

Institut für medizinische Physik und Biophysik



[PDF-Version]

DISSERTATION

Untersuchungen zur Wechselwirkung von Surfactant Protein A mit Liposomen

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin

Dipl.- Biochem. Astrid Meyboom

Prof. Dr. Jürgen P. Rabe

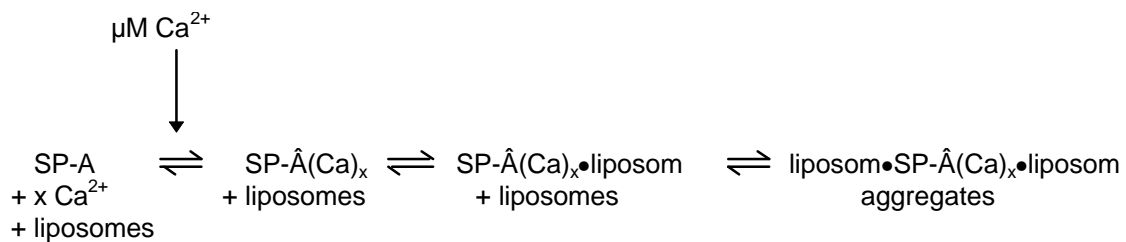
Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. Klaus-Peter Hofmann
 2. Prof. Dr. rer. nat. Andreas Herrmann
 3. Prof. Dr. rer. nat. Hansjoachim Galla

eingereicht: 22. Oktober 1998

Datum der Promotion: 25. Februar 1999

Abstract

Surfactant protein A (SP-A) is crucial for lung function, including tubular myelin formation and lipid uptake by type II pneumocytes. Known properties of SP-A in vitro are its Ca^{2+} dependent interaction with phospholipids and its role in the aggregation of liposomes. To dissect and to analyze these processes, the SP-A was immobilized and liposome binding was measured by resonant mirror technique. Liposome aggregation was followed separately by kinetic light scattering in suspensions. It was found that SP-A mediated binding and aggregation of liposomes depend on micromolar calcium concentrations in the range of $< 20 \mu\text{M}$, independent of the species (sheep, rat or cow) and of the phospholipid composition tested. The interaction between SP-A and liposomes shows cooperativity and reversibility. Liposomes dissociate from SP-A in $< 0.3 \text{ s}$ whereas disaggregation takes approx. 30 s. The interpretation of the results leads to a rapid and reversible reaction of three reactions: a cooperative Ca^{2+} dependent conformational change in SP-A, binding of Ca^{2+} -bound SP-A to liposomes, and aggregation of the Ca^{2+} /SP-A - bound liposomes.



With palmitoylcholine (POPC), the complex formation proceeds two fold slower compared to DPPC, leading to a lower final equilibrium level of SP-A/lipid interaction. Regarding the phospholipid headgroups, phosphatidylinositol (PI) and sphingomyelin (SM) interact comparable to PC, while less interaction is seen with phosphatidylethanolamine (PE) or phosphatidylserine (PS) or with phosphatidylglycerol (PG). Thus, both headgroup and fatty acid composition determine SP-A/phospholipid interaction. However, the protein has no high specificity, neither for the polar nor for the apolar moiety of phospholipids.

Keywords: Surfactant protein A, liposomes, light scattering, resonant mirror spectroscopy, biosensor

Zusammenfassung

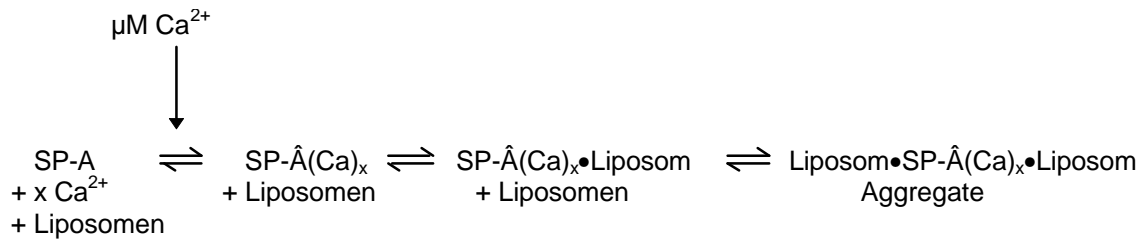
Die Lungen werden von einem oberflächenaktiven Gemisch, dem Surfactant ausgekleidet, das für die Regulation der Oberflächenspannung der Alveolen und die Immunabwehr der Lunge von Bedeutung ist. Bestandteile des Surfactants sind zu 90% Lipide und zu 10% vier durchalphabetisierte Surfactantproteine A bis D, von denen SP-A das mengenmäßig häufigste darstellt. Die Funktionen dieses Proteins liegen vermutlich in der Surfactanthomöostase und dabei im Phospholipid-Turnover der Hauptkomponente des Surfactants Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) und als Kollektin in der Immunabwehr. *In vitro* ist die SP-A induzierte, calciumabhängige Liposomenaggregation eine charakteristische Eigenschaft des Proteins.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wechselwirkung von SP-A mit Phospholipidliposomen mit der Resonant Mirror Spektroskopie und der Nah-Infrarot-Lichtstreuung untersucht. Durch den vergleichenden Einsatz der kinetischen Methoden ist es möglich, die Bindung von SP-A an Liposomen von der Aggregationsreaktion zu unterscheiden. Es konnte erstmals gezeigt werden, daß beide Reaktionen von mikromolaren Calciumkonzentrationen abhängig sind, die halbmaximale Reaktion erfolgt bei freien Calciumkonzentrationen $< 20 \mu\text{M}$. Die Ca^{2+} -induzierte Interaktion zwischen SP-A und Liposomen zeigt eine hohe Kooperativität und ist durch Zugabe von Calciumchelatoren reversibel. Die Dissoziation der Liposomenbindung erfolgt schneller als der Zerfall der Aggregate (0,3 s vs. 30 s).

Es sind zwei Konformationen des SP-A zu unterscheiden, eine lipidbindende Form in Gegenwart von Calcium und eine nichtbindende Form. Neben Calcium können auch mikromolare Strontium- und Bariumkonzentrationen die Konformationsänderung induzieren, Magnesium hingegen nicht. Die Liposomenbindung und nachfolgende Aggregation erfolgt bei SP-A von Rind, Ratte und Schaf in gleicher Weise in Abhängigkeit von mikromolaren Calciumkonzentrationen. Die Bindungseigenschaften des SP-A zeigen eine Abhängigkeit von der Art des verwendeten Phospholipids. Dabei zeigt sich eine „Affinität“, im Sinne einer verstärkten Wechselwirkung mit DPPC, aber die postulierte Spezifität wurde in der kinetischen Analyse nicht bestätigt. SP-A interagiert bevorzugt mit Phospholipiden, die langkettige, gesättigte Fettsäureseitenketten besitzen (DPPC, Distearoylphosphatidylcholin), sowie mit Phosphatidylcholin und ähnlichen Kopfgruppen (Sphingomyelin, Phosphatidylinositol). Da neben den Kopfgruppen auch die Seitenketten bei der Erkennung durch das

Protein bedeutsam sind, liegt nahe, daß die Packungsdichte der Lipidmoleküle in den Liposomen für die Interaktion wichtig ist.

Die Ergebnisse werden als reversible, sequentielle Reaktionsfolge interpretiert:



Diese ist ein Modell für die mögliche Wirkung von SP-A bei der Surfactanthomöostase, indem das Protein als Lipidtransporter zwischen alveolärer Hypophase und Typ-II-Pneumozyten funktioniert und erklärt, wie SP-A und Liposomen gemeinsam in die Zelle aufgenommen und auf unterschiedlichen Wegen wieder ausgeschleust werden könnten.

Schlagwörter: Surfactant Protein A, Liposomen, Lichtstreuung, Resonant Mirror Spektroskopie, Biosensor

Inhalt

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 7 |
| 2 | Grundlagen | 8 |
| 2.1 | Lungensurfactant | 8 |
| 2.1.1 | Bedeutung des Surfactants | 8 |
| 2.1.2 | Entwicklung der Lungensurfactant-Forschung | 8 |
| 2.1.3 | Biochemie und Funktion des Surfactants | 9 |
| 2.2 | Struktur und Aufgaben der Surfactantproteine | 12 |
| 2.2.1 | Hydrophobe Surfactantproteine | 12 |
| 2.2.1.1 | SP-B | 12 |
| 2.2.1.2 | SP-C | 13 |
| 2.2.2 | Hydrophile Surfactantproteine | 13 |
| 2.2.2.1 | SP-D | 13 |
| 2.2.2.2 | SP-A | 14 |
| 2.3 | Ziele der Arbeit | 20 |
| 3 | Material und Methoden | 22 |
| 3.1 | Präparationen | 22 |
| 3.1.1 | Surfactantpräparation | 22 |
| 3.1.2 | SP-A - Präparation | 23 |
| 3.1.3 | Präparation von Liposomen | 25 |
| 3.2 | Methoden | 28 |
| 3.2.1 | Photometrischer Aggregationstest | 28 |
| 3.2.2 | Kinetische Lichtstreuung | 29 |
| 3.2.2.1 | Meßprinzip | 29 |
| 3.2.2.2 | Apparativer Aufbau | 29 |
| 3.2.2.3 | Versuchsdurchführung | 30 |
| 3.2.2.4 | Caged Calcium | 31 |
| 3.2.3 | Resonant Mirror Spektroskopie | 31 |
| 3.2.3.1 | Meßprinzip | 32 |
| 3.2.3.2 | Versuchsdurchführung | 33 |
| 3.3 | Methodenapplikation | 36 |
| 3.3.1 | Kinetische Lichtstreuung | 37 |
| 3.3.2 | Resonant Mirror Spektroskopie | 37 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4 | <i>Ergebnisse</i> | 43 |
| 4.1 | Calciumabhängigkeit der Interaktion zwischen SP-A und Liposomen | 43 |
| 4.1.1 | Messungen mit Resonant Mirror Spektroskopie | 43 |
| 4.1.2 | Kinetische Lichtstreuung | 45 |
| 4.1.3 | Einfluß der Calciumkonzentration | 46 |
| 4.1.4 | Reaktion mit anderen zweiwertigen Kationen | 52 |
| 4.1.5 | Beeinflussung der Reaktion durch Reduktionsmittel | 53 |
| 4.2 | Die Geschwindigkeit der Reaktion zwischen SP-A und Liposomen | 54 |
| 4.3 | Variation der SP-A-Konzentration | 56 |
| 4.4 | Einfluß der Lipidkonzentration | 60 |
| 4.4.1 | Messungen mit kinetischer Lichtstreuung | 60 |
| 4.4.2 | Messungen mit Resonant Mirror Spektroskopie | 63 |
| 4.5 | Reaktion von SP-A mit verschiedenen Phospholipiden | 68 |
| 4.5.1 | Vergleich zwischen DPPC und POPC | 68 |
| 4.5.2 | Die Interaktion mit verschiedenen Phosphatidylcholinen | 70 |
| 4.5.3 | Bedeutung der Kopfgruppe der Phospholipide | 73 |
| 4.6 | Interaktion zwischen SP-A und Liposomen bei 37 °C | 75 |
| 5 | <i>Diskussion</i> | 79 |
| 5.1 | Methodenapplikation | 79 |
| 5.2 | Calciumabhängigkeit der Interaktion zwischen SP-A und Liposomen | 80 |
| 5.3 | Geschwindigkeit der Reaktion zwischen Calcium und Liposomen | 83 |
| 5.4 | Variation der SP-A-Konzentration | 84 |
| 5.5 | Einfluß der Lipidkonzentration | 85 |
| 5.6 | Reaktion von SP-A mit verschiedenen Phospholipiden | 86 |
| 5.7 | Temperaturabhängigkeit der Reaktion | 89 |
| 5.8 | Lokalisation der Lipidbindung am SP-A-Molekül | 91 |
| 5.9 | Physiologische Folgerungen | 93 |
| 5.10 | Hypothese | 96 |
| 5.11 | Ausblick | 97 |

1 Einleitung

Die Atmung des Menschen, im Ruhezustand etwa zwölf Atemzüge pro Minute, ist eine lebensnotwendige Funktion. Deren Aufrechterhaltung erfordert viele verschiedene Faktoren. Eine physiologisch wichtige Komponente der Atemfunktion ist ein oberflächenaktives Gemisch aus Lipiden und Proteinen, das die innere Oberfläche der Lungen auskleidet und ihr Zusammenfallen verhindert. Dieses Gemisch wird als Surfactant bezeichnet, eine aus dem Englischen übernommene Abkürzung von *surface active agent* (oberflächenaktiver Stoff).

Die Bestandteile des Surfactants werden von den alveolären Typ-II-Pneumozyten (Lungenzellen) gebildet, in speziellen Organellen, den Lamellarkörpern, gespeichert und nach Bedarf in die Alveolen sezerniert. Neben der Senkung der Oberflächenspannung erfüllt das Surfactant auch Funktionen bei der Immunabwehr der Lunge.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht das Surfactantprotein A (SP-A), das unter den vier spezifischen Surfactantproteinen (durchalphabetisiert von SP-A bis SP-D) das mengenmäßig häufigste ist. Den Hauptbestandteil des Surfactants bilden Phospholipide (> 80%), deren Interaktion mit SP-A analysiert wurde.

In der Lunge ist SP-A stets mit Phospholipiden assoziiert; *in vitro* können Interaktionen zwischen SP-A und Liposomen gemessen werden. Dazu verwendet man ein vereinfachtes, rekonstituiertes System, um die ablaufenden Prozesse in Abhängigkeit verschiedener Faktoren zu analysieren und Kausalbeziehungen aufzustellen. Der methodische Schwerpunkt der hier vorgelegten Arbeit liegt im vergleichenden Einsatz der Resonant Mirror Spektroskopie und der kinetischen Lichtstreuung zur detaillierten Untersuchung der SP-A/Liposomen-Interaktion.

Von einer genauen Kenntnis der im Surfactant ablaufenden molekularen Prozesse ist langfristig ein Beitrag zur Entwicklung wirksamer und spezifischer Therapien von Atemstörungen zu erhoffen.

Um die Thematik zu veranschaulichen, beginnt die Darstellung mit einem Überblick über die Bestandteile des Surfactantsystems und deren funktionelle Bedeutung. Daran schließt sich eine Beschreibung der verwendeten Methoden an. Nachfolgend werden die Ergebnisse dargestellt und in der Diskussion interpretiert.

2 Grundlagen

2.1 Lungensurfactant

2.1.1 Bedeutung des Surfactants

Die Lunge des Menschen besteht aus etwa 300 Millionen miteinander verbundener Alveolen. Diese haben einen Durchmesser von je 0,2 mm bis 0,3 mm und bilden so eine Gesamtoberfläche von etwa 80 m². Die zur Atmung notwendige Flexibilität und Stabilität dieser großen Oberfläche wird einerseits durch die Eigenschaften des Lungengewebes, andererseits durch die Auskleidung der Alveolen mit einer oberflächenaktiven Schicht, dem Surfactant, gewährleistet. Das Surfactant erleichtert die Entfaltung der Lunge und stabilisiert die Alveolen bei der Ausatmung, indem es die Oberflächenspannung im Vergleich zu einer reinen Luft-Wasser-Grenzfläche auf etwa ein Zehntel reduziert. An der Luft-Wasser-Grenzfläche bildet sich -so die Modellvorstellung- aus der Surfactantschicht ein Phospholipid-Monolayer, der im Wechsel von Ein- und Ausatmung expandiert und komprimiert wird und die Oberflächenspannung dynamisch verändert. Dadurch sinkt das Risiko des Kollabierens kleiner Alveolen, die nach dem Gesetz von Laplace $p=2\gamma/r$ (γ : Oberflächenspannung, r : Radius) bei gleicher Oberflächenspannung einen höheren Innendruck besitzen als Alveolen mit größerem Radius. Daneben schützt das Surfactant die Zellen des Lungengewebes vor dem Austrocknen und ist an der Infektabwehr, am Sekrettransport, sowie am Schutz vor Sauerstoffradikalen beteiligt (1), (2), (3).

2.1.2 Entwicklung der Lungensurfactant-Forschung

Die erste Mitteilung zur Existenz eines oberflächenaktiven Stoffes in der Lunge wurde durch Kurt von Neergaard veröffentlicht (4). Seine Untersuchungen zeigen, daß der Druck, welcher für das Füllen der Lunge mit Luft benötigt wird, größer ist, als der für das Füllen mit Wasser. Eine Erklärung seiner Ergebnisse sah von Neergard in der Stabilisierung der Alveolen durch die Erniedrigung der hohen Oberflächenspannung an der Luft-Alveolen-Grenzfläche.

Allerdings blieben diese frühen Erkenntnisse lange Zeit unberücksichtigt, bis Pattle und Clements in der Lunge Faktoren entdeckten, welche die Oberflächenspannung reduzieren (1), (5). Diese wurden bereits im Jahr 1946 durch Thannhauser als atelektatische Faktoren bezeichnet. Thannhauser bemerkte den ungewöhnlich hohen Gehalt des Lungengewebes an Dipalmityllecithin (heutige Nomenklatur: Dipalmitoylphosphatidylcholin, DPPC), erkannte aber nicht dessen funktionelle Bedeutung (6). Die Arbeitsgruppe von Clements zeigte, daß aus Rinderlungen isolierte Phospholipidfraktionen die Oberflächenspannung herabsetzen und daß vergleichbare Effekte auch mit synthetischem DPPC zu erzielen sind (7). Nach der Entdeckung der Surfactantproteine in den siebziger Jahren (8) wurde die Erforschung der Wechselwirkungen zwischen Phospholipiden und Proteinen des Surfactants Gegenstand vieler Untersuchungen, die bis heute aktuell sind.

Die medizinische Bedeutung des Surfactantmangels, der zum Atemnotsyndrom bei Frühgeborenen führt, zeigten Avery und Mead (9). Eine erfolgreiche Therapie durch Applikation eines künstlichen Surfactants gelang erstmals 1980 (10). Seitdem werden Surfactanersatzstoffe als Therapeutika ständig verbessert, wobei Erkenntnisse über Komponenten und deren Zusammenspiel im natürlichen Surfactant bei der Entwicklung von Nutzen sind.

2.1.3 Biochemie und Funktion des Surfactants

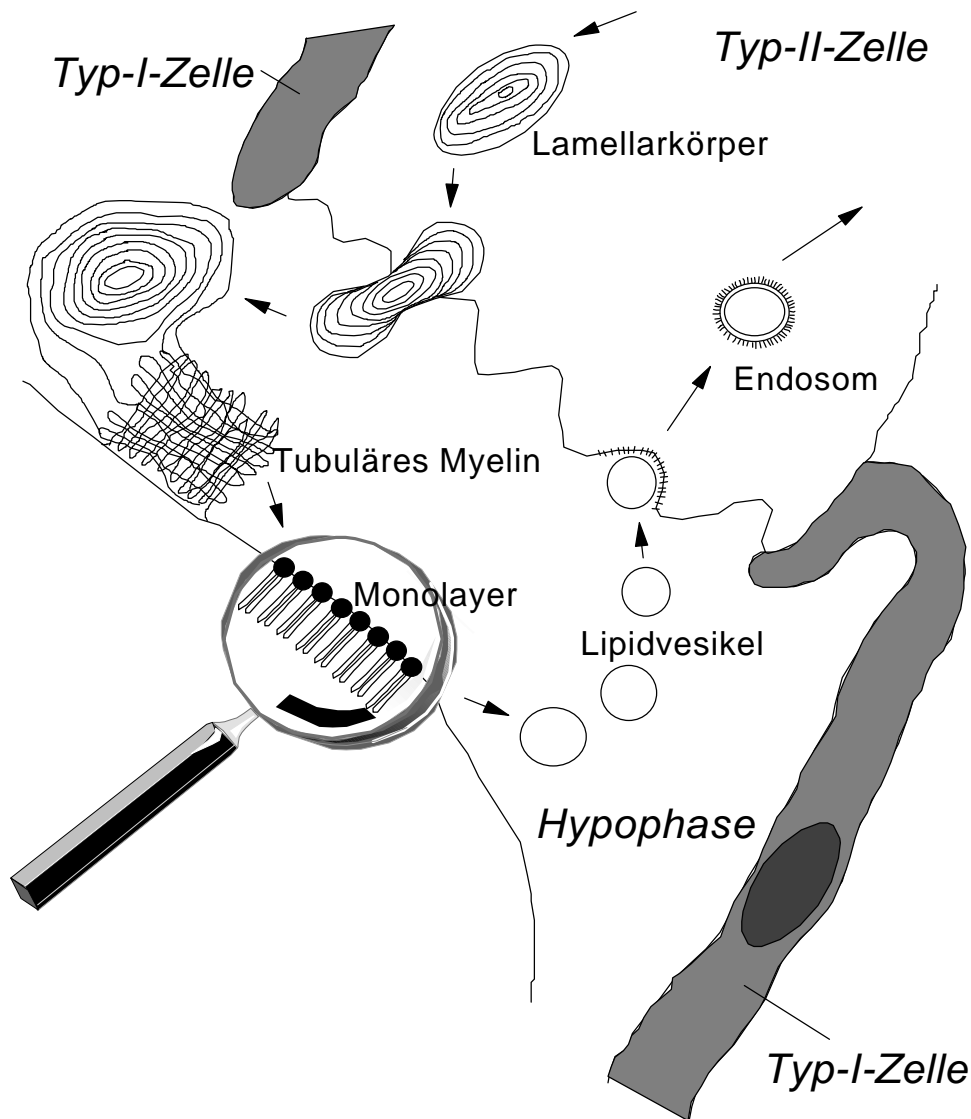
Surfactant wird von den Typ-II-Zellen der Lunge (Typ-II-Pneumozyten) synthetisiert und in den Alveolarraum sezerniert. Daher unterscheidet man zwischen intrazellulärem Surfactant, das in Speicher- und Abbauformen in den Typ-II-Pneumozyten vorkommt, und extrazellulärem Surfactant im Alveolarraum. Letzteres kann durch Waschen der Lunge mit gepufferten, salzhaltigen Lösungen -im Vergleich zu intrazellulärem Surfactant- einfach präpariert werden. Daher beziehen sich Angaben über die Zusammensetzung von Surfactant häufig auf extrazelluläres Surfactant. Dieses ist biochemisch gesehen eine Emulsion aus Lipiden (90%), Proteinen (8%) und Kohlenhydraten, die an Proteine und Lipide kovalent gebunden sind (2%). Die Lipide des Surfactants setzen sich wiederum zu etwa 90% aus Phospholipiden zusammen. Daneben kommen -in abnehmender Reihenfolge-

Cholesterin, Triacylglycerol und freie Fettsäuren vor. Etwa 70% - 80% der Phospholipide sind Phosphatidylcholine, davon mehr als die Hälfte das gesättigte Dipalmitoylphosphatidylcholin. Zwischen den Spezies sind die Unterschiede in der Lipidzusammensetzung des Surfactants gering. Bei wechselwarmen Reptilien verändert sich der Cholesteringehalt mit der Körpertemperatur. Eine niedrige Temperatur wird durch einen höheren Gehalt an Cholesterin ausgeglichen (11).

Die Phospholipide verursachen die Oberflächenaktivität des Surfactants. Deren hydrophobe Acylketten sind an der Luft-Wasser-Grenzfläche in die apolare Luftumgebung gerichtet, so daß die polaren Kopfgruppen mit der wäßrigen Umgebung wechselwirken. Durch den hohen Gehalt an DPPC bildet sich -so die Modellvorstellung- während der Kompressionsphase der Ausatmung ein geordneter, rigider Monolayer, der die Oberflächenspannung herabsetzt (d.h. den Oberflächendruck erhöht). Dies führt dazu, daß fluidere, z.B. ungesättigte Phospholipidkomponenten, die dem hohen Oberflächendruck ausweichen, aus dem Monolayer verdrängt werden (*squeeze out*) (12). *In vitro* konnte ein solcher Effekt anhand der Verdrängung von ungesättigtem Phosphatidylglycerol (PG) aus binären Mischungen mit DPPC gezeigt werden (13).

Die in der Lunge vorliegenden Strukturen sind um ein Vielfaches komplexer, obwohl das Modell eines Monolayers an der Luft-Wasser-Grenzfläche die Senkung der Oberflächenspannung plausibel und in *in vitro* Versuchen kontrollierbar macht. Elektronenmikroskopische Aufnahmen und Messungen der Oberflächenaktivität vermitteln ein Bild von mehreren Lipidschichten, die mit der Oberfläche wechselwirken (14). Bevor die Phospholipide den Kontakt zwischen der Luft-Wasser-Grenzfläche bilden, der vereinfacht als Monolayer dargestellt werden kann, durchlaufen sie verschiedene morphologische Strukturen (Abbildung 2.1).

Surfactant wird von den Typ-II-Pneumozyten der Lunge produziert und intrazellulär in dichten, multilamellaren Vesikeln, den sog. Lamellarkörpern gespeichert. Die Lamellarkörper werden in den Alveolarraum ausgeschleust und dort in eine gitterartige, aus Lipiddoppelschichten bestehende Struktur umgewandelt, die als tubuläres Myelin bezeichnet wird. Tubuläres Myelin ist Hauptreservoir für das intraalveoläre Surfactant und möglicherweise auch Ausgangsstruktur für den alveolären Monolayer. Für diesen könnten allerdings auch andere intraalveoläre



Membranstrukturen verantwortlich sein, da SP-A *knock-out* Mäuse, die aufgrund des so erzeugten Gendefektes keine tubulären Myelinstrukturen bilden können, normal atmen (15). Der Turnover des alveolären Monolayers erfolgt relativ schnell (ca. 4 h). Lipide werden wahrscheinlich in Form unilamellarer Vesikel wieder in die Zellen aufgenommen und rezykliert (16) oder von Alveolarmakrophagen abgebaut (17).

Abbildung 2.1: Lipidstrukturen pulmonalen Surfactants

An der Bildung und Veränderung der komplexen Lipidstrukturen sind auch die Surfactantproteine beteiligt. Die im Surfactant vorkommenden Proteine wurden von SP-A bis SP-D durchalphabetisiert und lassen sich in zwei Gruppen gliedern: Die hydrophoben Surfactantproteine B und C sowie die hydrophilen Surfactantproteine D und A (18).

Außer Surfactantprotein C, einem ausschließlich in der Lunge lokalisierten Protein (19), konnten alle Surfactantproteine auch in anderen Geweben nachgewiesen werden, z.B. im Gastrointestinaltrakt (20), (21).

2.2 Struktur und Aufgaben der Surfactantproteine

2.2.1 Hydrophobe Surfactantproteine

Die hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C wurden von Phizackerley und Mitarbeitern entdeckt (22). Bemerkenswert ist, daß sich diese Proteine nur in organischen Lösungsmitteln wie Chloroform/Methanol oder Ethanol/Äther lösen, nicht aber in Wasser. Diese extreme Hydrophobizität erfordert posttranslationale Modifikationen der intrazellulären Vorstufen, um eine Synthese in Typ-II-Zellen zu ermöglichen (23).

2.2.1.1 SP-B

SP-B ist ein kleines, hydrophobes Surfactantprotein aus 79 Aminosäuren, das zahlreiche Cysteine enthält (24). Diese stabilisieren durch eine intermolekulare und drei intramolekulare Disulfidbrücken das SP-B Dimer (25), (26). Die Sekundärstruktur ist vorwiegend α -helikal (27), (28), (29), wobei die Helices einen amphipatischen Charakter aufweisen.

Die wichtigste Funktion von SP-B ist die Wechselwirkung mit dem Lipidmonolayer an der Lungenoberfläche. SP-B führt zur Insertion und zum Einbau von Lipiden in den Oberflächenfilm und stabilisiert diesen (30), (31), (32). Bei der Ausatmung wird die Oberfläche verkleinert und der Oberflächendruck erhöht sich. Dadurch wird SP-B mit 2-3 Lipidmolekülen aus dem Oberflächenfilm herausgedrückt (33). Bei der folgenden Einatmung katalysiert SP-B die Aufnahme von Phospholipiden in den Monolayer (34). Die Bedeutung von SP-B zeigt sich in natürlich vorkommenden Mutationen des SP-B-Moleküls, die zu schweren Atemfunktionsstörungen mit Todesfolge führen (35), (36). Daneben ist SP-B, im Zusammenwirken mit SP-A, an der Ausbildung tubulärer

Myelinstrukturen beteiligt (37) und beeinflusst die Ordnung in Phospholipidbilagern (38), (39).

2.2.1.2 SP-C

SP-C ist mit nur 35 Aminosäuren das kleinste der Surfactantproteine. 2/3 des Proteins bilden eine reguläre α -Helix mit zahlreichen Valinresten, die extrem hydrophob ist und einen Monolayer durchspannen kann (40), (41). Die Acylierung zweier benachbarter Cysteinreste mit Palmitinsäure erhöht den hydrophoben Charakter des Proteins und orientiert SP-C annähernd parallel zur Membran (42).

Im Surfactant findet man sowohl monomere als auch dimere Formen. Es ist allerdings unklar, ob diese funktionell unterschiedlich sind. Ähnlich wie bei SP-B liegen auch die Funktionen des SP-C in der Interaktion mit Lipidschichten. SP-C beschleunigt die Aufnahme von Phospholipiden in den Monolayer (43) und beeinflusst die Ordnung der Phospholipide in Lipidschichten (44).

2.2.2 Hydrophile Surfactantproteine

Die hydrophilen Surfactantproteine A und D unterscheiden sich grundlegend von den zuvor beschriebenen hydrophoben Surfactantproteinen. Bei beiden handelt es sich um große, glykosylierte, multimere, wasserlösliche Proteine, die in die Untergruppe der C-Typ-Lektine (Collektine) eingeordnet werden. SP-A und SP-D besitzen in ihren Untereinheiten einen ähnlichen Aufbau bestehend aus einer carboxyterminalen Kohlenhydraterkennungsregion (*carbohydrate recognition domain*, CRD) (45), einer Übergangsregion, einer aminoterminalen collagenartigen Domäne und einer kurzen aminoterminalen Sequenz.

2.2.2.1 SP-D

Der Nomenklatur zufolge ist SP-D ein Surfactantprotein. Im Gegensatz zu den übrigen Proteinen dieser Gruppe ist es bei der Aufreinigung überwiegend in der Lavage gelöst und nur zu 10% mit den anderen Surfactantproteinen an Lipide gebunden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen des SP-D Holoproteins mit einem Molekulargewicht von 630 kD zeigen eine regelmäßige Tertiärstruktur in Form eines Kreuzes, die dem Conglutinin ähnelt (46). SP-D besteht aus 12 Untereinheiten, die in vier Trimeren arrangiert sind. Das Molekulargewicht liegt bei 630 kD.

Bisher wurde eine sehr spezifische Interaktion von SP-D mit Lipiden, in Form der calciumabhängigen Bindung von Phosphatidylinositol (PI) nachgewiesen (47), (48). Etwa 3% der Surfactantlipide sind Phosphatidylinositole. Die Beteiligung von SP-D an der Surfactantregulation zeigt sich in SP-D *knock-out* Mäusen, bei denen es im Erwachsenenalter zu einer Anhäufung von Phospholipiden in der Lunge und zu Veränderungen an Typ-II-Zellen und Makrophagen kommt.

Außerdem ist SP-D an der Immunabwehr beteiligt. SP-D bindet an die Lipopolysaccharidoberflächen zahlreicher Bakterien und hat durch seine vier voneinander entfernten Bindungsstellen, die durch je drei CRD-Regionen gebildet werden, eine ideale Form für die Agglutination von Bakterien (49). Außerdem bindet SP-D mit hoher Affinität an Makrophagen und induziert dadurch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen (50), (51).

2.2.2.2 SP-A

Das bei weitem häufigste Surfactantprotein ist SP-A, das als erstes Surfactantprotein gereinigt (8) und dessen Primärstruktur bestimmt wurde (52). Die Gene für SP-A liegen beim Menschen auf dem langen Arm des Chromosoms 10 (53). Für die Bildung eines stabilen SP-A Moleküls werden wahrscheinlich die Produkte zweier humaner SP-A Gene benötigt (54). Humane SP-A RNA codiert eine Untereinheit mit 248 Aminosäuren (52), in der vier verschiedene Domänen zu unterscheiden sind (Abbildung 2.2):

1. eine aminoternale Region mit einem Cysteinrest, durch den eine Disulfidbrücke gebildet wird, die für die Struktur des oligomeren Proteins von Bedeutung ist (55).
2. eine collagenartige Domäne mit sich wiederholender Gly-X-Y - Sequenz, die bei einigen Spezies ebenfalls einen Cysteinrest enthält, der an der Bildung von Disulfidbrücken beteiligt ist. Beide Strukturelemente sind für die korrekte Zusammenlagerung des aus 18 Untereinheiten bestehenden nativen Proteins entscheidend.
3. eine "Übergangs-" oder "Nacken-" Region, die aus einer kurzen Sequenz hydrophober Aminosäuren und aus einer amphipatischen Helix besteht. Möglicherweise befindet sich in diesem Abschnitt eine Lipidbindungsstelle (56).

4. eine C-terminale kohlenhydraterkennende Stelle. Diese zeigt sowohl eine strukturelle als auch eine funktionelle Ähnlichkeit mit der Gruppe der C-Typ Lektine, die Glykolipide und -proteine calciumabhängig binden (45). Die Struktur der CRD-Region wird durch zwei intramolekulare Disulfidbrücken gewährleistet, die einen größeren und einen kleineren Loop bilden (57).

Die beschriebene Struktur der SP-A Untereinheit ist speziesunabhängig und weist starke Ähnlichkeit zum Mannose bindenden Protein (MBP), einem weiteren C-Typ-Lektin, auf (58). Die makromolekulare Organisation des SP-A ähnelt der des Komplementproteins C1q. Beide Moleküle bestehen aus sechs Trimeren, die sich zu einer blumenstraußartigen Struktur zusammenlagern (Abbildung 2.2). Beim SP-A sind jeweils drei monomere Untereinheiten über Disulfidbrücken und die Bildung einer collagenartigen Tripelhelix durch die collagenartigen Domänen zu einem Trimer verknüpft. Die sechs Helices bilden den etwa 20 nm langen „Stiel“ des SP-A Moleküls. Jedes Trimer besitzt einen flexiblen Knick, der auf einer Unterbrechung der collagenartigen Struktur zwischen dem 13. und dem 14. Aminosäuretriplett beruht. Nach dieser Unterbrechung sind die Trimere nicht mehr nebeneinander angeordnet, sondern weisen seitlich in sechs Richtungen von der Zentralachse weg.

