

Zusammenfassung

Spezielle Lungenepithelzellen, die Typ II-Pneumozyten, produzieren Surfactant, welches als dünner Film die Alveolen der Lunge auskleidet und die Oberflächenspannung an der Luft-Wassergrenze der Alveoli herabsetzt. Das Surfactant setzt sich zu 90% aus Lipiden und 10% aus surfactantassoziierten Proteinen zusammen. Letztere werden als SP-A, SP-B, SP-C und SP-D bezeichnet. Das Surfactant wird von den Zellen über Exozytose sezerniert und über Endozytose wieder aufgenommen. In der Klinik wird natürliches und synthetisch hergestelltes Surfactant seit Jahren erfolgreich in der Behandlung des IRDS (infant respiratory distress syndrome) des Neugeborenen eingesetzt. Intensiv wird am Einsatz von Surfactant beim ARDS (acute respiratory distress syndrome) des Erwachsenen geforscht. Die Weiterentwicklung bzw. Verbesserung eines funktionsfähigen Surfactant erfordert genaue Kenntnisse seiner Bestandteile und deren Funktionsweisen sowie bestehender Regulationsmechanismen.

Gegenstand dieser Arbeit ist die Endozytose von Lipiden an frisch isolierten Typ II-Zellen *in vitro*, dabei interessierte uns insbesondere der Einfluß des surfactantassoziierten Proteins B (SP-B) auf die Lipidaufnahme der Typ II-Pneumozyten. Es wurde untersucht, ob die Lipidaufnahme mit SP-B auch über clathrin coated pits (CCP) und clathrin coated vesicles (CCV) erfolgt, wie es für SP-A und assoziiertes Lipid beschrieben wurde. Desweiteren erfolgte die Aufklärung der Abhängigkeit der Endozytose mit SP-B von Tubulin, welches sich bei zahlreichen Endozytosevorgängen als essentiell erwiesen hat. Der letzte Forschungsschwerpunkt dieser Arbeit bei der Endozytose von Lipiden mit SP-B war die Rolle spezieller Signaltransduktionskaskaden, wie sie für die Sekretion von Surfactant beschrieben worden sind.

Dazu haben wir *in vitro* Aufnahmeversuche an Typ II-Zellen durchgeführt. Um den physiologischen Bedingungen *in vivo* möglichst nahe zu kommen, wurden bei unseren Experimenten frisch isolierte Typ II-Pneumozyten eingesetzt. Die dabei verwendeten surfactantassoziierten Proteine (SP-A und SP-B) wurden in aufwendigen Schritten isoliert und auf Verunreinigung getestet. Die Lipidaufnahme wurde als Verhältnis der in den Typ II-Zellen gemessenen Radioaktivität (dpm) und des bestimmten Proteingehaltes der Zellen (μg) ausgedrückt.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß die Lipidaufnahme mit Zusatz von SP-B geringer ist als die Lipidaufnahme ohne surfactantassoziierte Proteine. Die widersprüchlichen Ergebnisse einzelner Arbeitsgruppen diesbezüglich können durch unterschiedliche Versuchsbedingungen (frische versus kultivierte Zellen, Isolationsmethoden insbesondere von SP-B, stark variierende Protein-Lipid-Ratios der Liposomen) erklärt werden und führen zu einer scheinbar großen Variationsbreite der Ergebnisse mit SP-B, wie sie durch Horowitz et al. bereits postuliert worden ist.

Weiterhin konnten wir zeigen, daß die Lipidaufnahme mit SP-B weder clathrin- noch tubulinabhängig ist und sich sowohl von der Lipidaufnahme ohne surfactantassoziierte Proteine als auch von der Lipidaufnahme mit SP-A unterscheidet.

Die bei der Sekretion von Surfactant bereits untersuchte Signaltransduktionskaskaden Adenylatcyclase (AC) mit dem second messenger cAMP, Phospholipase C (PLC) mit dem second messenger IP₃, Proteinkinase C (PKC) und die Involvierung der G-Proteinen haben wir bei der Endozytose der Lipide untersucht. Dabei konnten wir zeigen, daß der Einfluß der AC mit cAMP bei der Lipidaufnahme mit SP-B eine Rolle spielt. Dieser Signaltransduktionsweg scheint jedoch bei der Lipidaufnahme ohne surfactantassoziierte Proteine und bei der Lipidaufnahme mit SP-A nicht involviert zu sein. Die Signaltransduktionsmechanismen der PLC mit IP₃, PKC und die G-Proteine sind nach den uns vorliegenden Ergebnissen bei der Endozytose von Lipiden in An- und Abwesenheit von SP-A bzw. SP-B nicht beteiligt.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Hypothese von Griese et al., daß die Regulation der Surfactantaufnahme von der Regulation der Sekretion unabhängig ist.

Anhand der dargestellten Ergebnisse vermuten wir, daß die Lipidaufnahme mit SP-B über einen speziellen, rezeptorunabhängigen Weg erfolgt, der sich von dem der Lipide allein bzw. von dem mit SP-A unterscheidet. Dieser Endozytoseweg mit SP-B könnte dem „lamellarbodygetriggerten“ Aufnahmeweg für Surfactant entsprechen, der von der Arbeitsgruppe um Shuman als aktinabhängig beschrieben wurde.

1 Einleitung

1.1 Was ist Surfactant?

Als Surfactant (engl.: *surface-active-agent*) wird ein Lipidproteingemisch in der Lunge bezeichnet, welches als dünner Film die Alveolen auskleidet und die Oberflächenspannung an der Luft-Wassergrenze senkt. Diese Eigenschaft erlaubt niedrige Beatmungsdrücke und beugt besonders bei Expiration dem sonst unausweichlichen Lungenkollaps vor. Bei Oberflächenvergrößerung, wie sie z. B. bei der Inspiration in der Lunge stattfindet, adsorbiert das Surfactant an die Luft-Wassergrenze und verteilt sich sehr schnell auf der Lungenoberfläche. Bei Expiration wird der Lipidproteinfilm zusammengepresst, wobei negativ geladene Phospholipide, ungesättigte Lipide und bestimmte Surfactantproteine herausgepresst werden. Dieser Prozeß hinterlässt einen nahezu vollständig aus Dipalmitoylphosphatidylcholin bestehenden Film, der zu einer erhöhten Steifheit des Surfactant führt und weiterer Oberflächenverkleinerung entgegenwirkt (72). Eine weitere Eigenschaft des Surfactant ist der Schutz vor inhalativen Noxen, Ödembildung und Krankheitserregern (93), so daß immunologische Funktionen in der Surfactantforschung zunehmend an Bedeutung gewinnen.

Eine typische „Surfactantmangelkrankheit“ ist das Atemnotsyndrom des Neugeborenen, auch IRDS (infant respiratory distress syndrome) genannt. Besonders häufig tritt es bei Frühgeborenen (< vollendete 37. Schwangerschaftswoche) auf, da die fetale Lunge Surfactant erst ab der 34. SSW in wirksamer Zusammensetzung und ausreichender Menge produzieren kann. Kommt das Kind vor diesem Zeitpunkt auf die Welt, ist die Lunge noch unreif – d. h. es ist zu wenig oder funktionsunfähiges Surfactant vorhanden. Als Folge entwickelt das Neugeborene eine globale respiratorische Insuffizienz, die innerhalb von Stunden zum Tode führen kann. Die postpartale Behandlung des IRDS besteht in der rechtzeitigen maschinellen Beatmung mit positivem endexpiratorischen Druck (PEEP) sowie einer intratrachealen Surfactantinstillation. Doch trotz der Fortschritte in der Behandlung bleibt das IRDS eine Hauptursache für die hohe

Morbidität und Mortalität bei Frühgeborenen. Außerdem entwickeln diese Kinder als Folge der Langzeitbeatmung mit hohen Beatmungsdrücken und einem erhöhten O₂-Partialdruck eine bronchopulmonale Dysplasie, die sowohl die Lebensqualität als auch die Lebenserwartung erheblich einschränken kann.

Um dies zu verhindern, wird bei gefährdeten Frühgeborenen die sogenannte „Lungeninduktionsreife“ durchgeführt. Dabei wird die Mutter bei drohender Frühgeburt präventiv mit Glucocorticoiden behandelt, wodurch die Lungenreifung beim Fetus gefördert wird. Das führt zur verstärkten Bildung und Ausschüttung von Surfactant in den fetalen Lungenalveolen. Durch dieses Vorgehen konnte die Inzidenz des IRDS signifikant gesenkt werden.

Auch beim Erwachsenen gibt es eine Krankheit, die durch Surfactantmangel oder Surfactantdysfunktion ausgelöst wird. Sie wird als ARDS (adult respiratory distress syndrome) bezeichnet und führt wie bei den Neugeborenen zu einem globalen Lungenversagen. Bekannte Auslöser sind Schock, Trauma, Noxen und Infektionen. Auch hierbei wird der therapeutische Einsatz von Surfactant erprobt, jedoch sind die Ergebnisse der ausgewerteten Daten bisher klinisch nicht überzeugend (6), (48), (73).

1.2 Zusammensetzung des Surfactant

Das Surfactant setzt sich zu 90% aus Lipiden und zu etwa 10% aus Proteinen zusammen. Lipide der tierischen und pflanzlichen Zellen sind chemisch gesehen Ester aus Glycerin und langkettigen Monocarbonsäuren, letztere auch Fettsäuren genannt. Die **Lipide** liegen zu 80-90% als Phospholipide vor. Den wesentlichen Anteil macht mit 70-80% Phosphatidylcholin (PC) aus. Meist liegt es als Dipalmitoylphosphatidylcholin (**DPPC**) vor.

Das **DPPC** ist eine Verbindung bestehend aus Glycerin, welches an zwei Enden mit hochwertigen Fettsäuren verestert ist, die dritte Esterbindung besteht zwischen Glycerin und Cholin sowie Phosphorsäure (siehe Abb. 1).

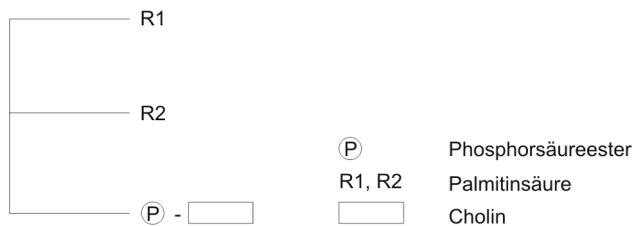


Abbildung 1: Aufbau von DPPC

Phospholipidmoleküle haben einen hydrophilen Kopf, bestehend aus einer Ammoniumgruppe und einem Phosphatrest, sowie einem hydrophoben Rest bestehend aus zwei Kohlenwasserstoffketten (siehe Abb. 2).



Abbildung 2: Aufbau eines Phospholipidmoleküls

In wässriger Lösung bilden Phospholipide bevorzugt Doppelschichten in Form von Membranen (siehe Abb. 3).

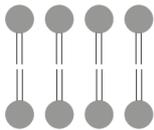


Abbildung 3: Membranaufbau

Dabei ist das polare Ende (hydrophiler Kopf) zur Flüssigkeit, die apolaren Enden zueinander gerichtet. Die Phospholipide können aber auch Micellen (einschichtige ringförmige Anordnung der Moleküle) bilden. An der Luft-Wassergrenze der Alveolen bilden sie einen einschichtigen Film, wobei die polare Kopfgruppe zur wässrigen Seite und die apolare Gruppe zur Luft hin ausgerichtet ist (siehe auch Abb. 5).

Zweithäufigstes Phospholipid ist mit 5-10% das Phosphatidylglycerol. Außerdem kommen Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol,

Sphingomyelin und Cholesterin vor.

Den größten Teil der **Proteine** stellen die surfactantassoziierten Proteine dar, sie werden nach der Nomenklatur von Possmayer (63) in zwei Gruppen eingeteilt: die hydrophilen surfactantassoziierten Proteine A und D (**SP-A**, **SP-D**) und die hydrophoben surfactantassoziierten Proteine B und C (**SP-B**, **SP-C**).

SP-A und **SP-D** mit einem Molekulargewicht von 26-35 kDa bzw. 39-46 kDa im reduzierten Zustand koordinieren als wichtigste ihrer Funktionen die spezifische und unspezifische Immunantwort der Lunge. Beide Proteine zählen aufgrund gemeinsamer Struktureigenschaften zu den C-Lektinen (Collektine). SP-A und SP-D sind Opsonine, steigern dadurch die Phagozytose, regulieren die Produktion von Entzündungsmediatoren und modulieren außerdem allergische Reaktionen (30), (46), (90), (91). Neueren Erkenntnissen zufolge soll SP-A unter normalen Bedingungen keinen Einfluß auf die Surfactanthomöostase haben (56), ebenso zeigen SP-A-geninaktivierte Mäuse unter „keimfreien“ Aufzuchtbedingungen eine scheinbar normale Lungenfunktion (39), (45). Allerdings erweisen sich SP-A- bzw. SP-D-geninaktivierte Mäuse anfälliger für Infektionen mit bestimmten Bakterien und Viren (16), (47), (51), (91). Auf die einzelnen Funktionen des SP-A wird in den Kapiteln 1.5.2 und 1.5.3 näher eingegangen.

SP-D soll neben seiner immunologischen Funktion ebenfalls an der Regulation der Surfactanthomöostase beteiligt sein (57). SP-D-geninaktivierte Mäuse zeigen eine progressive Akkumulation von Lipiden und Proteinen in den Alveoli (51), (91). Interessant für die biochemischen Eigenschaften des SP-D ist ebenfalls die Tatsache, daß es sowohl in vitro als auch in vivo keinen integrativen Bestandteil des oberflächenaktiven Lipidproteingemisches an der Luft-Wassergrenze der Alveolen darstellt (37), (56).

SP-B und **SP-C** mit einem Molekulargewicht von 8 bzw. 4 kDa unter reduzierten Bedingungen zählen eher zu den kleinen Proteinen, sie nehmen Einfluß auf die Bildung des oberflächenaktiven Lipidfilms (35) und tragen einen großen Teil zur Reduktion der Oberflächenspannung bei (22). Sie interagieren mit den Lipiden (17) und stimulieren

die Adsorption der Phospholipide an der Luft-Wassergrenze.

Neben den oberflächenspannungsreduzierenden Eigenschaften kommt dem SP-B eine immunologische Funktion im Sinne einer Interaktion mit verschiedenen proinflammatorischen zellulären Systemen sowie Inflammediatoren zu, wie z. B. nach Hyperoxie (27).

Eine ausführliche Beschreibung der SP-B Funktionen erfolgt in den Kapiteln 1.6.2 und 1.6.3.

1.3 Endo- und Exozytose

Die eukaryontische Zelle besteht aus dem Zellkern und dem Zytoplasma, sie wird von der Zellmembran begrenzt. Zum Zytoplasma gehören Zellorganellen wie Golgi-Apparat, glattes und rauhes endoplasmatisches Retikulum (ER), Mitochondrien, Lysosomen sowie das Zytoskelett und diverse Zelleinschlüsse (siehe Abb. 4).

Bei der Endozytose wird ein Teil der Zellmembran in das Zellinnere vorgewölbt und abgeschnürt, mit dieser wird die extrazelluläre Substanz in die Zelle eingeschleust (siehe Abb. 4).

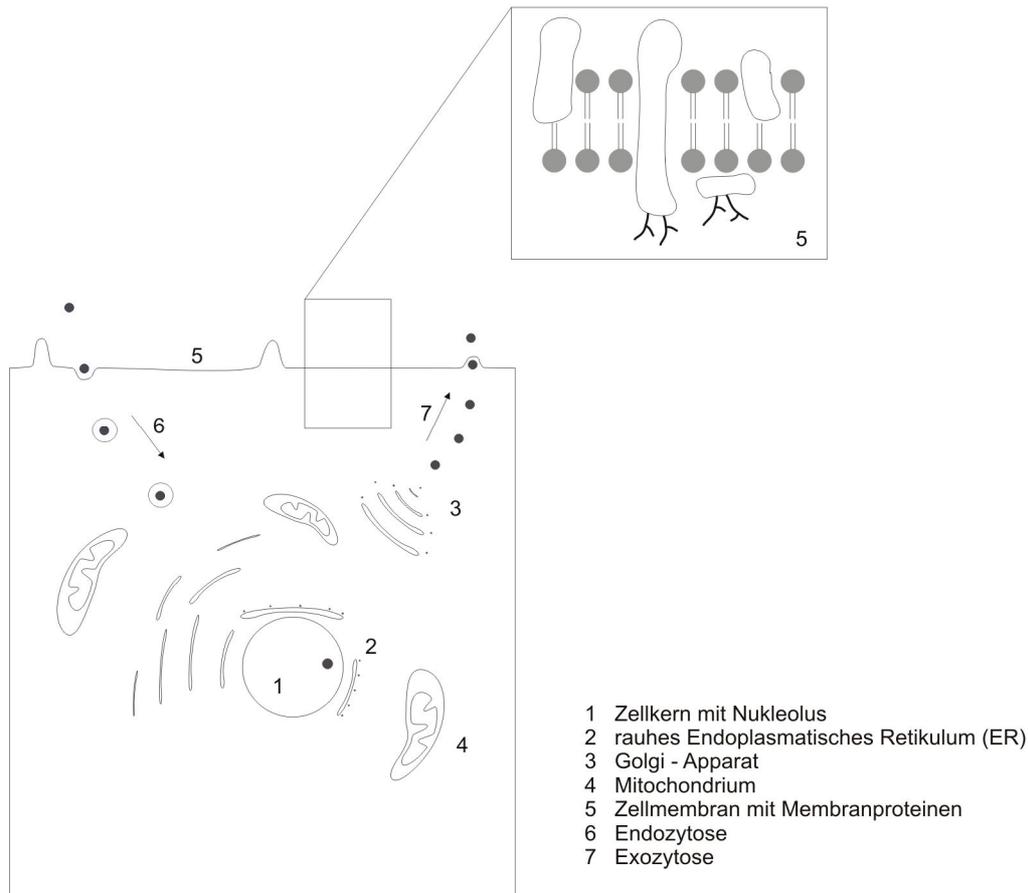


Abbildung 4: Zelle mit Endo- und Exozytose

Die Zellmembran selbst besteht aus einer Doppellipidschicht (Abb. 3), in die Proteine ganz oder teilweise eingelassen sind (Flüssigkeits-Mosaik-Modell genannt) (siehe Abb. 4). Dieser Aufbau bedingt einen fluiden Charakter der äußeren Zellbegrenzung. Genau in diesem Grenzbereich finden Stoffaufnahme und –abgabe statt, die als Endo- bzw. Exozytose bezeichnet werden und vorwiegend dem Transport von Partikeln und Flüssigkeiten dienen. Für den Austausch von Ionen bzw. anderen nieder- und hochmolekularen Stoffen besitzen die Zellen weitere Transportmechanismen, die über selektive Permeabilitäten und aktive Transporter bewerkstelligt werden und teilweise energieabhängig sind. Dazu zählen z. B. die Filtration bei hydrostatischen Druckdifferenzen in der Niere und der carriervermittelte Transport von Ionen zur Aufrechterhaltung des intra-/extrazellulären Milieus (Na^+/K^+ -Antiport). Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Vorgängen der Endozytose an speziellen Lungenepithelzellen, den Typ II-Pneumozyten.

Man kann die Endozytose anhand beteiligter Proteine in zwei große Gruppen einteilen: die von Clathrin abhängige und unabhängige Endozytose. Viele rezeptorvermittelte Endozytosevorgänge verlaufen clathrinabhängig, genauer gesagt über clathrin coated pits und clathrin coated vesicles. Die clathrinunabhängige Endozytose kann wiederum in weitere Gruppen unterteilt werden: aktinabhängiger (d.h. von einem Zytoskelettprotein abhängig) und caveolinabhängiger Weg sowie die unspezifische Aufnahme über Zellmembraninternalisation.

Das Zytoskelett mit seinen 3 Gruppen unterschiedlich großer Filamente spielt bei der Endozytose eine wichtige Rolle, außerdem sind Filamente an der Zellmobilität beteiligt, für die Bewegung der Zellausstülpungen wie Zilien (der Lungenzellen) oder Mikrovilli (der Darmepithelien) verantwortlich und übernehmen wichtige Funktionen bei der Zellteilung (Mitose).

Aktin gehört zu den dünnen Filamenten des Zytoskeletts (siehe Tab. 1).

	Größe	Bestandteile	Funktion
dicke Filamente (Mikrotubuli)	Ø ca. 24 nm	α- und β-Tubulin	Bewegung und Transport von Organellen, Zilienbestandteil, Mitosespindel
Intermediärfilamente	Ø ca. 10 nm	Bsp: Vimentin, Desmin	epitheliale Zellen
dünne Filamente	Ø ca. 7 nm	β- und γ-Aktin	Zellmobilität, Phagozytose, Mikrovillibestandteil

Tabelle 1: Zytoskelett

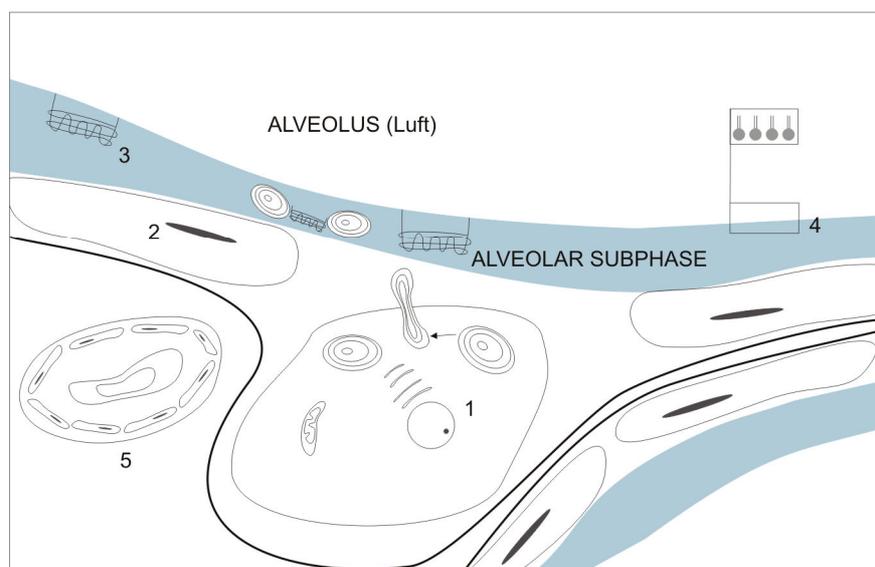
Caveolae sind Membraneinstülpungen, die kleiner sind als clathrin coated pits, sie weisen eine hohe Konzentration an Lipiden auf (52), (53).

Die internalisierten Substanzen werden zu Endosomen transportiert, wo sie im weiteren Verlauf entweder mit Lysosomen verschmelzen und ihr Inhalt abgebaut oder Teile der Inhalte abgespalten und als RV (recycling vesicle) wieder zur Oberfläche transportiert werden. Der dabei verbleibende Rest wird ebenfalls in den Lysosomen abgebaut. In jüngerer Zeit sind neben dem Aktin auch andere Zytoskelettfilamente bei der Endozytose untersucht worden. Mikrotubuli z.B. sollen für den Weitertransport der internalisierten Substanzen Richtung Zellinneres verantwortlich sein (77).

