

Stefan Malcharek

Der alveolare Surfactant:
Korrelation von Lipidmetabolismus,
Funktion und struktureller Organisation



2004

Biochemie

Der alveolare Surfactant:
Korrelation von Lipidmetabolismus,
Funktion und struktureller Organisation

Inaugural Dissertation
zur Erlangung der Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Stefan Malcharek
aus Herten

Dekan: Prof. Dr. J. Leker

Erster Gutachter : Prof. Dr. H.-J. Galla

Zweiter Gutachter: Priv.-Doz. Dr. J. Wegener

Tag der mündlichen Prüfung(en): 26./27.10.2004

Tag der Promotion: 27.10.2004

Abstract

This study is focused on the biophysical analysis of the changes in lung surfactant composition with an *in vitro* and *in vivo* lung surfactant model system. The *in vitro* system is composed of the saturated phospholipids dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and dipalmitoyl-phosphatidylglycerol (DPPG) in a molar ratio 80:20 with 0,4 mol % SP-C. Film balance (FB), fluorescence microscopy (FM) and scanning force microscopy (SFM) results show, that the compression of a model system containing DPPC/DPPG/SP-C leads to a formation of multilayer structures at high surface pressure. The structure of these protrusions can be influenced by adding non-bilayer lipids, such as POPE to this model system. The topography of these lipid-protein mixtures show smaller protrusions. This can be interpreted as a stabilisation of the edges of squeezed out multilayers by the cone shaped non-bilayer lipids. Following this interpretation an addition of the bilayer stabilizing lipid cholesterol, should lead to the formation of broadened domains. Experiments were performed on a DPPC/DPPG/SP-C (80:20:0,4 mol %) system and compared to the protein free DPPC/DPPG (80:20 mol %) films. Different amounts of Cholesterol or POPE were added to both systems. The results of the film balance experiments for these systems show a shift to smaller molecular area with increasing amounts of cholesterol, which is interpreted as a decrease of rigidity of the films. With increasing amount of POPE, a higher compressibility could be observed. This means that the fluidity is increased by POPE. For the characterisation of the phase behaviour fluorescence microscopy at the air-water interface was used. The domain structure at different pressures and ratios of cholesterol or POPE were compared. At a given surface pressure the size of the fluid domains increases with increasing cholesterol content. By increasing the content of POPE a phase separation was observed at high pressure for lipid- and lipid/protein-films. Additionally the observed protrusions become smaller. SFM was used to visualize the topography of the SP-C containing samples. For all peptide containing systems protrusions with steps of 6 nm in height could be observed. These protrusions become broader upon increasing cholesterol ratio, in contrary to the POPE containing systems, which show protrusion structures becoming more narrow upon increasing the amount of POPE. This results presented here are in line with our expectations for cholesterol as a bilayer stabilizing and POPE as a bilayer destabilizing compound.

In a second approach epidermal (E)- und heart (H)-fatty acid binding proteins (FABPs) single and double knock-out (d-ko) mice are used as an *in vivo* model system. Since lung surfactant contains 90 % lipids endogenous and exogenous fatty acids are necessary for the synthesis of lung surfactant. FABPs are required to transport and to provide these fatty acids to the lipid metabolism. The isolated hydrophobic extract from E-/H- FABP d-ko mice show a decreased lipid/protein-ratio. FB and SFM measurements of this lipid/protein-mixtures demonstrate a dysfunction in formation of multilayers at the air-water interface. Hydrophobic extract obtained from wildtype (wt) and d-ko mice was investigated by FM. The domains show differences in size and structure, which correspond to high and low values of the lipid/protein-ratio of wt and d-ko mice. A correlation between Lipid/protein-ratio and FB measurements with the material of single knock-out mice proved that E-FABP is mainly responsible for the change of the hydrophobic extract properties.

If d-ko mice were treated by oral administration of pioglitazone, a drug that intensifies lipid synthesis, an increase of the lipid/protein-ratio was observed coming close to a value observed with wildtype mice. Additionally the formation of multilayers in the plateau region of hydrophobic extract was regenerated by pioglitazone treatment. The isotherms and SFM images indicate an increasing formation of multilayers. FM measurements show comparable size and structure of domains.

With an ARDS model system varieties in lipid/protein-ratio of d-ko and wt mice could be perfectly demonstrated. Film balance measurements show that the H-FABP ko mice lost significantly less material into the subphase during the compression and expansion cycles. In conclusion we demonstrate that the lipid metabolism is strongly correlated to the structural organisation and proper function of the alveolar surfactant.

Meinen Eltern

Inhalt:

Abstract	<i>i</i>
Inhaltsverzeichnis	<i>v</i>
Glossar	<i>vii</i>

I Grundlagen und Methoden

1. Grundlagen

1.1 Aufbau und Funktion der Lunge.....	1
1.2 Das Lungensurfactant.....	2

2. Methoden

2.1 Isolierung von SP-C aus Schweinelungenlavage.....	24
2.2 Isolierung des hydrophoben Extraktes aus Mäuselungen.....	25
2.3 Biochemische Analysen.....	26
2.4 Apparative Techniken.....	30
2.5 Statistische Analyse.....	43

II Ergebnisse und Diskussion

3. *In vitro* Modell: Einfluss von Cholesterol & POPE

3.1 Einleitung.....	47
3.2 Filmwaageuntersuchungen an der Wasser/Luft-Grenzfläche.....	47
3.3 FM an Cholesterol und POPE-haltigen Filmen.....	49
3.4 Raster-Kraft-Mikroskopie (SFM) an Cholesterol und POPE-haltigen Filmen.....	53
3.5 Diskussion und Zusammenfassung.....	58

4. *In vivo* Extrakt-Modell: Charakterisierung des Surfactant aus *d-ko* Mäusen

4.1 Einleitung.....	66
4.2 Lipid/Protein-Verhältnisse.....	66
4.3 Zusammensetzung des hydrophoben Extraktes.....	68
4.4 Druck/Flächen-Diagramme.....	70
4.5 Charakterisierung des Phasenverhaltens mit Hilfe der FM.....	72
4.6 SFM-Untersuchungen des hydrophoben Extraktes.....	75
4.7 Diskussion und Zusammenfassung.....	78

5. *In vivo* Extrakt- Modell: Charakterisierung des Surfactant von E- und H- ko Mäusen

5.1 Einleitung.....	85
5.2 Lipid/Protein-Verhältnisse.....	85
5.3 Druck/Flächen-Diagramm.....	86
5.4 Diskussion und Zusammenfassung.....	87

6. *In vivo* Extrakt-Modell: Einfluss von Pioglitazon auf das Surfactant von d-ko Mäusen

6.1 Einleitung.....	89
6.2 Lipid/Protein-Verhältnisse.....	90
6.3 Druck/Flächen-Diagramme.....	91
6.4 Charakterisierung des Phasenverhaltens mit der FM.....	93
6.5 SFM-Untersuchungen des hydrophoben Extraktes.....	94
6.6 Diskussion und Zusammenfassung.....	96

7. *In vivo* Extrakt-Modell: Auswirkungen des ARDS auf das Surfactant

7.1 Einleitung.....	102
7.2 Lipid/Protein-Verhältnisse.....	103
7.3 Druck/Flächen-Diagramme.....	104
7.4 Diskussion und Zusammenfassung.....	107

8. Abschlußdiskussion und Ausblick..... 114

III Anhang

A. Literatur.....	127
B. Abbildungsverzeichnis.....	150
C. Materialien und Geräte.....	153
D. Danksagung.....	155
E. Lebenslauf.....	157

Glossar

Atemnotsyndrom des Früh- und Neugeborenen (eng. <i>infant respiratory distress syndrome</i>)	IRDS
Atemnotsyndrom des Erwachsenen (eng. <i>adult respiratory distress syndrom</i>)	ARDS
Surfactant Protein-A	SP-A
Surfactant Protein-B	SP-B
Surfactant Protein-C	SP-C
Surfactant Protein-D	SP-D
Phosphatidylethanolamin	PE
Phosphatidylcholin	PC
Phosphatidylserin	PS
Phosphatidylglycerol	PG
Phosphatidylinositol	PI
Sphingomyelin	SM
1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholin	DPPC
1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylglycerol	DPPG
1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholin	POPC
1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylethanolamin	DPPE
1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylethanolamin	POPE
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylethanolamin	DOPE
1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylethanolamin	DPPE
1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylethanolamin	DMPE
2-(4,4-difluoro-5-methyl-4-bora-3a,4a,-diazas-indacene-3-dodecanoyl)-1-hexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocolin	BODIPY-PC [®]
Rinderserumalbumin (eng. <i>Bovine Serum Albumin</i>)	BSA
Natriumdodecylsulfat (eng. <i>sodium dodecylsulfate</i>)	SDS
Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne (eng. <i>carbohydrate recognition domain</i>)	CDR
Aminosäuren	AS
komplementäre Desoxyribonucleinsäure	cDNA
N-Terminus	Aminoterminus (-NH ₂) eines Peptids

C-Terminus	Carboxyterminus (-COO ⁻)
	eines Peptids
Proliferator aktivierter Rezeptor	PPAR
Fettsäure-Translokase (eng. <i>fatty acid translokase</i>)	FAT
Retinsäure-X-Rezeptor	RXR
DNA-Erkennungsdomäne	PPRE
Phosphoenolpyruvatcarboxykinase	PEPCK
Glucosetransporter	GLUT
polymorph-kernige Granulozyten	PMNs
Fettsäurebindungsprotein (eng. <i>fatty acid binding protein</i>)	FABP
Herz-FABP	H-FABP
Epidermal-FABP	E-FABP
Leber-FABP	L-FABP
Adipozyten-FABP	A-FABP
<i>knock-out</i>	ko
E-(-/-) FABP <i>knock out</i>	E-ko
H-(-/-) FABP <i>knock out</i>	H-ko
E- und H-FABP doppel <i>knock-out</i>	d-ko
Wildtyp	wt
Lipopolysaccharid	LPS
<i>charge-coupled device</i>	CCD
Fluoreszenz-Mikroskopie	FM
flüssig kondensiert (eng. <i>liquid condensed</i>)	<i>l_c</i>
flüssig expandiert (eng. <i>liquid expanded</i>)	<i>l_e</i>
gasanalog (eng. <i>gaseous</i>)	<i>g</i>
<i>flüssig</i> (eng. <i>liquid</i>)	<i>l</i>
fest (eng. <i>solid</i>)	<i>s</i>
Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (eng. <i>High Performance Liquid-Chromatography</i>) (eng. <i>Molecular Dynamics</i>)	HPLC MD
Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie	FTIR -Spektroskopie
Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (eng. <i>Time-of-flight Secondary Ion Mass Spectrometry</i>)	Tof-SIMS

Raster-Kraft-Mikroskopie (eng. <i>Scanning Force-Microscopy</i>)	SFM
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	SDS-PAGE
Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie (eng. <i>High Performance Thin-Layer-Chromatography</i>) (eng. <i>Captive Bubble Tensiometer</i>) (eng. <i>Captive Bubble Surfactometer</i>)	HPTLC CBT CBS
Elektronen Spray Ionisation	ESI
Elektronen-Mikroskopie	EM
Druck	p
Radius	r
kilo Dalton	kDa
Erdbeschleunigung	g
Oberflächendruck	Π
molekulare Fläche	A_M
Nano	n
Mikro	μ
Liter	l
Ultraviolett	UV
visuell	Vis
$\text{Mol}\cdot\text{l}^{-1}$	M
Angström	Å
Compliance	C
Raumtemperatur	RT
(eng. <i>dots per inch</i>)	dpi
(eng. <i>bits per pixel</i>)	bpp
M_x, M_y	Inhomogenität der Ausleuchtung (x-, y- Koordinate)
Fluoreszenzintensität	I
Gesamtzahl	N
Fläche	A
dunklen Domänen	d

hellen Domänen	b
Verteilungsdichte	σ
mittlere Intensität	\bar{I}
relativen Flächen	A*
Tierexperimentellen Einrichtung	ZTE
Körpergewicht	KG

Teil I

Grundlagen und Methoden

1. Grundlagen

1.1 Aufbau und Funktion der Lunge

Das Atmungssystem besteht aus Nase, Nasennebenhöhlen, Rachen als Durchtritt für Atemluft, Kehlkopf, Luftröhre (Trachea), Bronchien, Bronchiolen und Alveolen (Abb. 1.0 **a**). Zusätzlich sind andere Körperteile wie Brustkorb (Pleura), Zwerchfell, Thoraxwand und die Atemmuskulatur, welche das Heben und Senken der Rippen während der Einatmung (Inspiration) und Ausatmung (Expiration) ermöglicht, für eine ausreichende Sauerstoffversorgung verantwortlich.

Über Nase und Mund gelangt die Luft in den Rachen und die Trachea, wobei sich diese im Brustkorb in den linken und rechten Hauptbronchus dichotom unterteilt. Beide Hauptbronchien treten an den Lungenwurzeln in den rechten bzw. linken Lungenflügel ein. Innerhalb der Lungenflügel verzweigen sich die Luftwege in viele kleine Äste, die Bronchien und Bronchiolen genannt werden. Die irregulär dichotom, luftleitenden Atemwege wie Trachea, Bronchien und Bronchiolen dienen nicht nur der Verteilung der Atemluft, sondern auch als effizienter, aerodynamischer Filter für inhalierte Partikel. Dieser Filter besitzt ein Selbstreinigungssystem (mukoziliärer Apparat [1]), welcher durch Husten und Bronchokonstriktion unterstützt wird. Am Ende dieses Luftkanal-Systems befinden sich die Lungenbläschen (Alveolen). Erst hier findet der Gasaustausch zwischen Kohlendioxid und Sauerstoff mit dem Blut statt. Die Alveolen sind mit einem oberflächenaktiven Lipid/Protein-Gemisch, dem Lungensurfactant ausgekleidet.

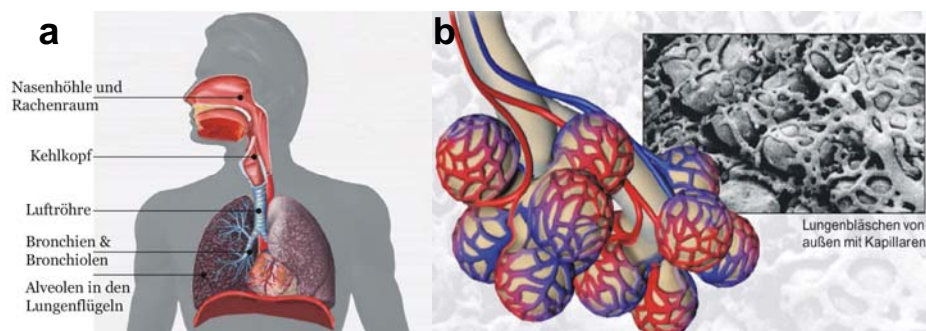


Abbildung 1.0 **(a)** Darstellung des Luftweges **(b)** Ausschnitt eines Bronchiolus mit begleitender Lungenarterie. Das Kapillarnetz umspinnt die Alveolen, wo dann der Gasaustausch stattfindet.

1.2. Das Lungensurfactant

1.2.1 Physiologische Funktion

Die alveolare Oberfläche der Lunge ist eine empfindliche, biologische Grenzfläche, die während des Atmungszyklusses unterschiedliche Oberflächenspannungen durchläuft. Die Oberflächenspannung γ ist am Ende der Inspiration groß und gewährleistet dadurch das Zurückziehen bzw. Schrumpfen (Retraktion) der Lunge. Am Ende der Expiration ist sie klein. Physikalisch lässt sich dies durch das Gesetz von Laplace beschreiben:

$$p = \frac{2 \cdot \gamma}{r} \quad (\text{Gl. 1})$$

p = Innendruck der Alveole,

γ = Oberflächenspannung,

r = Radius

Somit kann eine Alveole durch einen niedrigen Innendruck p stabil gehalten werden, wenn bei kleinem Radius r die Oberflächenspannung gering ist.

Zusätzlich muss die alveolare Oberfläche sich vor inhalierten Partikeln wie Pathogenen und Toxinen schützen. Dieses gelingt ihr mit einer multifunktionellen Substanz, dem Lungensurfactant [2]. Schon in den 1960er Jahren gelang der Nachweis, dass das Surfactant in der Lage ist, niedrige Oberflächenspannungen während der Ausatmung zu erzeugen [3-5]. Es bedeckt die Oberfläche und verhindert dadurch das Kollabieren von Alveolen durch niedrige Oberflächenspannungen und ist an der Beseitigung von Fremdpartikeln beteiligt.

Eine unzureichende Funktion des Surfactant kann die Ursache für eine Atmungsschwäche (respiratorische Insuffizienz), dem sog. Atemnotsyndrom des Früh- und Neugeborenen (eng. *infant respiratory distress syndrome*, IRDS) bzw. Erwachsenen (eng. *adult respiratory distress syndrom*, ARDS), sein. Diese Lungenerkrankungen resultieren aus einem Surfactantmangel, die nach dem Kollaps der

Lungenalveolen zu einer mangelhaften bis fehlenden Lungenausdehnung (Atelektase) führen.

1.2.2 Die Synthese des Lungensurfactant

Typ II Pneumozyten, Fibroblasten und Alveolar-Makrophagen spielen eine maßgebliche Rolle für den Surfactant-Metabolismus. Die Typ II Pneumozyten weisen einen Anteil von 14 % aller Lungenzellen auf und haben eine kubische Form mit einem Durchmesser von ca. 9 μm . Besonderes Merkmal dieser Zellen sind die Lamellar-Körper (eng. *lamellar bodies*), die ca. 18 bis 24 % des Zytoplasmas der Zelle ausmachen. Die Synthese der einzelnen Surfactantkomponenten beginnt im endoplasmatischen Retikulum der Typ II Pneumozyten, der Zusammenbau der einzelnen Komponenten und die intrazelluläre Speicherung erfolgt dann in den *lamellar bodies*. Durch Exozytose gelangen diese in den Flüssigkeitsfilm auf der Innenseite der Typ I Pneumozyten (Abb. 1.1). Dort entfalten sich die dicht gepackten Membranen und bilden mit dem hydrophilen Surfactant Protein (SP)-A, dem hydrophoben SP-B und Phospholipiden eine netzartige Struktur, das tubuläre Myelin. Dieses ist morphologisch durch sich in regelmäßigen Abständen kreuzende Doppelmembranen gekennzeichnet und stellt die direkte Vorläuferstufe des Surfactantfilms an der Luft/Wasser-Grenzfläche dar. Untersuchungen belegten, dass die Surfactant-Synthese ein dynamisches System ist [6], da 80 % des Lipid/Protein-Gemisches im Säugling zu den Typ II Pneumozyten zurückgeführt wird.

Die Fibroblasten befinden sich in unmittelbarer Nähe zu den Typ II Pneumozyten. Diese können die Typ II Pneumozyten mit Lipidbausteinen wie Triacylglyceriden versorgen. Insbesondere bei erhöhtem Bedarf an Lungensurfactant wie z.B. bei der Geburt oder Lungenerkrankungen kommt ihnen eine besondere Bedeutung zu. Durch Akkumulation der Lipidsubstrate stellen sie eine bedarfsgerechte Versorgung der Typ II Pneumozyten sicher [7].

Beim Recyclingprozess des Surfactant-Metabolismus nehmen Makrophagen altes oder auch oxidiertes, lysiertes Material auf (Phagozytose, Abb. 1.1). Indem sie es im Inneren der Zelle abbauen, können sie es für ihre eigene Triacylglycerinsynthese verwenden [8].

Insgesamt werden 10-15 % des Lungensurfactant im Recyclingprozess über die Makrophagen phagozytiert und ein Prozent über die Atemwege abgeleitet.

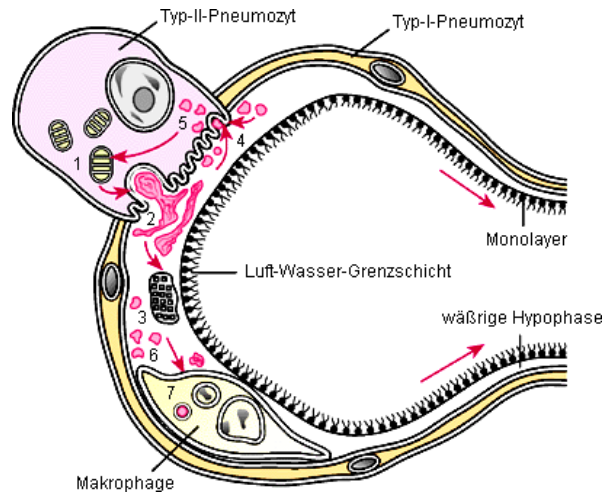


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung des Surfactant-Stoffwechsels. (1) Surfactant-Speicherung in *lamellar bodies* (2) Exozytose (3) tubuläres Myelin (4) und (6) gebrauchtes Surfactant in wässriger Hypophase (5) Rückabsorption von gebrauchten Surfactant (7) Phagozytose von gebrauchten Surfactant durch einen Makrophagen [9].

1.2.3 Die Zusammensetzung des Lungensurfactant

1.2.3.1 Lipide

Das Surfactant der Lunge besteht zu 90 % aus Lipiden und zu 10 % aus Proteinen. Obwohl eine Kooperation zwischen den Surfactant spezifischen Proteinen A, B, C und D und den Lipiden für einen vollständig funktionsfähigen Atmungsvorgang nötig ist, sind die Lipide essentiell für die lebenswichtige Reduktion der Oberflächenspannung während der Ausatmung [10].

Die Lipide bestehen aus einem Glycerin-Grundgerüst, das an den Kohlenstoffatomen C₁ und C₂ jeweils mit einer Fettsäure verestert ist. Am häufigsten treten ungesättigte Fettsäuren mit 16 oder 18 Kohlenstoffeinheiten auf, aber auch deren einfach ungesättigte Derivate. An C₃-Position ist das Glycerin über eine Phosphodiesterbindung

an eine polare oder geladene Kopfgruppe gebunden. Die Variation der Kopfgruppen und Fettsäuren führt zu unterschiedlichen Glycerophospholipiden (Abb. 1.2). Der jeweilige Name leitet sich aus den beiden Fettsäuren ab, gefolgt von den Namen der Kopfgruppe. 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholin (**DPPC**) besteht somit aus zwei gesättigten Palmitinsäuren sowie einer Phosphatidylcholin-Kopfgruppe.