Monomer

Oligomer

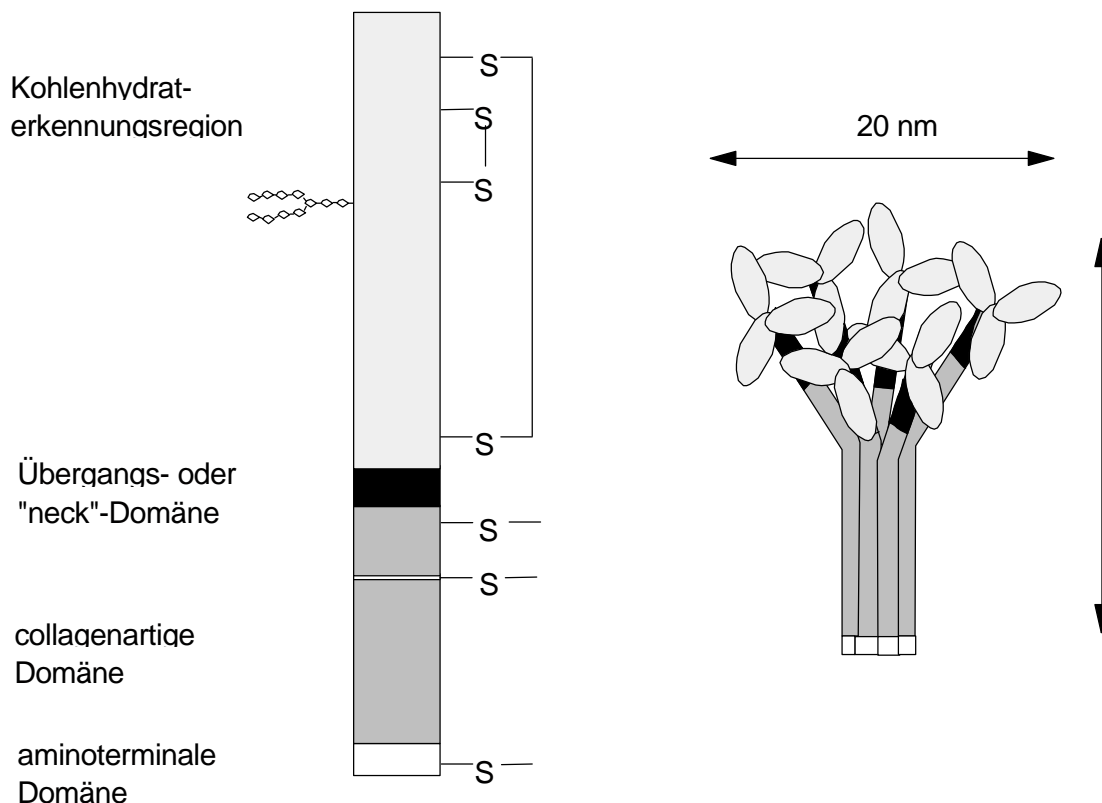


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines SP-A Moleküls

Diese Modellvorstellung wird durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt (59). Computermodelle, die anhand von Informationen aus der Kristallstruktur des MBP simuliert werden können, zeigen die drei CRD-Regionen der Trimere als weitgehend eigenständige Einheiten, deren jeweilige Oberfläche nur zu 7% durch Interaktionen mit den anderen CRD des Trimers bedeckt wird (60). Das Molekulargewicht des multimeren Moleküls liegt bei ca. 650 kD. Die genaue Bestimmung wird durch das heterogene Molekulargewicht der Untereinheiten erschwert, das zwischen 26 und 38 kD liegt (23). Die Heterogenität ist auf ein unterschiedliches Ausmaß der N-Glykosylierung in der CRD-Region zurückzuführen. An dieser wurden zusätzlich Sialisierungen (61) und Sulphatisierungen (62) nachgewiesen. Weitere posttranslationale Modifikationen am SP-A sind die Hydroxylierung von Prolinresten und die N-terminale Acetylierung (63). SP-A wird, wie andere sekretorische Proteine, in das Lumen des rauhen endoplasmatischen

Retikulums transportiert. Dabei oder anschließend kommt es zur Abspaltung eines Signalpeptids (23). Obwohl SP-A als das bestuntersuchte Surfactantprotein gilt, gibt es bis heute kein klares Bild für eine spezifische physiologische Rolle von SP-A. Die zahlreichen Funktionen, die dem SP-A zugeschrieben werden, lassen sich in zwei Gruppen gliedern: Immunologische Funktionen und Wechselwirkungen mit Lipiden (Abbildung 2.3).

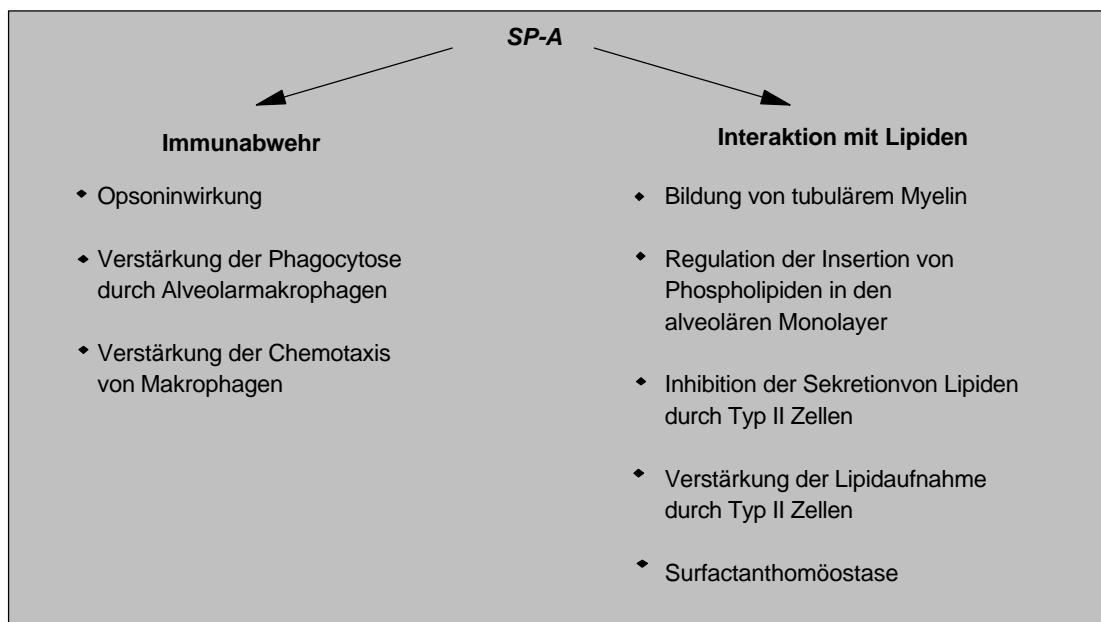


Abbildung 2.3: Mögliche physiologische Funktionen von SP-A

Eine wichtige Gruppe von Eigenschaften des SP-A besteht in der Immunabwehr der Lunge. Diese wurden aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des Proteins mit dem Komplementprotein C1q und der calciumabhängigen Bindung von Kohlenhydraten postuliert (57) und alsbald nachgewiesen. SP-A wirkt als Opsonin auf *Staphylococcus aureus* Bakterien und Herpes simplex Viren. Es verstärkt deren Phagocytose durch Alveolarmakrophagen (64).

Außerdem erhöht SP-A *in vitro* die Fc-Rezeptor vermittelte Phagocytose durch Monocyten und Makrophagen sowie die Complement-Rezeptor (CR1) vermittelte Phagocytose durch Makrophagen (65). Daneben stimuliert SP-A die Chemotaxis von Alveolarmakrophagen (66). Vielversprechend für die Erforschung der Bedeutung von

SP-A bei der Immunabwehr ist die Untersuchung von SP-A *knock-out* Mäusen (15), an denen sich das Fehlen der Funktionen des Proteins *in vivo* zeigen wird.

Eine weitere Gruppe von Eigenschaften betrifft die Wechselwirkungen von SP-A mit Lipiden.

Die Lipidbindungsstelle am SP-A konnte noch nicht genau lokalisiert werden. Die Untersuchung proteolytischer Fragmente führte zu der Annahme, daß Lipide im Bereich der „Übergangs“- oder „Nacken“-region binden (56), während Kuroki et al. mit monoklonalen Antikörpern eine putative Lipidbindungsstelle in der CRD-Region lokalisierten (67). Mutationen im Bereich der Calciumbindungsstelle der CRD-Region vermindern gleichfalls die Interaktion mit Lipiden (68). Bei dieser Untersuchung stellt sich allerdings die Frage, inwiefern durch die Verhinderung der Calciumbindung die Struktur der CRD-Region soweit verändert wird, daß auch die Lipidbindung nicht mehr stattfinden kann. Daneben scheint auch die aminoternale Region an der Lipidbindung beteiligt zu sein, da die Aufhebung der Disulfidbrücke durch Mutation von Cys 6 in Ser die Bindung von Lipiden beeinträchtigt. Gleiches gilt für die Entfernung der collagenartigen Region. Damit wurden in allen Domänen des Monomers putative Lipidbindungsstellen beschrieben (69).

Rekonstitutionsexperimente haben gezeigt, daß SP-A für die Bildung von tubulärem Myelin, der potentiellen Speicherform des extrazellulären, alveolären Surfactants, verantwortlich ist (37). In den Ecken der tubulären Myelinstrukturen konnte durch Antikörpermarkierung SP-A nachgewiesen werden (70). Die funktionelle Rolle des tubulären Myelins ist nach wie vor unbekannt. In SP-A *knock-out* Mäusen kann das Fehlen tubulären Myelins durch gesteigerte Produktion des oberflächenaktiven DPPC kompensiert werden (71). Für die Senkung der Oberflächenspannung spielt das tubuläre Myelin, wie auch SP-A, keine direkte Rolle.

In Zusammenhang mit der Bedeutung des SP-A für die Bildung von tubulärem Myelin wurde SP-A auch eine Funktion bei der Regulation der Insertion von Phospholipiden in den Monolayer zugeschrieben. Dafür sprechen *in vitro* Experimente, bei denen die Zugabe von SP-A zu hydrophoben Surfactantkomponenten zu einer verstärkten Adsorption von Phospholipiden in den Monolayer führt (30), (72), (73), (74).

SP-A ist an der Surfactanthomöostase zwischen intrazellulärem und extrazellulärem Surfactant beteiligt (23). An isolierten Typ-II-Pneumozyten inhibiert SP-A die Sekretion von Surfactantlipiden (75), (76). Diese Regulation hängt mit der Bindung des Proteins an Typ-II-Zellrezeptoren zusammen (77), die wahrscheinlich über die C-terminale Domäne erfolgt.

Darüber hinaus verstärkt SP-A an diesen Zellen die Aufnahme von Lipiden und wirkt möglicherweise an deren intrazellulärer Verpackung in Lamellarkörpern mit (78), (79), (80). Allerdings ist der Gehalt der Lamellarkörper an SP-A mit 1% des Gesamtproteins in diesen Vesikeln äußerst gering (81).

An der Oberfläche der Typ-II-Pneumozyten wurden mehrere Proteine detektiert, die SP-A mit hoher Affinität binden und an diesen Prozessen beteiligt sein können (77), (82). Dabei gibt es Hinweise auf die rezeptorvermittelte Endozytose eines SP-A/Lipid-Komplexes durch Typ-II-Pneumozyten über ein SP-A bindendes Rezeptorprotein bp55 (83). SP-A und Lipide werden in die Zellen aufgenommen und wahrscheinlich auf verschiedenen Wegen rezykliert (Wissel, pers. Mitteilung.), weitgehend ohne einem Abbauprozess zu unterliegen.

Noch unterliegt das Bild von der oder den Funktionen des SP-A einem stetigen Wandel, der mit dem Wissensfortschritt einhergeht. Zur Zeit verändert sich die Meinung über die Bedeutung von SP-A *in vivo*, da SP-A *knock-out* Mäuse in einer pathogenfreien Umgebung trotz SP-A Mangels normal atmen und leben. In diesen Mäusen scheint die Funktion des Proteins für die Surfactanthomöostase entweder überschätzt worden zu sein oder sie ist redundant, so daß ein Fehlen durch andere Strukturen kompensiert werden kann. Hingegen gewinnt die Beteiligung von SP-A an der Infektabwehr der Lunge an Bedeutung.

Die Erforschung der Wechselwirkungen zwischen Lipiden und Proteinen des Surfactantsystems ist wichtig, da ein Mangel an Surfactant die häufigste Ursache von Atemstörungen bei unreifen Frühgeborenen darstellt. Zur Therapie der Erkrankung, die eine Hauptursache neonataler Sterblichkeit bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1000 g darstellt, stehen natürliche tierische oder künstliche Surfactant-Präparationen zur Verfügung, die unterschiedliche Zusammensetzungen an Phospholipiden und Surfactantproteinen haben. Eine genaue Kenntnis der im Surfactant ablaufenden Prozesse, insbesondere der Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lipiden, kann langfristig zur Entwicklung wirksamerer und

spezifischerer Therapien von Atemstörungen beitragen.

2.3 Ziele der Arbeit

Die geschilderten Funktionen von SP-A als einem „Regulator der Surfactant-homöostase“ (69) erfordern die Interaktion des Proteins mit verschiedenen Liganden, zu denen Lipide, Kohlenhydrate, Calcium und zelluläre Rezeptoren zählen. Da SP-A in der alveolären Hypophase stets mit Phospholipiden assoziiert ist (8), liegt seit der Entdeckung des SP-A ein Schwerpunkt der Surfactantforschung auf der Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen SP-A und Lipiden. Die zahlreichen Untersuchungen haben zu unterschiedlichen, zum Teil kontroversen Ergebnissen geführt. Einerseits wurde eine calciumunabhängige Bindung von SP-A an Phospholipidvesikel festgestellt (84). Andererseits ist beschrieben worden, daß die Bindung von SP-A an Phospholipiden, die auf Silikagelplatten immobilisiert wurden, nur calciumabhängig erfolgt (85). Als Ursachen dieser unterschiedlichen Ergebnisse werden die verschiedenen Präparationsmethoden des SP-A vermutet (86). Die Rolle von Calcium bei der Bindung von Lipiden an SP-A ist daher umstritten. Unstrittig ist hingegen, daß SP-A in Anwesenheit von Calcium zu einer Aggregation von Phospholipidliposomen führt und Calcium die Struktur und Stöchiometrie des gebildeten Lipid-Proteinkomplexes beeinflusst (87). Über die zur Aggregation notwendigen Calciumkonzentrationen existieren in der Literatur gleichfalls unterschiedliche Angaben, die zwischen 0,74 μM (88) und 0,5 mM (89) Ca^{2+} für eine halbmaximale Aggregationsreaktion schwanken. Der Mechanismus, mit dem die Aggregationsreaktion erfolgt, ist unbekannt. Diskutiert werden zwei Modelle: Zum einen die Vernetzung verschiedener SP-A/Liposomen-Komplexe via SP-A/SP-A-Interaktionen (90), (88) und zum anderen die Vernetzung nebeneinanderliegender Liposomen über multivalente Lipidbindungsstellen, beispielsweise in den CRD-Regionen eines SP-A Moleküls (69). Diese Diskussionen werden durch die Unklarheit begünstigt, die nach wie vor über den Lipidbindungsort am SP-A besteht. Bei der Suche nach hydrophoben Regionen als putative Lipidbindungsstellen wurde zunächst die Übergangs- oder Neckregion favorisiert. Dies konnte durch Lipidbindung an proteolytischen Fragmenten bestätigt werden. Neuere Veröffentlichungen, die gezielte Punktmutationen in ihre Untersuchungen einbeziehen, weisen auf die Bedeutung der CRD-Region für die Lipidbindung hin. Auch die aminoternale Region, die für die

korrekte Oligomerisierung des Moleküls verantwortlich ist, hat einen Einfluß auf die Wechselwirkung mit Lipiden (69).

Einige der bestehenden Unklarheiten lassen sich in Form folgender Fragestellungen zusammenfassen:

- Ist die Lipidbindung an SP-A calciumabhängig oder calciumunabhängig?
- Welche Calciumkonzentrationen werden zur SP-A induzierten Liposomenaggregation benötigt?
- Erfolgt die Vernetzung von SP-A und Liposomen bei der Aggregation über SP-A/SP-A-Interaktionen oder über multivalente Bindungsstellen am SP-A?
- Wie erfolgt der molekulare Mechanismus der SP-A/Lipid-Interaktion und wie wird er reguliert?

Ziel der Arbeit war es, neue Informationen über die Eigenschaften der Interaktion zwischen SP-A und Lipiden zu gewinnen und daraus möglichst Antworten auf eine oder mehrere der oben formulierten Fragen zu finden.

Dazu wurden die bisher noch nicht zur Untersuchung des Surfactant Systems verwendeten biophysikalischen Meßmethoden, die Resonant Mirror Spektroskopie und die kinetische Lichtstreuung, vergleichend eingesetzt. Es galt, die Meßbedingungen zu etablieren und an die begrenzt verfügbaren Proteinmengen anzupassen.

Die methodischen Verbesserungen bei der Messung der SP-A/Lipid-Interaktion können als Grundlage für die Untersuchung anderer Liganden (Kohlenhydrate, Rezeptoren) verwendet werden oder auch direkt zur Untersuchung von rekombinantem bzw. mutiertem SP-A dienen. Besonders interessant erscheint dabei die Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen SP-A und dem Rezeptor auf Typ II-Zellen, deren Untersuchung in dieser Arbeit noch nicht möglich war, da bisher keine Präparation zu nennenswerten Mengen an gereinigtem SP-A Rezeptorprotein führt.

3 Material und Methoden

3.1 Präparationen

Ein rekonstituiertes System aus Surfactant Protein A und Lipiden erfordert die Reinigung und Präparation der einzelnen Komponenten, die in den folgenden Abschnitten beschrieben wird. Eine Liste der verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquellen befindet sich im Anhang.

3.1.1 Surfactantpräparation

Die Reinigung von Lungensurfactant erfolgt aus Schlachthofmaterial unter leichter Modifikation einer in der Literatur beschriebenen Methode (91).

Die Lungen von Schafen oder Rindern werden entnommen, sobald es der Schlachtprozess zulässt und auf Eis transportiert. Nach Entfernung von anhängenden Geweberesten werden die Lungen bis zu dreimal mit eisgekühltem TBS-Puffer (5 mM Tris, 150 mM Natriumchlorid, pH 7,4; Volumen in Abhängigkeit von der Lungengröße - Schaf: ca. 1 l, Rind: ca. 1,5 l) unter leichtem Bewegen des gefüllten Organs gespült. Dazu lässt man den Puffer über die Luftröhre ein- und auslaufen. Der sich in der Lunge ansammelnde Puffer kann mit einer Spritze oder Saugflasche an- bzw. abgesaugt werden. Die erhaltene Lavage sollte möglichst milchig-trüb und blutfrei sein. Zellen und Gewebereste werden durch zehninütige Zentrifugation der Lavage bei 1200 x g, 4 °C entfernt. Anschließend wird die zellfreie Lavage bei 27500 x g und 4 °C ca. 3 h zentrifugiert, um surfactanthaltige Partikel zu sedimentieren. Der klare Übrstand wird dekantiert und kann als Ausgangsmaterial für die Präparation von SP-D genutzt werden. Auf das surfactanthaltige Pellet gibt man nach der Zentrifugation erneut zellfreie Lavage und verfährt wie zuvor beschrieben, bis die gesamte Lavage zentrifugiert ist.

Das surfactanthaltige Pellet wird in ca. 50 ml Bromid-Puffer (5 mM Tris, 150 mM NaCl, 1,64 M NaBr, 5 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, pH 7,4) suspendiert und mit einem Dounce-Homogenisator zerkleinert. Das entstandene Homogenat wird bei 100000 x g und 4 °C mindestens 6 Stunden zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befindet sich das Surfactant als dünne Schicht auf der Oberfläche der bromidhaltigen Lösung. Man entnimmt diese vorsichtig mit einem Spatel und suspendiert sie mit etwa 10 ml bis 15 ml TBS-Puffer (5 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) im Dounce-Homogenisator.

Nach Homogenisation wird die Suspension auf ca. 50 ml verdünnt und bei 100000 x g

und 4 °C ca. 60 Minuten zentrifugiert. Um Natriumbromid vollständig zu entfernen, wird das entstandene Surfactantpellet erneut in TBS-Puffer (5 mM Tris, 150 mM Natriumchlorid, pH 7,4) aufgenommen und wie zuvor beschrieben, homogenisiert und zentrifugiert. Das gereinigte Surfactant wird in 3 ml bis 5 ml destilliertem Wasser aufgenommen und der Proteingehalt bestimmt. Damit eine nachfolgende SP-A Präparation lohnt, sollte der Proteingehalt bei etwa 2,5 mg/ml liegen. Bei geringeren Proteinkonzentrationen empfiehlt sich die Isolation von SP-A aus mehreren Surfactantpräparaten.

Aus Rattenlungen wird Surfactant auf entsprechende Weise durch Spülen der Lunge mit 10 ml bis 15 ml Puffer isoliert.

3.1.2 SP-A - Präparation

Die Präparation von Ratten- und Schaf-SP-A wurde in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Paul Stevens, Abteilung Neonatologie der Charité durchgeführt, die Präparation von Rinder-SP-A erfolgte im Institut für medizinische Physik und Biophysik der Charité.

In destilliertem Wasser gelöstes Surfactant wird durch eine 25 G Nadel bei Raumtemperatur zügig in stark gerührtes 1-Butanol eingespritzt. Die Endkonzentration sollte 30:1 (Volumen Butanol : mg Protein) betragen. Das Gemisch wird 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. SP-A fällt als weißer Niederschlag aus, während sich die Lipide sowie die hydrophoben Surfactantproteine B und C im Butanol lösen. Durch Zentrifugation (3000 x g, 30 Minuten, 4 °C) wird das SP-A von der Butanolphase getrennt. Diese entfernt man nach Beendigung der Zentrifugation vorsichtig mit einer Spritze. Die SP-A-haltigen Pellets werden nochmals in 20 ml bis 25 ml Butanol aufgenommen, geschüttelt, vereinigt und zentrifugiert (3000 x g, 30 Minuten, 4 °C). Nach dem vorsichtigen Abnehmen des Überstandes wird das Pellet unter leichtem Stickstoffstrom getrocknet, bis kein Butanolgeruch mehr wahrnehmbar ist. Beim Eintrocknen sollte das Zentrifugenglas, in dem sich SP-A befindet, mit Parafilm abgedeckt werden, da das Protein als Pulver mit dem Stickstoffstrom verblasen werden kann. Das Protein wird in OGP-Puffer (20 mM Octyl-β-D-glycopyranosid, 100 mM NaCl, 10 mM HEPES) aufgenommen (ca. 12 ml / 10 mg Surfactant), mit dem Dounce-Homogenisator homogenisiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert.

Anschließend zentrifugiert man die Suspension 45 Minuten bei 100000 x g, 15 °C. Nach der Zentrifugation wird der Überstand verworfen und das proteinhaltige Pellet zweimal -wie beschrieben- durch Homogenisation mit einem Dounce-Homogenisator

in OGP-Puffer und anschließender Zentrifugation (45 Minuten bei 100000 x g, 15 °C) gewaschen. Das erhaltene Protein-Pellet wird in einem kleinen Volumen 5 mM Trispuffer, pH 7,4 (hergestellt aus Tris-HCl und Tris-Base, ohne Titration) aufgenommen. Ausgehend vom Surfactant-Proteingehalt, sollte die Proteinkonzentration mindestens 2,5 mg/ml betragen. Das Protein wird 24 h bis 48 h gegen 5 mM Trispuffer dialysiert. Anschließend wird die Lösung bei 130000 x g, 4 °C 30 Minuten zentrifugiert. Das gereinigte SP-A befindet sich im Überstand. Nach einer Proteinbestimmung wird das Protein aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Haltbarkeit beträgt mehrere Monate.

Kontrolle der Präparate

Die Proteinbestimmung nach Bradford (92) erfolgte in allen Fällen mit dem Bio-Rad-Proteinassay und Serumalbumin als Standard (Microassay-Methode nach Angaben des Herstellers). Die Reinheit der SP-A Präparation wurde mit einer SDS-Gel-elektrophorese nach Lämmli (93) überprüft (Abbildung 3.1).

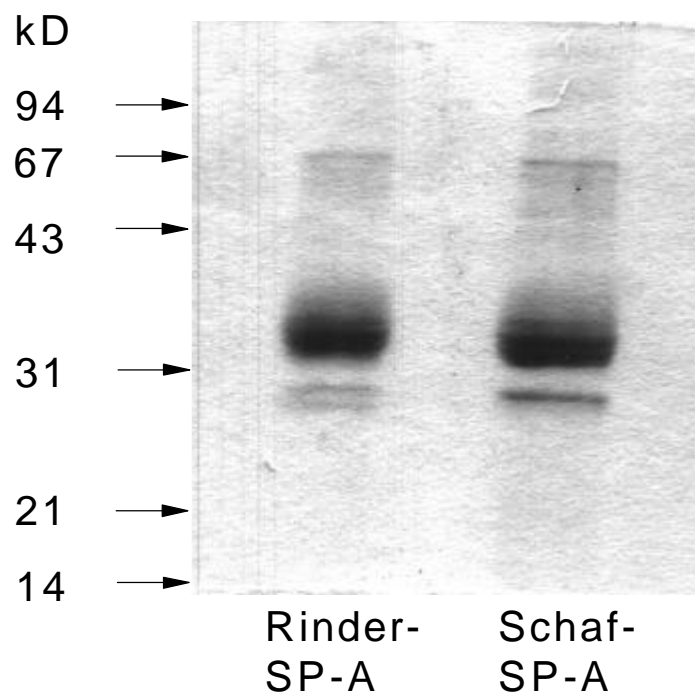


Abbildung 3.1: SDS-Gelelektrophorese (12% Acrylamid) von Rinder- und Schaf-SP-A unter reduzierenden Bedingungen

Die unter reduzierenden Bedingungen durchgeführte Elektrophorese zeigt nach der Färbung mit Serva Blue (0,1% Serva-Blue R in 40% Methanol, 10% Essigsäure) ein fast identisches Bandenmuster für Rinder- und Schaf-SP-A. Erkennbar ist in beiden Präparaten eine Hauptbande mit einem Molekulargewicht von 33 kD bis 36 kD, die das glykosylierte Monomer darstellt. Darunter ist bei ca. 28 kD die deglykosylierte Untereinheit des SP-A zu sehen. SP-A Dimere haben ein Molekulargewicht um 67 kD.

3.1.3 Präparation von Liposomen

Die Lipide wurden, sofern nicht vom Hersteller als Stammlösung bezogen, in Chloroform/Methanol 2/1 gelöst und in der gewünschten Zusammensetzung gemischt. Sehr häufig werden bei den Messungen sog. DPPC-Mix-Liposomen verwendet, deren Zusammensetzung mit 55% Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), 25% Phosphatidylcholin aus Eigelb (EiPC), 10% Phosphatidylglycerol (PG) und 10% Cholesterin dem Phospholipidgemisch des Lungensurfactants ähnelt. Die Anteile der Lipide in den Liposomen sind stets in Gewichtsprozenten angegeben.

Unter Einsatz einer Vakuumzentrifuge (Eppendorf) wird bei einem Vakuum von 20 mbar bis 30 mbar und Raumtemperatur das Lösungsmittel entzogen und ein Lipidfilm gebildet. Die Lipidfilme werden nach Zugabe von Tris-Puffer (100 mM NaCl, 50 μ M EGTA, 5 mM Tris, pH 7,4) unter Schütteln im Eppendorf-Thermostaten bei 50 °C hydratisiert.

Zur Herstellung von Liposomen mit einem Durchmesser um 200 nm werden aus der Suspension zunächst durch Ultraschall (8 x 15 s, Bandelin Sonoplus BM 70 Desintegrator mit Mikrospritze) kleine unilamellare Vesikel (SUV) hergestellt. Durch zehnmaliges Einfrieren und Auftauen erhält man multilamellare Vesikel (MLV). Diese werden durch eine Polycarbonatmembran mit 200 nm Porengröße unter Verwendung eines Liposo-Fast Extruders bei einer Temperatur von 50 °C extrudiert (40 x), wobei unilamellare Liposomen entstehen (94).

Bei der Präparation von Liposomen mit einem Durchmesser von 50 nm wird die nach dem Hydratisieren erhaltene Suspension ohne weitere Vorbehandlung bei 50 °C durch zwei Polycarbonatmembranen mit einem Porendurchmesser von 50 nm extrudiert.

Phosphatidylcholinbestimmung

Zur Bestimmung des Lipidgehaltes wurde eine Cholinbestimmung nach Stewart mit DPPC als Standard durchgeführt (95). Der Stewart-Assay eignet sich zur Bestimmung des Phosphatidylcholingehalts von Proben in Gegenwart von anorganischem Phosphat. Man nutzt die Eigenschaft von Lipiden mit Ammoniumeisen(III)thiocyanat in organischer Lösung einen farbigen Komplex zu bilden. Da die Komplexbildung von der Kopfgruppe des Phospholipids abhängt, eignet sich die Methode nicht zur Analyse von Proben, die ein unbekanntes Gemisch verschiedener Phospholipide enthalten. Insbesondere Phosphatidylglycerol wird beim Stewart-Assay nicht erfaßt. Da in den durchgeführten Experimenten der Cholingehalt von Liposomen bekannter Zusammensetzung bestimmt wird, ist diese einfache Methode zur Quantifizierung des Cholins geeignet.

Durchführung

Als Reagenzlösung dient eine wäßrige Lösung von 0,1 M Eisenchlorid und 0,4 M Ammoniumthiocyanat. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur mehrere Monate haltbar. Standardproben werden durch Verdünnen einer Lipidlösung von 0,1 mg/ml DPPC in Chloroform hergestellt. Dazu pipettiert man in 10 ml Glasröhrchen folgende Ansätze (Doppelbestimmung):

| | | | | | | | |
|------------|------|--------|--------|--------|--------|--------|------|
| Lipid | 0 ml | 0,1 ml | 0,2 ml | 0,4 ml | 0,6 ml | 0,8 ml | 1 ml |
| Chloroform | 2 ml | 1,9 ml | 1,8 ml | 1,6 ml | 1,4 ml | 1,2 ml | 1 ml |
| Reagenz | 2 ml | 2 ml | 2 ml | 2 ml | 2 ml | 2 ml | 2 ml |

Von den zu bestimmenden Proben werden entsprechende Ansätze hergestellt.

Alle Proben werden mit einem Vortex-Mixer 15 s geschüttelt und anschließend 10 Minuten bei 2700 rpm (Heraeus Biofuge 15 R, Rotor HSA 4100) zentrifugiert. Im Photometer wird die optische Dichte der unteren Chloroformphase bei 485 nm gegen den Chloroformblindwert gemessen und die Konzentration der Proben anhand der Eichkurve aus den Standards ermittelt. Bei ausgewählten Proben erfolgte eine elektronenmikroskopische Analyse der Liposomenpräparation. Dargestellt sind Liposomen nach Extrudern durch 200 nm und 50 nm Membranen und Färbung mit Uranylacetat (Abbildung 3.2).

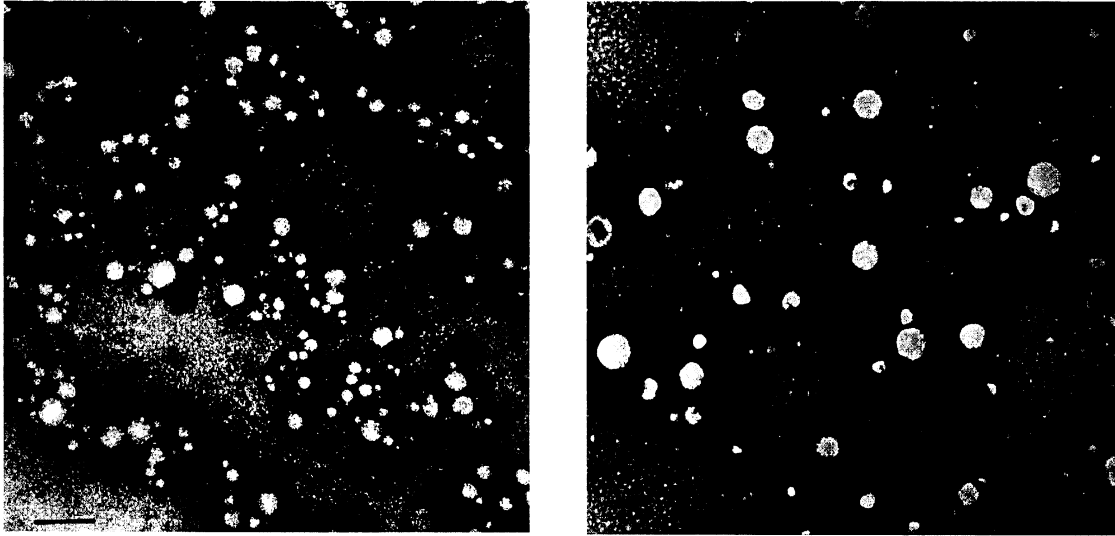


Abbildung 3.2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Liposomen

Dargestellt sind DPPC-Mix-Liposomen, die durch eine 50 nm (links) bzw. 200 nm (rechts) Membran extrudiert wurden. Die Präparate wurden an der Luft getrocknet, anschließend wurde eine Negativfärbung mit Uranylacetat durchgeführt. Die eingezeichneten Balken (---) entsprechen 250 nm.

Abschätzung der Liposomenkonzentration

Aus der Lipidkonzentration wurde die Konzentration an Liposomen in der Lösung anhand folgender Annahmen abgeschätzt, um eine grobe Vorstellung von der Anzahl der reagierenden Teilchen zu erhalten. Die in der Arbeit genannten Liposomenkonzentrationen geben also stets nur näherungsweise Auskunft über die Konzentration an Liposomen. Diese wurde über folgende Rechnung bestimmt: Als Grundlage diente die Oberfläche des Liposoms bei einem Durchmesser, der der verwendeten Porengröße der Membran entsprach. Außerdem wurden näherungsweise innere und äußere Oberfläche als gleich groß aufgefaßt. Als Fläche eines Lipidmoleküls wurden $0,5 \text{ nm}^2$ zugrundegelegt (96). Damit erhielt man ca. 500000 Lipidmoleküle für ein Liposom mit einem Durchmesser von 200 nm und 31000 Lipidmoleküle für ein Liposom mit einem Durchmesser von 50 nm. Die Liposomenkonzentration ergab sich durch Division der Lipidkonzentration durch die Zahl der Lipidmoleküle pro Liposom.

3.2 Methoden

Ziel der Arbeit war die Analyse der SP-A/Liposomen-Interaktion. Die Untersuchung der Wechselwirkungen erfolgte durch den vergleichenden Einsatz der Resonant Mirror Spektroskopie und der kinetischen Lichtstreuung. Zur Kontrolle der SP-A Präparate wurde außerdem ein photometrischer Aggregationstest verwendet.

Die zum Start der Interaktion erforderliche Calciumzugabe erfolgte stets in Form von Calciumchlorid, das in Wasser oder Puffer gelöst wurde, so daß Ca^{2+} - und Cl^- -Ionen in hydratisierter Form vorlagen. Auch bei der Beschreibung calciumabhängiger Prozesse ist im Folgenden, sofern nicht anders vermerkt, stets eine Abhängigkeit von der Konzentration an Ca^{2+} -Ionen gemeint.

3.2.1 Photometrischer Aggregationstest

Bei der photometrischen Untersuchung kolloidaler Lösungen kommt es zur Schwächung des eingestrahnten Lichtes bei Lichtabsorption durch chromophore Gruppen, durch Lichtstreuung an Partikeln aber auch durch apparative Faktoren wie Reflexion und Brechung an Küvetten. Durch Referenzmessungen mit identischen Küvetten können die apparativen Faktoren weitgehend ausgeschlossen werden. Photometrische Trübungsmessungen, die bei einer Wellenlänge von 400 nm durchgeführt werden, dienen als klassischer „Aggregationstest“ zur indirekten Untersuchung der Wechselwirkung zwischen SP-A und Liposomen über die durch SP-A ausgelöste Liposomenaggregation. Sie bieten eine einfache Möglichkeit zur Kontrolle der Aktivität der SP-A Präparation. Nach Inkubation von SP-A und Liposomen wird die Interaktion durch Zugabe von Calcium gestartet. Dabei werden in der Regel 2,5 mM bis 5 mM Calcium verwendet. Die SP-A abhängige, calciuminduzierte Aggregation der Liposomen führt zu einer Schwächung des eingestrahnten Lichtes durch zunehmende Streuung an den sich bildenden Aggregaten. Die Extinktion nimmt zu. In dieser Arbeit wurde der Aggregationstest zur Kontrolle der SP-A Präparate und als Referenzmethode eingesetzt. Dazu wurde ein Diodenarrayspektralphotometer der Firma Hewlett-Packard verwendet.

3.2.2 Kinetische Lichtstreuung

3.2.2.1 Meßprinzip

Trifft Licht auf Materieteilchen, so wird es gestreut. Diese Beobachtung ist in unserem Leben häufig, z.B. ist der Lichtkegel eines Autoscheinwerfers bei Nebel aufgrund von Streuung auch von der Seite sichtbar.

Die elektrische Feldstärke einer Lichtwelle führt beim Auftreffen auf ein Teilchen zu einer Kraft, die negative Ladungen (z. B. Elektronen) in die eine Richtung und positive Ladungen (z. B. Atomkerne) in die entgegengesetzte Richtung bewegt. Dadurch wird ein elektrischer Dipol induziert, der sich mit der sich verändernden Feldstärke der Lichtwelle ebenfalls periodisch ändert. Ein solcher oszillierender Dipol sendet elektromagnetische Strahlung in alle Richtungen aus, die sogenannte Streustrahlung.