Als Exozytose wird das Ausschleusen von Partikeln oder Flüssigkeiten aus der Zelle bezeichnet. Dabei wird ein Vesikel aus dem Zellinneren in die Zellmembran eingefügt und nach außen hin eröffnet, wodurch die intrazelluläre Substanz nach außen befördert wird (siehe Abb. 4). Sekretionsleistungen von Epithelzellen sind mit Exozytose verbunden, genaugenommen bedeutet Sekretion Bildung und Abgabe zelleigener, eigens zur Ausscheidung synthetisierter Stoffe.

1.4 Surfactanthaushalt

Den Typ II-Zellen der Lunge wird eine zentrale Rolle in der Produktion, Sekretion und Wiederaufbereitung des Surfactant zugeschrieben. Surfactant wird in Typ II-Pneumozyten gebildet und innerhalb der Zelle in spezifischen Organellen, den Lamellarbodies, gelagert, bevor es in das Alveolarlumen sezerniert wird (44) (siehe Abb. 5).



- 1 Typ II-Zelle mit Lamellarbodies
- 2 Typ I-Zelle
- 3 Tubuläres Myelin
- 4 Monolayer aus PL
- 5 Blutgefäß

Abbildung 5: Alveolus mit Typ II-Zelle und Surfactant

Nach Abgabe in den Alveolus (alveolar Subphase) wird der Inhalt der Lamellarbodies ganz oder teilweise in eine gitterartige Struktur umgewandelt, die als Tubuläres Myelin bezeichnet wird (siehe Abb. 5). Es enthält neben Phospholipiden (größtenteils DPPC) auch SP-A und SP-B. Die Funktion dieser dreidimensionalen tubulären Struktur ist noch nicht im Detail erforscht. Angenommen wird eine Funktion als großes extrazelluläres Surfactantreservoir, um zwischen den Atemzyklen die Bereitstellung einzelner Bestandteile zu gewährleisten. Genetisch manipulierte Mäuse, die kein typisches Tubuläres Myelin bilden können, scheinen eine normale Lungenfunktion zu haben (45).

Das extrazellulär vorliegende Tubuläre Myelin wird in einen einschichtigen Film umgewandelt, der die Luft-Wassergrenze der Alveolen auskleidet. Für die Formation des einschichtigen Films innerhalb physiologischer Zeitvorgaben ist die Anwesenheit der hydrophoben Proteine SP-B und SP-C erforderlich.

1.4.1 Surfactantsekretion

Die Sekretion des Surfactant und seiner Bestandteile war jahrelang Gegenstand intensiver Forschung, so daß heute viele Beeinflussungsfaktoren und Regulationsmechanismen bekannt sind. Als sekretionsfördernd gelten einerseits physikalische Faktoren wie die Dehnung der Lunge und andererseits chemische Substanzen, welche spezielle intrazelluläre Stoffwechselwege aktivieren (5). Weitere Einzelheiten siehe unter 1.7.

1.4.2 Surfactantwiederaufnahme

Der exakte Mechanismus der Surfactantwiederaufnahme von der Alveolaroberfläche sowie deren intrazellulärer Metabolismus durch Typ II-Zellen sind im Vergleich zur Sekretion bisher nur unzulänglich geklärt (5). Es gibt aber eine große Evidenz für eine stark regulierte Surfactanthomöostase, der Grund dafür ist die unter normalen Bedingungen konstante Menge an Surfactant. Da Surfactant ununterbrochen sezerniert wird, muß auch die Wiederaufnahme bzw. Clearance reguliert sein. Anhand von Studien in vitro wurde nachgewiesen, daß das „verbrauchte“ Surfactant zu 90% über die Typ II-Zelle wieder aufgenommen wird, während die restlichen 10% von den Alveolar-makrophagen abgebaut werden (92). In vivo Untersuchungen an Kaninchen und Ratten zeigen dagegen eine 65% -ige Lipidwiederaufnahme durch Typ II-Zellen (61).

Über den Aufnahme- bzw. Wiederaufnahmeprozess des Surfactant durch die Typ II-Zellen werden mehrere mögliche Wege postuliert:

I. Die klassische rezeptorvermittelte Endozytose:

SP-A bindet hochaffin an DPPC sowie an die SP-A Rezeptoren der Typ II-Zelle, der so gebildete SP-A/DPPC Komplex wird als eine Einheit internalisiert. Dieser Weg wurde als Aufnahme über clathrin coated pits und clathrin coated vesicles beschrieben (75), (87) (siehe Abb. 6).

II. Die Internalisation der zellulären Plasmamembran,

an deren extrazellulärer Oberfläche DPPC gebunden ist. Möglicherweise existieren Bindungsstellen für DPPC an der extrazellulären Seite der Zellmembran, die Resten von Lamellarbodymembranen entsprechen könnten. Diese würden postexozytotisch noch in der Zellmembran verankert sein und die Bindung von Surfactant an die Typ II-Zellen ermöglichen. Shuman et al. stellten einen monoklonalen Antikörper, das MAb 3C9, gegen ein integratives Lamellarbodymembranprotein (ABCA 3) her, welches sich auch an der Zellmembran von Typ II-Zellen nachweisen lässt (96). Auch in vivo konnten sie Beweise für eine „lamellarbodymembrangetriggerte“ Surfactantaufnahme finden (70). Dieser Weg ist als clathrinunabhängig, aber aktin- sowie zeit- und konzentrationsabhängig beschrieben worden (siehe Abb. 6).

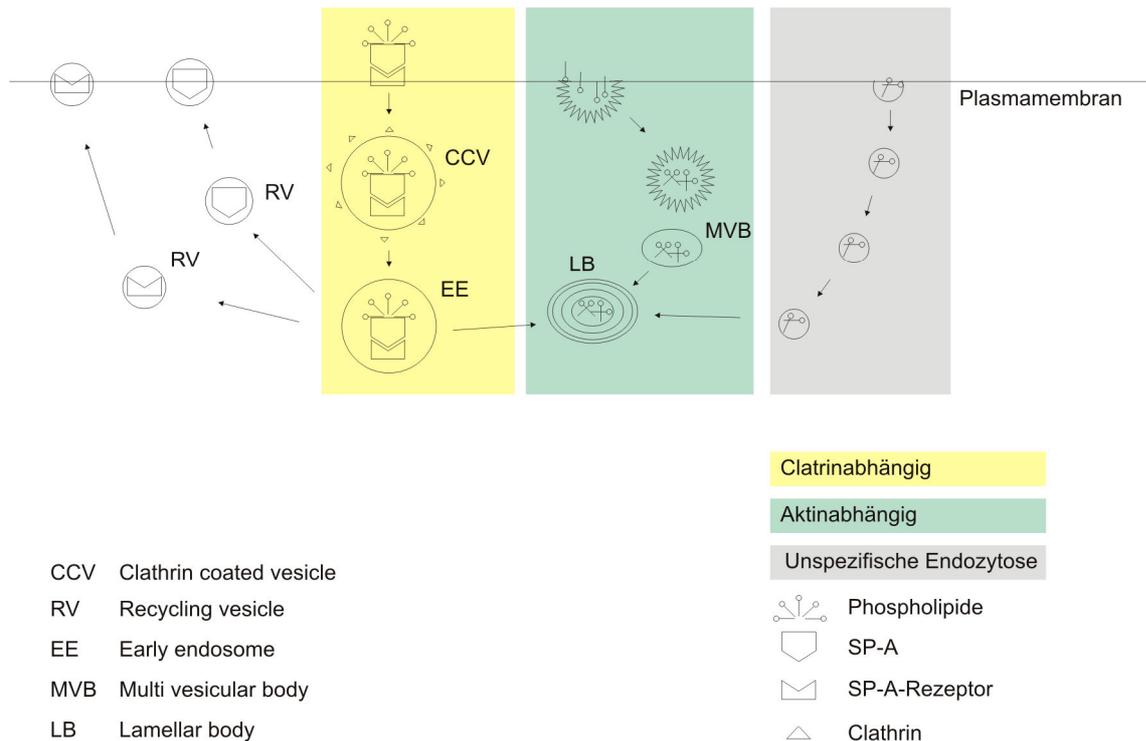


Abbildung 6: Aufnahmewege für Surfactant und seine Bestandteile

Für die Lipidaufnahme ohne surfactantassoziierte Proteine scheinen mehrere Wege möglich: ein clathrin- und ein aktinabhängiger Weg (28), (54), (66). Der Arbeitsgruppe um Rückert zufolge könnte der aktinabhängige Weg dem „lamellarbodymembrangetriggerten“ Aufnahmemechanismus entsprechen (66). Inhibiert man sowohl den clathrin- als auch den aktinabhängigen Weg, resultiert eine Lipidaufnahmehemmung von maximal 80%. Demzufolge muß ein alternativer Endozytoseweg existieren. Der caveolarvermittelte Aufnahmeweg ist aufgrund des Fehlens seiner Rezeptoren an Typ II-Zellen unwahrscheinlich (66). Die unspezifische Aufnahme über Fusion der Liposomen mit der Zellmembran erscheint hingegen wahrscheinlich.

Über den Einfluß der Mikrotubuli bei der Endozytose an Typ II-Zellen sind bisher wenig Daten publiziert worden.

Komplex erscheint die Tatsache, daß es Substanzen gibt, die zwar die Sekretion, nicht jedoch die Aufnahme von Phospholipiden beeinflussen. Das legt die Vermutung nahe, daß die Regulation der Wiederaufnahme der Lipide von der Sekretion der Lipide partiell oder komplett unabhängig sein könnte (29).

1.5 SP-A

SP-A wird ausschließlich in der Lunge und dem oberen Respirationstrakt exprimiert, den größten Teil produzieren die Typ II-Pneumozyten der Lunge.

1.5.1 Struktur

SP-A ist ein großes, oktadekames Protein mit einem Molekulargewicht von 650 kDa. Es ist aus sechs Untereinheiten zusammengesetzt, wobei jede von diesen sechs aus tripelhelikalen Monomeren besteht. Die Tripelhelices werden aus SP-A Monomeren gebildet, die je nach Glycosylierungsgrad 26-35 kDa wiegen (31), (46). Die komplette Aminosäuresequenz des Monomers ist seit 1985 bekannt und zeigt nur geringfügige Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies (9).

1.5.2 Immunologische Eigenschaften

SP-A gehört wie das Akute-Phase-Protein MBP (Mannosebindendes Protein), Complement Faktor C1q, Conglutinin und Collectin-43 zu der Familie der Collectine. Collectine sind kollagenähnliche Proteine mit ähnlichem Strukturaufbau und besitzen eine immunologische Wirkung. Sie bestehen aus einem kollagenähnlichen Teil (auch als Körper oder Hals bezeichnet) und einer globulären Kopfregion. Letztere enthält die CRD (carbohydrate recognition domain), mit deren Hilfe die Collectine in der Lage sind, an vielfältige Pathogene bzw. deren kohlenhydratreiche Regionen zu binden und diese über Involvierung von Phagozyten unschädlich zu machen. Zu den bakteriellen Erregern gehören *E. coli*, *H. influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carini*, *Staphylococcus aureus*, Gruppe A und B Streptokokken sowie *Streptococcus pneumoniae*. Außerdem wirkt das SP-A gegen

zahlreiche Viren wie HSV (Herpes Simplex Virus), RSV (Respiratory Syncytial Virus), Influenza A, Cytomegalievirus (CMV) sowie Pilze (*Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*).

Die Bedeutung dieser immunologischen Funktionen zeigt sich deutlich bei SP-A-gen-inaktivierten Mäusen (SP-A $-/-$). Diese zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine vermehrte Infektanfälligkeit für die oben genannten Erreger sowie eine frühere und stärkere Entzündungsreaktion (46), (90), (91).

1.5.3 Biophysikalische Eigenschaften

SP-A besitzt *in vitro* die Fähigkeit, die Lipidaufnahme durch Typ II-Zellen und Makrophagen zu steigern, sowie das intrazelluläre „Recycling“ des DPPC zu erhöhen (94). Zusätzlich ist es in der Lage, die Phospholipidsekretion *in vitro* zu hemmen (24). *In vivo* Versuche an SP-A-geninaktivierten Mäusen (SP-A $-/-$) konnten diese Ergebnisse bisher nicht bestätigen. Diese Mäuse wiesen eine normale respiratorische Funktion, eine typische Typ II-Zellmorphologie und ein unverändertes perinatales Überleben auf, obwohl sie im Vergleich zum Wildtyp (SP-A $+/+$) kein Tubuläres Myelin bilden konnten (39), (45), (46).

1.5.4 SP-A Metabolismus

Das surfactantassoziierte Protein A (SP-A) wird im endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet und im Golgi-Apparat glykosyliert. Anschließend wird es in die Lamellarkörperchen transportiert, von wo es gemeinsam mit Phospholipiden und den hydrophoben Surfactantproteinen sezerniert wird. Es ist integrativer Bestandteil des Tubulären Myelins in der alveolaren Subphase, welches als Surfactantreservoir angesehen werden kann. Nach der Sekretion wird das SP-A über CCP und CCV wieder durch Typ II-Pneumozyten aufgenommen (74), (76), (86). Weitere Einzelheiten zur Surfactantwiederaufnahme sind unter 1.4.2 beschrieben.

1.6 SP-B

Das SP-B wird in Typ II-Zellen sowie in Clara-Zellen der Lunge, aber auch in Zellen des Gastrointestinaltrakts und der Tuba auditiva gebildet (27).

1.6.1 Struktur

Das SP-B ist ein kleines, stark hydrophobes Protein und besteht aus 79 Aminosäuren. Die aktive Form des Moleküls entsteht durch intrazelluläre Umformung aus einem großen 42 kDa schweren Vorläuferprotein.

Innerhalb des Alveolarraums liegt das SP-B als Homodimer mit einem Molekulargewicht von 18 kDa vor (35), (43), dabei sind zwei SP-B Moleküle über Disulfidbrücken untereinander verbunden (33), (56). Die Sekundärstruktur entspricht größtenteils einer α -Helix (21). Über die Tertiär- sowie Quartärstruktur des SP-B in Lipidmembranen gibt es bis jetzt nur Vermutungen, da die Größe und Hydrophobizität des Proteins die Erforschung der dreidimensionalen Struktur erheblich erschweren. Bei der Anordnung spielen α -Helices und β -Formationen eine große Rolle (27), (71), (85), (95). Einige Arbeitsgruppen untersuchen daher gentechnisch hergestellte Peptidanaloga mit isolierten SP-B Sequenzen wie das SP-B₁₋₂₅ (10) und das SP-B₉₋₃₆ (25) bzw. chemisch veränderte SP-B Proteine (71). Eine schematische Anordnung des nativen SP-B Moleküls in Phospholipiddoppelschichten haben die Arbeitsgruppen um Gortner, Perez-Gil und Zaltash veröffentlicht (27), (56), (95).

Das SP-B gehört wie auch Saposin A-D, die zytotoxische T-Zelle und NK-Lysin zu den saposin like proteins (SAPLIP) (33). Neben den gemeinsamen Strukturelementen zeichnen sie sich durch spezielle Eigenschaften aus:

1. die Bildung reifer Proteine aus sehr großen Vorläuferproteinen
2. die Bindung an negativ geladene membranständige Phospholipide
3. die daran anschließende Fusion oder Lyse dieser Membranen

1.6.2 Extrazelluläre Eigenschaften

Eine der Hauptfunktionen des SP-B besteht, insbesondere während der Inspiration, in der Beschleunigung der Bildung eines einschichtigen, oberflächenaktiven Films an der Luft-Wassergrenze der Lunge sowie dessen Stabilisierung (35), (43), (80).

Auch während der Expiration scheint SP-B, neben SP-C, eine entscheidende Rolle zu spielen. Um die kleinstmögliche Oberflächenspannung der Alveolen unter dem Expirationsdruck zu ermöglichen, wäre ein nahezu aus DPPC bestehender Film nötig. Nach der „squeezed out“-Hypothese werden am Ende der Expiration alle nicht DPPC-Komponenten aus dem Monolayer an der Luft-Wasser-Oberfläche ausgepreßt und verbleiben möglicherweise direkt unterhalb des einschichtigen Films als Lipid-Protein-Komplexe, um bei der nächsten Inspiration wieder integriert werden zu können. Bei dieser Exklusion während der Expiration und deren Reintegration wird den Proteinen SP-B und SP-C eine entscheidende regulative Rolle zugeschrieben (55), (56), (79).

Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaft ermöglicht SP-B eine Fusion von Lipidvesikeln, welche als Voraussetzung für die Interaktion von SP-B mit Mono- bzw. Bilayern angesehen werden kann (33), (95). SP-B ist so in der Lage, an Membranen zu binden, diese durch Lyse aufzutrennen und auch wieder zu fusionieren. Durch diese Fähigkeit könnte SP-B auch als „Bereitsteller“ für große Surfactantreservoirs in der Subphase des Alveolus fungieren (56).

SP-B, so wie auch SP-C, sind in der Lage, die Inaktivierung von Phospholipiden durch Serumproteine zu bremsen bzw. ganz zu verhindern. Zusammen mit SP-A und Ca^{2+} -Ionen bildet SP-B einen Bestandteil des Tubulären Myelins.

1.6.3 Intrazelluläre Eigenschaften

SP-B ist an der Genese von Lamellarbodies beteiligt (33), (85). Von welcher Bedeutung diese Funktion ist, zeigt sich bei Kindern, die an einer angeborenen, homozygoten SP-B Mutation (SP-B $-/-$) leiden und deshalb kein funktionsfähiges SP-B bilden können.

Diese Kinder entwickeln kurz nach der Geburt ein respiratorisches Versagen, welches gegenüber Surfactantgabe behandlungsresistent ist und ohne Lungentransplantation innerhalb eines Jahres zum Tode führt (7), (27), (81), (84). Untersuchungen des Lungengewebes betroffener Kinder zeigen starke strukturelle Veränderungen und beeinträchtigte biochemische Eigenschaften des Surfactant. Elektronenmikroskopisch finden sich keine reifen Lamellarbodies, dafür eine Menge an Multivesiculabodies. In den Alveoli findet sich eine Anhäufung an zerstörten Lamellarbodies, schaumigen Makrophagen, akkumuliertes SP-A sowie unreifes SP-C im Sinne einer "Alveolären Proteinose" (7). Studien an SP-B-geninaktivierten Mäusen zeigen ein ähnliches Bild: SP-B Mangel führt zu disorganisierten Lamellarbodies, da die Phospholipide nicht in konzentrische Lamellen verpackt werden können (81). Das völlige Fehlen von endogenem SP-B führt zu einer gestörten Prozessierung des SP-C Präkursorproteins und damit zu seiner Anhäufung in den Alveolen.

1.6.4 SP-B Metabolismus

Das SP-B wird als Vorläuferprotein im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und anschließend im Golgi-Apparat glykosyliert. Nach proteolytischer Spaltung in das mature SP-B erfolgt der Transport in die Lamellarkörperchen und die weitere Assoziation an die Surfactantphospholipide sowie an das surfactantassoziierte Protein C (SP-C). Im Folgenden findet die Sekretion der Lamellarkörperchen in die Subphase statt.

Bis heute gibt es nur unzureichende Kenntnisse über den Einfluß von SP-B auf die Aufnahme von Lipiden in die Typ II-Zelle. Die Arbeitsgruppe um Rice konnte 1989 nachweisen, daß sowohl natürliches als auch synthetisches SP-B in der Lage ist, die Lipidaufnahme in vitro zu stimulieren (64). Sie gehen davon aus, daß die Steigerung der Lipidaufnahme vermutlich durch unspezifische Mechanismen, wie z.B. die Veränderung der Liposomengröße, erfolgt. Weiterhin stellte die Arbeitsgruppe fest, daß der Effekt des SP-B auf die Aufnahme von Phospholipiden zwar dosisabhängig doch weder sättigbar noch zellspezifisch ist und sowohl bei 37°C als auch bei 4°C gleichermaßen stattfindet. Deshalb kamen sie zu dem Schluß, daß SP-B wie Lipide ohne

surfactantassoziierte Proteine nicht rezeptorvermittelt aufgenommen wird (64). Weiterhin konnte eine Clathrinunabhängigkeit der SP-B Aufnahme und der damit assoziierten Lipide nachgewiesen werden (15). Vermutet wird auch ein intrazellulärer Recyclingweg für SP-B, welcher dem der Lipide ähnlich sein könnte. Dafür spricht, daß das internalisierte SP-B nicht weiter abgebaut, sondern in Lamellarbodies transportiert und wieder reseziert wird.

Dagegen findet die Forschungsgruppe um Fisher Hinweise für eine rezeptorabhängige Aufnahme von SP-B durch die Typ II-Zellen, da sich die Aufnahme als hochaffin, sättigbar, zeit- und konzentrationsabhängig sowie durch unmarkiertes SP-B hemmbar erwies. Voraussetzung für die hochaffine Bindung von SP-B an die Typ II-Zelle ist das Vorhandensein von Phospholipiden (4). Auch diese Arbeitsgruppe vermutet einen Recyclingweg für SP-B und die damit assoziierten Lipide in Typ II-Pneumozyten.

1.7 Signaltransduktion

Die Zellen kommunizieren miteinander und mit der Außenwelt durch eine Vielzahl von Signalmolekülen - dazu gehören Hormone, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter, Zytokine und viele andere Substanzen. Um ihre Wirkung an der Zielzelle zu entfalten, müssen diese Signalmoleküle erst an spezifische Rezeptoren (Andockstellen) binden und setzen dann weitere biochemische Reaktionen in Gang. Die Überführung eines extrazellulären in ein intrazelluläres Signal wird als Signaltransduktion bezeichnet. Je nachdem wo die Liganden (Signalmoleküle) an ihren Rezeptor binden, unterscheidet man intra- und extrazelluläre Rezeptoren.

Moleküle, die die Phospholipidmembran aufgrund ihres hydrophilen Charakters nicht frei passieren können, werden durch verschiedene Gruppen von membranständigen Rezeptoren erkannt und führen zu Folgereaktionen im Zytoplasma der Zielzelle. Dieses kann entweder durch den Rezeptor selbst (Konformationsänderung) oder über zwischengeschaltete Elemente in Gang gesetzt werden. An dieser Stelle ein Überblick über die häufigsten Rezeptoren (49):

- I. intrazelluläre Rezeptoren: z. B. Steroid- und Schilddrüsenhormonrezeptoren; Steroide und Schilddrüsenhormone durchdringen aufgrund ihres lipophilen Charakters die Zell- und Kernmembran und docken dort an spezifische Rezeptoren an, beeinflussen die Expression bestimmter Gene und führen damit zur gesteigerten oder gehemmten Biosynthese von Proteinen bzw. Enzymen.
- II. membranassoziierte Rezeptoren: integrale Membranproteine bilden Rezeptoren, an die Signalstoffe andocken und eine intrazelluläre Wirkung über sogenannte „second messenger“ entfalten. Membranassoziierte Rezeptoren können in vier Familien mit unterschiedlichem Aufbau eingeteilt werden (13):
 - a) kanalgekoppelte Rezeptoren: Rezeptor und Ionenkanal gleichzeitig, insbesondere für die Signalübertragung zwischen elektrisch reizbaren Zellen verantwortlich; die Liganden werden auch Neurotransmitter genannt; z. B. nikotinischer Acetylcholinrezeptor/Natriumkanal an der postsynaptischen Membran.

b) G-Proteingekoppelte Rezeptoren: diese aktivieren/deaktivieren ein intrazelluläres Protein/Enzym über sogenannte „second messenger“.

