

Aus der Abteilung für Pneumologie

Zentrum Innere Medizin

Medizinische Hochschule Hannover

Direktor Prof. Dr. med. T. Welte



Der Einfluss des pulmonalen Surfactant auf chronisch allergische  
Erkrankungen

- eine experimentelle Studie -

**Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

In der Medizinischen Hochschule Hannover

Vorgelegt von:

Stefanie Sommer

aus Alfeld / Leine

Hannover, 2008

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover am:

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. D. Bitter-Suermann

Betreuer der Arbeit: PD Dr. med. V.J. Erpenbeck /

Prof. Dr. med. J.M. Hohlfeld

Referentin: Prof. ´in Dr. Miriam Wittmann

Koreferentin: Prof. ´in Dr. Gesine Hansen

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2009

Promotionsausschussmitglieder: Prof. Dr. Alexander Kapp

Prof. Dr. Burkhard Wippermann

Prof. Dr. Stefan Kubicka

Meiner Familie.

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1. Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>1.1. Die Rolle des pulmonalen Surfactants im allergischen Asthma</b>	<b>8</b>
<b>1.2. Fragestellung</b>	<b>16</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>19</b>
<b>2.1. Studiendesign</b>	<b>19</b>
<b>2.2. Isolation, Vermessung und Färbung der PSG</b>	<b>20</b>
<b>2.3. Rasterelektronenmikroskopische Bestimmung der PSG- Größe</b>	<b>21</b>
<b>2.4. Surfactantproteine und Surfactantkompositionen</b>	<b>21</b>
<b>2.4.1. Surfactantprotein A von Patienten mit Alveolarproteinose (APSP-A)</b>	<b>21</b>
<b>2.4.2. Rekombinantes Humanes Surfactantprotein A (rhSP-A)</b>	<b>22</b>
<b>2.4.3. Rekombinantes Humanes homotrimeres SP-D Fragment (rfhSP-D)</b>	<b>22</b>
<b>2.4.4. Rekombinantes Surfactantprotein D der Ratte (rrSP-D)</b>	<b>22</b>
<b>2.4.5. Surfactantextrakt aus der Schweinelunge (Curosurf)</b>	<b>23</b>
<b>2.4.6. Phospholipidfraktion aus der Rinderlunge (Alveofact)</b>	<b>24</b>
<b>2.5. Alexa 488-Fluoreszenzmarkierung von SP-A und SP-D</b>	<b>24</b>
<b>2.6. Isolation der Alveolarmakrophagen aus der Sprague-Dawley Ratte</b>	<b>25</b>
<b>2.7. Konfokale Mikroskopie</b>	<b>26</b>
<b>2.8. Durchflusszytometrie (FACS)</b>	<b>27</b>
<b>2.9. Bindungs- und Aggregationsversuche</b>	<b>28</b>
<b>2.10. Phagozytose der PSG durch Alveolarmakrophagen</b>	<b>29</b>
<b>2.11. Funktionelle Untersuchung der rrSP-D vermittelten Phagozytose von PSG (Inhibition)</b>	<b>30</b>
<b>2.12. Untersuchung des Einflusses von Calcium auf die rrSP-D vermittelte Phagozytose von PSG</b>	<b>31</b>
<b>2.13. Langzeitbeobachtung der phagozytierten PSG in den Alveolarmakrophagen</b>	<b>31</b>

# Inhaltsverzeichnis

---

2.14. Statistik	32
2.15. Material- und Geräteliste	33
3. Ergebnisse	35
3.1. Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Größe und des Durchmessers der PSG von <i>Dactylis glomerata</i> und <i>Phleum pratense</i>	35
3.2. Aggregation von PSG durch rrSP-D und im geringen Maß von APSP-A	36
3.3. rrSP-D bindet calciumabhängig an <i>Dactylis glomerata</i> PSG	38
3.4. Nur rrSP-D fördert die Bindung bzw. Phagozytose von <i>Dactylis glomerata</i> PSG durch Alveolarmakrophagen	40
3.5. Nur rrSP-D zeigt eine Dosis-Wirkungsbeziehung bei Aufnahme von PSG durch Alveolarmakrophagen	43
3.6. Die rrSP-D-vermittelte PSG Aufnahme/Bindung ist durch Inhibitoren wie D-Galaktose und D-Maltose kompetitiv hemmbar	44
3.7. Die rrSP-D vermittelte Bindung/Phagozytose von <i>Dactylis glomerata</i> PSG durch Alveolarmakrophagen ist Ca <sup>2+</sup> -Abhängig	45
3.8. Phagozytierte fluoreszenzmarkierte <i>Dactylis glomerata</i> PSG sind für mindestens 96 Stunden in Alveolarmakrophagen nachweisbar	47
3.9. Auch <i>Phleum pratense</i> PSG unterliegen einer rr-SP-D-vermittelten Bindung/Phagozytose	49
4. Diskussion	51
5. Schlussfolgerung und Ausblick	58
6. Zusammenfassung	59
7. Literaturverzeichnis	60

### 1. Einleitung

Das allergische Asthma ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung bei dem eine erhöhte Reagibilität des Tracheobronchialbaums auf unterschiedliche Stimuli Atemwegsobstruktion mit den Symptomen Stridor und Dyspnoe verursacht (1). Der Grad der Atemwegsobstruktion variiert beim allergischen Asthma und kann sich spontan oder unter medikamentöser Behandlung vollständig zurückbilden (2). Bei familiärer Häufung ist eine Erstmanifestation im Kindesalter üblich. In der westlichen Zivilisation ist das allergische Asthma eine häufig auftretende Erkrankung. Das Auftreten von Asthma verläuft dabei episodisch. Die Prävalenz der amerikanischen Bevölkerung betrug im Jahr 2002 7,6 %, die Prävalenz in Deutschland lag im Jahr 2005 bei 6,34 % (3;4). Finnische Daten aus dem Jahr 2003 beschreiben seit 1926 eine kontinuierliche Zunahme des Krankenstandes bei Männern im Alter zwischen 18 und 19 Jahren (5). In Amerika beträgt die Prävalenz von Asthma im Kindesalter 3,7 %, in Deutschland 4,9 % (6;7). Die Manifestation wird durch verschiedene Co-Faktoren beeinflusst. Zu diesen Co-Faktoren zählen Übergewicht, männliches Geschlecht, eine positive Familienanamnese, die soziale Schicht und Hautfarbe. Das Risiko an Asthma zu erkranken ist für Asiaten relativ gering, während es für Menschen afro-amerikanischer Abstammung erhöht ist (8). Ein fortgeschrittenes Lebensalter und weibliches Geschlecht steigern das Risiko an den Folgen des allergischen Asthmas zu versterben (9). In diesem Zusammenhang treten Todesfälle in Assoziation zum allergischen Asthma gehäuft in den Wintermonaten auf, häufig in Verbindung mit Infektionen der Atemwege (9;10). Die Behandlung von Asthma ist unter volkswirtschaftlichen Gesichtspunkten aufwendig. Im Jahr 1999 belastete die Therapie des allergischen Asthmas das deutsche Gesundheitssystem mit Kosten in Höhe von 2,74 Milliarden Euro (4). Hausstaub, Tierhaare, Pollen und Pilzsporen sind die häufigsten Allergene, die zur Auslösung von allergischem Asthma führen. In der Diagnostik wird im

## 1. Einleitung

---

intrakutanen Allergentest (Pricktest) eine Hyperreagibilität auf verdächtige Allergene nachgewiesen. Im Serum ist häufig spezifisches IgE messbar. Zwar treten Asthmaanfälle episodisch auf, jedoch ist die Entzündungsreaktion der peripheren Atemwege jederzeit nachweisbar (2). Im Rahmen der Entzündungsreaktion tritt eine bronchiale Blutgefässerweiterung mit erhöhter Gefäßpermeabilität, paravaskulärer Ödembildung und Sequestration von Leukozyten auf. Zusätzlich sind eine verstärkte Desquamation bronchialer Epithelzellen und Epithelmetaplasie mit Drüsenhyperplasie vorhanden. Die Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur und die Hypersekretion von hochviskösem Mucus verengen die peripheren Bronchien. Die beschriebenen pathophysiologischen Veränderungen führen klinisch zu einer eingeschränkten Lungenfunktion mit Abfall der forcierten expiratorischen Einsekundenkapazität (FEV<sub>1</sub>).

Um das allergische Asthma auszulösen, müssen Allergene bis in die Alveolen inhaled werden. Im Alveolarraum werden die Allergene durch Antigen-präsentierende Zellen (APC), wie Dendritische Zellen und Makrophagen, aufgenommen und prozessiert. Fragmente des Antigens werden MHC II-vermittelt auf der Zelloberfläche präsentiert. T-Helferzellen binden mittels T-Zell-Rezeptor an das MHC II-präsentierte Antigen. Die aktivierten T-Zellen setzen Zytokine frei und veranlassen die Proliferation von B-Zellen in antikörperproduzierende Plasmazellen, die das Immunglobulin E (IgE) sezernieren (11). Bei wiederholter Allergenexposition binden Allergene an präformiertes IgE, das auf dem Mastzellrezeptor FcεRI gebunden ist. Eine Allergenbindung zwischen benachbarten mastzellständigen FAB-Domänen zweier IgE-Moleküle (cross-linking) verursacht eine Strukturveränderung am Fc-Anteil. Es folgt eine Veränderung der Mastzellmembran mit Mastzelldegranulation und Mediatorenfreisetzung (12;13). Dieser Vorgang wird als allergische Typ I-Reaktion bezeichnet. IgE bindet bei Asthmatikern außerdem an dem „Low Affinity Receptor“ von Makrophagen (FcεRII, CD23) und führt zur Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren

## 1. Einleitung

---

wie TNF-alpha, IL-1 und IL-8 (14). Diese FcεRII abhängige Makrophagenreaktion führt ebenso wie die beschriebene Typ I-Reaktion zur Bronchokonstriktion (15). Die allergische Reaktion auf Allergene lässt sich in eine Früh- und eine Spätphase einteilen. Die Frühphase tritt innerhalb von wenigen Sekunden nach Allergenprovokation auf. Es handelt sich um die zuvor beschriebene, IgE-vermittelte Freisetzung von Histamin und Leukotrienen aus Mastzellen. Die Histaminfreisetzung verursacht unmittelbar Bronchokonstriktion. Die freigesetzten chemotaktischen Mediatoren führen dann zu einer Immigration von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie von Monozyten bzw. Makrophagen in die Bronchialschleimhaut. Dieser Prozess wird als Spätphase bezeichnet (16). Die eingewanderten Entzündungszellen sezernieren proinflammatorische Mediatoren wie Leukotriene, Proteasen und Sauerstoffradikale. Diese Mediatoren verursachen ebenfalls eine Konstriktion der Bronchien, Schleimsekretion, Ödembildung und Schädigung des Bronchialepithels. Bei fortdauerndem Antigenkontakt ist eine chronische Entzündung der Schleimhaut nachweisbar.

### 1.1. Die Rolle des pulmonalen Surfactants im allergischen Asthma

In der Lunge überzieht der pulmonale Surfactant als Flüssigkeitsfilm die Innenwand von Alveolen und Bronchiolen. Der Surfactant wird von Typ II-Pneumozyten und zu einem geringen Anteil von Clarazellen produziert (17). Er besteht aus einer Lipidfraktion, überwiegend Phospholipiden und einer Proteinfraction, den vier surfactantassoziierten Proteinen A bis D (SP-A, SP-B, SP-C und SP-D).

Lipide stellen mit rund 90 % den Großteil der Surfactantmasse dar. Die Lipidfraktion besteht ihrerseits zu 90 % aus Phospholipiden, die übrigen 10 % vorwiegend aus Cholesterol. Die

## 1. Einleitung

---

amphiphatischen Phospholipide reduzieren die Oberflächenspannung an der Luft-Flüssigkeitsgrenze. Das wichtigste Phospholipid ist das Phosphatidylcholin, das überwiegend an gesättigte Fettsäuren konjugiert ist. In diesem Zusammenhang ist die Palmitinsäure die wichtigste Fettsäure (18;19). Das aus Palmitinsäure und Phosphatidylcholin konjugierte Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) ist maßgeblich für die Reduktion der Oberflächenspannung in den Alveolen und Bronchiolen verantwortlich (20;21). Der hydrophile Cholinrest interagiert mit der alveolären Flüssigkeitsphase, während der hydrophobe Palmitinsäurerest in die luminale Luftphase reicht (19).

Die surfactantassoziierten Proteine werden anhand ihrer Wasserlöslichkeit in eine hydrophobe und eine hydrophile Gruppe unterteilt. SP-B und SP-C gehören zu den hydrophoben Proteinen. Sie stabilisieren den Phospholipidfilm des Surfactants. Das SP-B ist ein 9 kDa kleines Protein, das über Thiolbrücken Oligomere unterschiedlicher Größe aufbaut. Die häufigste Form ist das Dimer (22). SP-B ist das Schlüsselprotein für einen stabilen Surfactantfilm (23). Ein angeborener SP-B-Mangel verursacht bereits in früher Kindheit eine schwerwiegende Störung der Lungenfunktion, gefolgt von einem progredienten respiratorischen Versagen. Das SP-C ist ein stark hydrophobes Protein mit einem Molekulargewicht von 45 kDa. Das SP-C spielt eine Rolle in der Adsorption von Phospholipiden (24). Es stabilisiert, ähnlich dem SP-B, den Surfactantfilm und besitzt keine bekannte immunologische Aktivität. Zu der Gruppe der hydrophilen surfactantassoziierten Proteine zählen SP-A und SP-D. Sie gehören in die Gruppe der Kollektine und sind wie das Komplementsystem ein Teil der angeborenen, unspezifischen Immunabwehr und haben immunregulatorischen Einfluss (25). Das SP-A und das SP-D sind aus vier unterschiedlichen Untereinheiten aufgebaut. Zu diesen Untereinheiten zählen eine aminoternale Region, eine kollagenartige Dreifachhelix gefolgt von einer alpha-helikalen Halsregion und einer Kohlenhydraterkennungsdomäne am C-Terminus (Carbohydrate Recognition Domain, CRD).

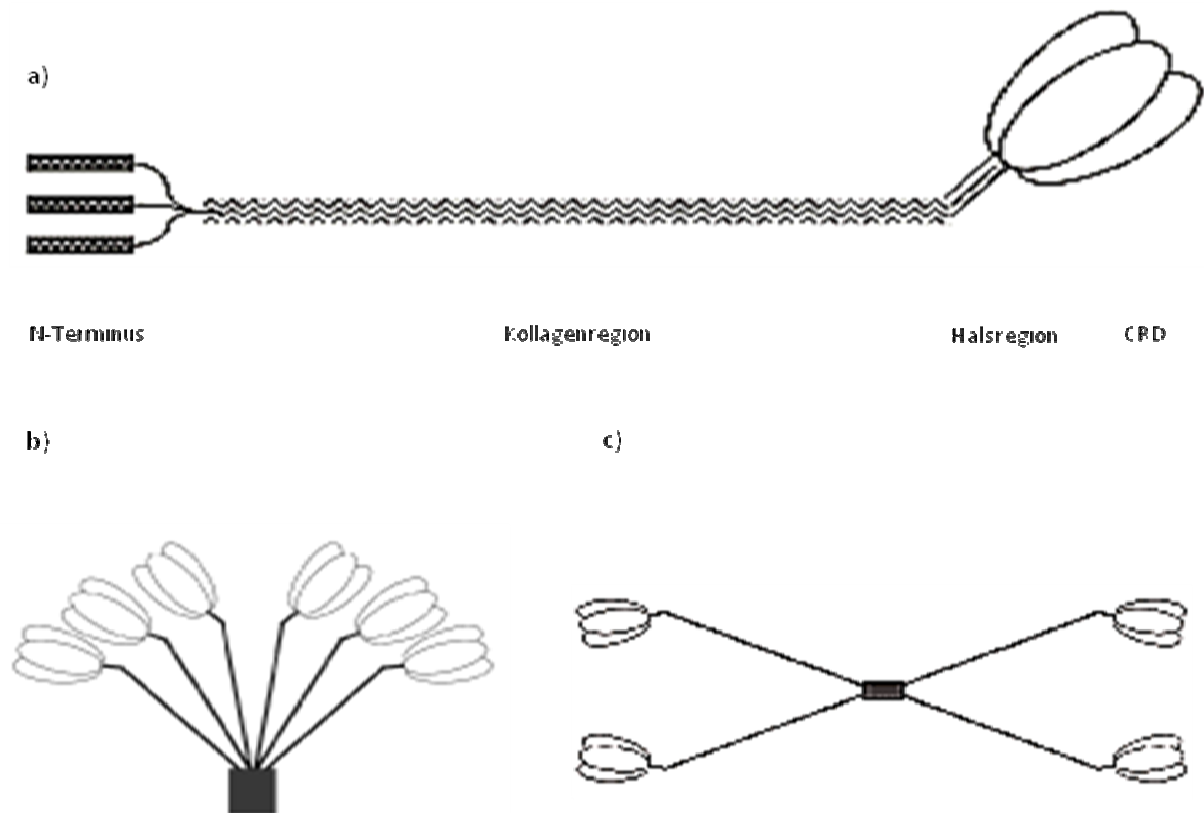
## 1. Einleitung

---

Diese Untereinheiten bilden eine trimere Struktur. Sechs dieser beschriebenen, trimeren Untereinheiten bilden ein bouquetförmiges octadecamer SP-A Molekül (26;27), vier der Untereinheiten bilden das kreuzförmige SP-D (Abbildung 1.1.1.). Unter den Surfactantproteinen stellt das SP-A die größte Fraktion dar. *In vivo* liegt es in einer Reihe von Isoformen mit einem Molekulargewicht zwischen 26 und 38 kDa vor. Die unterschiedlichen Massen der Isoformen resultieren aus Unterschieden in der Glykosylierung der CRD. Die C-terminale Domäne von SP-A und SP-D ähnelt funktional und strukturell den C-Typ Lektinen, in dessen Gruppe auch das Mannose-bindende Protein oder der Komplementfaktor C1q gehört. Die Kollagenregion des SP-A ist 20 nm lang. SP-A ist eingeschränkt wasserlöslich und im Surfactant an Lipide assoziiert. Die oberflächenspannungsreduzierenden Eigenschaften von SP-A sind vernachlässigbar. Das SP-D ist mit 1/8 der SP-A Masse im Surfactant enthalten. SP-D besteht aus vier Homotrimeren. Diese Homotrimere sind dodecamer zur einer kreuzförmigen Proteinstruktur mit vier Armen gleicher Länge organisiert (26;27). SP-D besitzt eine 171 nm lange Kollagenregion und ist gut wasserlöslich. Ebenso wie das SP-A beeinflusst SP-D die Oberflächenspannung in den Alveolen nicht nennenswert (28;29).

## 1. Einleitung

---



Quelle: Wright JR, 1997

**Abbildung 1.1.1:** Schematische Darstellung der unterschiedlichen Kollektine. a) Die Kollektine sind aus drei Polypeptidketten aufgebaut. Jede besteht aus einer aminoterminalen Region, einer Kollagenregion und einer alpha-helikalen Halsregion sowie einer carboxyterminalen Kohlenhydraterkennungsdomäne. b) Das SP-A ist ein octamerer Protein, dessen Kohlenhydraterkennungsdomänen bouquetförmig an einem Molekülende gruppiert sind. c) Das SP-D ist ein dodecameres Protein, bei dem die Kohlenhydraterkennungsdomänen kreuzförmig über das Molekül verteilt sind.

Die Entzündungsreaktion im Rahmen des allergischen Asthmas verursacht ein Kapillarleck mit Einstrom von Plasmaproteinen in die Alveolen (30). In den Alveolarraum eingedrungene Phosphatasen und Proteasen inaktivieren Phospholipide und surfactantassoziierte Proteine durch Spaltung (31-33). Surfactantdysfunktion und Veränderung der Surfactantzusammensetzung unterhalten sich gegenseitig im Sinne eines *circulus vitiosus* (34-37). Im Tierexperiment wurde gezeigt, dass Surfactantproteine und die Phospholipidfraktion die Oberflächenspannung in der Lunge reduzieren. Zur Behandlung einer akuten respiratorischen Insuffizienz auf dem Boden einer Surfactantdysfunktion sind mittlerweile

## 1. Einleitung

---

verschiedene Surfactantpräparate verfügbar. Zulassung besitzen das Curosurf® und das Alveofact®. Curosurf ist ein porcines Surfactant. Es wird aus Schweinelungen isoliert und besteht zu 99 % aus Phospholipiden und zu 1 % aus Proteinen (Surfactantprotein B, Surfactantprotein C). Es ist zur Therapie des neonatalen Atemnotsyndroms (RDS) zugelassen. Alveofact wird aus Rinderlungen durch Lavagierung isoliert. Alveofact besteht zu 88 % aus Phospholipiden, zu 4 % aus Cholesterol zu 8 % aus weiteren Lipiden und zu 1 % aus den hydrophoben surfactantassoziierten Proteinen SP-B und SP-C. Alveofact wird ebenfalls zur Therapie des RDS eingesetzt.