3.2.2.2 Apparativer Aufbau

Die verwendete Meßanordnung entspricht der von Hofmann und Emeis entwickelten Apparatur (97) (Abbildung 3.3).

Als Meßlicht dient das von einer Leuchtdiode emittierte Licht der Wellenlänge 820 nm (Hitachi HLR 60R), das auf eine Küvette mit einer Schichtdicke von 10 mm fokussiert wird. Das von der Probe in der Küvette ausgesandte Streulicht fällt aufgrund einer Ringblende nur im Winkelbereich von 14° bis 18° auf zwei Fresnellinsen und wird von diesen auf den Detektor (großflächige PIN-Diode) fokussiert. Die erhaltenen Signale werden elektronisch verstärkt und mit einem Digitaloszilloskop (Nicolet 4094 C) aufgezeichnet. Die Speicherung der Daten erfolgt mit Hilfe eines Computers (Pyramid). Im Verlauf dieser Arbeit wurde das Digitaloszilloskop Nicolet 4094 C durch ein Digitalspeicheroszilloskop Nicolet 420 ersetzt, das den Einsatz des Computers an der Meßanordnung erübrigte.

$$I(Q) \sim ((n/n_0)^2 - 1) * V^2 * P^2(Q) * (1 + \cos^2(Q))$$

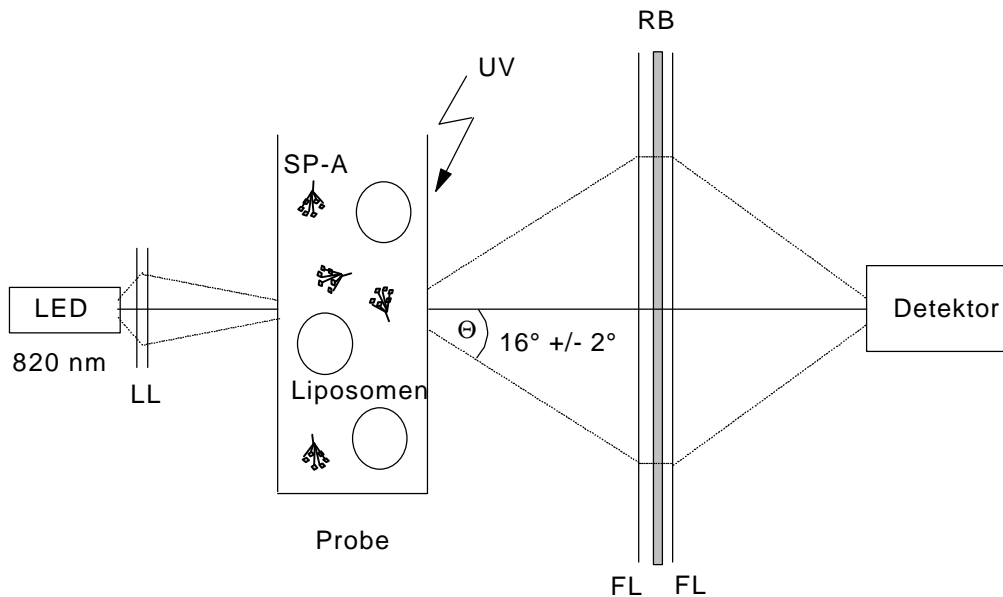


Abbildung 3.3: Messung der kinetischen Lichtstreuung

Schematische Darstellung der Apparatur, LED: Leuchtdiode, UV: UV-Blitz, RB: Ringblende, FL: Fresnellinse

Für die Intensität des Streulichts $I(Q)$ ist die Rayleigh-Debye Näherung anzunehmen, mit den Brechungsindices n und n_0 der streuenden Teilchen und der Pufferlösung, in der die streuenden Teilchen gelöst sind sowie mit dem Volumen V der Teilchen und einer Streufunktion $P(Q)$, die von der Form der streuenden Teilchen abhängt.

3.2.2.3 Versuchsdurchführung

SP-A und Liposomen werden in der Küvette in Puffer suspendiert und durch Calcium zur Reaktion gebracht. Der Reaktionsstart kann entweder durch Calciumzugabe von Hand oder durch Freisetzung von Calcium aus einem photolabilen Chelator DM-Nitrophen (98) mit Hilfe eines UV-Blitzes erfolgen (UV-Blitz: JLM-E, Rapp, Optoelektronik, Hamburg, bei Verwendung maximaler Ladespannung: 385 V, max.

Energie pro Puls: 257 J). Vor Beginn der Messung wird die Differenz zwischen Streulicht und Meßlicht auf Null abgeglichen. Daher werden im Verlauf der Messung nur Intensitätsänderungen registriert, die auf eine Veränderung der Probe zurückzuführen sind.

Zur Untersuchung von Liposomen, deren Brechungsindex sich nur geringfügig von dem des Puffers unterscheidet und deren Durchmesser unter der Wellenlänge des anregenden Lichtes liegt, gilt für die Intensität des Streulichts (ΔI_S , gemessen in Volt) in erster Näherung die Rayleigh-Debye-Näherung (Abbildung 3.3). Bei den verwendeten Meßbedingungen und der Beobachtung kleiner Aggregate wird die Intensität des gestreuten Lichts durch V^2 dominiert. Die Bildung von Aggregaten aus N Liposomen erhöht das Streulicht proportional zu N^2 , während gleichzeitig die Gesamtzahl der streuenden Teilchen proportional zu $1/N$ abnimmt. Damit erweisen sich die Lichtstreusignale als Monitor für die durchschnittliche Zahl der Liposomen pro Aggregat.

3.2.2.4 Caged Calcium

Die Messung der calciumabhängigen Reaktion zwischen SP-A und Liposomen mit hoher Zeitauflösung erfordert einen störungsfreien Reaktionsstart. Dazu verwendet man einen photolabilen, inerten Calciumchelator, DM-Nitrophen. Dieser komplexiert im Puffer vorhandenes und ggf. zugesetztes Calcium. Bei Photolyse mit einem UV-Blitz sinkt die Affinität des Ca^{2+} /DM-Nitrophen-Komplexes (*caged Calcium*) von $5 \cdot 10^{-9}$ M auf $3 \cdot 10^{-3}$ M, so daß Ca^{2+} -Ionen schnell und homogen in die Lösung abgegeben werden (99). So kann die Interaktion zwischen SP-A und Liposomen ohne Störung des Systems durch Rühren etc. gestartet werden.

3.2.3 Resonant Mirror Spektroskopie

Die Resonant Mirror Spektroskopie gehört zu einer Gruppe spektroskopischer Oberflächenmethoden, die sich in den letzten Jahren etabliert haben. Der Vorteil der Verwendung von Oberflächenmethoden liegt in der Verringerung der benötigten Probenmengen des mühevoll präparierten Proteins. Man unterscheidet zwischen der Plasmonenresonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance*) mit einer Goldschicht an der Oberfläche und der Resonant Mirror Spektroskopie, die einen Wellenleiter verwendet. Beide Methoden beruhen auf dem evaneszenten Feld, das an einer total-

reflektierenden Oberfläche auftritt.

3.2.3.1 Meßprinzip

Das zu den Messungen verwendete Gerät FPC-0001 der Firma Affinity Sensors erfordert Küvetten mit einem Volumen von max. 250 μl , auf deren Quarzboden verschiedene Schichten aufgedampft sind.

Aus einem Dioden-Laser fällt linear polarisiertes Licht der Wellenlänge 670 nm im Winkelbereich zwischen 8° und 12° auf den Boden der Küvette (Abbildung 3.4). Beim Eintritt des Lichtstrahls in den Quarzblock und beim Übergang vom optisch dichteren Quarzblock in die optisch dünnere Kopplungsschicht findet Brechung statt. Ab einem bestimmten Winkel, dem sog. kritischen Winkel, erfolgt Totalreflektion und die Lichtwellen werden zurückgeworfen.

Das elektrische Feld der reflektierten Lichtwelle setzt sich innerhalb des optisch dünneren Mediums fort. Das Feld nimmt exponentiell ab und wird als Evaneszenzfeld bezeichnet. Die auf dem Quarz befindliche optische Kopplungsschicht ist in ihrer Dicke etwa so groß wie die Durchdringungsfähigkeit des evaneszenten Feldes. Die Totalreflektion an der Grenzfläche zwischen der Quarzschicht und der optischen Kopplungsschicht erfolgt nicht vollständig. Denn ein Teil des Lichtes setzt sich durch die optische Kopplungsschicht fort und gelangt in den Wellenleiter, der einen hohen Brechungsindex aufweist. In diesem setzt sich das Licht durch Totalreflektion fort und baut wiederum ein Evaneszenzfeld auf.

Das Auftreten von Totalreflektion im Wellenleiter ist unter anderem abhängig vom Einstrahlwinkel, der Schichtdicke des Wellenleiters, seines Brechungsindex sowie des Brechungsindex in der Region des evaneszenten Feldes, der Sensorschicht. Die Sensorschicht hat eine Dicke von etwa 250 nm, so daß nur Reaktionen beobachtet werden können, die direkt an der Oberfläche ablaufen.

Durch die Kopplung von Proteinen, z.B. SP-A, an die Sensoroberfläche und deren Interaktion mit Liposomen, verändert sich der Brechungsindex in der Sensorschicht oberhalb des Wellenleiters und damit der Winkel, in dem Licht eingestrahlt werden muß, damit Totalreflektion im Wellenleiter stattfindet.

Aus dem Wellenleiter austretendes Licht ist -im Gegensatz zu direkt reflektiertem Licht- in seiner Polarisationsrichtung um 90° gedreht. Das aus dem Wellenleiter

austretende Licht wird am Detektor registriert. Durch einen Rückkopplungsmechanismus wird der Winkel ermittelt, unter dem das Licht in die Leiterschicht gelangt ist. Meßgröße ist der sogenannte Resonanzwinkel, der bei konstant bleibendem Versuchsaufbau nur von Änderungen des Brechungsindex in der Sensorschicht abhängt.

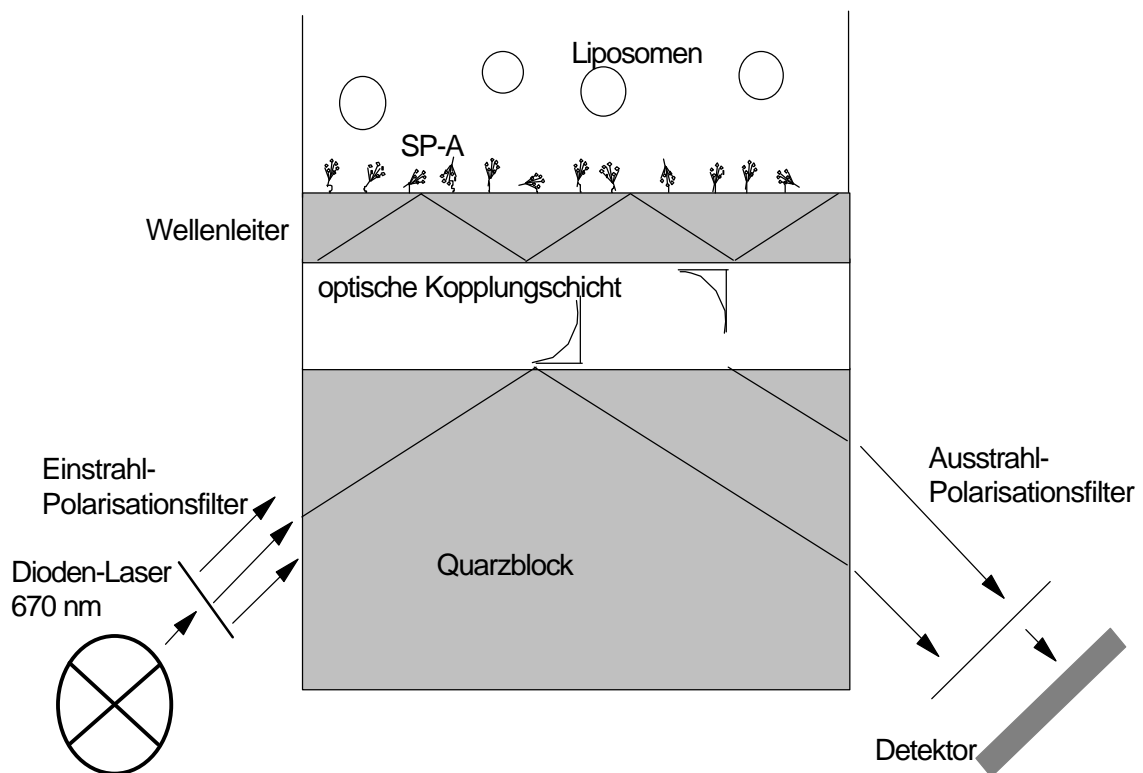


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Resonant Mirror Spektroskopie

3.2.3.2 Versuchsdurchführung

Die Oberfläche der zu den Messungen verwendeten Küvetten, d.h. der Wellenleiter, ist in unterschiedlichen Ausführungen kommerziell erhältlich. Zur Durchführung der Versuche wurde das Protein mit dem homobifunktionellen Crosslinker Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS³) auf einer planaren Aminosilanoberfläche immobilisiert. Die Kopplung von SP-A, wie auch alle Messungen, wurden, soweit nicht anders beschrieben, bei 15 °C und einer Rührereinstellung von 50 (halbmaximale

Geschwindigkeit) durchgeführt.

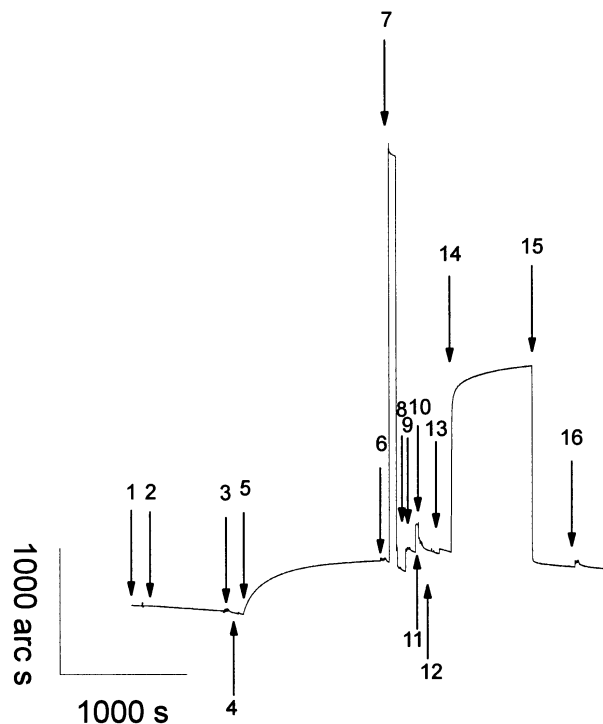
SP-A wurde nach der Präparation in Tris-Puffer gelagert. Da die Immobilisation über Aminogruppen erfolgte, war es erforderlich unter Verwendung eines Mikrokonzentratoren (Microcon-100, Amicon), Tris- gegen Phosphatpuffer auszutauschen.

Mit dem verwendeten 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,8 wurde auch die zum Versuch eingesetzte Küvette vor Versuchsbeginn etwa 30 Minuten äquilibriert. Anschließend wurde die Küvettenoberfläche 10 Minuten mit 200 µl 1 mM BS³ aktiviert und fünfmal mit je 200 µl Phosphatpuffer gewaschen. Nach Zugabe des umgepufferten SP-A beobachtete man einen Anstieg des Resonanzwinkels (Abbildung 3.5). Die Kopplungsreaktion wurde über einen Zeitraum von ca. 10 Minuten durchgeführt. Zum Reaktionsstop wurde die Oberfläche fünfmal mit je 200 µl Phosphatpuffer gewaschen.

Unbesetzte Bindungsstellen wurden mit 1 M Ethanolamin, pH 8,3 blockiert. Zum Abschluß der Kopplungsreaktion wurde die Küvette mit immobilisiertem SP-A fünfmal mit 200 µl Phosphatpuffer und fünfmal mit 200 µl 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 50 µM EGTA (Meßpuffer) gewaschen.

Nach der Kopplung des Proteins wurde die Reaktion zwischen SP-A und den in der Küvette suspendierten Liposomen durch Zugabe von Calciumchloridlösung gestartet. Aufgrund der Immobilisierung des Proteins und des raschen Abfalls des evaneszenten Feldes oberhalb des Wellenleiters ist die Resonant Mirror Spektroskopie eine geeignete Methode, um die Bindung von Liposomen unabhängig von der Aggregationsreaktion zu untersuchen.

Die durch Calciumionen induzierte Reaktion zwischen SP-A und Liposomen ist nach der Zugabe von Calciumchelatoren reversibel. Nach der Messung einer reversiblen Bindungsreaktion wurde häufig ein Waschschriff mit 10 mM EDTA, 10 mM Tris, 0,1% Tween-20, pH 7,4 durchgeführt, um Lipid- und Calciumreste zu entfernen und die unspezifische Bindung zu reduzieren. Das Detergenz wurde durch mehrmaliges Waschen mit dem Meßpuffer aus der Küvette entfernt.



Fisons IAsys Experimental Notes

Wed May 27 1998

Cuvette System

User : Astrid

Startup Instrument settings:

Sampling interval: 0.2

Smoothing: 1

Stirrer speed: 50

Experiment temperature: 15.0

| | | |
|----|--------------------------|---|
| 1 | Experimental Time : 0 | 200 ul 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,7 |
| 2 | Experimental Time : 85 | 200 ul 1 mM BS ³ |
| 3 | Experimental Time : 718 | 5 x 200 ul 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,7 |
| 4 | Experimental Time : 837 | 50 ul 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,7 |
| 5 | Experimental Time : 878 | 5 ul Schaf-SP-A vom 08.02.98 (max.3.4 ug) in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,7 |
| 6 | Experimental Time : 1951 | 5 x 200 ul 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,7 |
| 7 | Experimental Time : 2020 | 200 ul 1 M Ethanolamin, pH 8,5 |
| 8 | Experimental Time : 2076 | 5 x 200 ul 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,7 |
| 9 | Experimental Time : 2146 | 5 x 200 ul 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 50 uM EGTA, pH 7,4 |
| 10 | Experimental Time : 2224 | 200 ul 5 mM Tris, 10 mM EDTA, 0,1 % Tween-20, pH 7,5 |
| 11 | Experimental Time : 2247 | 5 x 200 ul 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 50 uM EGTA, pH 7,4 |
| 12 | Experimental Time : 2347 | 2 x 50 ul 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 50 uM EGTA, pH 7,4 |
| 13 | Experimental Time : 2411 | + 10 ul 10 mg/ml DPPC-Mix-Liposomen in TBS |
| 14 | Experimental Time : 2505 | + 10 ul 1 mM Calcium |
| 15 | Experimental Time : 3141 | + 10 ul 5 mM EDTA |
| 16 | Experimental Time : 3475 | 5 x 200 ul 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 50 uM EGTA, pH 7,4 |

Abbildung 3.5: Kopplung von SP-A an die Kuvettenoberfläche

Dargestellt sind die Meßdaten sowie das während der Messung aufgezeichnete Meßprotokoll.

3.3 Methodenapplikation

Als Ausgangspunkt der Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen SP-A und Liposomen als Liganden diente der in der Literatur beschriebene Aggregationstest für natives SP-A (89). Analoge Trübungsmessungen wurden zur Kontrolle der Aktivität der SP-A Präparate durchgeführt. Dabei wird die Absorptionsänderung einer Probe aus SP-A und Liposomen bei 400 nm vor und nach Zugabe von millimolaren Calciumkonzentrationen gemessen. Kontrollversuche ohne SP-A oder mit höherer Konzentration an BSA zeigen, daß in Abwesenheit des Surfactantproteins keine Reaktion erfolgt (Abbildung 3.6). Zu allen beschriebenen Untersuchungen wurden, sofern nicht anders vermerkt, Liposomen verwendet, die die Zusammensetzung des natürlichen Lungensurfactants imitieren (sog. DPPC-Mix-Liposomen, bestehend aus 55% DPPC, 25% EiPC, 10% PG, 10% Cholesterin, Angaben in Gewichtsprozent). Es wurden Messungen mit SP-A-Präparaten aus Lungen von Ratte, Rind und Schaf durchgeführt.

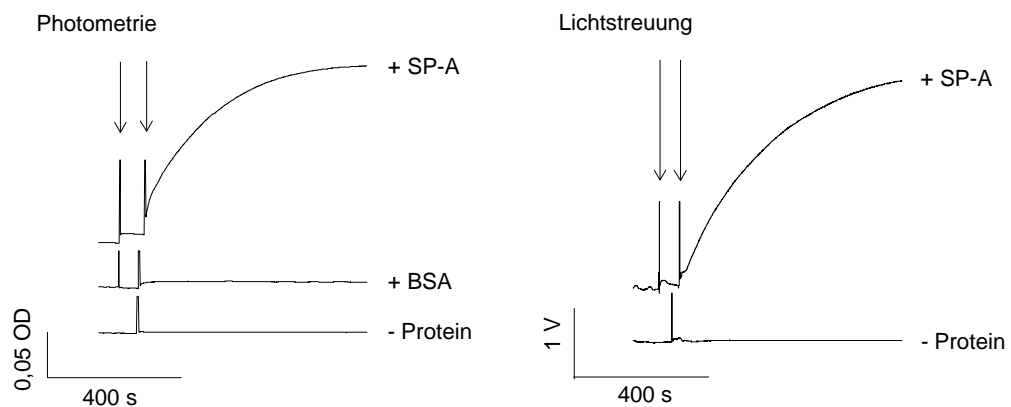


Abbildung 3.6: SP-A vermittelte Liposomenaggregation in Photometrie und kinetischer Lichtstreuung

Einer Liposomensuspension in 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 50 μ M EGTA werden zunächst das Protein, anschließend 4,5 mM Calcium zugesetzt. Jede Zugabe ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die finale Konzentration beträgt 613 μ M Lipid (50 nm DPPC-Mix-Liposomen), 10 nM SP-A und 333 nM BSA.

3.3.1 Kinetische Lichtstreuung

Die Bedingungen der in der Küvette des Spektralphotometers durchgeführten Trübungsmessungen sind direkt auf die Lichtstreuapparatur übertragbar (Abbildung 3.6). Die kinetische Lichtstreuung ist analog zum Aggregationstest ein Monitor der gesamten Interaktion, d.h. bei manueller Zugabe von Calcium beobachtet man i. w. die SP-A induzierte Liposomenaggregation. Ein Vorteil der Lichtstreuung gegenüber der Photometrie ist

1. die hohe zeitliche Auflösung der Signale und
2. das geringere Probenvolumen (für die Photometrie werden minimal 400 µl Probe benötigt, für die Lichtstreuung nur 200 µl).

Um das in der hohen Zeitauflösung liegende Potential der Lichtstreuung zu nutzen, ist allerdings eine Modifikation des Aggregationstests erforderlich. Durch die Störung des Systems bei manueller Calciumzugabe ist eine Zeitauflösung im Millisekundenbereich und die Detektion geringer Änderungen der Streulichtintensität nicht möglich. Daher wurde zur Messung der Startphase DM-Nitrophen als photolabiler Calciumchelator verwendet. Durch einen UV-Blitz werden Calciumionen aus der Verbindung freigesetzt und homogen in der Küvette verteilt, was einen Reaktionsstart in Suspension ermöglicht.

3.3.2 Resonant Mirror Spektroskopie

Als Methode zur Untersuchung der Liposomenbindung an immobilisiertes SP-A wurde die Resonant Mirror Spektroskopie in die Messungen einbezogen. Ein Vorteil dieser Methode liegt in der äußerst geringen Menge des zu immobilisierenden Proteins (minimal 0,3 µg). Über den homobifunktionellen Crosslinker BS³ wird SP-A kovalent an die Aminosilanoberfläche gebunden und steht für mehrere Messungen zur Verfügung. Untersucht man die Bindung von Liposomen an immobilisiertes SP-A mit der Resonant Mirror Spektroskopie, so ist die Meßgröße der Resonanzwinkel. Eine Zunahme des Resonanzwinkels indiziert eine Akkumulation des Reaktionspartners in der etwa 200 nm dicken Sensorschicht bei anderweitig konstant bleibenden Bedingungen. Die Ursache für die Veränderung des Resonanzwinkels ist eine Änderung des Brechungsindex, die im Meßsystem durch die Bindung der Liposomen an SP-A hervorgerufen werden kann.

In der Literatur gibt es bisher keine Beschreibung von Anwendungen der Resonant

Mirror Spektroskopie zur Untersuchung von SP-A-Interaktionen. Daher ist eine sorgfältige Kontrolle bezüglich der Funktionalität des immobilisierten Proteins und der Spezifität der gemessenen Signale erforderlich. Es wurden sowohl Küvetten ohne SP-A (blanke Oberfläche) als auch Küvetten, auf deren Oberfläche das Protein nach Immobilisation hitzedenaturiert wurde, in Kontrolllexperimente einbezogen.

Dabei zeigt sich, daß die Versuchsbedingungen des Liposomenaggregationstests mit Zugabe von millimolaren Calciumkonzentrationen nicht ohne weiteres auf die Resonant Mirror Spektroskopie übertragbar sind. Millimolare Calciumkonzentrationen ermöglichen die Adsorption von Liposomen an der Küvettenoberfläche und führen zu unspezifischen Signalen (Abbildung 3.7).

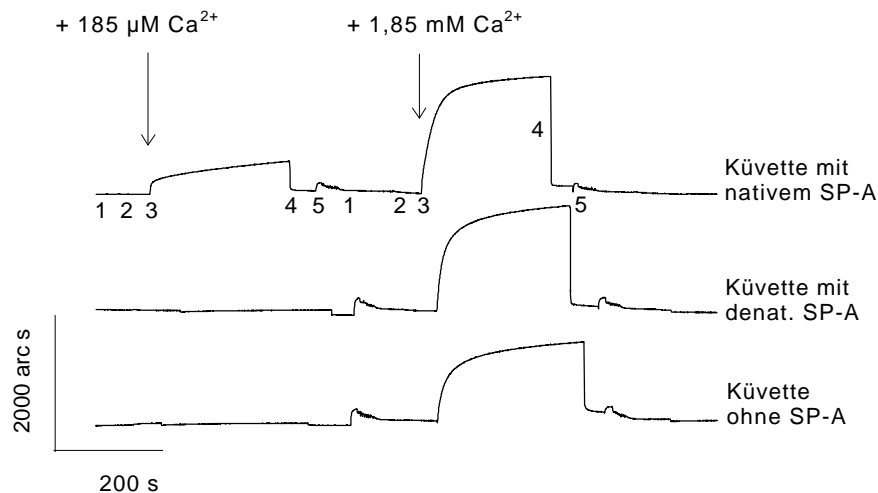


Abbildung 3.7: Spezifische und unspezifische Bindung von Liposomen an immobilisiertes SP-A bei Zugabe unterschiedlicher Calciumkonzentrationen

In jedem Versuch wurden in der Küvette 100 µl 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 50 µM EGTA, pH 7,4 vorgelegt (1) und 10 µl 10 mg/ml Liposomen (90% DPPC, 10% Cholesterin), in entsprechendem Puffer suspendiert, hinzugefügt (Liposomendurchmesser ca. 50 nm, Lipidkonzentration 1230 µM) (2). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 185 µM bzw. 1,85 mM Ca^{2+} gestartet (3) und war reversibel bei Zugabe von 185 µM EDTA bzw. 9 mM EDTA (4). Anschließend wurde einmal mit 10 mM EDTA, 10 mM Tris, 0,1% Tween-20, pH 7,4 und mehrmals mit Puffer gewaschen (5). Die Versuchsdurchführung war für die drei dargestellten Küvetten identisch.

Bei Verwendung geringer Calciumkonzentrationen im mikromolaren Bereich ist die SP-A-Spezifität der Reaktion hingegen deutlich erkennbar (Abbildung 3.7). Dargestellt sind jeweils zwei hintereinander durchgeführte Versuche mit verschiedenen Calciumkonzentrationen, die in drei verschiedenen Küvetten durchgeführt wurden. Bei Zugabe mikromolarer Calciumkonzentrationen (185 μM , erste Zugabe) erkennt man nur in Gegenwart von nativem SP-A ein Bindungssignal. Bei millimolaren Calciumkonzentrationen (1,85 mM, zweite Zugabe) tritt unabhängig von Anwesenheit oder Zustand des immobilisierten Proteins ein Signal auf, welches das durch SP-A hervorgerufene Signal überlagert. Betrachtet man eine Messung mit mikromolaren Calciumkonzentrationen genauer, so zeigen die in Abbildung 3.8 dargestellten Messungen jeweils den typischen Verlauf eines Experiments mit der Resonant Mirror Spektroskopie. Vorgelegt wurde im ersten Versuch eine Küvette mit nativem, immobilisierten SP-A und Puffer. Bei der Zugabe von Liposomen wird eine geringe Änderung des Brechungsindex registriert. Diese tritt vor allem bei hohen Liposomenkonzentrationen und bei der erstmaligen Benutzung der Küvetten mit gekoppeltem SP-A auf. Nach der Calciumzugabe kommt es zu einem starken Anstieg des Resonanzwinkels, der die Bindung der Liposomen an das SP-A zeigt.

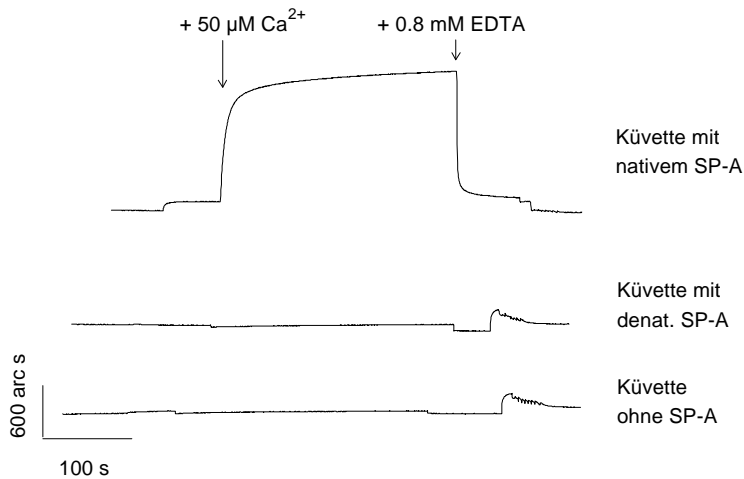


Abbildung 3.8: Kontrollexperimente zur Resonant Mirror Spektroskopie

Reaktion von immobilisiertem Schaf-SP-A mit $676 \mu\text{M}$ Lipid (Durchmesser der Liposomen 50 nm , Zusammensetzung: 89% DPPC, 10% Cholesterin, 1% α -Tocopherol) in 100 mM NaCl , 5 mM Tris , $50 \mu\text{M EGTA}$, $\text{pH } 7,4$ nach Zugabe von $50 \mu\text{M Calcium}$.

Die Liposomen werden durch das immobilisierte Protein an der Oberfläche der Küvette gebunden und führen zu einem Anstieg des Brechungsindex in der Sensorschicht. Die Zugabe von Calciumchelatoren, wie EDTA oder EGTA, führt zu einer raschen Abnahme des Resonanzwinkels, als Indikator der Dissoziation der Liposomen vom SP-A bei niedriger Calciumkonzentration. Durch erneute Zugabe von Calcium kann nach der Dissoziation erneut eine Assoziationsreaktion gestartet werden, die wiederum reversibel ist.

Das Auftreten reversibler Bindungssignale bei mikromolaren Calciumkonzentrationen ist charakteristisch für das ternäre System aus SP-A, Calcium und Liposomen. Fehlt einer der Reaktionspartner oder liegt denaturiertes SP-A vor, erfolgt keine Reaktion. Als Kriterium für die Qualität dieser Oberflächenmethode wurde die Proportionalität des Meßsignals zur Menge des an der Oberfläche immobilisierten Proteins unter konstanten Versuchsbedingungen untersucht. Es wurde eine Linearität zwischen Meßsignal und Kopplungssignal in einem breiten Konzentrationsbereich, unter Verwendung verschiedener SP-A Präparate, festgestellt (Abbildung 3.9).

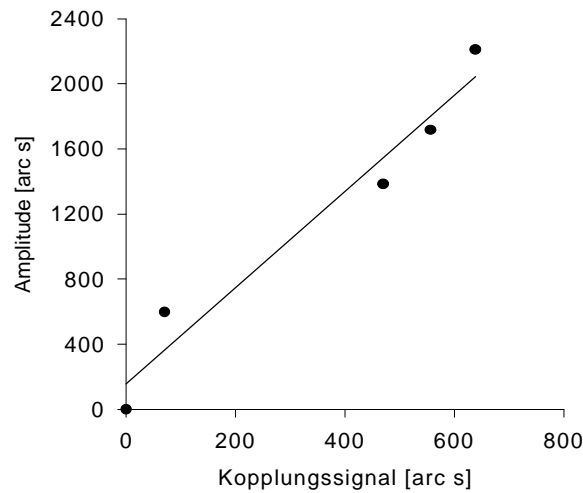


Abbildung 3.9: Abhängigkeit des Meßsignals von der Menge des immobilisierten Proteins

Aufgetragen ist der durch die Kopplung von SP-A an die Küvettenoberfläche erhaltene Resonanzwinkel (Kopplungssignal) gegen den Resonanzwinkel, der für die jeweilige Küvette bei Reaktion mit durchschnittlich 387 μM Lipid (min. 363 μM , max. 418 μM Phosphatidylcholin, Liposomendurchmesser ca. 50 nm, 90% DPPC, 10% Cholesterin) nach Zugabe von 90 μM Calcium bestimmt wurde. Zur Kopplung wurden zwischen 0,3 μg und 30 μg SP-A eingesetzt.

Die Reproduzierbarkeit der Experimente ist bei hintereinander durchgeführten Messungen gut (Abbildung 3.10), allerdings ist eine Alterung des immobilisierten Proteins bei mehrmaligen Messungen oder Lagerung zu beobachten.

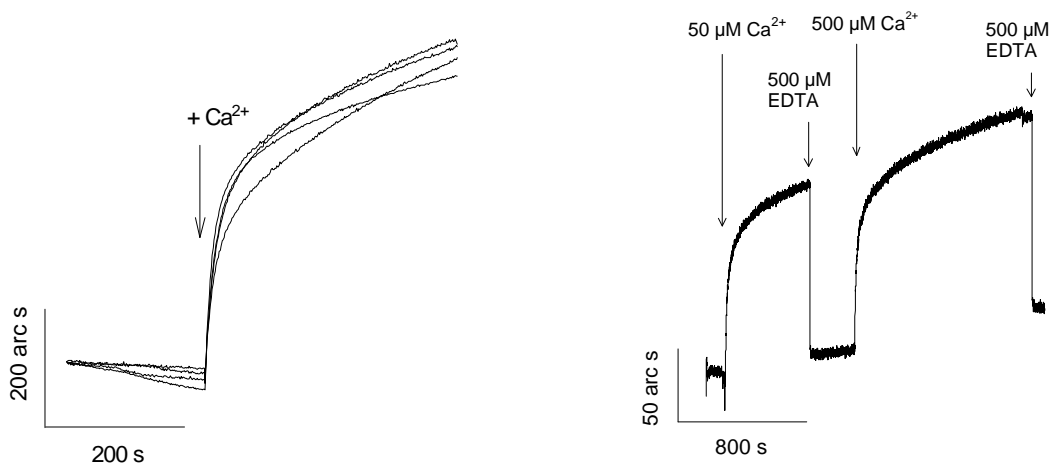


Abbildung 3.10: Reproduzierbarkeit der Messungen

Dargestellt sind die Original-Meßdaten ohne Korrektur der Basislinie.

Links: Vier Messungen der Bindung von 200 nm DPPC-Mix-Liposomen (588 μM Lipid) an immobilisiertes Schaf-SP-A nach Zugabe von 87 μM Calcium.