- Adenylatcyclase (AC) und Proteinkinase A (PKA) mit cAMP als second messenger: stimulierende oder hemmende Substanzen binden an ihre entsprechenden Rezeptoren (R_s) bzw. (R_i) und leiten das Signal nach Bindung auf ein heterotrimeres Protein (G_s) bzw. (G_i) weiter, welches wiederum zur Aktivierung/Hemmung der Adenylatcyclase befähigt ist und zur vermehrten bzw. verminderten Bildung von cAMP führt (siehe Abb. 7). Das cAMP hat eine einzige intrazelluläre Funktion: Aktivierung der PKA, die ihrerseits Proteine phosphoryliert. Die Phosphodiesterase „inaktiviert“ das cAMP, indem es das cAMP in AMP umwandelt.

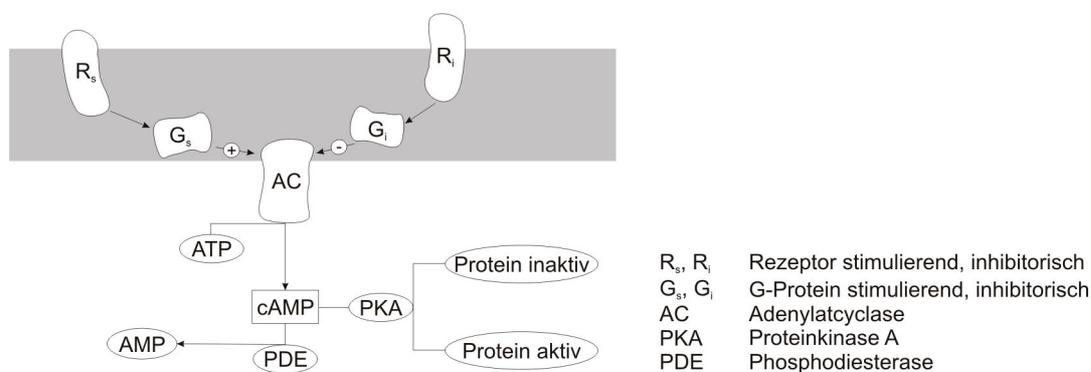


Abbildung 7: Adenylatcyclase

- Phospholipase C (PLC) und Proteinkinase C (PKC) mit Inositoltrisphosphat sowie Diacylglycerol als second messenger: eine Reihe von Signalmolekülen lösen nach Wechselwirkung mit dem in der Plasmamembran verankerten Rezeptor einen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration aus, was zu spezifischen Änderungen des Stoffwechsels der Zielzelle führt (siehe Abb. 8). Als intrazellulärer Überträgerstoff fungiert dabei das Inositoltrisphosphat (IP3), welches durch Phosphorylierung aus Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP_2) gebildet wird und zur intrazellulären Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen führt. Für diesen Vorgang ist die Aktivierung der PLC erforderlich. Ein häufig gebrauchtes Synonym für die PLC ist die Phosphatidylinositol 3-Kinase. Als weiteres Reaktionsprodukt entsteht das Diacylglycerol, welches zur Aktivierung der PKC führt, die in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen katalytisch wirksam wird. Der second messenger IP3 ist außerdem in der Lage, die Proteinkinase B (PKB) zu aktivieren (siehe Abb. 8).

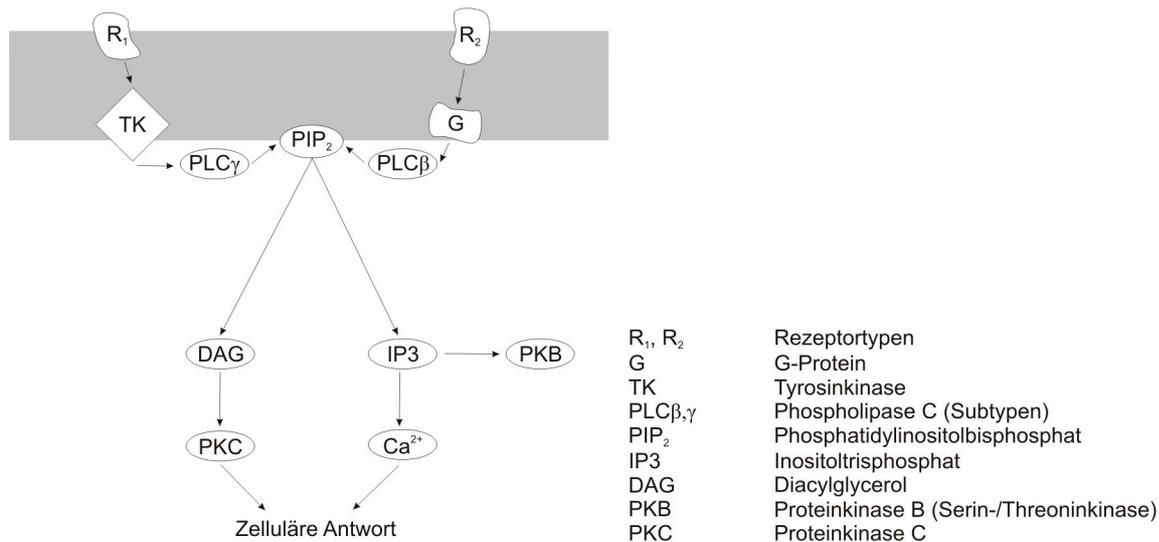


Abbildung 8: Phospholipase C

- c) Rezeptor-Tyrosinkinasen und Rezeptoren mit assoziierten Tyrosinkinasen (TK): Tyrosinkinaserzeptoren binden nach Aktivierung ebenfalls an die PLC und führen zu den unter IIb beschriebenen Vorgängen (siehe Abb. 8).
- d) membrangebundene Guanylatcyclasen (ein der AC ähnliches System): nach Bindung des Liganden an den Rezeptor kommt es zur Aktivierung der Guanylatcyclase, die zur Bildung von cGMP führt. Das cGMP kann Proteinkinasen aktivieren oder Ionenkanäle öffnen und ist eine dem cAMP analoge Verbindung. Beispielhaft seien hier die löslichen Guanylatcyclasen erwähnt, die über Stimulation mit NO zur Relaxation der glatten Muskulatur führen (Vasodilatoren).

Während die klassischen Hormone über den Blutstrom auch weiter entfernte Zielgewebe erreichen, wirken Zytokine, die auch als Gewebshormone bezeichnet werden, parakrin oder autokrin. Zu ihnen gehören Wachstumsfaktoren, Interleukine, Interferone und Chemokine. Bei der Signalübertragung der Zytokine unterscheidet man: Rezeptor-Tyrosinkinasen bzw. Rezeptoren mit assoziierten Tyrosinkinasen sowie G-Proteingekoppelte Rezeptoren. Zur weiteren Funktionsweise der Signaltransduktion der Zytokine sei auf die aktuellen Physiologie- und Biochemiebücher verwiesen.

Auch an Typ II-Zellen sind die Vorgänge der Signaltransduktion untersucht worden, insbesondere in Hinblick auf die Surfactantsekretion. Bereits 1987 haben Sano et al. nachgewiesen, daß die Sekretionsförderung sowohl über Depolarisation der Zellmembran als auch depolarisationsunabhängig verläuft (69). Die Depolarisation wurde dabei durch eine extrazelluläre Kaliumkonzentrationserhöhung ausgelöst, die depolarisationsunabhängige Steigerung der Sekretion wurde durch spezielle Substanzen (TPA, Terbutalin, IBMX) hervorgerufen (69). IBMX ist ein unspezifischer Inhibitor der cAMP und cGMP Phosphodiesterase (siehe Abb. 9).

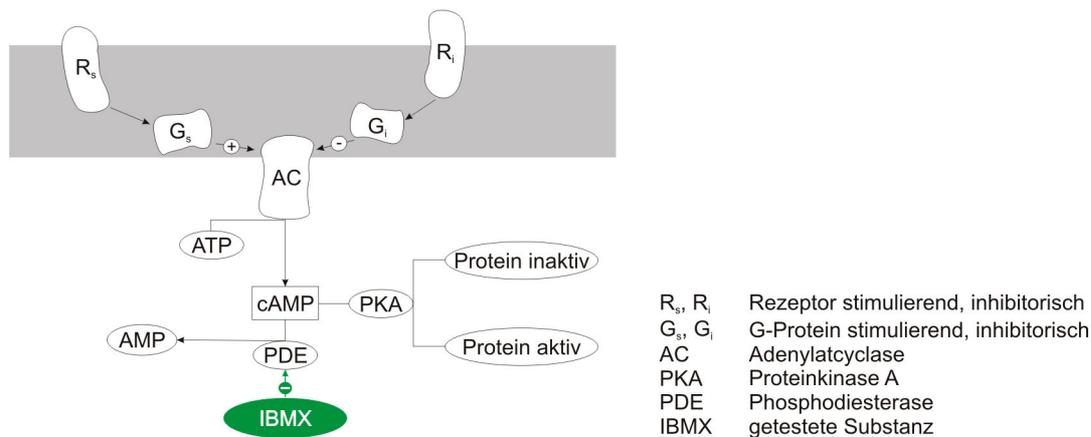


Abbildung 9: Adenylatcyclase mit cAMP und G-Proteinen und deren Beeinflussung durch IBMX

Rooney et al. konnten nachweisen, daß Surfactantsekretion über drei unterschiedliche Mechanismen reguliert werden kann, von denen alle durch ATP stimulierbar sind. Dabei spielen die AC mit nachfolgender cAMP-Erhöhung sowie die PKC und der calziumregulierte Mechanismus eine Rolle (26), (65) (zur Funktionsweise der PKC siehe Abb. 8).

Die Beteiligung von TK scheint ausgeschlossen (26), (65). Auch andere Arbeitsgruppen finden Beweise für die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden bei der Surfactantsekretion: cAMP und PKA (8), (59), PLC und IP3 (83). Mehrere Arbeitsgruppen konnten bei der Sekretion von Surfactant bzw. Phospholipiden zusätzlich die Involvierung von G-Proteinen nachweisen (58) (zur Funktionsweise der G-Proteine siehe Abb. 7 und 8).

Es gibt allerdings nur vereinzelt Daten in der Literatur über Signaltransduktion und Endozytose von Surfactant und seinen Bestandteilen. Griese et al. haben in ihrer Arbeit postuliert, daß die Surfactantaufnahme von der Surfactantsekretion unabhängig reguliert sein könnte, da Sekretionsförderer sich auf die Aufnahme von Liposomen als partiell oder komplett wirkungslos erwiesen (28), (29).

1.8 Ziele der Arbeit

In Hinsicht auf Endozytose von Lipiden in Typ II-Zellen in Anwesenheit von SP-B in vitro ergeben sich folgende Schwerpunkte der Aufgabenstellung:

1. Einfluß des SP-B auf die Aufnahme von Lipiden im Vergleich zu einfachen Liposomen.
 - a) Wie beeinflusst SP-B die Lipidaufnahme?
 - b) Ist die Lipidaufnahme mit SP-B abhängig von Clathrin?
 - c) Ist die Lipidaufnahme mit SP-B abhängig von Tubulin?
 - d) Wie verändert sich die Endozytose der Lipide mit SP-B bei zusätzlicher Gabe von SP-A?
2. Untersuchung der Signaltransduktionskaskaden bei der Endozytose von Lipiden: dabei interessierten uns insbesondere jene Wege, die bereits bei der Sekretion von Lipiden bzw. Surfactant intensiver untersucht worden sind. Dies sind die Adenylatcyclase mit dem second messenger cAMP sowie die Phospholipase C mit den second messengern IP3 und Diacylglycerol und der Einfluß der G-Proteine.
 - a) Sind unterschiedliche Signaltransduktionswege bei der Internalisation von Lipiden mit SP-B im Vergleich zu einfachen Liposomen beteiligt?
 - b) Inwieweit modifiziert das SP-A diese Signaltransduktionswege?

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Bovine Serum Albumin (BSA), CaCl_2 , KCl , MgSO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ und $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ von Merck;

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), PBS, Fetales Kälberserum (FKS) von Gibco;

Glucose, EGTA, DNase, HEPES, 3-Isobutyl-1-Methylxanthine (IBMX), Forskolin, Crystalviolett, Color Marker Ultra-Low Range für SDS-Elektrophorese (Molekulargewicht 1,06-26,6 Da) von Sigma;

Wortmannin, Calphostin C, Nocodazole, Guanosin 5'-O-(3 Thiotriphosphat) [GTP γ] von Calbiochem;

Rat purified Immunglobulin (IgG) von ICN;

Pentobarbital-Natrium (Nembutal) von Synopharm;

Elastase von Roche;

NaCl von Braun;

Prestained Protein Marker, Broad Range von New England BioLabs für SDS-Elektrophorese (Molekulargewicht 6,5-175 Da);

Trypanblau von Serva Feinbiochemica GmbH & Co;

Optiphase 'HiSafe' liquid scintillations cocktail von Wallac scintillations products manufactured by Fisher chemicals;

Säulenmaterial Sephadex LH 20 und LH 60 von Pharmacia Fine Chemicals

2.2 Präparation von Alveolar Typ II-Zellen

Typ II-Pneumozyten wurden nach der Methode von Dobbs et al. (23) aus männlichen Wistarratten (100-150 g) isoliert.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Crystalviolettlösung (50 µl Zellsuspension und 200 µl Crystalviolett). Außerdem bestimmten wir die Vitalität der Typ II-Pneumozyten zum Zeitpunkt 0 und am Ende jedes Experiments unter Zuhilfenahme von Trypanblau (90 µl Zellsuspension und 10 µl Trypanblau). Sie betrug $93\% \pm 3\%$ SD. Weiterhin führten wir eine Reinheitsprüfung der Typ II-Zellen mittels Auszählung der nach PAP gefärbten Zellen (modified Papanicolaou stain) unter dem Mikroskop durch. Sie betrug bei unseren Versuchen $91\% \pm 2\%$ SD.

2.3 SP-A Gewinnung

SP-A konnten wir aus Schafslungen, die von brandenburgischen Schlachthöfen zur Verfügung gestellt wurden, isolieren. Die Extraktion erfolgte nach der Methode von Hawgood et al. (36). Das so isolierte SP-A bewahrten wir bei -80°C auf. Die Reinheit des SP-A wurde in der SDS-Elektrophorese mit anschließendem Westernblot nachgewiesen. Die Testung der Funktion des SP-A erfolgte im Lipidaufnahme-Assay. Dabei untersuchten wir die Steigerung der Lipidaufnahme an Typ II-Pneumozyten im Vergleich zur Lipidaufnahme ohne SP-A. Anschließend führten wir eine Testung nach Dobbs et al. (24) durch, ob mittels SP-A die Lipidsekretionshemmung eintrat. Desweiteren erfolgten die Lipidaggregationsprüfung des SP-A nach Hawgood (34) sowie die Bestimmung des LPS-Gehalts nach Bartlett in der Modifikation nach Zöllner und Eberhagen (2), (97).

2.4 SP-B Gewinnung

2.4.1 Aufreinigung von SP-B

Bei der Gewinnung des hydrophilen SP-A aus Schafslungenlavage wurde das Butanolextrakt, in dem lipophile Substanzen gelöst sind, aufgehoben und daraus anschließend SP-B isoliert.

Als erster Schritt erfolgte die Konzentration des Butanolextraktes in einem Rotationsverdampfer. Die konzentrierte Lösung trugen wir auf eine LH 20-Säule auf, Fraktionen von 2-3 ml wurden dabei über einen Kollektor aufgefangen. Anschließend wurde die Extinktion jeder Fraktion bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen (214 nm und 280 nm) gemessen. Bei der Photometrie werden über die Wellenlänge 214 nm die Peptidbindungen gemessen und über 280 nm die aromatischen Bindungen. Man erwartet bei Fraktionen, in denen SP-B enthalten ist, einen Anstieg der Extinktionen bei beiden Wellenlängen. Hingegen zeigen die SP-C enthaltenen Fraktionen nur einen Anstieg bei 214 nm.

Der erste Peak (alle Proben mit deutlichem Extinktionsanstieg bei beiden Wellenlängen) enthielt das SP-B/SP-C Gemisch. Als nächstes schloß sich die Trennung der lipophilen Proteine SP-B und SP-C an. Alle dieses Gemisch enthaltenden Proben (ca. 5-7 Proben) wurden gepoolt und in der Speedvac eingeeengt. Diese trugen wir anschließend auf die LH 60-Säule auf und sammelten Fraktionen von je 5 ml. Im nächsten Schritt wurden jeweils 20 µl aus jeder Fraktion entnommen, in einer Speedvac eingeeengt, in einen nichtreduzierenden Puffer aufgenommen und auf ein Tricine-Gel aufgetragen. Daran schloß sich eine Silberfärbung der Tricine-Gele an. Anhand der beiden im Gel mitlaufenden Proteinmarker konnten wir die SP-B enthaltende Fraktionen bei einem Molekulargewicht der SP-B-Monomere ca. 6-8 kDa eindeutig identifizieren. Zusätzlich erfolgte der Nachweis des SP-B über einen Immuno-Westernblot (siehe Abb. 10).

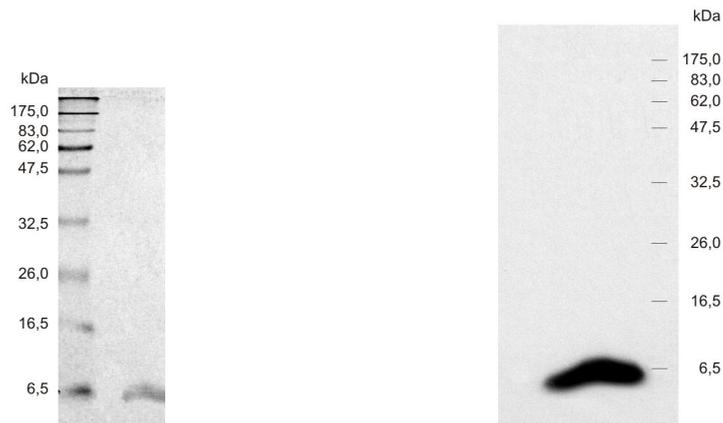


Abbildung 10: SP-B im Tricine-Gel (links) und Immuno-Westernblot (rechts)

Die SP-B haltigen Fraktionen wurden gepoolt und die Proteinkonzentration des SP-B bestimmt. Das isolierte SP-B überprüften wir anschließend auf das Vorhandensein von restlichem Lipid mittels der Phospholipidextraktion nach Bligh und Dyer (11) und anschließender Bestimmung des LPS-Gehalts nach Bartlett (2) in der Modifikation nach Zöllner und Eberhagen (97).

2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die SP-B Proteinkonzentration bestimmten wir durch den Fluorescamine Assay nach der Methode von Böhlen und Stein (12) am Fluorometer.

benötigte Lösungen:

- Fluorescamine 9 mg Fluorescamine ad 30 ml Dioxan
- 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 8,0)
A) 0,069 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ in 10 ml H_2O
B) 0,445 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in 50 ml H_2O
Lsg. B mit Lsg. A bis pH 8,0 titrieren,
beide Lösungen wurden immer frisch
angesetzt
- BSA-Stammlösung 200 μg BSA/ml H_2O

Vorbereitung der Proben:

- zwei mal 5 µl und zwei mal 10 µl des SP-B Gemisches waren in Eppendorfgefäße zu pipettieren (Doppelwerte)
- vollständige Eintrocknung mittels Speedvac
- Hinzugabe von 100 µl 10% SDS zu jeder Probe, Vortexen, Einritzen des Deckels mit einem Skalpell sowie Abdeckung mit Parafilm, 5 min. Kochen
- Zentrifugation und Abkühlung bei Raumtemperatur

Durchführung:

(sowohl die Standard- als auch die Probenreihe wurden in Glasröhrchen 10 mm *100 mm angesetzt)

Standardreihe (Doppelbestimmung) entsprechend Tabelle 2 herstellen:

BSA Menge (µg)	BSA-Stammlsg. (µl)	Natriumphosphatpuffer (µl)	Anzeige im Photometer
0	0	1500	0 µg/ml
1	5	1495	0,5 µg/ml
5	25	1475	2,5 µg/ml
10	50	1450	5,0 µg/ml
15	75	1425	7,5 µg/ml
20	100	1400	10,0 µg/ml

Tabelle 2: Standardreihe

Probenansätze (Doppelbestimmung) entsprechend Tabelle 3 vorbereiten:

Probe (µl)	Natriumphosphatpuffer (µl)
5 in 100 µl SDS gelöst	1400
10 in 100 µl SDS gelöst	1400

Tabelle 3: Probenreihe SP-B

Jeder Probe (Standardreihe und SP-B-Proben) wurden einzeln während des Vortexens je 0,5 ml Fluorescaminelösung hinzugegeben. Nach Umfüllen der Mischung in eine Quarzküvette bestimmten wir die Extinktion exakt 3 min. nach Zugabe des Fluorescamines. Jede Probe wurde am Fluorophotometer (SHIMADZU RF-50001 PC) bei 390 und 475 nm gemessen. Anhand der gemessenen Extinktionen der Proben wurde unter zu Hilfenahme der Standardreihe die SP-B Menge/Konzentration berechnet.

2.5 Aufnahmeversuche

2.5.1 Herstellung von Liposomen

Die Liposomen für die Aufnahmeassays an Alveolar Typ II-Zellen von Ratten wurden nach einer modifizierten Methode von Chander et al. (17) hergestellt.

benötigte Lösungen:

5,5 mg L- α -dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)

2,5 mg L- α -phosphatidylcholine (PC)

1 mg L- α -phosphatidyl-DL-glycerol (PG)

1 mg Cholesterol

14,6 μ Ci [3 H] DPPC

Durchführung:

Alle Bestandteile wurden sorgfältig gemischt und vollständig in einer Speedvac eingetrocknet. Die Lipidpellets nahmen wir in 1 ml 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,4) auf, anschließend erfolgte ein dreiminütiges Schallen der Lipidsuspension bei 50°C und 40 % Power mittels Bandelin Ultraschallgerät. Die Liposomen wurden für 16-20 h bei 4°C gelagert und anschließend bei Raumtemperatur aufgewärmt, anschließend 5 Minuten lang bei 22°C und 1000 \times g zur Entfernung großer Lipidaggregate zentrifugiert. Nach Abnahme des liposomenhaltigen Überstandes bewahrten wir diesen für weitere Versuche bei 4°C auf.

Bei den nun folgenden Aufnahmeversuchen werden 15 μ l Liposomen für je $2,5 \times 10^6$ Typ II-Zellen / 1 ml DMEM eingesetzt.

Bei der Herstellung der SP-B Liposomen wird zuerst die SP-B Fraktion vollständig in einer Speedvac eingetrocknet. Nach Zugabe von Lipiden verfährt man, wie für einfache Liposomen unter 2.5.1 beschrieben, weiter. Auch bei den Aufnahmeversuchen mit SP-B Liposomen setzen wir 15 μ l Liposomen für je $2,5 \times 10^6$ Typ II-Zellen / 1 ml DMEM ein, was einer Menge von 2 μ g SP-B / $2,5 \times 10^6$ Typ II-Zellen entspricht.