Neben den Surfactantpräparaten mit klinischer Zulassung sind rekombinante Surfactantproteine bzw. isolierte Surfactantproteine verfügbar. Diese finden zurzeit keinen klinischen Einsatz. Sie werden jedoch zur Untersuchung wissenschaftlicher Fragestellungen und auch in dieser Arbeit eingesetzt. Zu den verfügbaren rekombinanten Proteinen zählen unter anderem die hydrophilen Surfactantproteine SP-A und SP-D. Beide Proteine besitzen immunregulative Eigenschaften und sind ein wichtiger Bestandteil der unspezifischen pulmonalen Infektabwehr. Anti-inflammatorische Effekte von SP-A und SP-D konnten in Asthma-Tiermodellen beobachtet werden (38;39). SP-A und SP-D binden partikuläre Allergene und Pathogene und unterstützen deren Elimination aus der Lunge. Zusätzlich erhöhen sie die ziliäre Schlagfrequenz des respiratorischen Epithels, was die Elimination von inhalierten Pathogenen beschleunigt (40;41). Wang et al. konnten *in vitro*, anhand Blut juveniler Asthmapatienten zeigen, dass SP-A und SP-D nach Provokation die Proliferation von Lymphozyten und die Freisetzung von Histamin hemmen (42). Diese Ergebnisse weisen auf einen Zusammenhang von Lymphozytenproliferation und Histaminfreisetzung hin, ohne diesen zu erklären. Allerdings unterdrückt SP-A die Produktion von IL-8 durch aktivierte Eosinophile und kontrolliert die Leukozytensequestration (43). SP-A und SP-D regulieren möglicherweise auch die allergische Typ I-Reaktion durch Bindung an Allergene (42). *In*

## 1. Einleitung

---

*in vitro* inhibiert Surfactant dosisabhängig die Freisetzung von Histamin aus Vollblut von Atopikern nach Provokation mit *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p.*) (44). SP-A und SP-D regulieren ebenso die allergenspezifische Bindung von IgE an Allergene (42). Ebenso konnte *in vitro* eine Hemmung der allergeninduzierten Lymphozytenproliferation durch SP-A und SP-D nachgewiesen werden (42).

Die Phospholipidfraktion reguliert neben der bronchoalveolären Oberflächenspannung auch lokale pulmonale Immunreaktionen. Die Phospholipidfraktion moduliert die Aktivierung von Lymphozyten und deren Proliferation (45-47). Im Fall des allergischen Asthmas führt die Proliferation von T-Lymphozyten zur Zytokin-vermittelten Differenzierung von B-Zellen in Plasmazellen und dann zur Produktion von IgE. Die Freisetzung von IL-5 durch aktivierte T-Zellen lässt eosinophile Granulozyten in das Lungengewebe einwandern. Sequestrierte eosinophile Granulozyten unterhalten eine chronische Inflammation durch Freisetzung von IL-8. Die Surfactantphospholipide und die Kollektine SP-A und SP-D können die beschriebene Lymphozytenaktivierung verhindern und die Entzündungsreaktion regulieren (45;46;48;49). Eine Veränderung der Phospholipidfraktion des pulmonalen Surfactant begünstigt daher, neben einer Einschränkung der Lungenfunktion, wahrscheinlich auch eine Störung des Immunsystems der Lunge (50).

Im bronchoalveolären Zellbild stellen Alveolarmakrophagen mit über 90 % die dominierende Zellart dar. Alveolarmakrophagen sind die erste Verteidigungslinie des Immunsystems gegenüber inhalierbaren Pathogenen aus der Umwelt (51). In diesem Zusammenhang ist der Einfluss von den surfactantassoziierten Proteinen SP-A und SP-D auf die Interaktion von Alveolarmakrophagen mit Bakterien und Pilzen gut untersucht. SP-A und SP-D binden über die CRD an verschiedene Pathogene wie Bakterien, Viren, Pilze und Allergene (52;53). Gleichzeitig binden Kollektine an die Makrophagen, um die Phagozytose von Pathogenen

## 1. Einleitung

---

durch Opsonierung zu erleichtern (54;55). SP-A bindet mit einem Asparagin-gebundenen Zuckerrest am SP-A-Rezeptor auf Makrophagen bzw. am Fc- bzw. C1q-Rezeptor (56-58). SP-A vermittelt die Phagozytose unterschiedlicher Pathogene durch Opsonierung. Hierzu zählen beispielsweise *Mykobakterien*, *Staphylokokken*, *RSV-Viren* und *Aspergillus fumigatus* (59-62). SP-D bindet auf unterschiedlichen Rezeptoren von Makrophagen. SP-D erleichtert Alveolarmakrophagen die Phagozytose von *Pseudomonas aeruginosa* durch Aggregation (59). Des Weiteren beschleunigt SP-D durch Opsonierung die Phagozytose von *Staphylokokkus aureus*, *Aspergillus fumigatus* und Viren (63). Sowohl SP-A wie auch SP-D werden von Makrophagen aufgenommen und sind intrazellulär in Phagolysosomen nachweisbar (64). Ferner stimulieren SP-A und SP-D Makrophagen zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). ROS wirken im Gewebe direkt bakterizid (58;65). Zuletzt hemmen SP-A und SP-D unterschiedliche Pathogene Phagozytose-unabhängig. SP-A und SP-D führen im Fall von gramnegativen Bakterien zu einer Permeabilitätserhöhung der Zellmembran (66). Viren und Pilze werden durch eine SP-A- und SP-D-vermittelte Bindung agglutiniert und inaktiviert (67-69).

Neben Pathogenen interagieren die Kollektine auch mit verschiedenen Allergenen und beeinflussen darüber Reaktionen des Immunsystems. SP-A und SP-D binden Calcium-abhängig an *Der p*, ein Allergen der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* (44). Eine spezifische Bindung von IgE an *Der p* wird in Anwesenheit von SP-A oder SP-D inhibiert. Vermutlich handelt es sich in diesem Fall um eine kompetitive Hemmung oder eine sterische Behinderung. Ähnliche Interaktionen zwischen SP-A und Allergenen wie z.B. Pollen sind beschrieben. Hierzu zählen vor allem Pollen, beispielsweise von *Poa pratensis* (Wiesenrispe) und *Populus nigra italica* (Pyramidenpappel) (70). *Poa pratensis* gehört zur Familie der Süßgräser, *Populus nigra italica* ist ein Weidengewächs. Das SP-A bindet an diese Pollen. Diese Bindung ist durch Mannose kompetitiv inhibierbar (70). Während ihrer

## 1. Einleitung

---

Blütezeit sind die Pollen von Süßgräsern (*Dactylis glomerata*, *Phleum pratense*) der Hauptauslöser des allergischen Asthmas (71). Die Pollen von Gräsern erreichen aufgrund ihres Durchmessers von 25-60 µm den unteren Respirationstrakt kaum. Die Pollen können jedoch kleinere Pollenstärkegranula (PSG) freisetzen. Diese PSG stellen mit ihrer Größe unter 5 µm den eigentlichen inhalierbaren Bestandteil von Pollen dar (72;73). Eine Freisetzung von Pollenstärkegranula nach Regen bzw. bei erhöhter relativer Luftfeuchtigkeit oder bei Luftverschmutzung ist nachgewiesen. Dieser Zusammenhang erklärt eine Häufung von Asthmaanfällen und Allergien in Abhängigkeit zur Witterung (74-76). Die PSG bestehen aus Stärke und komplexen Kohlenhydraten. Für verschiedene Gräser konnten eine Reihe von wichtigen Allergenen innerhalb ihrer PSG identifiziert werden. Zum Beispiel im Roggen ist das maßgebliche PSG-assoziierte Allergen das *Lol p 5*, im Fall von *Phleum pratense* das *Phl p 5* (77;77-79).

Eine intra-tracheale Immunisierung von Ratten mit den PSG von *Phleum pratense* führt zur Induktion von spezifischem IgE. Nach wiederholter Provokation mit *Phleum pratense* PSG war bei Ratten eine Proliferation der mediastinalen Lymphknoten als Hinweis auf eine PSG-vermittelte zelluläre Immunreaktion nachweisbar (80). Auch Alveolarmakrophagen binden und phagozytieren PSG (81). Die Phagozytose von PSG durch Makrophagen ist Calcium-abhängig und kann *in vitro* mit EDTA inhibiert werden (81).

Während der Einfluss von Surfactant auf die Interaktion zwischen Makrophagen und Pathogenen gut untersucht ist, fehlen bislang derartige Daten zu Allergenen. Kollektine binden und inhibieren Pathogene und erleichtern deren Phagozytose durch Opsonierung und beeinflussen so die Immunreaktion auf Pathogene. In der vorgelegten Arbeit soll untersucht werden, ob Surfactant einen ähnlichen Einfluss auf Allergene hat und so deren Aufnahme in Makrophagen beeinflussen könnte.

## 1. Einleitung

---

### 1.2. Fragestellung

Die Interaktion von Surfactant und dessen Bestandteilen mit Pathogenen ist gut untersucht. Wie bereits dargestellt, binden SP-A und SP-D spezifisch über ihre CRD-Region an Pathogene wie Bakterien, Pilze und Viren. Diese Bindung erfolgt  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig und ist durch EDTA kompetitiv inhibierbar. SP-A oder SP-D aggregieren *E. coli*, *Aspergillus fumigatus* und andere Pathogene und fördern als Opsonine die Phagozytose dieser Pathogene durch Makrophagen.

Gräserpollen setzen unter Einfluss von Feuchtigkeit Pollenstärkegranula (PSG) frei. Die inhalierbaren PSG stellen einen wichtigen Faktor für die Auslösung des allergischen Asthmas dar. Die Interaktion von unterschiedlichen Surfactantkomponenten mit den PSG ist bisher nicht untersucht worden. Es ergeben sich einige Analogien der PSG zu verschiedenen Pathogenen, die sowohl die Größe als auch die Oberflächeneigenschaften betreffen. Aufgrund von Daten, die die Interaktion von Surfactant und Pathogenen dokumentieren, wurde vermutet, dass ähnliche Daten auch für die Interaktion mit Allergenen gefunden werden könnten. Daraus ergibt sich folgende Fragestellung:

#### 1. Interagieren unterschiedliche SP-A- und SP-D-Formen, Curosurf und Alveofact mit Pollenstärkegranula von *Dactylis glomerata*?

- 1.1. Binden Surfactantkomponenten an die PSG?
- 1.2. Aggregieren die PSG in Kontakt mit den Surfactantkomponenten?
- 1.3. Welche Strukturen sind für eine Bindung und Aggregation verantwortlich?

## **1. Einleitung**

---

### **2. Beeinflussen Surfactantkomponenten die Aufnahme von PSG in Makrophagen?**

- 2.1. Vermitteln Surfactantkomponenten die Aufnahme von PSG in Makrophagen?
- 2.2. Ist eine mögliche surfactant-vermittelte Aufnahme von PSG in Makrophagen inhibierbar?
- 2.3. Gibt es zwischen PSG unterschiedlicher Gräserarten Unterschiede hinsichtlich der Phagozytose durch Alveolarmakrophagen?

### **3. Was geschieht mit PSG nach der Phagozytose in Makrophagen?**

- 3.1. Sind die PSG nach Aufnahme über einen bestimmten Zeitraum in den Alveolarmakrophagen nachweisbar?
- 3.2. Welche Bedeutung hat ein möglicher Verbleib der PSG in den Alveolarmakrophagen?

### 1.3. Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

APSP-A	Surfactantprotein A von Patienten mit Alveolarproteinose
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
CHO-Zellen	Chinese Hamster Ovary Zellen
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Durchflusszytometer
FEV1	Forcierte Exspiratorische Einsekundenkapazität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PSG	Pollenstärkegranula
RDS	Atemnotsyndrom
rfhSP-D	Rekombinantes Fragment des humanen Surfactantprotein D
rhSP-A	Rekombinantes Humanes Surfactantprotein A
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale
rrSP-D	Rekombinantes Surfactantprotein D der Ratte
NO	Stickstoffmonoxid
TNF	Tumor Nekrose Faktor

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Studiendesign

Die vorliegende Studie gliedert sich in eine Reihe von aufeinander aufbauenden Experimenten. Zunächst wurde die Interaktion von Surfactantkomponenten mit den PSG in einem Bindungs- und Aggregationsassay untersucht. PSG von *Dactylis glomerata* wurden mit unterschiedlichen Surfactantproteinen inkubiert. Die Bindung wurde mittels konfokaler Mikroskopie und Durchflusszytometrie untersucht. Die Aggregation von PSG durch Surfactantkomponenten wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie quantifiziert. Mittels unterschiedlicher Inhibitoren wurde die Hemmung der Aggregation untersucht. In einem weiteren Ansatz wurde der Einfluss unterschiedlicher Surfactantkomponenten auf die Phagozytose von PSG durch Alveolarmakrophagen gemessen. Dazu wurden Alveolarmakrophagen mit Surfactantkomponenten und PSG inkubiert und der Anteil phagozytierter Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Mikroskopie bestimmt. Durch den Einsatz unterschiedlicher Inhibitoren wurde versucht, die Wirkung der Surfactantkomponenten zu studieren. Die Alveolarmakrophagen wurden nach Phagozytose bis zu 96 Stunden in Kultur gehalten, um das intrazelluläre Schicksal der phagozytierten PSG mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Mikroskopie zu verfolgen. Zusätzlich wurde untersucht, ob sich für PSG anderer Gräserpollen ähnliche Effekte zeigen.

## 2. Material und Methoden

---

### 2.2. Isolation, Vermessung und Färbung der PSG

Die Pollen von *Dactylis glomerata* wurden von der Firma Biopol Laboratory Inc., Spokane, Washington, USA bezogen, die Pollen von *Phleum pratense* von der Firma Allergon, Ängelholm, Schweden. Die Pollenstärkegranula von *Dactylis glomerata* oder *Phleum pratense* wurde basierend auf einem Protokoll von Currie et al. gewonnen (81). Zu 200 mg Pollen wurden 20 ml autoklaviertes, deionisiertes Wasser und 0,05 % Tween 20 hinzugefügt. Diese Suspension wurde 3 Minuten auf dem Rüttler durchmischt und danach für 2 Stunden bei 4 °C rotiert. Nach einer vier-minütigen Zentrifugation bei 50 g und 4 °C wurde der Überstand durch einen 20 µm Nylonfilter (VWR International, Hannover, Deutschland) filtriert. Das gewonnene Filtrat wurde für 10 Minuten bei 4 °C und 2500 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml steril-filtrierte, deionisierten Wasser aufgenommen und durch einen 3 µm Nylonfilter (Osmonics Minnetonka, MN, USA) filtriert. Es folgte eine erneute zehnminütige Zentrifugation bei 2500 g und 4 °C. Das Pellet wurde in 1 ml sterilem PBS (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) aufgenommen und zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Zur Quantifizierung der isolierten PSG wurde eine 1:100 Verdünnung in PBS hergestellt und die PSG wurden mit Hilfe einer Neubauer Kammer (Improved) gezählt. Die Menge der isolierten PSG betrug zwischen  $12,0 \cdot 10^8$  PSG bis  $19,2 \cdot 10^8$  PSG.

Die PSG wurden mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) oder Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) markiert. Eine Suspension bestehend aus maximal  $10^9$  PSG in 500 µl sterilem PBS und 0,1 M Natriumbikarbonat wurde dazu in ein mit Alexa Fluor-Farbstoff gefülltes Röhrchen aufgenommen. Die Alexa Fluor-Farbstoffe bestehen aus einem Succinimidylester, der mit primären Aminen von Proteinen einen stabilen Farbkomplex bildet. Durch Zugabe von Natriumbikarbonat wurde die Färbelösung auf pH 8,3 eingestellt, so dass die Succinimidylester des Farbstoffes mit den primären Aminen der PSG-Proteine reagieren. Das

## **2. Material und Methoden**

---

Absorptionsmaximum des gebildeten Farbkomplex liegt für Alexa 488 bei 494 nm und für Alexa 546 bei 556 nm. Die Emissionsmaxima liegen jeweils bei 519 nm und 573 nm. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur eine Stunde lichtgeschützt rotiert. Im Anschluss wurden die gefärbten PSG zweimal mit 15 ml sterilem PBS gewaschen. Das PSG-Pellet wurde nach 10minütiger Zentrifugation bei 2500 g und 4 °C in 1 ml PBS aufgenommen. Nach erneuter Zählung in der Neubauer Kammer (Improved) wurden die PSG in den *in vitro* Versuchen eingesetzt.

### **2.3. Rasterelektronenmikroskopische Bestimmung der PSG- Größe**

Die Länge und der Durchmesser der PSG wurden rasterelektronenmikroskopisch vermessen. 500 µg PSG wurden in 10 ml faserfreiem Aqua bidest. resuspendiert und im Ultraschallbad 10 Sekunden geschüttelt. Die Suspension wurde auf einen 47 mm Nucleoporefilter mit der Porengröße 0,2 µm aufgezogen. Eine Filterprobe wurde auf den Probenhalter geklebt und mit Gold bedampft. Nach Einschleusung in das Rasterelektronenmikroskop erfolgte bei 5000facher Vergrößerung die computergestützte Vermessung von jeweils 220 Granula.

### **2.4. Surfactantproteine und Surfactantkompositionen**

#### **2.4.1. Surfactantprotein A von Patienten mit Alveolarproteinose (APSP-A)**

Als Quelle für das APSP-A diente die broncho-alveoläre Lavageflüssigkeit (BALF), die bei der therapeutischen Bronchoskopie von Patienten mit Alveolarproteinose anfällt (82). Das APSP-A wurde freundlicherweise von J.R. Wright, Duke University, Durham NC, USA, zur

## **2. Material und Methoden**

---

Verfügung gestellt. Für die Experimente wurde eine APSP-A Stammlösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml und einem Endotoxingehalt <200 pg/mg verwendet (83).

### **2.4.2. Rekombinantes Humanes Surfactantprotein A (rhSP-A)**

Als Alternative zur Isolierung von nativem humanen SP-A wurde im Jahr 1991 von Byk Gulden Konstanz (heute Altana Pharma AG, Konstanz) die gentechnische Herstellung von rhSP-A entwickelt (84). Diese Substanz wurde freundlicherweise von der Altana Pharma AG, Konstanz zur Verfügung gestellt. Der Endotoxingehalt des rhSP-A betrug <44 pg/mg Protein.

### **2.4.3. Rekombinantes Humanes homotrimeres SP-D Fragment (rfhSP-D)**

Das rekombinante Humane SP-D Fragment (rfhSP-D) wurde in *Escherichia coli* über Bakteriophagen exprimiert (85). Es handelt sich beim rfhSP-D um ein kleines homotrimeres Molekül mit einer Größe von 60 kDa, während das humane SP-D eine Molekülgröße von 540 kDa besitzt. Das rfhSP-D besteht aus einer alpha-helikalen Halsregion mit acht Gly-Xaa-Yaa Wiederholungen und drei CRD am C-Terminus, die dem humanen SP-D gleichen. Obwohl das rfhSP-D wesentlich kleiner als das native SP-D ist, hat es für verschiedene Funktionen immunologische Aktivität (85;86). Das rfhSP-D wurde ebenfalls von der Altana Pharma AG, Konstanz, Deutschland zur Verfügung gestellt. Der Endotoxingehalt des rfhSP-D betrug 40 pg/mg.

### **2.4.4. Rekombinantes Surfactantprotein D der Ratte (rrSP-D)**

## 2. Material und Methoden

---

Das rekombinante Surfactantprotein D der Ratte (rrSP-D) wurde in Chinese Hamster Ovary Zellen (CHO-K1-Zellen) durch Transfektion mit dem SP-D cDNA-clone pEE14 der Ratte synthetisiert (87). Das rrSP-D wird als vollständiges Dodecamer exprimiert und ist posttranslational glykosyliert und hydroxyliert. Es ist in Struktur und Größe vom natürlichen SP-D der Ratte nicht zu unterscheiden (48). pEE14-transfizierte CHO-K1 Zellen wurden für acht Tage kultiviert (87). Der Zellüberstand der Kulturen wurde gegen eine 25 mM Tris-Aminomethanlösung (140 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>) dialysiert und anschließend über einer Maltosesäule gereinigt. Die Konzentration des gewonnenen rrSP-D wurde mittels Bicinchoninicsäure-Assay (BCA-Assay, Pierce, Rockford, USA) bestimmt. Der Endotoxingehalt betrug < 0,460 pg/μg Protein (QLC-1000 Limulus Amebocyte Lysate Assay).

