins und eine weitere bei 13 kDa. Zur Kontrolle wurde gleichzeitig eine Negativkontrolle durchgeführt, die wie erwartet kein Signal zeigte.

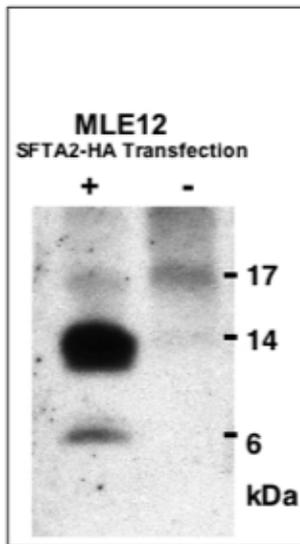


Abb. 4.4.1-2 MLE12 SFTA2-HA Transfektion

In der linken Seite der Abbildung wurde Zellysate aus MLE12 SFTA2-HA transfizierten Zellen aufgetragen. Hier wurden zwei spezifischen Banden mittels HA-Antikörper detektiert. Die schwächere Band bei 6,5 kDa und die deutlich stärkere Bande bei 13 kDa. Auf der rechten Seite der Abbildung ist die negativ Kontrolle zu sehen. Hier konnte keine Bande mittels HA-Antikörper detektiert werden.

4.4.2 N-Glykosylierung und Endo H

Nachdem im Vorversuch mit SFTA2-HA transfizierten Zellen zwei verschieden große Banden nachweisen werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei SFTA2 um ein posttranslational modifiziertes Protein handelt und es sich bei der größeren der beiden Banden um das glykosylierte Protein handelt. Daher wurde SFTA2 mittels Endo H im Westernblot auf Glykosylierung getestet. Es wurden erneut SFTA2-HA transfizierte MLE12 Zellen verwendet. Wie in Abb 4.4.2-1 zu sehen ist, wurden die Zellen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten getestet, nach 24 und nach 48 Stunden jeweils einmal mit und einmal ohne Endo H. Dabei zeigte sich, dass nach 24 Stunden nur ein Teil des Proteins in glykosylierter Form vorlag, da noch eine weitere Band zu sehen waren. Nach 48 Stunden konnte nur mehr die größere Bande nachgewiesen werden und somit das glykosylierte Protein. Durch die Verwendung von Endo H konnte nun gezeigt werden, dass die größere Band bei 13kDa komplett verschwand und nur noch die 6,5 kDa Band zu detektieren war. Durch die Verwendung von EndoH kam es zur Deglykosylierung des Proteins und Verschiebung der kompletten 13 kDa Band zu 6,5 kDa. Hiermit konnte gezeigt werden, dass es sich bei der 13 kDa Band um die N-glykosylierte Form von SFTA2 handelt und bei der kleineren Band um das deglykosylierte Protein mit dem erwarteten Molekulargewicht von 6,5 kDa.

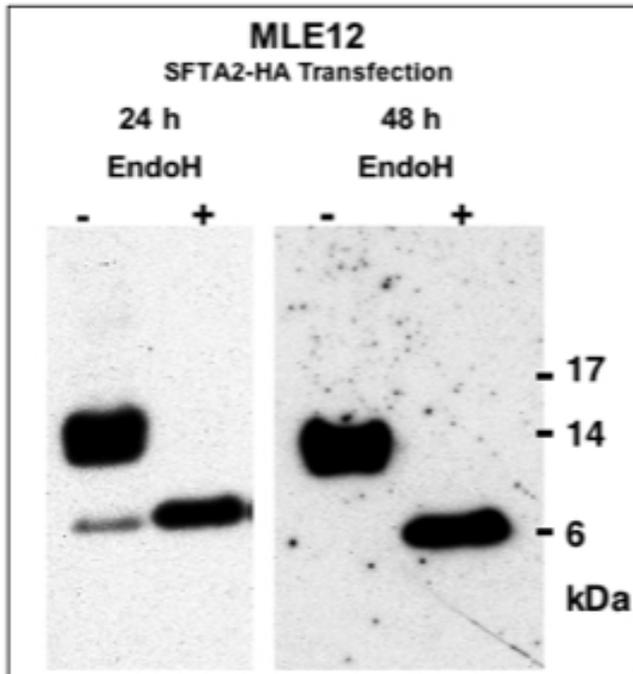


Abb. 4.4.2-1 Westernblot mit EndoH

MLE12 Zellen wurde 24 Stunden (linke Seite) und 48 Stunden (rechte Seite) nach Transfektion mit SFTA2-HA verwendet. Nach 24 Stunden zeigten sich zwei Banden, eine bei 6 kDa und eine weitere bei 13 kDa. Nach 48 Stunden war die 6 kDa Bande nicht mehr nachweisbar. Durch Verwendung von EndoH zur Deglykosylierung wurde die 13 kDa Bande komplett zu 6 kDa verschoben. Damit konnte gezeigt werden, dass die 13 kDa Band die N-glykosylierte Form des Proteins darstellt.

4.5 Lokalisation von SFTA2

4.5.1 Lokalisation in intrazellulären Vesikeln

Für die Immunofluoreszenz wurden A549 Zellen mit SFTA2-HA transfiziert. Zur Detektion von SFTA2-HA wurde sowohl der Peptidantikörper als auch ein Antikörper mit einem HA-Epitop verwendet. Unter dem Immunofluoreszenzmikroskop zeigte sich dann eine deutliche Kolokalisation des Peptidantikörpers mit dem HA-Epitop Antikörper. Damit konnte gezeigt werden, dass der Peptidantikörper menschliches SFTA2, das durch Transfektion in die Zellen eingebracht wurde, erkennt (siehe Abb 4.5.1-1).

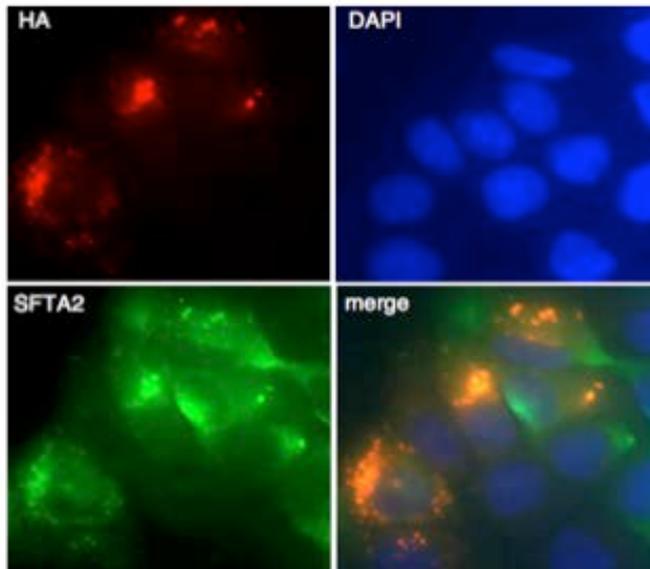


Abb 4.5.1-1 Immunofluoreszenzmikroskopie in mit pCDNA-SFTA2-HA transfizierten A549 Zellen mit Peptidantikörper und HA-Antikörper

Kolokalisation von HA und SFTA2 Signal. Der SFTA2-Peptidantikörper erkennt durch Transfektion in die Zelle gebrachtes menschliches SFTA2. Das punktierte zytoplasmatische Muster spricht für eine Lokalisation in Sekretionsvesikeln. Das Hintergrundsignal stammt vermutlich von nicht transfizierten A549 Zellen mit einer natürlichen SFTA2 Expression.

Für weitere Untersuchungen der genauen Lokalisation von SFTA2 in der Zelle wurden weitere Antikörper in der Immunofluoreszenzmikroskopie verwendet. LAMP1, der als Marker für Lamellarkörperchen und Lysosomen-ähnliche Organellen dient, wurde in SFTA2-HA transfizierten A549 Zellen verwendet. Dabei zeigte sich keine Kolokalisation von LAMP1 und SFTA2 (siehe Abb 4.5.1-2).

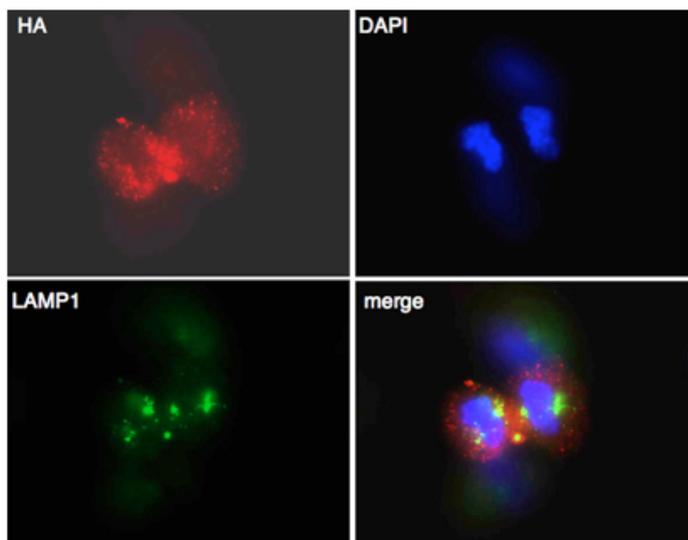


Abb 4.5.1-2 Immunofluoreszenzmikroskopie in mit pCDNA-SFTA2-HA transfizierten A549 Zellen mit LAMP1 und HA- Antikörper

SFTA2-HA Signal kolokalisiert nicht mit LAMP1, einem Marker für Lamellarkörperchen und Lysosomenähnlichen Organellen. Daher befindet sich SFTA2 nicht in Lysosomen oder Lysosomen-ähnlichen Organellen wie Lamellarkörperchen.

MLE12 Zellen wurden auch mit ABCA3 transfiziert. Das Plasmid Konstrukt codiert für die äußere Membran von Lamellarkörperchen und zeigt normalerweise eine ringförmige Struktur. In der Immunfluoreszenzmikroskopie mit SFTA2-HA und ABCA3 transfizierten Zellen zeigte sich jedoch für SFTA2 ein deutlich anderes Muster als das bislang bekannte (siehe Abb. 4.5.1-3). Die MLE12 Zellen zeigten sowie auch schon die A549 Zellen ein deutlich punktiertes zytoplasmatisches Muster.