2.5.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in den einzelnen Ansätzen erfolgte nach der Methode von Bradford (14). Bei diesem sogenannten Microassay liegt die Sensitivität zwischen 1 und 20 µg Protein und ist damit für unsere Proben geeignet. Das eingesetzte Bio-Rad Dye Reagent Concentrate (Coomassie Brilliant Blau-G250) verändert durch Bindung an das Protein sein Absorptionsmaximum und anhand der gemessenen Extinktion kann die Proteinkonzentration berechnet werden. Die Eichkurve erstellen wir mit einer Standardreihe aus einer BSA-Stammlösung (200 µg BSA/ml H₂O) entsprechend Tabelle 4.

BSA-Menge in µg	BSA-Stammlsg. in µl	aqua dest in µl
0	0	800
1	5	795
5	25	775
10	50	750
15	75	725
20	100	700

Tabelle 4: BSA-Stammlösung

Zu jedem Probenansatz aus dem Aufnahmeversuch (10 µl) fügten wir jeweils 790 µl aqua dest. sowie 200 µl Bio-Rad Dye Reagent Concentrate zu. Nach gründlichem Vortexen wurden die Suspensionen in Küvetten überführt und die Extinktion innerhalb von 1 h bei 595 nm am Photometer gemessen.

2.5.3 Aufnahmeassays

Die Aufnahmeassays wurden entsprechend der 1996 beschriebenen Methode unserer Arbeitsgruppe durchgeführt (87).

Jeder Ansatz ($n=1$) entsprach $2,5 \times 10^6$ Zellen gelöst in 1 ml 0,1% BSA-DMEM. Sofern nicht anders angegeben, wurde grundsätzlich bei SP-A bzw. SP-B Verwendung pro Ansatz 10 μg SP-A bzw. 2 μg SP-B hinzugefügt.

Als erstes wurde die benötigte Anzahl an Typ II-Zellen hergestellt, welche auf Eis in entsprechende Portionen unterteilt und 20-30 Minuten bei 37°C im Wasserbad vorinkubiert worden sind. Den Zellen fügten wir im zweiten Schritt SP-B sowie SP-A auf Eis hinzu. Zur Bindung der zugegebenen Substanzen beließen wir die Zellsuspension für weitere 5 Minuten auf Eis. Es schloss sich eine Inkubation mit der jeweiligen Substanz (Aktivator/Inhibitor) für 10 Minuten im 37°C warmen Wasserbad an. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Ansätze sofort bei 900 rpm und 4°C zentrifugiert, jeweils dreimal mit 3% BSA- und 10 mM EGTA-DMEM sowie mit DMEM ohne Zusätze gewaschen. Zusätzlich bestimmten wir die Vitalität der Typ II-Zellen mit Trypanblaulösung (siehe auch 2.2.2). Der Überstand wurde verworfen und je 200 μl aqua dest. je Zellpellet (d. h. je $2,5 \times 10^6$ Zellen) zugesetzt. Jeden Ansatz schallten wir 2 mal je 10 Sekunden bei 40% Power mit der Bandelin-Ultraschallsonde. Aus jedem Probenansatz erfolgte die zweimalige Entnahme von 10 μl für die Proteinbestimmung. (Die Proteinwerte wurden wie unter 2.5.2 beschrieben bestimmt.) Die restliche Probe (180 μl) wurde in Szintillationsröhrchen überführt, mit 300 μl Methanol sowie 4 ml Szintillationsmedium versetzt, gevortext und 5 Minuten im Counter gemessen. Die in dpm bestimmte Radioaktivität wurde zu den in μg gemessenen Proteinwerten ins Verhältnis gesetzt und als dpm/ μg Protein ausgedrückt.

2.5.3.1 Aufnahmeversuche zur Konzentrationsabhängigkeit von SP-B

Versuchsaufbau:

1	0 µg SP-B/ml Medium/2,5×10 ⁶ Zellen
2	0,5 µg SP-B/ml Medium/2,5×10 ⁶ Zellen
3	1 µg SP-B/ml Medium/2,5×10 ⁶ Zellen
4	2 µg SP-B/ml Medium/2,5×10 ⁶ Zellen
5	4 µg SP-B/ml Medium/2,5×10 ⁶ Zellen
6	8 µg SP-B/ml Medium/2,5×10 ⁶ Zellen

Tabelle 5: SP-B Liposomen unterschiedlicher Konzentration

Versuchsdurchführung:

Als erster Schritt erfolgte die Teilung der Zellen Portionen je 2,5 Mio auf Eis sowie eine 10 Minuten Zentrifugation bei 4°C und 900 rpm. Der Überstand wurde verworfen und jeder Ansatz in 1 ml 0,1% BSA-DMEM aufgenommen. Die Ansätze wurden, wie in Tabelle 5 dargestellt, mit SP-B versetzt, gevortext und für 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert, wobei die Zellen in zweiminütigen Abständen geschüttelt worden sind. Die weitere Behandlung der Proben erfolgte wie unter 2.5.3 beschrieben.

2.5.3.2 Aufnahmeversuche unter Kaliumdepletionsbedingungen mit und ohne SP-A

Ansatz der kaliumhaltigen Lösung:

0,1% BSA-DMEM entspricht der kaliumhaltigen Lösung
(5,9 g Kalium/l = 0,15 M Lösung)

Ansatz der kaliumdepletierten Lösung:

20 mM Hepes pH 7,4

1 mM CaCl₂

1 mM MgCl₂

0,1% BSA

-ad 200 ml mit NaCl auffüllen

-direkt vor dem Einsatz 200 mg Glucose hinzugeben, mischen und steril filtrieren

Versuchsdurchführung:

Nachdem alle Lösungen auf 37°C erwärmt worden sind, wurden die Zellen in zwei Portionen je 10 Mio geteilt. Die Zellen der ersten Fraktion wurden in einem Verhältnis 1:2 mit aqua dest. verdünnte kaliumhaltigen Lösung, die der zweiten Fraktion in einem Verhältnis 1:2 mit aqua dest. verdünnte kaliumdepletierten Lösung aufgenommen. Es schloß sich eine 5minütige Vorinkubation bei 37°C an. Nun unterteilten wir die Zellen bei 37°C in Ansätze je 5 Mio und zentrifugierten diese bei 900 rpm und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in unverdünnte 37°C warme kaliumhaltige bzw. kaliumdepletierte Lösung aufgenommen. Nach Zugabe von SP-B und SP-A inkubierten wir die Ansätze für weitere 10 Minuten im 37°C warmen Wasserbad. Anschließend erfolgte wiederum eine Zentrifugation bei 900 rpm und 4°C. Die Proben wurden wie unter 2.5.3 beschrieben gewaschen und weiterbehandelt.

2.5.3.3 Aufnahmeversuche mit IBMX, Forskolin, Tubulin, GTP γ Wortmannin, Calphostin C mit und ohne SP-A

Versuchsdurchführung:

Die isolierten Typ II-Zellen wurden auf Eis in zwei Portionen je 10 Mio unterteilt und für 20-30 Minuten mit der jeweiligen Substanz bei 37°C vorinkubiert. Anschließend teilten wir die Zellen auf Eis in Ansätze je 5 Mio, gaben Liposomen oder SP-B Liposomen sowie SP-A hinzu und beließen die Proben für 5 Minuten zur Bindung auf Eis. Daran schloss sich eine 10minütige Inkubationsphase im Wasserbad bei 37°C an. Die weiteren Schritte (Zentrifugation, Waschen und weitere Behandlung der Proben) erfolgten wie unter 2.5.3 beschrieben.

2.5.3.4 Statistik

Die Daten im Ergebnisteil sind als Mittelwerte mit den Standardabweichungen dargestellt. Für die statistische Analyse verwendeten wir die Einfache Varianzanalyse (ANOVA) und Fisher's PLSD Test, um signifikante Unterschiede zwischen den getesteten Gruppen nachzuweisen. Um die Versuche statistisch auswerten zu können, wurde jedes Experiment drei mal durchgeführt (n=3).

3 Ergebnisse

Unsere Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung der Lipidaufnahme von Typ II-Zellen *in vitro*. Vorrangiges Ziel war es dabei den Einfluß von SP-B auf die Lipidaufnahme aufzuklären. Unsere Arbeitshypothese war: Es gibt relevante Unterschiede bei der Aufnahme von Lipiden in An- und Abwesenheit von SP-B. Weiterhin sollten Fragen zur Konzentrationsabhängigkeit von SP-B, Abhängigkeit von Clathrin und Tubulin sowie zu intrazellulären Prozessen wie der Signaltransduktion beantwortet werden. Bei der Signaltransduktion beschränkten wir uns auf die bei der Sekretion bereits untersuchten Signaltransduktionswege: Adenylatcyclase mit dem second messenger cAMP sowie die Phospholipase C mit den second Messengern IP₃ und Diacylglycerol und zusätzlich der Einfluß der G-Proteine (siehe Kap. 1.7 sowie Abb. 7 und 8).

Um einen Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen, werden in allen Darstellungen lineare Achseneinteilungen verwendet. Die Lipidaufnahme wird als Verhältnis der in den Typ II-Zellen am Ende der Inkubation gemessenen Radioaktivität (dpm) und des dazu bestimmten Proteingehaltes der Zellen (μg) dargestellt.

3.1 Einfluß des SP-B auf die Lipidaufnahme

Von mehreren Arbeitsgruppen ist die Liposomenaufnahme unter Einfluß von SP-B durch Typ II-Zellen als konzentrationsabhängig beschrieben worden (3), (64). Unsere ersten Untersuchungen zielten daher auf die Bestimmung der Abhängigkeit der Liposomenaufnahme von der SP-B Konzentration.

In Abbildung 11 ist die Lipidaufnahme der Typ II-Zellen in Abhängigkeit von der SP-B Konzentration dargestellt. Unsere Ergebnisse zeigen, daß die SP-B vermittelte Lipidaufnahme konzentrationsabhängig ist. Der Zusatz von SP-B hemmt die Lipidaufnahme durch Typ II-Pneumozyten. Der physiologische Protein/Lipid-Quotient wird mit 1:100 beschrieben (62). Der von uns verwendete Protein/Lipid-Quotient liegt bei 1:75 und entspricht damit nahezu der physiologischen Zusammensetzung und ist für

alle weiteren Versuche ebenso eingesetzt worden. Dies entspricht einem Zusatz von 2 µg SP-B je 2,5 Mio Typ II-Zellen.

Die Reinheit des stark hydrophoben und lipophilen SP-B spielt eine entscheidende Rolle bei den Aufnahme- und Sekretionsversuchen an Typ II-Pneumozyten. Daher wurde das SP-B nach der Extraktion aus Schafslavage in mehreren aufwendigen Schritten von anderen lipophilen Proteinen getrennt, es schloß sich eine Prüfung auf Vorhandensein von restlichem Lipid an, um eine hohe Reinheit des SP-B zu gewährleisten. Der Nachweis des SP-B erfolgte im Tricine-Gel und Immuno-Westernblot. Einzelheiten dazu siehe 2.4.1.

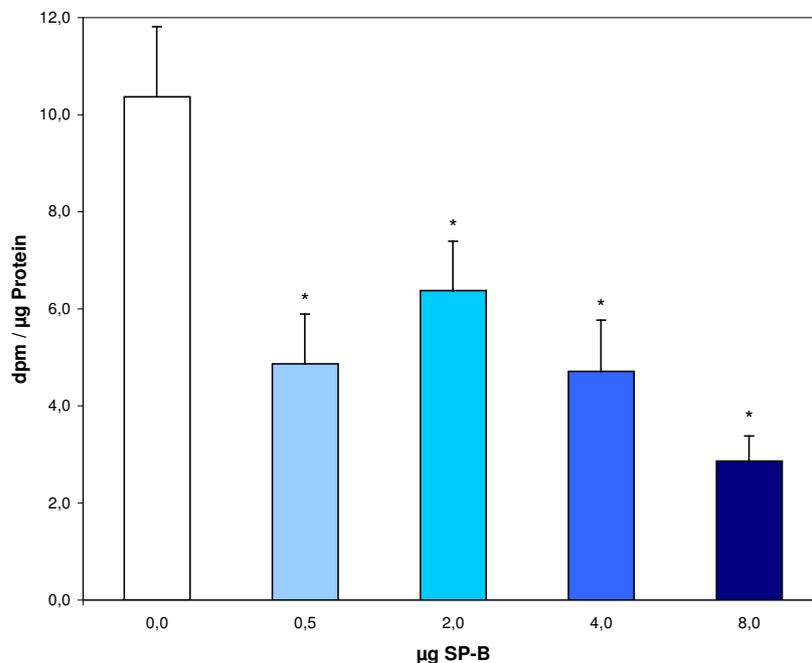


Abbildung 11: Aufnahme von Lipiden in Typ II-Pneumozyten in Abhängigkeit von der SP-B Konzentration der Liposomen.

Auf der X-Achse ist die steigende Konzentration von SP-B in den Liposomen dargestellt (0 bis 8 µg je $2,5 \times 10^6$ Typ II-Zellen), auf der Y-Achse die Liposomenaufnahme der Typ II-Zellen nach 10minütiger Inkubation in dpm/µg Protein.

Ein Zusatz von SP-B zu Liposomen inhibiert deren Aufnahme. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (0 µg SP-B).

3.2 Aufnahmeversuche zur Kaliumabhängigkeit

Ziel dieses folgenden Versuches war es zu klären, ob Lipide unter dem Einfluß von SP-B wie unter SP-A Einfluß über clathrin coated pits und CCV aufgenommen werden.

Eine Verminderung der intrazellulären Kaliumkonzentration führt zur Beeinträchtigung des Clathrins und damit auch zu Störungen aller Aufnahmeprozesse, die über clathrin coated pits (CCP) bzw. clathrin coated vesicles (CCV) verlaufen. Hansen et al. konnten 1993 den Mechanismus des Kaliumeinflusses auf die clathrinabhängige Endozytose aufklären (32). Erniedrigung der intrazellulären Kaliumkonzentration, auch Kaliumdepletion genannt, verhindert die Interaktion des Clathrins mit seinem spezifischen Adapter an der Zellmembran. Dadurch können die gitterartigen Strukturen, die für die Formation von clathrin coated pits und vesicles notwendig sind, nicht gebildet werden (32).

In unseren Versuchen konnte gezeigt werden, daß die Lipidaufnahme unter dem Einfluß von SP-B nicht von der intrazellulären Kaliumkonzentration abhängig ist ($p > 0,05$) (Abb. 12). Daraus kann geschlossen werden, daß die Lipide mit SP-B nicht über CCP und CCV aufgenommen werden.

Dagegen ist die Lipidaufnahme mit SP-B unter Zusatz von SP-A signifikant von der Kaliumkonzentration abhängig (Abb. 12).

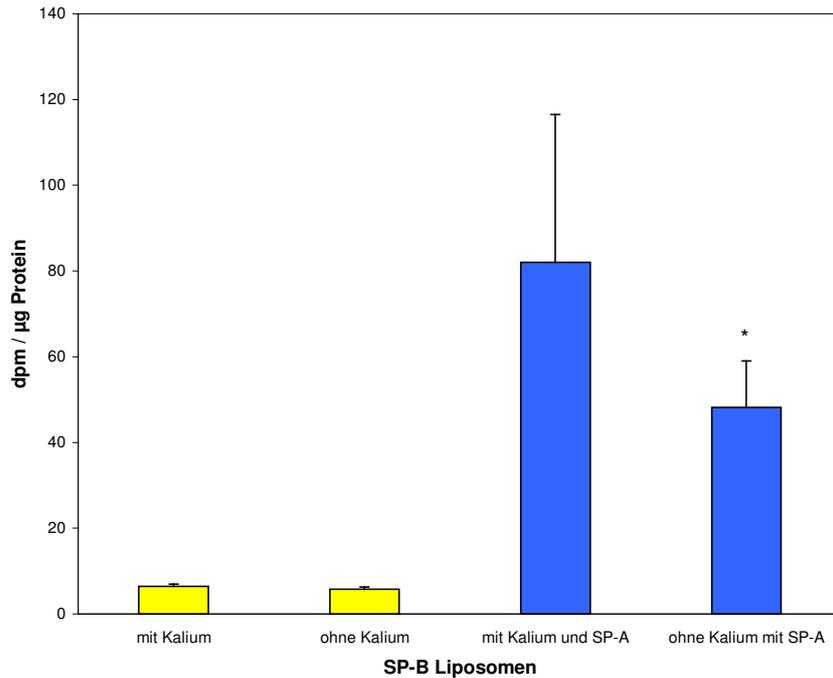


Abbildung 12: Einfluß der Kaliumdepletion auf die Lipidaufnahme mit SP-B sowie unter Zusatz von SP-A. Kaliumdepletion beeinflusst die Lipidaufnahme mit SP-B nicht. Unter Zusatz von SP-A zu den Liposomen mit SP-B zeigt die Lipidaufnahme eine signifikante Abhängigkeit von der Kaliumkonzentration. * $p < 0,05$ im Vergleich zur entsprechend gleichfarbig dargestellten Kontrolle.

3.3 Aufnahmeversuche mit Nocodazole

Die nachfolgenden Versuche sollten klären, ob Mikrotubuli in die Endozytose von Lipiden mit SP-B involviert sind bzw. wie sich diese unter zusätzlichem Einsatz von SP-A verändert.

Der Einfluß der Mikrotubuli auf den Weitertransport der bei der Endozytose internalisierten Substanzen ist von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben worden. Diese spezifischen Zytoskelettfilamente sind für den Transport von den frühen (early endosomes = EE) zu späten Endosomen (late endosomes = LE) notwendig (siehe Abb. 6). Inhibiert man diese durch spezifische Substanzen, resultiert ein „Stau“

der endozytierten Substanzen in den frühen Endosomen (77). An Typ II-Zellen sind Mikrotubuli bis heute nur in Zusammenhang mit der Exozytose untersucht worden. Für unsere Versuche verwendeten wir Nocodazole, einen hochspezifischen Hemmer von Mikrotubulin, der seine Aktivität über Tubulindepolymerisation entfaltet.

Aus der unten gezeigten Abbildung ist ersichtlich, daß sich die Lipidaufnahme unter Zusatz von Nocodazole verändert. Sowohl ohne als auch mit SP-A führt Nocodazole signifikant zur Erhöhung der Lipidaufnahme ($p < 0,05$). Genauer ausgedrückt, führt es vermutlich zum „Stau“ von endozytiertem Material innerhalb der Zelle.

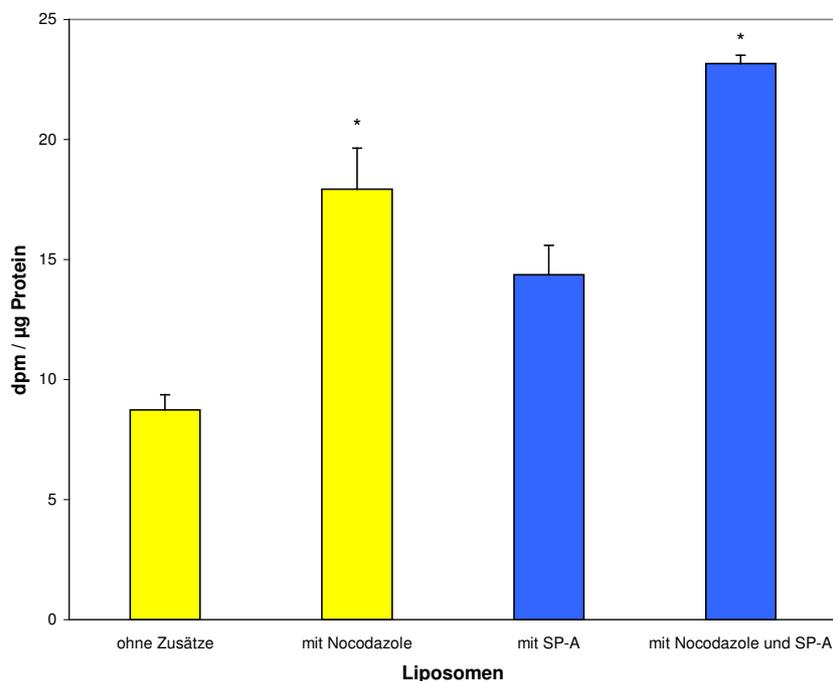


Abbildung 13: Lipidaufnahme mit 100 µM Nocodazole. Der Wirkstoff Nocodazole führt zur erhöhten Lipidaufnahme, sowohl für einfache Liposomen allein, als auch unter Zusatz von SP-A. * $p < 0,05$ im Vergleich zur entsprechend gleichfarbig dargestellten Kontrolle.

Auf die Lipidaufnahme mit SP-B, dargestellt in Abbildung 14, scheint Nocodazole keinen Effekt zu haben ($p > 0,05$). Sobald jedoch SP-A den Zellen zugesetzt wird, zeigt sich wiederum eine erhöhte Lipidaufnahme in die Typ II-Zellen (Abb. 14).

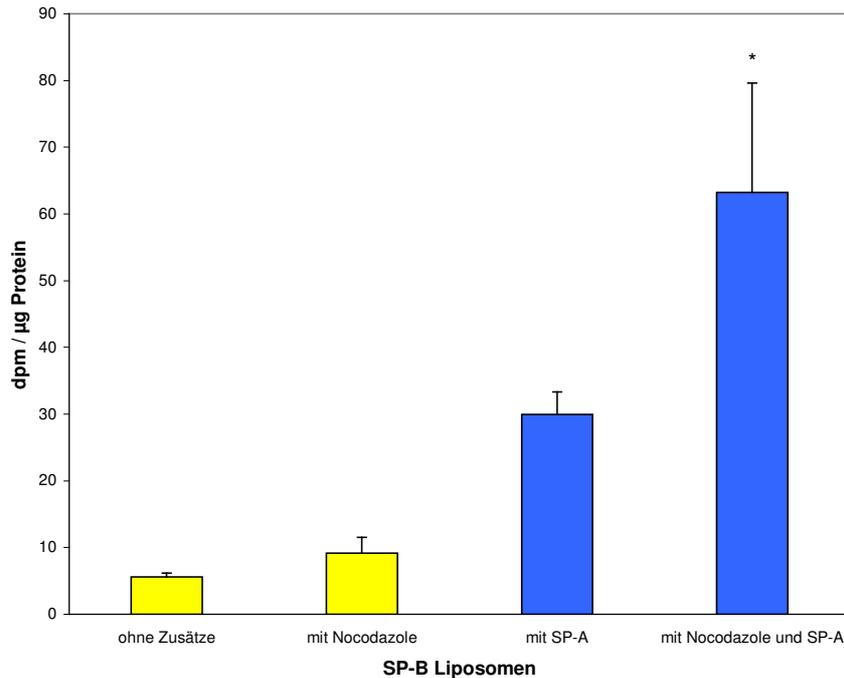


Abbildung 14: Lipidaufnahme mit SP-B und 100 µM Nocodazole. Die Lipidaufnahme mit SP-B ändert sich unter dem Einfluß von Nocodazole nicht, unter Zusatz von SP-A führt Nocodazole zur gesteigerten Lipidaufnahme. * $p < 0,05$ im Vergleich zur entsprechend gleichfarbig dargestellten Kontrolle.

3.4 Aufnahmeversuche mit IBMX und Forskolin

Die folgenden Experimente (3.4-3.7) untersuchten Vorgänge der Signaltransduktion bei der Endozytose von Lipiden an Typ II-Zellen. Dabei interessierten uns insbesondere die Signaltransduktionswege, die bei der Sekretion der Lipide bereits untersucht worden sind.

Die erste Versuchsreihe beschäftigt sich mit dem Adenylatcyclasesystem.