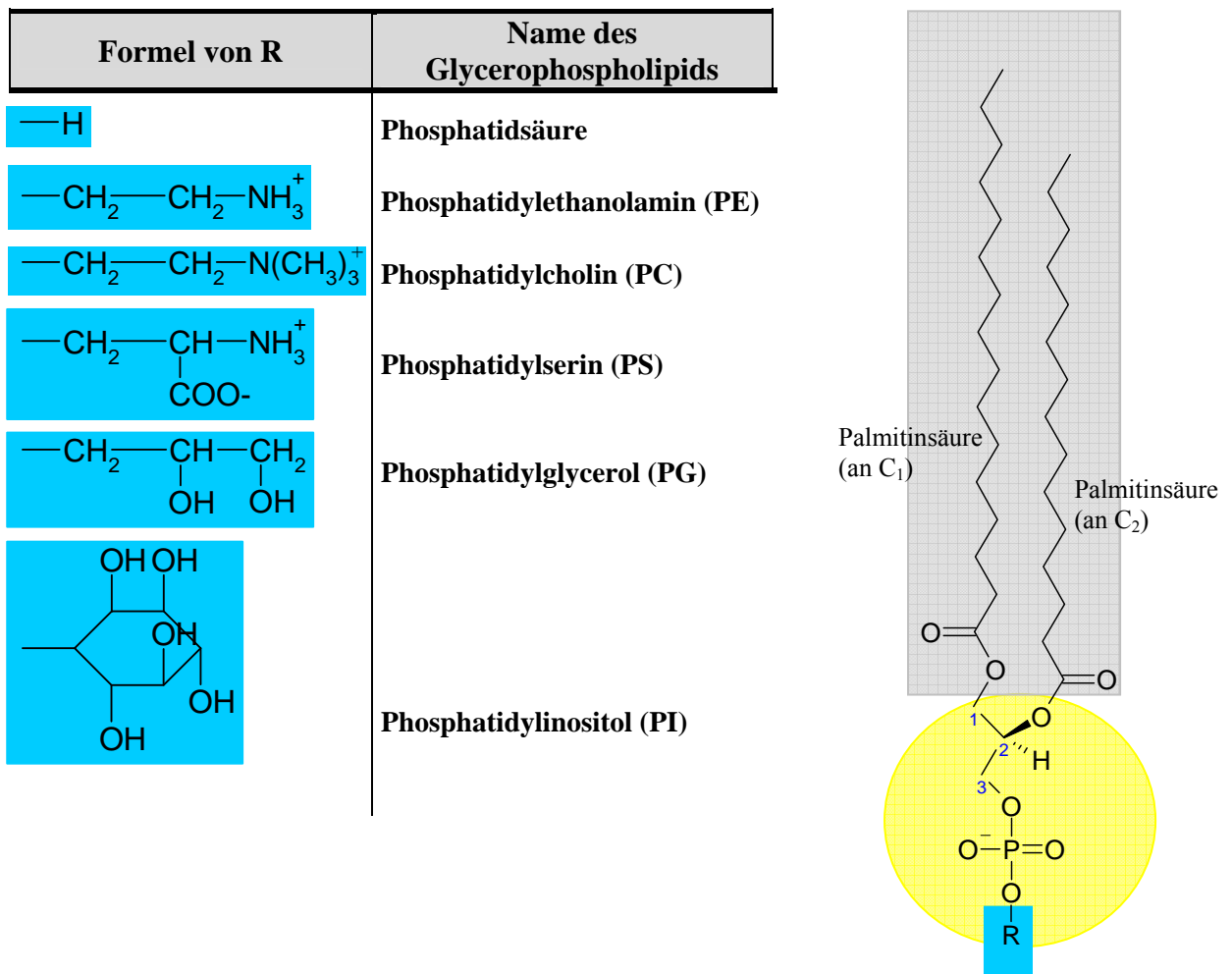


Abbildung 1.2 Glycerophospholipide sind meist Diacylglycerine, die über eine Phosphodiesterbindung mit den Kopfgruppen verknüpft sind (gelb). Die Stammverbindung ist die Phosphatidsäure. Jedes Derivat ist nach der Kopfgruppe (blau) benannt. An Position C₁ und C₂ sind die langkettigen hydrophoben Fettsäuren gebunden (grau).

Bei Mäusen ist 61 % des extrazellulären Surfactantmaterials Phosphatidylcholin (PC), wobei über die Hälfte DPPC ist (Abb. 1.3). Ein hoher DPPC-Anteil von 10-20 % wurde auch im Myelin des Gehirns und in der Erythrozytenmembran identifiziert. Jedoch ist der Anteil dieses Lipids im Lungensurfactantgemisch noch wesentlich höher. Dieses führt dazu, dass der ungewöhnlich hohe DPPC-Anteil als Charakteristikum des Lungensurfactant angesehen wird. 15 % des Surfactantpools beinhalten die sauren Lipide Phosphatidylglycerol (PG). Phospholipide wie Phosphatidylethanolamin (PE) sind nur in sehr geringen Mengen vorhanden. Cholesterin als Hauptkomponente der neutralen Lipide hat einen Anteil von 9 % im Surfactant von Mäusen. In geringen Mengen lassen sich noch Mono-, Di-, Triacylglycerol, freie Fettsäuren sowie Cholesterolester in vielen Spezies nachweisen [11, 12].

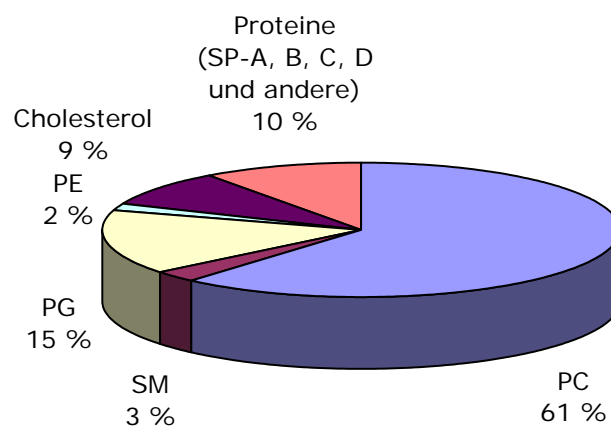


Abbildung 1.3 Zusammensetzung des murinen Surfactant (Angaben in Gew.%) [13].

In den letzten Jahren wurden die Lipide und Proteine mit Hilfe biophysikalischer Methoden intensiv untersucht. Dabei wurden sie charakterisiert und die Funktion im Lungensurfactant erforscht. Im Folgenden sollen die Ergebnisse vorgestellt werden.

Phosphatidylcholin

Eine besondere Bedeutung kommt den Lipiden mit der Kopfgruppe PC im Lungensurfactant zu. Monoschichten, angereichert mit dem DPPC, sind in der Lage die Oberflächenspannung an der Luft/Wasser-Grenzfläche auf Werte nahe Null mN/m abzusinken, wodurch das Entfalten der Lunge bei der Geburt ermöglicht wird und ein normales Atmen stattfinden kann [13]. Dies konnte mit Untersuchungen an einer Luftblase des *Captive Bubble Tensiometers* (CBT) bestätigt werden. Bei dieser Messtechnik wird die unterschiedliche Form der Blase verwendet, um auf die Oberflächenspannung an der Luft/Wasser-Grenzfläche zu schließen. Eine kleine ovale Form der Blase weist auf eine niedrige Oberflächenspannung hin, während eine runde Form eine hohe Oberflächenspannung bedeutet. Die Untersuchungen belegten, dass eine Oberflächenverkleinerung von 10-12 % einer DPPC ausgekleideten Blase ausreichend war, um die Oberflächenspannung ausgehend vom Gleichgewichtsdruck (25 mN/m) auf 2 mN/m abzusinken. Diese blieb durch den DPPC-Monofilm bei gleicher Oberfläche über einige Stunden konstant, bevor sie sich in Richtung des Gleichgewichtsdruckes erhöhte.

Ungesättigte PC-Filme zeigen oberhalb der fest-flüssigen Phasenumwandlungstemperatur eine weniger dichte Packung bei hohen Oberflächendrücken. Die Kompression dieser PC-Filme führt aus diesem Grunde zu wesentlich höheren Oberflächenspannungen. Zusätzlich wird nach dynamischer Kompression der Gleichgewichtsdruck innerhalb von kurzer Zeit erreicht. Dies zeigt, dass die Stabilisierung der Lunge bei geringen Volumen von fluideren Lipiden als DPPC nicht gewährleistet werden kann [14-16].

Benötigt werden fluide Lipide und die hydrophoben Proteine SP-B und C, um die Adsorption bzw. das Spreitverhalten zu verbessern [17]. Es zeigte sich, dass das Spreitverhalten bzw. die Adsorption von DPPC-Vesikeln an der Luft/Wasser-Grenzfläche unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur von 41°C unzureichend ist. Sie bilden nur sehr langsam eine Monoschicht.

Fluide Lipide spielen auch eine wichtige Rolle innerhalb des Surfactant-Zyklusses. Die Formierung von *lamellar bodies*, ausgehend von reinem DPPC, ist auf Grund der Geometrie und fehlender Flexibilität des Moleküls schwer vorstellbar. Der Effekt der

Lipidfluidisierung könnte also auch wichtig für die Sekretion von *lamellar bodies*, sowie der Formierung von tubulären Myelin oder anderen Vorläufern des Oberflächenfilms sein [18].

Saure Phospholipide

Die Tatsache, dass alle Spezies signifikante Mengen von PG und/oder Phosphatidylinositol (PI) enthalten, lässt auf eine wichtige Rolle dieser Lipide im Surfactant schließen. Untersuchungen haben gezeigt, dass fluide, saure Phospholipide und DPPC zu einer verbesserten Adsorption an der Luft/Wasser-Grenzfläche führen, wodurch diesen Lipiden eine Rolle in der Reduktion der Oberflächenspannung zugeschrieben wurde [19]. Messungen mit dem Fluoreszenz-Mikroskop und der Filmwaage zeigten die Interaktion von SP-B und PG in DPPC/PG/SP-B Lipid/Protein-Mischungen [20]. Mit DPPC/1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylglycerol (DPPG) und SP-C konnte die Anreicherung von DPPC in der Monoschicht sowie das selektive Ausschleusen von PG während der Kompression gezeigt werden [20, 21].

Der Rückgang des PG-Anteils im Lungensurfactant wird häufig bei Patienten mit ARDS beobachtet. Es wird vermutet, dass ein niedriger Anteil an PG im Lungensurfactant zum Rückgang der biologischen Aktivität führt. Dieses erklärt auch die niedrige Aktivität des Surfactant bei einem hohen PI/PG-Verhältnis. Allerdings zeigte die Zugabe von PG zum Surfactant sowohl *in vivo* als auch *in vitro* keine signifikanten Effekte [13].

Nebenbestandteile der Phospholipide

Die Analyse des Lungensurfactant zeigt eine Vielzahl von Phospholipiden mit sehr geringen Anteilen. Im Allgemeinen ist die Aufgabe dieser als *minor components* bezeichneten Lipide noch nicht aufgeklärt. Es wird angenommen, dass auf Grund der geringen Mengen der Einfluss dieser Lipide auf die Reduktion der Oberflächenspannung gering ist.

Studien an PE zeigten, dass 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin (POPE) Lipiddoppelschichten oberhalb des Kollapsdruckes bildet [22] und die Fluidität von PC-Lipiddoppelschichten erhöht [23].

Größere Mengen dieser *minor components*, die zum Beispiel bei Lungenverletzungen auftreten, werden in Zusammenhang mit dem Rückgang der biologischen Aktivität gebracht. Bis heute fehlt noch jeder spezifische Beweis hierfür. Es ist jedoch bekannt, dass Lyso-PC die Sensitivität des Surfactant gegenüber der Inhibierung durch Serum Proteine erhöht, welches auch durch SP-A nicht rückgängig gemacht werden kann [24].

Neutrale Lipide

Obwohl die neutralen Lipide in signifikanten Mengen im Surfactant vorliegen, sind sie auf Grund ihrer komplexen Effekte, die in starker Abhängigkeit zum verwendeten Lipidsystem und Analysemethoden stehen, weniger gut untersucht worden als die Phospholipide.

Zusätze von Mono-, Di- und Triacylglycerol oder freie Palmitinsäuren in DPPC oder DPPC/PG zeigten eine Erhöhung der Adsorptionsrate auf Grund der Bildung von Fehlstellen in der Vesikel-Membran [13].

Auf Grund des amphiphilen Charakters und des starren kondensierten Grundgerüsts besitzt Cholesterol unterschiedliche Eigenschaften, wie die Stabilisierung und Verflüssigung von Mono- und Lipiddoppelschichten [25-27]. Weiterhin beeinflusst Cholesterol die laterale Domänenbildung der fluiden und kondensierten Phasen [28]. In Cholesterolhaltigen Phospholipidmonoschichten wurde eine Veränderung der Viskosität des Oberflächenfilms gezeigt [29]. Der fluidisierende Effekt des Cholesterols, innerhalb einer Lipidmonoschicht, ist verantwortlich für die stärkere Adsorption von DPPC-Vesikeln [30, 31]. Die Erhöhung der Fluidität führt jedoch auch zu einer größeren Oberflächenspannung während der Kompression und Expansion. Ein Grund hierfür ist, dass das Steroid nicht aus der Monoschicht bei hohen Oberflächendrücken herausgedrückt wird (*squeeze-out* Prozess) [32-34]. Deswegen findet Cholesterol keine Anwendung bei der Herstellung von synthetischen oder natürlichen Surfactanersatzstoffen zu Behandlung von Lungenkrankheiten wie ARDS oder auch IRDS. Interessanterweise kann der Cholesterolgehalt in Lungensurfactant sehr schnell variieren. So führt die induzierte Hyperventilation von schwimmenden Ratten zu einem niedrigeren Cholesterol/DPPC-Verhältnis. Anschließende Studien der Lunge deuteten darauf, dass Cholesterol schnell durch die Hyperventilation mobilisiert wird [35].

Untersuchungen zum Einfluss der neutralen Lipide auf die Oberflächenaktivität von DPPC und DPPC/PG zeigten, dass die Mischung aus DPPC, PG, Tripalmitoylglycerol oder Palmitinsäure sowie hydrophobe Surfactant Proteine die besten Eigenschaften bezüglich der Oberflächenaktivität besitzen [36]. Die Mischungen aus DPPC/Proteine sowie DPPC/PG/Proteine adsorbierten zwar effektiv an der Oberfläche, jedoch konnten nur unzureichend niedrige Oberflächenspannungen während der Kompression mit der Filmwaage erreicht werden.

1.2.3.2 Proteine

Das erste Surfactant Protein wurde im Jahre 1973 identifiziert und SP-A genannt [37]. Erst 6 Jahre später gelang die Identifikation des SP-B und SP-C [38]. Sie wurden durch organisches Lösungsmittel aus der gespülten Lungenlösung (Lavage) extrahiert und in *lamellar bodies* detektiert. Der Grund für die spätere Identifikation der beiden hydrophoben Proteine, im Vergleich zum hydrophilen SP-A, war deren starke Assoziation mit Lipiden. Dieses führt zu einer geringen Auflösung in Natriumdodecylsulfat (eng. *sodium dodecylsulfate*, SDS)-Gelen. Zusätzlich erschwerte die fehlende *Coomassie blue* Anfärbung die Identifikation dieser beiden hydrophoben Proteine [39-41]. Im Jahre 1988 erfolgte die Identifikation des vierten Proteins dem SP-D [42].

SP-A

Als funktionsfähiges Protein liegt SP-A als Assoziation von sechs Trimeren vor und besitzt eine molekulare Masse von 650 kDa (Mensch) [43]. Stabilisiert wird es durch starke hydrophobe und elektrostatische Kräfte, sowie inter- und intramolekulare Disulfidbrücken am Amino (N)-Terminus. Die Trimere bilden dort eine α -helikale *coiled coils* Struktur, während die sich am Carboxy (C)-Terminus befindliche kollagenartige Region aus einer Tripelhelix aufgebaut ist (Abb. 1.4).

Das Monomer des hydrophilen SP-A ist aus vier Domänen aufgebaut. Ein kurzes N-terminales Segment aufgebaut aus 8-11 Aminosäuren (AS) (Spezies abhängig) mit intermolekularen Disulfidbindungen. Die Prolinreiche Domäne mit kollagenartiger Struktur ist aus 23 (Mensch) oder 24 (Ratte, Hase, Hund, Schwein) Glycin (Gly)-*x-y*

Einheiten aufgebaut, die wahrscheinlich trimerhelikal gefaltet sind [45]. Primärstrukturen abgeleitet aus der komplementären Desoxyribonucleinsäure (cDNA) bestätigten die Anwesenheit von Prolin in vier oder fünf x -Einheiten, hauptsächlich in der Mitte und am Carboxy (C)-terminalen Ende der Kollagen-Domäne. Weiterhin befinden sich Hydroxyproline [46] an vielen y -Positionen, welche die Stabilität der Kollagen-Helix erhöhen [47]. Die zweite Hälfte der kollagenartigen Domäne besitzt alternierende Aminosäureladungen, welche zusätzlich zur Stabilität der Helix beitragen. Dieser Bereich wird auch für die Bindung an einen Kollektin-Rezeptor [48] und zur Assoziation an löslichen Liganden verwendet [49-51]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in isolierten Typ II Pneumozyten die kollagenartige Domäne wichtig für die Inhibition der Surfactant-Sekretion ist [52]. Die letzten beiden Domänen des SP-A sind ein kleiner hydrophober Bereich sowie eine Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne (eng. *carbohydrate recognition domain*, CRD). Die CRD zeigt eine Vielzahl von Funktionen, wie die Bindung und Aggregation von Phospholipiden, einen Einfluss auf die Typ II Pneumozytenfunktion und die Immunantwort der Lunge. Die Domäne enthält 115 AS mit zwei Calcium-Bindungstaschen [53, 54], wobei die oben genannten CRD Funktionen Calcium abhängig sind.

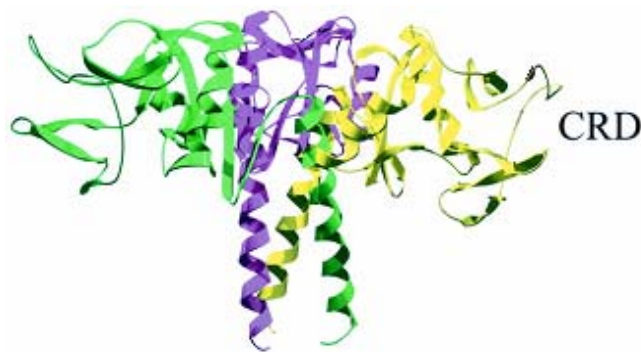


Abbildung 1.4 Kristallstruktur eines Trimers im SP-A mit unterschiedlich gefärbten Monomeren. Zusätzlich ist die im Bereich des C-Terminus befindliche Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne (eng. *carbohydrate recognition domain*, CRD) dargestellt [44].

Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* bestätigten, dass SP-A zur Synthese von großen Surfactantaggregaten (eng. *large surfactant aggregates*) wie zum Beispiel tubulärem Myelin notwendig ist [55]. Das Protein lagert sich in den Randbereichen ein und stabilisiert somit die tubulären Strukturen. Mit Hilfe von SP-A *knock-out* (*ko*) Mäusen

konnte gezeigt werden, dass SP-A eine wichtige Rolle in dem Immunsystem der Lunge spielt [56].

Zusätzlich wird ein Einfluss des SP-A auf die Oberflächeneigenschaften des Surfactantfilms diskutiert. So wird in der Literatur zwar berichtet, dass SP-A in Verbindung mit hydrophoben Proteinen nur zu einer vernachlässigbar geringen Verbesserung der Adsorption an der Luft/Wasser-Grenzfläche führt [57]. Jedoch beschreiben andere Quellen [58], dass SP-A die Reduktion der Oberflächenspannung eines Surfactantfilms auf einer pulsierenden Luftblase verbessert.

SP-B

Das hydrophobe SP-B ist ein 79 AS großes Dimer mit einer mittleren Masse von 18 kDa. Die Expression des SP-B findet in den Clara-Zellen und in den Alveolar Typ II Pneumozyten statt. Das primäre Translationsprodukt des menschlichen SP-B ist ein Peptid, welches aus 381 AS besteht. Eine Signalsequenz von 23 AS, lokalisiert am N-Terminus des Proproteins, führt zur Translokation des SP-B in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums. Nach Abspaltung des Signalpeptids besteht das Proprotein aus einem N-terminalen Propeptid (AS 24-200), einem C-terminalen Propeptid (AS 280-381) und dem reifen SP-B (AS 201-279). Zur Bildung des funktionsfähigen, reifen SP-B werden die flankierenden Bereiche in den letzten Schritten der posttranslationalen Modifikation abgespalten [59, 60].

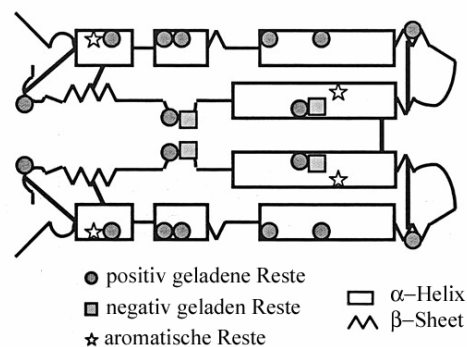


Abbildung 1.5 Protein-Struktur des SP-B [62].

Menschliches SP-B besitzt neun positive und zwei negativ geladene AS, wodurch es insgesamt eine Ladung von +7 besitzt. Jedes SP-B Monomer besitzt drei

intramolekulare Disulfidgruppen, die Cystein 8 mit 11, Cystein 11 mit 71 und Cystein 35 mit 46 verbinden. Das Cystein an Position 48 bildet die intermolekulare Disulfidbindung und ist für die Dimerisierung verantwortlich [61] (Abb. 1.5).

SP-B spielt bei vielen Prozessen im Lungensurfactant eine Rolle, wie z.B. bei der Membran-Lyse, der Lipidadsorption an der Luft/Wasser-Grenzfläche, der Stabilisierung des monomolekularen Surfactantfilms und dem Zurückspreiten des kollabierten Films.

SP-B unterstützt in Gegenwart von SP-A die Formierung von tubulärem Myelin, welches sich nach Sekretion der *lamellar bodies* in dem Alveolarraum bildet [55, 63]. Die Gendeletion des SP-B ist letal [64, 65]. Die SP-B *ko* Mäuse sind nicht fähig, lamellare Strukturen in den Typ II Pneumozyten zu bilden [65]. Zusätzlich führt die Gendeletion des SP-B zu einer Akkumulation des Surfactant im Gewebe mit dramatisch vergrößerten *lamellar bodies* [66].

Modelle beschreiben die Anlagerung von SP-B in den Ecken der Doppelschichten von Lipidmembranen zur Stabilisierung der Multischichten bei hohen Oberflächendrücken [67] (Abb. 1.6). Aber auch einfache Protein/Lipid-Komplexe werden durch die Interaktion zwischen negativ geladenen Kopfgruppen der Phospholipide und den basischen Resten in SP-B stabilisiert [68, 69].

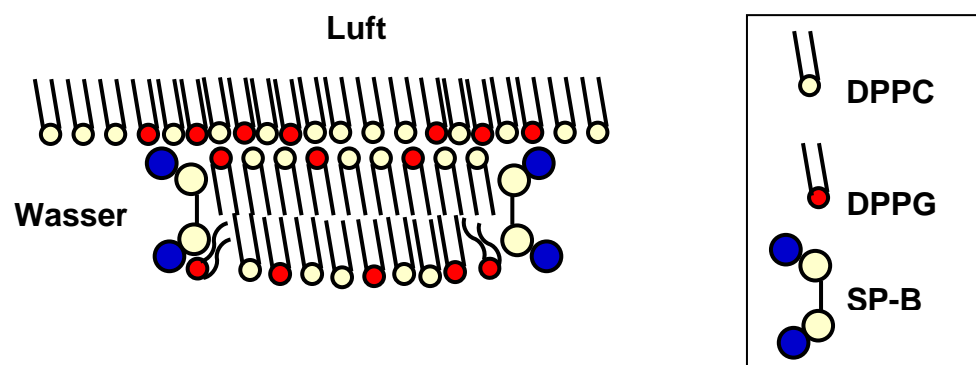


Abbildung 1.6 Anlagerung von SP-B in den Randbereichen der Doppelschichten

SP-C

SP-C ist ein stark hydrophobes Protein, das zu mehr als 70 % aus nicht polaren Resten besteht und zwei kovalent gebundene Fettsäuren enthält. Es kommt zu ca. 0,4 mol % im extrazellulären Surfactant vor und die Expression findet in den Typ II Pneumozyten statt [70]. Das menschliche 197 AS lange SP-C ist wie das SP-B von einem N-terminalen Propeptid (AS 1-23) und einem C-terminalen Propeptid (AS 59-197) flankiert.

Es sind mehrere Isoformen des SP-C bekannt. So sind durch die Aminosäuresequenzierung Peptide entdeckt worden, welche erst an Position 2 oder 3 des N-Terminus beginnen, wobei der Grund für das Auftreten dieser Formen noch nicht geklärt ist. Mit der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) wurde eine weitere Isoform entdeckt, welche eine Palmitoylgruppe gebunden an Lysin der Position 11 enthält [70]. Sie wird vermutlich durch Acyl-Transfer der umgebenden Phospholipide im Surfactant gebildet. Weiterhin wurde zu Methioninsulfoxid oxidiertes Methionin an Position 33 und methyliertes SP-C am N-Terminus entdeckt [71, 72].

