

Kinderklinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig Maximilians Universität München

Direktor: Prof. Dr. D. Reinhardt

Proteolytische Degradation von Surfactant Protein D

Dissertation

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

vorgelegt von
Annegret Wiesener
aus Potsdam
2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Griese

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Fink
Priv. Doz. Dr. J. Behr

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

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2002

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	Seite 6
Zusammenfassung.....	Seite 7
1. Einleitung.....	Seite 8-12
2. Material und Methoden	
2.1. Material	Seite 13-15
2.1.1. Geräte	
2.1.2. Material	
2.1.3. Patientenmaterial	
2.2. Methoden.....	Seite 15-26
2.2.1. Gesamtproteinbestimmung	
2.2.2. SP-D ^{PAP} Isolierung	
2.2.3. Bestimmung der SP-D ^{PAP} Konzentration	
2.2.4. Bestimmung der Humanen Leukozyten Elastase Aktivität	
2.2.5. Gelelektrophorese	
2.2.6. Enzymatische Degradation des SP-D ^{PAP}	
2.2.7. Darstellung und funktionelle Assays des Abbauproduktes	
2.2.8. Statistik	
3. Ergebnisse	
3.1. SP-D ^{PAP}	Seite 27-32
3.1.1. SP-D ^{PAP} Isolierung	
3.1.2. Darstellung in der SDS/PAGE	
3.1.3. Darstellung in der 2D PAGE	
3.1.4. CF und SP-D	

3.2. Enzymatische Degradation des SP-D ^{PAP}	Seite 33-45
3.2.1. Humane Leukozyten Elastase	
3.2.2. Cathepsin G	
3.2.3. Proteinase 3	
3.2.4. Pseudomonas Elastase	
3.3. Funktionelle Assay.....	Seite 47-49
3.3.1. Maltosebindungsassay	
3.3.2. Agglutination	
3.4. Darstellung des degradierten SP-D ^{PAP}	Seite 50-54
3.4.1. Gelfiltration	
3.4.2. Sequenzierung	
4. Diskussion.....	Seite 55-60
5. Anhang.....	Seite 61-64
Literaturverzeichnis.....	Seite 65-67
Danksagung	Seite 68
Lebenslauf	Seite 69

Verzeichnis der häufigsten Abkürzungen:

2D PAGE	Zweidimensionale Polyacrylamid Gel Elektrophorese
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
CF	Cystische Fibrose
HLCG	Humanes Leukozyten Cathepsin G
HLE	Humane Leukozyten Elastase
HLP3	Humane Leukozyten Proteinase 3
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter PH Gradient
Mol.W	Molekulargewicht
P.aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
PAP	Alveolarproteinose
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SDS/PAGE	SDS-Elektrophorese
SP-D	Surfactant Protein D
SP-D ^{PAP}	Surfactant Protein D von PAP-Patienten isoliert
SP-D ^{rat}	Surfactant Protein D von Ratten
SP-D ^{rh}	Rekombinantes humanes SP-D
SP-D ^{rrat}	Rekombinantes Ratten SP-D

Zusammenfassung

Surfactant Protein D (SP-D) spielt eine wichtige Rolle in der pulmonalen Immunabwehr und im Surfactantmetabolismus der Lunge. Frühere in vitro Studien zeigten, dass SP-D resistent gegenüber einer enzymatischen Proteolyse ist. Das Ziel dieser Arbeit war es, den Umfang und die funktionelle Bedeutung der proteolytischen Degradation von SP-D durch Proteasen weiter zu untersuchen, die in hohen Konzentrationen bei suppurativen Lungenerkrankungen wie Mukoviszidose (CF) vorkommen.

Isoliertes Surfactant Protein D von Patienten mit Alveolarproteinose (SP-D^{PAP}) wurde mit humaner Leukozytenelastase, humaner Leukozytenproteinase 3, humanem Leukozyten-cathepsin G und Pseudomonas Elastase inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden mit Hilfe der SDS Elektrophorese dargestellt und durch Immunblotting mittels polyklonalem Antikörper detektiert. Zusätzlich wurden proteolysierte Fragmente mit Hilfe der Aminosäure-Sequenzanalyse identifiziert.

Alle untersuchten Proteasen degradierten SP-D^{PAP} in Abhängigkeit von der Zeit. Die Fragmente häuften sich um 38 kDa unter reduzierenden Bedingungen an. Durch Zugabe von Ca⁺⁺ kam es zu einer zeitlichen Verzögerung der Degradation, jedoch nicht zu einer kompletten Hemmung. Die Sequenzanalyse zeigte, dass durch humane Leukozytenelastase, hauptsächlich Fragmente des Kohlenhydrat-Erkennungs-Bereiches (CRD) generiert wurden und so SP-D^{PAP} partiell proteolysiert wurde. Nach limitierter Proteolyse war sowohl die Bindungsfähigkeit von SP-D^{PAP} an seinen Kohlenhydratliganden Maltose, als auch die funktionelle Aktivität in Form der Aggregation des gram-negativen Keimes *Pseudomonas aeruginosa* aufgehoben.

Diese Untersuchungen zeigen, dass eine limitierte Proteolyse von SP-D^{PAP} durch Proteasen in einem Konzentrationsbereich ablaufen kann, welcher für Lungenerkrankungen mit einer vorwiegend von neutrophilen Granulozyten geprägten Entzündungsreaktion typisch ist. Eine derartige partielle Proteolyse resultiert in einer eingeschränkten funktionellen Aktivität von SP-D. Daher sind bei verschiedenen Lungenerkrankungen, die mit einer neutrophilen Inflammationsreaktion einhergehen, biochemische und funktionelle Alterationen von SP-D zu erwarten.

1. Einleitung

Surfactant Protein D

Die Surfactantproteine sind wichtige Bestandteile des Abwehrsystems der Lunge und bilden neben den Phospholipiden etwa 10 % des Gesamtlungensurfactants. Man unterscheidet die hydrophoben lipidassoziierten Proteine (Surfactantproteine B und C) und die hydrophilen Proteine (Surfactantproteine A und D) [Crouch, 1998].

Das Surfactantprotein D (SP-D) gehört zur Gruppe der kollagenen Glycoproteine und calciumabhängigen Lectine und wird in der Lunge von den Alveolarepithelzellen Typ II und nicht ciliären Bronchialepithelzellen synthetisiert [Mason et al., 1998].

Die komplexe Quartärstruktur (Abb. 1), ein Dodecamer, wird aus 4 Trimeren gebildet, welche wiederum aus identischen Monomeren zusammengesetzt sind. Diese Monomeren enthalten einen Aminoterminus, einen kollagenen Anteil, einen Halsbereich und einen Kohlenhydrat-Erkennungsbereich (CRD).

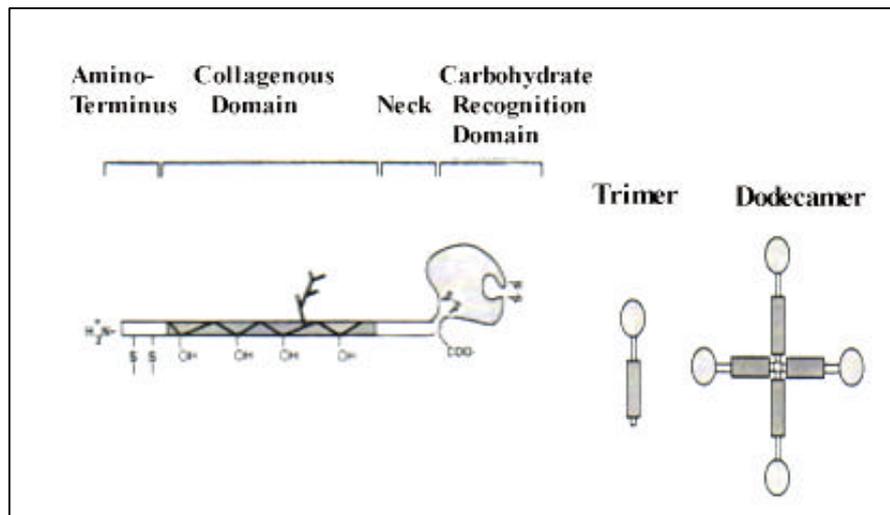


Abb. 1: Struktur von Surfactant Protein D [aus Mason et al., 1998]

SP-D ist in der Lage, gram-negative und gram-positive Bakterien zu binden. Hierbei kommt es zu einer calciumabhängigen Wechselwirkung des CRD mit Zellmembranbestandteilen. So werden z.B. die Kernoligosaccharide des LPS von *Pseudomonas aeruginosa* oder *E.coli* gebunden [Mason et al., 1998]. SP-D agglutiniert ebenfalls Influenza A Viren [Crouch, 1998], hemmt das Hämagglutinin und steigert die Bindungsfähigkeit neutrophiler Granulozyten [Mason et al., 1998].

SP-D spielt auch eine Rolle in der Abwehr von Pilzinfektionen [Reid, 1998]. So bindet SP-D an *Aspergillus fumigatus* Conidien [Allen et al., 1999] und steigert deren Phagozytose und Abtötung durch Leukozyten und alveoläre Makrophagen [Mason et al., 1998]. Die Adhärenz von *Pneumo-cystis carinii* an Makrophagen wird durch SP-D ebenfalls stimuliert [Mason et al., 1998]. Aufgrund dieser Eigenschaften spielt das SP-D in der Immunabwehr eine große Rolle.

Surfactant Protein D und Cystische Fibrose (CF)

Cystische Fibrose ist eine autosomal-rezessive Funktionsstörung der exokrinen Drüsen, verursacht durch Mutationen im Gen des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR). Zentrale Folge dieses Defektes ist eine pathologische, zähe Atemwegssekretion und eine chronisch persistierende Inflammationsreaktion der Lungen.

Die chronische bakterielle Infektion der Atemwege und die resultierende Zerstörung des Lungengewebes ist hauptverantwortlich für die Mortalität und Morbidität bei CF. Besonders häufig sind die Infektionen durch *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* zu beobachten [Postle et al., 1999].

Einige Studien zeigten, dass die Konzentrationen der Surfactantproteine A und D in BAL von Patienten mit CF deutlich erniedrigt sind [Postle et al., 1999; Griese et al., 1997] (siehe auch Tab 1.).

Tab. 1: Konzentrationen von SP-D und SP-A in BAL bei CF und Kontrollgruppen

[aus: Postle et al., 1999]

	Subject Group		
	Control (n = 11)	Infection (n = 11)	Cystic Fibrosis (n = 13)
SP-A, µg/ml, median (95% CI)	12.35 (8.57–19.83)	9.76 (3.05–23.26)	2.65* [†] (0.03–8.63)
SP-D, ng/ml, median (95% CI)	641 (9.43–1216)	12.17 (4.75–1313)	0.1* [†] (0.1–11.79)
SP-A:phospholipid, ng/nmol, median (95% CI)	184 (60–588)	148 (55–458)	22.6* [†] (1–101)
SP-D:phospholipid, ng/nmol, median (95% CI)	5.52 (0.231–33.06)	0.206* (0.038–8.16)	0.001* [†] (0.001–0.118)

Concentrations of SP-A and SP-D in BALF were measured by ELISA and expressed as absolute concentration and relative to total phospholipid. Results are presented as median values with 95% confidence intervals specified. Significant differences between groups were estimated by the Mann-Whitney U test: *P < 0.05 versus control group; [†]P < 0.05 versus infection group.

Wie die Tab. 1 zeigt, war die SP-D Konzentration bei nicht-CF lungenkranken Kindern mit Atemwegsinfektion gegenüber lungengesunden Kindern signifikant erniedrigt. Jedoch ist eine

ausgeprägte Erniedrigung von SP-A und SP-D bei CF kranken Kindern in dieser Studie deutlich zu erkennen.

Lungenrelevante Proteasen und CF

Neutrophile Granulozyten sezernieren verschiedene Proteasen, wobei pathogenetisch vor allem die Serinproteasen und hier die neutrophile Elastase, Cathepsin G und Proteinase 3 eine bedeutende Rolle spielen [Hubbard et al., 1991]. Das zelluläre Infiltrat in den Atemwegen bei CF weist eine z.T. extrem starke Neutrophilie auf (siehe Abb. 2) [Konstan et al., 1994; Hubbard et al., 1991; Birrer et al., 1994]. Daher sind bei CF-Patienten besonders hohe Konzentrationen dieser Proteasen in den Atemwegen zu erwarten und auch bereits nachgewiesen worden [Caughey, 1994; Witko-Sarsat et al., 1999].

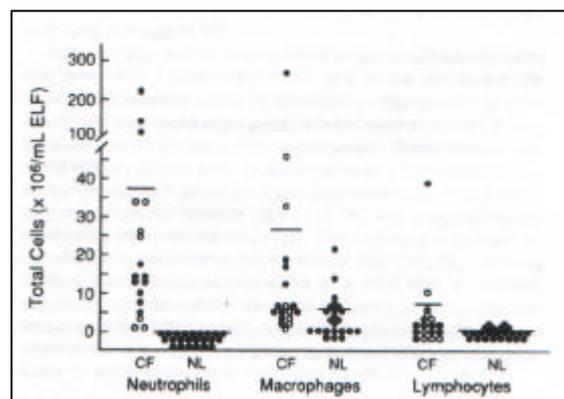


Abb. 2: Darstellung der Anzahl neutrophiler Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten bei Patienten mit CF und gesunden Patienten (NL) in ELF (Epithelial lining Fluid)

[aus: Konstan et al., 1994]

Die humane Leukozyten Elastase (HLE), die bedeutendste Serinprotease (Molekulargewicht 29 kDa), kommt in den azurophilen Granula der neutrophilen und basophilen Granulozyten und ebenso in Mastzellen vor [Hubbard et al., 1991]. HLE besitzt die Fähigkeit, Elastin, welches in besonders hoher Konzentration im Lungengewebe vorkommt, zu hydrolysieren. Das Enzym weist eine besondere Spezifität zu Alanin und Valin auf [Caughey, 1994; Witko-Sarsat et al., 1999]. Neben der Gewebeschädigung durch Hydrolysieren von Proteinen in Basalmembranen, extrazellulärer Matrix und zellassoziierter Glycokalix, kann HLE Endothelzellen, Epithelialzellen und seröse Zellen aktivieren. Eosinophile Granulozyten

werden durch HLE degranuliert [Liu et al., 1999]. Sehr hohe Konzentrationen von HLE sind mehrfach in den CF-Atemwegssekreten gemessen worden (im Sputum [Witko-Sarsat et al., 1999] und in der Lungenspülflüssigkeit [Birrer et al., 1994; Konstan et al., 1994]).

Die gleiche Spezifität wie HLE besitzt die humane Leukozyten Proteinase 3 (HLP 3). Sie ist ebenfalls eine Serinprotease, hat ein Molekulargewicht von 27 kDa und ist jedoch ausschließlich in den neutrophilen Granulozyten zu finden [Caughey, 1994]. Witko-Sarsat und Mitarbeiter [Witko-Sarsat et al., 1999] fanden im Sputum von Patienten mit CF sogar deutlich höhere Konzentrationen von Proteinase 3 als HLE. Bei Patienten mit chronischer Bronchitis ohne CF waren die Werte der HLE erhöht gegenüber der Proteinase 3. HLP 3 ist wie HLE in der Lage, Proteine der extrazellulären Matrix zu degradieren.

Eine hohe Aktivität von Leukozyten Cathepsin G (HCG) wurde auch im Sputum von Patienten mit CF gemessen [Rochat et al., 1996]. Leukozyten Cathepsin G kommt ebenfalls nur in neutrophilen Granulozyten vor. Diese „Chymotrypsin-ähnliche“ Serinprotease besitzt die gleiche Substratspezifität wie das Chymotrypsin und spaltet Proteine vor allem zwischen den Aminosäuren Phenylalanin und Thyrosin [Caughey, 1994; Hubbard et al., 1991]. Daher hat Cathepsin G die Fähigkeit, eine große Zahl von Proteinen der pulmonalen Matrix insbesondere Kollagene vom Typ I und III sowie Fibronectin abzubauen [Hubbard et al., 1991].

Eine bakterielle elastolytische Protease ist die Pseudomonas Elastase. Diese Metalloprotease (Cofaktoren Zink und Kalzium) wird von Pseudomonas aeruginosa gebildet und sezerniert. Aufgrund der hohen Keimbesiedelung durch Pseudomonas aeruginosa der Atemwege bei CF, kommt es zu hohen Aktivitäten dieses Enzymes im Sputum bei Infektionen mit Pseudomonas aeruginosa [Bruce et al., 1985].

In einer vorausgegangenen Studie wurde gezeigt, dass SP-D^{rrat} eine hohe Resistenz gegenüber einer Proteolyse aufweist. Eine proteolytische Degradation war in dieser Arbeit nicht nachgewiesen worden [Brown-Augsburger et al., 1996]. Andererseits haben Dong und Wright die Degradation von SP-D^{rrat} durch Alveolarmakrophagen in vitro gezeigt [Dong Q, Wright JR, 1998].

Diese Ergebnisse wurden aufgegriffen und detailliert untersucht, da eine hohe Konzentration an Proteasen bei schweren suppurativen Lungenerkrankungen zu einer Schädigung von SP-D führen könnten. Dadurch würde eine funktionelle Schädigung des Abwehrmechanismus des SP-D bei der Keimbeseidung und Infektion durch pathogene Erreger, wie *Pseudomonas aeruginosa*, begünstigt und eine entsprechende Korrektur könnte mögliche neue therapeutische Ansätze eröffnen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Für die SDS/PAGE wurde das NuPAGE Elektrophorese System (bestehend aus Xcell II Mini-Cell; Xcell Blot Module) von der Firma Novex/Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) genutzt.

Für das Einscannen und Bearbeiten der Gele wurde das Fluor-S Multimager-System und die dazugehörige Software MULTI ANALYST der Firma Biorad (Richmond, CA, USA) benutzt.

Für die 2D PAGE wurde die Multiphor Elektrophorese Kammer mit Rehydrierungskassette, Gelgießkassette (bestehend aus Glasplatten, Flexiclamp, Gradientengeißer), Filmremover, Westernblotkammer und DryStripKitRahmen der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) verwendet.

2.1.2. Material

Für die SDS/PAGE wurden das Novex System der Firma Novex/Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) mit folgenden Komponenten benutzt: NuPAGE 10 % Bis-Tris Gele, NuPAGE Antioxidant, NuPAGE MOPS SDS Running Buffer 20X, NuPAGE LDS Sample Buffer, NuPAGE Reducing Agent, NuPAGE Tris-Acetat (3-8 %) Gele, NuPAGE Tris-Acetat SDS Running Buffer 20X, Mark 12TM Wide Range (enthaltene Proteine siehe Abb. 4), See BlueTM PreStained Marker (enthaltene Proteine siehe Abb.5).

Für die 2D PAGE wurden IPG Dry Strips (Pharmacia Biotech; Uppsala, Schweden), Gel Bond (Biozym; Oldendorf, Deutschland), Filterpapier (Whatman International; Maidstone, USA), Nitrocellulosemembran (Amersham Pharmacia Biotech; Uppsala, Schweden) und ECL-Plus System (Amersham Life Science; Buckinghamshire, UK) verwendet.

Enzyme

Die Humane Sputum Leukozyten Elastase (HLE) 875 U/mg protein (29500 Da) [EC 3.4.21.37], das Humane Sputum Leukozyten Cathepsin G (HCG) 4400 U/mg protein (23500 Da) [EC 3.4.21.20], die Humane Sputum Leukozyten Proteinase 3 (HLP3) (29000 Da) [EC 3.4.21.76] und die Pseudomonas aeruginosa Elastase (PAE) (53687 Da) 261 U/mg protein [EC 3.4.24.26] stammten von der Firma Elastin Product Company (Owensville, Mo, USA).

Antikörper

Anti-human SP-D (polyclonal) nativ war eine freundliche Gabe von Prof. K. B. Reid (Oxford, UK). Anti-human SP-D (S91) war eine freundliche Gabe von Prof. E. Crouch (St.Louis, MO, USA). Die Meerettich-Peroxidase (konjugierter Goat Anti-Rabbit polyclonal IgG) stammte von der Firma Biorad Hercules (CA, USA).