IBMX und Forskolin greifen beide in die cAMP-vermittelte Signaltransduktionskaskade ein (zur Funktionsweise der AC mit cAMP siehe Abb. 7 und 9). IBMX ist ein unspezifischer Inhibitor der cAMP und cGMP Phosphodiesterase. Forskolin aktiviert direkt die Adenylatcyclase.

Ziel dieses Versuches war es herauszufinden, ob die cAMP-abhängige Signaltransduktionskaskade in die Lipidaufnahme mit und ohne SP-B involviert ist.

Wie aus der Abbildung 15 ersichtlich, bewirkt weder die Zugabe von IBMX noch der Zusatz von Forskolin eine Änderung der Lipidaufnahme in die Pneumozyten ($p > 0,05$). Auch die gleichzeitige Gabe beider Substanzen hat keinen signifikanten Einfluß auf die Lipidaufnahme ($p > 0,05$).

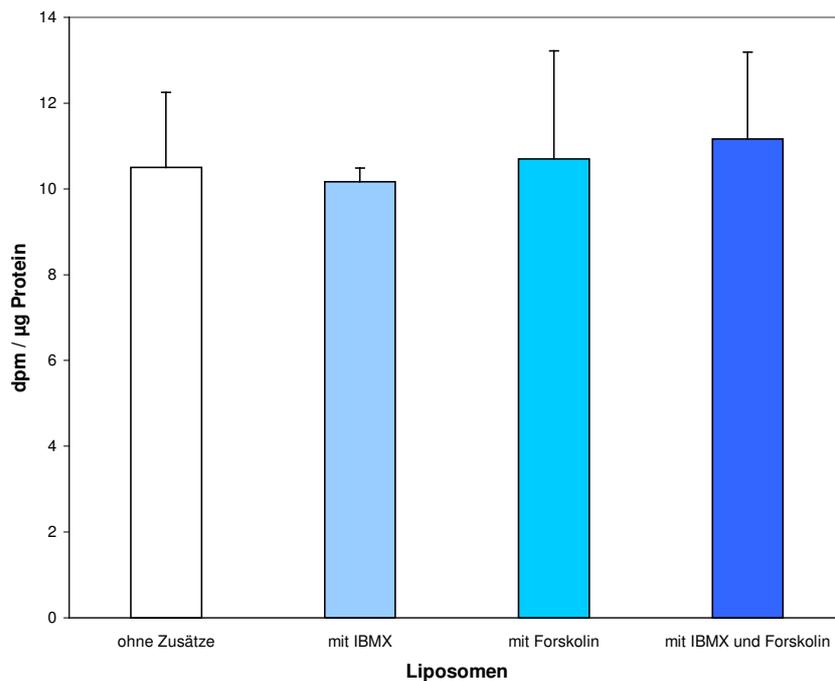


Abbildung 15: Lipidaufnahme mit 100 µM IBMX und 100 µM Forskolin. Weder IBMX noch Forskolin zeigen einen signifikanten Einfluß auf die Lipidaufnahme ($p > 0,05$).

Auch die in Abb. 16 dargestellte Lipidaufnahme mit SP-A wird durch die beiden oben erwähnten Substanzen nicht signifikant beeinflusst ($p > 0,05$).

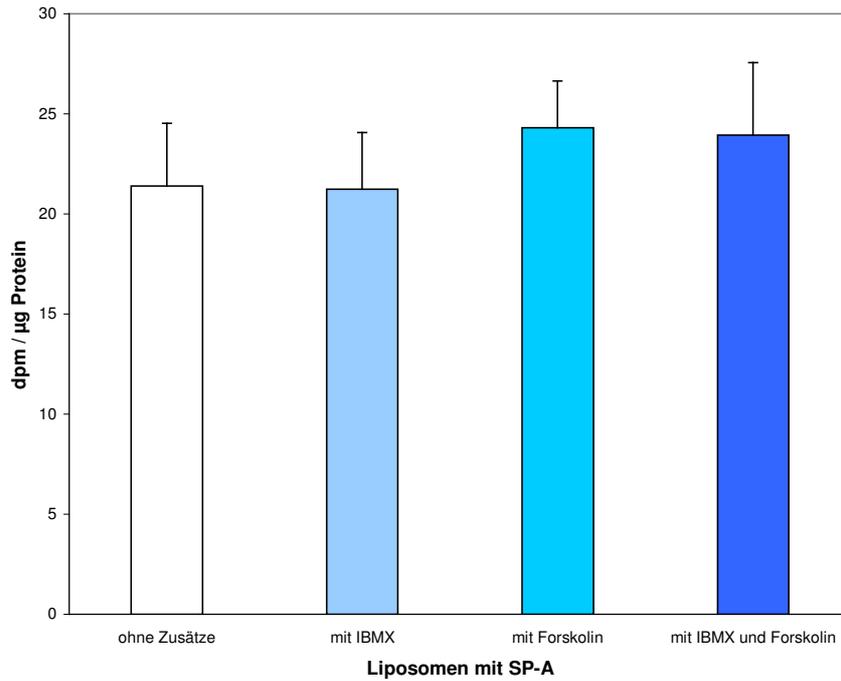


Abbildung 16: Lipidaufnahme mit SP-A sowie 100 µM IBMX und 100 µM Forskolin. Weder IBMX noch Forskolin zeigen einen signifikanten Einfluß auf die Lipidaufnahme ($p > 0,05$).

Unterschiede zeigen sich, wenn man die Lipidaufnahme mit SP-B betrachtet (Abb. 17). Die Lipidaufnahme mit SP-B wird sowohl bei Zugabe von IBMX als auch von Forskolin signifikant reduziert. Der Einfluß von Forskolin ist stärker ausgeprägt als der von IBMX ($p < 0,001$ vs. $p < 0,01$). Der Zusatz beider Substanzen hat keinen additiven Effekt.

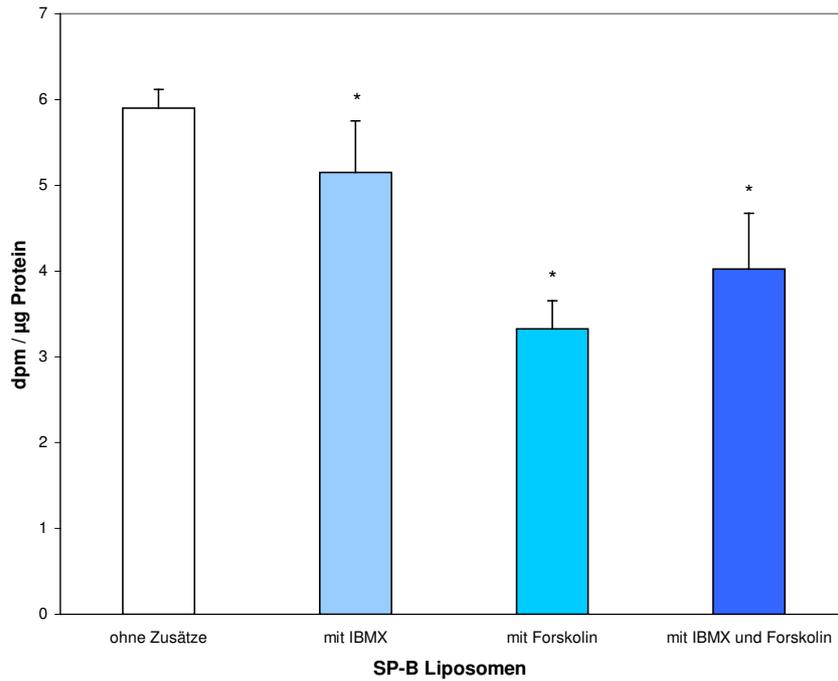


Abbildung 17: Lipidaufnahme mit SP-B sowie 100 µM IBMX und 100 µM Forskolin. Beide Substanzen hemmen die Lipidaufnahme. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle ohne Zusätze.

Abbildung 18 zeigt die Aufnahmesituation der Lipide unter dem Einfluß von SP-B und SP-A. Der Zusatz von IBMX und/oder Forskolin hat keinen signifikanten Effekt auf die Lipidaufnahme durch Typ II-Pneumozyten mit SP-A und SP-B ($p > 0,05$).

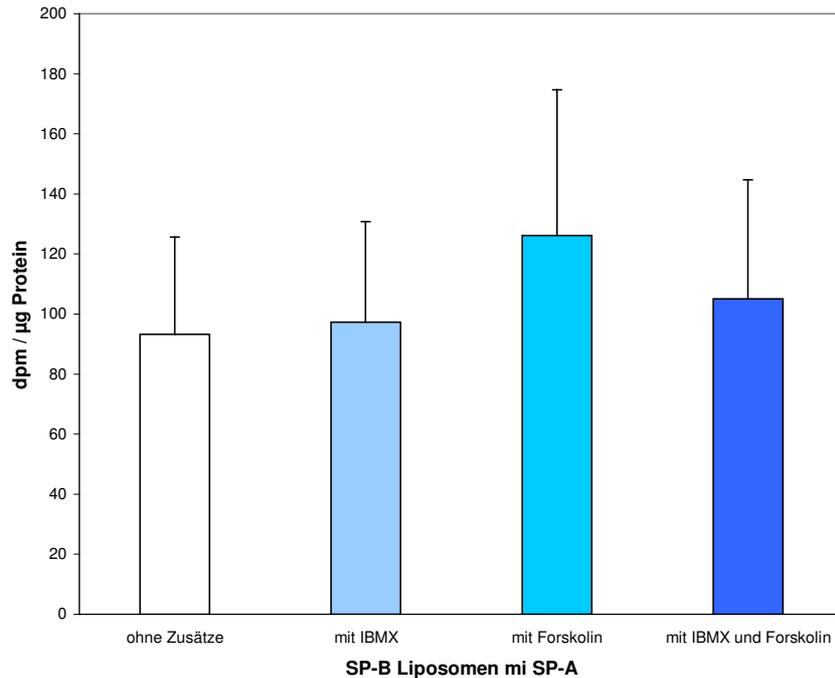


Abbildung 18: Lipidaufnahme mit SP-B und SP-A sowie 100 µM IBMX und 100 µM Forskolin. Weder IBMX noch Forskolin zeigen einen signifikanten Einfluß auf die Lipidaufnahme ($p > 0,05$).

3.5 Aufnahmeversuche mit GTP γ

Bei dieser Versuchsreihe wurde der Einfluß der G-Proteine bei der Endozytose von Lipiden untersucht.

GTP γ aktiviert durch seine GTP-Analogie G-Proteine, über welche eine große Zahl der rezeptorabhängigen Prozesse verlaufen (zur Funktionsweise der G-Proteine siehe Abb. 7 und 8). Die Abbildungen 19 und 20 zeigen die Lipidaufnahme der Typ II-Zelle mit und ohne SP-B. Der Zusatz von GTP γ zeigt weder mit noch ohne SP-B einen Effekt auf die Lipidaufnahme ($p > 0,05$). Auch unter Zugabe von SP-A bleibt die Aufnahme der Lipide, sowohl mit als auch ohne SP-B, nahezu unverändert ($p > 0,05$).

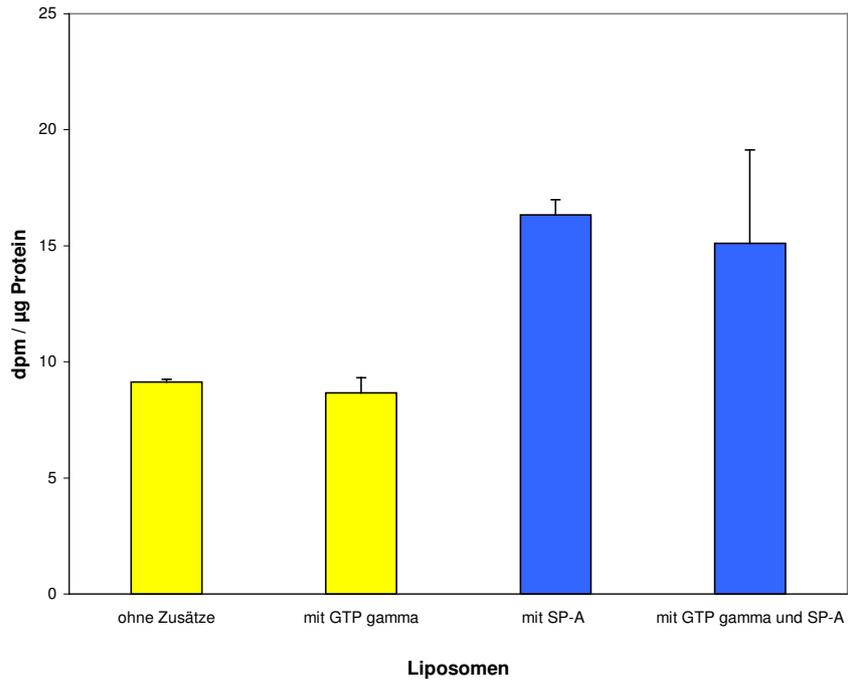


Abbildung 19: Lipidaufnahme mit 160 µM GTP γ mit und ohne SP-A. GTP γ zeigt keinen signifikanten Einfluß auf die Aufnahme der Lipide in Typ II-Zellen ($p > 0,05$).

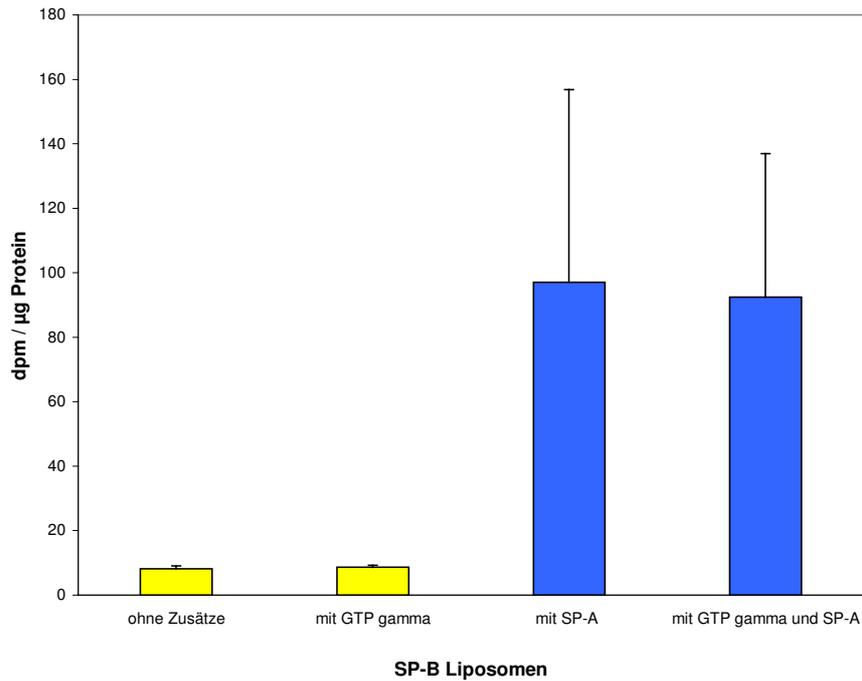


Abbildung 20: Lipidaufnahme mit SP-B und 160 µM GTPγ mit und ohne SP-A. GTPγ hat weder bei der Lipidaufnahme mit SP-B ohne Zusatz von SP-A, noch unter Zusatz von SP-A einen signifikanten Einfluß auf die Internalisation der Lipide ($p > 0,05$).

3.6 Aufnahmeversuche mit Calphostin C

Die nächste Versuchsreihe beschäftigt sich mit der Proteinkinase C, welche über das System der Phospholipase C aktiviert wird (zur Funktionsweise der Proteinkinase C siehe Abb. 8).

Calphostin C ist ein hochspezifischer Hemmer der Proteinkinase C. Diese wird über eine kompetitive Hemmung der Bindungsstelle für Diacylglycerol und Phorbol ester verursacht.

Inkubiert man Typ II-Zellen mit Calphostin C, zeigen sich, wie in Abbildung 21 dargestellt, keine signifikanten Lipidaufnahmeveränderungen ($p > 0,05$). Auch die Zellpopulation mit SP-A wird durch den Zusatz von Calphostin C in ihrer Lipidaufnahme nicht signifikant verändert ($p > 0,05$).

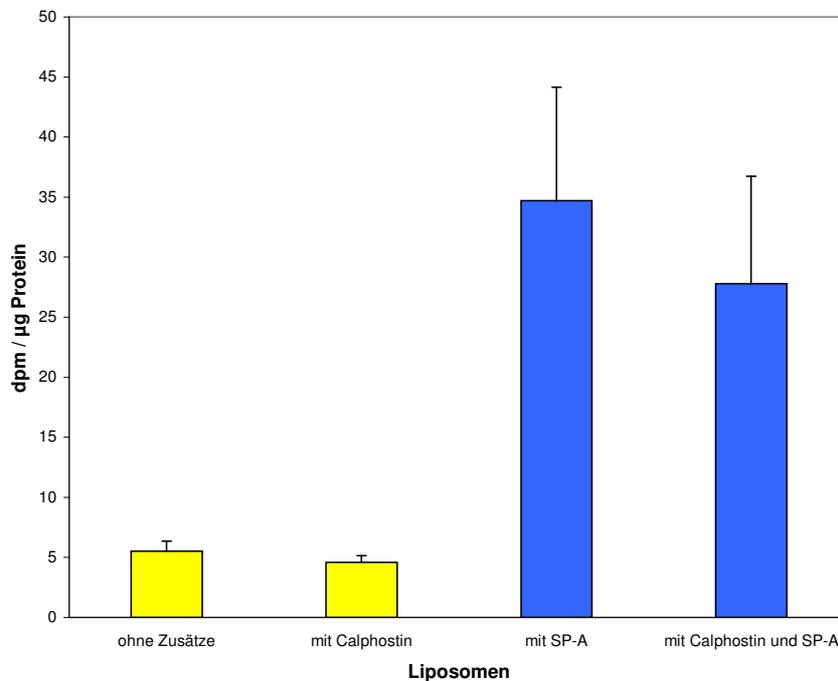


Abbildung 21: Lipidaufnahme mit 600 nM Calphostin C mit und ohne SP-A. Der Zusatz von Calphostin C zeigt weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von SP-A einen signifikanten Effekt auf die Aufnahme von Lipiden ($p > 0,05$).

Betrachtet man die Lipidaufnahme mit SP-B in Abbildung 22, so kann man feststellen, daß auch hier die Zugabe von Calphostin C keine signifikante Änderung der Lipidaufnahme zur Folge hat. Das gilt sowohl ohne als auch mit Zusatz von SP-A ($p > 0,05$).

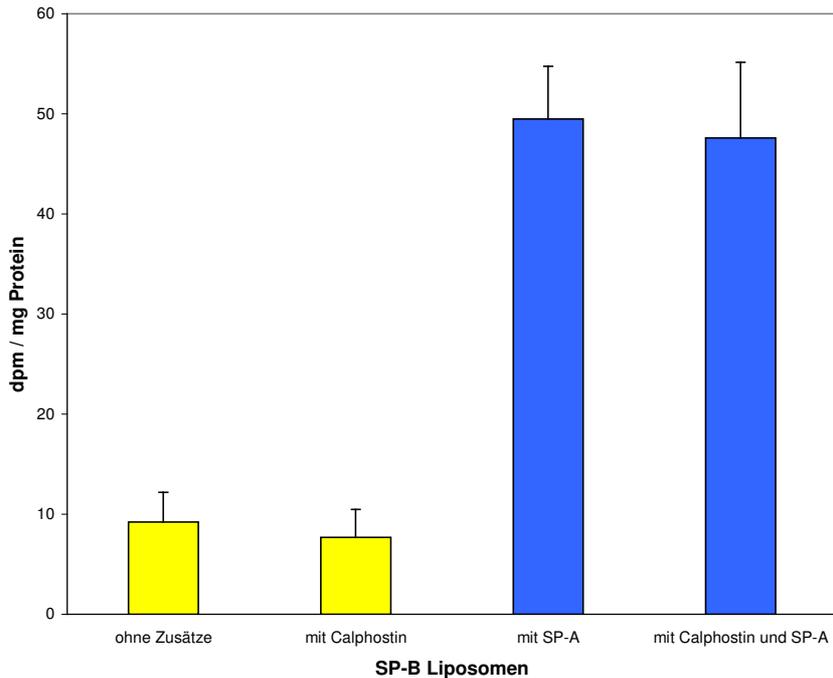


Abbildung 22: Lipidaufnahme mit SP-B und 600 nM Calphostin C mit und ohne SP-A. Calphostin C übt keinen signifikanten Einfluß auf die Lipidaufnahme mit SP-B aus. Auch bei SP-B haltigen Liposomen unter Zugabe von SP-A zeigt der Zusatz von Calphostin C keine Veränderung der Lipidaufnahme der Typ II-Zellen ($p > 0,05$).

3.7 Aufnahmeversuche mit Wortmannin

Ziel der Versuche mit Wortmannin war es herauszufinden, inwieweit der second messenger IP3 des PLC Systems bei der Endozytose von Lipiden an Typ II-Pneumozyten eine Rolle spielt.

Wortmannin ist ein selektiver, irreversibler Inhibitor der Phosphatidylinositol 3-Kinase, der katalytisch die Kinaseaktivität blockiert. Kinasen sind Enzyme, welche Phosphatreste von einer Substanz auf die andere übertragen (siehe auch Abb. 8).

Abbildung 23 zeigt die Lipidaufnahme mit und ohne SP-A, der Zusatz von Wortmannin bewirkt keine signifikante Änderung der Lipidaufnahme in den Typ II-Zellen ($p > 0,05$).

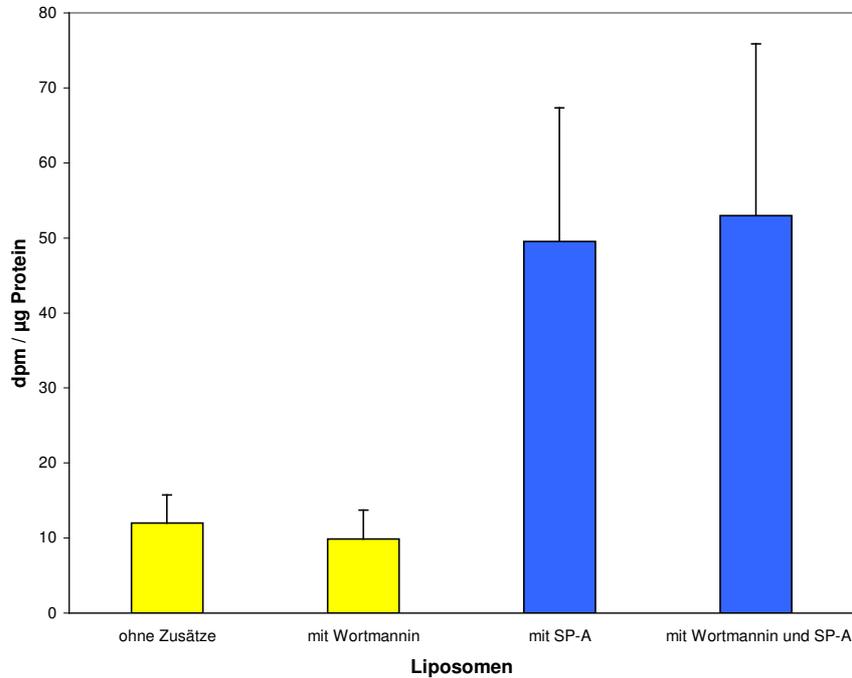


Abbildung 23: Lipidaufnahme mit 23,4 nM Wortmannin mit und ohne SP-A. Wortmannin übt keinen Einfluß auf die Lipidaufnahme aus ($p > 0,05$).