### 2.4.5. Surfactantextrakt aus der Schweinelunge (Curosurf)

Bei Curosurf (Nycomed Pharma GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) handelt es sich um porcines Surfactant. Curosurf wird aus zerkleinerten Schweinelungen durch eine Kombination aus Waschen, Zentrifugieren, Methanol-Chloroformextraktion und Flüssigkeits-Gel-Chromatographie gewonnen. Die isolierte Phospholipidfraktion wird in Chloroform gelöst und über ein Hochdruck-Filtersystem sterilisiert. Neutrale Lipide wie Cholesterol werden chromatographisch entzogen. Curosurf liegt in einer Gesamtkonzentration von 80 mg/ml bei pH 6,2 vor, entsprechend 74 mg/ml Phospholipiden in 0,9 %iger Natriumchloridlösung (88). Es handelt sich zu 90 % um Phospholipide und zu 1 % um Proteine (Surfactantprotein B, Surfactantprotein C). Die Phospholipidfraktion unterteilt sich zu 41-48 % in gesättigte

## **2. Material und Methoden**

---

Phospholipide (DPPC) und zu 51-58 % in andere Phospholipide. SP-A und SP-D sind im Curosurf nicht enthalten.

### **2.4.6. Phospholipidfraktion aus der Rinderlunge (Alveofact)**

Alveofact (Boehringer Ingelheim, Biberach, Deutschland) wird zur Therapie des Atemnotsyndroms (RDS) eingesetzt. Es wird aus Rinderlungenlavage über Chloroform-Methanol Extraktion und Zentrifugation isoliert und enthält 50,76 mg - 60,00 mg Phospholipide in der Trockenmasse. Es besteht zu 88 % aus Phospholipiden, zu 4 % aus Cholesterol, zu 8 % aus weiteren Lipiden und zu 1 % aus den hydrophoben surfactantassoziierten Proteinen SP-B und SP-C. Alveofact enthält keine relevante Menge an hydrophilen surfactantassoziierten Proteinen (SP-A und SP-D). Es wird als Lyophilisat mit 50 mg Phospholipiden zur Suspension in 1,2 ml Lösungsmittel (NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O) resuspendiert. Alveofact wurde freundlicherweise von Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Biberach, Deutschland zu Verfügung gestellt.

### **2.5. Alexa 488-Fluoreszenzmarkierung von SP-A und SP-D**

Eine Dialysekassette (Slide-A-Lyzer 05-3,0 ml, 10,000 MWCO, Pierce, Rockford, USA) wurde für 30 Sekunden in 200 ml PBS mit 5 µl Tween 20 gewässert. Es folgte die Injektion von 100 µg des zu markierenden rrSP-D oder APSP-A in 1000 µl PBS in die Dialysekassette, dann eine vierstündige Dialyse gegen 0,1 M Natriumbikarbonatlösung (500 ml) bei 4 °C. Eine Ampulle Alexa 488 wurde in 1 ml Natriumbikarbonatpuffer bei pH 8,3 gelöst. Diese Lösung enthält  $6,2 \cdot 10^{-8}$  mol Alexa 488. Zum Färben von 100 µg SP-D wurden gemäß

## **2. Material und Methoden**

---

Herstellerangaben umgerechnet  $3,3 \cdot 10^{-9}$  mol Alexa benötigt, bzw. 60  $\mu\text{l}$  der  $6,2 \cdot 10^{-8}$  molaren Alexa 488-Stammlösung. Zur Fluoreszenzmarkierung von 100  $\mu\text{g}$  APSP-A wurden  $4,4 \cdot 10^{-9}$  mol Alexa benötigt was 72  $\mu\text{l}$  der  $6,2 \cdot 10^{-8}$  molaren Stammlösung entspricht. Zur Fluoreszenzmarkierung von 100  $\mu\text{g}$  rrSP-D wurden 60  $\mu\text{l}$  der Alexastammlösung in die Dialysekassette injiziert, für 100  $\mu\text{g}$  APSP-A wurden 72  $\mu\text{l}$  verwendet. Es folgte eine achtstündige Inkubation in feuchter, lichtgeschützter Kammer unter leichter Agitation bei 4 °C. Ungebundenes Alexa 488-Fluorochrom wurde dem Ansatz danach durch 14stündige Dialyse gegen 2x 0,5 Liter calcium- und magnesiumfreies PBS entzogen. Das Dialysat wurde nach 6 Stunden erneuert. Es folgte die Entnahme des fluoreszenzmarkierten surfactantassoziierten Proteins aus der Dialysekassette und die lichtgeschützte Verwahrung bei 4 °C.

### **2.6. Isolation der Alveolarmakrophagen aus der Sprague-Dawley Ratte**

Männliche Sprague-Dawley Ratten wurden von Charles River bezogen. Für den Umgang und die Haltung der Tiere wurden die Richtlinien des NIH beachtet (“Principles of Laboratory Animal Care” and the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, and published by the National Academy Press, revised 1996.). Das Gewicht der Ratten betrug zum Zeitpunkt des Experiments 300 bis 470 g. Die Ratten wurden durch eine intraperitoneal applizierte, letale Dosis von 160 mg Narcoren (Veterinaria AG Zürich, Schweiz) schmerzlos getötet. Das Abdomen wurde mittels Medianschnitt eröffnet und die Lebervene zur Exsanguination durchtrennt. Es folgte die cervicale Präparation und Kanülierung der Trachea. Der Thorax wurde durch einen linksseitigen Parasternalschnitt vom Xiphoid aus eröffnet, und die Lunge wurde samt Trachea aus dem Thorax entnommen. Rattenalveolarmakrophagen wurden mittels

## **2. Material und Methoden**

---

bronchoalveolärer Lavage (BAL) gewonnen. Nach Entnahme wurde die Lunge 8mal mit 10 ml PBS lavagiert. Die gewonnene BALF wurde bei 250 g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde anschließend verworfen. Nach Resuspension des Zellpellets in 5 ml Medium (RPMI 1650 mit L-Glutamin + 10 % fetales, hitzeinaktiviertes Kälberserum + 1 % Penicillin/Streptomycin) wurde ein Teil der Zellen mit Trypanblau gefärbt und Zellzahl sowie Vitalität wurden mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Darauf wurden die Zellen entsprechend der Versuchsprotokolle aufgeteilt und inkubiert.

### **2.7. Konfokale Mikroskopie**

Das verwendete konfokale Mikroskop war ein Zeiss LSM 510 META (Zeiss, Jena, Deutschland). Das Mikroskop ist mit einem Argonlaser (488 nm) und zwei Helium-Neonlasern (543 nm und 633 nm) ausgestattet. Bei der konfokalen Mikroskopie konzentriert sich der Laserstrahl auf einen Punkt im Untersuchungsobjekt. Der Strahl wird im Rasterverfahren Punkt für Punkt und Zeile für Zeile über das Präparat geführt. Durch die punktförmige Fokussierung ergeben sich bei übereinander gestapelten Ebenen räumliche Bilder. Zur Auswertung der Bindung, Aggregation und Aufnahme von PSG in Alveolarmakrophagen sowie der Bindung von Alexa Fluor 488 gefärbten Surfactantproteinen an die PSG wurde ein 63 x Ölimmersionsobjektiv verwendet. Die Zellen wurden für die konfokale Mikroskopie fixiert, mit Evans Blue gefärbt und in Chamber slides unter dem Mikroskop betrachtet. Der Vorteil der Chamber slides gegenüber herkömmlichen Zytospin-Präparationen liegt darin, dass die Zellen ihre kugelförmige Struktur behalten und nicht flach auf den Objektträger gedrückt werden. Das ermöglicht die eindeutige Darstellung der gebundenen beziehungsweise aufgenommenen PSG pro Zelle. Für die Auswertung wurden mindestens 100 Alveolarmakrophagen pro 3D-Bild gezählt. Die Fluoreszenz von Alexa 488

## **2. Material und Methoden**

---

wurde mit dem Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Emission bei 500 bis 530 nm detektiert. Alexa 546 und Evans Blue wurden mit dem Heliumlaser angeregt und die Wellenlänge bei 560 nm gemessen.

### **2.8. Durchflusszytometrie (FACS)**

Mittels Durchflusszytometrie wurden die Bindungs- und Aggregationsassays sowie die Phagozytoseassays durchgeführt. Verwendet wurde ein FC 500 Durchflusszytometer (Beckman Coulter, Fullerton, USA). Das Durchflusszytometer war mit einem 488 nm Argonionenlaser und mit einem 635 nm Diodenlaser bestückt. Es wurden pro Experiment mindestens 5000 Zellen analysiert. Die Zellzählung erfolgte anhand positiver Zellkernfärbung mittels To-Pro 3. Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse einzelner Zellen anhand ihrer optischen Eigenschaften. Das von der Zelle in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht wird von einem „Forward-Scatter“-Detektor (Vorwärtsstreulicht, FSC) in der Ebene des Laserstrahls detektiert, der „Sideward-Scatter“-Detektor (Seitwärtsstreulicht, SSC) und die Fluoreszenz werden rechtwinklig zum Laserstrahl gemessen. Das Vorwärtsstreulicht korreliert mit der Zell- bzw. Partikelgröße, das Seitwärtsstreulicht dient der Detektion der internen Struktur, der Granularität der Zelle. Neben Größe und Granularität kann das FACS simultan emittiertes Licht von drei unterschiedlichen Wellenlängen (FL1, FL2, FL3) quantitativ bestimmen. Diese wellenlängenspezifische Lichtemission wird durch Fluoreszenzfarbstoffe, die an Zellbestandteile gekoppelt werden, erzielt. Für die Experimente wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) und Alexa 546 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) verwendet. Zusätzlich wurde To-Pro 3 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) als Kernfarbstoff verwendet.

## 2. Material und Methoden

---

Die durchflusszytometrische Analyse der Aggregation erfolgte im FSC-Kanal, der die Granulagröße misst. Dieses Verfahren wurde bereits für Aggregation von Bakterien und Zellen beschrieben (89;90). Als Kontrolle dienten PSG, die nicht mit Surfactantproteinen inkubiert wurden. Die gemessene mittlere Intensität im FSC-Kanal wurde prozentual zur Kontrolle (=100 %) ausgedrückt. Die Bindung von Surfactantprotein an PSG wurde ebenfalls durchflußzytometrisch bestimmt. Für den Bindungsassay erfolgte die Fluoreszenzmarkierung von PSG mittels Alexa 546 und den Surfactantproteinen mittels Alexa 488. Als Kontrolle wurde EDTA hinzugegeben, das die calciumabhängige Bindung der Surfactantproteine verhindert. Für die Phagozytoseassays erfolgte eine Zellfärbung mit To-Pro 3, die PSG wurden mit Alexa 488 gefärbt. Aus jeder Probe erfolgte die Analyse von mindestens 5000 Ereignissen.

### 2.9. Bindungs- und Aggregationsversuche

Für den Bindungsassay wurden APSP-A und rrSP-D mit Alexa Fluor 488 fluoreszenzmarkiert. Die PSG von *Dactylis glomerata* wurden mit Alexa Fluor 546 gefärbt. Für den Bindungsassay wurden  $2 \cdot 10^6$  Alexa 546-gefärbte PSG mit den gefärbten Surfactantproteinen APSP-A (1-10 µg) und rrSP-D (1 µg) in 1 ml Medium für acht Stunden inkubiert. Für die konfokalmikroskopische Analyse wurden Zytospinpräparate angefertigt. Im Aggregationsassay wurden  $2 \cdot 10^6$  PSG (Alexa 546-fluoreszenzmarkiert) mit verschiedenen Surfactantproteinen in 1 ml Medium ohne Zellen für acht Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Surfactantkomponenten rhSP-A (1-30 µg/ml), APSP-A (1-10 µg/ml), rfhSP-D (1-30 µg/ml) und rrSP-D (1 µg/ml) wurden hinzugefügt. Es wurden höhere Konzentrationen von Surfactantproteinen eingesetzt, wenn bei niedrigen Konzentrationen keine Effekte nachweisbar waren. Weitere Ansätze enthielten zusätzlich die Inhibitoren EDTA (10 mM),

## 2. Material und Methoden

---

Maltose (100 mM) und Galaktose (100 mM) (42;91). Die Negativkontrollen ohne Inhibitoren wurden bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die PSG zentrifugiert, fixiert und analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Mikroskopie. Die Größenbestimmung der Aggregate erfolgte im Durchflusszytometer durch die Bestimmung der durchschnittlichen Intensität im FSC-Kanal. Diese Methode wurde bereits für Zellen und Bakterien beschrieben (89;90). Die Messungen wurden auf die nativen PSG, die ohne Surfactantprotein inkubiert wurden, normiert (=100 %). Für die konfokale Mikroskopie wurden die Alveolarmakrophagen mit Paraformaldehyd fixiert und mit Evans Blue gefärbt.

### 2.10. Phagozytose der PSG durch Alveolarmakrophagen

Für diese Versuche wurden die Alveolarmakrophagen ( $2 \cdot 10^5$ ) in 1 ml Medium (RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin) in Kultur genommen. Es folgte die Inkubation mit unterschiedlichen Surfactantkomponenten (250 µg/ml Curosurf, 250 µg/ml Alveofact, 30 µg/ml rhSP-A, 1 µg/ml APSP-A, 30 µg/ml rhSP-D, 1 µg/ml rrSP-D) für 40 Minuten bei 37 °C und 5 % Kohlendioxidgehalt in Polypropylen Röhren. Zur Bestimmung der Dosisabhängigkeit auf die Bindung und Aufnahme der PSG durch Alveolarmakrophagen wurden APSP-A und rrSP-D in den Konzentrationen 0,1 µg, 0,25 µg, 0,5 µg, 1,0 µg, 2,5µg, 5,0 µg eingesetzt. Eine Kontrolle wurde ohne Surfactantzusatz und eine weitere Kontrolle mit Surfactant bei 4 °C mitgeführt. Es wurden in einen Verhältnis von 10:1 die mit Alexa 488-gefärbten PSG (*Dactylis glomerata*, *Phleum pratense*) mit den Alveolarmakrophagen für acht Stunden bei 37 °C, beziehungsweise bei 4 °C für die Negativkontrolle, inkubiert. Zur Vorbereitung für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen für 10 Minuten bei 250 g und 4 °C zentrifugiert und das Zellpellet mit 2 ml einer 2 %igen

## **2. Material und Methoden**

---

Paraformaldehydlösung (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) mit 12 mM Natriumazid (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit 1 ml PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und in einem Gesamtvolumen von 400 µl PBS aufgenommen. Für die anschließende Durchflusszytometrie wurde eine Kernfärbung mit 2 µmol To-Pro 3 durchgeführt. Pro Probe wurden 10.000 Zellen im Durchflusszytometer gezählt, hierzu wurde ein Gate auf die To-Pro 3-positiven Zellen gelegt. Der Prozentsatz PSG-positiver Zellen wurde ermittelt, indem ein Gate auf die positiven Zellen gesetzt wurde.

Auch für die konfokale Mikroskopie wurden die Alveolarmakrophagen mit Paraformaldehyd fixiert. Die Färbung der Zellen erfolgte mit Evans Blue. Evans Blue diffundiert in das Cytoplasma fixierter Zellen und färbt diese gleichmäßig blau an. Mittels dreidimensionaler Rekonstruktion der Schichtaufnahmen durch konfokale Mikroskopie wurde differenziert, ob die Alexa 488-markierten PSG auf der Oberfläche der Alveolarmakrophagen gebunden waren oder intrazellulär lagen. Auch für diese Versuche wurden Zellen bei 4 °C inkubiert, da bei dieser Temperatur keine Phagozytose der PSG erfolgt und eine intrazelluläre Aufnahme ausgeschlossen werden konnte. So konnte der Anteil der Zellen ermittelt werden, die die PSG lediglich gebunden hatten. Insgesamt wurden ca. 100 Zellen pro Sektion ausgewertet.

### **2.11. Funktionelle Untersuchung der rrSP-D vermittelten Phagozytose von PSG (Inhibition)**

Um den Mechanismus der Phagozytose von SP-D zu untersuchen, wurden in  $2 \cdot 10^5$  Alveolarmakrophagen jeweils die Inhibitoren (10 mM EDTA, 100 mM Maltose, 100 mM Galaktose), und 1 µg rrSP-D pipettiert. Die Zellen wurden für 40 Minuten bei 37 °C und 5 %

## 2. Material und Methoden

---

Kohlendioxidgehalt vorinkubiert. Eine weitere Inkubation erfolgte für acht Stunden nach Zugabe von  $2 \cdot 10^6$  Alexa Fluor 488 gefärbten PSG. Im Anschluss wurden die Alveolarmakrophagen zentrifugiert, fixiert und mittels Durchflusszytometrie ausgewertet.

### 2.12. Untersuchung des Einflusses von Calcium auf die rrSP-D vermittelte Phagozytose von PSG

$2 \cdot 10^5$  Alveolarmakrophagen wurden in 1ml RPMI 1640 Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin ohne FCS aufgenommen und einmal mit und einmal ohne 1 mg rrSP-D bei 4 °C und bei 37 °C für 40 Minuten inkubiert. Alexa 488-markierte PSG von *Dactylis glomerata* wurden in einem Verhältnis von 10:1 zu den Zellen pipettiert. Es folgte eine Inkubation von acht Stunden bei 4 °C und 37 °C bei 5 % Kohlendioxidgehalt. In weiteren Ansätzen wurde 1 mM  $\text{CaCl}_2$  zugefügt. Die Aufbereitung der Zellen für die FACS-Analyse erfolgte analog zu den vorhergehenden Versuchen.

### 2.13. Langzeitbeobachtung der phagozytierten PSG in den Alveolarmakrophagen

$2 \cdot 10^5$  Alveolarmakrophagen wurden mit und ohne rrSP-D (1 µg) für 40 Minuten bei 37 °C und 5 % Kohlendioxidgehalt vorinkubiert. Anschließend wurden Alexa 488-gefärbte PSG von *Dactylis glomerata* im Verhältnis 20:1 zu den Zellen hinzugefügt und für acht Stunden inkubiert. Um nach acht Stunden Inkubationszeit eine weitere PSG-Aufnahme zu verhindern, erfolgte die Separation der Alveolarmakrophagen von den PSG über einen Percollgradienten. Aus der Percollstammlösung (Amersham, Buckinghamshire, UK) wurde mit PBS eine 5 %ige und 65 %ige Lösung hergestellt. In 15 ml Falconröhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg,

## **2. Material und Methoden**

---

Deutschland) erfolgte die Überschichtung der 5 % Percollösung (3 ml) auf die 65 % Lösung (3 ml). Die Zellsuspension wurde über den Percollgradient geschichtet und für 35 Minuten bei 3500 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Zentrifugation befanden sich die Alveolarmakrophagen in der Zwischenphase, während sich die freien, ungebundenen PSG am Boden des Röhrchens befanden. Die Zwischenphase wurde mit Hilfe einer 2 ml Messpipette (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) abgenommen und zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation (250 g bei 4 °C) wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen erneut mit 0,5 ml Vollmedium in Kultur genommen. Die Zellen wurden direkt nach der Percollseparation sowie nach 24 Stunden, 48 Stunden, und 96 Stunden nach der Separation zur FACS-Analyse aufgearbeitet. Zur Analysevorbereitung wurden die Zellen wie oben beschrieben für 10 Minuten bei 250 g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 2 ml einer 2 %igen Paraformaldehydlösung mit 12 mM Natriumazid für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Es folgte Waschen mit 1 ml PBS und erneute Zentrifugation bei 250 g und im Anschluss Resuspension in einem Gesamtvolumen von 400 µl PBS. Für die anschließende FACS-Analyse wurde eine Zellkernfärbung mit To-Pro 3 durchgeführt.

### **2.14. Statistik**

Die statistische Datenanalyse für Einzelwerte erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem t-Test. Die Signifikanzgrenzen wurden unter Beachtung der Bonferronikorrektur angegeben. Werte von  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant betrachtet.

## 2. Material und Methoden

---

### 2.15. Material- und Geräteliste

Reagenzien	Hersteller
Alexa Fluor 488	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Alexa Fluor 546	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Alveofact	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH, Biberach
APSP-A	J. R. Wright, Duke University, Durham NC, USA
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Curosurf	Nycomed Pharma GmbH, Unterschleissheim
<i>Dactylis glomerata</i> Pollen	Biopol Laboratories Inc., Spokane Washington, USA
Evans blue	Sigma-Aldrich, München
Fötales Kälberserum	Biochrom, Berlin
Galaktose	Sigma-Aldrich, München
Limulus Amebocyte Lysate Assay QLC-1000	Bio-Whittaker, Walkersville, Maryland, USA
Maltose	Sigma-Aldrich, München
Narcofen	Veterinaria AG, Zürich, Schweiz
Natriumazid	Sigma-Aldrich, München
Natriumphosphatpuffer (ph 7,5)	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd 2 %	Sigma-Aldrich, München
PBS	Bio-Whittaker, Walkersville, Maryland,

## 2. Material und Methoden

---

	USA
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, München
Percoll	Amersham, Buckinghamshire, UK
<i>Phleum pratense</i> Pollen	Allergon, Ängelhom, Schweden
rfhSP-D	Altana Pharma, Konstanz
rhSP-A	Altana Pharma, Konstanz
rrSP-D	J.R. Wright, Duke University, Durham NC, USA
RPMI 1640	Bio-Whittaker, Walkersville, Maryland, USA
To-Pro 3	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, München

### Geräte und Materialien

### Hersteller

---

20 µm Nylonfilter	VWR International, Hannover
3 µm Nylonfilter	Osmonics Minnetonka, Minnesota, USA
Cytomics Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
Neubauer Zählkammer (Improved)	Merck, Darmstadt
Nucleoporefilter 0,2 µm	VWR International, Hannover
Polypropylenröhrchen, Falcon	Becton Dickinson, Heidelberg
Rasterelektronenmikroskop	Carl-Zeiss Optik und Messtechnik, Jena
Slide-A-Lyzer (05-3,0 ml)	Pierce, Rockford, USA
Zeiss LSM 150 Meta Zeiss	Carl-Zeiss Optik und Messtechnik, Jena

### 3. Ergebnisse

---

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Größe und des Durchmessers der PSG von *Dactylis glomerata* und *Phleum pratense*

Es erfolgte rasterelektronenmikroskopische (REM) Vermessung von 212 *Dactylis glomerata* PSG bzw. 212 *Phleum pratense* PSG (Abbildung 3.1.1). Die PSG wiesen überwiegend eine ovale Form auf. Die mittlere PSG-Länge für *Phleum pratense* betrug  $1,49 \pm 0,53 \mu\text{m}$  bzw.  $1,34 \pm 0,43 \mu\text{m}$  für *Dactylis glomerata*. Der mittlere PSG-Durchmesser für *Phleum pratense* betrug  $0,99 \pm 0,33 \mu\text{m}$  und  $0,95 \pm 0,24 \mu\text{m}$  für *Dactylis glomerata*. Somit waren die *Phleum pratense* PSG eher größer als die *Dactylis glomerata* PSG (Abbildung 3.1.2).

