Metabolismus von inhalativ appliziertem rSP-C Surfactant in SP-C knock out Mäusen

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

> vorgelegt von Kleist, Vera, geb. Hillebrand aus Büren

> > Giessen 2014

Aus dem medizinischen Zentrum für Innere Medizin Medizinische Klinik II der Uniklinikum Giessen & Marburg GmbH Leiter: Prof. Dr. med. W. Seeger Klinische Forschergruppe "Lungenfibrose" Leiter: Prof. Dr. med. A. Günther

- 1. Gutachter: Prof. Dr. med. A. Günther
- 2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. K.-D. Schlüter

Tag der Disputation: 21.11.2014

Inhaltsverzeichnis

VORWORT

1. EINLEITUNG

1.1. Das pulmonale Surfactant-System	1
1.1.1. Die Funktionen des pulmonalen Surfactants	5
1.2. Die Klassifikation der Idiopathischen Interstitiellen Pneumonien	8
1.3. Die pathogenetische Bedeutung des Surfactant-Systems in der	
Entstehung von Lungenfibrosen	17
1.3.1. Angeborene und erworbene Störungen des Surfactant-Systems	17
1.3.2. Zusammenhang zwischen Oberflächenspannungsregulation	
und IPF	23
1.4. Murines Modell einer SP-C Defizienz induzierten Lungenfibrose	24
2. FRAGESTELLUNG	26
3. MATERIALIEN UND METHODEN	
3.1. Materialien	27
3.1.1. Versuchstiere	27
3.1.2. Substanzen	27
3.1.3. Verbrauchsmaterial	29
3.1.4. Geräte / Software	30
3.2. Methoden	31
3.2.1. Inhalative Applikation von Surfactant	31
3.2.2. Compliance-Bestimmung	34
3.2.3. Gewinnung von BALF	35

3.2.4. Proteinextraktion	35
3.2.5. Proteinbestimmung mittels BCA-Protein-Assay	35
3.2.6. SDS-Gelelektrophorese	37
3.2.7. Western Blotting	39
3.2.8. Densitometrie	42
3.2.9. Lipidextraktion nach Bligh & Dyer	42
3.2.10. Colorimetrische Phosphatbestimmung	43
3.2.11. Histologische Aufarbeitung der Lunge	44
3.2.11.1. Einbettung des Gewebes	44
3.2.11.2. Hämatoxillin-Eosin (H&E) – Färbung	45
3.2.11.3. Auswertung der gefärbten Schnitte	46
3.2.11.4. Immunhistochemie	46
3.2.12. Statistische Auswertung	47

4. ERGEBNISSE

4.1. rSP-C-Surfactant Verneblung von spontan atmenden Mäusen mit	ttels
Trockenvernebler	48
4.1.1. Pulmonale Deposition von SP-C	48
4.1.2. Pulmonale Deposition von Phospholipiden	51
4.2. Kinetik und Metabolismus von exogen appliziertem rSP-C Surfac	tant
nach Verneblung an spontan atmenden Mäusen	53
4.2.1. C57 Black 6/N Mäuse	53
4.2.2. SP-C knock out Mäuse	57
4.3. Aufnahme von exogen synthetisiertem Surfactant in alveoläre	
Typ-II-Zellen	61
4.4. Chronische Surfactant Verneblung an SP-C knock out Mäusen	64
5. DISKUSSION	71
6. ZUSAMMENFASSUNG	82

7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	86
8.	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	89
9.	LITERATURVERZEICHNIS	91
10.	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	100
11.	ERKLÄRUNG	101
12.	DANKSAGUNG	102

Vorwort

Fibrosierende Lungenerkrankungen haben in den vergangenen Jahren innerhalb der Pneumologie zunehmend Beachtung gefunden. Im Besonderen gilt dies für die Gruppe der Idiopathischen Interstitiellen Pneumonien (IIP), für welche die zugrunde liegenden molekularen und biochemischen Zusammenhänge bis dato noch nicht eindeutig entschlüsselt werden konnten. Sicher ist jedoch, dass Mutationen in den Genen von Surfactant-Proteinen eine große Rolle in der Ätiologie bei familiären Formen der Lungenfibrose spielen [Nogee, 1993, 1994, 2001]. Aber auch bei sporadischen Formen scheinen Störungen des Surfactant-Systems für die Fibroseentwicklung von großer Bedeutung zu sein [Günther 1999; Korfei/Günther 2007, unveröffentlichte Daten]. Vor dem Hintergrund dieser Befunde erscheint eine Gabe von exogenem Surfactant zur Korrektur der Surfactantveränderungen als mögliche Therapieoption.

vorliegenden Dissertation soll In der der Metabolismus einer exogenen Surfactantpräparation, die auf rekombinant hergestelltem rSP-C beruht, im tierexperimentellen Modell der Idiopathischen Pulmonalen Fibrose (IPF) betrachtet werden. Zunächst wurden Versuche zur pulmonalen Deposition des rSP-C nach Surfactant Verneblung von spontan atmenden Mäusen mit Hilfe eines eigens für diese Zwecke generierten Trockenverneblers durchgeführt. Anschließend erfolgte die Surfactant Verneblung an gesunden Wildtyp- und SP-C knock out Mäusen, deren Lungen nach verschiedenen Zeitpunkten auf den Gehalt an SP-C untersucht wurden, um so die Routen der Aufnahme des SP-Cs darstellen zu können. Nach der Etablierung der Surfactant Verneblung mittels Trockenvernebler erfolgte eine chronische Surfactant Verneblung von SP-C knock out Mäusen mit dem Ziel eine mögliche Beeinflussung des Phänotyps, bedingt durch die SP-C Behandlung, aufzuzeigen.

1. Einleitung

1.1. Das pulmonale Surfactant-System

Das pulmonale Surfactant-System ist von größter Notwendigkeit für die Aufrechterhaltung einer normalen Lungenfunktion. Beim Surfactant (<u>surface act</u>ive <u>agent</u>) handelt es sich um ein oberflächenaktives Lipid-Protein-Gemisch, welches die Oberflächenspannung an der Luft-Wasser-Grenzfläche auf Werte nahe 0 mN/m reduziert und folglich die Atmung bei normalen transthorakalen Drücken ermöglicht [Pattle, 1955; Clements, 1957]. Somit wird eine Stabilisierung der Alveolen während der Atemexkursionen, insbesondere der Endexspiration gewährleistet und ein Kollaps verhindert, womit ein funktionierender Gasaustausch sichergestellt werden kann [Neergard, 1929].

Hauptbestandteil des Surfactants sind zu 90 % Lipide und zu 10 % Proteine. Auch kleine Mengen an Kohlenhydraten können gefunden werden [King, 1972].





Innerhalb der Gruppe der Lipide dominieren die Phospholipide (PL) mit einem Anteil von ~ 90 %. Hauptvertreter der PL ist das Phosphatidylcholin (PC) mit ca. 75 %. Wiederum 50 % bis 65 % aller PC-Moleküle liegen mit zwei gesättigten Palmitinsäureresten verestert als Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) vor, welches hauptsächlich für die Reduktion der Oberflächenspannung in den Alveolen verantwortlich ist [Klaus, 1961; Hallman, 1982].

Neben Serumproteinen wie z.B. Albumin oder Immunglobulin G können vier verschiedene Surfactant-assoziierte Proteine im Surfactant nachgewiesen werden. In Verbindung mit den Surfactantlipiden tragen sie in großem Maß zu den spezifischen Eigenschaften des Surfactants bei. Nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung werden sie in Surfactantprotein A (SP-A), Surfactantprotein B (SP-B), Surfactantprotein C (SP-C) und Surfactantprotein D (SP-D) unterteilt [Possmayer, 1988]. Sowohl das den Hauptanteil der Surfactantproteine ausmachende SP-A als auch das in nur geringen Mengen vorkommende SP-D sind große, multimere und hydrophile Proteine. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit gehören beide der Gruppe der Kollektine (C-Typ-Lectine) an. Das Vorkommen der relativ kleinen und hydrophoben Surfactantproteine B und C entdeckten erstmals Phizackerley et al. im Jahr 1979 [Phizackerley, 1979]. Wegen ihrer extremen Hydrophibizität sind sie nur in (semi-) organischen Solventien löslich.

Die Synthese der Surfactantkomponenten erfolgt in den alveolären Typ-II-Zellen, welche ca. 5 % der alveolären Oberfläche einnehmen. Zytologisch handelt es sich um kubische sezernierende Zellen mit einem großen Zellkern, einem umfassenden Enzymsystem und den für die Zellen typischen Lamellarkörperchen. Sowohl die Lipidals auch die Proteinkomponenten werden im rauen endoplasmatischen Retikulum produziert, bevor sie den sekretorischen Pfad durchlaufen. Hierzu erfolgt im Golgi- und Post-Golgi-Komplex die proteolytische Prozessierung. Über multivesikuläre Körperchen gelangen die Lipide sowie die maturen Surfactantproteine dann zu den Lamellarkörperchen [Chevalier, 1972]. Die Lamellarkörperchen stellen die intrazelluläre Speicherform des Surfactants dar, von wo aus eine regulierte Sekretion in den alveolären Raum erfolgen kann. Mit einem Durchmesser von jeweils 0,2-1µm und einer Anzahl von 100 bis 150 pro Zelle machen die Lamellarkörperchen einen Großteil der alveolären Typ-II-Zelle aus [Crystal, 1991]. Die Exkretion des Surfactants geschieht durch Exozytose des Inhalts der Lamellarkörperchen in die alveoläre Hypophase [Ryan, 1975]. Hier breitet es sich in Form einer hoch geordneten gitter-ähnlichen Struktur aus, welche den Oberflächenfilm speist [Williams, 1977]. Dieses sogenannte Tubuläre Myelin ist somit als Vorläufer des Phospholipid-Films an der Luft-Wasser-Grenzfläche zu betrachten. SP-A scheint eine wichtige Rolle in der Formation bzw. Erhaltung des Tubulären Myelins zu spielen und ist an den Eckpunkten des Gitters lokalisiert [Voorhout, 1991]. Zudem lassen in-vitro-Studien vermuten, dass zusätzlich zum SP-A das Vorkommen von SP-B notwendig ist, um die richtige Anordnung des Tubulären Myelins zu gewährleisten [Williams, 1991].



Abb. 2: <u>Schematische Darstellung des pulmonalen Surfactantmetabolismus (modifiziert</u> <u>nach Myoshi, 2001)</u>

Das Surfactant wird im rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) der Typ-II-Zelle synthetisiert und über den Golgi-Apparat (Golgi) und multivesikuläre Körperchen (MVB) zu den Lamellarkörperchen (LB) transportiert.

- (1) Exocytose der LB in den alveolären Raum
- (2) Umwandlung der LB in Tubuläres Myelin (TM)
- (3) Formation des Oberflächenfilms an der Luft-Wasser-Grenzfläche
- (4) Auflösung des Oberflächenfilms und Bildung von unilamellären Vesikeln (UV)
- (5) Wiederaufnahme der Surfactantkomponenten in die alveoläre Typ-II-Zelle
- (6) Aufnahme der Surfactantkomponenten durch alveoläre Makrophagen (AM)

Die Surfactantkomponenten werden in der Regel alle 3 bis 11 Stunden aus dem alveolären Raum entfernt und durch neu sezerniertes Surfactant ersetzt [Baritussio, 1981]. Nachdem sie in unilamelläre Vesikel verpackt worden sind, werden sie zu 65% [Geiger, 1975] bis 95% [Hallman, 1981] durch Endozytose in die alveolären Typ-II-Zellen wieder aufgenommen und wiederverwertet. Unklar ist, ob die Phospholipide als intakte Moleküle wiederverwertet oder abgebaut und de-novo synthetisiert werden. Vieles deutet jedoch darauf hin, dass sie letztendlich zwischen den Lamellarkörperchen und den Alveolen "recycelt" werden [Young, 1981; van Golde, 1988].

Reguliert wird der Surfactant-Umsatz durch die Surfactantproteine. So konnte eine gesteigerte Aufnahme der Phospholipide durch den Einfluss von SP-A, SP-B und SP-C [d, 1987; Rice, 1989; Tsuzuki, 1993] und eine Sekretionshemmung durch SP-A [Dobbs, 1987] beobachtet werden. Besonders das SP-A scheint folglich den Umsatz des Surfactants durch Interaktion mit spezifischen Rezeptoren auf den Typ-II-Zellen zu regulieren [Ryan, 1989].

10 % bis 20 % des Surfactants werden von alveolären Makrophagen aufgenommen und in Lysosomen abgebaut [Williams, 1981]. Ein kleiner Teil von etwa 7% wird entlang der Atemwege abtransportiert (mukoziliare Clearance) [Pettenazzo, 1988].

1.1.1. Die Funktion des pulmonalen Surfactants

Die Hauptaufgabe des pulmonalen Surfactants besteht in der Reduktion der alveolären Oberflächenspannung an der Luft-Wasser-Grenzfläche. Besonders in der endexspiratorischen Phase wird so ein Kollaps der Alveolen bei normalen transthorakalen Drücken verhindert. Dies geschieht durch die Bildung eines stabilen Oberflächenfilms, der in hohem Maße DPPC, aber auch andere Lipide und Proteine enthält. An der Luft-Wasser-Grenzfläche richten sich die Phospholipide gemäß ihres amphiphilen Charakters mit der polaren, hydrophilen Kopfgruppe zur wässrigen Phase und den hydrophoben Fettsäureschwänzen zur Luftphase hin aus. Unter statischen den Bedingungen erzielen Phospholipidgemische Verbindung mit in Surfactantproteinen Oberflächenspannungswerte von etwa 25 mN/m (Aqua dest. etwa 70 mN/m) [Possmayer, 1990]. Eine weitere Reduktion der Oberflächenspannung auf Werte nahe 0 mN/m gelingt durch die biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften des DPPC. Durch seine zwei gesättigten Fettsäuren und einer über Körpertemperatur liegenden Phasenübergangstemperatur von 41°C (fest nach flüssig) erhält es auf Grund der damit verbundenen geringen Fluidität maximale Komprimierbarkeit und Stabilität. So wird ein Entweichen der DPPC-Moleküle aus dem Grenzflächenfilm während der exspiratorischen Kompression weitgehend vermieden. Im Gegensatz dazu zeigen die mit ungesättigten Fettsäuren substituierten Phospholipidbzw. Phosphatidylcholin-Moleküle eine höhere Fluidität und erfüllen somit die Voraussetzung einer schnellen Adsorption an die Luft-Wasser-Grenzfläche. Dies ist insbesondere von Bedeutung, wenn die alveoläre Phase bei zunehmender Oberfläche während der Inspiration möglichst schnell mit oberflächenaktivem Material angereichert werden muss. Bei der erneuten Kompression werden die mobilen, ungesättigten Phoshatidylcholin-Moleküle aus dem Oberflächenfilm "herausgequetscht" (*squeeze out*) [Taneva, 1994; Discher, 1999].

Weiterhin spielt das Surfactant-System eine entscheidende Rolle bei der Steigerung der Compliance sowie der Gewährleistung eines effektiven Gasaustauschs. Nach dem La Place'schen Gesetz ($\Delta p=2\sigma/r$; p=Druck; σ =Oberflächenspannung; r=Radius) würde in Abwesenheit eines intakten Surfactant-Systems eine Verkleinerung der Alveolen bei der Exspiration mit einem Anstieg der Oberflächenspannung einhergehen. Dieser hätte einen Kollaps der Alveolen zur Folge. Auf Grund der größeren Retraktionskraft der kleineren Alveolen wären zuerst diese von einem Kollaps betroffen, was zu einer ungleichen Ventilation führen würde. In Gegenwart des Surfactants erfolgt hingegen während der Expiration eine Absenkung der Oberflächenspannung auf Werte nahe 0 mN/m, wodurch kollabierte Lungenanteile mit einem minimalen inspiratorischen Druck wieder geöffnet und somit die Bildung von Atelektasen verhindert werden kann [Notter, 1975]. Neben der Tatsache, dass somit die Lungendehnbarkeit (Compliance) gesteigert wird, können so auch unterschiedlich große Alveolen nebeneinander koexistieren und kommunizieren [Hamm, 1996]. Dies wiederum ist für einen effektiven Gasaustausch in der Lunge von Bedeutung. Ein intaktes Surfactant-System macht den Gasaustausch bei niedrigen transpulmonalen Drücken möglich, indem es die große Lungenoberfläche aufrechterhält. Surfactant-Mangel würde in diesem Zusammenhang zu einem gestörten Ventilations-Perfusions-Verhältnis und einem intrapulmonalen "Shunting" mit folgender Hypoxämie führen.

Auch im Immunsystem der Lunge kommt dem Surfactant eine besondere Bedeutung zu. Allein der von den Phospholipiden gebildete stabile Grenzfilm, weitere Lipidstrukturen und das unterhalb des Grenzfilms liegende Tubuläre Myelin wirken als Barriere für Mikroorganismen und verhindern somit deren Adhäsion und Invasion [Veldhuizen, 2000]. Die Tatsache, dass die beiden hydrophilen Surfactantproteine SP-A und SP-D sowohl in Tracheal- und Bronchialdrüsen als auch im Epithel der zuführenden Atemwege gefunden werden konnten, lässt deren wichtige Funktion in der Immunabwehr der Lunge vermuten [Khoor, 1993].

1.2. Die Klassifikation der Idiopathischen Interstitiellen Pneumonien

Die Idiopathischen Interstitiellen Pneumonien (IIP) sind eine heterogene Gruppe von nicht-neoplastischen Erkrankungen, bei denen das Lungenparenchym durch Entzündungen und/oder Fibrosierung geschädigt wird. Das Interstitium ist der primäre Angriffsort, wobei im weiteren Verlauf auch die luftführenden Räume, die Blutgefäße und deren zugehörigen epi- und endothelialen Begrenzungen beeinträchtigt werden. Mit ca. 60 % stellt die Idiopathische Pulmonale Fibrose (IPF) die größte Entität der IIP dar. Die aktuellen Leitlinien der IPF -gemeinschaftlich herausgegeben durch die American Thoracic Society (ATS), die European Respiratory Society (ERS), die Japanese Respiratory Society (JRS) und die Latin American Thoracic Association (ALAT)- befassen sich u.a. mit der Definition, Epidemiologie, Risikofaktoren, Diagnosekriterien sowie möglichen Behandlungstrategien dieser schwerwiegenden Erkrankung [Raghu, 2011]. Neben diesen Punkten soll im Folgenden kurz auf weitere Krankheitsformen der IIP entsprechend einer älteren Richtlinie der ATS/ ERS aus dem Jahr 2002 eingegangen werden. Die Unterscheidung der einzelnen Krankheitsformen erfolgt hierbei unter Berücksichtigung der Symptome, der Befunde -vor allem aus bildgebenden Untersuchungsverfahren-, der Pathologie, des Krankheitsverlaufs sowie der Behandlungsmöglichkeiten [ATS & ERS, 2002; Günther, 2003; Wittram, 2003].

Idiopathische Pulmonale Fibrose

Die Idiopathische Pulmonale Fibrose (IPF), auch *"usual interstitial pneumonia"* (UIP), ist die Form der IIP mit der schlechtesten Prognose. Ein rascher und therapierefraktärer Verlauf führt nach Diagnosestellung im Mittel nach 3 bis 5 Jahren zum Tod. Die Erkrankung betrifft in der Regel Menschen im mittleren bis höheren Lebensalter (meist über 50 Jahre); Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen. Einen Risikofaktor stellt der Nikotinabusus dar. Außerdem scheint eine genetische Komponente Einfluss auf die Entstehung einer IPF zu haben. Bei familiären Formen konnten Punktmutationen im Bereich des SP-C Gens als mögliche Ursache identifiziert werden. Diese können eine gestörte Proteinprozessierung mit nachfolgender Proteinfehlfaltung und Selbstaggregation zur Folge haben und somit den Ausgangspunkt eines epithelialen Zellschadens (Apoptose) und den darauffolgenden fibrotischen Umbau darstellen [Günther, 2003] (siehe 1.3). Über einen ähnlichen Mechanismus, nämlich Apoptose des

alveolären Epithels infolge einer chronischen DNA- Schädigung, führen auch Mutationen der Telomerase (TERT) zur Entwicklung einer Lungenfibrose [Tsakiri, 2007.]

Die Symptome einer IPF bleiben oft über einen langen Zeitraum unerkannt. Das sich langsam entwickelnde Krankheitsbild beginnt meist mit zunehmender Belastungsdyspnoe und trockenem Husten. Bei der Auskultation kann ein beidseits basales Knisterrasseln gehört werden. Im späteren Stadium sind Zeichen der chronischen Hypoxämie zu erkennen (Uhrglasnägel, Trommelschlegelfinger, Zyanose und Cor pulmonale).

Die Diagnose einer IPF erfordert gemäß der aktuellen Leitlinien den Ausschluss aller anderen Formen einer interstitiellen Lungenerkrankung sowie den Nachweis des sogenannten UIP-Musters mittels hochauflösender CT (HRCT) oder Histopathologie in einer offenen Lungenbiopsie. Diagnosekriterien für die CT-Morphologie sind beispielsweise eine subpleurale und pleurale Betonung, Retikulationen, ein Honigwabenmuster mit oder ohne Traktionsbronchiektasen oder das Fehlen aller Kriterien, die mit dem **UIP-Muster** unvereinbar sind (z.B. Oberund Mittelfeldbetonung, ausgedehnte Milchglasveränderungen, Konsolidierung, etc.). Die histologische UIP-Diagnose beinhaltet neben einer deutlichen Fibrose bzw. Architekturzerstörung auch eine herdförmig-heterogene Fibrose des Lungenparenchyms sowie den Nachweis von Fibroblastenherden bei Fehlen von Kriterien, die gegen eine UIP sprechen. Hier wären z.B. eine organisierende Pneumonie, Granulome oder deutliche interstitielle Entzündungen außerhalb von Honigwaben zu nennen [Raghu, 2011].



Abb. 3: <u>Diagnosealgorithmus bei Verdacht auf Idiopathische Interstitielle Fibrose (IPF)</u> (modifiziert nach Günther, 2003) HRCT = High-Resolution-Computertomographie

HRCT-Muster	Histologisches Muster	Diagnose IPF
UIP	UIP	ја
	wahrscheinliche UIP	ја
	mögliche UIP	ја
	nicht klassifizierbare Fibrose	ја
	keine UIP	nein
mögliche UIP	UIP	ја
	wahrscheinliche UIP	ја
	mögliche UIP	wahrscheinlich
	nicht klassifizierbare Fibrose	wahrscheinlich
	keine UIP	nein
unvereinbar mit		
UIP	UIP	möglich
	wahrscheinliche UIP	nein
	mögliche UIP	nein
	nicht klassifizierbare Fibrose	nein
	keine UIP	nein

 Tab. 1: Diagnoseschema des UIP-Musters nach HRCT-Morphologie und Histologie (modifiziert nach Behr, 2013)

Nichtspezifische Interstitielle Pneumonie

Der Begriff der Nichtspezifischen Interstitiellen Pneumonie (NSIP) ist ursprünglich ein Sammelbegriff für alle nicht klassifizierbaren IIP. Folglich ist die Definition dieser Gruppe an Pneumonien eher schwierig. Trotz der beobachteten Heterogenität kann sie allerdings zur Gruppe der UIP abgegrenzt werden. Die Patienten sind bei Diagnosestellung meist zwischen 40 und 50 Jahren alt. Es liegt keine Geschlechtspräferenz und keine Abhängigkeit von Nikotinkonsum vor. Ein gleichzeitiges Auftreten von UIP und NSIP ist möglich. Die Prognose der reinen NSIP variiert je nach Ausmaß der Erkrankung zwischen vollständiger Rückbildung der Veränderungen bis zur Chronizität mit dem Vorhandensein stabiler Symptome. Die Symptome ähneln denen der UIP, wobei zusätzlich zu Belastungsdyspnoe und Husten, auch Müdigkeit und Gewichtsabnahme auftreten können.