Surfactant Protein D

Das SP-D^h (rekombinantes human SP-D) und das SP-D^{rat} (rekombinantes Ratten SP-D) wurden von Prof. E. Crouch (St.Louis, MO, USA) freundlicher Weise zu Verfügung gestellt. SP-D^{PAP} wurde mit der Methode, welche unter 2.2.2 beschrieben ist, isoliert.

Verwendete Chemikalien

Acrylamid, Ammoniumpersulfat, Bisacrylamid, Dichlordiphenyltrichlorethan (DTT), Glycin, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Pharmalyte (3-10), Sodiumdodecylsulfat (SDS), Silikonöl Dry Stripcover Fluid, Urea stammten von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden).

Bromphenolblau, Chaps, Jodacetamid, Molekulargewichtsmarker LMW, N,N,N,N Tetramethylethylendimaine (TEMED) von Sigma (St. Louis, USA).

Essigsäure, Formaldehyd, Glycerin, HCl, Methanol, Natriumcarbonat, NaCl, Natriumacid, Natriumthiosulfat, Pefablock, Ponceau SC, Silbernitrat, Tris HCl von Merck (Darmstadt, Deutschland).

Kerosin, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Trichloressigsäure von Fluka Chemie AG (Neu-Ulm, Deutschland). Serdolit MB-1 Ionenaustauscher p.a. von Serva-Elektrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland). Das Aqua dest (Millipore), Ethanol, stammten von der Apotheke des Klinikum der Innenstadt (München, Deutschland).

Als Mager-Milchpulver wurde Bebita der Firma Salamon Vertriebs GmbH (München, Deutschland) verwendet. Rinderalbumin (BSA) stammte von der Firma Paesel & Lore (Hanau, Deutschland).

2.1.3. Patientenmaterial

BAL PAP

Gepoolte bronchoalveoläre Lavage von adulten Patienten mit idiopatischer PAP wurde uns vom Krankenhaus Gauting (Gauting, Deutschland) freundlicher Weise zur Verfügung gestellt. Die Lavage wurde aus therapeutischen Gründen durchgeführt und das anderweitig verworfene Material zur Isolierung des SP-D verwendet.

CF BAL

Die Proben der BAL der 4 Patienten mit klinisch manifester und durch positiven Schweißtest bestätigter CF wurden einer Studie zur Darstellung des Effektes von inhaliertem α 1 Antitrypsin auf proteolytisch verändertes CF Lungengewebe [Griese et al., 2001] entnommen. Eine Aufklärung und eine Einverständniserklärung der Eltern lag vor Beginn der BAL vor.

2.2. Methoden

2.2.1. Gesamtproteinbestimmung

Der Gesamtproteingehalt der Proben wurde spektrophotometrisch mit dem Photometer Anthos II (Anthos, Salzburg, Österreich) mit Hilfe der Biolise-Software (Biolise, Hombrechtikon, Schweiz) nach der Methode von Bradford [Bradford, 1976] bestimmt. Dieser Nachweis beruht auf der spezifischen Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant G an Proteine, wobei das Absorptionmaximum des Farbstoff-Proteinkomplexes bei 595 nm liegt. Als Standard wurde Rinderserumalbumin verwendet. Die Bestimmung erfolgte in 96 well Microtiterplatten (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) und wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die

Proben wurden anschließend zu je 80 µg Gesamtprotein aliquotiert und bei -70 °C eingefroren.

2.2.2. SP-D^{PAP} Isolierung

Die Isolierung des humanen SP-D^{PAP} erfolgte aus gepoolter bronchoalveolärer Lavage (BAL) von Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose mit Hilfe der Maltose-Agarose Affinitätschromatographie nach der Methode von Strong et al. [Strong et al., 1998] unter Verwendung des Purifier Äkta (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden).

Dazu wurde BAL mit 20 mM Tris-HCl und 10 mM EDTA bei pH 7,4 eingestellt. Nach einer Zentrifugation bei 10 000 g über 40 min wurde der Überstand auf 20 mM CaCl₂ rekalkifiziert und anschließend auf eine Maltose-Agarose Säule (M 8896, Sigma, St. Louis, USA) aufgetragen. Nach Waschen der Säule wurde das gebundene SP-D^{PAP} anschließend durch 50 mM Mangan(II)-chlorid, 20 mM Tris-HCl pH 7,4 heruntergespült. Die weitere Aufreinigung des SP-D^{PAP} erfolgte durch eine Gelfiltration-Chromatographie über Superose 6 (No. 9834044, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Die Äquilibrierung der Säule erfolgte durch 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl und 5 mM EDTA bei pH 7,4. Die durch diese Auftrennung gewonnenen Fraktionen wurden bei -70 °C aufbewahrt. Die Fraktionen des markierten Peaks (siehe Abb. 6, Abschnitt 3.1.1.) enthielten SP-D^{PAP} und mit diesen ungepoolten Fraktionen wurde weiter gearbeitet.

2.2.3. Bestimmung der SP-D^{PAP}-Konzentration

Die Konzentration des SP-D^{PAP} der Fraktionen wurde durch einen Zweiseiten-ELISA bestimmt, wobei das nachzuweisende SP-D^{PAP} an zwei Antikörper (1. Antikörper: VI F 11 monoklonaler mouse anti-rat SP-D, kreuzreaktiv mit human SP-D, BMA Biomedicals AG, Augst, Schweiz; 2. Antikörper: II E 11-Biotin monoklonaler mouse anti-rat SP-D, BMA Biomedicals AG, Augst, Schweiz) gebunden und mit einem Antiglobulin-Enzymkonjugat (Avidin-Peroxidase Komplex, DAKO, Glostrup, Dänemark) nachgewiesen worden. Als SP-D Standard wurde rekombinantes human SP-D verwendet.

2.2.4. Messung der Humanen Leukozyten Elastase Aktivität

Die Humane Leukozyten Elastase (HLE) Aktivität der BAL von CF wurde spektrophotometrisch mit dem Photometer Anthos II (Anthos, Salzburg, Österreich) mit Hilfe der

Biolise-Software (Biolise, Hombrechtikon, Schweiz) unter Verwendung des Substrates N-Suc-Ala-Ala-Ala p-Nitro anilide (320 µg/ml) (Elastin Products Company, Owensville, Mo, USA) bestimmt [von Bredow et al., 2001]. Dieser Assay wurde bei Raumtemperatur in 96 well Mikrotiterplatten (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) durchgeführt. Die Änderung der Absorption wurde photometrisch über 5 min kontinuierlich bei 410 nm gemessen. Die Aktivität der HLE wurde durch Vergleich mit der Standardkurve (0-12,26 U/ml) ermittelt.

2.2.5. Gelelektrophorese

Eindimensionale SDS Elektrophorese (1D SDS/PAGE) und Westernblotanalyse

Die lyophilisierten Proben wurden nach Vorschrift des NOVEX-Systems im NuPAGE-LDS-Sample-Buffer (20 µl pro Lane) für 10 min bei 70 °C inkubiert. Durch die Zugabe des NuPAGE-Reducing-Agent wurden die Proben reduziert. Aus dem NuPAGE System wurden die Bis-Tris-HCl gepufferten (ph 6,4) Polyacrylamid-Gele mit einer Acrylamidkonzentration von 10 % und die Tris-Acetat gepufferten (ph 7,0) Polyacrylamid-Gele mit der Acrylamidkonzentration von 3-8 % verwendet.

Für die Bis-Tris (10 %) Gele wurde als Laufpuffer der NuPAGE-MOPS-SDS-Running-Buffer-20X benutzt. Dieser wirkt aufgrund seines SDS-Gehaltes denaturierend. Für stabile reduzierende Bedingungen sorgte die Zugabe von NuPAGE-Antioxidant zum NuPAGE-SDS-MOPS- Buffer.

Für die nativen Tris-Acetat (3-8 %) Gele wurde als Laufpuffer NuPAGE-Tris-Acetat-SDS-Running- Buffer-20X verwendet, welcher ebenfalls denaturierend wirkt, aufgrund der fehlenden Zugabe eines NuPAGE-Reducing-Agent aber nicht reduzierend ist.

Die Elektrophorese erfolgte in den Mini-Cell-Kassetten unter folgenden Laufbedingungen:

Für Bis-Tris-Gele: 200 V, Start: 100 mA, Ende 60 mA pro Gel über 50 min.

Für Tris-Acetat-Gele: 150 V, Start: 55 mA, Ende 40 mA pro Gel über 60 min.

Als Protein Standard wurde Mark-12TM Wide-Range bzw. See-BlueTM PreStained Marker von Novex/ Invitrogen verwendet (Siehe Abb.3 und 4).

Nach dem Elektrophoreselauf erfolgte entweder eine Silberfärbung, eine Coomassiefärbung oder ein Proteintransfer (Westernblott) auf eine Nitrocellulosemembran.

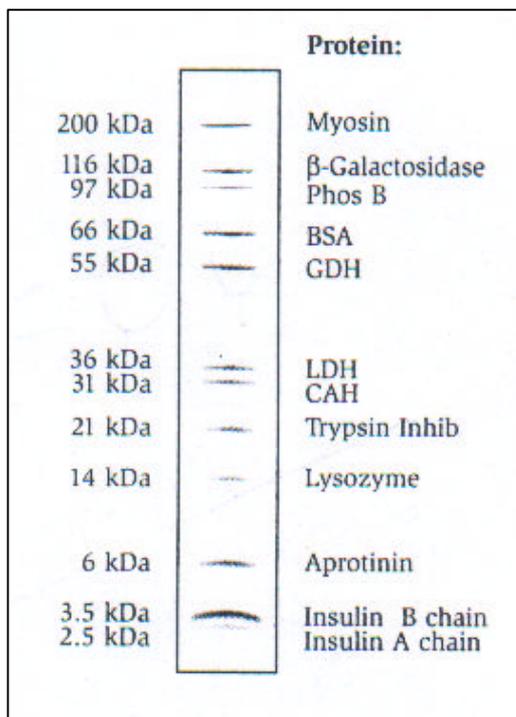


Abb. 3: Mark 12™ Standard
 (aus NuPAGE Electrophoresis System:
 Instruction Booklet von Novex- Invitogen)

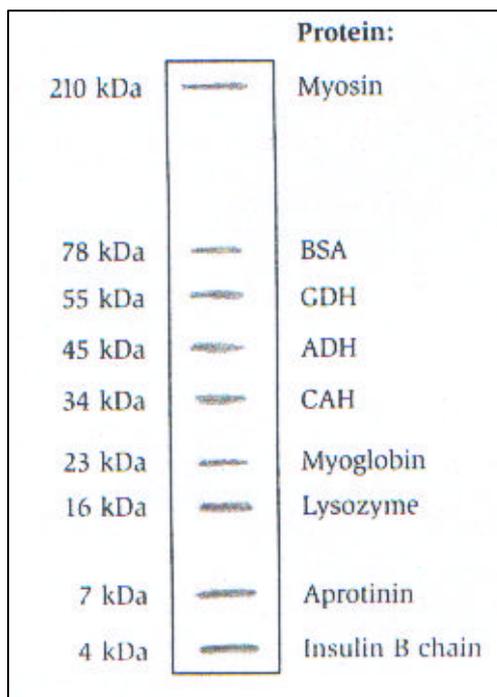


Abb. 4: See Blue™ Pre Stained Marker
 (aus NuPAGE Electrophoresis System:
 Instruction Booklet von Novex/ Invitrogen)

Silberfärbung und Coomassiefärbung

Für die Silberfärbung der NuPAGE Gele wurde das NOVEX-SilverXpress-Silver-Staining-Kit verwendet.

Nach der Fixierung der Gele über 10 min in 50 % Methanol, 10 % Essigsäure und 40 % Aqua dest, erfolgte die Silberfärbung nach Vorschrift des Kits (Novex/ Invitrogen).

Für die Coomassiefärbung wurde das NOVEX-Colloidal-Blue-Kit verwendet. Der Vorteil lag hierin, dass die Proteinbanden nach der Färbung und Dokumentation anschließend auf Nitrocellulosemembranen geblottet werden konnten. Auch hier wurde nach der Vorschrift der Firma Novex/ Invitrogen vorgegangen.

Westernblot und Entwicklung der Nitrocellulosemembran

Der Proteintransfer erfolgte im vertikalen „SemiDry“ Verfahren unter Nutzung der NOVEX X Cell-Appartur (X-Cell-II-Mini-cell; Blot-Module) auf eine Nitrocellulosemembran für 60 min bei 30 V und Anfangsstromstärke von 170 mA, Endstromstärke 110 mA im NuPAGE-Transfer-Buffer.

Die Membran wurde 30 min in 5 % Milchpulverlösung inkubiert zur Absättigung der noch freien Bindungsstellen. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper (Anti-human SP-D nativ, polyclonal; 1:250) in 5 % Magermilchpulver bei 4 °C und nach Entfernen von überschüssigen nicht gebundenen Molekülen durch folgende Waschschr

- (1) 10 min in TBS (50 mM Tris HCl pH 7,4, 200 mM NaCl)
- (2) 10 min in TTBS (0,01 % Triton X in TBS)
- (3) 10 min in TBS

wurde mit einem 2. Antikörper (Meerrettich-Peroxidase konjugiertes goat anti-rabbit polyclonales IgG in Magermilchpulver 1:10000) für 60 min bei 4 °C inkubiert. Die Membran wurde erneut für zweimal 10 min in TBS gewaschen und schließlich durch das Chemilumineszenz-Verfahren (ECL-System) entwickelt.

Mit Hilfe des Fluor-D Multimager-System wurden die gefärbten Gele und die entwickelten Filme eingescannt und unter Verwendung der dazugehörigen Software Multianalyst ausgewertet. Aufgrund der Bandenbreite wurde für die Beschreibung des Molekulargewichtes

der obere und der untere Rand der einzelnen Banden bewertet und ein Mittelwert zur einfacheren Handhabung angegeben. Die Verteilung der Banden innerhalb einer Lane (Gesamtbandenfläche 100 %) wurde ermittelt und ist in Tab. 4- 10 im Anhang dargestellt.

Zweidimensionale Polyacrylamid Gel Elektrophorese (2D PAGE)

Für die Elektrophorese wurde die Probe entsalzt durch Dialyse gegen Aqua dest im Verhältnis 1:100 in Dialyseschläuchen mit einer Molekulargewichtstrenngrenze (Spectrum Laboratories NC, Rancho, Dominguez, CA, USA) von 1.000 Da über 24 h bei 4 °C. Anschließend wurde die Probe lyophilisiert (Bachhofer Vakuum Konzentrador) und resuspendiert in einer Solubilisierungslösung (9 M Harnstoff, 2 % Chaps, 1 % DTT, 0,8 % w/v 2-D Pharmalyte ph 3-10, 8 mM Pefablock SC).

Die 2D Polyacrylamidgele wurden nach der Vorschrift nach Goerg und Mitarbeiter [Görg et al.,1988] selbst hergestellt.

Im einzelnen sind folgende Lösungen vorbereitet worden:

Lösung I: 28,8 % Acryamid + 1,2 % Bisacrylamid

Lösung II: 1,5 M Tris HCl Puffer, pH 8,8 + 0,4 % SDS

Lösung III: 40 % Ammoniumpersulfat

Die Lösungen wurden anschließend nach folgendem Schema angesetzt und zum Gießen der Gele verwendet:

Sammelgel (6 %):

1,6 ml Lösung I

2,0 ml Aqua dest.

2,0 ml Lösung II

3,0 g Glycerin

Trenngel (12 %):

9,6 ml Lösung I

6,0 ml Aqua dest

6,0 ml Lösung II

3,0 g Glycerin

Direkt vor dem Gießen der einzelnen Ansätze wurden:

8 µl Lösung III

2,4 µl TEMED

24 µl Lösung III

7,2 µl TEMED

dazupipettiert, um den Polymerisationsprozeß durch Radikalbildung zu starten und Kettenbildung der Polymere zu erhalten.

Die Gele sind auf ein Gel Bond Film aufpolymerisiert worden für 30 min bei 50 °C (siehe Abb. 5.A-C)

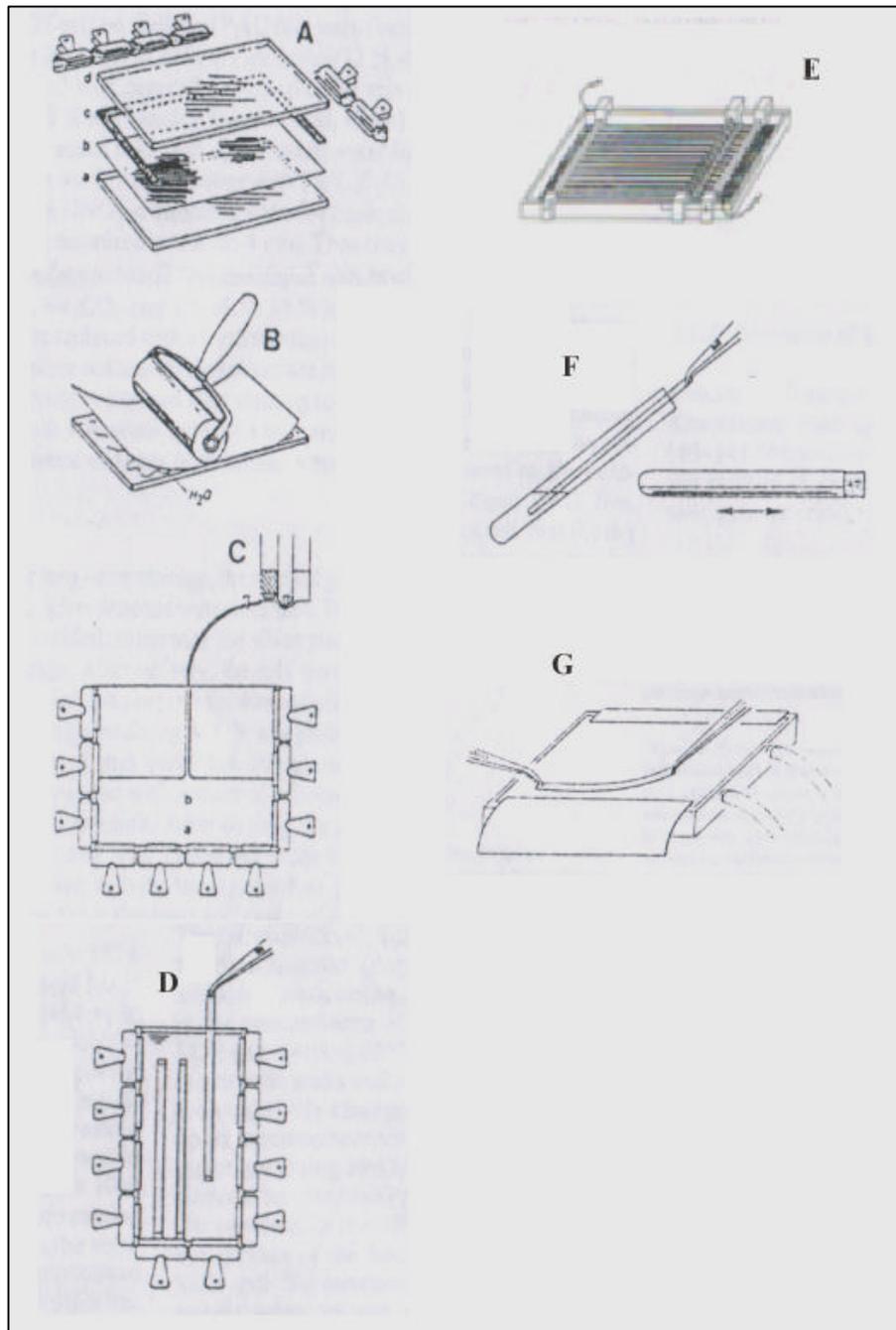


Abb. 5: 2D PAGE (nach Görg et al., 1988)

A-C Vorgehen beim Gießen der Gele,

D+E Isoelektrische Fokussierung

F+G Zweite Dimension

Die Isoelektrische Fokussierung erfolgte in den rehydrierten IPG-Gel Streifen (13 cm, pH 3-10) unter Verwendung des DryStripKit Rahmen der Multiphor Elektrophorese Kammer unter folgenden Bedingungen:

- (1) 30 min 150 V
- (2) 1 h 300 V
- (3) 1 h 600 V
- (4) 4 h 3500 V

Die Stromstärke und die Leistung wurden konstant gehalten bei 1 mA/ Streifen und 5 W (siehe Abb. 5. D+E).

