

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik  
im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Professor Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

**Zellbiologische Charakterisierung von Surfactant Protein C Mutationen  
bei Interstitiellen Lungenkrankheiten**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Tobias Stefan Thurm  
aus

Weimar

2014

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Gries

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Kohlhäufel  
Priv. Doz. Dr. Claus Neurohr

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Sunčana Kern und  
Dr. rer. nat. Ralf Zarbock

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der Mündlichen Prüfung: 13.02.2014

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik  
im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Professor Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

**Zellbiologische Charakterisierung von Surfactant Protein C Mutationen  
bei Interstitiellen Lungenkrankheiten**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Tobias Stefan Thurm  
aus

Weimar

2014

**Für Vanessa**



## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	8
1.1. Surfactant - Homöostase und Funktion.....	8
1.2. Interstitielle Lungenerkrankungen.....	11
1.3. EMT in ILD .....	14
1.4. Surfactant-Protein-C .....	17
1.4.1. Funktion, Aufbau und Prozessierung .....	17
1.4.2. Surfactant Protein C Mutationen als Ursache für ILD.....	21
1.5. Zielsetzungen der Arbeit .....	25
2. Material und Methoden.....	26
2.1. Material .....	26
2.1.1. Laborinstrumente .....	26
2.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	27
2.1.3. Kits.....	27
2.1.4. Chemikalien.....	27
2.1.5. Plasmide und Zelllinien.....	28
2.1.6. Antikörper.....	29
2.1.6.1. Für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	29
2.1.6.2. Für Blot-Versuche .....	29
2.1.7. Pufferlösungen .....	30
2.2. Methoden.....	32
2.2.1. Herstellung der Plasmidvektoren.....	32
2.2.2. Zellkultur .....	32
2.2.3 Stabile Transfektion .....	32
2.2.4. Herstellung von Zelllysaten.....	33
2.2.5. MTT-Assay .....	33
2.2.6. Luciferase-Assay zur Ermittlung der generellen Sekretionsleistung.....	33
2.2.7. Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	34
2.2.8. Kongo-Rot Färbung .....	35
2.2.9. Western Blot .....	35
2.2.10. Immunpräzipitation.....	37
2.2.11. Slot Blot.....	37
2.2.12. TGF $\beta$ <sub>1</sub> -ELISA.....	37
2.2.13. Statistische Auswertung .....	38

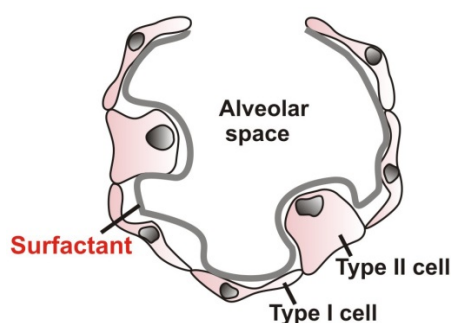
3. Ergebnisse .....	40
3.1. Einfluss von proSP-C-Mutationen auf die allgemeine Zell-Viabilität .....	40
3.2. Einfluss von proSP-C-Mutationen auf die generelle Sekretionsleistung.....	40
3.3. Intrazelluläres Verteilungsmuster von ProSP-C-Mutationen .....	41
3.4. Prozessierung der proSP-C Mutanten.....	43
3.5. Aberrantes proSP-C <sup>I73T</sup> und proSP-C <sup>A116D</sup> akkumulieren intrazellulär .....	45
3.6. Intrazelluläre Kompartimentierung von proSP-C .....	46
3.6.1. ProSP-C <sup>P30L</sup> , proSP-C <sup>P115L</sup> und proSP-C <sup>L188Q</sup> verbleiben im ER .....	46
3.6.2. Sowohl proSP-C <sup>WT</sup> als auch proSP-C <sup>MUT</sup> befinden sich im Golgi-Apparat .....	48
3.6.3. ProSP-C <sup>P30L</sup> und proSP-C <sup>P115L</sup> : Geringerer Anteil in Lamellar-Körperchen .....	48
3.6.4. ProSP-C <sup>I73T</sup> und proSP-C <sup>A116D</sup> : Keine Sekretion über den SNARE-Komplex .....	50
3.7. Quantitative Veränderung von Proteinen, die als Kompartimentmarker dienen.....	51
3.7.1. Quantitative Verringerung des ER-Markers Calnexin in BRICHOS-Mutationen..	51
3.7.2. Expression von Lamellar-Körperchen-Proteinen in mit proSP-C <sup>MUT</sup> transfizierten Zellen .....	52
3.8. Einige proSP-C <sup>MUT</sup> führen zu intrazellulären amyloidähnlichen Aggregaten .....	53
3.9. Abbau von proSP-C <sup>MUT</sup> durch das Ubiquitin-Proteasom-System.....	55
3.9.1. Auftreten von proSP-C <sup>MUT</sup> in Ubiquitin-positiven Vesikeln .....	55
3.9.2. Verstärkte Ubiquitinylierung von proSP-C-Formen bei p.I73T und p.P115L.....	57
3.10. ProSP-C <sup>I73T</sup> und proSP-C <sup>A116D</sup> gelangen in die Plasmamembran .....	57
3.11. ProSP-C <sup>WT</sup> unterliegt einer vermehrten Autophagie .....	58
3.12. Einfluss stabil transfizierter proSP-C Mutationen auf das UPR-/ ER-Stress-System ..	59
3.12.1. Auswirkung der stabilen Expression von proSP-C <sup>MUT</sup> auf Marker für ER-Stress	59
3.12.2. Vorkommen von proSP-C <sup>WT</sup> und proSP-C <sup>MUT</sup> ohne ER-Arrest in BiP/GRP78 positiven Vesikeln .....	61
3.13. Sekretion von TGF-β in proSP-C <sup>MUT</sup> exprimierenden Zellen.....	63
3.14. Überblick über die gesamten Ergebnisse .....	64
4. Diskussion.....	66
4.1. Gleicher Endeffekt durch Mutationen: SP-C Sekretion gestört .....	67
4.2. Einteilung der Mutationen nach ihrer intrazellulären Lokalisation/Prozessierung .....	67
4.3. Zelluläre Reaktionen auf Fehlprozessierung und Prozessierungsstopp.....	69
4.4. Mutationen der BRICHOS-Domäne zeigen ein unterschiedliches Verhaltensmuster...	70
4.5. ProSP-C: Tendenz zu β-Fibrillen und protektiver Effekt der BRICHOS-Domäne.....	71
4.6. BiP/GRP78 notwendig für einen korrekten Transport des proSP-C .....	72
4.7. Stabil transfizierte Zellen mit <i>SFTPC</i> -Mutationen adaptieren sich an ER-Stress.....	73
4.8. Generelle Auswirkungen auf die Funktionen der Zelle .....	74
4.9. Ausblick .....	75
5. Zusammenfassung .....	78

6. Literaturverzeichnis .....	80
7. Anhang .....	92
7.1. Ergänzende Daten: Messung der proSP-C mRNA Expression .....	92
7.2. Abkürzungsverzeichnis .....	93
7.3. Abbildungsverzeichnis .....	94
7.4. Tabellenverzeichnis .....	96
7.5. Lebenslauf .....	97
7.6. Publikationsliste .....	98
8. Danksagung .....	99

## 1. Einleitung

### 1.1. Surfactant - Homöostase und Funktion

Die Endstrecke der Atemwege bilden die Alveolen der Lunge, in denen der Gasaustausch mit den Kapillaren stattfindet. Die Barriere zwischen diesen beiden wird aus dem kapillären Endothel, dem Interstitium und den parenchymalen Zellen der Lunge, den so genannten Pneumozyten Typ I und Typ II, gebildet. Während die Pneumozyten Typ-I 90% der alveolären Auskleidung ausmachen und eine entscheidende Rolle beim Gasaustausch innehaben, stellen die Typ-II Zellen hochspezifische Lungenzellen dar, die essentiell für eine intakte Lungenfunktion sind. Sie produzieren Surfactant, aktivieren die Erregerabwehr bei Anwesenheit von pathogenen Keimen [12, 79] und können sich bei Endothelschäden im Sinne eines Reparaturmechanismus in Pneumozyten Typ-I umwandeln [33].



**Abbildung 1: Graphische Darstellung des Alveolarraums**

Gezeigt ist eine exemplarische Alveole mit dem luftgefüllten Alveolarraum (Alveolar space) und dem angrenzenden raumbildenden Lungenparenchym, bestehend aus Pneumozyten-I (type I cell) und den Pneumozyten-II (type II cell). Letztere bilden das Surfactant, welches als Oberflächenfilm den Alveolarraum auskleidet und vielfältige Aufgaben wahrnimmt (die Grafik wurde freundlicherweise von Dr. S. Kern erstellt).

Die etwa 300 Millionen Alveolen der Lunge sind mit einem speziellen Oberflächenfilm, dem Surfactant, ausgekleidet [104] (siehe *Abb. 1*). Das oberflächenaktive Surfactant („*surface active agent*“) ist essentiell für eine ausreichende und funktionierende Ventilation [76]. Ähnlich dem Luftballon ist insbesondere zu Beginn des „Aufblasens“ der Alveolen, also bei Beginn der Inspiration, eine besonders große Kraft aufzuwenden, um die Oberflächenspannung zu überwinden. Der Surfactantfilm reduziert diese, so dass ein geringerer Kraftaufwand von Nöten ist und die zu leistende Atemarbeit verringert wird. Eine ausreichende Menge an Surfactant steht normalerweise ab der 34. Schwangerschaftswoche bereit, um eine reibungslose Anpassung von den fetalen auf die postnatalen äußeren Bedingungen zu gewährleisten. Neben der Reduktion der Oberflächenspannung nimmt das

Surfactant weitere essentielle Aufgaben war. Zu diesen gehört der Schutz der Lunge vor pathogenen Keimen, deren Abwehr im Rahmen einer Makrophagenaktivierung [55, 79] und ein protektiver Effekt gegenüber Entzündungs- und Umbauprozessen, die nachhaltig schädigend auf die Lungenarchitektur wirken können [103].

Hauptbestandteile des Surfactant sind mit einem Anteil von 90% die Phospholipide. Unter diesen bildet Phosphatidylcholin den Hauptbestandteil (etwa 80% der Phospholipide) [41, 48], welches auch als Marker für die fetale Lungenreife aus dem Fruchtwasser gewonnen werden kann. Etwa die Hälfte des Phosphatidylcholins liegt in zweifach palmitoylierter Form vor [41]. Weitere Komponenten innerhalb der Phospholipide sind Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylserin, Lysophosphatidylcholin und Sphingomyelin [14, 41, 86].

Neben diesen Phospholipiden enthält das Surfactant etwa 10 % Proteine. Den Großteil stellen Serumproteine dar. In sehr viel geringerem Umfang werden vier Surfactant - spezifische Apoproteine (SP) unterschiedlichen Molekulargewichts gefunden [85]. Diese Apoproteine können in zwei Gruppen eingeteilt werden. In der ersten befinden sich die spezifischen Apoproteine SP-A und SP-D, beide hochmolekular und hydrophil. Diese dienen primär der lokalen mikrobiellen Erregerabwehr in den Alveolen und einem Schutz der Alveolen vor Serumproteinasen [55, 82, 86]. Die zweite Gruppe umfasst das SP-B und SP-C, zwei niedermolekulare und äußerst hydrophobe Apoproteine. Diese spielen eine entscheidende Rolle in der Absorption und schnellen Ausbreitung der Surfactantphospholipide in den Alveolen [48, 105]. Daher sind sie auch Bestandteil einer exogen zugeführten Surfactantsubstitution, um eine schnelle Verteilung des Oberflächenfilms in den Alveolen zu gewährleisten. Des Weiteren dienen sie der lokalen Erregerabwehr. So bindet SP-B an Bakterien und führt sie der Phagozytose durch Alveolarmakrophagen zu [111]. SP-C scheint insbesondere der Pseudomonas-Abwehr zu dienen, in dem es Lipopolysaccharide bindet [7, 43]. *Tabelle 1* gibt einen Überblick über die vier genannten Surfactant-Proteine.

**Tabelle 1: Überblick über die Surfactantproteine**

	SP-A	SP-B	SP-C	SP-D
<b>Molekulargewicht</b>	26-38 kDa	8,7 kDa	3,7 kDa	43 kDa
<b>Polarität</b>	hydrophil	hydrophob	hydrophob	hydrophil
<b>Funktionen</b>	Immunabwehr	Surfactantstabilisierung	Surfactantstabilisierung	Immunabwehr
	Myelinbildung	Reduzierung der Oberflächenspannung	Reduzierung der Oberflächenspannung	Regulation der Surfactant-Balance
	Inhibition der Serumproteasen	LB-Genese SP-C Genese		
	Surfactantadsorption	Immunabwehr	Immunabwehr	
<b>Sekretion</b>	direkt	via LB	via LB	direkt
<b>Defektauswirkung</b>	ILD Infekte unter Stress	ILD	ILD	Emphysem, Infektionen

LB: Lamellar-Körperchen; SP: Surfactant-Protein; ILD: Interstitielle Lungenkrankheiten; Tabelle zusammengestellt aus [3, 55, 85]

In den Pneumozyten Typ-II werden die Phospholipide zusammen mit SP-B und SP-C in speziellen Organellen, den so genannten Lamellar-Körperchen (LB), gespeichert und transportiert. Diese verschmelzen unter Vermittlung von SNARE-Proteinen wie Synaptobrevin, Syntaxin und Snap23/25 mit der Plasmamembran und geben ihren Inhalt an den Extrazellularraum ab [2, 116]. Des Weiteren scheint ABCA3, ein Protein aus der ABC-Transporterfamilie, wichtig für die Bildung von LBs zu sein [13, 26]. Die Lamellar-Körperchen stellen eine zwiebelschalenartige Anordnung von Membranen dar und entstehen aus mehreren unreifen Vorgängerorganellen [6, 37, 99]. Phospholipide ordnen sich über Neusynthese oder endosomales Recycling zu so genannten Multivesikulär-Körperchen (MVB) und *composite bodies* an, aus denen schlussendlich Lamellar-Körperchen entstehen (Abb 5). Im Gegensatz zu SP-C ist SP-B essentiell für die Bildung von intakten Lamellar-Körperchen [29]. Bei SP-B Defekten kann Surfactant nicht korrekt transportiert werden [72, 87]. Notwendig für eine funktionierende Sekretion ist zusätzlich ein saures Milieu (pH 5,6 – 6,1) innerhalb der Lamellar-Körperchen [28, 85]. Um stets gleiche alveoläre Konzentrationen an sezerniertem Surfactant zu gewährleisten, kann dieses entweder über endosomale Strukturen in die Zelle wieder aufgenommen oder durch Alveolarmakrophagen phagozytiert werden [19].

Entscheidend für eine effektive Surfactant Funktion ist das korrekte Zusammenspiel zwischen Lipiden und Apoproteinen. Aufgrund der komplexen und ineinandergreifenden Transport- und Funktionsweisen stellt das Surfactant ein labiles und für Erkrankungen äußerst anfälliges System dar.

## 1.2. Interstitielle Lungenerkrankungen

Interstitielle Lungenerkrankungen (englisch: *interstitial lung diseases*; kurz ILD) sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die den Respirationstrakt betreffen und typischerweise einen chronischen Verlauf nehmen. Betroffen sind die Alveolen, das Alveolarepithel, das Kapillarendothel sowie der extrazelluläre Raum im pulmonalen Interstitium [39]. Gemeinsam ist den verschiedenen Entitäten der ILD eine ähnliche Klinik, Bildgebung und therapeutisches Regime. Allerdings unterscheiden sich die einzelnen Formen zum Teil gravierend in ihrer Prognose und ihrem Manifestationszeitpunkt. Unterschieden werden sie durch ihr histologisches Bild. Die ILD sind entweder auf die Lunge begrenzt oder Teil einer Multiorganerkrankung, wie beispielsweise im Rahmen von Vaskulitiden und Kollagenosen [32, 39]. Es gibt ILD mit bekannter Genese (etwa 50%), wie Asbestose, Stäube, Strahlenpneumonitis, und solche mit idiopathischer Genese (50%). Generell soll das Zusammenspiel von auslösendem Agens, einer dauerhaft schädlichen Umwelt und einem vulnerablen Gewebe zur Ausprägung einer ILD führen [32, 59]. Daneben sind auch familiäre Formen bekannt, wie beispielsweise Surfactant-Defekte, Morbus Niemann-Pick, Morbus Gaucher, Hermansky-Pudlak Syndrom und Sarkoidose. Zu den auslösenden Agenzien gehören Stäube und Viren (hier RSV, EBV und Adenoviren) [39]. Eine Klassifikation der ILD war lange Zeit uneinheitlich, nicht zuletzt weil es mehr als 200 verschiedene Subtypen gibt. 2001 konnte sich ein internationales Konsensusgremium auf eine auch aktuell immer noch gültige Klassifikation einigen [1]. *Tabelle 2* gibt einen Überblick über die Klassifikation der ILD.

**Tabelle 2: Klassifikation der ILD**

<b>Typ I: Inflammation, Fibrose, Alveolitis</b>	
<b>Bekannte Genese</b>	<b>Unbekannte Genese</b>
Asbestose	Idiopathische Interstitielle Pneumonie (IIP)
ARDS-Spätfolgen	Akute Interstitielle Pneumonie (AIP)
Aspirationspneumonie	Bronchiolitis assoziierte ILD (RB-ILD)
Gase	Bronchiolitis obliterans (BOOP)
Medikamente	Desquamative Interstitielle Pneumonie (DIP)
Pilze	Idiopathische pulmonale Fibrose (IPF)
Strahlung	Lymphozytenreiche Interstitielle Pneumonie (LIP)
	Nichtspezifische Interstitielle Pneumonie (NSIP)
	Kollagenosen

- Pulmonal-Hämorrhagische Syndrome
  - Goodpasture Syndrom
  - Idiopathische Pulmonale Hämosiderose
  - Isoliert-Pulmonale Kapillaritis
- Pulmonale Alveoläre Proteinose (PAP)
  - Eosinophilenreiche Pneumonie
  - Lymphozytenreiche Interstitielle Pneumonie (LIP)
- Lymphangioliomyomatose
- Amyloidosen
- Hereditäre Krankheiten
  - Phakomatosen
  - Morbus Niemann-Pick
  - Morbus Gaucher
  - Hermansky-Pudlak-Syndrom
- Gastrointestinale-/Lebererkrankungen
  - Morbus Crohn; Colitis Ulcerosa
  - Primär Biliäre Zirrhose
  - Chronisch aktive Hepatitis
- Graft-vs.-host disease nach Transplantation

---

**Typ II: Granulombildung**

---

**Bekannte Genese**

- Organic-dust-Pneumonitis
- Beryllium
- Silikate

**Unbekannte Genese**

- Sarkoidose
- Langerhanszell Granulomatose
- Granulomatöse Vaskulitiden
- Bronchozentrische Granulomatose
- Lymphomatoide Granulomatose

---

Tabelle zusammengestellt aus [39]

Diese hat ihre Gültigkeit insbesondere bei ILD im Erwachsenenalter. Histologisch lassen sich zwei große Gruppen unterscheiden: zum einen eine sich ausbildende Fibrose und Inflammation, zum anderen ein granulomatöser Verlauf mit T-Zell-Invasion und Epitheloid-Zellen. Die innerhalb der idiopathischen interstitiellen Pneumonien häufigste Form ist die idiopathische pulmonale Fibrose (50%) mit einem oft akuten Verlauf, schlechtem



therapeutischen Ansprechen und einer hohen Mortalität innerhalb der ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung [39]. Es findet sich eine typische Anamnese mit trockenem Husten, mäßigem Temperaturanstieg und Luftnot bei reduziertem Allgemeinzustand. Diese Beschwerden verstärken sich bei körperlicher Anstrengung. Die Lungenfunktion zeigt meist eine restriktive Ventilationsstörung. Für die Diagnose wegweisend ist eine adäquate Bildgebung. Goldstandard ist derzeit eine hochauflösende Computertomographie mit typischen Veränderungen wie milchglasartigem Lungengewebe, in späteren Stadien Honigwabemuster und Bullae im Sinne einer lokalen Überblähung [63]. Entscheidend für die Diagnose ist eine Biopsie mit histologischer Sicherung. Therapeutisch kamen bisher hauptsächlich Steroide [30] und Hydroxychloroquin [9, 11, 35] zum Einsatz, bei inadäquatem Ansprechen auch Immunmodulatoren wie Ciclosporin A, Azathioprin, Methotrexat und Cyclophosphamid. Derzeit sind weitere Wirkstoffgruppen in klinischer Erprobung, etwa Makrolide [46, 54].

Für das Kindesalter kann die derzeit gültige Klassifikation nur begrenzt eingesetzt werden, da dort die einzelnen Krankheitsbilder eine deutlich variabelere Klinik und Histologie aufweisen [38]. Aufgrund der Seltenheit von ILD im Kindesalter sind epidemiologische Daten nur in begrenztem Umfang vorhanden. So wird die Prävalenz in Großbritannien auf etwa 0,36/100 000 und in Deutschland auf 0,13/100 000 geschätzt [35, 44]. Um der Notwendigkeit des Zugewinns an besseren epidemiologischen Daten und therapeutischen Ansätzen Rechnung zu tragen, wurde 2012 das europaweite Projekt „chILD-EU“ ins Leben gerufen. Während bei Erwachsenen zwischen Symptombeginn und Erstdiagnose in der Regel weniger als ein Jahr vergehen, dauert es bei Kindern oft mehrere Jahre bis zur definitiven Diagnose einer ILD. Dies mag zum einen an der geringen Prävalenz im Kindesalter liegen, zum anderen auch an dem oft milden und schleichenden Verlauf im Vergleich zur Erkrankung im Erwachsenenalter. Die häufigsten histologisch fassbaren ILD bei Kindern sind die Desquamative Interstitielle Pneumonie (DIP), die Nichtspezifische Interstitielle Pneumonie (NSIP) und die Lymphozytenreiche Interstitielle Pneumonie (LIP) [32] mit oder ohne Pulmonalalveoläre Proteinose (PAP) [45, 63]. *Tabelle 3* zeigt histologische Eckdaten dieser ILD-Formen.

**Tabelle 3: Histologische Eckdaten häufiger kindlicher ILD**

DIP	NSIP	LIP
Invasion von Alveolarmakrophagen	Breites variables Spektrum	Ausgeprägte Lymphozyteninvasion ins Lungeninterstitium
Verdickte Alveolarsepten	Alveolarwandinflammation	(einschl. Plasmazellen, Histiozyten)
Diffuse Verteilung von Entzündungszellen	Chronische Entzündungszeichen	
Geringe Fibrosezeichen	Moderate/ausgeprägte Fibrose	
Hyperplastische Pneumozyten-II	Hyperplastische Pneumozyten-II	

DIP: Diffuse Interstitielle Pneumonie; NSIP: Nichtspezifische Interstitielle Pneumonie; LIP: Lymphozytenreiche Interstitielle Pneumonie; modifiziert nach [32]

Sonderformen der frühkindlichen ILD sind die Pulmonale Interstitielle Glykogenose, die Neuroendokrine Zellhyperplasie und die chronische Pneumonitis [34].

Unter anderem führen auch Surfactant-Defizite zu ILD. Zu diesen gehören Mutationen im Gen für SP-B und SP-C. Des Weiteren zählen Mutationen im ABCA3 Gen und im *thyroid transcription factor 1* Gen (TTF-1) dazu [105]. TTF-1 ist ein Regulator der SP-B und SP-C Transkription. In jüngster Zeit sind Telomerasedefekte in Pneumozyten II als mögliche Ursache für ILD ins Blickfeld der Forschung geraten. Durch fehlerhafte Telomerasen wird die Telomerlänge vorzeitig verkürzt und somit die Regenerationsfähigkeit durch Pneumozyten II verringert. Als Folge könnte es zu einer frühzeitigen Fibrosierung im Sinne einer ILD kommen [4, 36, 98].

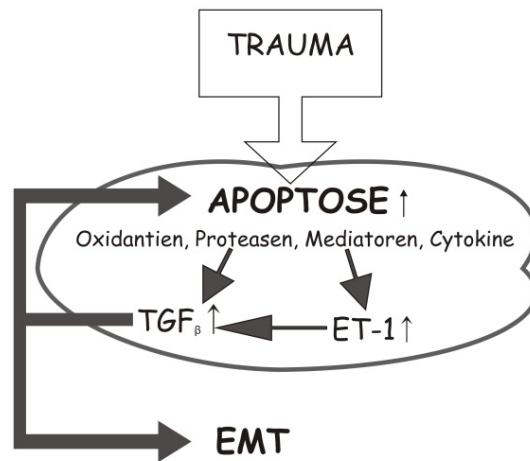
### 1.3. EMT in ILD

Unter epithelial – mesenchymaler Transition (EMT) versteht man die Umwandlung von epitheliale in mesenchymales Gewebe. Genauer umfasst dieser Begriff zwei verschiedene Phänomene. Zum einen die Transformation, zum anderen die Transdifferentiation (Zeisberg Biomarkers), zu der auch die Metaplasie gehört [114]. Auch der umgekehrte Weg, von mesenchymal zu epithelial, ist bekannt (MET). Epitheliale Zellen zeichnen sich durch typische Charakteristika aus. Zu diesen gehören ausgeprägte Zell-Zell-Kontakte mittels *tight junctions*, *adherens junctions*, Desmosomen und *Gap junctions*. Epitheliale Zellverbände weisen eine apikale – basale Ausrichtung auf mit einer endständigen Basalmembran, auf der die Zellen zwar migrieren können, aber trotzdem in ihrem Verband verbleiben. Ein zentraler Oberflächenmarker für epitheliales Gewebe ist E-Cadherin. Weitere Biomarker sind unter anderem Occludin und Zytokeratine. Im Gegensatz hierzu bildet mesenchymales Gewebe keinen organisierten Zellverband aus, auch ist keine strikte Polarisierung vorhanden. Der Zell-

Zell-Kontakt ist nur punktuell und die Migrationsfähigkeit ist deutlich ausgeprägter. Typische mesenchymale Marker sind unter anderem Fibronectin, Vimentin und *smooth-muscle actin*. Solche Biomarker, zu denen weitere Oberflächenmarker, Transkriptionsfaktoren, Zytoskelett-Marker und Extrazellulärproteine gehören, können quantitativ bestimmt werden [102]. Ein zentraler Entwicklungsschritt in der EMT ist der Verlust an E-Cadherin in epithelialen Zellen. Dies kann über verschiedene Signalwege erfolgen. Wichtige Akteure hierbei sind Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, Matrix-Metalloproteinasen und *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ ) [78, 91]. Insbesondere für TGF $\beta$  konnten vielfältige hemmende Einflussmöglichkeiten auf die Transkriptionsrate von E-Cadherin gezeigt werden [92]. Die experimentelle Zugabe von TGF $\beta$  führte zu einer dramatisch ansteigenden Rate an EMT [77]. Allerdings muss EMT nicht irreversibel sein. In einem bestimmten Zeitfenster konnte der Einfluss von TGF $\beta$  unter experimentellen Bedingungen mittels Zugabe von BMP-7 (*bone morphogenetic protein-7*) unterbunden werden [101, 113].

Zeisberg *et al.* unterscheiden drei verschiedene Formen der EMT [114]. Einerseits eine physiologisch ablaufende EMT (und MET) im Rahmen der Embryogenese. So konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung der Herzklappen einem EMT-Prozess unterliegt, in den unter anderem TGF $\beta$  involviert ist [94]. Eine andere Form der EMT findet sich in maligne entarteten Zellen. Die Fähigkeit zur Metastasierung wird unter anderem einer stattgefundenen EMT zugeschrieben. Ein wichtiger Schritt zur Metastasierung ist der Verlust an Zell-Zell-Kontakten und eines geordneten Zellverbands durch Verlust an E-Cadherin [92]. Als Drittes gibt es eine EMT im Rahmen nichtmaligner Erkrankungen. So kann eine chronische Inflammation über EMT zu einer fortschreitenden Fibrose unter Umwandlung von Epithelzellen zu Fibroblasten führen. Beweise hierfür konnten bei chronischen Nierenkrankheiten, in der Linse bei Kataraktleiden sowie in Pneumozyten II bei Patienten mit ILD gesammelt werden [92]. Auch für Mutationen im Surfactant Protein C Gen (*SFTPC*) konnte eine induzierte EMT im *in vitro* Modell nachgewiesen werden [91, 115].

Pneumozyten II wird eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung einer Fibrose im Rahmen von ILD zugeschrieben. Als Reaktion auf ein initiales Trauma können diese eine Reepithelialisierung bewirken oder im Sinne der EMT zu Fibroblasten transformiert werden. Eine dabei andauernde Apoptose scheint einen wichtigen Faktor hierbei zu spielen. Durch Apoptose kommt es zur verstärkten Expression von EMT-Mediatoren, unter anderem TGF $\beta$  und Endothelin-1. Dadurch entsteht eine Art *circulus vitiosus*, da TGF $\beta$  selbst wiederum proapoptotisch wirkt (*Abb. 2*) [31].



**Abbildung 2: TGF $\beta$  als ein zentraler Akteur in EMT**

Durch Apoptose kommt es zur vermehrten Expression von TGF $\beta$ . Hierüber wird einerseits EMT induziert und andererseits der proapoptotische Signalweg weiter unterhalten.

TGF $\beta$ : *transforming growth factor*  $\beta$ ; ET-1: Endothelin 1; EMT: Epithelial- mesenchymale Transition

## 1.4. Surfactant-Protein-C

### 1.4.1. Funktion, Aufbau und Prozessierung

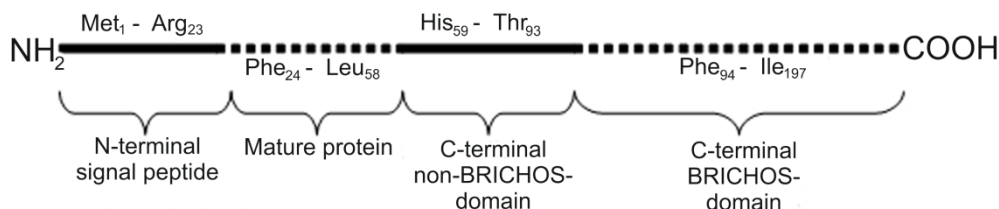
Surfactant Protein C wird ausschließlich in Pneumozyten II produziert, ist essentieller Bestandteil des Surfactant und zählt zu den Transmembranproteinen. Unter den vier bekannten Surfactant Proteinen ist SP-C das kleinste. Ein Vergleich zwischen verschiedenen Spezies zeigt, dass SP-C ein im Verlauf der Evolution hochkonserviertes Protein darstellt, mit einer Homologie von nahezu 90% [19]. Allein das C-terminale Ende des Vorläuferproteins (proSP-C) weist spezifische Eigenheiten auf.