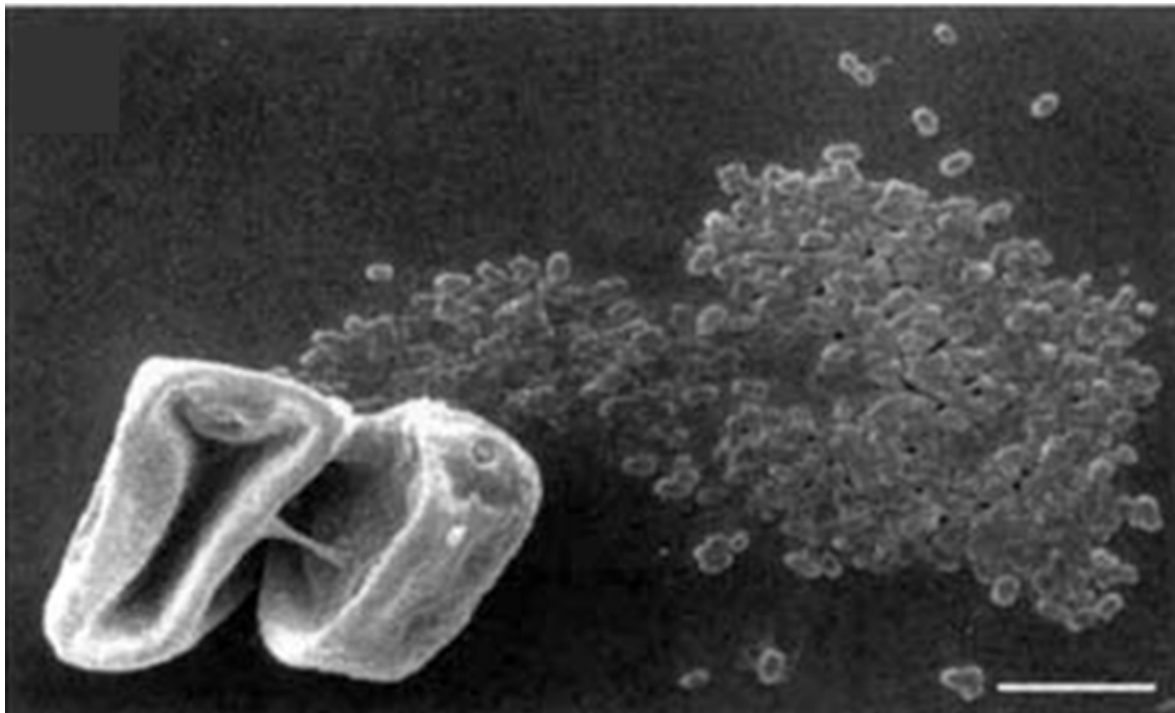


Abbildung 3.1.2: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der PSG-Freisetzung aus Pollen. Links unten im Bild ist ein Pollenkörper der PSG freisetzt (Taylor et al. J Allergy Clin Immunol 2002).

### 3. Ergebnisse

---

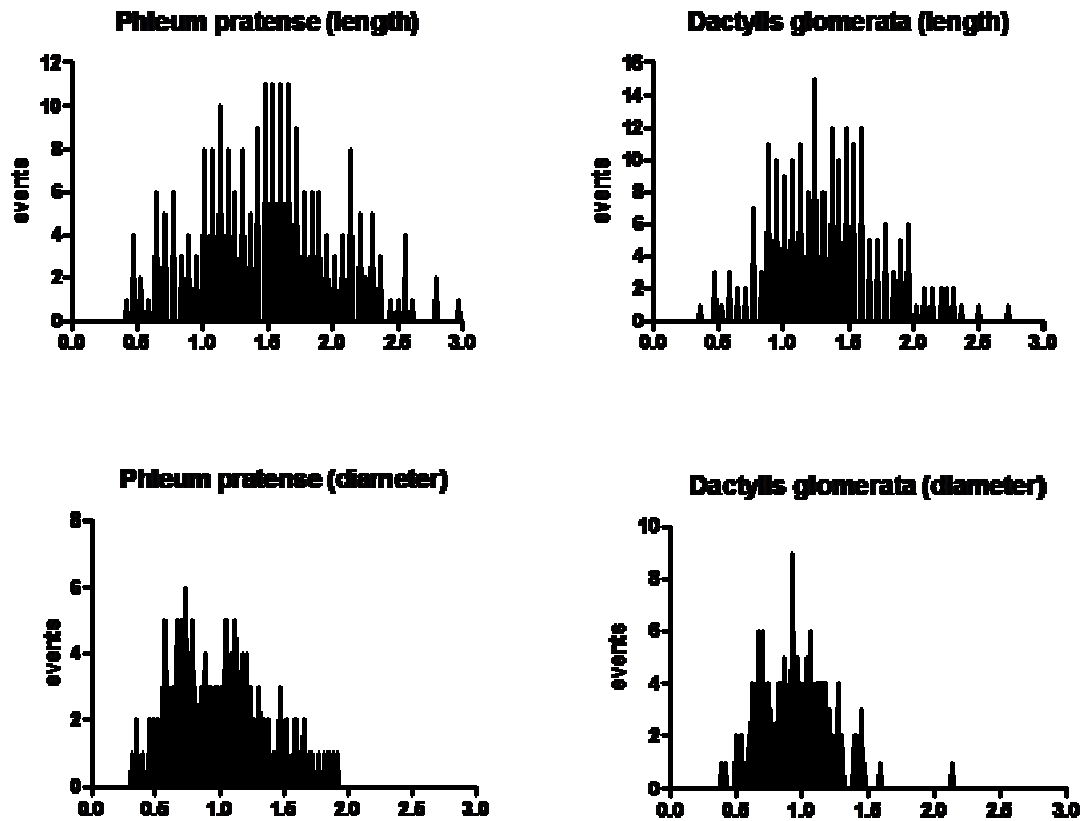


Abbildung 3.1.2: Rasterelektronenmikroskopische Vermessung der PSG von *Dactylis glomerata* sowie *Phleum pratense* PSG. Die X-Achse stellt Länge bzw. Durchmesser in  $\mu\text{m}$  dar, die Y-Achse die Anzahl der PSG in Abhängigkeit der Größe auf der X-Achse.

#### 3.2. Aggregation von PSG durch rrSP-D und im geringen Maß von APSP-A

Die *Dactylis glomerata* PSG aggregieren in Anwesenheit von rrSP-D (Abbildung 3.2.1). Die in der Kontrolle bei 37 °C gemessene Aggregation entsprach 100 % (n=7). In Gegenwart von 1  $\mu\text{g/ml}$  rrSP-D (n=6) betrug die relative Aggregation von *Dactylis glomerata* PSG  $2495 \pm 121$  % (Abbildung 3.2.2.). Die relative Aggregation in Anwesenheit von 10  $\mu\text{g/ml}$  APSP-A war mit  $313 \pm 166$  % (n=6) signifikant geringer als die unter rrSP-D-Einfluss (rrSP-D vs. APSP-A,  $p < 0,001$ , t-Test). Die übrigen Surfactantpräparate rhSP-A (30  $\mu\text{g/ml}$ , n=4) und rfhSP-D (30  $\mu\text{g/ml}$ , n=4) hatten keinen messbaren Einfluss auf die Aggregation von *Dactylis glomerata* PSG. Die rrSP-D-vermittelte Aggregation konnte durch Entzug von Calciumionen (n=5) vollständig inhibiert werden (rrSP-D vs. rrSP-D + EDTA,  $p < 0,001$ , t-Test). 100 mM D-

### 3. Ergebnisse

Maltose (n=5) führten zu einer signifikanten und 100 mM D-Galaktose (n=3) zu einer nicht-signifikanten, partiellen Inhibition der rrSP-D vermittelten Aggregation von PSG (rrSP-D vs. rrSP-D + Maltose,  $P < 0,001$ , t-Test). Die schwache APSP-A vermittelte Aggregation wurde durch EDTA unspezifisch und Maltose spezifisch inhibiert.

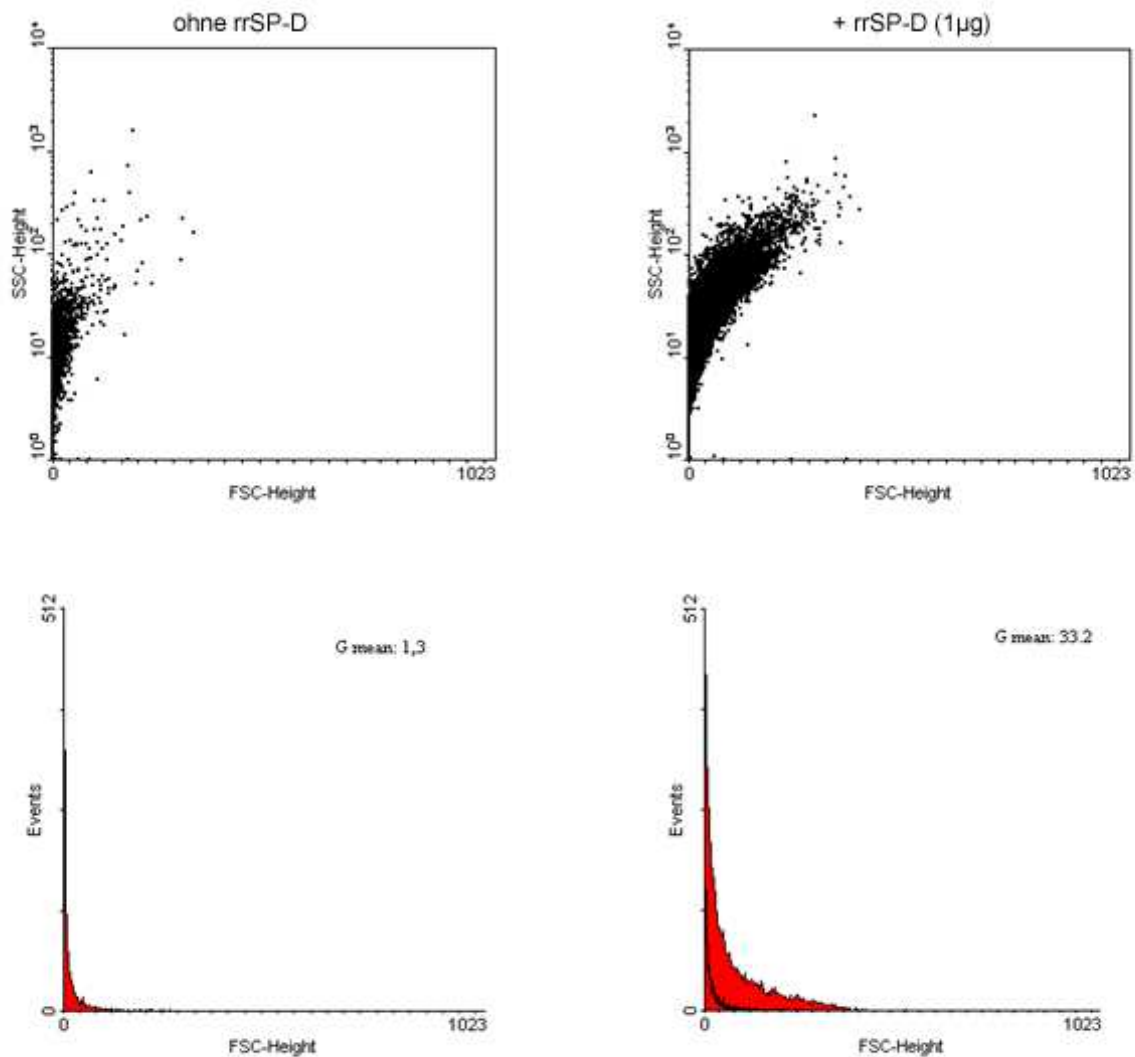
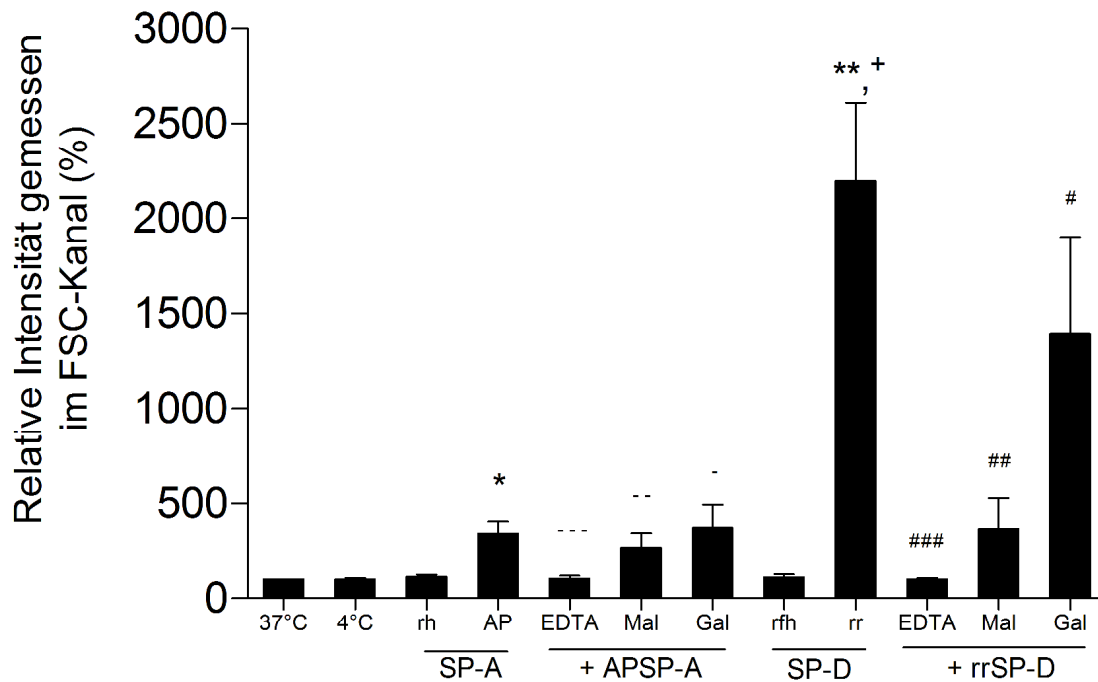


Abbildung 3.2.1: FACS-Analyse der rrSP-D-vermittelten PSG-Aggregation (1  $\mu\text{g}$  rrSP-D/ml). Die Grafiken links zeigen die Negativkontrolle in Abwesenheit von rrSP-D. Die Grafiken rechts stellen die PSG Aggregation unter rrSP-D-Einfluss dar. Die oberen Grafiken stellen die Partikelgröße auf der X-Achse (FSC) dar, die Partikelgranularität auf der Y-Achse (SSC). Die unteren Grafiken stellen die Ereignissumme (gezählte PSG-Partikel) auf der Y-Achse in Abhängigkeit von der Partikelgröße (FSC) dar.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.2.2:** Messung der SP-vermittelten PSG-Aggregation im FACS. Eine maximale Aggregation von *Dactylis glomerata* PSG im Vergleich zur 37 °C-Kontrolle erfolgte unter Einfluss von rrSP-D (\*\*,  $p < 0,01$ ). AP-SP-A führte im Vergleich zur 37 °C-Kontrolle ebenfalls zu einer messbaren PSG-Aggregation (\*,  $p < 0,05$ ), jedoch signifikant geringer als im Vergleich zu rrSP-D (+,  $p < 0,05$ ). Der Einfluss von rrSP-D auf die PSG-Aggregation wurde vollständig durch EDTA (###,  $p < 0,001$ ) und partiell durch Maltose (Mal) (##,  $p < 0,001$ ) und Galaktose (Gal) (#,  $p > 0,05$ ) inhibiert. Die APSP-A vermittelte Aggregation wurde durch EDTA (---,  $p > 0,05$ ) unspezifisch und spezifisch durch Maltose (--,  $p > 0,05$ ) und Galaktose (-,  $p > 0,05$ ) inhibiert (t-Test).

### 3.3. rrSP-D bindet calciumabhängig an *Dactylis glomerata* PSG

Mittels konfokaler Mikroskopie erfolgte ein qualitativer Bindungsnachweis von rrSP-D an *Dactylis glomerata* PSG. Die Abbildung 3.3.1 links zeigt das fluoreszenzmarkierte rrSP-D (grün) auf der Oberfläche der PSG. Diese Bindung zwischen rrSP-D und PSG erfolgt calciumabhängig und war durch EDTA vollständig inhibierbar Abbildung 3.3.1 rechts. Im Gegensatz zum rrSP-D konnte keine Bindung von APSP-A an die PSG nachgewiesen werden. Auch bei 10fach höherer Konzentration (10 µg/ml) konnte mit dieser Technik für das APSP-A keine Bindung an *Dactylis glomerata* PSG nachgewiesen werden.

### 3. Ergebnisse

---

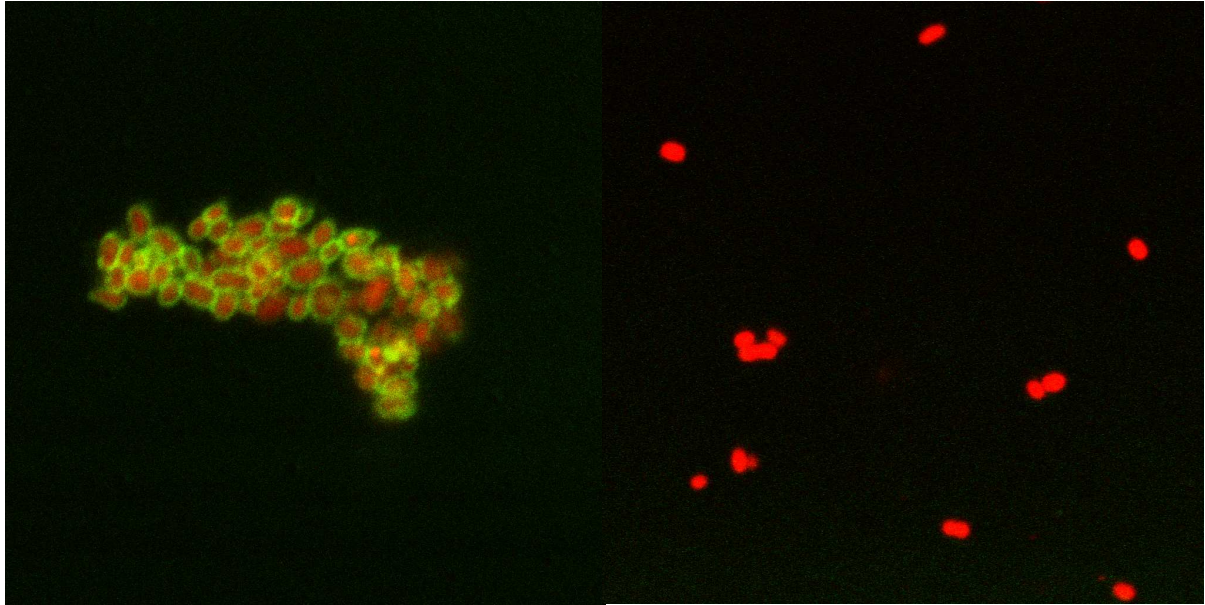


Abbildung 3.3.1: *Dactylis glomerata* PSG binden rrSPD. Das Foto auf der linken Seite zeigt Alexa 488-markiertes rrSP-D (grün), das an die Alexa 546-markierten PSG (rot) bindet und sie aggregiert. Im Vergleich zeigt die rechte Seite Alexa 546-markierte PSG unter Einfluss von EDTA. Entzug der Calciumionen durch EDTA inhibiert vollständig die Bindung von rrSP-D an die PSG.