Rechts: Immobilisiertes Ratten-SP-A reagiert mit Liposomen in 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 50 μM EGTA, pH 7,4 nach Zugabe von 50 μM Calcium. Die Reaktion ist reversibel durch Zugabe von 500 μM EDTA und kann durch Zugabe einer äquimolaren Calciummenge wieder gestartet werden.

Zur Kopplung wurden zwischen 0,3 μg und 30 μg Protein (0,5 pmol bis 5 pmol) eingesetzt. Die Kopplungsreaktion verläuft nicht vollständig. Aus der Höhe des Kopplungssignals kann man, nach den Angaben des Herstellers, lediglich näherungsweise die insgesamt immobilisierte Proteinmenge berechnen. Sie beträgt in den dargestellten Experimenten zwischen 0,01 und 0,04 pmol. Ein weiteres Problem der Messungen besteht darin, daß die Menge an aktivem, d.h. lipidbindendem Protein, an der Küvettenoberfläche nicht genau bekannt ist.

4 Ergebnisse

Eine charakteristische *in vitro* Reaktion von SP-A ist die calciumabhängige Liposomenaggregation. Diese ist als interessanter Einstieg zur Anwendung biophysikalischer Methoden bei der Untersuchung von Komponenten des Surfactants gewählt worden (siehe 3.3).

Die calciumabhängige Interaktion zwischen SP-A und Liposomen ist formal in zwei Teilreaktionen zerlegbar. Initial ist eine Bindungsreaktion der Liposomen an SP-A (bzw. umgekehrt) zu postulieren. Diese ist Voraussetzung für eine Aggregationsreaktion, d.h. Vernetzung der an SP-A gebundenen Liposomen.

Beide Schritte der Interaktion können in unterschiedlicher Weise die Anwesenheit von Calciumionen erfordern. Die Bindung von SP-A an Lipide (bzw. umgekehrt) wird in der Literatur sowohl als calciumabhängig als auch als calciumunabhängig dargestellt (siehe 2.3). Dieser Unterschied wird auf verschiedene Präparationsmethoden zurückgeführt (86). Zur SP-A induzierten Aggregation von Phospholipidliposomen ist nach den vorliegenden Erkenntnissen immer Calcium erforderlich, wenn auch in unterschiedlichen Konzentrationen.

Mit den biophysikalischen Methoden der Resonant Mirror Spektroskopie und der Lichtstreuung ist es möglich, Bindung und Aggregation als voneinander getrennte Vorgänge zu analysieren. Durch die Immobilisation von SP-A an der Küvettenoberfläche ist eine nachfolgende Aggregation nicht möglich, der Bindungsvorgang kann unabhängig von der Aggregation beobachtet werden.

4.1 Calciumabhängigkeit der Interaktion zwischen SP-A und Liposomen

4.1.1 Messungen mit Resonant Mirror Spektroskopie

Die SP-A spezifische, durch mikromolare Calciumkonzentrationen ausgelöste Bindungsreaktion kann in Abhängigkeit von der freien Calciumkonzentration gesteuert werden (Abbildung 4.1). Schrittweises Hinzufügen von Calciumchelatoren während der Assoziationsphase einer Reaktion führt zunächst nicht zu einer Abnahme der Signalamplitude (siehe zwei Zugaben zu Beginn der EGTA-Titration). Wahrscheinlich ist noch ausreichend Calcium für die Bindung der Liposomen an SP-A vorhanden.

Durch weitere Rücktitration von Calcium erfolgt dann eine sehr schnelle Dissoziationsreaktion. Wird das gesamte zugegebene Calcium durch eine äquimolare Menge an EGTA komplexiert, erhält man den Ausgangszustand. Das gemessene Signal sinkt dabei unter den Resonanzwinkel zu Beginn des Versuches, da die Liposomen-suspension durch Zugabe der EGTA-Lösung verdünnt wird und dadurch eine geringfügige Beeinflussung des Brechungsindex der Lösung stattfindet.

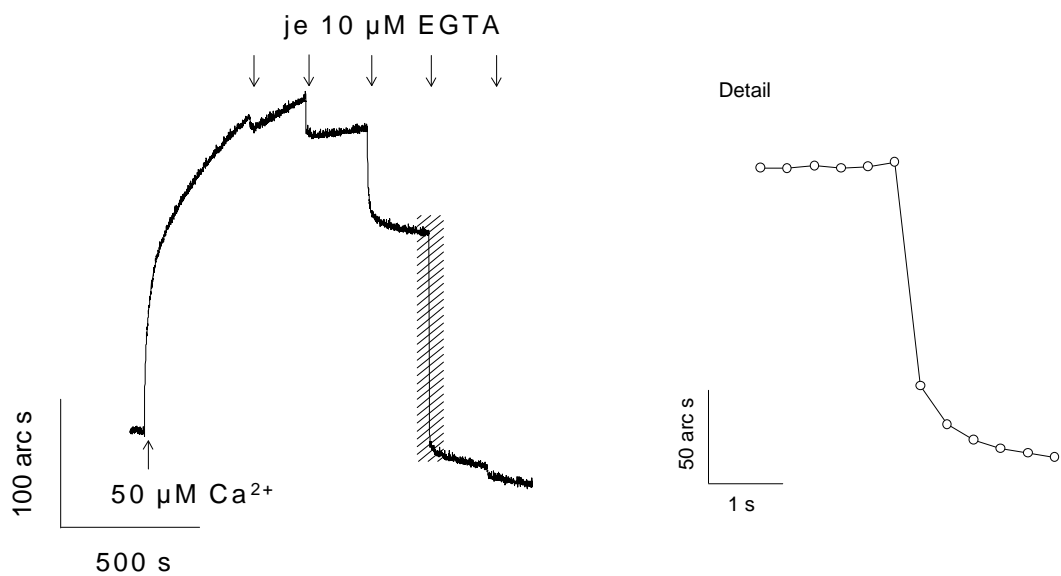
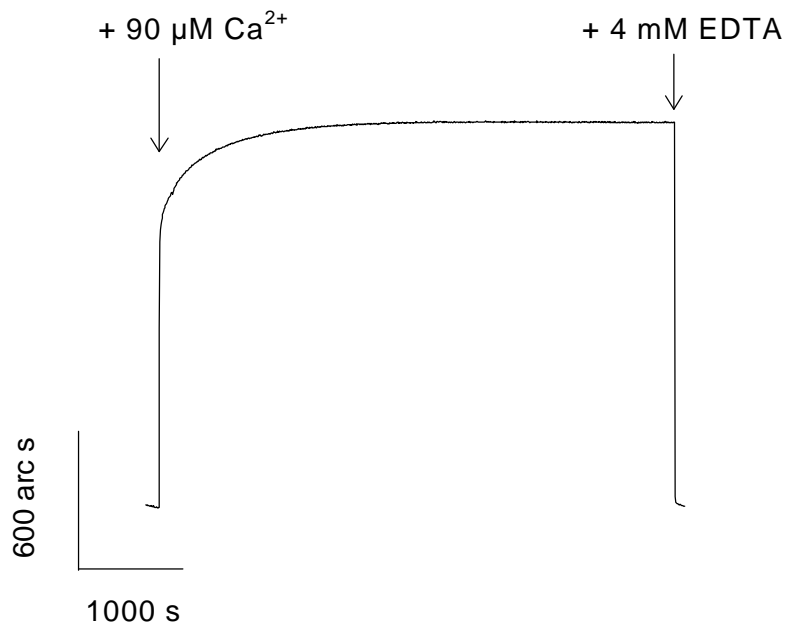


Abbildung 4.1: Calciumabhängigkeit und Reversibilität der Liposomenbindung an immobilisiertes SP-A

640 µM Lipid (200 nm DPPC-Mix-Liposomen) in 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 50 µM EGTA, pH 7,4 reagieren mit immobilisiertem Rinder-SP-A nach Zugabe von 50 µM Calcium. Die schrittweise Zugabe von EGTA führt zu einer schnellen Dissoziation der Liposomen. Der schraffierte Bereich des Resonant Mirror Signals ist im Detail vergrößert dargestellt.

Die beobachtete Reversibilität der von mikromolaren Ca²⁺-Konzentrationen abhängigen Liposomenbindung an immobilisiertes SP-A bleibt über einen langen Zeitraum erhalten und ist charakteristisch für das native Protein. Auch nach mehreren

Stunden kann durch Zugabe von EGTA oder EDTA die Dissoziation der Liposomen ausgelöst werden. Das Meßsignal sinkt auf den Ausgangswert (Abbildung 4.2).



*Abbildung 4.2: Reversibilität der Liposomenbindung an immobilisiertes SP-A
Langzeitversuch*

Dargestellt sind Resonant Mirror Signale der Reaktion von 50 nm DPPC-Mix-Liposomen (Konzentration an Phosphatidylcholin: 2334 μM) in 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 50 μM EGTA, pH 7,4 mit immobilisiertem Schaf-SP-A nach Zugabe von 90 μM Calcium. Die Reaktion ist auch nach 1,5 Stunden noch reversibel.

4.1.2 Kinetische Lichtstreuung

Im Gegensatz zu Messungen mit der Resonant Mirror Spektroskopie, die ein Monitor für die Bindung von Liposomen an SP-A ist, zeigt die kinetische Lichtstreuung den gesamten Verlauf der Interaktion, d.h. Bindung und Aggregation der in Suspension befindlichen Reaktionspartner. Nach manueller Zugabe von Calcium manifestieren sich insbesondere die Aggregationssignale in einer starken Zunahme der Lichtstreuung (Abbildung 4.3), während die Liposomenbindung an SP-A durch die bei der Zugabe verursachten Störungen nicht gemessen werden kann.

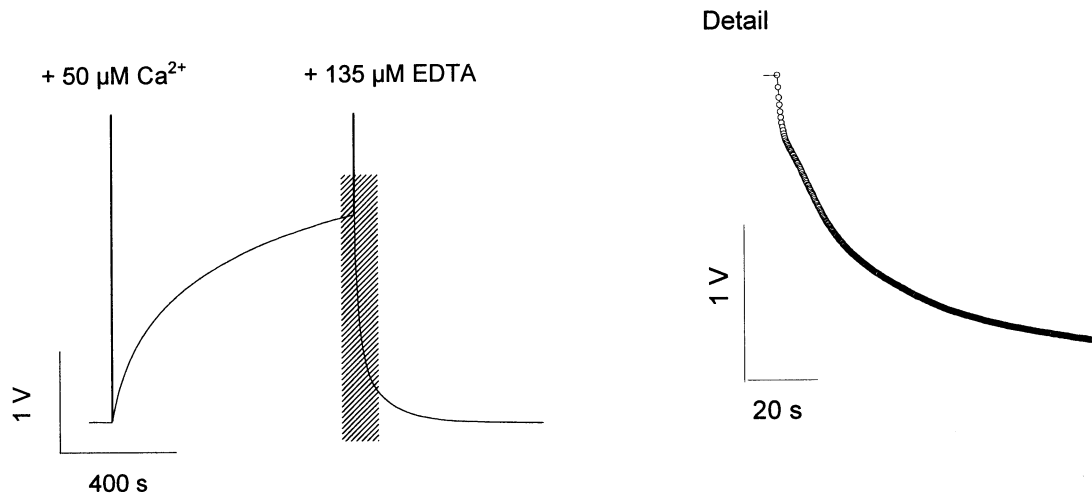


Abbildung 4.3: Reversibilität der Aggregationsreaktion

Die Abbildung zeigt den Verlauf der Aggregation von 1350 µM Lipid (200 nm DPPC-Mix-Liposomen) und 12 nM Schaf-SP-A in 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 50 µM EGTA, pH 7,4 nach Zugabe von 50 µM Calcium, gemessen mit kinetischer Lichtstreuung. Durch Zugabe von EDTA ist die Reaktion vollständig reversibel. Die Halbwertszeit der „Disaggregation“ liegt bei etwa 18 s, der schraffierte Bereich ist vergrößert im Detail dargestellt.

Die Zugabe von Calciumchelatoren (EDTA oder EGTA) im Überschuß führt zu einem Zerfall der Aggregate und die Signalintensität sinkt auf den Anfangswert. Die vollständige Reversibilität der Reaktion zeigt, daß eine Vergrößerung der Liposomen, z. B. durch SP-A induzierte Fusion, nicht stattfindet. Kontrollen ohne SP-A oder Calcium zeigen keine Änderungen der Lichtstreuung (siehe Abbildung 4.4).

Vergleicht man die Geschwindigkeit der Dissoziation der Liposomen vom immobilisierten SP-A mit dem Zerfall der Aggregate (Abbildung 4.1 und 4.3), so liegt die Halbwertszeit der Dissoziation bei etwa 0,3 s, während die Halbwertszeit der Disaggregation ca. 18 s beträgt. Die 0,3 s der Dissoziationsreaktion sind nur eine obere Grenze für den tatsächlichen Meßwert, da die Zeitauflösung des Geräts in dieser Größenordnung liegt.

4.1.3 Einfluß der Calciumkonzentration

Die Reaktion zwischen SP-A und Liposomen erfolgt im Bereich mikromolarer Calciumkonzentrationen. Eine genaue Quantifizierung der Calciumkonzentrationen in der

Probe ist aus experimentellen Gründen schwierig, da Calciumkontaminationen in SP-A, Natriumchlorid, Wasser und Puffersubstanzen vorkommen. Photometrische Bestimmungen des Calciumgehalts mit Arsenazo III (100) ergaben für die Calciumkonzentrationen im Puffer Werte um 20 μM . Eine Bestimmung mit Atomabsorptionsspektroskopie führte zu Konzentrationen von maximal 6 μM Calcium. Mit beiden Methoden ist die Festlegung des Nullwertes (calciumfreie Lösung) ein besonderes Problem. Daher sind Angaben zur freien Calciumkonzentration in Lösung stets mit Unsicherheiten behaftet.

Der Einfluß dieser geringen Calciumkonzentrationen in Puffer und Proben läßt sich im Lichtstreuexperiment deutlich zeigen: Bei Verwendung eines Puffers ohne Calciumchelator erfolgt ein deutlicher Anstieg der Lichtstreuintensität nach Zugabe von SP-A, der in einer Probe mit 20 μM EDTA im Puffer geringer ist. Umgekehrt erkennt man in der Probe ohne Calciumchelator nach anschließender Zugabe von 300 μM Calcium eine geringere Zunahme der Lichtstreuung bei der anschließenden Aggregationsreaktion im Vergleich zu der Liposomensuspension, die 20 μM EDTA enthält. Als Kontrollen sind Messungen ohne Liposomen sowie ohne SP-A dargestellt (Abbildung 4.4). Derartige Messungen waren ein erster Hinweis auf die Empfindlichkeit des Systems gegenüber Calciumionen.

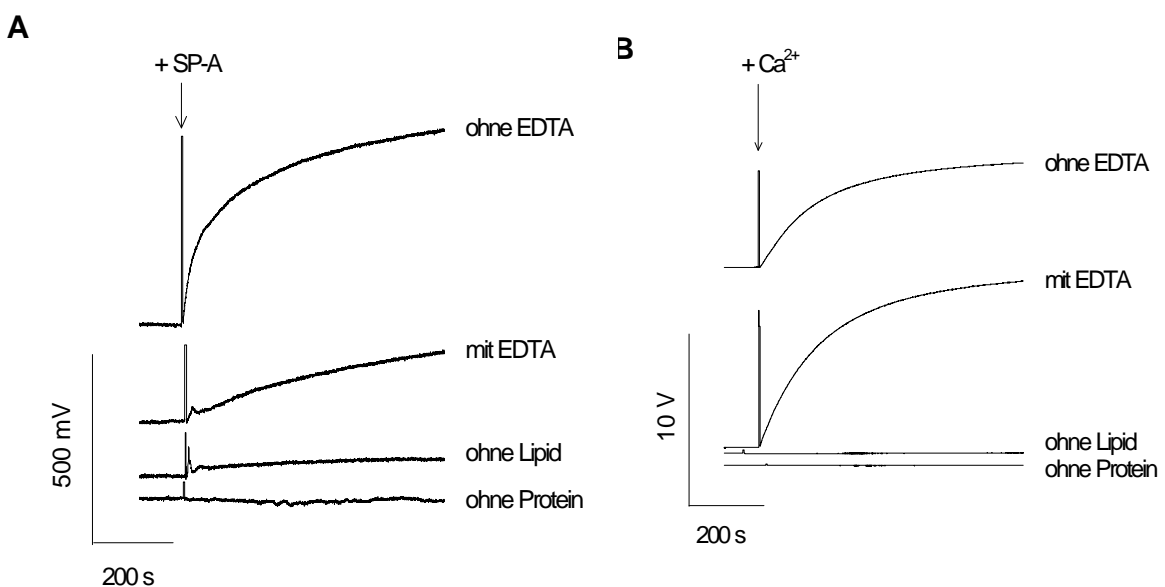


Abbildung 4.4: Lichtstreuungssignale bei der Probenvorbereitung (A) und der Aggregationsreaktion nach Zugabe von 300 μM Calcium (B)

307 μM Lipid als 200 nm DPPC-Mix-Liposomen reagieren mit 9,1 nM SP-A unter verschiedenen Bedingungen nach Zugabe des Proteins (A) und Zugabe von 300 μM Calcium (B). Es wurden Versuche in 100 mM NaCl, 5 mM Tris, pH 7,4 (ohne EDTA) und in einem Puffer mit 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 20 μM EDTA, pH 7,4 (mit EDTA) sowie Kontrollversuche in 100 mM NaCl, 5 mM Tris, pH 7,4 ohne Lipid bzw. Protein durchgeführt, in denen anstelle von Protein oder Liposomen die entsprechende Flüssigkeitsmenge an Puffer ergänzt wurde.

Um unerwünschte Reaktionen im Bereich geringer Calciumkonzentrationen zu vermeiden, wurde in den Versuchen routinemäßig Puffer mit 50 μM EGTA eingesetzt, das Calciumverunreinigungen komplexiert. Untersucht man die Calciumabhängigkeit der Reaktion von SP-A und Liposomen in einem solchen Puffersystem und trägt die Amplituden von Bindungs- bzw. Aggregationssignalen nach 200 s bzw. 400 s gegen die zugesetzte Calciumkonzentration auf, so ergibt sich der in Abbildung 4.5 dargestellte Kurvenverlauf. Liposomenbindung und -aggregation werden bei Zugabe mikromolarer Calciumkonzentrationen sichtbar und zeigen einen ähnlichen Verlauf (Abbildung 4.5).

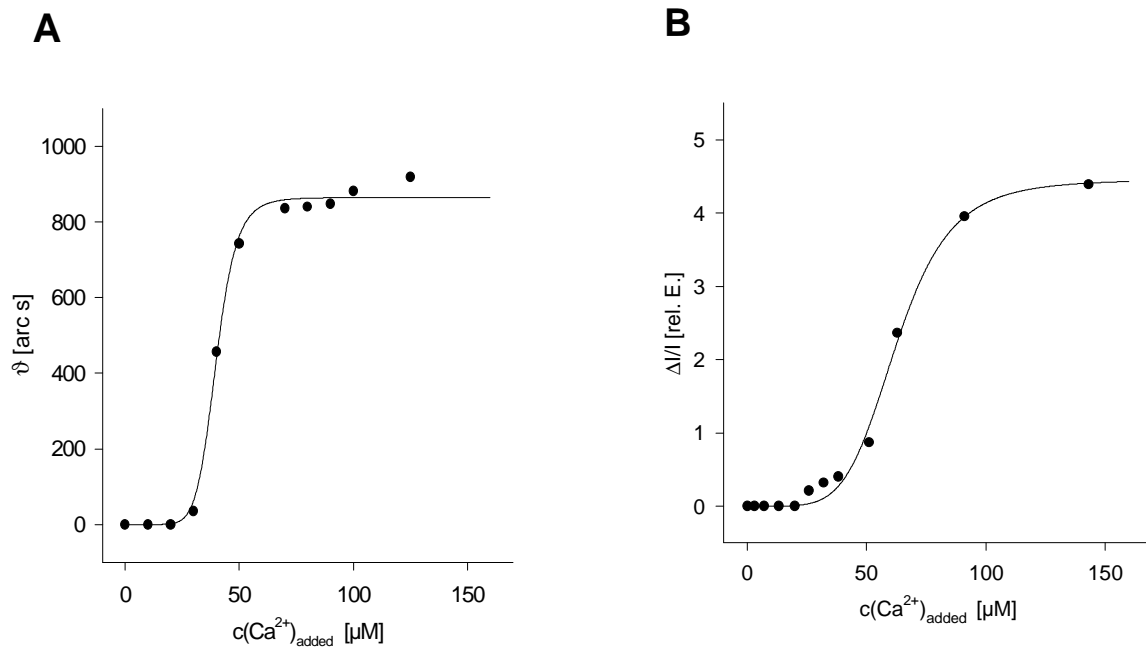


Abbildung 4.5: Bindungs- (A) und Aggregationssignale (B) in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration

Immobilisiertes Rinder-SP-A wurde mit 640 μM Lipid (200 nm DPPC-Mix-Liposomen) in 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 50 μM EGTA, pH 7,4 durch Zugabe von Calcium zur Reaktion gebracht. Die Signalamplituden nach 200 s (Resonant Mirror Spektroskopie, A) bzw. 400 s (Lichtstreuung, B) nach Zugabe von Calcium sind gegen die zugesetzte Calciumkonzentration aufgetragen. Bei der Lichtstreuung wurde das jeweils erhaltene Meßsignal durch die Grundstreuung der Probe dividiert, daher ergaben sich für die Einheiten relative Werte (r.E.). Die Punkte wurden mit einer Hill-Gleichung angepaßt, die Parameter sind in Tabelle 4.1 zusammengefaßt.

Tabelle 4.1:

Mathematische Anpassung der Bindungs- und Aggregationssignale in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration

Fit: $f = [A * (Ca^{2+})^n] / [(Ca^{2+})^n + K_{0,5}^n]$, A: Amplituden, n: Hill-Koeffizienten

Angegeben sind die erhaltenen Werte sowie die Standardabweichung.

| | Resonant Mirror Spektroskopie | Lichtstreuung |
|----------------------|-------------------------------|--------------------------|
| A | 865 ± 13 [arc s] | 4.5 ± 0.14 [rel. E.] |
| n | 8.8 ± 1.2 | 5.5 ± 0.62 |
| $K_{0,5}$ [μ M] | 40 ± 0.6 | 62.7 ± 1.15 |

Etwas genauere quantitative Zusammenhänge zur Calciumabhängigkeit der Interaktion zwischen SP-A und Liposomen erhält man aus Messungen mit der Resonant Mirror Spektroskopie.

Da das Protein kovalent an die Küvettenoberfläche gebunden ist, besteht die Möglichkeit, es mit hohen EGTA Konzentrationen zu waschen, um präparationsbedingt an das Protein gebundenes Calcium zu entfernen. Die Calciumkonzentration in der Küvette kann dann näherungsweise aus der Menge an Calcium und EGTA im Puffer und der zugegebenen Menge an Calcium berechnet werden.

Nimmt man die Calciumkonzentration im Puffer mit 5 μ M (untere Grenze) und 20 μ M (obere Grenze) an, so ergeben sich die in Abbildung 4.6 dargestellten Abhängigkeiten der Liposomenbindung von der freien Calciumkonzentration. Man erkennt einen sigmoiden Verlauf der Kurven, in Abhängigkeit von der abgeschätzten Calciumkonzentration erhält man einen Hill-Koeffizienten von 2,6 (Annahme: 5 μ M, untere Grenze) bzw. 7,2 (Annahme 20 μ M, obere Grenze), das auf eine Kooperativität der Untereinheiten des SP-A hinweist.

Der Umschlagsbereich zwischen Calciumkonzentrationen, bei denen eine Interaktion erfolgt und bei denen keine Reaktion beobachtet wird, ist mit 0 μ M - 3 μ M bzw. 9 μ M - 16 μ M eng. In Abhängigkeit von den vorausgesetzten Annahmen zum

Calciumgehalt des Meßansatzes liegt die zur Bindung der Liposomen an immobilisiertes SP-A erforderliche halbmaximale Calciumkonzentration zwischen 8 μM und 22 μM .

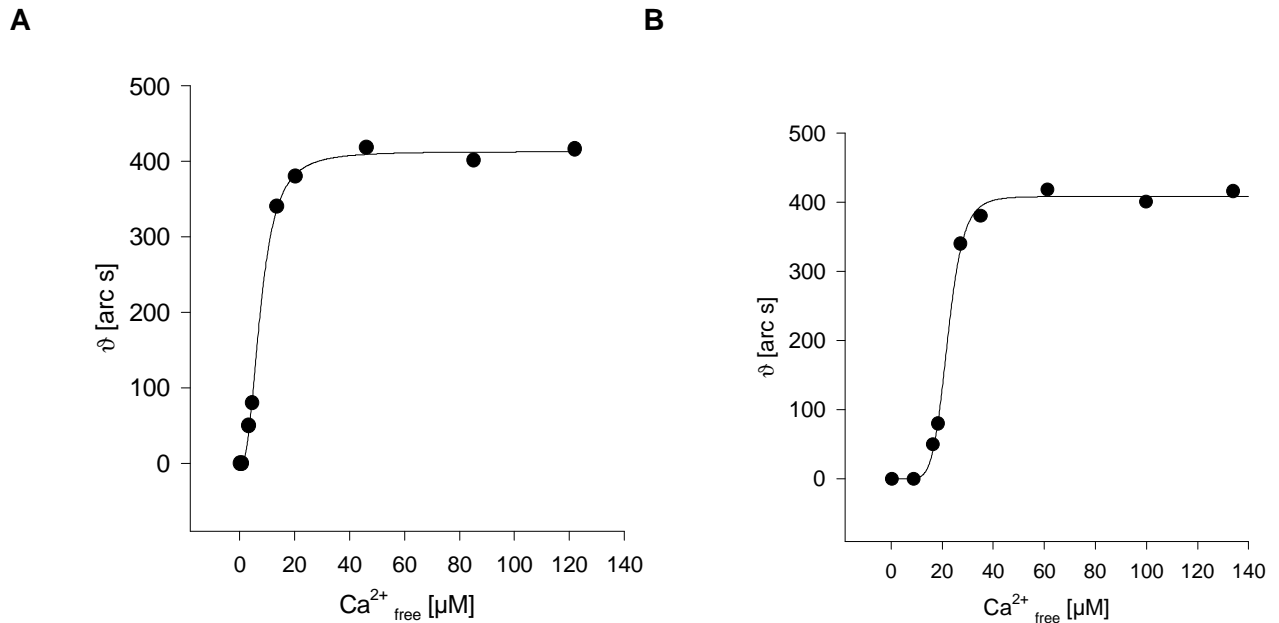


Abbildung 4.6: Bindung von Liposomen an immobilisiertes SP-A in Abhängigkeit von der freien Calciumkonzentration

Immobilisiertes Schaf-SP-A wurde mit EGTA gewaschen und mit 640 μM Lipid (DPPC-Mix-Liposomen, 200 nm) im 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 50 μM EGTA, pH 7,4 inkubiert. Die mit Resonant Mirror Spektroskopie aufgenommenen Signale 200 s nach Calciumzugabe sind gegen die freie Calciumkonzentration aufgetragen, die aus der Calciumverunreinigung im Puffer (A: 5 μM , B: 20 μM) und den zugesetzten EGTA und Calciumkonzentrationen berechnet wurde (Programm Chelator). Die Meßpunkte wurden mit der Hill-Gleichung gefittet, die erhaltenen Parameter sind in Tabelle 4.2 zusammengefaßt.

Tabelle 4.2

Bindung von Liposomen an immobilisiertes SP-A in Abhängigkeit von der freien Calciumkonzentration

Berechnung von Hill-Koeffizienten (n) und Werten für $K_{0,5}$ für die Ca^{2+} -Kooperativität von SP-A unter Annahme von 5 μM bzw. 20 μM Calciumverunreinigung im Puffer.

Fit: $f = [A * (\text{Ca}^{2+})^n] / [(\text{Ca}^{2+})^n + K_{0,5}^n]$, A: Amplituden, n: Hill-Koeffizienten

Angegeben sind die erhaltenen Werte und die Standardabweichung.

| | 5 μM Calcium im Puffer | 20 μM Calcium im Puffer |
|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| A [arc s] | 413 \pm 5 | 409 \pm 5 |
| n | 2,6 \pm 0,1 | 7,3 \pm 0,5 |
| $K_{0,5}$ [μM] | 7,7 \pm 0,3 | 22,2 \pm 0,3 |

4.1.4 Reaktion mit anderen zweiwertigen Kationen

Neben Calcium können auch andere zweiwertige Kationen, wie Strontium oder Barium eine Aggregationsreaktion zwischen SP-A und Liposomen induzieren (89). Messungen zeigen, daß auch die Bindung von Liposomen an SP-A durch mikromolare Konzentrationen an Strontium oder Barium ausgelöst werden kann (Abbildung 4.7). Die Amplitude nimmt bei konstanter Kationen- und Lipidkonzentration allerdings mit zunehmender Ordnungszahl des Ions ab. Mit Magnesium erfolgt selbst bei millimolaren Konzentrationen keine SP-A vermittelte Bindung der Liposomen an das Protein.

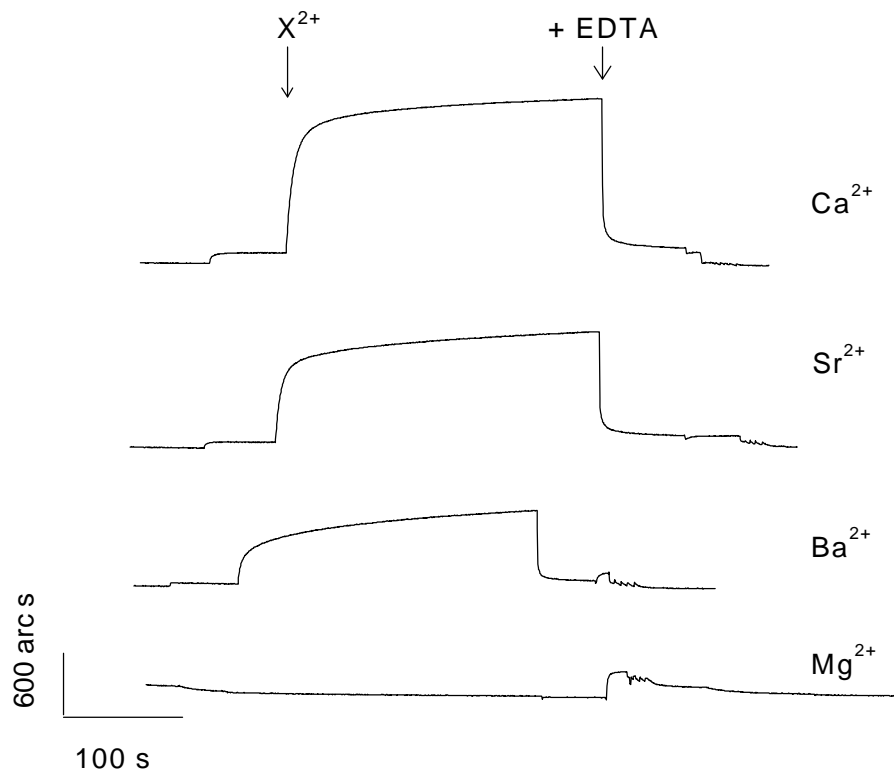


Abbildung 4.7: Abhängigkeit der Liposomenbindung von zweiwertigen Kationen

Dargestellt sind vier Messungen mit Resonant Mirror Spektroskopie. Immobilisiertem Schaf-SP-A mit 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 50 μM EGTA, pH 7,4 wurden 644 μM Lipid (89% DPPC, 10% Cholesterin, 1% α -Tocopherol, 50 nm Liposomen) zugefügt. Der Reaktionsstart erfolgt durch Zugabe von 50 μM zweiwertiger Kationen. Die Reaktion war nach Zugabe von 0,8 mM EDTA reversibel. Die Küvette wurde anschließend mehrmals mit Puffer gewaschen.

4.1.5 Beeinflussung der Reaktion durch Reduktionsmittel

Die Bindung von Liposomen an SP-A wurde in Gegenwart des Reduktionsmittels Dithiotreitol (DTT) untersucht. In der Literatur ist eine Änderung des Fluoreszenzspektrums von SP-A in Anwesenheit von Calcium beschrieben, die durch 1 mM DTT verstärkt wird (101). Dabei wurde festgestellt, daß die Bindung von Calcium durch DTT nicht beeinflusst wird. Die Autoren gehen allerdings davon aus, daß sich die Struktur des Komplexes aus Calcium und SP-A durch Reduktionsmittel verändert.

Messungen mit der Resonant Mirror Spektroskopie zeigen, daß die calciumabhängige Bindung der Liposomen an immobilisiertes SP-A in Anwesenheit von 1 mM DTT nicht und bei Zugabe von 10 mM DTT kaum beeinflusst wird (Abbildung 4.8). Dies gilt für verschiedene Lipidkonzentrationen.

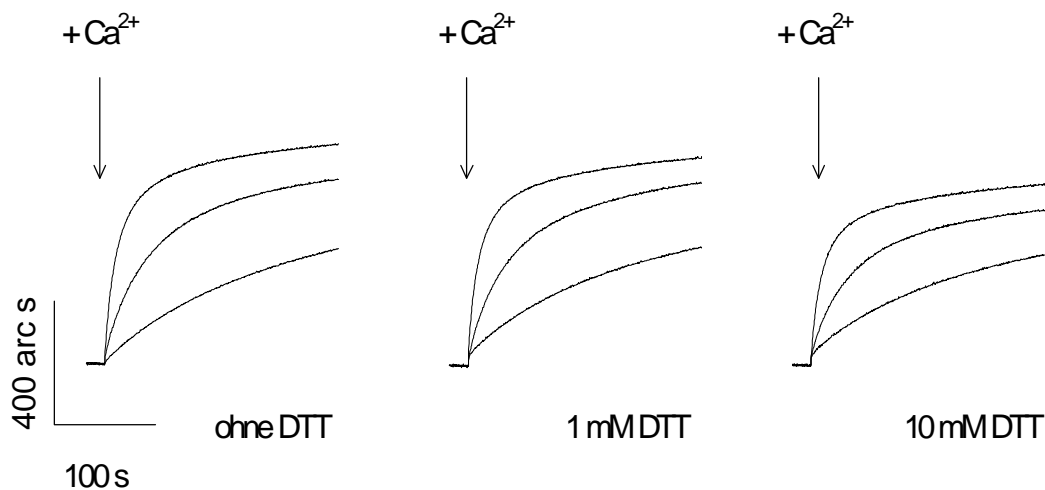


Abbildung 4.8: Bindung von Liposomen an immobilisiertes Schaf-SP-A in Gegenwart von DTT

Die Reaktion zwischen 80 µM Lipid, 320 µM Lipid bzw. 1280 µM Lipid (200 nm DPPC-Mix-Liposomen, höhere Signalintensität mit steigender Lipidkonzentration) und immobilisiertem SP-A wird durch Zugabe von 70 µM Ca²⁺ gestartet. Die dargestellten Messungen wurden mit Resonant Mirror Spektroskopie nacheinander in einer Küvette durchgeführt.

4.2 Die Geschwindigkeit der Reaktion zwischen SP-A und Liposomen

Die Messung der calciumabhängigen Reaktion zwischen SP-A und Liposomen mit hoher Zeitauflösung ist nur bei störungsfreiem Reaktionsstart durch eine schnelle Calciumfreisetzung möglich. Die Photolyse von DM-Nitrophen, als photolabilem Calciumchelator, setzt nach einem UV-Blitz Calciumionen homogen in der Lösung frei und startet somit die Interaktion durch SP-A Aktivierung (Abbildung 4.9).