In fast allen Spezies sind zwei Palmitinsäuren an Position 5 und 6 durch Thioesterbindungen an Cystein gebunden. Charakteristisch für das SP-C ist die Region von Position 13-28, die sog. Poly-Valin Region.

Die Konformation des SP-C in Chloroform/Methanol/0,1 M HCl (32:64:5) wurde mit zweidimensionaler $^1\text{H-NMR}$ aufgeklärt [73]. Die Struktur zeigt eine ideale α -helikale Geometrie, aufgebaut aus den AS an Position 9-34, wobei die ersten acht Reste inklusive der zwei Palmitoylcysteine an Position 5 und 6 flexibel in Richtung des sauren organischen Lösungsmittels angeordnet sind (Abb. 1.7). Mittels *Molecular Dynamics* (MD) Simulationen konnte die Stabilität des Helix-Gerüsts in Chloroform, Methanol und Wasser berechnet werden. Es zeigte sich, dass die Konformation in den polaren Lösungsmitteln unverändert bleibt. In Chloroform blieb die α -helikale Struktur intakt, lediglich am Beginn des C-Terminus fand eine Entfaltung statt [74].



Abbildung 1.7 Konformation und Strukturmerkmale des SP-C. Die α -Helix zwischen den AS 9 und 34 ist 3,7 nm lang. Die 2,3 nm lange Poly-Valin Region umfasst die Reste 13-28 (grau). Cystein 5 und Cystein 6 sind palmitoyliert.

Mit Fourier-Transformations-Infrarot (FTIR)-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass SP-C sich transmembran in DPPC/DPPG oder DPPC/PG-Lipiddoppelschichten einlagert. Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass die Größe der SP-C Helix mit 37 Å (AS 9-34) und 23 Å für den Poly-Valin Teil gut mit den Größen einer fluiden DPPC Monoschicht (37 Å) und deren veresterten Fettsäure-Ketten (26 Å) übereinstimmt [75].

SP-C ist innerhalb einer DPPC Monoschicht um einem Winkel von 70° bezogen auf die Oberflächennormalen geneigt. Hierdurch wird eine optimale Wechselwirkung zwischen der lipophilen Oberfläche der Helix und den Phospholipid Acylketten gewährleistet. Der Einfluss der beiden Palmitoylketten auf die Struktur und Stabilität der Helix ist noch unbekannt und widersprüchlich. So wird in der Literatur beschrieben, dass deren chemische Entfernung zu einer 20 %igen Reduktion der α -helikalen Struktur führt. Eine Begründung hierfür ist, dass Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den ersten Windungen der Helix und den Palmitoylgruppen fehlen [75-77]. Andererseits wird auch beschrieben, dass bei MD-Simulationen mit nicht palmitoylierten SP-C, die α -Helix eine hohe Stabilität besitzt.

Die SP-C Helix ist kürzer als der Durchmesser der flüssig kondensierten (eng. *liquid-condensed*, l_c) Lipiddoppelschicht. Auf Grund der übereinstimmenden Längenverhältnisse mit fluiden palmitoylierten Phospholipiden interagiert SP-C

vorwiegend mit diesen Lipiden und wird auf Grund der Phasenseparation aus der l_c Phase ausgeschlossen [78]. Unterstützt wird dies auch durch die Tatsache, dass SP-C die Formierung von Lipidmultischichten in der l_c Phase unterbricht, sie jedoch in der flüssig expandierten (eng. *liquid-expand*, l_e) Phase unterstützt [75]. Bei starker Kompression werden SP-C Proteine mit assoziierten Lipiden aus dem Monofilm ausgeschlossen. Bei der Expansion werden diese durch den Einfluss des SP-C reversibel wieder in die Monoschicht eingebaut.

Untersuchungen des depalmitoylierten SP-C mit synthetischem Phospholipiden und isolierten Lipiden aus der Lunge zeigten nur eingeschränkte Funktionen gegenüber den palmitoylierten SP-C. So ist nur eine verminderte Adsorption und Spreitung von SP-C/Phospholipiden an der Luft/Wasser-Grenzfläche beobachtet worden. Der Protein/Lipid-Film besitzt geringere mechanische Stabilität und kann die für die Atmung wichtige Oberflächenspannung nur unzureichend minimieren [21, 76].

Da die Einlagerung des Proteins in die Membran aber auch in Abwesenheit der Fettsäuren stattfindet, tragen die Fettsäuren möglicherweise dazu bei, den N-terminalen Teil in der Membran zu verankern und gleichzeitig seine Konformation zu stabilisieren. Dies geschieht, indem die basischen Reste Lysin 11 und Arginin 12 mit den negativen Ladungen der Phospholipide wechselwirken und so die laterale Bewegung des N-Terminus des SP-C verhindern. Der C-terminale Teil liegt auf Grund der kleinen hydrophoben Seitenketten frei beweglich in der Membran vor. Dieser Mobilitätsgradient erleichtert das wiederholte Spreiten der Phospholipide durch das Aufbrechen von Fettsäureaggregaten und ist somit essentiell für die Funktion des SP-C [75].

SP-D

Unter reduzierenden Bedingungen besitzt SP-D ein Molekulargewicht von 43 kDa und liegt als Dodekamer mit 4 homotrimeren Untereinheiten vor (Abb. 1.8). Jede trimere Untereinheit besitzt vier Hauptdomänen: eine kurze querverknüpfte Cystein beinhaltende N-terminale Region, eine dreifach helikale Kollagen-Domäne mit unterschiedlicher Länge, eine dreifach *coiled-coil* verknüpfte Domäne sowie eine CRD Domäne.



Abbildung 1.8 Kristallstruktur des Trimers im SP-D mit unterschiedlich gefärbten Monomeren. Zusätzlich ist die befindliche CRD-Domäne dargestellt [79].

Das hydrophile SP-D gehört wie SP-A zu der Familie der kollagenartigen Kohlenhydrat bindenden Proteine, auch *Collectine* genannt [80]. Kuan et al. zeigten, dass SP-D mit seiner Lecithin-Domäne an Gram-negativ Bakterien bindet und ein wirksamer Blutantikörper gegen einige Bakterienstämme ist [81]. Spätere Studien *in vitro* zeigten, dass SP-D spezifische Wechselwirkungen mit mehreren Mikroorganismen und Leukozyten eingeht. Hieraus wurde geschlossen, dass SP-D eine Funktion in der Immunantwort der Lunge übernimmt, zum Beispiel bei akuten Lungenverletzungen, Entzündungs- und Reinigungsprozessen [82].

Natürliches und rekombinantes SP-D liegt oft aus vier homotrimeren Untereinheiten mit 12 CRD Domänen aufgebaut vor. Außerdem wurde jedoch eine neue SP-D Variante identifiziert, die mit 32 CRD Domänen strukturiert ist. Dieses hoch geordnete Multimer entsteht durch *Self-Association* am N-Terminus.

Aufgereinigtes SP-D zeigte hohe Bindungsaffinitäten zu PI und Glykosylceramiden. Die Bindung SP-D, PI sowie SP-D, Glykosylceramide ist Calcium abhängig [83, 84]. Außerdem konnten keine Wechselwirkungspräferenzen des rekombinanten Ratten SP-D mit bestimmten Kopfgruppen der Lipide im Filmen identifiziert werden. Die Wechselwirkungen zwischen Lipid und SP-D an der Luft/Wasser-Grenzfläche sind lediglich auf hydrophobe Interaktionen zurückzuführen [85].

1.2.4 Modellsysteme des Lungensurfactant

1.2.4.1 *In vitro* Modell

Vor einigen Jahren konnte eine stabile multilamellare Phase auf dem Oberflächenfilm an der Innenseite der Alveole mit der Elektronen-Mikroskopie (EM) gezeigt werden (Abb. 1.9 **bc**) [86]. Die Existenz dieser multilamellaren Phase geht mit dem Befund einher, dass SP-B und C sowie Phospholipide bei starker Kompression aus der Luft/Wasser-Grenzfläche in die Subphase gedrängt werden.

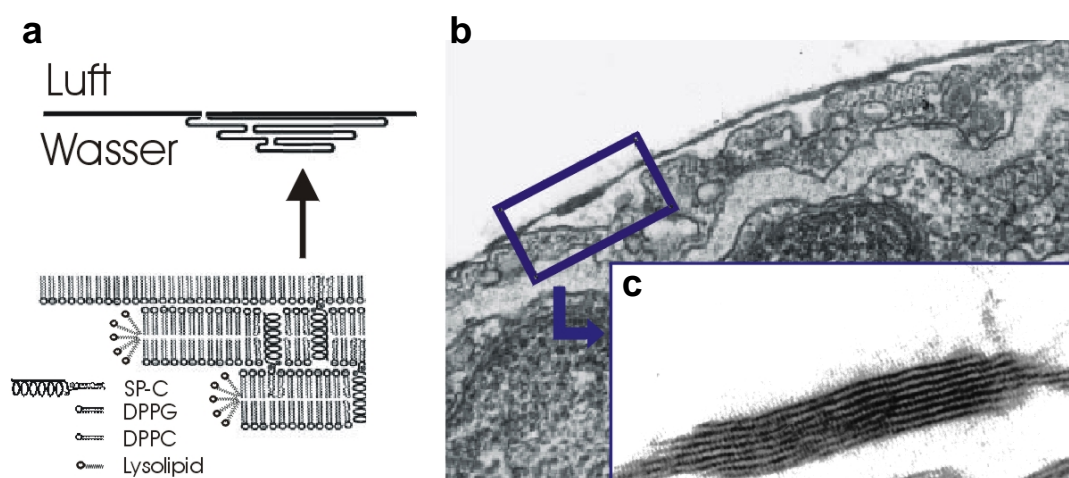


Abbildung 1.9 Das Surfactant-Modell zeigt Formierung der Multschichten (Protrusions) bei hohen Oberflächendrücken, die bei Expansion wieder zurück zur Oberfläche spreiten [88]. Die lamellaren Ränder bilden mizellenartige Strukturen, die wahrscheinlich aus Lysolipiden bestehen (a). Darstellung der EM-Aufnahme einer Alveole, welche die Multschichten auf der wässrigen Phase zeigt (bc).

Die Oberflächen assoziierten multilamellaren Phasen bilden Reservoirs, die bei Expansion der Lunge wieder an der Oberfläche spreiten. Hierdurch wird gewährleistet, dass zu jeder Zeit während der Atmung die Alveolen mit Surfactant bedeckt sind. Schürch interpretierte die Befunde auf der Grundlage der Untersuchungen, die von Nahmen et al. durchgeführt haben [87, 88]. Sie zeigten in Filmwaagemessungen mit einem Modellsystem des Surfactant DPPC/DPPG/SP-C (80:20:0,4 mol %), dass bei hohen Oberflächendrücken (ca. 47 mN/m) trotz Verringerung der Oberfläche kein Druckanstieg zu beobachten war. In Kombination mit biophysikalischen Techniken wurde bewiesen, dass SP-C die Morphologie der Phospholipidmonoschicht beeinflusst. SP-C führt bei hohen Oberflächendrücken zur Bildung von Protrusions, bestehend aus

mehreren Lipiddoppelschichten (Abb. 1.9 a). Diese Multischichten bestehen aus Lipiddoppelschichten mit einer Stapelhöhe von 5.5-6 nm [67, 87, 89-91] in denen das SP-C eingelagert ist. Bestätigt wurden diese Protrusions auch mit der Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (eng. *Time-of-flight Secondary Ion Mass Spectrometry*, ToF-SIMS). Ergänzend zu den Bildern des Raster-Kraft-Mikroskops konnten mit dieser Technik innerhalb der Kollapsregion SP-C reiche Domänen, die von einer reinen Lipidmonoschicht umgeben sind, dargestellt werden [92].

1.2.4.2 *In vivo* Extrakt-Modell

Die Typ II Pneumozyten synthetisieren, speichern und sekretieren das Surfactant in den Alveolarraum der Typ I Pneumozyten. Für die Biosynthese der Phospholipide werden Fettsäuren benötigt, die sowohl *de novo* in den Typ II Pneumozyten synthetisiert, als auch von exogenen Quellen zugeführt werden [100, 101]. Obwohl die Aufnahme und der intrazelluläre Transport innerhalb der Typ II Pneumozyten noch nicht gänzlich verstanden ist, so lässt doch der Umsatz an Phospholipiden auf ein effektives Transportsystem schließen, indem Fettsäurebindungsproteine (eng. *fatty acid binding proteins*, FABP) involviert sind.

Im Jahre 1972 wurden die FABPs zum ersten Mal in der Literatur beschrieben [93]. Sie besitzen eine Größe von 14-15 kDa. Die Namensgebung der FABP erfolgt nach dem Gewebe der Erstisolierung. Das Herz (H)-FABP und insbesondere Epidermal (E)-FABP sind weit verbreitet [94]. H-FABP wird z.B. in Kardiomyozyten des Herzens, Myozyten der Skelettmuskel, Fibroblasten der Lunge und alveolaren Epithelzellen der Brustdrüse detektiert [95, 96]. Auf Protein- und Ribonukleinsäure (RNA)-Ebene der Spezies Maus konnte E-FABP in den Fibroblasten, Typ II Pneumozyten und Makrophagen nachgewiesen werden, während H-FABP in den Fibroblasten und in sehr geringen Mengen in den letzt genannten Zelltypen vorhanden ist [97]. FABPs sind involviert in den Transport von Fettsäuren zu zellulären Kompartimenten, modulieren den intrazellulären Lipid-Metabolismus und sind in die Genexpression involviert [98, 99].

Durch Generierung einer E- und H-FABP doppel *knock-out* (d-ko) Maus konnte erstmals gezeigt werden, dass diese genetische Veränderung die Phospholipidsynthese innerhalb der Typ II Pneumozyten beeinflusst [102]. Die isolierten Typ II Pneumozyten

aus *d-ko* Mäusen wiesen eine geringere Aufnahme und Verwendung von exogen zugeführten Palmitinsäuren auf [103]. Außerdem resultiert der veränderte Lipid-Metabolismus in einen unterschiedlichen Gehalt an DPPC und PC im Vergleich zum Wildtyp (*wt*).

Basierend auf dem Konzept von Stremmel [104], indem Caveolin-1 als intrazellulärer Fettsäuretransporter fungiert, wurde mit Pioglitazon die Aufhebung des *d-ko* Phänotyps durch Aktivierung eines möglichen Calvolin-1 *back-up* Systems erreicht. Pioglitazon verstärkt die Phospholipidsynthese. Dies geschieht wahrscheinlich, indem die Expression von Genen, die in der Lipidhomöostase involviert sind, intensiviert wird [103].

Die unterschiedlichen Kompositionen des Surfactant, induziert durch die genetische Deletion oder durch das Pioglitazon wird hier als *in vivo* Extrakt-Modell für eine veränderte Surfactantzusammensetzung verwendet.

1.2.4.3 ARDS-Modell

Im Jahre 1979 wurden erstmals große Veränderungen des alveolaren Surfactant bei verstorbenen ARDS Patienten erkannt [106]. Sowohl bei dieser Gruppe als auch bei Patienten mit drohendem ARDS zeigten die Proben ausgewaschener Lungen (Lavage) eine deutlich erhöhte Oberflächenspannung. Gründe hierfür sind der Verlust des Lungensurfactant, Veränderungen der Phospholipid sowie SP-A, SP-B und SP-C Zusammensetzung. Der Gesamtgehalt an Surfactant Proteine und Phospholipiden, insbesondere PC und PG ist in Abhängigkeit des Krankheitsstadiums reduziert. Eine relative Zunahme des Gehaltes konnte bei den Lipiden PE, PS, PI und SM gezeigt werden. Ursachen sind die Schädigungen der sekretorischen Typ II Pneumozyten, die einen veränderten Lipid/Protein-Metabolismus zeigen und eine veränderte Sekretionsleistung besitzen.

Gesundes, frisch lavagiertes Lungensurfactant besteht zu 80 bis 90 % aus den großen Surfactantaggregaten (eng. *large surfactant aggregates*) welche einen großen Anteil an SP-B und eine hervorragende Oberflächenaktivität besitzen. Der restliche Anteil besteht aus den kleinen Surfactantaggregaten (eng. *small surfactant aggregates*). Sie besitzen

nur eine geringe Oberflächenaktivität und sind aus kleinen Lipidvesikeln aufgebaut. Beim ARDS kehren sich diese Verhältnisse um, die Fraktion der SM steigt auf 80-90 %, verbunden mit einem hohen Verlust an SP-B und niedriger Oberflächenaktivität (Abb. 1.10).

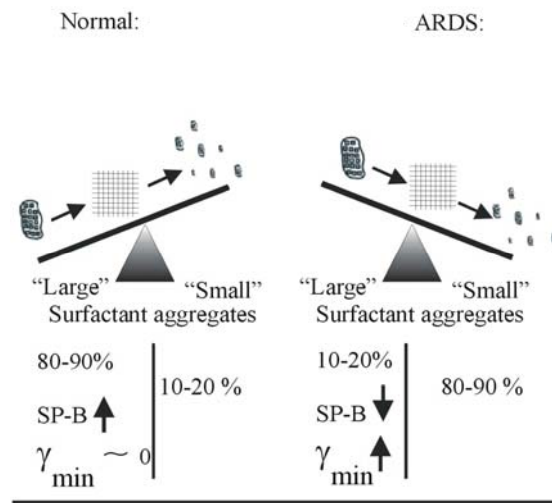


Abbildung 1.10 Veränderung der Surfactant-Subtypen-Verteilung, der Oberflächenaktivität und des SP-B Gehaltes als Folge der Entstehung des ARDS.

Zusätzlich wird die Funktion des Surfactants durch das Eintreten von Plasma-Proteinen in die interstitiellen und alveolaren Kompartimente auf Grund der angegriffenen Luft/Blut-Schranke belastet. Der deutliche Anstieg des Proteingehaltes der Lavage im Vergleich zu gesunden Proben führt zu einer Beeinträchtigung der dynamischen Reduktion der Oberflächenspannung im Atmungszyklus. Surfactant inhibitorische Eigenschaften konnten für Albumin [107], Hämoglobin [108], Fibrinogen und Fibrinmonomere [109] nachgewiesen werden.

Hyaline Membranen als Folge der Akkumulation von Gerinnungsfaktoren im Alveolarbereich sind mit verantwortlich für den Verlust der Oberflächenaktivität des Lungensurfactant. Phospholipide, sowie die hydrophoben SP-B und SP-C werden in die entstehende Membran inkorporiert, welches in einem Verlust an funktionellen Surfactantkomponenten mündet. Dieses führt, neben den oben genannten Ursachen, zu einem akuten Lungenversagen.

Die Schädigung der Lunge in Form des ARDS wird durch intratracheale Injektion von Lipopolysaccharid (LPS)-Lösung im Mausmodell induziert. Die Entzündungsantwort zeichnet sich durch eine Infiltration der Lunge mit polymorph-kernige Granulozyten (PMN), Freisetzung von Proteasen und anderen entzündungsfördernden Molekülen sowie einer gesteigerten Surfactant-Produktion aus. Die Entzündung erreicht nach 12 bis 24 h ein Maximum. Auch histopathologisch können ab 24 h nach der intratrachealen Injektion bei diesem ARDS Modell Alveolar-Blutungen beobachtet werden [110, 111].

1.2.5 Bedeutung biophysikalischer Methoden in der Surfactantanalyse

Veränderungen in der Zusammensetzung des nativen Surfactant aus Ratten, induziert durch mechanische Be- und Entlüftung der Lunge, führten zu unterschiedlichen biophysikalische Eigenschaften des Lungensurfactant [112]. Tiere, denen durch die Beatmungstechnik eine Verletzung der Lungen zugefügt wurde, wiesen eine verminderte Lungendehnbarkeit (Lungencompliance) und Anzahl an großen Surfactantaggregaten im Vergleich zu nicht oder schonend beatmeten Tieren auf. Untersuchungen der großen Surfactantaggregate mit dem *Captive Bubble Surfactometer* (CBS) zeigten zusätzlich eine deutliche Verschlechterung der Adsorption und Verringerung der Oberflächenspannung aus verletzten Tieren. Außerdem wurden Analysen des Materials mit der Filmwaage, Raster-Kraft-Mikroskop und Fluoreszenz-Mikroskop durchgeführt [113]. Es konnten deutliche Unterschiede im Phasen-, im Kompressions- und Expansionsverhalten beim Vergleich des Materials der gesunden und verletzten Tiere aufgezeigt werden.

Ziel dieser Arbeit ist die Funktionsbestimmung der Surfactantbestandteile anhand von Surfactant-Modellsystemen unter biophysikalischen Gesichtspunkten. Um die Funktion einzelner Lipide innerhalb des Surfactantgemisches besser verstehen und interpretieren zu können, wurde zunächst der Einfluss einzelner Komponenten auf ein einfaches *in vitro* Modellsystem des Surfactant, bestehend aus DPPC/DPPG/SP-C (80:20:0,4 mol %), untersucht. Mit diesem *in vitro* Modellsystem soll die noch weitgehend unbekannt Funktion des Cholesterols und POPE auf die Morphologie von gemischten Lipid- und Lipid/Protein-Filmen bei verschiedenen Oberflächendrücken im Vergleich zum Modellsystem des Surfactant untersucht werden.

Das Gesamtsurfactant ist bisher nur unzureichend in der Literatur beschrieben [114-116]. Insbesondere das Surfactant aus Mäusen ist bisher noch nicht im Detail untersucht worden. Aus diesem Grunde wird in dieser Arbeit die Zusammensetzung und Funktion des Surfactant an Mäusen erforscht. Als *in vivo* Extrakt-Modellsystem für eine veränderte Gesamtzusammensetzung wurden E-(-/-) FABP *knock out* (E-ko), H-(-/-) FABP *knock out* (H-ko) sowie d-ko Mäuse im Vergleich zu *wt* Mäusen verwendet. Außerdem soll die Aufhebung des biochemischen d-ko Phänotyps durch Pioglitazon überprüft werden. Ziel ist es, mit biophysikalischen Messmethoden zu zeigen, dass die Tiere, obwohl äußerlich normal bei einem veränderten biochemischen Phänotyp auch eine veränderte Surfactantfunktion haben.

Zusätzlich soll unter Stressbedingungen mit Hilfe eines Infektions- bzw. ARDS-Modells die Zusammensetzung und Oberflächenaktivität des Lungensurfactant untersucht werden. Es soll die Frage geklärt werden, inwieweit die Infektion in *wt* aber auch in genetisch modifizierten Mäusen die Surfactantfunktion beeinflusst.

2. Methoden:

2.1 Isolierung von SP-C aus Schweinelungenlavage

Zur Untersuchung des Einflusses von Cholesterol und 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin (POPE) auf das Modellsystem des Lungensurfactant bestehend aus 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholin (DPPC)/1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylglycerol (DPPG) (80:20 mol %) und Surfactant Protein (SP)-C (0,4 mol %) wurde das SP-C aus Lungen frisch geschlachteter Schweine isoliert [1].