Die Bindung von rrSP-D an PSG konnte auch mittels FACS quantifiziert werden (Abbildung 3.3.2). Die Bindung wurde im FACS mit Alexa 488-markiertem rrSP-D gemessen (n=3) und zeigte  $67,8 \pm 9,2$  % rrSP-D positive PSG (rrSP-D,  $p < 0,05$ , t-Test). Zugabe von EDTA führte zu einer vollständigen Inhibition der Bindung von rrSP-D an PSG (n=3), mit  $1,2 \pm 1,6$  % positiven PSG (rrSP-D vs. rrSP-D + EDTA,  $p < 0,05$ , t-Test). Die Bindung von Alexa 488-markierten SP-A an die PSG konnte auch mit dieser Technik nicht nachgewiesen werden.

### 3. Ergebnisse

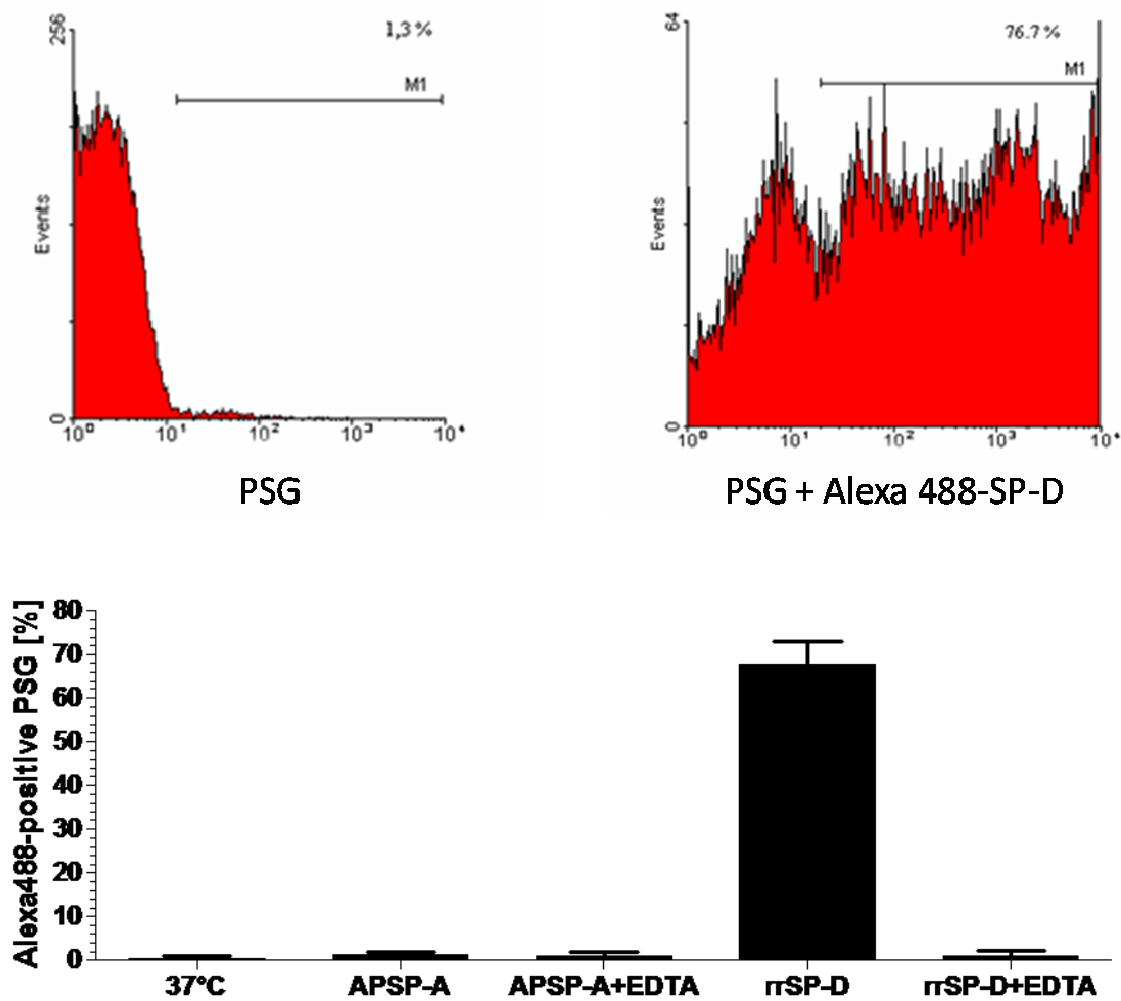


Abbildung 3.3.2: Durchflusszytometrisch konnte nur für Alexa 488-markiertes rrSP-D eine Bindung an *Dactylis glomerata* PSG nachgewiesen werden. Diese Bindung konnte durch Entzug von Calcium durch EDTA vollständig inhibiert werden. Für APSP-A konnte auch mit dem Durchflusszytometer keine Bindung an PSG nachgewiesen werden.

#### 3.4. Nur rrSP-D fördert die Bindung bzw. Phagozytose von *Dactylis glomerata* PSG durch Alveolarmakrophagen

Alveolarmakrophagen inkubierten für 40 Minuten bei 37 °C mit 250 µg/ml Curosurf (CS, n=4), 250 µg/ml Alveofact (AF, n=4), 30 µg/ml rhSP-A (n=4), 1 µg/ml APSP-A (n=7), 30 µg/ml rfhSP-D (n=4) und 1 µg/ml rrSP-D (n=7). Alexa 488-fluoreszenzmarkierte *Dactylis glomerata* PSG wurden im Verhältnis von 1:10 zugefügt und für 8 Stunden bei 37 °C (n=7)

### 3. Ergebnisse

weiter inkubiert. Die Alveolarmakrophagen und die markierten PSG wurden bei 37 °C und 4 °C für 8 Stunden inkubiert. In der Durchflusszytometrie zeigte die 37 °C Kontrolle  $14,3 \pm 1,9$  % PSG-positive Zellen, die 4 °C Kontrolle  $7,1 \pm 1,1$  % PSG-positive Zellen. Die Inkubation mit 1 mg/ml rrSP-D erhöhte die Anzahl PSG-positiver Zellen im Vergleich zur 37 °C-Kontrolle signifikant auf  $44,6 \pm 4,6$  % ( $p < 0,001$ , t-Test). Im Vergleich zur 37 °C Kontrolle zeigten auch hohe Konzentrationen von APSP-A (10 µg), rhSP-A (30 µg) und rfhSP-D (30 µg) keinen Einfluss auf die PSG Aufnahme durch Alveolarmakrophagen (Abbildung 3.4.1). Weder Curosurf noch Alveofact beeinflussten die Bindung bzw. Phagozytose von PSG durch Alveolarmakrophagen. Aus diesem Grund wurden auf die Verwendung dieser Präparate in den übrigen Experimenten verzichtet.

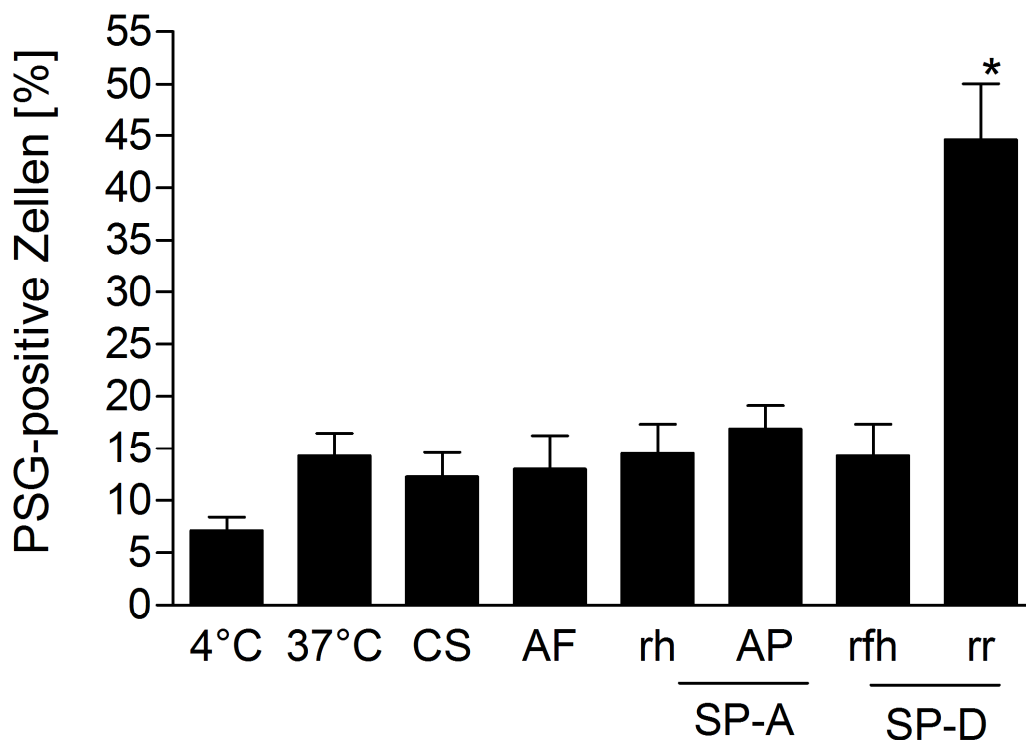


Abbildung 3.4.1: Phagozytose von *Dactylis glomerata* PSG in Gegenwart unterschiedlicher Komponenten des Surfactant. Weder Curosurf (CS) noch Alveofact (AF) bzw. rhSP-A und APSP-A konnten die Phagozytose von PSG durch Alveolarmakrophagen erhöhen. Allein das dodecamere rrSP-D führte zu einer signifikanten Induktion von Bindung/ Phagozytose (\* im Vergleich zur 37 °C Kontrolle,  $p < 0,001$ , t-Test). Die 4 °C und 37 °C-Kontrollen enthielten PSG und Zellen. Die trimere rfhSP-D Variante zeigte keinen Einfluss auf die Phagozytose von PSG.

### 3. Ergebnisse

---

Die Auswertung mittels dreidimensionaler, konfokaler Mikroskopie erlaubte die Differenzierung zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Lage der PSG. Zur Auswertung wurden insgesamt ca. 100 Alveolarmakrophagen pro 3D-Bild gezählt. Nach Inkubation bei 37 °C ohne rrSP-D fanden sich bei  $11 \pm 1$  % der Zellen Alexa 488-fluoreszenzmarkierte PSG auf der Oberfläche, bei  $13 \pm 2$  % der Zellen ließ sich eine intrazelluläre Lage nachweisen. Wurden die fluoreszenzmarkierten PSG sowohl intrazellulär wie auch extrazellulär nachgewiesen, wurden die entsprechenden Alveolarmakrophagen zu der Gruppe „intrazelluläre PSG“ gerechnet. Mit rrSP-D inkubierte Alveolarmakrophagen waren zu  $28 \pm 2$  % positiv für intrazelluläre PSG und zu  $14 \pm 2$  % für extrazelluläres PSG. Die Auswertung der Durchflusszytometrie und der konfokalen Mikroskopie zeigte, dass eine Inkubation der Zellen mit rrSP-D (1µg/ml) sowohl die Bindung von PSG an Alveolarmakrophagen als auch die Aufnahme von *Dactylis glomerata* PSG in Alveolarmakrophagen erhöhte. Die Abbildung 3.4.2 zeigt exemplarisch die konfokale Mikroskopie von rrSP-D-inkubierten Alveolarmakrophagen nach Phagozytose von Alexa 488-fluoreszenzmarkierten *Dactylis glomerata* PSG.

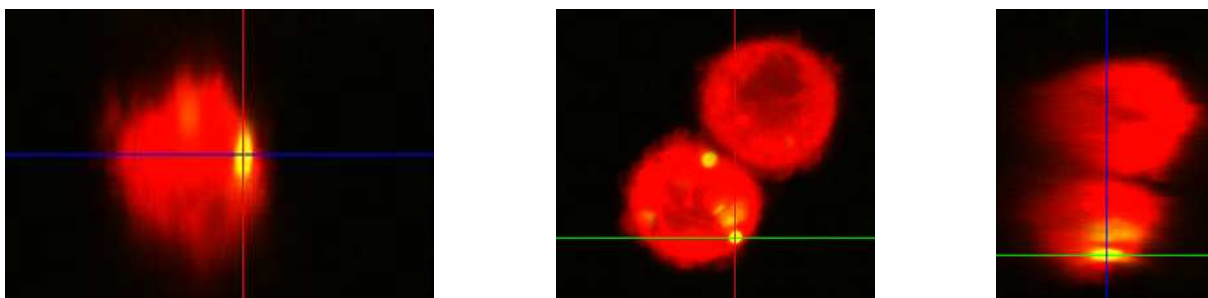


Abbildung 3.4.2: Die konfokale Mikroskopie zeigt Makrophagen (rot) nach Bindung und Phagozytose von Alexa 488-fluoreszenzmarkierten *Dactylis glomerata* PSG (gelb).

### 3. Ergebnisse

#### 3.5. Nur rrSP-D zeigt eine Dosis-Wirkungsbeziehung bei Aufnahme von PSG durch Alveolarmakrophagen

Alveolarmakrophagen wurden 40 Minuten mit APSP-A und rrSP-D in Konzentrationen von 0,1 µg/ml bis 5 µg/ml vorinkubiert und anschließend mit Alexa 488-fluoreszenzmarkierten PSG für 8 Stunden inkubiert. Das Verhältnis von Zellen zu PSG betrug 1:10. Mit steigender rrSP-D Konzentration zeigte sich eine verstärkte Aufnahme bzw. Bindung der PSG durch die Alveolarmakrophagen mit annähernd linearem Anstieg (Abbildung 3.5.1).

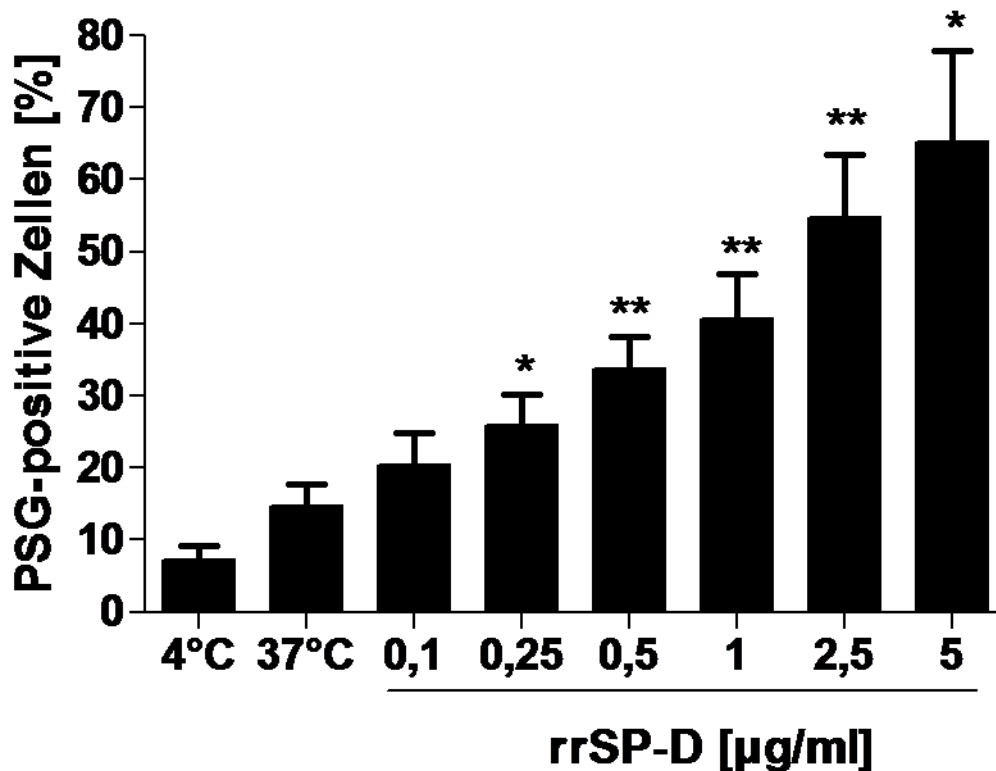


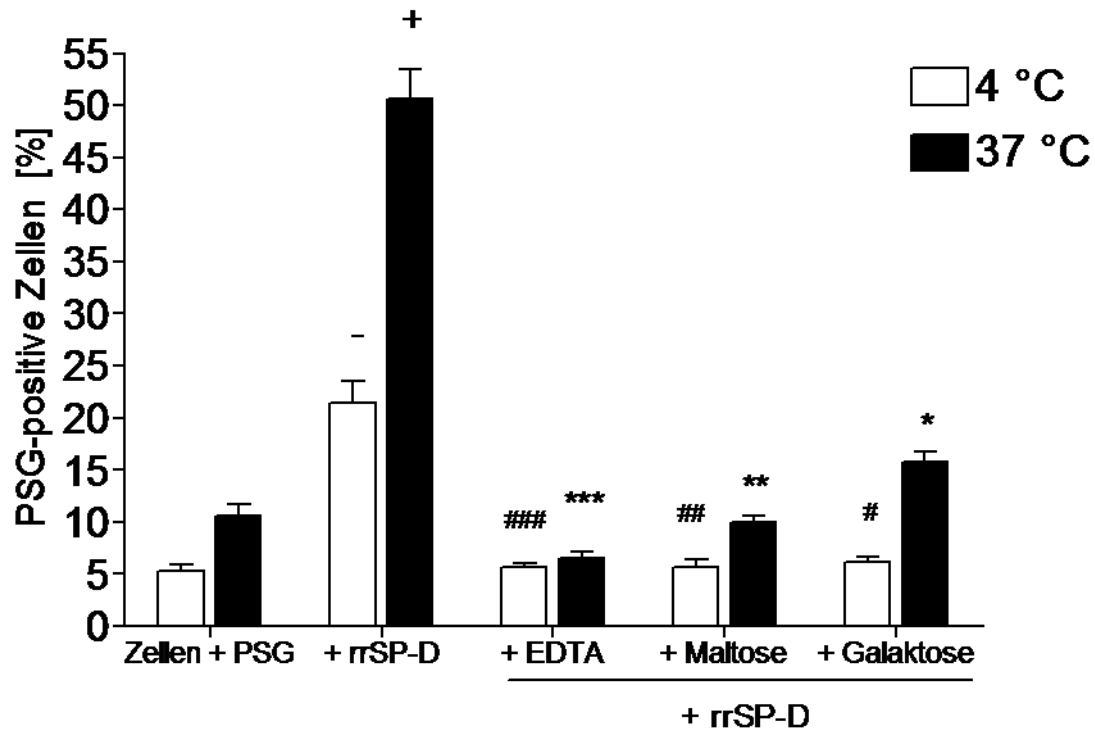
Abbildung 3.5.1: Bindung/Phagozytose von PSG durch Makrophagen unter Einfluss von rrSP-D. Es war im Vergleich zum 37 °C-Basalwert ohne rrSP-D eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen rrSP-D und Aufnahme von PSG nachweisbar (\* p < 0,05, \*\*p < 0,01, t-Test).

### 3. Ergebnisse

---

#### 3.6. Die rrSP-D-vermittelte PSG Aufnahme/Bindung ist durch Inhibitoren wie D-Galaktose und D-Maltose kompetitiv hemmbar

Alveolarmakrophagen wurden in Gegenwart fluoreszenzmarkierter *Dactylis glomerata* PSG wahlweise ohne und mit 1 µg/ml rrSP-D bei 4 °C (n=6) bzw. 37 °C (n=6) inkubiert. 10 mM EDTA, 100 mM D-Maltose (n=6) und 100 mM D-Galaktose (n=6) wurden mit Alveolarmakrophagen und 1µg/ml rrSP-D 40 Minuten bei 37 °C bzw. 4 °C inkubiert. Nach Zugabe der Alexa 488-fluoreszenzmarkierten PSG folgte eine weitere achtstündige Inkubation bei 4 °C bzw. 37 °C. Die Phagozytose fluoreszenzmarkierter PSG in der 37 °C-Kontrolle war mit  $10,9 \pm 2,8$  % doppelt so hoch wie die Phagozytose in der 4 °C Kontrolle mit  $6,9 \pm 4,0$  % ( $p < 0,05$ , t-Test). Bei 37 °C führte die Anwesenheit von rrSP-D zu einer signifikanten Steigerung der Phagozytose fluoreszenzmarkierter PSG ( $10,9 \pm 2,8$  % vs.  $51,9 \pm 6,7$  %,  $p > 0,001$ , t-Test). Entzug von Calcium durch EDTA führte zu einer vollständigen Inhibition der rrSP-D-vermittelten Phagozytose bei 37 °C ( $50,7 \pm 6,7$  % vs.  $6,6 \pm 1,5$  %,  $p < 0,001$ , t-Test). Die rrSP-D vermittelte Phagozytose bei 37 °C war durch D-Maltose ( $50,7 \pm 6,7$  % vs.  $10,0 \pm 1,5$  %,  $p < 0,001$ , t-Test) und schwächer durch D-Galaktose ( $50,7 \pm 6,7$  % vs.  $15,7 \pm 2,3$  %,  $p < 0,001$ , t-Test) inhibierbar. Bei 4 °C führte rrSP-D zu einer signifikanten Steigerung der PSG-positiven Alveolarmakrophagen. Da bei 4 °C aufgrund enzymatischer Hemmung keine Phagozytose stattfindet, handelt es sich hier nur um die PSG-Bindung an die Oberfläche der Alveolarmakrophagen. Die Zugabe von D-Maltose ( $21,4 \pm 5,2$  % vs.  $5,7 \pm 1,6$  %,  $p < 0,001$ , t-Test) und D-Galaktose ( $21,4 \pm 5,2$  % vs.  $6,1 \pm 1,3$  %,  $p < 0,001$ , t-Test) inhibierten in der 4 °C Gruppe die rrSP-D-vermittelte Bindung fluoreszenzmarkierter PSG an Alveolarmakrophagen. Entzug von Calcium hemmt die rrSP-D-abhängige PSG-Bindung (4 °C) und Phagozytose (37 °C) (Abbildung 3.6.1).