Röntgenologisch und im CT zeigt sich eine bilaterale subpleurale milchglasartige Trübung mit retikulärem Zeichnungsmuster. Auch Traktionsbronchiektasen und Honigwabenmuster können vorkommen. Histologisch dominieren entweder zelluläre oder fibrosierende Veränderungen.

Lymphoide Interstitielle Pneumonie

Der Lymphoiden Interstitiellen Pneumonie (LIP) liegt eine diffuse pulmonale Lymphozyten-Proliferation mit größtenteils interstitiellen Veränderungen zu Grunde. Die reine LIP ist eher selten. In der Mehrzahl der Fälle tritt sie in Verbindung mit kollagenen Gefäßerkrankungen, Immundefektsyndromen oder dem Sjögren-Syndrom auf. Betroffen sind in der Regel Frauen im Alter zwischen 40 und 50 Jahren. Symptomatisch stechen neben Belastungsdyspnoe und Husten auch Fieber, Gewichtsabnahme und Arthralgien hervor.

In der BALF fällt ein massiver Anstieg der Lymphozyten auf. Im CT zeigen sich milchglasartige Trübungen mit zentrolobulären und subpleuralen Knötchen und Verdichtungen der Interlobularsepten. Das histologische Bild umfasst eine diffuse Infiltration der Alveolarsepten mit Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen.

"Respiratory Bronchiolitis – Interstitial Lung Disease"

Der Begriff der "*respiratory bronchiolitis – interstitial lung disease*" (RB-ILD) beschreibt eine interstitielle Lungenerkrankung mit der Pathologie einer respiratorischen Bronchiolitis, wie sie bei Rauchern vorkommt. Ursächlich für die RB-

ILD, auch Kondensat- oder Raucherpneumopathie genannt, ist eine Entzündung der kleinen Atemwege als Resultat auf langjährigen und anhaltenden Nikotinkonsum (> 30 insbesondere 40 50jährige pack-years). Betroffen sind bis Männer (Geschlechterverhältnis m:w = 2:1). Bei Nikotinkarenz hat die RB-ILD eine relativ gute Prognose, da sich sowohl die Beschwerden als auch die pulmonalen Veränderungen weitestgehend zurückbilden. Neben asymptomatischen Formen sind auch schwerwiegenden Verläufe mit Husten, Dyspnoe und Hypoxämie bekannt.

Lungenfunktionell bestehen Zeichen teils obstruktiver, teils restriktiver Ventilationsstörungen und eine eingeschränkte CO-Diffusionskapazität. Die BALF besitzt eine gelblich-bräunlich Verfärbung, die durch goldene, braune oder schwarze "Tabak-Pigmente" in den Alveolarmakrophagen hervorgerufen wird. Im CT fallen fleckförmige Milchglastrübungen, eine Verdickung der zentralen und peripheren Atemwege und zentrilobuläre Knötchen auf. In den apikalen Lungenanteilen findet sich oft ein zentrilobuläres Emphysem und "air trapping".

In der Histologie fallen die akkumulierten pigmentierten Makrophagen im Bereich der kleinen Atemwege ins Auge.

Desquamative Interstitielle Pneumonie

Die Desquamative Interstitielle Pneumonie (DIP) ist nicht -wie der Name vermuten lässt- durch abgeschilferte Pneumozyten, sondern -ebenfalls wie die RB-ILD- durch Akkumulation von Alveolarmakrophagen in den distalen Atemwegen und Alveolen gekennzeichnet. Wahrscheinlich sind DIP und RB-ILD unterschiedliche Spektren derselben Erkrankung. So sind auch von der DIP meist langjährige Raucher (Geschlechterverhältnis m:w = 2:1) betroffen. Symptomatisch macht sie sich wie eine RB-ILD mit Dyspnoe und trockenem Husten bemerkbar.

Im CT sind die milchglasartigen Trübungen besonders in den unteren Lungenarealen zu sehen. Auch interlobuläre septale Verdickungen kommen vor. Das histologische Bild ähnelt mit akkumulierten pigmentierten Alveolarmakrophagen und milden Fibrosezeichen dem der RB-ILD. Jedoch sind bei der DIP im Gegensatz zur RB-ILD keine zentrilobulären Auffälligkeiten auszumachen.

Kryptogen Organisierende Pneumonie / "Bronchiolitis Obliterans Organizing Pneumonia"

Die Kryptogen Organisierende Pneumonie (COP) und die *"bronchiolitis obliterans organizing pneumonia"* (BOOP) bezeichnen dasselbe Krankheitsbild. Histologisch ist es durch eine organisierende Pneumonie mit intraluminaler organisierender Fibrose in den Ductus alveolares und den Alveolarräumen gekennzeichnet. Meist tritt die COP als Folge einer reaktiven Arthritis, einer viralen Pneumonie oder eines Drogenkonsums auf. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 55 Jahre, wobei Männer und Frauen gleich häufig, Nichtraucher jedoch doppelt so oft wie Raucher betroffen sind. Oft findet sich in der Anamnese ein respiratorischer Infekt kurz vor dem aktuellen Beschwerdebild. Dieses umfasst neben produktivem Husten und Dyspnoe vegetative Begleitsymptome wie Gewichtsverlust, Nachtschweiß, intermittierendes Fieber und Myalgien. Laborchemisch fallen erhöhte Entzündungswerte auf (Blutsenkung, CRP, Neutrophile). Bei der Auskultation ist ein lokales oder diffuses Knisterrasseln zu hören.

Lungenfunktionell bieten die Patienten eine restriktive Ventilationsstörung. Ein eingeschränkter Gasaustausch zeigt sich durch CO-Diffusionsstörungen und eine arterielle Hypoxämie. Im Röntgenbild sind uni- oder bilaterale fleckförmige Konsolidierungen und ein positives Bronchopneumogramm typisch für die COP. Im CT fallen besonders subpleurale und peribronchiale Veränderungen auf. Neben milchglasartigen Trübungen und kleinen Knötchen kann auch eine milde bronchiale Dilatation vorkommen. Oft sind die unteren Lungenareale stärker betroffen. In der Histologie unterscheidet man eine frühe von einer späten Phase. In der frühen Phase der COP finden sich lokale Veränderungen zentriert um einen Bronchiolus mit Einbeziehung der Ductus alveolares und der Alveolarräume. Lymphozyten und Plasmazellen liegen in Bereichen milder chronischer interstitieller Inflammation. In der späten Phase erscheint eine sich intraluminal und interstitiell ausbreitende Fibrose.

Akute Interstitielle Pneumonie

Die Akute Interstitielle Pneumonie (AIP) ist eine schnell voranschreitende Form der IIP mit diffusen alveolären Schäden. Sie nimmt in mindestens 50 % der Fälle einen tödlichen Verlauf. Die Patienten sind bei Erkrankungsbeginn im Mittel 50 Jahre alt. Sie berichten oft von einem vorausgehenden viralen respiratorischem Infekt mit Myalgien, Arthralgien, Fieber und Unwohlsein. Eine respiratorische Insuffizienz entwickelt sich bei der AIP besonders schnell, wobei in der Regel eine Intubation mit Beatmung nicht umgangen werden kann. Viele Patienten entwickeln in diesem Zusammenhang ein "acute respiratory distress syndrome" (ARDS). Bei überlebenden Patienten kann die AIP ausheilen, oft bleibt jedoch eine ausgedehnte Fibrose.

Das CT zeigt diffuse milchglasartige Trübungen mit Traktionsbrochiektasen und Zysten. Die Lungenarchitektur ist zum Großteil zerstört. Histologisch zeigt sich ein äußerst homogenes Bild, welches dem des ARDS vollkommen gleicht. In der exsudativen Phase der AIP fallen besonders hyaline Membranen, alveoläre Ödeme und eine ausgeprägte interstitielle und alveoläre Entzündungsreaktion ins Auge. Die folgende Organisationsphase ist durch lockere fibrotische Aufweitungen der Alveolarsepten und Hyperplasien der alveolären Typ-II-Zellen gekennzeichnet.

Klinik der Idiopathischen Interstitiellen Pneumonien

Klinische	IPF	NSIP	LIP	RB-ILD	DIP	COP/BOOP	AIP
Diagnose							
Pathologisches	UIP	NSIP	LIP	RB-ILD	DIP	ОР	DAD
Muster							
Mittleres	57 J.	49 J.	45 J.	36 J.	42 J.	55 J.	50 J.
Erkrankungsalter							
Beginn	schleichend	schleichend bis akut	schleichend	schleichend	schleichend	subakut	akut
Verhältnis m:w	m > w	m = w	m < w	m > w	m > w	m = w	m = w
Risikofaktor Nikotin	ја	nein	nein	ја	ја	nein	nein
Klinik	 Belastungsdyspnoe trockener Husten Zeichen chronischer Hypoxämie 	 Belastungsdyspnoe trockener Husten Zeichen chronischer Hypoxämie Müdigkeit Gewichtsverlust 	 Belastungsdyspnoe trockener Husten Fieber Gewichtsverlust Arthralgien 	 Belastungsdyspnoe trockener Husten Zeichen chronischer Hypoxämie 	 Belastungsdyspnoe trockener Husten 	 Dyspnoe produktiver Husten Gewichtsverlust Nachtschweiß Fieber Myalgien 	 Myalgien Arthralgien Fieber Unwohlsein
Mittlere Überlebenszeit	3-5 J.	17 J.		normal	12 J.		2 Mo.
Mortalität (%)	68	11		0	27		62
Komplette Remission möglich	nein	ја		ја	ја	ја	ја

Tab. 2: Klinische Zeichen der IIP (modifiziert nach Katzenstein und Myers, 1998)

Abkürzungen: IPF = Idiopathische Pulmonale Fibrose, UIP = ,,usual interstitial pneumonia", NSIP = Nichtspezifische InterstitiellePneumonie, LIP = Lymphoide Interstitielle Pneumonie, RB-ILD = ,,respirartory bronchiolitis - interstitial lung disease", DIP =Desquamative Interstitielle Pneumonie, COP = Kryptogen organisierende Pneumonie, BOOP = ,,bronchiolitis obliterans organizingpneumonia", OP = organisierende Pneumonie, AIP = Akute Interstitielle Pneumonie, DAD = diffuser alveolärer Schaden

BALF-Befunde bei Idiopathischen Interstitiellen Pneumonien

	IPF	NSIP	LIP	RB-ILD	DIP	COP/BOOP	AIP
Neutrophile	\uparrow	\uparrow	~	~ bis ↑	∼ bis 个		∼ bis 个
Lymphozyten	~	\uparrow	\uparrow		∼ bis 个	\uparrow	\uparrow
Eosinophile	\uparrow	\uparrow	~		∼ bis 个		
				gelb-braun	gelb-braun		
Alveolarmakrophagen	\checkmark	\checkmark		pigmentiert	pigmentiert		\checkmark
Erythrozyten							\uparrow

HRCT-Befunde bei Idiopathischen Interstitiellen Pneumonien

	IPF	NSIP	LIP	RB-ILD	DIP	COP/BOOP	AIP
	basal,	basal,	zentrolobulär,			subpleural,	
Lokalisation	subpleural	subpleural	subpleural	diffus	basal	peribronchial	diffus
Retikuläre							
Zeichnung	ја	ја	ја	nein	ја	nein	nein
Noduläre Zeichnung	nein	nein	nein	ја	nein	nein	nein
Milchglastrübung	ja	ja	ja	fleckförmig	ja	ја	ја
Konsolidierung	nein	ја	nein	nein	nein	fleckförmig	ја

Tab. 3: BALF- und HRCT-Befunde bei IIP (modifiziert nach Günther, 2003)

Abkürzungen: IPF = Idiopathische Pulmonale Fibrose, UIP = ,,usual interstitial pneumonia", NSIP = Nichtspezifische InterstitiellePneumonie, LIP = Lymphoide Interstitielle Pneumonie, RB-ILD = ,,respirartory bronchiolitis - interstitial lung disease", DIP =Desquamative Interstitielle Pneumonie, COP = Krytogen organisierende Pneumonie, BOOP = ,,bronchiolitis obliterans organizingpneumonia", OP = organisierende Pneumonie, AIP = Akute Interstitielle Pneumonie, DAD = diffuser alveolärer Schaden

1.3. <u>Die pathogenetische Bedeutung des Surfactant-Systems in der</u> <u>Entstehung von Lungenfibrosen</u>

Als wichtigste Vertreter der IIP zählen die IPF und die NSIP zu den häufigsten Formen der Lungenfibrose. Die zu Grunde liegenden Pathomechanismen, die zum Umbau des Alveolargerüsts in eine verdickte, durch Alveolarkollaps und Bindegewebebildung charakterisierte Gerüststruktur führen, sind noch weitestgehend ungeklärt. Ging man noch vor einigen Jahren von einer chronischen Inflammation des Lungenparenchyms aus, stehen heute eine chronische Schädigung des Alveolarepithels mit nachfolgender Wundheilungsstörung im Mittelpunkt des Interesses [Selman, 2001]. Unterstützt wird diese Hypothese durch Befunde bei Patienten mit familiären Formen einer IPF, bei denen die chronische Zellschädigung schließlich im programmierten Zelltod (Apoptose) der epithelialen Zellen endet [Günther, 2003].

Zunehmend rücken endogene Faktoren als Auslöser der epithelialen Schädigung in den Mittelpunkt des Interesses. Hier werden insbesondere angeborene und erworbene Störungen des Surfactant-Systems diskutiert, wovon im Folgenden Mutationen in den Genen des SP-C, des SP-B und des ABCA3-Transporters thematisiert werden.

1.3.1. Angeborene und erworbene Störungen des Surfactant-Systems

SP-C-Mutationen

Das SP-C ist neben dem SP-B das entscheidende Surfactant-Protein für die Steigerung der Oberflächenaktivität des Phospholipidfilms. Mutationen im SP-C-Gen führen nicht nur zum Anstieg der Oberflächenspannung, sondern resultieren auch in akuten und chronischen Lungenerkrankungen.

Erstmals konnten Nogee et al. im Jahr 2001 eine Veränderung im SP-C-Gen eines Kindes feststellen, in dessen Familie bereits drei Generationen das Bild einer IIP aufwiesen [Nogee, 2001]. War das Kind zum Zeitpunkt der Geburt noch symptomfrei, entwickelte es im Alter von drei Monaten eine plötzliche Zyanose. Die DNA-Sequenzanalyse des SP-C-Gens eröffnete die Substitution der ersten Base (Guanin zu Adenin) des Intron 4, was dazu führt, dass das Exon 4 bei der Transkription übersprungen wird. Resultat ist ein am carboxyterminalen Ende um 37 Aminosäuren verkürztes proSP-C (SPCΔExon4). Zudem kann eine somit einhergehende

herabgesetzte Expression von maturem SP-C beobachtet werden [Bridges, 2003; Wang, 2003]. Da diese Mutation zum einen nur auf einem Allel des Gens gefunden werden konnte und zum anderen auch bei der Mutter eine fibrosierende Lungenerkrankung (Diagnose: DIP) identifiziert wurde, geht man von einem autosomal-dominanten Erbgang aus.

Nach dieser Veröffentlichung sind in jüngster Zeit weitere Formen von familiärer pulmonaler Fibrose bekannt geworden. Mit 25 % ist die wohl häufigste vererbbare Mutation des SP-C-Gens eine Substitution von Threonin für Isoleucin im Codon 73 (I73T) in Exon 3. Erstmals wurde diese Mutation in einer Familie beschrieben, in welcher neun Mitglieder seit ihrer Kindheit an einer chronischen Lungenerkrankung litten. Neben mutierten pro-SP-C-Formen konnte bei diesen Patienten auch eine geringe Menge an aktivem maturen SP-C gefunden werden, was vermuten lässt, dass die Mutation zwar die Prozessierung des proSP-C verändert, aber dennoch die Produktion von maturem SP-C erlaubt [Cameron, 2005].

Eine weitere, in mehreren Generationen einer amerikanischen Familie beschriebene Punktmutation führt zu variabler Ausprägung einer NSIP oder UIP. Aus dem Austausch eines Thymins für ein Adenosin in Exon 5 resultiert hier die Substitution von Leucin durch Glutamin am carboxyterminalen Ende des proSP-C (L188Q). So scheint der intrazelluläre Transport des proSP-Cs vom TransGolgi in die multivesikulären Körperchen der alveolären Typ-II-Zelle gestoppt zu werden. Dem folgt eine intrazelluläre Akkumulation der mutierten SP-C-Variante und über diesen Mechanismus eine Zellschädigung [Thomas, 2002].

Neben diesen oben genannten Beispielen konnten weitere (insgesamt > 35) Mutationen im SP-C-Gen identifiziert werden, die zu variablen Formen einer IIP führen. Eine bedeutende Rolle in der Vererbung von SP-C-Mutationen spielen Mutationen in der ca. 100 Aminosäuren langen carboxyterminalen, sogenannten BRICHOS-Domäne. Während diese ein besonders dramatisches klinisches Bild aufzeigen, welches meist bereits in der Neonatalperiode tödlich endet, verlaufen Formen, die durch Mutationen außerhalb der BRICHOS-Domäne hervorgerufen werden, milder [Sanchez-Pulido, 2002; Beers, 2005].

Gemeinsam ist ihnen allen jedoch der autosomal-dominante Erbgang, der über eine heterozygote Mutation die Produktion veränderter proSP-C-Moleküle hervorruft, welche im endoplasmatischen Retikulum (ER) nicht in der richtigen Weise gefaltet und prozessiert werden können. Dies führt zu einer Akkumulation von SP-C Vorläuferproteinen in der alveolären Typ-II-Zelle und über diesen Mechanismus zur Induktion von ER-Stress und Apoptose [Bridges, 2003]. Zugleich wird die reguläre SP-C-Synthese unterbunden, was in einem Fehlen des maturen SP-Cs resultiert. Fraglich ist jedoch, ob der Mangel an maturem SP-C, die mutierte proSP-C-Variante oder die zytotoxische Akkumulation des proSP-C zur Beeinträchtigung der Surfactant-Funktion führt; des weiteren ist unklar, ob die Störung in der Surfactant-Funktion zur Pathogenese der symptomatischen Krankheiten beiträgt.

Wie bereits beschrieben kann das klinische Bild einer SP-C-Mutation sehr variabel sein; sogar in Familien mit ein- und derselben Mutation können sowohl asymptomatische als auch fatale Verläufe mit tödlichem Ausgang vorkommen. Kinder können ebenso betroffen sein wie Erwachsene. Bei Kindern zeigt sich häufig das Bild einer chronischen Pneumonie oder einer NSIP oder DIP, wohingegen bei Erwachsenen neben diesen Formen die IPF und UIP im Vordergrund stehen. Die Gründe für eine unterschiedliche Penetranz und das Auftreten verschiedener histologischer Formen sind unklar. Diskutiert werden exogene Faktoren (z.B. Umweltfaktoren) und sog. *second hits* wie z.B. virale Infektionen, die den Erkrankungsverlauf beeinflussen können.

Neben diesen familiären SP-C-Mutationen kommen in 55 % der Fälle (bezogen auf die Gesamtheit aller SP-C Mutationen, welche in einer IIP resultieren) auch spontane denovo Mutationen vor [Hamvas, 2004]. Diese führen zu sporadischen Erkrankungen, wobei sich das klinische Bild nicht von dem der familiären Formen unterscheidet.

Symptomatisch zeigt sich eine SP-C-Defizienz mit Dyspnoe, Zyanose oder vermehrtem Sauerstoffbedarf. Auch eine pulmonale Exazerbation nach z.B. einem viralen Infekt kann Merkmal des Mangels an SP-C sein. Histologisch fällt eine Störung der alveolären Homöostase auf, die Veränderungen wie alveoläre Typ-II-Zell-Hyperplasie, interstitielle Verdickungen, Fibrose und eine zerstörte zelluläre Architektur beinhalten. Zudem fallen atypische Einschlüsse in den Lamellarkörperchen und die Aggregation von kleinen Vesikeln in der alveolären Typ-II-Zelle auf, was auf die gestörte SP-C-Prozessierung und die damit verbundenen Veränderungen im intrazellulären Transport zurückzuführen ist [Hamvas, 2004; Stevens, 2005]. Spezifische Therapieoptionen bestehen für die SP-C-Defizienz bisher nicht. Konventionelle Maßnahmen wie Sauerstoff-Therapie und die Gabe von Glukokortikoiden kommen zum Einsatz, sind aber nicht immer wirkungsvoll. Oft bleibt als einzige Therapiemöglichkeit nur die Lungentransplantation.

SP-B-Mutationen

Noch bevor ein Zusammenhang zwischen SP-C-Defizienz und der IIP festgestellt werden konnte, gelang Nogee et al. im Jahr 1993 die erste Demonstration eines anderen genetischen Mechanismus als Ursache einer vererbbaren Lungenerkrankung [Nogee, 1993, 1994]. Die vererbliche SP-B-Defizienz wurde erstmals bei einem reifen Neugeborenen mit klinischen und radiologischen Anzeichen eines Respiratory Distress Syndroms (RDS) identifiziert. Der dramatische therapierefraktäre Verlauf und die Tatsache, dass familienanamnestisch bereits ein vorheriges reifes Neugeborenes der Eltern noch während der Neonatalperiode an einer Lungenerkrankung starb, deuteten auf einen genetischen Hintergrund hin.

Die DNA-Sequenzanalyse des SP-B-Gens des Kindes zeigte eine frameshift-Mutation im Codon 121 in Exon 4, wobei ein Triplett GAA (Guanin-Adenin-Adenin) ein einziges Cytosin ersetzt (sogenannte 121ins2-Mutation). Mit ca. 70 % macht diese Mutation den Großteil aller SP-B-Mutationen aus. Die Übertragungswahrscheinlichkeit liegt bei 1:1000, was das Krankheitsbild der SP-B-Defizienz eher selten macht [Hamvas, 2001].

Neben dieser häufigen Mutation sind über 30 weitere Mutationen im SP-B-Gen bekannt, denen allen eine homozygote Vererbung im Sinne eines autosomal-rezessiven Erbgangs zu Grunde liegt. Übermäßig häufig fallen eine positive Familienanamnese, d.h. bereits erkrankte Familienmitglieder oder Kosanguität auf. Spontane Mutationen konnten bisher nicht identifiziert werden; alle werden über einen autosomal-rezessiven Erbgang mit Homozygotie erworben [Hamvas, 2007]. Resultat der SP-B-Mutationen sind Krankheitsbilder, die durch das partielle oder komplette Fehlen des SP-B hervorgerufen werden. Zudem ist auch das mature SP-C nicht nachzuweisen. Dies ist darin begründet, dass eine ordnungsgemäße proteolytische Prozessierung des SP-Cs an das Vorhandensein von korrekt prozessiertem SP-B gekoppelt ist [Vorbroker, 1995]. Das klinische Bild einer SP-B-Defizienz zeigt sich meist sehr rasch nach der Geburt. Noch vor der 24. Lebensstunde entwickeln die reifen Neugeborenen eine Zyanose und sterben an respiratorischem Versagen [Williams, 1999].