Zudem stellt es eines der bekanntesten hydrophoben Proteine dar. Dies ergibt sich einerseits durch die große Anzahl von unpolaren Aminosäuren (besonders Valin, Isoleucin, Leucin) und andererseits durch kovalente Modifikation von Cysteinen mit Palmitoylsäure (gesättigte C<sub>16</sub>-Fettsäure) [85, 107]. Durch die poly-Valin Region nimmt SP-C als Sekundärstruktur eine  $\alpha$ -Helix ein. Gemeinsam mit den Phospholipiden des Surfactant kann so ein Bilayer aufgespannt werden, der eine Reduktion der Oberflächenspannung bewirkt [85]. Die Interaktion mit Lipiden wird zusätzlich durch die ausgeprägte Hydrophobie gefördert. Der Palmitoylierung werden entscheidende Effekte auf die Aufgaben des SP-C zugeschrieben: Neben der schon erwähnten Verstärkung der Hydrophobie [66] ergibt sich auch ein positiver Einfluss auf die  $\alpha$ -Helix und hierdurch Mitwirken bei der Minimierung der Oberflächenspannung und der Filmstabilisierung [52]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Palmitoylgruppen wichtig für eine Interaktion mit SP-B sind [15].

Neben der klassischen Rolle in der Reduktion der alveolären Oberflächenspannung gemeinsam mit SP-B werden SP-C weitere Aufgaben zugeschrieben. Hierzu gehört das Recycling von Surfactant, um eine gleichbleibende alveoläre Konzentration desselben zu gewährleisten. Weiterhin spielt SP-C eine Rolle in der Abwehr pathogener Keime in der Lunge. So konnte eine Interaktion von SP-C mit bakteriellen Lipopolysacchariden nachgewiesen werden [8]. Einen besonderen Stellenwert scheint SP-C in der Abwehr von Pseudomonaden zu spielen [66]. Andererseits hemmen Infektionen und Inflammation (Aktivierung von TNF $\alpha$ ) der Lunge die Neusynthese von SP-C [10].

Das Surfactant Protein C Gen (*SFTPC*) befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosom 8 (8.p21) und besteht aus sechs Exons. Reifes SP-C (mSP-C) entsteht aus einem Vorläuferprotein, proSP-C, das durch posttranslationale Prozessierung zum mSP-C wird. Durch alternatives Splicing existieren zwei verschiedene Formen des unreifen SP-C, die sich marginal in der Zahl ihrer Aminosäuren am C-terminalen Ende unterscheiden [85]. Reifes SP-

C besteht aus 35 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 3,7 kDa. ProSP-C weist nach der Transkription 191 – 197 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 21 kDa auf. Phenylalanin an Position 24 bis Leucin als Aminosäure 58 stellen das spätere reife SP-C innerhalb des proSP-C Moleküls dar.



**Abbildung 3: ProSP-C besteht aus vier intramolekularen Abschnitten**

Dargestellt sind die vier Abschnitte des proSP-C: Die Aminosäuren 1-23 bilden das N-terminale Propeptid; die Aminosäuren 24-58 stellen das spätere mSP-C mit der Transmembrandomäne dar. Das C-terminale Ende enthält die non-BRICHOS Domäne (Aminosäuren 59-93) und die BRICHOS-Domäne (Aminosäuren 94-197); Abbildung erstellt mit Hilfe [19, 85]

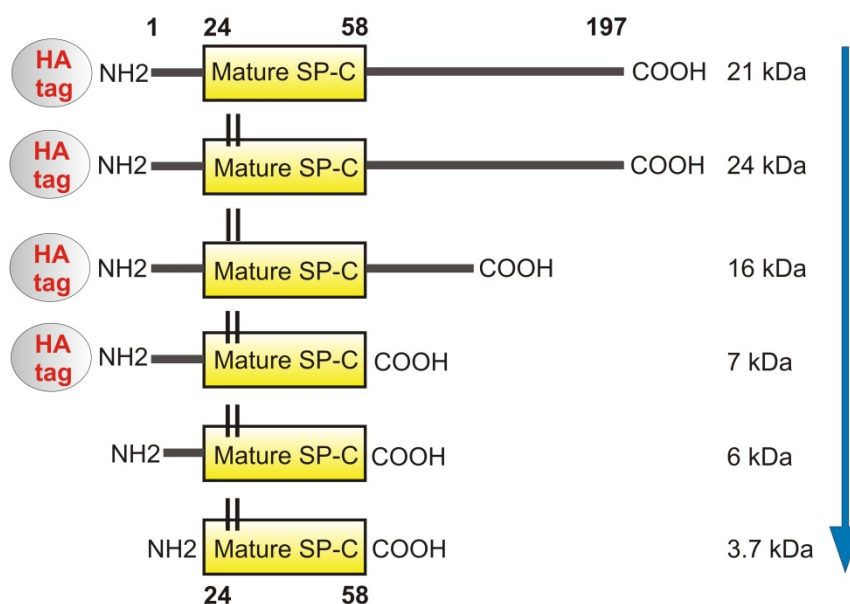
ProSP-C kann in vier Abschnitte eingeteilt werden (Abb. 3). Die Aminosäuren 1 bis 23 stellen das sogenannte N-terminale Propeptid dar. Dieses ist wichtig für den korrekten intrazellulären Transport des proSP-C [19, 97]. Besonders den Aminosäuren Methionin 10 bis Threonin 19 wird hierbei eine entscheidende Rolle zugeschrieben. Wang *et.al* konnten zeigen, dass ein um diesen Abschnitt gekürztes proSP-C nicht prozessiert wird [97].

Das eigentliche mSP-C umfasst die Aminosäuren 24 (Phenylalanin) bis 58 (Leucin). Dieser Abschnitt stellt mit den Aminosäuren 35 bis 58 auch die Transmembrandomäne des SP-C dar [52]. Nicht nur das reife SP-C fungiert als ein solches Transmembranprotein. Auch während der gesamten Prozessierung nimmt das proSP-C eine transmembrane Ausrichtung mit Typ-II Orientierung an (Zytosol<sub>n-terminal</sub>/Lumen<sub>c-terminal</sub>) [97] (Abb. 6). An den Cysteinen 28 und 29 erfolgt die Palmitoylierung, sehr selten auch zusätzlich an Lysin 34. Die Transmembrandomäne dient zusätzlich der korrekten Überführung des proSP-C in das Endoplasmatische Retikulum und dem weiteren intrazellulären Transport. Mutationen in diesem Abschnitt führen zu einem Prozessierungsstopp mit Arrest des proSP-C im ER [19, 85].

Das C-terminale Ende besteht aus der Linker-Domäne - auch C-terminale nonBRICHOS Domäne genannt - und der so genannten BRICHOS Domäne. Die erstere umfasst die Aminosäuren 59 bis 93. Die Funktion dieses Abschnitts ist unklar, allerdings betreffen mehr als 50% der bekannten Mutationen diesen Teil des proSP-C [19]. Die Aminosäuren 94 bis 191

bzw. 197 bilden die BRICHOS Domäne. Die BRICHOS Familie umfasst das **BRI**-Protein (*familial British and Danish dementia*), das **Chondromodulin-I** Protein (Chondrosarkom), das CA11 Protein (Magenkarzinom) und das **SP-C** (ILD) [81]. Diesen gemeinsam ist ein protektiver Effekt gegenüber der Ausbildung von  $\beta$ -Fibrillen. Bei Defekten in den BRICHOS-Proteinen kommt es, wie dies von der Alzheimerkrankheit bekannt ist, zu amyloidartigen Ablagerungen als Teilaspekt der oben genannten Krankheiten. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine Valin-reiche Aminosäuresequenz zur spontanen Umformung in  $\beta$ -Fibrillen neigt [107]. Dies trifft auf die Transmembrandomäne des proSP-C zu. Die BRICHOS Domäne verhindert als intramolekulares Chaperon (Faltungshelfer) eine solche Umformung und fördert die Beibehaltung der  $\alpha$ -Helix [50, 108]. Zusätzlich dient das C-terminale Ende als Signalprotein. Es ist notwendig für die korrekte Prozessierung des proSP-C im cis-Golgi-Netzwerk [19]. Hierbei scheinen besonders die beiden Cysteine an Aminosäureposition 120 und 189 beteiligt zu sein, die durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke eine intramolekulare Schleife bewirken. Der genaue Wirkmechanismus ist allerdings nicht abschließend aufgeklärt. Ein Fehlen der letzten 10 Aminosäuren führt zwar zur Translation, aber zu keiner weiteren Prozessierung [85].

Nach der Transkription erfolgt als erster Schritt der posttranslationalen Prozessierung die Palmitoylierung der Cysteine an Aminosäureposition 28 und 29 sowie die Ausbildung der Disulfidbrücke am proSP-C<sub>21</sub> (proSP-C mit 21 kDa). Anschließend finden zwei c-terminale Abspaltungen zu den Zwischenprodukten proSP-C<sub>16</sub> und proSP-C<sub>7</sub> statt. Dem folgen zwei N-terminale Schnitte zum proSP-C<sub>6</sub> und abschließenden reifen SP-C<sub>3,7</sub>. (*Abb. 4*). Mittlerweile wurde die Protease Cathepsin H identifiziert, die in die Prozessierung involviert ist [21]. Der genaue Mechanismus ist bisher aber nicht bekannt. Die Prozessierung kann auf verschiedenen Ebenen pharmakologisch blockiert werden. Als solche Inhibitoren dienen unter anderem Brefeldin A, Monensin, Bafilomycin und Chloroquin. Auch eine Verschiebung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich wirkt sich nachteilig aus [85].

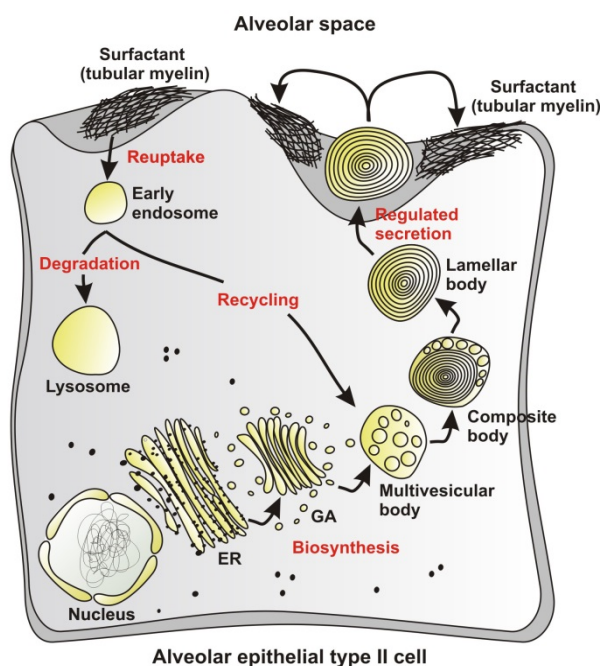


**Abbildung 4: Modell der Prozessierung von proSP-C**

Dargestellt sind die posttranslationalen Prozessierungsschritte von humanem proSP-C in Pneumozyten-II. Die Transkription ergibt ein 21 kDa großes proSP-C. Dieses wird zuerst zweifach im Bereich des späteren mSP-C palmitoyliert (gezeigt als zwei senkrechte schwarze Striche). Wahrscheinlich ergibt sich hieraus ein etwa 24 kDa großes proSP-C. Anschließend finden die beiden c-terminalen Prozessierungsschritte zum proSP-C<sub>16kDa</sub> und proSP-C<sub>7kDa</sub> statt. Danach erfolgen die beiden N-terminalen Schritte zum reifen mSP-C (3,7k Da). Das 21 kDa große primäre proSP-C umfasst hier 197 AS, das spätere mSP-C stellt die Aminosäuren 24 bis 58 im proSP-C Molekül dar (hier durch ein gelbes Rechteck symbolisiert). Zusätzlich dargestellt ist der N-terminal angefügte HA-Tag, der in dieser Arbeit zur Detektion von proSP-C diente. Mit der N-terminalen Prozessierung wird dieses ebenfalls abgeschnitten. mSP-C: reifes (*mature*) SP-C; (modifiziert nach einer Grafik von Dr. S. Kern.)

Die Prozessierungsschritte erfolgen in unterschiedlichen intrazellulären Organellen (*Abb. 5*). Nach der Translation wird proSP-C<sub>21</sub> in das Endoplasmatische Retikulum überführt, wo die erste Abspaltung des C-terminalen Endes zum proSP-C<sub>16</sub> erfolgt. Als Sekretionsprotein durchläuft proSP-C anschließend das Golgi-Netzwerk um dann in Multivesikulär-Körperchen aufgenommen zu werden. Diese stellen eine Zellvakuole mit Ansammlungen von Vesikeln dar, die eine Rolle im endosomalen Stoffwechselweg spielen [85]. Auch Surfactant-Protein B findet sich in MVB. Über eine Zwischenstufe (*composite bodies*) fusionieren die MVB zu den Lamellar-Körperchen. Diese stellen die sekretorischen Vesikel für SP-C, SP-B und Surfactant-Phospholipide dar (*siehe Kapitel 1.1.*). Irgendwo auf dem Weg vom Golgi-Apparat zum Lamellar-Körperchen erfolgt der zweite und dritte Prozessierungsschritt im proSP-C. Die letzte N-terminale Abspaltung zum mSP-C findet im Lamellar-Körperchen statt [19, 85]. Über die endosomal-lysosomale Route kann SP-C zum Recycling und anschließender Resekretion oder zur Degradation in den Lysosomen wieder in die Zelle aufgenommen werden.





**Abbildung 5: Intrazellulärer Transport und Zirkulation von SP-C**

Gezeigt sind wichtige Organellen für die Prozessierung und Zirkulation von SP-C. Über das Endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgi-Apparat (GA) erreicht proSP-C die Multivesikulär-Körperchen, die sich zu Lamellar-Körperchen anordnen und das reife mSP-C sezernieren. Um die Surfactant-Konzentration im Alveolarraum den aktuellen Gegebenheiten anzupassen, kann mSP-C über den endosomal Signalweg wieder in die Zelle aufgenommen werden. Anschließend wird SP-C entweder in Lysosomen abgebaut oder durch Recycling erneut für eine Sekretion zur Verfügung gestellt. (Grafik freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Dr. S. Kern)

#### 1.4.2. Surfactant Protein C Mutationen als Ursache für ILD

Wie in Kapitel 1.2. beschrieben, können Mutationen im SP-C Gen (*SFTPC*) zu interstitiellen Lungenerkrankungen führen. Mittlerweile sind über 50 verschiedene Mutationen in *SFTPC* bekannt [106]. Etwa 50% aller bekannten Mutationen betreffen den Austausch von Isoleucin gegen Threonin an Aminosäureposition 73 des proSP-C Moleküls (p.I73T) [63]. Während *SFTPC*-Mutationen im Erwachsenenalter nur eine sehr untergeordnete Rolle in der Genese von ILD spielen, ist ihr Anteil an kindlichen ILD nicht unerheblich. In einer Studie von Tredano *et al.* fand sich in 10 von 34 untersuchten Kindern mit ILD eine ursächliche *SFTPC*-Mutation [95]. Alle bisher bekannten *SFTPC*-Mutationen sind autosomal dominant. Es werden sowohl hereditäre als auch spontane Krankheitsfälle beschrieben. Die Pathologie mit Ausbildung einer ILD ergibt sich einerseits durch eine direkte toxische Wirkung des mutierten proSP-C auf die Zelle und andererseits durch die indirekte Wirkung auf das Lungengewebe aufgrund eines Mangels an funktionierendem reifen SP-C. Die klinische Präsentation entspricht weitestgehend den in Kapitel 1.2. beschriebenen Symptomen mit Husten, Dyspnoe und Zyanose. Die Histologie kann sehr variabel sein, oft beherrschen Mischbilder das

histologische Bild. Im Gegensatz zu Mutationen im SP-B Gen, die meist einen fulminanten Verlauf direkt postnatal aufzeigen, treten *SFTPC*-Mutationen oft erst jenseits der Perinatalzeit in Erscheinung und unterliegen einem vergleichsweise milden Krankheitsverlauf. Oft kann eine Rekonvaleszenz mit regelhafter Lungenfunktion nach einigen Jahren unter Therapie erreicht werden.

Die erste beschriebene SP-C Mutation umfasste den Verlust des vierten Exons nach Transkription des *SFTPC* Gens durch einen Nukleotidaustausch. Das Ergebnis ist ein um 37 Aminosäuren verkürztes proSP-C<sup>Δexon4</sup>. In der bronchoalveolären Lavage des betroffenen Mädchens fand sich kein reifes SP-C. Auch die Mutter litt an einer ILD, die histologisch als NSIP beschrieben wurde. Zusätzlich war der Großvater mütterlicherseits an einer nicht näher klassifizierten ILD verstorben [74]. Mittlerweile ist bekannt, dass die Δexon4-Mutation sowohl familiär als auch spontan auftritt.

Im Folgenden sollen kurz die in dieser Arbeit genauer untersuchten SP-C Mutationen mit ihrer Klinik und Histologie – sofern bekannt – vorgestellt werden.

Aus den mittlerweile über 50 bekannten Mutationen wurden sechs Mutationen ausgewählt, die Anfang 2009 klinisch bekannt waren (*Tab. 4*).

Aus dem Bereich des mSP-C wurde die bis dato einzige bekannte Mutation p.P30L ausgewählt.

Aus der Linker-Domäne wurde die unter allen SP-C Mutationen häufigste Mutation p.I73T ausgewählt.

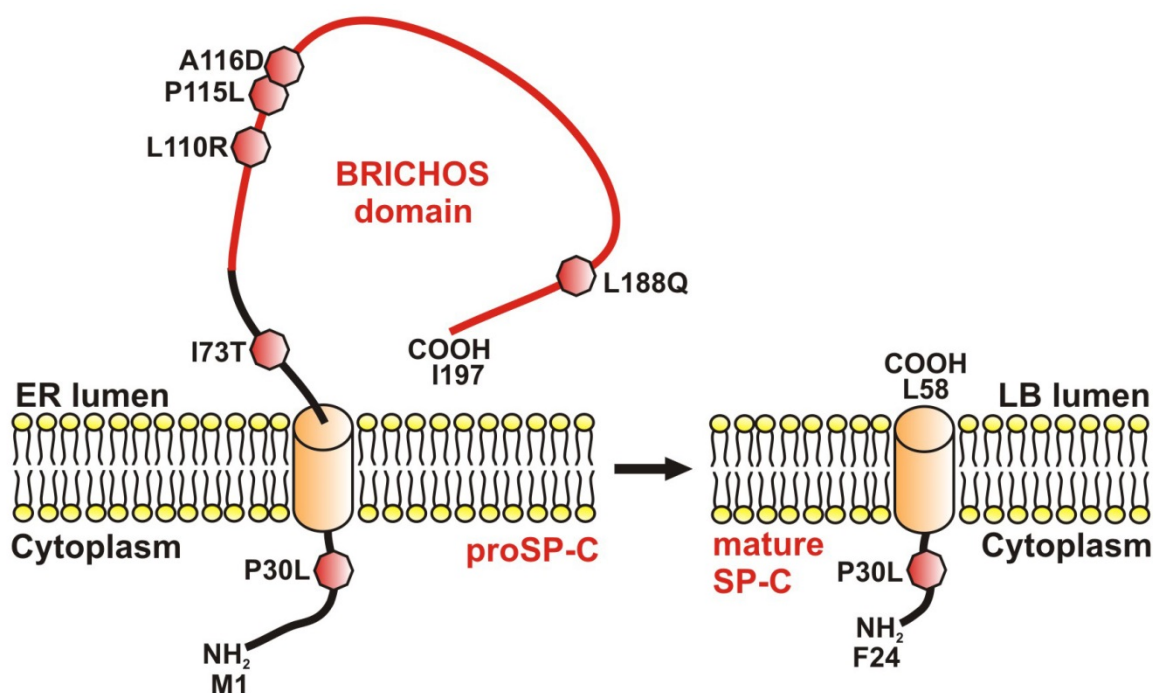
Aus dem Bereich der BRICHOS Domäne wurden die Mutationen p.L110R, p.P115L, p.A116D und p.L188Q ausgewählt.

**Tabelle 4: Überblick zu den für diese Arbeit ausgewählten proSP-C Mutationen**

Name der Mutation	AS-Position im proSP-C Molekül	Ursprüngliche AS	Durch Mutation eingefügte AS	ProSP-C Abschnitt
p.P30L/ proSP-C <sup>P30L</sup>	30	Prolin (P)	Leucin (L)	Reifes SP-C
p.I73T/ proSP-C <sup>I73T</sup>	73	Isoleucin (I)	Threonin (T)	Linker-Domäne
p.L110R/ proSP-C <sup>L110R</sup>	110	Leucin (L)	Arginin (R)	BRICHOS Domäne
p.P115L/ proSP-C <sup>P115L</sup>	115	Prolin (P)	Leucin (L)	BRICHOS Domäne
p.A116D/ proSP-C <sup>A116D</sup>	116	Alanin (A)	Asparaginat (D)	BRICHOS Domäne
p.L188Q/ proSP-C <sup>L188Q</sup>	188	Leucin (L)	Glutamin (Q)	BRICHOS Domäne

AS: Aminosäure

In *Abbildung 6* sind die Lokalisationen der Mutationen innerhalb des proSP-C Moleküls schematisch dargestellt.



**Abbildung 6: Lokalisation der untersuchten Mutationen im proSP-C und mSP-C Molekül**

Linke Seite: die sechs untersuchten Mutationen mit ihrer Lokalisation im proSP-C Molekül; rechte Seite: Position der Mutation p.P30L im reifen SP-C nach vollendeter Prozessierung; Dargestellt ist zudem die typische Zytosol<sub>n-terminal</sub>/Lumen<sub>c-terminal</sub> Ausrichtung des Transmembranproteins; die BRICHOS Domäne ist als rote Schleife gezeichnet; (Abbildung modifiziert nach Dr. S. Kern)

Die im Bereich des späteren mSP-C lokalisierte **proSP-C<sup>P30L</sup>** Mutation wurde in einem weiblichen Neugeborenen beschrieben. Erste Symptome traten bereits kurz nach Geburt auf [106]. Histologisch ergab sich ein Mischbild aus NSIP und DIP mit verdickten Alveolarsepten, vermehrter Makrophageninvasion und PAP [52]. Es konnten nur geringe Mengen an mSP-C in der BAL nachgewiesen werden [24].

Erstmalig von Tredano *et al.* im Jahre 2004 beschrieben, ist **proSP-C<sup>I73T</sup>** mittlerweile die mit etwa 50% häufigste identifizierte Mutation im SP-C Protein [95]. Der Indexpatient war ein Junge mit einer *de novo* Mutation, der nach komplikationsloser Geburt im Alter von etwa einem Monat zunehmend unter Dyspnoe und Husten litt. Mit neun Monaten bestand dauerhafter Sauerstoffbedarf. Ein *follow up* nach fünfjähriger Kortikoidtherapie ergab eine altersgemäße psychomotorische Entwicklung. Histologisch zeigte sich das typische Bild einer NSIP mit PAP. In der BAL konnten neben mSP-C auch große Mengen an fehlprozessiertem proSP-C nachgewiesen werden [16, 22, 95]. Mittlerweile wurden in Kindern mit proSP-C<sup>I73T</sup>

Mutationen eine ganze Reihe von histologisch unterschiedlichen ILD-Formen nachgewiesen [106].

Die Mutation **proSP-C<sup>L110R</sup>** wurde bisher nur einmal in einem Kind beschrieben, das zusätzlich auf dem anderen *SFTPC*-Allel eine p.I73T Mutation aufwies [27]. Die Eltern trugen jeweils eine der Mutationen und waren asymptomatisch. Das Kind zeigte einen fulminanten Verlauf mit Listung zur Lungentransplantation. Ob p.L110R also tatsächlich eine pathologische Mutation oder doch nur einen Polymorphismus darstellt, ist bis dato nicht abschließend geklärt.

Über die Mutation **proSP-C<sup>P115L</sup>** finden sich in der Literatur nur sehr wenige Angaben. Bisher wurde sie in vier Kindern mit ILD nachgewiesen. Es wurde eine chronische Pneumonitis, IPF und eine PAP beschrieben [75].

Im Jahre 2005 berichteten Rosen *et al.* über die erfolgreiche Behandlung eines Jungen mit Hydroxychloroquin, der an einer **proSP-C<sup>A116D</sup>** Mutation litt. Der Junge wurde im Alter von 5 Monaten nach einer Virusinfektion klinisch durch zunehmende Atemnot auffällig. Im CT zeigten sich typische Zeichen einer ILD. Die Lungenbiopsie ergab eine NSIP [80]. Nach einjähriger Therapie war der Patient soweit genesen, dass kein weiterer Bedarf an zusätzlichem Sauerstoff bestand. Die Kontroll-Bildgebung war unauffällig.

2002 wurde in einem Kind mit NSIP und beginnender Lungenfibrose die Mutation **proSP-C<sup>L188Q</sup>** nachgewiesen [93]. In der Familie des Kindes fanden sich mehrere Erwachsene mit p.L188Q Mutationen. Diese wiesen histologisch alle eine UIP auf [88, 93]. Obwohl **proSP-C<sup>L188Q</sup>** einen Prozessierungsstopp im Endoplasmatischen Retikulum verursacht, konnten geringe Mengen an mSP-C nachgewiesen werden. Zusätzlich fanden sich intrazellulär perinukleäre proSP-C Aggregate, so genannte Aggrosome [88].

## 1.5. Zielsetzungen der Arbeit

Durch *SFTPC*-Mutationen hervorgerufene interstitielle Lungenerkrankungen zeigen ein sehr heterogenes Krankheitsspektrum. Histologisch kann ein und dieselbe Mutation unterschiedliche Subtypen einer ILD verursachen. Bisher ist die pathologische Genese, die von der *SFTPC*-Mutation zur ILD führt, weitestgehend unklar. Um diese nachzuvollziehen, ist es nicht nur notwendig, zu verstehen, wie proSP-C physiologisch prozessiert wird. Vielmehr ist es unabdingbar, sich mit der Frage auseinanderzusetzen, wie sich mutiertes SP-C in der Zelle verhält und welche Auswirkungen dieses auf die Zelle und die zellulären Reaktionsmechanismen hat.

Dies sind daher auch die zentralen Fragestellungen der vorliegenden Arbeit. Hierfür wurde proSP-C<sup>WT</sup> mit sechs Mutationen verglichen, die in unterschiedlichen Abschnitten des proSP-C Moleküls lokalisiert sind. In einem ersten Schritt wurde analysiert, ob die Mutationen ein abweichendes Prozessierungsmuster zeigen und ob zwischen den Mutationen eine gewisse Kongruenz besteht. Anschließend wurde der Frage nachgegangen, ob und in welchem Ausmaß sich eine Fehlprozessierung auf die intrazelluläre Lokalisation von proSP-C auswirkt. Soweit dies im Zellmodell möglich war wurde evaluiert, ob mutiertes proSP-C sezerniert werden kann. Hieran anknüpfend wurde untersucht, was die intrazellulären Konsequenzen einer Akkumulation von proSP-C sind. Insbesondere wurde der Frage nach einer eventuell vorhandenen, erhöhten UPR-Rate (*unfolded protein response*) und gesteigerten Ubiquitinylierung nachgegangen. Ein besonderes Augenmerk galt der Charakterisierung der vier BRICHOS-Mutationen und der Funktion der BRICHOS-Domäne als intrazelluläres Chaperon. In einem weiteren Schritt wurden die Folgen auf die zelluläre Morphologie, eine mögliche Aktivierung von EMT-Prozessen und generelle Stoffwechselaktivitäten sowie die Viabilität untersucht. Bereits vorhandene Erkenntnisse zur Prozessierung von SP-C wurden nachvollzogen und gegebenenfalls ergänzt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Laborinstrumente

Analog-Schüttler	GFL, Burgwedel, Deutschland
Axiovert 135 Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Bio-Dot SF	BioRad, Hercules, USA
Cryocontainer	Nalgene, Rochester, USA
Diana III Kamera	Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt, Deutschland
Easypet	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eisschrank -20°C	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Eisschrank -80°C	Thermo Scientific, Waltham, USA
Entwicklerkassette	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Entwicklermaschine CP 1000	AGFA, Mortsels, Belgien
Feinwaage R200D	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Flüssigstickstofftank	German-Cryo, Jüchen, Deutschland
Ikamag REO	Ika, Staufen, Deutschland
Inkubator HeraCell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Magnetblock Dynamag-2 (# 123.21D)	Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norwegen
Mikroskop Olympus CKX41	Olympus Europa Holding, Hamburg, Deutschland
Mikrotiter Plate Reader HT III 12600	Anthos, Krefeld, Deutschland
Nanodrop	Thermo Scientific, Waltham, USA
Neubauer Zählkammer	Brand, Berlin, Deutschland
Novex Mini-Cell	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Novex X Cell II Blot Module	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PH Meter CG 840	Schott, Mainz, Deutschland
Pipetten (10µL, 20µL, 100µL, 200µL, 1000µL, 5mL)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Power Ease 500	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
System D65 Autoclave	System, Wettenberg, Deutschland
Thermo Block TDB-120	G. Kisker, Steinfurt, Deutschland
Tischwaage BP3100 P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Tischzentrifuge Centrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender&Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad	Julabo, Seelbach, Deutschland
Zellkultur Bank Safe 2020	Thermo Scientific, Waltham, USA

### 2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Adhäsionsfilm	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Cryo-Tubes (1,8mL)	Nunc, Langenselbold, Deutschland
Deckgläser	Menzel, Braunschweig, Deutschland
F96 Microwell-Platten weiß	Nunc, Langenselbold, Deutschland
Gel Loading Tips	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Immobilon P PVDF Membran	Millipore, Billerica, USA
Maxisorp 96-Well-Platte für ELISA	Nunc, Langenselbold, Deutschland
NuPAGE Novex Gel 10% Bis-Tris	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPAGE Novex Gel 3-8% Tris-Azetat	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Objektträger	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filtereinheit (10µL, 100µL, 1000µL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen ohne Filter (10µL, 100µL, 1000µL, 5mL)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Radiographischer Film	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Serologische Pipettenspitzen (2mL, 5mL, 10mL, 25mL)	Corning Incorporated, Corning, USA
Tubes (0,5mL, 1,5mL, 2,0mL)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellkultur-Flaschen 250mL, 750mL	BD, Heidelberg, Deutschland
Zellkultur-Platten (96-, 24-, 12-, 6-Well)	Corning Incorporated, Corning, USA
Zentrifugier-Tubes (15mL, 50mL)	BD, Heidelberg, Deutschland

### 2.1.3. Kits

Dynabeads <sup>®</sup> Antibody coupling kit (#143.11D)	Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norwegen
ECL Chemilumineszenz Lösung	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Human TGF-β1 DuoSet ELISA Development kit	R&D systems, Wiesbaden, Deutschland
Novex Sharp Prestained Protein Standard	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Histokitt <sup>®</sup> Eindeckmedium	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
VectaShield <sup>®</sup> Hardset Eindeckmedium mit DAPI	Vector Labs, Burlingame, USA
VenorGeM <sup>®</sup> Mycoplasmen-Test (#11-1025)	Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland

### 2.1.4. Chemikalien

Blasticidin	Invivogen, San Diego, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Paesel + Lorei, Duisburg, Deutschland
Coelenterazin (# s053)	Synchem, Felsberg, Deutschland
Complete protease-Inhibitor (20x)	Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

## Material und Methoden

---

Dinatriumphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Fluka, St. Louis, USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
ExGen500 in vitro Transfektions-Reagenz	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Fetales bovines serum (FBS) „Gold“	PAA, Pasching, Österreich
Glycerol	Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kongorot (C.I. 22120) (# A2385)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat ( $\text{Mg}_2\text{SO}_4$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (steril)	PAA, Pasching, Österreich
RPMI 1640 Medium	PAA, Pasching, Österreich
Salzsäure (HCL)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching, Österreich
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

### 2.1.5. Plasmide und Zelllinien

pUB6/HA <sup>N</sup> -SP-C <sup>WT</sup>	Hergestellt von M. Woischnik (AG Griese)
pUB6/HA <sup>N</sup> -SP-C <sup>P30L</sup>	Hergestellt von S. Kern (AG Griese)
pUB6/HA <sup>N</sup> -SP-C <sup>I73T</sup>	Hergestellt von S. Kern (AG Griese)
pUB6/HA <sup>N</sup> -SP-C <sup>L110R</sup>	Hergestellt von S. Kern (AG Griese)



pUB6/HA <sup>N</sup> -SP-C <sup>P115L</sup>	Hergestellt von S. Kern (AG Griese)
pUB6/HA <sup>N</sup> -SP-C <sup>A116D</sup>	Hergestellt von M. Woischnik (AG Griese)
pUB6/HA <sup>N</sup> -SP-C <sup>L188Q</sup>	Hergestellt von S. Kern (AG Griese)
pMET-Luc	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der AG Rudolph
A549-Zellen (# ACC-107)	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
MLE12-Zellen (# CRL-2119)	DSMZ, Braunschweig, Deutschland

## 2.1.6. Antikörper

### 2.1.6.1. Für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Antikörper	Katalognummer	Hersteller
BiP/GRP-78	# 3177	Cell Signaling, Danvers, USA
Calnexin	# sc-6465	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
GM-130	# sc-31148	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
HA-Taq	# 1 867 423	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Lamp3/CD63	# CBL553	Chemicon, Hofheim, Deutschland
Syntaxin2	# 110 022	Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland
Ubiquitin	# PW8810	Biomol, Hamburg, Deutschland
Goat Alexa Fluor 555	# A21432	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Mouse Alexa Fluor 456	# A10036	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Rabbit Alexa Fluor 555	# A31572	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Rat Alexa Fluor 488	# A21208	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.6.2. Für Blot-Versuche

Antikörper	Katalognummer	Hersteller
BiP/GRP-78	# 3177	Cell Signaling, Danvers, USA
Calnexin	# sc-6465	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
HA-Taq	# 1 867 423 rat	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
HSP90	# sc-69703	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Lamp3/CD63	# sc-15363	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
LC3A/B	# 4108	Cell Signaling, Danvers, USA
SNAP23	# 111 203	Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland
Syntaxin2	# 110 022	Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland
Ubiquitin	# ab7780	abcam, Hamburg, Deutschland
β-Actin (HRP-konjugiert)	# sc-47778	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland

## Material und Methoden

---

Goat IgG (HRP-konjugiert)	# 305-065-045	Dianova, Hamburg, Deutschland
Mouse IgG (HRP-konjugiert)	# AP124P	Millipore, Billerica, USA
Rabbit IgG (HRP-konjugiert)	# 111-036-045	Dianova, Hamburg, Deutschland
Rat IgG (HRP-konjugiert)	# P0450	Dako, Glostrup, Dänemark

### 2.1.7. Pufferlösungen

#### **PBS-T** (*pH 7,4*)

---

KCl	2,7 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,0 mM
NaCl	136,9 mM
Tween-20	0,1%

#### **TBS-T**

---

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,0 mM
NaCl	150 mM
Tris ( <i>pH 7,5</i> )	50,0 mM
Tween-20	0,1 %

#### **Einfrier-Medium für Zellkultur**

---

DMSO	3 %
FBS	50 %
RPMI 1640 Medium	40 %

#### **Radioimmunoprecipitationspuffer (RIPA)**

---

Complete Protease-Inhibitor	1x
EDTA ( <i>pH 8</i> )	5 mM
NaCl	0,15 mM
Natriumdeoxycholat	0,5 %
SDS	0,1 %
Tris ( <i>pH 8</i> )	50,0 mM
Triton-X 100	1 %

#### **Transfer-Puffer für Blot-Versuche**

---

Methanol	10 %
Transfer-Puffer (Invitrogen)	1x

**Membran-Restore-Puffer** (*in Aqua dest.*)

---

SDS 20 %	10 %
Tris 1 M ( <i>pH</i> 6,7)	6,2 %
$\beta$ -Mercaptoethanol 100 mM	0,7 %

**Slot Blot Probenpuffer** (*in Aqua dest.*)

---

Glycerol	12,5 %
Tris-HCl 0,5 M ( <i>pH</i> 6,8)	12,5 %
$\beta$ -Mercaptoethanol	5 %

**Block-/Antikörperpuffer für Immunfluoreszenz-Mikroskopie** (*in PBS*)

---

BSA	1 %
FBS	5 %

**Kongo-Rot-Färbelösung** (*gefiltriert*)

---

Ethanol	80 %
Kongo-Rot-Pulver	0,02 %
NaCl	aufgesättigt
NaOH	1 %

**Gebrauchsfertige Pufferlösungen**


---

Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, Hercules, USA
NuPAGE LDS Probenpuffer (4x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPAGE MES Laufpuffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPAGE MOPS Laufpuffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPAGE Tris-Acetat Laufpuffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPAGE Transferpuffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Herstellung der Plasmidvektoren

Humane SP-C cDNA wurde, entsprechend etablierter Verfahren, in einen modifizierten pUB6/V5-His Vektor mit integrierter Blasticidin-Resistenz kloniert [100]. Zum Einbau der entsprechenden SP-C Punktmutationen diente das *site-directed mutagenesis* Verfahren. Zur Detektion der SP-C Expression wurde in die hSP-C cDNA ein N-terminales Hämagglutinin (HA)-tag (HA<sup>N</sup>-SP-C) integriert. Hergestellt wurden ein proSP-C<sup>WT</sup>-Plasmid und die SP-C-Mutations-Plasmide proSP-C<sup>P30L</sup>, proSP-C<sup>I73T</sup>, proSP-C<sup>L110R</sup>, proSP-C<sup>P115L</sup>, proSP-C<sup>A116D</sup> und proSP-C<sup>L188Q</sup>. Die Etablierung und Herstellung der verwendeten Plasmide erfolgte freundlicherweise im Vorfeld dieser Arbeit durch Dr. S. Kern und Dr. M. Woischnik.

### 2.2.2. Zellkultur

A549-Zellen wurden in T-75 Flaschen mit RPMI 1640 Medium mit 10% FBS bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Kultur gehalten und regelmäßig alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:10 gesplittet, so dass ein Überwachsen vermieden wurde und die Zellen ein regelmäßiges Wachstum über den gesamten Versuchszeitraum aufwiesen. Es wurden Zellen bis maximal 10 Passagen für Versuche hergenommen. Für die einzelnen Experimente wurden Zellen in 6-, 12- oder 24-Well Platten ausgesät und für 24-48 Stunden mit RPMI und 10% FBS kultiviert. In regelmäßigen Abständen wurden die Zellkulturen auf eine Mykoplasmeninfektion hin überprüft. Hierfür wurde das VenorGeM<sup>®</sup> Mycoplasmen-test-Kit von Minerva Biolabs gemäß dem entsprechenden Hersteller-Protokoll verwendet.

### 2.2.3 Stabile Transfektion

A549-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 75% entsprechend des ExGen500 Hersteller-Protokolls in 12-Well-Platten transfiziert. Als Plasmid diente entweder pUB6-HA<sup>N</sup>-SP-C<sup>WT</sup> oder ein Plasmid mit einer der SP-C Mutationen p.P30L, p.I73T, p.L110R, p.P115L, p.A116D und p.L188Q. 24 Stunden nach erfolgter Transfektion wurde mittels Blasticidinzugabe (6µg/ml) mit der Selektion erfolgreich transfizierter Zellen begonnen. Nach Anzucht selektierter Zellen in 6-Well-Platten wurden Zellklone vereinzelt, in 96-Well-Platten übertragen und 14 Tage lang kultiviert. Eine erfolgreiche Transfektion wurde mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie und Western-Blot unter Verwendung von HA-Antikörpern getestet. Die stabile Transfektion von Zellen mit proSP-C<sup>WT</sup>, proSP-C<sup>I73T</sup> und proSP-C<sup>L188Q</sup>

wurde freundlicherweise im Vorfeld dieser Arbeit von Dr. rer. nat. E. Kaltenborn vorgenommen.

#### **2.2.4. Herstellung von Zellysaten**

Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Die nach Zentrifugation gewonnenen Zellpellets wurden in RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitoren aufgenommen und für 30 Minuten bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde als Gesamtzellysat in ein neues Tube überführt. Mittels Bradford Protein Assay [20] wurde die Proteinkonzentration im Photometer bestimmt. Als Proteinstandard diente BSA in aufsteigenden Konzentrationen.

#### **2.2.5. MTT-Assay**

Um die Zellviabilität zu bestimmen und einen möglichen zelltoxischen Effekt durch mutiertes proSP-C zu erkennen, wurde ein MTT-Assay durchgeführt [65]. Hierbei wird das gelbliche, wasserlösliche Tetrazoliumsalz MTT, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, durch die Reduktionsäquivalente NADH/NADPH zum unlöslichen, violett-purpuren Formazan umgesetzt. Diese Reduktion ist ein Maß für die Glykolyserate der Zelle und somit ein indirekter Indikator für Stoffwechsellistung und Zellviabilität. Für den MTT-Assay wurden jeweils 1250 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte ausgesät. Die Platten wurden entweder 24, 48, 72 oder 96 Stunden inkubiert. Anschließend wurde MTT in PBS (500µg/ml) zugegeben. Nach zweistündiger Inkubation wurden die MTT-haltigen Zellüberstände entfernt und durch DMSO (200 µl pro Well) ersetzt. Die Platten wurden dann 15 Minuten auf einem Schüttler mit 150 rpm inkubiert. DMSO dient der Auflösung der Formazankristalle, dieses ist eine Voraussetzung für die photometrische Konzentrationsbestimmung. Die Formazankonzentration wurde mittels Messung der optischen Dichte im Photometer bei 540 nm ermittelt. Zur Korrektur wurde das Hintergrundsignal bei 640 nm bestimmt. Als Negativkontrolle diente das Medium RPMI 1640 mit 10% FBS.

#### **2.2.6. Luciferase-Assay zur Ermittlung der generellen Sekretionsleistung**

Luciferasen sind Enzyme, die Luciferine unter Sauerstoffeinfluss zu instabilen Dioxetanen

oxidieren. Diese Dioxetane zerfallen im Anschluss unter Energiefreigabe. Hierdurch kommt es zur Chemilumineszenz, die photometrisch gemessen werden kann. Um die generelle Sekretionsleistung einer Zelle zu bestimmen, erfolgte die Transfektion mit einem pMetLuc-Plasmid. Hierbei handelt es sich um eine Luciferase aus *Metridia longa*, die physiologisch sezerniert wird [60]. Durch Zugabe von Coelenterazin, einem Luciferase-Substrat, wird die Luciferase im Zellüberstand aktiviert [61].

Es wurden 75 000 Zellen pro Well in einer 24-Well-Platte ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Transfektion des pMetLuc-Plasmids mittels ExGen500 entsprechend des Hersteller-Protokolls. Nach weiteren 24 Stunden wurden jeweils 50µl des Zellüberstandes abgenommen. Durch Zugabe von 100 µl Coelenterazin (100µmol/ml) wurde die Luciferaseaktivität gestartet. Anschließend erfolgte die Chemilumineszenzmessung im Photometer.

### **2.2.7. Immunfluoreszenz-Mikroskopie**

Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie basiert auf dem Prinzip, dass mit einem Fluorophor gekoppelte Antikörper direkt oder indirekt an bestimmte Zellstrukturen binden. Nach energetischer Anregung erfolgt die Aussendung eines Fluoreszenzsignals definierter Wellenlänge durch diese Antikörper. Dadurch werden nur die zuvor gezielt markierten Strukturen ohne störende Überlagerungen sichtbar.

In 12-Well-Platten, die zuvor mit Cover-Slips ausgelegt worden waren, wurden Zellen für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden diese mit 4%iger Paraformaldehyd-Lösung in PBS für 15 Minuten fixiert. Wenn nötig, wurden die Zellen dann für 10 Minuten mit 0,5% Triton-X 100 in PBS permeabilisiert. Nichtspezifische Bindungsstellen wurden für 30 Minuten mit einem Blockpuffer geblockt. Dann erfolgte die Inkubation mit einem Primärantikörper gegen den HA-Tag zur Detektion von proSP-C oder anderweitige intrazelluläre Zielstrukturen für eine Stunde. Nach Waschen der Wells (3 mal 5 Minuten in PBS) wurde der zweite, mit dem Fluorophor markierte, Antikörper gegen die Primärantikörper-Spezies zugegeben. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Nach erneutem Waschen (3 mal 5 Minuten in PBS und 1 mal 5 Minuten in *Aqua dest.*) wurden die Cover-Slips mit den gefärbten Zellen auf Objektträger übertragen und mit VectaShield®-Mounting Medium eingedeckt. In diesem Medium ist gleichzeitig ein DAPI-Farbstoff enthalten, durch den die Zellkerne angefärbt werden. Die Fluoreszenz-Betrachtung erfolgte mittels eines Zeiss Axiovert 135 Mikroskops. Bilder wurden mit der Zeiss AxioCam MR Kamera und Axiovision 3.1 Software erstellt.

**Tabelle 5: Anwendungsschemata verwendeter Antikörper im Fluoreszenzmikroskop**

Zelluläre Zielstruktur	Primärantikörper	Verdünnung Primär-AK	Sekundärantikörper
proSP-C	Rat anti-HA-Tag	1:200	Anti-rat Alexa Fluor 488
Lamellar-Körperchen	Mouse anti-lamp3	1:200	Anti-mouse Alexa Fluor 456
Endopl. Retikulum	Goat anti-calnexin	1:200	Anti-goat Alexa Fluor 555
Golgi-Apparat	Goat anti-GM130	1:50	Anti-goat Alexa Fluor 555
Syntaxin2	Rabbit anti-Syntaxin2	1:100	Anti-rabbit Alexa Fluor 555
Ubiquitin-Proteasom	Mouse anti-ubiquitin	1:500	Anti-mouse Alexa 546
BiP/GRP-78	Rabbit anti-BiP	1:200	Anti-rabbit Alexa 555

BiP: Binding Immunoglobulin Protein; AK: Antikörper

### 2.2.8. Kongo-Rot Färbung

Kongo-Rot ist ein gängiger Farbstoff zum Nachweis von Amyloid und somit von  $\beta$ -Faltblattstrukturen [40]. Im Polarisationsmikroskop zeigt Amyloid eine Apfelgelee-artige Anfärbung. Des Weiteren zeigt Kongo-Rot eine fluoreszierende Eigenschaft bei entsprechender energetischer Anregung.

Zellen wurden wie in *Kapitel 2.2.7.* beschrieben angezüchtet, fixiert und permeabilisiert. Es empfiehlt sich, die Wasch- und Färbelösungen zu filtern, um Kristallablagerungen zu vermeiden. Die Zellen wurden für 10 Minuten in gefiltertem, mit NaCl aufgesättigtem, 80%igen Ethanol gewaschen. Es folgte die Inkubation in 0,02% Kongo-Rot-Lösung für 10 Minuten. Anschließend wurden die Zellen mittels aufsteigender Alkoholreihe sukzessive dehydriert. Die Cover-Slips wurden auf Objektträger übertragen und mit Rothi-Histokitt<sup>®</sup> eingedeckt. Die Betrachtung erfolgte im Hellfeld-Auflichtmikroskop und im Fluoreszenzmikroskop bei einer Exzitationswellenlänge von 546nm mit einem Zeiss Axiovert 135 Mikroskop. Bilder wurden mit der Zeiss AxioCam MR Kamera und Axiovision 3.1 Software erstellt.

### 2.2.9. Western Blot

Im Western Blot werden Proteine auf eine Membran übertragen und anschließend über verschiedene Methoden detektiert. In der Regel erfolgt in einem ersten Schritt die Auftrennung der Gesamtproteinmenge einer Probe nach ihrer Größe in der Gelelektrophorese. Als Trägersubstanz dient, wie auch in dieser Arbeit, zumeist ein Polyacrylamidgel. Im anschließenden eigentlichen Western Blot werden die Proteine von dem Gel auf eine

Membran (oft Polyvinylidenfluorid [PVDF]) übertragen. Für diese Übertragung gibt es verschiedene Möglichkeiten: Diffusion, Kapillarwirkung oder – wie im vorliegenden Fall – Erzeugung eines elektrischen Feldes mit Wanderung der Proteine nach ihrer Ladung. Danach können die Proteine auf der Membran angefärbt und somit nachweisbar gemacht werden. Im Immunoblot werden gezielt bestimmte Proteine durch Antikörper und über ein fluoreszierendes Reagenz (zum Beispiel HRP: Merrettichperoxidase) detektiert.

Es wurden 30 µg Gesamtprotein je Probe in 4x LDS-Puffer und 10% DTT gelöst. Nach Erhitzen bei 70°C für 10 Minuten erfolgte die Beladung der NuPage<sup>®</sup> Polyacrylamidgele mit den Lysaten für die Elektrophorese. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Je nach verwendetem Antikörper wurde die Membran dann in 5% Magermilchpulver oder 5% BSA in TBS-T für eine Stunde geblockt. Über Nacht erfolgte die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper gegen das zu detektierende Protein bei 4°C. Die Membran wurde 3 mal 5 Minuten in TBS-T gewaschen. Es folgte die Inkubation mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper für eine Stunde. Zur Detektion der Proteine wurde ECL Reagenz auf die Membran gegeben, ein radiographischer Film damit belichtet und entwickelt. Die Quantifizierung erfolgte an der Diana III UV-Kamera mit Hilfe der Software Aida 3.40 Image analyzer von Raytest. Um die Versuchsergebnisse quantitativ vergleichen zu können, wurden die einzelnen Messungen auf das „housekeeping Protein“ β-Actin normalisiert. Sofern notwendig, wurde die Membran nachträglich mit einem Restore-Puffer von den Antikörpern gereinigt, um erneut Proteine nachzuweisen.

**Tabelle 6: Anwendungsschemata der verwendeten Antikörper für Blot-Versuche**

<b>Protein</b>	<b>Primär-AK-Verdünnung</b>	<b>Block-/AK-Puffer</b>
ProSP-C (HA-Tag)	1:1000	5% Magermilchpulver in TBS-T
Calnexin	1:500	5% Magermilchpulver in TBS-T
Lamp3/ CD63	1:200	5% Magermilchpulver in TBS-T
SNAP23	1:1000	5% Magermilchpulver in TBS-T
Syntaxin2	1:1000	5% Magermilchpulver in TBS-T
BiP	1:1000	5% BSA in TBS-T
HSP90	1:500	5% Magermilchpulver in TBS-T
Ubiquitin	1:2000	5% Magermilchpulver in TBS-T
LC3A/B	1:1000	5% BSA in TBS-T
Beta Actin	1:40 000	5% Magermilchpulver oder 5% BSA in TBS-T

HSP: Hitze-Schock-Protein; BiP: Binding Immunoglobulin Protein; AK: Antikörper



### 2.2.10. Immunpräzipitation

Mit der Immunpräzipitation kann ein Zielprotein durch Antikörperbindung aus einem Proteingemisch selektiert und damit aufkonzentriert gewonnen werden.

Im vorliegenden Fall wurde ein HA-Antikörper unter Verwendung des Dynabeads<sup>®</sup> Antibody Coupling Kits von Invitrogen über Nacht an magnetische *beads* gekoppelt. Es wurden an 1 mg *beads* 5µg Antikörper gekoppelt. Aus Zelllysaten wurde gemäß den Hersteller-Angaben des Kits dann proSP-C durch die *beads* isoliert. Die Präzipitate wurden in 4x LDS-Puffer und 10% DTT gelöst und erhitzt. Das weitere Vorgehen entspricht der Beschreibung in *Kapitel 2.2.9*.

Für die Koimmunpräzipitation wurde das, aus gleichen Zelllysaten stammende, aufgereinigte proSP-C einmal mit HA-Antikörpern und einmal mit Ubiquitin-Antikörpern nachgewiesen.

### 2.2.11. Slot Blot

Um die Gesamtmenge eines Zielproteins bestimmen, wurde zur Quantifizierung ein Slot Blot etabliert. Hierbei werden die Proteinproben durch Vakuumanlage direkt auf eine Membran übertragen. Auf dieser kann dann gemäß *Kapitel 2.2.9*. durch immunologische Verfahren das Protein, in diesem Fall der HA-Tag als Label für proSP-C, nachgewiesen werden.

Zur Anwendung kam die Apparatur Bio-Dot<sup>®</sup> SF System von BioRad. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Hersteller-Protokoll. Es wurden jeweils 5µg Protein in 200µl Probenpuffer gelöst, nach Erhitzen auf 70°C für 10 Minuten in die Apparatur geladen und mittels Vakuumanlage auf eine PVDF-Membran übertragen. Im Vorfeld wurden verschiedene Probenpuffer auf ihre Eignung untersucht

### 2.2.12. TGF $\beta$ <sub>1</sub>-ELISA

Ein *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) ist ein auf Antikörper basierendes Nachweisverfahren für Proteine, Viren, Hormone, Toxine etc. Entscheidend ist eine, durch ein Reporterenzym vermittelte, konzentrationsabhängige Farbreaktion, die üblicherweise im Photometer gemessen werden kann. Das Reporterenzym ist an einen Antikörper gekoppelt, der direkt oder indirekt an das nachzuweisende Protein bindet.

Die Sekretion von TGF $\beta$ <sub>1</sub> durch A549-Zellen mit proSP-C<sup>WT</sup> oder proSP-C<sup>MUT</sup> wurde in einem ELISA gemessen. Zellüberstände der entsprechenden Zellen, die zuvor für 48 Stunden

in 12-Well-Platten inkubiert waren, wurden gewonnen und bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert, um anschließend mit dem gereinigten Überstand den ELISA durchzuführen. Aus den angezüchteten Zellen wurden Gesamtzelllysate hergestellt und die Proteinkonzentration gemessen. Der ELISA wurde mit dem Human TGF-beta 1 DuoSet ELISA Development kit von R&D Systems entsprechend des Hersteller-Protokolls durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung im Photometer erfolgte bei 450 nm. Zur Korrektur wurde das Hintergrundsignal bei 540 nm bestimmt. Als Negativkontrolle diente das Medium RPMI 1640 mit 10% FBS. Die gemessenen TGF $\beta$ <sub>1</sub> Konzentrationen wurden mit der Gesamtproteinmenge aus den Zelllysaten relativiert.

### **2.2.13. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 17.0 anhand des ANOVA-One-Way Tests und des Dunett's-T post hoc Tests. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant festgelegt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (*standard error of the mean*, S.E.M.). Sofern nicht anders angegeben, liegen den statistischen Ergebnissen mindestens vier unabhängige Experimente zugrunde. Die graphische Darstellung der statistischen Ergebnisse erfolgte mit der Software GraphPad Prism 4.0.



### 3. Ergebnisse

Im Folgenden wird wiederholt der Begriff proSP-C<sup>MUT</sup> verwendet. Dieser Ausdruck soll als Sammelbegriff für alle in dieser Arbeit untersuchten proSP-C Mutationen dienen.

#### 3.1. Einfluss von proSP-C-Mutationen auf die allgemeine Zell-Viabilität

Die Zell-Viabilität wurde im MTT-Assay gemessen. Hierbei wird die Reduktion von MTT zu unlöslichem Formazan durch den Zellstoffwechsel quantitativ gemessen.

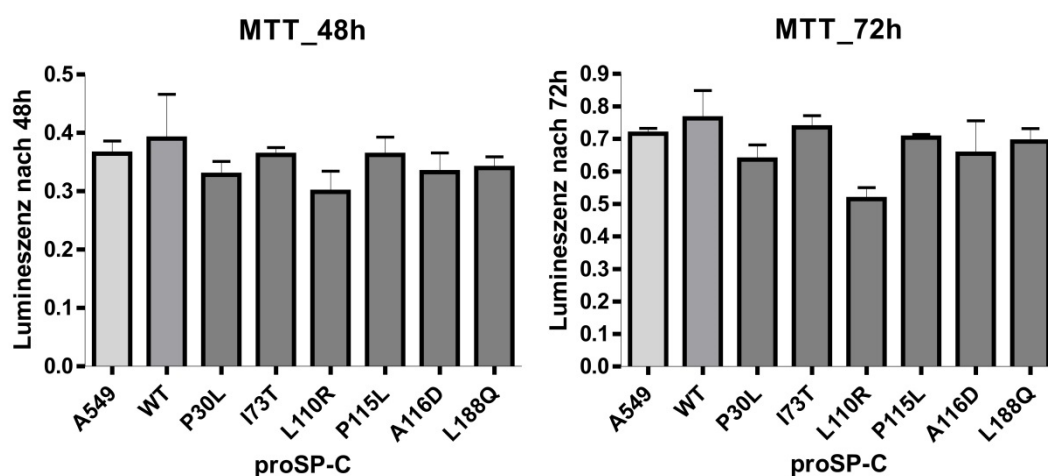


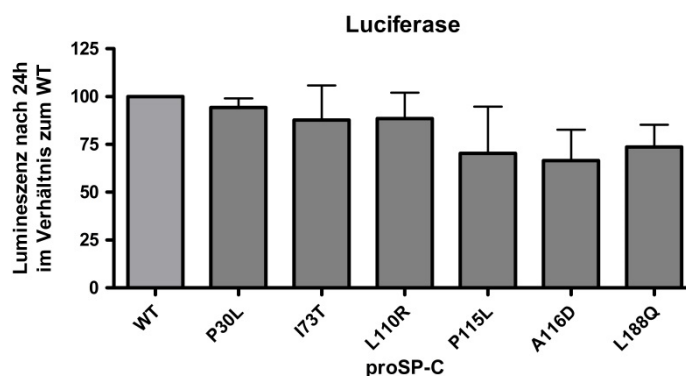
Abbildung 7: Ergebnisse des MTT-Assays

Dargestellt sind die gemessenen Lumineszenzwerte nach 48 und 72 Stunden im MTT-Assay. Die Lumineszenzrate verhält sich direkt proportional zur Viabilität. Es ergaben sich keine signifikanten Viabilitätsunterschiede zwischen untransfizierten (A549), Wildtyp (WT) und Zellen mit mutiertem SP-C.

Sowohl nach 48 Stunden, als auch nach 72 Stunden ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Viabilität zwischen Zellen mit *SFTPC* Mutationen und WT-Zellen (Abb. 7). Allenfalls zeigte sich eine geringe, nicht signifikante, Verringerung in Zellen mit den Mutationen p.P30L und p.L110R.

#### 3.2. Einfluss von proSP-C-Mutationen auf die generelle Sekretionsleistung

Ein möglicher Einfluss auf die generelle Sekretionsleistung durch proSP-C<sup>MUT</sup> wurde mittels Lumineszenzmessung sezernierter Luciferase im Zellüberstand gemessen. Hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen proSP-C<sup>WT</sup> und proSP-C<sup>MUT</sup> (Abb. 8).

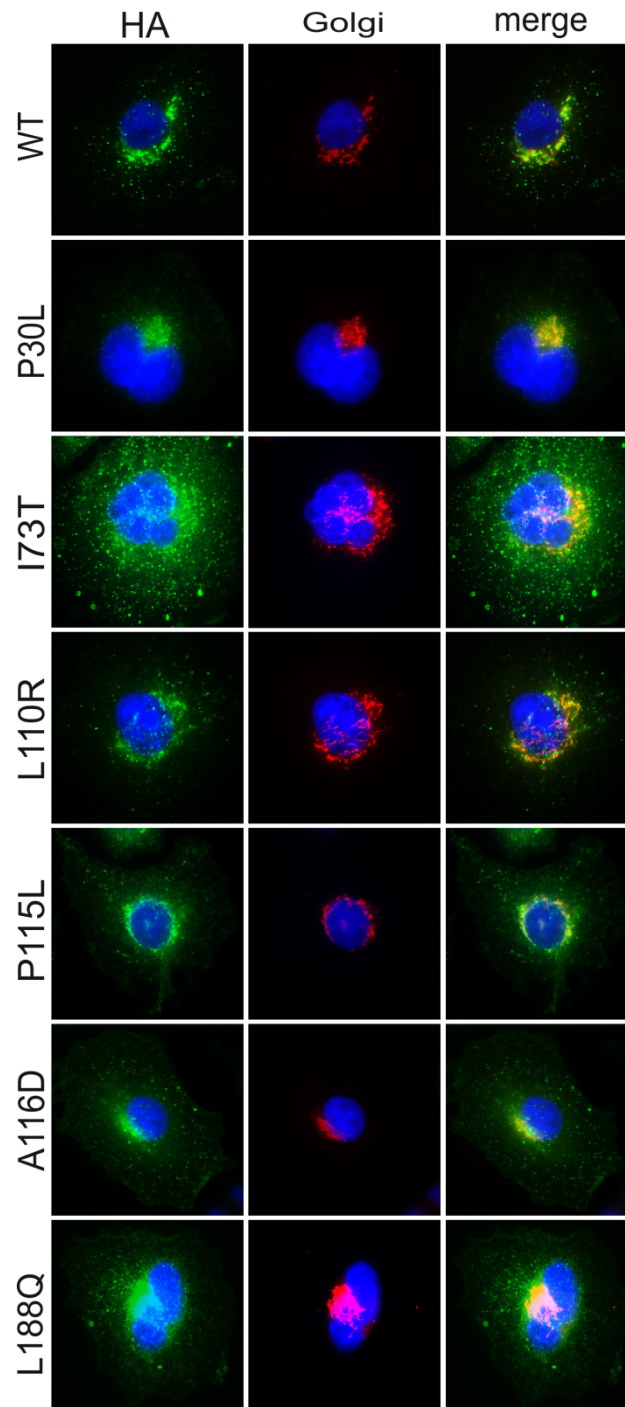


**Abbildung 8: Bestimmung der Sekretionsleistung mittels Luciferase-Assay**

Im Zellüberstand wurde die Aktivität einer sekretorischen Luciferase gemessen. Diese wurde zuvor in die Zellen transfiziert. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Experimenten ( $n = 3$ ) zu erreichen, wurde die gemessene proSP-C Menge jeweils ins Verhältnis zur Menge an proSP-C im WT gesetzt. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen proSP-C<sup>WT</sup> und proSP-C<sup>MUT</sup>.