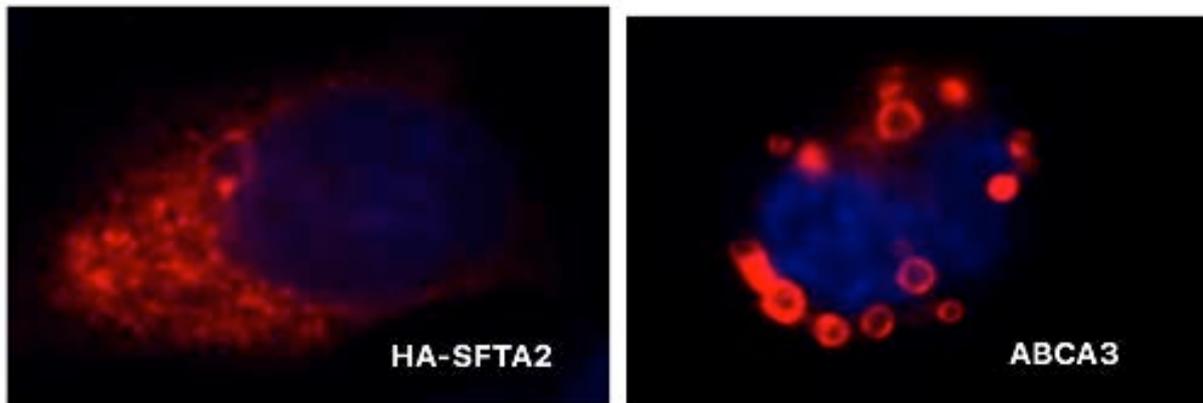


Abb 4.5.1-3 Immunfluoreszenzmikroskopie in mit pCDNA-SFTA2-HA transfizierten MLE12 Zellen mit SFTA2-HA Peptidantikörper und ABCA3 Peptidantikörper
ABCA3 kodiert für einen Phospholipidtransporter in der äußeren Membran von Lamellarkörperchen als ringförmige Struktur. SFTA2- zeigt jedoch ein abweichendes punktiertes zytoplasmatisches Muster.

4.5.2 Kolokalisation mit Golgi Apparat

Um zu zeigen, dass es sich bei SFTA2 um ein sezerniertes Protein handelt, das den klassischen Sekretionsweg durchläuft, wurden A549 Zellen mit SFTA2-HA transfiziert und eine partielle Kolokalisation mit einem Marker für den Golgi Apparat, golgin-97, konnte, wie in Abb 4.5.2-1 zu sehen ist, gezeigt werden. Als weiterer Marker für den klassischen Sekretionsweg diente ein anti-clathrin Antikörper. Dieser markiert sekretorische Vesikel. Auch hier zeigte sich, wie in Abb 4.5.2-2 zu sehen eine partielle Kolokalisation.

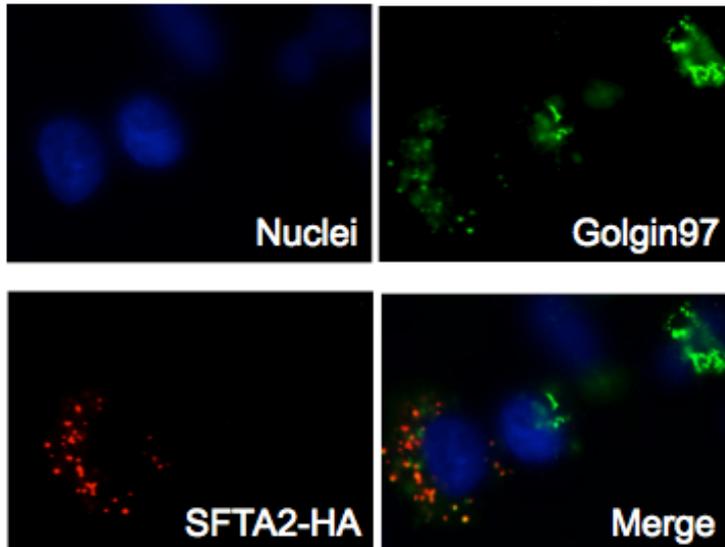


Abb. 4.5.2-1 Immunofluoreszenzmikroskopie mit SFTA2-HA transfizierten A549 Zellen und Färbung mit golgin97 und SFTA2-HA Antikörper

Teilweise Kolokalisation mit golgin97 gibt einen Hinweis darauf, dass SFTA2 den klassischen Sekretionsweg durch den Golgiapparat durchläuft.

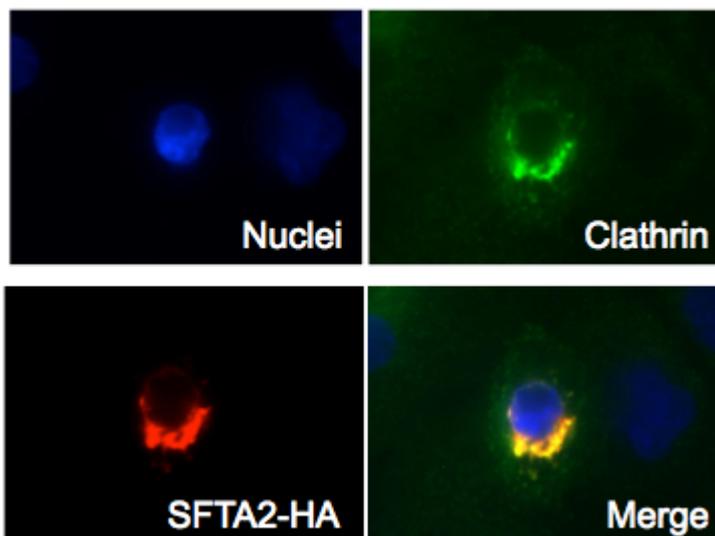


Abb. 4.5.2-2 Immunofluoreszenzmikroskopie mit SFTA2-HA transfizierten A549 Zellen und Färbung mit clathrin und SFTA2-HA Antikörper

Teilweise Kolokalisation mit clathrin zeigt, dass SFTA2 in sekretorischen Vesikeln vorhanden ist und somit den klassischen Sekretionsweg durchläuft.

4.6 Sekretion von SFTA2

Hierzu wurden SFTA2-HA transfizierten A549 und MLE12 Zellen verwendet. Der Überstand wurde nach 12, 24, 48, 72 und 96 Stunden aufgefangen und aufkonzentriert. Danach erfolgte der Nachweisversuch mittels Westernblot mit HA-Antikörpern. SFTA2 konnte in keinem der Überstände nachgewiesen werden.

4.7 Proteinexpression

Für den Expressionstest des GST-SFTA2 Fusionsprotein wurden verschiedene Konzentrationen an IPTG zur Induktion und verschiedene Puffer bei der Durchführung dieses Versuchs verwendet.

Bei der Durchführung des ersten Expressionstest von SFTA2-GST wurde das Protein zwischen der 28 kDa und der 39 kDa Bande detektiert, jedoch nur unlöslich im Pellet. Erwartete Zielgröße 32-33 kDa, da 26 kDa GST und 6 kDa SFTA2.

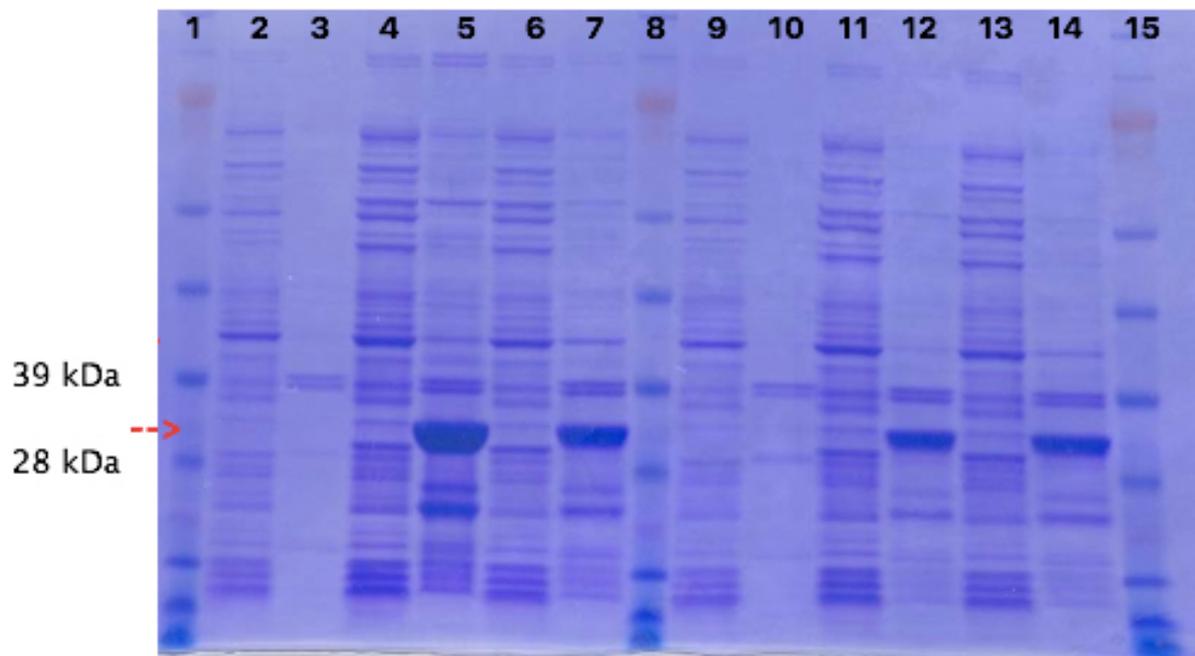


Abb. 4.7-1 Proteinexpression GST-SFTA2

Beschriftung des Bildes von links nach rechts

- 1.) Marker
- 2.) Preinduktion löslich (IPTG Konzentration von 0,5 mM)
- 3.) Preinduktion pellet (IPTG Konzentration von 0,5 mM)
- 4.) 2h Induktion löslich (IPTG Konzentration von 0,5 mM)
- 5.) 2h Induktion pellet (IPTG Konzentration von 0,5 mM)
- 6.) 4h Induktion löslich (IPTG Konzentration von 0,5 mM)
- 7.) 4h Induktion pellet (IPTG Konzentration von 0,5 mM)
- 8.) Marker
- 9.) Preinduktion löslich (IPTG Konzentration von 1 mM)
- 10.) Preinduktion pellet (IPTG Konzentration von 1 mM)
- 11.) 2h Induktion löslich (IPTG Konzentration von 1 mM)
- 12.) 2h Induktion pellet (IPTG Konzentration von 1 mM)
- 13.) 4h Induktion löslich (IPTG Konzentration von 1 mM)
- 14.) 4h Induktion pellet (IPTG Konzentration von 1 mM)
- 15.) Marker

SFTA2-GST zeigt sich nach Induktion unlöslich im Pellet zwischen den beiden Banden 28 kDa und der 39 kDa (siehe Pfeil →)

Es wurden weitere Versuche mit verschiedenen Pufferlösungen durchgeführt. Mit Hilfe von Sarkosyl als Zusatz zum Puffer konnte GST-SFTA2 in Lösung gebracht und detektiert werden.