In der Lungenbiopsie und –histologie können folgende Veränderungen beobachtet werden: ein diffuser alveolärer oder bronchialer Schaden, Atelektasen, hyaline Membranen, interstitielle Verdickungen, Hyperplasie der alveolären Typ-II-Zellen und eine Akkumulation von Makrophagen und Proteinen in den Alveoli. Außerdem fällt die Abwesenheit von Lamellarkörperchen und Tubulärem Myelin auf. Während proSP-B und SP-B in der alveolären Typ-II-Zelle oft komplett fehlen, sind immer veränderte proSP-C-Varianten in akkumuliertem Zustand vorhanden [Nogee, 1994, 2000].

Eine effektive Therapie für die SP-B-Defizienz konnte bisher nicht gefunden werden. Ansätze wie Glukokortikoid-Gabe, ECMO (*extracorporal membrane oxygenation*)-Therapie oder die Behandlung mit exogenem Surfactant blieben erfolglos [Hamvas, 1994]. Die fehlende Antwort der Surfactant-Therapie deutet daraufhin, dass nicht nur das Fehlen des SP-Bs die Pathologie hervorruft, sondern auch durch die fehlerhafte Prozessierung des SP-Cs nicht ausreichend oberflächenaktive Surfactantproteine in den Alveolarraum sezerniert werden. Zudem scheint –genau wie bei SP-C-Mutationen- die Akkumulation der proSP-C Proteine eine Rolle in der Entstehung einer Lungenerkrankung zu spielen [Nogee, 2004]. Letztlich bleibt so nur die Möglichkeit einer schnellen Lungentransplantation.

ABCA3-Mutationen

Der ABCA3-Transporter gehört zur Gruppe der "*ATP-binding cassette"* (ABC). Dies sind Membranproteine, welche durch Energiegewinnung aus ATP verschiedenste Moleküle über zelluläre Membranen transportieren.

ABCA3 ist ein aus 1704 Aminosäuren bestehendes Protein, dessen Synthese in den alveolären Typ-II-Zellen erfolgt. Dort ist es an der Grenzmembran der Lamellarkörperchen zu finden. Struktur und Lokalisation des ABCA3-Transporters weisen auf eine potentielle Rolle in der Aufrechterhaltung der intrazellulären Lipidhomöostase hin [Yamano, 2001]. Dies geschieht vermutlich durch den Lipidtransport in oder aus den Lamellarkörperchen.

Mutationen im ABCA3-Gen, welches auf Chromosom 16 lokalisiert ist, wurden erst vor kurzer Zeit als Ursache einer angeborenen Störung im Surfactant-Metabolismus entdeckt. Shulenin et al. sequenzierten im Jahr 2004 die codierenden Regionen des ABCA3-Gens von 21 Neugeborenen mit schwerer neonataler Surfactant-Defizienz, bei denen SP-B- und SP-C-Mutationen bereits ausgeschlossen worden waren. Bei 16 dieser 21 Patienten fanden sie verschiedene nonsense-, frameshift- oder splice-, jedoch keine gemeinsamen übereinstimmenden Mutationen. Auffällig war jedoch, dass hierunter fünf blutsverwandte Familien waren, was einen autosomal-rezessiven Erbgang vermuten lässt [Shulenin, 2004]. Mittlerweile konnten über 70 rezessive Mutationen im ABCA3-Gen identifiziert werden, wovon eine Variante, in der Glutaminsäure durch Valin im Codon 292 ersetzt wird (E292V), mit nur 7 % die wohl häufigste ist. Die Tatsache, dass

eine so große Anzahl an verschiedenen Mutationen auf einem relativ großen Gen vorkommen, lässt darauf schließen, dass die ABCA3-Defizienz die häufigste genetische Ursache für Störungen im Surfactant-Metabolismus ist [Brasch, 2006; Garmany, 2006]. Klinisch zeigt sich eine ABCA3-Defizienz meist in ähnlicher Weise wie eine SP-B-Defizienz. Häufig endet die Krankheit nach dem dritten Lebensmonat tödlich. Jedoch scheinen einige Mutationen zu milderen Krankheitsbildern zu führen, die ähnlich wie bei SP-C-Mutationen chronische Verläufe vorweisen und durch sekundäre genetische oder exogene Faktoren beeinflusst werden können [Hartl, 2005].

Das radiologische Bild einer ABCA3-Defizienz stimmt mit dem eines RDS des Neugeborenen überein. Neben diffusen pulmonalen Infiltraten zeigt sich typischerweise ein Luftbronchogramm. Die Histologie ist besonders durch Hyperplasie der alveolären Typ-II-Zellen, alveoläre Wandverdickung und die Akkumulation von Makrophagen und Proteinen gekennzeichnet, was typische Veränderungen bei einer DIP oder pulmonalen Alveolarproteinose (PAP) sind. Kennzeichen einer ABCA3-Defizienz sind zudem enorm verkleinerte Lamellarkörperchen [Tryka, 2000], was daraufhin deutet, dass dem ABCA3-Transporter eine entscheidende Rolle der Entstehung in der Lamellarkörperchen zukommt. Auch gegen die ABCA3-Defizienz ist bisher noch keine spezifische Therapie bekannt. Ventilation, Surfactant-Gabe und ECMO sind -wie auch bei der SP-B- und SP-C-Defizienz- ineffektiv. So bleibt auch hier nur die Lungentransplantation. Schwierig ist zudem die Identifizierung von Erkrankten mit ABCA3-Mutationen. Im Gegensatz zu den SP-B- und SP-C-Genen ist das ABCA3-Gen so groß, dass es unmöglich ist, bei jedem Patienten das komplette Gen zu sequenzieren. Es bleibt zur Diagnosestellung somit nur das klinische therapierefraktäre Bild in Kombination mit dem typischen elektronenmikroskopischen Muster mit besonders kleinen Lamellarkörperchen.

	SP-B-Defizienz	SP-C-Defizienz	ABCA3-Defizienz
Erkrankungsbeginn	Geburt	Geburt bis Erwachsenenalter	Geburt bis Kindesalter
Vererbung	autosomal rezessiv	autosomal dominant / sporadisch	autosomal rezessiv
Verlauf	tödlich	variabel	meist tödlich, z.T. chronisch
Diagnostik			
 biochemisch (Trachealsekret) 	Fehlen von SP-B und Vorhandensein von unvollständig prozessiertem proSP-C	keine	keine
• genetisch (DNA)	Sequenzierung SP-B Gen	Sequenzierung SP-C Gen	Sequenzierung ABCA3- Gen
 ultrastrukturell (Lungenbiopsie / Elektronenmikroskop) 	keine oder strukturell veränderte Lamellarkörperchen	zytoplasmatische, dichte Aggregate	kleine, dichte Lamellarkörperchen
Behandlung	Lungentransplantation	unterstützend, bei Progression Lungentransplantation	Lungentransplantation

Tab. 4: Vergleich von Surfactant-Defizienz Syndromen (modifiziert nach Hamvas, 2007)

1.3.2. Zusammenhang zwischen Oberflächenspannungsregulation und IPF

Wie bereits in Kapitel 1.1.3. erwähnt, besteht die Hauptaufgabe des pulmonalen Surfactants in der Reduktion der Oberflächenspannung. So wird ein Alveolarkollaps, insbesondere in der endexspiratorischen Phase, vermieden und ein optimaler Gasaustausch gewährleistet. Kommt es nun -wie bei der IPF- zu einer gestörten Komposition und somit zur Fehlfunktion von Surfactant (siehe 1.3.1.), resultiert eine erhöhte Oberflächenspannung. Diese wiederum führt zu einem repetitiven Alveolarkollaps in der exspiratorischen Phase; während der Inspiration kommt es dann angesichts der intrapulmonalen Druckerhöhung erneut zur Wiedereröffnung der Alveolen. Durch diesen ständigen Wechsel entstehen hohe Scherkräfte (*shear stress*) zwischen den die Alveolen auskleidenden Epithelien. Dies könnte zu der für die IPF pathogenetisch bedeutsamen und chronischen Epithelschädigung mit daraus resultierender Wundheilungsstörung beitragen [Selman, 2001].

1.4. Murines Modell einer SP-C Defizienz-induzierten Lungenfibrose

Um die Rolle des SP-Cs in der Lungenfunktion zu erforschen, erzeugten Glasser et al. im Jahr 2001 SP-C defiziente Mäuse (SP-C^{-/-}) und beobachteten deren Entwicklung. Die gezielte Zerstörung des SP-C-Gens in "outbred" Swiss Black Mäusen (d.h. Paarung nicht verwandter Partner mit genetischer Variation) resultierte in milden bis teilweise nicht sichtbaren Veränderungen der Lungenstruktur und –funktion [Glasser, 2001].

Während weder SP-C mRNA noch matures SP-C oder proSP-C in der Lunge der Mäuse entdeckt werden konnte, überlebten die Mäuse und wuchsen normal ohne nachteilige Effekte auf ihre Gesundheit oder die pulmonale Funktion. Histologisch zeigten sich eine normale Morphogenese der zuführenden und peripheren Atemwege, eine normale Verteilung der alveolären Typ-II-Zellen sowie eine normale Anzahl an Surfactant-Lipiden und den restlichen Surfactant-Proteinen (SP-A, SP-B und SP-D). Die einzige Auffälligkeit zeigte sich in der herabgesetzten Hysterese der Druck-Volumenkurve nahe der Endexspiration, was auf eine reduzierte Viskoelastizität der Lunge bei SP-C^{-/-} Mäusen hinweist. Zudem erkannte man 2002, dass SP-C^{-/-} Mäuse mit diesem "herausgezüchteten" genetischen Hintergrund feine Veränderungen der Lungenstruktur zeigen, wenn sie Hyperoxie oder einer SP-B-Reduktion ausgesetzt sind [Ikegami, 2002]. Die SP-C Defizienz allein, d.h. in Abwesenheit eines schädigenden Stimulus, zeigte dagegen keine Auswirkungen auf die Lunge bzw. deren Entwicklung.

Eine folgende Studie von Glasser et al. im Jahr 2003 befasste sich mit einem weiteren Mausstamm, den "inbred" 129/Sv Mäusen (d.h. durch Inzucht gezüchtet; Klone von genetisch identischen Individuen). Bei diesem Stamm führte die gezielte Zerstörung des SP-C-Gens zu einem Lungenphänotyp mit schwerem progressiven Verlauf. Wohingegen bei Geburt noch keine Auffälligkeiten in Lungenstruktur und –funktion erkennbar waren, entwickelten sich ab dem zweiten Lebensmonat emphysematöse Veränderungen, Fibrose und Kollagenablagerungen sowie zelluläre Infiltrate. Histologisch zeigten sich Lipidakkumulationen in Alveolarmakrophagen und alveolären Typ-II-Zellen. Ab dem sechsten bis zwölften Lebensmonat konnte ein deutliches alveoläres Remodeling mit Typ-II-Zell-Hyperplasie, Verschluss von pulmonalen Kapillaren und Myofibroblastentransformation erkannt werden.

Diese gravierenden Veränderungen der SP-C^{-/-} Mäuse des 129/Sv Stammes stehen in großem Kontrast zu den milden Anzeichen einer pulmonalen Störung der SP-C^{-/-} Mäuse

des Swiss Black Stammes. Das lässt vermuten, dass der Stamm scheinbar einen großen Einfluss auf den SP-C^{-/-} Phänotyp und das Ausmaß der SP-C Defizienz besitzt. Diese Annahme und die deutliche Heterogenität der pulmonalen Läsionen ist aber grundsätzlich vereinbar mit den Beobachtungen bei familiären interstitiellen Lungenerkrankung, die durch eine SP-C-Mutation hervorgerufen wurde [Nogee, 2001] (siehe 1.3.).

Während die SP-C-Mutation zwar die Störung der Lunge im Sinne einer interstitiellen Erkrankung beeinflusst, wird eben diese erst durch die Heterogenität in der Schwere der Erkrankung, dem Erkrankungsbeginn und der Geschwindigkeit der Progression charakterisiert. Scheinbar spielen folglich weitere genetische Faktoren oder umweltbedingte Einflüsse eine entscheidende Rolle in der Pathogenese einer SP-C Defizienz-induzierten Lungenfibrose. Den beobachteten Unterschieden in der Schwere der Erkrankung bei den beiden Mausstämmen können demnach ebenso weitere genetische Faktoren oder äußere Einflüsse zu Grunde gelegen haben.

2. Fragestellung

Unter Berücksichtigung des oben genannten Kenntnisstandes zur Rolle des Surfactant-Systems bei der Entstehung einer Idiopathischen Pulmonalen Fibrose (IPF) wurden in der hier vorliegenden Dissertation Versuche zur exogenen Surfactantapplikation (Verneblung von rSP-C Surfactant) an spontan atmenden Mäusen durchgeführt. Ziel war es den Metabolismus des aerosolisierten SP-C Surfactants in gesunden Wildtyp-(C57 Black 6/N) und SP-C knock out (129/Sv) Mäusen zu untersuchen sowie eine mögliche Beeinflussung des Phänotyps von SP-C knock out Mäusen durch chronische rSP-C Verneblung aufzuzeigen.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Gelangt aerosolisiertes Surfactant bei spontan atmenden gesunden Mäusen mittels rSP-C Verneblung über einen Trockenvernebler in die distalen Lungenabschnitte?
- Wie sieht der Metabolismus von exogenem rSP-C im tierexperimentellen Modell der IPF aus? Welche Zellen sind daran beteiligt? Gibt es Unterschiede zwischen gesunden Wildtyp- und SP-C knock out Mäusen?
- Kommt es nach der rSP-C Verneblung zu einer Dissoziation von Protein- und Lipidanteil?
- Kann durch chronische rSP-C Verneblung (2 x/ Woche) der Phänotyp von SP-C knock out Mäusen beeinflusst werden?

3. Materialien und Methoden

3.1. <u>Materialien</u>

3.1.1. Versuchstiere

In den Versuchen zu der hier vorliegenden Dissertation wurden Mäuse des Stammes C57 Black 6/N (Charles River Laboratorien, Sulzfeld) sowie SP-C knock out Mäuse und entsprechende Kontrollen (129/Sv) verwendet, die von Prof. Steven Glasser (Children's Hospital Medical Center Cincinnati, Ohio, USA) zur Verfügung gestellt und im Zentralen Labor der Justus-Liebig-Universität Giessen gezüchtet und gehalten wurden. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Experimente vier bis sechs Wochen alt und besaßen ein Körpergewicht von 18 bis 22 g. Für die Dauer der Experimente wurden die Tiere in dem Tierstall des Zentrums für Innere Medizin der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Giessen gehalten. Dabei befanden sich maximal fünf Tiere zusammen in einem Käfig. Die Fütterung der Mäuse erfolgte ad libitum mit Standardfutter Altromin® und Leitungswasser. Die Beleuchtungsdauer im Tierstall der Universität Giessen beträgt 12 Stunden pro Tag; die Umgebungstemperatur beträgt im Mittel 25 °C.

Die Tierversuche wurden durch den Regierungspräsidenten der Stadt Giessen bewilligt (Aktenzeichen V 54-19 c 20 15 GI 20/10 Nr. 63/2008).

3.1.2. Substanzen

30% Acrylamid/Bis(N,N`-Methylen-bisacrylamid)-Lösung (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Ammoniumheptamolybdat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Ammoniumperoxodisulfat (APS) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Antikörper "*polyclonal swine anti-rabbit immunoglobulins / HRP*" (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark)

Antikörper "polyclonal rabbit anti-human SP-C antibody" (Millipore/Chemicon, Billerica, Massachusetts, USA)

Ascorbinsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Avidin-Biotin Blocking Kit (Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland) BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, USA) Bovine Serum Albumin (BSA) (Roth, Karlsruhe, Deutschland) Bromphenolblau (Merck, Darmstadt, Deutschland) Chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland) ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Amersham, Freiburg) Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) Ethanol 70%, 96%, 99,6% vergällt mit Ethylmethylketon (Stockmeier Chemie, Dillenburg, Deutschland) Ethylendiaminetetraessigsäure di-Natriumsalz (EDTA) (Merck, Darmstadt, Deutschland) Formaldehyd säurefrei \geq 37% (Roth, Karlsruhe, Deutschland) Glycin (Roth, Karlsruhe, Deutschland) HCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) Isospropanol (Merck AG, Darmstadt, Deutschland) Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt, Deutschland) Ketanest[®] (Ketamin-Hydrochlorid 100mg/ml) (Pharmacia & Upjohn GmbH) Lichtgrün (Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland) Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) Methanol (Merck AG, Darmstadt, Deutschland) Methylgrün Counterstain (Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland) molecular weight marker (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) Natriumchlorid-Lösung 0,9% (NaCl) (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) Natrium dodecyl sulfat (SDS) (Merck, Darmstadt, Deutschland) Orange G (Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland) Paraffin Einbettmedium Paraplast Plus[®] (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) Perchlorsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) Phosphate Buffered Saline 10%, 1% (PBS) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) (Merck, Darmstadt, Deutschland) Rotihistol (Xylolersatz) (Roth, Karlsruhe, Deutschland) Rompun[®] (Xylazin-Hydrochlorid) (Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland) Saccharose (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

SP-C-Antikörper "rabbit anti-human mature SP-C antiserum" (Nycomed, vormals Altana Pharma, Konstanz, Deutschland)
TEMED (N,N,N´,N´-tetramethylethylethylendiamin) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Triton x 100 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Trockenmilchpulver (*Skim milk powder*) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Tween 20 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Venticute[®] rSP-C Surfactant (Nycomed GmbH, Konstanz, Deutschland)
Vectastain Elite ABC Kit, rabbit IgG (Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland)
Vector VIP Substrat Kit (Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland)
Wasserstoffperoxid, 30 % (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Wasser, doppelt destilliert (ddH20) (Milli-Q, Water Purification System; Millipore)
Weigertsches- Eisenhämatoxillin A+B (Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland)

3.1.3. <u>Verbrauchsmaterial</u>

Deckgläser 24x36mm (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deuschland) Einweghandschuhe (Ansell Surbiton Surrey, UK) Einwegskalpelle 10, 11, 20 (Feather Saftey Razor Co., Ltd. Medical Divison, Japan) Eppendorfcups 1,5ml, 2ml (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) Falkonröhrchen 15ml, 50ml (Corning Incorporated, USA) Glasspitzenbodenvials Hyperfilm[™] ECL Chemilumineszenzfilm (GE Healthcare Amersham, Freiburg) Immuno 96 MicroWell[™] Platten (Nunc, Langenselbold, Deutschland) Kanüle 26 G BD Microlance 3[®] (Becton Dickinson, Deutschland) Küvetten (Semi-Mikro-Küvetten, Ratiolab GmBH, Dreieich, Deutschland) Pipetten (10µl, 100µl, 1000µl Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

3.1.4. Geräte / Software

Digitaler Objektträgerscanner Mirax-Desk (Zeiss, Göttingen, Deutschland)

Elektrophoresekammer Mini-Protean[®] 3 Cell (Bio Rad, München, Deutschland)

ELISA-Photometer (Tecan Spectra Fluor Plus, Clairsheim, Deutschland)

Gelgießapparatur (Bio Rad, München, Deutschland)

Gewebehomogenisator Ultraturrax

HypercassetteTM (GE Healthcare Amersham, Freiburg)

Imager (Fluor Chem 8900) mit AlphaEase FC Software (Alpha Innotech, San Leandro, CA)

Inkubator VLM EC2 (VLM GmBH, Bielefeld, Deutschland)

Kühlplatte EG 1150 (Leica Microsystems, Nussloch/ Heidelberg, Deutschland)

Paraffinstreckbad HI 1210 (Leica Microsystems, Nussloch/ Heidelberg, Deutschland)

Paraffinausgießstation EG 1140H (Leica Microsystems, Nussloch/ Heidelberg,

Deutschland)

Rotationsmikrotom RM 2165 (Leica Microsystems, Nussloch/ Heidelberg,

Deutschland)

Statistikprogramm GraphPadPrism Version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, USA)

Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio Rad, München)

Trockenvernebler mit Expositionskammer

Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat Model TP 1050 (Leica Microsystems, Nussloch/

Heidelberg, Deutschland)

Vortexgerät (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Uvikon Spektrophotometer 922 (Kontron Instruments, Neufahrn)

Zentrifugen (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland)

3.2. <u>Methoden</u>

3.2.1. Inhalative Applikation von Surfactant

In den durchgeführten Experimenten wurden sowohl gesunde C57 Black 6/N Mäuse als auch SP-C knock out Mäuse des Stammes 129/Sv verwendet. Zum Zeitpunkt der Surfactant-Exposition waren die ausschließlich männlichen Mäuse ca. sechs Wochen alt und besaßen ein Körpergewicht zwischen 18 und 22g. Um möglichst große Nähe zur klinischen Realität zu wahren wurden alle therapeutischen Inhalationen unter Spontanatmung durchgeführt. Hierzu wurden die Mäuse in eine Expositionskammer gesetzt, in welche das rSP-C Surfactant eingeleitet wurde. Die Verneblung erfolgte mit einem eigens für diese Zwecke im Lungenzentrum der Justus-Liebig-Universität Giessen konstruierten Trockenvernebler, der die Generierung ausreichend hoher Surfactantaerosolmengen erlaubte [Ruppert, 2010]. Hierzu wurde das am Boden des Verneblers deponierte rSP-C-Pulver mit Hilfe von synthetischer Luft aufgewirbelt und das Aerosol in den oberen Teil des Verneblers transportiert, von wo aus es über das Verbindungsstück zur Expositionskammer gelangte. Eine spezielle konstruierte und am oberen Verneblerende platzierte Auslassdüse sorgte dafür, dass nur Aerosolpartikel geeigneter Größe (MMAD = $\sim 2 \mu m$) in die Verneblerkammer gelangten. In einem intermittierenden Verfahren (20 sec Verneblung im Wechsel mit 40 sec Pause für insgesamt 60 min.) wurden jeder Maus bei einem Gasdruck von 1 bar ca. 500 mg rSP-C Surfactant/min. angeboten (siehe Abb. 4).




OBEN: Links: die wichtigsten Elemente des Verneblers sind dargestellt. A-Gehäuse, B-Trockenpulver-Reservoir, C-Einlass für das Transportgas, D-innere Düse, E-Verschlusskappe am Austrittsbereich, F-äußere Düse (Zerstäuber).

Rechts: der Ablauf des Verfahrens ist dargestellt. 1. das Transportgas (synthetische Luft) wird mit einem Druck von 1 bar durch den Einlass (C) in das Gehäuse (A) gegeben und abwärts zum Trockenpulver-Reservoir (B) gelenkt, wobei es die erste innere Düse (D) passiert. 2. Das erzeugte Aerosol wird in den oberen Teil des Gehäuses transportiert. 3. Große Partikel werden durch die Kappe umgelenkt und von den kleineren Partikeln, welche den Zerstäuber (F) passieren können, getrennt. Diese verlassen den Vernebler durch die Verschlusskappe am Austrittsbereich (E).