### 3.3. Intrazelluläres Verteilungsmuster von ProSP-C-Mutationen

Um die intrazelluläre Verteilung von proSP-C in mit WT und Mutationen transfizierten Zellen zu analysieren, wurde intrazelluläres HA angefärbt und mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie betrachtet (Abb. 9). Hierbei zeigte sich für den WT ein vesikuläres Verteilungsmuster von proSP-C, mit nur geringem diffusem Hintergrund. Ein ähnliches Bild, allerdings mit stärkerer Betonung des Zellhintergrunds, ergab sich für die Mutationen p.I73T, p.L110R und p.A116D. Bei p.I73T und p.A116D fiel eine deutliche Betonung der Zellmembranen auf, als Hinweis auf eine mögliche Akkumulation von proSP-C an dieser Stelle (Kapitel 3.5. und 3.10.). Für proSP-C<sup>P115L</sup> fanden sich nur wenige vesikuläre Strukturen, vielmehr erschien hier das proSP-C netzartig in der Zelle verteilt vorzuliegen. Sowohl diffus als auch vesikulär vorhanden war proSP-C in den Mutationen p.P30L und p.L188Q. Da proSP-C als sekretorisches Protein posttranslational im Golgi-Apparat weiter prozessiert wird, stellte sich in allen Fluoreszenz-Bildern perinukleär ein deutlich eingefärbter Bereich dar, der die Lokalisation des Golgi-Apparates widerspiegelt. Für eine genauere Differenzierung und Darstellung siehe Kapitel 3.6.

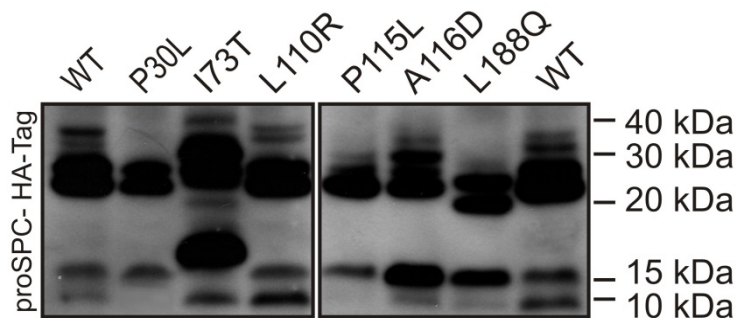


**Abbildung 9: Intrazelluläres Verteilungsmuster von proSP-C**

Dargestellt ist proSP-C mittels Antikörper gegen HA-Tag (HA; grüner Kanal) und das *cis*-Golgi-Netzwerk mittels GM-130 Antikörper (GM; roter Kanal); die rechte Spalte zeigt die Überlagerung beider Kanäle (merge). Örtliche Übereinstimmung zeigt sich als gelbliches Areal. Die Nucleoli wurden mit DAPI angefärbt (blau); WT, p.I73T, p.L110R und p.A116D zeigen vesikuläres proSP-C, die Mutationen p.P30L, p.P115L und p.L188Q zeigen ein eher retikuläres Verteilungsmuster von proSP-C; Sowohl WT als auch Mutationen sind im frühen Golgi-Netzwerk lokalisiert (siehe auch Kapitel 3.6.).

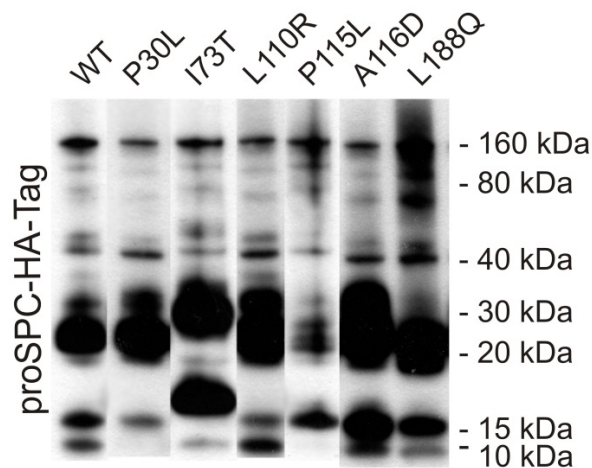
### 3.4. Prozessierung der proSP-C Mutanten

Um die posttranslationale Prozessierung von proSP-C mit Mutationen zu vergleichen, wurden mittels Western Blot die intermediären Prozessierungsprodukte qualitativ visualisiert (*Abb. 10*). Zusätzlich wurde aufgereinigtes proSP-C durch ein Immunpräzipitationsverfahren detektiert (*Abb. 11*).



**Abbildung 10: proSP-C Prozessierung aus Gesamtzelllysaten**

In Gesamtzelllysaten wurde im Western Blot proSP-C mittels Antikörper gegen den HA-Tag detektiert. ProSP-C<sup>I73T</sup>, proSP-C<sup>A116D</sup> und proSP-C<sup>L188Q</sup> zeigten Banden, die beim WT nicht vorkamen. Für proSP-C<sup>P30L</sup>, proSP-C<sup>P115L</sup> und proSP-C<sup>L188Q</sup> konnten keine oder nur sehr geringe Bandenintensitäten um etwa 10kDa nachgewiesen werden. Banden über 21 kDa stellen Oligomere von proSP-C Intermediaten dar.



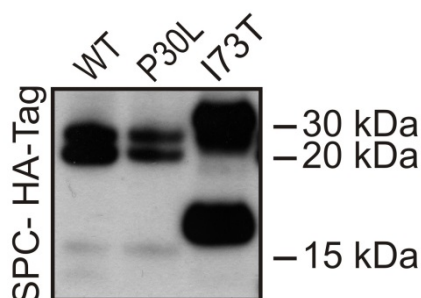
**Abbildung 11: proSP-C Prozessierung nach Immunopräzipitation**

Aus Gesamtzelllysaten wurde durch Immunopräzipitation mit Antikörpern gegen HA-Tag proSP-C isoliert und anschließend im Western Blot dargestellt. Für proSP-C<sup>L188Q</sup> ließ sich nun auch deutlich eine Bande bei etwa 10kDa nachweisen.

Für den WT zeigte sich eine Bande zwischen 20 und 30kDa, sowie zwei weitere Banden bei 16kDa und etwa 10kDa, die jeweils die verschieden weit prozessierten Formen des proSP-C

darstellen<sup>1</sup>. Reifes mSP-C (3,7kDa) konnte mit dieser Versuchsanordnung nicht dargestellt werden, da einerseits A549 Zellen mSP-C nicht bilden [18] und andererseits das N-terminale Ende des proSP-C und somit auch der HA-Tag im Verlauf der Prozessierung abgeschnitten und abgebaut wird (*siehe Abb 4*).

Allein bei proSP-C<sup>L110R</sup> ließ sich, wie bei WT, die unterste Bande (10kDa) deutlich nachweisen, als Zeichen, dass diese Mutation am ehesten physiologisch prozessiert werden kann. ProSP-C<sup>I73T</sup> zeigte eine schwache Bandenintensität bei 10kDa. Dies ist ein Hinweis darauf, dass bei dieser Mutation nur ein sehr geringer Anteil des proSP-C normal prozessiert wird. Vielmehr erschienen bei proSP-C<sup>I73T</sup> sehr ausgeprägte aberrante Banden bei 18kDa und 35kDa als Hinweis auf eine mögliche Akkumulation (18kDa) und Oligomerisierung (35kDa) von fehlprozessiertem proSP-C in der Zelle. Dass es sich hierbei um bedeutsame Mengen an Protein handeln muss, zeigt die Tatsache, dass selbst bei kürzesten Belichtungszeiten diese Banden schon deutlich detektierbar waren (*Abb. 12*).



**Abbildung 12: ProSP-C<sup>I73T</sup> zeigt aberrante Banden bei sehr kurzen Belichtungszeiten**

Um die Intensität der aberranten Banden bei proSP-C<sup>I73T</sup> zu demonstrieren, wurde der Detektionsfilm nur 10 Sekunden belichtet. Während sich bei p.I73T schon sehr deutlich die beiden fehlprozessierten Banden bei etwa 18 kDa und 35 kDa darstellen, können beim WT die prozessierten Banden bei 16 kDa und etwa 10 kDa nur erahnt werden.

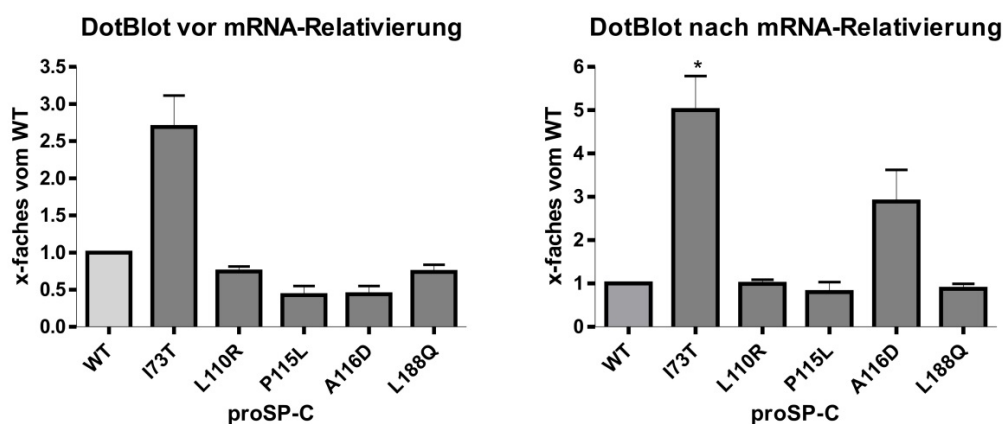
Auch bei proSP-C<sup>A116D</sup> und proSP-C<sup>L188Q</sup> zeigten sich aberrante Banden. Die Mutationen proSP-C<sup>P30L</sup>, proSP-C<sup>P115L</sup> und proSP-C<sup>L188Q</sup> zeigten erst bei sehr langen Belichtungszeiten Banden von weniger als 16kDa, die nur schwach ausgeprägt waren. Dies spricht für eine Unterbrechung der normalen Prozessierungsschritte auf einer bestimmten Stufe.

<sup>1</sup> Aufgrund der technischen Grenzen des hier verwendeten Systems der Proteinauffrennung kann im unteren Molekularbereich das exakte Molekulargewicht nur geschätzt werden. Da der verwendete Marker als niedrigstes Molekulargewicht 10 kDa anzeigt, dürfte es sich bei der hier detektierbaren Bande kurz unterhalb der 10 kDa Markierung um das entsprechende proSP-C mit 7 kDa handeln.



### 3.5. Aberrantes proSP-C<sup>I73T</sup> und proSP-C<sup>A116D</sup> akkumulieren intrazellulär

Im Western Blot mit vorheriger Gelelektrophorese konnten verschiedene Proformen des SP-C in den einzelnen Proben nachgewiesen werden. Dies erschwerte eine quantitative Auswertung der Gesamtproteinmenge an proSP-C. Daher wurde zur Quantifizierung ein Slot Blot durchgeführt und anschließend die gesamte intrazelluläre proSP-C Menge mittels HA-Antikörper bestimmt (Abb. 13). Es fiel auf, dass bis auf p.I73T alle untersuchten Mutationen eine geringere Gesamtproteinmenge an proSP-C als der WT aufwiesen. Nur bei p.I73T waren die gemessenen Werte im Mittel 2,5-fach höher als im WT. Um der Frage nachzugehen, ob die ermittelten Ergebnisse allein auf eine unterschiedlich ausgeprägte Genaktivierung von proSP-C zurückzuführen sind, wurden die Werte aus den Slot Blot Versuchen jeweils auf die mRNA-Expression<sup>2</sup> von proSP-C normalisiert. Der Effekt für p.I73T ließ sich hierbei bestätigen, die gemessenen Werte lagen sogar beim fünffachen des WT ( $p < 0,05$ ). Interessanter Weise ergab sich nun auch für p.A116D eine im Vergleich zum WT dreifach erhöhte proSP-C Menge ( $p > 0,05$ ). Die Werte für die anderen Mutationen blieben auch weiterhin unter dem WT-Niveau.



**Abbildung 13: Aberrantes proSP-C<sup>I73T</sup> und proSP-C<sup>A116D</sup> akkumulieren intrazellulär**

Im DotBlot (Slot Blot) wurde mit einem Antikörper gegen HA-Tag die Gesamtmenge an allen proSP-C Formen im WT und den proSP-C<sup>MUT</sup> gemessen. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Experimenten ( $n = 4$ ) zu erreichen, wurde die gemessene proSP-C Menge jeweils ins Verhältnis zur Menge an proSP-C im WT gesetzt. Links ist aufgetragen die Quantifizierung vor der Normalisierung auf die mRNA-Expression, rechts nach Normalisierung. Nach der Normalisierung bestätigte sich das Bild für proSP-C<sup>I73T</sup>. Die Proteinmenge an SP-C war fünffach höher als im WT ( $* = p < 0,05$ ). Auch für proSP-C<sup>A116D</sup> zeigte sich nach Normalisierung eine dreifach höhere SP-C Menge, die allerdings nicht signifikant unterschiedlich war.

<sup>2</sup> Die Messung der mRNA Expression erfolgte freundlicherweise durch Dr. R. Zarbock

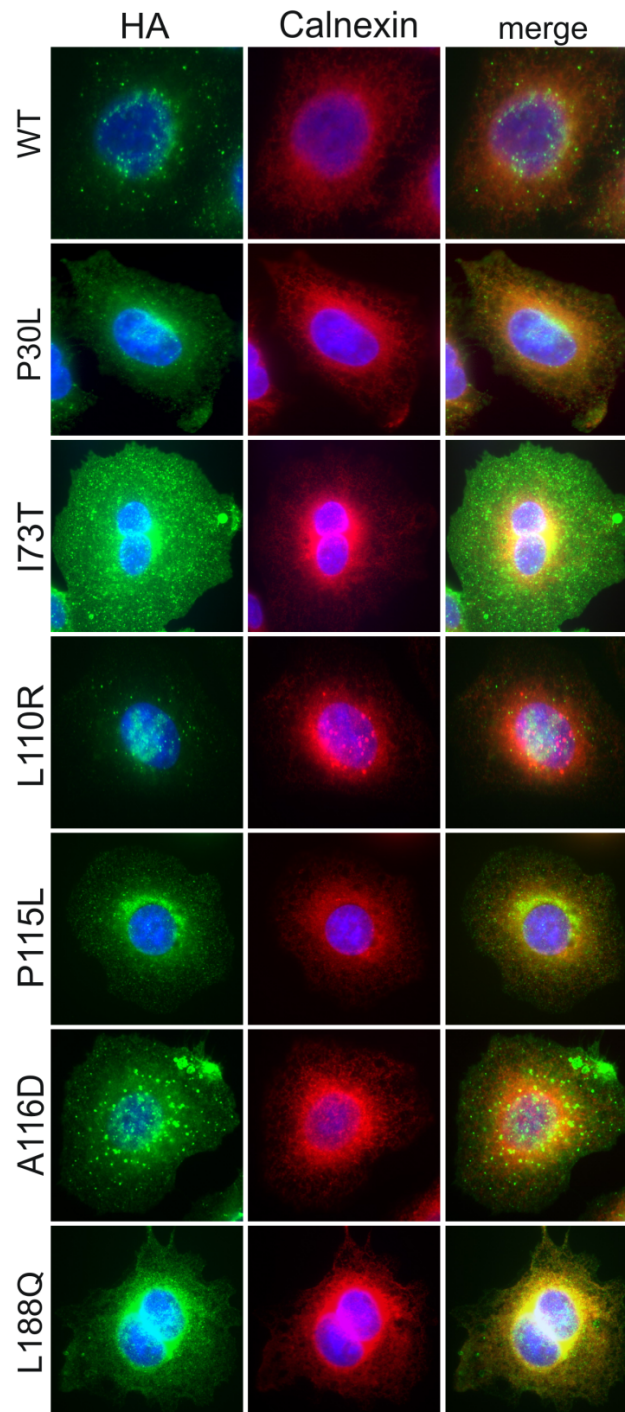
Zusammenfassend lässt sich hieraus schließen, dass fehlgefaltetes proSP-C<sup>I73T</sup> und - mit eingeschränkter Aussagekraft - auch proSP-C<sup>A116D</sup> in der Zelle akkumulieren, passend zu den ausgeprägten aberranten Banden im Western Blot. Im Gegensatz dazu ist die Menge an proSP-C in den Mutationen proSP-C<sup>L110R</sup>, proSP-C<sup>P115L</sup> und proSP-CL<sup>188Q</sup> im Vergleich zum WT in der Zelle unverändert.

### **3.6. Intrazelluläre Kompartimentierung von proSP-C**

Die posttranslationale Prozessierung von proSP-C erfolgt in verschiedenen intrazellulären Kompartimenten. Ausgehend von der eigentlichen Translation, wandert das Proprotein über das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat und wird im weiteren Verlauf in LB aufgenommen. Reifes mSP-C wird schließlich durch Fusion der LB mit der Plasmamembran sezerniert (*Kapitel 1.4.1.*). In der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde untersucht, ob proSP-C in Mutanten in den gleichen intrazellulären Kompartimenten vorhanden sind wie der WT.

#### **3.6.1. ProSP-C<sup>P30L</sup>, proSP-C<sup>P115L</sup> und proSP-C<sup>L188Q</sup> verbleiben im ER**

In der Immunfluoreszenzfärbung diente Calnexin als Marker für das Endoplasmatische Retikulum. ProSP-C wurde mittels HA-Antikörper sichtbar gemacht. Während sich für WT und die Mutationen p.I73T, p.L110R und p.A116D keine ausgeprägte Kolo-kalisation von proSP-C und Endoplasmatischem Retikulum ergab, konnte eine starke räumliche Überlagerung der Fluoreszenzsignale bei p.P115L und p.L188Q festgestellt werden. In einem geringeren Ausmaß wurde dies auch für im Fall von p.P30L gefunden (*Abb. 14*). Diese Kolo-kalisation spricht für eine verlängerte Verweildauer des Großteils des proSP-C im Endoplasmatischen Retikulum



**Abbildung 14: Untersuchung der ER-Lokalisation der verschiedenen proSP-C-Spezies**

Dargestellt ist proSP-C mittels Antikörper gegen den HA-Tag (HA; grüner Kanal) und das Endoplasmatische Retikulum mittels Calnexin-Antikörper (roter Kanal); die rechte Spalte zeigt die Überlagerung aus beiden Kanälen (merge). Örtliche Übereinstimmung zeigt sich als gelbliches Areal. Die Nucleoli wurden mit DAPI angefärbt (blau).

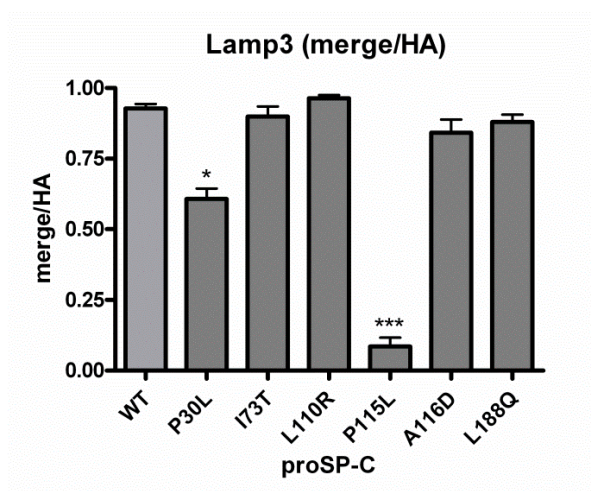
Im Gegensatz zu WT, p.I73T, p.L110R und p.A116D ergibt sich für p.P30L, p.P115L und p.L188Q ein netzartiges Muster für proSP-C, das mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) örtlich übereinstimmt.

### 3.6.2. Sowohl proSP-C<sup>WT</sup> als auch proSP-C<sup>MUT</sup> befinden sich im Golgi-Apparat

Als Marker für das *cis*-Golgi-Netzwerk diente ein GM-130 Antikörper (*Abb. 9*) Es fand sich kein Unterschied in der Lokalisation zwischen WT und den untersuchten Mutanten.

### 3.6.3. ProSP-C<sup>P30L</sup> und proSP-C<sup>P115L</sup>: Geringerer Anteil in Lamellar-Körperchen

Es wurde ein mögliches Vorkommen von mutiertem proSP-C in den Lamellar-Körperchen untersucht. Als Marker für Lamellar-Körperchen und MVB wurde ein Antikörper gegen Lamp3/CD208 benutzt (*Abb. 16*). Der WT zeigte eine ausgeprägte Kolokalisation von proSP-C und LB. Auch die Mutationen p.I73T, p.L110R, p.A116D und p.L188Q ergaben ein ähnliches Bild. Allerdings fanden sich insbesondere bei p.L188Q deutlich weniger vesikuläres proSP-C und Lamp3 positive Punkte. Anders verhielten sich p.P30L und p.P115L. Bei ersterer Mutation fanden sich zwar Punkte mit einer Kolokalisation von proSP-C und Lamp3, jedoch in wesentlich geringerem Ausmaß als im WT. Nur minimale Überlappung zeigte sich im Falle von proSP-C<sup>P115L</sup>. Die Quantifizierung der Punkte mit Kolokalisation im Verhältnis zu allen vorhandenen HA-Punkten pro Zelle ergab eine signifikant niedrigere Kolokalisation bei proSP-C<sup>P30L</sup> und proSP-C<sup>P115L</sup> (p.P30L:  $p < 0,05$ ; p.P115L:  $p < 0,001$ ; *Abb. 15*).

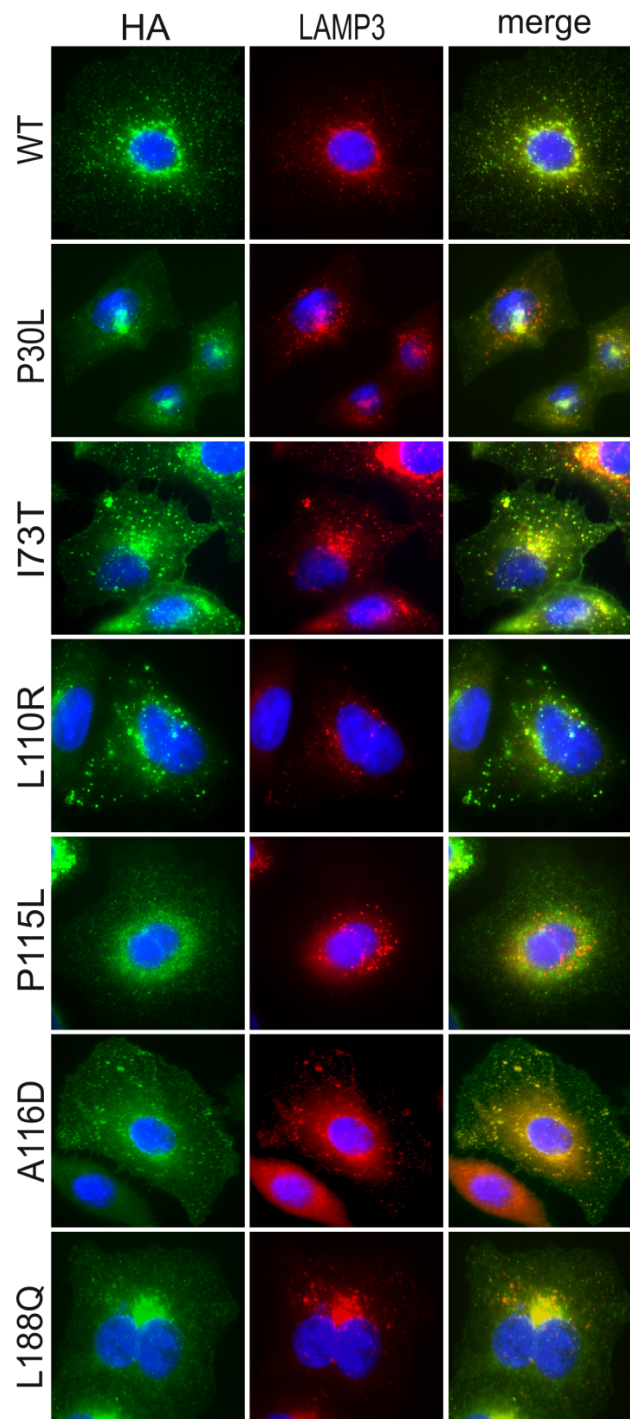


**Abbildung 15: Quantifizierung der Lokalisation von proSP-C Spezies im LB**

Die in der Immunfluoreszenzmikroskopie dargestellte Kolokalisation von proSP-C- und Lamp3-positiven Vesikeln wurde quantifiziert. Es wurden in ausgewählten Zellen alle Punkte, bei denen eine örtliche Überlappung von HA und Lamp3 vorhanden war, gezählt und ins Verhältnis mit allen für HA positiven Punkten in der Zelle gesetzt.

Für p.P30L und p.P115L ergab sich eine signifikant geringere Kolokalisation im Vergleich zum WT.

(\* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ); LB = Lamellarkörperchen



**Abbildung 16: Untersuchung der Lokalisation der proSP-C-Spezies im LB**

Dargestellt sind proSP-C mittels Antikörper gegen den HA-Tag (grüner Kanal) und LB/MVB mittels Lamp3-Antikörper (roter Kanal); die rechte Spalte zeigt die Überlagerung aus beiden Kanälen (merge). Örtliche Übereinstimmung zeigt sich als gelbliches Areal. Nucleoli wurden mit DAPI angefärbt (blau).

Nur geringe Übereinstimmung fand sich bei p.P30L und p.P115L. Für p.L188Q ergab sich zwar eine Kolokalisation, allerdings bei deutlich reduzierter Anzahl an vesikulärem proSP-C im Vergleich zum WT.

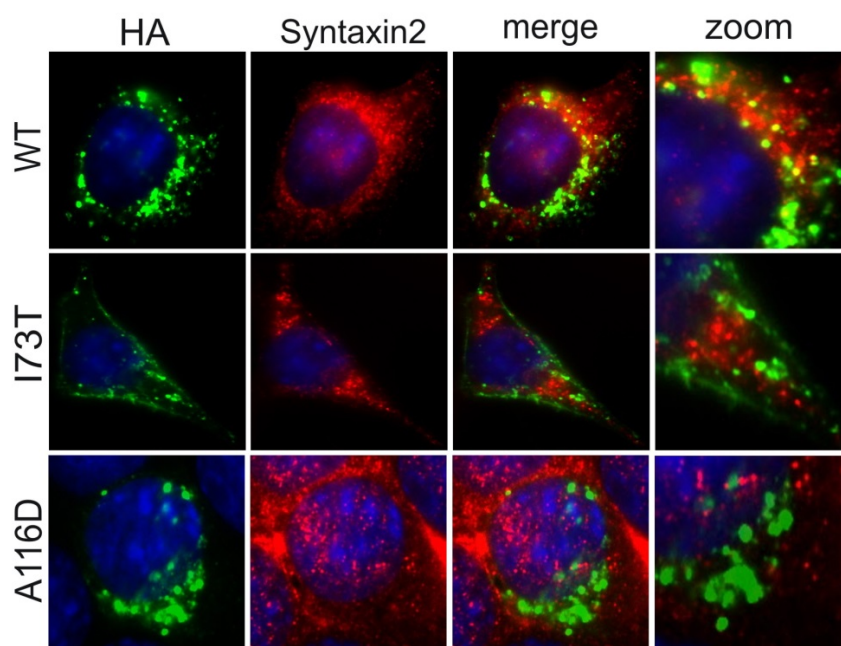
LB = Lamellar-Körperchen



### 3.6.4. ProSP-C<sup>I73T</sup> und proSP-C<sup>A116D</sup>: Keine Sekretion über den SNARE-Komplex

Physiologischer Weise wird mSP-C mit Hilfe des SNARE-Komplex durch Fusion der LB mit der Plasmamembran sezerniert. Als Vertreter des SNARE-Komplexes wurde Syntaxin 2 gewählt. Dieses Protein kommt zu großen Mengen in der Plasmamembran von Alveolar-Typ-II-Zellen und in geringerem Umfang auch in Lamellar-Körperchen vor [2].

In den untersuchten Zellen der A549-Zelllinie ließ sich weder im WT noch in den proSP-C<sup>MUT</sup> eine klare Kolokalisation zwischen proSP-C und Syntaxin 2 nachweisen (Daten nicht gezeigt). Dies mag daran liegen, dass A549-Zellen reifes SP-C nicht sezernieren. Um trotzdem eine mögliche Fusion zu evaluieren, wurde für WT, p.I73T und p.A116D die Immunfluoreszenzfärbung in MLE-12 Zellen durchgeführt. Hierbei ergab sich im Falle vom WT eine örtliche Überlagerung von proSP-C und Syntaxin 2. Im Gegensatz hierzu zeigte sich in den beiden untersuchten Mutationen nur eine geringe Kolokalisation (*Abb 17*).



**Abbildung 17: ProSP-C<sup>I73T</sup> und proSP-C<sup>A116D</sup> werden nicht über den SNARE-Komplex sezerniert**

Kolokalisationsfärbung in der Immunfluoreszenzmikroskopie zur Detektion von proSP-C (HA, grüner Kanal) und Syntaxin 2 (Syntaxin 2, roter Kanal) in MLE-12 Zellen. Die dritte Spalte zeigt die Überlagerung beider Kanäle (merge), ganz rechts der merge-Kanal in einer Vergrößerung dargestellt (zoom). Örtliche Übereinstimmung zeigt sich als gelbliches Areal. Nucleoli wurden mit DAPI angefärbt (blau). Die Zellen waren zuvor stabil transfiziert worden mit dem entsprechenden proSP-C Plasmid.

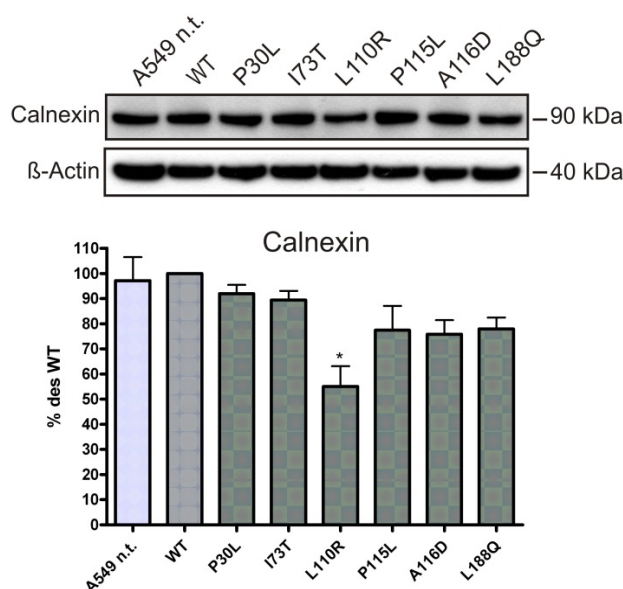
Für proSP-C<sup>WT</sup> ergab sich eine Kolokalisation zwischen HA und Syntaxin 2. Bei den beiden Mutationen konnte keine örtliche Übereinstimmung gefunden werden.