**Abbildung 3.6.1:** Inhibition der rrSP-D vermittelten Assoziation von PSG und Alveolarmakrophagen. Bei 4 °C findet definitionsgemäß keine Aufnahme von PSG durch Alveolarmakrophagen statt. rrSP-D verstärkt signifikant die Bindung bei 4 °C (-,  $p < 0,01$ ) und bei 37 °C die Bindung/Aufnahme (+,  $p < 0,01$ ). Die Zugabe von EDTA inhibiert die rrSP-D-vermittelte Bindung (###,  $p < 0,01$ ) bzw. Bindung/Aufnahme (\*\*\*,  $p < 0,01$ ) vollständig. Unter Maltose wird die Bindung (##,  $p < 0,01$ ) sowie die Bindung/Aufnahme (\*\*,  $p < 0,01$ ) kompetitiv inhibiert. Derselbe Effekt ist schwächer für die Bindung (#,  $p < 0,01$ ) und Bindung/Aufnahme (\*,  $p < 0,01$ ) unter Galaktose nachweisbar (t-Test).

### 3.7. Die rrSP-D vermittelte Bindung/Phagozytose von *Dactylis glomerata* PSG durch Alveolarmakrophagen ist $Ca^{2+}$ -abhängig

$2 \cdot 10^5$  Alveolarmakrophagen wurden in FCS-freiem Medium (calciumfrei) aufgenommen. Bei 4 °C und bei 37 °C folgte die 40minütige Inkubation mit und ohne rrSP-D. Darauf folgte eine weitere achtstündige Inkubation nach Zugabe von Alexa 488-fluoreszenzmarkierten *Dactylis glomerata*-PSG in Abwesenheit ( $n=6$ ) und in Gegenwart von 1 mmol/l  $Ca^{2+}$  ( $n=4$ ). Die Auswertung von Bindung und Phagozytose erfolgte mittels Durchflusszytometrie. In der

### 3. Ergebnisse

4 °C-Gruppe konnte Calcium in Abwesenheit von rrSP-D zu einer geringen Steigerung der PSG-Bindung an Alveolarmakrophagen führen ( $5,8 \pm 1,0 \%$  vs.  $9,2 \pm 1,2 \%$ ). In Gegenwart von rrSP-D bei 4 °C führte die Zugabe von Calcium ( $1 \text{ mmol/l Ca}^{2+}$ ) zu einer deutlich verstärkten Bindung von PSG an die Alveolarmakrophagen ( $9,2 \pm 1,2 \%$  vs.  $30,3 \pm 8,3 \%$ ,  $p < 0,05$ , t-Test). Bei 37 °C führte die Zugabe von Calcium in Abwesenheit und Gegenwart von rrSP-D zu einer signifikanten Steigerung von Bindung/Phagozytose von PSG durch Alveolarmakrophagen (ohne rrSP-D:  $15,0 \pm 2,8 \%$  vs.  $48,3 \pm 15,3 \%$ ; mit rrSP-D:  $13,3 \pm 2,7 \%$  vs.  $79,5 \pm 4,1 \%$ , jeweils  $p < 0,01$ , t-Test) (Abbildung 3.7.1).

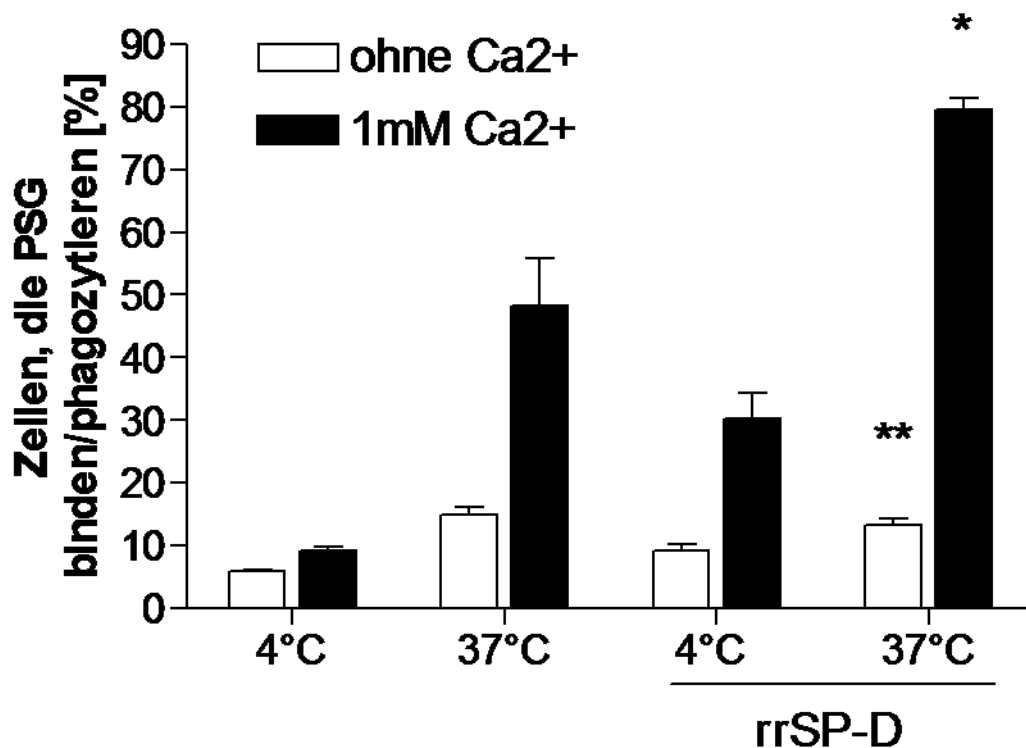


Abbildung 3.7.1: Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$  auf die rrSP-D-vermittelte Aufnahme. rrSP-D fördert die Bindung, gemessen bei 4 °C sowie die Phagozytose, gemessen bei 37 °C nur in Gegenwart von Calcium. Die Phagozytose ist bei 37 °C in Gegenwart von rrSP-D signifikant höher als in der Vergleichsprobe ohne rrSP-D (\*)  $p < 0,01$ , t-Test. Die Phagozytose in Gegenwart von Calcium ist signifikant höher als in der Vergleichsgruppe ohne (\*\*)  $p < 0,01$ , t-Test.

#### 3.8. Phagozytierte fluoreszenzmarkierte *Dactylis glomerata* PSG sind für mindestens 96 Stunden in Alveolarmakrophagen nachweisbar

Alveolarmakrophagen wurden sowohl ohne als auch mit 1 µg/ml rrSP-D für 40 Minuten vorinkubiert. Es folgte Inkubation mit Alexa 488-fluoreszenzmarkierten *Dactylis glomerata* PSG bei 37 °C. Das Verhältnis der Alveolarmakrophagen zu den PSG betrug 1:20. Die nicht an Alveolarmakrophagen gebundenen und die nicht phagozytierten PSG wurden mittels Percollgradient entfernt. Die von ungebundenen PSG gereinigten Alveolarmakrophagen wurden für 24, 48 und 96 Stunden (n=4) bei 37 °C inkubiert. Die 0-Stunden Probe (n=4) wurde direkt analysiert. rrSP-D führte in der 0 h-Gruppe zu einer signifikanten Steigerung der PSG Bindung/Phagozytose durch Alveolarmakrophagen ( $10,0 \pm 1,3 \%$  vs.  $63,9 \pm 6,0 \%$ ,  $p < 0,05$ , t-Test). In den folgenden Stunden (24 h bis 96 h) blieb in der Gruppe ohne rrSP-D der Anteil der Alveolarmakrophagen gebundenen/-phagozytierten PSG stabil bei 10 % (10,3 % bis 12,3 %). Unter Einfluss von rrSP-D konnte zwischen 0 Stunden und 24 Stunden eine Abnahme des Anteils PSG-positiver PSG Zellen beobachtet werden, in den folgenden Messungen nach 48 Stunden und 96 Stunden blieb der gemessene Anteil im Vergleich zum 24-Stundenwert jedoch weitgehend stabil (Abbildung 3.8.1).

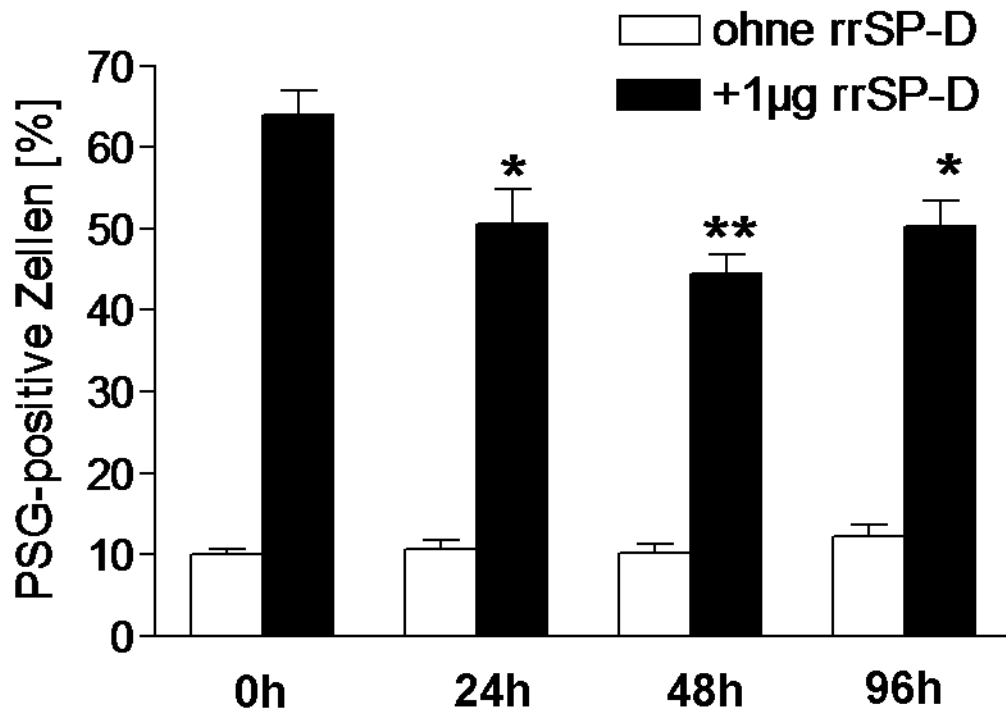


Abbildung 3.8.1: PSG-positive Alveolarmakrophagen zwischen 0 und 96 Stunden nach Phagozytose Alexa 488-fluoreszenzmarkierter *Dactylis glomerata* PSG. Die PSG blieben über den gesamten Beobachtungszeitraum im Vergleich zur 0-Stunden Probe in einem signifikant abnehmenden Anteil der Makrophagen nachweisbar (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , t-Test). In Abwesenheit von rrSP-D konnte keine relevante Abnahme des Anteils PSG-positiver Zellen nachgewiesen werden.

Die Anzahl der PSG-positiven Zellen erhöhte sich in der 0-Stunden Probe in Anwesenheit von rrSP-D auf  $63,9 \pm 6,0$  %. Nach 24, 48, 96 Stunden Inkubation schwankten die PSG-positiven Zellen um Werte von 47 % ( $44,5 \pm 4,7$  % bis  $50,6 \pm 8,3$  %) (Abbildung 3.8.1). Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie konnte nach der Separation eine überwiegend intrazelluläre Lage der PSG nachgewiesen werden. Die Abbildungen zeigen Zellen, die mit rrSP-D vorinkubiert wurden (Abbildung 3.8.2).

### 3. Ergebnisse

---

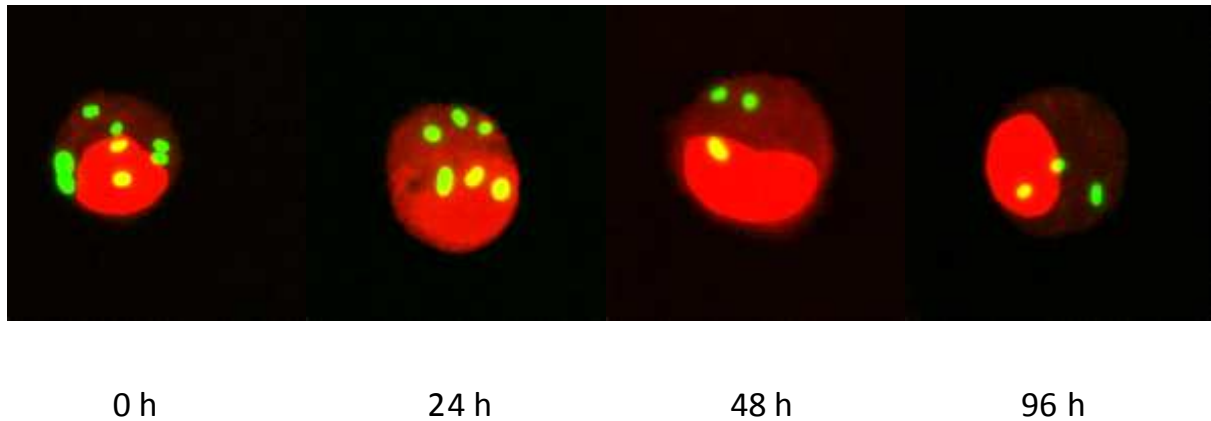


Abbildung 3.8.2: PSG-positive Alveolarmakrophagen unter Einfluss von rrSP-D. Mit der konfokalen Mikroskopie konnte eine überwiegend intrazelluläre Lage der PSG nachgewiesen werden.

#### **3.9. Auch *Phleum pratense* PSG unterliegen einer rr-SP-D-vermittelten Bindung/ Phagozytose**

Alexa 488-fluoreszenzmarkierte *Phleum pratense* PSG wurden im Verhältnis 10:1 bei 4 °C (n=4) und 37 °C (n=4) ohne Zusatz von rrSP-D mit Alveolarmakrophagen inkubiert. Zusätzlich wurden die PSG bei 37 °C mit 1 µg/ml rrSP-D und Alveolarmakrophagen inkubiert (n=4). Im Vergleich zur 4 °C-Gruppe hat sich bei 37 °C die Bindung/Phagozytose von *Phleum pratense*-PSG durch Alveolarmakrophagen etwa verdoppelt. Unter Einfluss von rrSP-D zeigte sich wie bei den *Dactylis glomerata*-PSG signifikante Zunahme von Bindung/Phagozytose (Abbildung 3.9.1).

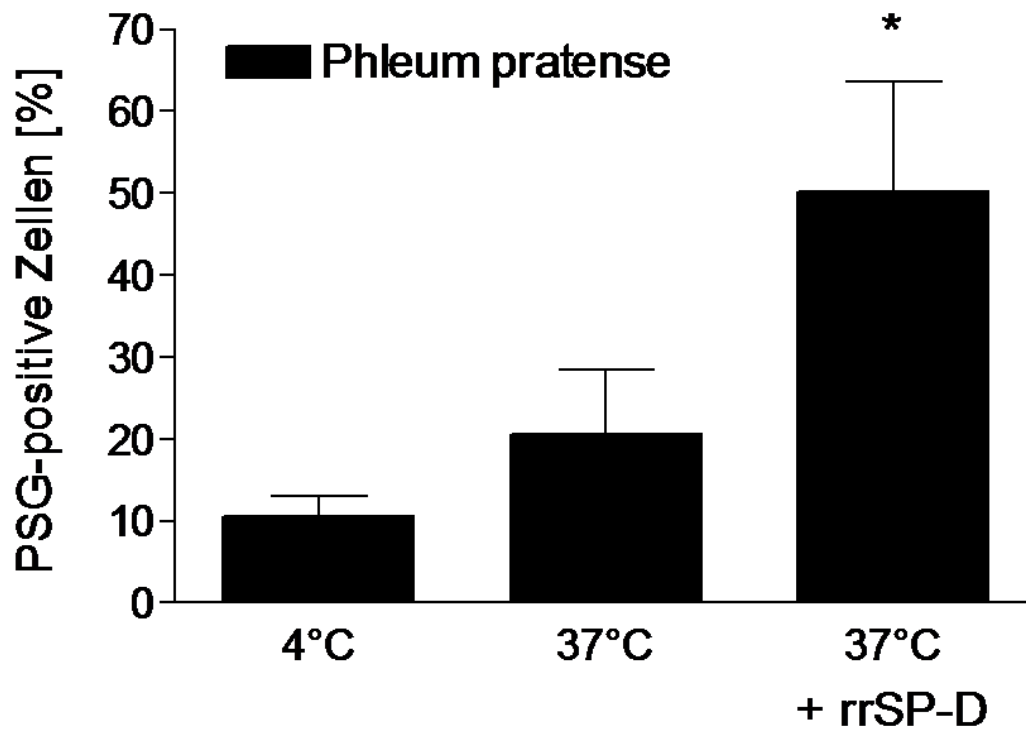


Abbildung 3.9.1: Bindung/Phagozytose von *Phleum pratense* PSG durch Alveolarmakrophagen. Unter rrSP-D- Einfluss ist der Anteil PSG-positiver Zellen ebenfalls signifikant erhöht (\*  $p < 0,05$ , t-Test).

### 4. Diskussion

Diese Arbeit untersuchte den Einfluss von verschiedenen Komponenten des pulmonalen Surfactant auf Allergene und deren Interaktion mit Alveolarmakrophagen. *In vitro* wurden PSG-Bindung, -Aggregation und -Phagozytose durch Alveolarmakrophagen in Abhängigkeit unterschiedlicher Surfactant-Komponenten gemessen.

Die unterschiedlichen Komponenten des pulmonalen Surfactant sind für die lokale Infektabwehr der Lunge von entscheidender Bedeutung. Die Kollektine SP-A und SP-D inhibieren oder inaktivieren inhalierte Pathogene direkt durch Bindung oder durch Aggregation. Zum anderen opsonieren SP-A und SP-D unterschiedliche Pathogene. Die Opsonierung erleichtert Alveolarmakrophagen die Phagozytose von Pathogenen und damit deren Elimination aus der Lunge. Darüber hinaus haben SP-A und SP-D immunregulatorische Eigenschaften. Zum Beispiel binden SP-A und SP-D an bakterielle Toxine, wie LPS und schwächen eine LPS-induzierte Entzündungsreaktion ab (92).

Inhalierte Allergene haben einen direkten Kontakt zum pulmonalen Surfactant und den Alveolarmakrophagen. Es war bislang nicht untersucht, wie das Surfactant zusammen mit Alveolarmakrophagen auf inhalierte Allergene wirkt. Die Hypothese dieser Arbeit war es, dass die Surfactantproteine SP-A und SP-D mit den PSG ähnlich interagieren, wie mit Bakterien oder Pilzen, und dass SP-A und SP-D an PSG binden. Ferner wurde vermutet, dass SP-A und SP-D die PSG aggregieren sowie die Phagozytose von PSG durch Makrophagen verstärken.