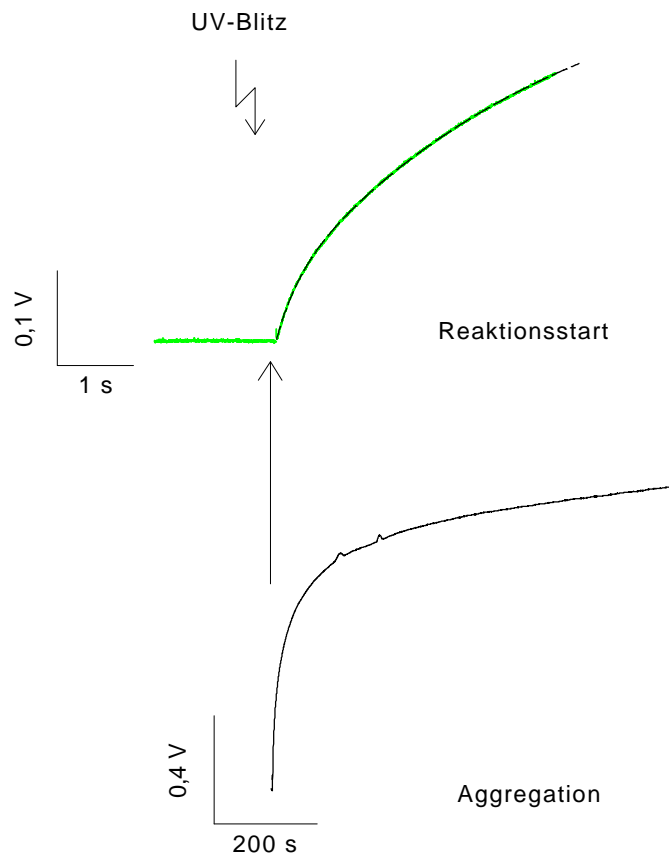


Abbildung 4.9: Interaktion zwischen SP-A und Liposomen nach Photolyse von caged Calcium

31 nM SP-A und 2000 μ M Lipid (60 nM 50 nm DPPC-Mix-Liposomen) in 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 7,5 μ M EGTA, 78 μ M Calcium, 100 μ M DM-Nitrophen, pH 7,4, reagieren nach Photolyse von DM-Nitrophen mit einem UV-Blitz. Dargestellt sind Lichtstreusignale einer Messung, die mit zwei Oszilloskopen unterschiedlicher Zeitauflösung aufgenommen wurde. Unten ist der gesamte Verlauf der Aggregation dargestellt, oben dieselbe Messung mit höherer Zeitauflösung. Der Beginn der Interaktion wurde mit zwei Exponentialfunktionen mathematisch angepaßt. Der Fit ist als schwarze, gestrichelte Linie dargestellt, er liegt genau auf den Meßwerten (durchgezogene, grüne Linie). Die Parameter für die mathematische Anpassung sind in Tabelle 4.3 (31 nM SP-A) aufgeführt.

Die Wechselwirkung zwischen SP-A und Liposomen zeigt sich in der Änderung des Lichtstreusignals. Untersucht man die ersten fünf Sekunden nach der Ca^{2+} -Freisetzung genauer (Abbildung 4.9 obere Kurve), so stellt man fest, daß der Beginn der

Interaktion zwischen SP-A und Liposomen zwei kinetische Komponenten enthält.

Die langsamere Komponente ist mit einer großen Änderung der Lichtstreuintensität verbunden. Sie kann als Beginn der Aggregationsreaktion interpretiert werden. Diese ist über einen Zeitraum von mehreren Minuten zu beobachten (Abbildung 4.9, untere Kurve). Daneben erkennt man unmittelbar nach der Photolyse von *caged Calcium* ein schnelles Signal, das wahrscheinlich die rasch erfolgende Bindung des calcium-aktivierten Proteins an die Liposomen widerspiegelt.

Bei geringen SP-A-Konzentrationen kann man eine Näherung für eine Reaktion pseudo erster Ordnung durchführen, die gilt, wenn die Konzentration eines Reaktanden (hier die Bindungsstellen an Liposomen) gegenüber der von aktivem SP-A groß ist und sich während der Reaktion nicht ändert. Für die initiale Reaktion zwischen SP-A an Liposomen erhält man Reaktionszeiten ($1/k_1$) in der Größenordnung von 0,3 s bei den verwendeten nanomolaren Konzentrationen. Die genaue Anpassung durch zwei Exponentialfunktionen und das Fehlen einer Verzögerung nach dem Reaktionsstart zeigen, daß sich aktives SP-A sehr schnell bildet, an Liposomen bindet und anschließend die Aggregationsreaktion abläuft.

4.3 Variation der SP-A-Konzentration

Die zuvor (Abschnitt 4.2) anhand einer Messung dargestellte Analyse des Beginns der Interaktion und der Aggregationsreaktion wird im folgenden anhand getrennter Meßreihen mit kinetischer Lichtstreuung durchgeführt. Dabei diente die Photolyse von *caged Calcium* zur Charakterisierung der Interaktion zu Reaktionsbeginn und der Reaktionsstart durch manuelle Zugabe von Calcium zur Messung der Aggregationsreaktion.

Variiert man im photolytischen Reaktionsansatz mit *caged Calcium* die Konzentration an SP-A bei Konstanz aller übrigen Parameter, so zeigen alle Signale in den ersten fünf Sekunden der Reaktion den zuvor beschriebenen zweiphasigen Verlauf der Lichtstreusignale (Abbildung 4.10). Die Signale steigen mit zunehmender SP-A-Konzentration, ein Indiz für die Bildung von mehr bzw. größeren Aggregaten.

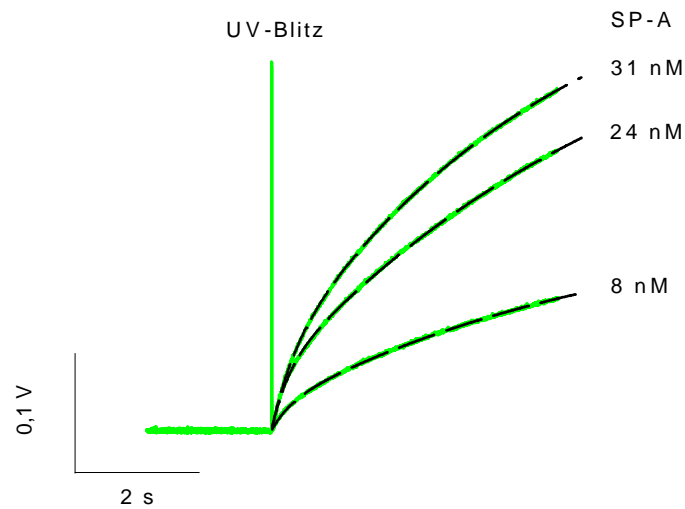


Abbildung 4.10: SP-A/Liposomen-Interaktion nach Photolyse von caged Calcium

Messungen mit kinetischer Lichtstreuung zwischen verschiedenen SP-A-Konzentrationen (gemäß Abbildung) und $2000 \mu\text{M}$ Lipid (entsprechend 60 nM 50 nm DPPC-Mix-Liposomen). Der Reaktionsstart in 100 mM NaCl , 5 mM Tris , $7,5 \mu\text{M EGTA}$, $78 \mu\text{M Calcium}$, $100 \mu\text{M DM-Nitrophen}$, $\text{pH } 7,4$ erfolgt durch Photolyse von caged Calcium. Die Signale (durchgezogene, grüne Linien) wurden mit einer Summe aus zwei Exponentialfunktionen angepaßt (gestrichelte, schwarze Linien), die Werte finden sich in Tabelle 4.3.

Tabelle 4.3:

SP-A/Liposomen-Interaktion nach Photolyse von *caged Calcium*

Fit: $f(t) = A_1 \cdot \{1 - \exp[(-k_1) \cdot t]\} + \{A_2 \cdot [1 - \exp[(-k_2) \cdot t]]\}$, A_1 , A_2 : Amplituden der ersten und zweiten Phase, k_1 , k_2 : Geschwindigkeitskonstanten der ersten und zweiten Phase

Die mathematische Anpassung wurde hier wie im folgenden mit dem Programm Sigma Plot 2.01 durchgeführt. Die Standardabweichung für die berechneten Parameter lag i.d.R. zwei Größenordnungen unter dem tabellierten Wert. Da hier eine beispielhafte Darstellung erfolgt, wurde auf die detaillierte Auflistung verzichtet.

| c(SP-A) [nM] | A_1 [V] | k_1 [s^{-1}] | A_2 [V] | k_2 [s^{-1}] |
|--------------|-----------|--------------------|-----------|--------------------|
| 8 | 0,01907 | 3,349 | 0,1596 | 0,1825 |
| 24 | 0,04507 | 3,881 | 0,3586 | 0,1616 |
| 31 | 0,05477 | 2,9030 | 0,3619 | 0,2169 |

Neben der Untersuchung der Interaktion mit hoher Zeitaufösung nach Blitzlicht-photolyse von *caged Calcium* wurde die Aggregationsreaktion über einen Zeitraum von mehreren Minuten in der kinetischen Lichtstreuung verfolgt. Dabei wird die Reaktion durch manuelle Calciumzugabe gestartet, so daß die ersten Sekunden der Interaktion zwischen SP-A und Liposomen durch die Zugabe gestört und nicht meßbar sind. Die Bindungsreaktion ist aufgrund dieser Störungen nicht zu erkennen. Im folgenden Aggregationsprozeß werden daher vorwiegend SP-A/Liposomen-Komplexe untereinander oder mit weiteren Liposomen reagieren. Dieser Prozeß wird als eine Reaktion betrachtet (einphasiger Fit, siehe 4.4), im Gegensatz zu der durch Photolyse ausgelösten Interaktion, bei der Bindung und Aggregation ineinander übergehen (zweiphasiger Fit, siehe 4.3) und sich nicht durch einen einphasigen Reaktionsverlauf anpassen lassen. Registriert man über einen längeren Zeitraum eine Aggregationsreaktion nach manueller Calciumzugabe in einer Suspension von SP-A und Liposomen, so wird wie bei der Messung der Interaktion nach Photolyse von *caged Calcium* eine Abhängigkeit von der SP-A-Konzentration erkennbar (Abbildung 4.11).

Höhere SP-A-Konzentrationen führen zu größeren Aggregationssignalen. Bei konstanter Lipid- und Calciumkonzentration ist das Ausmaß der Aggregation von der SP-A-Konzentration abhängig. Damit bestimmt die Menge des nach kurzer Zeit an die Liposomen gebundenen SP-A den Aggregationsprozeß.

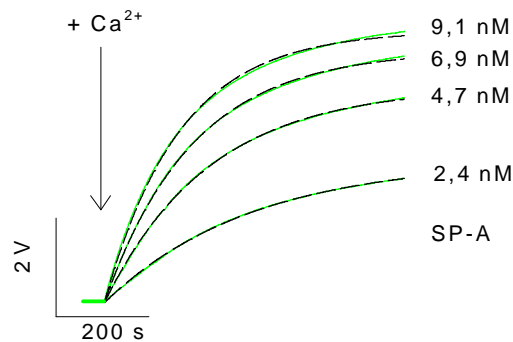


Abbildung 4.11: Effekt verschiedener SP-A-Konzentrationen auf die Aggregationsreaktion

Verschiedene Konzentrationen Schaf-SP-A reagieren mit $640 \mu\text{M}$ Lipid (200 nm DPPC-Mix-Liposomen) nach Zugabe von $50 \mu\text{M}$ Calcium in 100 mM NaCl, 5 mM Tris, $50 \mu\text{M}$ EGTA, $\text{pH } 7,4$. Die mit kinetischer Lichtstreuung erhaltenen Meßsignale (durchgezogene, grüne Linien) lassen sich jeweils mit einer Exponentialfunktion anpassen (unterbrochene, schwarze Linie), deren Parameter in Tabelle 4.4 zusammengefaßt sind.

Tabelle 4.4:

Effekt verschiedener SP-A-Konzentrationen auf die Aggregationsreaktion

Fit: $f(x) = A \cdot \{1 - \exp[-(k) \cdot t]\}$, A: Amplitude, k: Geschwindigkeitskonstanten

| c(SP-A) | 2,4 nM | 4,7 nM | 6,9 nM | 9,1 nM |
|---------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| A | 2,9 V | 4,4 V | 5,1 V | 5,5 V |
| k | $0,0032 \text{ s}^{-1}$ | $0,0044 \text{ s}^{-1}$ | $0,0052 \text{ s}^{-1}$ | $0,0061 \text{ s}^{-1}$ |

Eine mathematischer Anpassung der Lichtstreusignale mit einer Exponentialfunktion zeigt eine Zunahme der Amplituden und k_{on} -Werte für die Aggregationsreaktion mit

steigender SP-A-Konzentration. Die Vergrößerung der on-Rate erklärt sich durch die Zunahme der Konzentration an aktiviertem SP-A: Je mehr SP-A vorhanden ist, um so schneller kann es pro Zeiteinheit reagieren. Die verschiedenen Amplituden weisen darauf hin, daß die Größe und/oder Anzahl der Liposomen pro Aggregat von der Menge an SP-A in der Lösung abhängt.

4.4 Einfluß der Lipidkonzentration

4.4.1 Messungen mit kinetischer Lichtstreuung

Die Variation der Liposomenkonzentration führt zu ähnlichen Ergebnissen wie die Variation der SP-A-Konzentration. Bei Kurzzeitmessungen und Reaktionsstart durch Photolyse von *caged Calcium* erfolgt die Reaktion sehr rasch und die Amplitude nimmt mit zunehmender Liposomenkonzentration zu (Abbildung 4.12).

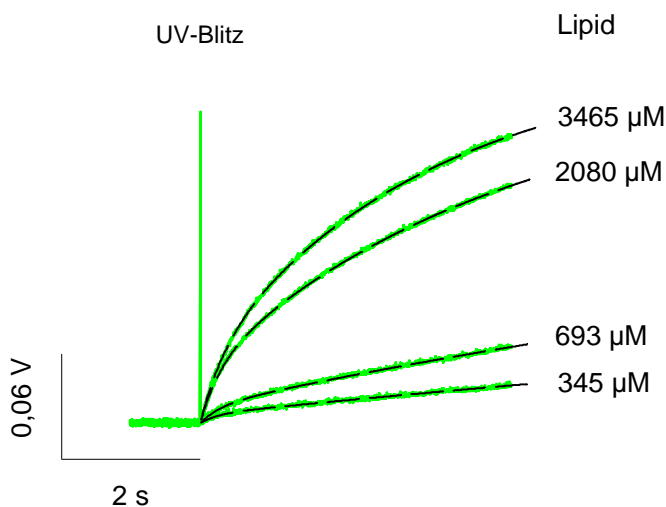


Abbildung 4.12: Interaktion von SP-A mit verschiedenen Lipidkonzentrationen nach Blitzlichtphotolyse von *caged Calcium*

Kinetische Lichtstreusignale der Reaktion von 20 nM Schaf-SP-A mit verschiedenen Lipidkonzentrationen (50 nm DPPC-Mix-Liposomen) nach Calciumfreisetzung aus DM-Nitrophen (Puffer 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 7,5 µM EGTA, pH 7,4, 78 µM Calcium, 100 µM DM-Nitrophen). Die Meßwerte (durchgezogene, grüne Linien) wurden durch zwei Exponentialfunktionen angepaßt, deren Parameter in Tabelle 4.5 zusammengefaßt sind (dargestellt als unterbrochene, schwarze Linien).

Tabelle 4.5:

Interaktion von SP-A mit verschiedenen Lipidkonzentrationen nach Blitzlichtphotolyse von *caged Calcium*

$$\text{Fit: } f(t) = A_1 \cdot \{1 - \exp[(-k_1) \cdot t]\} + \{A_2 \cdot [1 - \exp[(-k_2) \cdot t]]\}$$

A_1, A_2 : Amplituden der ersten und zweiten Phase

k_1, k_2 : Geschwindigkeitskonstanten der ersten und zweiten Phase

| c(Lipid) [μM] | A_1 [V] | k_1 [s^{-1}] | A_2 [V] | k_2 [s^{-1}] |
|-------------------------------|--------------|------------------------------|--------------|------------------------------|
| 345 | 0,0049 | 4,106 | 0,1088 | 0,0382 |
| 693 | 0,0093 | 3,413 | 0,1351 | 0,0646 |
| 2080 | 0,0294 | 3,525 | 0,1639 | 0,2305 |
| 3465 | 0,0349 | 2,992 | 0,1736 | 0,3004 |

Auch bei der Variation der Liposomenkonzentration ist eine mathematische Anpassung mit einer Summe von zwei Exponentialfunktionen zur Beschreibung von Bindung und Aggregation möglich.

Verfolgt man nach manueller Calciumzugabe die Aggregation bei konstanter SP-A- und Lipidkonzentration über einen längeren Zeitraum, so ist eine Abhängigkeit von der Lipidkonzentration gegeben (Abbildung 4.13). Paßt man die erhaltenen Meßsignale mit einer Exponentialfunktion für die Aggregationsreaktion an, so erhält man für eine Zunahme der Konzentration an Liposomen einen Anstieg der apparenten Geschwindigkeitskonstanten, da mit steigender Liposomenkonzentration auch die Geschwindigkeit für die SP-A Bindung und Aggregation zunimmt. Außerdem ist eine Zunahme der Amplitude bei steigender Liposomenkonzentration zu erkennen, bis die SP-A-Konzentration die Aggregationsreaktion limitiert.

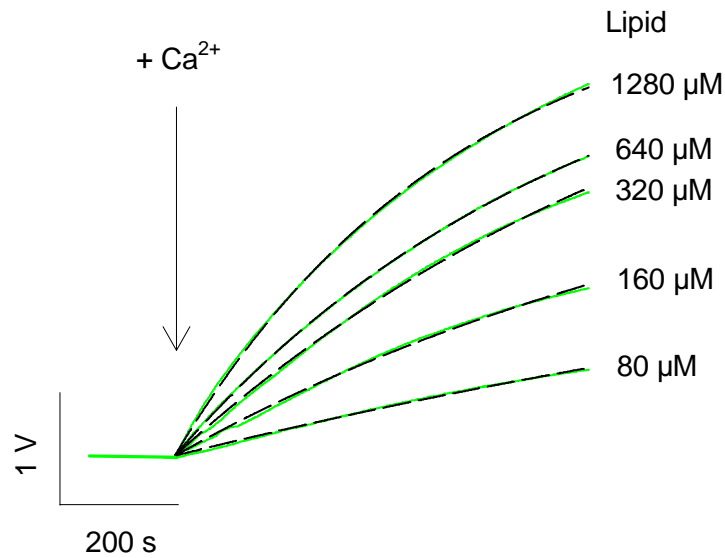


Abbildung 4.13: Effekt verschiedener Lipidkonzentrationen auf die Aggregationsreaktion

In der kinetischen Lichtstreuung wird die Reaktion von 4,5 nM Ratten-SP-A mit verschiedenen Lipidkonzentrationen (200 nm DPPC-Mix-Liposomen) in 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 50 µM EGTA, pH 7,4 nach Zugabe von 50 µM Calcium gestartet und über einen Zeitbereich von mehreren Minuten verfolgt. Die Meßsignale (durchgezogene, grüne Linien) werden mit einer Exponentialfunktion (dargestellt als unterbrochene, schwarze Linien) angepaßt, deren Werte in Tabelle 4.6 zusammengefaßt sind.

Tabelle 4.6:

Effekt verschiedener Lipidkonzentrationen auf die Aggregationsreaktion

Fit: $f(x)=A\{1-\exp[(-k)*t]\}$

A: Amplitude, k: Geschwindigkeitskonstanten

| | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| c(Lipid) [μM] | 80 | 130 | 320 | 640 | 1280 |
| A [V] | 2,72 | 3,81 | 4,56 | 4,20 | 4,30 |
| k [s^{-1}] | 0,0005 | 0,0009 | 0,0011 | 0,0015 | 0,0021 |

4.4.2 Messungen mit Resonant Mirror Spektroskopie

Eine Variation der Liposomenkonzentration ist auch bei Messungen mit immobilisiertem SP-A möglich. Abbildung 4.14 zeigt eine Meßreihe mit sechs verschiedenen Lipidkonzentrationen.

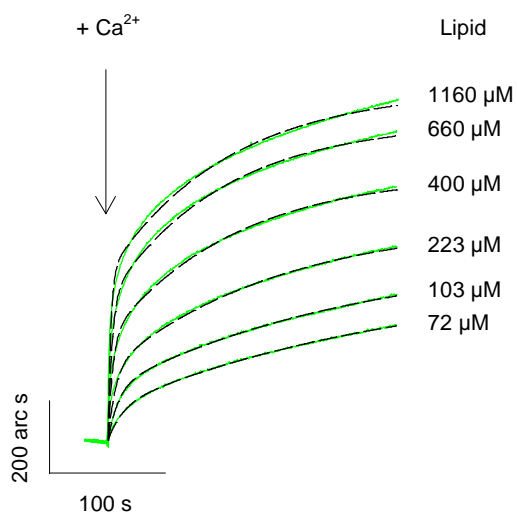


Abbildung 4.14: Bindung von Liposomen an immobilisiertes SP-A bei verschiedenen Lipidkonzentrationen

Reaktionsstart zwischen immobilisiertem Schaf-SP-A und 50 nm Liposomen aus 80% DPPC, 10% Cholesterin, 10% α -Tocopherol, suspendiert in 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 50 μM EDTA, pH 7,4, durch Zugabe von 91 μM Calcium. Die Parameter für die mathematische Anpassung der mit Resonant Mirror Spektroskopie erhaltenen Signale (durchgezogene, grüne Linien) sind in Tabelle 4.7 zusammengefaßt, die Funktionen als unterbrochene, schwarze Linien dargestellt.

Tabelle 4.7:

Bindung von Liposomen an immobilisiertes SP-A bei verschiedenen Lipidkonzentrationen

Fit: $f(t)=A_1\{1-\exp[(-k_1)t]\}+A_2\{1-\exp[(-k_2)t]\}$, A_1 , A_2 : Amplituden der ersten und zweiten Phase, k_1 , k_2 : Geschwindigkeitskonstanten der ersten und zweiten Phase

| c(Lipid) [μM] | A_1 [arc s] | k_1 [s^{-1}] | A_2 [arc s] | k_2 [s^{-1}] |
|----------------------------|---------------|---------------------------|---------------|---------------------------|
| 72 | 89 | 0,0826 | 362 | 0,0039 |
| 103 | 142 | 0,1144 | 373 | 0,0046 |
| 223 | 196 | 0,1577 | 409 | 0,0068 |
| 400 | 284 | 0,2496 | 454 | 0,0091 |
| 666 | 389 | 0,2928 | 489 | 0,0101 |
| 1160 | 461 | 0,4308 | 508 | 0,0096 |

Zu jeder Messung wurde eine Probe mit einer anderen Lipidkonzentration verwendet und durch Zugabe von Calcium gestartet. Dabei steigt das Meßsignal mit zunehmender Konzentration an Lipid bzw. Liposomen. Eine Anpassung ist bei Messungen bis 250 s durch einen zweiphasigen Fit möglich. Mit zunehmender Meßzeit wird eine mathematische Anpassung der Signale schwieriger und ungenauer. Die Reaktionsgeschwindigkeit der ersten Phase variiert nur gering mit der Liposomenkonzentration. Die Amplituden beider Phasen steigen mit zunehmender Liposomenkonzentration, wodurch eine dichtere Belegung der Oberfläche mit Liposomen bei zunehmender Lipidkonzentration angezeigt wird.

Sind an einer Küvettenoberfläche sehr viele SP-A Moleküle immobilisiert und werden große Liganden (Liposomen mit einem Durchmesser von 200 nm) verwendet, ist eine Überladung der Oberfläche zu vermeiden. Sonst kann es dazu kommen, daß beim Einsatz verschiedener Konzentrationen bereits die kleinste eingesetzte Lipidmenge ausreicht, um im Gleichgewicht die gesamte Küvettenoberfläche zu besetzen. Dann erhält man in der Summe der Amplituden beider Phasen einen konstanten Wert, der die maximal mögliche Belegung der Oberfläche mit Liposomen anzeigt (Abbildung 4.15). Bei einer solchen Messung ist eine Auswertung schwierig und wenn überhaupt, ist nur die Anfangskinetik auswertbar.

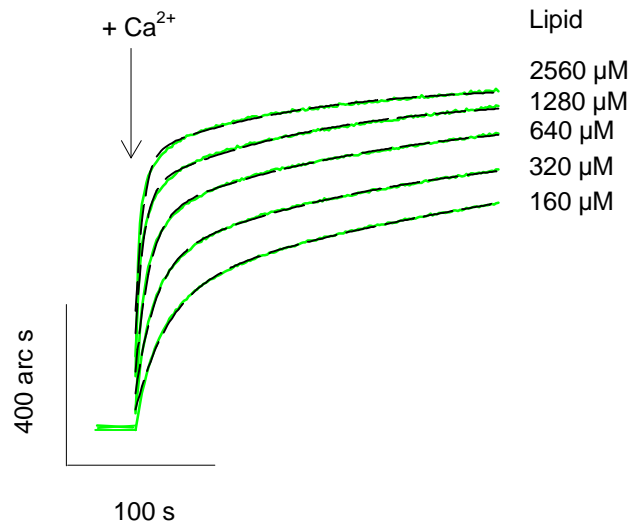


Abbildung 4.15: Bindung von Liposomen an immobilisiertes SP-A - Effekt verschiedener Lipidkonzentrationen bei Immobilisation von viel SP-A und Verwendung großer Liganden

Immobilisiertes Ratten-SP-A reagiert mit verschiedenen Lipidkonzentrationen (200 nm DPPC-Mix-Liposomen) in 100 mM NaCl, 50 μM EGTA, 5 mM Tris, pH 7,4 nach Zugabe von 90 μM Calcium. Die mit Resonant Mirror Spektroskopie erhaltenen Meßsignale (durchgezogene, grüne Linien) wurden mit zwei Exponentialfunktionen angepaßt, deren Parameter in Tabelle 4.8 zusammengefaßt sind. In der Graphik sind die Funktionen durch schwarze, gestrichelte Linien dargestellt.

Tabelle 4.8:

Bindung von Liposomen an immobilisiertes SP-A - Effekt verschiedener Lipidkonzentrationen bei Immobilisation von viel SP-A und Verwendung großer Liganden
 Fit: $f(t)=A_1\{1-\exp[(-k_1)*t]\}+A_2\{1-\exp[(-k_2)*t]\}$, mit A_1, A_2 : Amplituden der ersten und zweiten Phase, k_1, k_2 : Geschwindigkeitskonstanten der ersten und zweiten Phase

| c(Lipid) [μM] | A_1 [arc s] | k_1 [s^{-1}] | A_2 [arc s] | k_2 [s^{-1}] |
|----------------------------|---------------|---------------------------|---------------|---------------------------|
| 160 | 337 | 0,0449 | 431 | 0,0029 |
| 320 | 407 | 0,0751 | 310 | 0,0054 |
| 640 | 515 | 0,1050 | 269 | 0,0061 |
| 1280 | 587 | 0,1719 | 234 | 0,0082 |
| 2560 | 668 | 0,1925 | 180 | 0,0095 |

Zur Bewertung der Gleichgewichtseinstellung wurden Messungen bei Variation der Lipidkonzentration über einen langen Zeitraum durchgeführt (4000 s - 6000 s) (Abbildung 4.16).

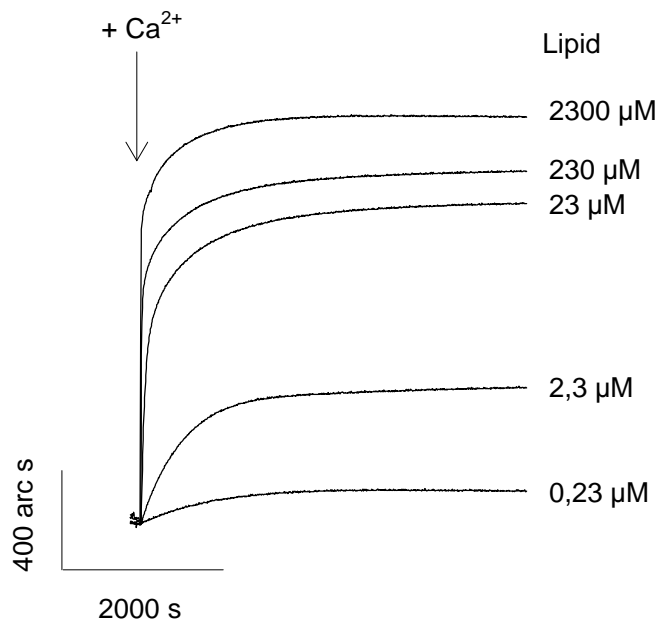


Abbildung 4.16: Reaktion von DPPC-Mix-Liposomen unterschiedlicher Konzentration mit immobilisiertem Schaf-SP-A zur Bestimmung der Gleichgewichtsamplitude

Die angegebenen Lipidkonzentrationen beziehen sich auf den Gehalt der Liposomen (Durchmesser ca. 50 nm) an Phosphatidylcholin. Die Reaktion wurde in 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 50 µM EGTA, pH 7,4 durchgeführt und durch Zugabe von 91 µM Calcium gestartet.

Zur Auswertung dient dann die Gleichgewichtsamplitude zwischen gebundenen und freien Liposomen bei unterschiedlichen Konzentrationen. Stellt man diese in einer dem Scatchard-Plot ähnlichen Auftragung gegen den Quotienten aus Amplitude und Liposomenkonzentration dar, kann man aus der Steigung die Dissoziationskonstante ermitteln (Abbildung 4.17). Sie beträgt für DPPC-Mix-Liposomen ca. 2,9 µM (Mittelwert aus 2 Messungen, 2,8 µM und 3 µM) und für DPPC-Liposomen 4,9 µM ± 0,98 µM (Mittelwert und Standardabweichung aus 5 Messungen), bezogen auf den Gehalt der Liposomen an Phosphatidylcholin.

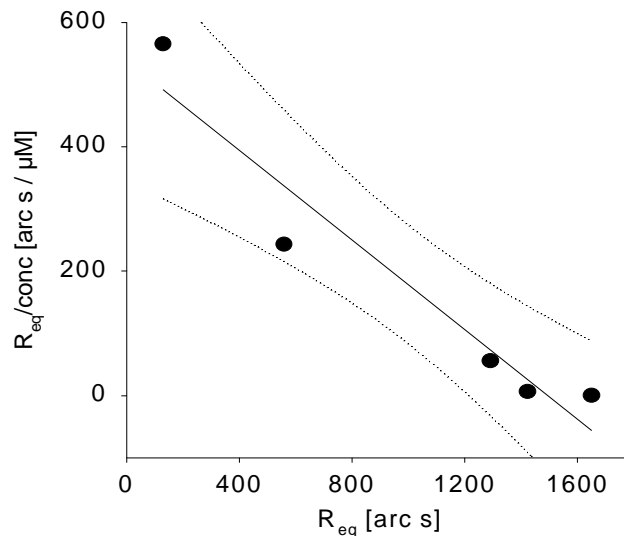


Abbildung 4.17: Bestimmung einer apparenten Dissoziationskonstante für den SP-A/Liposomen Komplex

Die Darstellung ist an einen Scatchard-Plot angelehnt, d.h. das Signal nach der Gleichgewichtseinstellung dividiert durch die Lipidkonzentration ($R_{eq}/conc$) wird gegen die Gleichgewichtsamplitude (R_{eq}) aufgetragen. Die Steigung der Regressionsgeraden ist $-K_A=1/K_D$, $K_D = 2,8 \mu M$, $r^2=0,9212$. Die Lage des 95% Konfidenzintervalls ist im gepunkteten Kurvenpaar dargestellt.

4.5 Reaktion von SP-A mit verschiedenen Phospholipiden

Während SP-A Präparate verschiedener Spezies (Ratte, Schaf, Rind) keine Unterschiede im Bindungs- und Aggregationsverhalten zeigen, sind beide Reaktionen im hohen Ausmaß vom verwendeten Lipid abhängig. Eine Übersicht über die verwendeten Lipide befindet sich im Chemikalienverzeichnis.

4.5.1 Vergleich zwischen DPPC und POPC

Die Lipidspezifität der Interaktion zeigt sich besonders deutlich im Vergleich von Liposomen, die neben 10% Cholesterin zu 90% aus Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) bzw. Phosphatidyleoylcholin (POPC) bestehen (Abbildung 4.18).

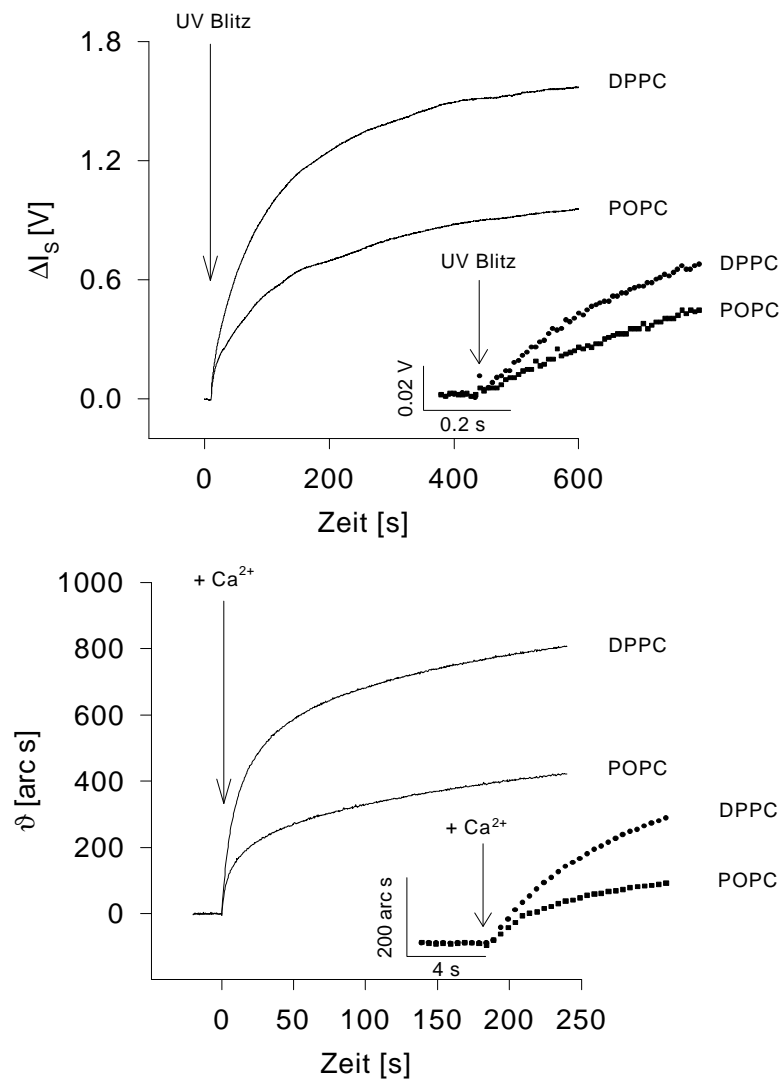


Abbildung 4.18: Unterschiede zwischen den Wechselwirkungen von SP-A mit DPPC- bzw. POPC-Liposomen

Oben: Zeitverlauf von Lichtstreuungssignalen in einer Suspension von Liposomen, Schaf-SP-A und caged Calcium (Ca^{2+} /DM-Nitrophen) bei Start durch Photolyse von caged Calcium. Zusammensetzung der Liposomen: 90% DPPC oder POPC, 10% Cholesterin, die Konzentration an SP-A beträgt 20 nM, die an Lipid 1885 μM (60 nM Liposomen, Durchmesser ca. 50 nm), Puffer: 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 40 μM Ca^{2+} , 8 μM EGTA, 102 μM DM-Nitrophen, pH 7,4. Im Inset ist der Reaktionsbeginn im Detail dargestellt.

Unten: Zeitverlauf der Resonant Mirror Signale bei Bindung von 20 nM DPPC- oder POPC-Liposomen (s.o.) an immobilisiertes Schaf-SP-A. Die Reaktion in 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 50 μM EGTA, pH 7,4 wurde durch Zugabe von 90 μM Calcium gestartet. Im Inset ist der Beginn der Reaktion dargestellt.