Hierzu wurde gekühlte (4 °C) isotonische (150 mM) Kochsalzlösung unter leichtem Vakuum in jeweils einen der beiden Lungenflügel gespült. Das verwendete Volumen darf nicht zu groß gewählt werden, da es ansonsten zur Verletzung des Lungengewebes kommen kann. Um eine gleichmäßige Verteilung der Kochsalzlösung zu gewährleisten, wurde das Gewebe massiert und hierbei das Lungensurfactant vom Flüssigkeitsfilm der Alveolen gespült. Die so erhaltene Lavage enthält Lipide und Proteine und wurde aus der Lunge abgepumpt. Dieser Vorgang wurde mit jedem Lungenflügel dreimal wiederholt. Um im nächsten Schritt Zellbestandteile abzutrennen, wurde die Lavage bei 1000 g für 10 Minuten (min) zentrifugiert. Anschließend wurde für 90 min bei 17000 g zentrifugiert und als Pellet tubuläres Myelin und Surfactant Proteine erhalten. Das Pellet wurde in 1 ml Reinstwasser suspendiert und bei -20 °C gelagert oder direkt aufgearbeitet. Zur Isolierung der hydrophoben Komponenten wurde die Suspension in Butanol eingespritzt (v:v, 1:20) und 2 h stark gerührt. Die Lösung wurde erneut bei 17000 g zentrifugiert, um die hydrophilen Proteine SP-A und SP-D abzutrennen. Die hydrophoben Proteine SP-B und SP-C sowie die Lipide bleiben in Butanol gelöst. Nach Übertrag des Butanol-Überstandes wurde die Lösung am Rotationsverdampfer bei 8 mbar und einer Temperatur von <37°C bis zur Trockene eingengt und der Rückstand, im Weiteren als hydrophober Extrakt bezeichnet, in 1-2 ml Chloroform/Methanol (v:v; 1:1) aufgenommen. Die Trennung der Proteine und Lipide erfolgte säulenchromatographisch nach Größe und Hydrophobizität [2]. SP-B und SP-C wurden mittels einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (eng. *sodiumdodecylsulfate-polyacrylamid-gelelectrophoresis*, SDS-PAGE) identifiziert und mit Edmann Abbau und Elektronen Spray Ionisation (ESI) nachgewiesen [2].

2.2 Isolierung des hydrophoben Extraktes aus Mäuselungen

Die Generierung der Epidermal (E)- und Herz (H)-Fettsäurebindungsprotein (FABP) doppel *knock-out* (d-ko) Mäuse erfolgte durch die Kreuzung der homozygoten E-(-/-) FABP *knock out* (E-ko) und H-(-/-) FABP *knock out* (H-ko) Mäuse [3-5]. Die Haltung der Wildtyp (*wt*) und d-ko Mäuse erfolgte in der Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) des Universitätsklinikums Münster unter definierten Bedingungen; 12 h Tag/Nacht-Zyklus bei 22 ± 2 °C und 50 ± 10 % Luftfeuchtigkeit [7]. D-ko und *wt* Mäuse erhielten Kontrollfutter (Altromin, Ladbergen, Deutschland) oder Futter mit Pioglitazon (40 mg/kg Körpergewicht (KG)) für 7 Tage *ad libitum*. Die Auslösung des Atemnotsyndroms der Erwachsenen (eng. *adult respiratory distress syndrom*, ARDS) erfolgte nach Stimulierung mit Lipopolysaccharid (LPS)-Lösung [6], da gezeigt werden konnte, dass intratracheale Injektion von LPS im Tiermodell (Maus) bereits nach 4 h eine Entzündungsantwort der Lunge in Form von ARDS hervorruft. LPS, welches als Endotoxin wirkt, ist die amphiphile Hauptkomponente der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien.

Die Isolierung der Mäuselungenlavage erfolgte durch dreimaliges Spülen der einzelnen Lungenflügel mit je 0,8 ml isotonischer, eiskalter Kochsalzlösung. Die so erhaltene Lavage wurden bei 1200 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20 °C gelagert oder direkt aufgearbeitet [7].

Zur Isolierung des hydrophoben Extraktes wurde 1 ml Lavage 25 min bei 42000 g zentrifugiert [8]. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300 µl Reinstwasser resuspendiert. Unter starkem Rühren wurde die Suspension in 20 ml Butanol eingespritzt und 2 h bei 4°C gerührt. Das anschließende 90-minütige Zentrifugieren bei 17700 g trennte die hydrophilen Bestandteile als Bodensatz ab. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand am Rotationsverdampfer bei Temperaturen <37 °C eingengt. Der Rückstand, bestehend aus SP-C, SP-B und Lipiden, wurde an der Lyophilie über Nacht getrocknet und anschließend in 3 ml Chloroform/Methanol (v:v; 1:1) gelöst.

Zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sind jeweils die hydrophoben Extrakte aus mindestens drei Tieren isoliert worden und mit den im

Folgenden beschriebenen biochemischen und biophysikalischen Methoden untersucht worden.

2.3 Biochemische Analysen

2.3.1 Quantifizierung der Phospholipide

Zur quantitativen Analyse der Phospholipide DPPC, DPPG und des hydrophoben Extraktes wurde ein Phosphattest durchgeführt [9]. Grundlage dieser Bestimmung ist die Umwandlung des organisch gebundenen Phosphors in Lipiden zu anorganischem Phosphat PO_4^{3-} . Die Phosphationen bilden mit dem Molybdat in saurer Lösung Dodecamolybdatphosphorsäure. Diese Polysäure kann mit starken Reduktionsmitteln wie Eisen (II) oder Ascorbinsäure reduziert werden. Die daraus resultierende blaue Färbung der Reaktionslösung kommt durch die Mo-Komplexe zustande.

2.3.1.1 Durchführung

Ausgehend von einer 0,1 g/l Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)-Standardlösung wurde eine Kalibrationsreihe erstellt (0,35; 0,70; 1,03; 1,33 $\mu\text{g/ml}$). Das Lösungsmittel Chloroform/Methanol (v:v; 1:1) der DPPC oder DPPG Proben, sowie der Proben des hydrophoben Extraktes wurden im seichten Stickstoffstrom bei Raumtemperatur (RT) bis zur Trockene verdampft. Nach Zugabe von 7 Tropfen Perchlorsäure (w:v; 70 %) wurden die Proben gründlich geschüttelt und auf 200 °C für 2 h aufgeheizt. Die Proben wurden auf RT abgekühlt und 700 μl Reagenz A und 700 μl Reagenz B zugegeben. Nach anschließendem Schütteln wurden die Proben im Wasserbad für 5 min auf 95 °C erwärmt. Nachdem Abkühlen der Proben auf RT, wurde die Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 820 nm mit einem UV/Vis Spektrometer bestimmt [4].

Reagenz A:	2,232 g Ammonium-Molybdat (VI) · 4 H ₂ O 89 ml Perchlorsäure (70%ige) 411 ml H ₂ O
Reagenz B:	8,929 g/500 ml Ascorbinsäure

2.3.2 Konzentrationsbestimmung der Surfactant Proteine B und C

Die Konzentration der SP-C Proben, isoliert aus Schweinelavage, sowie der Proteine SP-B und SP-C innerhalb des hydrophoben Extraktes wurde mit Hilfe des Fluorescamintests durchgeführt [10]. Dieser Test beruht auf der Reaktion von Fluorescamin mit primären Aminen des Proteins zu einem Fluorophor und ermöglicht die Detektion von Proteinen im picomolaren Maßstab.

Die Bestimmung der Konzentrationen der SP-B und SP-C enthaltenden Lösungen ist möglich, da nur eine vernachlässigbare Fluoreszenzintensität bei einer evtl. Kreuzreaktion des primären Amins des PE im hydrophoben Extrakt mit dem Fluorescamin entsteht. Die Fluoreszenzintensität wurde mittels einer 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin (DMPE) Kalibrationsreihe für 0-5 Gew.% PE bestimmt. Für die Maus ist von ca. 1,9 Gew.% PE auszugehen [11]. Die Bestimmung ergab eine nicht signifikante Erhöhung der Fluoreszenzintensität durch PE in diesem Bereich.

2.3.2.1 Durchführung

Das Chloroform/Methanol-Gemisch (v:v; 1:1) der SP-C Lösung oder des hydrophoben Extraktes wurde bei RT im seichem Stickstoffstrom verdampft. Anschließend wurden 100 µl 10 %iges (w:v) Natriumdodecylsulfat (eng. *sodium dodecylsulfate*, SDS) hinzugegeben, die Lösung stark geschüttelt und 5 min aufgekocht. Als Kalibrationsreihe dienten 50 µl Aliquots von Rinderserumalbumin (eng. *Bovine Serum Albumin*, BSA) mit den Konzentrationen 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; und 0,3 mg/ml. Diese Lösungen wurden ebenfalls mit gleichem Volumen der SDS-Lösung versetzt, geschüttelt und 5 min aufgekocht. Nach dem Abkühlen der Proben wurden 1,5 ml 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 8,9), bestehend aus den Stammlösungen 0,05 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 0,05 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ zu den Proben und 1,45 ml des Puffers zu den BSA-Standards gegeben. Nach Zugabe von 500 µl Fluorescamin (0,3 mg/ml), gelöst in Aceton, wurden die Emulsionen stark geschüttelt. Die Fluoreszenzintensität wurde bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm und einer Emissionswellenlänge von 475 nm bestimmt.

2.3.3 Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie (HPTLC)

Die Auftrennung der Phospholipide und des Cholesterols des hydrophoben Extraktes erfolgte mit der Methode der Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie (eng. *High Performance Thin-Layer-Chromatography*, HPTLC) und den von Ando et al. (1980) und Macala et al. (1983) entwickelten Lösungsmittelsystemen [12-14].

2.3.3.1 Durchführung

Die HPTLC-Platten wurden unmittelbar vor der Auftragung der Probe 30 min bei 120 °C aktiviert. Durch die Aktivierung desorbiert Wasser und leichtflüchtige Substanzen, wodurch die Trennleistung des Sorptionsmittels erhöht wird. Die Laufmittel wurden jeweils unmittelbar vor der Chromatographie angesetzt und etwa 1 cm hoch in die Laufkammer gefüllt. Um eine Sättigung der Kammer mit Laufmittel zu erreichen, wurden die Seitenwände mit Filterpapier ausgeschlagen. Die Kammern wurden mindestens 30 min mit dem Laufmitteldampf equilibriert.

1000 µl des hydrophoben Extraktes wurden im seichem Stickstoffstrom verdampft, danach in jeweils 10-20 µl einer Chloroform/Methanol-Lösung (1:1; v:v) aufgenommen und in Form von feinen Punkten 1,5 cm oberhalb der unteren Kante der HPTLC-Platte mit einer Mikroliterspritze in kleinen Mengen aufgetragen. Während der Auftragung wurde das Lösungsmittel permanent im Luftstrom entfernt.

Laufmittel 1: Chloroform:Methanol:Essigsäure:Ameisensäure:Wasser = 35:15:6:2:1

Laufmittel 2: n-Hexan: Diisopropylether:Essigsäure = 65:35:2

Der Phospholipidgehalt der Spots wurde mittels chemischer Analyse des in den Lipiden enthaltenen Phosphors durchgeführt [15]. Hierzu wurde nach der Probenauftragung die Platte in eine Kammer mit gesättigtem Laufmitteldampf gestellt und die Phospholipide bis zur Mitte der HPTLC-Platte in Laufmittel 1 aufgetrennt. Anschließend wurde die Platte getrocknet und mit dem nächsten Laufmittelsystem bis 1 cm unterhalb der oberen Kante entwickelt. Die Platte wurde erneut getrocknet und in ein Gefäß gestellt, indem sich elementares Iod befand. Durch Sublimation gelangt das Iod bevorzugt an die Stellen, an denen sich Lipide befinden. Die Anfärbung ist reversibel und verschwindet nach kurzer Zeit an Luft. Die angefärbten Kieselgel-Partikel wurden mit Hilfe eines

Skalpells von der HPTLC-Platte entfernt und die Phospholipide mit dem im Kapitel 2.3.1 beschriebenen Phosphatrest nachgewiesen und quantifiziert.

Die anschließende Quantifizierung des Cholesterols erfolgte mit einem kommerziellen Cholesterin Farbttest. Bei diesem Test wird das Cholesterin von Cholesterin-Oxidase zu Cholestenon oxidiert. Das entstehende Wasserstoffperoxid oxidiert Methanol in Gegenwart von Katalase zu Formaldehyd, welches im letzten Schritt zu einem gelben Lutidin Farbstoff reagiert. Die Konzentration des entstehenden Lutidin Farbstoffes ist der Menge an Cholesterol äquivalent.

Das mit Iod angefärbte Cholesterol wurde mit einem Skalpell von der HPTLC Platte entfernt und über Nacht mit 2 ml Chloroform aus dem Kieselgel-Partikeln eluiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel mit Stickstoff bis zur Trockene eingedampft und der Rückstand in 400 µl Isopropanol aufgenommen. 15 ml der Reagenzlösung 1 wurden mit 10 ml der auf RT gebrachten Reagenzlösung 2 vermischt und 1 h bei 20-25 °C inkubiert. 5 ml dieses Gemisches wurden mit 400 µl Probelösung versetzt. Nachdem 2,5 ml Reagenzlösung für den Blindwert entnommen worden sind, wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl Reagenzlösung 3 gestartet. Die Lösung ist 1 h bei 37—40°C inkubiert worden, bevor die photometrische Konzentrationsbestimmung bei einer Wellenlänge von 405 nm erfolgte.

Reagenzlösung 1:	Ammoniumphosphatpuffer, pH 7 Methanol 2,6 M Katalase, 220.000 U
Reagenzlösung 2:	Acetylaceton, 0,05 M Methanol, 0,3 M
Reagenzlösung 3:	Cholesterin-Oxidase, ca. 12 U

2.4 Apparative Techniken

2.4.1 Filmwaagetechnik

2.4.1.1 Grundlagen

Erste Grenzflächen-Untersuchungen wurden von Agnes Pokels (1862–1935) über das anomale Verhalten der Wasseroberfläche durchgeführt. Hierzu baute sie einen sogenannten Pokelschen Trog, um die Oberflächenspannung von Wasser präzise zu vermessen. Irvin Langmuir optimierte und perfektionierte den primitiven Trog und entwickelte so die nach ihm benannte Filmwaage. Diese stellt bis heute ein wichtiges Hilfsmittel zur Lösung biophysikalischer Fragestellungen dar.

Die Filmwaage dient zur Untersuchung von amphiphatischen Molekülen wie z.B. Lipiden. Diese besitzen einen unpolaren hydrophoben und polaren hydrophilen Teil. In Kontakt mit der Wasseroberfläche bilden diese einen monomolekularen Film, wobei die polare Kopfgruppe im Kontakt mit der Wasseroberfläche steht und die hydrophoben Ketten zur Luft gerichtet sind.

Befindet sich der monomolekulare Film im thermodynamischen Gleichgewicht so ist der Oberflächendruck Π gleich der Differenz aus Oberflächenspannung einer reinen γ_0 und der mit einer oberflächenaktiven Substanz bedeckten Wasseroberfläche γ .

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \quad (\text{Gl. 2})$$

Wird eine monomolekulare Lipidschicht bei konstanter Temperatur unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur komprimiert, zeigt sie vergleichbar zu einem realen Gas unterschiedliche Phasen. Neben der gasanalogen (eng. *gaseous*, *g*), flüssigen (eng. *liquid*, *l*) und festen (eng. *solid*, *s*) Phase, die sich sowohl im Abstand als auch in den Wechselwirkungen der Lipide zueinander unterscheiden, können Lipide im Gegensatz zum realen Gas aber auch in den kristallinen Phasen flüssig kondensiert (eng. *liquid condensed*, *l_c*) und flüssig expandiert (eng. *liquid expanded*, *l_e*) vorliegen (Abb. 2.0).

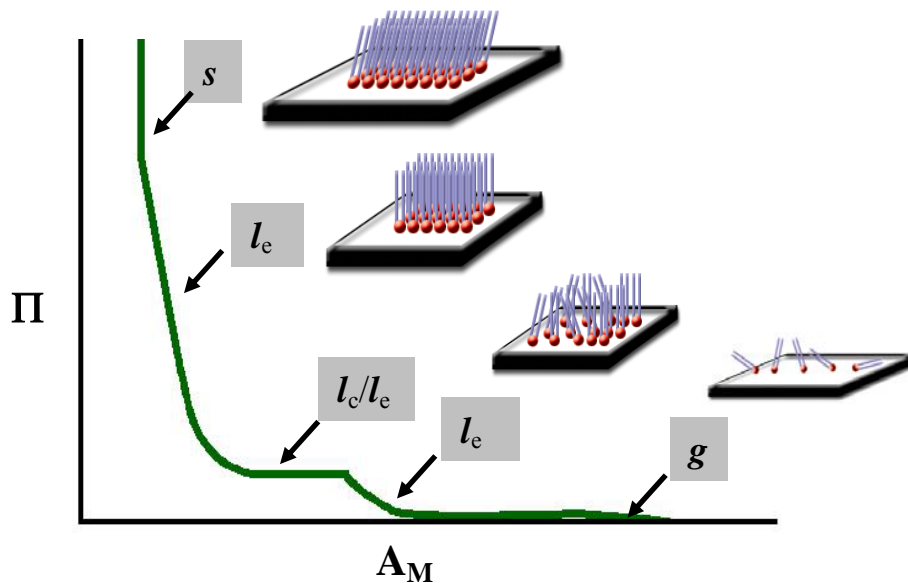


Abbildung 2.0 Kompressionsisotherme einer Lipidmonoschicht. Dargestellt sind die unterschiedlichen Packungen der Phospholipide in Abhängigkeit von der molekularen Fläche A_M und dem Oberflächendruck Π bei konstanter Temperatur.

In der gasanalogen Phase sind die Lipidmoleküle weit voneinander entfernt und besitzen nahezu keine Wechselwirkungen untereinander. Die l_e Phase ist gekennzeichnet durch das Aufrichten der Lipide. Die Kopfgruppen sind in einem höheren Grad hydratisiert im Vergleich zur gasanalogen Phase. Bei weiterer Kompression verringert sich der Abstand zwischen den Lipiden und die Fettsäuren sind dichter gepackt. Bereiche höherer Ordnung innerhalb des Lipidfilms befinden sich im l_c Zustand. Da die l_e und l_c Phasen koexistent vorliegen, findet bei weiterer Kompression keine Druckveränderung statt (Phasenübergang erster Ordnung). In der l_c Phase liegen die Lipidmoleküle dicht angeordnet vor und die Kompressibilität des Films ist stark reduziert. Nahezu keine Kompression ist bei dem Lipiden, die sich in der festen Phase befinden, möglich. Die Fettsäuren sind in dieser Phase gegen die Oberflächennormalen geneigt (DPPC: 30°) und der Hydratationsgrad ist gering [16].

2.4.1.2 Aufbau einer Filmwaage

Grundsätzlich besteht eine Filmwaage aus einem Drucksensor, Teflon Trog und einer beweglichen Barriere (Abb. 2.1). Teflon ist hydrophob, weshalb der Meniskus der Subphase nach oben gewölbt ist. Das Aufbringen des monomolekularen Films erfolgt durch das sogenannte Spreiten. Hierzu wird an der Spitze einer Mikroliterspritze ein Meniskus an der Wasseroberfläche erzeugt und die Probesubstanz gleichmäßig durch Entleeren der Spritze auf die Oberfläche appliziert. Anschließend kann die Oberfläche,

die den Molekülen zur Verfügung steht, durch Bewegen der Barriere verringert werden. Simultan wird über ein Druckmesssystem der Lateraldruck detektiert.

Hierzu werden sowohl ein Wilhelmy- als auch ein Langmuir-Messsystem verwendet (Abb. 2.1 **ab**). Bei dem Wilhelmy-System dient ein Filterpapier als Drucksensor, welches in die Subphase eintaucht und vollständig benetzt ist. Dieses wird vor den Messungen 30 min in Reinstwasser bzw. Lösungsmittel der Subphase inkubiert. Durch die Oberflächenspannung entsteht eine auf das Papier in Richtung der Oberflächennormalen gerichtete Kraft. Diese Kraft ist der Oberflächenspannung σ proportional.

Das Langmuir-System nutzt eine schwimmende Barriere als Drucksensor. Durch Kompression der monomolekularen Schicht wirkt eine Kraft auf die Barriere, welche der Oberflächenspannung σ proportional ist. Mit beiden Systemen kann die Kraft durch eine Waage, daher der Begriff Filmwaage, gemessen werden. Die Oberflächenspannung wird in Oberflächendruck umgerechnet (Gl. 2) und graphisch gegen die Fläche pro Molekül aufgetragen.

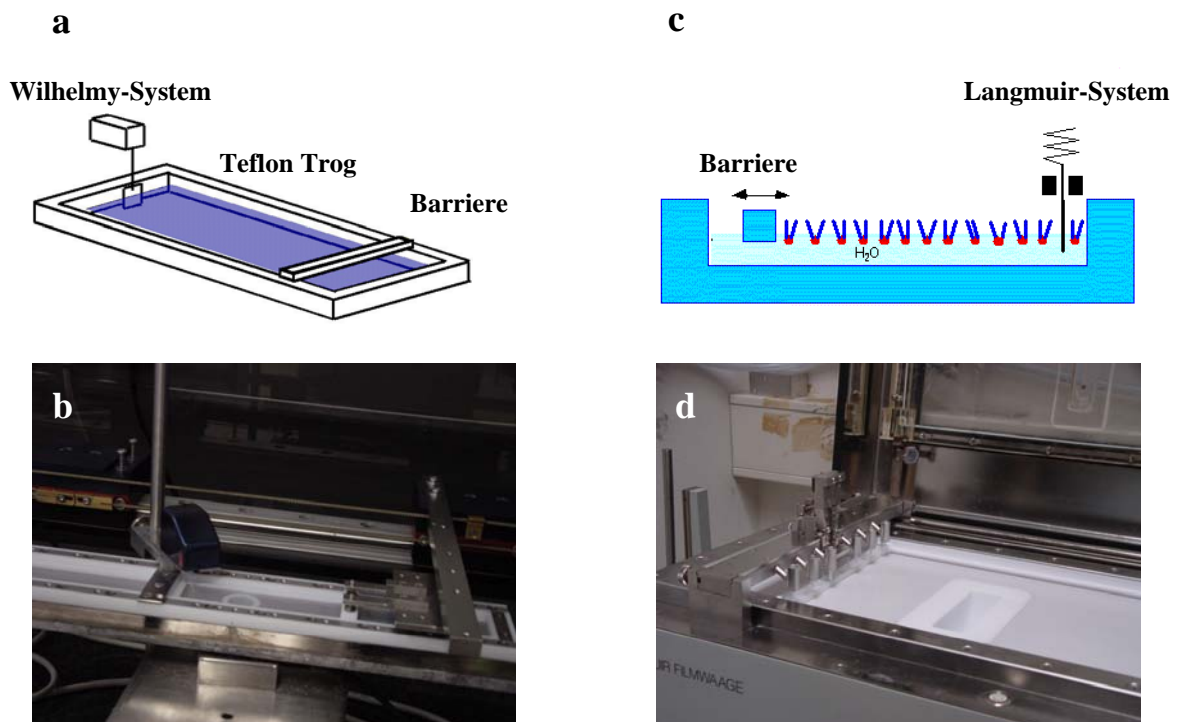


Abbildung 2.1 Unterschiedliche Messsysteme. (**ab**) Filterpapier des Wilhelmy-Systems und (**cd**) Barriere des Langmuir-Systems.

2.4.1.3 Durchführung

Die in dieser Arbeit verwendeten Wilhelmy- (Abb. 2.1 **b**) und Langmuir- Filmwaagen (Abb. 2.1 **d**) besitzen maximale Gesamtflächen von 39 bzw. 927 cm². Zum Schutz vor Erschütterungen und Staub befinden sich beide Filmwaagen auf einem gedämpften Marmorblock innerhalb eines Kastens aus Plexiglas. Zum Temperieren des Filmwaagetrgs wird ein Thermostat verwendet. Für die Erstellung der Druck/Flächen-Diagramme wurden die wichtigen Soll-Größen Temperatur, Konzentration und Volumen der zu spreitenden Lösung gespeichert.

Die Filmwaagemessungen zur Untersuchung des Einflusses von Cholesterol bzw. POPE auf das Lipidsystem DPPC/DPPG (80:20 mol %) und auf das Surfactant-Modellsystem DPPC/DPPG/SP-C (80:20:0,4 mol %) sind mit der Wilhelmy-Filmwaage durchgeführt worden. Bei den Untersuchungen zum Druck/Flächen-Verhalten des hydrophen Extraktes wurde die Langmuir-Filmwaage verwendet. Alle Filmwaageexperimente sind auf einer Subphase bestehend aus Reinstwasser bei einer Temperatur von $20 \pm 0,1$ °C durchgeführt worden. Die Filmwaagemessung gliedert sich in aus zwei Schritte:

Der erste Schritt ist die Reinigung der Filmwaage mit Mucosol[®], Dichlormethan und Reinstwasser. Hierzu wurde die Filmwaage 30 min auf 20 °C temperiert und anschließend 30 min mit Mucosol[®] inkubiert. Dieses wurde durch Absaugen von der Filmwaage entfernt, wobei anschließend der Trog noch dreimal mit Reinstwasser nachgespült wurde. Zum Schluss erfolgte das Abwischen des Troges mit Dichlormethan und erneutes Spülen mit Reinstwasser.