### 3.7. Quantitative Veränderung von Proteinen, die als Kompartimentmarker dienen

In den vorherigen Versuchen wurde eine qualitative Analyse der intrazellulären Lokalisation von proSP-C durchgeführt. Um mögliche quantitative Auswirkungen von proSP-C<sup>MUT</sup> auf Proteine, die als Kompartimentmarker dienen, zu untersuchen, wurden Western Blots mit entsprechenden Antikörpern durchgeführt.

#### 3.7.1. Quantitative Verringerung des ER-Markers Calnexin in BRICHOS-Mutationen

Wie in Kapitel 3.6.1. wurde Calnexin, als struktureller Bestandteil des Endoplasmatischen Retikulums, als Markerprotein bestimmt (Abb. 18).



**Abbildung 18: Quantifizierung der Expression von Calnexin in proSP-C Spezies**

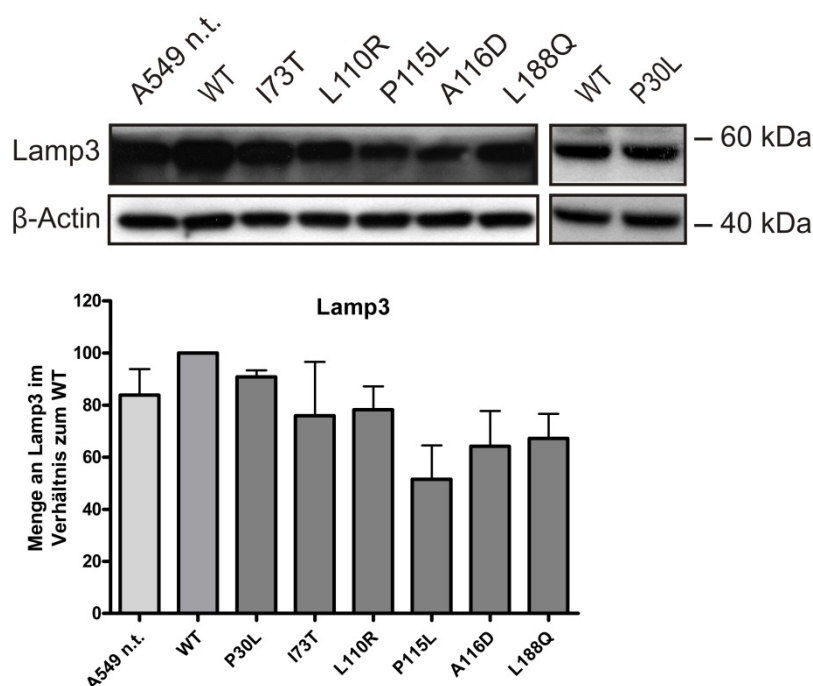
Im Western Blot detektiertes Calnexin wurde densitometrisch quantifiziert. Zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Experimenten ( $n = 5$ ) wurde das Ergebnis anschließend auf den WT normalisiert (WT = 100%). Die BRICHOS-Mutationen zeigten tendenziell geringere Calnexin-Expression im Vergleich zum WT. Das Signifikanzniveau wurde nur für proSP-C<sup>L110R</sup> erreicht ( $p < 0,05$ ).

Im Vergleich zum proSP-C<sup>WT</sup> ergab sich in allen untersuchten BRICHOS-Mutationen (p.L110R, p.P115L, p.A116D und p.L188Q) eine verringerte Proteinmenge an Calnexin. Statistisch signifikant war dieser Unterschied allerdings nur im Falle von p.L110R ( $p < 0,05$ ). Für die non-BRICHOS-Mutationen (p.P30L und p.I73T) waren die gemessenen Werte in etwa mit dem WT vergleichbar.

### 3.7.2. Expression von Lamellar-Körperchen-Proteinen in mit proSP-C<sup>MUT</sup> transfizierten Zellen

Als Marker für Lamellar-Körperchen wurde Lamp3 gewählt und mit dem entsprechenden Antikörper detektiert.

Im Western-Blot wurde in allen untersuchten Mutationen eine verringerte Menge an Lamp3 gemessen, der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (*Abb. 19*).



**Abbildung 19: Quantifizierung der Expression von Lamp3 in proSP-C**

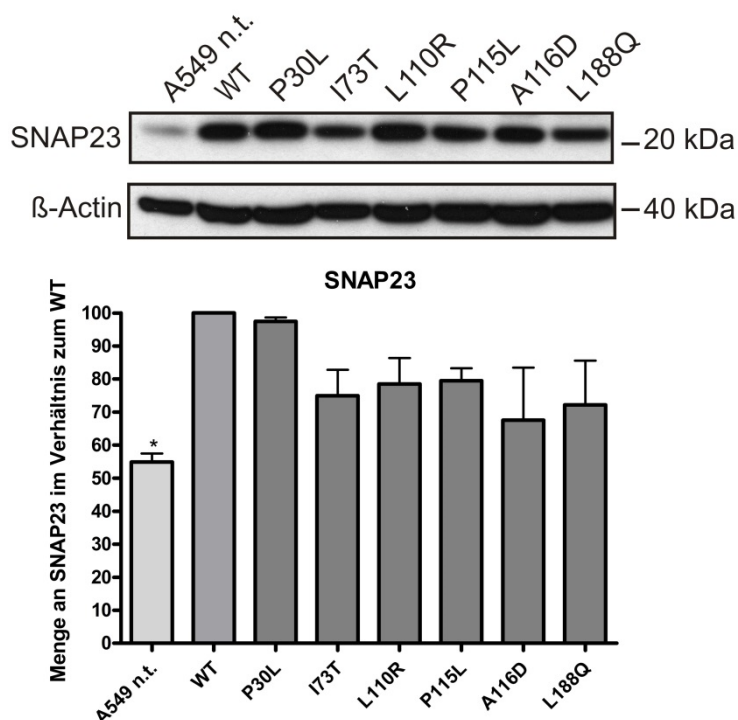
Im Western Blot detektiertes Lamp3 wurde densitometrisch quantifiziert. Zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Experimenten ( $n = 3$ ) wurde das Ergebnis anschließend auf den WT normalisiert. Im Vergleich zum WT ergab sich zwar eine insgesamt verringerte Proteinmenge an Lamp3 sowohl bei untransfizierten wie auch bei mit proSP-C-Mutationen transfizierten Zellen, allerdings war diese in keinem Fall statistisch signifikant.

Als weiteres in LB vorhandenes Protein wurde SNAP23 quantifiziert. SNAP23 ist, ebenso wie Syntaxin 2, Teil des SNARE-Komplexes und somit integraler Bestandteil der Plasmamembran, wo es für die Verschmelzung von Vesikeln mit der Membran eine essentielle Rolle spielt. Zusätzlich wurde SNAP23 auch in Lamellar-Körperchen nachgewiesen [2]. Weiterführende Untersuchungen konnten zeigen, dass es auch bei der Fusion von Lamellar-Körperchen mit der Plasmamembran eine entscheidende Rolle spielt [116]. Im Western Blot ergab sich eine Steigerung der Proteinmenge bei proSP-C<sup>WT</sup> im Vergleich zu untransfizierten A549 Zellen und proSP-C<sup>MUT</sup>, mit Ausnahme von proSP-C<sup>P30L</sup>. Einen signifikanten



Unterschied zum WT erreichten die Ergebnisse der Messungen allerdings nur im Vergleich zu untransfizierten Zellen (*Abb. 20*).

Im Gegensatz dazu konnten bei der Quantifizierung von Syntaxin 2 keine signifikanten Unterschiede zwischen WT, untransfizierten und mit mutiertem proSP-C transfizierten Zellen gemessen werden (*Daten nicht dargestellt*).



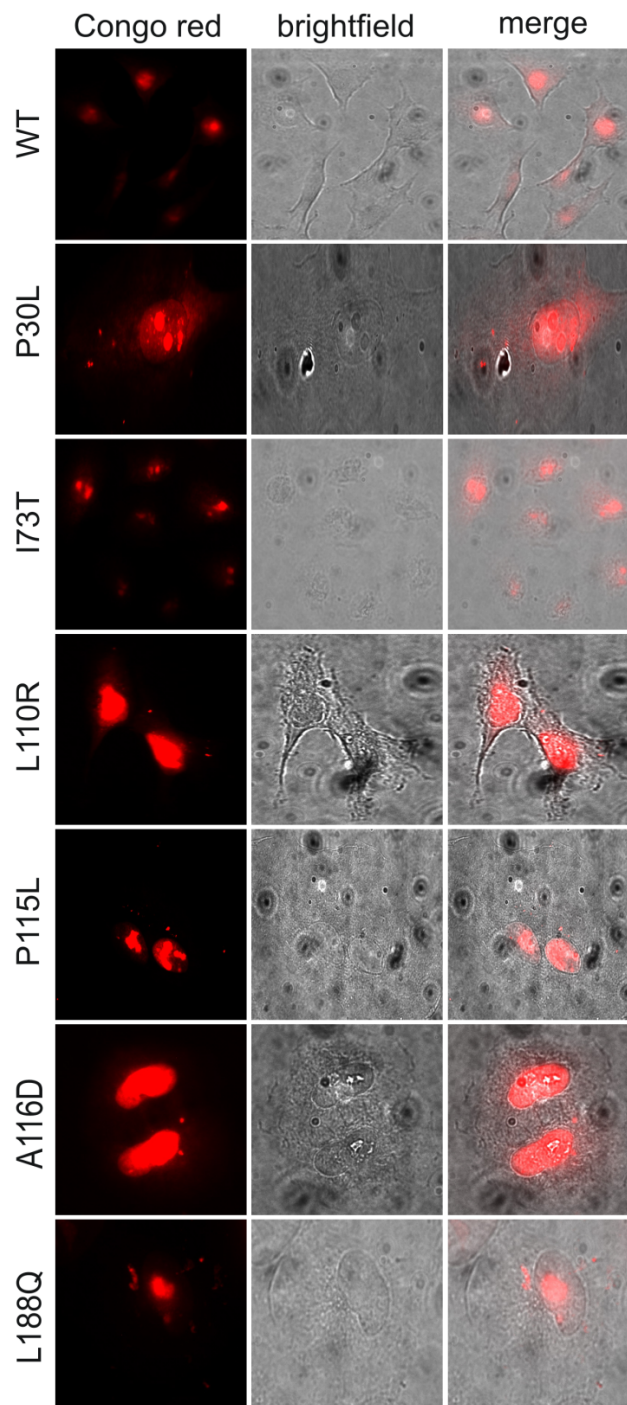
**Abbildung 20: Quantifizierung der Expression von SNAP23 in proSP-C Spezies**

Im Western Blot detektiertes SNAP23 wurde densitometrisch quantifiziert. Zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Experimenten ( $n = 4$ ) wurde das Ergebnis anschließend auf den WT normalisiert (WT = 100%). Im Vergleich zum WT ergab sich zwar eine insgesamt verringerte Proteinmenge an SNAP23 (hier als integrales Membranprotein in Lamellar-Körperchen genutzt) sowohl bei untransfizierten, wie auch in mutierten Zellen, allerdings erreichte der Unterschied nur im Fall von untransfizierten Zellen (A549 n.t.) statistische Signifikanz (\* =  $p < 0,05$ ). Für proSP-C<sup>P30L</sup> war die Proteinmenge mit dem WT vergleichbar.

### 3.8. Einige proSP-C<sup>MUT</sup> führen zu intrazellulären amyloidähnlichen Aggregaten

Für die BRICHOS-Mutationen proSP-C<sup>L188Q</sup> und proSP-C<sup>Δexon4</sup> konnte bereits gezeigt werden, dass sich intrazellulär Aggregate ansammeln, die eine, für Amyloid typische und schwer lösliche,  $\beta$ -Faltblattstruktur annehmen [70]. Eine etablierte Methode zur Visualisierung solcher Aggregate ist die Anfärbung mit Kongo-Rot. In den hier untersuchten Zellen konnten bei allen BRICHOS-Mutationen Kongo-Rot-positive Aggregate in der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden (*Abb. 21*). Zusätzlich ergab sich ebenso in der non-BRICHOS-Mutation proSP-C<sup>P30L</sup> ein solcher Befund. Im Gegensatz dazu wurden in mit proSP-C<sup>WT</sup> oder proSP-C<sup>I73T</sup> transfizierten sowie in untransfizierten Zellen keine

amyloidtypischen Ablagerungen gefunden.



**Abbildung 21: Einige proSP-C<sup>MUT</sup> führen zu intrazellulären, amyloidähnlichen Aggregaten**

Nach Färbung mit Kongo-Rot wurde dieses im Fluoreszenzmikroskop angeregt und dargestellt (linke Spalte, roter Kanal). Man beachte die starke artifizielle Anfärbung der Nucleoli. Zur besseren Abgrenzung zwischen Nucleolus und Zytoplasma wurde der gleiche Bildausschnitt mit Auflicht fotografiert (mittlere Spalte, brightfield-Kanal). Die rechte Spalte zeigt die Überlagerung beider Kanäle (merge Kanal).

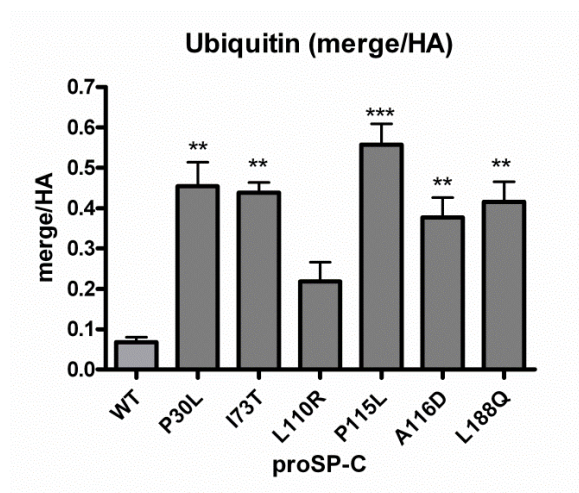
Bei WT und proSP-C<sup>I73T</sup> konnten keine intrazellulären, zytoplasmatischen Amyloidablagerungen entdeckt werden. Diese fanden sich dagegen bei allen BRICHOS-Mutationen, sowie bei proSP-C<sup>P30L</sup> (kleine rote Punkte innerhalb der Zelle). Untransfizierte Zellen sind nicht dargestellt.

### 3.9. Abbau von proSP-C<sup>MUT</sup> durch das Ubiquitin-Proteasom-System

Es wurde der Frage nachgegangen, ob die Überexpression eines mutierten Proteins zu einem vermehrten Abbau desselben im Ubiquitin-Proteasom-System führt.

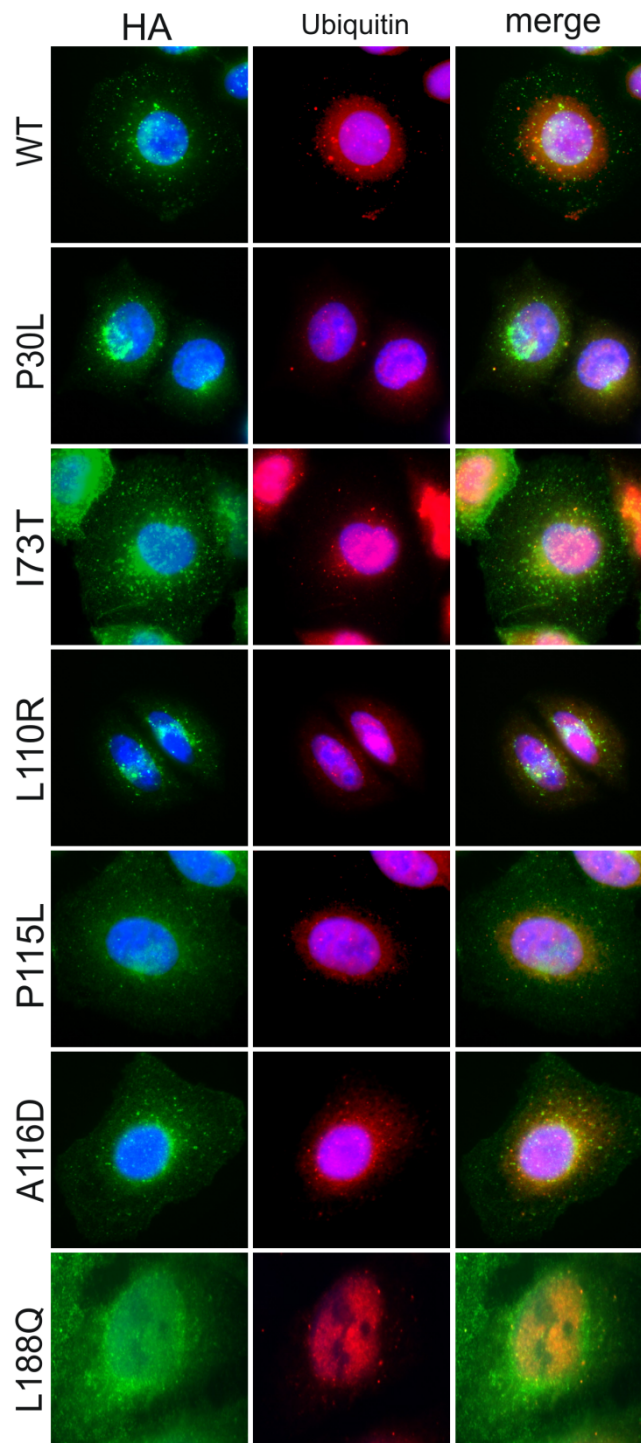
#### 3.9.1. Auftreten von proSP-C<sup>MUT</sup> in Ubiquitin-positiven Vesikeln

In einem ersten Schritt wurde eine mögliche Kolo-kalisation des HA-Tags mit Ubiquitin-positiven Vesikeln in der Immunfluoreszenzmikroskopie als Hinweis auf einen vermehrten Abbau von proSP-C untersucht. Hierbei zeigten sich mit Ausnahme von p.L110R in allen proSP-C<sup>MUT</sup> signifikant höhere Überlagerungen von proSP-C und Ubiquitin als im WT (*Abb.22+23*).



**Abbildung 22: Auftreten von proSP-C<sup>MUT</sup> in Ubiquitin-positiven Vesikeln - Quantitative Darstellung**

Die in der Immunfluoreszenzmikroskopie dargestellte Kolo-kalisation von proSP-C und Ubiquitin-positiven Vesikeln wurde quantifiziert. Es wurden in ausgewählten Zellen alle Punkte, die eine örtliche Überlappung von HA-Tag und Ubiquitin darstellten (merge), gezählt und ins Verhältnis zu allen HA-Punkten (HA) der Zelle gesetzt. Bis auf p.L110R ergab sich für alle untersuchten Mutationen eine signifikant höhere räumliche Überlagerung als in proSP-C<sup>WT</sup> als Zeichen für eine vermehrte Ubiquitinylierung. (\*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ )

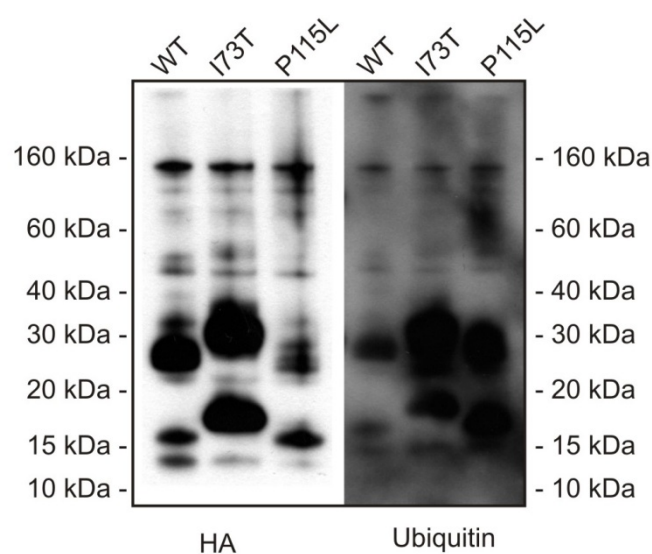


**Abbildung 23: Auftreten von proSP-C<sup>MUT</sup> in Ubiquitin-positiven Vesikeln - Qualitative Darstellung**

Dargestellt sind proSP-C mittels Antikörper gegen den HA-Tag (HA; grüner Kanal) und das Ubiquitin-Proteasom-System mittels Ubiquitin Antikörper (roter Kanal); die rechte Spalte zeigt die Überlagerung aus beiden Kanälen (merge). Ein örtliche Übereinstimmung zeigt sich als gelbliches Areal. Nucleoli wurden mit DAPI angefärbt (blau). Bei proSP-CWT und proSP-CL110R zeigten sich nur wenige übereinstimmende grüne und rote Punkte. Im Gegensatz dazu fanden sich bei den anderen Mutationen zahlreiche gelbe Punkte, was eine Kolokalisation von proSP-C und Ubiquitin bedeutet.

### 3.9.2. Verstärkte Ubiquitylierung von proSP-C-Formen bei p.I73T und p.P115L

Um die Ubiquitylierung von proSP-C-Formen zu visualisieren, wurde beispielhaft für den WT, p.I73T und p.P115L eine Koimmunopräzipitation durchgeführt. Aus Gesamt-Zelllysaten wurde mittels Immunopräzipitation gegen den HA-Tag proSP-C isoliert. Anschließend wurden im Western-Blot in diesem aufgereinigten proSP-C ubiquitylierte Formen mittels Ubiquitin-Antikörper detektiert. Es zeigte sich bei p.I73T und p.P115L ein erhöhter Anteil an ubiquityliertem proSP-C (*Abb. 24*).



**Abbildung 24: Verstärkte Ubiquitylierung von proSP-C-Formen bei p.I73T und p.P115L**

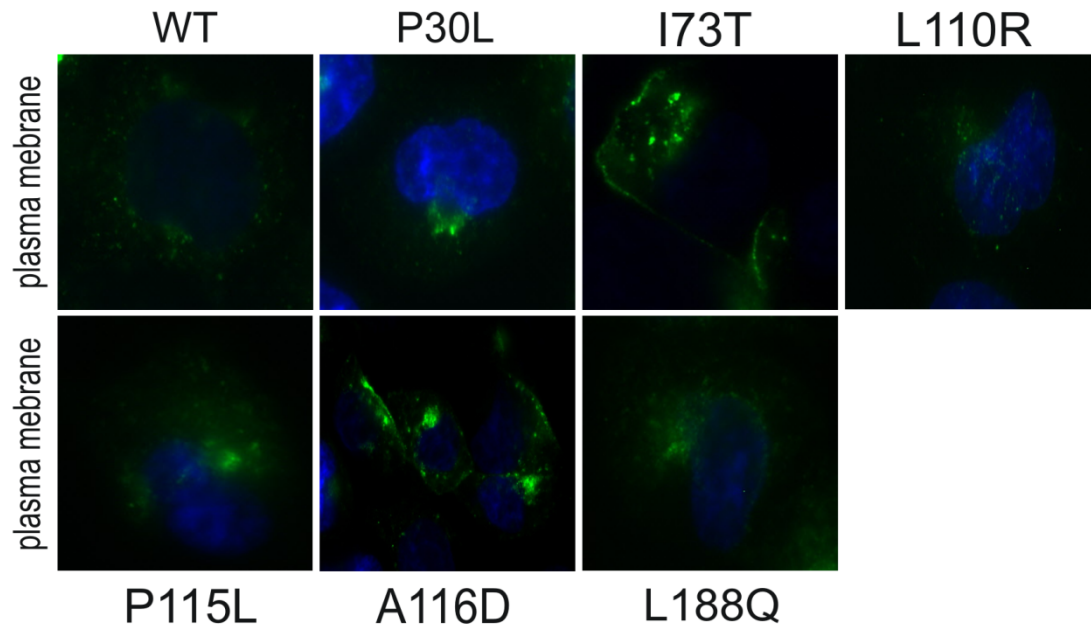
Aus Gesamt-Zelllysaten wurde mittels Immunopräzipitation proSP-C aufgereinigt. Im Western Blot wurde aus dem gleichen Probenansatz einmal proSP-C mit einem Antikörper gegen den HA-Tag (linke Seite) und einmal proSP-C mit einem Antikörper gegen Ubiquitin (rechte Seite) nachgewiesen. ProSP-C<sup>I73T</sup> und proSP-C<sup>P115L</sup> weisen verstärkt ubiquitylierte proSP-C Formen auf.

### 3.10. ProSP-C<sup>I73T</sup> und proSP-C<sup>A116D</sup> gelangen in die Plasmamembran

Fixierte, aber nicht permeabilisierte Zellen wurden mit Antikörper gegen den HA-Tag angefärbt und im Immunfluoreszenzmikroskop betrachtet. Durch die fehlende Permeabilisierung wurde die intrazelluläre Anfärbung des HA-Tags reduziert und eine mögliche Anfärbung der Zellmembran betont. Da A549 Zellen mSP-C nicht sezernieren können und der HA-Tag im Laufe der Prozessierung abgespaltet wird, sollte physiologischer Weise kein Fluoreszenzsignal in der Plasmamembran detektierbar sein. In den Mutationen proSP-C<sup>I73T</sup> und proSP-C<sup>A116D</sup> konnte interessanterweise eine Betonung der Plasmamembran durch das HA-Signal beobachtet werden (*Abb. 25*). ProSP-C Moleküle werden in diesem Fall



unphysiologischer Weise in die Zellmembran eingebaut. Bei proSP-C<sup>WT</sup> und den anderen in dieser Arbeit untersuchten Mutationen konnte eine solche Einlagerung von proSP-C Molekülen nicht beobachtet werden.

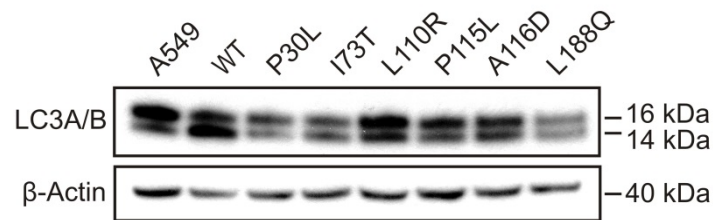


**Abbildung 25: ProSP-C<sup>I73T</sup> und proSP-C<sup>A116D</sup> werden in die Plasmamembran eingebaut**

In zuvor nicht permeabilisierten Zellen wurde proSP-C mittels HA-Antikörper im Fluoreszenzmikroskop detektiert (grün fluoreszierend). Aufgrund der fehlenden Permeabilisierung wurde intrazellulärer HA-Tag nur geringfügig angefärbt. In die Plasmamembran eingelagerter HA-Tag (proSP-C) wurde dadurch betont. Im WT zeigte sich intrazelluläres proSP-C nur schemenhaft, gleiches gilt für die Mutationen proSP-C<sup>P30L</sup>, proSP-C<sup>L110R</sup>, proSP-C<sup>P115L</sup> und proSP-C<sup>L188Q</sup>. Bei den Mutationen proSP-C<sup>I73T</sup> und proSP-C<sup>A116D</sup> zeigte sich eine Betonung der Plasmamembran durch eingelagerten HA-Tag (proSP-C). Nucleoli wurden mit DAPI angefärbt (blau).

### 3.11. ProSP-C<sup>WT</sup> unterliegt einer vermehrten Autophagie

Im Western Blot wurde die Autophagosomenaktivität bestimmt. Hierzu wurde ein Antikörper gegen LC3A/B (*light chain 3*) verwendet. Während zellulärer Autophagieaktivität wird LC3A/B posttranslational modifiziert, so dass aus LC3A/B-I mit etwa 16 kDa das verkürzte LC3A/B-II (etwa 14 kDa) entsteht. Eine vermehrte Konversion in die LC3A/B-II Form dient als Indikator für eine verstärkte Autophagosomenaktivität in der Zelle [90].



**Abbildung 26: ProSP-C<sup>WT</sup> unterliegt einer vermehrten Autophagie**

Im Western Blot wurde die Autophagosomenaktivität mittels eines LC3A/B Antikörpers gemessen. Die prozessierte Form bei 14 kDa (untere Bande) gilt als Indikator für eine erhöhte Aktivität. Im Gegensatz zu untransfizierten und mutierten Zellen, zeigt proSP-C<sup>WT</sup> eine erhöhte Autophagosomenaktivität.

Es zeigte sich im Western-Blot eine Betonung der unteren 14 kDa Bande für proSP-C<sup>WT</sup> (Abb. 26). Bei den Mutationen p.P30L, p.L110R, p.P115L sowie bei untransfizierten Zellen ergab sich eine stärkere Bandenintensität zugunsten LC3A/B-I. Gleiche Bandenstärken für 16 kDa und 14 kDa ließen sich bei p.I73T, p.A116D und p.L188Q messen. Diese Ergebnisse lassen auf eine erhöhte Autophagosomenaktivität in Zellen mit proSP-C<sup>WT</sup> schließen.

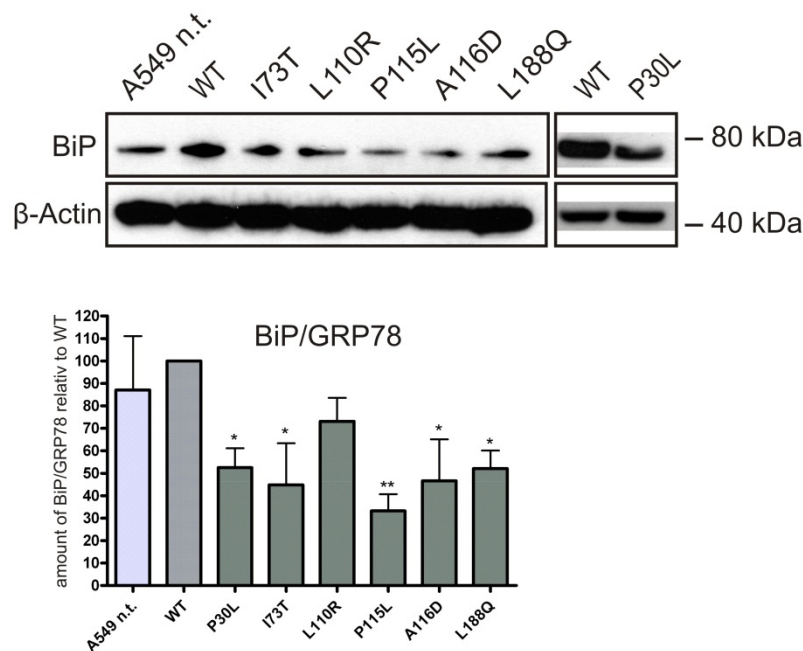
### 3.12. Einfluss stabil transfizierter proSP-C Mutationen auf das UPR-/ ER-Stress-System

In zahlreichen Publikationen der letzten Jahre wurde eine Aktivierung des UPR-Systems (*unfolded protein response system*) und somit eine erhöhte Expression von so genannten Stressproteinen im Endoplasmatischen Retikulum durch proSP-C Mutationen beschrieben [56, 57, 68]. Zu den gemessenen Stressproteinen zählen Chaperone, also Faltungshelfer, wie BiP/GRP78, Hsp70, Hsp90, XBP-1 etc. Die beschriebenen Versuche wurden in transient transfizierten Zellen durchgeführt. In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob auch in stabil transfizierten Zellen ein erhöhtes Level an ER-Stress messbar ist.