In Abbildung 24 ist die Aufnahme der Lipide mit SP-B dargestellt. Weder mit noch ohne SP-A zeigt Wortmannin einen signifikanten Effekt ($p > 0,05$).

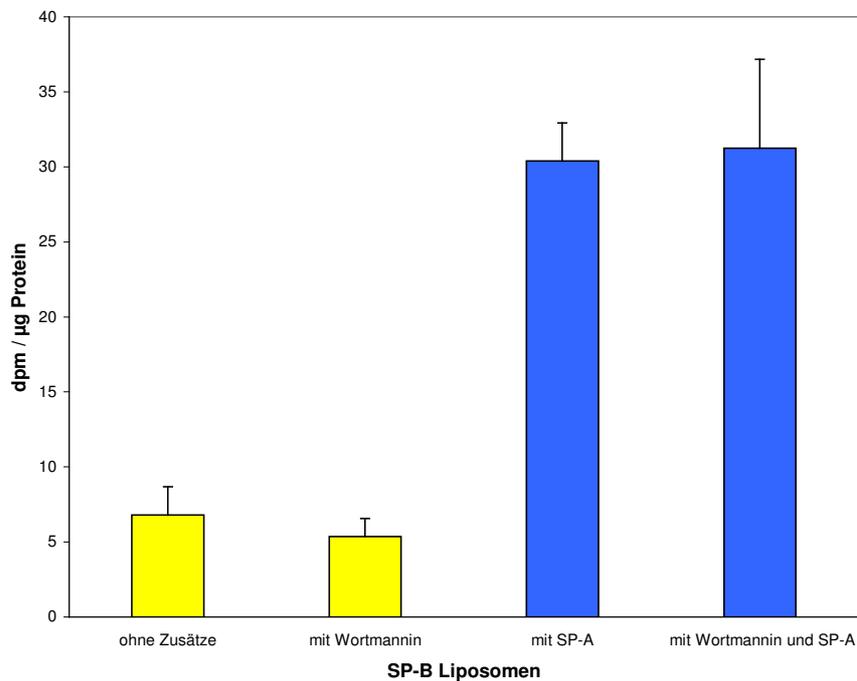


Abbildung 24: Lipidaufnahme mit SP-B und 23,4 nM Wortmannin mit und ohne SP-A. Mit und ohne SP-A ist keine Aufnahmeänderung unter Zusatz von Wortmannin zu erkennen ($p > 0,05$).

4 Diskussion

Surfactant senkt die Mortalität und Morbidität sowie die Behandlungskosten für stark untergewichtige Neugeborene (VLBW = Verylowbirthweightinfants). Außerdem wird intensiv am Einsatz in der Behandlung des adulten respiratorischen Versagens (ARDS) geforscht (6), (48), (73). Jedoch erfordert die Zusammensetzung und Herstellung eines effizienten Surfactant für therapeutische Zwecke genaues Wissen über die molekularen Mechanismen der Surfactantfunktion und -aktivität sowie des respiratorischen Recyclingzyklus. Dazu gehört die genaue Kenntnis der einzelnen Surfactantbestandteile und die jeweiligen Funktionen sowie das Zusammenspiel aller Bestandteile mit den jeweils beeinflussenden Faktoren.

Das Surfactant setzt sich größtenteils aus Phospholipiden, insbesondere dem DPPC, sowie 4 verschiedenartigen Surfactantproteinen zusammen. Unsere Versuche haben wir auf das hydrophobe surfactantassoziierte Protein B (SP-B) fokussiert, dabei interessierte uns insbesondere seine Rolle bei der Wiederaufnahme (Endozytose) von Lipiden, da diese im Vergleich zur Sekretion (Exozytose) bisher wenig erforscht worden ist.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluß von SP-B auf die Lipidaufnahme von Typ II-Zellen *in vitro* zu untersuchen. Da der Einsatz von SP-B allein, d.h. ohne assoziierte Lipide, auch heute noch aufgrund seiner starken Lipophilie und der damit verbundenen Hydrophobie die Versuche erschwert (15), haben wir bei unseren Experimenten SP-B haltige Liposomen eingesetzt. Die dabei eingesetzten Liposomen entsprachen in ihrer Lipidkonstellation bzw. ihrem Protein-Lipid-Verhältnis (1:75) nahezu der physiologischen Zusammensetzung des natürlichen Surfactant (1:100) (60), (62). In dieser Arbeit sollten insbesondere der Einfluß des SP-B auf die Lipidaufnahme (= Liposomenaufnahme) sowie die Abhängigkeit von Clathrin und Mikrotubulin näher beleuchtet werden. Auch der additive Effekt von SP-A sollte parallel dazu untersucht werden. Zusätzlich interessierten wir uns für die intrazellulären Vorgänge der Typ II-Zellen während der Endozytose mit SP-B. Dieser als Signaltransduktion bezeichnete Vorgang ist bereits bei der Sekretion von Surfactant untersucht worden.

4.1 Einfluß des SP-B auf die Lipidaufnahme

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß SP-B die Lipidaufnahme in frisch isolierten Typ II-Zellen *in vitro* signifikant senkt. Bereits 1996 haben Horowitz et. al beschrieben, daß SP-B in der Lage ist, die durch SP-C erhöhte Lipidaufnahme zu senken (38).

Unsere Daten widersprechen allerdings einigen bis heute publizierten Ergebnissen, die *in vitro* einen stimulatorischen Effekt der lipophilen surfactantassoziierten Proteine SP-B und SP-C auf die Lipidaufnahme an kultivierten Typ II-Zellen beobachteten (19), (38), (64).

Eine Ursache könnte im Verwenden unterschiedlicher Zellsysteme liegen, wie kultivierte Zellen versus frisch isolierte Typ II-Zellen. Nach wie vor gibt es kontroverse Meinungen zu Morphologie und Funktion der kultivierten Typ II-Pneumozyten, denn die Typ II-Zellen verlieren durch Kultivierung ihre zellspezifischen Eigenschaften, was bei der Endozytose von Liposomen durchaus eine Rolle spielen könnte (17), (28), (78), (87).

Einige Arbeitsgruppen verwenden zur Untersuchung der Funktionen surfactantassoziiierter Proteine andere Zelltypen, wie z.B. Lungenfibroblasten, Alveolarmakrophagen und pulmonale Karzinomzelllinien, was jedoch die Beurteilung der Ergebnisse erschwert (38), (64), (68). Daher verwendeten wir in unseren Versuchen frisch isolierte Typ II-Zellen und diskutieren, soweit nicht anders erwähnt, Ergebnisse an Typ II-Pneumozyten.

Horowitz et. al haben bereits 1996 festgestellt, daß zwar SP-C die Lipidaufnahme in kultivierten Typ II-Pneumozyten stimuliert, jedoch bei zusätzlicher Anwesenheit von SP-B die Lipidaufnahmesteigerung des SP-C vermindert wird, wohingegen SP-B allein die Lipidaufnahme steigert. Außerdem haben sie festgestellt, daß die Variationsbreite der Ergebnisse, durchgeführt mit SP-B und SP-C, sehr groß war (38). Bei ihren Ergebnissen haben sie geschlußfolgert, daß Unterschiede in der Lipidaufnahme von der Liposomengröße abhängen könnten, da nach Verkleinerung der Liposomengröße durch Sonifikation nahezu keine aufnahmesteigernde Wirkung des SP-B nachgewiesen werden konnte. Der Einfluß der Liposomengröße auf die Lipidaufnahme konnte in einer neueren Studie von Poelma et al. Jedoch nicht bestätigt werden (61).

Diese Arbeitsgruppe findet allerdings keinen signifikanten Effekt von SP-B auf die

Lipidaufnahme (60), (62). Die Versuche sind *in vitro* und *in vivo* durchgeführt worden. Sie konnten jedoch einen Einfluß der SP-B-Lipid-Ratio auf die Lipidaufnahme feststellen. Eine Erhöhung der SP-B-Lipid-Ratio auf 8:100 steigert die Lipidaufnahme, nicht jedoch die physiologische SP-B-Lipid-Ratio von 1:100 (60), (62). In unseren Versuchen lag die SP-B-Lipid-Ratio bei 1:75.

Auf die Bedeutung der Isolationsmethode und die damit verbundenen möglichen Änderungen der Struktur bzw. Funktionsweise der surfactantassoziierten Proteine sind Hawgood et al. (35) sowie Weaver et al. (81) in ihren Arbeiten eingegangen. Einer der wesentlichsten Schritte bei der Isolation des SP-B ist die Trennung vom ebenfalls lipophophilen SP-C. Bei „Verunreinigung“ des SP-B mit SP-C würde eine falsch hohe Liposomenaufnahme gemessen werden, da SP-C die Lipidaufnahme an Typ II-Zellen stimuliert (60), (62).

Wir sehen es als erwiesen an, daß die Lipidaufnahme mit SP-B stark von den Versuchsbedingungen abhängt und daher einer großen Variationsbreite unterliegt. Ein weiterer Punkt sind die unterschiedlichen Inkubationszeiten mit SP-B, welche von einigen Minuten bis zu einigen Stunden betragen. Obwohl verschiedene Arbeitsgruppen bereits zeitabhängige Unterschiede der Liposomenaufnahme an Typ II-Zellen beschrieben haben (19), (38), (64), gibt es keinen Konsens über eine einheitliche Zeit zur Registrierung der Lipidaufnahme (28), (61), (62). Insbesondere bei Steady-State Bedingungen erscheint es schwierig, die Grenze zwischen Endozytose und Resekretion zu ziehen. Die Arbeitsgruppe um Shuman konnte zeigen, daß die „lamellarbodygetriggerte“ Surfactantaufnahme 10-20 Minuten dauert (70), Wissel et al. zeigten, daß die Resekretion von markiertem SP-A nach 20 Minuten vollständig beendet sein kann (89).

In der Literatur zur Endozytose an anderen Zelltypen wird beschrieben, daß insbesondere Lipide und lipidassoziierte Proteine nonselektiv über einen passiven Mechanismus aufgenommen werden (53). Mukherjee et al. deuten in ihrer Arbeit an, daß die Kinetiken der rezeptorunabhängigen Endozytose etwa 10% der rezeptorabhängigen Internalisierung entsprechen könnten. So könnte der von uns gewählte Beobachtungszeitraum von 10 Minuten den langsamen Prozeß der möglichen unspezifischen Lipidaufnahme mit SP-B nicht vollständig abbilden und so zu der verminderten Lipidaufnahme in die Typ II-Zellen geführt haben. Andererseits beschreiben Mellman et al. in ihrer ausführlichen Abhandlung über Endozytose (52),

daß selbst internalisierte Substanzen, die über RV (recycling vesicles) wieder an der Zellmembran ausgeschleust werden, nach maximal 10 Minuten die Zellmembran erreichen können.

4.2 Lipidaufnahme mit SP-B und der clathrinabhängige Aufnahmeweg

Endozytose von Surfactant und seinen Bestandteilen durch Typ II-Pneumozyten wurde als clathrin- und aktinabhängig beschrieben (28), (41) (siehe Abb. 6). Für die Lipidaufnahme ohne surfactantassoziierte Proteine beschrieben Muller et al. (54) ebenfalls die Abhängigkeit von Clathrin und Aktin. Die clathrinabhängigkeit der Lipidaufnahme ohne surfactantassoziierte Proteine konnte durch unsere Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden (75) (siehe Abb. 25). Stevens und Wissel sowie weitere Arbeitsgruppen (41), (75) identifizierten die Lipidaufnahme der Typ II- Pneumozyten mit SP-A als rezeptorvermittelte Endozytose über clathrin coated pits (CCP) und clathrin coated vesicle (CCV), d.h. deren Abhängigkeit von Clathrin.

In unseren Versuchen konnten wir nachweisen, daß die Lipidaufnahme mit SP-B nicht clathrinabhängig ist und damit nicht über clathrin coated pits oder vesicles verläuft. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den von Breslin et al. veröffentlichten Daten (15). Damit wird auch eine rezeptorabhängige Aufnahme für SP-B unwahrscheinlich, da die meisten rezeptorvermittelten Endozytosevorgänge über clathrin coated pits und vesicles verlaufen (52). Breslin et al. konnten für das SP-B die unspezifische Aufnahme über den Marker horseradish peroxidase nachweisen (15). Der clathrinunabhängige Aufnahmeweg der Lipide mit SP-B könnte durchaus dem aktinabhängigen Endozytoseweg entsprechen, den die Arbeitsgruppe um Shuman für Surfactant angenommen hat (70) (siehe Abb. 25).

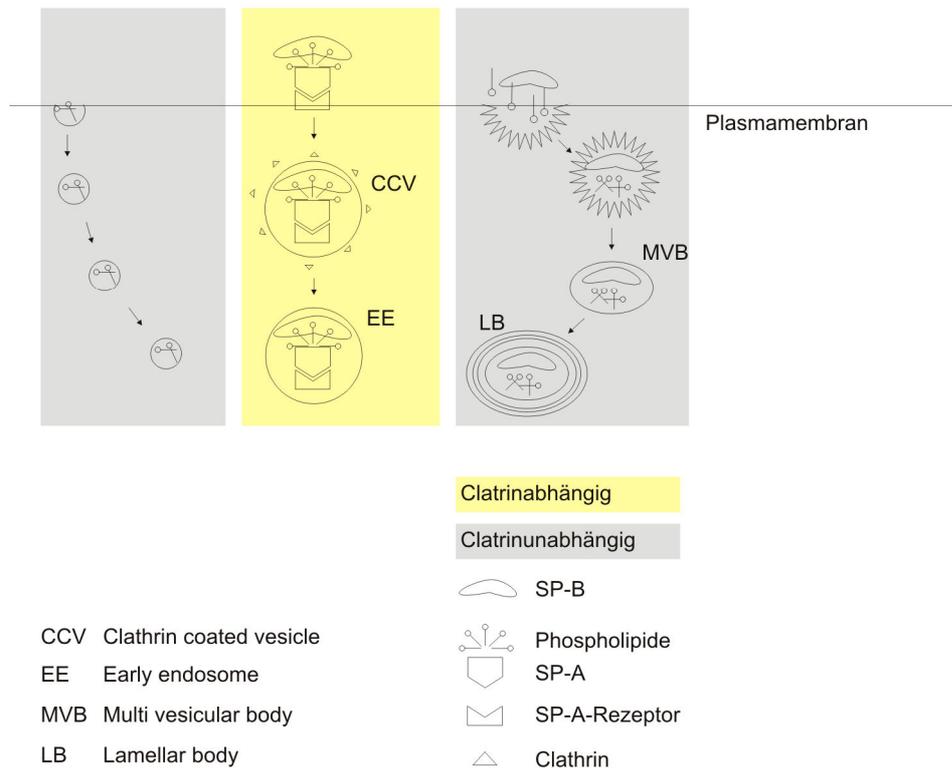


Abbildung 25: Abhängigkeit der Lipidaufnahme von Clathrin

Für die Lipidaufnahme mit SP-A und SP-B konnten wir eine clathrinabhängige Aufnahme nachweisen. Vermutlich bindet SP-B aufgrund seiner Eigenschaften an Phospholipide, die bereits an SP-A assoziiert sind. Dieser Komplex wird dann rezeptorabhängig über clathrin coated pits und vesicles internalisiert (siehe Abb. 25).

Noch eine Feststellung erscheint interessant: die Hemmung clathrin- und aktinabhängiger Mechanismen, sowohl bei Gesamtsurfactant als auch bei einfachen Lipiden, erzeugt nur eine 70-80%-ige Hemmung der Lipidaufnahme (66). Außerdem wurde beschrieben, daß es durchaus die Möglichkeit gibt, daß Zellen bei Störung der clathrinabhängigen Endozytose clathrinunabhängige Endozytosewege verstärkt nutzen (52), was weitere Wege der Aufnahme von Lipiden und evtl. auch des SP-B wahrscheinlich macht.

4.3 Lipidaufnahme mit SP-B und Tubulin

Dem Zytoskelett von Zellen kommt eine wichtige Funktion beim intrazellulären Transport von Partikeln sowie beim Austausch von Bestandteilen zwischen verschiedenen Zellkompartimenten zu. Das gilt insbesondere für die Vorgänge der Endozytose und Sekretion.

Zu den Grundelementen des Zytoskeletts zählen dünne, intermediäre sowie dicke Filamente (siehe Tab. 1 unter 1.3). Die dicken Filamente, auch Mikrotubuli genannt, sind mit spezifischen Motorproteinen (z. B. Dynein) assoziiert, welche die Bewegung von endozytiertem Material entlang der Mikrotubuli ermöglichen. An anderen Zelltypen als Typ II-Pneumozyten ist beschrieben worden, daß der Transport von endozytiertem Material von den early endosomes (EE) zu den late endosomes (LE) anhand von Mikrotubuli sowie dem Motorprotein Dynein erfolgt (20).

Nocodazole ist ein Tubulindepolymerisator, welcher den Weitertransport in der Zelle entlang der Tubulinfilamente behindert. Das gilt sowohl zentripetal für die Endozytose als auch zentrifugal für die Exozytose.

Über den Einsatz von Nocodazole konnten wir nachweisen, daß sowohl die einfache Lipidaufnahme als auch die Lipidaufnahme mit SP-A tubulinabhängige Prozesse sind (siehe Abb. 26).

Auch für andere Aufnahmevorgänge über clathrin coated pits (CCP) und clathrin coated vesicles (CCV) ist eine Tubulinabhängigkeit nachgewiesen worden (42), (77). Im Unterschied dazu ist der Weg der internalisierten Partikel von early endosomes (EE) über recycling vesicles (RV) tubulinunabhängig (42).

An Typ II-Zellen konnten Wissel et al. nachweisen, daß der intrazelluläre Weg von SP-A und dem SP-A assoziierten Lipid von der Funktion des Tubulins abhängig ist (88).

Die Aufnahme von Lipiden mit SP-B verläuft dagegen nicht über Tubulin, was wir in unseren Versuchen zeigen konnten (siehe Abb. 26). Unser Ergebnis steht damit im Einklang mit den Ergebnissen von Jin et al. (42). Diese Arbeitsgruppe konnte am Bsp. von horseradish peroxidase (einem Marker für unspezifische Endozytose) zeigen, daß die unspezifische Aufnahme von Partikeln tubulinunabhängig ist.

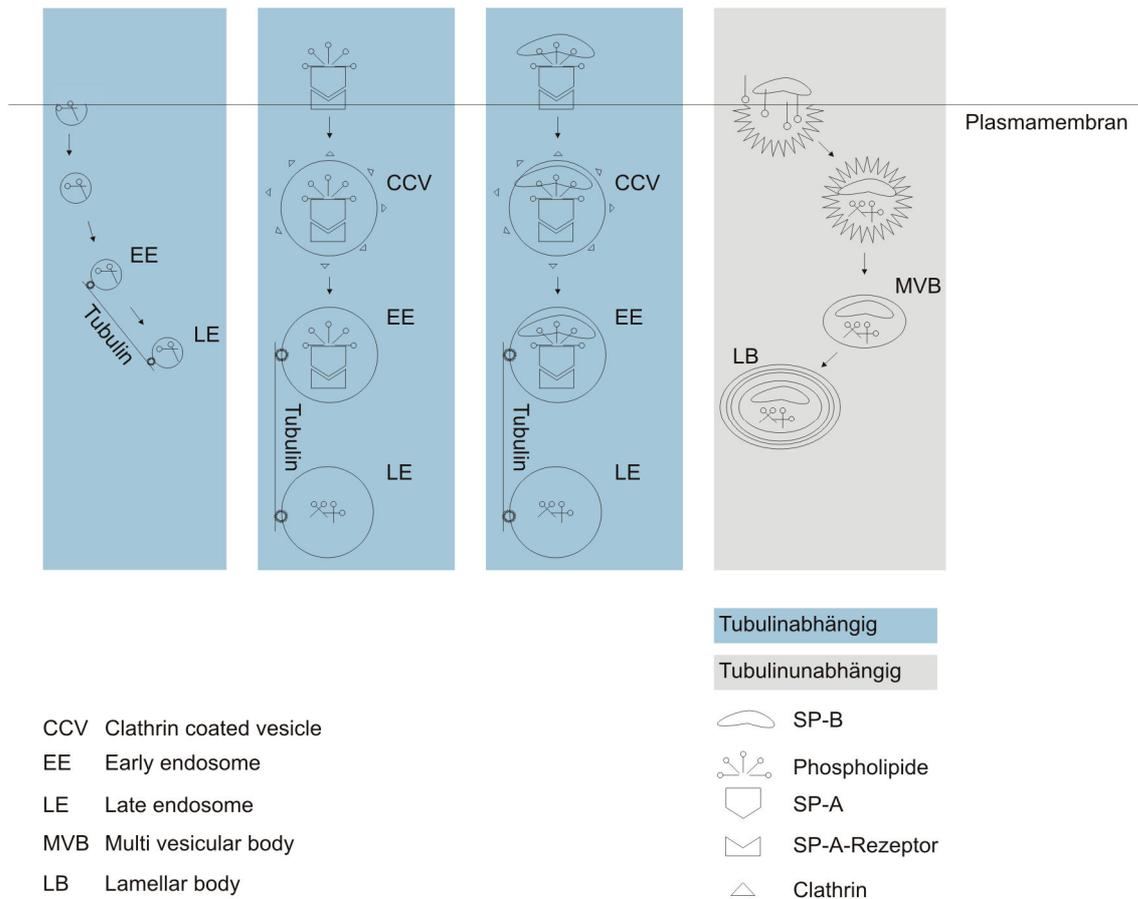


Abbildung 26: Abhängigkeit der Lipidaufnahme von Tubulin

Die Lipidaufnahme mit SP-A und SP-B verläuft tubulinabhängig. Wir vermuten, daß SP-B aufgrund seiner lipophilen Eigenschaft an Lipide bindet, die bereits an SP-A gebunden sind und dann als Einheit internalisiert wird (siehe Abb. 26).

4.4 Lipidaufnahme und Signaltransduktion

Die Arbeitsgruppen um Sano und Rooney haben die Vorgänge der Signaltransduktion bei der Surfactantsekretion an Typ II-Zellen untersucht. Dabei konnten sie nachweisen, daß die Surfactantsekretion über die Adenylatcyclase, die Proteinkinase C sowie die intrazelluläre Calciumkonzentrationserhöhung reguliert wird (26), (65), (69).

Ziel der in diesem Abschnitt diskutierten Experimente unserer Arbeitsgruppe war es, die Signaltransduktion bei der Lipidaufnahme an Typ II-Zellen zu untersuchen. Untersucht haben wir dabei die Signaltransduktionswege über den second messenger cAMP, die Proteinkinase C, die Phosphatidylinositol 3-Kinase und über G-Proteine.

4.4.1 Lipidaufnahme und cAMP als second messenger

Anhand der Substanzen IBMX und Forskolin, die die Signaltransduktionskaskade über einen cAMP-Anstieg aktivieren, haben wir die Vorgänge der Lipidaufnahme an Typ II-Zellen a) ohne surfactantassoziierte Proteine, b) mit SP-A, c) mit SP-B, d) mit SP-A und SP-B untersucht.