Nachdem die IPG Gel Streifen erst in Lösung I [50 mM Tris HCl pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30 % Glycerin, 2 % SDS, 1 % DTT (65 mM), Bromphenolblau], dann in Lösung II [50 mM Tris HCl pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30 % Glycerin, 2 % SDS, 8 % Jodacetamid (220 mM), Bromphenolblau] äquilibriert wurden, erfolgte die Elektrophorese mit Hilfe der Multiphor Elektrophorese Kammer unter folgenden Bedingungen:

- (1) 200 V / 30 mA/ 30 W 1 h
- (2) 600 V / 30 mA/ 30 W 3 h.

Als Molekulargewichtsmarker wurde der LMW-Standard-Marker von Sigma (M 3913, Sigma, St. Louis, USA) [Albumin 66 kDa, Ovalbumin 45 kDa, Glycerinaldehyde 3 phosphate Dehydrogenase 36 kDa, Carbonanhydrase 29 kDa, Trypsinogen 24 kDa, Trypsinogen 24 kDa, Lactalbumin 14,2 kDa, Aprotinin 6,5 kDa] verwendet, nachdem dieser in Lämmli-Puffer (240 mM Tris HCl pH 6,8, 4,8 % SDS, 6 % Mercaptoethanol, 24 % Glycerin, 0,012 % Bromphenolblau) gelöst und bei 95 °C für 10 min gekocht wurde.

Das als Proteinstandard verwendete SP-Dth wurde ebenfalls vorher in Lämmli-Puffer gelöst und bei 95 °C 10 min gekocht.

Westernblotanalyse

Der Proteintransfer (Westernblot) der Proteinbanden aus der 2D PAGE auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte im horizontalen „Semidry Blotting“ Verfahren für 85 min bei konstanter Stromstärke von 0,8 mA/cm² Trenngeloberfläche und 20 V in Transferpuffer (25 mM Tris HCl, 190 mM Glycin, 0,1 % SDS, 20 % Methanol).

Zur Entwicklung der Nitrocellulosemembran wurde nach den gleichen Schritten wie in der 1 D SDS/PAGE vorgegangen.

2.2.6. Enzymatische Degradation des SP-D^{PAP}

Isoliertes SP-D^{PAP} (100 ng) wurde über mehrere Zeiträume (2 min; 10 min, 240 min) in zwei verschiedenen Enzymkonzentrationen des jeweiligen Enzymes in einem Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 6,5, 0,01 % NaN₃) in Ab- und Anwesenheit von 2 mM Ca⁺⁺ im Puffer bei 37 °C inkubiert.

Für die einzelnen Enzyme wurden folgende Konzentrationen verwendet: Humane Leukozyten Elastase (HLE; 57 µg/ml = 50 U/ml; 5,7 µg/ml = 5 U/ml); Humanes Leukozyten Cathepsin G (HCG; 11,36 µg/ml = 50 U/ml; 1,136 µg/ml = 5 U/ml); Humane Leukozyten Proteinase 3 (HLP 3; 11,44 µg/ml; 1,144 µg/ml); Pseudomonas aeruginosa Elastase (PAE; 9,5 µg/ml = 2,5 U/ml).

Dazu wurden erst der Puffer mit der jeweiligen Konzentration des Enzymes in 1,5 ml Eppendorfgefäßen [Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland] auf Eis vorgelegt, anschließend das SP-D^{PAP} dazupipettiert und der erste Zeitansatz t₁ = 2 min entnommen. Die Reaktion wurde durch sofortiges Lagern bei -60 °C gestoppt. Anschließend wurde der restliche Ansatz im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Nach 10 min wurde der Ansatz t₂ entnommen.

Als Kontrollversuche wurden:

- (1) SP-D^{PAP} ohne Enzym in Puffer über die Zeit (2 min; 10 min; 240 min) bei 37 °C
- (2) Vorherige Hemmung des Enzymes durch 5 mM PMSF für die Serinprotease HLE und HLP 3 bzw. 5 mM EDTA für die Metalloprotease PAE untersucht.

Die einzelnen Ansätze wurden bei -60 °C gelagert und in der SDS/PAGE dargestellt und ausgewertet.

2.2.7. Darstellung und funktionelle Assays des Abbauproduktes

Für die funktionellen Assays wurde ein Ansatz mit SP-D^{PAP} und HLE (5 U/ml) bei 37 °C über 240 min inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von 5 mM PMSF gestoppt. Ein Teil des Ansatzes wurde in der SDS/PAGE dargestellt und diente der Dokumentation der Degradation. Der andere Teil wurde für die Agglutination und den Bindungsassay sowie für die Sequenzierung verwendet.

Maltosebindungsassay

Um die Kohlenhydratbindungsfähigkeit des SP-D^{PAP} bzw. des Abbauproduktes festzustellen, wurde ein Zweiseiten-ELISA durchgeführt.

Im ersten Schritt wurde eine Mikrotiterplatte (Maxisorp C 96, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) mit Avidin (20 µg/ml in Carbonatpuffer [15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 6,9]) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde biotinylierte PAA–Maltose (Syntheson, Moskau, Rußland) (2 µg/ml in TBS/TC [10 mM Tris, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0,1 % Triton X-100, pH 7,4]) für eine Stunde bei Raumtemperatur gebunden. Nach dreimaligem Waschen mit TBS/TC (ELISA Waschstraße, Unitech, Gaißach, Deutschland) erfolgte eine Blockung mit einem Blockpuffer (TBS/TC 1 % BSA) über 1 Stunde bei 37 °C. Nach einem Waschgang (3 x TBS/TC) wurden der Standard und die Proben, welche 1:1 in Blockpuffer gelöst waren, aufgetragen. Als Standard diente das Ausgangs SP-D^{PAP} in einer Verdünnung von 200 ng/ml. Als Kontrollproben wurden SP-D^{PAP} + PMSF sowie SP-D^{PAP} +PMSF gehemmte Elastase und degradiertes SP-D^{PAP} untersucht. Die Platte wurde bei 37 °C zwei Stunden inkubiert. Nach dem Waschen (3 x TBS/TC) erfolgte das Auftragen des monoklonalen Maus-Antikörper gegen Ratten SP-D (BMA Biomedicals, Augst, Schweiz) in einer Konzentration von 0,2 µg/ml in Blockpuffer verdünnt und über eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach dem Waschen (3 x TBS/TC) wurde als zweiter Antikörper Anti-Maus IgG vom Kaninchen verwendet, welcher an Meerrettichperoxidase gekoppelt ist (Dianova, Hamburg, Deutschland). Er wurde 1:1000 in Blockpuffer verdünnt aufgetragen. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C und anschließendem Waschen (3 x TBS/TC) erfolgte die Substratreaktion als Umsetzung des Reagenz ABTS (Boehringer, Mannheim, Deutschland)(10 mg ABTS in 10 ml Citrat-Puffer pH 4,0,+ 10 µl H₂O₂ 30 %) welches zugegeben wurde und nach ca. 10 min, 30 min und 60 min wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm über ein Photometer Anthos II (Anthos, Salzburg, Österreich) gemessen. Die Berechnung der Standardkurve und der Probenmesswerte erfolgte computergestützt mit dem Programm Biolise (Biolise, Hombrechtikon, Schweiz).

Agglutination

Die ausgestrichenen Bakterien des Stammes *Pseudomonas aeruginosa* 16 (klinische Isolation eines Patienten mit Cystischer Fibrose) wurden in 10 ml TBS Puffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,4) eingerührt und eine OD von 2 photometrisch eingestellt. Nach einer Zentrifugation 10 min 10 000 g wird das gewonnene Pellet dreimal in TBS Puffer gewaschen. Das Pellet wurde nun in 1,3 ml TBS mit 20 mM Ca^{++} aufgenommen. Zu 1,5 μl dieser Bakteriensuspension wurden nun

- (1) 13,5 μl SP-D^{PAP} mit einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in TBS
- (2) 13,5 μl degradiertes SP-D^{PAP} [5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SP-D^{PAP} und 5 U/ml HLE] in TBS

auf einen Objektträger aufgebracht und unter einem Mikroskop auf Agglutinationen hin untersucht. Die Objektträger wurden angefärbt und zur Dokumentation fotografiert und ausgewertet.

Gelfiltration

Um eine Auftrennung des degradierten SP-D^{PAP} zu erzielen, wurde eine Gelfiltration mit Hilfe einer Superose 6 Säule durchgeführt (Details siehe 2.2.2.).

Dazu wurden 40 μg SP-D^{PAP} und HLE (5 U/ml) über 240 min bei 37 °C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde mit 5 mM PMSF gestoppt. Anschließend wurden in der SDS/PAGE ein Kontrollgel des inkubierten Ansatzes angefertigt.

Der restliche Ansatz wurde über eine Superose 6 Säule gegeben und die einzelnen Fraktionen in der SDS/PAGE untersucht und bei -70 °C aufbewahrt.

Aminosäuresequenzanalyse des degradierten SP-D^{PAP}

Die Aminosäuresequenzanalyse wurde mit dem Verfahren des schrittweisen Edman-Abbaues in einer Modifikation nach Hunkapiller durchgeführt und freundlicher Weise von Prof. Dr. Lotspeich (Max-Planck-Institut, Martinsried, Deutschland) übernommen.

Die verwendete Apparatur war ein Aminosäuresequenzer Procise 492 der Fa. Biosystems (Weiterstadt, Deutschland) mit On-Line PTH Analyser 140C und UV Detektor 785 A der Fa. Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die zu bestimmende Probe (2 µg SP-D^{PAP} und HLE 5 U/ml) war vorher 240 min bei 37 °C inkubiert worden. Die Enzymreaktion wurde durch 5 mM PMSF gestoppt.

2.2.8. Statistik

Falls nicht anders vermerkt, wurden alle Experimente, einschließlich der SDS-Gele und Westernblots mindestens 2- 3 mal reproduziert und je ein repräsentatives Ergebnis in einer Abbildung dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. SP-D^{PAP}

3.1.1. SP-D^{PAP} Isolierung

Das Surfactantprotein D, welches für die folgenden Untersuchungen verwendet wurde, ist aus gepoolter BAL von Patienten mit Alveolarproteinose nach der Methode Strong et al. (siehe 2.2.2.) isoliert worden. Es wurden die Fraktionen des in Abb. 6 mit einem Pfeil gekennzeichneten SP-D Peaks gewonnen.

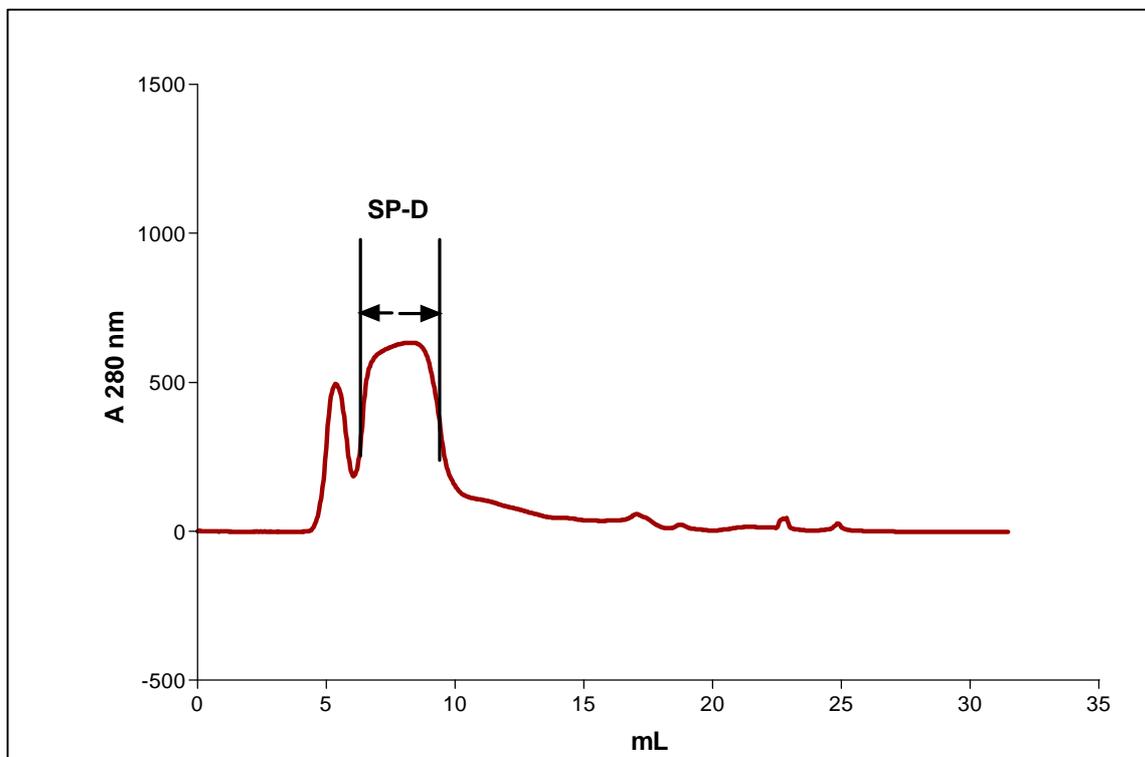


Abb. 6: Die Gelfiltration einer gepoolten PAP- BAL über eine Superose 6 Säule nach vorangegangener Maltose-Agarose-Affinitätschromatographie. Die Fraktionen des mit SP-D markierten Peaks wurden für die weiteren Experimente verwendet.

3.1.2. Darstellung des SP-D^{PAP} in der SDS/PAGE

Für die Molekulargewichtsanalyse des SP-D^{PAP} wurden SP-D^{rat}, SP-D^{rh} und SP-D^{PAP} in der SDS/PAGE aufgetrennt und mit anschließender Silberfärbung dargestellt und miteinander verglichen (Abb. 7).

Es konnte kein Unterschied festgestellt werden bezüglich des Molekulargewichtes der verschiedenen SP-D's. Das Molekulargewicht betrug unter reduzierenden Bedingungen je 47-51 kDa. Die Bandenbreiten verhielten sich proportional zu den aufgetragenen Proteinmengen.

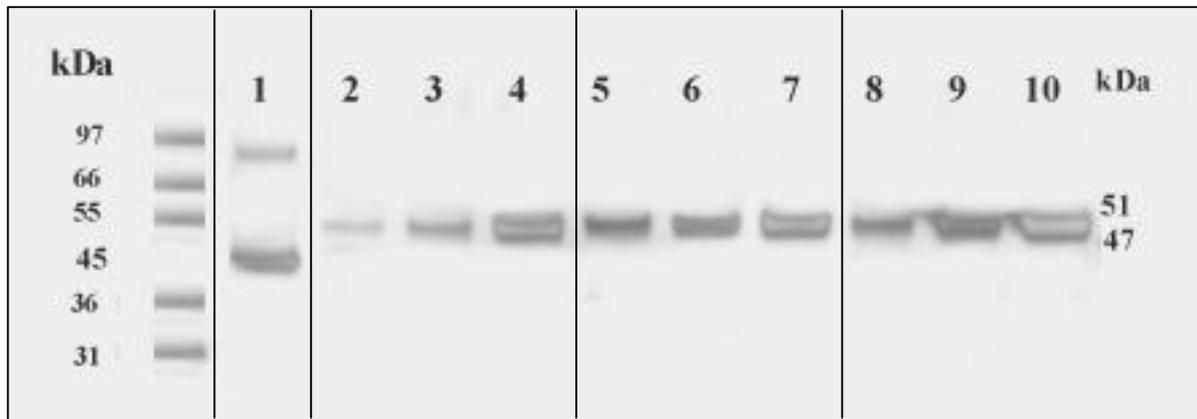


Abb. 7: Silberfärbung von SP-D^{rRat}, SP-D^{rh} und von SP-D^{PAP} nach SDS/PAGE [10 % Bis/Tris]

Die Darstellung des SP-D^{rRat} und SP-D^{rh} und SP-D^{PAP} in SDS/PAGE unter reduzierenden Bedingungen in drei verschiedenen Konzentrationen mit anschließender Silberfärbung. Als zusätzlicher Marker wurde Ovalbumin benutzt, welches ein Molekulargewicht von 45 kDa hat.

Lane 1: Ovalbumin 0,5 µg
 Lane 2-4: SP-D^{rRat} (2) 50 ng (3) 100 ng (4) 150 ng
 Lane 5-7: SP-D^{rh} (5) 50 ng (6) 100 ng (7) 150 ng
 Lane 8-10: SP-D^{PAP} (8) 50 ng (9) 100 ng (10) 150 ng

Diese Aussage konnte auch durch eine Westernblotanalyse bestätigt werden (Abb. 8). Zusätzlich wurden mit dieser sensitiveren Methode nicht reduzierbare Di- oder, schwächer sichtbar, Oligomere nachgewiesen (Abb. 8, Lane 5 und 6). In geringer Konzentration auch immunreaktive Banden bei 44 kDa.

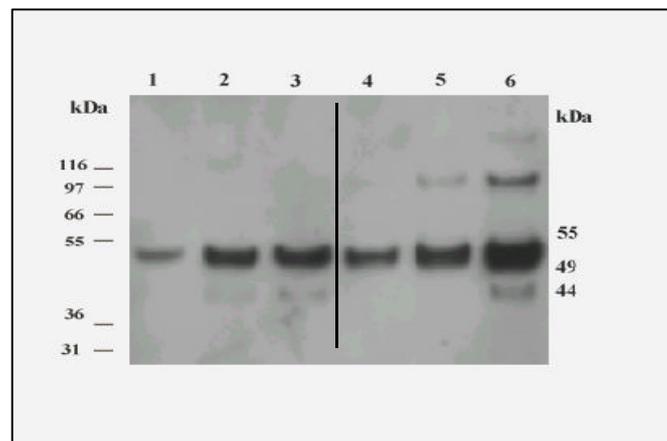


Abb. 8: Westernblotanalyse des SP-Dth und SP-D^{PAP} nach SDS/PAGE [10 % Bis/Tris]

Eine gemeinsame Darstellung des SP-Dth und SP-D^{PAP} in der SDS/PAGE unter reduzierenden Bedingungen und Westernblotanalyse mit antihuman SP-D, polyclonal

Lane 1-3: SP-Dth (1) 50 ng; (2) 100 ng; (3) 150 ng
Lane 4-6: SP-D^{PAP} (4) 50 ng; (5) 100 ng; (6) 150 ng

3.1.3. Darstellung des SP-D^{PAP} in der 2D PAGE

Um einen noch detaillierteren Überblick über das verwendete SP-D^{PAP} zu erhalten, wurde das isolierte Protein mittels der 2D PAGE aufgetrennt. Hier zeigen sich im isoelektrischen Bereich von pK 5-9 etwa 12 Spots mit einem Molekulargewicht von 47-51 kDa. Höhere, nicht reduzierbare Formen stellten sich bei einem pK 5-8 dar (siehe oberer Bildrand, Abb. 9).

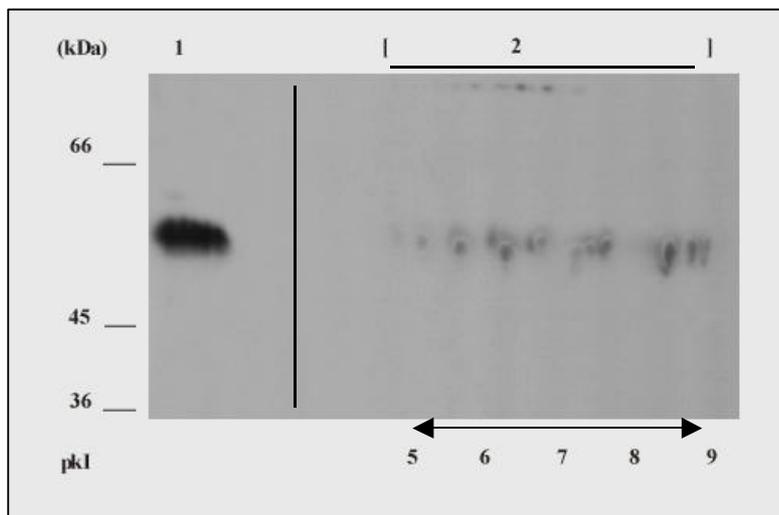


Abb. 9: Westernblotanalyse des SP-D^{PAP} nach 2D PAGE

Darstellung des SP-D^{PAP} (1000 ng) in der 2D PAGE unter reduzierenden Bedingungen und anschließender Westernblotanalyse mit polyclonalem antihuman SP-D.