UNTEN: Schematische Darstellung der Expositionskammer. Über ein Verbindungsstück (B) wird das im Trockenvernebler (A) generierte Aerosol in die Expositionskammer (C) geleitet, in welcher sich die Mäuse aufhalten. Den spontan atmenden Mäusen wird in einem intermittierenden Verfahren das rSP-C inhalativ verabreicht; hierzu folgt jeder Verneblungsphase von 20 sec eine Pause von 40 sec. Bei einem Gasdruck von 1 bar werden so ca. 500 µg rSP-C Surfactant/min. in die Kammer vernebelt.

Um den Metabolismus exogen applizierten rSP-C Surfactants untersuchen zu können, wurde bei gesunden C57 Black 6/N Mäusen wie auch SP-C knock out Mäusen die Verneblung an Tag 0 durchgeführt und die Tiere an Tag 1, Tag 2 bzw. Tag 4 getötet und untersucht (siehe Abb. 5). An Tag 0 wurden die Mäuse aus Gruppe 1 und 2 (gesunde Wildtyp-Mäuse und SP-C knock out Mäuse) der rSP-C Surfactant Verneblung mittels Trockenvernebler unterzogen. Mäuse ohne Surfactant-Inhalation dienten als Kontrollen. Von den der Inhalation unterzogenen Mäusen wurden jeweils drei aus diesen Gruppen an Tag 1, Tag 2 und Tag 4 nach der rSP-C Surfactant Verneblung getötet und lavagiert.

Die so gewonnene BALF beider Gruppen wurde bei 300 x g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -25 °C für weitere Untersuchungen eingefroren. Die Lunge wurde zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert, um sie zu einem späteren Zeitpunkt wie in 3.2.4. und 3.2.5. beschrieben auf ihren Proteingehalt hin zu untersuchen. Der Nachweis des 4,2 kDa Surfactantproteins C in der BALF und dem LH erfolgte mittels Western Blot.

Neben dem SP-C-Gehalt wurde auch der Phospholipid-Gehalt (PL-Gehalt) in BALF und LH ermittelt. Dies erfolgte wie in 3.2.10. dargestellt mit Hilfe der colorimetrischen Phosphatbestimmung. Der PL-Gehalt in der BALF konnte direkt in μ g PL/ml angegeben werden; im LH hingegen wurde er auf den Gesamtproteingehalt bezogen, welcher zuvor für jede Probe mittels BCA-Protein-Assay (siehe 3.2.5.) bestimmt worden war.



Abb. 5: Zeitlicher Verlauf der inhalativen Applikation von Surfactant d = lat. dies (Tag)

Weitere SP-C knock out Mäuse erhielten eine chronische SP-C Verneblung (2x/Woche für jeweils 60 min.) über einen Zeitraum von 6 Monaten, um dann histologisch eine mögliche Beeinflussung des Phänotyps erkennen zu können. Hierzu wurden SP-C knock out Mäuse des Stammes 129/Sv für einen Zeitraum von sechs Monaten der rSP-C-Surfactant Inhalation über den Trockenvernebler unterzogen. Die Tiere wurden dabei 2x/Woche mit dem rSP-C-Surfactant Aerosol behandelt. Die Verneblung erfolgte für jeweils 60 min. in einem intermittierenden Verfahren (20 sec Verneblung im Wechsel mit 40 sec Pause). Als Kontrolle dienten SP-C knock out Mäuse, welchen 2x/Woche reine Luft über den Trockenvernebler angeboten wurde.

Nach 6 Monaten wurden die Tiere getötet und ihre Lungen histologisch aufgearbeitet (siehe 3.2.11.). H&E-gefärbte Schnitte wurden mit Hilfe eines digitalen Slide-Scanners wurde mit einer speziellen eingescannt. Anschließend Bildanalyseund Auswertsoftware der Anteil der alveolären Luftfläche bzw. der Gewebefläche an der Gesamtlungenfläche bestimmt, um so die fibrotischen Veränderungen quantitativ erfassen zu können. Neben den Lungen der unbehandelten und der mit Surfactant behandelten SP-C knock out Mäuse wurden zur Kontrolle Lungen von gesunden Wildtyp-Mäusen des Stammes C57 Black 6/N, welche ein normales Luft-Gewebe-Verhältnis aufweisen sollten, untersucht.

3.2.2. Compliance-Bestimmung

Zunächst wurden die Mäuse mit einer Überdosis Ketamin/Xylazin getötet. Die Trachea wurde freipräpariert, quer inzidiert und ein Tubus eingebunden. Daraufhin erfolgte unmittelbar die Umlagerung in einen Ganzkörperplethysmographen (Robertson-Box), in welchem die Tiere über einen Zeitraum von 5 min. volumenkontrolliert, d.h. konstantes Atemvolumen (V) von 200 µl bei einer Frequenz von 20 Atemzügen/min., beatmet wurden. Der pro Atemzug aufzubringende Druck (p) wurde ermittelt. Die sich hieraus ergebende Compliance (C = $\Delta V/\Delta p$) wurde berechnet und auf das Körpergewicht des jeweiligen Tieres bezogen.

3.2.3. Gewinnung von BALF

Mit Hilfe einer Spritze wurde die Lunge über den bereits liegenden Tubus drei Mal mit jeweils 500µl isotoner Natriumchloridlösung lavagiert. Die so gewonnene BALF wurde gepoolt und bei 300 x g für 10 min. bei 4 °C zur Zelldepletion zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -25 °C für weitere Untersuchungen eingefroren. Die Lunge wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für weitere Analysen bei -80 °C gelagert.

3.2.4. Proteinextraktion

Material:

• Lysepuffer: 50 mM Tris

150 mM Natriumchlorid
5 mM EDTA
1% Triton x 100
0,5% Natrium-Deoxycholat
1mM PMSF (frische Zugabe, 1:100 Verdünnung einer 100mM ethanolischen Stammlösung)

Durchführung:

Die zuvor bei -80°C gelagerten Mäuselungen wurden unter Zugabe von flüssigem Stickstoff (-196°C) mit Mörser und Pistill mechanisch homogenisiert. Das fein gepulverte Lungengewebe wurde durch Zugabe des Lysepuffers aufgeschlossen. Nach Inkubation für 1h auf Eis wurden die unlöslichen Zellbestandteile bei 13.000 x g für 10 min. abzentrifugiert und der Überstand mit dem Proteinextrakt in neue Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.5. Proteinbestimmung mittels BCA-Protein-Assay

Material:

Die Proteinkonzentrationsbestimmung in den Lungenhomogenaten (LH) erfolgte mit Hilfe des BCA (*Bicinchoninic acid*)-Protein-Assay (Pierce). Die hierfür benötigten Lösungen setzen sich wie folgt zusammen:

- Lösung A: 1% Dinatriumsalz der Bicinchoninsäure 2% Natriumcarbonat-Monohydrat 0,16% Natriumtartat 0,4% Natriumhydroxid 0,95% Natriumhydrogencarbonat in 1000ml H₂O dest.
- Lösung B: 4% KupfersulfatPentahydrat in 1000ml H₂O dest.

Prinzip:

Diese von Smith et al. beschriebene Methode der Proteinkonzentrationsbestimmung beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{+} -Ionen durch Proteine in alkalischer Lösung. Die entstehenden Cu^{+} -Ionen reagieren im Folgenden mit BCA unter Bildung eines farbigen Komplexes. Die resultierende Farbintensität ist proportional zur enthaltenen Proteinmenge und wird photometrisch bestimmt [Smith, 1985].

Durchführung:

Zunächst wurde eine Standardreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen angelegt. Hierfür wurde BSA (Bovines Serum Albumin) von der höchsten Konzentration von 2 mg/ml bis auf 7,813 µg/ml mit 0,9 %iger Kochsalz-Lösung seriell verdünnt. Als Leerprobe diente 0,9 %ige Kochsalz-Lösung.

Die Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit 0,9 %iger Kochsalz-Lösung verdünnt (20μ l LH + 80μ l NaCl), da die zu erwartende Proteinkonzentration unverdünnt erfahrungsgemäß außerhalb des Messbereichs gelegen hätte.

Je 100 µl der Standards und der Proben wurden als Doppelbestimmung in die Vertiefungen einer 96-well Mikrotiterplatte pipettiert. Je 200 µl der BCA-Lösung (Lösung A und Lösung B im Volumenverhältnis 1:50) wurden zu jedem Standard und jeder Probe gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min. bei 37 °C konnte die Absorption in einem ELISA-Photometer (SPECTRAFluor PLUS, Tecan) bei einer Wellenlänge von 492nm gemessen werden. Anhand der Standardkurve wurde die Proteinkonzentration computergestützt errechnet. Der erhaltene Wert musste anschließend mit dem Verdünnungsfaktor (x5) multipliziert werden.

3.2.6. SDS-Gelelektrophorese

Prinzip:

Das Prinzip der SDS-Gelelektrophorese als elektrophoretisches Trennverfahren für Proteine basiert auf deren Wanderung in einem elektrischen Feld.

Bei der Gelelektrophorese nach Laemmli werden die Proteine in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgrund ihres Molekulargewichts getrennt. Durch Zugabe des negativ geladenen Detergenzes SDS wird die Eigenladung der Proteine aufgehoben, so dass die elektrophoretische Beweglichkeit allein von der Größe des Moleküls abhängt. Die Wanderungsrichtung der dann stark negativ geladenen Proteine beschränkt sich folglich auf die Anode. Als Trägermaterial für die Gelelektrophorese dient ein Polymer aus Acrylamid und Bisacrylamid, welches je nach Acrylamidkonzentration verschiedene Porengrößen aufweisen kann.

Bei der hier durchgeführten Gelelektrophorese durchlaufen die Proteine zunächst ein Sammelgel und dann das eigentliche Trenngel. Die beiden Gele unterscheiden sich sowohl im pH-Wert als auch in der Acrylamidkonzentration. Im Sammelgel mit großer Porenweite und einem schwach sauren pH-Wert (pH 6,8) konzentrieren sich die Proteine aufgrund von Wechselwirkungen mit Pufferionen (Chlorid- und Glycinionen) in einer schmalen Bande, bevor sie im engmaschigen und leicht alkalischen (pH 8,8) Trenngel entsprechend ihrer molekularen Größe aufgetrennt werden.

	Sammelgel 5%	Trenngel 15%
30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid	1,33 ml	5 ml
1,125 M Tris / HCl pH 8,8 (Trenngelpuffer)	-	3,33 ml
0,625 M Tris / HCl pH 6,8 (Sammelgelpuffer)	2 ml	-
H ₂ O	6,57 ml	1,53 ml
10% SDS	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl
10% APS	100 µl	50 µl

Material:

Tab. 5: <u>Gelzusammensetzung für diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese</u> (pro Gel 8x10x0,15 cm)

• 4 x Probenpuffer (nicht reduzierend):	25 ml Sammelgelpuffer
	5 g SDS
	40 ml Glycerin
	Spatelspitze Bromphenolblau
	mit H ₂ O dest. auf 100 ml auffüllen
• 4 x Probenpuffer (reduzierend):	wie 4 x Probenpuffer (nicht reduzierend)
	zusätzlich 10 % Mercaptoethanol

 SDS-Laufpuffer (10x): 30 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS in 1000 ml H₂O dest.

Herstellung des Polyacrylamidgels

Zunächst wurden die mit Ethanol gereinigten Glasplatten mit einem 1,5 mm-Abstandhalter in die vorgesehene Halterung zum Gießen des Gels eingeklemmt.

Nun wurde die Lösung für das Trenngel angesetzt Tab. 5). (siehe Ammoniumperoxodisulfat (APS), das als Reaktionsstarter die Vernetzung von Acrylamid und Bisacrylamid in Gang setzt, wurde erst unmittelbar vor dem Gießen des Gels hinzugegeben. Die Trenngel-Lösung wurde bis ca. 1 cm unterhalb der Probetaschen (zuvor nach Einsetzen des Probenkamms markiert) eingefüllt und mit destilliertem Wasser beschichtet. Nach ca. 10 min. war die Polymerisation erfolgt und das über dem Trenngel stehende Wasser konnte abgegossen werden.

Anschließend wurde die Sammelgel-Lösung bis zum oberen Rand der Gelkassette eingefüllt und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Das Sammelgel polymerisierte ebenfalls in ca. 10 min.

Probenvorbereitung und Durchführung der Elektrophorese

Die bei Raumtemperatur aufgetauten Proben wurden im Volumenverhältnis 3:1 entweder mit einem reduzierenden oder einem nicht reduzierenden 4-fach konzentrierten Probenpuffer gemischt und für 5 min. bei 90°C denaturiert. Im Fall eines reduzierenden Probenpuffers wurden dabei die Disulfidbrücken der Proteine durch β - Mercaptoethanol reduziert. An die nun entfalteten Proteinketten lagerte sich das ebenfalls im Probenpuffer enthaltene SDS, wodurch die Proteine ihre negative Ladung erhielten.

Im Fall der BALF wurden je 24 μ l Probe mit 8 μ l Puffer gemischt, anschließend davon 26,7 μ l (entsprechend 20 μ l BALF) in die Probentasche des Polyacrylamidgels gefüllt. Im Falle von Lungenhomogenaten wurde eine einheitliche Proteinmenge geladen. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die hitzedenaturierten Proben (95°C, 5 min.) für 1 min. bei 13.000 x g zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen.

Zur Größenbestimmung wurde jeweils in der ersten Spur ein Molekulargewichtsmarker mitlaufen gelassen. In der zweiten Spur liefen 100 ng eines SP-C-Standards, um die SP-C-Bande der BALF- und LH-Proben mit Sicherheit identifizieren zu können.

Die elektrophoretische Trennung erfolgte in einer vertikalen Elektrophoresekammer bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA (bei Verwendung von 2 Gelen pro Kammer) und dauerte ca. 3 Stunden. Anschließend wurde das Gel vorsichtig zwischen den Glasplatten herausgelöst und bis zum weiteren Gebrauch in Transferpuffer (siehe 3.2.7.) gelagert.

3.2.7. Western Blotting

Beim Western Blotting werden elektrophoretisch aufgetrennten Proteine durch Anlegen einer Spannung aus dem Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran überführt [Towbin, 1979]. Mit Hilfe von Antikörpern und Enzymsubstraten können Proteine anschließend immunologisch detektiert und quantitativ bestimmt werden.

Prinzip:

Das Blotting nach dem Semi-Dry-Verfahren beruht auf der Methode nach Kyhse-Andersen [Kyhse-Andersen, 1984]. Hierbei wandern die durch das SDS negativ geladenen Proteine innerhalb eines elektrischen Feldes in Richtung Anode, vor welcher sich eine PVDF-Membran befindet, auf die sie transferiert werden. Material:

Transferpuffer: 4,85 g Tris
 22,51 g Glycin
 400 ml Methanol
 in 2000 ml H₂O dest.

Durchführung:

Eine mit Methanol benetzte PVDF-Membran sowie sechs Filterpapiere in Größe des Polyacrylamidgels (8,5 x 6,5 cm) wurden für 30 min. in Transferpuffer getränkt. Anschließend wurde ein Stapel aus drei Filterpapierlagen, gefolgt von der PVDF-Membran, dem Polyacrylamidgel sowie drei weiteren Filterpapierlagen auf die untere Elektrodenplatte (Anode) der Blotting-Apparatur (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad) gelegt und darin befindliche Luftblasen mit einer Glaspipette ausgestrichen. Nachdem die obere Elektrodenplatte aufgesetzt worden war, konnte der Transfer bei einer Stromstärke von 1,5mA/cm² für 90 min. gestartet werden.

Immunodetektion

Um Proteine auf der PVDF-Membran sichtbar zu machen, bedient man sich eines immunologischen Nachweises mittels Antigen-Antikörper-Bindung. Hierbei bindet ein spezifischer Primärantikörper an ein bestimmtes Epitop des Proteins. An die Fc-Region des Primärantikörpers bindet in einem zweiten Schritt ein sekundärer Antikörper, welcher mit einem Enzym namens Meerrettich-Peroxidase (HRP = *horseradish peroxidase*) als spezifischer Marker versehen ist. Diese HRP wird für die nachfolgende Chemilumineszenzreaktion verwendet, indem sie die Umsetzung von Luminal in seine oxidierte Form katalysiert. Das sich nun in einem angeregten Zustand befindliche Luminal erreicht durch Lichtemission wieder seinen Grundzustand, wobei es zur Schwärzung eines aufgelegten Röntgenfilms führt.

Material:

• TBST-Waschpuffer (10x): 0,5 M Tris/HCl

0,5 M Natriumchlorid 1% Tween 20 in 2000 ml H₂O dest., pH 7,5

• Blockierungspuffer:	5% Magermilchpulver		
	in TBS	T-Waschpuffe	er
• Entwicklerlösungen A und	1 B:	A: ECL Plus s buffer B: Stock Acrie	substrate solution containing tris dan solution in Dioxane and Ethanol
• Entwicklerlösung:		G138i; AGFA	Δ.
		für 5 1:	$3,5 1 H_2O$ dest.
			1,25 l Lösung A
			0,125 l Lösung B
			0,125 l Lösung C
• Fixierlösung:		G334i; AGFA	
		für 5 l:	$31 H_2O$ dest.
			11 Lösung A
			0,25 l Lösung B

Durchführung:

Blot-Transfer Nach wurde die Bahn, auf welcher der dem erste Molekulargewichtsmarker gelaufen war, abgeschnitten und die Banden mit einer Amido-Schwarz-Lösung angefärbt. Die restliche Membran wurde zur Blockierung der freien Bindungsstellen für 2 h in Blocklösung (5% Magermichpulver in TBST-Puffer) gegeben. Anschließend erfolgte die eigentliche Nachweisreaktion, indem die Membran mit der Erstantikörper-Lösung (anti-mature SP-C, 1:1000 mit Blockierungspuffer verdünnt) inkubiert wurde. Hierzu wurde die Membran - umgeben von der Antikörper-Lösung- in eine Folie eingeschweißt und über Nacht bei 4°C auf einen Schüttler gelegt. Es folgten drei jeweils 15 minütige Waschschritte in TBST-Waschpuffer, um restliche ungebundene Antikörper von der Membran zu entfernen.

Anschließend wurde die Membran -wiederum eingeschweißt- mit der im Verhältnis 1:2000 verdünnten Zweitantikörper-Lösung (*polyclonal swine anti-rabbit immunoglobulins / HRP*, Dako) inkubiert. Dieses erfolgte für zwei Stunden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur. Nach drei weiteren 15 minütigen Waschschritten in TBST-Waschpuffer folgte die Zugabe des Chemilumineszenzsubstrates zur Sichtbarmachung der SP-C-Banden. Die beiden Entwicklerlösungen A und B (Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare) wurden im Verhältnis 1:50 gemischt, gleichmäßig auf die Membran pipettiert und für 5 min. inkubiert. In eine Filmkassette (HypercassetteTM, Amersham Biosciences) wurde eine zugeschnittener Röntgenfilm aufgelegt und belichtet. Nach einer Expositionszeit von zunächst 2 min. wurde der Röntgenfilm entwickelt, indem er für wenige Sekunden in die Entwicklerlösung getaucht, anschließend in Wasser abgewaschen und zum Fixieren der Schwärzung in die Fixierlösung gelegt wurde. Falls die SP-C-Banden nicht oder nur schwach sichtbar waren, wurde die Expositionszeit von 2 min. schrittweise auf max. 2 h erhöht.

3.2.8. Densitometrie

Zur Quantifizierung der Proteinmenge in den Western Blots wurde eine Dichtemessung der Banden mit Hilfe der AlphaEase FC (Fluor Chem 8900) Software von Alpha Innotech vorgenommen. Zunächst wurden die einzelnen Western Blots digitalisiert und die zu bestimmenden Banden markiert. Das Programm bestimmt das Integral aus der Dichte der Bildpunkte über der festgelegten Fläche und korrigiert diesen Wert für die Bildpunkte des Hintergrundes. Je intensiver und größer eine Bande ist, desto höher ist auch der ermittelte Wert. Nach Ermittlung der Intensitäten der spezifischen Banden wurden aus der Gesamtintensität aller Banden die relativen Anteile der Einzelbanden errechnet. Aus mehrfach verwendeten Proben wurde jeweils der Mittelwert bestimmt und graphisch mittels Microsoft Excel dargestellt.

3.2.9. Lipidextraktion nach Bligh & Dyer

Prinzip:

Die Extraktion resuspendierter Lipide aus der BALF bzw. aus dem Lungengewebe wurde mittels einer Zweiphasenextraktion mit Chloroform und Methanol nach der Methode von Bligh & Dyer durchgeführt [Bligh/Dyer, 1959]. Ziel war es die Phospholipide bzw. das darin organisch gebundene Phosphor von anorganischem Phosphor -z.B. aus Phosphat-haltigen Puffersalzen- zu trennen, um es bei einer nachfolgenden colorimetrischen Phosphatbestimmung nachweisen zu können.

Durchführung:

Die bei -80°C gelagerten BALF- und LH-Proben wurden bei Zimmertemperatur aufgetaut. In einer Doppelbestimmung wurden je 200 µl BALF bzw. 20 µl LH in ein Glas-Spitzenbodenvial pipettiert und auf jeweils 800µl mit 0,9 %iger Kochsalz-Lösung aufgefüllt. Anschließend wurde jeder Ansatz mit zwei Teilen Methanol (2 ml) und einem Teil Chloroform (1 ml) versetzt. Die entstandene einphasige Lösung wurde innerhalb von 30 min. mehrfach gevortext. Nachdem im folgenden zweiten Schritt je ein Teil Chloroform (1 ml) und ein Teil 0,9% ige Kochsalz-Lösung (1 ml) hinzugegeben wurden, wurde der Ansatz nochmals kräftig gevortext (siehe Tab. 6) und zur vollständigen Phasentrennung über Nacht bei 4°C gelagert.

Die untere Chloroform-haltige Phase wurde mittels einer Pasteurpipette von der oberen, wässrigen Phase getrennt und in ein neues Reagenzglas überführt. Bei 37°C wurde die Chloroform-Phase anschließend unter Stickstoff getrocknet.