Der Surfactantsekretionsvorgang ist von den Arbeitsgruppen Rooney und Benito als cAMP-abhängiger Mechanismus beschrieben worden (8), (26), (65) (zu der Funktionsweise von IBMX bzw. Forskolin siehe Abb. 27).

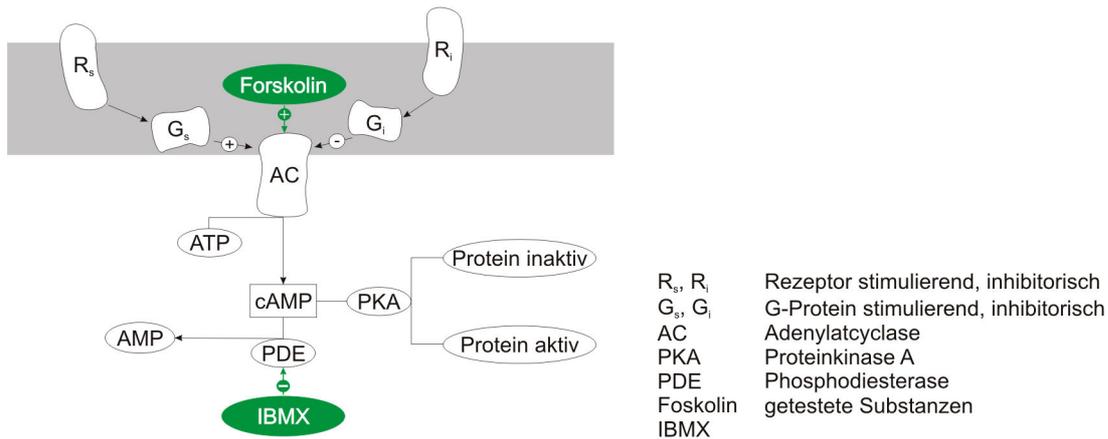


Abbildung 27: Adenylatcyclase mit cAMP und IBMX sowie Forskolin

Am Beispiel der Monozyten untersuchten Pinot et al. den Einfluß der Wirkstoffe IBMX und Forskolin auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration bei zusätzlichem Einsatz von SP-A bzw. von Curosurf (59). Curosurf ist ein natürliches, aus Schweinelavage extrahiertes, Surfactant mit den lipophilen surfactantassoziierten Proteinen SP-B und SP-C jedoch ohne SP-A. Weder Curosurf noch SP-A hatten einen Effekt auf die IBMX-induzierte cAMP-Erhöhung. Jedoch war Curosurf in der Lage, ob in Kombination mit SP-A oder ohne, das intrazelluläre cAMP-Level zu senken, welches durch den Einfluß von Forskolin hervorgerufen worden war. SP-A allein hingegen hatte keinen Effekt auf die cAMP-Konzentration (59). Gleiche Ergebnisse erzielt die Gruppe mit Cholera toxin, einem Stoff, der ebenfalls zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt. In unseren Experimenten konnten wir keine Beeinflussung der Lipidaufnahme a) ohne surfactantassoziierte Proteine, b) in Anwesenheit von SP-A und d) SP-A und SP-B feststellen, damit erscheint die Involvierung des second messengers cAMP für diese drei Gruppen unwahrscheinlich. Für die Lipidaufnahme in Anwesenheit von SP-B konnten wir in unseren Experimenten feststellen, daß der Signaltransduktionsweg über cAMP eine Rolle spielt (siehe auch Tab. 6). Es ist durchaus denkbar, daß die in Curosurf enthaltenen surfactantassoziierten Proteine B und C für die Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration verantwortlich sind. Wenn man annimmt, daß bei der Endozytose der Lipide mit SP-B die intrazelluläre cAMP-Konzentration sinkt, dann könnte bei künstlicher Erhöhung der cAMP-Konzentration (mit IBMX oder Forskolin) evtl. die Endozytose der Lipide beeinträchtigt werden. Diese Annahme wird durch die von uns gemessene reduzierte Aufnahme von Lipiden in Anwesenheit von SP-B unter

Einfluß von Forskolin und IBMX gestützt.

Pinot et al. zeigen, daß SP-A allein keine Wirkung auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration hat (59). Entsprechend dazu zeigen unsere Experimente, daß weder IBMX noch Forskolin eine Änderung der Lipidaufnahme mit SP-A bewirken. Inwieweit das in Curosurf enthaltene SP-C bei diesen Vorgängen eine Rolle spielt, kann anhand der vorliegenden Daten nicht geklärt werden.

IBMX ist ein unspezifischer Inhibitor der Phosphodiesterase. Wahrscheinlich existieren auch in Typ II-Zellen verschiedene Subtypen von Phosphodiesterasehemmern (PDE), welche für die Inaktivierung von cAMP verantwortlich sind, wie sie zumindest an anderen Zelltypen beschrieben worden sind (50), (82). Unter dieser Annahme wäre bei Einsatz von IBMX möglicherweise nur ein Subtyp eines PDE-Hemmers betroffen und der cAMP-Spiegel deutlich niedriger als der unter Einsatz von Forskolin.

Wahrscheinlich ist das einer der Gründe, weswegen in unseren Experimenten an Typ II-Pneumozyten der Einfluß von Forskolin über dem von IBMX lag. Es sollte an dieser Stelle erwähnt werden, das IBMX ebenfalls die Sekretion fördert und hierdurch zu einer geringeren Aufnahme von Lipiden führen könnte.

4.4.2 Lipidaufnahme und die Phosphatidylinositol 3-Kinase

Bekannt ist die Hemmung der Surfactantsekretion an Typ II-Pneumozyten durch SP-A. Die Arbeitsgruppe um Strayer fand heraus, daß bei dieser Sekretionshemmung Phosphatidylinositol 3-Kinase involviert ist (83)
(zu der Funktionsweise der Phosphatidylinositol 3-Kinase siehe Abb. 28).

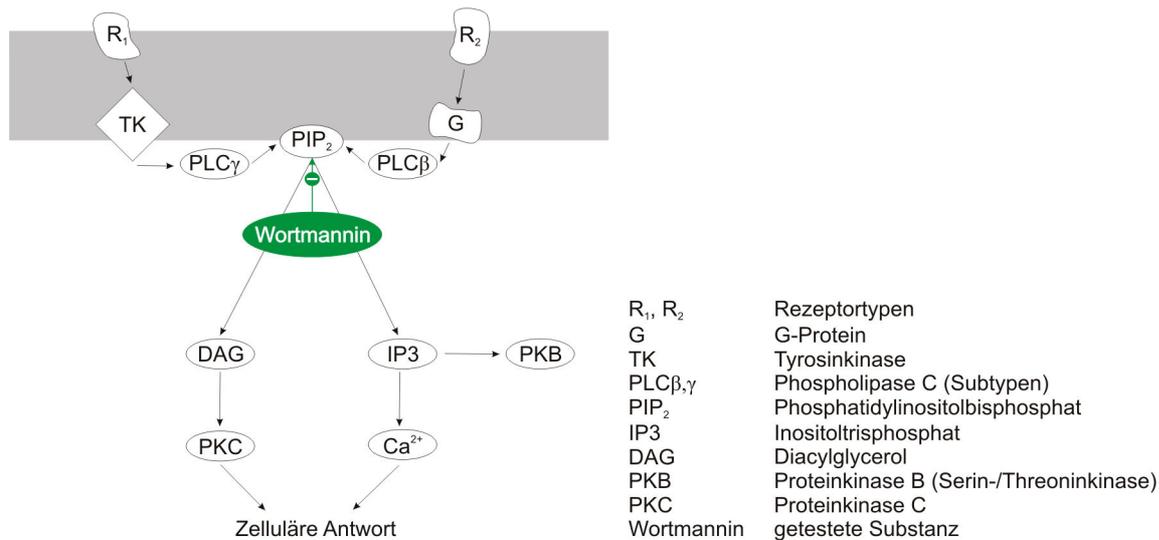


Abbildung 28: Phosphatidylinositol 3-Kinase mit dem second messenger IP₃ und Wortmannin

Bei Zugabe von SP-A zu Typ II-Pneumozyten stieg die Aktivität der Phosphatidylinositol 3-Kinase stark an und führte zu einer Hemmung der Sekretion. Bei Einsatz eines Phosphatidylinositol 3-Kinase-Hemmers und damit verbundener Senkung der Aktivität der Phosphatidylinositol 3-Kinase konnte die Sekretion wieder das normale Niveau erreichen (83).

Geht man davon aus, daß die Sekretion von Surfactant über den second messenger Inositoltrisphosphat reguliert wird, ist es denkbar, daß die Aufnahme von Surfactant ebenfalls über diesen Signaltransduktionsweg verläuft. Um diesen Ansatz zu testen, haben wir Lipidaufnahmeversuche mit Wortmannin, einem selektiven Inhibitor der Phosphatidylinositol 3-Kinase, durchgeführt. Dabei konnten wir keine Beeinflussung der Lipidaufnahme mit und ohne surfactantassoziierte Proteine SP-A und SP-B durch Wortmannin feststellen. Damit erscheint die Involvierung des second messengers Inositoltrisphosphat bei der Endozytose von Lipiden unwahrscheinlich. Eine mögliche Erklärung bietet die Arbeitsgruppe von Griesse et al. (29). Sie publizierten in ihrer Arbeit, daß die Surfactantsekretion und -wiederaufnahme unabhängig voneinander reguliert sein könnten. In ihren Versuchen hatten sekretionsfördernde Substanzen starken Einfluß auf die Sekretion von Lipiden, hingegen größtenteils keinen Einfluß auf die Aufnahme von Lipiden.

4.4.3 Lipidaufnahme und die Proteinkinase C

Analog zur Phosphatidylinositol 3-Kinase ist die Involvierung der Proteinkinase C in den Sekretionsvorgang von Surfactant von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben worden (26), (65), (67). Die Ergebnisse wurden zum größten Teil über Einsatz von Hemmern bzw. Aktivatoren der Proteinkinase C erzielt (zum besseren Verständnis der Signaltransduktionskaskade mit der Proteinkinase C siehe Abb. 29).

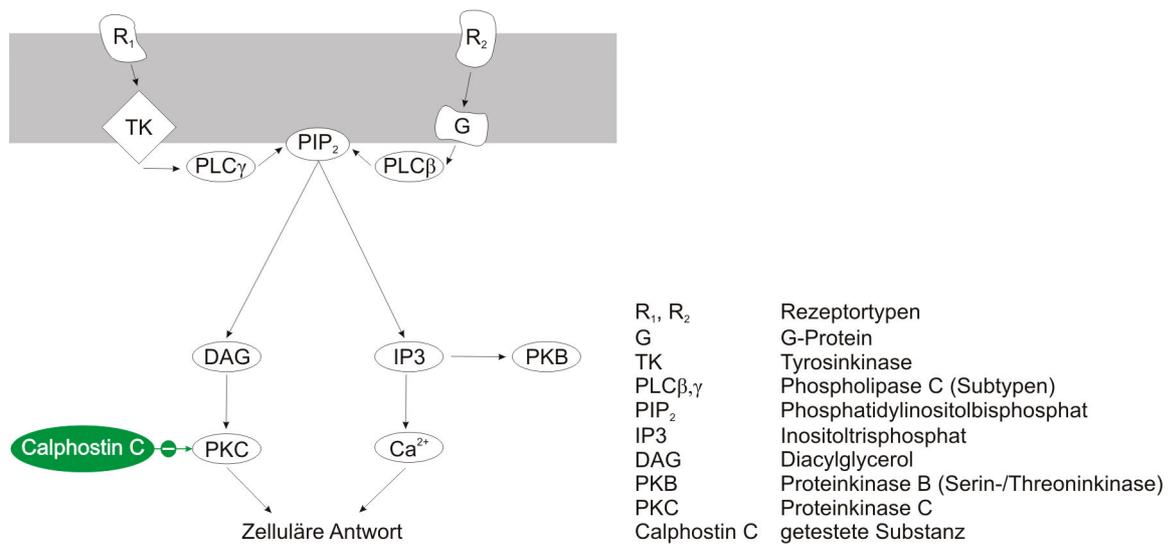


Abbildung 29: Proteinkinase C mit Calphostin C

Wenn die Sekretionsförderung über Aktivierung der Proteinkinase C erfolgt, so könnte die Wiederaufnahme von Lipiden den gleichen Signaltransduktionsweg benutzen. Um diese Hypothese zu testen, haben wir Lipidaufnahmeversuche mit Calphostin C, einem hochspezifischen Hemmer der Proteinkinase C, durchgeführt. Dabei konnten wir keine Beeinflussung der Lipidaufnahme mit und ohne surfactantassoziierte Proteine SP-A und SP-B feststellen. Damit erscheint die Involvierung der Proteinkinase C bei der Endozytose von Lipiden unwahrscheinlich. Möglicherweise ist die Regulation der Endozytose von der der Sekretion an Typ II Zellen abgekoppelt, wie Griese et al. es annehmen (29).

4.4.4 Lipidaufnahme und G-Proteine

Im Zuge der weiteren Erforschung der Regulation der Surfactantsekretion durch Typ II-Zellen beschäftigten sich viele Arbeitsgruppen mit speziellen Bestandteilen von Signaltransduktionskaskaden, den G-Proteinen (zum besseren Verständnis der Funktionsweise von G-Proteinen siehe Abb. 30 und 31).

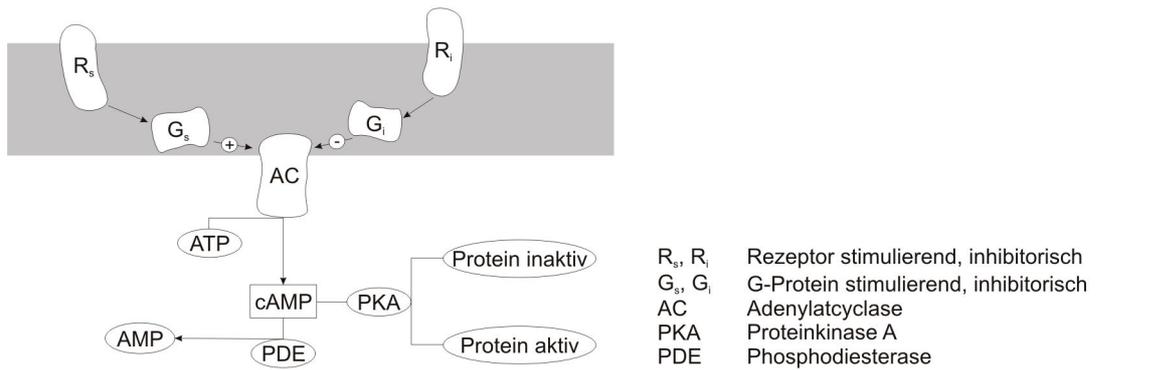


Abbildung 30: G-Proteine im Signaltransduktionssystem der Adenylatcyclase

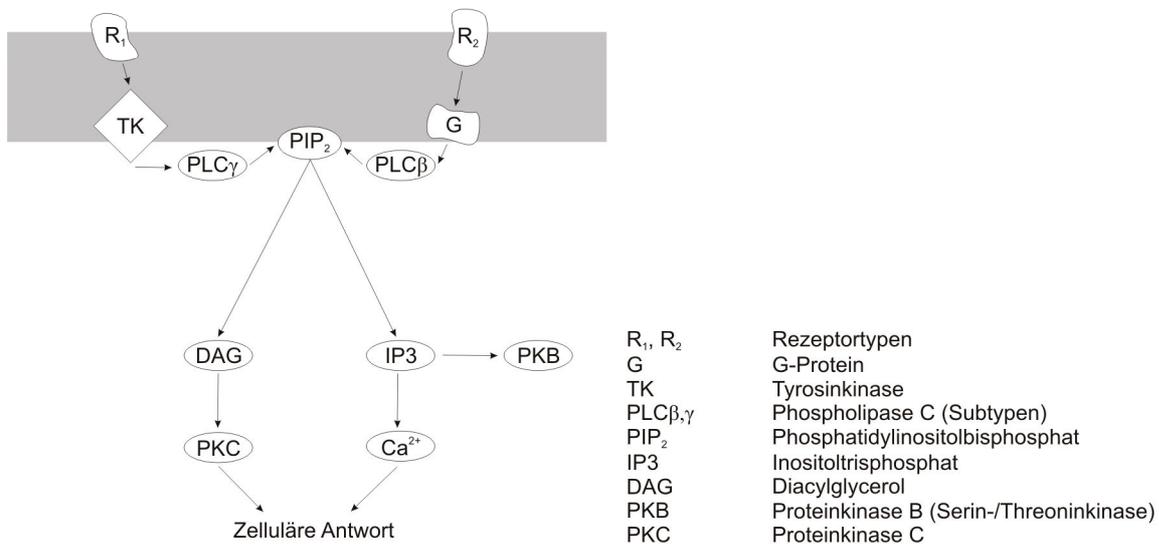


Abbildung 31: G-Proteine im Signaltransduktionssystem der PLC

So beschreiben Chander et al. sowie Borys et al. die Involvierung von G-Proteinen bei der Sekretion von Lipiden an Typ II-Zellen (18). Beide Arbeitsgruppen konnten eine Steigerung der Sekretion durch Aktivierung der G-Proteine anhand der Substanz GTP_γ hervorrufen, was die Frage aufwarf: Spielen G-Proteine eine Rolle bei der Aufnahme

der Lipide durch Typ-II Zellen? Dazu haben wir Aufnahmeversuche mit dem GTP-Analogen GTP γ durchgeführt. In unseren Experimenten konnten wir zeigen, daß G-Proteine keinen Einfluß auf die Endozytose von Lipiden haben, auch die Anwesenheit der surfactantassoziierten Proteine SP-A bzw. SP-B änderte nichts an der Aufnahme von Lipiden mit GTP γ .

Andererseits beschreiben Pian et al. eine bivalente Eigenschaft der G-Proteine, die sowohl die Sekretion an Typ II-Pneumozyten hemmen als auch fördern können (58).

Die Funktion der G-Proteine ist dabei abhängig von der intrazellulären Calciumkonzentration. Auch die Arbeitsgruppe um Ahnert-Hilger (1) findet Beweise für unterschiedliche Funktionsweisen der G-Proteine anhand anderer Zelltypen. Sie schließen, daß die festgestellten Unterschiede in der Involvierung verschiedener GTP-bindender Proteine und der Inkubationszeit der Zellen begründet sind.

Erschwert wird die Interpretation der Ergebnisse auch durch die Vielfalt von existierenden Adenylatcyclasen. Insgesamt werden 8 Typen unterschieden, für die eine gewebeabhängige Verteilung beschrieben worden ist (40). Alle Adenylatcyclasen können durch G_s (stimulatorische G-Proteine) und Forskolin aktiviert werden. Die Stimulation der AC durch Forskolin ist dabei unabhängig von G-Proteinen (G_s) (40). Dieses deckt sich mit den Ergebnissen unserer Arbeit, daß die Lipidaufnahme mit SP-B von der Konzentration des cAMP (siehe Versuche mit IBMX und Forskolin unter 4.1), jedoch nicht G-Protein abhängig ist (siehe Tab. 6).

Auch die Beeinflussung der G-Proteine durch die PKA und die PKC als auch in umgekehrter Richtung, wie durch Iyengar beschrieben, erschweren die Erforschung einzelner Signaltransduktionswege (40).

Aus diesen Gründen halten wir weitere Versuche zur differenzierten Klärung der Funktionsweise der G-Proteine an Typ II-Zellen für notwendig.

Zusammenfassend lassen sich die folgenden Punkte festhalten.

Die Lipidaufnahme ist in Anwesenheit von SP-B im Vergleich zu einfachen Lipiden reduziert. Mögliche Ursachen bzw. Unterschiede zu anderen publizierten Untersuchungen liegen unserer Meinung nach in der Verwendung kultivierter Typ II-Zellen bzw. anderer Zelltypen anstelle der von uns verwendeten frisch isolierten Typ II-Zellen. Der Einfluß der Inkubationszeit, die Sorgfältigkeit der Isolierung insbesondere von SP-B sowie die unterschiedliche Protein-Lipid-Zusammensetzung stellen ebenfalls verschiedene Ausgangsbedingungen dar. Dadurch unterliegen die Ergebnisse mit SP-B einer großen Variationsbreite, was deren Vergleich und Auswertung insgesamt erschwert.

Unsere Untersuchungen zeigen, daß die Lipidaufnahme mit SP-B sowohl tubulin- als auch clathrinunabhängig ist. Hingegen erweist sich die Lipidaufnahme ohne surfactantassoziierte Proteine und die Lipidaufnahme mit SP-A als tubulinabhängig. Damit unterscheidet sich der Endozytoseweg mit SP-B von den Aufnahmewegen zuletzt genannter (siehe Übersicht Tab. 6).

Wir gehen davon aus, daß die Lipidaufnahme mit SP-B dem aktinabhängigen Endozytoseweg über die Lamellarbodymembran entspricht, wie ihn die Arbeitsgruppe um Shuman für Surfactant angenommen hat (70). Bei der Endozytose der Lipide mit SP-B scheint das Signaltransduktionsystem über die Adenylatcyclase mit dem second messenger cAMP eine Rolle zu spielen. Im Gegensatz dazu scheinen die Signaltransduktionskaskaden über Phosphatidylinositol 3-Kinase, Proteinkinase C und G-Proteine nicht in die Endozytose von Lipiden mit SP-B involviert zu sein, obwohl ihre regulative Rolle bei der Sekretion von Surfactant mehrfach beschrieben worden ist.

	Lipidaufnahme an frisch isolierten Typ II-Pneumozyten			
	Liposomen	Liposomen mit SP-A	Liposomen mit SP-B	Liposomen mit SP-A und SP-B
Clathrin-abhängigkeit	↔ *	↓ *	↔	↓
Tubulin-abhängigkeit	↑	↑	↔	↑
Signaltransduktion über cAMP	↔	↔	↓	↔
Signaltransduktion über IP3	↔	↔	↔	↔
Signaltransduktion über PKC	↔	↔	↔	↔
Signaltransduktion über G-Proteine	↔	↔	↔	↔

Tabelle 6: Abhängigkeit der Lipidaufnahme an Typ II-Zellen

* bereits vorliegende Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe (75)

↑ Steigerung der Lipidaufnahme

↓ Verminderung der Lipidaufnahme

↔ keine Veränderung der Lipidaufnahme

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse konnten einige Beeinflussungsfaktoren der Lipidaufnahme an Typ II-Zellen mit SP-B aufklären. Unsere Resultate werfen jedoch neue Fragen auf, die durch weitere Erforschung näher untersucht werden sollten.