Zusätzlich wurde in weiteren Versuchen noch Triton X-100 zu dem löslichen Überstand hinzugefügt. Auch dadurch konnte das Protein in Lösung gebracht werden.

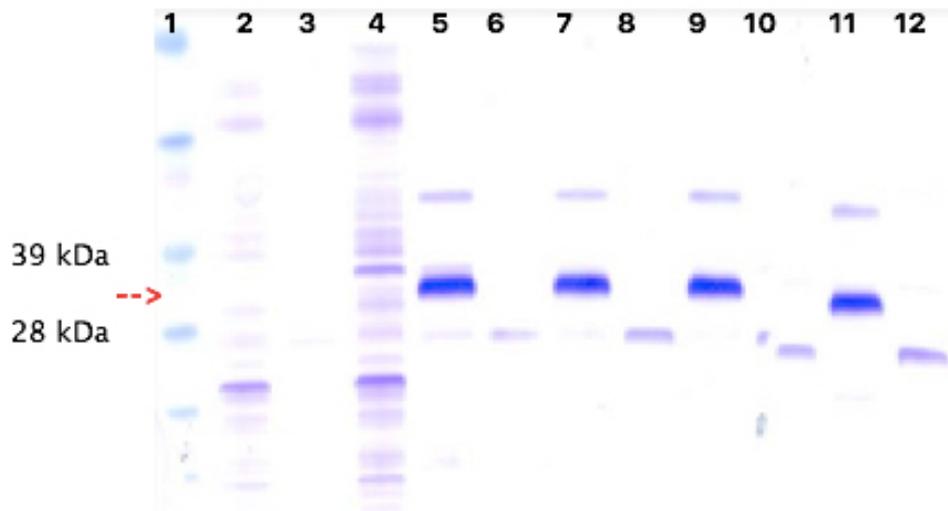


Abb. 4.7-2 Proteinexpression GST-SFTA2 mit Hilfe von Sarkosyl

Beschriftung des Bildes von links nach rechts

- 1.) Marker
 - 2.) Preinduktion löslich (IPTG Konzentration von 0,5 mM)
 - 3.) Preinduktion pellet (IPTG Konzentration von 0,5 mM)
 - 4.) 4h Induktion löslich in normalem Puffer (ohne Zusatz von Detergenzien) (IPTG Konzentration von 0,5 mM)
 - 5.) 4h Induktion 4%Sarkosyl löslich (IPTG Konzentration von 0,5 mM)
 - 6.) 4h Induktion 4%Sarkosyl Pellet (IPTG Konzentration von 0,5 mM)
 - 7.) 4h Induktion 2%Sarkosyl löslich (IPTG Konzentration von 0,5 mM)
 - 8.) 4h Induktion 2%Sarkosyl Pellet (IPTG Konzentration von 0,5 mM)
 - 9.) 4h Induktion 1%Sarkosyl löslich (IPTG Konzentration von 0,5 mM)
 - 10.) 4h Induktion 1%Sarkosyl Pellet (IPTG Konzentration von 0,5 mM)
 - 11.) 4h Induktion 0,5%Sarkosyl löslich (IPTG Konzentration von 0,5 mM)
 - 12.) 4h Induktion 0,5%Sarkosyl Pellet (IPTG Konzentration von 0,5 mM)
- Nach Lösung mit Sarkosyl und nach Induktion zeigt sich SFTA2-GST löslich Pellet zwischen den beiden Banden 28 kDa und der 39 kDa (siehe Pfeil →)

Nachdem das Fusionsprotein GST-SFTA2 in Lösung gebracht werden konnte, wurde es mit Hilfe von GStap FF (GE Healthcare, Freiburg) aufgereinigt. Mit Hilfe der GStap FF Säulen können GST-Fusionsproteine schnell und einfach aufgereinigt werden. Es handelt sich dabei um Glutathion-Sepharose-Säulen mit denen man GST-Fusionsproteine direkt aus Bakterienlysaten aufreinigen kann. Durch die schonende Aufreinigung geht die Funktion und Antigenität des Proteins nicht verloren (GEHealthcare 2014).

Das somit gewonnene Protein wurde im Anschluss konzentriert und im Bradford getestet. Dabei zeigte sich eine Konzentration von 1mg/ml. Es wurden Aliquots von je 100 µl bei -20°C für weitere Versuche eingefroren und zur Immunisierung von Kanninchen verschickt.

4.8 Immunfluoreszenz Mikroskopie an menschlichen Lungengeweben

In menschlichen Lungengeweben konnte mittels des Peptidantikörpers SFTA2 im Zytoplasma von Alveolarepithelzellen und von Bronchialzellen nachgewiesen werden.

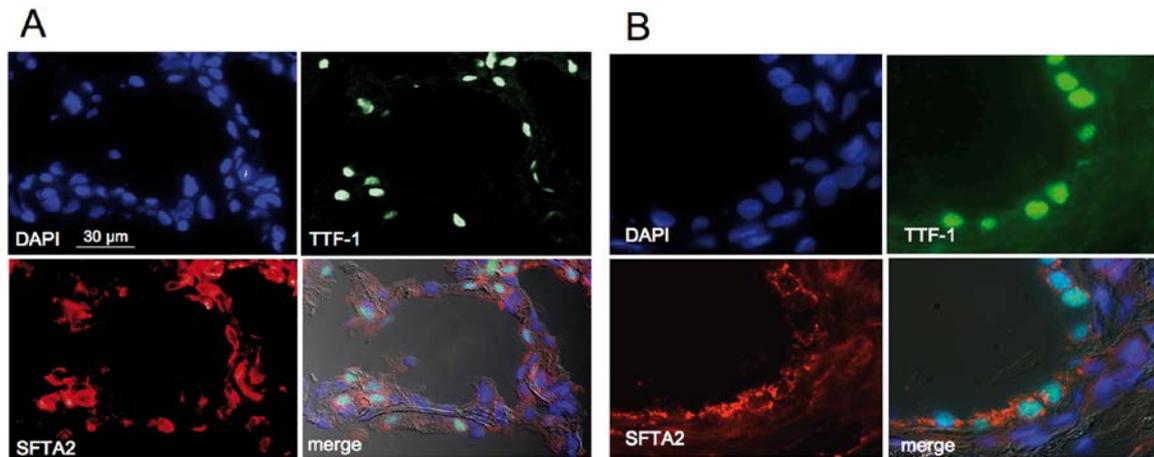


Abb. 4.8-1 Immunfluoreszenzmikroskopie an menschlichen Lungengeweben mittels SFTA2 Peptidantikörper

DAPI färbt die Zellkerne, TTF-1 färbt Typ II Pneumozyten und nicht-cilientragende Bronchialepithelzellen
A Der SFTA2 Peptidantikörper zeigt ein cytoplasmatisches Muster in Alveolarepithelzellen, sowie auch TTF1.
B Der SFTA2 Peptidantikörper zeigt eine Co-Lokalisation mit TTF-1 und nicht-zilientragend Brochialepithel.

4.8.1 Peptidantikörper Blockierung

Blockierung des Peptidantikörpers mit den drei Peptiden welche zur Antikörper Generierung verwendet wurden. Ohne Blockierung mittels Peptide zeigt sich ein cytoplasmatisches Signal mittels SFTA2 Peptidantikörper (siehe auch Abb. 4.8.1). Werden die Peptide, welche zur Generierung des Peptidantikörpers eingesetzt wurden verwendet, wird das spezifische Signal vollkommen geblockt.

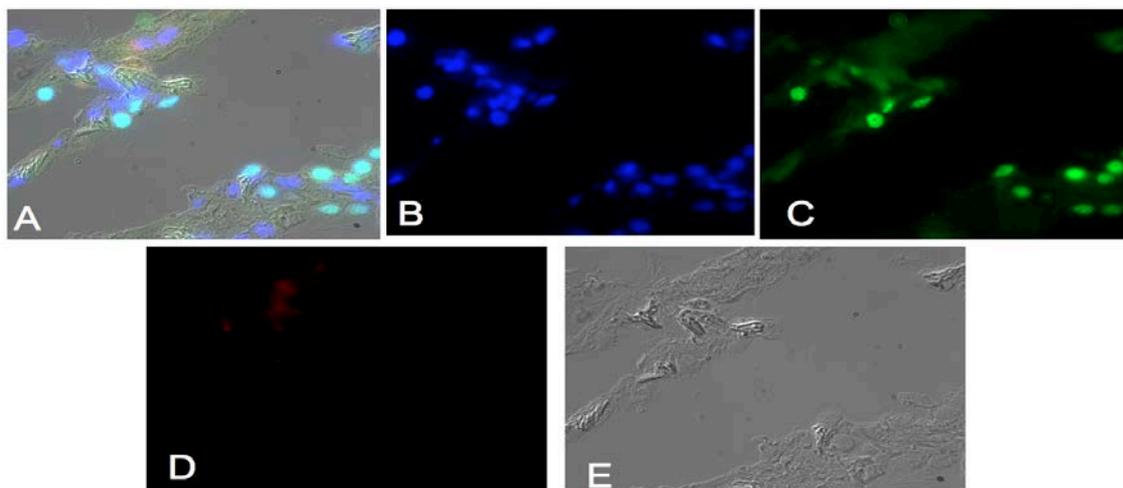


Abb. 4.8.1-1 Peptidantikörper Blockierung

A Merge aller Bilder, B DAPI Färbung, C TTF-1 Färbung der Typ II Pneumozyten und des nicht-cilientragenden Bronchialepithels, D Kein Signal des SFTA2 Peptidantikörpers in Anwesenheit alle 3 Peptide zum Blockieren, E Lungenmorphologie mittels Interferenzmikroskopie

4.9 LPS und Hyperoxieversuche

Um mögliche Funktionen von SFTA2 zu identifizieren wurde an C57BL/6 Mäusen eine Studie mit LPS und Hyperoxie durchgeführt. Durch intratracheale Gabe von LPS kam es zur deutlichen Herunterregulation von SFTA2 zusammen mit anderen Proteinen die von Typ II Pneumozyten exprimiert werden. Darunter waren auch SP-B und SP-C, jedoch nicht SP-D.