In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass das kreuzförmige dodecamere rrSP-D an PSG bindet und diese aggregiert. Das bouquetförmige APSP-A konnte PSG ebenfalls

## 4. Diskussion

---

aggregieren, jedoch fiel diese Aggregation im Vergleich zum rrSP-D deutlich geringer aus. Die Unterschiede in der Ausprägung der Aggregation lassen sich wahrscheinlich durch die unterschiedlichen Strukturen der beiden Surfactantmoleküle erklären (Abbildung 1.1.1). Das dodecamere SP-D verteilt seine CRD kreuzförmig über vier Arme. Räumlich gesehen ermöglicht diese Verteilung eine parallele Bindung an verschiedene PSG. Im Gegensatz zum SP-D liegen beim APSP-A alle CRD polar gebündelt an einem Ende des Moleküls. Diese Gruppierung aller CRD auf engem Raum erschwert möglicherweise eine gleichzeitige Bindung von mehreren PSG oder die Verbindung von Makrophagen mit den PSG. Möglicherweise begründet sich der Unterschied in der Aggregation von PSG auch in einer unterschiedlichen Affinität der rrSP-D CRD und der APSP-A CRD gegenüber den eingesetzten PSG. Diese These wird durch Arbeiten gestützt, die ein unterschiedliches Pathogenbindungsspektrum von SP-A und SP-D beschreiben (59;61-63;92). Während das dodecamere rrSP-D wie bereits ausgeführt zu einer deutlichen Aggregation und Erhöhung der Phagozytose von PSG führt, konnte das trimere rfhSP-D diese Effekte nicht zeigen. Im Gegensatz zum rrSP-D besteht das rfhSP-D lediglich aus einer trimeren, spiralsierten Halsregion und der C-terminalen CRD. Dem rfhSP-D fehlen die cysteinreiche Region sowie die kollagenähnliche Region. Dennoch besitzt das rfhSP-D immunologische Aktivität und konnte im Tierversuch die allergische Hyperreagibilität nach *Aspergillus fumigatus*-Provokation verhindern (39). Ferner konnte unter Einfluss von rfhSP-D eine Verminderung der IgE und IgG-Produktion sowie Bluteosinophilie nach Provokation beobachtet werden. Als trimeres Molekül kann das rfhSP-D wahrscheinlich nur an ein einzelnes PSG-Molekül binden, eine Vernetzung von mehreren PSG-Molekülen durch rfhSP-D ist daher unwahrscheinlich. Möglicherweise wird der positive Einfluss auf die allergische Entzündungsreaktion durch andere Mechanismen ausgelöst.

In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass das dodecamere SP-D zu einer Pathogenaggregation führt. Es zeigte sich, dass die Kollagendomäne vom rrSP-D für die

#### 4. Diskussion

---

Aggregation von Pathogenen essentiell ist (93;94). Dieser anhand Pathogenen gezeigte Effekt bestätigte sich in den Aggregationsversuchen mit den PSG. Die Aggregation von PSG durch Kollektine ist kompetitiv inhibierbar. Die Aggregation von PSG durch rrSP-D und durch APSP-A wurde durch Zuckermoleküle kompetitiv inhibiert. Die Zucker Maltose und Galaktose binden mit hoher Affinität an rrSP-D und AP-SP-A und inhibieren kompetitiv die Bindung von rrSP-D und AP-SP-A an Moleküle mit geringerer Affinität, z.B. PSG. Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass rrSP-D in erster Linie durch Maltose und schwächer durch Galaktose inhibiert wird.

Mit der Durchflusszytometrie und der konfokalen Mikroskopie konnten neben der rrSP-D-vermittelten PSG-Aggregation auch die Bindung von rrSP-D an die PSG gezeigt werden. Es wurde vermutet, dass die PSG-Aggregation durch rrSP-D eine Bindung zwischen rrSP-D und den PSG erfordert. In diesem Fall vernetzt ein rrSP-D-Molekül über seine CRD mehrere PSG. Interessanterweise konnten wir eine schwache, APSP-A-vermittelte PSG-Aggregation nachweisen, jedoch konnten wir keine Bindung zwischen APSP-A an die PSG messen. Ein detektierbarer Bindungsnachweis zwischen APSP-A und PSG gelang selbst bei zehnfach erhöhter APSP-A Konzentration nicht. Diese Ergebnisse erscheinen zumindest in Teilen widersprüchlich, da für eine Aggregation der PSG durch APSP-A auch eine Bindung von APSP-A an die PSG zu erwarten wäre. Es bleibt zu berücksichtigen, dass die Aggregation der PSG durch APSP-A eher schwach ausfällt. Möglicherweise ist die Sensitivität der Durchflusszytometrie und der konfokalen Mikroskopie hoch genug, um die Aggregation zu messen, während die Sensitivität nicht ausreicht, eine geringe Bindung von PSG an APSP-A nachzuweisen. Die unterschiedlichen Strukturen von APSP-A und rrSP-D spielen wahrscheinlich auch in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle. Vielleicht können aufgrund höherer Affinität mehr rrSP-D-Moleküle an ein PSG binden als APSP-A-Moleküle, was zu diesen unterschiedlichen Ergebnissen beitragen könnte.

#### 4. Diskussion

---

Die Ergebnisse aus den Bindungsexperimenten stehen in Konkordanz zu den Ergebnissen aus den Phagozytoseversuchen. Nur rrSP-D steigerte die Phagozytose von PSG durch Alveolarmakrophagen. Im Vergleich hierzu zeigten rhSP-A, APSP-A und rfhSP-D keine Wirkung. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass SP-D die Phagozytose von PSG durch Alveolarmakrophagen erhöhen kann, jedoch nur dann, wenn es in seiner unveränderten Quaternärstruktur vorliegt. Beim rrSP-D handelt es sich um ein dodecameres Molekül. rfhSP-D ist ein inkomplettes Molekül dem die kollagenähnliche Domäne fehlt. Es besteht lediglich aus einem Teil eines der vier Trimere. Es ist beschrieben, dass SP-D über seine kollagenähnliche Domäne an Alveolarmakrophagen bindet (95). Die vorliegenden Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die rrSP-D-abhängige Steigerung der PSG-Phagozytose eine Interaktion der CRD mit den PSG einerseits und der kollagenähnlichen Domäne des rrSP-D mit den Alveolarmakrophagen andererseits erfordert. Alternativ kann die Existenz mehrerer CRD in einem Molekül durch Bindung an PSG einerseits und Makrophagen andererseits zur Steigerung der Phagozytose führen. Eine CRD-abhängige Bindung von rrSP-D an Zuckermoleküle auf der Zellmembran von Makrophagen wurde ebenfalls beschrieben (64).

Die Bindung von Surfactantproteinen an die PSG und die durch Surfactant verstärkte PSG-Phagozytose durch Alveolarmakrophagen scheinen in einem kausalen Zusammenhang zu stehen. APSP-A aggregiert PSG geringfügig. Die Bindung und Phagozytose der PSG durch Alveolarmakrophagen kann AP-SPA nicht verstärken. Bereits früher konnte gezeigt werden, dass SP-A die Phagozytose von Pathogenen wie *S. aureus* und *E. coli* durch Bindung an den Fc-Rezeptor von Alveolarmakrophagen steigert, ohne selbst an das Pathogen zu binden (57;58).

#### 4. Diskussion

---

Bindung, Aggregation und gesteigerte Phagozytose unter rrSP-D sind durch Maltose und schwächer durch Galaktose inhibierbar. Die Affinität der CRD von rrSP-D gegenüber einzelnen Monosacchariden ist gering, die Affinität zu Oligosacchariden ist dagegen sehr hoch. SP-A und SP-D unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Affinität gegenüber unterschiedlichen Oligosacchariden. Diese Unterschiede könnten ein unterschiedliches Wirkungsspektrum von SP-A und SP-D gegenüber verschiedenen Pathogene erklären. SP-A bindet mit hoher Affinität an N-Acetylmonosamin und Fucose, während SP-D bevorzugt an Inositol, Maltose und Glucose bindet. Die Bindung von SP-A an Glycokonjugate ist durch Mannan, Maltose, Glucose und Fucose kompetitiv inhibierbar, von SP-D durch Maltose, Glukose und Galaktose (96;97).

Die Calciumabhängigkeit von rrSP-D konnte durch die Inhibition der Phagozytose, der Bindung und der Aggregation unter Einfluss von EDTA gezeigt werden. SP-A und SP-D binden calciumabhängig über ihre CRD an die Kohlenhydratreste auf der Oberfläche von Pathogenen und Allergenen (47;98). Ein durch EDTA-vermittelter  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug blockiert diese Bindung vollständig.

Die Phagozytose von PSG durch Alveolarmakrophagen ist ein aktiver, temperaturabhängiger Vorgang. Das gilt sowohl für die spontane Phagozytose von PSG (ohne Surfactantproteine) wie auch für die rrSP-D vermittelte Phagozytose von PSG durch die Alveolarmakrophagen. Bei 37 °C war die Zahl der PSG-positiven Makrophagen etwa doppelt so hoch wie in der 4 °C Kontrolle. Während es bei 37 °C neben Bindung von PSG an Makrophagen auch zur Phagozytose kommt, handelt es sich bei 4 °C um Zellen, die PSG gebunden haben. Phagozytose ist ein aktiver, zellulärer Vorgang der bei 4 °C nicht stattfindet. Außerdem sind sowohl Bindung als auch Phagozytose calciumabhängig. Das gilt sowohl für die spontane wie auch für die rrSP-D-vermittelte Bindung/Phagozytose. EDTA-vermittelter Entzug von Calcium führte zur vollständigen Inhibition von Bindung/Phagozytose bei 4 °C und 37 °C.

#### 4. Diskussion

---

Große Teile der phagozytierten *Dactylis glomerata* PSG blieben über den Beobachtungszeitraum von insgesamt 96 Stunden in den Alveolarmakrophagen nachweisbar. Zwar konnte in den ersten 24 Stunden ein signifikanter Abfall an PSG-positiven Alveolarmakrophagen beobachtet werden. Im weiteren Verlauf blieb die Anzahl der PSG-positiven Alveolarmakrophagen jedoch bis zu 96 Stunden stabil. Die Daten legen die Schlussfolgerung nahe, dass unter dem Einfluss von rrSP-D Alveolarmakrophagen entweder mehr oder schneller angebotene PSG durch Phagozytose aufnehmen und auf diese Art PSG aus dem Alveolarraum entfernen. Die Entfernung von Allergenen aus den Alveolen könnte die chronische Entzündungskomponente des allergischen Asthmas durch Entzug des auslösenden Agens positiv beeinflussen. Das intrazelluläre Schicksal phagozytierter PSG nach 96 Stunden ist unklar. Möglicherweise findet ein Abbau in Phagolysosomen statt, alternativ ist ein Auswandern „gesättigter“ Alveolarmakrophagen nach Phagozytose von PSG denkbar. Knapp und Swanson beschreiben ein Bestreben der Makrophagen phagozytierte Partikel in Lysosomen abzubauen. Ist den Makrophagen dieses nicht möglich, verbleiben phagozytierte Partikel intrazellulär in den Phagolysosomen (99). Eine Entfernung von inhalierten Stäuben durch Phagozytose mittels Alveolarmakrophagen und deren Auswanderung in das lymphatische Gewebe ist beschrieben wurden (100). Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass dodecameres rrSP-D die Aggregation von PSG sowie deren Phagozytose durch Alveolarmakrophagen fördert. Daher könnte das SP-D zu einer Elimination von Allergenen aus dem Alveolarraum beitragen. rrSP-D könnte die alveoläre Allergenbelastung reduzieren und das allergische Asthma positiv beeinflussen.

Alveofact und Curosurf führten in der vorliegenden Arbeit zu keiner messbaren Steigerung der Phagozytose von PSG durch Alveolarmakrophagen. Curosurf besteht zu 99 % aus Phospholipiden, der Proteinanteil ist mit ca. 1 % vernachlässigbar. Dieser Proteinanteil besteht aus den lipophilen Surfactantproteinen SP-B und SP-C. Für diese Proteine ist keine

#### 4. Diskussion

---

nennenswerte immunmodulatorische Aktivität, wie für die Kollektine SP-A und SP-D, beschrieben. Für Alveofact ist die Situation ähnlich. Es besteht überwiegend aus Phospholipiden und Cholesterol und zu 1 % aus Proteinen. Auch beim Alveofact besteht die Proteinfraction aus den hydrophoben Surfactantproteinen SP-B und SP-C. Die Phospholipidfraktionen sowie SP-B und SP-C reduzieren die alveoläre Oberflächenspannung. In den vorliegenden Untersuchungen war der Einfluss der Phospholipid-Präparate auf die Aggregation und Phagozytose von PSG nicht signifikant.

### 5. Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aggregation von PSG durch rrSP-D und im geringeren Maße durch APSP-A erfolgt. Diese Aggregation kann spezifisch durch unterschiedliche Zucker und unspezifisch durch Entzug von Calcium inhibiert werden. In diesem Zusammenhang ist die Struktur des SP-D von Bedeutung. Die Bindung von Surfactantprotein an PSG konnte nur für dodecameres rrSP-D nachgewiesen werden, nicht jedoch für das AP-SP-A. Bindung und Aggregation sind Reaktionen, die möglicherweise unabhängig voneinander auftreten. Das APSP-A aggregiert PSG in geringem Maß. Eine Bindung zwischen dem APSP-A und den PSG war nicht nachweisbar. Sowohl die Aggregation als auch die Bindung und Phagozytose konnten spezifisch durch Zuckermoleküle und unspezifisch durch EDTA inhibiert werden. Möglicherweise bindet das rrSP-D mittels CRD an die PSG und mittels kollagenähnlicher Domäne an den Makrophagen, um so die Phagozytose auszulösen. Eine Bindung der Alveolarmakrophagen durch die CRD wäre ebenfalls möglich, da Makrophagen auf ihrer Oberfläche zahlreiche Zuckermoleküle tragen.

Die vorliegenden Experimente zeigen, dass die surfactantassoziierten Proteine rrSP-D und schwächer auch APSP-A mit inhalierbaren PSG interagieren. Es wäre sinnvoll die Effekte der festgestellten Interaktionen *in vivo* zu untersuchen.

### 6. Zusammenfassung

Die Surfactantproteine SP-A und SP-D gehören zur Gruppe der Kollektine und modulieren die Phagozytose verschiedener Pathogene durch Alveolarmakrophagen. Diese Modulation der Phagozytose könnte neben der Elimination von Pathogenen ebenso eine wichtige Rolle bei der Elimination inhalierter Allergene spielen. Diese Annahme könnte die entzündungshemmenden Eigenschaften von SP-A und SP-D bei allergischen Atemwegserkrankungen erklären. Gräserpollen bzw. deren Pollenstärkegranula (PSG) als inhalierbares Agens stellen eines der häufigsten relevanten Allergene für das allergische Asthma dar. In dieser Arbeit wurde der Effekt unterschiedlicher Surfactantkomponenten auf Bindung, Aggregation und Phagozytose von Pollenstärkegranula von *Phleum pratense* und *Dactylis glomerata* durch Alveolarmakrophagen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass nur vollständiges SP-D und weniger stark SP-A PSG von *Dactylis glomerata* binden und aggregieren kann. Nur das SP-D war in der Lage die Phagozytose von PSG durch Alveolarmakrophagen zu steigern. Bindung, Aggregation und Phagozytose stellten sich als substanzspezifische Reaktionen des SP-D dar, die möglicherweise über die Kohlenhydraterkennungsdomäne des SP-D vermittelt sind und durch Maltose und Galaktose kompetitiv inhibiert werden konnten. Ebenso waren diese Reaktionen calciumabhängig und konnten durch EDTA vollständig inhibiert werden. Die Fähigkeit vom dodecameren SP-D, Bindung, Aggregation und Phagozytose zu erhöhen, sowie die Unfähigkeit von einem trimeren Fragment des SP-D, Aggregation und Phagozytose zu steigern, legen den Schluss nahe, dass die vollständige dodecamere Form des SP-D eine grundlegende Rolle für dessen Funktion spielt. SP-D moduliert die Bindung und Phagozytose von PSG und könnte so Einfluss auf die Elimination von Allergenen aus dem Alveolarraum nehmen. Dies ist vielleicht einer der Mechanismen, durch den das SP-D den Verlauf des allergischen Asthmas günstig beeinflussen könnte.

### 7. Literaturverzeichnis

- (1) McFadden Jr EA. Harrison's Principles of Internal Medicine - Asthma. Harrison's Principles of Internal Medicine. McGraw-Hill, 2001: 1456-1463.
- (2) Global Strategy for Asthma Management and Prevention Workshop 2005. Gina Pocket Guide 2005. A Pocked Guide for Physicians and Nurses. Ginasthma.org . 18-10-2005.
- (3) Coordinators of the Behavioral Risk Surveillance System. Asthma Prevalence and Control Characteristics by Race/Ethnicity --- United States, 2002. Centers for Disease Control . 27-2-2004. Centers for Disease Control.
- (4) Stock S, Redaelli M, Luengen M, Wendland G, Civello D, Lauterbach KW. Asthma: prevalence and cost of illness. Eur Respir J 2005; 25(1):47-53.
- (5) Latvala J, von Hertzen L, Lindholm H, Haahtela T. Trends in prevalence of asthma and allergy in Finnish young men: nationwide study, 1966-2003. BMJ 2005; 330(7501):1186-1187.
- (6) Dombkowski KJ, Wasilevich EA, Lyon-Callo SK. Pediatric asthma surveillance using Medicaid claims. Public Health Rep 2005; 120(5):515-524.
- (7) Zollner IK, Weiland SK, Piechotowski I, Gabrio T, von Mutius E, Link B et al. No increase in the prevalence of asthma, allergies, and atopic sensitisation among children in Germany: 1992-2001. Thorax 2005; 60(7):545-548.
- (8) Netuveli G, Hurwitz B, Levy M, Fletcher M, Barnes G, Durham SR et al. Ethnic variations in UK asthma frequency, morbidity, and health-service use: a systematic review and meta-analysis. Lancet 2005; 365(9456):312-317.

## 7. Literaturverzeichnis

---

- (9) McCoy L, Redelings M, Sorvillo F, Simon P. A Multiple Cause-of-Death Analysis of Asthma Mortality in the United States, 1990-2001. *J Asthma* 2005; 42(9):757-763.
- (10) Greiling AK, Boss LP, Wheeler LS. A preliminary investigation of asthma mortality in schools. *J Sch Health* 2005; 75(8):286-290.
- (11) O'Hehir RE, Garman RD, Greenstein JL, Lamb JR. The specificity and regulation of T-cell responsiveness to allergens. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:67-95.
- (12) Paul WE, Seder RA, Plaut M. Lymphokine and cytokine production by Fc epsilon RI+ cells. *Adv Immunol* 1993; 53:1-29.
- (13) Adamczewski M, Kinet JP. The high-affinity receptor for immunoglobulin E. *Chem Immunol* 1994; 59:173-190.
- (14) Gosset P, Tillie-Leblond I, Oudin S, Parmentier O, Wallaert B, Joseph M et al. Production of chemokines and proinflammatory and antiinflammatory cytokines by human alveolar macrophages activated by IgE receptors. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(2 Pt 1):289-297.
- (15) Dasic G, Juillard P, Graber P, Herren S, Angell T, Knowles R et al. Critical role of CD23 in allergen-induced bronchoconstriction in a murine model of allergic asthma. *Eur J Immunol* 1999; 29(9):2957-2967.
- (16) Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD. The role of allergy in the development of asthma. *Nature* 1999; 402(6760 Suppl):B12-B17.
- (17) Dong Q, Wright JR. Degradation of surfactant protein D by alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1998; 274(1 Pt 1):L97-105.

## 7. Literaturverzeichnis

---

- (18) Harwood JL. Lung surfactant. *Prog Lipid Res* 1987; 26(3):211-256.
- (19) Wright JR, Clements JA. Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136(2):426-444.
- (20) Barrow RE, Hills BA. Surface tension induced by dipalmitoyl lecithin in vitro under physiological conditions. *J Physiol* 1979; 297(0):217-227.
- (21) Batenburg JJ. Surfactant phospholipids: synthesis and storage. *Am J Physiol* 1992; 262(4 Pt 1):L367-L385.
- (22) Johansson J, Curstedt T, Jornvall H. Surfactant protein B: disulfide bridges, structural properties, and kringle similarities. *Biochemistry* 1991; 30(28):6917-6921.
- (23) Baatz JE, Elledge B, Whitsett JA. Surfactant protein SP-B induces ordering at the surface of model membrane bilayers. *Biochemistry* 1990; 29(28):6714-6720.
- (24) Yu SH, Possmayer F. Role of bovine pulmonary surfactant-associated proteins in the surface-active property of phospholipid mixtures. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1046(3):233-241.
- (25) Pastva AM, Wright JR, Williams KL. Immunomodulatory roles of surfactant proteins A and D: implications in lung disease. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4(3):252-257.
- (26) Hoppe HJ, Reid KB. Collectins--soluble proteins containing collagenous regions and lectin domains--and their roles in innate immunity. *Protein Sci* 1994; 3(8):1143-1158.
- (27) Kuroki Y, Voelker DR. Pulmonary surfactant proteins. *J Biol Chem* 1994; 269(42):25943-25946.

## 7. Literaturverzeichnis

---

- (28) Crouch E, Parghi D, Kuan SF, Persson A. Surfactant protein D: subcellular localization in nonciliated bronchiolar epithelial cells. *Am J Physiol* 1992; 263(1 Pt 1):L60-L66.
- (29) Stahlman MT, Gray ME, Hull WM, Whitsett JA. Immunolocalization of surfactant protein-D (SP-D) in human fetal, newborn, and adult tissues. *J Histochem Cytochem* 2002; 50(5):651-660.
- (30) McDonald DM. Angiogenesis and remodeling of airway vasculature in chronic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(10 Pt 2):S39-S45.
- (31) Ackerman SJ, Kwatia MA, Doyle CB, Enhorning G. Hydrolysis of surfactant phospholipids catalyzed by phospholipase A2 and eosinophil lysophospholipases causes surfactant dysfunction: a mechanism for small airway closure in asthma. *Chest* 2003; 123(3 Suppl):355S.
- (32) Kwatia MA, Doyle CB, Cho W, Enhorning G, Ackerman SJ. Combined activities of secretory phospholipases and eosinophil lysophospholipases induce pulmonary surfactant dysfunction by phospholipid hydrolysis. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119(4):838-847.
- (33) Hite RD, Seeds MC, Bowton DL, Grier BL, Safta AM, Balkrishnan R et al. Surfactant phospholipid changes after antigen challenge: a role for phosphatidylglycerol in dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288(4):L610-L617.
- (34) Hohlfeld JM, Ahlf K, Enhorning G, Balke K, Erpenbeck VJ, Petschallies J et al. Dysfunction of pulmonary surfactant in asthmatics after segmental allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159(6):1803-1809.