Literaturverzeichnis

1. Ahnert-Hilger G, Wegenhorst U, Stecher B, Spicher K, Rosenthal W, Gratz M. Exocytosis from permeabilized bovine adrenal chromaffin cells is differently modulated by guanosine 5'-[gamma-thio]triphosphate and guanosine 5'-[beta-gamma-imido]triphosphate. Evidence for the involvement of various guanine nucleotide-binding proteins. *Biochem J* 284 (Pt 2): 321-6, 1992.
2. Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 234: 466-8, 1959.
3. Bates SR, Beers MF, Fisher AB. Binding and uptake of surfactant protein B by alveolar type II cells. *Am J Physiol* 263: L333-L341, 1992.
4. Bates SR, Fisher AB. Degradation of surfactant protein B by alveolar type II cells. *Am J Physiol* 265: L448-L455, 1993.
5. Bates SR, Tao JQ, Schaller S, Fisher AB, Shuman H. Lamellar body membrane turnover is stimulated by secretagogues. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L443-L452, 2000.
6. Baudouin SV. Exogenous surfactant replacement in ARDS--one day, someday, or never? *N Engl J Med* 351: 853-5, 2004.
7. Beers MF, Hamvas A, Moxley MA, Gonzales LW, Guttentag SH, Solarin KO, Longmore WJ, Noguee LM, Ballard PL. Pulmonary surfactant metabolism in infants lacking surfactant protein B. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22: 380-91, 2000.
8. Benito E, Blazquez E, Bosch MA. Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide increases pulmonary surfactant secretion through a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase mechanism in rat type II pneumocytes. *Endocrinology* 139: 2363-8, 1998.

9. Benson B, Hawgood S, Schilling J, Clements J, Damm D, Cordell B, White RT. Structure of canine pulmonary surfactant apoprotein: cDNA and complete amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 6379-83, 1985.
10. Biswas N, Shanmukh S, Waring AJ, Walther F, Wang Z, Chang Y, Notter RH, Dluhy RA. Structure and properties of phospholipid-peptide monolayers containing monomeric SP-B(1-25) I. Phases and morphology by epifluorescence microscopy. *Biophys Chem* 113: 223-32, 2005.
11. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-7, 1959.
12. Bohlen P, Stein S, Dairman W, Udenfriend S. Fluorometric assay of proteins in the nanogram range. *Arch Biochem Biophys* 155: 213-20, 1973.
13. Bomsel M, Mostov K. Role of heterotrimeric G proteins in membrane traffic. *Mol Biol Cell* 3: 1317-28, 1992.
14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54, 1976.
15. Breslin JS, Weaver TE. Binding, uptake, and localization of surfactant protein B in isolated rat alveolar type II cells. *Am J Physiol* 262: L699-L707, 1992.
16. Casals C. Role of surfactant protein A (SP-A)/lipid interactions for SP-A functions in the lung. *Pediatr Pathol Mol Med* 20: 249-68, 2001.
17. Chander A, Claypool WD, Jr., Strauss JF, III, Fisher AB. Uptake of liposomal phosphatidylcholine by granular pneumocytes in primary culture. *Am J Physiol* 245: C397-C404, 1983.

18. Chander A, Sen N, Spitzer AR. Synexin and GTP increase surfactant secretion in permeabilized alveolar type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L991-L998, 2001.
19. Claypool WD, Wang DL, Chander A, Fisher AB. An ethanol/ether soluble apoprotein from rat lung surfactant augments liposome uptake by isolated granular pneumocytes. *J Clin Invest* 74: 677-84, 1984.
20. Cole NB, Lippincott-Schwartz J. Organization of organelles and membrane traffic by microtubules. *Curr Opin Cell Biol* 7: 55-64, 1995.
21. Creuwels LA, van Golde LM, Haagsman HP. The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects. *Lung* 175: 1-39, 1997.
22. Curstedt T, Jornvall H, Robertson B, Bergman T, Berggren P. Two hydrophobic low-molecular-mass protein fractions of pulmonary surfactant. Characterization and biophysical activity. *Eur J Biochem* 168: 255-62, 1987.
23. Dobbs LG, Gonzalez R, Williams MC. An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. *Am Rev Respir Dis* 134: 141-5, 1986.
24. Dobbs LG, Wright JR, Hawgood S, Gonzalez R, Venstrom K, Nellenbogen J. Pulmonary surfactant and its components inhibit secretion of phosphatidylcholine from cultured rat alveolar type II cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 1010-4, 1987.
25. Flach CR, Cai P, Dieudonne D, Brauner JW, Keough KM, Stewart J, Mendelsohn R. Location of structural transitions in an isotopically labeled lung surfactant SP-B peptide by IRRAS. *Biophys J* 85: 340-9, 2003.

26. Gobran LI, Rooney SA. Regulation of SP-B and SP-C secretion in rat type II cells in primary culture. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L1413-L1419, 2001.
27. Gortner L, Hilgendorff A. Surfactant-associated proteins B and C: molecular biology and physiologic properties. *Z Geburtshilfe Neonatol* 208: 91-7, 2004.
28. Griese M, Baatz A, Beck J, Deubzer B. Uptake of a natural surfactant and increased delivery of small organic anions into type II pneumocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L144-L154, 2001.
29. Griese M, Gobran LI, Rooney SA. Surfactant lipid uptake and secretion in type II cells in response to lectins and secretagogues. *Am J Physiol* 261: L434-L442, 1991.
30. Haagsman HP. Interactions of surfactant protein A with pathogens. *Biochim Biophys Acta* 1408: 264-77, 1998.
31. Haagsman HP, White RT, Schilling J, Lau K, Benson BJ, Golden J, Hawgood S, Clements JA. Studies of the structure of lung surfactant protein SP-A. *Am J Physiol* 257: L421-L429, 1989.
32. Hansen SH, Sandvig K, van Deurs B. Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification. *J Cell Biol* 121: 61-72, 1993.
33. Hawgood S. Surfactant protein B: structure and function. *Biol Neonate* 85: 285-9, 2004.
34. Hawgood S, Benson BJ, Hamilton RL, Jr. Effects of a surfactant-associated protein and calcium ions on the structure and surface activity of lung surfactant lipids. *Biochemistry* 24: 184-90, 1985.

35. Hawgood S, Derrick M, Poulain F. Structure and properties of surfactant protein B. *Biochim Biophys Acta* 1408: 150-60, 1998.
36. Hawgood S, Efrati H, Schilling J, Benson BJ. Chemical characterization of lung surfactant apoproteins: amino acid composition, N-terminal sequence and enzymic digestion. *Biochem Soc Trans* 13: 1092-6, 1985.
37. Herbein JF, Savov J, Wright JR. Binding and uptake of surfactant protein D by freshly isolated rat alveolar type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L830-L839, 2000.
38. Horowitz AD, Moussavian B, Whitsett JA. Roles of SP-A, SP-B, and SP-C in modulation of lipid uptake by pulmonary epithelial cells in vitro. *Am J Physiol* 270: L69-L79, 1996.
39. Ikegami M, Korfhagen TR, Bruno MD, Whitsett JA, Jobe AH. Surfactant metabolism in surfactant protein A-deficient mice. *Am J Physiol* 272: L479-L485, 1997.
40. Iyengar R. Molecular and functional diversity of mammalian Gs-stimulated adenylyl cyclases. *FASEB J* 7: 768-75, 1993.
41. Jain D, Dodia C, Fisher AB, Bates SR. Pathways for clearance of surfactant protein A from the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: L1011-L1018, 2005.
42. Jin M, Snider MD. Role of microtubules in transferrin receptor transport from the cell surface to endosomes and the Golgi complex. *J Biol Chem* 268: 18390-7, 1993.

43. Johansson J, Curstedt T. Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components. *Eur J Biochem* 244: 675-93, 1997.
44. King RJ. Pulmonary surfactant. *J Appl Physiol* 53: 1-8, 1982.
45. Korfhagen TR, Bruno MD, Ross GF, Huelsman KM, Ikegami M, Jobe AH, Wert SE, Stripp BR, Morris RE, Glasser SW, Bachurski CJ, Iwamoto HS, Whitsett JA. Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9594-9, 1996.
46. Kramer BW, Speer CP. Surfactant proteins A and D: major factors of the immune response of the lung. *Z Geburtshilfe Neonatol* 207: 41-7, 2003.
47. LeVine AM, Bruno MD, Huelsman KM, Ross GF, Whitsett JA, Korfhagen TR. Surfactant protein A-deficient mice are susceptible to group B streptococcal infection. *J Immunol* 158: 4336-40, 1997.
48. Lewis JF, Veldhuizen R. The role of exogenous surfactant in the treatment of acute lung injury. *Annu Rev Physiol* 65: 613-42, 2003.
49. Löffler G&PPE. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag GmbH: 792ff, 1997.
50. Madelian V, La Vigne E. Rapid regulation of a cyclic AMP-specific phosphodiesterase (PDE IV) by forskolin and isoproterenol in LRM55 astroglial cells. *Biochem Pharmacol* 51: 1739-47, 1996.
51. McCormack FX, Whitsett JA. The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. *J Clin Invest* 109: 707-12, 2002.

52. Mellman I. Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 575-625, 1996.
53. Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR. Endocytosis. *Physiol Rev* 77: 759-803, 1997.
54. Muller WJ, Zen K, Fisher AB, Shuman H. Pathways for uptake of fluorescently labeled liposomes by alveolar type II cells in culture. *Am J Physiol* 269: L11-L19, 1995.
55. Nag K, Munro JG, Inchley K, Schurch S, Petersen NO, Possmayer F. SP-B refining of pulmonary surfactant phospholipid films. *Am J Physiol* 277: L1179-L1189, 1999.
56. Perez-Gil J. Molecular interactions in pulmonary surfactant films. *Biol Neonate* 81 Suppl 1: 6-15, 2002.
57. Persson A, Chang D, Crouch E. Surfactant protein D is a divalent cation-dependent carbohydrate-binding protein. *J Biol Chem* 265: 5755-60, 1990.
58. Pian MS, Dobbs LG. Activation of G proteins may inhibit or stimulate surfactant secretion in rat alveolar type II cells. *Am J Physiol* 266: L375-L381, 1994.
59. Pinot F, Walti H, Haagsman HP, Polla BS, Bachelet M. Curosurf modulates cAMP accumulation in human monocytes through a membrane-controlled mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L99-L104, 2000.
60. Poelma DL, Ju MR, Bakker SC, Zimmermann LJ, Lachmann BF, van Iwaarden JF. A common pathway for the uptake of surfactant lipids by alveolar cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30: 751-8, 2004.

61. Poelma DL, Zimmermann LJ, Scholten HH, Lachmann B, van Iwaarden JF. In vivo and in vitro uptake of surfactant lipids by alveolar type II cells and macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L648-L654, 2002.
62. Poelma DL, Zimmermann LJ, van Cappellen WA, Haitzma JJ, Lachmann B, van Iwaarden JF. Distinct effects of SP-B and SP-C on the uptake of surfactant-like liposomes by alveolar cells in vivo and in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L1056-L1065, 2004.
63. Possmayer F. A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *Am Rev Respir Dis* 138: 990-8, 1988.
64. Rice WR, Sarin VK, Fox JL, Baatz J, Wert S, Whitsett JA. Surfactant peptides stimulate uptake of phosphatidylcholine by isolated cells. *Biochim Biophys Acta* 1006: 237-45, 1989.
65. Rooney SA. Regulation of surfactant secretion. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 129: 233-43, 2001.
66. Ruckert P, Bates SR, Fisher AB. Role of clathrin- and actin-dependent endocytotic pathways in lung phospholipid uptake. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L981-L989, 2003.
67. Samuels ER, Harrower T, Kahlon S, Oulton MR, MacDonald J, Siauw C, Scott JE. Calcium-PS-dependent protein kinase C and surfactant protein A in isolated fetal rabbit type II alveolar cells and surfactant-related material. *Pediatr Pulmonol* 27: 95-103, 1999.
68. Sane AC, Young SL. The stimulation of cellular phospholipid uptake by surfactant apoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1213: 107-12, 1994.

69. Sano K, Voelker DR, Mason RJ. Tetradecanoylphorbol acetate and terbutaline stimulate surfactant secretion in alveolar type II cells without changing the membrane potential. *Biochim Biophys Acta* 902: 317-26, 1987.
70. Schaller-Bals S, Bates SR, Notarfrancesco K, Tao JQ, Fisher AB, Shuman H. Surface-expressed lamellar body membrane is recycled to lamellar bodies. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L631-L640, 2000.
71. Serrano AG, Cruz A, Rodriguez-Capote K, Possmayer F, Perez-Gil J. Intrinsic structural and functional determinants within the amino acid sequence of mature pulmonary surfactant protein SP-B. *Biochemistry* 44: 417-30, 2005.
72. Shiffer K, Hawgood S, Duzgunes N, Goerke J. Interactions of the low molecular weight group of surfactant-associated proteins (SP 5-18) with pulmonary surfactant lipids. *Biochemistry* 27: 2689-95, 1988.
73. Spragg RG, Lewis JF, Walmrath HD, Johannigman J, Bellingan G, Laterre PF, Witte MC, Richards GA, Rippin G, Rathgeb F, Hafner D, Taut FJ, Seeger W. Effect of recombinant surfactant protein C-based surfactant on the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 351: 884-92, 2004.
74. Stevens PA, Wissel H, Sieger D, Meienreis-Sudau V, Rustow B. Identification of a new surfactant protein A binding protein at the cell membrane of rat type II pneumocytes. *Biochem J* 308 (Pt 1): 77-81, 1995.
75. Stevens PA, Wissel H, Zastrow S, Sieger D, Zimmer KP. Surfactant protein A and lipid are internalized via the coated-pit pathway by type II pneumocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L141-L151, 2001.
76. Strayer DS. Identification of a cell membrane protein that binds alveolar surfactant. *Am J Pathol* 138: 1085-95, 1991.

77. Suikkanen S, Aaltonen T, Nevalainen M, Valilehto O, Lindholm L, Vuento M, Vihinen-Ranta M. Exploitation of microtubule cytoskeleton and dynein during parvoviral traffic toward the nucleus. *J Virol* 77: 10270-9, 2003.
78. Suwabe A, Mason RJ, Voelker DR. Temporal segregation of surfactant secretion and lamellar body biogenesis in primary cultures of rat alveolar type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5: 80-6, 1991.
79. Taneva SG, Keough KM. Dynamic surface properties of pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C and their mixtures with dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochemistry* 33: 14660-70, 1994.
80. Veldhuizen EJ, Batenburg JJ, van Golde LM, Haagsman HP. The role of surfactant proteins in DPPC enrichment of surface films. *Biophys J* 79: 3164-71, 2000.
81. Weaver TE, Conkright JJ. Function of surfactant proteins B and C. *Annu Rev Physiol* 63: 555-78, 2001.
82. Weston MC, Anderson N, Peachell PT. Effects of phosphodiesterase inhibitors on human lung mast cell and basophil function. *Br J Pharmacol* 121: 287-95, 1997.
83. White MK, Strayer DS. Surfactant protein A regulates pulmonary surfactant secretion via activation of phosphatidylinositol 3-kinase in type II alveolar cells. *Exp Cell Res* 255: 67-76, 2000.
84. Whitsett JA, Noguee LM, Weaver TE, Horowitz AD. Human surfactant protein B: structure, function, regulation, and genetic disease. *Physiol Rev* 75: 749-57, 1995.
85. Whitsett JA, Weaver TE. Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. *N Engl J Med* 347: 2141-8, 2002.

86. Wissel H, Lehfeldt A, Klein P, Muller T, Stevens PA. Endocytosed SP-A and surfactant lipids are sorted to different organelles in rat type II pneumocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L345-L360, 2001.
87. Wissel H, Looman AC, Fritzsche I, Rustow B, Stevens PA. SP-A-binding protein BP55 is involved in surfactant endocytosis by type II pneumocytes. *Am J Physiol* 271: L432-L440, 1996.
88. Wissel H, Schulz C, Rudiger M, Krull M, Stevens PA, Wauer RR. Chlamydia pneumoniae affect surfactant trafficking and secretion due to changes of type II cell cytoskeleton. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29: 303-13, 2003.
89. Wissel H, Zastrow S, Richter E, Stevens PA. Internalized SP-A and lipid are differentially resecreted by type II pneumocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L580-L590, 2000.
90. Wright JR. Host defense functions of pulmonary surfactant. *Biol Neonate* 85: 326-32, 2004.
91. Wright JR. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol* 5: 58-68, 2005.
92. Wright JR, Clements JA. Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Respir Dis* 136: 426-44, 1987.
93. Wright JR, Wager RE, Hawgood S, Dobbs L, Clements JA. Surfactant apoprotein Mr = 26,000-36,000 enhances uptake of liposomes by type II cells. *J Biol Chem* 262: 2888-94, 1987.
94. Wright JR, Youmans DC. Degradation of surfactant lipids and surfactant protein A by alveolar macrophages in vitro. *Am J Physiol* 268: L772-L780, 1995.

95. Zaltash S, Palmblad M, Curstedt T, Johansson J, Persson B. Pulmonary surfactant protein B: a structural model and a functional analogue. *Biochim Biophys Acta* 1466: 179-86, 2000.
96. Zen K, Notarfrancesco K, Oorschot V, Slot JW, Fisher AB, Shuman H. Generation and characterization of monoclonal antibodies to alveolar type II cell lamellar body membrane. *Am J Physiol* 275: L172-L183, 1998.
97. Zoellner N&ED. Untersuchung und Bestimmung der Lipide im Blut. In: Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York, 1965.

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatcyclase
CCV	clathrin coated vesicles
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
EE	early endosomes
IBMX	Isobutylmethylxanthine
LB	Lamellarbody
LE	late endosomes
LPS	Lipopolysaccharide
Mr	Molecular Weight
MVB	Multivesicularbody
PC	Phosphatidylcholin
PG	Phosphatidylglycerol
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PL	Phospholipide
PLC	Phospholipase C
SAPLIP	saposin like proteins
SP-A, -B, -C, -D	surfactantassoziertes Protein A, B, C, D
TPA	Tetradecanoylphorbolacetat

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau von DPPC	9
Abbildung 2: Aufbau eines Phospholipidmoleküls	9
Abbildung 3: Membranaufbau	9
Abbildung 4: Zelle mit Endo- und Exozytose	12
Abbildung 5: Alveolus mit Typ II-Zelle und Surfactant	15
Abbildung 6: Aufnahmewege für Surfactant und seine Bestandteile	18
Abbildung 7: Adenylatcyclase	26
Abbildung 8: Phospholipase C	27
Abbildung 9: Adenylatcyclase mit cAMP und G-Proteinen und deren Beeinflussung durch IBMX	28
Abbildung 10: SP-B im Tricine-Gel (links) und Immuno-Westernblot (rechts)	34
Abbildung 11: Aufnahme von Lipiden in Typ II-Pneumozyten in Abhängigkeit von der SP-B Konzentration der Liposomen	43
Abbildung 12: Einfluß der Kaliumdepletion auf die Lipidaufnahme mit SP-B sowie unter Zusatz von SP-A	45
Abbildung 13: Lipidaufnahme mit 100 µM Nocodazole	46
Abbildung 14: Lipidaufnahme mit SP-B und 100 µM Nocodazole	47
Abbildung 15: Lipidaufnahme mit 100 µM IBMX und 100 µM Forskolin	48
Abbildung 16: Lipidaufnahme mit SP-A sowie 100 µM IBMX und 100 µM Forskolin	49
Abbildung 17: Lipidaufnahme mit SP-B sowie 100 µM IBMX und 100 µM Forskolin	50
Abbildung 18: Lipidaufnahme mit SP-B und SP-A sowie 100 µM IBMX und 100 µM Forskolin	51
Abbildung 19: Lipidaufnahme mit 160 µM GTP γ mit und ohne SP-A	52
Abbildung 20: Lipidaufnahme mit SP-B und 160 µM GTP γ mit und ohne SP-A	53
Abbildung 21: Lipidaufnahme mit 600 nM Calphostin C mit und ohne SP-A	54
Abbildung 22: Lipidaufnahme mit SP-B und 600 nM Calphostin C mit und ohne SP-A	55
Abbildung 23: Lipidaufnahme mit 23,4 nM Wortmannin mit und ohne SP-A	56
Abbildung 24: Lipidaufnahme mit SP-B und 23,4 nM Wortmannin mit und ohne SP-A	57
Abbildung 25: Abhängigkeit der Lipidaufnahme von Clathrin	62
Abbildung 26: Abhängigkeit der Lipidaufnahme von Tubulin	64
Abbildung 27: Adenylatcyclase mit cAMP und IBMX sowie Forskolin	66
Abbildung 28: Phosphatidylinositol 3-Kinase mit dem second messenger IP3 und Wortmannin	68
Abbildung 29: Proteinkinase C mit Calphostin C	69
Abbildung 30: G-Proteine im Signaltransduktionssystem der Adenylatcyclase	70
Abbildung 31: G-Proteine im Signaltransduktionssystem der PLC	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zytoskelett	13
Tabelle 2:	Standardreihe	35
Tabelle 3:	Probenreihe SP-B	35
Tabelle 4:	BSA-Stammlösung	37
Tabelle 5:	SP-B Liposomen unterschiedlicher Konzentration	39
Tabelle 6:	Abhängigkeit der Lipidaufnahme an Typ II-Zellen	73

Danksagung

Viele Menschen haben mich bei der Fertigstellung dieser Dissertation unterstützt. Als erstes möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich während dieser gesamten Zeit moralisch und auch finanziell unterstützt haben. Insbesondere in jenen „schlechten Zeiten“, als dieses Vorhaben aussichtslos schien, haben sie mir Mut und Kraft gegeben, um weitermachen zu können. Was auch immer kam - Ihr habt immer an mich geglaubt! Es hat sich gelohnt, und ihr habt sehr viel dazu beigetragen –
DANKESCHÖN!

Ein unendliches Dankeschön gebührt meinem Doktorvater, PD. Dr. med. P. A. Stevens für die fachliche Gründlichkeit und Kompetenz, mit der er mich durch das Labyrinth der wissenschaftlichen Arbeit begleitet und geführt hat. Immer wieder hat er mich zum selbstständigen Denken ermutigt und in mir die Hoffnung genährt, daß ich es schaffen kann. Trotz zahlreicher beruflicher und privater Belastungen und großer räumlicher Distanz hat er großartige Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit geleistet. Insbesondere für meine praktische Arbeit im Lipidlabor der Charité bin ich zu großem Dank Frau Dr. H. Wissel verpflichtet, die mir in dem Jahr der experimentellen Arbeit täglich mit Rat und Tat zur Seite stand.

Liebe Helga - dir möchte ich aus tiefstem Herzen danken! Im Labor haben wir Seite an Seite gearbeitet, und trotz eigener Aufgaben hattest du immer ein offenes Ohr für mich und meine Probleme. Danke auch dafür, daß du mir das Gefühl gegeben hast, daß es auch noch ein Leben außerhalb des Labors gibt und nicht die Welt untergeht, wenn mal wieder ein Experiment nicht geklappt hat.

Markus, auch Du ein unersetzlicher Helfer in der Experimentierphase. Wo wäre nur das wertvollste SP-B, wenn es dich nicht gäbe – wahrscheinlich noch in BB, vielen Dank. Meinem Freund Torsten möchte ich ebenfalls danken für die ausdauernde Unterstützung bei dieser Dissertation. Dieses kleine Dankeschön kann niemals das aufwiegen, was ich dir schulde.

Ich möchte auch allen meinen Freunden und Verwandten danken, die während dieser langwierigen Zeit nie den Glauben an mich verloren haben, teilweise habt ihr es sogar vor mir geschafft – Danke und Gratulation (jetzt weiß ich endlich selbst was es bedeutet).

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Eidstattliche Erklärung

Ich, Helena Zerr, erkläre, daß ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:
„Einfluß des surfactantassoziierten Proteins B auf die Aufnahme von Lipiden in Typ II-
Zellen im Vergleich mit und ohne das surfactantassoziierte Protein A“ selbst verfaßt
und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die
(unzulässige) Hilfe Dritter verfaßt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten
dargestellt habe.