Im Gegensatz dazu zeigt der Hyperoxie Versuch trotz deutlicher Schädigung der Lunge in der Lavage (ohne Abbildung) keine Veränderung sowohl von SFTA2 als auch von SP-B, SP-C und SP-D.

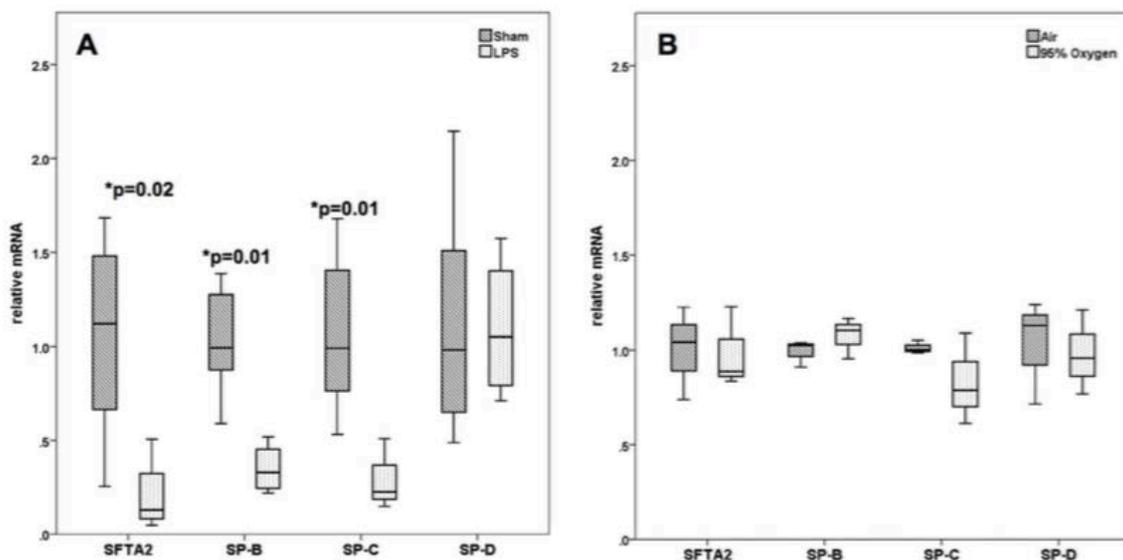


Abb. 4.9-1. Analyse von spezifischen mRNA Levels in Mäuselungen als Reaktion auf Schädigung nach LPS Gabe oder Hyperoxie-Exposition

Mittelwert wurde für alle Tiere bei 1.0 festgelegt

A. SFTA2 qRT-PCR von Gewebe der Mäuselunge 18 Stunden nach intratrachealer LPS Gabe oder nach Placebo Gabe im Vergleich mit anderen Typ II Pneumozyten Proteinen SP-B, SP-C, SP-D und Signifikante Herunterregulation von SFTA2 sowie SP-B und SP-C in der LPS exponierten Mäusegruppe. Keine Änderung durch LPS Exposition bei SP-D

B. SFTA2 qRT-PCR von Gewebe der Mäuselunge nach Hyperoxie Exposition (95% Sauerstoff) oder bei Raumluft mit anderen Typ II Pneumozyten Proteinen SP-B, SP-C, SP-D. Es zeigt sich sowohl bei SFTA2 als auch bei den anderen Proteinen keine Veränderung trotz signifikanter Inflammation. (nicht gezeigt)

5 Diskussion

5.1 Eigenschaften von SFTA2 im Vergleich zu bekannte Surfactant Proteinen

SFTA2 wurde als neues vorwiegend lungenspezifisches Protein identifiziert. Neben der vorwiegenden Expression in der Lunge wird es noch in anderen Geweben, unter anderem Zervix, Ösophagus, Magen und Hoden exprimiert. Interessant daran ist, dass SFTA2, wie auch SP-A (Garcia-Verdugo, Tanfin et al. 2010) und SP-D (Leth-Larsen, Floridon et al. 2004) im weiblichen Genitaltrakt exprimiert wird. Die Identifizierung eines spezifischen Rezeptors für SFTA2 in bestimmten Lungenzellen und im weiblichen Genitaltrakt könnte daher bedeutend zum besseren Verständnis beitragen.

Des weiteren weist SFTA2 Ähnlichkeiten, wie zum Beispiel posttranslationale Modifizierung, welche mit Hilfe von Endo H Versuchen bestätigt werden konnte, mit den beiden Proteinen SP-B und SP-C auf (Whitsett, Hull et al. 1986, Yu, Chung et al. 1987). Es hat jedoch keine strukturellen Ähnlichkeiten oder Ähnlichkeiten in der genomischen Sequenz. Somit stellt SFTA2 eine neue bislang nicht beschriebene Klasse an Surfactant Proteinen dar.

Erstmalig beschrieben wurde das Protein SFTA2 2004 von Zhang et al. (Zhang and Henzel 2004). Wir konnten SFTA2 als kleines Protein identifizieren, das nach der Translation aus 78 Aminosäuren besteht. Durch Abspaltung eines 19 Aminosäuren langen Signalpeptids entsteht das reife 59 Aminosäuren umfassende Protein mit einem Molekulargewicht von 6.55 kDa. Das Signalpeptid ist essentiell für die Proteinsekretion (Nakai, Harabayashi et al. 1989).

SFTA2 ist ein sogenanntes single copy gene. Damit werden Gene bezeichnet die nur mit einer einzigen Kopie im Genom vorkommen. SFTA2 liegt auf Chromosom 6 p21.33 zwischen HLA-A und HLA-B.

Ausserdem liegt SFTA2 auf dem Genom nahe an DPCR1, MUC21 und PBMUCL1. Diese Regionen steht in Verbindung mit der diffusen Panbronchiolitis (DPB) bei Patienten aus Japan (Keicho, Ohashi et al. 2000). Bei der diffusen Panbronchiolitis handelt es sich um eine seltene Erkrankung die durch die Symptome Sinusitis und Bronchitis gekennzeichnet ist (Poletti, Chilosi et al. 2004, Poletti, Casoni et al. 2006). Der genaue Pathomechanismus ist bis heute jedoch nicht vollständig bekannt. Es ist aber davon auszugehen, dass sowohl die Genetik als auch Umweltfaktoren eine wichtige Rolle spielen. Vor allem in mehreren Familien in Japan tritt diese Krankheit auf und es konnte eine Assoziation zu bestimmten HLA Typen nachgewiesen werden (Sugiyama, Kudoh et al. 1990).

DPCR1 steht in Assoziation mit DPB, bislang konnte dieser Verdacht aber noch nicht bestätigt werden. Bei MUC21 handelt es sich um ein Gen das für ein bestimmtes Mucin codiert, das vor allem in der Lunge exprimiert wird. PBMUCL1 Polymorphismen konnten bei an DPB erkrankten Patienten nachgewiesen werden (Hijikata, Matsushita et al. 2011).

Welche Rolle SFTA2 im Zusammenhang mit der DFB übernimmt ist jedoch bislang unklar.

Ferner scheint SFTA2 auch für die Lungenentwicklung eine Rolle zu spielen. In einer neuen Arbeit konnte in zwei verschiedenen Mäusestämmen mit unterschiedlichen Lungenvolumina und Lungenfunktionen SFTA2 als eines von acht Kandidatengenen für diesen Unterschied identifiziert werden. SFTA2 konnte sowohl in der embryonalen als auch in der postnatalen Phase der Lungenentwicklung als mitbeteiligtes Protein identifiziert werden (George, Mitra et al. 2017).

Bei der Charakterisierung von SFAT2 wurden alle verfügbaren Genome von Säugetieren untersucht und dabei festgestellt, dass SFTA2 weder Homologien innerhalb einer Spezies aufweist noch Ähnlichkeit mit Strukturen anderer Proteine zeigt. Diese Daten wurden auch durch die Arbeitsgruppe von F. Rausch bestätigt (Rausch, Schicht et al. 2012). Damit bildet SFTA2 eine neue Klasse von Surfactant Proteinen.

SFTA2 ist ein posttranslational modifiziertes Protein, wie auch SP-B und SP-C (Whitsett, Hull et al. 1986, Yu, Chung et al. 1987). Es ist bereits bekannt, dass SP-B und SP-C mit Hilfe dieser posttranslationalen Modifikation ihre Oberflächenaktivität entfalten (Gustafsson, Palmblad et al. 2000). Diese Arbeit als auch die Arbeit von Rausch et al. demonstriert, dass SFTA2 ein glykosliertes hydrophobes Protein ist. Die Glykosilierung am N-terminalen Ende ist möglicherweise zur Stabilisierung des Proteins notwendig. Außerdem wurde festgestellt, dass SFTA2 höchstwahrscheinlich eine Disulfidbrücke aufweist. In der Arbeit von Rausch et al. (Rausch, Schicht et al. 2012) wird dies zwar in einem Model skeptisch gesehen, dennoch weißt SFTA2 2 Cysteine auf, die über alle Arten konserviert sind. Des weiteren prediktiert die DiANNA Software eine mögliche Disulfidbrücke. Daher besteht durchaus die Möglichkeit zur Ausbildung von Disulfidbrücken. Über die Funktion einer Disulfidbrücke in SFTA2 kann nur spekuliert werden. Für SP-B und SP-C ist bereits bekannt, dass Disulfidbrücken die Oligomerization des Proteins ermöglichen und sich somit das Molekulargewicht des Proteins und dessen Funktionen ändern könnte (Whitsett, Hull et al. 1986, Glasser, Korfhagen et al. 1988, Voorhout, Veenendaal et al. 1992, Beck, Ikegami et al. 2000).

Wie schon beschrieben enthält SFTA2 ein Sekretionssignal und zeigt partielle Kolokalisation mit golgin97, welches für den Golgiapparat codiert und clathrin, welches für sekretorische

Vesikel codiert. Dies deutet stark daraufhin, dass SFTA2 den klassischen Sekretionsweg durchläuft und somit ein sekretorisches Protein ist. Jedoch konnte im Rahmen dieser Arbeit kein Nachweis von SFTA2 in Extrazellularraum erbracht werden. Vermutlich wird ein spezieller Sekretionsreiz benötigt

Bei der *in silicio* Promotoranalyse wurden mehrere konservierte Bindungsstellen innerhalb des SFTA2 Promotors gefunden. Obwohl es sich bei den gefundenen Bindungsstellen um bekannte Regionen handelt, sind die Kombination und der Abstand dieser Regionen äußerst selten. Zusammen mit der besonderen Aminosäuresequenz von SFTA2 könnte das auf eine besondere Funktion und Regulation von SFTA2 hindeuten.