- (1) SP-D^{rh} 200 ng wurde in der SDS/PAGE in der zweiten Dimension als SP-D-Standard verwendet.
- (2) SP-D^{PAP} 1000 ng.

3.1.4. SP-D und CF

Darstellung des SP-D in BAL von Patienten mit CF in der SDS/PAGE

Um Veränderungen des SP-D bei Patienten mit Cystischer Fibrose zu untersuchen, wurde BAL von vier verschiedenen Patienten mit CF elektrophoretisch aufgetrennt und in einer Westernblotanalyse SP-D mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen.

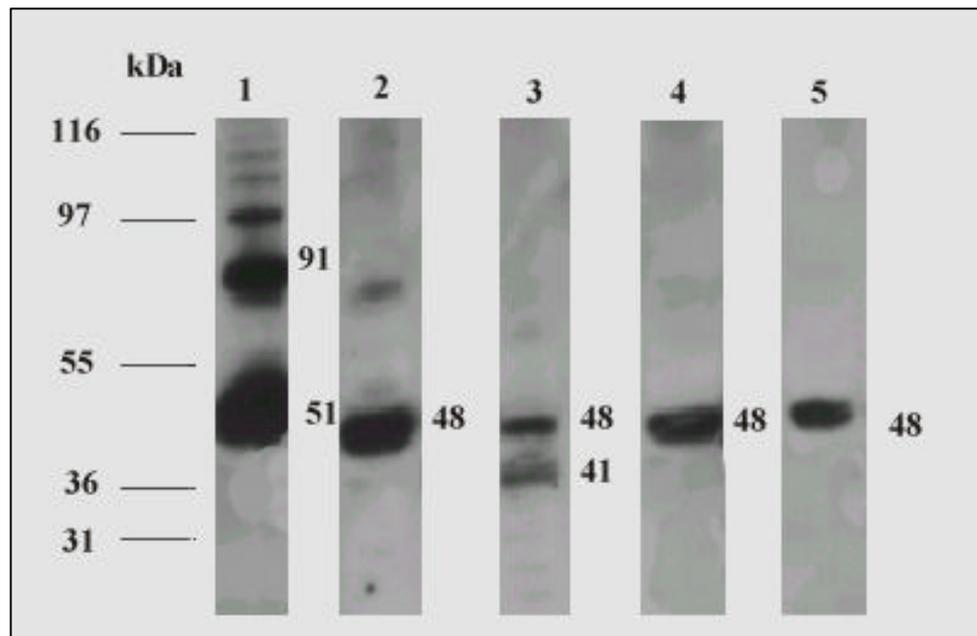


Abb. 10: Westernblotanalyse des SP-D nach SDS/PAGE [10 % Bis/Tris]

Darstellung des SP-D bei verschiedenen CF Patienten in der BAL in einer SDS/PAGE unter reduzierenden Bedingungen und Westernblotanalyse mit antihuman SP-D polyclonal

Lane 1: SP-D^{PAP} 150 ng als Standard verwendet
 Lane 2-5: verschiedene CF-Patienten, 80 µg Gesamtprotein pro Lane

Zuerst wurde BAL in einer Gesamtproteinmenge von 80 µg pro IPG- Streifen in der 2D PAGE aufgetragen. Jedoch konnte nach Westernblotanalyse mit polyclonalem antihuman SP-D kein SP-D detektiert werden. Dies wurde auf die geringen SP-D Konzentrationen der Proben zurückgeführt. Da für Wiederholungen mit höheren Proteinkonzentrationen das Patienten-material nicht ausreichend vorhanden war, wurde der Nachweis mittels SDS/PAGE geführt. Bei Verwendung einer Gesamtproteinmenge in der BAL von ebenfalls 80 µg Gesamtprotein pro Lane konnte SP-D nachgewiesen werden.

In jeder verwendeten Patientenprobe konnte eine Hauptbande bei 48 kDa erkannt werden (Abb. 10). Nur bei einer Probe war bei 41 kDa eine zusätzliche Bande zu beobachten (Abb. 10, Lane 3).

Tab. 2: Daten zu den einzelnen CF-Proben

Patienten Nummer der Probe	Geschlecht m/w	Alter bei BAL in Jahren	Gesamtprotein in µg/ml	SP-D Gehalt in ng/ml	HLE Aktivität in U/ml
1	M	14	224,0	*	*
2	M	14	135,0	52,5	0,9
3	W	15	108,0	28,7	1,5
4	W	15	183,0	12,8	1,31

* nicht messbar

3.2. Enzymatische Degradation des SP-D^{PAP}

Um eine mögliche enzymatische Degradation des SP-D^{PAP} zu untersuchen, wurde das SP-D^{PAP} mit drei verschiedenen Serinproteasen und einer Metalloprotease inkubiert.

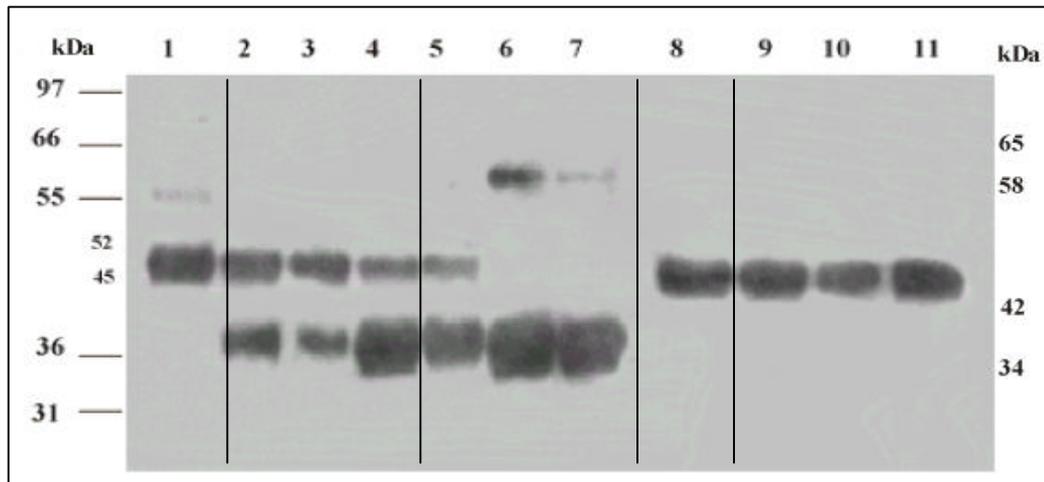
Der HLE wurde die größte Bedeutung zugemessen.

3.2.1. Humane Leukozyten Elastase (HLE)

Das SP-D^{PAP} wurde mit zwei Enzymkonzentrationen (50 U/ml; 5 U/ml) an HLE inkubiert und anschließend mit Hilfe der SDS/PAGE dargestellt.

50 U/ml Enzymkonzentration der HLE

a)



b)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SP-D ^{PAP} 0,5µg/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HLE 50U/ml	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Ca ⁺⁺ 2 mM	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Zeit (min)	0	2	10	240	2	10	240	0	2	10	240
PMSF 5 mM	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

1+8 jeweils als Standard genutzt

Abb. 11: Westernblotanalyse des SP-D^{PAP} nach SDS/PAGE [10 % Bis/Tris]

Die Inkubation des SP-D^{PAP} durch HLE in 50 U/ml Enzymkonzentration bei 37 °C über 3 verschiedene Zeitabschnitte in An- und Abwesenheit von Ca⁺⁺ im Puffer und PMSF-gehemmter HLE.

- Westernblotanalyse mit antihuman SP-D, polyclonal nach SDS/PAGE unter reduzierenden Bedingungen, densitometrische Auswertung siehe Tab. 4 im Anhang
- Ansätze der verschiedenen Lanes (Endvolumen des Ansatzes 200 µl)

Eine Inkubation von 100 ng SP-D^{PAP} in einer HLE-Konzentration von 50 U/ml bei 37 °C über drei verschiedene Zeitabschnitte (2; 10; 240 min) führte in Abhängigkeit des Ca⁺⁺-Gehaltes des Puffers zu einem Abbau des SP-D^{PAP}.

Bei Abwesenheit von Ca⁺⁺ im Puffer konnte ein schnellerer Abbau beobachtet werden.

So ist nach einer Zeit von 2 eine zusätzliche Bande bei 41-36 kDa zu erkennen, welche im Zeitverlauf an Intensität zunimmt. Nach 240 min ist in diesem Bereich nur noch eine 41-36 kDa Bande zu beobachten, jedoch erscheint eine Bande im 62 kDa Bereich. Diese könnte auf eine Anlagerung der abgespaltenen SP-D^{PAP} Ketten an noch vorhandenes SP-D^{PAP} oder an andere Proteinfragmente im Reaktionsgemisch zurückzuführen sein.

Bei einer Anwesenheit von Ca⁺⁺ im Puffer kommt es zu einer zeitlichen Verzögerung des Abbaues des SP-D^{PAP}, d.h. nach einer Zeit von 240 min ist die 48 kDa Bande noch vorhanden, der Anteil der niedermolekularen Bande hat jedoch deutlich zugenommen.

Durch eine Inaktivierung der HLE durch den Proteinaseinhibitor PMSF läßt sich die Degradation des SP-D^{PAP} komplett hemmen.

5 U/ml Konzentration der HLE

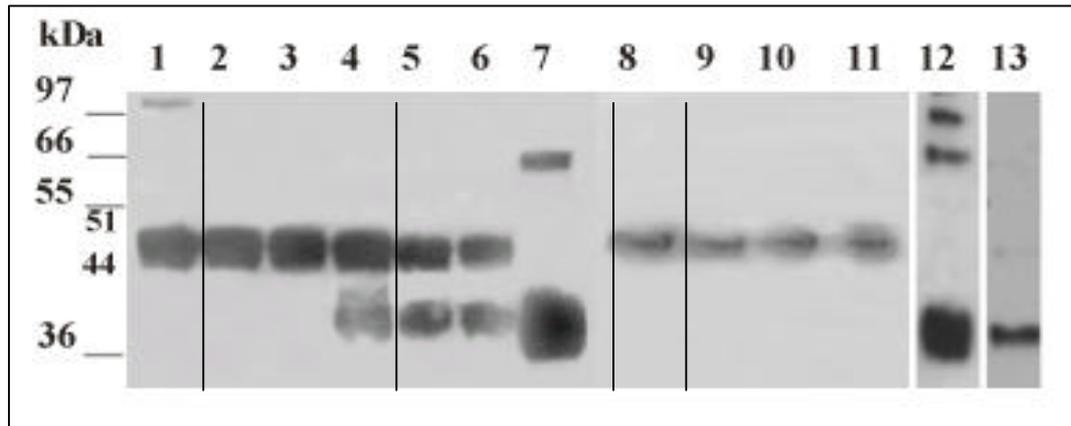
Auch bei einer HLE-Konzentration von 5 U/ml konnte nach einer Inkubation von 100 ng SP-D^{PAP} über drei verschiedene Zeitabschnitte (2; 10; 240 min) bei 37 °C ebenfalls ein Abbau des SP-D^{PAP} beobachtet werden (Abb. 12).

Auch hier führte die Abwesenheit von Ca⁺⁺ zu einer schnelleren proteolytischen Degradation. Jedoch war dies aufgrund der niedrigeren Enzymkonzentration der HLE zeitlich etwas verzögert. So verschwand die 48 kDa Bande bei simultanem Sichtbarwerden der 62 kDa Bande erst nach 240 min.

Bei einer Anwesenheit von Ca⁺⁺ im Puffer verzögert sich der Abbau noch weiter und erst nach 240 min war die 38 kDa Bande zu erkennen.

Auch unter diesen Bedingungen ist nach einer Hemmung der HLE durch PMSF keine Veränderung des SP-D^{PAP} zu erkennen.

a)



b)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
SP-D ^{PAP} 0,5 µg/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HLE 5U/ml	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Ca ⁺⁺ 2 mM	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zeit (min)	0	2	10	240	2	10	240	0	2	10	240	8h	24h
PMSF 5 mM	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-

1+8 jeweils als Standard genutzt

Abb. 12: Westernblotanalyse des SP-D^{PAP} nach SDS/PAGE [10 % Bis/Tris]

Die Inkubation des SP-D^{PAP} durch HLE in 5 U/ml Enzymkonzentration bei 37 °C über 3 verschiedene Zeitabschnitte in An- und Abwesenheit von Ca⁺⁺ im Puffer und PMSF gehemmter HLE.

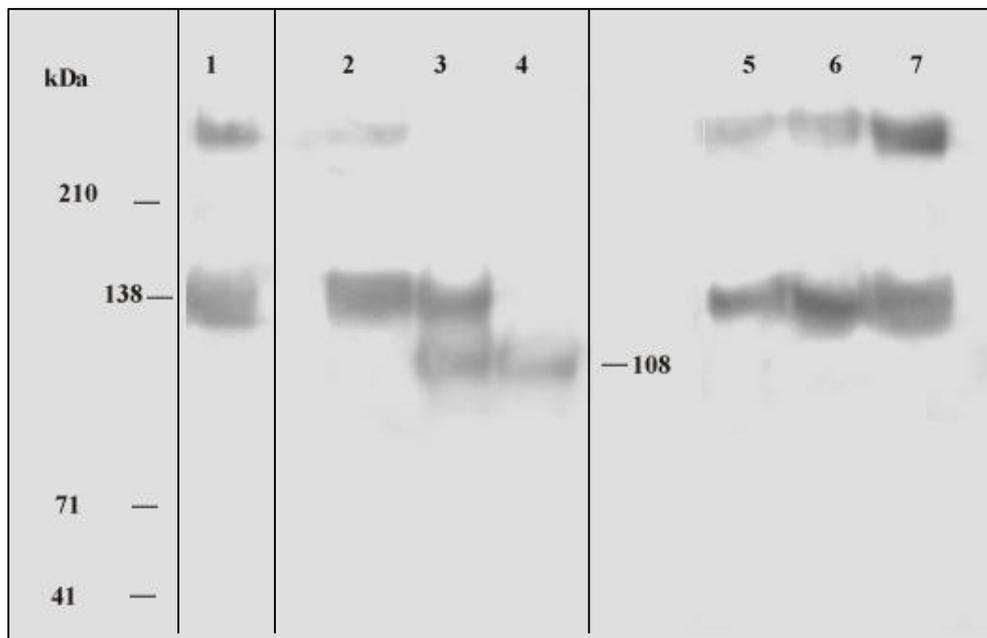
- Westernblotanalyse mit antihuman SP-D, polyclonal nach SDS/PAGE unter reduzierenden Bedingungen, densitometrische Auswertung siehe Tab. 5 im Anhang
- Ansätze der verschiedenen Lanes (Endvolumen 200 µl)

Ebenfalls nach einer Inkubation des SP-D^{PAP} mit einer HLE-Konzentration von 5 U/ml und einer Darstellung in der SDS/PAGE unter denaturierenden, aber nicht reduzierenden Bedingungen, ist eine degradative Veränderung des SP-D^{PAP} zu erkennen (Abb. 13).

Das Molekulargewicht des Ausgangs SP-D^{PAP} liegt bei 138 kDa. Nach 10 min proteolytischer Degradation ist eine zusätzliche niedermolekulare Bande bei 108 kDa sichtbar. Nach 240 min ist nur noch diese 108 kDa Bande allein zu beobachten.

Durch eine PMSF-Hemmung der HLE kommt es zu keiner Veränderung des SP-D^{PAP}.

a)



b)

	1	2	3	4	5	6	7
SP-D ^{PAP} 0,5 µg/ml	+	+	+	+	+	+	+
HLE 5 U/ml	-	+	+	+	+	+	+
Ca ⁺⁺ 2 mM	-	-	-	-	-	-	-
Zeit (min)	0	2	10	240	2	10	240
PMSF 5 mM	-	-	-	-	+	+	+

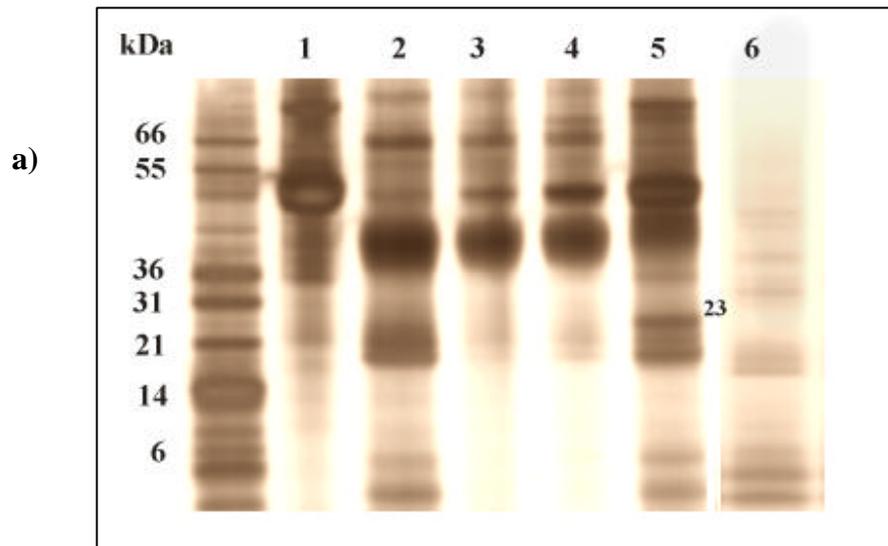
1 als Standard genutzt

Abb. 13: Westernblotanalyse des SP-D^{PAP} nach SDS /PAGE [Tris Acetat 3- 8 %]

Die Inkubation des SP-D^{PAP} durch HLE in 5 U/ml Enzymkonzentration bei 37 °C über 3 verschiedene Zeitabschnitte Abwesenheit von Ca⁺⁺ im Puffer und PMSF-gehemmter HLE.