Der zweite Schritt ist die Amplifizierung der Probesubstanz auf die Luft/Wasser-Grenzfläche. Lipid, Lipid/SP-C-Mischungen und hydrophober Extrakt wurden gelöst in Chloroform/Methanol (v:v,1:1) auf die Reinstwasser Subphase gespreitet und das Lösungsmittel 15 min zum Verdampfen inkubiert. Die anschließende Kompression des Cholesterol- bzw. POPE-Gemisches wurde mit einer Geschwindigkeit von 2,92 cm²/min durchgeführt, während bei den Messungen mit dem hydrophoben Extrakt eine Geschwindigkeit von 9,27 cm²/min eingestellt worden ist. Ausnahmen sind die in Kapitel 7 beschriebenen Kompressions-/Expansions-Zyklen. Um eine irreversible Kollabierung des hydrophoben Extraktes zu verhindern, wurde der Film mit einer Geschwindigkeit von 2,92 cm²/min komprimiert bzw. expandiert.

Um den Atmungszyklus besser zu simulieren und Unterschiede in der Stabilität und Elastizität des hydrophoben Extraktes messen zu können, wurde das Langmuir-Messsystem und eine höhere Geschwindigkeit im Vergleich zu den POPE- bzw. Cholesterolfmessungen verwendet. Die Gefahr der Entstehung von Messartefakten durch Auslenkung des Filterpapiers bei hohen Kompressionsgeschwindigkeiten ist mit dem Langmuir-System im Gegensatz zum Wilhelmy-System nicht gegeben.

2.4.2 Fluoreszenz-Mikroskopie (FM)

2.4.2.1 Grundlagen

Lösche und Möhwald entwickelten im Jahre 1980 die FM an der Luft/Wasser-Grenzfläche [17]. Sie verwendeten einen einfachen Versuchsaufbau bestehend aus Mikroskopobjektiv, Fokussierungsoptik und Videokamera.

Die FM liefert Informationen über das Phasenverhalten amphiphiler Substanzen an der Luft/Wasser-Grenzfläche. Da jedoch viele monomolekulare Lipid oder Lipid/Protein-Filme keine Eigenfluoreszenz zeigen, ist es notwendig Fluoreszenzsonden zuzugeben. Es sind eine große Anzahl von Sonden, die sich in ihren Absorptionskoeffizienten, Quantenausbeuten, Löslichkeiten und Strukturen unterscheiden, kommerziell erhältlich. Um eine möglichst geringe Wechselwirkung zwischen der Lipidmatrix und den Sondenmolekülen zu erhalten, werden die Sonden häufig so synthetisiert, dass ihre Strukturen eine große Analogie zu den zu untersuchenden Lipidmolekülen besitzen. Der Einfluss der Sonde auf das charakteristische Phasenverhalten der zu untersuchenden Substanz soll durch die einheitliche Struktur gering bleiben.

In dieser Arbeit ist die Sonde BODIPY-PC[®] (2-(4,4-difluoro-5-methyl-4-bora-3a,4a,-diazas-indacene-3-dodecanoyl)-1-hexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) der zu untersuchenden Substanzen in geringen Mengen beigemischt worden (Abb. 2.2). Die Sonde besitzt eine fluoreszierende Indacen-Gruppe, welche bei einer Wellenlänge von 500 nm das Licht absorbiert und dieses bei einer Wellenlänge von 510 nm emittiert. BODIPY-PC[®] zeichnet sich durch einen hohen Absorptionskoeffizienten und eine gute Quantenausbeute aus.

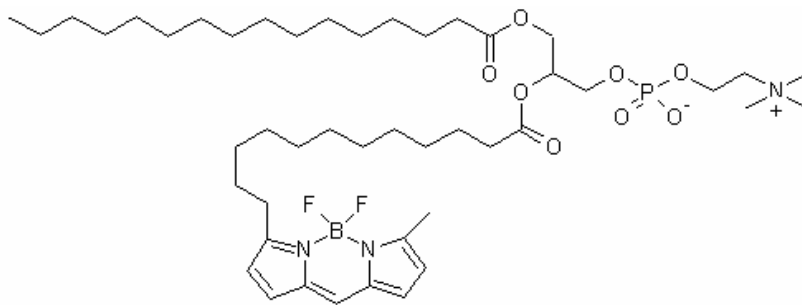


Abbildung 2.2 Struktur von BODIPY-PC[®] (2-(4,4-difluoro-5-methyl-4-bora-3a,4a,-diazas-indacene-3-dodecanoyl)-1-hexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin, β -BODIPY 500/510 C₁₂-HPC).

Nach Einlagerung der Sonde in die Monoschicht wird die laterale Sondenverteilung gemessen. Der Kontrast der koexistierenden Phasen entsteht durch die unterschiedliche Löslichkeit der Sonde in der l_c und l_e Phase. l_c Bereiche erscheinen als dunkle Areale, in denen die Sonde aufgrund der starken Wechselwirkung der Lipide eine geringere Löslichkeit besitzt als in den hellen Arealen. Hier liegt der Monofilm als l_e Phase mit geringer Packungsdichte der Lipide vor. Eine Verminderung der Fluoreszenzintensität und des Kontrastes durch Quenchen, d.h. Übertragung der Anregungsenergie auf ein Löschermolekül, entsteht häufig bei hohen Oberflächendrücken. In diesen Bereichen ist die molekulare Dichte der Sondenmoleküle besonders groß, so dass die Anregungsenergie einer Sonde häufig auf die benachbarte Sonde übertragen wird. Dieser Prozess wird „Selfquenching“ genannt.

2.4.2.2 Aufbau eines Fluoreszenz-Mikroskops

Im Rahmen dieser Dissertation wurden für die FM an der Luft/Wasser-Grenzfläche eine Wilhelmy-Filmwaage, Mikroskopiertisch und ein Fluoreszenz-Mikroskop verwendet (Abb. 2.3).

Die Grundelemente des Fluoreszenz-Mikroskops sind in Abbildung 5 **b** gezeigt. Hierbei wird Licht von einer Quecksilber-Hochdruckdampfampe durch einem optischen Filter zu einem halbdurchlässigen Spiegel und Objektiv geleitet. Von dort gelangt es zur Luft/Wasser-Grenzfläche, wo die Fluoreszenzsonde innerhalb des Lipid- oder Lipid/Protein-Films das Licht absorbiert und bei höherer Wellenlänge wieder emittiert. Diese Fluoreszenzstrahlung passiert das Objektiv und gelangt erneut durch den

halbdurchlässigen Spiegel. Hinter dem Emissionsfilter werden die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten mit einer *charge-coupled device* (CCD) Kamera in Echtzeit aufgenommen.

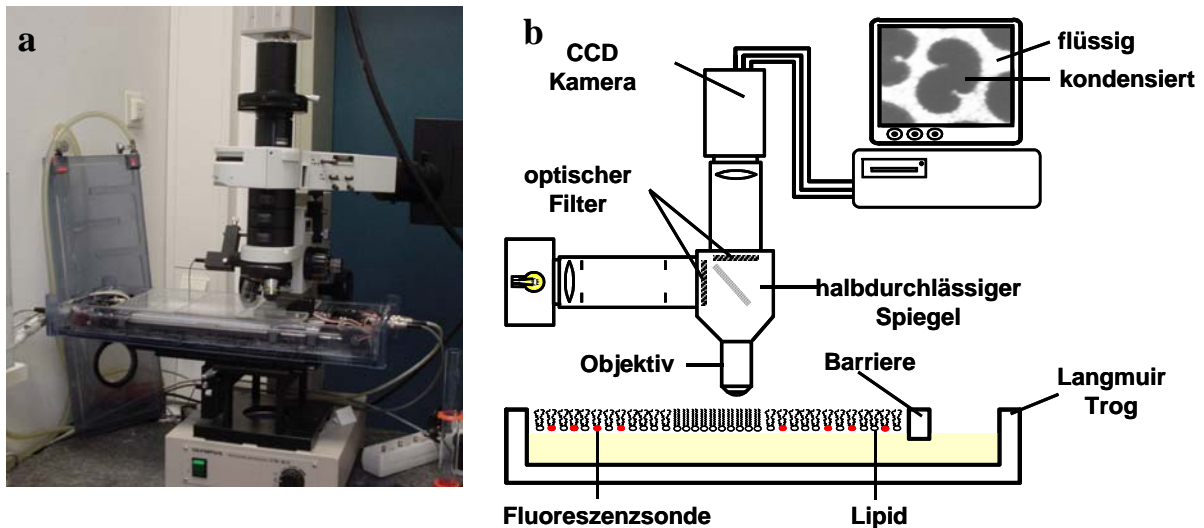


Abbildung 2.3 FM an der Luft/Wasser-Grenzfläche. (a) Versuchsaufbau, (b) Schema.

2.4.2.3 Durchführung

BODIPY-PC[®] wurde in Methanol (25 μM) gelöst. Die Lösung wurde mit Alufolie vor Lichteinwirkung geschützt und bei -20°C gelagert. Zur Untersuchung des Einflusses von Cholesterol/POPE auf das Phasenverhalten des Lipidsystems DPPC/DPPG (80:20 mol %) und des Surfactant-Modellsystems DPPC/DPPG/SP-C (80:20:0,4 mol %) wurde die Fluoreszenzsonde BODIPY-PC[®] in einer Konzentration von 0,4 mol % beigefügt. Messungen zum Studium des Phasenverhaltens des hydrophoben Extraktes wurden mit einer Sondenkonzentration von 0,5 mol %, bezogen auf den Phospholipidanteil, durchgeführt.

Die Reinigung der Wilhelmy-Filmwaage und das Spreiten der Fluoreszenzlösungen erfolgte wie in der Durchführung Kapitel 2.4.1.3 beschrieben. Cholesterol bzw. POPE-Mischungen wurden mit einer Barrieregeschwindigkeit von $2,92 \text{ cm}^2/\text{min}$, der hydrophobe Extrakt mit $11,5 \text{ cm}^2/\text{min}$ komprimiert. Nach Erreichen des gewünschten Druckes wurde die Barriere gestoppt, der Film äquilibriert und die laterale Verteilung der Fluoreszenzsonde mittels der CCD Kamera aufgenommen. Dabei wurden fünf Bilder in Serie aufgenommen, um mögliche Bewegungen des Oberflächenfilms und die

damit verbundene Unschärfe der Bilder auszugleichen. Die verwendete Apparatur erzeugte $130 \cdot 130 \mu\text{m}^2$ große Bilder.

Die erhöhte Kompressionsgeschwindigkeit bei den Untersuchungen des hydrophoben Extraktes im Vergleich zu den Cholesterol bzw. POPE-Systemen dient der besseren Unterscheidung des Phasenverhaltens des hydrophoben Extraktes.

2.4.3 Langmuir-Blodgett-Transfer

2.4.3.1 Grundlagen

In vielen Fällen lässt sich durch senkrechtetes Eintauchen und Herausziehen eines geeigneten Trägers die komprimierte Monoschicht auf diesen übertragen, was als Langmuir-Blodgett-Transfer bezeichnet wird. Einen erheblichen Einfluss auf das Übertragungsverhalten hat die Art der Trägeroberfläche. Oft lassen sich hydrophile Oberflächen wie z. B. Glas, Mica oder Silizium verwenden. Eine Umwandlung zu hydrophoben Oberflächen durch Physisorption von Amphiphaten oder durch chemische Modifikation ist ebenfalls möglich. Auf dieser Schicht lassen sich dann Monolayer bei hohem Oberflächendruck besser übertragen, d.h. die Gefahr der Entstehung von Übertragungsartefakten auf mit Amphiphaten beschichtete Träger ist auf Grund der vergleichbaren Stoffe, z.B. Lipid des Trägers und Lipid/Protein-Gemisch, auf der Subphase geringer.

Es wird zwischen hydrophilem und hydrophobem Übertrag unterschieden (Abb. 6). Grundlage des hydrophilen Transfers ist die Physisorption, die die Wechselwirkung des Mica mit der oberflächenaktiven Substanz beschreibt. Aufgrund des hydrophilen Materials des Trägers lagern sich die polaren Kopfgruppen des Lipids auf den Träger, während die Fettsäuren des Lipids zur Luft gerichtet sind.

Der hydrophobe Transfer erfolgt durch Eintauchen eines hydrophoben Trägers, wie z.B. ein DPPC präpariertes Mica *Sheet*. Die Fettsäuren der Lipide, d.h. der DPPC-Moleküle und der transferierten Lipide, bilden Doppelschichten, während die hydrophilen Kopfgruppen zum Mica oder zur Subphase zeigen.

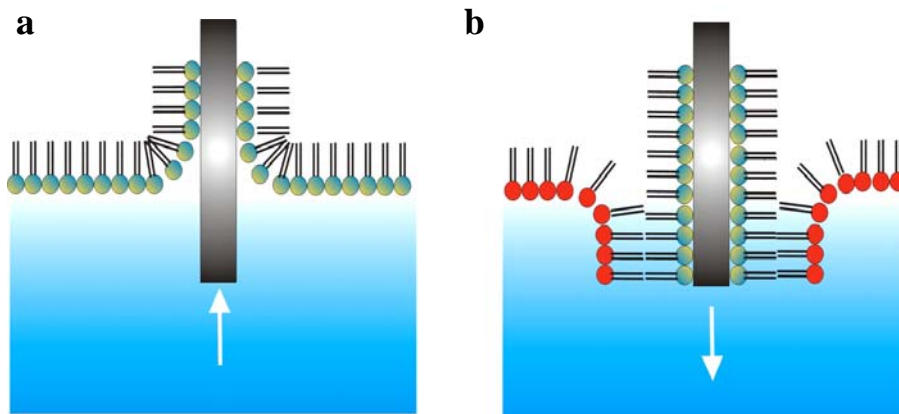


Abbildung 2.4 Langmuir-Blodgett-Transfer. (a) hydrophiler und (b) hydrophober Übertrag.

2.4.3.2 Durchführung

Nach der in Kapitel 2.4.1.3 beschriebenen Reinigung der Filmwaage wurden die zu untersuchenden Substanzen durch Langmuir-Blodgett-Transfer entweder hydrophil oder hydrophob auf Mica *Sheets* übertragen.

Zur Untersuchung des Einflusses von Cholesterol/POPE auf das Surfactant-Modellsystem DPPC/DPPG/SP-C (80:20:0,4 mol %) wurde der Protein/Lipid-Film auf ein frisch gespaltenes Mica *Sheet* im Plateau Bereich der Isotherme (ca. 47 mN/m) hydrophil übertragen. Hierfür wurde das Cholesterol- oder POPE-Gemisch auf die Reinstwasser Subphase ($T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$) gespreitet und 30 min äquilibriert. Anschließend wurde der Film mit einer Kompressionsgeschwindigkeit von $1,79\text{ cm}^2/\text{min}$ bis zum Plateaubereich der Isotherme komprimiert und durch Herausziehen des Mica *Sheet* auf den Träger transferiert ($v_{\text{Lift}} = 0,72\text{ mm}/\text{min}$). Innerhalb des Plateaus wurde die Kompressionsgeschwindigkeit der Barriere manuell so gewählt, dass der Film nahezu bei konstantem Druck übertragen wird. Ist das gesamte Mica *Sheet* außerhalb der Subphase, wurde es mindestens 2 bis 3 Stunden getrocknet und anschließend mit dem Raster-Kraft-Mikroskop untersucht.

Zur Untersuchung des hydrophoben Extraktes wurde der hydrophobe Übertrag gewählt. Hierzu wurde im ersten Schritt ein DPPC-Film auf einem Oberflächendruck von 45 mN/m komprimiert, 30 min äquilibriert und auf das Mica *Sheet* durch Herausziehen übertragen (Abb. 2.4 a). Der Übertrag erfolgte durch vollautomatische Anpassung der

Kompressionsgeschwindigkeit auf den Solldruck von 47 mN/m. Das Mica wurde bei RT über Nacht getrocknet und am nächsten Tag für die Untersuchung des hydrophoben Extraktes verwendet.

Der zweite Schritt ist der Übertrag des hydrophoben Extraktes auf das DPPC präparierte Mica *Sheet*. Nachdem der Protein/Lipid-Film 30 min äquilibriert wurde, wurde er mit einer Geschwindigkeit von 1,79 cm²/min bis zum Plateau der Isotherme komprimiert. Der Übertrag erfolgte durch langsames Eintauchen des Mica *Sheets* in die Reinstwasser Subphase ($v_{\text{Lift}} = 0,72$ mm/min). Die Kompressionsgeschwindigkeit wurde so eingestellt, dass nur geringe Druckabweichungen zugelassen worden sind. Nach dem Übertrag wurde das Mica *Sheet* unter Wasser in eine spezielle Teflon Vorrichtung befestigt und mit dem Raster-Kraft-Mikroskop untersucht.

Trotz der komplizierteren Handhabung der Probe, sowie der Schwierigkeit der Einstellung experimenteller Parameter bei der anschließenden Untersuchung mit dem Raster-Kraft-Mikroskop wurde der hydrophobe Übertrag bei der Untersuchung des hydrophoben Extraktes eingesetzt. Grund hierfür ist, dass die Gefahr der Entstehung von Übertragungsartefakten beim hydrophoben im Vergleich zum hydrophilen Transfer niedriger ist.

2.4.4 Raster-Kraft-Mikroskopie (SFM)

2.4.4.1 Grundlagen

E. Ruska, G. Binnig und H. Rohrer erhielten im Jahre 1986 den Nobelpreis für die Entwicklung des Rastertunnel-Mikroskop im Jahre 1982 [18]. Dies war der Grundstein für das vier Jahre später erbaute erste funktionsfähige Raster-Kraft-Mikroskop [19]. Schon 1988 erschien die erste Publikation [20] zur Untersuchung von biologischen Proben, jedoch gelang die eigentliche Etablierung dieser Technik erst im Jahre 1992 mit der ersten Abbildung von DNA [21]. Das Potential der Raster-Kraft-Mikroskopie (eng. *Scanning-Force-Microscopy*, SFM) liegt in der großen Bandbreite der Möglichkeiten zur Untersuchung von biologischen Proben. So ist es möglich, Strukturen von Biomolekülen oder biologischen Oberflächen in molekularer oder atomarer Auflösung abzubilden. Hierbei können auch Informationen über mechanische, chemische und

physikalische Eigenschaften erhalten werden. Die SFM wird auch verwendet, um einzelne Moleküle zu manipulieren oder Proben, z.B. Zellen, unter physiologischen Bedingungen zu studieren.

Untersuchungen mit dem Raster-Kraft-Mikroskop basieren auf der Interaktion einer feinen Spitze, welche an einem Tastarm (eng. *cantilever*) befestigt ist, mit der Oberfläche der Probe. Die Spitze des *cantilevers* tritt beim Annähern an die Probe mit dieser in Wechselwirkung. Diese sind in Lösung im Wesentlichen Van-der-Waals-Wechselwirkungen, Coulombsche-Wechselwirkungen, sterische oder Hydratations-Wechselwirkungen [22]. Die Auslenkung des *cantilevers* z_F ist nach dem Hookschen Gesetz (Gl.3) proportional zur ausgeübten Kraft F (k ist die Federkonstante des *cantilevers*).

$$F = k \cdot z_F \quad (\text{Gl. 3})$$

Beim Annähern des *cantilevers* an die Probenoberfläche treten sowohl attraktive als auch repulsive Kräfte auf, wie z. B. elektrostatische Kräfte (10^{-6} m), Kapillarkräfte (10^{-7} m) oder Van-Der-Waals Kräfte (10^{-9} m) [23]. Die Probe wird in parallelen Linien abgerastert, wobei für jede Position die Wechselwirkung der Spitze mit der Probenoberfläche aufgezeichnet wird (Abb. 2.5 a).



Abbildung 2.5 (a) Raster-Elektronen-Mikroskopieaufnahme eines *cantilevers*. Am oberen Ende des *cantilevers* ist die Spitze zu erkennen, mit der der Kontakt zur Probe hergestellt wird. (b) Abrasterung der Probe \circ = Messpunkte, $-$ = Messweg der SFM Spitze.

2.4.4.2 Aufbau eines Raster-Kraft-Mikroskops

Auf Grund des einfachen Prinzips sind Raster-Kraft-Mikroskope relativ kleine, kompakte Geräte, welche mit einer Steuereinheit und einem Computer verbunden sind. Wird die hohe Auflösung bei kleinen Flächendimensionen berücksichtigt, wird deutlich, wie wichtig die Isolation des Gerätes von externen Vibrationen ist. Hierzu befindet sich das Mikroskop auf einen Dämpfungstisch. Vibrationen werden so reduziert und Interferenz während der SFM-Messung verhindert. Zusätzlich befindet sich die Messapparatur innerhalb einer Kammer, um es vor Schallwellen zu schützen (Abb. 2.6 a). Die Wechselwirkung der Spitze des Tastarms mit der Oberfläche der Probe führt zu einer Auslenkung des *cantilevers*. Die Auslenkung wird über einen auf der Rückseite des *cantilevers* fokussierten Laserstrahls, der von dort auf eine Photodiode reflektiert wird, mit hoher Präzision detektiert. Zusätzlich kann der *cantilever* noch mit einem Piezoelement in alle drei Raumrichtungen positioniert werden (Abb. 2 b). Veränderungen in der Topologie führen zu unterschiedlichen Wechselwirkungen der Spitze mit der Probe. Die örtlichen Spitzen/Proben-Interaktionen geben Anhaltspunkte über die Topographie der Probenoberfläche wieder. Mit ihnen lässt sich ein dreidimensionales Bild (Falschfarbenbild) erstellen.

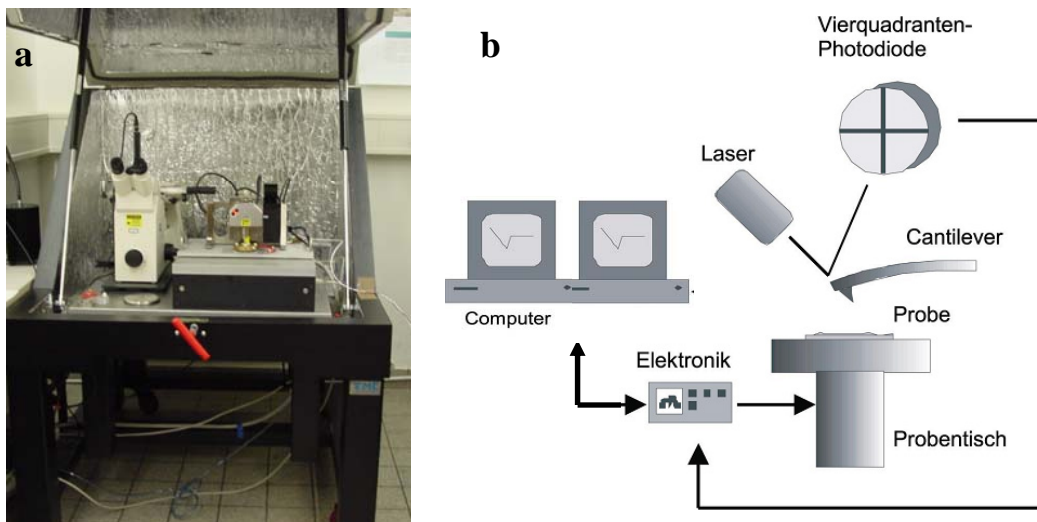


Abbildung 2.6 Raster-Kraft-Mikroskop. (a) Aufbau, (b) Schema.