Die beiden interessanten Kombinationen die durch die Promotor-Analyse gefunden wurden könnten weitere Hinweise auf die Funktion von SFTA2 geben. **V\$ETSF-V\$SP1** ist in sieben Arten konserviert. Über diese Kombination ist bereits bekannt, dass sie für die Regulierung der menschlichen Bruton Agammaglobulinemia Tyrosinkinase zuständig ist. Diese ist entscheidend bei der Entwicklung von B-Zellen (Muller, Maas et al. 1999).

Die zweite Kombination lautet **V\$ETSF-V\$NFKB** ist in fünf Arten konserviert. Diese Kombination ist ein wichtiges Element in der Regulation von IRF8 abhängiger Herabregulation von CCL5 als Teil der angeborenen Immunantwort (Liu and Ma 2006).

Auffällig sind auch ähnliche Expressionsmuster von SFTA2 und TTF-1 in der Lunge. Sehr interessant ist dabei auch eine 80 Basenpaare umfassende hoch konservierte Region 300 Basenpaare des menschlichen SFTA2 vorgelagert. Diese Region umfasst mehrere potenzielle Bindungsstellen für Homöobox Faktoren. Dazu zählt auch NKX-2-1 das für TTF-1 codiert. TTF-1 Bindungsstellen könnten ein Hinweis darauf sein, dass TTF-1 die Expression von SFTA2 vor allem in der Lunge reguliert.

Zwischenzeitlich konnte durch weitere Arbeiten unserer Gruppe (Mittal) mittels RT-PCR gezeigt werden, dass SFTA2 in Typ II Pneumozyten und nicht-zilientragenden Bronchialepithelzellen exprimiert wird. Mit Hilfe der RT-PCR konnte nachgewiesen werden, dass SFTA2 im Vergleich zur restlichen Lunge in Typ II Zellen vierfach so hoch exprimiert wird. Dieses konnte ebenso in Gefrierschnitten der menschlichen Lunge durch Antikörperfärbungen bestätigt werden. Hierbei zeigte sich ebenso ein Vorkommen von SFTA2 in nicht-zilientragenden Bronchialepithelzellen. In lungenspezifischen Tumorzelllinien zeigte sich die höchste Expression von SFTA2 in Calu-3 Zellen, einer Airway Adenocarcinoma Zelllinie, gefolgt von der Expression in A549 Zellen, einer humanen Adenocarcinoma Zelllinie die Gemeinsamkeiten mit Type II Zellen besitzt.

5.2 Möglich Funktionen von SFTA2

Durch Versuche unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass SFTA2 in Typ II Pneumozyten und nicht-zilientragenden Bronchialepithelzellen exprimiert wird.

Proteine, die von diesen zwei Zellarten sezerniert werden, haben verschiedenen Funktionen. SP-B und SP-C, zwei kleine hydrophobe Proteine, sind wesentlich für die physikalischen Eigenschaften von pulmonalem Surfactant und somit für die Funktion und Elastizität der Lunge (Nogee, de Mello et al. 1993, Nogee, Dunbar et al. 2001). Die beiden hydrophilen Proteine SP-A- und SP-D spielen hingegen eine bedeutende Rolle bei der Immunabwehr. Sie begünstigen unter anderem die Phagozytose durch Makrophagen (Arias-Diaz, Garcia-Verdugo et al. 2000, Seaton, Crouch et al. 2010). Außerdem sorgen die beiden Proteine SP-A und SP-D dafür, exzessive Inflammationsprozesse zu limitieren (Arias-Diaz, Garcia-Verdugo et al. 2000, Jain, Atochina-Vasserman et al. 2007, Sato, Whitsett et al. 2010). Zusätzlich kontrolliert SP-A die Produktion von Surfactant. SFTA2 ist ein hydrophobes oder auch amphipathisches Protein und ähnelt daher eher den beiden SP-B und SP-C. Es konnte aber kein Zusammenhang zu einer Funktion des pulmonalen Surfactant hergestellt werden und daher stellt sich die Frage ob es eine Rolle in der Immunabwehr spielt wie SP-A und SP-D.

In der Immunofluoreszenzmikroskopie in transfizierten A549 Zellen mit Peptidantikörper und HA-Antikörper konnte die Transfektion nachgewiesen werden durch eine Kolo-kalisation des Peptidantikörpers mit dem HA-Epitop Antikörper. Es ergab sich dabei ein punktiertes zytoplasmatisches Muster, dieses legt die Vermutung nahe, dass SFTA2 in Sekretionsvesikeln lokalisiert ist. Zusätzlich konnte man in den nicht transfizierten Zellen ein Hintergrundsignal erkennen, welches für die natürliche Expression von SFTA2 spricht. Auch in einem weiteren Versuch, bei der Transfektion von MLE12 Zellen mit ABCA3, ein Marker für Lamellarkörperchen, zeigte sich ein punktiertes zytoplasmatisches Muster und keine ringförmige Struktur wie es für Lamellarkörperchen typisch wäre.

Wie bereits weiter oben beschrieben konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass SFTA nicht nur von Typ II Pneumozyten sezerniert wird. Außerdem konnte SFTA2 nicht in lysosomalen Organellen nachgewiesen werden. Daher scheint es unwahrscheinlich, dass SFTA2, sowie SP-B und SP-C, wesentlich für die physikalischen Eigenschaften von pulmonalem Surfactant verantwortlich ist.

Einen wichtigen Hinweis auf die Funktion von SFTA2 gibt die Studie mit LPS und Hyperoxie. Dort konnte gezeigt werden, dass die Expression von SFTA2, zusammen mit anderen Proteinen

die von Typ II Pneumozyten exprimiert werden, wie SP-B und SP-C, nicht aber SP-D als Reaktion auf eine Inflammation der Lunge durch LPS vermindert wird. Dies weist darauf hin, dass die Herunterregulation von SFTA2 nicht ausschließlich auf einen Schaden der Typ II Pneumozyten zurückzuführen ist. Hingegen konnte durch Hyperoxie keine Herunterregulation von SFTA2 nachgewiesen werden. Wichtig zu wissen ist dabei, dass Alveolar Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Reaktion auf LPS spielen, in dem sie Inflammationsprozesse triggern. Sauerstofftoxizität hingegen führt durch direkte Schädigung von Endothelzellen und Typ I Zellen zur Inflammation. Durch die Kolokalisationsexperimente der einzelnen Zellkompartimenten erscheint SFTA2 nicht ein klassisches, die physikalischen Eigenschaften des Surfactant bestimmendes Protein, wie SP-B und SP-C zu sein. Durch die Herunterregulation mit dem Macrophagen beeinflussenden Inflammationsweg LPS scheint eine Assoziation mit der Innate Immunity wahrscheinlicher. Allerdings ist die Aufgabe von SFTA2 durch die verschiedene Regulation im Gegensatz zu SP-D nicht in der Abwehr exzessiver Inflammationsprozesse zu sehen. Letztlich bleibt jedoch offen welche Rolle SFTA2 genau als Vermittler von Inflammation und Abwehr einnimmt.

Defekte von SFTA2 sind möglicherweise direkt ursächlich für Lungenerkrankungen beim Menschen. Wie bereits in dieser Arbeit mehrmals beschrieben liegt der Genlocus von SFTA2 in einer Region, die bereits für die diffuse Panbronchiolitis bekannt ist. Jedoch sind bislang mögliche Mechanismen die zur Erkrankung führen unbekannt.

5.3 Ausblick

Um mehr über die Funktion von SFTA2 zu erfahren würde es sich anbieten ein Maus Knockout Modell zu verwenden. Knockout Modelle konnten bereits zum besseren Verständnis der Funktion von Surfactant Proteinen beitragen (Clark, Wert et al. 1995, Korfhagen, Bruno et al. 1996, Glasser, Burhans et al. 2001). Der nächste Schritt wäre somit eine genauere Untersuchung von SFTA2 in Mäusen und ein Knockout Modell dafür zu etablieren. Hier eröffnet sich mit der CRISPR / Cas9 Technologie, die 2015 als „breakthrough of the year“ des Science Magazins gewählt wurde und die es nicht nur ermöglicht Knockout Mäuse sondern auch gezielte Genabschaltungen an humanen Zelllinien zu untersuchen (Jinek, Chylinski et al. 2012), eine einfache und effiziente Methode.

Ein weiterer möglicher Schritt wäre auch die Aufnahme von SFTA2 in Next Generation Sequencing (NGS) Gene Panels zur Untersuchung unklarer Lungenerkrankungen.

Ferner bietet sich mit der Schaffung der EU ChILD Datenbank die Möglichkeit die Auswirkung und die Krankheitsrelevanz von SFTA2 bei Kindern mit seltenen Lungenerkrankungen besser zu verstehen. So dient diese Datenbank unter anderem zum besseren Verständnis von Erkrankungen wie NEHI (Rauch, Wetzke et al. 2016).

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
A549	human lung adenocarcinoma
ABC	ATP-binding cassette
AK	Antikörper
ATII	Alveolar Epithelzellen Typ II
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
CCSP	clara cell secretory protein
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
cDNA	complementary DNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPB	diffuse Panbronchiolitis
FBA	fetal bovine serum
g	Gramm
HA	Human influenza hemagglutinin
H ₂ O bidest.	zweifach destilliertes Wasser
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
IPTG	isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
LPS	Lipopolysaccharid
mg	Milligramm
mi	Mikroliter
min	Minute
ml	Mililiter

MLE12	mouse lung epithelium
MBP	Maltose-binding protein
MUC21	Mucin 21
NEHI	neuroendocrine cell hyperplasia in infancy
NGS	Next Generation Sequencing
n-terminal	aminoterminal
PBMUCL1	panbronchiolitis related mucin-like 1
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RDS	Respiratory Distress Syndrom
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
SP	Surfactant Protein
TTF-1	thyroid transcription factor 1

6.2 Abkürzung Bindungstellen von Transkriptionsfaktoren

V\$ETSF: ETS1 factors; (EHF, ELF1through 3, ELF4, ELF5, ELK1, ELK3, ELK4, ERF, ERG, ETS1, ETS2, ETV1,

ETV2, ETV3, ETV4, ETV5, ETV6, ETV7, FEV, FLI1, GABPA, GABPAP, GABPB1, GABPB2, SPDEF,

SPI1, SPIB, SPIC)

V\$SP1F: GC-Box factors SP1/GC; (SP1 through 7; KLF10, KLF11 KLF16 KLF5

V\$NFkB: Nuclear factor kappa B/c-rel (HIVEP1, HIVEP2, HIVEP3, NFkB1, NFkB2, REL, RELA, RELB)