Untersucht man die Reaktion in der Lichtstreuung unmittelbar nach Reaktionsstart durch Photolyse von *caged Calcium* und registriert man den Verlauf der Aggregationsreaktion, so zeigt sich, daß die Interaktion zwischen SP-A und POPC-Liposomen von Anfang an nur zu halb so großen Lichtstreusignalen führt, wie die Interaktion zwischen SP-A und DPPC-Liposomen. Daher unterscheidet sich die Palmitoyl-oleoylform des Phosphatidylcholins in der Affinität, die sich in der Verminderung der Amplitude unter sonst identischen Bedingungen widerspiegelt. Die bei geringerer Zeitauflösung aufgenommenen Lichtstreusignale dokumentieren den Verlauf der Aggregationsreaktion. Dabei wird deutlich, daß der Beginn der Interaktion zwischen SP-A und den DPPC- bzw. POPC-Liposomen die Aggregation bestimmt. Der Aggregationsprozeß selbst trägt nicht viel zur Spezifität der Wechselwirkung bei. Die mit der Resonant Mirror Spektroskopie aufgenommenen Bindungssignale zeigen qualitativ dieselbe Differenz zwischen den beiden Phosphatidylcholinen. Daher wurde diese Methode zur genaueren Charakterisierung der Lipidspezifität von SP-A verwendet.

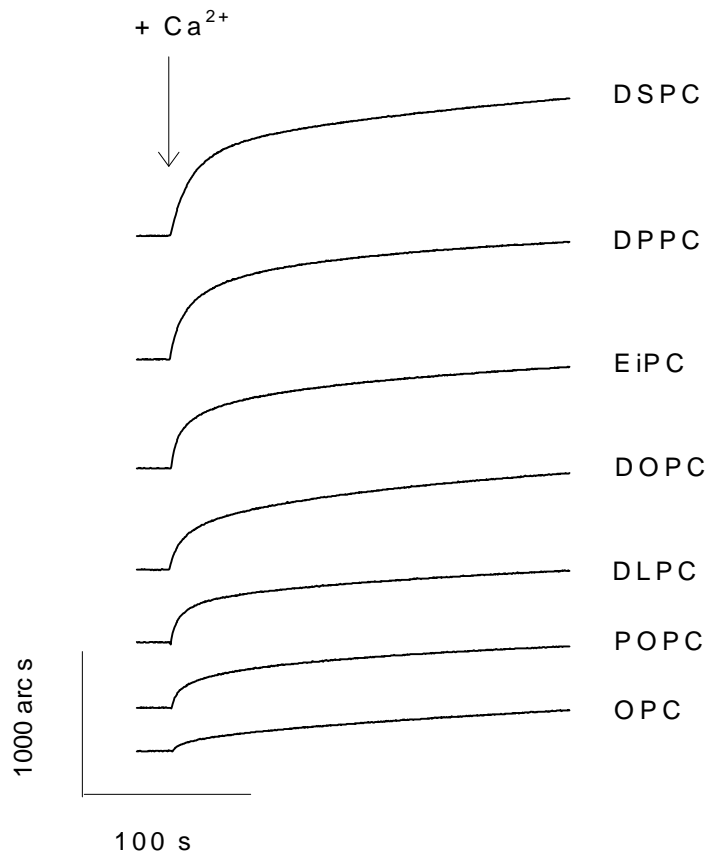
4.5.2 Die Interaktion mit verschiedenen Phosphatidylcholinen

Untersucht man die Bindung verschiedener Phosphatidylcholine an immobilisiertes SP-A, so zeigt sich, daß mit Liposomen aller verwendeten Choline eine calcium-abhängige, SP-A spezifische, reversible Bindung erfolgt. Kontrollversuche mit denaturiertem SP-A haben ergeben, daß die unspezifischen Wechselwirkungen der verschiedenen Liposomen im Vergleich zum Bindungssignal gering sind.

Paßt man die erhaltenen Bindungssignale über den zuvor beschriebenen zweiphasigen Fit an, so erhält man für alle Choline (mit Ausnahme des Distearoylphosphatidylcholins, DSPC) eine ähnliche Reaktionsgeschwindigkeit in der ersten Phase der Reaktion (DPPC: $0,1586 \text{ s}^{-1}$, EiPC: $0,1694 \text{ s}^{-1}$, Dioleoylphosphatidylcholin, DOPC: $0,1563 \text{ s}^{-1}$, Dilauroylphosphatidylcholin, DLPC: $0,2 \text{ s}^{-1}$, POPC: $0,1608 \text{ s}^{-1}$, Lysooleoyphosphatidylcholin, OPC: $0,1553 \text{ s}^{-1}$ für Liposomenkonzentrationen um 20 nM, gegeben sind die Mittelwerte aus fünf Messungen bei einer Anpassung der Meßwerte der ersten 200 s). Nur DSPC zeigt bei diesen Konzentrationen gegenüber allen anderen Cholinen eine deutlich verminderte Geschwindigkeit (DSPC: $0,096 \text{ s}^{-1}$).

Größere Unterschiede beobachtet man hingegen bei der Amplitude des Meßsignals zwischen den gemessenen Cholinen (Abbildung 4.19). Dies zeigt einen Einfluß der Lipidzusammensetzung der Liposomen auf die Geschwindigkeit des Zerfalls der

SP-A/Lipid-Komplexe. Bei fünf unabhängig voneinander durchgeführten Messungen nahm die Amplitude des Signals in der Reihenfolge DSPC>DPPC>EiPC>DOPC >DLPC>POPC>OPC ab, wobei die Unterschiede zwischen DLPC und DOPC gering sind. Um die Amplituden besser miteinander vergleichen zu können, wurde die Amplitude der ersten Phase für DPPC auf 100% normiert. Dann ergaben sich für die



anderen Phosphatidylcholine folgende Meßwerte: DSPC: 134, DPPC: 100, EiPC: 65, DOPC: 54, DLPC: 53, POPC: 32, OPC: 10.

Abbildung 4.19: Bindung verschiedener Phosphatidylcholin-Liposomen an immobilisiertes SP-A

Zur Messung mit Resonant Mirror Spektroskopie wurde Schaf-SP-A auf dem Sensorchip mit ca. 20 nM Liposomen (Durchmesser etwa 50 nm) aus verschiedenen Phosphatidylcholinen in 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 50 µM EGTA, pH 7,4 inkubiert (Zusammensetzung der Liposomen: 80% Phospholipid -siehe Abbildung-, 10% Cholesterin, 10% α -Tocopherol). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 90 µM Calcium gestartet.

Bei der Untersuchung der Aggregationsreaktion mit der kinetischen Lichtstreuung erkennt man eine Analogie zur Bindungsreaktion. In Abbildung 4.20 fällt auf, daß die Reaktion mit DSPC und DPPC auch nach ca. 200 s weiterläuft, während bei den übrigen Liposomen nur noch eine geringe Veränderung der Signalamplitude zu erkennen ist.

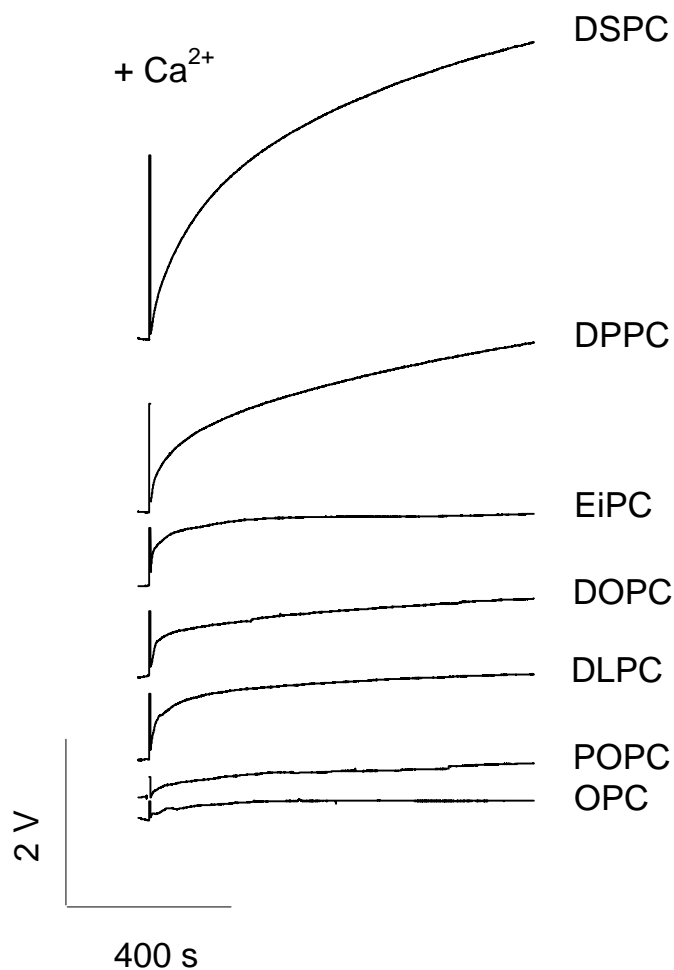


Abbildung 4.20: SP-A vermitteltes Aggregationsverhalten verschiedener Phosphatidylcholin-Liposomen

Reaktion von 1280 μM Lipid (41 nM unterschiedliche Liposomen 80% Phosphatidylcholin, 10% Cholesterin, 10% α -Tocopherol, Durchmesser 50 nm) mit 7 nM Schaf-SP-A in 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 50 μM EGTA nach Zugabe von 470 μM Calcium.

4.5.3 Bedeutung der Kopfgruppe der Phospholipide

Untersucht man Liposomen, die aus Surfactantlipiden mit unterschiedlicher Kopfgruppe zusammengesetzt sind, so zeigt sich bei jeder Messung die charakteristische Calciumabhängigkeit der Interaktion. Für alle Reaktionen ist Calcium erforderlich und bei Zugabe des Calciumchelators EDTA ist die Interaktion reversibel (Abbildung 4.21).

Es gibt keine eindeutige Präferenz für die Bindung der Phosphatidylcholinkopfgruppe an SP-A. Eine im Hinblick auf Geschwindigkeit und Affinität ähnliche Bindung zeigen Phosphatidylinositol (PI) und Sphingomyelin (SM). Liposomen, die allein Phosphatidylglycerol (PG) enthalten, binden deutlich schlechter als Liposomen mit anderen Phospholipid-Kopfgruppen. In Gemischen mit DPPC beeinträchtigt PG die Liposomenbindung jedoch nicht, wie der Vergleich zwischen DPPC-Mix-Liposomen mit DPPC-Liposomen (90% DPPC, 10% Cholesterin) zeigt. Im Vergleich zwischen Dipalmitoylphosphatidylserin (DPPS), Dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG) und DPPC ist die Wechselwirkung zwischen SP-A und DPPS am schwächsten, erkennbar am langsamen Anstieg der ersten Phase, während von den übrigen Phospholipiden mit gemischten Seitenketten Phosphatidylethanolamin (PE) die geringsten Bindungseigenschaften zeigt. Daß die Lipidbindung, neben der Kopfgruppe, auch von den Seitenketten und/oder der Ordnung der Kopfgruppen abhängig ist, zeigt sich beim Unterschied zwischen DPPG- und PG-Liposomen. Wie bei DPPC und PC erhöhen die beiden C16-Seitenketten die Affinität um ca. 50%.

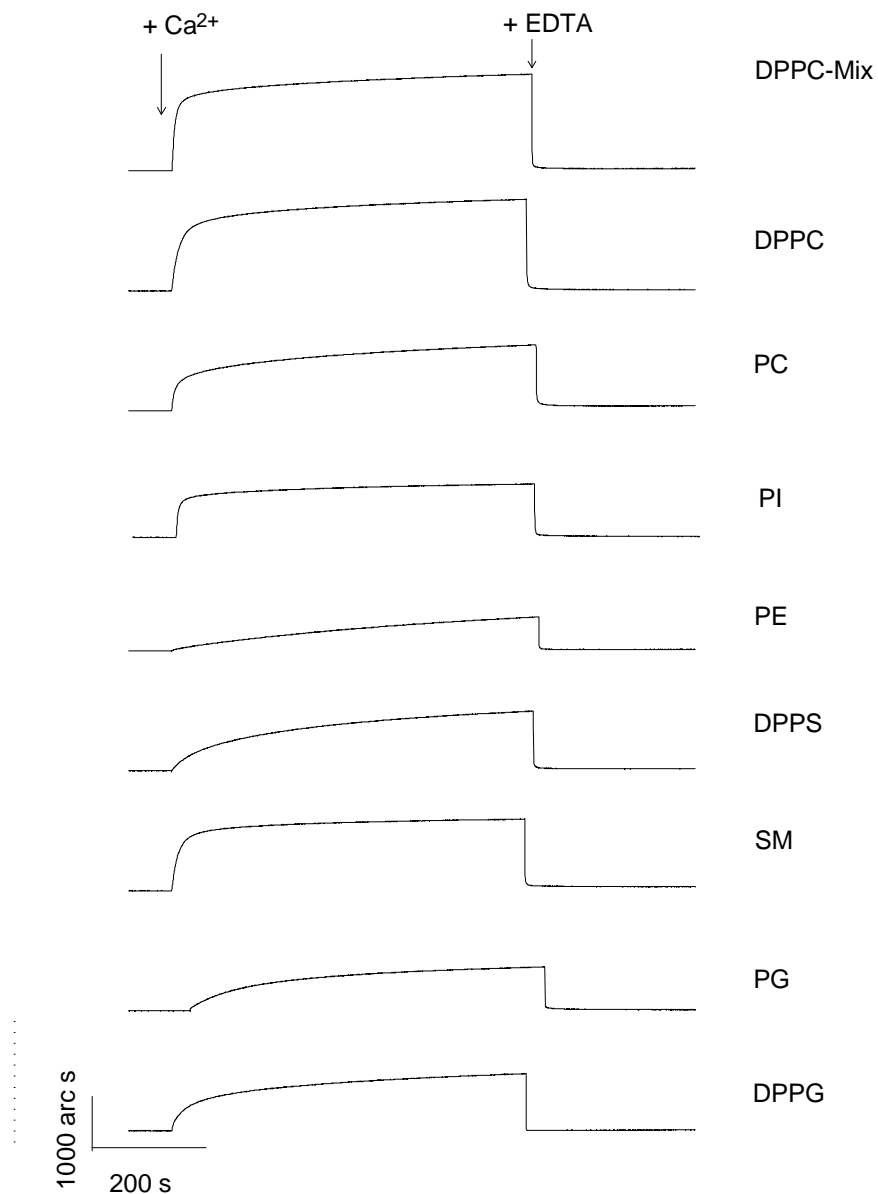


Abbildung 4.21: Resonant Mirror Signale mit verschiedenen Phospholipid-Liposomen

Immobilisiertes Schaf-SP-A wurde mit verschiedenen Liposomen in 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 50 μM EGTA, pH 7,4 inkubiert und durch Zugabe von 87 μM Calcium aktiviert. Es wurden ca. 590 μM Lipid (19 nM Liposomen, Durchmesser ca. 50 nm, 89% DPPS, DPPG, PE, PC, PG, PI, SM, DPPC, 10% Cholesterin, 1% α -Tocopherol, DPPC-Mix-Liposomen) zur Reaktion gebracht. Die Rückreaktion erfolgte nach Zugabe von 400 μM EDTA.

4.6 Interaktion zwischen SP-A und Liposomen bei 37 °C

Um die Übertragbarkeit des Systems auf physiologische Temperaturen zu untersuchen, wurden Messungen mit gekoppeltem SP-A in der Resonant Mirror Technik der Liposomen-Interaktion bei 37 °C durchgeführt.

Dabei ergaben sich Probleme bei der Temperaturstabilität des immobilisierten Proteins auf der Küvettenoberfläche. Bei höheren Temperaturen nahm die Stabilität von SP-A ab, so daß mit der Küvette weniger Messungen durchgeführt werden konnten, als bei 15 °C. Um den Einfluß der Temperatur auf die Bindung vom Aktivitätsverlust unterscheiden zu können, wurde in allen dargestellten Resonant Mirror Experimenten eine Sequenz aus drei Versuchsreihen bei 15 °C, 37 °C und 15 °C durchgeführt.

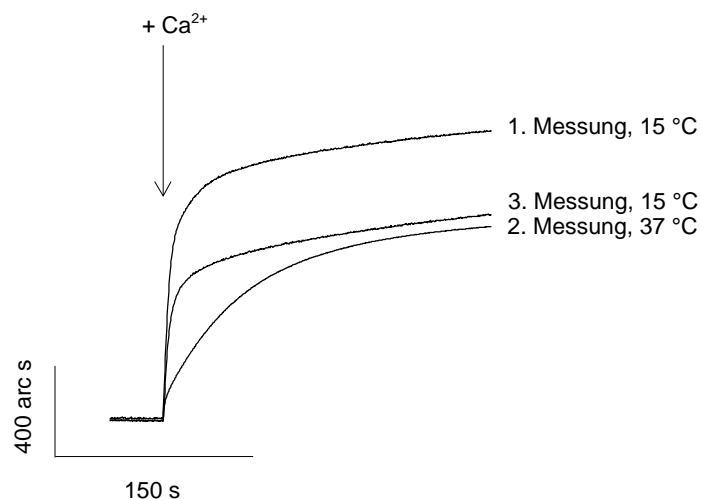
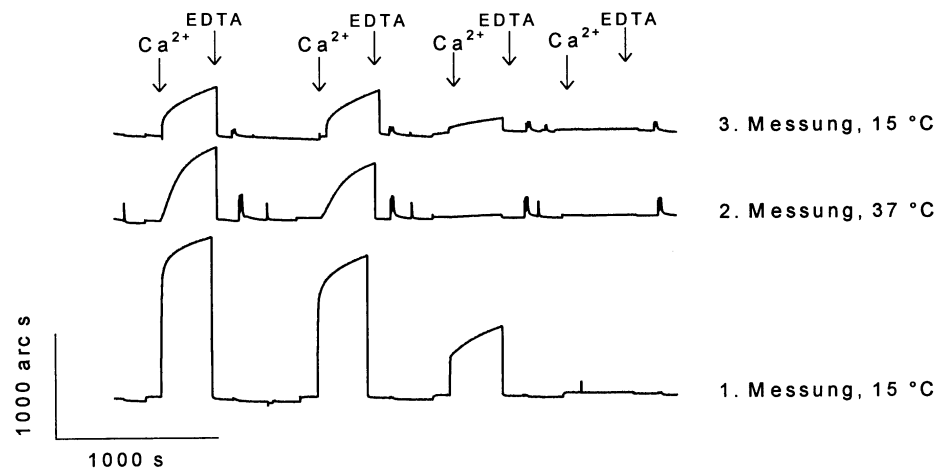


Abbildung 4.22: Temperaturabhängigkeit der Liposomenbindung

320 µM DPPC-Mix-Liposomen (50 nm) suspendiert in 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 50 µM EGTA, pH 7,4 binden bei 15 °C und 37 °C an immobilisiertes Schaf-SP-A nach Zugabe von 90 µM Calcium.

Dabei erfolgt sowohl bei 15 °C als auch bei 37 °C die durch mikromolare Calciumkonzentrationen induzierte Bindung von Liposomen an immobilisiertes SP-A. Allerdings ist die Geschwindigkeit der Bindung bei 37 °C deutlich langsamer als bei 15 °C. Die steile Anstiegsphase nach der Zugabe von Calcium verringert sich von ca. 300 arc s bei 15 °C in den Messungen 1 und 3 auf etwa 100 arc s bei 37 °C (Abbildung 4.22). Die Bindung ist reversibel und zeigt bei 15 °C wie bei 37 °C analoge Unterschiede zwischen DPPC- und POPC-Liposomen sowie eine entsprechende Abhängigkeit von der Calciumkonzentration (Abbildung 4.23).

DPPC



POPC

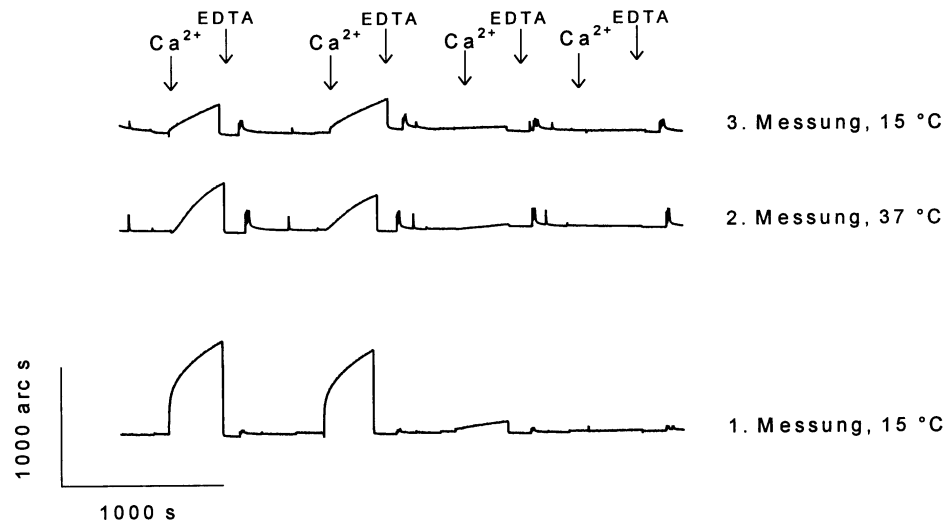


Abbildung 4.23: Einfluß der Temperatur auf die Bindung von DPPC- und POPC-Liposomen an immobilisiertes SP-A

Ca. 1230 μM DPPC in 50 nm Liposomen (Zusammensetzung: 89% DPPC, 10% Cholesterin, 1% α -Tocopherol) bzw. POPC in 50 nm Liposomen (Zusammensetzung: 89% POPC, 10% Cholesterin, 1% α -Tocopherol) in 100 μM NaCl, 5 mM Tris, 50 μM EGTA reagieren nach Zugabe von 150 μM , 75 μM , 38 μM oder 16 μM Calcium (von rechts nach links) mit immobilisiertem Schaf-SP-A. Untereinander dargestellt sind jeweils drei nacheinander durchgeführte Meßreihen in einer Küvette mit Resonant Mirror Spektroskopie bei 15 °C, 37 °C und 15 °C (Messung 1, 2, 3). Die Reaktion ist durch äquimolare EDTA-Zugabe reversibel; zwischen den Einzelmessungen werden Waschschrirte durchgeführt.

Sowohl bei POPC- als auch bei DPPC-Liposomen ist eine Verringerung der steilen Anstiegsphase bei 37 °C zu erkennen. Für DPPC-Bilayer liegt die Übergangstempe-

ratur vom "festen" Gelzustand zur "fluiden" flüssigkristallinen Phase bei 41 °C. Durch die Zugabe von 10% Cholesterin ändert sich die Übergangstemperatur kaum. Bei der Betrachtung der Übergangstemperatur ist allerdings zu berücksichtigen, daß bei kleinen Liposomen (SUV) aus DPPC im Gegensatz zu lamellaren Strukturen kein Übergangszustand (Pre-Transition) zu messen ist, der Phasenübergang breiter wird und bei etwa 37 °C erfolgt, d.h. die Übergangstemperatur um etwa 4 °C sinkt (102). Bei POPC-Liposomen (Übergangstemperatur - 2 °C) liegt bei Temperaturen von 15 °C und 37 °C der flüssigkristalline Zustand vor.

Die Aggregation zeigt hingegen in der Anfangssteigung keine Unterschiede zwischen 37 °C und 15 °C, die Amplitude ist jedoch bei 37 °C geringer (Abbildung 4.24), was allerdings auch mit einer verminderten Aktivität des SP-A bei der höheren Temperatur erklärt werden kann.

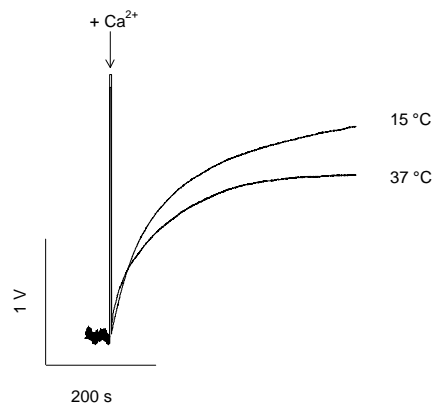


Abbildung 4.24: Einfluß der Temperatur auf die Aggregationsreaktion

Aggregation von 50 nm Liposomen, Zusammensetzung 89% DPPC, 10% Cholesterin, 0,1% α -Tocopherol (ca. 640 μ M Lipid) und 23 nM Schaf-SP-A in 100 mM NaCl, 5 mM Tris, 50 μ M EGTA nach Zugabe von 73 μ M Calcium.

5 Diskussion

SP-A interagiert in der alveolären Hypophase mit verschiedenen Liganden, zu denen Lipide, Calcium, zelluläre Rezeptoren oder Kohlenhydrate als Bestandteile von Glykolipiden oder -proteinen zählen. Da SP-A in der alveolären Hypophase stets mit Phospholipiden assoziiert ist (8), sind die Wechselwirkungen von SP-A mit Lipiden Ausgangspunkt zur Untersuchung des Surfactant Systems mit biophysikalischen Methoden. Diese ermöglichen eine Unterscheidung zwischen der calciumabhängigen Bindung von Phospholipid-Liposomen und der Rolle von SP-A bei der Aggregation von Liposomen. Beide Prozesse sind *in situ* eng miteinander verknüpft und Bestandteile eines calciumabhängigen Gesamtprozesses. Zu diesem zählen die Bildung von tubulärem Myelin, die SP-A, SP-B und Calcium erfordert, die Inhibition der Sekretion von Phospholipiden und die Verstärkung der Aufnahme von Phospholipiden via Rezeptoren in Typ-II-Zellen.

5.1 Methodenapplikation

Ausgehend vom klassischen Aggregationstest wurden die Meßbedingungen für die Methoden Resonant Mirror Spektroskopie und Lichtstreuung untersucht. Dabei konnten mit beiden Techniken reversible Meßsignale bei mikromolaren Calciumkonzentrationen beobachtet werden. Die Verwendung mikromolarer Calciumkonzentrationen ist notwendig, um bei der Resonant Mirror Spektroskopie eine unspezifische Bindung der Liposomen auf der Küvettenoberfläche zu vermeiden. In diesem Konzentrationsbereich wird außerdem eine Selbstaggregation von SP-A verhindert. Diese konnte in der Lichtstreuung unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht beobachtet werden (Abbildung 4.9). Bei Zugabe von SP-A zu einer Pufferlösung ohne Lipid ist eine geringe Zunahme der Streuung zu beobachten, die sich bei Zugabe von Calcium nicht erhöht, so daß keine Indizien für eine Selbstaggregation vorlagen.

Ergebnisse von Ruano et al. (88) bestätigen diesen Befund. Die halbmaximale Selbstaggregation erfolgt bei Calciumkonzentrationen von 2,4 mM für Schweine-SP-A und 0,7 mM für Hunde-SP-A. Damit erfordert die Selbstaggregation wesentlich höhere Calciumkonzentrationen, die z.T. nicht einmal in der alveolären Hypophase erreicht werden. Hier wurden Calciumkonzentration von etwa 1,5 mM gemessen (103). Daher

ist davon auszugehen, daß die Selbstaggregation von SP-A von der Lipidbindung unabhängig ist und die Aggregation der Liposomen durch Selbstaggregation von SP-A weniger plausibel ist, als die der Vernetzung von Liposomen durch multivalente Bindung an SP-A.

Die Resonant Mirror Spektroskopie vermeidet durch die Fixierung der SP-A Moleküle auf dem Träger das Problem der Selbstaggregation. Der Versuch, die gekoppelten Proteinmoleküle am Träger durch Kraftfeldmikroskopie zu detektieren, scheiterte an der rauhen Oberfläche der Küvette. Eine Aussage über die Menge an nativem SP-A am Träger ist schwierig zu treffen und zudem von der Qualität der Proteinpräparation abhängig. Die gute Übereinstimmung der Meßergebnisse aus Lichtstreu- und Resonant Mirror-Versuchen spricht jedoch für die Funktionalität eines beachtlichen Proteinanteils nach der Immobilisierung. Ein Vorteil bei der Durchführung der Kopplung ist die Vermeidung eines direkten Kontaktes zwischen Protein und freiem Kopplungsreagenz. Die Oberfläche wird zunächst mit BS³ aktiviert, anschließend wird der nicht gebundene Anteil der Crosslinker durch Waschen mit Puffer entfernt und erst danach reagiert das Protein mit dem am Träger gebundenen Crosslinker. Daher ist die Reaktionswahrscheinlichkeit peripherer Aminogruppen des SP-A (Lysin-Reste) deutlich höher als die im Inneren des Proteins liegender und möglicherweise strukturbildender Aminogruppen.

5.2 Calciumabhängigkeit der Interaktion zwischen SP-A und Liposomen

Die Bindung von Liposomen an immobilisiertes SP-A erfordert mikromolare Calciumkonzentrationen. Bei gleichen Calciumkonzentrationen führt SP-A auch zu einer Aggregation der Liposomen, die in der Lichtstreuung gemessen wurde.

Anhand der Ergebnisse wird ein Modell mit zwei verschiedenen molekularen Zuständen des Proteins postuliert:

Bei niedriger Calciumkonzentration ($< 1 \mu\text{M}$) liegt ein inaktiver Zustand vor, in dem die Lipidbindung herabgesetzt ist. Durch Calcium im mikromolaren Bereich wird das SP-A in einen aktiven Zustand überführt, in dem eine Wechselwirkung mit Liposomen erfolgt. Die Aktivierung setzt im SP-A Molekül vermutlich hydrophobe Phospholipid-Bindungsstellen frei, die ohne mikromolare Calciumkonzentrationen nicht zugänglich

sind. Eine derartige calciumabhängige Konformationsänderung könnte sowohl Bindung als auch Aggregation von Liposomen im gleichen Bereich der Calciumkonzentration in einer geordneten Sequenz auslösen. Das Calciumion wirkt dabei als Schalter der SP-A/Liposomen-Interaktion in einem breiten Konzentrationsbereich von SP-A- und Lipidkonzentrationen und bei SP-A verschiedener Spezies (Rind, Ratte, Schaf). Die calciumabhängige Interaktion paßt gut zu einer Klasse von Calciumbindungsstellen in der Größenordnung von $10 \mu\text{M}$ (104). Die zwei verschiedenen Konformationen des SP-A-Moleküls in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration wurden anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Possmayer et al. beobachtet. Die Aufnahmen lassen eine aufgeweitete SP-A-Konformation im calciumfreien und eine schmale Konformation nach Calciumzugabe erkennen (Possmayer, pers. Mitteilung).

Es gibt in der Literatur aber auch Hinweise auf eine calciumunabhängige Lipidbindung des SP-A (84), (105).

Da die Versuche von King et al. (84) in Gegenwart von 10 mM EDTA durchgeführt wurden, ist hier von einem durch die Komplexierung von Calciumverunreinigungen calciumfreien System auszugehen. Damit ist die Existenz von lipidassoziiertem SP-A im Gleichgewicht ohne Calcium wahrscheinlich.

Im Gegensatz dazu könnten die Ergebnisse von Casals (105) Kontaminationen von Calcium in mikromolaren Konzentrationen enthalten, da ein Puffer mit 5 mM Tris und 150 mM NaCl ohne EDTA oder EGTA verwendet wurde. Hier ist ein Effekt möglich, wie er auch in dieser Arbeit beobachtet und in Abbildung 4.9 dargestellt ist (beginnende Aggregationsreaktion durch Calciumverunreinigungen in einem Puffer mit 5 mM Tris, 100 mM NaCl, ohne Calciumchelatoren). In der Veröffentlichung von Casals et al. 1993 wird angeführt, daß die physiologische NaCl-Konzentration von 100 mM bis 150 mM zur Interaktion zwischen Lipiden und Proteinen notwendig ist. Gleichzeitig berichten die Autoren über ein verändertes Fluoreszenzspektrum von SP-A in reinem Wasser gegenüber dem bei 100 mM bis 150 mM NaCl. Auch hier liegt die Vermutung nahe, daß Calciumkontaminationen im mikromolaren Bereich ($<10 \mu\text{M Ca}^{2+}$) im Puffer in Gegenwart von Salz beide Phänomene (Lipidbindung und Fluoreszenzänderung) verursacht haben.

Eine Beeinflussung des Fluoreszenzspektrums von SP-A in Abwesenheit von Lipiden durch mikromolare Calciumkonzentrationen wurde von Sohma et al. gemessen (101).

Bezogen auf die Struktur der Untereinheiten bleibt es eine interessante Frage, wie die durch Calcium ausgelöste Strukturveränderung aussieht, die den beobachteten Effekt ergibt. Es ist charakteristisch für eine Reaktionsfolge aus Bindung und Aggregation, daß die Assoziation von Liposomen an SP-A sehr viel schneller erfolgt als die nachfolgende Aggregationsreaktion. Aus den Bindungsdaten kann ein Hill-Koeffizient mit hoher Kooperativität für Calcium berechnet werden. Die maximale Anzahl von n entspricht der Zahl wirksamer Untereinheiten. Die genaue Zahl der Bindungsstellen und deren Affinität für Calcium am SP-A Molekül ist unbekannt (nach Daten von Haagsman et al. sind dies zwei, deren Affinität bei $10 \mu\text{M}^{-1}$ und $0,7 \text{mM}^{-1}$ Calcium liegt (104); nach Molekülmodellen in Analogie zum MBP ergibt sich eine Bindungsstelle pro Untereinheit). Der Hill-Koeffizient spricht in Übereinstimmung mit der komplexen multimeren SP-A Struktur für eine hohe Symmetrie der Untereinheiten.

Mögliche Bindungsregionen für Lipide sind die Nacken und CRD-Region des Okta-dekamers (67), (56), die eine blumenstraußartige Molekülstruktur bilden (59).

Durch die Zugabe von EGTA oder EDTA können Bindungs- und Aggregationsprozeß umgekehrt werden. Dabei wurde beobachtet, daß der Zerfall der Aggregate sehr viel langsamer erfolgt, als die Dissoziation der Liposomen von immobilisiertem SP-A (18 s vs. 0,3 s). Dies ist mit einem zweistufigen Modell konsistent, in dem die Aufhebung der SP-A/Liposomenbindung die Disaggregation auslöst. Da nur wenige SP-A Moleküle pro Liposom zu einer Aggregationsreaktion ausreichen, ist es wahrscheinlich, daß SP-A zwischen den Liposomen über einen Vesikel/SP-A/Vesikel-Mechanismus bi- oder multivalente Verknüpfungen herstellt. Dafür spricht, daß die Selbstaggregation von SP-A, die für eine Verknüpfung der Liposomen über SP-A Moleküle notwendig wäre, erst bei höheren Calciumkonzentrationen ($>0,5 \text{mM}$) einsetzt.

Die schnelle und vollständige Reversibilität der Interaktion zwischen SP-A und Liposomen zeigt, daß durch SP-A keine Fusion der Lipidvesikel erfolgt. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein (88), (89), (104), die die Reversibilität der Aggregationsreaktion im photometrischen Aggregationstest bei millimolaren Calciumkonzentrationen beschrieben haben.

Neben Calcium sind auch andere zweiwertige Kationen, wie Strontium und Barium, in der Lage, die Liposomenbindung an SP-A zu induzieren. Magnesium führt weder zu einer Bindung noch zur nachfolgenden Aggregation der Liposomen (siehe Abbildung 4.7). Dies ist eine Bestätigung der Ergebnisse von Efrati et al., nach denen Calcium, Strontium oder Barium zu einer Aggregation erforderlich sind (89). Die Ionenspezifität unterstützt nach Einschätzung der Autoren die Hypothese einer direkten Protein-Kationen-Interaktion, da das Verhältnis von Masse zu Ladung bei Barium und Strontium ähnlich ist wie bei Calcium und die notwendige Flexibilität für eine Koordination durch Calciumbindungsstellen im Protein besteht. Diese Hypothese wird durch die in der Arbeit dargestellten Bindungsversuche bestätigt, bei denen SP-A nicht nur durch Calcium, sondern auch durch Strontium oder Barium in eine aktive, lipidbindende Konformation überführt werden konnte.