Für die Messungen an Luft (hydrophiler Transfer) oder unter Wasser (hydrophober Transfer) wurden unterschiedliche *cantilever* verwendet, die sich in ihren Eigenschaften unterscheiden (Tab. 2.0).

Eigenschaften	Luft	Wasser
Bildpunkte	512·512	512·512
Betriebsmodus	<i>tapping mode</i>	<i>tapping mode</i>
Federkonstante	40 (20-70) N/m	0,12 mN/m
Resonanzfrequenz	300 ± 100 kHz	20 ± 6 kHz
Länge	125 ± 10 µm	196 -16 µm
Breite	30 ± 5 µm	41 ±8 µm
Dicke	4 ± 1 µm	0,6 (0,4-0,70) µm
Spitzenhöhe	17 ± 2 µm	2,5-3,5 µm

Tabelle 2.0: Eigenschaften der *cantilever* für SFM-Messungen unter Wasser und an Luft.

Im Rahmen dieser Arbeit sind sowohl die Untersuchungen der Cholesterol- bzw. POPE-Systeme an Luft als auch die Untersuchungen des hydrophoben Extraktes unter Wasser in *tapping mode* durchgeführt worden [24]. In diesem Betriebsmodus wird der *cantilever* durch ein Piezoelement im Bereich der Resonanzfrequenz des Tastarms zur Schwingung angeregt und an die Probenoberfläche angenähert. Durch attraktive oder repulsive Wechselwirkungen der Spitze mit der Probe widerfährt dem Oszillationsvorgang eine Veränderung der Schwingungsamplitude und -phase. Der *cantilever* wird, während er lateral über die Probenoberfläche geführt wird, in seinem Abstand zur Probenoberfläche derart reguliert, dass die Schwingungsamplitude konstant bleibt. Mit dem Regelsignal des z-Piezo wird aus der Amplitude die Topographie und aus der Phaseninformation ein Bild über die Beschaffenheit (Rauigkeit, Härte) der Oberfläche berechnet.

Im *tapping mode* besteht zwar Kontakt zur Probe, doch die Kontaktdauer ist sehr gering. Durch die Oszillation der Spitze treten keine Lateralkräfte entlang der Bewegungsrichtung auf. Durch den kurzen Kontakt Probe und Spitze verringert sich die Beschädigung weicher Proben, wodurch sich dieser Modus als besonders geeignet zur Abbildung von biologischen Proben herausgestellt hat (Abb. 2.7).

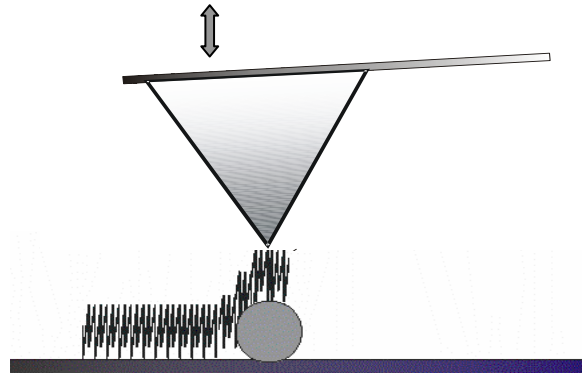


Abbildung 2.7 *tapping mode* (Zerstörungsfrei).

2.5 Statistische Analyse

Die Analyse der erhaltenen SFM und FM Aufnahmen ist nicht immer rein visuell ausführbar. Insbesondere die Interpretation der Fluoreszenzabbildungen ist problematisch, da die lokale Fluoreszenzintensität von verschiedenen Faktoren, wie lokaler Dichte der Sonde, Orientierung des Fluorophors oder von Interferenzen in der Strahlungsquelle abhängt.

Um trotzdem quantitative Aussagen über die Fluoreszenzintensität und Flächenverteilung der dunklen Domänen und hellen Bereiche zu erhalten wurden die Lipidfilme (DPPC/DPPG 80:20 mol %) und Lipid/Protein-Filme (DPPC/DPPG/SP-C 80:20:0,4 mol %) mit unterschiedlichen Anteilen an POPE und Cholesterol einer komplexen statistischen Auswertung unterworfen [25]. Durch Variation dieser Methode konnte zusätzlich die Flächenverteilung der Protrusions in den SFM-Abbildungen der Cholesterol- und POPE-Gemische analysiert werden.

2.5.1 FM-Abbildungen

Im Allgemeinen werden die Objekte bei Untersuchungen mit einem Fluoreszenzmikroskop nicht homogen von der Strahlungsquelle ausgeleuchtet. Um die inhomogene Ausleuchtung zu kompensieren, wurden die Fluoreszenzintensitäten $I_{xy, roh}$ der erhaltenen Abbildungen, die mit einer Auflösung von $256 \cdot 255$ Pixel, $254 \cdot 254$ dots

per inch (dpi) und einer Farbtiefe von 8 bits per pixel (bpp) digital gespeichert vorlagen mit einem Computerprogramm korrigiert. (Parabolische Korrektur, Gl. 4).

$$I_{xy} = I_{xy,raw} - M_x(x - x_0)^2 - M_y(y - y_0)^2 \quad (Gl. 4)$$

M_x , M_y , x_0 , y_0 stellen die ermittelten Parameter dar. x_0 und y_0 beschreiben die Lage des Maximums, während M_x , M_y die Inhomogenität der Ausleuchtung wiedergibt.

Der nächste Schritt der Auswertung war die Ermittlung der Intensitätsverteilung in Form eines Histogramms. Dazu wurden allen diskreten Werte der Fluoreszenzintensität I ein Grauwert zugeordnet und die relative Häufigkeit N_I/N ermittelt. Hierbei repräsentiert N die Gesamtzahl der Elemente, während N_I die Anzahl der Elemente mit einem definierten Grauwert beschreibt.

Das Histogramm in Abbildung 2.8 zeigt exemplarisch, dass sich dieses aus zwei Bereichen unterschiedlicher Fluoreszenzintensität zusammensetzt. Die dunklen Domänen (d) der l_c Phase zeigen eine Bande mit niedrigen Grauwerten, die hellen Domänen (b) der l_e Phase eine Bande mit hohen Grauwerten. Die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten lässt sich mit der Summe aus zwei Gauss-Funktionen anpassen. Mit dieser angepassten Funktion wurden die Mittelwerte der Intensitäten \bar{I}_d und \bar{I}_b sowie die Flächen A_d und A_b bestimmt [25].

$$\frac{N(I)}{N_t} = \frac{1 - A_b^*}{\sigma_d \sqrt{\pi}} \exp\left\{-\frac{(I - \bar{I}_d)^2}{\sigma_d^2}\right\} + \frac{A_b^*}{\sigma_b \sqrt{\pi}} \exp\left\{-\frac{(I - \bar{I}_b)^2}{\sigma_b^2}\right\} \quad (Gl. 5)$$

A_d^* und A_b^* sind die relativen Flächen der hellen bzw. dunklen Bereiche, während σ_d und σ_b die Breite der jeweiligen Verteilung präsentiert (Gl. 5).

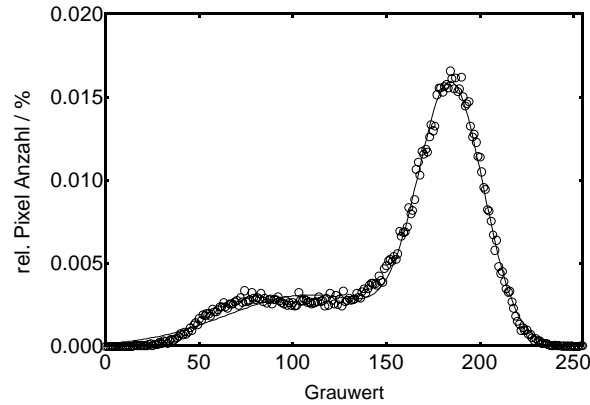


Abbildung 2.8 Exemplarische Darstellung der Anpassung zweier Gauss-Funktionen an die Originaldaten zur Bestimmung der Parameter A_d , A_b , I_d und I_b .

2.5.2 SFM-Abbildungen

Für die Auswertung der SFM-Bilder wurden diese in $256 \cdot 255$ Pixel, $254 \cdot 254$ dpi und 8 bpp umgewandelt. Zusätzlich wurde die Farbskalierung auf Graustufen reduziert. Im Gegensatz zu dem Erscheinungsbild im Zweiphasengebiet der FM war eine Anpassung der Histogramme aus den SFM-Abbildungen mit einer Summe aus zwei Gauss-Funktionen nicht möglich. Die Verteilung der I_e Bereiche bzw. Protrusions ist unsymmetrisch und gleicht eher einer Poisson-Verteilung. Um dennoch Informationen über die Flächenverteilung der Protrusions erhalten zu können, wurden auch hier die Intensitäten der dunklen/hellen Domänen \bar{I}_d , \bar{I}_b sowie deren relativen Flächen A_d^* , A_b^* nach folgender Methodik bestimmt:

Zunächst wurde eine Intensität I_{limit} innerhalb des Histogramms festgelegt, die gerade noch einer Gauss-Verteilung der dunklen Domänen zugeordnet werden kann. An diesem Punkt wurde eine Gauss-Funktion angepasst und somit die mittlere Intensität \bar{I}_d und die relative Flächen A_d^* , A_b^* ($A_b^* = 1 - A_d^*$) erhalten. Anschließend wurde dann die Funktion von dem Histogramm subtrahiert, woraus sich die mittlere Intensität der hellen Domänen \bar{I}_b berechnen lässt.

$$\bar{I}_b = \frac{\sum_{I > I_{\text{limit}}} N_b I}{\sum_{I > I_{\text{limit}}} N_b} \quad (\text{Gl. 6})$$

N_b stellt die Anzahl der Pixel der hellen Domänen mit der Fluoreszenzintensität I dar. Zur Überprüfung der Werte wurde I_{limit} innerhalb geringer Intervalle variiert. Es zeigten sich jedoch durch die Variation keine signifikanten Änderungen in den berechneten Parametern.

Zur Bestimmung der Protrusionsgröße wurde das Programm CorelDRAW verwendet. Indem alle Pixel mit gleicher Farbe zusammengefasst wurden, konnten die Strukturen mit einer unterschiedlichen Grauskalierung von mehr als 50 Pixeln summiert werden. Hierdurch konnten Protrusions bestimmt werden, die aus einer Vielzahl an unterschiedlichen Graufärbungen aufgebaut sind.

Teil II

Ergebnisse und Diskussion

3. *In vitro* Modell: Einfluss von Cholesterol & POPE

3.1 Einleitung

Es wurde der Einfluss von Cholesterol und 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin (POPE) auf die Morphologie des binären Lipidgemisches 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholin (DPPC)/ 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylglycerol (DPPG) (80:20 mol %) und des ternären Lipid/Protein-Gemisches (80:20:0,4 mol %), als Modell des Lungensurfactant, bei verschiedenen Oberflächendrücken untersucht. Basierend auf den Ergebnissen der Filmwaageuntersuchungen, Fluoreszenz-Mikroskopie (FM) und Raster-Kraft-Mikroskopie (eng. *Scanning Force-Microscopy*, SFM), entstand ein neues Modell, welches die Wechselwirkung von Cholesterol und POPE innerhalb der Multischichten bei hohem Oberflächendruck mit der Phospholipidumgebung beschreibt.

Zusätzlich sollten die Ergebnisse verwendet werden, um Rückschlüsse auf die Funktion innerhalb des natürlichen Surfactant ziehen zu können. Die Interpretation der Ergebnisse des natürlichen Surfactant aus den genetisch veränderten Mäusen im Vergleich zu den wildtyp (*wt*) Mäusen sollte hierdurch unterstützt werden.

3.2 Filmwaageuntersuchungen an der Wasser/Luft-Grenzfläche

In Abb. 3.0 sind die Isothermen der verschiedenen Cholesterol- und POPE-haltigen Systeme dargestellt, wobei in Teil **a** und **c** diejenigen des binären Lipidgemisches DPPC/DPPG und in Teil **b** und **d** die des ternären Lipid/Protein-Gemisches DPPC/DPPG/Surfactant Protein (SP)-C gezeigt werden. Die Abszissen sind auf den Gesamtlipidgehalt, also DPPC, DPPG und Cholesterol bzw. POPE normiert.

3.2.1 Isothermen der Cholesterolgemische

Bei der Betrachtung der Isothermen wird deutlich, dass mit steigendem Cholesterolgehalt eine Verschiebung zu kleineren molekularen Flächen zu beobachten ist. Die Isothermen der SP-C-haltigen Gemische (Abb. 3.0 **ab**) zeigen das für das Protein typische Plateau bei ~ 50 mN/m und ein Plateau bei ~ 5 mN/m, welches auf die flüssig expandierte (eng. *liquid expanded*, l_e)/flüssig kondensierte (eng. *liquid condensed*, l_c) Phasenumwandlung des Lipidgemisches zurückzuführen ist. Dieses ist jedoch bei hoher Cholesterolkonzentration nicht mehr zu erkennen, wohingegen das SP-C-Plateau durch die Cholesterolzugabe unverändert bleibt. Die Isothermen der Lipid/Protein-Gemische mit höheren Cholesterolgehalten besitzen als weiteres Charakteristikum einen abrupten Druckanstieg bei weiterer Kompression, welcher auf die Einlagerung von Cholesterol und damit auf die Kondensierung der Monoschicht zurückzuführen ist. Des Weiteren haben mehrmalige Kompressions- und Expansionszyklen gezeigt, dass die Multischichten, welche für das Proteinplateau kennzeichnend sind, reversibel zurückgebildet werden.

3.2.2 Isothermen der POPE-Gemische

Die Isothermen des DPPC/DPPG-Gemisches und des Modellsystems des Lungensurfactant DPPC/DPPG/SP-C mit variablem Gehalt an POPE sind in Abb. 3.0 **c** und **d** zusammengefasst. Die Isothermen zeigen, dass mit steigendem POPE-Anteil die Kompressibilität des Oberflächenfilms bei niedrigen Oberflächendrücken (10 mN/m) abnimmt. Ein abrupter Anstieg des Oberflächendruckes, wie für Cholesterol gezeigt, ist auf Grund der erhöhten Fluidität nicht zu beobachten. Das Vorhandensein von SP-C führt wie bei den cholesterolhaltigen Lipid/Protein-Gemischen zur Ausbildung zweier Plateaus, eines bei ~ 50 mN/m und eines bei ~ 5 mN/m. Bei hoher POPE-Konzentrationen ist das Plateau bei niedrigen Oberflächendrücken nicht mehr zu erkennen, was auf den fluidisierenden Effekt der ungesättigten Fettsäureketten des POPE zurückzuführen ist. POPE erniedrigt also die Kompressibilität bei niedrigen Oberflächendrücken, das Cholesterol hingegen die Rigidität.

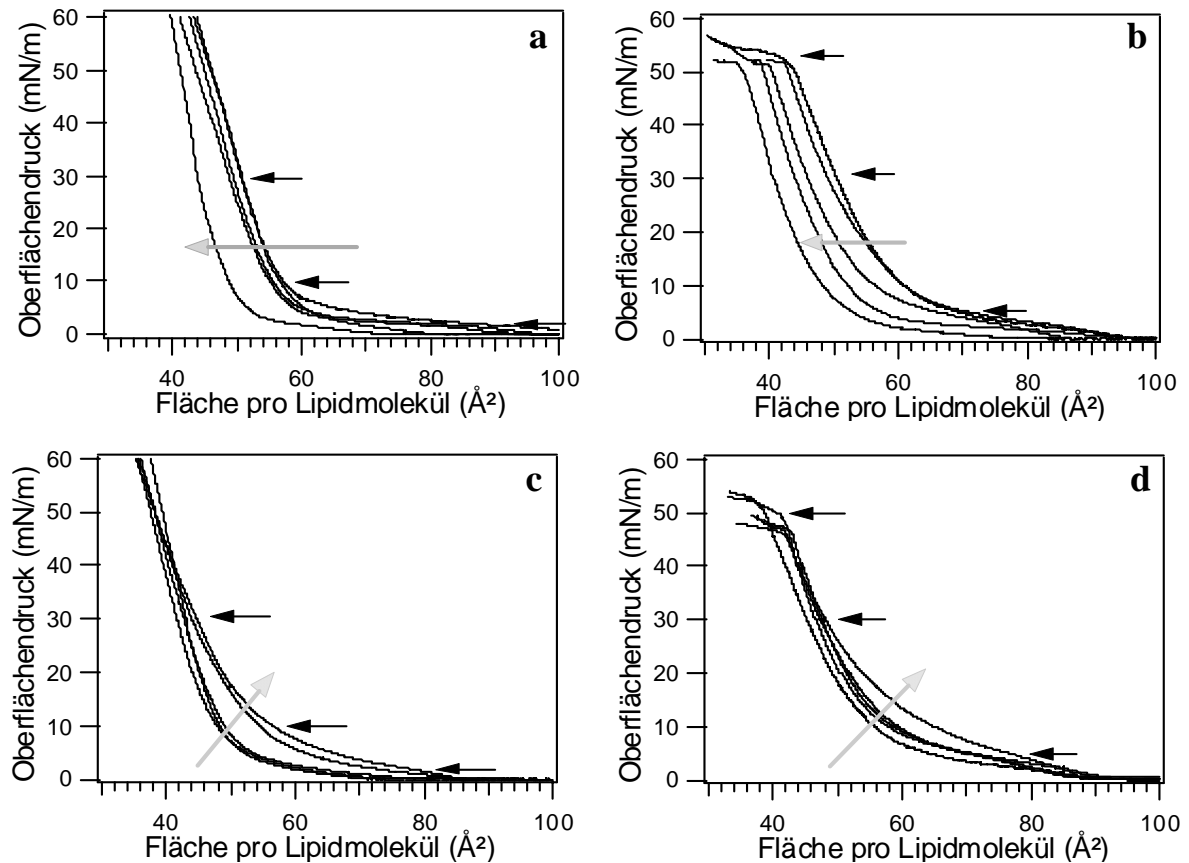


Abbildung 3.0 Isothermen der Cholesterol- und POPE-haltigen Lipid und Lipid/Protein-Filme. (a) DPPC/DPPG mit Cholesterol, (b) DPPC/DPPG/SP-C mit Cholesterol (c) DPPC/DPPG mit POPE (d) DPPC/DPPG/SP-C mit POPE. Die grauen Pfeile präsentieren die aufsteigenden Konzentrationen des Cholesterols und POPE (0, 1, 5, 10 und 30 mol %), während die schwarzen Pfeile die verwendeten Drücke, bei denen die Fluoreszenz-Mikroskopie (FM) durchgeführt worden ist, darstellen.

3.3 FM an Cholesterol- und POPE-haltigen Filmen

In Abb. 3.1 und 3.2 sind die FM-Aufnahmen der verschiedenen Cholesterol/POPE-haltigen Systeme zu sehen. Die linken Abbildungen zeigen diejenigen des binären Lipidgemisches DPPC/DPPG und die rechten Abbildungen die des Modellsystems des Lungensurfactant.

3.3.1 Cholesterol

DPPC/DPPG zeigt nierenförmige Domänen, welche mit steigendem Oberflächendruck einen zusammenhängenden l_c Bereich ausbilden (Abb. 3.1 **aei**). Die Zugabe von Cholesterol führt zu kleineren runden l_c Domänen und zur Vergrößerung der Fläche des l_c Bereiches (Abb. 3.1 **abcd**). Bei hohem Oberflächendruck nimmt der Anteil an l_c Bereichen mit steigendem Cholesterolgehalt zu (Abb. 3.1 **ijkl**). Dieses Verhalten steht mit der Einlagerung von Cholesterol in die Phospholipidschicht in Übereinstimmung, da diese zu einer Fluidisierung führt, die ihrerseits das *squeeze out* der Fluoreszenzsonde verhindert. Die Bilder der FM des Modellsystems DPPC/DPPG/SP-C zeigen kleine runde l_c Domänen, welche, wie bei dem DPPC/DPPG-System, bei hohen Drücken nahezu die komplette Oberfläche bedecken (Abb. 3.1 **mqu**). Die Zugabe von Cholesterol führt zu einer Verkleinerung der Domänen bei niedrigen Drücken und gleichzeitiger Zunahme der Gesamtfläche heller Bereiche (Abb. 3.1 **mnop**). Außerdem sind die l_c Domänen bei hohen Cholesterolanteilen und hohen Oberflächendrücken nicht mehr zu erkennen.

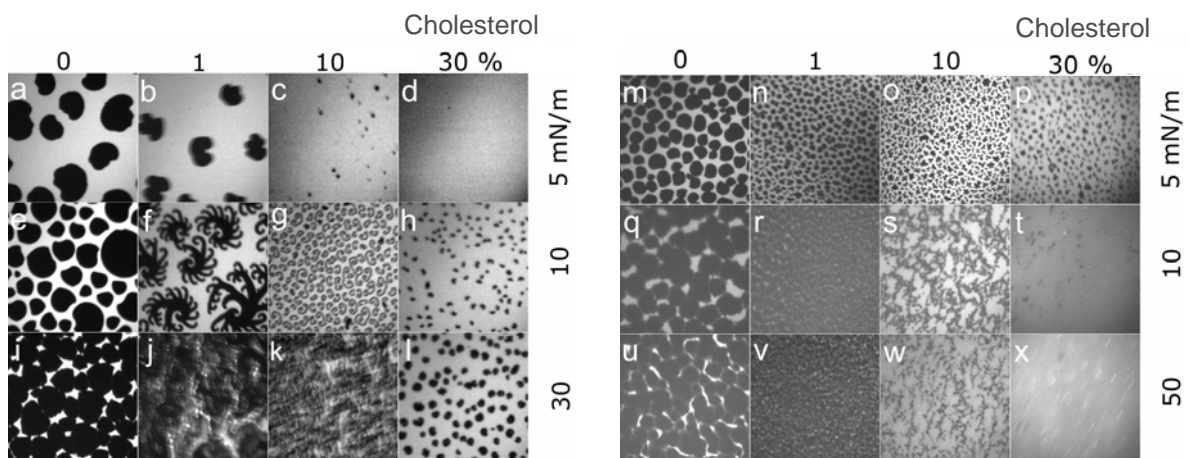


Abbildung 3.1 FM-Bilder eines **(a-l)** Lipid/Cholesterol-Gemisches und **(m-x)** Lipid/Protein/Cholesterol-Gemisches. Die Spalten **(a-d)** und **(m-p)** geben die aufsteigenden Konzentrationen des Cholesterols wieder. Die Zeilen repräsentieren die Oberflächendrücke.

3.3.2 POPE

Wie in Abbildung 3.2 gezeigt, ist die Zugabe von POPE mit einer Abnahme und Verkleinerung der Anzahl an dunklen l_c Domänen verbunden (Abb. 3.2 **abc**). Der fluidisierende Einfluss, der schon bei den Filmwaagemessungen beobachtet wurde, ist

an der zunehmenden Fläche der l_e Phase zu erkennen. Bei hohen Oberflächendrücken und POPE-Konzentrationen ist die Ausbildung großer l_c Domänen zu erkennen, die von hellen l_e Bereichen umgeben sind (Abb. 3.2 **hi**). Diese Domänen existieren jedoch nicht bei Konzentrationen unterhalb von 10 mol % POPE. Hier liegt dann ein aus fusionierten l_c Domänen gebildeter Bereich vor, der von einzelnen kleinen hellen l_e Domänen unterbrochen ist (Abb. 3.2 **g**). Diese bei hohen Oberflächendrücken auftretenden hellen Domänen stellen wahrscheinlich eine l_e Phase mit hoher POPE-Konzentration dar, wobei die ungesättigte Fettsäuren der POPE-Moleküle die Einlagerung der Fluoreszenzsonde begünstigen. Die Zugabe von SP-C führt zu einer Ausbildung sehr kleiner l_c Domänen. Mit steigendem Oberflächendruck ist bei niedrigen POPE-Konzentrationen eine überwiegend dunkle l_c Phase erkennbar (Abb. 3.2 **p**). Bei hoher POPE-Konzentration nimmt jedoch der Anteil an hellen l_e Domänen zu (Abb. 3.2 **qr**). Eine klare Phasentrennung l_c/l_e bleibt erhalten. Dies deutet darauf hin, dass die Domänen aus Lipiden mit gesättigten Fettsäureketten bestehen, welche von POPE-Molekülen umgeben sind. Die POPE-Moleküle stabilisieren somit die Ränder der l_c Domänen. Die größer werdenden hellen l_e Domänen bestehen aus Bereichen mit hoher POPE-Konzentration, in welche die Fluoreszenzsonde eingelagert ist.