V\$NKXH: NKX homeodomain factors (HMX1, HMX2, HMX3, NKX2-1, NKX2-2, NKX2-3, NKX2-4, NKX2-5,

NKX2-6, NKX2-8, NKX3-1, NKX3-2)

V\$MAZF: MAZ, PATZ1

V\$ZF02: ZNF281, ZBTB7B, ZNF219, ZBTB7A, ZNF148, ZNF202, ZKSCAN3, ZNF300

V\$KLFS: KLF1, KLF2, KLF3, KLF4, KLF6, KLF7, KLF8, KLF9, KLF12, KLF13, KLF15

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Zubehör	Seite 25-26
Tabelle 2: Enzyme	Seite 26-27
Tabelle 3: Bakterien und Zellen	Seite 27
Tabelle 4: Kulturmedien	Seite 27
Tabelle 5: Antikörper	Seite 28
Tabelle 6: Westernblot Materialien	Seite 33
Tabelle 7: Westernblot Lösungen	Seite 34
Tabelle 8: PCR Protokoll für den Thermocycler	Seite 37
Tabelle 9: Zusammensetzung des Lysispuffers	Seite 47
Tabelle 10: Relative SFTA2 mRNA Levels in menschlichen Geweben	Seite 54

6.4 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.1.1-1 SP-B	Seite 13
Abb. 1.1.2-1 Proteinstruktur von ABCA3	Seite 15
Abb. 1.1.3-1 Expression von TTF1 und TTF-1-abhängigen Genen in der Lunge	Seite 17
Abb. 1.2-1 SFTA2 in GeneNote	Seite 17
Abb. 1.2-2 SFTA2 in GEO	Seite 18
Abb. 1.3-1 Genomische Lokalisation von SFTA2	Seite 18
Abb. 1.4-1 Schematische Darstellung des Sekretionsweges in der Zelle	Seite 19
Abb. 1.5.1-1 Metabolismus der Surfactantbestandteile im Alveolarraum	Seite 20
Abb. 1.5.1-2 Lungenbiopsie bei einem Patienten mit Alveolarproteinose	Seite 20
Abb. 1.5.1-3 Alveolarproteinose Röntgen-Thorax Übersichtsaufnahme	Seite 21
Abb. 1.5.1-4 Alveolarproteinose axiale CT-Aufnahme	Seite 21
Abb. 3.2.1.1-1 SP-C in GeneNote	Seite 29
Abb. 3.2.1.1-2 SP-C in GEO	Seite 30
Abb. 3.2.5.1-1 Schematische Darstellung Westernblot	Seite 35
Abb. 3.2.5.12-1 Vektor pGEX	Seite 43
Abb. 4.1-1 Relative Expression von SFTA2 in menschlichen Geweben	Seite 55
Abb. 4.3-1 Generierung des Peptidantikörpers gegen menschliches SFTA2	Seite 57
Abb. 4.4-1 Lokalisation auf Chr.6p21.33	Seite 57
Abb. 4.4-2 SFTA2, ein kleines 78 Aminosäuren umfassendes Protein	Seite 58
Abb. 4.4-3 Alignment der SFTA2 Aminosäuresequenz von 21 verschiedenen Säugetierarten	Seite 58
Abb. 4.4.1-1 Detektion des MBP-SFTA2-Fusionsproteins im Bakterienlysat mittels Peptidantikörper	Seite 59
Abb. 4.4.1-2 MLE12 SFTA2-HA Transfektion	Seite 60

Abb. 4.4.2-1 Westernblot mit EndoH	Seite 61
Abb 4.5.1-1 Immunofluoreszenzmikroskopie in mit pCDNA-SFTA2-HA transfizierten A549 Zellen mit Peptidantikörper und HA-Antikörper	Seite 62
Abb 4.5.1-2 Immunofluoreszenzmikroskopie in mit pCDNA-SFTA2-HA transfizierten A549 Zellen mit LAMP1 und HA- Antikörper	Seite 62
Abb 4.5.1-3 Immunofluoreszenzmikroskopie in mit pCDNA-SFTA2-HA transfizierten MLE12 Zellen mit SFTA2-HA Peptidantikörper und ABCA3 Peptidantikörper	Seite 63
Abb. 4.5.2-1 Immunofluoreszenzmikroskopie mit SFTA2-HA transfizierten A549 Zellen und Färbung mit golgin97 und SFTA2-HA Antikörper	Seite 64
Abb. 4.5.2-2 Immunofluoreszenzmikroskopie mit SFTA2-HA transfizierten A549 Zellen und Färbung mit clathrin und SFTA2-HA Antikörper	Seite 64
Abb. 4.7-1 Proteinexpression GST-SFTA2	Seite 65
Abb. 4.7-2 Proteinexpression GST-SFTA2 mit Hilfe von Sarkosyl	Seite 66
Abb. 4.8-1 Immunofluoreszenzmikroskopie an Lungengewebe mittels Peptidantikörper	Seite 67
Abb. 4.8.1-1 Peptidantikörper Blockierung	Seite 67
Abb. 4.9-1 Analyse von spezifischen mRNA Levels in Mäuselungen als Reaktion auf Schädigung nach LPS Gabe oder Hyperoxie-Exposition	Seite 68

7 Literaturverzeichnis

Arias-Diaz, J., I. Garcia-Verdugo, C. Casals, N. Sanchez-Rico, E. Vara and J. L. Balibrea (2000). "Effect of surfactant protein A (SP-A) on the production of cytokines by human pulmonary macrophages." Shock **14**(3): 300-306.

Avery, M. E. and J. Mead (1959). "Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease." AMA J Dis Child **97**(5, Part 1): 517-523.

Balis, J. U. and P. E. Conen (1964). "The Role of Alveolar Inclusion Bodies in the Developing Lung." Lab Invest **13**: 1215-1229.

Beck, D. C., M. Ikegami, C. L. Na, S. Zaltash, J. Johansson, J. A. Whitsett and T. E. Weaver (2000). "The role of homodimers in surfactant protein B function in vivo." J Biol Chem **275**(5): 3365-3370.

Beers, M. F. and S. Mulugeta (2005). "Surfactant protein C biosynthesis and its emerging role in conformational lung disease." Annu Rev Physiol **67**: 663-696.

BLAST. (13.01.2016). "Align Sequences Nucleotide BLAST." Retrieved 14.06.2012, 2012, from http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq

Boggaram, V. (2009). "Thyroid transcription factor-1 (TTF-1/Nkx2.1/TITF1) gene regulation in the lung." Clin Sci (Lond) **116**(1): 27-35.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal. Biochem.(Bd. 72): S. 248-254.

Brasch, F., S. Schimanski, C. Muhlfield, S. Barlage, T. Langmann, C. Aslanidis, A. Boettcher, A. Dada, H. Schrotten, E. Mildenerger, E. Prueter, M. Ballmann, M. Ochs, G. Johnen, M.

Griese and G. Schmitz (2006). "Alteration of the pulmonary surfactant system in full-term infants with hereditary ABCA3 deficiency." Am J Respir Crit Care Med **174**(5): 571-580.

Brasch, F., A. Ten Brinke, G. Johnen, M. Ochs, N. Kapp, K. M. Muller, M. F. Beers, H. Fehrenbach, J. Richter, J. J. Batenburg and F. Buhling (2002). "Involvement of cathepsin H in the processing of the hydrophobic surfactant-associated protein C in type II pneumocytes." Am J Respir Cell Mol Biol **26**(6): 659-670.

Bullard, J. E., S. E. Wert and L. M. Noguee (2006). "ABCA3 deficiency: neonatal respiratory failure and interstitial lung disease." Semin Perinatol **30**(6): 327-334.

Bullard, J. E., S. E. Wert, J. A. Whitsett, M. Dean and L. M. Noguee (2005). "ABCA3 mutations associated with pediatric interstitial lung disease." Am J Respir Crit Care Med **172**(8): 1026-1031.

C. Kroegel, U. C. (2013). Klinische Pneumologie - Das Referenzwerk für Klinik und Praxis, Thieme.

Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-159.

Chronos, Z. C., Z. Sever-Chronos and V. L. Shepherd (2010). "Pulmonary surfactant: an immunological perspective." Cell Physiol Biochem **25**(1): 13-26.

Clark, H. F., A. L. Gurney, E. Abaya, K. Baker, D. Baldwin, J. Brush, J. Chen, B. Chow, C. Chui, C. Crowley, B. Currell, B. Deuel, P. Dowd, D. Eaton, J. Foster, C. Grimaldi, Q. Gu, P. E. Hass, S. Heldens, A. Huang, H. S. Kim, L. Klimowski, Y. Jin, S. Johnson, J. Lee, L. Lewis, D. Liao, M. Mark, E. Robbie, C. Sanchez, J. Schoenfeld, S. Seshagiri, L. Simmons, J. Singh, V. Smith, J. Stinson, A. Vagts, R. Vandlen, C. Watanabe, D. Wieand, K. Woods, M. H. Xie, D. Yansura, S. Yi, G. Yu, J. Yuan, M. Zhang, Z. Zhang, A. Goddard, W. I. Wood, P. Godowski and A. Gray (2003). "The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human secreted and transmembrane proteins: a bioinformatics assessment." Genome Res **13**(10): 2265-2270.

Clark, J. C., S. E. Wert, C. J. Bachurski, M. T. Stahlman, B. R. Stripp, T. E. Weaver and J. A. Whitsett (1995). "Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(17): 7794-7798.

Connors, T. D., T. J. Van Raay, L. R. Petry, K. W. Klinger, G. M. Landes and T. C. Burn (1997). "The cloning of a human ABC gene (ABC3) mapping to chromosome 16p13.3." Genomics **39**(2): 231-234.

Corti, M., A. R. Brody and J. H. Harrison (1996). "Isolation and primary culture of murine alveolar type II cells." Am J Respir Cell Mol Biol **14**(4): 309-315.

Dean, M., Y. Hamon and G. Chimini (2001). "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily." J Lipid Res **42**(7): 1007-1017.

Devriendt, K., C. Vanhole, G. Matthijs and F. de Zegher (1998). "Deletion of Thyroid Transcription Factor-1 Gene in an Infant with Neonatal Thyroid Dysfunction and Respiratory Failure." New England Journal of Medicine **338**(18): 1317-1318.

Doan, M. L., R. P. Guillerman, M. K. Dishop, L. M. Noguee, C. Langston, G. B. Mallory, M. M. Sockrider and L. L. Fan (2008). "Clinical, radiological and pathological features of ABCA3 mutations in children." Thorax **63**(4): 366-373.