#### 3.12.1. Auswirkung der stabilen Expression von proSP-C<sup>MUT</sup> auf Marker für ER-Stress

Aus Gesamt-Zelllysaten wurden Western Blots erstellt und mittels Antikörpern ER-Chaperone detektiert und quantifiziert. Als Indikatoren für eine mögliche Aktivierung des UPR-Systems wurden die Chaperone BiP/GRP78 und Hsp90 ausgewählt [71].

Für BiP/GRP78 ergab sich zwischen WT und untransfizierten Zellen kein relevanter Unterschied (Abb. 27). In allen Zellen mit proSP-C Mutationen zeigte sich eine reduzierte Proteinmenge an BiP/GRP78. Dieser Unterschied erreichte, mit Ausnahme von proSP-C<sup>L110R</sup>, statistische Signifikanz.

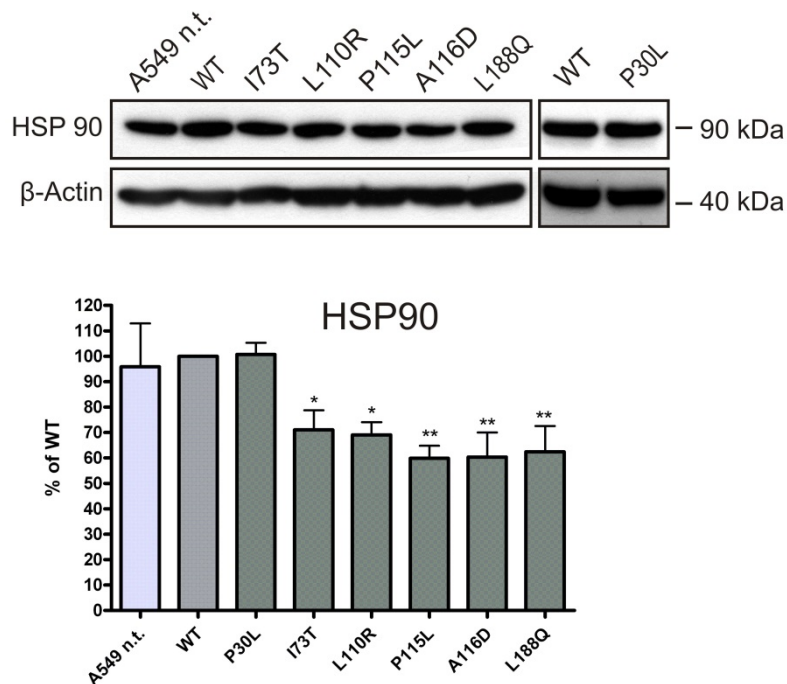


**Abbildung 27: Expression von BiP/GRP78**

Im Western Blot detektiertes BiP/GRP78 wurde densitometrisch quantifiziert. Zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Experimenten ( $n = 5$ ) wurde das Ergebnis anschließend auf den WT normalisiert (WT = 100%). BiP/GRP78 diente als typisches ER-Chaperon und Indikator für möglichen ER-Stress. Bis auf proSP-C<sup>L110R</sup> war die gemessene BiP/GRP78 Menge in allen untersuchten Mutationen signifikant niedriger als im WT; (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ); ER: Endoplasmatisches Retikulum; BiP: *Binding immunoglobulin protein*

Für Hsp90 ergab sich ein ähnliches Bild wie für BiP/GRP78 (Abb. 28). Es konnte ebenso kein Unterschied zwischen WT und untransfizierten Zellen gemessen werden. Allerdings war die detektierte Menge an Hsp90 bei proSP-C<sup>P30L</sup> zum WT nicht verändert. In den anderen Mutationen ergab sich auch diesmal eine reduzierte Expression des Chaperons.





**Abbildung 28: Expression von Hsp90**

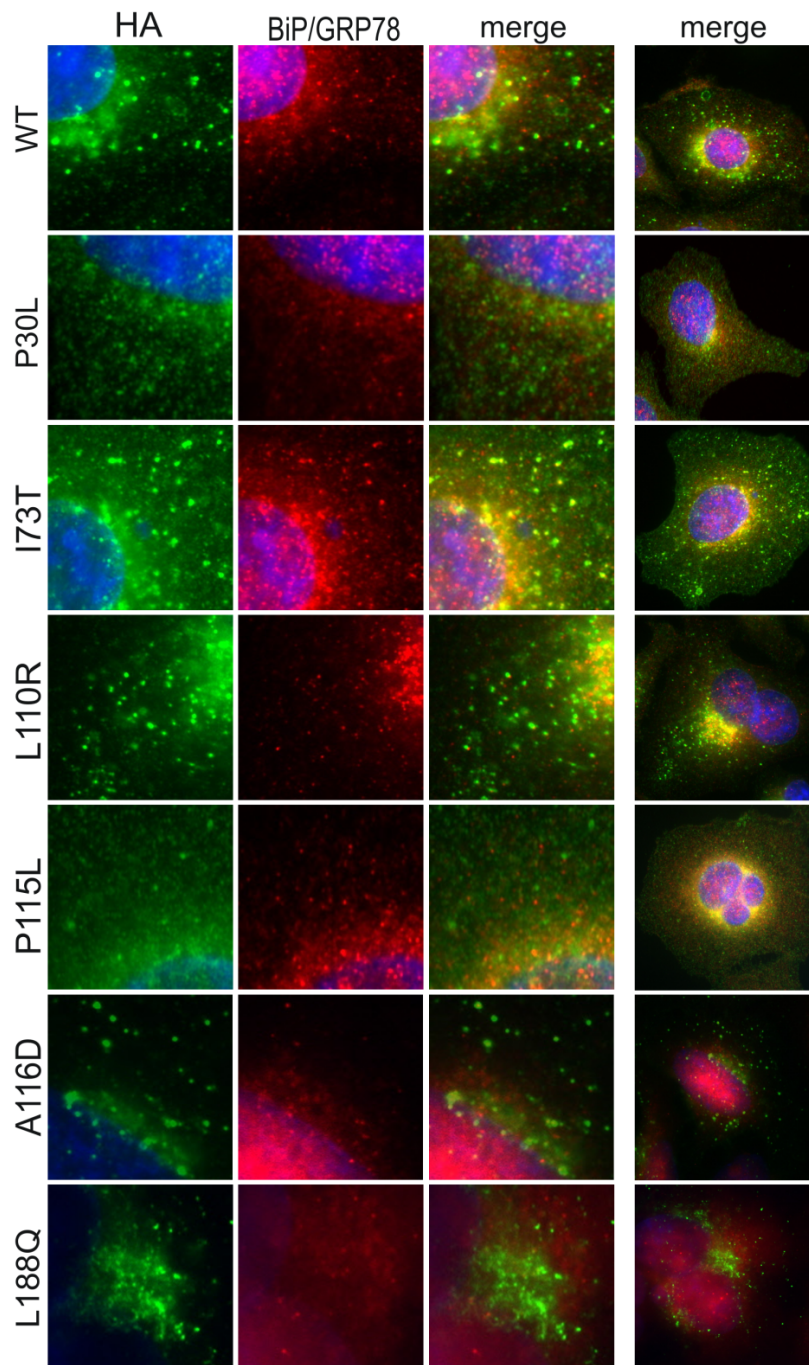
Im Western Blot detektiertes Hsp90 wurde densitometrisch quantifiziert. Zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Experimenten ( $n = 5$ ) wurde das Ergebnis anschließend auf den WT normalisiert (WT = 100%). Hsp90 diente als typisches ER-Chaperon und Indikator für möglichen ER-Stress. Bis auf proSP-C<sup>P30L</sup> war die gemessene Hsp90 Menge in allen untersuchten Mutationen signifikant niedriger als im WT; (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ); ER: Endoplasmatisches Retikulum.

### 3.12.2. Vorkommen von proSP-C<sup>WT</sup> und proSP-C<sup>MUT</sup> ohne ER-Arrest in BiP/GRP78 positiven Vesikeln

Der Idee folgend, dass BiP/GRP78 durch Mutationen im *SFTPC*-Gen aktiviert wird und als Faltungshelfer einer Fehlfaltung von proSP-C entgegen wirkt, wurde der Frage nachgegangen, ob BiP/GRP78 in solchen Fällen eine vermehrte Kolokalisation mit proSP-C Molekülen zeigt. Hierfür wurde in der Immunfluoreszenzmikroskopie sowohl der HA-Tag als auch BiP/GRP78 mit Antikörpern angefärbt und auf Kolokalisation hin untersucht.

Bei proSP-C<sup>WT</sup> konnte eine ausgeprägte Kolokalisation beobachtet werden (Abb. 29). Ähnlich verhielten sich Zellen mit proSP-C<sup>I73T</sup>, proSP-C<sup>L110R</sup> und proSP-C<sup>A116D</sup> Mutationen. Im Gegensatz dazu konnte in den Mutationen, die eine deutliche Übereinstimmung von proSP-C mit dem ER-Signal Calnexin aufwiesen, also proSP-C<sup>P30L</sup>, proSP-C<sup>P115L</sup> und proSP-C<sup>L188Q</sup>, nur eine geringe räumliche Übereinstimmung zwischen HA-Tag und BiP/GRP78 nachgewiesen werden.

Weiterführende Experimente ergaben keine räumliche Übereinstimmung von BiP/GRP78 und Lamp3 positiven Vesikeln (Daten nicht dargestellt).



**Abbildung 29: Vorkommen von proSP-C<sup>WT</sup> und proSP-C<sup>MUT</sup> ohne ER-Arrest in BiP/GRP78 positiven Vesikeln**

Dargestellt ist proSP-C mittels Antikörper gegen den HA-Tag (HA; grüner Kanal, vergrößert) und BiP/GRP78 mittels BiP/GRP78 Antikörper (roter Kanal, vergrößert); die dritte Spalte zeigt die Überlagerung aus beiden Kanälen (merge, vergrößert). Ganz rechts: Übersichtsaufnahme des entsprechenden Bildausschnitts. Örtliche Übereinstimmung zeigt sich als gelbliches Areal. Nucleoli wurden mit DAPI angefärbt (blau).  
ER: Endoplasmatisches Retikulum; BiP: *Binding immunoglobulin protein*

### 3.13. Sekretion von TGF- $\beta$ in proSP-C<sup>MUT</sup> exprimierenden Zellen

In Lungenbiopsien von Patienten mit Interstitiellen Lungenerkrankungen und SP-C Mutationen wurden wiederholt Fibrosierungen beschrieben. Mittlerweile konnte auch experimentell eine erhöhte Rate an endothelial-mesenchymaler Transition (EMT) bei ILDS nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 1.3.). Daher wurden die Konzentrationen von TGF $\beta_1$  im Überstand gemessen. Hierbei zeigte sich zwischen untransfizierten Zellen und proSP-C<sup>WT</sup> kein Unterschied in der Menge an TGF $\beta_1$  (Abb. 30). Auch in p.I73T ergab sich keine Veränderung zum WT. In den anderen untersuchten Mutationen wurde eine signifikant höhere Menge an TGF $\beta_1$  im Überstand bestimmt. ( $p < 0,01$  für p.L110R und p.P115L;  $p < 0,001$  für p.P30L, p.A116D und p.L188Q). Dies ist möglicherweise ein Hinweis auf das Vorliegen eines profibrotischen Milieus, in Übereinstimmung mit der bei Patienten mit bestimmten *SFTPC*-Mutationen beschriebenen, verstärkten Fibrosierung des pulmonalen Interstitiums.

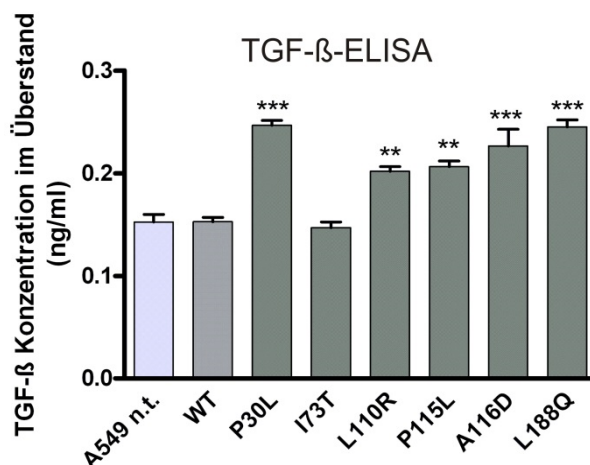


Abbildung 30: Konzentration von TGF $\beta_1$  im Zellkulturüberstand

Mit einem ELISA wurde die von kultivierten Zellen sezernierte TGF $\beta_1$ -Menge im Zellkulturüberstand gemessen. Die Zellen wurden zuvor für 48 Stunden inkubiert. Die gemessene TGF $\beta_1$  Menge wurde auf die Gesamtproteinmenge in den entsprechenden Zelllysaten normalisiert. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen untransfizierten Zellen (A549 n.t.) und proSP-C<sup>WT</sup>. Bis auf proSP-C<sup>I73T</sup> wurde in allen Mutationen eine signifikant höhere Sekretion von TGF $\beta_1$  gemessen; (\*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ); TGF $\beta_1$ : Transforming growth factor.

### 3.14. Überblick über die gesamten Ergebnisse

Die Tabelle 7 zeigt schematisch eine Synopse der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche und ihrer Ergebnisse. Der besseren Übersicht halber wurde auf eine eingehendere Erklärung und Differenzierung verzichtet. Eine detaillierte Darstellung der Einzelergebnisse findet sich in den entsprechenden Kapiteln.

**Tabelle 7: Überblick über die Ergebnisse**

Lokalisation der Mutation	Mutation						
	WT	mature	non BRICHOS	BRICHOS			
		p.P30L	p.I73T	p.L110R	p.P115L	p.A116D	p.L188Q
Aspekt							
Zellviabilität	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
Sekretionsleistung	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
Prozessierung	normal	keine 10 kDa	aberrant	wie WT	keine 10 kDa	aberrant	aberrant
Akkumulation	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein
Golgi-Lokalisation	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
Kokalisation mit Calnexin (ER Arrest)	nein	ja	nein	nein	ja	nein	ja
Vorkommen in LB	ja	teilweise	ja	ja	teilweise	ja	ja
BiP Kokalisation	ja	nein	ja	ja	nein	ja	nein
Interaktion mit dem SNARE-Komplex	ja	-	nein	-	-	nein	-
LB-Proteine	normal	normal	reduziert*	reduziert*	reduziert*	reduziert*	reduziert*
proSP-C in der Plasmamembran	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein
$\beta$ -Fibrillen	nein	ja	nein	ja	ja	ja	ja
Ubiquitinierung	nein	ja	ja	nein	ja	ja	ja
Autophagie erhöht	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein
ER-Chaperon (BiP)	normal	reduziert	reduziert	normal	reduziert	reduziert	reduziert
ER-Chaperon (HSP90)	normal	normal	reduziert	reduziert	reduziert	reduziert	reduziert
EMT (TGF $\beta$ <sub>1</sub> -Menge)	normal	erhöht	normal	erhöht	erhöht	erhöht	erhöht

\*= nicht signifikant im Western Blot



## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde eine Charakterisierung von Mutationen im *SFTPC* Gen beschrieben, wobei sich der Schwerpunkt der Untersuchungen auf intrazelluläre Auswirkungen konzentrierte. Dies lag hauptsächlich an den limitierenden Faktoren des hier genutzten Zellmodells. So können A549 Zellen reifes SP-C nicht sezernieren und die Prozessierung erfolgt nicht im gleichen Umfang wie in Pneumozyten-II [16]. Die Prozessierung erfolgt wahrscheinlich unvollständig bis zum proSP-C<sub>6kDa</sub> [18]. Entsprechend konnte kein reifes mSP-C mit 3,7 kDa in A549 Zellen nachgewiesen werden. Trotz der Einschränkungen stellen A549-Zellen ein etabliertes Zellmodell für Versuche mit proSP-C Mutationen dar. Nicht zuletzt, weil primäre Pneumozyten-II in der Zellkultur eine Instabilität typischer Stoffwechsellösungen zeigen. Die Expression der Surfactant Proteine wird bereits nach 24 Stunden herunterreguliert und die sekretorischen Stoffwechselwege sind verändert [17, 83]. A549 Zellen sind transformierte humane Pneumozyten-II, die aus einem bronchialen Adenokarzinom isoliert wurden. Damit besitzen sie einige wesentliche Fähigkeiten der ursprünglichen Pneumozyten-II, unter anderem die Fähigkeit zur Synthese von LB [84] und nach Transfektion die Bildung von proSP-C Formen, die, bis auf die Endstrecke der Prozessierung, denen in Pneumozyten-II entsprechen [18].

Es wurden sechs Mutationen im *SFTPC* Gen untereinander und mit dem proSP-C<sup>WT</sup> verglichen. Aus dem Bereich der Transmembrandomäne und des späteren reifen SP-C wurde p.P30L gewählt. Als weitere nicht BRICHOS-Mutation wurde p.I73T ausgesucht. Diese war die bisher in der Fachliteratur am häufigsten beschriebene Mutation und somit einerseits geeignet, um die eigenen Ergebnisse auf Validität zu überprüfen, und andererseits als Orientierungspunkt für den „state of the art“. Aus der BRICHOS-Domäne wurden die vier Mutationen p.L110R, p.P115L, p.A116D und p.L188Q gewählt.

Die Zusammenschau der Ergebnisse zeigt gemeinsame Auswirkungen aller Mutationen auf den Zellstoffwechsel. So fanden sich typische Veränderungen in den Zellen, wie Ubiquitinierung, Aggregation und Akkumulation. Die einzelnen Ausprägungen allerdings waren mutationsspezifisch, so dass nicht auf eine allgemein gültige Pathophysiologie geschlossen werden kann.

#### 4.1. Gleicher Endeffekt durch Mutationen: SP-C Sekretion gestört

Trotz individueller intrazellulärer Ausprägung der Folgen einer Mutation im *SFTPC* Gen konnte ein gemeinsamer Endpunkt der Auswirkungen festgestellt werden. In allen untersuchten Mutationen scheint die Sekretion von reifem, und damit funktionstüchtigem SP-C, reduziert zu sein. Eine direkte Messung von sekretorischem SP-C war im Zellmodell aus oben genannten Gründen nicht möglich. Allerdings lassen mehrere Versuchsergebnisse diesen Schluss zu. So fanden sich signifikant weniger proSP-C Moleküle in Lamellar-Körperchen bei p.P30L und p.P115L. In allen Mutationen wurde eine, wenn auch nicht signifikant, geringere Menge an Lamp3, und somit indirekt an Lamellar-Körperchen, gemessen. Ob eine Fehlprozessierung von SP-C tatsächlich großen Einfluss auf die Synthese von LB hat, ist nicht abschließend geklärt. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass Surfactant-Protein-B eine entscheidende Rolle in der LB-Synthese und -Transport spielt [29, 73]. Jedoch könnte fehlgefaltetes und daraus folgend nicht sezernierbares SP-C zu einem geringeren Bedarf an LB führen, so dass für die Zelle auch weniger *de novo* Synthese erforderlich ist.

Weiterhin ergab sich eine tendenziell geringere Menge an SNAP23 in den mutierten Zellen. Dies könnte darauf hinweisen, dass weniger LB durch proSP-C induziert werden, eine Verschmelzung mit der Plasmamembran vorzubereiten. SNAP23 wurde sowohl in der Plasmamembran als auch in LB nachgewiesen und spielt gemeinsam mit Syntaxin2 eine wichtige Rolle bei der Sekretion von SP-C in LB [2, 116]. Zusätzlich konnte in der hier vorliegenden Arbeit in MLE12 Zellen eine, im Gegensatz zum WT, geringere Kolo-kalisation von p.I73T und p.A116D mit Syntaxin2 gezeigt werden.

Auch klinisch lässt sich die Vermutung, dass fehlgefaltetes SP-C nicht korrekt sezerniert werden kann, bestätigen. Nogee *et al.* beschrieben 2001 in einer Patientin eine SP-C Mutation, proSP-C<sup>exon4</sup>, in der kein mSP-C in der bronchoalveolären Lavage gefunden werden konnte [74]. Weitere Fallstudien folgten, u.a. mit p.I73T und p.L188Q. Tredano *et al.* konnten im Falle der p.I73T Mutation lediglich geringe Mengen an mSP-C und große Mengen an fehlgefaltetem proSP-C in der Lavage nachweisen [95]. Ein ähnliches Bild ergab sich für p.L188Q [88].

#### 4.2. Einteilung der Mutationen nach ihrer intrazellulären Lokalisation/Prozessierung

Während der posttranslationalen Prozessierung durchwandert proSP-C mehrere Zellorganellen. Über das endoplasmatische Retikulum erreicht proSP-C den Golgi-Apparat,

um dann im weiteren Verlauf über Multivesikulär-Körperchen mit den Lamellar-Körperchen zu verschmelzen, bevor diese sich wiederum mit der Plasmamembran vereinen (*Kapitel 1.4.1*).

Um eine erste Einteilung der untersuchten Mutationen zu gewinnen, bietet es sich an, diese nach ihrer überwiegenden intrazellulären Lokalisation im Verlauf der Prozessierung vorzunehmen. Hierbei lassen sich grob zwei Gruppen von Mutationen unterscheiden. Einmal diese, die im Verlauf eine annähernde oder vollkommene Unterbrechung ihrer Prozessierung im Endoplasmatischen Retikulum erfahren und diese, die – zumindest zum großen Teil – in Lamellar-Körperchen zu finden sind, dafür aber fehlgefaltete Zwischenprodukte bilden.

Zu ersteren gehören die Mutationen p.P30L, p.P115L und – mit Einschränkungen – p.L188Q. Diese zeigten eine ausgeprägte Kolo-kalisation mit dem ER-Marker Calnexin in der Immunfluoreszenzmikroskopie. Für p.P30L wurde eine solche verstärkte intrazelluläre Lokalisation bereits beschrieben [25]. Passend zu dieser Unterbrechung des weiteren Transports aus dem ER wurde das *N*-terminale Ende des proSP-C als entscheidend für einen korrekten intrazellulären Transport identifiziert [52, 97]. Zusätzlich ließ sich für p.P30L und p.P115L eine signifikant geringere Übereinstimmung der Lokalisation von proSP-C Molekülen und Lamellar-Körperchen nachweisen. Entsprechend einer Blockade der Prozessierung auf Ebene des ER fehlte eine Bande bei etwa 10kDa im Western Blot für proSP-C. Die weiteren Prozessierungsschritte ab proSP-C<sub>16kDa</sub> sollen distal des Endoplasmatischen Retikulums erfolgen [85]. Aberrante Banden fanden sich in diesen beiden Mutationen nicht.

Zur zweiten Gruppe gehören die untersuchten Mutationen p.I73T, p.L110R und p.A116D. Die Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte eine deutliche Kolo-kalisation von proSP-C und Lamellar-Körperchen, ähnlich dem Wildtyp. Im Western Blot fand sich regelmäßig eine prozessierte Form bei 10kDa im Western Blot. Zusätzlich ließen sich bei den Mutationen p.I73T und p.A116D aberrante Banden detektieren, die im WT nicht vorkamen. Es kommt also zu einer wildtypähnlichen Prozessierung mit Aufnahme des proSP-C in die Lamellar-Körperchen und gleichzeitig zur Akkumulation von fehlgefalteten Zwischenprodukten bei p.I73T und p.A116D.

Eine Zwischenstellung nimmt p.L188Q ein. Es fanden sich typische Merkmale aus beiden Gruppen. ER-Lokalisation, aber auch Übereinstimmung mit Lamellar-Körperchen. Aberrante Banden und gleichzeitig nur minimale Ausprägung einer 10kDa Bande nach langen Belichtungszeiten. Wahrscheinlich wird ein Großteil des proSP-C im ER zurückgehalten und akkumuliert dort (passend zur ersten Gruppe) und nur ein sehr geringer Anteil kann durch



Chaperone noch korrekt gefaltet werden und erreicht die Lamellar-Körperchen (passend zur zweiten Gruppe).

Eine weiterführende Hypothese könnte darin bestehen, dass Proteasen trotz aberrant prozessierten proSP-C bei p.I73T, p.A116D und p.L188Q im weiteren Verlauf die physiologische Schnittstelle erkennen, und es somit wieder zu Wildtyp-ähnlichen Proformen (hier die 10kDa Bande) kommt.

### 4.3. Zelluläre Reaktionen auf Fehlprozessierung und Prozessierungsstopp

Es konnten drei typische Reaktionen der Zelle auf angehäuften mutiertes *SFTPC* aufgezeigt werden. Je nach Mutation waren diese zu einem unterschiedlichen Grad ausgeprägt. Es fand sich eine vermehrte Ubiquitylierung, eine Einlagerung von proSP-C in die Plasmamembran und eine Aggregation von proSP-C in Form von amyloidähnlichen  $\beta$ -Fibrillen. Die ubiquitylierten proSP-C Moleküle waren in allen Mutationen, bis auf p.L110R, im Vergleich zum WT signifikant erhöht. Bridges *et al.* beschrieben bei stabil transfizierten proSP-C <sup>$\Delta$ exon4</sup> Zellen eine geringere Aktivierbarkeit des Ubiquitin - Proteasomsystems und führten dies auf eine verstärkte Auslastung desselben durch mutiertes proSP-C zurück [23]. Gemeinsam mit den Ergebnissen aus der in dieser Arbeit dargestellten Koimmunopräzipitation von HA-Tag und Ubiquitin spricht dies für eine erhöhte Ubiquitylierung in proSP-C<sup>MUT</sup>.

Fehlprozessiertes proSP-C<sup>I73T</sup> und proSP-C<sup>A116D</sup> akkumulierte zu einem beträchtlichen Ausmaß intrazellulär (*siehe Kapitel 3.5.*). Wahrscheinlich wird dieses in nicht unerheblichen Mengen in die Plasmamembran eingebaut (*Kapitel 3.10.*; [16, 89]). Von dort aus könnte es über endosomale Transportwege wieder in die Zelle aufgenommen werden zur weiteren Degradation oder Prozessierung. Sowohl proSP-C<sup>I73T</sup> als auch proSP-C<sup>A116D</sup> konnten in EEA-1 positiven Vesikeln, einem Marker für das frühe endosomale Netzwerk, nachgewiesen werden [16, 112]. Dies würde erklären, warum geringe Mengen an prozessiertem proSP-C bei 10kDa detektiert werden konnten. Eine weitere Möglichkeit wäre die Sekretion aus der Plasmamembran in die Alveolen, so dass mutiertes proSP-C in der bronchoalveolären Lavage nachgewiesen werden kann [95].

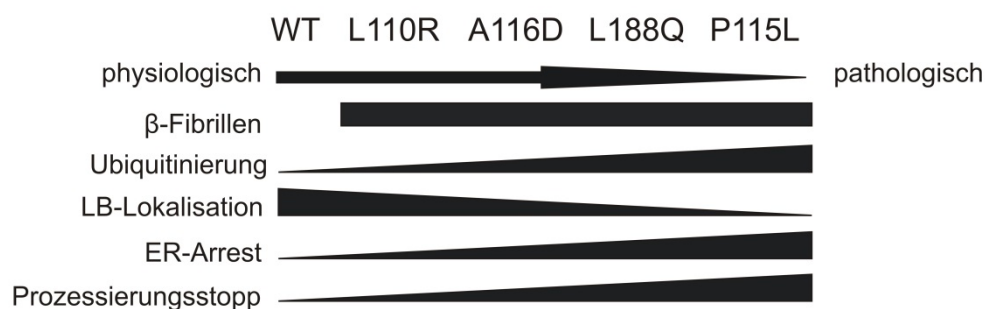
Als weitere Reaktion wurde eine vermehrte Tendenz zur Bildung von  $\beta$ -Fibrillen festgestellt. Eine genauere Besprechung erfolgt in *Kapitel 4.5.*

Im Gegensatz zu mutiertem proSP-C zeigte proSP-C<sup>WT</sup> eine verstärkte Autophagie-Aktivität. Womöglich wird proSP-C bis zu einer bestimmten Stufe physiologisch in A549 Zellen prozessiert und akkumuliert anschließend intrazellulär, da reifes SP-C nicht sezerniert werden

kann. Dieses wird im Sinne der Autophagie nun recycelt. In den Mutationen wird proSP-C als fehlerhaft erkannt. Es werden statt Autophagie die oben genannten alternativen Stoffwechselwege aktiviert.

#### 4.4. Mutationen der BRICHOS-Domäne zeigen ein unterschiedliches Verhaltensmuster

In dieser Studie wurden vier Mutationen aus der so genannten BRICHOS-Domäne untersucht. Die BRICHOS-Domäne wurde als wichtiges Signalpropeptid des proSP-C zur korrekten Prozessierung im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat identifiziert [19]. Die Annahme, dass Mutationen in diesem Bereich diesbezüglich ein ähnliches Verhaltensmuster aufzeigen [19, 67], kann nicht bekräftigt werden. Im Gegenteil, während sich bei p.L110R ein dem WT sehr ähnliches Bild ergab, zeigte sich bei p.P115L eine enorme Abweichung des proSP-C bei der Prozessierung und intrazellulären Lokalisation (*Abb. 31*).



**Abbildung 31: Unterschiedliches Verhaltensmuster der BRICHOS Mutationen**

Schematischer Vergleich der vier untersuchten BRICHOS Mutationen und proSP-C<sup>WT</sup> bezüglich ihrer intrazellulären Lokalisation, Prozessierung und Verhaltensmuster.

Ob proSP-C<sup>L110R</sup> daher tatsächlich zu einem klinisch relevanten Phänotyp führt, kann bisher nicht abschließend geklärt werden, da im einzigen, bisher klinisch dokumentierten Fall neben der p.L110R Mutation auch eine p.I73T Mutation nachgewiesen wurde [27].

ProSP-C<sup>A116D</sup> zeigte in vielerlei Hinsicht ein ähnliches pathophysiologisches Bild wie die non-BRICHOS Mutation p.I73T. Beide werden in die Plasmamembran eingebaut, nachdem aberrantes proSP-C gebildet wurde und intrazellulär akkumuliert. Gleichzeitig kann ein bestimmter Anteil korrekt prozessiert werden, so dass sich proSP-C in Lamellar-Körperchen wiederfindet. Ein Prozessierungsstopp mit nachfolgender Akkumulation von proSP-C im Endoplasmatischen Retikulum, wie dies bei p.P115L und zum größten Teil auch bei p.L188Q gesehen wurde, fand sich bei p.A116D nicht. Die bisher publizierten Erkenntnisse für proSP-

C<sup>L188Q</sup> konnten größtenteils bestätigt werden [88, 89, 93]. Während p.P115L annähernd komplett im ER akkumulierte und alternativ abgebaut wurde (s.o.), wurde p.L188Q zu einem geringen Anteil weiter prozessiert und in LB aufgenommen. Hierfür spricht die Kolo-kalisation von proSP-C<sup>L188Q</sup> und Lamellar-Körperchen, bei insgesamt weniger LB pro Zelle im Vergleich zum WT, und die schwach detektierbare Bande von etwa 10kDa im Western-Blot.