- Westernblotanalyse mit spezifischem Antikörper (antihuman SP-D, polyclonal) nach SDS/PAGE denaturierenden, nicht reduzierenden Bedingungen
- Ansätze der verschiedenen Lanes (Endvolumen der Ansatzes 200 µl)

Nach einer Inkubation des SP-D^{PAP} mit 5 U/ml HLE mit anschließender SDS/PAGE und Silberfärbung ist auch hier eine Degradation zu erkennen. Nach 90 min erscheint eine zusätzliche Bande bei 23 kDa.



b)

	1	2	3	4	5	6
SP-D ^{PAP} 100 ng	+	+	+	+	+	-
HLE 1 U	-	+	+	+	+	+
Ca ⁺⁺ 2 mM	-	-	-	-	-	-
Zeit (min)	0	2	30	60	90	0

Abb. 14: Silberfärbung des SP-D^{PAP} nach SDS/PAGE [10 % Bis/Tris]

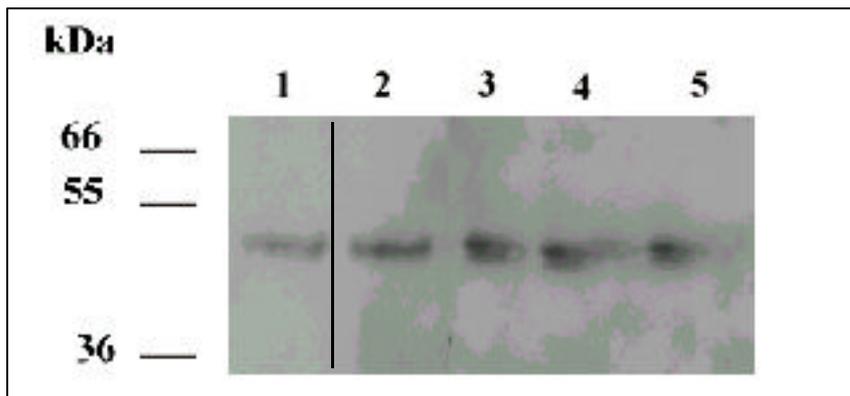
Die Inkubation des SP-D^{PAP} durch HLE in 5 U/ml Enzymkonzentration bei 37 °C über 3 verschiedene Zeitabschnitte

- Silberfärbung nach SDS/PAGE unter reduzierenden Bedingungen
- Ansätze der verschiedenen Lanes (Endvolumen 200 µl)

Kontrollversuche-Ansatz in Abwesenheit von HLE

Um eine Veränderung des SP-D^{PAP} schon allein durch die Temperatur (37 °C) und den Versuchspuffer auszuschließen, wurde SP-D^{PAP} parallel zu den oben beschriebenen Experimenten ohne Enzym über drei verschiedene Zeitabschnitte bei 37 °C in Puffer inkubiert und in der SDS/PAGE und Westernblotanalyse dargestellt.

a)



b)

	1	2	3	4	5
SP-D ^{PAP} 0,5 µg/ml	+	+	+	+	+
Enzym	-	-	-	-	-
Ca ⁺⁺ 2 mM	-	-	-	-	-
Zeit (min)	0	2	10	60	240

1= als Standard genutzt

Abb. 15: Westernblotanalyse des SP-D^{PAP} nach SDS/PAGE [10 % Bis/Tris]

Inkubation des SP-D^{PAP} bei 37 °C ohne Enzym in Puffer ohne Ca⁺⁺.

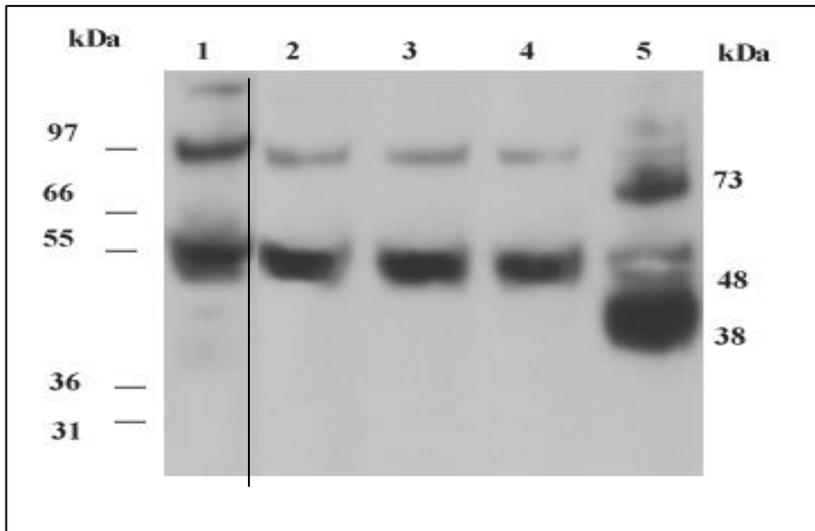
- Westernblotanalyse mit antihuman SP-D, polyclonal nach SDS/PAGE unter reduzierenden Bedingungen
- Ansätze der verschiedenen Lanes (Endvolumen des Ansatzes 200 µl)

Bei einer Inkubation des SP-D^{PAP} ohne Enzymzugabe bei 37 °C über drei verschiedene Zeitabschnitte in Puffer ohne Ca⁺⁺ konnte keine Veränderung des SP-D^{PAP} gesehen werden.

Kontrollversuche-hitzeinaktivierte HLE

Eine andere Form der Enzymhemmung durch Denaturierung ist die Hitzeinaktivierung.

a)



b)

	1	2	3	4	5
SP-D ^{PAP} 0,5 µg/ml	+	+	+	+	+
HLE 5 U/ml	-	+	+	+	+
Ca ⁺⁺ 2 mM	-	-	-	-	-
Zeit (min)	0	2	60	240	1440 (24 h)

1= als Standard benutzt

Abb. 16: Westernblotanalyse des SP-D^{PAP} nach SDS/PAGE [10 % Bis/Tris]

Inkubation des SP-D^{PAP} mit hitzeinaktivierter HLE in einer Konzentration von 5 U/ml bei 37 °C in Puffer ohne Ca⁺⁺, wobei die HLE im Vorfeld für 30 min bei 95 °C gekocht wurde.

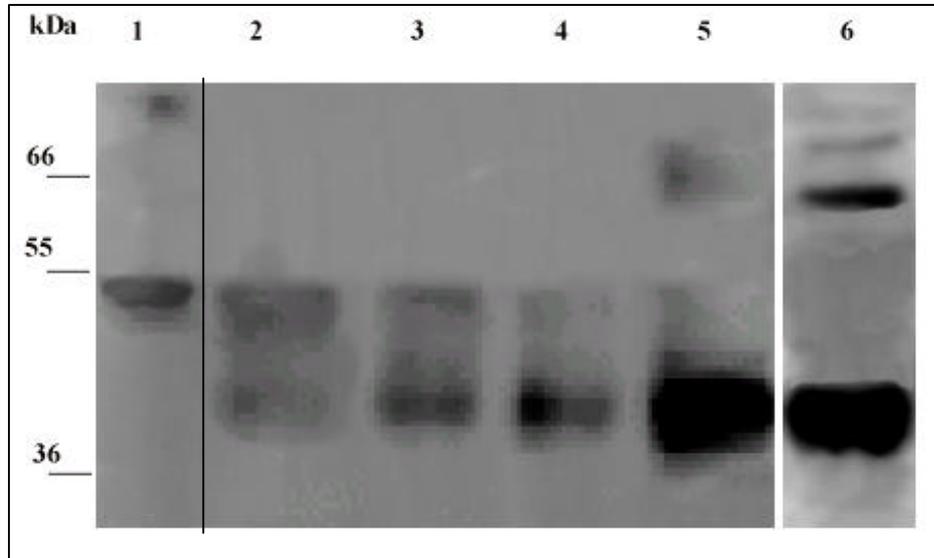
- a) Westernblotanalyse mit antihuman SP-D, polyclonal nach SDS/PAGE unter reduzierenden Bedingungen
 b) Ansätze der verschiedenen Lanes (Endvolumen des Ansatzes 200 µl)

Nach einer Inkubation des SP-D^{PAP} mit hitzeinaktivierter HLE bei einer Konzentration von 5 U/ml in Puffer konnte erst nach einer Zeit von 24 h eine Veränderung des SP-D^{PAP} erkannt werden. Es erscheinen eine niedermolekulare Bande von 42-52 kDa und eine 62 kDa Bande zur schwächer werdenden 51 kDa Bande. Möglicherweise kam es nicht zu einer vollständigen Hemmung der HLE durch Hitze und ein Rest konnte aktiv bleiben und somit das SP-D^{PAP} proteolytisch spalten.

3.2.2. Humanes Leukozyten Cathepsin G (HCG)

50 U/ml Enzymkonzentration des HCG

a)



b)

	1	2	3	4	5	6
SP-D ^{PAP} 0,5 µg/ml	+	+	+	+	+	+
HLC G 50U/ml	-	+	+	+	+	+
Ca ⁺⁺ 2 mM	-	-	-	-	-	-
Zeit (min)	0	2	30	60	90	8h

1= als Standard genutzt

Abb. 17: Westernblotanalyse des SP-D^{PAP} nach SDS/PAGE [10 % Bis/Tris]

Inkubation des SP-D^{PAP} durch HCG in 50 U/ml Enzymkonzentration bei 37 °C über 4 verschiedene Zeitabschnitte.

- Westernblotanalyse mit antihuman SP-D, polyclonal nach SDS/PAGE unter reduzierenden Bedingungen, densitometrische Auswertung siehe Tab. 8 im Anhang.
- Ansätze der verschiedenen Lanes (Endvolumen des Ansatzes 200 µl)

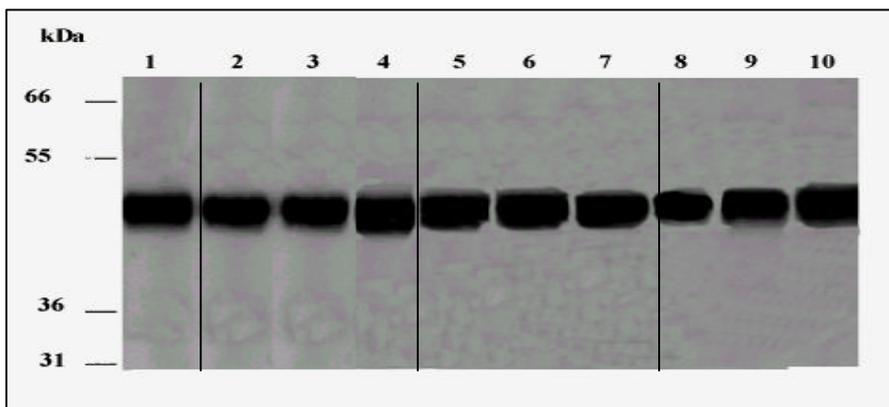
Nach einer Inkubation des SP-D^{PAP} bei einer HCG Konzentration von 50 U/ml bei 37 °C über 4 verschiedene Zeitabschnitte (2; 30; 60; 90 min) konnte eine Degradation des SP-D^{PAP} beobachtet werden.

Nach 30 min ist eine zusätzliche Bande bei 38 kDa zu erkennen, welche zeitabhängig an Intensität zunimmt. Nach dem fast vollständigen Verschwinden der 48 kDa Bande nach 90 min, ist im Bereich von 62 kDa eine schwache Bande sichtbar.

Wie schon bei der HLE ist diese 62 kDa Bande wahrscheinlich auf die Zusammenlagerung von proteolytisch abgespaltenen SP-D^{PAP} Fragmenten an noch vorhandenes SP-D^{PAP} bzw. Proteinfragmenten zurückzuführen.

5 U/ml Enzymkonzentration der HCG

a)



b)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SP-D ^{PAP} 0,5 µg/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HLC G 5 U/ml	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ca ⁺⁺ 2 mM	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Zeit (min)	0	2	10	240	2	10	240	2	10	240
PMSF 5 mM	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

1= als Standard benutzt

Abb. 18: Westernblotanalyse des SP-D^{PAP} nach SDS/PAGE [10 % Bis/Tris]

Inkubation des SP-D^{PAP} durch HCG in 5 U/ml Enzymkonzentration bei 37 °C.

- Westernblotanalyse mit antihuman SP-D, polyclonal nach SDS/PAGE unter reduzierenden Bedingungen, densitometrische Auswertung siehe Tab. 9 im Anhang
- Ansätze der verschiedenen Lanes (Endvolumen des Ansatzes 200 µl)

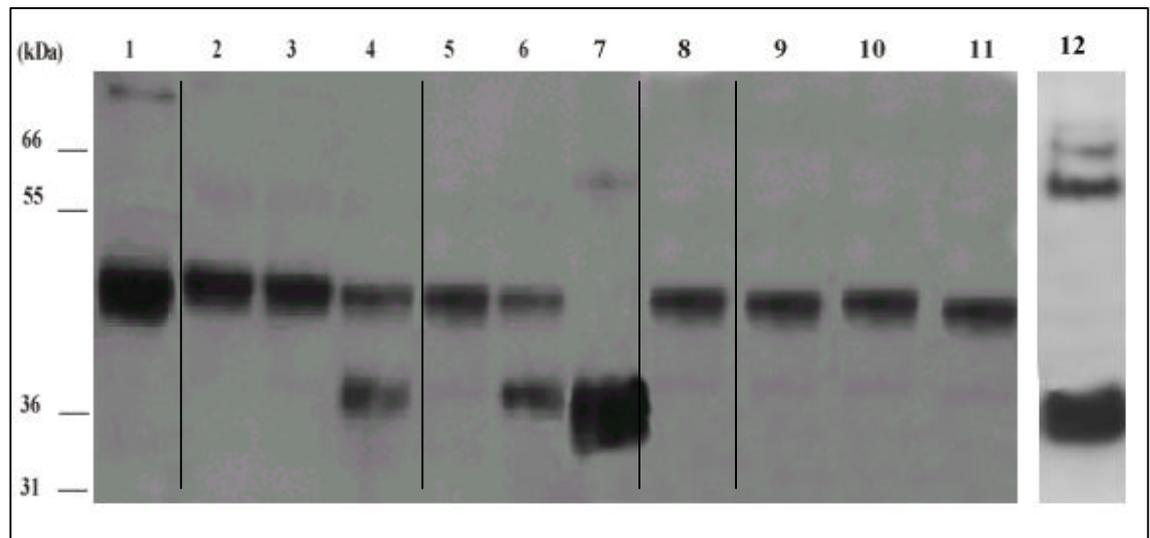
Nach einer Inkubation des SP-D^{PAP} in einer Enzymkonzentration von 5 U/ml des HCG ist keine Veränderung des SP-D^{PAP} sichtbar.

3.2.3. Humane Leukozyten Proteinase 3 (HLP 3)

Als weitere Protease wurde die Humane Leukozyten Proteinase 3 untersucht. Auch hier wurde eine proteolytische Degradation erwartet. Das SP-D^{PAP} wurde mit zwei verschiedenen Enzymkonzentration über drei verschiedene Zeitabschnitte inkubiert und in der Westernblot-Analyse auf eine Degradation des SP-D^{PAP} analysiert.

11,44 µg/ml Enzymkonzentration der HLP 3

a)



b)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
SP-D ^{PAP} 0,5 µg/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HLP 3 11,44 µg/ml	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Ca ⁺⁺ 2 mM	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Zeit (min)	0	2	10	240	2	10	240	0	2	10	240	8 h
PMSF 5 mM	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-

1+8 = als Standard genutzt

Abb. 19: Westernblotanalyse des SP-D^{PAP} nach SDS/PAGE [10 % Bis/Tris]

Inkubation des SP-D^{PAP} mit HLP 3 in 11,44 µg/ml Enzymkonzentration bei 37 °C über 3 verschiedene Zeitabschnitte in An- und Abwesenheit von Ca⁺⁺ im Puffer und PMSF Hemmung der HLP.

- Westernblotanalyse mit antihuman SP-D, polyclonal nach SDS/PAGE unter reduzierenden Bedingungen, densitometrische Auswertung siehe Tab. 6 im Anhang
- Ansätze der verschiedenen Lanes (Endvolumen des Ansatzes 200 µl)

Es konnte auch bei der Inkubation des SP-D^{PAP} mit der HLP 3 in einer Enzymkonzentration von 11,44 mg/ml eine proteolytische Degradation des SP-D^{PAP} festgestellt werden.

Auch hier ist diese vom Ca⁺⁺-Gehaltes des Puffers abhängig.

Ohne Ca⁺⁺ ist nach 10 min eine 38 kDa Bande zu erkennen, welche nach 240 min in diesem Bereich nach Verschwinden der 48 kDa Bande allein sichtbar ist. Ebenfalls zu beobachten ist die 62 kDa Bande nach 240 min, welche bei der HLE und der HLC G schon zu erkennen waren. Durch die Anwesenheit von Ca⁺⁺ im Puffer kommt es genau wie auch bei der HLE, zu einer zeitlichen Verzögerung des Abbaues, so daß erst nach 240 min eine 38 kDa Bande erscheint.

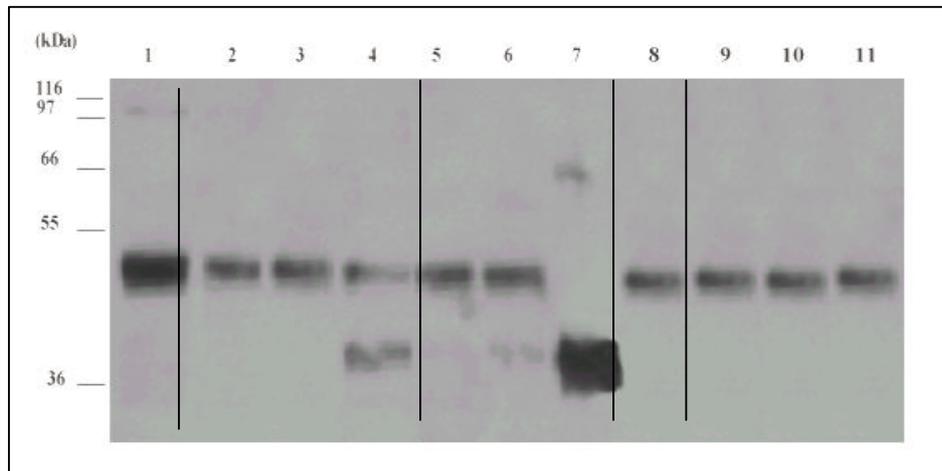
Durch Zugabe des Proteaseninhibitors PMSF läßt sich die Degradation des SP-D^{PAP} vollständig hemmen.

1,144 µg/ml Enzymkonzentration der HLP 3

Auch bei einer Enzymkonzentration von 1,144 µg/ml der HLP 3 konnte ein Abbau des SP-D^{PAP} beobachtet werden, abhängig ebenfalls vom Ca⁺⁺-Gehalt des Puffers. Ist dem Puffer kein Ca⁺⁺ zugefügt, verschwindet nach 240 min die 48 kDa Bande unter Erscheinen der 38 kDa und der 62 kDa Bande. Bei einer Anwesenheit von Ca⁺⁺ ist erst nach 240 min eine 38 kDa Bande zu beobachten.

Nach einer PMSF Hemmung ist auch hier keine Veränderung des Erscheinungsbildes des SP-D^{PAP} zu erkennen.

a)



b)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SP-D ^{PAP} 0,5 µg/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HLP 3 1,144 µg/ml	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Ca ⁺⁺ 2 mM	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Zeit (min)	0	2	10	240	2	10	240	0	2	10	240
PMSF 5 mM	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

1+8 = als Standard genutzt

Abb. 20: Westernblotanalyse des SP-D^{PAP} nach SDS /PAGE [10 % Bis/Tris]

Die Inkubation des SP-D^{PAP} mit HLP 3 in 1,14 µg/ml Enzymkonzentration bei 37 °C über 3 verschiedene Zeitabschnitte in An- und Abwesenheit von Ca⁺⁺ im Puffer und PMSF Hemmung der HLP 3.

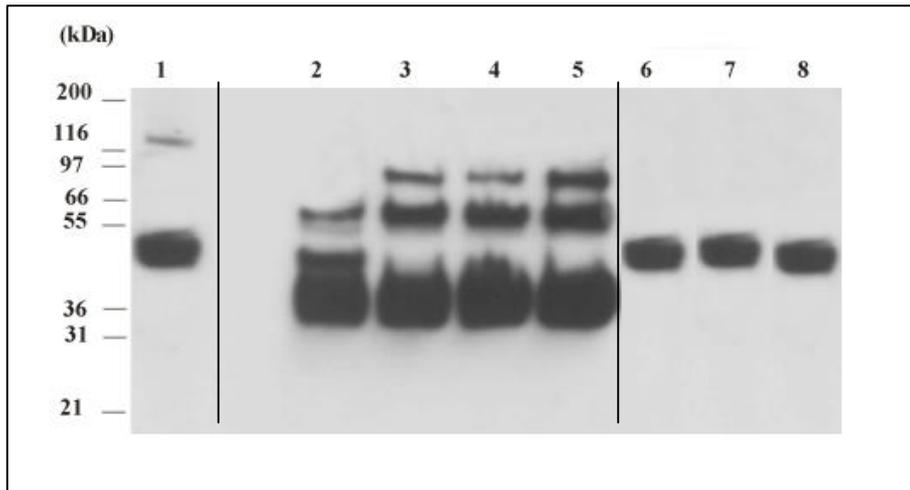
- Westernblotanalyse mit antihuman SP-D, polyclonal nach SDS/PAGE unter reduzierenden Bedingungen, densitometrische Auswertung siehe Tab. 7 im Anhang
- Ansätze der verschiedenen Lanes (Endvolumen des Ansatzes 200 µl)

3.2.4. *Pseudomonas aeruginosa* Elastase (PAE)

Die Metalloprotease PAE wurde mit SP-D^{PAP} in einer Enzymkonzentration von 2,5 U/ml über verschiedenen Zeitabschnitte bei 37 °C inkubiert.