Edgar, R., M. Domrachev and A. E. Lash (2002). "Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository." Nucleic Acids Res **30**(1): 207-210.

Ferre, F. and P. Clote (2005). "DiANNA: a web server for disulfide connectivity prediction." Nucleic Acids Res **33**(Web Server issue): W230-232.

Flamein, F., L. Riffault, C. Muselet-Charlier, J. Pernelle, D. Feldmann, L. Jonard, A. M. Durand-Schneider, A. Coulomb, M. Maurice, L. M. Noguee, N. Inagaki, S. Amselem, J. C. Dubus, V. Rigourd, F. Bremont, C. Marguet, J. Brouard, J. de Blic, A. Clement, R. Epaud and

L. Guillot (2012). "Molecular and cellular characteristics of ABCA3 mutations associated with diffuse parenchymal lung diseases in children." Hum Mol Genet **21**(4): 765-775.

Galambos, C., H. Levy, C. L. Cannon, S. O. Vargas, L. M. Reid, R. Cleveland, R. Lindeman, D. E. deMello, S. E. Wert, J. A. Whitsett, A. R. Perez-Atayde and H. Kozakewich (2010). "Pulmonary pathology in thyroid transcription factor-1 deficiency syndrome." Am J Respir Crit Care Med **182**(4): 549-554.

Garcia-Verdugo, I., Z. Tanfin and M. Breuiller-Fouche (2010). "Surfactant protein A: an immunoregulatory molecule involved in female reproductive biology." Int J Biochem Cell Biol **42**(11): 1779-1783.

GEHealthcare. (2014). "GSTrap FF Columns." Retrieved 27.09.2014, 2014, from <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/productById/en/GELifeSciences/17513001>

GenBANK, N. "GenBANK." Retrieved 20.03.2018, 2018, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AY102070>

GeneCards®. (2018). "GeneCards®: The Human Gene Database." Retrieved 20.03.2018, 2018, from https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?id_type=hgnc&id=18386

GeneNote. "GeneNote." Retrieved 2012, 2012, from <http://genecards.weizmann.ac.il/genenote/>

GEOProfiles.

George, L., A. Mitra, T. A. Thimraj, M. Irmeler, S. Vishweswaraiyah, L. Lunding, D. Huhn, A. Madurga, J. Beckers, H. Fehrenbach, S. Upadhyay, H. Schulz, G. D. Leikauf and K. Ganguly (2017). "Transcriptomic analysis comparing mouse strains with extreme total lung capacities identifies novel candidate genes for pulmonary function." Respir Res **18**(1): 152.

Glasser, S. W., M. S. Burhans, T. R. Korfhagen, C. L. Na, P. D. Sly, G. F. Ross, M. Ikegami and J. A. Whitsett (2001). "Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6366-6371.

Glasser, S. W., T. R. Korfhagen, T. Weaver, T. Pilot-Matias, J. L. Fox and J. A. Whitsett (1987). "cDNA and deduced amino acid sequence of human pulmonary surfactant-associated proteolipid SPL(Phe)." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(12): 4007-4011.

Glasser, S. W., T. R. Korfhagen, T. E. Weaver, J. C. Clark, T. Pilot-Matias, J. Meuth, J. L. Fox and J. A. Whitsett (1988). "cDNA, deduced polypeptide structure and chromosomal assignment of human pulmonary surfactant proteolipid, SPL(pVal)." J Biol Chem **263**(1): 9-12.

Griese, M. (2002). "Molekulare Grundlagen und Klinik der pulmonalen Alveolarproteinosen." Deutsches Ärzteblatt **Jg. 99**(Heft 15): A 1013 - 1023.

Gustafsson, M., M. Palmblad, T. Curstedt, J. Johansson and S. Schurch (2000). "Palmitoylation of a pulmonary surfactant protein C analogue affects the surface associated lipid reservoir and film stability." Biochim Biophys Acta **1466**(1-2): 169-178.

Guttentag, S., L. Robinson, P. Zhang, F. Brasch, F. Buhling and M. Beers (2003). "Cysteine protease activity is required for surfactant protein B processing and lamellar body genesis." Am J Respir Cell Mol Biol **28**(1): 69-79.

Guttentag, S. H., M. F. Beers, B. M. Bieler and P. L. Ballard (1998). "Surfactant protein B processing in human fetal lung." Am J Physiol **275**(3 Pt 1): L559-566.

Hallman, M. (2004). "Lung surfactant, respiratory failure, and genes." N Engl J Med **350**(13): 1278-1280.

Hamvas, A. (2010). "Evaluation and management of inherited disorders of surfactant metabolism." Chin Med J (Engl) **123**(20): 2943-2947.

Hamvas, A., F. S. Cole and L. M. Noguee (2007). "Genetic disorders of surfactant proteins." Neonatology **91**(4): 311-317.

Hamvas, A., L. M. Noguee, D. E. deMello and F. S. Cole (1995). "Pathophysiology and treatment of surfactant protein-B deficiency." Biol Neonate **67 Suppl 1**: 18-31.

Hamvas, A., L. M. Noguee, G. B. Mallory, Jr., T. L. Spray, C. B. Huddleston, A. August, L. P. Dehner, D. E. deMello, M. Moxley, R. Nelson, F. S. Cole and H. R. Colten (1997). "Lung transplantation for treatment of infants with surfactant protein B deficiency." J Pediatr **130**(2): 231-239.

Hartl, D. and M. Griese (2005). "Interstitial lung disease in children -- genetic background and associated phenotypes." Respir Res **6**: 32.

Healthcare, G. (2009). "pGEX vectors, GST Gene Fusion System." Retrieved 29.08.2014, 2014, from http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/RelatedContent/Files/1314774443672/litdoc28919162AC_20110831100927.pdf

Higgins, C. F. (1992). "ABC transporters: from microorganisms to man." Annu Rev Cell Biol **8**: 67-113.

Hijikata, M., I. Matsushita, G. Tanaka, T. Tsuchiya, H. Ito, K. Tokunaga, J. Ohashi, S. Homma, Y. Kobashi, Y. Taguchi, A. Azuma, S. Kudoh and N. Keicho (2011). "Molecular cloning of two novel mucin-like genes in the disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis." Hum Genet **129**(2): 117-128.

Holzinger, A., S. Dingle, P. A. Bejarano, M. A. Miller, T. E. Weaver, R. DiLauro and J. A. Whitsett (1996). "Monoclonal antibody to thyroid transcription factor-1: production, characterization, and usefulness in tumor diagnosis." Hybridoma **15**(1): 49-53.

Iwatani, N., H. Mabe, K. Devriendt, M. Kodama and T. Miike (2000). "Deletion of NKX2.1 gene encoding thyroid transcription factor-1 in two siblings with hypothyroidism and respiratory failure." J Pediatr **137**(2): 272-276.

J. Sambrook, D. W. R. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, the Third edition. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Jain, D., E. Atochina-Vasserman, H. Kadire, Y. Tomer, A. Inch, P. Scott, R. C. Savani, A. J. Gow and M. F. Beers (2007). "SP-D-deficient mice are resistant to hyperoxia." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **292**(4): L861-871.

Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna and E. Charpentier (2012). "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." Science **337**(6096): 816-821.

Jorch G., H. A. (2010). Neonatologie: Die Medizin des Früh- und Reifgeborenen. Stuttgart, Thieme.

Keicho, N., J. Ohashi, G. Tamiya, K. Nakata, Y. Taguchi, A. Azuma, N. Ohishi, M. Emi, M. H. Park, H. Inoko, K. Tokunaga and S. Kudoh (2000). "Fine localization of a major disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis." Am J Hum Genet **66**(2): 501-507.

Kimura, S., Y. Hara, T. Pineau, P. Fernandez-Salguero, C. H. Fox, J. M. Ward and F. J. Gonzalez (1996). "The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary." Genes Dev **10**(1): 60-69.

Kirchhausen, T. (2000). "Three ways to make a vesicle." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(3): 187-198.

Kleinlein, B., M. Griese, G. Liebisch, H. Krude, P. Lohse, C. Aslanidis, G. Schmitz, J. Peters and A. Holzinger (2011). "Fatal neonatal respiratory failure in an infant with congenital hypothyroidism due to haploinsufficiency of the NKX2-1 gene: alteration of pulmonary surfactant homeostasis." Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed **96**(6): F453-456.

Klugbauer, N. and F. Hofmann (1996). "Primary structure of a novel ABC transporter with a chromosomal localization on the band encoding the multidrug resistance-associated protein." FEBS Lett **391**(1-2): 61-65.

Korfhagen, T. R., M. D. Bruno, G. F. Ross, K. M. Huelsman, M. Ikegami, A. H. Jobe, S. E. Wert, B. R. Stripp, R. E. Morris, S. W. Glasser, C. J. Bachurski, H. S. Iwamoto and J. A. Whitsett (1996). "Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9594-9599.

Korimilli, A., L. W. Gonzales and S. H. Guttentag (2000). "Intracellular localization of processing events in human surfactant protein B biosynthesis." J Biol Chem **275**(12): 8672-8679.

Kruger, N. J. (1994). "The Bradford method for protein quantitation." Methods Mol. Biol **32**: 9-15.

Leth-Larsen, R., C. Floridon, O. Nielsen and U. Holmskov (2004). "Surfactant protein D in the female genital tract." Mol Hum Reprod **10**(3): 149-154.

Liu, J. and X. Ma (2006). "Interferon regulatory factor 8 regulates RANTES gene transcription in cooperation with interferon regulatory factor-1, NF-kappaB, and PU.1." J Biol Chem **281**(28): 19188-19195.

Matsumura, Y., N. Ban, K. Ueda and N. Inagaki (2006). "Characterization and classification of ATP-binding cassette transporter ABCA3 mutants in fatal surfactant deficiency." J Biol Chem **281**(45): 34503-34514.

Mittal, R. A., M. Hammel, J. Schwarz, K. M. Heschl, N. Bretschneider, A. W. Flemmer, S. Herber-Jonat, M. Konigshoff, O. Eickelberg and A. Holzinger (2012). "SFTA2--a novel secretory peptide highly expressed in the lung--is modulated by lipopolysaccharide but not hyperoxia." PLoS One **7**(6): e40011.

Morgenstern, B. (1999). "DIALIGN 2: improvement of the segment-to-segment approach to multiple sequence alignment." Bioinformatics **15**(3): 211-218.