	Probe / 0,9 % NaCl	Methanol	Chloroform
1. Schritt	0,8 ml	2 ml	1 ml
30 min.; Vortexen			
2. Schritt	1 ml	-	1 ml
Vortexen; lagern oder zentrifugieren zur Phasentrennung			
Summe Volumina	1,8 ml	2 ml	2 ml

Tab. 6: Volumenanteile der Reagenzien bei der Lipidextraktion nach Bligh & Dyer

3.2.10. Colorimetrische Phosphatbestimmung

Ziel der der Colorimetrischen Phosphatbestimmung in Anlehnung an das Verfahren nach Rouser et al. ist die quantitative Bestimmung des Phospholipidgehalts [Rouser, 1970]. Zunächst wurde eine Standardreihe mit Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) in fünf aufsteigenden Konzentrationen von 0,2 μ g bis 5 μ g Phosphor entsprechend 4,7 μ g bis 120 μ g Phospholipid in einer Doppelbestimmung erstellt. Hierfür wurden je 2, 5, 10, 20 und 50 μ l der Kaliumdihydrogenat-Lösung in Reagenzgläser pipettiert. Sowohl die Standards als auch die nach Lipidextraktion im Stickstoffstrom getrockneten Phospholipide der Proben wurden mit 200 μ l 70 %iger Perchlorsäure versetzt und zur Freisetzung der Phosphatgruppe für 60 min. bei 200°C in einem Thermoblock verkocht. Nach dem Abkühlen wurde jedem Ansatz je 1 ml 4,6 mM Ammoniumheptamolybdat hinzugefügt. Es folgte die Reduktion zum Farbkomplex durch Zugabe von 20 μ l 650 mM Ascorbinsäure und eine weitere Inkubation für 60 min. bei 60°C im Trockenschrank. Die Messung der Absorption der Standards und der Proben erfolgte mit einem Spektralphotometer (Uvikon Spektrophotometer 922, Kontron Instruments) bei einer Wellenlänge von 698 nm. Nach Abzug des Leerwertes konnten die Proben über eine lineare Regression aus den Werten der ermittelten Standards ausgewertet werden. Zur Berechnung des Phospholipidgehalts wurde das relative Molekulargewicht von DPPC (M(r)=734) benutzt.

3.2.11. Histologische Aufarbeitung der Lunge

3.2.11.1. Einbettung des Gewebes

Material:

PBS: 8,0 g Natriumchlorid (NaCl)
0,2 g Kaliumchlorid (KCl)
1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)
0,24 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)
in 1000 ml H₂O dest.

Nachdem die Lungen mit 4%-igem Formalin unter einem hydrostatischen Druck von 20cm Wassersäule gefüllt und fixiert worden waren, wurden sie 24h später in Einbettkassetten überführt und in PBS-Puffer eingelegt. Die in PBS eingelegten Lungen wurden anschließend über Nacht im Routineprogramm des geschlossenen Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomaten (Model TP 1050, Leica) entwässert. Anschließend wurden die Lungen in Paraffin eingegossen (Paraffinausgießstation EG 1140H, Leica). Nach dem Aushärten der Lungen auf einer Kühlplatte (EG 1150, Leica) wurden die Lungen parallel zur Facies diaphragmatica mit einem Trimmesser (Rotationsmikrotom 2165 vollautomatisch, Leica) in jeweils 3µm dicke Scheiben geschnitten. Mit Hilfe eines Wasserstreckbades wurden die 3µm dicken Lungenschnitte daraufhin auf einen Objektträger aufgezogen. Die fertigen Objektträger konnten nun den verschiedenen Färbungen zugeführt werden.

3.2.11.2. Hämatoxillin-Eosin (H&E) – Färbung

Die Hämatooxillin-Eosin (H&E) - Färbung erzielt unterschiedliche Färbungen für verschiedene Gewebearten (siehe Tab. 7). So färben sich Zellkerne blau bis violett; Zytoplasmabestandteile sowie Kollagenfasern hingegen rot. Diese Färbemethode verläuft nach einem genau festgelegten Färbeschema, das in Tab. 8 wiedergegeben ist. Demnach erfolgte zunächst die Entparaffinierung durch Rotihistol[®], bevor die Lungenschnitte mittels absteigender Alkoholreihe rehydriert wurden. Nach der eigentlichen Färbung und Dehydrierung durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol wurden die Schnitte eingedeckt.

Färbeergebnis

Zellkerne	blau bis violett
Zytoplasma	rot
Erythrozyten	rot
Bindegewebe / Kollagenfasern	rot

Tab. 7: Färbeergebnis für Gewebe und Zellorganellen nach erfolgter H&E-Färbung

Färbeanleitung

10 min.	Rotihistol®
10 min.	Rotihistol®
5 min.	Ethanol absolut 99,6%
5 min.	Ethanol absolut 99,6%
5 min.	Ethanol 96%
5 min.	Ethanol 70%
10 min.	Gemisch nach Weigert (Weigertsches-Eisenhämatoxillin A+B)
5 min.	Bläuen unter fließendem lauwarmen Leitungswasser
10 min.	Ponceau Säurefuchsin
1 min.	Mehrmals in Essigsäure 1% eintauchen bis sich keine Farbschlieren
	mehr lösen
5 min.	Orange G Lösung
1 min.	Mehrmals in Essigsäure 1% eintauchen bis sich keine Farbschlieren
	mehr lösen
20 min.	Lichtgrün
5 min.	Ethanol absolut 99,6%
5 min.	Ethanol absolut 99,6%
5 min.	Rotihistol [®]
5 min.	Rotihistol [®]
5 min.	Xylol [®]
Eindecken mit Pertex	

Tab. 8: Färbeanleitung für Hämatoxillin-Eosin-Färbung

Gezeigt wird die Färbedauer jedes einzelnen Schrittes und die jeweils benötigten Reagenzien.

3.2.11.3. Auswertung der gefärbten Schnitte

Die Schnitte aller Lungen wurden mit Hilfe eines digitalen Slide-Scanners (Mirax-Scan, Zeiss) eingescannt. Anschließend wurde der Anteil der alveolären Luftfläche an der Gesamtlungenfläche mit einer Bildanalyse- und Auswertsoftware (Axiovision, Zeiss) quantifiziert.

3.2.11.4. Immunhistochemie

Der Nachweis bestimmter Proteine (hier: SP-C) gelingt mit Hilfe einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Der Antikörper ist mit einem Sekundärantikörper gekoppelt, durch welchen er mittels Färbung sichtbar gemacht werden kann. Die einzelnen Schritte und Inkubationszeiten sind in Tab. 9 angegeben.

Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte		
15 min.	20 ml 30 % H ₂ O ₂ in 180 ml MetOH	Block endogener Peroxidasen
3 x 5 min.	PBS	waschen
10 min.	Trypsin Digest all [®] 1:3	Proteolytische Demaskierung
3 x 5 min.	PBS	waschen
60 min.	10 % BSA	Block unspezifischer Bindungen
15 min.	Avidin Blocking Reagenz	Block endogenen Avidins
3 x 5 min.	PBS	waschen
15 min.	Biotin Blocking Reagenz	Block endogenen Biotins
3 x 15 min.	PBS	waschen
30 min.	Primärantikörper anti-SP-C	polyclonal anti-SP-C antibody
3 x 15 min.	PBS	waschen
20 min.	Biotinylierter Sekundärantikörper	Vectastain ABC Elite Kit
3 x 5 min.	PBS	waschen
20 min.	ABC-Reagenz	Vectastain ABC Elite Kit
90 sec.	Vector VIP [®]	Violettes Chromogen
3 x 15 min.	PBS	waschen
2 min.	Methylgrün	Gegenfärbung der Zellkerne
Dehydrieren und Eindecken der Gewebeschnitte mit Pertex®		

Tab. 9: Protokoll zur immunhistochemischen Färbung von SP-C

3.2.12. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung beim Vergleich mehrerer Gruppen miteinander (keine Surfactantbehandlung (Kontrolle) vs. Surfactantbehandlung sowie Vergleich der mit Surfactant behandelten Gruppen) erfolgte mittels ANOVA-Analyse (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's-Post-Test) unter Verwendung des Statistikprogramms GraphPadPrism Version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, USA). Die Signifikanzniveaus sind mit * (p<0.05), ** (p<0.001) und *** (p<0.0001) angegeben. Für den Vergleich der SP-C Gehalte im zeitlichen Verlauf wurde der jeweils höchst ermittelte Wert (Tag 1 nach Verneblung) als 100% und die anderen Werte dazu in Relation gesetzt.

4. Ergebnisse

4.1. <u>rSP-C Surfactant Verneblung an spontan atmenden Mäusen</u> <u>mittels Trockenvernebler</u>

4.1.1. Pulmonale Deposition von SP-C

Zunächst wurde untersucht, ob das mittels Trockenvernebler generierte Surfactant-Aerosol die distalen Lungenabschnitte von spontan atmenden Mäusen erreicht. Hierzu wurden Wildtyp-Mäuse des Stammes C57 Black 6/N verwendet. Die Tiere erhielten das rSP-C Surfactant-Aerosol über einen unterschiedlich langen Zeitraum mit Hilfe des Trockenverneblers (siehe 3.2.1.) in einem intermittierenden Verfahren (20 sec Verneblung im Wechsel mit 40 sec Pause). Als Kontrollgruppe dienten Wildtyp-Mäuse, die keiner rSP-C-Surfactant-Behandlung unterzogen wurden.

Bei den gesunden spontan atmenden Mäusen konnte nach einer Verneblungszeit von 30 min. nahezu eine Verdreifachung des Gehalts an SP-C in der BALF gemessen werden. Nach 60 min. war nur noch eine geringe weitere Zunahme des SP-C-Gehalts auszumachen, welche im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen jedoch deutlich signifikant war. Im Lungengewebe (Lungenhomogenat, LH) hingegen konnte bereits bei unbehandelten Tieren ein hoher Gehalt an SP-C erfasst werden. Nach 30 bzw. 60 min. Verneblung stieg der SP-C Gehalt im LH im Vergleich zum Gehalt in der BALF nur wenig, jedoch signifikant, an (siehe Abb. 6). Begleitend konnte eine leichte Verbesserung der Compliance von 6,0 ml/kPa/kg auf 7,0 ml/kPa/kg beobachtet werden (siehe Abb. 7).



Abb. 6: <u>SP-C Gehalt nach Surfactant Verneblung an spontan atmenden Mäusen in</u> <u>Abhängigkeit von der Verneblungsdauer</u>

SP-C-Gehalt in der BALF (links) und im LH (rechts) nach rSP-C-Surfactant Verneblung an spontan atmenden gesunden Wildtyp-Mäusen (n=8). Die Verneblung erfolgte mit Hilfe des Trockenverneblers im intermittierenden Verfahren (20 sec Verneblung im Wechsel mit 40 sec Pause) für 30 bzw. 60 min. Kontrollgruppen (n=8) ohne Surfactant-Verneblung. Alle Daten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler. **p < 0.001 und ***p < 0.0001 verglichen mit unbehandelter Kontrolle. Für die sonstigen Parameter konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden.



Abb. 7: <u>Compliance nach Surfactant Verneblung an spontan atmenden Mäusen in</u> <u>Abhängigkeit von der Verneblungsdauer</u>

Compliance nach rSP-C-Surfactant Verneblung an spontan atmenden gesunden Wildtyp-Mäusen (n=8). Die Verneblung erfolgte mit Hilfe des Trockenverneblers im intermittierenden Verfahren (20 sec Verneblung im Wechsel mit 40 sec Pause) für 30 bzw. 60 min. Kontrollgruppe ohne Surfactant-Verneblung (n=8). Alle Daten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler. Es konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

4.1.2. <u>Pulmonale Deposition von Phospholipiden</u>

Um eine evtl. Dissoziation zwischen Protein- und Lipidanteil des vernebelten Surfactants festzustellen, wurde neben dem Gehalt an SP-C in BALF und LH auch der Gehalt an Phospholipiden (PL) quantitativ bestimmt.

Bei den gesunden spontan atmenden Mäusen kam es nach der 60-minütigen Verneblung zu einem signifikanten Anstieg des PL-Gehalts um nahezu 30 % in der BALF sowie zu einem ca. 15 %-igen Anstieg im LH (siehe Abb. 8).



Abb. 8: <u>PL-Gehalt nach Surfactant Verneblung an spontan atmenden Mäusen in</u> <u>Abhängigkeit von der Verneblungsdauer</u>

PL-Gehalt in der BALF (links) und den LH (rechts) nach rSP-C Verneblung an spontan atmenden gesunden Wildtyp-Mäusen (n=8). Die Verneblung erfolgte mit Hilfe des Trockenverneblers im intermittierenden Verfahren (20 sec Verneblung im Wechsel mit 40 sec Pause) für 30 bzw. 60 min. Kontrollgruppen (n=8) ohne Surfactant-Verneblung. Alle Daten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler. ***p < 0.0001 verglichen mit unbehandelter Kontrolle. Für die sonstigen Parameter konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

4.2. <u>Kinetik und Metabolismus von exogen appliziertem rSP-C</u> <u>Surfactant nach Verneblung an spontan atmenden Mäusen</u>

Zur Ermittlung des Metabolismus von exogen appliziertem Surfactant und dessen Kinetik wurden neben gesunden Wildtyp-Mäusen (C57 Black 6/N) auch SP-C knock out Mäuse (129/Sv) verwendet.

Gruppe 1:gesunde C57 Black 6/N MäuseGruppe 2:SP-C knock out Mäuse des Stammes 129/Sv

4.2.1. C57 Black 6/N Mäuse

Bei gesunden Wildtyp-Mäusen konnte auf Grund der vorhandenen Synthese von endogenem Surfactant auch bei unbehandelten Tieren ein "physiologischer" Gehalt an SP-C in der BALF dargestellt werden. Ausgehend von diesem Basalspiegel stieg der SP-C-Gehalt an Tag 1 nach rSP-C-Surfactant Verneblung signifikant um das nahezu Fünffache an. An Tag 2 konnte ein starker ebenfalls signifikanter Abfall des SP-C-Gehalts auf ca. 10 % des an Tag 1 gemessenen Maximalwertes festgestellt werden; an Tag 4 kam es zu einer weiteren signifikanten Abnahme von SP-C in der BALF.

Ähnlich verhielt es sich mit dem SP-C-Gehalt im LH. Auch hier zeigte sich an Tag 1 nach Verneblung eine signifikante nahezu Verfünffachung des Ausgangswerts (endogener SP-C Spiegel). Bereits an Tag 2 fiel der SP-C-Gehalt im LH auf ca. 40 % des an Tag 1 gemessenen Maximalwerts ab. An Tag 4 war auch hier eine weitere signifikante Reduktion auf ca. 17 % zu verzeichnen (siehe Abb. 9).





Abb. 9: <u>SP-C-Gehalt in BALF und LH von gesunden Wildtyp Mäusen nach Surfactant</u> <u>Verneblung im zeitlichen Verlauf</u>

SP-C-Gehalt in der BALF (oberes Diagramm) und im LH (unteres Diagramm) bei spontan atmenden gesunden Wildtyp Mäusen nach rSP-C-Surfactant Verneblung mit Hilfe des Trockenverneblers im intermittierenden Verfahren (20 sec Verneblung im Wechsel mit 40 sec Pause) für 60 min.. An d1, d2, d4 nach Verneblung wurde eine BALF durchgeführt und die Lungen entnommen. Die Bestimmung des SP-C Gehalts erfolgte mittels Western Blot (unten – oberer Blot: BALF, unterer Blot: LH) und densitometrischer Auswertung. Dabei wurde der an Tag 1 nach Verneblung ermittelte höchste SP-C Gehalt als Referenz gleich 100 % gesetzt. n=3/Zeitpunkt. Alle Daten sind angegeben als Mittelwert ± Standardfehler. *p < 0.05 und verglichen mit unbehandelter Kontrolle. *p < 0.05 und *### p < 0.0001 verglichen mit SP-C Gehalt an d1.

Auch bei den Phospolipiden konnte in der BALF an Tag 1 nach Verneblung ein signifikanter Anstieg des PL-Gehalts um ca. 50 % gegenüber nicht behandelten Mäusen beobachtet werden. Im weiteren Verlauf sank der PL-Gehalt ab, bis an Tag 4 wieder das Ausgangsniveau erreicht war.

Im LH hingegen kam es nach Surfactant Verneblung zu einem geringen Abfall des PL-Gehalts. So konnten bei den Mäusen ohne Surfactant Verneblung 0,35 μ g PL/ μ g Gesamtprotein nachgewiesen werden; an Tag 1, Tag 2 und Tag 4 lag der Gehalt auf etwa gleichem Niveau zwischen 0,28 und 0,3 μ g PL/ μ g Gesamtprotein (siehe Abb. 10).



Abb. 10: <u>PL-Gehalt in BALF und LH von spontan atmenden Wildtyp Mäusen nach</u> <u>Surfactant Verneblung im zeitlichen Verlauf</u>

PL-Gehalt in der BALF (oben) und im LH (unten) bei gesunden Wildtyp Mäusen nach rSP-C Verneblung mit Hilfe des Trockenverneblers im intermittierenden Verfahren (20 sec Verneblung im Wechsel mit 40 sec Pause) für 60 min.; n=3/Zeitpunkt. Der PL-Gehalt an d 1, d 2 und d 4 nach Verneblung wurde mittels colorimetrischem Phosphat-Assay bestimmt. Alle Daten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler. *p < 0.05 verglichen mit unbehandelter Kontrolle. [#]p < 0.05 verglichen mit PL-Gehalt an d 1.

4.2.2. SP-C knock out Mäuse

Bei den SP-C knock out Mäusen war an Tag 1 nach der Surfactant-Verneblung ein massiver signifikanter Anstieg des rSP-C-Gehalts zu detektieren. Auf Grund des Fehlens von endogen produziertem SP-C wurde dieser höchst ermittelte Wert mit 100% als Referenz gesetzt, um die folgenden Werte beurteilen zu können. So fiel der SP-C-Gehalt in der BALF an Tag 2 um ca. 50 % ab; an Tag 4 war noch ein Drittel des rSP-C-Gehalts von Tag 1 vorhanden, wobei in beiden Fällen eine statistische Signifikanz vorliegt.

Auch bei den SP-C knock out Mäusen konnte ein paralleler Verlauf des SP-C-Gehalts in der BALF und dem LH gesehen werden. So wurde auch im LH ausgehend von dem Maximum des SP-C-Gehalts an Tag 1 eine signifikante Abnahme auf 40 bzw. 30 % an Tag 2 bzw. Tag 4 gemessen (siehe Abb. 11).







Abb. 11: <u>SP-C-Gehalt in BALF und LH von SP-C knock out Mäusen nach Surfactant</u> <u>Verneblung im zeitlichen Verlauf</u>

SP-C-Gehalt in der BALF (oberes Diagramm) und im LH (unteres Diagramm) bei spontan atmenden SP-C knock out Mäusen nach rSP-C-Surfactant Verneblung mit Hilfe des Trockenverneblers im intermittierenden Verfahren (20 sec Verneblung im Wechsel mit 40 sec Pause) für 60 min. An d 1, d 2 und d 4 nach Verneblung wurde ein BALF durchgeführt und die Lungen entnommen. Die Bestimmung des SP-C Gehalts erfolgte mittels Western Blot (unten – oberer Blot: BALF, unterer Blot: LH) und densitometrischer Auswertung. Aufgrund des Fehlens von endogenem SP-C wurde dabei der an Tag 1 nach Verneblung ermittelte höchste SP-C Gehalt als Referenz gleich 100 % gesetzt. n=3/Zeitpunkt. Alle Daten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler. *p < 0.05 und ***p < 0.0001 verglichen mit unbehandelter Kontrolle. *p < 0.05 verglichen mit SP-C Gehalt an d1.

Auch bei den unbehandelten SP-C knock out Mäusen konnte in der BALF und dem LH ein recht hoher Gehalt an PL nachgewiesen werden. Von diesem ausgehend stieg der PL-Gehalt in der BALF an Tag 1 nach Verneblung um ca. 20 % an. Auch an Tag 2 konnten noch vermehrt PL detektiert werden, woraufhin an Tag 4 nach Surfactant Inhalation der PL-Gehalt wieder auf das Ausgangsniveau abfiel.

Im LH wurde ausgehend vom "physiologischen" PL-Gehalt der SP-C knock out Mäuse keine signifikante Veränderung der PL beobachtet. So schwankte der PL-Gehalt von unbehandelten Mäusen bis hin zu Mäusen an Tag 4 nach Surfactant Verneblung um Werte zwischen 0,22 und 0,25 µg PL/µg Gesamtprotein/ml (siehe Abb. 12).



Abb. 12: <u>PL-Gehalt in BALF und LH von SP-C knock out Mäusen nach Surfactant</u> <u>Verneblung im zeitlichen Verlauf</u>

PL-Gehalt in der BALF (oben) und im LH (unten) bei SP-C knock out Mäusen nach rSP-C Verneblung mit Hilfe des Trockenverneblers im intermittierenden Verfahren (20 sec Verneblung im Wechsel mit 40 sec Pause) für 60 min.; n=3/Zeitpunkt. Der PL-Gehalt an d 1, d 2 und d 4 nach Verneblung wurde mittels colorimetrischem Phosphat-Assay bestimmt. Alle Daten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler. Es konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

4.3. <u>Aufnahme von exogen synthetisiertem Surfactant</u> <u>in alveoläre Typ-II-Zellen</u>

Die Untersuchungen zur Veränderung des SP-C-Gehalts in BALF und LH zum zeitlichen Verlauf zeigten, dass sowohl bei gesunden Wildtyp-Mäusen als auch bei SP-C knock out Mäusen jeweils an Tag 1 nach Surfactant-Verneblung ein maximaler SP-C-Spiegel erreicht werden konnte. Um die Frage zu klären, durch welche Zellen exogen applizierter Surfactant aufgenommen wird bzw. ob auch alveoläre Typ-II-Zellen am Metabolismus des rSP-C beteiligt sind, wurden die Lungen von SP-C knock out Mäusen 24 Stunden nach der rSP-C Surfactant-Verneblung (60 min. im intermittierenden Verfahren wie in 3.2.1. erläutert) immunhistochemisch aufarbeitet. Als Kontrollgruppe dienten mit Luft vernebelte SP-C knock out Mäuse.

Die immunohistochemische Analyse der mit rSP-C-Surfactant behandelten Mäuse zeigte ein deutliches Antigensignal in Bronchialzellen, in alveolären Typ-II-Zellen sowie in den Alveolarmakrophagen. Dies deutet daraufhin, dass das rSP-C-Aerosol auch die distalen Lungenabschnitte erreicht und 24 Stunden nach Verneblung im Lungenparenchym nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu konnte SP-C in der Kontrollgruppe nicht immunohistochemisch nachgewiesen werden (siehe Abb. 13) a) SP-C knock out Maus; keine Surfactant Verneblung



40x

b) SP-C knock out Maus; Surfactant Verneblung





Abb. 13: Immunhistochemische Analyse von SP-C knock out Mäusen nach rSP-C-Surfactant Verneblung

24 h nach Surfactant Verneblung wurde die Lunge entnommen, mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. An 3 μ m dicken Schnitten wurde das SP-C immunhistochemisch (rotes Signal) dargestellt.

- a) Lungengewebe einer SP-C knock out Maus nach Luft-Verneblung. Es ist kein SP-C nachweisbar.
- b) Lungengewebe einer SP-C knock out Maus 24 h nach rSP-C Surfactant Verneblung. Deutliche Antigensignale sind in Bronchialzellen, in alveolären Typ-II-Zellen sowie in den Makrophagen sichtbar.

4.4. Chronische Surfactant Verneblung an SP-C knock out Mäusen

Nachdem in den vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, dass das aerosolisierte Surfactant bis in die distalen Lungenabschnitte vordringen und einen therapeutischen Effekt erzielen sowie von alveolären Typ-II-Zellen aufgenommen werden kann, sollte nun die Frage geklärt werden, ob der Phänotyp von SP-C knock out Mäusen durch eine chronische Behandlung mit rSP-C-Surfactant korrigiert werden kann.