2,5 U/ml Enzymkonzentration der PAE

a)



b)

	1	2	3	4	5	6	7	8
SP-D ^{PAP} 0,5 µg/ml	+	+	+	+	+	+	+	+
PAE 2,5 U/ml	-	+	+	+	+	+	+	+
Ca ⁺⁺ 2 mM	-	-	-	-	-	-	-	-
Zeit (min)	0	2	60	240	1440/ 24h	2	10	240
EDTA 5 mM	-	-	-	-	-	+	+	+

1= als Standard genutzt

Abb. 21: Westernblotanalyse des SP-D^{PAP} nach SDS/PAGE [10 % Bis/Tris]

Inkubation des SP-D^{PAP} durch PAE in 2,5 U/ml Enzymkonzentration bei 37 °C über 3 verschiedene Zeitabschnitte in Abwesenheit von Ca⁺⁺ im Puffer und EDTA-gehemmter PAE.

- Westernblotanalyse mit antihuman SP-D, polyclonal nach SDS/PAGE unter reduzierenden Bedingungen, densitometrische Auswertung siehe Tab. 10 im Anhang
- Ansätze der verschiedenen Lanes (Endvolumen des Ansatzes 200 µl)

Bei einer Inkubation des SP-D^{PAP} mit PAE in einer Enzymkonzentration von 2,5 U/ml ist eine Degradation des SP-D^{PAP} zu erkennen.

Schon nach 2 ist ein intensive Bande im 34 kDa Bereich sichtbar. Mit dem Verschwinden der 48 kDa Bande nach 60 min, nehmen die höhermolekularen Banden im Bereich (62 kDa, 88 kDa) zu.

Durch eine Inaktivierung der PAE durch EDTA ist keine Degradation des SP-D^{PAP} zu beobachten.

3.3. Funktionelle Assay

3.3.1. Maltosebindungsassay

Um funktionelle Veränderungen des proteolytisch degradierten SP-D^{PAP} zu erkennen, wurde die Bindungsfähigkeit an Maltose untersucht. Es wurden degradiertes SP-D^{PAP} mit unverändertem SP-D^{PAP} in einem Zweiseiten ELISA miteinander verglichen.

Da die Enzymreaktion durch die Zugabe von 5 mM PMSF gestoppt wurde (siehe 2.2.6), sind mehrere Kontrollansätze (2) SP-D^{PAP} und PMSF und (3) SP-D^{PAP} und PMSF gehemmte HLE ebenfalls mit untersucht worden (n =3).

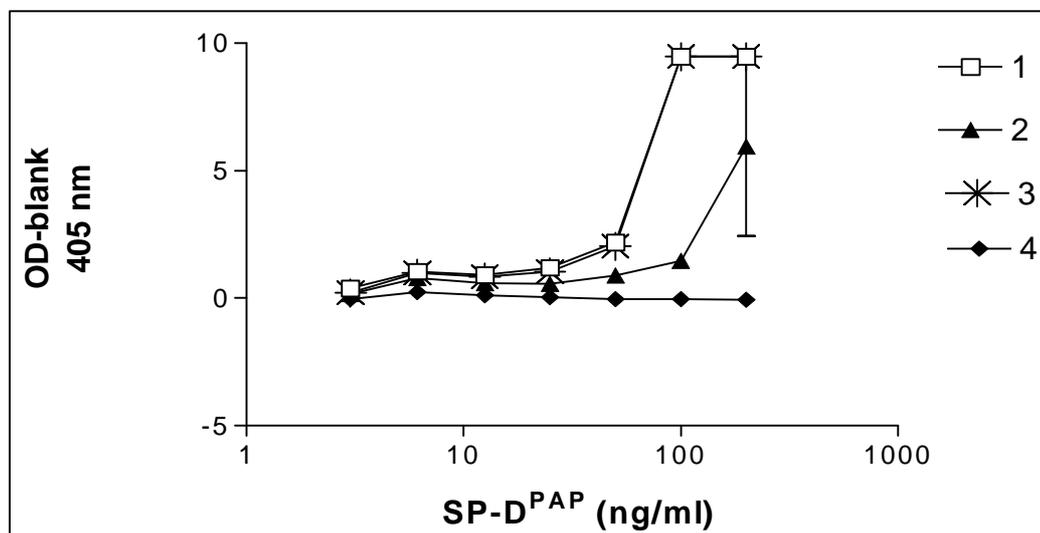


Abb. 22: Kohlenhydratbindungassay des SP-D^{PAP}

Graph 1: SP-D^{PAP}

Graph 2: SP-D^{PAP} und 5 mM PMSF

Graph 3: SP-D^{PAP} und durch 5 mM PMSF gehemmter HLE

Graph 4: SP-D^{PAP} mit HLE (5 U/ml) nach Inkubation von 240 min bei 37 °C

Nach Inkubation des SP-D^{PAP} mit 5 U/ml HLE über 240 min bei 37 °C konnte anschließend keine Bindung des SP-D^{PAP} an Maltose mehr beobachtet werden. 5 mM PMSF allein führte bereits zu einer gewissen Hemmung der Bindung von SP-D^{PAP} an Maltose (Graph 2).

3.3.2. Agglutination

Als weitere auf mögliche Veränderungen untersuchte funktionelle Eigenschaft des SP-D^{PAP} wurde das Agglutinationsverhalten gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* (Stamm 16) untersucht.

Unbehandeltes SP-D^{PAP} führte zu einer deutlichen Agglutination (Abb. 23), während das proteolytisch degradierte SP-D^{PAP} die Bakterien nicht zu agglutinieren vermochte (Abb. 24).

Als Kontrolle diente die reine Bakteriensuspension (Abb. 25).

n=2

Material	Makroskopisch	mikroskopisch
SP-D ^{PAP} 5 µg/ml	-	+
SP-D ^{PAP} degradiert 5 µg/ml	-	-
Bakteriensuspension allein	-	-

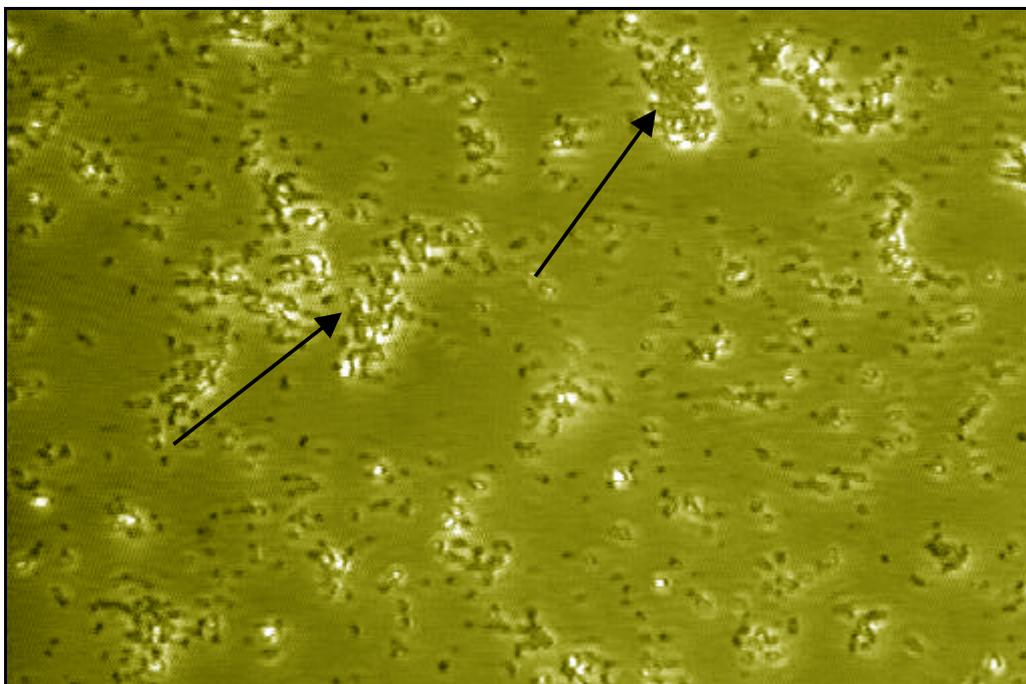


Abb. 23: Agglutination von *Ps. aeruginosa* durch SP-D^{PAP}

SP-D^{PAP} (5 µg/ml), *Ps. aeruginosa* (OD 1,5) Stamm 16 in TBS

Pfeile deuten auf die Agglutinate

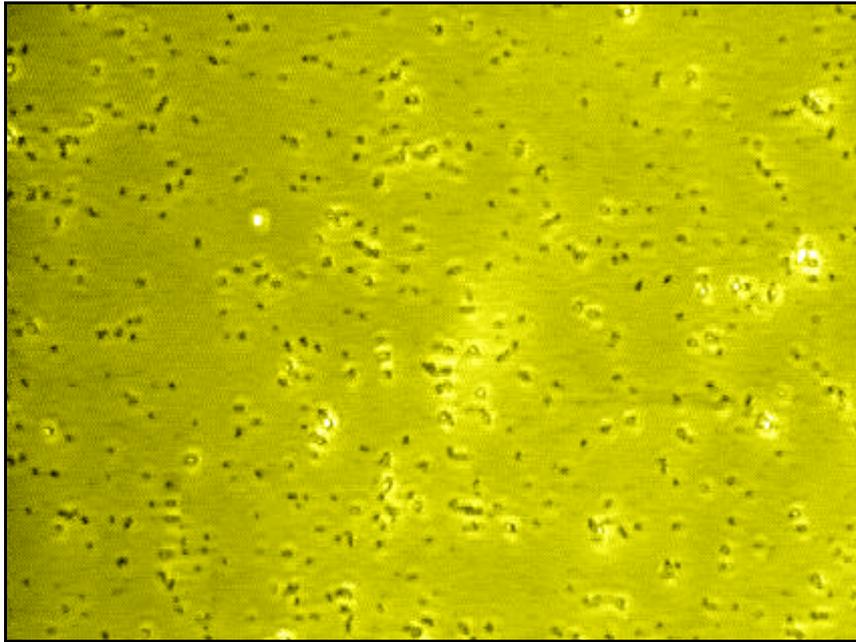


Abb. 24: Agglutinationsverhalten des SP-D^{PAP}

SP-D^{PAP} (5 µg/ml) nach 240 min Inkubation mit HLE (5 U/ml) und Ps.aeruginosa Stamm 16 (OD 1,5) in TBS, keine Agglutinate.

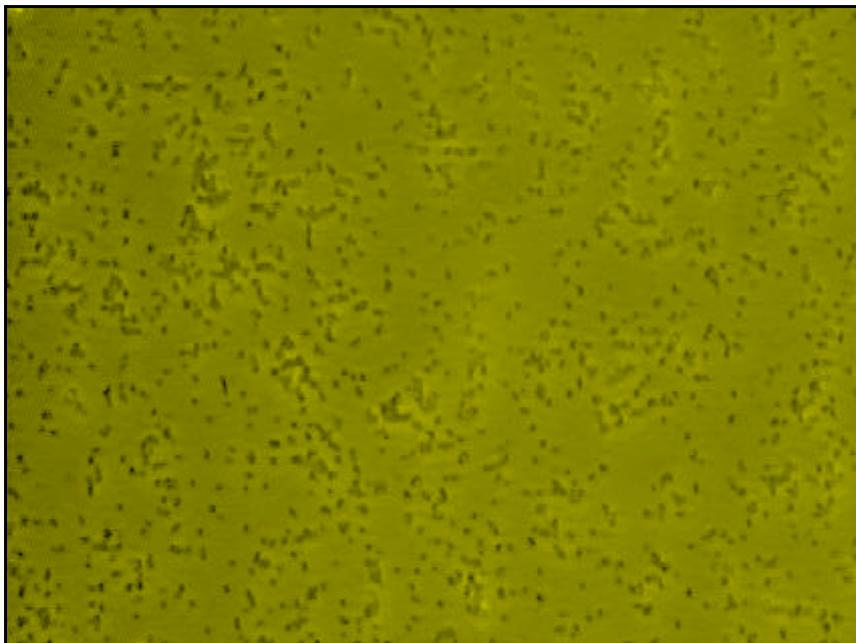


Abb. 25: Kontrollversuch

Bakteriensuspension der Pseudomonas aeruginosa Stamm 16; OD 1,5
Keine Agglutinate.

III.4. Darstellung des degradierten SP-D^{PAP}

3.4.1. Gelfiltration

Um einen Überblick über die makromolekulare Organisation von SP-D^{PAP} vor und nach Inkubation mit HLE zu bekommen, erfolgte die Auftrennung über eine Superose 6 Säule. Zunächst wurde ein Aliquot des Versuchsansatzes (40 µg SP-D^{PAP} und HLE 5 U/ml, 240 min 37 °C) in der SDS/PAGE mit anschließender Silberfärbung und Westernblotanalyse untersucht, wobei auch hier eine Degradation des SP-D^{PAP} zu erkennen ist (siehe Abb. 26, A Lane 2 und B Lane 2). Das Ergebnis der Gelfiltration ist in der Abb. 27 dargestellt.

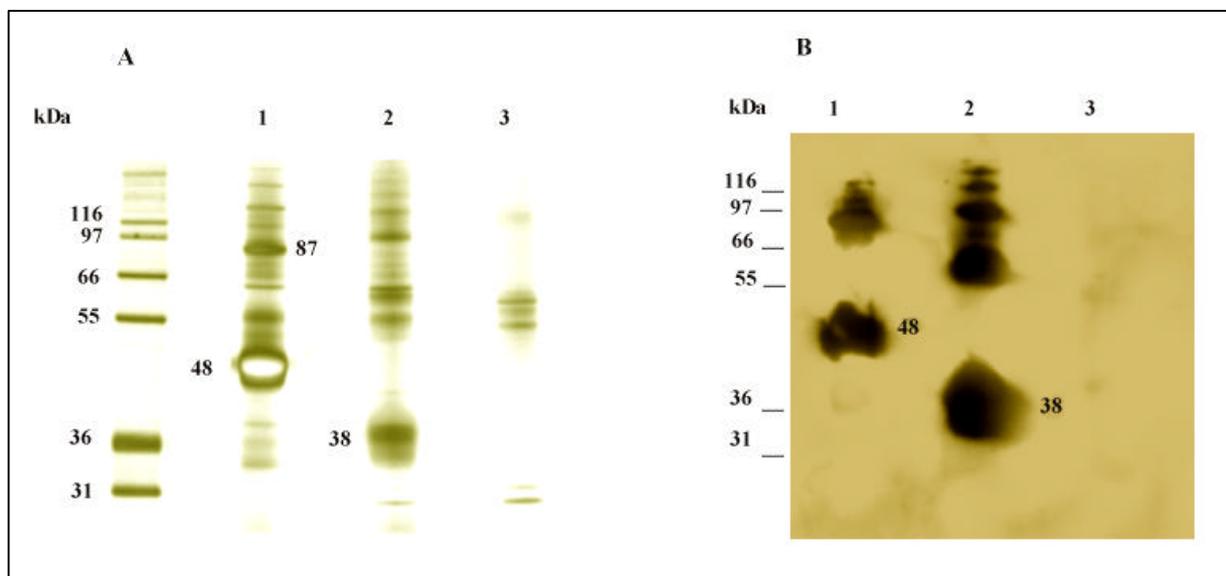


Abb. 26: SDS/PAGE des SP-D^{PAP}; SP-D^{PAP} + HLE und HLE allein [10 % Bis/Tris] unter reduzierenden Bedingungen

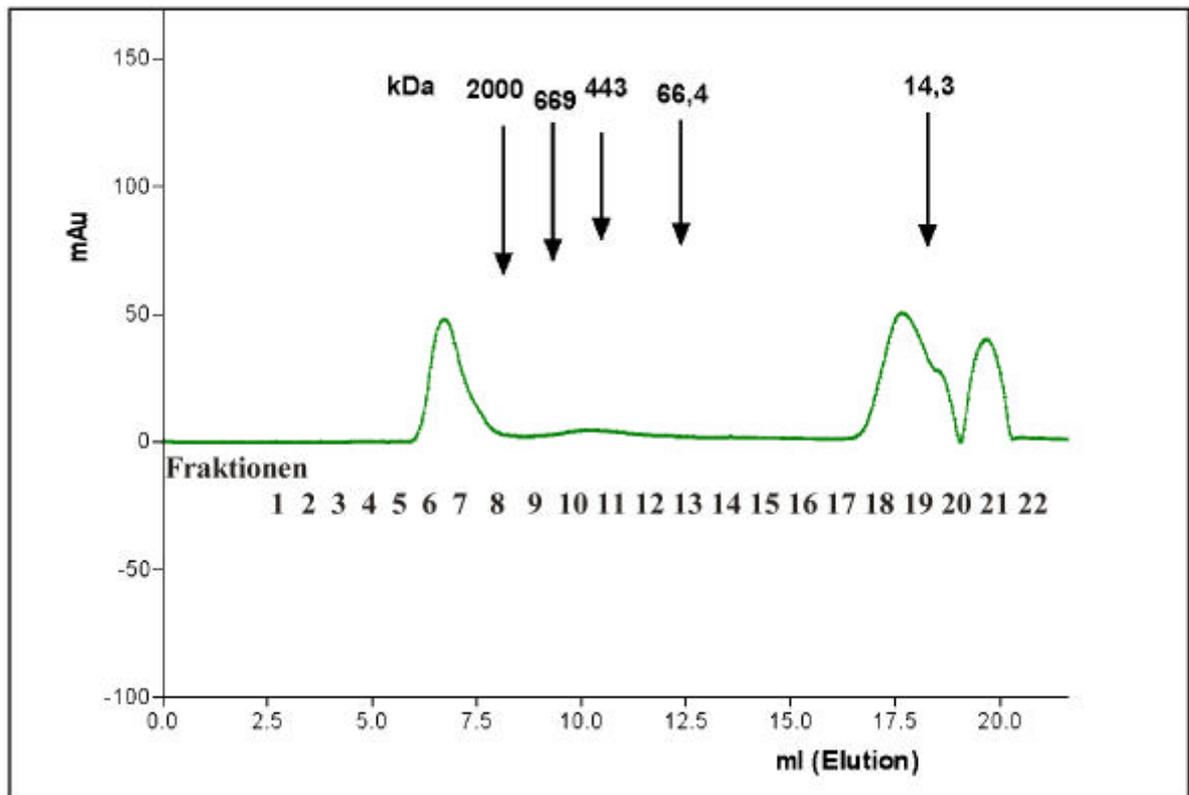
- A) Silberfärbung
 B) Westernblotanalyse mit der Verwendung eines polyclonalen antihuman SP-D Antiserums.