Der Einfluß der Reduktion von Disulfidbrücken des SP-A auf die Liposomenbindung war gering. Nach Sohma et al. zeigt sich anhand einer Verschiebung des Fluoreszenzmaximums eine Aufweitung der Konformation des SP-A (101). Da aber in den durch Sohma et al. durchgeführten Versuchen die Calciumbindung nicht beeinflußt wurde, ist zu vermuten, daß möglicherweise auch die Lipidbindung, welche hier als Monitor verwendet wurde, unbeeinflußt bleibt.

5.3 Geschwindigkeit der Reaktion zwischen Calcium und Liposomen

Die Wechselwirkung zwischen SP-A und Liposomen vollzieht sich überraschend schnell. Der Reaktionsstart durch Photolyse von *caged Calcium* erfordert einige Millisekunden, um Calcium aus dem Chelator-Komplex freizusetzen. Eine Interaktion zwischen SP-A und Liposomen erfolgt nach weniger als 1 s. Die kinetische Auswertung der Lichtstreuensignale führt zu einer apparenten Geschwindigkeitskonstante von $k_{on} = 3 \text{ s}^{-1}$ bei nanomolaren Konzentrationen der Reaktionspartner für die schnelle Komponente des Lichtstreuensignals. Über die Geschwindigkeit der Reaktion zwischen SP-A und Liposomen liegen bisher in der Literatur keine vergleichbaren Messungen vor.

Eine mögliche Erklärung für die schnelle Reaktion zwischen SP-A und Liposomen liegt in der Annahme eines präformierten Komplexes. SP-A könnte zumindest

teilweise über unspezifische Wechselwirkungen in Lösung mit Lipid assoziiert sein. Ein solcher präformierter Komplex zwischen SP-A und Liposomen, bei dem SP-A im Kontakt mit Lipiden vorliegt und sich zur beobachteten Bindung mit nachfolgender Aggregation nur noch „umdrehen“ muß, könnte eine Ursache für die schnelle Interaktion mit fließendem Übergang zwischen Bindung und Aggregation bei der Wechselwirkung zwischen SP-A und Liposomen sein. Bei der Resonant Mirror Spektroskopie könnte dieser assoziierte Zustand durch den in die Küvette integrierten Rührer verhindert werden, der Fehler durch den Transport von Molekülen an die Oberfläche vermeiden soll. Dadurch werden Strömungen verursacht, die bei ungerührten Systemen fehlen. Durch eine calciuminduzierte Konformationsänderung im Protein wird eine feste Bindung zwischen Liposomen und SP-A ausgelöst, die auch im gerührten System stabil ist und nachfolgend zu einer Aggregation führt.

Ein solcher assoziierter Komplex könnte sich im Verlauf von Zentrifugationsexperimenten (24 - 36 h) stabilisieren und zur gemeinsamen Sedimentation von SP-A und Liposomen führen. Dies ist eine mögliche Erklärung dafür, daß von King et al. in Gegenwart von 10 mM EDTA Lipidbindung an SP-A beobachtet wurde (84). In diesen Versuchen ist von einer freien Calciumkonzentration im submikromolaren Bereich auszugehen.

Eine sequentielle Folge der Ereignisse bei der Interaktion zwischen SP-A und Liposomen wäre auch mit dem Besetzen von Calciumbindungsstellen unterschiedlicher Affinität erklärbar, die verschiedene Interaktionen zwischen Protein und Lipid hervorrufen. Eine Bestätigung dieser Hypothese ist aber insofern schwierig, als daß es gelingen müßte, Calcium- und lipidfreies SP-A zu präparieren. Präzisere Aussagen werden auch durch die unbekannte Zahl von Bindungsstellen und deren Affinität für Calcium am SP-A Molekül erschwert.

5.4 Variation der SP-A-Konzentration

Die Erhöhung der SP-A-Konzentration führt in der kinetischen Lichtstreuung von Beginn an zu einer höheren Signalintensität. Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten für die erste Phase der Reaktion nach der Photolyse von *caged Calcium* liegen bei 3 s^{-1} bei nanomolaren Konzentrationen der Reaktionspartner. Dies gilt sowohl für die Variation der SP-A- als auch der

Liposomenkonzentration. Dabei konnte in der Initialphase der Reaktion keine Abhängigkeit von der Konzentration des variierten Reaktionspartners ermittelt werden. Die Reaktion zwischen SP-A und Liposomen erfolgt damit auffallend schnell. Als mögliche Ursache wurde bereits oben die Ausbildung eines präformiertes Komplexes zwischen SP-A und Lipiden erörtert.

Betrachtet man die zweite Phase der SP-A/Liposomen-Interaktion, die als Beginn der Aggregationsreaktion interpretiert wird, so steigen hier apparente Geschwindigkeitskonstanten und Amplituden mit zunehmender SP-A-Konzentration. Dies ist ein Indiz für die Bildung von mehr bzw. größeren Aggregaten und zeigt, daß das Protein den Aggregationsprozeß kontrolliert. Die Unterschiede der apparenten Geschwindigkeitskonstanten zwischen den Kurzzeitmessungen nach Photolyse (5 s) und den Langzeitmessungen (600 s) erklären sich aus dem beobachteten Zeitraum, in dem verschiedene Prozesse ablaufen. Während die Kurzzeitmessung nur den Beginn der Aggregationsreaktion erfaßt, geht dieser Zeitbereich bei der Langzeitmessung in dem durch die Calciumzugabe verursachten Rühren unter. Es ist zu beobachten, daß sich der komplizierte Aggregationsprozeß, der mehrere Reaktionen umfaßt (z.B. Bindung eines Liposoms an einen SP-A/Liposomen-Komplex, Bindung von zwei SP-A/Lipid-Komplexen aneinander, Bindung eines Liposoms an einen Komplex aus mehreren SP-A-Molekülen und Liposomen) mit einer einzigen Exponentialfunktion mathematisch anpassen läßt. Eine Erklärung dieser Beobachtung könnte darin bestehen, daß man i.w. nur einen Schritt des Aggregationsprozesses, die Verknüpfung zweier Liposomen über ein SP-A-Molekül beobachtet, der über einen Mechanismus pseudo erster Ordnung abläuft und geschwindigkeitsbestimmend ist.

5.5 Einfluß der Lipidkonzentration

Bei konstanter SP-A- und Calciumkonzentration ist die Interaktion zwischen SP-A und Liposomen in einem weiten Konzentrationsbereich von der Konzentration an Liposomen abhängig. Die Kurz- und Langzeitmessungen in der Lichtstreuung zeigen einen ähnlichen Verlauf, wie die Signale bei Variation der SP-A-Konzentration.

Bei der Messung der Bindung verschiedener Lipidkonzentrationen an immobilisiertes SP-A mit der Resonant Mirror Spektroskopie beobachtet man einen zweiphasigen Reaktionsverlauf, der als initiale Besetzung der freien Bindungsstellen am SP-A und

nachfolgenden Umlagerungsreaktionen interpretiert werden kann. Die Einstellung eines Gleichgewichts zwischen gebundenen und freien Liposomen dauert -in Abhängigkeit von der Konzentration- bis zu mehreren Stunden. Aus den Gleichgewichtsamplituden von Messungen mit verschiedenen Lipidkonzentrationen ist es möglich, die Dissoziationskonstante zwischen SP-A und Lipiden zu bestimmen. Bezieht man sich auf den gemessenen Gehalt der Liposomen an Phosphatidylcholin, so erhält man Dissoziationskonstanten für überwiegend DPPC-haltige Liposomen zwischen 3 μM und 5 μM (bei 15 °C). Dies liegt in der gleichen Größenordnung wie die durch King et al. (106) aus Zentrifugationsexperimenten mit radioaktiv markiertem SP-A bestimmten Dissoziationskonstanten, die bei 37 °C mit 1 μM angegeben wurden. Schätzt man aus der Lipidkonzentration und der Liposomengröße die Liposomenkonzentration, so erhält man für den Komplex zwischen calciumaktiviertem SP-A- und DPPC-haltigen Liposomen eine nanomolare Affinität (K_d ca. 0,2 nM). Dieses Vorgehen erfordert die Voraussetzung von Liposomen als reagierende Einheiten, eine Annahme, die durch die vollständige Reversibilität und Reproduzierbarkeit der Reaktion zwischen SP-A und Liposomen gerechtfertigt ist.

5.6 Reaktion von SP-A mit verschiedenen Phospholipiden

Die Untersuchung verschiedenster Phospholipide mit unterschiedlichen Kopfgruppen und Fettsäureacylresten bestätigt die generelle Hypothese der calciumabhängigen Aktivierung von SP-A in eine zusätzlich lipidbindende Form SP- \hat{A} , die zu einer Liposomenaggregation führt.

Diese charakteristische Reaktionsfolge lässt sich bei allen untersuchten Phospholipiden durch mikromolare Calciumkonzentrationen auslösen und ist vollständig reversibel. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Indikator für eine direkte Wechselwirkung zwischen speziellen Calciumbindungsstellen am SP-A und Calciumionen.

Vergleicht man die Phospholipide DPPC und POPC, die sich nur durch eine Doppelbindung unterscheiden, so führt die ungesättigte Fettsäure von Beginn an zu einer Halbierung der Signalintensität und schließlich zu einer im gleichen Verhältnis verringerten Amplitude. Auch die Aggregationsreaktion zeigt vom Zeitpunkt der Aktivierung des SP-A durch Calcium analoges Verhalten (Abbildung 4.23). Daher können die Un-

terschiede nicht mit einer Beeinträchtigung des SP-A durch die Immobilisierung erklärt werden.

Untersucht man die Bindung weiterer Phosphatidylcholone an immobilisiertes SP-A, so unterscheiden sich die Reaktionsgeschwindigkeiten der ersten Phase bei einem zweiphasigen Fit über 200 s nur geringfügig. Abweichungen sind nur beim gesättigten Lipid DSPC festzustellen (-60%). Die Amplituden der ersten Reaktionsphase nehmen in charakteristischer Reihenfolge von DSPC, DPPC, EiPC, DLPC, DOPC, POPC, OPC ab.

Die unterschiedliche Bindung der verschiedenen Phosphatidylcholone durch SP-A spricht dafür, daß neben der Kopfgruppe (die für alle Lipide identisch ist) auch die Ordnung der Acylketten, d.h. deren Packungsdichte in den Liposomen bei der Bindung eine Rolle spielen.

Die unterschiedliche Affinität der verschiedenen Phosphatidylcholone zum SP-A ist auch in der Lichtstreuung festzustellen. Dabei zeigen nur DSPC und DPPC eine über längere Zeit ausgeprägte Aggregationsreaktion. Bei allen anderen Lipiden befindet sich die Reaktion nach ca. 200 s im Gleichgewicht. Diese Beobachtung zeigt die kausale Verknüpfung von Bindung und Aggregation, da die schwächere Bindung von Phosphatidylcholinen mit ungesättigten oder kurzkettigen Fettsäuren auch eine Verringerung (bzw. einen Stillstand) der Aggregation bewirkt, was eine verringerte Stabilität der Aggregate indiziert.

Vergleicht man unterschiedliche Lipidkopfgruppen miteinander, so zeigen PC, PI und SM ein ähnliches Bindungsverhalten. Apparente Geschwindigkeitskonstanten und Amplituden für vergleichbare Liposomen aus PE und PG sind deutlich geringer. Dies zeigt die Präferenz des Proteins für Phosphatidylcholin- (und ähnliche) Kopfgruppen.

Daß darüber hinaus, wie bereits beim Vergleich unterschiedlicher Phosphatidylcholone dargestellt wurde, eine Abhängigkeit der Lipidbindung des SP-A von der Natur der Fettsäuren besteht, zeigt sich im Vergleich von DPPG und PG Liposomen. Analog zu DPPC und PC erhöhen die beiden C16-Seitenketten die Affinität um etwa 50%. Eine derartige Vergrößerung der Amplitude beim Vergleich von DPPC und PC ist auch für den photometrischen Aggregationstest bei deutlich höheren Calciumkonzentrationen von Casals et al. gemessen worden (105). Dies zeigt, daß die hier verwendete

geringe Calciumkonzentration keinen prinzipiellen Einfluß auf den Reaktionsprozeß hat und genauso als Auslöser der Interaktion dienen kann, wie eine Calciumkonzentration im millimolaren Bereich.

Insgesamt erlauben die Ergebnisse keine Aussage über eine spezifische Erkennung von Kopfgruppen oder Fettsäuren, sondern legen vielmehr nahe, daß beide Lipidcharakteristika für die Interaktion zwischen SP-A und Liposomen entscheidend sind und insbesondere die Packungsdichte bestimmter Kopfgruppen die Bindung beeinflusst. Die nur als relativ zu betrachtende Lipidspezifität wird auch durch die Ergebnisse von Casals et al. bestätigt, die aus ihren Untersuchungen schließen: "Die Interaktion von SP-A mit DPPC war ausgeprägter als die mit anderen Phospholipiden (mit derselben Acylkette und T_m aber verschiedenen Kopfgruppen) oder EiPC (mit derselben polaren Kopfgruppe aber verschiedenen Acylketten und T_m)". In dem von den Autoren publizierten Aggregationstest (Calciumkonzentration 5 mM) liegen die Meßwerte für DPPG-Liposomen geringfügig über denen für DPPC. DPPG-Liposomen zeigen allerdings nach Zugabe von Calcium eine höhere Aggregation in Abwesenheit von SP-A (105).

Für die Lipidbindung an SP-A wurde von Kuroki und Akino eine Spezifität für DPPC postuliert. Die Autoren beschreiben eine deutlich schwächere Bindung von radioaktiv markiertem SP-A an EiPC, immobilisiert auf Dünnschichtplatten, im Vergleich zu DPPC (85).

Trotz des vollständig anderen verwendeten Systems (Phospholipide adsorbiert an Sili-cagel auf Dünnschichtplatten im Gegensatz zu Liposomen in Lösung) und der deutlich höheren Calciumkonzentration (2 mM) ist die qualitative Aussage zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit ähnlich. Übereinstimmungen ergeben sich auch bei der starken Bindung von DSPC und der schwachen Bindung von DLPC.

Unterschiede in den Ergebnissen der Untersuchungen sind hingegen beim Vergleich der Kopfgruppen festzustellen: PG, PI, PE und PS binden kein SP-A, während SP-A -in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen- ähnlich gut an SM bindet, wie an DPPC. Mit großer Wahrscheinlichkeit sind die Unterschiede auf das von Kuroki und Akino verwendete Overlayssystem zurückzuführen, in dem die Bindung von iodmarkiertem SP-A an immobilisierte Lipide auf Kieselgel untersucht wird. PE, PG und DPPS binden auch als Liposomen schwächer an SP-A und konnten möglicherweise auf der Autoradiographie nicht mehr vom Hintergrund unterschieden

werden. Zudem ist der Zustand der Lipide auf Silicagel mit Sicherheit anders (d.h. weniger geordnet) als in Liposomen. Dies könnte auch bei PI dazu geführt haben, daß keine Bindung von SP-A erfolgt, zudem die Ordnung der Kopfgruppen und/oder Acylseitenketten für die Bindung entscheidend zu sein scheinen (s.o.).

Die Schlußfolgerung der Autoren Kuroki und Akino, die bereits im Titel programmatisch umgesetzt wird: „*Pulmonary Surfactant Protein A Specifically Binds Phosphatidylcholine*“ ist daher mit den Ergebnissen der Autoren nicht vollständig konsistent, denn SP-A bindet nach den dargestellten Versuchen genauso gut an DSPC wie an DPPC. Auch die Schlußfolgerung, daß SP-A an die unpolare Gruppe der Phospholipide bindet, ist kritisch zu betrachten, denn unter Umständen sind die unpolaren Fettsäureketten die einzige Lipidstruktur, die auf der Kieselgelplatte für das Protein zugänglich ist, da die polaren Kopfgruppen mit dem Kieselgel wechselwirken.

King et al. untersuchten die Bindung von SP-A an Liposomen in unterschiedlichen Lipidmischungen in Gegenwart von 3 mM Calcium (84). Die stärkste Interaktion wurde dabei zwischen SP-A und Liposomen aus 85% DPPC und 15% DPPG festgestellt. Die deutlichen Unterschiede zwischen Liposomen aus einem Gemisch verschiedener Phospholipide und Liposomen mit 90% DPPC könnten bei millimolaren Calciumkonzentrationen auf die verstärkte spontane Aggregation von DPPG-haltigen Liposomen zurückzuführen sein. Bei reinen DPPC-Liposomen ist eine solche Liposomenaggregation ohne SP-A nicht zu beobachten. Für die Ergebnisse in 10 mM EDTA-haltigen Puffer könnten unspezifische Wechselwirkungen zwischen SP-A und Lipid verantwortlich sein. Eine mögliche Erklärung ist eine unterschiedliche Präparationsmethode für SP-A, die bei King et al. zu stärker lipidhaltigem Protein führte, im Vergleich zu den hier verwendeten Präparaten, eine Erklärung, die auch Hawgood anführt (86). Außerdem könnte die lange Dauer der Zentrifugationsexperimente (24 bis 36 Stunden) zu einer Lipidassoziation bei partieller Inaktivierung des Proteins führen. Wie von King et al. gezeigt wurde, findet eine Aggregation unter diesen Versuchsbedingungen nicht statt. Gleichfalls konnte keine Lipidspezifität für SP-A festgestellt werden.

5.7 Temperaturabhängigkeit der Reaktion

Die Temperaturabhängigkeit wurde nur exemplarisch anhand der Bindung von DPPC-

Mix-Liposomen und Liposomen aus 90% DPPC bzw. POPC und 10% Cholesterin untersucht, da höhere Temperaturen (37 °C) die Lebensdauer und Aktivität des immobilisierten SP-A erheblich beeinträchtigen und damit die Kosten für die Versuche sehr hoch sind. Bei den verwendeten Liposomen ist in allen Fällen eine langsamere Bindungsreaktion bei 37 °C im Vergleich zu 15 °C festzustellen. Daher ist die Ursache für die Verlangsamung nicht im Zustand der Lipide zu sehen. Während DPPC eine Übergangstemperatur von 41 °C hat und hier der Phasenübergang durch die Verwendung von Liposomen herabgesetzt sein könnte, ist dies für POPC Liposomen bei -2 °C ausgeschlossen. Da aber auch bei POPC Liposomen die Verlangsamung der Bindung einsetzt, ist der Phasenübergang für diesen Prozeß nicht entscheidend. Hingegen kommt dafür als Ursache in Betracht, daß immobilisiertes SP-A im Gegensatz zu SP-A in Lösung empfindlicher auf die Erhöhung der Temperatur reagiert. Dafür spricht auch der Aktivitätsverlust beim Erwärmen auf 37 °C und die Tatsache, daß in der Lichtstreuung keine Unterschiede in der Anfangskinetik zu beobachten sind.

Für humanes oder Hunde-SP-A wurde eine Übergangstemperatur von der tripelhelikalen zur Zufallsknäuelstruktur von 52 °C ermittelt (57), bei dieser Temperatur ist mit einer Denaturierung des Moleküls zu rechnen.

Nach Angaben von Casals et al. (105) hat eine Erwärmung des SP-A auf 50 °C für 10 Minuten in Abwesenheit von Lipiden in Lösung und anschließendes Abkühlen auf 37 °C nur einen geringen Einfluß auf die Aggregation (ähnliche Geschwindigkeit und Ausmaß der SP-A induzierten Liposomenaggregation) während die Temperaturstabilität des immobilisierten SP-A, vielleicht auch aufgrund seiner geringen Konzentration am Träger, nicht so groß ist. Die im Vergleich dazu geringen Unterschiede in der Aggregation stimmen mit den Ergebnissen von Casals et al. überein, die für SP-A induzierte Aggregation von DPPC Liposomen in Gegenwart von 1 mM Calcium keine großen Unterschiede zwischen 20 °C und 37 °C feststellten und erst bei Temperaturen um 45 °C eine Abnahme der Aggregation um 40% beobachteten (105). Die Messung der Liposomenbindung an immobilisiertes SP-A bei physiologischen Temperaturen ist somit problematischer als die der Aggregationsreaktion in Lösung. Anscheinend wird das immobilisierte Protein durch die höhere Temperatur in einen Zustand versetzt, aus dem heraus es schlechter reagiert. Nur durch ein vorgelagertes inhibitorisches Gleichgewicht ist eine Verlangsamung der Reaktion zu verstehen.

Ansonsten ergaben sich keine prinzipiellen Unterschiede zwischen den Messungen bei 37 °C und 15 °C. Bei beiden Temperaturen wird die Bindung durch mikromolare Calciumkonzentrationen ausgelöst und ist reversibel. Auch die Abhängigkeit der Liposomenbindung von der Calcium- und Lipidkonzentration bleibt erhalten. Gleiches gilt für die Unterschiede in der Bindung von DPPC und POPC (Signale sind um ca. 50% verringert).

5.8 Lokalisation der Lipidbindung am SP-A-Molekül

Die Untersuchung von Bindungs- und Aggregationsreaktion läßt zwar keinen direkten Schluß über die Lipidbindungsregion am SP-A zu, dennoch kann man anhand der Ergebnisse einige hypothetische Betrachtungen über mögliche Lipidbindungsorte am Molekül und deren Plausibilität anstellen. In der Literatur sind letztendlich alle Regionen des Moleküls als Lipidbindungsstellen genannt worden. Geht man aber davon aus, daß SP-A durch Calcium in eine lipidbindende Konformation überführt wird, so ist diese rasche Konformationsänderung im Bereich der flexiblen CRD- und Nackenregion wahrscheinlicher als in der durch Disulfidbrücken und Helixstruktur stabilisierten collagenartigen Domäne. Diese Vermutung wird auch durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von Possmayer et al. gestützt. In Gegenwart von EDTA ist eine aufgeweitete Konformation der CRD-Region zu erkennen, während Calcium zu einem „Zusammenklappen“ des SP-A Moleküls führt (Possmayer, pers. Mitteilung). Wahrscheinlich gibt es neben der calciuminduzierten noch eine unspezifische Lipidbindung an SP-A, die deutlich schwächer ist und keine Aggregation zur Folge hat. Die Bildung eines präformierten Komplexes und die calciumabhängige Lipidbindung könnten auch strukturell an zwei verschiedenen Orten des Moleküls lokalisiert sein und in den elektronenmikroskopisch sichtbaren, unterschiedlichen Konformationen des Moleküls erfolgen. Dafür spricht, daß für die Lipidbindung in der Literatur stets zwei Orte genannt werden:

1. Die aminoternale Region, da die Aufhebung der Disulfidbrücke am Cys 6 und die Abspaltung der collagenartigen Domäne die Lipidbindung herabsetzen.
2. Die CRD-Region, wobei die Aminosäuren um die Disulfidbindung zwischen Cys204 und Cys 218 eine wichtige Rolle spielen (69) und der Sequenzbereich Thr 174 bis Ser 194, der im Ratten-SP-A als essentiell

für die Phospholipidbindung angesehen wird (Kuroki et al, 5th Marburg Surfactant Symposium).

Postuliert man einen präformierten Komplex, in dem keine Aggregation erfolgt, so binden Lipide wahrscheinlich am aminoterminalen Ende der SP-A-Untereinheiten, also am „Stiel“ des blumenstraußartigen Oktadekamers.

Hingegen ist die calciumabhängige Lipidbindung als Voraussetzung für eine Aggregationsreaktion wahrscheinlich an der CRD-Region lokalisiert. In dieser Region wurde anhand der Struktur des MBPs eine Calciumbindungsstelle postuliert. Mutationen an der putativen Calciumbindungsstelle des SP-A unterstützen die Bedeutung der Calciumbindung als Voraussetzung der Lipidbindung (68). Für die CRD-Region ist gesichert, daß sie für die SP-A induzierte Liposomenaggregation erforderlich ist, während die collagenartige Domäne für die Aggregation nicht benötigt wird. Darüber hinaus ist die multivalente Struktur der CRD-Region für eine Aggregation der Liposomen prädestiniert.

Die Hypothese, die anhand der Ergebnisse dieser Arbeit und der Literatur gezogen wurden, ist in Abbildung 5.1 schematisch dargestellt und läßt sich wie folgt zusammenfassen:

1. Es gibt wahrscheinlich einen assoziierten Zustand zwischen SP-A und Lipiden, der nicht zu einer Aggregation führt und in dem die Lipidbindung am aminoterminalen Ende lokalisiert ist. Dieser könnte auch in Gegenwart von 10 mM EDTA die calciumunabhängige Co-Sedimentation von SP-A und Proteinen hervorrufen (84).
2. Die von mikromolaren Calciumkonzentrationen abhängige SP-A-Aktivierung und Bindung von Liposomen führt zu einer nachfolgenden Aggregationsreaktion und erfolgt wahrscheinlich im Bereich der CRD/Nacken Region.

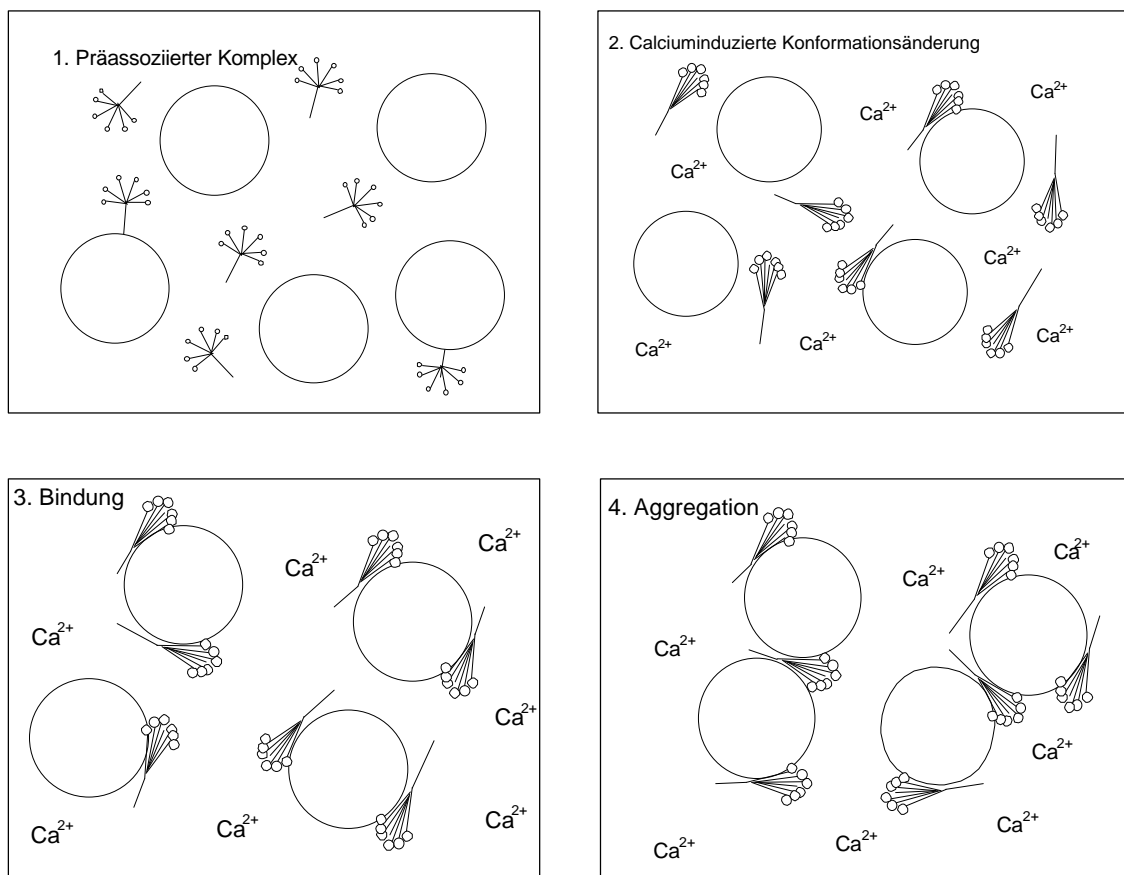


Abbildung 5.1: Hypothetische Reaktionsfolge (Schemazeichnungen)

Comicartige Darstellung des präassozierten Komplexes (1), der Konformationsänderung und Umlagerung nach Calciumzugabe (2), der Bindung (3) und der Aggregationsreaktion (4).

5.9 Physiologische Folgerungen

SP-A ist an zahlreichen Prozessen in Immunabwehr und Surfactanthomöostase beteiligt. Da diese physiologischen Funktionen des Proteins in der Regel calciumabhängig sind, hat die reversible Bindung von Calcium, die hier über die besser zu untersuchende Lipidbindung nachgewiesen wurde, wahrscheinlich die Funktion, zwei Proteinzustände mit unterschiedlichen Aktivitäten, einen calciumbindenden aktiven und einen calciumfreien inaktiven, zu definieren.

Die Calciumkonzentrationen in der alveolären Hypophase um 1,5 mM (103) sollten SP-A aktivieren und in einen lipidbeladenem Zustand überführen. Dabei ist von einer dichten Lipidpackung um das SP-A auszugehen, die am ehesten mit Aggregaten in

konzentrierten Liposomensuspensionen zu vergleichen ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß SP-A bei mikromolaren Calciumkonzentrationen unterschiedlichste Phospholipid-Liposomen bindet, obwohl spezifische quantitative Unterschiede zu messen sind. Daher verhält sich SP-A wie ein calciumabhängiges, peripheres Membranprotein, das vor allem die Kopfgruppen der Lipide, ihre Anordnung und/oder Eigenschaften der Fettsäureseitenketten erkennt. SP-A in seiner calciumaktivierten Form könnte als vergleichsweise unspezifisches aber schnelles extrazelluläres Transportmolekül wirken. Der „beladene Transporter“, ein Komplex aus SP-A und Liposomen, wird gemeinsam in Typ-II-Pneumozyten aufgenommen. Dies stimmt mit den Beobachtungen überein, daß SP-A die Aufnahme von Lipiden in die Typ-II-Pneumozyten erhöht (78). Die Endozytose wird durch spezifische, auf der apikalen Seite der Typ-II-Pneumozyten lokalisierten Rezeptoren vermittelt, zu denen das Rezeptorprotein bp55 zählt (83). In der Zelle werden SP-A und Lipide nicht abgebaut, sondern einem Resekretionsprozeß zugeführt (Recycling). Untersuchungen der Arbeitsgruppe von PD Dr. P. Stevens haben gezeigt, daß SP-A bereits binnen Minuten wieder aus der Zelle ausgeschleust wird und gleichzeitig aufgenommene Lipide in Lamellarkörper eingebaut und kurze Zeit später sezerniert werden (Wissel, pers. Mitteilung). Dies erfordert einen intrazellulären Sortiermechanismus, der SP-A und Lipide rasch voneinander trennt und auf unterschiedlichen Wegen dem Recycling zuführt. Dabei könnte die Aufhebung der Lipidbindung an SP-A durch den Entzug von Calcium eine entscheidende Rolle spielen. Unter intrazellulären Bedingungen bei (sub)mikromolaren Calciumkonzentrationen könnte die Aufhebung der Lipidbindung und die Freisetzung von Liposomen durch Überführung von SP-A in den calciumfreien Zustand erfolgen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß Calcium die Lipidbindung an SP-A an- und ausschalten kann. Die Reaktion erfolgt rasch, reversibel und führt nicht zu einer Fusion der Liposomen. Diese Voraussetzungen muß man für den intrazellulären Freisetzungprozeß fordern.

Bisher ist noch nichts über die Signaltransduktion in den Typ-II-Pneumozyten bei der Aufnahme und intrazellulären Sortierung von SP-A/Lipid-Komplexen bekannt. Unter zellulären Bedingungen ist es durchaus möglich, daß weitere Proteine (z.B. der SP-A Rezeptor) an der Freisetzung und Sortierung beteiligt sind.

Extrazellulär ist SP-A stets im lipidbindenden Zustand und beispielsweise an der Bil-

dung tubulärer Myelinstrukturen beteiligt, deren funktionelle Rolle allerdings nicht geklärt ist. Tubuläres Myelin bildet sich *in vitro* in Gegenwart von SP-A und SP-B und millimolarem Calcium (37). Lipidgebundenes SP-A ist an der strukturellen Organisation spezieller, dichter tubulärer Myelinstrukturen beteiligt, die durch Konversion in den Alveolen in leichtere vesikuläre Formen umgewandelt werden (107). Strukturbildende Funktionen werden sicherlich nicht allein durch SP-A wahrgenommen, da die Experimente zeigen, daß eine Modifikation von Bilayern durch Wechselwirkung mit dem Protein nicht erfolgt. Für strukturbildende Wechselwirkungen sind die hydrophoben Surfactantproteine erforderlich. Eine wichtige funktionelle Rolle übernimmt dabei das SP-B, das wahrscheinlich in Interaktion mit SP-A und SP-C die Oberflächenaktivität durch Ausbreitung eines Lipidmonolayers reguliert. Inwiefern dabei eine direkte Wechselwirkung zwischen den Proteinen stattfindet, bleibt Gegenstand weiterer Forschung.

5.10 Hypothese

Die Interpretation der Ergebnisse lässt sich anhand eines Reaktionsschemas darstellen:

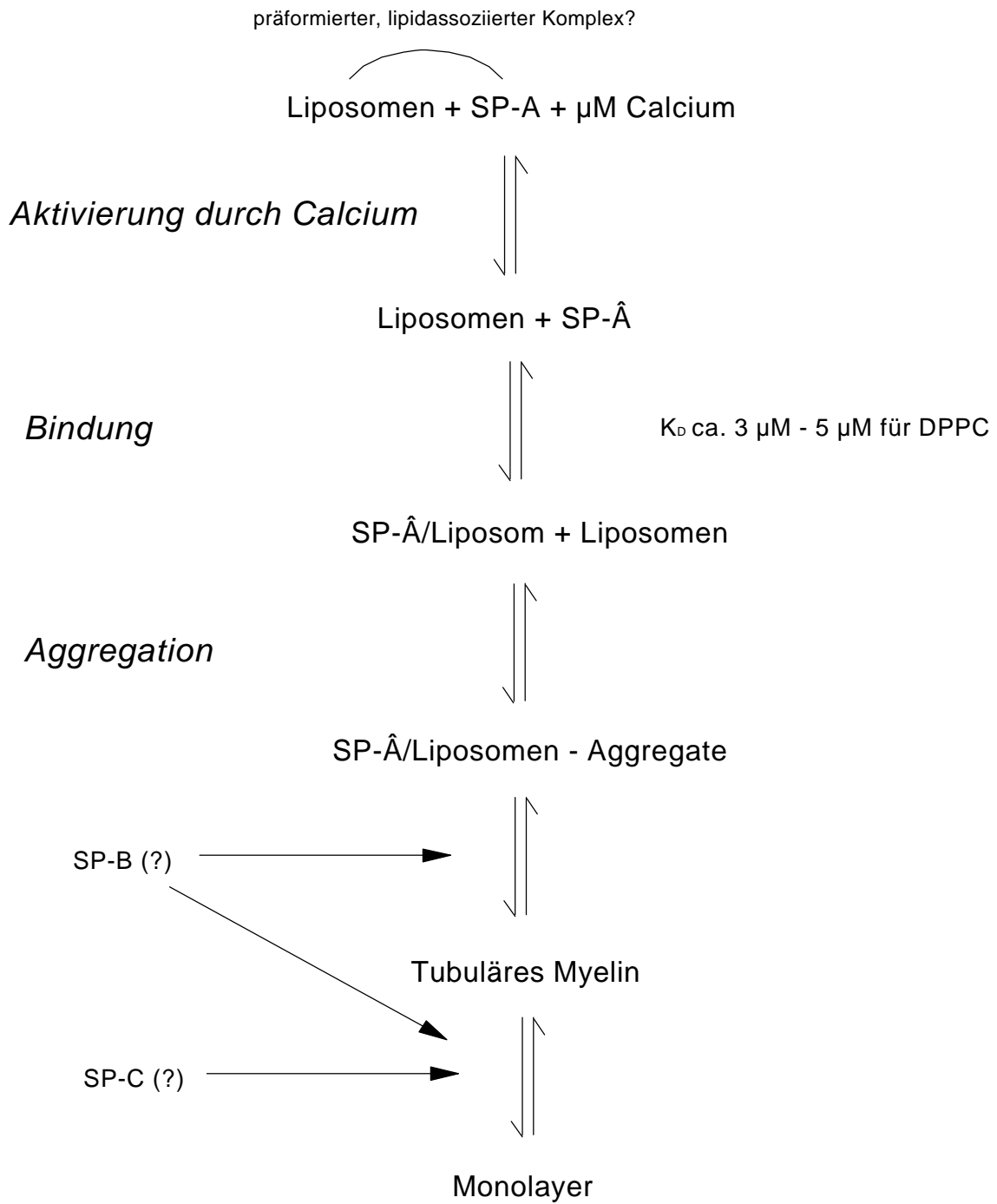


Abbildung 5.2: Reaktionsschema

5.11 Ausblick

Um die im unteren Teil der Hypothese dargestellten Reaktionen experimentell zu prüfen, ist eine Erweiterung des Methodenspektrums unter Einbeziehung von Oberflächenmethoden erforderlich. Neben dem klassischen Langmuir-Trog bietet sich dazu eine methodische Neuentwicklung von Herrn PD Dr. Wolfgang Meier am Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Charité an. Der sogenannte „schwingende Tropfen“ hängt an einer Glaskapillare und wird elektromechanisch zu Resonanzschwingungen angeregt. Bei Einhaltung bestimmter Randbedingungen ist der Tropfen ein mechanisches System, dessen Eigenfrequenz bzw. Schwingungsdauer von der Oberflächenspannung und der Masse bestimmt wird. Die Masse des Tropfens bestimmt man bei dieser Methode durch Videobildverarbeitung. Aus der Schwingungsdauer kann die Oberflächenspannung berechnet werden. Zusätzlich kann aus der Abklingkonstanten nach kurzzeitigem Anhalten des Erregers auch die Viskosität der Tropfenflüssigkeit berechnet werden. Der Vorteil des schwingenden Tropfens gegenüber herkömmlichen Oberflächenmethoden besteht in der Verwendung äußerst geringer Volumina und der gleichzeitigen Bestimmung von Oberflächenspannung und Viskosität.