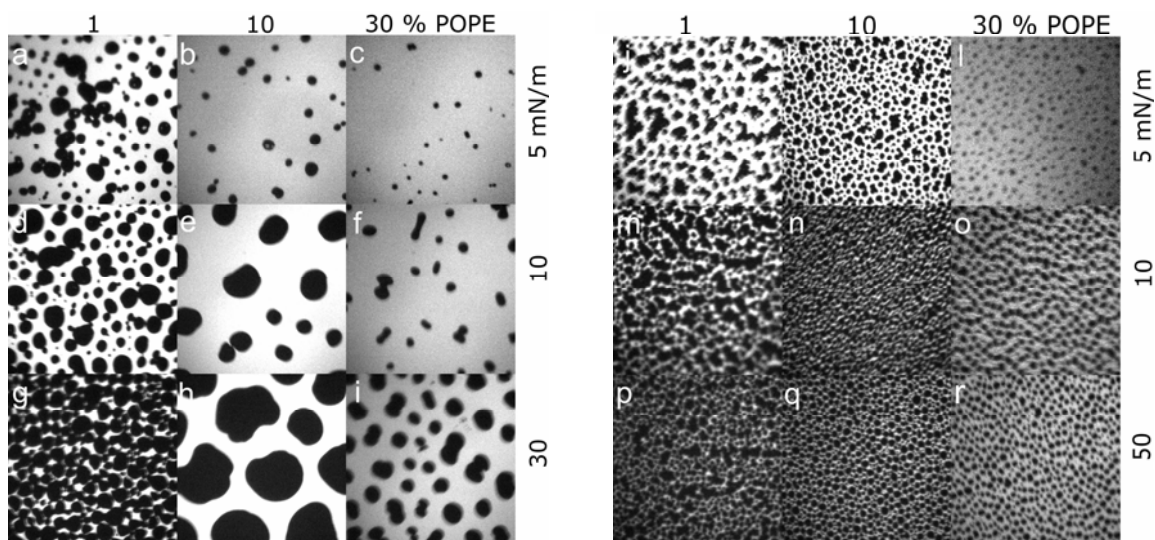


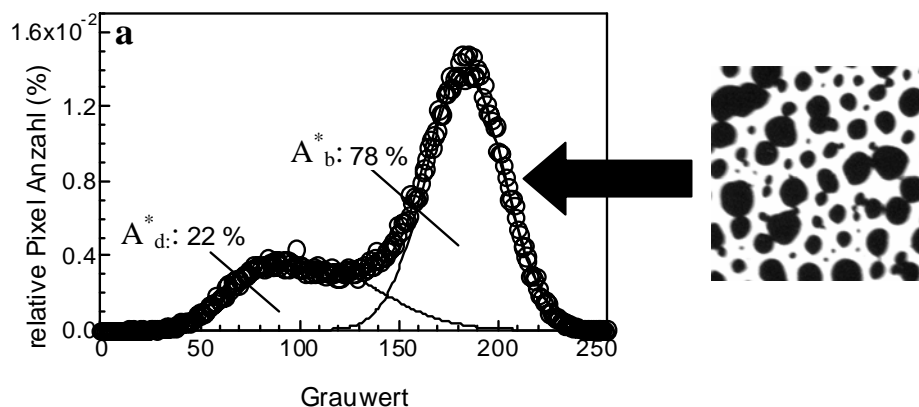
Abbildung 3.2 FM-Bilder eines (**a-l**) DPPC/DPPG/POPE-Gemisches und (**m-x**) DPPC/DPPG/SP-C/POPE-Gemisches. Die Spalten (**a-d**) und (**m-p**) geben die aufsteigenden Konzentrationen des POPE wieder. Die Zeilen repräsentieren die Oberflächendrücke.

3.3.3 Statistische Auswertung der FM-Bilder

Der rein visuelle Eindruck der FM-Bilder wurde mittels statistischer Auswertung quantifiziert. Die Histogramme der Aufnahmen zeigen Gauß-Verteilungen um helle bzw. dunkle Grauwerte. Die durchgezogene Linie stellt die Anpassung dieser Werte an die Summe zweier Gauß-Funktionen dar (Glg. 5), wobei der Schnittpunkt beider Gauß-Funktionen die jeweilige Grenze zwischen hellen und dunklen Bereichen repräsentiert. Die Integration der beiden Gauß-Funktionen stellt die Gesamtfläche der dunklen bzw. hellen Domänen dar.

Der Monolayer DPPC/DPPG/SP-C/POPE (80:20:0,4:1 mol %) bei einem Oberflächendruck von 5 mN/m führt zu einem Verhältnis von hellen zu dunklen Domänen $A_b^* : A_d^*$ von 62:38 (Abb. 3.3 a). Diese Auswertung wurde für Drücke von 5 mN/m für DPPC/DPPG und DPPC/DPPG/SP-C-Systeme mit unterschiedlichen Mengen an Cholesterol bzw. POPE durchgeführt, um die Entwicklung der Flächenverhältnisse quantifizieren zu können.

Mit zunehmender Menge an Cholesterol steigt der Prozentsatz heller Bereiche im proteinfreien System von 41 % auf 90 %. Dagegen führt die Zugabe von POPE zu einer Veränderung der Gesamtfläche heller Domänen von 48 % auf bis zu 79 % (Abb. 3.3 b). Die Auswertung der Bilder des proteinhaltigen Modellsystems des Surfactant zeigt, dass eine Zugabe von Cholesterol zu einer Veränderung von 22 % auf 62 % führt. Die Zugabe von POPE resultiert nur eine Zunahme der l_e Domänen von 51 % auf 60 % (Abb. 3.3 c). Das aus der visuellen Auswertung erhaltene Ergebnis konnte also bestätigt und quantifiziert werden.



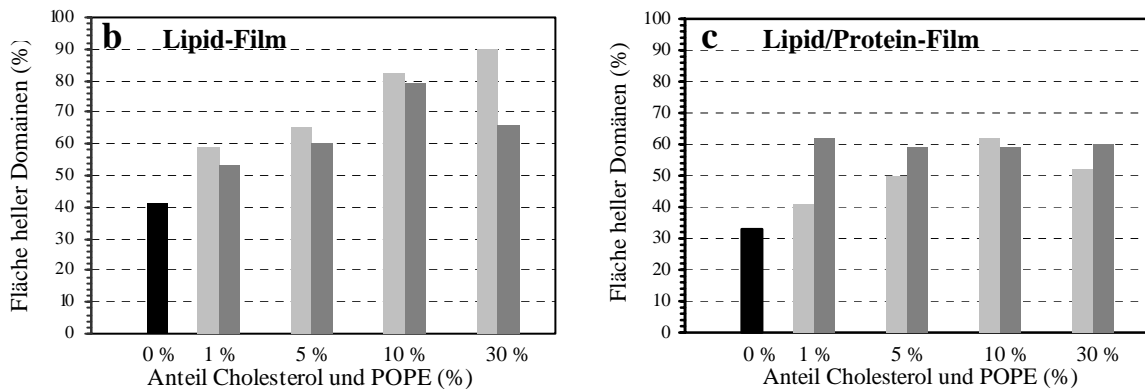


Abbildung 3.3 Statistische Auswertung zur Bestimmung der Veränderungen der relativen Anteile an hellen Domänen durch den Einfluss von Cholesterol und POPE. (a) Exemplarische Darstellung der Histogramm- Auswertung (Erläuterung siehe Text). (b) und (c) zeigen unterschiedliche Konzentrationen des Cholesterols bzw. POPE mit den jeweiligen Anteilen der hellen Domänen. schwarz = Surfactant-Modellsystem, grau = POPE, hell grau = Cholesterol

3.4 Raster-Kraft-Mikroskopie (SFM) an Cholesterol- und POPE-haltigen Filmen

Die in Abbildung 20 gezeigten $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ großen Ausschnitte geben die Topographie der verschiedenen Lipid/Protein-Gemische im Bereich des jeweiligen Plateaus wieder ($\sim 50 \text{ mN/m}$). Das Modellsystem DPPC/DPPG/SP-C bildet wie in Abb. 3.4 a zu sehen längliche Filamente aus, die aus kleineren Substrukturen bestehen.

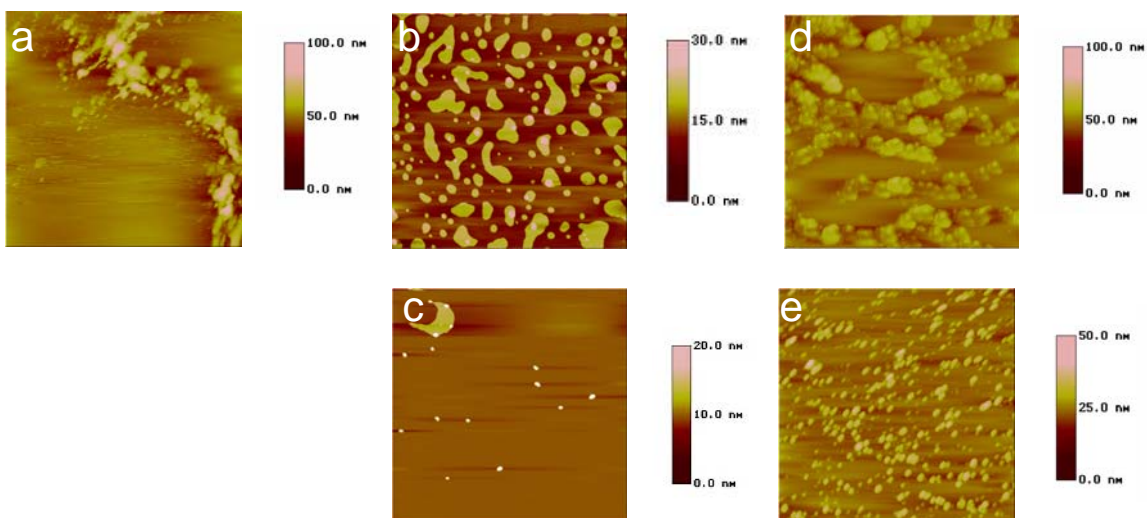


Abbildung 3.4 SFM-Aufnahmen des (a) kollabierten ternären Surfactant-Modellsystems mit (b) 10 mol %, (c) 30 mol % Cholesterol (d) 10 mol % und (e) 30 mol % POPE. Die Ausschnitte stellen eine Fläche von $25 \mu\text{m}^2$ dar.

Bei Betrachtung der Bilder für die Systeme mit Anteilen von 10 % und 30 % Cholesterol ist zu erkennen, dass bei niedrigem Cholesterolgehalt (Abb. 3.4 **b**) viele Protrusions verschiedener Größe auftreten, dass aber bei hoher Konzentration diese Vielfalt verloren geht (Abb. 3.4 **c**). In diesem Konzentrationsbereich sind nur noch zwei Arten von Domänen zu finden, zum einen sehr große, die weitere Protrusions beinhalten, aber auch sehr kleine. Beide besitzen eine halbmondförmige Struktur (Abb. 3.4 **c**). Die SFM-Bilder mit unterschiedlicher Cholesterolkonzentration führen zu der Aussage, dass die vielen Protrusions unterschiedlichster Größe bei Cholesterolgehalten von 10 % auf Grund der erhöhten Rigidität bei 30 % nicht mehr vorhanden sind. Induziert durch das Cholesterol, liegt das Protein/Lipid-Gemisch hauptsächlich als Monofilm vor.

Die Oberflächenstrukturen der POPE-haltigen Filme sind analog zum Modellsystem aus größeren Filamenten aufgebaut. Jedoch sind die Filamente des POPE-haltigen Systems mit 10 mol % immer wieder unterbrochen (Abb. 3.4 **d**). Mit steigendem POPE-Anteil ist eine Verringerung der Größe mit steigender Anzahl der einzelnen Protrusions sichtbar, was bedeutet, dass POPE die Randbereiche der Protrusions stabilisiert und ihre Bildung fördert (Abb. 3.4 **e**).

Die Höhenanalyse stellt den Einfluss des Cholesterols und POPE auf die Topologie der Multischichten im Plateau-Bereich dar (Abb. 3.5) und zeigt, dass im Modellsystem Protrusions bis zu einer Höhe von 30 nm generiert werden. Basierend auf der Höhe einer Lipiddoppelschicht von 6 nm zeigen die Protrusions der Cholesterol- und POPE-Systeme eine unterschiedliche Anzahl an Lipiddoppelschichten. Im Vergleich zum Modellsystem reduziert Cholesterol sowohl bei Gehalten von 10 mol % als auch von 30 mol % die Höhe der Protrusions.

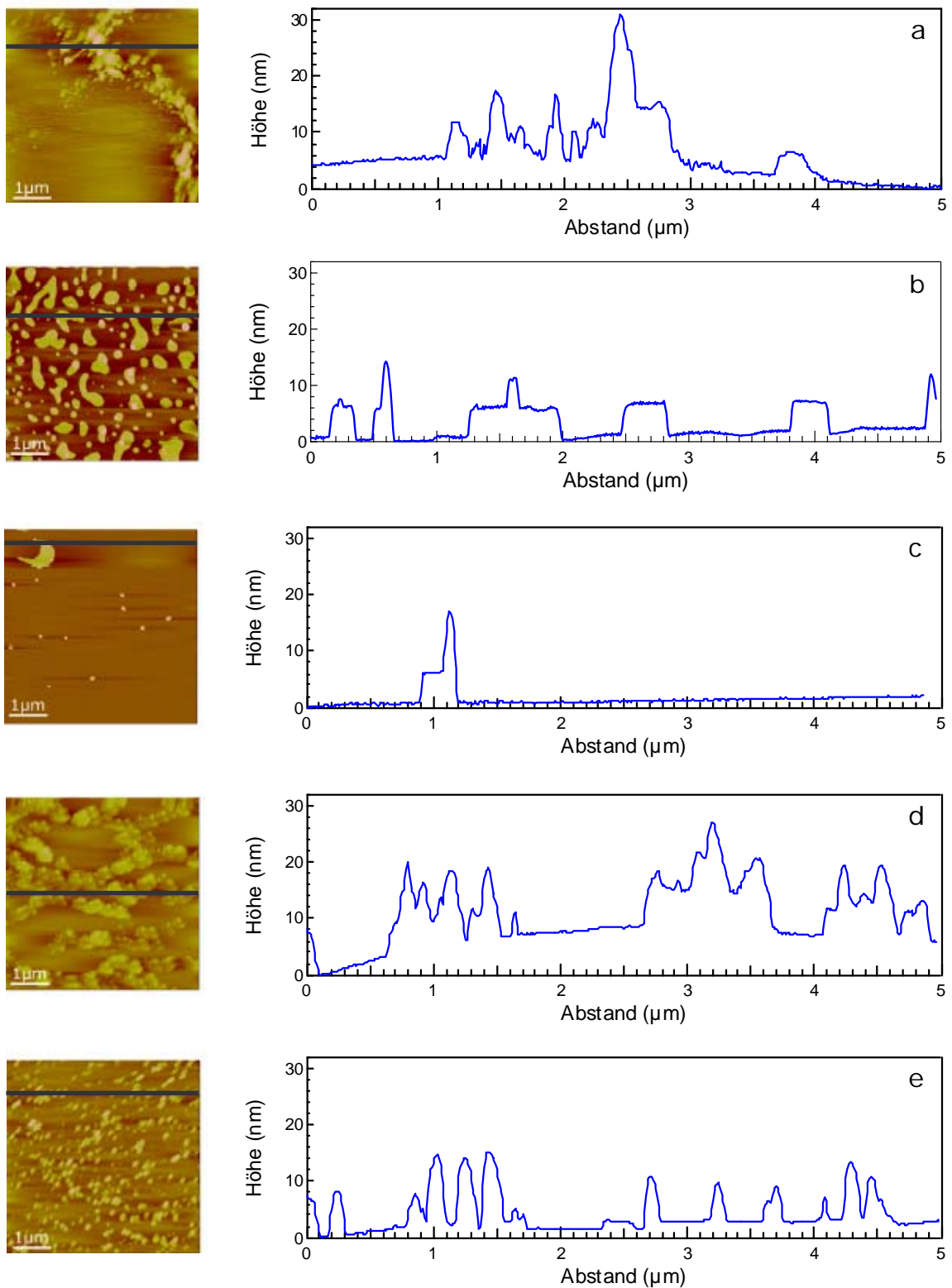


Abbildung 3.5 Exemplarische Darstellung der Höhenprofile des (a) Modellsystems mit (b) 10 mol % und (c) 30 mol % Cholesterol. Die Aufnahmen (d) und (e) präsentieren 10 und 30 mol % POPE.

Die Auswertung der Höhenanalyse des POPE-Systems zeigt Höhen bis zu 18 nm, die weniger häufig auch bei Filmen mit 30 mol % POPE zu sehen sind (Tab. 3.0). Der Einfluss von POPE auf den Umfang der Protrusions ist sehr viel größer als auf ihre Höhe (Abb. 3.5 e).

Systeme	Flächenanteil der Protrusions (%)	Anzahl der Lipiddoppelschichten in den Protrusions
DPPC/DPPG/SP-C (80:20:0,4 mol %)	20	6 (1), 12 (2), 18 (3), 24 (4)
DPPC/DPPG/SP-C/Cholesterol (80:20:0,4:10 mol %)	27	6 (1), 12 (2)
DPPC/DPPG/SP-C/Cholesterol (80:20:0,4:30 mol %)	5	6 (1), 12 (2)
DPPC/DPPG/SP-C/POPE (80:20:0,4:10 mol %)	23	6 (1), 12 (2), 18 (3)
DPPC/DPPG/SP-C/POPE (80:20:0,4:30 mol %)	23	6 (1), 12 (2), 18 (3)

Tabelle. 3.0 Flächenverteilung und Lipiddoppelschichten innerhalb der Protrusions. In Klammern sind die Anzahl der einzelnen Stufenhöhen angegeben.

Der Anteil der Fläche der Protrusions an der Gesamtoberfläche wurde wie im Kapitel 2.5.2 bestimmt (Abb. 3.6). Das Modellsystem zeigt einen Anteil an Ausstülpungen von ~20 %, und das POPE-System einen ähnlichen Anteil von ~23 %. Gravierender ist der Unterschied bei Betrachtung des cholesterolhaltigen Systems mit ~27 % Protrusions bei einem Gehalt von 10 mol % und ~5 % bei 30 mol % Cholesterol (Tab. 3.0). Bei einem Gehalt von 10 mol % Cholesterol ist die Tendenz zu einem größeren Bedeckungsgrad an Protrusions konform zu der getroffenen Aussage, dass Cholesterol Lipiddoppelschichten stabilisiert.

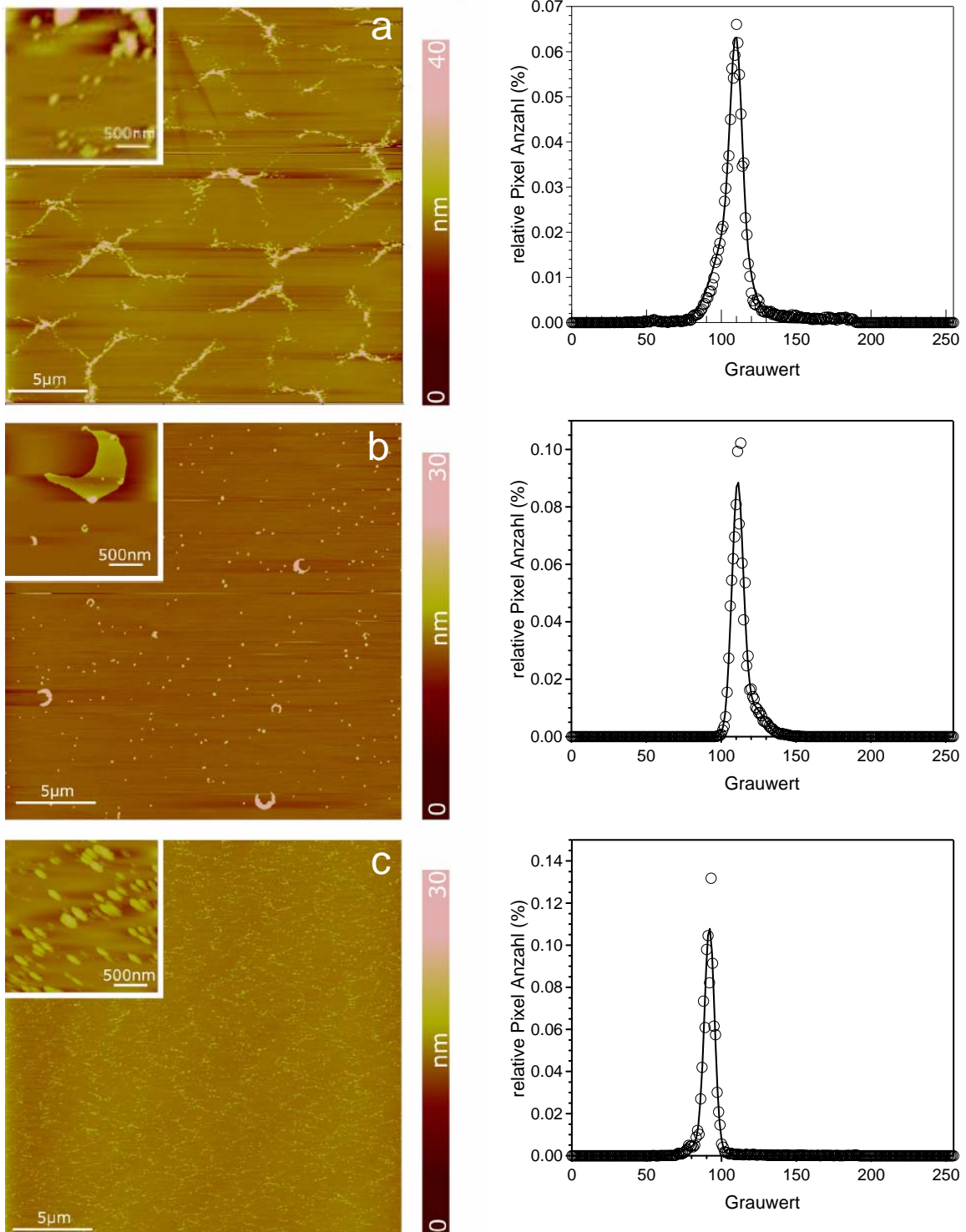


Abbildung 3.6 SFM-Abbildungen (a) des Modellsystems mit (b) 30 mol % Cholesterol und (c) 30 mol % POPE. Die entsprechenden Histogramme stellen die Anpassung der Daten bis zur Intensität I_{limit} durch eine Gauss-Funktion dar. Die Bilder stellen Flächen von $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ dar, wobei die *Inserts* eine Fläche von $4 \mu\text{m}^2$ besitzen.

3.5 Diskussion und Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war die Untersuchung des Einflusses von Cholesterol und POPE auf das Lipidsystem DPPC/DPPG und das Modellsystem des Lungensurfactant DPPC/DPPG/SP-C (80:20:0,4 mol %). Die Ergebnisse erweitern das in unseren Arbeitskreis etablierte Protrusion-Modell [1-3] und geben Aufschluss über die Funktion der *minor components* und des Cholesterols während des Atmungszyklusses.