Lane 1: SP-D^{PAP} 250 ng

Lane 2: SP-D^{PAP} degradiert (6,25 µl des Ansatzes entspricht ca.250 ng Ausgangs SP-D^{PAP})

Lane 3: HLE 0,0125 U

A)



B)

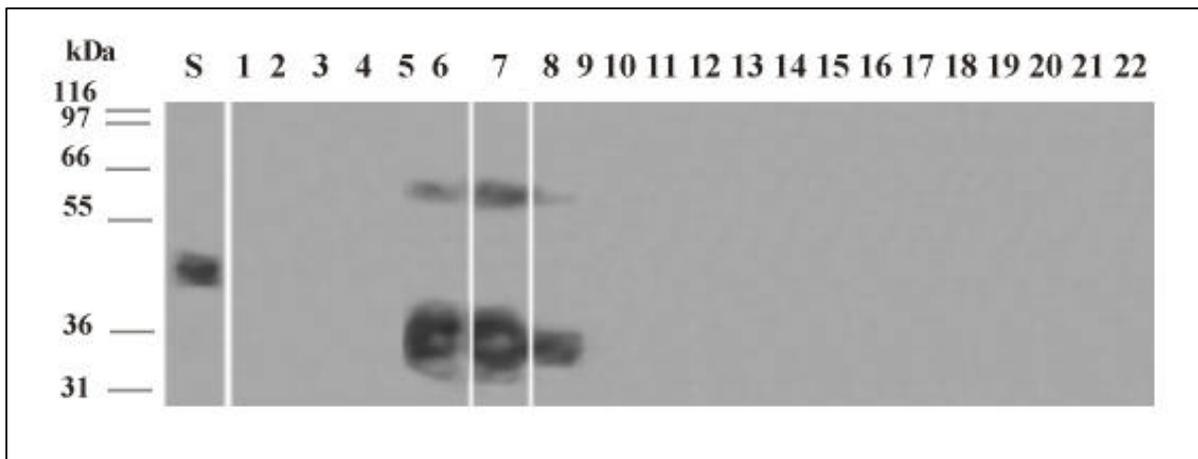


Abb. 27: Gelfiltration von SP-D^{PAP} inkubiert mit HLE; anschließend Westernblot-analyse der einzelnen Fraktionen nach SDS/PAGE [10 % Bis/Tris]

- A) Gelfiltration des Ansatzes (40 µg SP-D^{PAP} und HLE 5 U/ml über 240 min bei 37 °C) über eine Superose 6 Säule.
- B) Die Darstellung des SP-D^{PAP} der einzelnen Fraktionen (je 1,5ml) in der SDS/PAGE unter reduzierenden Bedingungen mit anschließender Westernblotanalyse mit Verwendung von anti human SP-D, polyclonal.
- Lane S : SP-D^{PAP} 100 ng als Standard
- Lane 1-12: die Fraktionen 1-22 (70 µl der aufgefangenen 1,5 ml pro Fraktion)

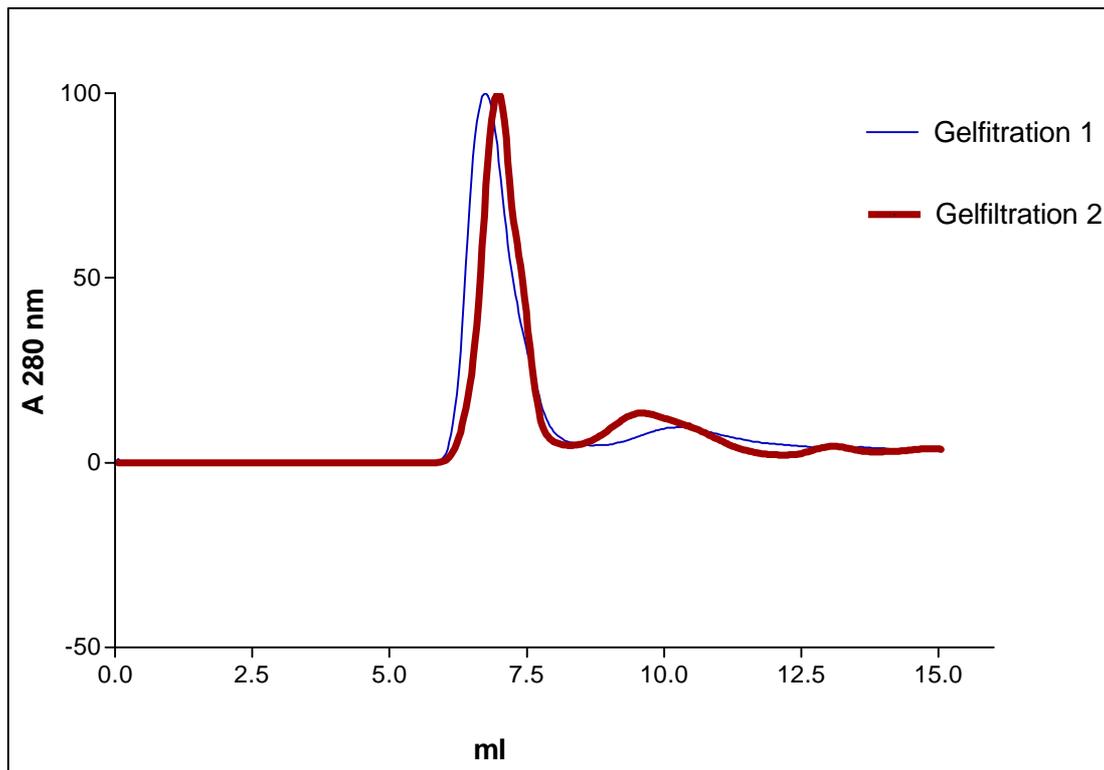


Abb. 28: Vergleich verschiedener Gelfiltrationen

Gelfiltration 1: degradiertes SP-D^{PAP} (siehe auch Abb. 26)

Gelfiltration 2: Isolierung von SP-D^{PAP} aus aufgereinigter und aufkonzentrierter

BAL von Patienten mit Alveolarproteinose nach Methode von Strong et al., 1998 (siehe 2.2.2)

In Abb. 28 wurde zwei Gelfiltrationen von SP-D^{PAP} miteinander verglichen. Bei Gelfiltration 1 handelt es sich um SP-D^{PAP} nach Inkubation mit HLE und beobachteter Degradation (siehe Abb. 27). Bei Gelfiltration 2 erfolgte keine Inkubation mit HLE. Auch nach limitierter Proteolyse ändert sich das Erscheinungsbild des SP-D^{PAP} in der Gelfiltration nicht und es kann kein Unterschied zwischen proteolytisch-degradiertem und nicht behandeltem SP-D^{PAP} beobachtet werden. Das partiell degradierte SP-D^{PAP} hat also unter nativen Bedingungen in Lösung ähnliche molekulare Dimensionen wie das nicht degradierte SP-D^{PAP}.

3.4.2. Sequenzierung

Um die Hauptangriffsstellen der proteolytischen Degradation der HLE festzustellen, wurde eine N-terminale Sequenzierung mit dem Verfahren des schrittweisen Edman-Abbaues in der Modifikation nach Hunkapiller durchgeführt.

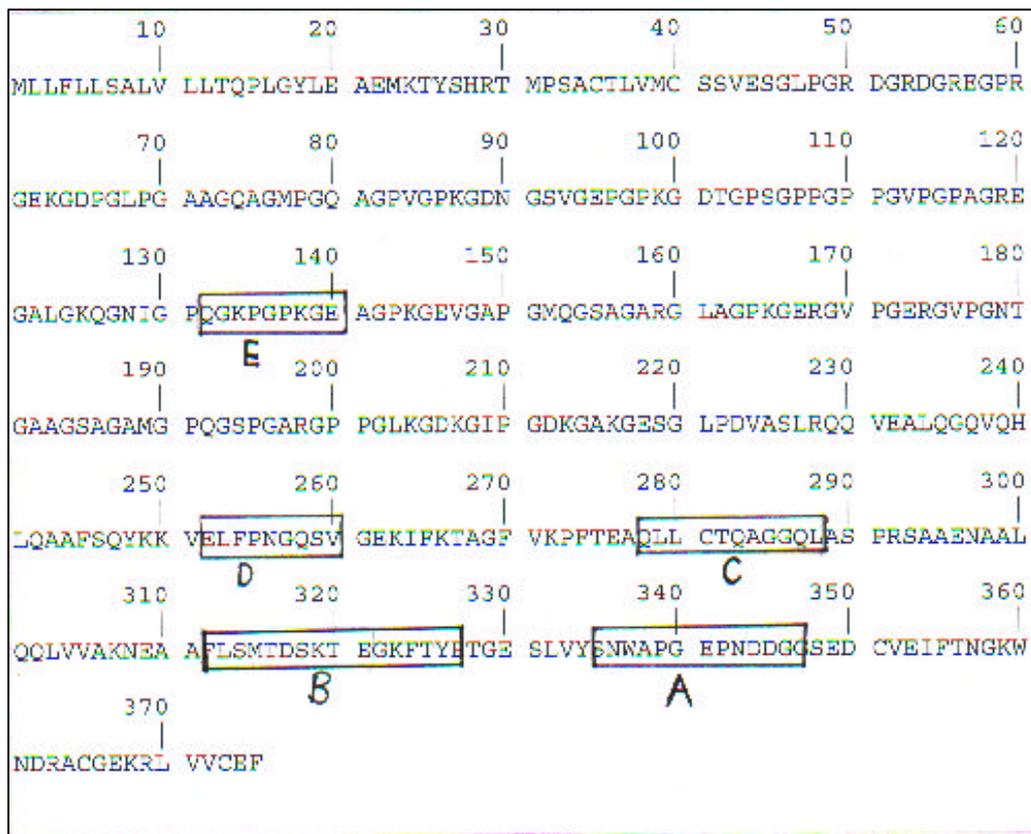


Abb. 29: Aminosäuresequenz des SP-D^{PAP}

Mittels N-terminaler Sequenzierung (Edmann-Abbau) des degradierten SP-D^{PAP} (2 µg SP-D^{PAP} + HLE 5 U/ml; 37 °C; 240 min) wurden die Sequenzen A, B, C, D, E gefunden. Das Mengenverhältnis der Sequenzen A, B, C, wie 1: 1: 0,3; N-Terminus bei 1, C-terminales Ende des Proteins bei 375.

Die Sequenzierung ergab, dass hauptsächlich Fragmente des Bereiches des Kohlenhydraterkennungsbereiches (CRD) erkannt wurden (siehe auch Tab. 3 nächste Seite).

Tab. 3: Aminosäuresequenzanalyse von SP-D^{PAP} nach Inkubation mit HLE

	Mengen- angabe (% des Gesamt- proteins)	Fragmente nach der Inkubation mit HLE und anschließender Sequenzierung des neugebildeten N-Terminus:		Restfragment mit geblocktem N-terminus des SP-D ^{PAP} (Met ¹)	
		Aminosäure- sequenz des identifizierten Fragmentes (anhand Aminosäuresequenz [www.expasy.ch])	Molekulargewicht (Da) des Fragmentes bis zum C-Terminus (Phe ³⁷⁵) = Fragment S	Errechnetes Molekulargewicht (kDa) des verbleibenden Fragmente E aus dem ermittelten Molekulargewicht von SP-D ^{PAP} in der SDS/PAGE (48 kDa, Spanne 45-51 kDa) minus des Fragmentes S	
Fragment 1	42 %	Tyr ³³⁴ - Ser ³⁴⁸	4707 Da ~ 5 kDa = A	40- 46 kDa; 43 kDa	38 kDa, (34-42 kDa)
Fragment 2	42 %	Phe ³¹² - Thy ³²⁷	7126 Da ~ 7 kDa = B	38- 44 kDa; 41 kDa	
Fragment 3	12 % *	Gln ²⁷⁸ - Ser ²⁹⁰	10528 Da ~ 10 kDa = C	35- 41 kDa; 38 kDa	
Fragment 4	2%	Gla ²⁵² - Gla ²⁶²	13351 Da ~ 13 kDa = D	32- 38 kDa; 35 kDa	
Fragment 5	2 %	Gln ¹³² - Gla ¹⁴⁶	24839 Da ~ 25 kDa = E	20- 26 kDa; 23 kDa	

* Mengenangabe bei N-terminalem Gln²⁷⁸ wegen Pyroglutamatbildung eventuell zu niedrig. Es ist auch möglich, dass primär Fragment 3 entstand und daraus dann Fragment 1 und Fragment 2.

IV. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Struktur von SP-D in der SDS/ PAGE und in der 2D PAGE zu untersuchen und das Ausmaß einer proteolytischen Degradation des SP-D in vitro und deren funktionelle Bedeutung zu untersuchen. Es wurden vor allem solche Proteasen gewählt, die in hoher Konzentration bei suppurativen Lungenerkrankungen wie Mukoviszidose (CF) oder Bronchiektasen vorkommen.

SP-D^{PAP} Darstellung

SP-D^{PAP} stellte sich unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen in der SDS/PAGE mit anschließender Westernblotanalyse mit einem polyclonalen Antikörper bei 47-51 kDa dar. Mason et al. hatte dies ebenfalls beobachtet [Mason et al., 1998]. Bei einer gemeinsamen Darstellung des SP-D^{PAP} mit SP-Dth und SP-D^{rat} konnte kein Unterschied bezüglich des Molekulargewichtes beobachtet werden (siehe Abb. 7). So konnte bei allen drei SP-D-Formen eine Hauptbande bei 47-51 kDa und konzentrationsabhängig eine schwache Bande bei 44 kDa detektiert werden. In einer Darstellung des SP-D in BAL von Patienten mit CF stellten sich ebenfalls eine 48 kDa und einmal eine 41 kDa Bande dar (siehe Abb. 10).

Die 43 kDa Bande wurde zuvor schon mehrmals beschrieben [Chailley-Heu 1997, Crouch 1998, Leth-Larsen 1999]. Der isoelektrische Bereich in der 2D PAGE, in welchem sich das SP-D^{PAP} darstellte, lag bei 5-9 pI (siehe Abb. 11) und stimmte gut mit den von Persson und Mitarbeitern ermittelten Werten überein [Persson et al., 1988].

Somit besteht das SP-D^{PAP}, welches für die weiteren Experimente verwendet wurde, hauptsächlich aus Bestandteilen mit einem Molekulargewicht von 51 kDa und nur einem sehr geringen Anteil an 43 kDa.

Proteolytische Degradation des SP-D^{PAP} durch CF-relevante Proteasen

In einer früheren Studie wurde bereits eine proteolytische Degradation von SP-D^{rat} untersucht und eine sehr hohe Resistenz gegenüber verschiedenen proteolytischen Enzymen festgestellt [Brown-Augsburger et al., 1995]. Dabei wurde SP-D^{wild type rat} mit verschiedenen Enzymen, unter anderem auch HLE bei 37 °C über Nacht inkubiert und anschließend unter

reduzierenden Bedingungen in der SDS/PAGE mit nachfolgender Silberfärbung dargestellt. Es konnte keine proteolytische Degradation erkannt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde SP-D^{PAP} verwendet. Die verwendeten Konzentrationen der einzelnen Enzyme richtete sich nach den in verschiedenen Studien gemessenen Werten dieser Proteasen in den Atemwegen von CF-Patienten.

Witko-Sarsat et al. konnte in ihrer Studie stark erhöhte Konzentrationen der Leukozyten Elastase im Sputum ($99,7 \pm 18,6 \mu\text{g/ml}$) bei Patienten mit CF messen [Witko-Sarsat et al. 1999]. Nun konnte gezeigt werden, dass schon bei geringeren Konzentrationen ($57 \mu\text{g/ml}$ entsprechen 50 U/ml ; $5,7 \mu\text{g/ml}$ entsprechen 5 U/ml) der HLE es zu einer proteolytischen Veränderung des SP-D^{PAP} in vitro kommen kann.

So konnte nach einer Inkubation des SP-D^{PAP} mit Enzymkonzentrationen von 50 U/ml und 5 U/ml über 2 bis 24 h bei 37°C eine limitierte proteolytische Degradation des SP-D^{PAP} in der SDS/PAGE mit anschließender Westernblotanalyse beobachtet werden. Dabei bestand eine Abhängigkeit zwischen der Ca^{++} Konzentration im Puffer und der Geschwindigkeit der proteolytischen Degradation. Die Anwesenheit von 2 mM Ca^{++} bewirkte eine zeitliche Verzögerung der Proteolyse, jedoch keine komplette Hemmung.

Kontrollexperimente belegten, dass nach einer thermischen Denaturierung der HLE durch kurzes Erhitzen oder durch Anwesenheit des Serinproteasenhemmers PMSF, die Enzyme inaktiviert wurden und es auch zu keiner proteolytischen Degradation mehr kam.

Für die anderen Serinproteasen (Cathepsin G, Proteinase 3) konnte ebenfalls eine limitierte Degradation beobachtet werden.

Rochat et al. hatte Aktivitäten von $19,3 \pm 8,5 \text{ U/ml}$ der HCG im Sputum von CF-Patienten gemessen [Rochat et al., 1996]. Capodici et al. konnte zeigen, dass es bei Konzentrationen von $50 \mu\text{g/ml}$ es zu einer Degradation von Collagen kommt [Capodici et al., 1989].

Nach einer Inkubation des SP-D^{PAP} mit 50 U/ml (entsprechen $11,36 \mu\text{g/ml}$) über verschiedene Zeiträume, kam es auch hier zu einer limitierten enzymatischen Degradation. Bei einer Konzentration von 5 U/ml (entsprechen $1,136 \mu\text{g/ml}$) war jedoch keine Veränderung des SP-D^{PAP} zu erkennen.

Bei einer Konzentration der Proteinase 3 von $11,44 \mu\text{g/ml}$ konnte ebenfalls nach Inkubation bei 37°C über einen Zeitraum von 2 bis 8 h eine proteolytische Veränderung des

SP-D^{PAP} in der SDS/PAGE beobachtet werden. Diese Konzentration entspricht ungefähr 10 % der gemessenen Werte im Sputum von CF Patienten von Witko-Sargat et al [Witko-Sargat et al., 1999]. Selbst die Konzentration von 1,14 µg/ml führte zu einer limitierten Degradation. Durch eine Anwesenheit von Ca⁺⁺ im Puffer wurde der Abbau des SP-D^{PAP} zeitlich verzögert. Durch PMSF wurde das Enzym komplett inaktiviert.

Aufgrund der hohen Keimbesiedelung und chronischen Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* kommt es bei Cystischer Fibrose ebenfalls zu sehr hohen Konzentrationen an *Pseudomonas aeruginosa* Elastase (PAE) in den Atemwegen [Bruce et al., 1985]. PAE gehört nicht zu den Serinproteasen, sondern ist eine Metalloprotease mit den Coenzymen Zink und Calcium. Bei einer Inkubation des SP-D^{PAP} mit PAE (9,5 µg/ml) wurden deutliche proteolytische Veränderungen des SP-D^{PAP} in der SDS/PAGE beobachtet. Eine vollständige Hemmung des Metalloenzym PAE wurde durch 5 mM EDTA erzielt.

Alle untersuchten Proteasen führten nur zu einer partiellen Proteolyse. Da für alle Enzyme theoretisch aufgrund der Aminosäuresequenz ausreichend viele proteolytische Angriffspunkte vorliegen, um das SP-D komplett in kleinste Fragmente zu verdauen, könnte die Ursache für die limitierte Proteolyse hierfür in der tertiären und quartären Konfiguration der SP-D Multimere liegen.

Bei allen verwendeten Proteasen bildete sich nach einer Inkubation des SP-D^{PAP} ein 38 kDa Fragment in der SDS/PAGE unter reduzierenden Bedingungen, welches gegenüber einer weiteren Proteolyse stabil war. Es kam also zu einem Molekulargewichtsverlust von etwa 10 kDa. In einer SDS/PAGE Darstellung unter nicht reduzierenden Bedingungen stellte sich dieses proteolytisch veränderte Fragment bei 108 kDa dar, auch hier kam es zu einem Verlust von ungefähr 30 kDa.

Funktionelle Veränderungen des durch Degradation veränderten SP-D^{PAP}

SP-D gehört zu den Collectinen, den kollagenen Glycoproteinen. Über einen Kohlenhydrat-erkennungs-bereich (CRD) ist eine Bindung an verschiedene Zucker möglich. Maltose wird bevorzugt gebunden [Lu et al., 1992]. Ebenso bindet der CRD Bakterien, Viren und Pilze und kann zu einer Agglutination dieser Organismen führen [Crouch 1998, Mason et al., 1998].

Da es in allen Fällen nicht zu einer vollständigen Degradation des SP-D^{PAP} kam, sondern nur zu einer Verringerung des Molekulargewichtes unter reduzierenden Bedingungen um ca. 10 kDa, sollte geklärt werden, ob die proteolytische Verkürzung des SP-D^{PAP} zu einer funktionellen Veränderung führt.

Dazu wurden zunächst die Bindungseigenschaften des SP-D^{PAP} an Maltose untersucht. Nach einer Inkubation des SP-D^{PAP} mit HLE unter Bedingungen, die zu einer limitierten, aber nicht kompletten Proteolyse führten, kam es zu keiner Bindung dieses proteolytisch veränderten SP-D^{PAP} an Maltose. Da diese Bindung über den CRD erfolgt, könnte es durch die Proteolyse zu einer Veränderung bzw. zu einem Abtrennen von Teilen des CRD gekommen sein.