Diese unterschiedlichen Verhaltensmuster deuten darauf hin, dass bedeutendere und weniger bedeutendere Abschnitte für die posttranslationale Prozessierung innerhalb der BRICHOS-Domäne vorhanden sein müssen. Es wurde gezeigt, dass ein Fehlen der C-terminal endständigen 22 Aminosäuren (AS 176-197) zu einer Retention im Endoplasmatischen Retikulum führt [53]. Allerdings führt nicht nur das komplette Fehlen dieser C-terminalen Aminosäuren zu einer Retention, auch der Austausch einer einzigen Aminosäure aus diesem Abschnitt reicht hierzu aus, wie im Fall von proSP-C<sup>L188Q</sup> gezeigt werden konnte. Zusätzlich scheint zumindest noch ein weiterer für die korrekte Prozessierung relevanter Abschnitt, Aminosäureposition 115 mit eingeschlossen, zu existieren.

#### **4.5. ProSP-C: Tendenz zu $\beta$ -Fibrillen und protektiver Effekt der BRICHOS-Domäne**

Die Transmembrandomäne des proSP-C, später das eigentliche reife mSP-C, stellt einen instabilen Abschnitt dar, der dazu neigt, aus der  $\alpha$ -Helix eine  $\beta$ -fibrilläre Struktur einzugehen und damit zu akkumulieren solange er noch nicht in die Zellmembran eingebaut ist [107]. Proteinabschnitte, die vermehrt unpolare Aminosäuren aufweisen, haben eine vermehrte Tendenz zur Bildung von  $\beta$ -Fibrillen [51]. Willander *et al.* konnten zeigen, dass die Transmembrandomäne im proSP-C einen solchen Abschnitt darstellt [107]. Unlängst wurde ein protektiver Effekt der BRICHOS-Domäne als intramolekulares Chaperon gegenüber dieser Umformung beschrieben [50, 108]. Womöglich bindet die BRICHOS-Domäne an  $\beta$ -*hairpins*, also Vorläufer einer  $\beta$ -Faltblattstruktur, und verhindert so eine Ausbildung und Anlagerung weiterer solcher  $\beta$ -*hairpins* im Sinne eines Dominoeffekts [107]. Es konnte gezeigt werden, dass in Zellen mit fehlendem C-terminalen Ende von proSP-C vermehrt Amyloid gebildet wird [50]. Auf bereits gebildetes Amyloid hat eine intakte BRICHOS-Domäne keinen positiven Effekt ([69]. Passend dazu konnten in allen hier untersuchten BRICHOS-Mutationen amyloidähnliche  $\beta$ -Fibrillen in der Kongo-Rot Färbung nachgewiesen werden. Für p.L188Q wurde dies bereits gezeigt [70].

Auch die N-terminale, und damit in der eigentlich betroffenen Transmembrandomäne

lokalisierte, Mutation proSP-C<sup>P30L</sup> zeigt intrazelluläre Amyloidaggregate. Während der posttranslationalen Prozessierung von proSP-C werden die beiden Cysteine an den Aminosäurepositionen 28 und 29 palmitoyliert [19]. Ein korrektes Zusammenspiel zwischen den dann palmitoylierten Cysteinen und den in den Alveolarsepten vorkommenden Lipiden stabilisiert die  $\alpha$ -Helix-Konformation der Transmembrandomäne. [47, 52]. Das flankierende Prolin an Aminosäureposition 30 ist notwendig für die richtige räumliche Orientierung der Palmitoylgruppen. Wenn, wie im Falle von p.P30L, Prolin durch Leucin ersetzt wird, könnte dies zu einer fehlerhaften Ausrichtung führen [25, 52]. Dadurch könnte eine Interaktion der BRICHOS-Domäne mit der Transmembrandomäne nicht mehr möglich sein und es käme konsekutiv zu  $\beta$ -fibrillärer Anordnung von proSP-C mit der Mutation p.P30L.

#### 4.6. BiP/GRP78 notwendig für einen korrekten Transport des proSP-C

BiP/GRP78 ist ein ER-Chaperon, das intraluminal an ungefaltete Proteinabschnitte bindet und somit der physiologischen posttranslationalen Prozessierung im ER dienlich ist. Zudem ist es notwendig, um Proteine korrekt durch das ER zu schleusen [71]. Mittlerweile konnte ein Zusammenspiel zwischen proSP-C<sup>WT</sup> und BiP unter physiologischen Bedingungen in A549-Zellen gezeigt werden [62]. In der Sucrose-Gradient-Zentrifugation zur Fraktionierung von subzellulären Strukturen wurde proSP-C gemeinsam mit BiP/GRP78 in den Fraktionen 7-10 ermittelt. Reifes mSP-C dagegen fand sich in den Fraktionen 3-5 gemeinsam mit reifen Lamellar-Körperchen. Passend zu diesen Ergebnissen fand sich in den hier durchgeführten Versuchen BiP/GRP78 selbst nicht in Lamellar-Körperchen (*Kapitel 3.12.2.* und [96]). In einer Arbeit von Mimura *et al.* konnte gezeigt werden, dass BiP/GRP78 einen essentiellen Faktor für die korrekte Biosynthese von SP-C darstellt. In Zellen mit mutiertem BiP/GRP78 kam es zu einer Akkumulation von proSP-C im ER und einer geringeren Sekretion von Surfactant via Lamellar-Körperchen. Des Weiteren konnte eine Kollokalisierung von proSP-C<sup>WT</sup> und BiP/GRP78<sup>WT</sup> im Konfokalmikroskop nachgewiesen werden [64].

In der vorliegenden Arbeit wurde die räumliche Anordnung von BiP/GRP78 und proSP-C in der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Für den Wildtyp sowie für alle Mutationen, die auch in Lamellar-Körperchen vorkommen, konnte eine Kollokalisierung aufgezeigt werden. Für die beiden ER-Mutationen p.P30L und p.P115L sowie für p.L188Q ergab sich keine oder nur eine sehr geringe räumliche Übereinstimmung. Zusätzlich wurde in den proSP-C<sup>MUT</sup> eine im Vergleich zum WT geringere Proteinmenge an BiP/GRP78 in den Zellen gemessen.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass BiP/GRP78 für die physiologische Prozessierung und

vor allem für den korrekten Transport von proSP-C durch das ER hin zu den Lamellar-Körperchen notwendig ist.

Womöglich werden die ER-Mutanten des proSP-C in ein falsches Kompartiment innerhalb des ER geschleust, wie dies für proSP-C<sup>P30A</sup> vorgeschlagen wurde [24]. Somit stehen sie nicht mehr für eine Interaktion mit BiP/GRP78 zur Verfügung, was zu ihrer Akkumulation im ER und einer Unterbrechung der weiteren Prozessierung führt.

#### 4.7. Stabil transfizierte Zellen mit *SFTPC*-Mutationen adaptieren sich an ER-Stress

Als sogenannte ER-Chaperone werden Proteine bezeichnet, die im ER die posttranslationale Prozessierung unterstützen, so zum Beispiel als Faltungshelfer dienen und, wie im Falle von BiP/GRP78, an ungefaltete Proteinabschnitte binden, um eine Konformationsänderung zu bewirken. Kommt es im ER zu einer Ansammlung von ungefalteten Proteinen, so wird unter anderem auch BiP als zentrales Element in der Steuerung des UPR (*unfolded protein response*) vermehrt exprimiert, um einer Akkumulation der Proteinmoleküle entgegenzuwirken [71]. Dieser ER-Stress, also die Aktivierung des UPR, führt zu vermehrter Degradation oder Faltung der betroffenen Proteine. Ein weiteres Chaperon im UPR-Netzwerk ist unter anderem Hsp90/GRP94 [71]. Etliche Studien der letzten Jahre wiesen eine Induktion von UPR und somit auch eine vermehrte Expression von BiP/GRP78 in Zellen mit proSP-C Mutationen nach [57, 58, 67, 68, 115]. Einschränkend muss festgehalten werden, dass die entsprechenden Versuche in transient transfizierten Zellen durchgeführt wurden, also die Messungen in aller Regel 24-48 Stunden nach Transfektion erfolgten. In der vorliegenden Arbeit wurden BiP/GRP78 und Hsp90/GRP94 in stabil transfizierten Zellen gemessen. Hierbei konnte keine gesteigerte Expression der Chaperone festgestellt werden. Dies könnte an dem Umstand liegen, dass in transient transfizierten Zellen der Vorgang der Transfektion an sich schon einen starken Zellstress auslöst und damit auch eine Aktivierung von ER-Chaperonen verursacht. Im stabilen *in vitro* Versuchsmodell, was ein Stück weit eher einer *in vivo* Situation entspricht, haben die Zellen genügend Zeit, sich einerseits vom Transfektionsvorgang zu erholen und andererseits sich auch an, durch mutiertes Protein verursachten, chronischen ER-Stress zu adaptieren. Eventuell führt eine initiale Induktion von ER-Stress zu einer erniedrigten Expression des mutierten Proteins und in der Folge zu weniger ER-Stress. Eine solche Anpassung an dauerhaften ER-Stress wurde bereits für die stabile Expression von proSP-C<sup>Δexon4</sup> demonstriert [23].

#### 4.8. Generelle Auswirkungen auf die Funktionen der Zelle

Die Auswirkungen auf generelle zelluläre Funktionen wurden in dieser Studie nur orientierend evaluiert. So kann mit den vorliegenden Daten keine Aussage über die direkte Proliferationsrate, Apoptose oder Stoffwechsellistung gemacht werden. Allerdings sprechen die Ergebnisse im MTT-Assay für eine intakte Viabilität und dienen damit orientierend als Hinweis für eine im Vergleich zum WT nicht entscheidend veränderte Proliferationsrate oder gleichbleibende Apoptoserate ([42, 49, 65]. Auch die Luciferase-Absorptionsmessungen sprechen für eine durch proSP-C Mutationen nicht beeinflusste generelle Sekretionsleistung der Zellen.

Eine Fibrosierung des Lungengerüsts in Verbindung mit EMT ist eine regelmäßige Beobachtung in ILD. Neuere Studien weisen darauf hin, dass wiederholte Entzündungen und Verletzungen von Pneumozyten Typ II zur Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren und zu einer Aktivierung von Fibroblasten führen. In ihrer Folge kommt es nicht nur zu einer Proliferation des mesenchymalen Gewebes, sondern auch zu einer direkten Umwandlung von Pneumozyten-II zu Fibroblasten/Myofibroblasten [92, 109]. Für SP-C Mutationen wurde bereits eine EMT beschrieben. So wurden Mutationen innerhalb der BRICHOS-Domäne mit Inflammation und Fibrosierung assoziiert ([57]. Zhong *et al* konnten einen Zusammenhang von ER-Stress und EMT in Zellen mit SP-C Mutationen aufzeigen [115]. Dabei ergaben sich für geringen ER-Stress ansteigende Level von EMT, bei starkem ER-Stress jedoch eine vermehrte Apoptoserate. Ein zentraler Mediator für die EMT ist TGF $\beta$ <sub>1</sub> (Kapitel 1.3.). In dieser Arbeit wurde daher in einem ELISA die Sekretion von TGF $\beta$ <sub>1</sub> durch A549-Zellen mit SP-C Mutationen gemessen, als Marker für parakrine und autokrine Stimulation der EMT. Es ergab sich, außer bei p.I73T, in allen proSP-C<sup>MUT</sup> ein signifikanter Anstieg der TGF $\beta$ <sub>1</sub> Menge im Zellüberstand. Interessanter Weise kam eine kürzlich veröffentlichte Studie zu einem gegenteiligen Ergebnis [91]. Die hierbei gemessene Menge an TGF $\beta$ <sub>1</sub> bei p.L188Q war im Vergleich zum WT nicht erhöht. Trotzdem wurde eine erhöhte Rate an EMT durch weiterführende Versuche gemessen. Auch eine Blockierung des TGF $\beta$ <sub>1</sub> – Signalweges führte zu keinem Einfluss auf die gemessene EMT, was dafür spricht, dass auch andere Mediatoren als nur TGF $\beta$ <sub>1</sub> eine wichtige Rolle in Pneumozyten-II bei der Umwandlung zu Fibroblasten spielen. Die Autoren schlugen vor, dass EMT in Zellen mit SP-C Mutationen als *Escape*-Mechanismus dient, wodurch weniger mutiertes Protein exprimiert wird und damit weniger ER-Stress entsteht. TGF $\beta$ <sub>1</sub> ist nicht nur ein wichtiger Akteur in der EMT, sondern verursacht ebenso eine geringere Expression von SP-C [5]. Auch Bleomycin, ein EMT-Induktor, hat

ähnliche Auswirkungen auf SP-C [5]. Der in der vorliegenden Arbeit gemessene Anstieg an  $TGF_{\beta 1}$  im Zellüberstand könnte daher eine Erklärung für die gemessenen geringeren mRNA-Werte in den proSP-C<sup>MUT</sup> im Vergleich zum WT sein (*Kapitel 7.1.*). Die Ergebnisse deuten weiterhin auf eine durch Pneumozyten-II induzierte Umwandlung zu mesenchyalem Gewebe hin. Allerdings sind weitere Versuche notwendig, um hier klare Aussagen zur Pathogenese treffen zu können.

#### 4.9. Ausblick

Das Ziel klinisch-experimenteller Forschung sollte selbstverständlich primär das Verstehen der Krankheitsgenese und im nächsten Schritt die Entwicklung neuer Therapiestrategien darstellen. In den letzten Jahren wurden unzählige Fortschritte in der Aufdeckung von Physiologie und Pathologie des SP-C gemacht. Nichts desto trotz bleiben entscheidende Aspekte diesbezüglich unklar und bedürfen weiterer intensiver Erforschung, um gezielt therapeutisch intervenieren zu können. Insbesondere muss die Verknüpfung zwischen der Erkrankung und ihren molekularbiologischen Grundlagen gelingen. So stellt sich unter anderem die Frage, welche konkreten klinisch fassbaren Auswirkungen eine Akkumulation von mutiertem proSP-C in der Zelle hat und in einem nächsten Schritt, wie diese verhindert werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden sechs SP-C Mutationen untereinander und mit dem Wildtyp verglichen. Die Ergebnisse zeigten neben Gemeinsamkeiten vor allem auch mutationsspezifische Veränderungen in der Zelle, die nicht auf eine allgemein gültige Pathophysiologie schließen lassen. Vielmehr lassen sich die Mutationen in unterschiedliche Gruppen einteilen (*Kapitel 4.2.*), innerhalb derer sich Gemeinsamkeiten in der Prozessierung und intrazellulären Lokalisation finden. Allerdings ist auch hier das Verhaltensmuster nicht stringent, sondern durchaus individuell verschieden. Eine Gruppierung der Mutationen bietet aber die Möglichkeit, bestimmte Pathologien gezielt zu evaluieren, und stellt einen ersten Ansatzpunkt zum fokussierten Einsatz medikamentöser Interventionen dar. So könnten in Zukunft Medikamente zum Einsatz kommen, die bei Mutationen mit ER-Arrest den dortigen Prozessierungsstopp aufheben und proSP-C weiter zum mSP-C reifen lassen. Erste *in vitro* Experimente wurden bereits publiziert [89]. So konnte die Prozessierungsrate von proSP-C<sup>L188Q</sup>, eine Mutation die zu ER-Arrest führt, durch den *in vitro* Einsatz von 4-Phenylbutyrat eindrucksvoll gesteigert werden. Allerdings sind solche chemischen Chaperone, die industriell zur besseren Proteinausbeute genutzt werden, für den *in vivo* Einsatz aufgrund der toxischen Nebenwirkungen bisher noch ungeeignet. Das kausale Zusammenspiel zwischen Medikament

und mutiertem proSP-C bleibt aber auch weiterhin oft unklar. Dies nicht zuletzt, weil die eingesetzten und zum Teil auch klinisch erfolgversprechenden Medikamente eine komplexe mehrseitige Pharmakodynamik aufweisen [112], [110]. So beschränken sich therapeutische Regime bisher oft auf symptomatische Ansätze. Bis zum „serienmäßigen“ Einsatz von kausalen Therapien dürfte also noch einiges an Forscherdrang von Nöten sein. In letzter Zeit haben sich mehrere Arbeitsgruppen mit dem Zusammenhang zwischen pulmonaler Fibrose in ILD und *SFTPC*-Mutationen als kausaler Genese beschäftigt. Hier konnten zahlreiche neue Erkenntnisse gewonnen werden, die aber noch weiter evaluiert und ausgebaut werden müssen. Wenn sich tatsächlich wenige Zytokine, wie  $TGF_{\beta 1}$ , als zentrale Mediatoren einer EMT in ILD herauskristallisieren, dürfte dieser Krankheitsaspekt mit den Möglichkeiten der modernen Antikörpertherapie einen attraktiven und vielversprechenden Ansatzpunkt zur medikamentösen Intervention darstellen.





## 5. Zusammenfassung

Interstitielle Lungenkrankheiten (ILD) sind eine seltene aber schwer zu therapierende Erkrankung des Kindes- und Erwachsenenalters. Die Gruppe der ILD umfasst sowohl organbegrenzte als auch systemische Krankheitsbilder mit einer heterogenen klinischen Ausprägung. Die Therapie beschränkt sich bisher zumeist auf symptomatische Ansätze. Neben anderen Auslösern konnten auch Mutationen im Surfactant Protein C Gen (*SFTPC*) als Ursache einer kindlichen ILD identifiziert werden, wobei der Zusammenhang zwischen molekularer Genese und klinischem Phänotyp bisher nur unzureichend aufgeklärt ist. In der vorliegenden Arbeit „Zellbiologische Charakterisierung von Surfactant Protein C Mutationen bei Interstitiellen Lungenkrankheiten“ wurden SP-C Mutationen mit dem Wildtyp bezüglich ihrer Prozessierung, intrazellulären Lokalisation und ihren Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel verglichen, um klinische Symptome und zu Grunde liegende Pathomechanismen besser zu verstehen. Hierfür wurden sechs repräsentative, bereits klinisch bekannte, Mutationen aus den verschiedenen proSP-C Abschnitten ausgewählt: Aus dem Teil des späteren reifen SP-C die Mutation p.P30L, aus der *Linker*-domäne p.I73T und aus der BRICHOS Domäne die Mutationen p.L110R, p.P115L, p.A116D und p.L188Q. Um mögliche generelle Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel zu eruieren, wurde die Viabilität der Zellen gemessen und die allgemeine Sekretionsleistung verglichen. Beide Messgrößen wurden durch SP-C Mutationen nicht beeinflusst. Zusätzlich wurde TGF $\beta$ <sub>1</sub> als zentraler Mediator einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) bestimmt. Hierbei ergaben sich deutliche Hinweise auf eine Stimulation der EMT durch die Mutationen. Interessanter Weise fanden sich keine Anzeichen für einen induzierten ER-Stress durch proSP-C Mutationen, wie dies mehrfach postuliert wurde. Eine Erklärung könnte die Adaptation des Zellstoffwechsels an chronischen Stress und fehlgefaltetes Protein im stabil transfizierten Zellmodell sein.

Die Prozessierung wurde mittels Western Blot und Immunopräzipitation untersucht. Zur Darstellung von proSP-C in intrazellulären Kompartimenten kam die Immunfluoreszenzmikroskopie zum Einsatz. Es fanden sich deutliche Hinweise auf eine reduzierte physiologische Sekretion von SP-C via Lamellar-Körperchen. Es konnten drei typische Folgen der Fehlprozessierung erkannt werden, die je nach Mutation unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Zum einen ein vermehrter Abbau von mutiertem proSP-C im Proteasom-Ubiquitin-System, des Weiteren eine Akkumulation von intrazellulärem proSP-C in der Plasmamembran sowie eine Aggregation von proSP-C in amyloidähnlichen

intrazellulären  $\beta$ -Fibrillen.

Grundsätzlich ergaben sich zwei verschiedene Gruppen von Mutationen. Eine umfasst Mutationen (p.I73T, p.L110R, p.A116D und teilweise p.L188Q), die soweit prozessiert werden, dass eine Integration in die Lamellar-Körperchen erfolgen kann. Zur zweiten Gruppe zählen jene Mutationen (p.P30L und p.P115L), die einem Prozessierungsstopp im Endoplasmatischen Retikulum unterliegen, und daher nicht in Lamellar-Körperchen aufgenommen werden.

Das ER-Chaperon BiP/GRP78 wurde als wichtiges Element im intrazellulären Transport von proSP-C identifiziert. So fand sich eine regelmäßige Kollokalisierung von BiP und proSP-C bei Mutationen, die auch in Lamellar-Körperchen vorkommen. In Mutationen mit Prozessierungsstopp auf der Stufe des ER konnte dies nicht festgestellt werden.

Entgegen der bisher üblichen Annahme, dass alle Mutationen der BRICHOS Domäne sich ähnlich verhalten, ergaben die hier präsentierten Ergebnisse ein differenzierteres Bild. So scheinen nicht alle Abschnitte der BRICHOS Domäne in gleicher Weise als intramolekulares Signalpeptid zu wirken, insoweit dass BRICHOS Mutationen zu einem unterschiedlichen Grad prozessiert werden und in verschiedenen Zellorganellen wiederzufinden sind. Entsprechend der postulierten Aufgabe als intrazelluläres Chaperon konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die BRICHOS Domäne protektiv gegenüber der Ausbildung von  $\beta$ -Fibrillen aus proSP-C wirkt. Bei allen Mutationen aus diesem Bereich fanden sich intrazelluläre Kongorot-positive Ablagerungen im Sinne von  $\beta$ -Fibrillen. Das gleiche Bild ergab sich auch für die Mutation p.P30L.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse konnten bisherige Erkenntnisse bestätigen und ergänzen. Zusätzlich verdeutlichen die Ergebnisse, dass *SFTPC*-Mutationen nicht als eine Einheit zu betrachten sind, sondern dass eine differenzierte Betrachtung der einzelnen Mutationen oder einzelner Mutationsgruppen in Zukunft notwendig sein wird, um eine gezielte kausale Therapie einsetzen zu können.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] 2002. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 2, 277–304.
- [2] Abonyo, B. O., Gou, D., Wang, P., Narasaraaju, T., Wang, Z., and Liu, L. 2004. Syntaxin 2 and SNAP-23 Are Required for Regulated Surfactant Secretion †. *Biochemistry* 43, 12, 3499–3506.
- [3] Akella, A. and Deshpande, S. B. 2013. Pulmonary surfactants and their role in pathophysiology of lung disorders. *Indian J Exp Biol* 51, 1, 5–22.
- [4] Alder, J. K., Chen, J. J.-L., Lancaster, L., Danoff, S., Su, S.-c., Cogan, J. D., Vulto, I., Xie, M., Qi, X., Tudor, R. M., Phillips, J. A. 3., Lansdorp, P. M., Loyd, J. E., and Armanios, M. Y. 2008. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 35, 13051–13056.
- [5] Alipio, Z. A., Jones, N., Liao, W., Yang, J., Kulkarni, S., Sree Kumar, K., Hauer-Jensen, M., Ward, D. C., Ma, Y., and Fink, L. M. 2011. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) induced by bleomycin or TGF(β1)/EGF in murine induced pluripotent stem cell-derived alveolar Type II-like cells. *Differentiation* 82, 2, 89–98.
- [6] Andreeva, A. V., Kutuzov, M. A., and Voyno-Yasenetskaya, T. A. 2007. Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293, 2, L259-71.
- [7] Augusto, L. A., Synguelakis, M., Johansson, J., Pedron, T., Girard, R., and Chaby, R. 2003. Interaction of pulmonary surfactant protein C with CD14 and lipopolysaccharide. *Infect Immun* 71, 1, 61–67.
- [8] Augusto, L., Le Blay, K., Auger, G., Blanot, D., and Chaby, R. 2001. Interaction of bacterial lipopolysaccharide with mouse surfactant protein C inserted into lipid vesicles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281, 4, L776-85.
- [9] Avital, A., Godfrey, S., Maayan, C., Diamant, Y., and Springer, C. 1994. Chloroquine treatment of interstitial lung disease in children. *Pediatr Pulmonol* 18, 6, 356–360.
- [10] Bachurski, C. J., Pryhuber, G. S., Glasser, S. W., Kelly, S. E., and Whitsett, J. A. 1995. Tumor necrosis factor-α inhibits surfactant protein C gene transcription. *J Biol Chem* 270, 33, 19402–19407.

- 
- [11] Balasubramanian, N., Murphy, A., O'Sullivan, J., and O'Connell, E. J. 1997. Familial interstitial lung disease in children: response to chloroquine treatment in one sibling with desquamative interstitial pneumonitis. *Pediatr Pulmonol* 23, 1, 55–61.
- [12] Bals, R. and Hiemstra, P. S. 2004. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J* 23, 2, 327–333.
- [13] Ban, N., Matsumura, Y., Sakai, H., Takanezawa, Y., Sasaki, M., Arai, H., and Inagaki, N. 2007. ABCA3 as a lipid transporter in pulmonary surfactant biogenesis. *J Biol Chem* 282, 13, 9628–9634.
- [14] Batenburg, J. J. 1992. Surfactant phospholipids: synthesis and storage. *Am J Physiol* 262, 4 Pt 1, L367-85.
- [15] Baumgart, F., Ospina, O. L., Mingarro, I., Rodriguez-Crespo, I., and Perez-Gil, J. 2010. Palmitoylation of pulmonary surfactant protein SP-C is critical for its functional cooperation with SP-B to sustain compression/expansion dynamics in cholesterol-containing surfactant films. *Biophys J* 99, 10, 3234–3243.
- [16] Beers, M. F., Hawkins, A., Maguire, J. A., Kotorashvili, A., Zhao, M., Newitt, J. L., Ding, W., Russo, S., Guttentag, S., Gonzales, L., and Mulugeta, S. 2011. A nonaggregating surfactant protein C mutant is misdirected to early endosomes and disrupts phospholipid recycling. *Traffic* 12, 9, 1196–1210.
- [17] Beers, M. F. and Lomax, C. 1995. Synthesis and processing of hydrophobic surfactant protein C by isolated rat type II cells. *Am J Physiol* 269, 6 Pt 1, L744-53.
- [18] Beers, M. F., Lomax, C. A., and Russo, S. J. 1998. Synthetic processing of surfactant protein C by alveolar epithelial cells. The COOH terminus of proSP-C is required for post-translational targeting and proteolysis. *J Biol Chem* 273, 24, 15287–15293.
- [19] Beers, M. F. and Mulugeta, S. 2005. Surfactant protein C biosynthesis and its emerging role in conformational lung disease. *Annu Rev Physiol* 67, 663–696.
- [20] Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254.
- [21] Brasch, F., Brinke, A., ten, Johnen, G., Ochs, M., Kapp, N., Muller, K. M., Beers, M. F., Fehrenbach, H., Richter, J., Batenburg, J. J., and Buhling, F. 2002. Involvement of cathepsin H in the processing of the hydrophobic surfactant-associated protein C in type II pneumocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26, 6, 659–670.

- [22] Brasch, F., Griese, M., Tredano, M., Johnen, G., Ochs, M., Rieger, C., Mulugeta, S., Muller, K. M., Bahua, M., and Beers, M. F. 2004. Interstitial lung disease in a baby with a de novo mutation in the SFTPC gene. *Eur Respir J* 24, 1, 30–39.
- [23] Bridges, J. P., Xu, Y., Na, C.-L., Wong, H. R., and Weaver, T. E. 2006. Adaptation and increased susceptibility to infection associated with constitutive expression of misfolded SP-C. *J Cell Biol* 172, 3, 395–407.
- [24] Brinke, A. ten, Batenburg, J. J., Haagsman, H. P., van Golde, L. M. G., and Vaandrager, A. B. 2002. Differential effect of brefeldin A on the palmitoylation of surfactant protein C proprotein mutants. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 1, 532–538.
- [25] Brinke, A. ten, van Golde, L. M. G., and Batenburg, J. J. 2002. Palmitoylation and processing of the lipopeptide surfactant protein C. *Biochim Biophys Acta* 1583, 3, 253–265.
- [26] Bullard, J. E., Wert, S. E., and Noguee, L. M. 2006. ABCA3 deficiency: neonatal respiratory failure and interstitial lung disease. *Semin Perinatol* 30, 6, 327–334.
- [27] Cameron, H. S., Somaschini, M., Carrera, P., Hamvas, A., Whitsett, J. A., Wert, S. E., Deutsch, G., and Noguee, L. M. 2005. A common mutation in the surfactant protein C gene associated with lung disease. *J Pediatr* 146, 3, 370–375.
- [28] Chander, A., Johnson, R. G., Reicherter, J., and Fisher, A. B. 1986. Lung lamellar bodies maintain an acidic internal pH. *J Biol Chem* 261, 13, 6126–6131.
- [29] Clark, J. C., Wert, S. E., Bachurski, C. J., Stahlman, M. T., Stripp, B. R., Weaver, T. E., and Whitsett, J. A. 1995. Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 17, 7794–7798.
- [30] Clement, A. 2004. Task force on chronic interstitial lung disease in immunocompetent children. *Eur Respir J* 24, 4, 686–697.
- [31] Clement, A. and Eber, E. 2008. Interstitial lung diseases in infants and children. *European Respiratory Journal* 31, 3, 658–666.
- [32] Clement, A., Nathan, N., Epaud, R., Fauroux, B., and Corvol, H. 2010. Interstitial lung diseases in children. *Orphanet J Rare Dis* 5, 1, 22.
- [33] Danto, S. I., Shannon, J. M., Borok, Z., Zabski, S. M., and Crandall, E. D. 1995. Reversible transdifferentiation of alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12, 5, 497–502.

- [34] Deutsch, G. H., Young, L. R., Deterding, R. R., Fan, L. L., Dell, S. D., Bean, J. A., Brody, A. S., Nogee, L. M., Trapnell, B. C., Langston, C., Albright, E. A., Askin, F. B., Baker, P., Chou, P. M., Cool, C. M., Coventry, S. C., Cutz, E., Davis, M. M., Dishop, M. K., Galambos, C., Patterson, K., Travis, W. D., Wert, S. E., and White, F. V. 2007. Diffuse lung disease in young children: application of a novel classification scheme. *Am J Respir Crit Care Med* 176, 11, 1120–1128.
- [35] Dinwiddie, R., Sharief, N., and Crawford, O. 2002. Idiopathic interstitial pneumonitis in children: a national survey in the United Kingdom and Ireland. *Pediatr Pulmonol* 34, 1, 23–29.
- [36] Driscoll, B., Buckley, S., Bui, K. C., Anderson, K. D., and Warburton, D. 2000. Telomerase in alveolar epithelial development and repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, 6, L1191-8.
- [37] Edwards, V., Cutz, E., Viero, S., Moore, A. M., and Nogee, L. 2005. Ultrastructure of lamellar bodies in congenital surfactant deficiency. *Ultrastruct Pathol* 29, 6, 503–509.
- [38] Fan, L. L. 2002. Pediatric Interstitial Lung Disease: Children Are Not Small Adults. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165, 11, 1466–1467.
- [39] Fauci, A. S., Kasper, D. L., Braunwald, E., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L., and Loscalzo, J. 2007. *Harrison's principles of internal medicine*. Harrison's Principles of Internal Medicine (2v.). McGraw-Hill Education, New York.
- [40] Fernandez-Flores, A. 2011. A review of amyloid staining: methods and artifacts. *Biotech Histochem* 86, 5, 293–301.
- [41] Garmany, T. H., Moxley, M. A., White, F. V., Dean, M., Hull, W. M., Whitsett, J. A., Nogee, L. M., and Hamvas, A. 2006. Surfactant composition and function in patients with ABCA3 mutations. *Pediatr Res* 59, 6, 801–805.
- [42] Gerlier, D. and Thomasset, N. 1986. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods* 94, 1-2, 57–63.
- [43] Glasser, S. W., Senft, A. P., Whitsett, J. A., Maxfield, M. D., Ross, G. F., Richardson, T. R., Prows, D. R., Xu, Y., and Korfhagen, T. R. 2008. Macrophage dysfunction and susceptibility to pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in surfactant protein C-deficient mice. *J Immunol* 181, 1, 621–628.
- [44] Griese, M., Haug, M., Brasch, F., Freihorst, A., Lohse, P., Kries, R. von, Zimmermann, T., and Hartl, D. 2009. Incidence and classification of pediatric diffuse parenchymal lung diseases in Germany. *Orphanet J Rare Dis* 4, 26.