## 7. Literaturverzeichnis

---

- (35) Jarjour NN, Enhorning G. Antigen-induced airway inflammation in atopic subjects generates dysfunction of pulmonary surfactant. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(1):336-341.
- (36) Schmidt R, Markart P, Ruppert C, Wygrecka M, Kuchenbuch T, Walmrath D et al. Time-dependent changes in pulmonary surfactant function and composition in acute respiratory distress syndrome due to pneumonia or aspiration. *Respir Res* 2007; 8(1):55.
- (37) Cheng G, Ueda T, Sugiyama K, Toda M, Fukuda T. Compositional and functional changes of pulmonary surfactant in a guinea-pig model of chronic asthma. *Respir Med* 2001; 95(3):180-186.
- (38) Madan T, Kishore U, Singh M, Strong P, Clark H, Hussain EM et al. Surfactant proteins A and D protect mice against pulmonary hypersensitivity induced by *Aspergillus fumigatus* antigens and allergens. *J Clin Invest* 2001; 107(4):467-475.
- (39) Strong P, Reid KB, Clark H. Intranasal delivery of a truncated recombinant human SP-D is effective at down-regulating allergic hypersensitivity in mice sensitized to allergens of *Aspergillus fumigatus*. *Clin Exp Immunol* 2002; 130(1):19-24.
- (40) De Sanctis GT, Tomkiewicz RP, Rubin BK, Schurch S, King M. Exogenous surfactant enhances mucociliary clearance in the anaesthetized dog. *Eur Respir J* 1994; 7(9):1616-1621.
- (41) Kakuta Y, Sasaki H, Takishima T. Effect of artificial surfactant on ciliary beat frequency in guinea pig trachea. *Respir Physiol* 1991; 83(3):313-321.
- (42) Wang JY, Shieh CC, You PF, Lei HY, Reid KB. Inhibitory effect of pulmonary surfactant proteins A and D on allergen-induced lymphocyte proliferation and

## 7. Literaturverzeichnis

---

- histamine release in children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158(2):510-518.
- (43) Cheng G, Ueda T, Nakajima H, Nakajima A, Kinjyo S, Motojima S et al. Suppressive effects of SP-A on ionomycin-induced IL-8 production and release by eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 117 Suppl 1:59-62.
- (44) Wang JY, Kishore U, Lim BL, Strong P, Reid KB. Interaction of human lung surfactant proteins A and D with mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) allergens. *Clin Exp Immunol* 1996; 106(2):367-373.
- (45) Bartmann P, Bamberger U, Pohlandt F, Gortner L. Immunogenicity and immunomodulatory activity of bovine surfactant (SF-RI 1). *Acta Paediatr* 1992; 81(5):383-388.
- (46) Bartmann P, Gortner L, Pohlandt F, Jaeger H. In vitro lymphocyte functions in the presence of bovine surfactant and its phospholipid fractions. *J Perinat Med* 1992; 20(3):189-196.
- (47) Wright JR. Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiol Rev* 1997; 77(4):931-962.
- (48) Borron PJ, Crouch EC, Lewis JF, Wright JR, Possmayer F, Fraher LJ. Recombinant rat surfactant-associated protein D inhibits human T lymphocyte proliferation and IL-2 production. *J Immunol* 1998; 161(9):4599-4603.
- (49) Borron PJ, Mostaghel EA, Doyle C, Walsh ES, McHeyzer-Williams MG, Wright JR. Pulmonary surfactant proteins A and D directly suppress CD3+/CD4+ cell function: evidence for two shared mechanisms. *J Immunol* 2002; 169(10):5844-5850.

## 7. Literaturverzeichnis

---

- (50) Erpenbeck VJ, Hagenberg A, Dulkys Y, Elsner J, Balder R, Krentel H et al. Natural porcine surfactant augments airway inflammation after allergen challenge in patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169(5):578-586.
- (51) Lohmann-Matthes ML, Steinmuller C, Franke-Ullmann G. Pulmonary macrophages. *Eur Respir J* 1994; 7(9):1678-1689.
- (52) Crouch E, Wright JR. Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense. *Annu Rev Physiol* 2001; 63:521-554.
- (53) Holmskov U, Thiel S, Jensenius JC. Collectins and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:547-578.
- (54) Crouch E, Hartshorn K, Ofek I. Collectins and pulmonary innate immunity. *Immunol Rev* 2000; 173:52-65.
- (55) Lawson PR, Reid KB. The roles of surfactant proteins A and D in innate immunity. *Immunol Rev* 2000; 173:66-78.
- (56) Ohkuro M, Kobayashi K, Takahashi K, Nagasawa S. Effect of C1q on the processing of immune complexes by human neutrophils. *Immunology* 1994; 83(3):507-511.
- (57) Tenner AJ, Robinson SL, Borchelt J, Wright JR. Human pulmonary surfactant protein (SP-A), a protein structurally homologous to C1q, can enhance FcR- and CR1-mediated phagocytosis. *J Biol Chem* 1989; 264(23):13923-13928.
- (58) van Iwaarden F, Welmers B, Verhoef J, Haagsman HP, Van Golde LM. Pulmonary surfactant protein A enhances the host-defense mechanism of rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990; 2(1):91-98.

## 7. Literaturverzeichnis

---

- (59) Bufler P, Schmidt B, Schikor D, Bauernfeind A, Crouch EC, Griese M. Surfactant protein A and D differently regulate the immune response to nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* and its lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28(2):249-256.
- (60) Barr FE, Pedigo H, Johnson TR, Shepherd VL. Surfactant protein-A enhances uptake of respiratory syncytial virus by monocytes and U937 macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23(5):586-592.
- (61) McNeely TB, Coonrod JD. Comparison of the opsonic activity of human surfactant protein A for *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* with rabbit and human macrophages. *J Infect Dis* 1993; 167(1):91-97.
- (62) Allen MJ, Harbeck R, Smith B, Voelker DR, Mason RJ. Binding of rat and human surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun* 1999; 67(9):4563-4569.
- (63) Restrepo CI, Dong Q, Savov J, Mariencheck WI, Wright JR. Surfactant protein D stimulates phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 21(5):576-585.
- (64) Ferguson JS, Martin JL, Azad AK, McCarthy TR, Kang PB, Voelker DR et al. Surfactant protein D increases fusion of *Mycobacterium tuberculosis*-containing phagosomes with lysosomes in human macrophages. *Infect Immun* 2006; 74(12):7005-7009.
- (65) van Iwaarden JF, Shimizu H, Van Golde PH, Voelker DR, Van Golde LM. Rat surfactant protein D enhances the production of oxygen radicals by rat alveolar macrophages. *Biochem J* 1992; 286 ( Pt 1):5-8.

## 7. Literaturverzeichnis

---

- (66) Wu H, Kuzmenko A, Wan S, Schaffer L, Weiss A, Fisher JH et al. Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. *J Clin Invest* 2003; 111(10):1589-1602.
- (67) McNeely TB, Coonrod JD. Aggregation and opsonization of type A but not type B *Hemophilus influenzae* by surfactant protein A. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 11(1):114-122.
- (68) van Iwaarden JF, Pikaar JC, Storm J, Brouwer E, Verhoef J, Oosting RS et al. Binding of surfactant protein A to the lipid A moiety of bacterial lipopolysaccharides. *Biochem J* 1994; 303 ( Pt 2):407-411.
- (69) Zimmerman PE, Voelker DR, McCormack FX, Paulsrud JR, Martin WJ. 120-kD surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii* is a ligand for surfactant protein A. *J Clin Invest* 1992; 89(1):143-149.
- (70) Malhotra R, Haurum J, Thiel S, Jensenius JC, Sim RB. Pollen grains bind to lung alveolar type II cells (A549) via lung surfactant protein A (SP-A). *Biosci Rep* 1993; 13(2):79-90.
- (71) Jaen A, Sunyer J, Basagana X, Chinn S, Zock JP, Anto JM et al. Specific sensitization to common allergens and pulmonary function in the European Community Respiratory Health Survey. *Clin Exp Allergy* 2002; 32(12):1713-1719.
- (72) Grote M, Vrtala S, Niederberger V, Valenta R, Reichelt R. Expulsion of allergen-containing materials from hydrated rye grass (*Lolium perenne*) pollen revealed by using immunogold field emission scanning and transmission electron microscopy. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105(6 Pt 1):1140-1145.

## 7. Literaturverzeichnis

---

- (73) Wilson AF, Novey HS, Berke RA, Surprenant EL. Deposition of inhaled pollen and pollen extract in human airways. *N Engl J Med* 1973; 288(20):1056-1058.
- (74) Marks GB, Colquhoun JR, Girgis ST, Koski MH, Treloar AB, Hansen P et al. Thunderstorm outflows preceding epidemics of asthma during spring and summer. *Thorax* 2001; 56(6):468-471.
- (75) Taylor PE, Flagan RC, Valenta R, Glovsky MM. Release of allergens as respirable aerosols: A link between grass pollen and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109(1):51-56.
- (76) Taylor PE, Flagan RC, Miguel AG, Valenta R, Glovsky MM. Birch pollen rupture and the release of aerosols of respirable allergens. *Clin Exp Allergy* 2004; 34(10):1591-1596.
- (77) Schappi GF, Taylor PE, Pain MC, Cameron PA, Dent AW, Staff IA et al. Concentrations of major grass group 5 allergens in pollen grains and atmospheric particles: implications for hay fever and allergic asthma sufferers sensitized to grass pollen allergens. *Clin Exp Allergy* 1999; 29(5):633-641.
- (78) Grote M, Dolecek C, Van Ree R, Valenta R. Immunogold electron microscopic localization of timothy grass (*Phleum pratense*) pollen major allergens Phl p I and Phl p V after anhydrous fixation in acrolein vapor. *J Histochem Cytochem* 1994; 42(3):427-431.
- (79) Grote M, Stumvoll S, Reichelt R, Lidholm J, Rudolf V. Identification of an allergen related to Phl p 4, a major timothy grass pollen allergen, in pollens, vegetables, and fruits by immunogold electron microscopy. *Biol Chem* 2002; 383(9):1441-1445.

## 7. Literaturverzeichnis

---

- (80) Motta A, Peltre G, Dormans JA, Withagen CE, Lacroix G, Bois F et al. Phleum pratense pollen starch granules induce humoral and cell-mediated immune responses in a rat model of allergy. *Clin Exp Allergy* 2004; 34(2):310-314.
- (81) Currie AJ, Stewart GA, McWilliam AS. Alveolar macrophages bind and phagocytose allergen-containing pollen starch granules via C-type lectin and integrin receptors: implications for airway inflammatory disease. *J Immunol* 2000; 164(7):3878-3886.
- (82) Wright JR, Zlogar DF, Taylor JC, Zlogar TM, Restrepo CI. Effects of endotoxin on surfactant protein A and D stimulation of NO production by alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1999; 276(4 Pt 1):L650-L658.
- (83) Vanhaecke E, Pijck J, Vuye A. Endotoxin testing. *J Clin Pharm Ther* 1987; 12(4):223-235.
- (84) Voss T, Melchers K, Scheirle G, Schafer KP. Structural comparison of recombinant pulmonary surfactant protein SP-A derived from two human coding sequences: implications for the chain composition of natural human SP-A. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 4(1):88-94.
- (85) Strong P, Townsend P, Mackay R, Reid KB, Clark HW. A recombinant fragment of human SP-D reduces allergic responses in mice sensitized to house dust mite allergens. *Clin Exp Immunol* 2003; 134(2):181-187.
- (86) Strong P, Reid KB, Clark H. Intranasal delivery of a truncated recombinant human SP-D is effective at down-regulating allergic hypersensitivity in mice sensitized to allergens of *Aspergillus fumigatus*. *Clin Exp Immunol* 2002; 130(1):19-24.

## 7. Literaturverzeichnis

---

- (87) Crouch E, Chang D, Rust K, Persson A, Heuser J. Recombinant pulmonary surfactant protein D. Post-translational modification and molecular assembly. *J Biol Chem* 1994; 269(22):15808-15813.
- (88) Wiseman LR, Bryson HM. Porcine-derived lung surfactant. A review of the therapeutic efficacy and clinical tolerability of a natural surfactant preparation (Curosurf) in neonatal respiratory distress syndrome. *Drugs* 1994; 48(3):386-403.
- (89) Gottfredsson M, Erlendsdottir H, Sigfusson A, Gudmundsson S. Characteristics and dynamics of bacterial populations during postantibiotic effect determined by flow cytometry. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(5):1005-1011.
- (90) Scherer JM, Stillwell W, Jenki LJ. Anomalous changes in forward scatter of lymphocytes with loosely packed membranes. *Cytometry* 1999; 37(3):184-190.
- (91) Vuk-Pavlovic Z, Standing JE, Crouch EC, Limper AH. Carbohydrate recognition domain of surfactant protein D mediates interactions with *Pneumocystis carinii* glycoprotein A. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24(4):475-484.
- (92) Stamme C, Muller M, Hamann L, Gutschmann T, Seydel U. Surfactant protein a inhibits lipopolysaccharide-induced immune cell activation by preventing the interaction of lipopolysaccharide with lipopolysaccharide-binding protein. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27(3):353-360.
- (93) Ferguson JS, Voelker DR, Ufnar JA, Dawson AJ, Schlesinger LS. Surfactant protein D inhibition of human macrophage uptake of *Mycobacterium tuberculosis* is independent of bacterial agglutination. *J Immunol* 2002; 168(3):1309-1314.

## 7. Literaturverzeichnis

---

- (94) Hartshorn KL, Crouch E, White MR, Colamussi ML, Kakkanatt A, Tauber B et al. Pulmonary surfactant proteins A and D enhance neutrophil uptake of bacteria. *Am J Physiol* 1998; 274(6 Pt 1):L958-L969.
- (95) Gardai SJ, Xiao YQ, Dickinson M, Nick JA, Voelker DR, Greene KE et al. By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell* 2003; 115(1):13-23.
- (96) Haurum JS, Thiel S, Haagsman HP, Laursen SB, Larsen B, Jensenius JC. Studies on the carbohydrate-binding characteristics of human pulmonary surfactant-associated protein A and comparison with two other collectins: mannan-binding protein and conglutinin. *Biochem J* 1993; 293 ( Pt 3):873-878.
- (97) Persson A, Chang D, Crouch E. Surfactant protein D is a divalent cation-dependent carbohydrate-binding protein. *J Biol Chem* 1990; 265(10):5755-5760.
- (98) Reid KB. Interactions of surfactant protein D with pathogens, allergens and phagocytes. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1408(2-3):290-295.
- (99) Knapp PE, Swanson JA. Plasticity of the tubular lysosomal compartment in macrophages. *J Cell Sci* 1990; 95 ( Pt 3):433-439.
- (100) Sorokin SP, Brain JD. Pathways of clearance in mouse lungs exposed to iron oxide aerosols. *Anat Rec* 1975; 181(3):581-625.

## Curriculum Vitae

### Personalien

Name: Stefanie Sommer, geborene Goldmann

Geburtsdatum: 29.06.1975

Geburtsort: Alfeld / Leine

Familienstand: verheiratet

Kinder: Anna Marie Sommer, geb. 14.03.2007

### Schulbildung

Grundschule, Orientierungsstufe,  
Realschule in Bockenem;

Gymnasium in Hildesheim  
Abschluss: Abitur, Note 3,3

1981 - 1994

### Ausbildung

Ausbildung zur Hotelfachfrau,  
Maritim Grand Hotel, Hannover  
Abgebrochen nach bestandener  
Zwischenprüfung, Note 2

01.1995 – 11.1995

Ausbildung zur Medizinisch-  
Technischen Laboratoriumsassistentin  
Medizinische Hochschule Hannover  
Abschlussnote 2

04.1996 – 03.1999

## Beschäftigung als Medizinisch-Technische Assistentin

Dr. med. R. Glaubitz, FA für Humangenetik, Hannover 04.1999 – 08.1999

Prof. Dr. J. Borlak, ITEM, Fraunhofer Institut für  
Toxikologie und Aerosolforschung, Hannover 09.1999 – 09.2000

### Hochschulausbildung

Studium der Humanmedizin  
an der Christian-Albrechts-Universität Kiel 10.1999 – 03.2000

Studium der Humanmedizin  
an der Medizinischen Hochschule Hannover 04.2000 – 11.2006

Ärztliche Vorprüfung, Gesamtnote gut 08.2002

1. Staatsexamen, Note gut 08.2003

2. Staatsexamen, Gesamtnote gut 08.2005

### Praktisches Jahr

Abteilung für Innere Medizin in Rotation  
Marienhospital Osnabrück 10.2005 - 01.2006

Prof. Dr. Cording  
Abteilung für Anästhesie  
Marienhospital Osnabrück 02.2006 – 05.2006

Abteilung für Chirurgie in Rotation  
Marienhospital Osnabrück 06.2006 – 09.2006

3. Staatsexamen Gesamtnote sehr gut 11.2006

## Wissenschaftliches Arbeiten

### Dissertation

PD. Dr. V. Erpenbeck, ITEM, Fraunhofer Institut für  
Toxikologie und Aerosolforschung / Abt. für  
Pneumologie, Medizinische Hochschule Hannover,  
Dissertation in Korrektur

09.2003 – 09.2005

## Wissenschaftliche Veröffentlichungen

### Originalarbeiten

Erpenbeck VJ, Malherbe DC, Sommer S, Schmiedl A, Steinhilber W, Ghio AJ, Krug N, Wright JR, Hohlfeld JM. Surfactant protein D increases phagocytosis and aggregation of pollen-allergen starch granules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005 Apr;288(4):L692-8. Epub 2004 Dec 10.

### Posterpräsentationen / Vorträge

Erpenbeck VJ, Sommer S, Malherbe DC, Braun A, Krug N, Wright JR, Hohlfeld JM. Surfactant-Protein D decreases the number of allergen-loaded antigen presenting cells in the mouse lung after intratracheal instillation of pollen starch granules (PSG) from *Phleum pratense* pollen. EAACI DAVOS meeting Davos (Switzerland), 2006.

Erpenbeck VJ, Sommer S, Malherbe DC, Braun A, Krug N, Wright JR, Hohlfeld JM. Surfactant protein D decreases the number of allergen-containing antigen presenting cells in the mouse lung after intratracheal instillation of allergen particles. 100<sup>th</sup> international conference of the American thoracic society San Diego (USA), 2005.

Erpenbeck VJ, Sommer S, Malherbe DC, Braun A, Krug N, Wright JR, Hohlfeld JM. Surfactant Protein D vermindert die Zahl allergenbeladener antigen-präsentierender Zellen in der Mauslunge nach intratrachealer Instillation von Allergenpartikeln. 17 Mainzer Allergie-Workshop, Mainz (Germany), 2005.

Fuchs B, Erpenbeck VJ, Sommer S, Krug N, Hohlfeld J, Braun A. A grass-pollen induced murine model of allergic inflammation in the lung. *Journal of the world allergy Organization* 2005; S1:183.

Würzburg, den 17. Juli 2008

Stefanie Sommer

### Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. J.M. Hohlfeld für die Überlassung des Dissertationsthemas danken. Ferner bedanke ich mich bei meinem Betreuer Herrn PD Dr. med. V.J. Erpenbeck für die exzellente Betreuung während der Bearbeitung der Fragestellung und bei der Korrektur dieser Arbeit.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Frau Bianca Lavae-Mokthari, Britta Reubke-Gothe und den Mitarbeitern der Abteilung für Immunologie des ITEM für die Unterstützung und Zusammenarbeit im Labor.

**Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nrn. 5 und 6**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte  
Dissertation mit dem Titel:

**Der Einfluss des pulmonalen Surfactant auf chronisch allergische Erkrankungen**

In der Abteilung für Pneumologie, Zentrum Innere Medizin der Medizinischen Hochschule Hannover unter Betreuung von PD Dr. V. Erpenbeck / Prof. Dr. J. Hohlfeld mit der Unterstützung ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Ergebnisse der Dissertation wurden/werden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2005 Apr; 288(4):L692-8. Epub 2004 Dec 10  
Journal of the world allergy Organization 2005; S1:183  
EAACI DAVOS meeting Davos (Switzerland), 2006  
100<sup>th</sup> international conference of the American thoracic society San Diego (USA), 2005  
17 Mainzer Allergie-Workshop, Main7 (Germany), 2005

Hannover, den 18. Juli 2008

.....  
(Unterschrift)