Dieser CRD wird auch als "Collagenase-resistant fragment" CRF bezeichnet, da sich dieses Fragment nach einer Collagenasebehandlung des SP-D^h in der SDS/PAGE (5-15 %) unter reduzierenden Bedingungen als eine Bande bei 20 kDa darstellt [Lu et al. 1992]. Dieses Fragment hat weiterhin die Fähigkeit an Maltose zu binden [Lu et al. 1992]. Eine Analyse der Aminosäuresequenz zeigte die Sequenz Gly²¹⁴ – Ala²⁴³ des sequenzierten SP-D⁽²¹⁻³⁷⁵⁾ [Lu et al. 1992]. Analog dazu wurde auch von Ogasawara et al. ebenfalls nach einer Collagenaseverdauung von SP-D^{wild type rh} und anschließender Gel-Chromatographie ein ähnliches Collagenase-resistant-fragment (CRF) isoliert (siehe Abb. 29) [Ogasawara et al., 1995].

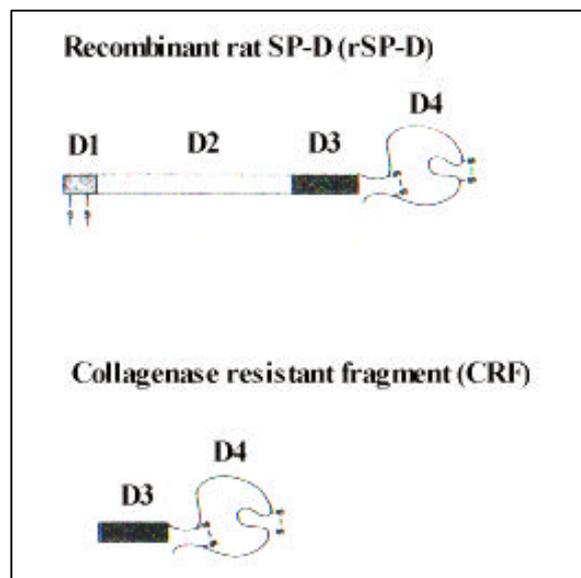


Abb. 29: Schematische Darstellung des rekombinanten SP-D [aus Ogasawara Y et al., 1995]

D1: Ala²¹ - Asn⁴⁵
 D2: Gly⁴⁶ - Pro²²²
 D3: Asp²²³ - Val²⁶⁰
 D4: Gly²⁶¹ - Phe³⁷⁵

In der vorliegenden Studie wurden im Anschluß an den Verdau mit HLE in einer Aminosäuresequenzierung des proteolytischen Gemisches intakte Bruchstücke aus dem Collagenase-resistent fragment erkannt.

Die proteolytischen Fragmente sind in Tab.3 aufgelistet. Mengenmäßig am stärksten vertreten waren nach den Ergebnissen der Aminosäuresequenzierung Fragmente aus dem CRD.

Diese Fragmente mit Molekulargewichten von etwa 5, 7 und 10 kDa waren im Immunblotting nach SDS/PAGE jedoch nicht direkt nachweisbar. Verantwortlich ist wahrscheinlich eine fehlende Reaktivität mit dem Antiserum. Mengenmäßig entsprach die dargestellte Menge jedoch nicht ganz dem aufgrund der Sequenzierung erwarteten Umfang. Direkt nachweisbar im Immunblotting waren die den in der Sequenzanalyse complementären Fragmente mit einem mittleren Molekulargewicht von 38 kDa (Spanne 34-42 kDa).

Die temporär nachweisbare Bande um 62 kDa könnte auch durch eine Zusammenlagerung einzelner Fragmente entstanden sein (siehe Abb. 11, 12, 19, 20). Die Fragmente 1, 2 und 3 liegen im Bereich des CRD. Obwohl sie nicht primär entstanden sein müssen, sondern sich auch sekundär aus größeren Fragmenten gebildet haben könnten, scheint es, dass es durch die HLE vor allem zu einer Proteolyse des CRD kommt und somit deren Funktionsverlust wahrscheinlich ist. Diese Folgerung steht mit der fehlende Maltosebindung in Einklang.

Eine weitere Folge eines defekten oder fehlenden CRD, ist die Unfähigkeit des SP-D an Bakterien zu binden und sie zu agglutinieren.

SP-Dth kann *Escherichia coli* und *Streptococcus pneumoniae* agglutinieren [Hartshorn et al., 1998]. Restrepo et al. konnte bei der Untersuchung eines einzelnen Stammes von *Ps. aeruginosa* keine Agglutination durch SP-D erkennen [Restrepo et al., 1999]. Hingegen konnten wir beim Screening vieler klinischer Isolate von CF-Patienten eine Ca⁺⁺-abhängige Agglutination von *Ps. aeruginosa*, die durch Maltose hemmbar ist, feststellen [unveröffentlichte Ergebnisse]. Dieses Assaysystem wurde verwendet, um die funktionellen Eigenschaften des proteolytisch durch HLE angegriffenen SP-D^{PAP} zu bestimmen. Nach einer Inkubation des SP-D^{PAP} mit HLE war keine Bildung von Agglutinaten mehr zu erkennen. Zusammengefasst zeigen die fehlende Maltosebindung und fehlende Agglutination von *Ps. aeruginosa* nach limitierter proteolytischer Degradation einen Funktionsverlust des SP-D^{PAP}. Diese Daten und die Ergebnisse der Aminosäuresequenz legen nahe, dass die Hauptangriffsstellen der HLE im Bereich des CRD liegen.

Leukozyten Elastase, Cathepsin G, Proteinase 3 und Pseudomonas Elastase besitzen die Fähigkeit, SP-D^{PAP} limitiert proteolytisch zu degradieren. Der primäre Angriffspunkt liegt bei der HLE im Bereich des CRD. Das so veränderte SP-D^{PAP} verliert seine Fähigkeit an Kohlenhydratoberflächen zu binden und Bakterien zu agglutinieren.

Aufgrund der bei CF und anderen suppurativen Lungenerkrankungen hohen freien Enzymaktivitäten in den Atemwegen ist es wahrscheinlich, dass die hier in vitro beobachteten Vorgänge auch in vivo ablaufen können. Der resultierende Funktionsverlust von SP-D kann dazu beitragen, dass die Elimination von Viren, Bakterien und Pilzen aus der Lunge reduziert ist. Darüber hinaus hat SP-D immunmodulatorische Funktionen und es kann spekuliert werden, dass das veränderte SP-D sich auch auf die Immunabwehr in der geschädigten Lunge auswirkt.

5. Anhang**Tab. 4: HLE 50 U/ml** Verteilung der Banden innerhalb der einzelnen Lane in Abb. 11

1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11	
kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%								
										65-58	23	63-58	16								
57	19																				
52-45	81	50-45	54	50-45	54	49-45	29	50-45	37					50-45	100	52-45	100	51-45	100	51-45	100
		41-36	46	41-37	46	41-34	71	42-35	63	42-34	77	42-34	84								

Nach einer Inkubation des SP-D^{PAP} bei 37 °C über drei verschiedene Zeitabschnitte in einer Enzymkonzentration von 50 U/ml der HLE in Abhängigkeit des Ca⁺⁺ gehaltes des Puffers bzw. der vorherigen Hemmung der HLE durch PMSF; SDS/PAGE und Westernblotanalyse mit spezifischem Antikörper und anschließender Auswertung mit Hilfe des Fluor-Imager und Multianalyst-Software.

Tab. 5: HLE 5 U/ml Verteilung der Banden innerhalb der einzelnen Lane in Abb. 12

1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13	
kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%
93	17																					93	16		
												62-57	21									68-63	17		
51-44	83	50-44	100	50-43	100	49-43	48	49-43	57	48-43	48			50-48	100	50-48	100	50-48	100	50-48	100				
						42-40	9																		
						39-34	43	39-35	43	39-32	52	41-32	79									40-33	65	39	100

Nach einer Inkubation des SP-D^{PAP} bei 37 °C über drei verschiedene Zeitabschnitte in einer Enzymkonzentration von 5 U/ml der HLE in Abhängigkeit des Ca⁺⁺ gehaltes des Puffers bzw. der vorherigen Hemmung der HLE durch PMSF; SDS/PAGE und Westernblotanalyse mit spezifischem Antikörper und anschließender Auswertung mit Hilfe des Fluor-Imager und Multianalyst-Software.

Tab. 6: HLP 3 11,44 µg/ml, Verteilung der Banden innerhalb der einzelnen Lane in Abb. 19

1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		
kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	
93	10																							
												59-54	12									66	12	
50-43	90	49-43	100	48-43	100	47-43	48	47-42	100	47-43	43			47-43	100	47-43	100	47-43	100	47-43	100			
						38-34	52			38-34	57	38-33	88									41-33	65	

Nach einer Inkubation des SP-D^{PAP} bei 37 °C über drei verschiedene Zeitabschnitte in einer Enzymkonzentration von 11,44 µg/ml der Proteinase 3 in Abhängigkeit des Ca⁺⁺gehaltes des Puffers bzw. der vorherigen Hemmung der Proteinase 3 durch PMSF; SDS/PAGE und Westernblotanalyse mit spezifischem Antikörper und anschließender Auswertung mit Hilfe des Fluor-Imager und Multianalyst-Software.

Tab. 7: HLP 1,14 µg/ml, Verteilung der Banden innerhalb der einzelnen Lane in Abb. 20

1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		
kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	
93	10																					
												62-58	15									
49-42	90	50-46	100	50-46	100	49-45	49	48-44	100	48-43	86			48-44	100	48-44	100	48-44	100	48-44	100	
						39-35	51			38-36	14	39-33	85									

Nach einer Inkubation des SP-D^{PAP} bei 37 °C über drei verschiedene Zeitabschnitte in einer Enzymkonzentration von 1,144 µg/ml der Proteinase 3 in Abhängigkeit des Ca⁺⁺gehaltes des Puffers bzw. der vorherigen Hemmung der Proteinase 3 durch PMSF; SDS/PAGE und Westernblotanalyse mit spezifischem Antikörper und anschließender Auswertung mit Hilfe des Fluor-Imager und Multianalyst-Software.

Tab. 8: HCG 50 U/ml, Verteilung der Banden innerhalb der einzelnen Lane in Abb. 17

1		2		3		4		5		6	
kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%
98	11									80	10
								66- 60	4	63	24
51- 49	89	53- 44	68	48	19	51- 46	4				
		43- 36	32	45- 35	81	42- 35	96	44- 33	96	40- 33	67

Nach einer Inkubation des SP-D^{PAP} bei 37 °C über vier verschiedene Zeitabschnitte in einer Enzymkonzentration von 50 U/ml des Cathepsin G; SDS/PAGE und Westernblotanalyse mit spezifischem Antikörper und anschließender Auswertung mit Hilfe des Fluor-Imager und Multianalyst-Software.

Tab. 9: HCG 5 U/ml, Verteilung der Banden innerhalb der einzelnen Lane in Abb. 18

1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
kDa	%																		
51- 45	100																		

Nach einer Inkubation des SP-D^{PAP} bei 37 °C über drei verschiedene Zeitabschnitte in einer Enzymkonzentration von 5 U/ml des Cathepsin G in Abhängigkeit des Ca⁺⁺gehaltes des Puffers bzw. der vorherigen Hemmung des Cathepsin G durch PMSF; SDS/PAGE und Westernblotanalyse mit spezifischem Antikörper und anschließender Auswertung mit Hilfe des Fluor-Imager und Multianalyst-Software.

Tab. 10: PAE 2,5 U/ml, Verteilung der Banden innerhalb der einzelnen Lane in Abb. 21

1		2		3		4		5		6		7		8	
kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%
125	11			82	8	83	7	84	10						
		62	22	63- 61	23	62	24	62	21						
50- 44	89	49- 42	25							48- 45	100	48- 45	100	48- 45	100
		41- 29	53	47- 29	69	46- 29	69	45- 29	69						

Nach einer Inkubation des SP-D^{PAP} bei 37 °C über 4 verschiedene Zeitabschnitte in einer Enzymkonzentration von 2,5 U/ml der Pseudomonas Elastase und der vorherigen Hemmung der Pseudomonas Elastase durch EDTA; SDS/PAGE und Westernblotanalyse mit spezifischem Antikörper und anschließender Auswertung mit Hilfe des Fluor-Imager und Multianalyst-Software.

Literaturverzeichnis

Allen MJ, Harbeck R, Smith B, Voelker DR, Mason RJ: Binding of Rat and Human Surfactant Proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* Conidia; *Infection and Immunity* 1999; Vol 67: p 4563-4569 No 9

Birrer P, McElvaney NG, R deberg A, Wirz Sommer C, Liechti-Gallati S, Kraemer R, Hubbard R, Crystal RG: Protease-Antiprotease Imbalance in the Lungs of Children with cystic Fibrosis; *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 207-213

Bradford M: a rapid and sensitive Methods for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding; *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 248-254

Brown-Augsburger P, Hartshorn K, Chang D, Rust K, Fliszar C, Welgus HG, Crouch E: Site-directed Mutagenesies of Cyst-15 and Cyst-20 of pulmonary Surfactant Protein D; *J Biol Chem* 1996; 271: No.23, Jun 7:13724-30

Bruce MC, Poncz L, Klinger JD, Stern RC, Tomashefski JF, Dearborn DG: Biochemical and pathologic Evidence for proteolytic Destruction of Lung Connective Tissue in Cystic fibrosis; *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 529-535

Capodici C, Berg R: Cathepsin G degrades denatured Collagen; *Inflammation* 1989; 2: 137-145

Caughey GH: Serine Proteinases of Mast Cell and Leukocyte Granules; *Am J Respir Crit care Med* 1994; 150: S 138-142

Chailley-Heu B, Rubio S, Rougier JP, Ducroc R, Barlier-Mur AM, Ronco P, Bourbon J: Expression of hydrophilic surfactant protein by mesentary cells in rat and man; *Biochem J* 1997; 328: 251-256

Crouch E: Structure, biologic properties and expression of surfactant protein D (SP-D); *Biochimica et Biophysica Acta* 1998; 1408: 278-289

Crouch E: Collectins and Pulmonary Host Defense; *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; Vol 19, pp. 177-201

- Dong Q, Wright JR: Degradation of surfactant protein D by alveolar macrophages; *Am J Physiol* 1998; 276: L97-L105
- Goerg A, Postel W, Guenther S: The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients; *Electrophoresis* 1988; 9:531-546
- Griese M, Birrer P, Demirsoy A: Pulmonary surfactant in cystic fibrosis; *Eur Respir J* 1997; 10: 1983-1988
- Griese M, von Bredow C, Birrer P: Reduced proteolysis of surfactant protein A and changes of the bronchoalveolar lavage fluid proteome by inhaled alpha 1-protease inhibitor in cystic fibrosis. *Electrophoresis* 2001; Jan;22(1):165-71
- Hartshorn KL, Crouch E, White MR, Colamussi ML, Kakkanatt A, Tauber B, Shepherd V, Sastry KN: Pulmonary surfactant A and D enhance neutrophil uptake of bacteria; *Am J Physiol* 1998; 274 (*Lung Cell Mol Physiol* 18): L 958-969
- Hubbard RC, Brantly ML, Crystal R: Proteases; *The Lung: Scientific Foundations; Volume 2;* Raven Press new York 1991: 1763-1773
- Konstan M, Hilliard K, Norvell T, Berger M: Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation; *Am J Respir Crit Care Med* 1994; Vol 150: pp 448-454
- Leth-Larsen R, Holmskov U, Hojrup P: Structural characterization of human and bovine lung surfactant protein D ; *BiochemJ* 1999; 343: 646-652
- Liu H, Lazarus SC, Caughey GH, Fahy JV: Neutrophil elastase and elastase-rich cystic fibrosis sputum degranulate human eosinophils in vitro; *Am J Physiol* 1999; 276: L28-L34
- Lu J, Willis AC, Reid KBM: Purification, characterization and cDNA cloning of human lung surfactant D; *Biochem J*; 1992; 284: 795-802
- Mason R.J, Greene K, Voelker D: Surfactant protein A and Surfactant protein D in Health and disease; *Am J Physiol* 1998; 275: L1-L13
- Mason RJ, Nielsen LD, Kuroki Y, Matsuura E, Freed JH, Shannon JM: A 50-kDa variant form of human surfactant protein D; *Eur Respir J* 1998; 12: 1147-1155

Ogasawara Y, Voelker DR: the role of the amino-terminal domain and the collagenous region in the structure and the function of rat surfactant protein d; *J Biol Chem* 1995; Vol 270: No 32: pp 19052-19058

Postle AD, Mander A, Reid KBM, Wang JY, Writh SM, Moustaki M, Warner JO: Deficient hydrophilic lung surfactant protein A and D with normal surfactant phospholipid molecular species in cystic fibrosis; *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; Vol 20: pp. 90-98

Reid KBM: Interaction of surfactant protein D with pathogens, allergens and phagocytes; *Biochimica et Biophysica Acta* 1998; 1408: 290-295

Restrepo CI, Dong Q, Savov J, Mariencheck WI, Wrigth JR: Surfactant protein D stimulates phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by alveolar macrophages; *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; Vol 21, No 5 (Nov): 576-585

Rochat T, Dayer Pastore F, Schlegel-Haueter SE, Filthuth I, Auckenthaler R, Belli D, Suter S: Aerosolized rhDNase in cystic fibrosis: effect on leukocyte proteases in sputum; *European Respiratory Journal* 1996; 9: 2200-2206

Strong P, Kishore U, Morgan C, Bernal LA, Singh M, Reid KBM: a novel method of purifying lung surfactant proteins A and D from lung lavage of alveolar proteinosis patients and from pooled amniotic fluid; *Journal of Immunological Methods* 1998; 8244

Suter S, Schaad UB, Roux L, Nydegger UE, Waldvogel F: Granulocyte Neutral Proteases and *Pseudomonas* Elastase as Possible Causes of Airway Damage in Patients with Cystic Fibrosis; *J Infect Dis* 1984; 149: 523-531

Von Bredow C, Birrer P, Griese M: Degradation of Surfactant Protein A and other bronchoalveolar lavage fluid proteins in patients with cystic fibrosis; *Eur Respir J* 2001; April 17(4) 716-722

Witko-Sarsat V, Halbwachs-Mecarelli L, Schuster A, Nusbaum P, Ucki J, Canteloup S, Lenoir G, Descamps-Latscha B, Nadel JA: Proteinase 3, a Potent Secretagogue in Airways, Is Present in Cystic Fibrosis Sputum; *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20: 729-736

besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. med. M. Griese für seine Betreuung während der gesamten Arbeit und die ständige Unterstützung und Herausforderung

Frau Dr. med. C. von Bredow für die vielen Ratschläge und die fröhliche Zusammenarbeit

Frau A. Schams für die Geduld und vielen Hilfestellungen

Herrn Dr. med. dent. H. Schönfeld für die ständigen Ermutigungen

Annegret Wiesener
 Hansastr. 109
 81373 München

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 7. April 1972

Geburtsort: Potsdam

Schulbildung:

1978- 1988	Oberschule Potsdam
1988- 1990	Erweiterte Oberschule Potsdam
1990	Abitur

Studium:

1990- 1991	Praktisches Jahr, Tätigkeit als Vorpraktikantin im Klinikum „Ernst von Bergman“ in Potsdam auf einer gynäkologischen Station
1991	mit Beginn des Wintersemesters Studium der Zahnmedizin an der Alexander von Humboldt Universität in Berlin
1994	Physikum
1994	Wechsel an die Ludwig Maximilian Universität in München
1998	Staatsexamen

Promotion: ab 1999 an der Kinderpoliklinik der Universität München (Leitung Prof. Dr. D. Reinhardt) als Teil der Forschungsgruppe Lunge unter der Leitung von Prof. Dr. M. Griese zum Thema: Proteolytische Degradation von Surfactant Protein D

Berufliche Tätigkeit: seit 2000 Tätigkeit als Assistenzärztin in einer Praxis in München