Erste Vorversuche zeigen, daß in einer Liposomensuspension SP-A keine Wirkung auf die Oberflächenspannung hat, während die hydrophoben Surfactantproteine zu einer deutlichen Verringerung der Oberflächenspannung führen.

Daneben soll in Zukunft die Wechselwirkung zwischen SP-A und SP-B auch mit den Methoden der Kinetischen Lichtstreuung und der Resonant Mirror Spektroskopie charakterisiert werden. Dabei könnte das Verhalten von SP-B-haltigen Liposomen bei Bindung und Aggregation mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit verglichen werden.

Zur genaueren Untersuchung der Aggregation erscheint der Einsatz der Multiwinkellichtstreuung sinnvoll. Möglicherweise ist dem Verlauf der Streukurven eine Gestalt-

änderung bei der Bildung der Aggregate zu entnehmen, so daß Details des Aggregationsprozesses deutlich werden.

Die mit der Calciumbindung einhergehenden intramolekularen Strukturänderungen lassen sich möglicherweise mit Fouriertransform-Infrarot-(FTIR)-Differenz-Spektroskopie erfassen.

Außerdem ist eine Charakterisierung der Interaktion zwischen SP-A und anderen Liganden, z.B. Glykoproteinen oder dem Rezeptor bp55 von besonderem Interesse, sobald von diesem hinreichende Proteinmengen zur Verfügung stehen.

Um die molekularen Ursachen der Wechselwirkung zwischen SP-A und Liposomen genauer zu untersuchen, sollten rekombinantes SP-A und Mutanten mit modifizierten Calcium- und -nach Möglichkeit und Erkenntnisfortschritt- auch Lipidbindungsstellen untersucht werden.

Wie sich an der Vielzahl geplanter Projekte ablesen läßt, wird die Forschung am Surfactant System und an seinem Hauptprotein SP-A auch in Zukunft interessant und spannend bleiben.

Literaturverzeichnis

1. Pattle, R. E. Properties, function and origin of the alveolar lining layer. *Nature*. 1955; 175:1125-1126.
2. Possmayer, F. A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *American Review of Respiratory Disease*. 1988; 138:990-998.
3. Possmayer, F. Biophysical properties of pulmonary surfactant. In: *Surfactant and the respiratory tract*, Edited by: Ekelund, J., Jonson, L., and Malm, L.; Elsevier, Amsterdam, 1989.
4. von Neergard, K. Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik. *Zeitschrift Für Die Gesamte Experimentielle Medizin*. 1929; 66:373-394.
5. Clements, J. A. Surface tension of lung extracts. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1957; 95:170-172.
6. Thannhauser, S. J. Benotti J. Boncoddò N. F. Isolation and properties of hydrolecithin (dipalmityl lecithin) from lung: its occurrence in the sphingomyelin fraction of animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 1946; 166:669-675.
7. Klaus, M. H. Clements J. A. Havel R. J. Composition of surface-active material isolated from beef lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1961; 47:1858-1859.
8. King, R. J.; Klass, D. J.; Gikas, E. G., and Clements, J. A. Isolation of apoproteins from canine surface active material. *American Journal of Physiology*. 1973; 224:788-795.
9. Avery, M. E. and Mead, J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *American Journal of Diseases of Children*. 1959; 97:517-523.
10. Fujiwara, T.; Maeta, H.; Chida, S.; Morita, T.; Watabe, Y., and Abe, T. Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease. *Lancet*. 1980; 1:55-59.
11. Daniels, C. B.; Orgeig, S., and Smits, A. W. The composition and function of reptilian pulmonary surfactant. *Respiration Physiology*. 1995; 102:121-135.
12. Lesur, O.; Veldhuizen, R. A.; Whitsett, J. A.; Hull, W. M.; Possmayer, F.; Cantin, A., and Begin, R. Surfactant-associated proteins (SP-A, SP-B) are increased proportionally to alveolar phospholipids in sheep silicosis. *Lung*. 1993; 171:63-74.
13. Pastrana Rios, B.; Flach, C. R.; Brauner, J. W.; Mautone, A. J., and Mendelsohn, R. A direct test of the "squeeze-out" hypothesis of lung surfactant function. External reflection FT-IR at the air/water interface. *Biochemistry*. 1994; 33:5121-5127.

14. Schurch, S.; Qanbar, R.; Bachofen, H., and Possmayer, F. The surface-associated surfactant reservoir in the alveolar lining. *Biology of the Neonate*. 1995; 67 Suppl 1:61-76.
15. Korfhagen, T. R.; Bruno, M. D.; Ross, G. F.; Huelsman, K. M.; Ikegami, M.; Jobe, A. H.; Wert, S. E.; Stripp, B. R.; Morris, R. E.; Glasser, S. W.; Bachurski, C. J.; Iwamoto, H. S., and Whitsett, J. A. Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996; 93:9594-9599.
16. Hallman, M.; Epstein, B. L., and Gluck, L. Analysis of labeling and clearance of lung surfactant phospholipids in rabbit. Evidence of bidirectional surfactant flux between lamellar bodies and alveolar lavage. *Journal of Clinical Investigation*. 1981; 68:742-751.
17. Rider, E. D.; Ikegami, M., and Jobe, A. H. Localization of alveolar surfactant clearance in rabbit lung cells. *American Journal of Physiology*. 1992; 263:L201-L209.
18. Johansson, J.; Curstedt, T., and Robertson, B. The proteins of the surfactant system. *European Respiratory Journal*. 1994; 7:372-391.
19. Glasser, S. W.; Korfhagen, T. R.; Wert, S. E.; Bruno, M. D.; McWilliams, K. M.; Vorbroker, D. K., and Whitsett, J. A. Genetic element from human surfactant protein SP-C gene confers bronchiolar-alveolar cell specificity in transgenic mice. *American Journal of Physiology*. 1991; 261:L349-L356.
20. Eliakim, R.; DeSchryver Kecskemeti, K.; Noguee, L.; Stenson, W. F., and Alpers, D. H. Isolation and characterization of a small intestinal surfactant-like particle containing alkaline phosphatase and other digestive enzymes. *Journal of Biological Chemistry*. 1989; 264:20614-20619.
21. Fisher, J. H. and Mason, R. Expression of pulmonary surfactant protein D in rat gastric mucosa. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 1995; 12:13-18.
22. Phizackerley, P. J. P. Town M. H. Newman G. E. Hydrophobic proteins of lamellated osmophilic bodies isolated from pig lung. *Biochemical Journal*. 1979; 183:731-736.
23. Weaver, T. E. and Whitsett, J. A. Function and regulation of expression of pulmonary surfactant-associated proteins. *Biochemical Journal*. 1991; 273:249-264.
24. Curstedt, T.; Johansson, J.; Barros Soderling, J.; Robertson, B.; Nilsson, G.; Westberg, M., and Jornvall, H. Low-molecular-mass surfactant protein type 1. The primary structure of a hydrophobic 8-kDa polypeptide with eight half-cystine residues. *European Journal of Biochemistry*. 1988; 172:521-525.
25. Johansson, J.; Curstedt, T., and Jornvall, H. Surfactant protein B: disulfide bridges, structural properties, and kringle similarities. *Biochemistry*. 1991; 30:6917-6921.
26. Johansson, J.; Jornvall, H., and Curstedt, T. Human surfactant

polypeptide SP-B. Disulfide bridges, C-terminal end, and peptide analysis of the airway form. *FEBS-Letters*. 1992; 301:165-167.

27. Bruni, R.; Tausch, H. W., and Waring, A. J. Surfactant protein B: lipid interactions of synthetic peptides representing the amino-terminal amphipathic domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991; 88:7451-7455.

28. Vandebussche, G.; Clercx, A.; Clercx, M.; Curstedt, T.; Johansson, J.; Jornvall, H., and Ruyschaert, J. M. Secondary structure and orientation of the surfactant protein SP-B in a lipid environment. A Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biochemistry*. 1992; 31:9169-9176.

29. Morrow, M. R.; Perez Gil, J.; Simatos, G.; Boland, C.; Stewart, J.; Absolom, D.; Sarin, V., and Keough, K. M. Pulmonary surfactant-associated protein SP-B has little effect on acyl chains in dipalmitoylphosphatidylcholine dispersions. *Biochemistry*. 1993; 32:4397-4402.

30. Hawgood, S.; Benson, B. J.; Schilling, J.; Damm, D.; Clements, J. A., and White, R. T. Nucleotide and amino acid sequences of pulmonary surfactant protein SP 18 and evidence for cooperation between SP 18 and SP 28-36 in surfactant lipid adsorption. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987; 84:66-70.

31. Kobayashi, T.; Nitta, K.; Takahashi, R.; Kurashima, K.; Robertson, B., and Suzuki, Y. Activity of pulmonary surfactant after blocking the associated proteins SP-A and SP-B. *Journal of Applied Physiology*. 1991; 71:530-536.

32. Oosterlaken Dijksterhuis, M. A.; Haagsman, H. P.; van Golde, L. M., and Demel, R. A. Characterization of lipid insertion into monomolecular layers mediated by lung surfactant proteins SP-B and SP-C. *Biochemistry*. 1991; 30:10965-10971.

33. Taneva, S. and Keough, K. M. Pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C in spread monolayers at the air-water interface: III. Proteins SP-B plus SP-C with phospholipids in spread monolayers. *Biophysical Journal*. 1994; 66:1158-1166.

34. Keough, K. M. W. Perez-Gil J. Nag K. Adsorption and monolayer formation of some pulmonary surfactant components visualized by epifluorescence microscopy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1994; 149:A95.

35. Nogee, L. M.; de Mello, D. E.; Dehner, L. P., and Colten, H. R. Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *New England Journal of Medicine*. 1993; 328:406-410.

36. Nogee, L. M.; Garnier, G.; Dietz, H. C.; Singer, L.; Murphy, A. M.; deMello, D. E., and Colten, H. R. A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *Journal of Clinical Investigation*. 1994; 93:1860-1863.

37. Suzuki, Y.; Fujita, Y., and Kogishi, K. Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant. *American Review of Respiratory Disease*. 1989; 140:75-81.

38. Cochrane, C. G. and Revak, S. D. Pulmonary surfactant protein B (SP-B): structure-function relationships. *Science*. 1991; 254:566-568.
39. Vincent, J. S.; Revak, S. D.; Cochrane, C. G., and Levin, I. W. Raman spectroscopic studies of model human pulmonary surfactant systems: phospholipid interactions with peptide paradigms for the surfactant protein SP-B. *Biochemistry*. 1991; 30:8395-8401.
40. Pastrana, B.; Mautone, A. J., and Mendelsohn, R. Fourier transform infrared studies of secondary structure and orientation of pulmonary surfactant SP-C and its effect on the dynamic surface properties of phospholipids. *Biochemistry*. 1991; 30:10058-10064.
41. Morrow, M. R.; Taneva, S.; Simatos, G. A.; Allwood, L. A., and Keough, K. M. ²H NMR studies of the effect of pulmonary surfactant SP-C on the 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine headgroup: a model for transbilayer peptides in surfactant and biological membranes. *Biochemistry*. 1993; 32:11338-11344.
42. Creuwels, L. A. J. M. Demel R. A. van Golde L. M. G. Benson G. L. Haagsman H. P. Effect of acylation on structure and function of surfactant protein C at the air-liquid interface. *Journal of Biological Chemistry*. 1993; 268:26752-26758.
43. Takahashi, A. and Fujiwara, T. Proteolipid in bovine lung surfactant: its role in surfactant function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1986; 135:527-532.
44. Williams, M. C.; Hawgood, S., and Hamilton, R. L. Changes in lipid structure produced by surfactant proteins SP-A, SP-B, and SP-C. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 1991; 5:41-50.
45. Day, A. J. The C-type carbohydrate recognition domain (CRD) superfamily. *Biochemical Society Transactions*. 1994; 22:83-88.
46. Lu, J.; Wiedemann, H.; Holmskov, U.; Thiel, S.; Timpl, R., and Reid, K. B. Structural similarity between lung surfactant protein D and conglutinin. Two distinct, C-type lectins containing collagen-like sequences. *European Journal of Biochemistry*. 1993; 215:793-799.
47. Persson, A. V.; Gibbons, B. J.; Shoemaker, J. D.; Moxley, M. A., and Longmore, W. J. The major glycolipid recognized by SP-D in surfactant is phosphatidylinositol. *Biochemistry*. 1992; 31:12183-12189.
48. Ogasawara, Y.; Kuroki, Y., and Akino, T. Pulmonary surfactant protein D specifically binds to phosphatidylinositol. *Journal of Biological Chemistry*. 1992; 267:21244-21249.
49. Kuan, S. F.; Rust, K., and Crouch, E. Interactions of surfactant protein D with bacterial lipopolysaccharides. Surfactant protein D is an *Escherichia coli*-binding protein in bronchoalveolar lavage. *Journal of Clinical Investigation*. 1992; 90:97-106.
50. Van Iwaarden, J. F.; Shimizu, H.; Van Golde, P. H.; Voelker, D. R., and Van Golde, L. M. Rat surfactant protein D enhances the production of oxygen radicals by rat alveolar macrophages. *Biochemical Journal*. 1992; 286:5-8.

51. Miyamura, K.; Leigh, L. E.; Lu, J.; Hopkin, J.; Lopez Bernal, A., and Reid, K. B. Surfactant protein D binding to alveolar macrophages. *Biochemical Journal*. 1994; 300:237-242.
52. White, R. T.; Damm, D.; Miller, J.; Spratt, K.; Schilling, J.; Hawgood, S.; Benson, B., and Cordell, B. Isolation and characterization of the human pulmonary surfactant apoprotein gene. *Nature*. 1985; 317:361-363.
53. Bruns, G.; Stroh, H.; Veldman, G. M.; Latt, S. A., and Floros, J. The 35 kd pulmonary surfactant-associated protein is encoded on chromosome 10. *Human Genetics*. 1987; 76:58-62.
54. Voss, T.; Melchers, K.; Scheirle, G., and Schafer, K. P. Structural comparison of recombinant pulmonary surfactant protein SP-A derived from two human coding sequences: implications for the chain composition of natural human SP-A. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 1991; 4:88-94.
55. Ross, G. F.; Sawyer, J.; O'Connor, T., and Whitsett, J. A. Intermolecular cross-links mediate aggregation of phospholipid vesicles by pulmonary surfactant protein SP-A. *Biochemistry*. 1991; 30:858-865.
56. Ross, G. F.; Notter, R. H.; Meuth, J., and Whitsett, J. A. Phospholipid binding and biophysical activity of pulmonary surfactant-associated protein (SAP)-35 and its non-collagenous COOH- terminal domains. *Journal of Biological Chemistry*. 1986; 261:14283-14291.
57. Haagsman, H. P.; White, R. T.; Schilling, J.; Lau, K.; Benson, B. J.; Golden, J.; Hawgood, S., and Clements, J. A. Studies of the structure of lung surfactant protein SP-A. *American Journal of Physiology*. 1989; 257:L421-L429.
58. Drickamer, K. and McCreary, V. Exon structure of a mannose-binding protein gene reflects its evolutionary relationship to the asialoglycoprotein receptor and nonfibrillar collagens. *Journal of Biological Chemistry*. 1987; 262:2582-2589.
59. Voss, T.; Eistetter, H.; Schafer, K. P., and Engel, J. Macromolecular organization of natural and recombinant lung surfactant protein SP 28-36. Structural homology with the complement factor C1q. *Journal of Molecular Biology*. 1988; 201:219-227.
60. Weis, W. I. and Drickamer, K. Trimeric structure of a C-type mannose-binding protein. *Structure*. 1994; 2:1227-1240.
61. Whitsett, J. A.; Ross, G.; Weaver, T.; Rice, W.; Dion, C., and Hull, W. Glycosylation and secretion of surfactant-associated glycoprotein A. *Journal of Biological Chemistry*. 1985; 260:15273-15279.
62. Weaver, T. E.; Kropp, K. L., and Whitsett, J. A. In vitro sulfation of pulmonary surfactant-associated protein-35. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1987; 914:205-211.
63. Weaver, T. E.; Hull, W. M.; Ross, G., and Whitsett, J. A. In vitro acetylation of rat pulmonary surfactant-associated glycoprotein(s) A primary translation products. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1986; 869:330-336.

64. van Iwaarden, J. F.; van Strijp, J. A.; Ebskamp, M. J.; Welmers, A. C.; Verhoef, J., and van Golde, L. M. Surfactant protein A is opsonin in phagocytosis of herpes simplex virus type 1 by rat alveolar macrophages. *American Journal of Physiology*. 1991; 261:L204-L209.
65. Tenner, A. J.; Robinson, S. L.; Borchelt, J., and Wright, J. R. Human pulmonary surfactant protein (SP-A), a protein structurally homologous to C1q, can enhance FcR- and CR1-mediated phagocytosis. *Journal of Biological Chemistry*. 1989; 264:13923-13928.
66. Wright, J. R. and Youmans, D. C. Pulmonary surfactant protein A stimulates chemotaxis of alveolar macrophage. *American Journal of Physiology*. 1993; 264:L338-L344.
67. Kuroki, Y.; McCormack, F. X.; Ogasawara, Y.; Mason, R. J., and Voelker, D. R. Epitope mapping for monoclonal antibodies identifies functional domains of pulmonary surfactant protein A that interact with lipids. *Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269:29793-29800.
68. McCormack, F. X.; Stewart, J.; Voelker, D. R., and Damodarasamy, M. Alanine mutagenesis of surfactant protein A reveals that lipid binding and pH-dependent liposome aggregation are mediated by the carbohydrate recognition domain. *Biochemistry*. 1997; 36:13963-13971.
69. McCormack, F. The structure and function of surfactant protein-A. *Chest*. 1997; 111(6 Suppl):114S-119S.
70. Voorhout, W. F.; Veenendaal, T.; Haagsman, H. P.; Verkleij, A. J.; van Golde, L. M., and Geuze, H. J. Surfactant protein A is localized at the corners of the pulmonary tubular myelin lattice. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1991; 39:1331-1336.
71. Ikegami, M.; Korfhagen, T. R.; Bruno, M. D.; Whitsett, J. A., and Jobe, A. H. Surfactant metabolism in surfactant protein A-deficient mice. *American Journal of Physiology*. 1997; 272:L479-L485.
72. Chung, J.; Yu, S. H.; Whitsett, J. A.; Harding, P. G., and Possmayer, F. Effect of surfactant-associated protein-A (SP-A) on the activity of lipid extract surfactant. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1989; 1002:348-358.
73. Schurch, S.; Possmayer, F.; Cheng, S., and Cockshutt, A. M. Pulmonary SP-A enhances adsorption and appears to induce surface sorting of lipid extract surfactant. *American Journal of Physiology*. 1992; 263:L210-L218.
74. Yu, S. H. and Possmayer, F. Effect of pulmonary surfactant protein A and neutral lipid on accretion and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine in surface films. *Journal of Lipid Research*. 1996; 37:1278-1288.
75. Rice, W. R.; Ross, G. F.; Singleton, F. M.; Dingle, S., and Whitsett, J. A. Surfactant-associated protein inhibits phospholipid secretion from type II cells. *Journal of Applied Physiology*. 1987; 63:692-698.
76. Dobbs, L. G.; Wright, J. R.; Hawgood, S.; Gonzalez, R.; Venstrom, K., and Nellenbogen, J. Pulmonary surfactant and its components inhibit secretion

of phosphatidylcholine from cultured rat alveolar type II cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1987; 84:1010-1014.

77. Kuroki, Y.; Mason, R. J., and Voelker, D. R. Alveolar type II cells express a high-affinity receptor for pulmonary surfactant protein A. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1988; 85:5566-5570.
78. Wright, J. R.; Wager, R. E.; Hawgood, S.; Dobbs, L., and Clements, J. A. Surfactant apoprotein Mr = 26,000-36,000 enhances uptake of liposomes by type II cells. Journal of Biological Chemistry. 1987; 262:2888-2894.
79. Young, S. L.; Wright, J. R., and Clements, J. A. Cellular uptake and processing of surfactant lipids and apoprotein SP-A by rat lung. Journal of Applied Physiology. 1989; 66:1336-1342.
80. Bates, S. R.; Dodia, C., and Fisher, A. B. Surfactant protein A regulates uptake of pulmonary surfactant by lung type II cells on microporous membranes. American Journal of Physiology. 1994; 267:L753-L760.
81. Oosterlaken Dijksterhuis, M. A.; van Eijk, M.; van Buel, B. L.; van Golde, L. M., and Haagsman, H. P. Surfactant protein composition of lamellar bodies isolated from rat lung. Biochemical Journal. 1991; 274:115-119.
82. Wright, J. R.; Borchelt, J. D., and Hawgood, S. Lung surfactant apoprotein SP-A (26-36 kDa) binds with high affinity to isolated alveolar type II cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1989; 86:5410-5414.
83. Wissel, H.; Looman, A. C.; Fritzsche, I.; Rustow, B., and Stevens, P. A. SP-A-binding protein BP55 is involved in surfactant endocytosis by type II pneumocytes. American Journal of Physiology. 1996; 271:L432-L440.
84. King, R. J.; Carmichael, M. C., and Horowitz, P. M. Reassembly of lipid-protein complexes of pulmonary surfactant. Proposed mechanism of interaction. Journal of Biological Chemistry. 1983; 258:10672-10680.
85. Kuroki, Y. and Akino, T. Pulmonary surfactant protein A (SP-A) specifically binds dipalmitoylphosphatidylcholine. Journal of Biological Chemistry. 1991; 266:3068-3073.
86. Hawgood, S. The hydrophilic surfactant protein SP-A: molecular biology, structure and function. In: Pulmonary Surfactant: From Molecular Biology to Clinical Practice Edited by Bengt Robertson, Lambert M.G. Van Golde and Joseph J. Batenburg. Elsevier, 1992.
87. King, R. J. Lipid-apolipoprotein interactions in surfactant studied by reassembly. Experimental Lung Research. 1984; 6:237-253.
88. Ruano, M. L.; Miguel, E.; Perez Gil, J., and Casals, C. Comparison of lipid aggregation and self-aggregation activities of pulmonary surfactant-associated protein A. Biochemical Journal. 1996; 313:683-689.
89. Efrati, H.; Hawgood, S.; Williams, M. C.; Hong, K., and Benson, B. J. Divalent cation and hydrogen ion effects on the structure and surface activity

- of pulmonary surfactant. *Biochemistry*. 1987; 26:7986-7993.
90. Haagsman, H. P.; Elfring, R. H.; van Buel, B. L., and Voorhout, W. F. The lung lectin surfactant protein A aggregates phospholipid vesicles via a novel mechanism. *Biochemical Journal*. 1991; 275:273-276.
91. Hawgood, S.; Benson, B. J., and Hamilton, R. L. Jr. Effects of a surfactant-associated protein and calcium ions on the structure and surface activity of lung surfactant lipids. *Biochemistry*. 1985; 24:184-190.
92. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72:248-254.
93. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:680-685.
94. MacDonald, R. C.; MacDonald, R. I.; Menco, B. P.; Takeshita, K.; Subbarao, N. K., and Hu, L. R. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1991; 1061:297-303.
95. Stewart, J. C. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Analytical Biochemistry*. 1980; 104:10-14.
96. Sackmann, E. Dynamische Struktur von Lipid-Doppelschichten und biologischen Membranen: Untersuchung mit Radikalsonden. In: *Biophysik, Ein Lehrbuch* Herausgeber: Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H., Ziegler, H.; Springer Verlag, Berlin. 1978.
97. Hofmann, K.-P., and Emeis, D. Comparative kinetic light-scattering and -absorption photometry. *Biophys. Struct. Mech*. 1981; 8:23-34.
98. McCray, J. A.; Fidler Lim, N.; Ellis Davies, G. C., and Kaplan, J. H. Rate of release of Ca²⁺ following laser photolysis of the DM-nitrophen-Ca²⁺ complex. *Biochemistry*. 1992 ; 31:8856-8861.
99. Ellis Davies, G. C. and Kaplan, J. H. Nitrophenyl-EGTA, a photolabile chelator that selectively binds Ca²⁺ with high affinity and releases it rapidly upon photolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994; 91:187-191.
100. Yingst, D. R. and Hoffman, J. F. Intracellular free Ca and Mg of human red blood cell ghosts measured with entrapped arsenazo III. *Analytical Biochemistry*. 1983; 132:431-448.
101. Sohma, H.; Watanabe, T.; Kuroki, Y.; Yoshino, H.; Matsushima, N.; Yazawa, M., and Akino, T. Calcium dependent conformational changes of surfactant protein A (SP-A) and its collagenase resistant fragment with or without dithiothreitol. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1992; 1159:150-154.
102. New, R. R. C. *Liposomes: A practical approach*. 1990. (Oxford University Press).
103. Nielson, D. W. Electrolyte composition of pulmonary alveolar subphase in anesthetized rabbits. *Journal of Applied Physiology*. 1986; 60:972-979.

104. Haagsman, H. P.; Sargeant, T.; Hauschka, P. V.; Benson, B. J., and Hawgood, S. Binding of calcium to SP-A, a surfactant-associated protein. *Biochemistry*. 1990; 29:8894-8900.
105. Casals, C.; Miguel, E., and Perez Gil, J. Tryptophan fluorescence study on the interaction of pulmonary surfactant protein A with phospholipid vesicles. *Biochemical Journal*. 1993; 296:585-593.
106. King, R. J.; Phillips, M. C.; Horowitz, P. M., and Dang, S. C. Interaction between the 35 kDa apolipoprotein of pulmonary surfactant and saturated phosphatidylcholines. Effects of temperature. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1986; 879:1-13.
107. Wright, J. R. and Dobbs, L. G. Regulation of pulmonary surfactant secretion and clearance. *Annual Review of Physiology*. 1991; 53:395-414.

Anhang

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

| | |
|------------------|--|
| arc s | Bogensekunden |
| Ba ²⁺ | Bariumion |
| BS ³ | Bis(sulfosuccinimidyl)suberat |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| DLPC | Dilauroylphosphatidylcholin |
| DOPC | Dioleoylphosphatidylcholin |
| DPPC | Dipalmitoylphosphatidylcholin |
| DPPG | Dipalmitoylphosphatidylglycerol |
| DPPS | Dipalmitoylphosphatidylserin |
| DSPC | Distearoylphosphatidylcholin |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglykol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| EiPC | Phosphatidylcholin aus Hühnereigelb |
| FTIR | Fourier-Transform-Infrarot |
| h | Stunde |
| K _a | Assoziationskonstante |
| KD | Kilodalton |
| K _d | Dissoziationskonstante |
| MBP | Mannose bindendes Protein |
| Mg ²⁺ | Magnesiumion |
| OGP | Octyl-β-D-glucopyranosid |
| OPC | 1-Oleoyl-2-Hydroxy-sn-Glycero-3-Phosphocholin |
| PC | Phosphatidylcholin |
| PE | Phosphatidylethanolamin |
| PG | Phosphatidylglycerol |
| PI | Phosphatidylinositol |
| POPC | Palmitoyl-oleoylphosphatidylcholin |

| | |
|------------------|--|
| RNA | Ribonukleinsäure |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SM | Sphingomyelin |
| SP-A | Surfactant Protein A |
| SP-B | Surfactant Protein B |
| SP-C | Surfactant Protein C |
| SP-D | Surfactant Protein D |
| Sr ²⁺ | Strontiumionen |
| SUV | Small Unilamellar Vesicles (Kleine unilamellare Liposomen) |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan |
| UV | Ultraviolett |

Verzeichnis der verwendeten Chemikalien

| | | |
|----------------------|---|----------------|
| Acrylamid | Rotiphorese Gel, 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid | Roth |
| Arsenazo III | 1,8-Dihydroxynaphthalen-3.6-disulphonsäure-2,7-bis((azo-2)-phenylarsensäure) | Alexis |
| α -Tocopherol | | Merck |
| BaCl ₂ | Bariumchlorid | Merck |
| BS ³ | Bis(sulfosuccinimidyl)suberat | Pierce |
| BSA | Rinderserumalbumin, fettsäurefrei | Fluka |
| 1-Butanol | | Merck |
| CaCl ₂ | Calciumchlorid | Merck |
| Chloroform | | Merck |
| DM-Nitrophen | [1-(2-Nitro-4,5-dimethoxyphenyl)-1,2-diaminorthan-N,N,N',N',Tetraessigsäure; Dimethoxynitrophenylamin, Natriumsalz] | Calbiochem |
| DTT | Dithiotreitol | Fluka |
| EDTA | Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure, Na ₄ -Salz•1,5 H ₂ O | Serva |
| EGTA | Ethylenglycol-O.O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure | Fluka |
| Essigsäure | | Merck |
| Ethanolamin | | Merck |
| FeCl ₃ | Eisen-III-chlorid | Merck |
| HCl | Salzsäure | Merck |
| Hepes | 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure | Fluka |
| Methanol | | Merck |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid | Merck |
| NaBr | Natriumbromid | Merck |
| NaCl | Natriumchlorid | Merck |
| NaOH | Natriumhydroxid | Merck |
| NH ₄ SCN | Ammoniumthiocyanat | Riedel-de Haën |
| OGP | Octyl- β -D-glycopyranosid | Merck |
| Serva Blue R | | Serva |
| SrCl ₂ | Strontiumchlorid | Merck |

| | | |
|----------|----------------------------------|-------|
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan | Merck |
| Tween-20 | | Merck |

Lipide

| | | | |
|----------|--|------------|---------------------|
| DLPC | 1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholin | C12:0 | Sigma |
| DOPC | 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-phosphocholin | C18:1 | Avanti Polar Lipids |
| DPPC | 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin | C16:0 | Sigma |
| DPPG | Dipalmitoyl-DL- α -phosphatidyl-DL-glycerol | | Sigma |
| DPPS | 1,2-Dipalmitoyl-rac-glycero-3-phospho-L-serin | C16:0 | Sigma |
| DSPC | 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin | C18:0 | Sigma |
| OPC | 1-Oleoyl-2-Hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholin | C18:1 | Avanti Polar Lipids |
| PC, EiPC | Phosphatidylcholin Typ V-E aus Eigelb | | Sigma |
| PE | L- α -Phosphatidylethanolamin | | Sigma |
| PG | L- α -Phosphatidyl-DL-glycerol | | Sigma |
| PI | L- α -Phosphatidylinositol aus Rinderleber | | Sigma |
| POPC | 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin | C16:0-18:1 | Avanti Polar Lipids |
| SM | Sphingomyelin aus Hühnereigelb | | Sigma |

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 1996 bis Oktober 1998 am Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Charité, Universitätsklinikum der Humboldt Universität zu Berlin, unter der Leitung von Prof. Dr. Klaus-Peter Hofmann angefertigt. Hiermit danke ich Herrn Prof. Dr. Klaus-Peter Hofmann herzlich für die Überlassung des Themas und der Arbeitsmöglichkeiten im Institut sowie für viele interessante und hilfreiche Gespräche.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Dieter Maretzki, der meine Arbeit mit zahlreichen Anregungen und großem Interesse begleitete. Seine Unterstützung hat maßgeblich zum Entstehen der Arbeit beigetragen.

Für die gute Arbeitsatmosphäre, Hilfsbereitschaft und das freundliche Miteinander möchte ich *allen* Mitgliedern des Instituts danken, insbesondere Frau Dr. Gabriele Tellgmann, Frau Dipl.-Chem. Kristina Sachs und Herrn Dipl.-Biochem. Christoph Seibert, die stets unmittelbaren Anteil am Fortgang der Arbeit nahmen.

Herrn PD Dr. Paul Stevens danke ich für die Überlassung von Schaf- und Ratten-SP-A. Herrn Mark Eigen danke ich für die Präparation des Proteins. Für die Calciumbestimmung mit Arsenazo danke ich Frau Dr. Elke Hessel, IMPB, und für die Analyse mit Atomabsorptionsspektroskopie Frau Dipl.-Biochem. Simone Kardinahl, Institut für Biochemie der Medizinischen Universität Lübeck.

Herr Dr. Oliver Ernst hat mich in die Benutzung der Resonant Mirror Spektroskopie eingeführt, Herr Dr. Martin Heck erklärte mir die Lichtstreuung, beiden sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

Herrn Dr. Sigurd Magnus und Herrn Dr. Martin Drechsler danke ich für die Hilfe bei der Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Bei der Beschaffung von Literatur war mir freundlicherweise Frau Margit Neumann behilflich, Frau Renate Raddatz half mir tatkräftig beim Meistern organisatorischer Probleme - vielen Dank.

Für das kritische Lesen des Manuskripts und das Austreiben des „Fehlerteufels“ danke ich Herrn PD Dr. Dieter Maretzki, Frau Dipl.-Chem. Kristina Sachs und meinem Freund Mirko Klezath.

Lebenslauf

| | | |
|---------------------|--------------------|---|
| Vorname, Name | | Astrid Meyboom |
| Geburtsdatum | | 12.03.1971 |
| Geburtsort | | Goch |
| | | |
| Familienstand | | ledig |
| Staatsangehörigkeit | | deutsch |
| | | |
| Ausbildung | | |
| Schule | 1977 - 1981 | St. Georg Schule Goch, Gemeinschaftsgrundschule |
| | 1981 - 1990 | Städt. Gymnasium Goch |
| | Mai 1990 | Abitur |
| | | |
| Hochschule | 1990 - 1996 | Studium der Biochemie an der Universität Hannover Diplomarbeit am Institut für Toxikologie Thema: Nachweis von Amanitin durch Hemmung der eukaryontischen RNA- Polymerase II Abschluß: Diplom |
| | seit 01.02.1996 | Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für medizinische Physik und Biophysik der Charité, Humboldt-Universität zu Berlin |
| | 1999 | Promotion zum Thema: Untersuchungen zur Wechselwirkung von Surfactant Protein A mit Liposomen |

Erklärung

Ich erkläre, daß ich diese Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe und daß alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinne nach anderen Werken entnommen sind, durch Angaben der Quellen als Entlehnung kenntlich gemacht worden sind.

Berlin, 22. Oktober 1998

Astrid Meyboom