Die H&E-gefärbten histologischen Schnittbilder der Lungen von den 2 x wöchentlich mit rSP-C-Surfactant behandelten Mäusen zeigten keine deutlichen Veränderungen im Aufbau der Lungenstruktur gegenüber der Kontrollgruppe der unbehandelten SP-C knock out Mäuse. Vereinzelt konnten in allen Lungen kleine verdichtete Herde nachgewiesen werden (siehe Abb. 14). Verglichen mit Lungen von gesunden Wildtyp-Tieren waren die zu beobachteten Veränderungen der Lungenstruktur bei SP-C knock out Tieren wider Erwarten aber nur geringgradig. Die Quantifizierung über die Bestimmung des prozentualen alveolären Luftanteils an der Gesamtlungenfläche erbrachte keinen signifikanten Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten SP-C knock out Mäusen sowie zwischen SP-C knock out Mäusen und der Wildtyp-Kontrollgruppe. Mit einem 60 %igen Luftanteil bewegten sich beide Gruppen in einem Bereich, welcher auch bei gesunden Wildtyp Mäusen als Norm angesehen werden kann (siehe Abb. 15).

a) SP-C knock out Maus; 2 x wöchentlich Surfactant Verneblung



















b) SP-C knock out Maus; keine Surfactant Verneblung






Abb. 14: <u>Histologische Analyse von SP-C knock out Mäusen nach chronischer</u> <u>Surfactant Verneblung</u>

- a) Lungen von SP-C knock out Mäusen nach 6 monatiger rSP-C-Surfactant Verneblung (2 x wöchentlich für 60 min. im intermittierenden Verfahren); n=8.
- b) Lungen von SP-C knock out Mäusen nach 6 Monaten ohne rSP-C-Surfactant Verneblung; n=8.



Abb. 15: <u>Prozentualer Anteil der alveolären Luftfläche an der Gesamtlungenfläche von</u> <u>SP-C knock out Mäusen nach chronischer Surfactantapplikation</u>

Mit einem bildanalytischen Verfahren (Axiovison Software) wurde das Luft-Gewebe-Verhältnis an H&E-gefärbten Lungenschnitten bestimmt. Schwarz dargestellt (untere Fläche) ist der prozentuale Gewebeanteil, grau dargestellt (obere Fläche) der prozentuale Luftanteil an der Gesamtlungenfläche.

Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen 2x wöchentlich (n=10) und unbehandelten (n=8) SP-C knock out Mäusen zu sehen. Ebenso besteht kein signifikanter Unterschied zu gesunden 6 Monate alten Wildtyp Mäusen (n=8).

5. <u>Diskussion</u>

Wie in dieser Dissertation zu Beginn beschrieben, hat das pulmonale Surfactantsystem nicht nur eine bedeutsame Funktion in der Reduktion der Oberflächenspannung und der Vermeidung eines Alveolarkollaps, sondern es führt ebenfalls zu einer Steigerung der Compliance und des Gasaustauschs. Im Falle von Mutationen in den Genen der Surfactant-Proteine B und C als auch des ABCA3-Proteins -als Transporter in der Außenmembran der Lamellarkörperchen- kommt es zu Störungen der Surfactant-Homöostase, welche die Ausführung der oben genannten Funktionen des Surfactants nicht erlauben. Letztlich resultiert hieraus eine chronische Schädigung des Alveolarepithels, welche Ausgangspunkt für die Entstehung von interstitiellen Lungenerkrankungen wie der Idiopathischen Pulmonalen Fibrose (IPF) ist. Diese zeichnet sich durch ein dramatisches Krankheitsbild mit raschem und therapierefraktärem Verlauf sowie hoher Mortalitätsrate aus. Angesichts des weitgehenden Fehlens von effektiven Therapiemethoden und der oben beschriebenen Surfactantveränderungen in der Pathogenese stellt die exogene Surfactant-Applikation eine mögliche, innovative Therapieoption dar. Eine solche Applikation von exogenem Surfactant hat sich im Rahmen von Studien beim Acute Respiratory Distress Syndrom (ARDS) als mögliche und sichere Methode herausgestellt, um die biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften des endogenen Surfactant-Pools größtenteils wieder herzustellen.

Voraussetzung für eine inhalative Verabreichung von Surfactant ist die Erzeugung einer geeigneten Menge lungen- und alveolargängiger Partikel, was nicht zwangsläufig durch gängige Vernebler erreicht wird. Man unterscheidet Flüssig- und Trockenvernebler. Bei Flüssigverneblern wird das Arzneimittel in flüssiger Form entweder mittels Venturiprinzip oder mittels Piezotechnologie in feine Aerosoltröpfchen vernebelt, die bis in die Lunge und Alveolen gelangen können. Es handelt sich um Systeme, die auch eine Integration in ein Beatmungssystem erlauben. Nachteil dieser Art der Verneblung ist eine nur sehr eingeschränkte (alveoläre) Deposition relevanter Mengen an Surfactant, wie sich unter anderem im Rahmen einer Studie zur Flüssigverneblung von synthetischem Surfactant bei Patienten mit ARDS herausstellte [Anzueto, 1996]. Der Großteil der bisher verfügbaren Trockenvernebler, die prinzipiell eine Generierung

höhere Mengen an Surfactant erlauben könnte, ist hingegen nicht im Sinne eines kontinuierlichen Betriebes, so auch in Respiratoren, verfügbar. Ein weiteres Problem besteht in der Größenverteilung der Partikel. So erfolgt eine Deposition von größeren, nicht lungengängigen Partikeln bereits im Mund- und Rachenraum bzw. bei beatmeten Patienten im Tubus, was letztlich dazu führt, dass die Dosis, die tatsächlich in die Lunge als Wirkort gelangt, sich auf nur ca. 30 % beläuft [Babu, 2003]. Vor diesem Hintergrund wurde im Lungenzentrum der Justus-Liebig-Universität Giessen ein für die Trockenverneblung von lyophilisiertem Surfactant geeigneter Vernebler entwickelt. In diesem Vernebler werden die großen, nicht lungengängigen Partikel herausgefiltert. Dies führt dazu, dass ein größerer Anteil des eingesetzten Arzneimittels den Wirkort in den Lungenalveolen erreicht und sich folglich lokal höhere Dosen des eingesetzten Arzneimittels applizieren lassen. Erlaubten bisherige Trockenvernebler die Verneblung von max. 250 mg des sog. Pumactant[®], eines synthetisch proteinfreien Präparats, pro Verneblungseinheit [Babu, 2003; Young, 2004], so ermöglicht der neu generierte Trockenvernebler der Justus-Liebig-Universität die Verneblung von bis zu 800 mg Surfactant / Minute. Dabei werden weder die biochemischen noch die biophysikalischen Eigenschaften beeinflusst. Ferner ist die Integration in ein Verneblersystem bzw. einen Respirator möglich [Ruppert, 2010].

In der hier vorliegenden Dissertation wurde daher der Trockenvernebler auf seine Eignung bei der Verneblung von lyophilisiertem Surfactant in vivo untersucht. An spontan atmenden gesunden Mäusen führte eine 30-minütige Verneblung von lyophilisiertem, pulverförmigen rSP-C Surfactant im intermittierndem Verfahren (20 sec.Verneblung im Wechsel mit 40 sec Pause) zu einer Verdreifachung des SP-C Gehalts in der BALF und zu einem erkennbaren Anstieg im LH. Dies ist umso bemerkenswerter, wenn man das Atemmuster der Maus -schnelle und flache Atmung mit ca. 120 Atemzügen/min. und einem Atemzuvolumen von ~200µl- berücksichtigt. Schlussfolgernd kann also festgehalten werden, dass bei spontan atmenden gesunden Mäusen per Trockenvernebler aerosolisiertes rSP-C Surfactant in kurzer Zeit in großen Mengen bis in die distalen Lungenabschnitte gelangt.

Schon länger ist bekannt, dass Störungen des pulmonalen Surfactant Systems eine wichtige Rolle in der Pathogenese sowohl von akut-inflammatorischen Erkrankungen wie dem ARDS als auch von Idiopathischen Interstitiellen Pneumonien (IIP) spielen

[Nogee, 1993, 1994, 2001]. Diese äußern sich als grundsätzlicher Mangel an oberflächenaktiven Substanzen, in Veränderungen in der Surfactant-Komposition und der Surfactant-Prozessierung sowie in Störungen der relativen Surfactant-Subtypenverteilung. Beim ARDS belegen mehrere Studien die Verbesserung des Gasaustausches nach der transbronchialen oder intratrachealen Applikation exogenen Surfactants [Spragg, 1994; Gregory, 1997; Günther, 2002]. Eine positive Beeinflussung der Mortalität des ARDS konnte in den entscheidenden Studien, wohl auch aufgrund von Fehlern in dem Protokoll zur Resuspensierung des auf rekombinantem SP-C basierendem Surfactant, allerdings nicht nachgewiesen werden [Spragg, 2004; Kesecioglu, 2009; Spragg/Günther, 2011].

Bei familiären Formen der Idiopathischen Pulmonalen Fibrose (IPF), welche durch vererbbare Mutationen hervorgerufen werden, konnte in einigen betroffenen Familien zweifelsfrei ein kausaler Zusammenhang zwischen Mutationen in den Genen, die für die Surfactant-Proteine SP-A, SP-B und SP-C kodieren, und der Manifestation einer Lungenfibrose festgestellt werden [Nogee, 1994; Amin, 2001; Wang, 2009]. Im Folgenden soll genauer auf die entsprechenden Mutationen im SP-C Gen eingegangen werden.

Erstmals konnte durch Nogee et al. im Jahr 2001 ein Zusammenhang zwischen einer Mutation im SP-C Gen und dem Auftreten familiärer Formen chronisch interstitieller Lungenerkrankungen hergestellt werden. Es folgten weitere Studien, welche bewiesen, dass Punktmutationen im SP-C Gen tatsächlich eine ursächliche Rolle für die Entstehung einiger familiärer idiopathischer interstitiellen Pneumonien spielt [Amin, 2001; Thomas, 2002]. Alle Befunde der genannten Studien lassen vermuten, dass das mutante SP-C Proprotein auf Grund einer Fehlfaltung den sekretorischen Pfad innerhalb der Typ-II-Zelle nicht durchlaufen kann und das unvollständig prozessierte Proprotein in Trans-Golgi Vesikeln aggregiert, akkumuliert und zu einer Schädigung der Typ-II-Zelle führt. Den potentiell zytotoxischen Effekt des mutanten ProSP-C Proteins konnten die Autoren durch Transfektionsstudien an der murinen Lungenepithelzelllinie MLE-12 belegen. Inwieweit nun die Akkumulation des abnormal prozessierten ProSP-C oder auch das Fehlen von maturem SP-C per se zum Erkrankungsgeschehen beiträgt, kann jedoch gegenwärtig noch nicht abschließend beurteilt werden.

Im Gegensatz zu diesen familiären Formen konnte bei sporadischen Formen der IPF keine Mutation im SP-C Gen festgestellt werden, was darauf schließen lässt, dass Mutationen dieses Gens keine bedeutende Rolle in der Pathogenese dieser Formen der IPF spielt [Markart, 2007]. Vielmehr scheint es durch eine fehlerhafte Prozessierung der hydrophoben Surfactantproteine B und C zu einer Akkumulation von unprozessierten Zwischenprodukten in der alveolären Typ-II-Zelle zu kommen [Korfei/Günther, 2007, unveröffentlichte Daten]. In diesem Zusammenhang ließ sich kürzlich erstmals eine beträchtliche ER-Stressantwort in den Typ-II-Alveolarzellen von Patienten mit einer IPF nachweisen [Korfei, 2008], wobei eine kausale Verknüpfung zwischen einer gestörten Prozessierung von Surfactantprotein B, Induktion von ER-Stress und der Entwicklung einer Lungenfibrose gezeigt wurde. In Ergänzung hierzu sei angemerkt, dass sowohl im klinischen Kontext als auch tierexperimentell das Fehlen von SP-C Grundlage der Entwicklung einer Idiopathischen Interstitiellen Pneumonie (IIP) sein könnte. Hier sei zunächst das Modell der SP-C Defizienz beschrieben. Grundlage hierfür sind Versuche mit (inbred) SP-C knock out Mäusen durch Glasser et al. aus dem Jahr 2002. Hierzu wurde das SP-C Gen bei Mäusen des Stammes 129/Sv gezielt inaktiviert. Die so hervorgerufene Abwesenheit von maturem SP-C verursachte eine progressiv verlaufende Lungenschädigung mit histologischen Kennzeichen einer interstitiellen Pneumonitis [Glasser, 2002]. Obgleich die pathomechanischen Zusammenhänge bei den o.g. Formen einer IIP noch nicht lückenlos aufgeklärt sind, spricht dennoch viel dafür, dass die chronische Schädigung und konsekutiv der programmierte Zelltod der alveolären Typ-II-Zelle eine erhebliche Rolle spielt. Darüber hinaus könnte auch die durch das mehr oder weniger ausgeprägte Fehlen maturer Formen der Surfactantproteine und einiger wichtiger Phospholipide wie dem DPPC Erhöhung der alveolären Oberflächenspannung bedingte eine wichtige pathomechanische Bedeutung einnehmen. Diese Erhöhung der alveolären Oberflächenspanung bedingt möglicherweise den repeptitiven Kollaps und die Wiederbelüftung peripherer Alveolen (recruitment – derecruitment) und damit eine zyklische Überdehnung der distalen Lungen, vor allem in den basalen und subpleuralen Abschnitten der Lunge. Interessanterweise sind es genau diese Areale der Lunge, die prototypischerweise die ersten fibrotischen Veränderungen bei der IPF aufweisen, so dass ein biomechanischer Zusammenhang hier vermutet werden könnte. In der Tat ist die Überdehnung der Alveolen in der Vergangenheit mit einem gesteigertem Zelltod der alveolären Typ-II-Zelle in Verbindung gebracht worden [Hammerschmidt, 2004]. Zudem ist die Integrin-abhängige Aktivierung interstitieller Fibroblasten durch eine Verhärtung der Matrix und durch Überdehnung eine mittlerweile gut bekannte Reaktion [Hinz, 20121. Tatsächlich könnte also die Erhöhung der alveolären

Oberflächenspannung an sich eine nicht unbedeutende Rolle bei der Auslösung und der Propagation der IIP spielen. Eine therapeutische Verabreichung von Surfactant erscheint daher grundsätzlich als wissenschaftlich begründet.

Allerdings existieren bisher keine Daten zum Metabolismus von exogen appliziertem Surfactant bei fibrosierenden Lungenerkrankungen. In diesem Zusammenhang wurden in dieser Dissertation zu einem wesentlichen Teil Versuche zum Metabolismus von exogen appliziertem Surfactant an einem tierexperimentellen Modell der Lungenfibrose, hier im speziellen an SP-C knock out Mäusen, durchgeführt.

Um die oben genannte Fragestellung bzgl. des Metabolismus von inhalativ verabreichtem exogenem Surfactant zu bearbeiten, wurde der SP-C Gehalt in der BALF und im LH zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Surfactant Verneblung mittels Trockenvernebler bestimmt. Die Verneblung betrug bei jeder Maus 60 min. im intermittierenden Verfahren, d.h. 20 sec Verneblung im Wechsel mit 40 sec Pause. Die Festlegung der Verneblungszeit von 60 min. repräsentiert einen Kompromiss zwischen möglichst kurzer Verneblungszeit und einem messbaren therapeutischen Effekt. So konnte nach 60 min. bereits ein um 20 % höherer SP-C Gehalt nachgewiesen werden. Dieser Anstieg wurde als ausreichend erachtet, um die Kinetik des Metabolismus nachverfolgen zu können.

Wie bereits auf der Basis der ersten Versuche zur pulmonalen Deposition des Surfactants vermutet, gelangte der Surfactant und damit das rSP-C bei den gesunden Wildtyp-Mäusen nach Inhalation schnell in die distalen Lungenabschnitte. So konnte an Tag 1 nach Verneblung sowohl in der BALF als auch im LH nahezu eine Verfünffachung des SP-C Gehalts nachgewiesen werden. Bereits an Tag 2 waren jedoch von dem applizierten rSP-C nur noch 10 % in der BALF bzw. 40 % im LH nachweisbar, was auf einen schnellen Metabolismus des exogenen Surfactants schließen lässt.

Genau wie bei den gesunden Wildtyp-Mäusen diente auch bei den SP-C knock out Mäusen der höchst ermittelte SP-C Wert als Referenz. Ebenso wie bei den gesunden Mäusen wurde dieser maximale SP-C Gehalt sowohl in der BALF als auch im LH an Tag 1 nach Verneblung gemessen. Im Gegensatz zu den gesunden Wildtyp-Mäusen waren jedoch bei den SP-C knock out Tieren auch an Tag 2 nach Verneblung noch deutlich erhöhte SP-C Mengen von 55 % in der BALF nachweisbar. Sogar an Tag 4 war noch ein SP-C Gehalt von knapp 32 % (im Gegensatz dazu bei Wildtyp-Mäusen 28 %) messbar.

Die Kinetik des applizierten rSP-C Surfactants im LH bei den SP-C knock out Mäusen gleicht in etwa der der gesunden Wildtyp-Mäuse; so sind auch hier an Tag 2 nach Erreichen des Maximalwerts von Tag 1 noch ca. 40 % SP-C nachweisbar, woraufhin es an Tag 4 zu einem weiteren Abfall der SP-C Menge auf 30 % kommt.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass es hinsichtlich der schnellen und effektiven Aufnahme des exogen applizierten rSP-C Surfactants im Sinne des Erreichens einer Maximaldosis an Tag 1 in der BALF und im LH keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunden und SP-C knock out Mäusen gibt.

An Tag 2 und Tag 4 nach Surfactantapplikation sind dann jedoch wesentliche Unterschiede im SP-C Gehalt der BALF nachweisbar. Diese zeigen sich in einer signifikanten Verlangsamung der Clearance bei SP-C knock out Mäusen im Gegensatz zu den gesunden Tieren. Im Fall der SP-C knock out Mäuse scheint trotz fehlender Hinweise hinsichtlich der Entwicklung einer manifesten Fibrose der Metabolismus angesichts des Fehlens von Surfactant Protein C verändert, was sich vor allem in einer deutlich langsameren Elimination des rSP-C Surfactants aus dem Alveolarraum zeigt. Zu diskutieren ist hier ein vermehrter Einbau des von exogen zugeführten Surfactant Protein Cs in den endogenen Surfactantfilm, wodurch sich ein längerer Verbleib in der Alveole und somit in der BALF begründen ließe. Dies würde mit den in dieser Dissertation erhobenen Daten übereinstimmen, welche an Tag 2 noch 55 % des exogen applizierten rSP-C Surfactants in der BALF bei SP-C knock out Mäusen nachweisen (im Gegensatz dazu nur 10 % bei gesunden Mäusen).

Bereits an Tag 1 nach Surfactant Verneblung ist der maximal ermittelte Wert an SP-C nicht nur in den Alveolen, sondern auch im Lungengewebe nachweisbar. Angesichts der kurzen Halbwertszeit des Surfactants im alveolären Kompartiment von etwa nur 6 Stunden [Hallman, 1981] überrascht dies nicht. Im Weiteren ist dann an Tag 2 und Tag 4 nach Verneblung tendenziell eine langsamere Elimination als in der BALF zu sehen. Möglicherweise ist eine latente Schädigung der Typ-II-Zelle mit einem veränderten Metabolismus ausschlaggebend für die langsamere Elimination im Vergleich zu den gesunden Tieren. Der weitere Weg der Verstoffwechselung von exogen appliziertem Surfactant ist bisher noch nicht endgültig geklärt; möglich ist sowohl die Reutilisierung mit Einbau in Lamellarkörperchen oder das Recycling in Typ-II-Zellen, eine Phagozytose über Alveolarmakrophagen oder die Elimination über die Atemwege oder die Blutbahn.

Diese Erkenntnisse bzgl. des Metabolismus von exogen appliziertem rSP-C Surfactant stimmen mit denen von Alberti et al. überein. Demnach verlässt innerhalb der ersten 3 Stunden nach Applikation ein Großteil des verabreichten Surfactants die Atemwege und gelangt von dort ins Lungengewebe. Im Fall der gesunden Mäuse vermischt sich dort das exogene Surfactant schnell mit dem endogenen. Bereits nach 1 bis 2 Tagen ist exogenes Surfactant im Serum, in Leber und Nieren nachzuweisen, was auf einen schnellen Metabolismus des exogenen Surfactants hinweist [Alberti, 1998]. Auch eine Studie von DeAngelis und Findlay an jungen Kaninchen, welchen radioaktiv markiertes Surfactant verabreicht wurde, zeigt, dass nach 5 Tagen der Hauptanteil des markierten Surfactants bereits im Körper verteilt ist und eliminiert wird [DeAngelis, 1993]. Zusätzlich unterstützt eine Studie von Allen et al. die Feststellung des rapiden Abfalls des nach der Verneblung in der Lunge gemessenen SP-Cs. Demnach wird ein Surfactant-freies synthetisches Surfactant (Exofurf[®]) bzw. eine auf den hydrophoben Surfactant-Proteinen SP-B und SP-C basierende Surfactantpräparation (Survanta[®]), welches frühreifen Kaninchen per inhalationem zugeführt worden war, deutlich schneller verstoffwechselt als gleichartig verabreichtes natürliches Surfactant [Allen, 2001].

Auf der Basis der gewonnenen Erkenntnisse über den Surfactant Metabolismus wurden im weiteren Verlauf der Dissertation Untersuchungen durchgeführt, um die an der Verstoffwechselung beteiligten Zellen zu identifizieren. Hierzu wurden SP-C knock out Mäuse über einen Zeitraum von 60 min. der Surfactant Verneblung im intermittierenden Verfahren (20 sec Verneblung im Wechsel mit 40 sec Pause) unterzogen. Als Kontrolle dienten SP-C knock out Mäuse, denen nur Luft zugeführt worden war. Die Lungen der Tiere wurden 24 Stunden nach der rSP-C-Surfactant Verneblung immunhistochemisch aufgearbeitet und ausgewertet. Die Histologie der mit rSP-C-Surfactant behandelten Mäuse zeigten deutliche Antigensignale in den Bronchialzellen, in den alveolären Typ-II-Zellen und in den alveolären Makrophagen. In der Kontrollgruppe konnte im Gegensatz dazu und erwartungsgemäß keine immunhistochemische Reaktion beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass das vernebelte Surfactant hauptsächlich durch Epithelzellen der distalen Lungenabschnitte (alveoläre Typ-II-Zellen, Bronchialzellen) und Makrophagen aufgenommen wird. Inwieweit und in welchem Ausmaß applizierter Surfactant direkt in die Blutbahn gelangt, konnte durch diese Methode nicht festgestellt werden. Eine wichtige Rolle der Typ-II-Zellen und der Makrophagen im Abbau von Surfactant konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden [Wright, 1995; Gurel, 2001; Forbes, 2007]. Während Surfactant von Makrophagen phagozytiert und anschließend degradiert wird, kann durch die Typ-II-Zelle aufgenommenes Surfactant wiederverwertet werden. Verschiedene Studien zeigten, dass 65-95% des endogenen, in die Alveolen sezernierten Surfactantmaterials von der Typ-II-Zelle wieder aufgenommen wird [Haagsman, 1991; Rider, 1992]. Die folgenden von Alberti et al. erhobenen Ergebnisse konnten zeigen, dass für exogen applizierten Surfactant vergleichbare Wiederaufnahmemechanismen zum Tragen kommen. So ließen sich nach kurzer Zeit ca. 60 % des im applizierten Surfactant vorkommenden DPPC in den Lamellarkörperchen der alveolären Typ-II-Zelle nachweisen und somit für eine erneute Sekretion wiederverwerten [Alberti, 1998].