Muller, S., A. Maas, T. C. Islam, P. Sideras, G. Suske, S. Philipsen, K. G. Xanthopoulos, R. W. Hendriks and C. I. Smith (1999). "Synergistic activation of the human Btk promoter by transcription factors Sp1/3 and PU.1." Biochem Biophys Res Commun **259**(2): 364-369.

Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-350.

Mulugeta, S., J. M. Gray, K. L. Notarfrancesco, L. W. Gonzales, M. Koval, S. I. Feinstein, P. L. Ballard, A. B. Fisher and H. Shuman (2002). "Identification of LBM180, a lamellar body limiting membrane protein of alveolar type II cells, as the ABC transporter protein ABCA3." J Biol Chem **277**(25): 22147-22155.

Nakai, M., M. Harabayashi, T. Hase and H. Matsubara (1989). "Protein sorting between the outer and inner mitochondrial membranes: submitochondrial localization of cytochrome c1 whose presequence is replaced by the amino-terminal region of a 70 kDa outer membrane protein." J Biochem **106**(1): 181-187.

NCBI. (2012, 14.01.2016). Retrieved 16.06.2012, 2012, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Asembly/av.cgi?db=human&c=gene&q=SFTA2&a=fmol&h=1&vr=v73a>

Nogee, L. M. (2006). "Genetics of pediatric interstitial lung disease." Curr Opin Pediatr **18**(3): 287-292.

Nogee, L. M., D. E. de Mello, L. P. Dehner and H. R. Colten (1993). "Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis." N Engl J Med **328**(6): 406-410.

Nogee, L. M., A. E. Dunbar, 3rd, S. E. Wert, F. Askin, A. Hamvas and J. A. Whitsett (2001). "A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease." N Engl J Med **344**(8): 573-579.

Nogee, L. M., G. Garnier, H. C. Dietz, L. Singer, A. M. Murphy, D. E. deMello and H. R. Colten (1994). "A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds." J Clin Invest **93**(4): 1860-1863.

Orgeig, S., P. S. Hiemstra, E. J. Veldhuizen, C. Casals, H. W. Clark, A. Haczku, L. Knudsen and F. Possmayer (2010). "Recent advances in alveolar biology: evolution and function of alveolar proteins." Respir Physiol Neurobiol **173 Suppl**: S43-54.

Pilot-Matias, T. J., S. E. Kister, J. L. Fox, K. Kropp, S. W. Glasser and J. A. Whitsett (1989). "Structure and organization of the gene encoding human pulmonary surfactant proteolipid SP-B." DNA **8**(2): 75-86.

Poletti, V., G. Casoni, M. Chilosi and M. Zompatori (2006). "Diffuse panbronchiolitis." Eur Respir J **28**(4): 862-871.

Poletti, V., M. Chilosi, G. Casoni and T. V. Colby (2004). "Diffuse panbronchiolitis." Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis **21**(2): 94-104.

Rauch, D., M. Wetzke, S. Reu, W. Wesselak, A. Schams, M. Hengst, B. Kammer, J. Ley-Zaporozhan, M. Kappler, M. Proesmans, J. Lange, A. Escribano, E. Kerem, F. Ahrens, F. Brasch, N. Schwerk, M. Griesse and P. T. I. S. G. o. t. K. L. Register (2016). "Persistent Tachypnea of Infancy. Usual and Aberrant." Am J Respir Crit Care Med **193**(4): 438-447.

Rausch, F., M. Schicht, F. Paulsen, I. Ngueya, L. Brauer and W. Brandt (2012). ""SP-G", a putative new surfactant protein--tissue localization and 3D structure." PLoS One **7**(10): e47789.

Sato, A., J. A. Whitsett, R. K. Scheule and M. Ikegami (2010). "Surfactant protein-d inhibits lung inflammation caused by ventilation in premature newborn lambs." Am J Respir Crit Care Med **181**(10): 1098-1105.

Schroder, H., L. Sollfrank, F. Paulsen, L. Brauer and M. Schicht (2016). "Recombinant expression of surfactant protein H (SFTA3) in Escherichia coli." Ann Anat **208**: 129-134.

Scorer PW, P. M., McIntosh GG. (2011). "Thyroid Transcription Factor-1 (TTF-1): protein expression is not exclusive to lung and thyroid tissue." Retrieved 16.09.2014, 2014, from http://www.leicabiosystems.com/fileadmin/biosystems/whitepapers/95.10112_rev_a_TTF-1_whitepaper_EN.pdf

Seaton, B. A., E. C. Crouch, F. X. McCormack, J. F. Head, K. L. Hartshorn and R. Mendelsohn (2010). "Review: Structural determinants of pattern recognition by lung collectins." Innate Immun **16**(3): 143-150.

Service, G. A. (2014). "Lungen Surfactant assoziierte Genmutationen." Retrieved 24.09.2014, 2014, from <http://www.gene-analysis-service.de/gaswebde/surfacb.htm>

Shulenin, S., L. M. Noguee, T. Annilo, S. E. Wert, J. A. Whitsett and M. Dean (2004). "ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency." N Engl J Med **350**(13): 1296-1303.

Sorokina, E. M., S. I. Feinstein, T. N. Milovanova and A. B. Fisher (2009). "Identification of the amino acid sequence that targets peroxiredoxin 6 to lysosome-like structures of lung epithelial cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **297**(5): L871-880.

Sugiyama, Y., S. Kudoh, H. Maeda, H. Suzaki and F. Takaku (1990). "Analysis of HLA antigens in patients with diffuse panbronchiolitis." Am Rev Respir Dis **141**(6): 1459-1462.

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.

Tredano, M., M. Griese, F. Brasch, S. Schumacher, J. de Blic, S. Marque, C. Houdayer, J. Elion, R. Couderc and M. Bahuau (2004). "Mutation of SFTPC in infantile pulmonary alveolar proteinosis with or without fibrosing lung disease." Am J Med Genet A **126A**(1): 18-26.

van Moorsel, C. H., M. F. van Oosterhout, N. P. Barlo, P. A. de Jong, J. J. van der Vis, H. J. Ruven, H. W. van Es, J. M. van den Bosch and J. C. Grutters (2010). "Surfactant protein C mutations are the basis of a significant portion of adult familial pulmonary fibrosis in a dutch cohort." Am J Respir Crit Care Med **182**(11): 1419-1425.

Voorhout, W. F., T. Veenendaal, H. P. Haagsman, T. E. Weaver, J. A. Whitsett, L. M. van Golde and H. J. Geuze (1992). "Intracellular processing of pulmonary surfactant protein B in an endosomal/lysosomal compartment." Am J Physiol **263**(4 Pt 1): L479-486.

Wauer, R. R. (2005). Surfactanttherapie. Grundlage, Diagnostik, Therapie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.

Weichert, N., E. Kaltenborn, A. Hector, M. Woischnik, A. Schams, A. Holzinger, S. Kern and M. Griese (2011). "Some ABCA3 mutations elevate ER stress and initiate apoptosis of lung epithelial cells." Respir Res **12**: 4.

White, J. A., P. J. McAlpine, S. Antonarakis, H. Cann, J. T. Eppig, K. Frazer, J. Frezal, D. Lancet, J. Nahmias, P. Pearson, J. Peters, A. Scott, H. Scott, N. Spurr, C. Talbot, Jr. and S. Povey (1997). "Guidelines for human gene nomenclature (1997). HUGO Nomenclature Committee." Genomics **45**(2): 468-471.

Whitsett, J. A. (2006). "Genetic disorders of surfactant homeostasis." Paediatr Respir Rev **7 Suppl 1**: S240-242.

Whitsett, J. A., W. M. Hull, B. Ohning, G. Ross and T. E. Weaver (1986). "Immunologic identification of a pulmonary surfactant-associated protein of molecular weight = 6000 daltons." Pediatr Res **20**(8): 744-749.

Yamano, G., H. Funahashi, O. Kawanami, L. X. Zhao, N. Ban, Y. Uchida, T. Morohoshi, J. Ogawa, S. Shioda and N. Inagaki (2001). "ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells." FEBS Lett **508**(2): 221-225.

Yanai, I., H. Benjamin, M. Shmoish, V. Chalifa-Caspi, M. Shklar, R. Ophir, A. Bar-Even, S. Horn-Saban, M. Safran, E. Domany, D. Lancet and O. Shmueli (2005). "Genome-wide midrange transcription profiles reveal expression level relationships in human tissue specification." Bioinformatics **21**(5): 650-659.

Yu, S. H., W. Chung, R. W. Olafson, P. G. Harding and F. Possmayer (1987). "Characterization of the small hydrophobic proteins associated with pulmonary surfactant." Biochim Biophys Acta **921**(3): 437-448.

Zaltash, S., M. Palmblad, T. Curstedt, J. Johansson and B. Persson (2000). "Pulmonary surfactant protein B: a structural model and a functional analogue." Biochim Biophys Acta **1466**(1-2): 179-186.

Zen, K., K. Notarfrancesco, V. Oorschot, J. W. Slot, A. B. Fisher and H. Shuman (1998). "Generation and characterization of monoclonal antibodies to alveolar type II cell lamellar body membrane." Am J Physiol **275**(1 Pt 1): L172-183.

Zhang, Z. and W. J. Henzel (2004). "Signal peptide prediction based on analysis of experimentally verified cleavage sites." Protein Sci **13**(10): 2819-2824.

8 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Holzinger von ganzem Herzen für die Bereitstellung des Themas, sowie für die außerordentlich tolle Zusammenarbeit. Durch seine wissenschaftliche Unterstützung und wertvollen Anregungen hat er einen großen Teil zur Verwirklichung dieser Arbeit beigetragen.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meiner Betreuerin Frau Dr. Rashmi Mittal bedanken, die mir von Anfang zur Seite stand und mich sowohl im Labor als auch bei der wissenschaftlichen Recherche unterstützt hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. M. Hammel und den Arbeitsgruppen von Frau Prof. Dr. Ensenauer und Frau Prof. Dr. Muntau bedanken, die mir bei Fragestellungen zu Experimenten immer zur Seite standen.

Ein herzliches Dankeschön gilt denjenigen die bei der Korrektur dieser Arbeit mitgearbeitet haben.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meinen Eltern bedanken, die immer hinter mir gestanden sind und mich unterstützt haben. Sie haben mir das Studium der Humanmedizin in München ermöglicht und somit auch die Fertigstellung dieser Arbeit.

Eidesstattliche Versicherung

Heschl Katharina Maria

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Zürich, 06.12.2018

Ort, Datum

Heschl Katharina Maria

Unterschrift Doktorandin/Doktorand