- [45] Griese, M., Tredano, M., Nicolai, T., and Bahau, M. 2002. Molekulare Grundlagen und Klinik der pulmonalen Alveolarproteinosen. *Deutsches Ärzteblatt* 99, 15 (Apr. 2002), 1013–1023.
- [46] Guillot, L., Tabary, O., Nathan, N., Corvol, H., and Clement, A. 2011. Macrolides: New therapeutic perspectives in lung diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 43, 9, 1241–1246.
- [47] Gustafsson, M., Thyberg, J., Naslund, J., Eliasson, E., and Johansson, J. 1999. Amyloid fibril formation by pulmonary surfactant protein C. *FEBS Lett* 464, 3, 138–142.
- [48] Hamvas, A., Cole, F. S., and Noguee, L. M. 2007. Genetic disorders of surfactant proteins. *Neonatology* 91, 4, 311–317.
- [49] Hayon, T., Dvilansky, A., Shpilberg, O., and Nathan, I. 2003. Appraisal of the MTT-based Assay as a Useful Tool for Predicting Drug Chemosensitivity in Leukemia. *Leuk Lymphoma* 44, 11, 1957–1962.
- [50] Johansson, H., Eriksson, M., Nordling, K., Presto, J., and Johansson, J. 2009. The Brichos domain of prosurfactant protein C can hold and fold a transmembrane segment. *Protein Sci* 18, 6, 1175–1182.
- [51] Johansson, J., Nerelius, C., Willander, H., and Presto, J. 2010. Conformational preferences of non-polar amino acid residues: an additional factor in amyloid formation. *Biochem Biophys Res Commun* 402, 3, 515–518.
- [52] Johansson, J., Weaver, T. E., and Tjernberg, L. O. 2004. Proteolytic generation and aggregation of peptides from transmembrane regions: lung surfactant protein C and amyloid beta-peptide. *Cell Mol Life Sci* 61, 3, 326–335.
- [53] Keller, A., Steinhilber, W., Schafer, K. P., and Voss, T. 1992. The C-terminal domain of the pulmonary surfactant protein C precursor contains signals for intracellular targeting. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6, 6, 601–608.
- [54] Knyazhitskiy, A., Masson, R. G., Corkey, R., and Joiner, J. 2008. Beneficial response to macrolide antibiotic in a patient with desquamative interstitial pneumonia refractory to corticosteroid therapy. *Chest* 134, 1, 185–187.
- [55] Kuroki, Y., Takahashi, M., and Nishitani, C. 2007. Pulmonary collectins in innate immunity of the lung. *Cell Microbiol* 9, 8, 1871–1879.



- [56] Lawson, W. E., Crossno, P. F., Polosukhin, V. V., Roldan, J., Cheng, D.-S., Lane, K. B., Blackwell, T. R., Xu, C., Markin, C., Ware, L. B., Miller, G. G., Loyd, J. E., and Blackwell, T. S. 2008. Endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells is prominent in IPF: association with altered surfactant protein processing and herpesvirus infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294, 6, L1119-26.
- [57] Maguire, J. A., Mulugeta, S., and Beers, M. F. 2011. Endoplasmic reticulum stress induced by surfactant protein C BRICHOS mutants promotes proinflammatory signaling by epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44, 3, 404–414.
- [58] Maguire, J. A., Mulugeta, S., and Beers, M. F. 2012. Multiple ways to die: delineation of the unfolded protein response and apoptosis induced by Surfactant Protein C BRICHOS mutants. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 1, 101–112.
- [59] Maher, T. M., Wells, A. U., and Laurent, G. J. 2007. Idiopathic pulmonary fibrosis: multiple causes and multiple mechanisms? *Eur Respir J* 30, 5, 835–839.
- [60] Markova, S. V., Burakova, L. P., and Vysotski, E. S. 2012. High-active truncated luciferase of copepod *Metridia longa*. *Biochem Biophys Res Commun* 417, 1, 98–103.
- [61] Markova, S. V., Golz, S., Frank, L. A., Kalthof, B., and Vysotski, E. S. 2004. Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod *Metridia longa*. A novel secreted bioluminescent reporter enzyme. *J Biol Chem* 279, 5, 3212–3217.
- [62] Matsumura, Y., Sakai, H., Sasaki, M., Ban, N., and Inagaki, N. 2007. ABCA3-mediated choline-phospholipids uptake into intracellular vesicles in A549 cells. *FEBS Lett* 581, 17, 3139–3144.
- [63] Mechri, M., Epaud, R., Emond, S., Coulomb, A., Jaubert, F., Tarrant, A., Feldmann, D., Flamein, F., Clement, A., Blic, J. de, Taam, R. A., Brunelle, F., and Le Pointe, H. D. 2010. Surfactant protein C gene (SFTPC) mutation-associated lung disease: High-resolution computed tomography (HRCT) findings and its relation to histological analysis. *Pediatr. Pulmonol.* 45, 10, 1021–1029.
- [64] Mimura, N., Hamada, H., Kashio, M., Jin, H., Toyama, Y., Kimura, K., Iida, M., Goto, S., Saisho, H., Toshimori, K., Koseki, H., and Aoe, T. 2007. Aberrant quality control in the endoplasmic reticulum impairs the biosynthesis of pulmonary surfactant in mice expressing mutant BiP. *Cell Death Differ* 14, 8, 1475–1485.
- [65] Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 1-2, 55–63.

- [66] Mulugeta, S. and Beers, M. F. 2006. Surfactant protein C: its unique properties and emerging immunomodulatory role in the lung. *Microbes Infect* 8, 8, 2317–2323.
- [67] Mulugeta, S., Maguire, J. A., Newitt, J. L., Russo, S. J., Kotorashvili, A., and Beers, M. F. 2007. Misfolded BRICHOS SP-C mutant proteins induce apoptosis via caspase-4- and cytochrome c-related mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293, 3, L720-9.
- [68] Mulugeta, S., Nguyen, V., Russo, S. J., Muniswamy, M., and Beers, M. F. 2005. A surfactant protein C precursor protein BRICHOS domain mutation causes endoplasmic reticulum stress, proteasome dysfunction, and caspase 3 activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32, 6, 521–530.
- [69] Nerelius, C., Gustafsson, M., Nordling, K., Larsson, A., and Johansson, J. 2009. *Anti-Amyloid Activity of the C-Terminal Domain of proSP-C against Amyloid  $\beta$ -Peptide and Medin* †. Accessed 2 April 2013.
- [70] Nerelius, C., Martin, E., Peng, S., Gustafsson, M., Nordling, K., Weaver, T., and Johansson, J. 2008. Mutations linked to interstitial lung disease can abrogate anti-amyloid function of prosurfactant protein C. *Biochem J* 416, 2, 201–209.
- [71] Ni, M. and Lee, A. S. 2007. ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Letters* 581, 19, 3641–3651.
- [72] Noguee, L. M. 2004. Alterations in SP-B and SP-C expression in neonatal lung disease. *Annu Rev Physiol* 66, 601–623.
- [73] Noguee, L. M. 2004. Genetic mechanisms of surfactant deficiency. *Biol Neonate* 85, 4, 314–318.
- [74] Noguee, L. M., Dunbar, A. E. 3., Wert, S. E., Askin, F., Hamvas, A., and Whitsett, J. A. 2001. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N Engl J Med* 344, 8, 573–579.
- [75] Noguee, L. M., Dunbar, A. E. 3., Wert, S., Askin, F., Hamvas, A., and Whitsett, J. A. 2002. Mutations in the surfactant protein C gene associated with interstitial lung disease. *Chest* 121, 3 Suppl, 20S-21S.
- [76] Notter, R. H. and Finkelstein, J. N. 1984. Pulmonary surfactant: an interdisciplinary approach. *J Appl Physiol* 57, 6, 1613–1624.
- [77] Okada, H., Danoff, T. M., Kalluri, R., and Neilson, E. G. 1997. Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Physiol* 273, 4 Pt 2, F563-74.

- [78] Piek, E., Moustakas, A., Kurisaki, A., Heldin, C. H., and Dijke, P. ten. 1999. TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J Cell Sci* 112 (Pt 24), 4557–4568.
- [79] Rohmann, K., Tschernig, T., Pabst, R., Goldmann, T., and Drömann, D. 2011. Innate immunity in the human lung: pathogen recognition and lung disease. *Cell Tissue Res* 343, 1, 167–174.
- [80] Rosen, D. M. and Waltz, D. A. 2005. Hydroxychloroquine and surfactant protein C deficiency. *N Engl J Med* 352, 2, 207–208.
- [81] Sanchez-Pulido, L., Devos, D., and Valencia, A. 2002. BRICHOS: a conserved domain in proteins associated with dementia, respiratory distress and cancer. *Trends Biochem Sci* 27, 7, 329–332.
- [82] Sano, H., Chiba, H., Iwaki, D., Sohma, H., Voelker, D. R., and Kuroki, Y. 2000. Surfactant proteins A and D bind CD14 by different mechanisms. *J Biol Chem* 275, 29, 22442–22451.
- [83] Shannon, J. M., Emrie, P. A., Fisher, J. H., Kuroki, Y., Jennings, S. D., and Mason, R. J. 1990. Effect of a reconstituted basement membrane on expression of surfactant apoproteins in cultured adult rat alveolar type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2, 2, 183–192.
- [84] Shapiro, D. L., Nardone, L. L., Rooney, S. A., Motoyama, E. K., and Munoz, J. L. 1978. Phospholipid biosynthesis and secretion by a cell line (A549) which resembles type II alveolar epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 530, 2, 197–207.
- [85] Solarin, K. O., Wang, W. J., and Beers, M. F. 2001. Synthesis and post-translational processing of surfactant protein C. *Pediatr Pathol Mol Med* 20, 6, 471–500.
- [86] Speer, C. and Gahr, M. 2009. *Pädiatrie*. Springer, Heidelberg.
- [87] Stahlman, M. T., Gray, M. P., Falconieri, M. W., Whitsett, J. A., and Weaver, T. E. 2000. Lamellar body formation in normal and surfactant protein B-deficient fetal mice. *Lab Invest* 80, 3, 395–403.
- [88] Stevens, P. A., Pettenazzo, A., Brasch, F., Mulugeta, S., Baritussio, A., Ochs, M., Morrison, L., Russo, S. J., and Beers, M. F. 2005. Nonspecific interstitial pneumonia, alveolar proteinosis, and abnormal proprotein trafficking resulting from a spontaneous mutation in the surfactant protein C gene. *Pediatr Res* 57, 1, 89–98.
- [89] Stewart, G. A., Ridsdale, R., Martin, E. P., Na, C.-L., Xu, Y., Mandapaka, K., and Weaver, T. E. 2012. 4-Phenylbutyric acid treatment rescues trafficking and processing of a mutant surfactant protein-C. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47, 3, 324–331.

- [90] Tanida, I. and Waguri, S. 2010. Measurement of autophagy in cells and tissues. *Methods Mol Biol* 648, 193–214.
- [91] Tanjore, H., Cheng, D.-S., Degryse, A. L., Zoz, D. F., Abdolrasulnia, R., Lawson, W. E., and Blackwell, T. S. 2011. Alveolar Epithelial Cells Undergo Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Response to Endoplasmic Reticulum Stress. *Journal of Biological Chemistry* 286, 35, 30972–30980.
- [92] Thiery, J. P. and Sleeman, J. P. 2006. Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 2, 131–142.
- [93] Thomas, A. Q., Lane, K., Phillips, J. 3., Prince, M., Markin, C., Speer, M., Schwartz, D. A., Gaddipati, R., Marney, A., Johnson, J., Roberts, R., Haines, J., Stahlman, M., and Loyd, J. E. 2002. Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 9, 1322–1328.
- [94] Timmerman, L. A., Grego-Bessa, J., Raya, A., Bertran, E., Perez-Pomares, J. M., Diez, J., Aranda, S., Palomo, S., McCormick, F., Izpisua-Belmonte, J. C., and La Pompa, J. L. de. 2004. Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev* 18, 1, 99–115.
- [95] Tredano, M., Griese, M., Brasch, F., Schumacher, S., Blic, J. de, Marque, S., Houdayer, C., Elion, J., Couderc, R., and Bahuau, M. 2004. Mutation of SFTPC in infantile pulmonary alveolar proteinosis with or without fibrosing lung disease. *Am J Med Genet A* 126, 1, 18–26.
- [96] Wang, P., Chintagari, N. R., Narayanaperumal, J., Ayalew, S., Hartson, S., and Liu, L. 2008. Proteomic analysis of lamellar bodies isolated from rat lungs. *BMC Cell Biol* 9, 34.
- [97] Wang, W.-J., Russo, S. J., Mulugeta, S., and Beers, M. F. 2002. Biosynthesis of surfactant protein C (SP-C). Sorting of SP-C proprotein involves homomeric association via a signal anchor domain. *J Biol Chem* 277, 22, 19929–19937.
- [98] Warburton, D., Perin, L., Defilippo, R., Bellusci, S., Shi, W., and Driscoll, B. 2008. Stem/progenitor cells in lung development, injury repair, and regeneration. *Proc Am Thorac Soc* 5, 6, 703–706.
- [99] Weaver, T. E., Na, C.-L., and Stahlman, M. 2002. Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant. *Semin Cell Dev Biol* 13, 4, 263–270.
- [100] Weichert, N., Kaltenborn, E., Hector, A., Woischnik, M., Schams, A., Holzinger, A., Kern, S., and Griese, M. 2011. Some ABCA3 mutations elevate ER stress and initiate apoptosis of lung epithelial cells. *Respir Res* 12, 4.

- [101] Weiskirchen, R., Meurer, S. K., Gressner, O. A., Herrmann, J., Borkham-Kamphorst, E., and Gressner, A. M. 2009. BMP-7 as antagonist of organ fibrosis. *Front Biosci* 14, 4992–5012.
- [102] Welsch, U. 2006. *Sobotta Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie*. StudentConsult. Urban & Fischer in Elsevier, München [u.a.].
- [103] Whitsett, J. A. 2010. Review: The intersection of surfactant homeostasis and innate host defense of the lung: lessons from newborn infants. *Innate Immunity* 16, 3, 138–142.
- [104] Whitsett, J. A., Wert, S. E., and Weaver, T. E. 2010. Alveolar Surfactant Homeostasis and the Pathogenesis of Pulmonary Disease. *Annu. Rev. Med.* 61, 1, 105–119.
- [105] Whitsett, J. A., Wert, S. E., and Xu, Y. 2005. Genetic disorders of surfactant homeostasis. *Biol Neonate* 87, 4, 283–287.
- [106] Willander, H., Askarieh, G., Landreh, M., Westermark, P., Nordling, K., Keranen, H., Hermansson, E., Hamvas, A., Noguee, L. M., Bergman, T., Saenz, A., Casals, C., Aqvist, J., Jornvall, H., Berglund, H., Presto, J., Knight, S. D., and Johansson, J. 2012. High-resolution structure of a BRICHOS domain and its implications for anti-amyloid chaperone activity on lung surfactant protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 7, 2325–2329.
- [107] Willander, H., Hermansson, E., Johansson, J., and Presto, J. 2011. BRICHOS domain associated with lung fibrosis, dementia and cancer--a chaperone that prevents amyloid fibril formation? *FEBS J* 278, 20, 3893–3904.
- [108] Willander, H., Presto, J., Askarieh, G., Biverstal, H., Frohm, B., Knight, S. D., Johansson, J., and Linse, S. 2012. BRICHOS domains efficiently delay fibrillation of amyloid beta-peptide. *J Biol Chem* 287, 37, 31608–31617.
- [109] Willis, B. C., duBois, R. M., and Borok, Z. 2006. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proc Am Thorac Soc* 3, 4, 377–382.
- [110] Woischnik, M., Sparr, C., Kern, S., Thurm, T., Hector, A., Hartl, D., Liebisch, G., Mulugeta, S., Beers, M. F., Schmitz, G., and Griese, M. 2010. A non-BRICHOS surfactant protein c mutation disrupts epithelial cell function and intercellular signaling. *BMC Cell Biol* 11, 1, 88.
- [111] Yang, L., Johansson, J., Ridsdale, R., Willander, H., Fitzen, M., Akinbi, H. T., and Weaver, T. E. 2010. Surfactant protein B propeptide contains a saposin-like protein domain with antimicrobial activity at low pH. *J Immunol* 184, 2, 975–983.

- [112] Zarbock, R., Woischnik, M., Sparr, C., Thurm, T., Kern, S., Kaltenborn, E., Hector, A., Hartl, D., Liebisch, G., Schmitz, G., and Griese, M. 2012. The surfactant protein C mutation A116D alters cellular processing, stress tolerance, surfactant lipid composition, and immune cell activation. *BMC Pulm Med* 12, 1, 15.
- [113] Zeisberg, M., Hanai, J.-i., Sugimoto, H., Mammoto, T., Charytan, D., Strutz, F., and Kalluri, R. 2003. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 9, 7, 964–968.
- [114] Zeisberg, M. and Neilson, E. G. 2009. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest.* 119, 6, 1429–1437.
- [115] Zhong, Q., Zhou, B., Ann, D. K., Minoos, P., Liu, Y., Banfalvi, A., Krishnaveni, M. S., Dubourd, M., Demaio, L., Willis, B. C., Kim, K.-J., duBois, R. M., Crandall, E. D., Beers, M. F., and Borok, Z. 2011. Role of endoplasmic reticulum stress in epithelial-mesenchymal transition of alveolar epithelial cells: effects of misfolded surfactant protein. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45, 3, 498–509.
- [116] Zimmerman, U. J., Malek, S. K., Liu, L., and Li, H. L. 1999. Proteolysis of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 in alveolar epithelial type II cells. *IUBMB Life* 48, 4, 453–458.

Ein Teil der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse wurde in einem Fachjournal veröffentlicht:

**Thurm T**, Kaltenborn E, Kern S, Griese M, Zarbock R; 2013. SFTPC mutations cause SP-C degradation and aggregate formation without increasing ER stress. *Eur J Clin Invest* 2013, April 24.



## 7. Anhang

### 7.1. Ergänzende Daten: Messung der proSP-C mRNA Expression

Die Messung der mRNA-Expression von proSP-C in den zuvor stabil transfizierten Zellen wurde freundlicherweise von Dr. R. Zarbock durchgeführt.

Nach Inkubation der Zellen für 48 Stunden wurden die Gesamt-RNA mit dem High-Pure RNA Isolation Kit (Roche) entsprechend des Hersteller Protokolls gewonnen. Es wurde die RNA Konzentration mit einem NanoDrop Spektrophotometer bestimmt. Anschließend wurde mit Hilfe des QuantiTect transcription kit (Qiagen) ein Mikrogramm der RNA in cDNA umgeschrieben. Die relative Genexpression wurde mittels der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode bestimmt. Als *Housekeeping*-Gen diente *HPRT1*.

	WT	p.P30L	p.I73T	p.L110R	p.P115L	p.A116D	p.L188Q
<b>mRNA Expression (relativ)</b>	38898	13006	7999	11140	7939	2255	12515

Es fanden sich unterschiedliche Raten der mRNA Expression im WT und den SP-C Mutationen. In den WT Zellen konnte die höchste Expression gemessen werden. Eine schon deutlich geringere Rate wiesen p.P30L, p.L110R und p.L188Q auf. Die geringste Expression von SP-C mRNA fand sich in p.I73T, pP115L und p.A116D Zellen. Es muss hinzugefügt werden, dass durch die unterschiedlichen Expressionsraten die Versuchsergebnisse stets mit Vorsicht zu vergleichen sind. Unterschiede in den gemessenen Ergebnissen zwischen WT und SP-C Mutationen in den einzelnen Versuchen könnten teilweise auch durch die verschiedenen Mengen an exprimiertem proSP-C beeinflusst sein. So kommt erst durch die Berücksichtigung der mRNA Expressionsrate bei p.I73T und p.A116D der kumulative Effekt des mutierten Proteins besonders zur Geltung (siehe 3.5). In den Kapiteln 4.7 und 4.8. wurde bereits ein möglicher Zusammenhang zwischen der stabilen Expression von SP-C<sup>MUT</sup> und der Adaptation der betroffenen Zellen an chronischen ER-Stress diskutiert und somit eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen mRNA-Expressionsraten aufgezeigt.



## 7.2. Abkürzungsverzeichnis

BiP	Binding Immunoglobulin Protein
BMP-7	bone morphogenetic protein-7
DIP	Desquamative Interstitielle Pneumonie
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMT	Epitheliale – mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
HSP	Hitze-Schock-Protein
ILD	Interstitielle Lungenerkrankung ( <i>engl: interstitial lung disease</i> )
IPF	Idiopathische Pulmonale Fibrose
kDa	Molekulare Maßeinheit (Kilodalton)
LB	Lamellar-Körperchen ( <i>engl: lamellar body</i> )
LIP	Lymphozytenreiche Interstitielle Pneumonie
MET	Mesenchymal – epitheliale Transition
mSP-C	Reifes, endgültiges, SP-C
MVB	Multivesikulär-Körperchen ( <i>engl: multivesicular body</i> )
NSIP	Nichspezifische Interstitielle Pneumonie
PAP	Pulmonale Alveoläre Proteinose
proSP-C	Vorläufer Protein des Surfactant Protein C
proSP-C <sup>MUT</sup>	Mutiertes ProSP-C
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SFTPC	Surfactant Protein C Gen
SP	Surfactant Protein
SP-A	Surfactant Protein A
SP-B	Surfactant Protein B
SP-C	Surfactant Protein C
SP-D	Surfactant Protein D
TGF $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
TTF-1	thyroid transcription factor 1
UPR-System	unfolded protein response system
WT	Wildtyp

### 7.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Graphische Darstellung des Alveolarraums .....	8
Abbildung 2: TGF $\beta$ als ein zentraler Akteur in EMT .....	16
Abbildung 3: ProSP-C besteht aus vier intramolekularen Abschnitten .....	18
Abbildung 4: Modell der Prozessierung von proSP-C.....	20
Abbildung 5: Intrazellulärer Transport und Zirkulation von SP-C .....	21
Abbildung 6: Lokalisation der untersuchten Mutationen im proSP-C und mSP-C Molekül... 23	
Abbildung 7: Ergebnisse des MTT-Assays.....	40
Abbildung 8: Bestimmung der Sekretionsleistung mittels Luciferase-Assay .....	41
Abbildung 9: Intrazelluläres Verteilungsmuster von proSP-C.....	42
Abbildung 10: proSP-C Prozessierung aus Gesamtzellysaten .....	43
Abbildung 11: proSP-C Prozessierung nach Immunopräzipitation .....	43
Abbildung 12: ProSP-C <sup>I73T</sup> zeigt aberrante Banden bei sehr kurzen Belichtungszeiten.....	44
Abbildung 13: Aberrantes proSP-C <sup>I73T</sup> und proSP-C <sup>A116D</sup> akkumulieren intrazellulär .....	45
Abbildung 14: Untersuchung der ER-Lokalisation der verschiedenen proSP-C-Spezies.....	47
Abbildung 15: Quantifizierung der Lokalisation von proSP-C Spezies im LB .....	48
Abbildung 16: Untersuchung der Lokalisation der proSP-C-Spezies im LB.....	49
Abbildung 17: ProSP-C <sup>I73T</sup> und proSP-C <sup>A116D</sup> werden nicht über den SNARE-Komplex sezerniert.....	50
Abbildung 18: Quantifizierung der Expression von Calnexin in proSP-C Spezies.....	51
Abbildung 19: Quantifizierung der Expression von Lamp3 in proSP-C .....	52
Abbildung 20: Quantifizierung der Expression von SNAP23 in proSP-C Spezies.....	53
Abbildung 21: Einige proSP-C <sup>MUT</sup> führen zu intrazellulären, amyloidähnlichen Aggregaten. 54	
Abbildung 22: Auftreten von proSP-C <sup>MUT</sup> in Ubiquitin-positiven Vesikeln - Quantitative Darstellung.....	55
Abbildung 23: Auftreten von proSP-C <sup>MUT</sup> in Ubiquitin-positiven Vesikeln - Qualitative Darstellung.....	56
Abbildung 24: Verstärkte Ubiquitylierung von proSP-C-Formen bei p.I73T und p.P115L.. 57	
Abbildung 25: ProSP-C <sup>I73T</sup> und proSP-C <sup>A116D</sup> werden in die Plasmamembran eingebaut .....	58
Abbildung 26: ProSP-C <sup>WT</sup> unterliegt einer vermehrten Autophagie .....	59
Abbildung 27: Expression von BiP/GRP78 .....	60
Abbildung 28: Expression von Hsp90.....	61
Abbildung 29: Vorkommen von proSP-C <sup>WT</sup> und proSP-C <sup>MUT</sup> ohne ER-Arrest in BiP/GRP78	

positiven Vesikeln.....	62
Abbildung 30: Konzentration von TGF $\beta_1$ im Zellkulturüberstand.....	63
Abbildung 31: Unterschiedliches Verhaltensmuster der BRICHOS Mutationen .....	70

#### **7.4. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Überblick über die Surfactantproteine .....	10
Tabelle 2: Klassifikation derILD.....	11
Tabelle 3: Histologische Eckdaten häufiger kindlicher ILD .....	14
Tabelle 4: Überblick zu den für diese Arbeit ausgewählten proSP-C Mutationen .....	22
Tabelle 5: Anwendungsschemata verwendeter Antikörper im Fluoreszenzmikroskop.....	35
Tabelle 6: Anwendungsschemata der verwendeten Antikörper für Blot-Versuche.....	36
Tabelle 7: Überblick über die Ergebnisse.....	64

## 7.5. Lebenslauf

### Angaben zu Person:

Name: Tobias Stefan Thurm  
Geburtstag: 13.09.1985  
Geburtsort: Weimar  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## 7.6. Publikationsliste

Woischnik, M., Sparr, C., Kern, S., **Thurm, T.**, Hector, A., Hartl, D., Liebisch, G., Mulugeta, S., Beers, M. F., Schmitz, G., and Griese, M. 2010. A non-BRICHOS surfactant protein c mutation disrupts epithelial cell function and intercellular signaling.

*BMC Cell Biol* 2011, 1, 88.

Zarbock, R., Woischnik, M., Sparr, C., **Thurm, T.**, Kern, S., Kaltenborn, E., Hector, A., Hartl, D., Liebisch, G., Schmitz, G., and Griese, M. 2012. The surfactant protein C mutation A116D alters cellular processing, stress tolerance, surfactant lipid composition, and immune cell activation.

*BMC Pulm Med* 12, 1, 15.

**Thurm T**, Kaltenborn E, Kern S, Griese M, Zarbock R; 2013. SFTPC mutations cause SP-C degradation and aggregate formation without increasing ER stress.

*Eur J Clin Invest* 2013, April 24.

## 8. Danksagung

Bedanken möchte ich mich zunächst bei der ärztlichen Direktion des Haunerschen Kinderspitals, Herrn Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. C. Klein und seinem Vorgänger Prof. Dr. med. Dr. h. c. D. Reinhardt, für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit an ihrer Klinik. Auch an den Leiter der Forschungseinrichtung des Haunerschen Kinderspitals „KUBUS“, Herrn Prof. Dr. med. A. Roscher richtet sich mein Dank.

Der Fakultät Humanmedizin an der LMU München danke ich für die Einrichtung des Promotionsstudiengangs „Molekulare Medizin“ mit dem Förderprogramm Forschung und Lehre (FöFoLe), im Rahmen dessen diese Arbeit erst entstehen konnte.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. M. Griese danke ich sehr herzlich für die Überlassung dieses sehr interessanten und herausfordernden Dissertationsthemas. Er war mir stets ein kritischer und konstruktiver Gesprächspartner. Er brachte viele neue und vor allem wichtige Impulse im Verlauf der Arbeit ein. Sehr zu schätzen wusste ich den persönlichen und respektvollen Umgang miteinander. Die gewährte Möglichkeit des selbstständigen Arbeitens und der relativ freien Zeiteinteilung ermöglichten es mir, diese Dissertation während des regulären Studiums durchzuführen.

Ein besonders herzlicher Dank geht an meine beiden unmittelbaren Betreuer Dr. rer. nat. S. Kern und Dr. rer. nat. R. Zarbock. Mit beiden ist im Laufe der gemeinsamen Zeit ein herzliches und vertrauensvolles Verhältnis entstanden. Die Möglichkeit, Experimente selbst zu gestalten und weiterzuentwickeln hat den besonderen Reiz dieser Arbeit ausgemacht. Herrn Dr. med. R. Zarbock möchte ich im Besonderen für die stets gute Zusammenarbeit bei der Publikation der Dissertationsergebnisse danken und die schnelle und überaus produktive Überarbeitung der Dissertationsschrift.

Den Mitgliedern der AG Griese danke ich für viele unterhaltsame Stunden im Labor und der allzeit vorhandenen Hilfsbereitschaft bei entstandenen Problemen. Ein besonderer Dank richtet sich an Dr. rer. nat. E. Kaltenborn, die mir gerade in der Anfangszeit in vielen praktischen Dingen mit Rat und Tat zu Seite stand und sich stets für Fragen Zeit genommen hat.

Meiner Familie danke ich für die in den ganzen Jahren bestehende Unterstützung und die oft kritische Auseinandersetzung mit meinen Ideen und Vorstellungen.

Mein herzlichster und innigster Dank gebührt meiner lieben Freundin Vanessa Leistner, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre. Sie hat oft lange und geduldig ausgeharrt, bis ich müde aus dem Labor kam und hat mich mit ihrer liebevollen Art mehr als einmal mental wieder aufgebaut und neu motiviert, wenn die Experimente scheiterten oder neu überarbeitet werden mussten.





---

Erklärung:

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, und die verwendeten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und ich die Stellen der Arbeit einschließlich Tabellen und Abbildungen, die anderen Werken im Wortlaut oder Sinn nach entnommen wurden, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe. Ferner bestätige ich, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegt hat und dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt.

Tobias Thurm