Da Surfactant überwiegend aus (Phospho-)lipiden besteht und das Lipidprofil bei diversen Lungenerkrankungen zum Teil erheblich verändert ist [Schmidt, 2002], wurde in dieser Dissertation desweiteren die Frage nach der Dissoziation zwischen Proteinund Lipidanteil des aerosolisierten Surfactants bearbeitet. Hierzu wurde parallel zum SP-C Gehalt der Phospholipid (PL)-Gehalt in der BALF und dem LH von gesunden Wildtyp- und SP-C knock out Mäusen bestimmt, d.h. ebenfalls vor Surfactant Verneblung sowie an Tag 1, Tag 2 und Tag 4 nach Verneblung.

Aufgrund der relativ hohen endogenen PL-Spiegel war die Analyse exogen applizierter Surfactant Phospholipide im Vergleich zum Surfactantprotein C ungleich schwieriger. Dennoch konnte auch hier gezeigt werden, dass der Lipidanteil des Surfactants nach Applikation mittels Trockenvernebler bis in die distalen Lungenabschnitte gelangte. Im Gegensatz zum SP-C Gehalt, wobei an Tag 1 nach Applikation in der BALF mindestens das Vierfache des "Ausgangswerts" erreicht werden konnte, ist hier jedoch nicht einmal eine Verdopplung nachzuweisen. In der BALF der Mäuse stieg der PL-Gehalt nach Verneblung an Tag 1 um 20 % bei den SP-C knock out Mäusen und um 50 % bei den gesunden Wildtyp-Mäusen. Im weiteren Verlauf war dann ein Abfall des PL-Gehalts nachzuweisen, so dass an Tag 4 nach Verneblung bei den gesunden Tieren in etwa die "Ausgangswerte" (welche vor Verneblung gemessen worden waren) und bei den SP-C knock out Mäusen sogar Werte unterhalb des Ausgangsniveaus erreicht wurden. Hinsichtlich der SP-C knock out Mäuse sprechen die Daten zwar grundsätzlich für eine Beeinflussung der Clearance; jedoch scheint angesichts einer nur geringfügigen Erhöhung der PL-Spiegel nach rSPC Verneblung mit weiterem Abfall unterhalb des Ausgangsniveaus an Tag 4 die Aufnahme in die Typ-II-Zellen und / oder der Abbau durch Makrophagen nicht gestört zu sein. Insgesamt ist in jedem Fall festzuhalten, dass die Befunde zur Phosholipidkinetik mit einem schnellen Übertritt der PL aus dem Alveolarraum in das Lungengewebe zu vereinbaren sind, was wiederum mit den gewonnenen Erkenntnissen des SP-C Metabolismus übereinstimmt.

Im LH selbst gestaltete sich die Bestimmung des PL-Gehalts schwierig. Schon in den Versuchen zur pulmonalen Deposition der PL nach Surfactant Verneblung hatte sich gezeigt, dass der zu erwartende Anstieg der PL nach Verneblung und der im weiteren Verlauf kontinuierliche Abfall im LH nicht nachzuweisen war. Auch die folgenden Versuche zum Metabolismus erbrachten keine verwertbaren Ergebnisse. Möglich ist, dass der große Anteil an endogenen Lipiden zu einer Maskierung der vernebelten PL führte. Denkbar wäre auch dass bzgl. des intrazellulären Gehaltes von Phospholipiden eine noch engere Regulation vorherrscht als beim SP-C, z.B. vermittelt durch basolateral exprimiertes ABCA1 [Zhou, 2004]. Weiterführende Aussagen sind auf der Basis der hier durchgeführten Analysen nicht möglich, sie bedürften des "labelings" exogen zugeführter Surfactantlipide.

Die Befunde, welche zum DPPC-Gehalt in der BALF der Mäuse erhoben werden konnten, stimmen jedoch mit Feststellungen aus zuvor durchgeführten Studien überein. Danach befinden sich fünf Tage nach Applikation noch 72 % des in Form vom Surfactant dargereichten DPPC im Körper [DeAngelis, 1993]. Der Großteil ist jedoch bereits im Sinne einer fortgeschrittenen Verstoffwechselung in Leber und Exkrementen nachzuweisen, was mit einer schnellen Aufnahme des Surfactants nach Verneblung ins Lungengewebe vereinbar wäre.

Letztendlich kann also festgehalten werden, dass Protein- und Lipidanteil des von exogen zugeführten Surfactants scheinbar nicht dissoziieren, da ähnliche Kinetiken im Bezug auf deren Metabolismus zu beobachten waren. Die quantitativen Unterschiede der ermittelten Protein- bzw. Lipidgehälter (im Vergleich größerer Anstieg des SP-Cs gegenüber der PL nach Surfactant Verneblung) sind am ehesten durch messtechnische Probleme zu erklären. Allerdings kann trotz der ähnlichen Kinetiken nicht komplett ausgeschlossen werden, dass die PL von den Proteinen dissoziieren und folglich zu einem geringeren Teil aufgenommen werden. Diese Annahme würde zudem die genannten quantitativen Unterschiede der Gehälter begründen.

Eine weitere Fragestellung dieser Dissertation befasste sich mit der möglichen Beeinflussung des Phänotyps von SP-C knock out Mäusen durch chronische Surfactant Verneblung. Glasser et al. hatten zuvor gezeigt, dass SP-C defiziente Mäuse des Stammes 129/Sv nach max. sechs Monaten eine schwerwiegende pulmonale Erkrankung entwickelte, welche durch Emphyseme, Dysplasie der Epithelzellen, Infiltration von Monozyten und ungewöhnliche Lipidakkumulationen charakterisiert waren [Glasser, 2003]. Im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation sollte überprüft werden, ob durch eine exogene Surfactant-Therapie die durch die SP-C Defizienz hervorgerufene Lungenschädigung abgemildert bzw. korrigiert werden kann.

Hierzu wurden fünf Wochen alte SP-C knock out Mäuse des Stammes 129/Sv über einen Zeitraum von sechs Monaten der Surfactant Verneblung unterzogen. Die Tiere erhielten die Behandlung 2x wöchentlich für jeweils 60 min.. Als Kontrolle dienten SP-C knock out Mäuse, denen Luft vernebelt wurde.

Leider konnte im Rahmen unserer Versuche der vorbeschriebene (fibrotische) Phänotyp der SP-C knock out Mäuse nicht reproduziert werden. Weder die Kontrolltiere, die kein Surfactant erhielten, noch die mit rSP-C behandelten Tiere entwickelten eindeutige Anzeichen einer pulmonalen Fibrose. Entgegen der Erwartungen waren auch keinerlei signifikante histologische Auffälligkeiten wie etwa eine Verschiebung des Luft-Gewebe-Verhältnisses zu Gunsten des Gewebes nachzuweisen. So wiesen die SP-C knock out Mäuse mit 40 % den gleichen prozentualen Anteil der alveolären Luftfläche an der Gesamtlungenfläche auf wie gesunde Wildtyp-Mäuse. Dies spricht gegen das Vorliegen einer Lungenfibrose, bei welcher die alveoläre Luftfläche deutlich herabgesetzt sein müsste. Auf Nachfrage bei der Arbeitsgruppe Glasser erhielten wir die Information, dass der von Glasser et al. im "inbread-strain" [Glasser, 2003] beschriebene Phänotyp auch nicht bei allen SP-C defizienten 129/Sv Mäusen aufgetreten war und dass die Arbeitsgruppe auch innerhalb der eigenen Kolonie aktuell selbst Schwierigkeiten hatte den Phänotyp zu reproduzieren [S. Glasser, persönliche Kommunikation]. Angesichts der vorab beschriebenen Abhängigkeit des Phänotypes vom verwendeten Stamm [Glasser, 2001] vermutete die Arbeitsgruppe eine Verunreinigung des 129/Sv Stamms. Unbeschadet von diesen theoretischen Erklärungsansätzen für das Ausbleiben einer manifesten pulmonalen Fibrose bei unseren Tieren bleibt dennoch festzuhalten, dass die Mäuse eine exogene Surfactant-Therapie über einen Zeitraum von sechs Monaten gut vertragen haben und keinerlei negative Effekte (z. B. Überladung der Lunge mit Lipiden, Entwicklung einer Lipidpneumonie, etc.) als Ausdruck einer pulmonalen Toxizität zu sehen waren.

6. Zusammenfassung

Fibrosierende Lungenerkrankungen haben in den vergangenen Jahren innerhalb der Pneumologie zunehmend Beachtung gefunden. Besonders die Idiopathischen Interstitiellen Pneumonien (IIP) stellen einen bedeutenden Teil des komplexen Spektrums interstitieller Lungenerkrankungen dar. Die zugrundeliegenden Ursachen und pathomechanischen Zusammenhänge sind nur unzureichend bekannt. Bei familiären Formen konnten Mutationen des Surfactant Protein Cs (SP-C) als möglich Ursache für die Entstehung einer Lungenfibrose identifiziert werden. Punktmutationen im Bereich des für die intrazelluläre Prozessierung dieses Proteins wichtigen Proproteinanteils können eine gestörte Proteinfaltung und Selbstaggregation auslösen und somit den Ausgangspunkt eines epithelialen Zellschadens darstellen, der über die Induktion einer epithelialen Apoptose zu einem profibrotischen Milieu im Alveolarraum führt. Darüber hinaus konnten auch bei Patienten mit sporadischer Idiopathischer Pulmonaler Fibrose (IPF) Störungen der intrazellulären Surfactantprozessierung und Veränderungen der alveolären Surfactanthomöostase beobachtet werden, die auf eine kausale Rolle des Surfactantsystems bei der Pathogenese der IIPs schließen lassen und somit Grundlage für eine Therapie mit exogen appliziertem Surfactant bieten. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Dissertation 1) der Metabolismus von inhalativ verabreichtem, exogenen Surfactant an der Maus und 2) die Beeinflussung des Phänotys von SP-C knock out Mäusen durch chronische Surfactant Verneblung betrachtet.

Der Metabolismus von exogenem Surfactant wurde sowohl an gesunden Mäusen als auch an SP-C knock out Mäusen (SP-C ^{-/-} des Stammes 129/Sv), für die zuvor die Entwicklung einer Lungenfibrose beschrieben worden war, untersucht. Hierzu wurden die spontan atmenden Mäuse einer Verneblung eines auf rekombinantem SP-C basierenden Surfactants unter Verwendung eines eigens für diese Zwecke am Lungenzentrum der Justus-Liebig-Universität Giessen entwickelten Trockenverneblers unterzogen.

Nach der Surfactant Verneblung kam es schnell zur Zunahme des SP-C- und Phospholipid (PL)-Gehaltes in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF). So konnte einen Tag nach Verneblung bei gesunden Wildtyp- und SP-C knock out Mäusen jeweils der höchst ermittelte Wert von SP-C und PL gemessen werden. Ebenso verhielt es sich mit den im Lungengewebe (LH) erfassten Mengen an SP-C. Bei den SP-C knock out Mäusen ließ sich eine im Gegensatz zu gesunden Wildtypen verlangsamte Elimination von SP-C im LH herausarbeiten. Die hauptsächlich an der Verstoffwechselung des exogenen Surfactants beteiligten Zellen wurden mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung der Lungen von SP-C knock out Mäusen ausfindig gemacht. So konnte gezeigt werden, dass v.a. alveoläre Typ-II-Zellen, bronchiale Epithelien und alveoläre Makrophagen den exogenen Surfactant bzw. exogenes SP-C aufnehmen und verstoffwechseln.

Die Erforschung einer möglichen Beeinflussung des Phänotyps von SP-C knock out Mäusen durch exogene Surfactant Behandlung erfolgte über einen Zeitraum von sechs Monaten. Hierzu wurden SP-C ^{-/-} Mäuse des Stammes 129/Sv 2x wöchentlich für 60 min. der rSP-C Inhalation unter Verwendung des Trockenverneblers unterzogen; als Kontrolle galten mit Luft vernebelte SP-C ^{-/-} Mäuse.

Entgegen der Erwartungen, nach welchen die nicht mit SP-C behandelten Mäuse eine pulmonale Fibrose entwickelt haben sollten, konnten keine signifikanten histologischen Auffälligkeiten und auch keine Veränderung des prozentualen Anteils der alveolären Luftfläche an der Gesamtlungenfläche nachgewiesen werden. Ein identisches Bild zeigten die Untersuchungen an Mäusen, die eine 2x wöchentliche rSP-C Inhalation erhalten hatten. Somit kann zur therapeutischen Wirksamkeit einer inhalativen Surfactantapplikation bei SP-C knock out Mäusen leider keine Aussage getroffen werden. Andererseits wurden in dieser Studie auch keine Hinweise auf eine pulmonale Toxizität einer lang anhaltenden Surfactantverabreichung gewonnen.

Summary

In the field of pneumology, fibrotic lung diseases have gained increased interest within the last years. Particularly the idiopathic interstitial pneumonias (IIP) represent an important part of the complex spectrum of interstitial lung diseases. The underlying causes and pathomechanic connections are only insufficiently known. Recently, mutations of the Surfactant protein C (SP-C) could be identified as one possible reason for the emergence of pulmonary fibrosis in patients with familial forms. Point mutations in the area of the pro-protein which is important for the intracellular processing of this protein lead to a disturbed protein folding and self aggregation and cause epithelial cell damage which in turn leads to the induction of an epithelial apoptosis and triggers a profibrotic environment in the alveolar space. Furthermore, disturbances of the intracellular surfactant processing and changes of the alveolar surfactant homeostasis could be identified also in patients with sporadic idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), which suggests a causative role of the surfactant system in the pathogenesis of the IIPs and therefore offer basis for a therapy with exogenously applied surfactant. In line with such reasoning, the thesis on hand looked at 1) the metabolism of inhalative applied exogenous surfactant in mice and 2) the effects of chronic surfactant aerosolization in order to correct the phenotype of SP-C knock out mice.

The metabolism of exogenous surfactant was examined both in healthy mice and knock out mice (SP-C $^{-/-}$ of strain 129/Sv) for which the development of a pulmonary fibrosis has been described before. Spontaneously breathing mice underwent aerosolization with a recombinant SP-C-based surfactant using a dry powder aerosolizer, which has been developed for this special purpose at the Justus-Liebig University of Giessen Lung Center.

rSPC surfactant aerosolization resulted in a rapid increase of the SP-C and phospholipid (PL) levels measured in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Highest levels for SP-C and PL were found 1 day after aerosolization. Similar results were obtained in lung homogenates. When compared with wild type mice, SP-C knock out mice showed a slowed down elimination of SP-C from both the alveolar spaces and from lung tissues. The cells involved in the metabolization of the exogenous surfactant were identified by means of an immunohistochemical staining of lung sections from SP-C knock mice for SP-C. We could show that primarily alveolar type II cells, bronchial epitheliums and

alveolar macrophages play a role in the uptake and metabolism of exogenous surfactant or exogenous SP-C.

In order to examine the effect of rSP-C surfactant treatment on the phenotype of SP-C knock out mice, spontaneously breathing animals underwent longterm (6 month) rSP-C surfactant inhalation twice weekly for 60 minutes employing the dry powder aerosolizer. SP-C knock out mice treated with air served as controls.

Against our expectations, sham-treated control mice did not develop fibrosis. Neither compliance, nor histological and morphometric analysis forwarded any signs of fibrosis. In knock out mice which received surfactant twice weekly an identical picture was seen, the lung structure was virtually unaffected. Therefore, we cannot make a statement about the therapeutic efficacy of an inhalative surfactant application in SP-C knock out mice. On the other hand, no evidences for a pulmonary toxicity of a continuous surfactant application were found in this study either.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABCA3	ATP-binding cassette, sub-family A, member 3, spezifisches
	Membranprotein
AIP	Akute Interstitielle Pneumonie
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARDS	acute respiratory distress syndrome akutes Lungenversagen
BALE	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BCA	hicinchoninic acid
BOOP	bronchiolitis obliterans organizing pneumonia
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw	beziehungsweise
C2	circa
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratzentimeter
C	Compliance
C	Kohlonmonovid
COP	Kuntagan Organisiaranda Dnaumania
CDP	Riyptogen Organisterende Pheumome
CRD	Caroonyarale recognition aomain
CRP	C-reaktives Protein
d	<i>lat. ales</i> (Tag)
dest.	destilliert
DIP	Desquamative Interstitielle Pneumonie
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsaure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et altera
etc.	et cetera
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
h	<i>lat. hora</i> (Stunden)
HCl	Chlorwasserstoff
HRCT	High Resolution Computertomographie
H_2O	Wasser
H&E	Hämatoxillin-Eosin
IIP	Idiopathische Interstitielle Pneumonie
IPF	Idiopathische Pulmonale Fibrose
kDa	kiloDalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kPa	Kilopascal
LH	Lungenhomogenate
LIP	Lymphoide Interstitielle Pneumonie
LK	Lamellarkörperchen
LSA	large surfactant aggregates
m	Meter
М	Molar

m^2	Quadratmeter
mA	Milliamper
MMAD	Mass Median Aerodynamic Diameter
min.	Minuten
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mN	Millinewton
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NSIP	Nichtspezifische Interstitielle Pneumonie
0.g.	oben genannt
р	pressure, Druck
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phoshatidylglycerol
PI	Phoshatidylinositol
PL	Phospholipide
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pO_2	Sauerstoff-Partialdruck
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RB-ILD	respiratory bronchiolitis – interstitial lung disease
RDS	respiratory distress syndrome
rSP-C	rekombinantes SP-C, gentechnisch hergestelltes Surfactant Protein C
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec.	Sekunden
SP-A	Surfactant Protein A
SP-B	Surfactant Protein B
SP-C	Surfactant Protein C
SP-D	Surfactant Protein D
SPH	Sphingomyelin
SSA	small surfactant aggregates
Tab.	Tabelle
TBST	Tris-Buffered Saline and Tween
U	Unit
u.a.	unter anderem
UIP	usual interstitial pneumonia
V	Volumen
z.B.	zum Beispiel

alpha
beta
Delta
Mikrogramm
Mikroliter
Mikrometer
Grad Celsius
Prozent
eingetragenes Markenzeichen

8. <u>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</u>

Abb. 1: Die Zusammensetzung des pulmonalen Surfactants	2
Abb. 2: Schematische Darstellung des pulmonalen Surfactantmetabolismus	4
Abb. 3: Diagnosealgorithmus bei Verdacht auf IPF	10
Abb. 4: Schematische Darstellung des Trockenverneblers	
und der Verneblereinheit	32
Abb. 5: Zeitlicher Verlauf der inhalativen Applikation von Surfactant	33
Abb. 6: SP-C Gehalt nach Surfactant Verneblung an spontan atmenden Mäusen	L
in Abhängigkeit von der Verneblungsdauer	49
Abb. 7: Compliance nach Surfactant Verneblung an spontan atmenden Mäusen	
in Abhängigkeit von der Verneblungsdauer	50
Abb. 8: PL-Gehalt nach Surfactant Verneblung an spontan atmenden Mäusen	
in Abhängigkeit von der Verneblungsdauer	52
Abb. 9: SP-C-Gehalt in BALF und LH von gesunden Wildtyp Mäusen	
nach Surfactant Verneblung im zeitlichen Verlauf	55
Abb. 10: PL-Gehalt in BALF und LH von spontan atmenden Wildtyp Mäusen	
nach Surfactant Verneblung im zeitlichen Verlauf	56
Abb. 11: SP-C-Gehalt in BALF und LH von SP-C knock out Mäusen	
nach Surfactant Verneblung im zeitlichen Verlauf	59
Abb. 12: PL-Gehalt in BALF und LH von SP-C knock out Mäusen	
nach Surfactant Verneblung im zeitlichen Verlauf	60
Abb. 13: Immunhistochemische Analyse von SP-C knock out Mäusen	
nach rSP-C-Surfactant Verneblung	63
Abb. 14: Histologische Analyse von SP-C knock out Mäusen	
nach chronischer Surfactant Verneblung	69
Abb. 15: Prozentualer Anteil der alveolären Luftfläche an der Gesamtlungenflä	che
von SP-C knock out Mäusen nach chronischer Surfactantapplikation	70

Tab. 1: Diagnoseschema des UIP-Musters nach HRCT-Morphologie	
und Histologie	10
Tab. 2: Klinische Zeichen der IIP	
Tab. 3: BALF- und HRCT-Befunde bei IIP	16
Tab. 4: Vergleich von Surfactant-Defizienz Syndromen	23
Tab. 5: Gelzusammensetzung für diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese	37
Tab. 6: Volumenanteile der Reagenzien bei der Lipidextraktion	
nach Bligh & Dyer	43
Tab. 7: Färbeergebnis für Gewebe und Zellorganellen	
nach erfolgter H&E-Färbung	45
Tab. 8: Färbeanleitung für Hämatoxillin-Eosin-Färbung	
Tab. 9: Protokoll zur immunhistochemischen Färbung von SP-C	

9. Literaturverzeichnis

Alberti A, Pettenazzo A, Enzi GB, Palamidese A, Mapp C, Ventura P, Baritussio A. 1998. Uptake and degradation of Curosurf after tracheal administration to newborn and adult rabbits. *Eur Respir J*. 1998, 12: 294-300.

Allen V, Oulton M, Stinson D. 2001. Alveolar metabolism of natural vs. synthetic surfactants in preterm newborn rabbits. *J Appl Physiol*. 2001, 90: 198-204.

Amin RS, Wert SE, Baughman RP, Tomashefski JF, Jr, Nogee LM, Brody AS, Hull WM, Whitsett JA. 2001. Surfactant protein deficiency in familial interstitial lung disease. *J Pediatr*. 2001, 139: 85-92.

Anzueto A, Baughman RP, Guntupalli KK, Weg JG, Wiedemann HP, Raventós AA, Lemaire F, Long W, Zaccardelli DS, Pattishall EN. 1996. Aerosolized surfactant in adults with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. Exosurf Acute Respiratory Distress Syndrome Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 1996, 334: 1417-1421.

ATS & ERS, American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. 2002. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am Respir Crit Care Med.* 2002, 165: 277-304.

Babu KS, Woodcock DA, Smith SE, Staniforth JN, Holgate ST, Conway JH. 2003. Inhaled synthetic surfactant abolishes the early allergen-induced response in asthma. *Eur Resp J.* 2003, 21: 1046-1049.

Baritussio AG, Magoon MW, Goerke J, Clements JA. 1981. Precursor-product relationship between rabbit type II cell lamellar bodies and alveolar surface-active material. *Biochim Biophys Acta*. 1981, 666: 382–393.

Beers MF, Mulugeta S. 2005. Surfactant Protein C Biosynthesis and Its Emerging Role in Conformational Lung Disease. *Ann Rev Physiol.* 2005, 67: 663-696.

Behr J, Günther A, Ammenwerth W, Bittmann I, Bonnet R, Buhl R, Eickelberg O, Ewert R, Gläser S, Gottlieb J, Grohé C, Kreuter M, Kroegel C, Markart P, Neurohr C, Pfeifer M, Prasse A, Schönfeld N, Schreiber J, Sitter H, Theegarten D, Theile A, Wilke A, Wirtz H, Witt C, Worth H, Zabel P, Müller-Quernheim J, Costabel U. 2013. S2K-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der idiopathischen Lungenfibrose. *Pneumologie*. 2013; 67: 81-111.

Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959, 37 (8): 911-917.

Brasch F, Schimanski S, Muhlfeld C, Barlage S, Langmann T, Aslanidis C, Boettcher A, Dada A, Schroten H, Mildenberger E, Prueter E, Ballmann M, Ochs M, Johnen G, Griese M, Schmitz G. 2006. Alteration of the pulmonary surfactant system in full-term infants with hereditary ABCA3 deficiency. Am J Resp Crit Care Med. 2006, 174: 571-580.

Bridges JP, Wert SE, Nogee LM, Weaver TE. 2003. Expression of a human surfactant protein C mutation associated with interstitial lung disease disrupts lung development in transgenic mice. *J Biol Chem.* 2003, 287: 52739-52746.

Cameron HS, Somaschini M, Carrera P, Hamvas A, Whitsett JA, Wert SE, Deutsch G, Nogee LM. 2005. A common mutation in the surfactant protein C gene associated with lung disease. *J Pediatr.* 2005, 146: 370–375.

Chevalier G, Collet AJ. 1972. In vivo incorporation of choline- 3H, leucine-3H and galactose-3H in alveolar type II pneumocytes in relation to surfactant synthesis. A quantitative radioautographic study in mouse by electron microscopy. *Anat Rec.* 1972, 174: 289-310.

Clements JA. 1957. Surface tension of lung extracts. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1957, 95: 170-172.

Crystal RG, West JB. 1991. The lung Bd. 3.1.10. . *Ltd. New York: Raven Press.* 1991, 247-261.

DeAngelis RL, Findlay JW. 1993. Metabolism of synthetic surfactants. *Clin Perinatol.* 1993, 20: 697-710.

Discher BM, Schief WR, Vogel V, Hall SB. 1999. Phase separation in monolayers of pulmonary surfactant phospholipids at the air-water interface: composition and structure. *Biophys J.* 1999, 77: 2051-2061.

Dobbs LG, Wright JR, Hawgood S, Gonzalez R, Venstrom K, Nellenbogen J. 1987. Pulmonary surfactant and its components inhibit secretion of phosphatidylcholine from cultured rat alveolar type II cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987, 84: 1010-1014.

Forbes A, Pickell M, Foroughian M, Yao LJ, Lewis J, Veldhuizen R. 2007. Alveolar macrophage depletion is associated with increased surfactant pool sizes in adult rats. *J Appl Physiol.* 2007, 103: 637-645.

Garmany TH, Moxley MA, White FV, Dean M, Nogee LM, Hamvas A. 2006. Surfactant composition and function in patients with ABCA3 mutations. *Pediatr Res.* 2006, 59: 801–805.

Geiger K, Gallagher ML, Hedley-Whyte J. 1975. Cellular distribution and clearance of aerosolized dipalmitoyl lecithin. *J Appl Physiol*. 1975, 39: 759–766.

Glasser SW, Korfhagen TR, Weaver TE, Pilot-Matias T, Fox JL, Whitsett JA. 1987. cDNA and deduced amino acid sequence of human pulmonary surfactant-associated proteolipid SPL. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987, 84: 4007-4011.

Glasser SW, Korfhagen TR, Perme CM, Pilot-Matias TJ, Kister SE, Whitsett JA. 1988. Two SP-C genes encoding human pulmonary surfactant proteolipid. *J. Biol Chem.* 1988, 263: 10326-10331.

Glasser SW, Burhans MS, Korfhagen TR, Na CL, Sly PD, Ross GF, Ikegami M, Whitsett JA. 2001. Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001, 98: 6366–6371.

Glasser SW, Detmer EA, Ikegami M, Na CL, Stahlman MT, Whitsett JA. 2003. Pneumonitis and emphysema in SP-C gene targeted mice . *J Biol Chem.* 2003, 278: 14291-14298.

Gregory TJ, Steinberg KP, Spragg R, Gadek JE, Hyers TM, Longmore WJ, Moxley MA, Cai GZ, Hite RD, Smith RM, Hudson LD, Crim C, Newton P, Mitchell BR, Gold AJ. 1997. Bovine surfactant therapy for patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997, 155 (4): 1309-1315.

Günther A, Schmidt R, Nix F, Yabut-Perez M, Guth C, Rosseau S, Siebert C, Grimminger F, Morr H, Velcovsky HG, Seeger W. 1999. Surfactant abnormalities in idiopathic pulmonary fibrosis, hypersensitivity pneumonitis and sarcoidosis. *Eur Respir J*. 1999, 14: 565-73.

Günther A, Schmidt R, Harodt J, Schmehl T, Walmrath D, Ruppert C, Grimminger F, Seeger W. 2002. Bronchoscopic administration of bovine natural surfactant in ARDS and septic shock: impact on biophysical and biochemical surfactant properties. *Eur Respir J*. 2002, 19 (5): 797-804.

Günther A, Ermert L, Breithecker A, Hackstein N, Eickelberg O, Morr H, Grimminger F, Velcovsky HG, Seeger W. 2003. Klassifikation, Diagnostik und Therapie der idiopathischen interstitiellen Pneumonien: Eine kritische Bestandsaufnahme der gegenwärtig in Deutschland geübten Praxis. *Dtsch Ärztebl.* 2003, 100(24): A-1676 / B-1389 / C-1305.

Gurel O, Ikegami M, Chroneos ZC, Jobe AH. 2001. Macrophage and type II cell catabolism of SP-A and saturated phosphatidylcholine in mouse lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001, 280: 1266-1272.

Haagsman HP, van Golde LM. 1991. Synthesis and assembly of lung surfactant. *Annu Rev Physiol* . 1991, 53: 441-464.

Hallman M, Epstein BL, Gluck L. 1981. Analysis of labelling and clearance of lung surfactant phospholipids in rabbit. Evidence of bidirectional surfactant flux between lamellar bodies and alveolar lavage. *J Clin Invest.* 1981, 68: 742-751.

Hallman M, Spragg R, Harrell JH, Moser KM, Gluck L. 1982. Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure. Study of bronchoalveolar lavage phospholipids, surface activity, phospholipase activity and plasma myoinositol. *J Clin Invest.* 1982, 70: 673-683.

Hamm H, Kroegel C, Hohlfeld J. 1996. Surfactant: a review of ist functions and relevances in respiratory disorders. *Respir Med.* 1996, 90: 251-270.

Hammerschmidt S, Kuhn H, Grasenack T, Gessner C, Wirtz H. 2004. Apoptosis and necrosis induced by cyclic mechanical stretching in alveolar type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004, 30 (3): 396-402.

Hamvas A, Cole FS, deMello DE, Moxley M, Whitsett JA, Colten HR. 1994. Surfactant Protein-B Deficiency – Antenatal Diagnosis and Prospective Treatment with Surfactant Replacement. *J Pediatr*. 1994, 125: 356-361.

Hamvas A, Trusgnich M, Brice H, Baumgartner J, Hong Y, Nogee LM, Cole FS. 2001. Population-based screening for rare mutations: high throughput DNA extraction and amplification from Guthrie cards. *Pediatr Res.* 2001, 50: 666–668.

Hamvas A, Nogee LM, White FV, Schuler P, Hackett BP, Huddleston CB, Mendeloff EN, Hsu FF, Wert SE, Gonzales LW, Beers MF, Ballard PL. 2004. Progressive lung disease and surfactant dysfunction with a deletion of surfactant protein C gene. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004, 30: 771-776.

Hamvas A, Cole FS, Nogee LM. 2007. Genetic disorders of surfactant proteins. *Neonatology*. 2007, 91 (4): 311-317.

Hartl D, Griese M. 2005. Interstitial lung disease in children – genetic background and associated phenotypes. *Respir Res.* 2005, 8; 6:32 (Review).

Hinz B. 2012. Mechanical aspects of lung fibrosis: a spotlight on the myofibroblast. *Proc Am Thorac Soc.* 2012, 9 (3): 137-147.

Ikegami M, Weaver TE, Conkright JJ, Sly PD, Ross GF, Whitsett JA, Glasser SW. 2002. Deficiency of SP-B reveals protective role of SP-C during oxygen lung injury. *J Appl Physiol.* 2002, 92: 519–526.

Katzenstein ALA, Myers JL. 1998. Idiopathic pulmonary fibrosis. Clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998, 157: 1301-1315.

Kesecioglu J, Beale R, Stewart TE, Findlay GP, Rouby JJ, Holzapfel L, Bruins P, Steenken EJ, Jeppesen OK, Lachmann B. 2009. Exogenous natural surfactant for treatment of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009, Nov 15; 180 (10): 989-994.

Khoor A, Gray ME, Hull WM, Whitsett JA, Stahlmann MT. 1993. Developmental expression of SP-A and SP-A mRNA in the proximal and distal respiratory epithelium in the human fetus and newborn. *J.Histochem. Cytochem.* 1993, 41: 1311-1319.

King RJ, Clements JA. 1972. Surface active material from dog lung. II. Composition and physiological correlations. *Am J Physiol*. 1972, 223: 715-726.

Klaus MH, Clements JA, Havel R. 1961. Composition of surface-active material isolated from beef-lung. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1961, 47: 1858-1859.

Korfei M, Ruppert C, Mahavadi P, Koch M, Markart P, Witt H, Lang G, Seeger W, Weaver T, Günther A. 2007. Abnormal accumulation of unprocessed surfactant protein (SP)-B and activation of the ER stress pathway in patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) and non-specific interstitial pneumonia (NSIP). *Am J Respir Crit Care Med.* 2007, 175: A735 (Abstract).

Korfei M, Ruppert C, Mahavadi P, Henneke I, Markart P, Koch M, Lang G, Fink L, Bohle RM, Seeger W, Weaver TE, Guenther A. 2008. Epithelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008, 15: 178 (8): 838-846.

Khyse-Andersen, J. 1984. Electroblotting of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 1984, 10: 203–209.

Lu J, Willis AC, Reid KBM. 1992. Purification, characterization and cDNA cloning of human lung surfactant protein D. *Biochem J*. 1992, 284: 795–802.

Markart P, Ruppert C, Wygrecka M, Schmidt R, Korfei M, Harbach H, Theruvath I, Pison U, Seeger W, Günther A, Witt H. 2007. Surfactant protein C mutations in sporadic forms of idiopathic interstitial pneumonias. *Eur Respir J.* 2007, 29 (1): 134-137.

Miyoshi MH. 2001. Surfactant replacement therapy. J Pediatr (Rio J) 200, 77 (1): 3-16.

Neergaard K. 1929. Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik. Die Retraktionskraft der Lunge, abhängig von der Oberflächenspannung in den Alveolen. Z Gesamte Exp Med, 1929: 66: 373-394.

Nogee LM, deMello DE, Dehner LP, Colten HR. 1993. Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *N Engl J Med.* 1993, 328: 406-410.

Nogee LM, Garnier G, Dietz HC, Singer L, Murphy AM, deMello DE, Colten HR. 1994. A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *J Clin Invest.* 1994, 93: 1860–1863.

Nogee LM, Wert SE, Proffit SA, Hull WM, Whitsett JA. 2000. Allelic heterogeneity in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000, 161: 973–981.

Nogee LM, Dunbar AE, Wert SE, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA. 2001. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familiar interstitial lung disease. *N Engl J Med.* 2001, 344: 537-579.

Nogee LM. 2004. Alterations in SP-B and SP-C expression in neonatal lung disease. *Ann Rev Physiol.* 2004, 66:601-623.

Notter RH, Morrow PE. 1975. Pulmonary Surfactant: a surface chemistry viewpoint. *Ann Biomed Eng.* 1975, 3: 119-159.

Pattle RE. 1955. Properties, function and origin of the alveolar lining layer. *Nature* (*Lond*), 1955, 175: 1125-1126.

Pettenazzo A, Jobe A, Humme J, Seidner S, Ikegami M. 1988. Clearance of surfactant phosphatidylcholine via the upper airways in rabbits. *J Appl Physiol*. 1988, 65: 2151-2155.

Phizackerley PJR, Town MH, Newman GE. 1979. Hydrophobic proteins of lamellated osmiophilic bodies isolated from pig lung . *Biochem J.* 1979, 183: 731-736.

Possmayer F. 1988. A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *Am Rev Respir Dis.* 1988, 138: 990-998.

Possmayer F. 1990. The role of surfactant-associated proteins. *Am Rev Respir Dis.* 1990, 142: 749-752.

Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier JF, Flaherty KR, Lasky JA, Lynch DA, Ryu JH, Swigris JJ, Wells AU, Ancochea J, Bouros D, Carvalho C, Costabel U, Ebina M, Hansell DM, Johkoh T, Kim DS, King TE Jr, Kondoh Y, Myers J, Müller NL, Nicholson AG, Richeldi L, M, Dudden RF. Griss BS, Protzko SL, Schünemann Selman HJ: ATS/ERS/JRS/ALAT Committee on Idiopathic Pulmonary Fibrosis. 2011. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. Am J Respir Crit Care Med. 2011, 183: 788-824.

Rice WR, Sarin VK, Fox JL, Baatz J, Wert S, Whitsett JA. 1989. Surfactant peptides stimulate uptake of phosphatidylcholine by isolated cells. *Biochim Biophys Acta*. 1989, 1006: 237-245.

Rider ED, Ikegami M, Jobe AH. 1992. Localization of alveolar surfactant clearance in rabbit lung cells. *Am J Physiol-Lung Physiol.*. 1992, 263: 201-209.

Rouser G, Fleischer S, Yamamoto A. 1970. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*. 1970, 5 (5): 494-496.

Ruppert C, Kuchenbuch T, Boensch M, Schmidt S, Mates U, Hillebrand V, Henneke I, Markart P, Reiss I, Schermuly RT, Seeger W, Günther A. 2010. Dry Powder Aerosolization of a rSP-C Based Surfactant for Inhalative Treatment of the Acutely Inflamed Lung. *Crit Care Med.* 2010, 38 (7): 1584-1591.

Ryan RM, Morris RE, Rice WR, Ciraolo G, Whitsett JA. 1989. Binding and uptake of pulmonary surfactant protein (SP-A) by pulmonary type II epithelial cells. *J Histochem Cytochem.* 1989, 37: 429-440.

Ryan US, Ryan JW, Smith DS. 1975. Alveolar type II cells: studies on the mode of release of lamellar bodies. *Tissue Cell.* 1975, 3: 587–599.

Sanchez-Pulido L, Devos D, Valencia A. 2002. BRICHOS: a conserved domain in proteins associated with dementia, respiratory distress and cancer. *Trends in Biochemical Sciences*. 2002, 27: 329-332.

Schmidt R, Meier U, Markart P, Grimminger F, Velcovsky HG, Morr H, Seeger W, Günther A. 2002. Altered fatty acid composition of lung surfactant phospholipids in interstitial lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002, 283: 1079-1085.

Selman M, King TE, and Pardo A. 2001. Idiopathic pulmonary fibrosis: Prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med.* 2001, 134: 136–151.

Shulenin S, Nogee LM, Annilo T, Wert SE, Whitsett JA, Dean M. 2004. ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *N Engl J Med.* 2004, 350: 1296-1303.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985, 150: 76-85.

Spragg RG, Gilliard N, Richman P, Smith RM, Hite RD, Pappert D, Robertson B, Curstedt T, Strayer D. 1994. Acute effects of a single dose of porcine surfactant on patients with the adult respiratory distress syndrome. *Chest*. 1994, 105(1): 195-202.

Spragg RG, Lewis JF, Walmrath HD, Johannigman J, Bellingan G, Laterre PF, Witte MC, Richards GA, Rippin G, Rathgeb F, Häfner D, Taut FJH, Seeger W. 2004. Effect of recombinant surfactant protein C-based surfactant on the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 2004, 351: 884-892.

Spragg RG, Taut FJ, Lewis JF, Schenk P, Ruppert C, Dean N, Krell K, Karabinis A, Günther A. 2011. Recombinant surfactant protein C-based surfactant for patients with severe direct lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011, 183: 1055-1061.

Stevens PA, Pettenazzo A, Brasch F, Mulugeta S, Baritussio A, Ochs M, Morrison L, Russo SJ, Beers MF. 2005. Nonspecific interstitial pneumonia, alveolar proteinosis, and abnormal proprotein trafficking resulting from a spontaneous mutations in the surfactant protein C gene. *Pediatr Res.* 2005, 57: 89-98.

Taneva S, Keough KM. 1994. Pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C in spread monolayers at the air-water interface: II. Monolayers of pulmonary surfactant Protein SP-C and phospolipids. *Biophys J.* 1994, 66: 1149-1157.

Taut FJH, Rippin G, Schenk P, Findlay G, Wurst W, Häfner D, Lewis JF, Seeger W, Günther A, Spragg RG. 2008. A Search for Subgroups of Patients With ARDS Who May Benefit From Surfactant Replacement Therapy. A Pooled Analysis of Five Studies With Recombinant Surfactant Protein-C Surfactant (Venticute). *Chest.* 2008, 134: 724-732.

Thomas AQ, Lane K, Phillips J 3rd, Prince M, Markin C, Speer M, Schwartz DA, Gaddipati R, Marney A, Johnson J, Roberts R, Haines J, Stahlman M, Loyd JE. 2002. Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in kindred. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002, 165: 1322-1328.

Towbin H, Staehlin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979, 76: 4350-4354.

Tryka AF, Wert SE, Mazursky JE, Arrington RW, Nogee LM. 2000. Absence of lamellar bodies with accumulation of dense bodies characterizes a novel form of congenital surfactant defect. *Pediatr Dev Pathol.* 2000, 3: 335-345.

Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC, Rosenblatt RL, Shay JW, Garcia CK. 2007. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007, 104:7552-7.

Tsuzuki A, Kuroki Y, Akino T. 1993. Pulmonary surfactant protein A-mediated uptake of phosphatidylcholine by alveolar type II cells. *Am J Physiol* . 1993, 265: 193-199.

van Golde LMG, Batenburg JJ, Robertson B. 1988. The pulmonary surfactant system: biochemical aspects and functional significance. *Physiol Rev.* 1988, 68: 374–455.

Veldhuizen EJA, Haagsman HP. 2000. Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics. *Biochim Biophys Acta*. 2000, 1467: 255-270.

Voorhout WF, Veenendaal T, Haagsman HP, Verkleij AJ, van Golde LM, Geuze HJ. 1991. Surfactant protein A is localized at the corners of the pulmonary tubular myelin lattice . *J Histochem Cytochem*. 1991, 39: 1331-1336.

Vorbroker DK, Profitt SA, Nogee LM, Whitsett JA. 1995. Aberrant processing of surfactant protein C in hereditary SP-B deficiency. *Am J Physiol*. 1995, 268: 647–656.

Wang WJ, Mulugeta S, Russo SJ, Beers MF. 2003. Deletion of exon 4 from human surfactant protein C results in aggreesome formation and generation of a dominant negative . *J Cell Sci.* 2003, 116: 683–692.

Wang Y, Kuan PJ, Xing C, Cronkhite JT, Torres F, Rosenblatt RL, DiMaio JM, Kinch LN, Grishin NV, Garcia CK. 2009. Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer. *Am J Hum Genet*. 2009, 84 (1): 52-59.

Williams GD, Christodoulou J, Stack J, Symons PJ, Wert SE, Murrell MJ, Nogee LM. 1999. Surfactant protein B deficiency: clinical, histological and molecular evaluation. *J Pediatr Child Health*. 1999, 35: 214-220.

Williams, MC. 1977. Conversion of lamellar body membranes into tubular myelin in alveoli of fetal rat lungs. *J Cell Biol*. 1977, 72: 260-277.

Williams MC, Benson BJ. 1981. Immunocytochemical localization and identification of the major surfactant protein in adult rat lung. *J Histochem Cytochem.* 1981, 29: 291–305.

Williams MC, Hawgood S, Hamilton RL. 1991. Changes in lipid structure produced by surfactant proteins SP-A, SP-B and SP-C. *Am J Resp Cell Mol Biol.* 1991, 5: 41-50.

Wittram C, Mark EJ, McLoud TC. 2003. CT-Histological Correlation of ATS/ERS 2002 Classification of Idiopathic Interstitial Pneumonias. *RadioGraphics*. 2003, 23: 1057-1071.

Wright JR, Wager RE, Hawgood S, Dobbs L, Clements JA. 1987. Surfactant apoprotein Mr = 26,000-36,000 enhances uptake of liposomes by type II cells. *J Biol Chem*. 1987, 262: 2888-2894.

Wright JR, Youmans DC. 1995. Degradation of surfactant lipids and surfactant protein A by alveolar macrophages in vitro. *Am J Physiol*. 1995, 268: 772-780.

Yamano G, Funahashi H, Kawanami O, Zhao LX, Ban N, Uchida Y. 2001. ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. *Febs Letters*. 2001, 508: 221-225.

Young PM, Thompson J, Woodcock D, Aydin M, Price R. 2004. The development of a novel high-dose pressurized aerosol dry-powder device (PADD) for the delivery of pumactant for inhalation therapy. *J Aerosol Med* 2004; 17: 123-128.

Young SL, Kremers SA, Apple JS, Crapo JD, Brumley GW. 1981. Rat lung surfactant kinetics: biochemical and morphometric correlation. *J Appl Physiol*. 1981, 51: 248–253.

Zhou J, You Y, Ryan AJ, Mallampalli RK. 2004. Upregulation of surfactant synthesis triggers ABCA1-mediated basolateral phospholipid efflux. *J Lipid Res.* 2004, 45 (9): 1758-1767.

10. Publikationsverzeichnis

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Ruppert C, Kuchenbuch T, Boensch M, Schmidt S, Mates U, **Hillebrand V**, Henneke I, Markart P, Reiss I, Schermuly RT, Seeger W, Günther A. 2010. Dry Powder Aerosolization of a rSP-C Based Surfactant for Inhalative Treatment of the Acutely Inflamed Lung. *Crit Care Med.* 2010, 38 (7): 1584-1591.

11. Erklärung

"Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden."

Ort, Datum

Unterschrift

12. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. med. Andreas Günther, der mir mit seinem großen Fachwissen sowie seiner wissenschaftlichen Kompetenz stets zur Seite stand.

Ebenso danken möchte ich Professor Dr. med. Werner Seeger für die Überlassung des Themas und das entgegengebrachte Vertrauen.

Ein großer Dank geht an Dr. rer. nat. Clemens Ruppert, mit dessen Unterstützung hinsichtlich der Einarbeitung in das Thema, der Durchführung der experimentellen Analytik sowie der labortechnischen Datenauswertung die Ergebnisse dieser Dissertation erst möglich wurden. Auch während des Verfassens meiner Arbeit konnte ich mich stets an ihn wenden.

Ich danke meinem Mann, der mir stets Mut zugesprochen und mich in meiner Arbeit bestärkt hat.

Zuletzt möchte ich meinen größten Dank meinen Eltern aussprechen, die in jeglicher Hinsicht den Grundstein für meinen Weg gelegt haben und auf deren liebevolle Unterstützung ich immer vertrauen kann.