Wie die Filmwaage-Experimente gezeigt haben, ist bei der Zugabe von Cholesterol zu den verschiedenen Lipid bzw. Lipid/Protein-Gemischen eine Verschiebung zu kleineren molekularen Flächen zu beobachten, wenn die Abszisse auf den Gesamtlipidgehalt, also auf DPPC, DPPG und Cholesterol, normiert ist. Der ausschließliche Bezug der Fläche auf die Phospholipide hat nur geringen Einfluss auf die Verschiebung der Isothermen von Cholesterolgemischen unterschiedlicher Konzentration. Dies bedeutet, dass Cholesterol keine den Phospholipiden vergleichbare Rolle spielt, sondern im Gegenteil bei Vorhandensein von Phospholipiden mit deren Fettsäureketten wechselwirkt. Die Verschiebung zu kleineren Flächen bedeutet also, dass Cholesterol sich in die Fettsäureketten der Phospholipide einlagert und somit einen geringeren Platzbedarf hat, als für ein Phospholipid angenommen. Dieses Verhalten ist sowohl für DPPC/Cholesterol [4], DLPC/Cholesterol [5] als auch für Protein-enthaltende Monolayer [6] beobachtet und ähnlich interpretiert worden.

Dem Cholesterol wird ein kondensierender Effekt zugeschrieben, der bei Konzentrationen um 30 mol % zu Isothermen führt, die große Analogie mit denen des reinen Cholesterols besitzen. Höhere Konzentrationen an Cholesterol führen dazu, dass eine Trennung von Phospholipiden und Cholesterol auftritt. Eine einheitliche Mischung ist nicht mehr zu beobachten [4].

Die Zugabe geringer Mengen Protein führte wie in der Literatur gezeigt nur zu geringfügigen Änderungen der Isotherme [6]. Dies trifft auch insofern zu, dass DPPC/DPPG/SP-C sich im unteren Druckbereich ähnlich dem reinen Lipidsystem verhält und ebenfalls die Verschiebung zu kleineren molekularen Flächen bei steigendem Cholesterolgehalt aufweist. Im Druckbereich um 50 mN/m induziert SP-C das reversible Herausdrücken von Lipiden aus der Monoschicht, welches sich in der

Ausbildung eines Plateaus manifestiert [2]. Diese Eigenschaft wird auch durch einen hohen Cholesterolgehalt nicht beeinträchtigt, denn bei jeder verwandten Cholesterolkonzentration war bei wiederholter Kompression und Expansion kein signifikanter Substanzverlust zu beobachten. Außerdem ist mit steigendem Cholesterolgehalt der Übergang zwischen l_e und l_c Phase durch die Einlagerung des Cholesterols in die Alkylketten der Phospholipide nicht mehr zu beobachten. Der Phasenübergang, der sich durch die Neuausrichtung der Alkylketten kennzeichnet, wird also durch das Cholesterol gestört.

Die für POPE-haltige Systeme erhaltenen Isothermen zeichnen sich durch eine reduzierte Kompressibilität bei niedrigen Oberflächendrücken aus. Diese erhöhte laterale Mobilität, induziert durch POPE, wurde am Excimer/Monomer-Verhältnis gezeigt. Der schrittweise Ersatz von POPC durch POPE führt zu einer Erhöhung der lateralen Mobilität innerhalb von binären Mischungen [7]. Dabei ist nicht nur die Kopfgruppe entscheidend für den Einfluss des Lipids auf einen Monolayer, sondern auch die Beschaffenheit der Fettsäureketten spielt eine große Rolle [8]. 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin (DPPE)-, 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin (DOPE)- und POPE-Monolayer zeigen eine Verschiebung zu größeren Flächen pro Molekül, wobei die gesättigten Palmitoylketten des DPPE zu einer geringeren Fluidität führen als die ungesättigten Oleoylketten des DOPE. Eine Kombination aus ungesättigten und gesättigten Fettsäureketten, wie sie in POPE vorliegt, führt zur größten Fluidität im Vergleich der drei Lipide untereinander. Auch Mischungen aus DPPE und DOPE zeigten innerhalb dieser Studie eine erhöhte Fluidität vergleichbar mit der des POPE [8]. Diese Untersuchungen sind konform mit den Ergebnissen die für das System DPPC/DPPG und DPPC/DPPG/SP-C nach Zugabe von POPE erhalten wurden (Abb. 3.0 **cd**).

Bei Betrachtung der Fluoreszenzbilder des DPPC/DPPG-Gemisches bei verschiedenen Oberflächendrücken fällt auf, dass bei niedrigen Drücken große nierenförmige l_c Domänen innerhalb der l_e Phase vorliegen (Abb. 3.1 **a**), der Druckanstieg führt dann zu einer größeren Anzahl von Domänen, die eine größere Fläche in Anspruch nehmen. Bei Drücken über 20 mN/m (Abb. 3.1 **i**) ist nahezu die komplette Fläche mit dunklen Domänen bedeckt.

Die Fluoreszenzbilder der DPPC/DPPG-Monolayer mit höheren Gehalten an Cholesterol weisen einen größeren Anteil an l_c Bereichen auf. Die Ursache hierfür könnte bei niedrigen Drücken, in einem Aufbrechen der l_c Phasen durch das Cholesterol liegen. Dies führt dann dazu, dass die l_c Domänen kleiner werden. Mit steigendem Oberflächendruck wird bei allen Cholesterolkonzentrationen eine Vergrößerung der Fläche, die von dunklen Domänen bedeckt ist, beobachtet. Trotzdem führt die Erhöhung des Oberflächendrucks im Lipidgemisch mit 30 mol % Cholesterol nicht dazu, dass eine einheitliche l_c Phase wie im Cholesterol freien Lipidsystem auftritt. Dies kann so interpretiert werden, dass das Kondensieren der Phospholipide behindert wird und die Fluoreszenzsonde nicht aus diesen festen Monolayer gepresst wird.

Der Vergleich der Fluoreszenzbilder Cholesterolhaltiger DPPC/DPPG/SP-C Monolayer mit denen des Modellsystems zeigt wesentlich kleinere und rundere l_c Domänen. Sie bilden im Plateau-Bereich eine fast einheitliche dunkle Fläche aus, die von kleineren hellen l_c Bereichen unterbrochen wird. Diese l_c Bereiche wurden den Ausstülpungen, die mittels der SFM-Technik beobachtet wurden zugeordnet und stellen die aufgefalteten Lipiddoppelschichten dar, in die das Protein SP-C eingelagert ist [2]. Die hellen Domänen können zum einen durch die eigentliche Auffaltung, die zwangsläufig eine weniger dichte Packung der Fettsäureketten voraussetzt, verursacht werden. Aber auch durch eine Fluiditätserhöhung, die durch die Einlagerung des Proteins induziert wird kann hierfür ursächlich sein. Analog zum reinen Lipidsystem ist eine Vergrößerung der hellen l_c Bereiche bei niedrigen Oberflächendrücken bei steigendem Cholesterolgehalt zu erkennen. Ein zusätzlicher Effekt des SP-C ist also eine weitere Verkleinerung der einzelnen Domänen, aber auch der Verlust der Domänenstruktur bei hohen Cholesterolgehalten in hohen Druckbereichen. Bei einem Cholesterolgehalt von 30 mol % im Modellsystem ist nur noch eine einheitliche l_c Phase zu erkennen, die auch schon für 35 mol % beschrieben worden ist [5]. Diese homogene Mischung muss durch das Cholesterol in Kombination mit dem SP-C entstanden sein, da bei einem SP-C freien System weiterhin Domänen auftreten.

Die Fluoreszenzbilder der POPE-haltigen DPPC/DPPG-Monolayer zeigen, dass die Zugabe von POPE zu einer Verringerung der Anzahl sowie Verkleinerung der dunklen Domänen führt (Abb. 3.2 **abc**). Außerdem ist zu beobachten, dass hohe POPE-Anteile zu einer Phasenseparation bei hohen Oberflächendrücken führen. Diese Separation wird

nur marginal für Konzentrationen von 1 mol % und 5 mol % POPE beobachtet, ist aber für 10 mol % und 30 mol % deutlich zu erkennen (Abb. 3.2 **hi**). Die Ursache muss darin gesucht werden, dass eine viel größere Fläche durch POPE bedeckt ist. Die dunklen l_c Domänen enthalten Lipide, deren gesättigten Fettsäureketten parallel zueinander ausgerichtet sind. Diese dichte Aneinanderlagerung ist den unterschiedlichen Ketten des POPE nicht möglich, sie bilden eine l_e Phase aus. Weiterhin bedeutet dies, dass es zur Ausbildung von POPE-reichen Bereichen kommt. Bei niedrigen POPE-Konzentrationen lagern sich diese Moleküle vornehmlich am Rand der l_c Phase an, da dort die ungesättigten Fettsäureketten die geringste sterische Hinderung in Bezug auf die Kondensation der gesättigten Phospholipide darstellen. Hohe POPE-Konzentrationen führen jedoch dazu, dass die l_e Phase, die hauptsächlich aus POPE-Lipiden mit ungesättigten Fettsäureketten besteht, größer wird.

Im Modellsystem DPPC/DPPG/SP-C führt POPE schon in niedrigen Konzentrationen zu einer Verkleinerung der l_c Domänen (Abb. 3.2 **jkl**). Im Vergleich zum POPE freien Modellsystem ist zu erkennen, dass die dort beobachteten runden Domänen verloren gehen. Statt dessen werden durch Fusionsprozesse Domänen ausgebildet, die aus mehreren runden l_c Domänen aufgebaut sind. Die im Modellsystem bei hohen Oberflächendrücken auftretenden länglichen weißen l_e Bereiche treten im POPE-haltigen Systemen nicht auf. 10 und 30 mol % POPE im Modellsystem führen zu kleineren und einheitlicheren Domänen, die von hellen l_e Bereichen umgeben sind. Die Fläche der l_e Domänen wird analog zum Lipidsystem DPPC/DPPG mit steigendem POPE-Gehalt größer. Auch hier kann so argumentiert werden, dass die hellen l_e Domänen POPE-reich sind und dass es so der Fluoreszenzsonde möglich ist im Lipidlayer zu verbleiben. Das bedeutet, dass die im Plateau gezeigten hellen l_e Bereiche zwei Ursachen haben können: Zum einen, dass es sich um POPE-reiche Monolayer handelt, und zum anderen, dass diese hellen Bereiche aus Ausstülpungen des Monolayers zu Multilayern entstehen (Abb. 3.2 **pqr**). Innerhalb der Multischichten liegen die Fettsäureketten der Lipide weniger geordnet vor und begünstigen die Einlagerung der Fluoreszenzsonde.

Die innerhalb der Plateau-Region der Isotherme formierten Protrusions sind mit SFM-Technik abbildbar (Abb. 3.5 **a**). Im Modellsystem sind Höhen bis 24 nm gefunden worden, d.h. es liegen vier Doppelschichten übereinander gestapelt vor. Weiterhin ist

eine Fernordnung erkennbar. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass es längliche Bereiche von Protrusions gibt, welche sich innerhalb eines Lipidmonofilms in der l_c Phase befinden [2, 9]. Die Protrusions selber sind aus vielen unterschiedlich großen Substrukturen aufgebaut. Diese Substrukturen lassen sich als vornehmlich runde Ausstülpungen mit unterschiedlicher Höhe auffassen, die in ihrer Gesamtheit eine filamentartige Struktur aufbauen.

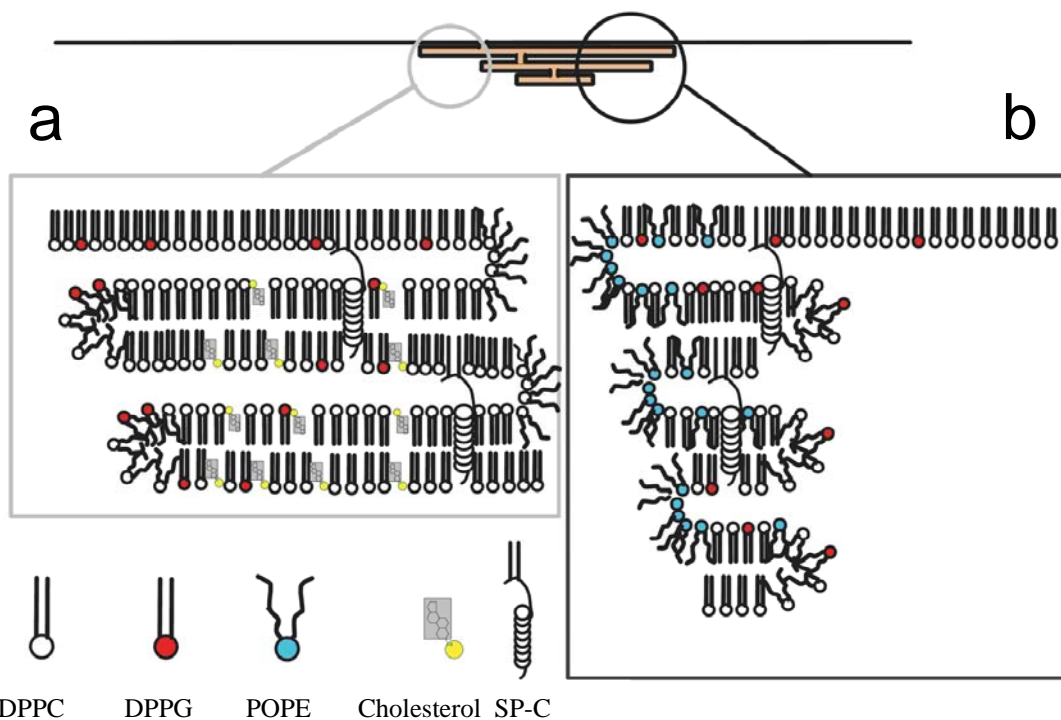


Abbildung 3.7 Modell des alveolaren Lungensurfactant: Einfluss von (a) Cholesterol und (b) POPE auf die Formierung der Protrusions.

Die SFM-Abbildungen des Modellsystems mit einem Gehalt an 10 mol % Cholesterol zeigen, dass es zu Ausbildung sehr vieler Protrusions mit einer maximalen Höhe von 18 nm kommt (Abb. 3.5 b). Es ist weiterhin erkennbar, dass die Protrusions in Gegenwart von Cholesterol eine größere Fläche besitzen. Dies ist ein Indiz dafür, dass Cholesterol einen positiven Beitrag auf die Bildung von Lipiddoppelschichten hat, indem es sich in diese einlagert und sie stabilisiert. Eine Fernordnung wie sie für das Modellsystem beobachtet wurde, ist aber nicht zu erkennen. Die Protrusions sind über die gesamte Fläche gleichmäßig verteilt. Die Einlagerung von Cholesterol führt zu einem Aufbrechen der geordneten DPPC-haltigen l_c Phase. Dies hat zur Folge, dass das

Protein, welches die Ausbildung der Protrusions begünstigt, sich gleichmäßig über die gesamte Fläche verteilt und so die Fernordnung, wie sie im Modellsystem zu erkennen ist, verloren geht (Abb. 3.6). Die Erhöhung der Konzentration auf 30 mol % Cholesterol innerhalb des DPPC/DPPG/SP-C-Films führt zu einer Störung der Bildung von Multischichten. Diese Störung kann einerseits durch die Bildung von Cholesterolkristallen, aber auch andererseits allein durch die große Anzahl an Cholesterolmolekülen erfolgen. Da jedes dritte Molekül Cholesterol ist, kann insbesondere die Bildung der mizellenartigen Randbereiche der Multischichten durch die hohe Anzahl an Cholesterolmolekülen gestört werden. Außerdem führt diese hohe Cholesterolkonzentration zu einer drastischen Erhöhung der Rigidität des Lipid/Protein-Films, die die Formierung der Multischichten verhindert. Der Anteil der Protrusions an der Gesamtoberfläche beträgt im Modellsystem ~20%, wohingegen der Anteil bei einem 10 mol % Cholesterol enthaltenden Film bei ~27% liegt. Die Tendenz zu einem größeren Bedeckungsgrad an Protrusions ist konform zu der Aussage, dass Cholesterol Lipiddoppelschichten stabilisiert und den Protrusionsdurchmesser vergrößert (Abb.3.7 a). Der beobachtete Anteil an Protrusions beim Modellsystem DPPC/DPPG/SP-C mit 30 mol % Cholesterol liegt weit unter den Erwartungen bei ~5%.

Die filamentartige Struktur, die für das reine Modellsystem DPPC/DPPG/SP-C gefunden wurde, ist auch bei der Zugabe von POPE erhalten geblieben (Abb. 3.5 d und 3.6 c). Bei Konzentrationen von 10 wie auch 30 mol % POPE ist weiterhin eine Fernordnung erkennbar ist, wobei die flachen l_c Domänen mit ansteigender POPE-Konzentration kleiner werden. Zusätzlich werden die einzelnen Protrusions bei steigendem POPE-Anteil deutlich kleiner, aber ihre Anzahl steigt, so dass die Gesamtfläche nahezu unverändert bleibt. Diese Verkleinerung der Protrusions mit steigendem POPE-Anteil lässt den Schluss zu, dass durch POPE gerade die Ränder der Protrusions stabilisiert werden, da Lipide mit ungesättigten Fettsäureketten und kleinen Kopfgruppen kleinere Radien besser ausbilden können. DPPC oder DPPG mit den gesättigten Palmitoylketten und der daraus resultierenden zylindrischen Struktur vermögen dies weniger gut. Das generelle Erscheinungsbild im Plateau eines DPPC/DPPG/SP-C Films mit 10 mol % POPE ist geprägt von wolkenartigen Ausstülpungen, die ihrerseits weitere Ausstülpungen besitzen, welche nicht zentral angesiedelt sind. Der wolkenartige Eindruck kommt dadurch zustande, dass die Protrusions meist mehrere weitere Protrusions ausbilden, und damit ein stärkere

dreidimensionale Struktur besitzen. Dieser Eindruck geht bei höherem POPE-Anteil von 30 mol % verloren, da die erste Ebene der Protrusions selbst schon einen geringeren Umfang aufweist, und ihrerseits durch weitere Protrusions erhöht ist, die fast die gleiche Fläche aufzeigen.

Der Einfluss von POPE auf die Höhe der Protrusion ist wesentlich weniger gravierend, als der auf den Umfang der Protrusions. So werden bei DPPC/DPPG/SP-C mit 10 mol % POPE Höhen bis zu 18 nm gefunden, wobei Höhen von 12 nm die Regel darstellen. Bei Gehalten von 30 mol % POPE sind Protrusions mit einer Höhe von 18 nm die Ausnahme. Die flächenmäßig kleineren Protrusions zeigen hier Höhen von 6 nm und die etwas größeren, besitzen weitere Protrusions, die zu einer Gesamthöhe von 12 nm beitragen. Die im Modellsystem abgebildeten Protrusions mit maximalen Höhen von 24 nm sind im POPE-haltigen System nicht nachgewiesen worden. Die Stabilisierung der Randbereiche führt somit zur Reduzierung der Protrusionfläche, hat jedoch keinen positiven Einfluss auf die Höhe der Multischichten. Die Ursache hierfür könnte sein, dass POPE auf Grund seiner Geometrie nur die inneren mizellartigen Randbereiche stabilisiert (Abb. 3.7 **b**). Die äußeren Randbereiche der Protrusions werden von den DPPC- und DPPG-Molekülen gebildet. Folglich ist die Stabilisierung der inneren Randbereiche durch POPE für eine signifikante Erhöhung der Protrusions nicht ausreichend.

Die Verringerung der Fläche der einzelnen Protrusions mit steigendem POPE-Anteil liegt darin begründet, dass die durchschnittliche Fläche der SP-C-reichen Bereiche mit steigendem POPE-Anteil abnimmt. Die Verringerung der Fläche der einzelnen hellen Bereiche im Plateau wird durch eine Stabilisierung der Grenze zwischen l_e und l_c durch POPE möglich, die ein höheres Verhältnis Umfang/Fläche begünstigt. POPE wirkt also am Rand der l_c Domänen als Tensid im Zweiphasengebiet l_c/l_e . Die Vergrößerung des Umfangs bei gegebener Fläche wird auch durch die Analyse der Gesamtfläche der Protrusions im Vergleich zum Modellsystem untermauert. Diese stellt dar, dass bei 30 mol % POPE eine Bedeckung von ~23% erhalten wird (Modellsystem ~20%).

Der unterschiedliche Einfluss von POPE auf die Höhe bzw. den Umfang der Protrusions kann auf zwei unterschiedliche Effekte zurückgeführt werden. Der erste rein zweidimensionale Effekt ist der, dass sich POPE auf Grund seiner chemischen Struktur bevorzugt in die Grenzfläche zwischen l_e und l_c Phase einlagert, was unabhängig vom herrschenden Oberflächendruck erfolgt.

Ein anderer dreidimensionaler Effekt ist die Stabilisierung der Randbereiche der Protrusions, durch die kegelförmige Struktur, welche auf Grund der ungesättigten Oleoylkette in Kombination mit der Palmitoylkette und kleiner Kopfgruppe des Lipids entsteht (Abb. 3.7 **b**). Das SP-C ordnet sich so an, dass die α -Helix innerhalb der neu gebildeten Lipiddoppelschicht inkooperiert, während die Palmitoylketten an der Luft-Wasser-Grenzfläche verbleiben. Lipide mit einer inversen Kegelstruktur wie z.B. POPE stabilisieren die inneren mizellartigen Randbereiche und reduzieren den Protrusionsdurchmesser.

4. *In vivo* Extrakt-Modell: Charakterisierung des Surfactant aus *d-ko* Mäusen

4.1 Einleitung

In Kapitel 3 wurde gezeigt, dass die Zugabe von geringen Mengen 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin (POPE) bzw. Cholesterol die Eigenschaften des Lungensurfactant Modellsystems 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholin (DPPC)/1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylglycerol (DPPG)/Surfactant Protein (SP)-C verändert. Dieses Kapitel soll die Fragestellung klären, ob biophysikalische Messungen geeignet sind, Veränderungen der Gesamtsurfactant-zusammensetzung anhand von Strukturveränderungen zu identifizieren. Hierzu wurden die hydrophoben Komponenten des Lungensurfactant von Mäusen, bei denen das epidermale (E)-Fettsäurebindungsprotein (FABP) und das Herz (H)-FABP durch Gendeletion ausgeschaltet wurde (doppel *knock-out* (*d-ko*) Mäuse), isoliert. Dieses Material wurde mit dem hydrophoben Extrakt aus wildtyp (*wt*) Mäusen verglichen. Die *d-ko* Mäuse weisen eine verminderte DPPC-Synthese innerhalb der Typ II Pneumozyten auf [1, 2]. Diese sind innerhalb der Lunge für die Lipidsynthese zuständig und damit für eine intakte Lungenfunktion mit verantwortlich.

4.2 Lipid/Protein-Verhältnisse

In vorausgegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Gendeletion in den *d-ko* Mäusen zu einer verminderten Phosphatidylcholin (PC)- und speziell DPPC-Synthese in isolierten Typ II Pneumozyten führt [1, 2]. Um zu überprüfen, ob dieser biochemische Phänotyp in einer veränderten Surfactantzusammensetzung resultiert, wurden die Lungen der *d-ko* und *wt* Mäuse mit isotonischer Kochsalzlösung gespült. Die erhaltene Lavage besteht aus Lipiden und den hydrophoben wie auch hydrophilen Surfactant Proteinen (SP-A, -B, -C, -D). Anschließend wurde die auf ein Surfactant Protein normierte Anzahl an Phospholipiden mit dem Phosphattest (Kapitel 2.3.1) bzw. Fluorescamintest (Kapitel 2.3.2) bestimmt. In diesem Vorversuch wurde überprüft, ob die *d-ko* Mäuse eine Veränderung in der Zusammensetzung der Lavage aufweisen. Die Balken stellen die auf ein Surfactant Protein berechneten Phospholipidmoleküle in der

Lavage aus drei *wt* Mäusen und drei genetisch veränderten Mäusen dar (Abb. 4.0). Die Lavagen der Letzteren besitzen einen Mittelwert von 39 ± 3 mol/mol, die Lavage der *wt* Mäuse einen Wert von 94 ± 2 mol/mol.

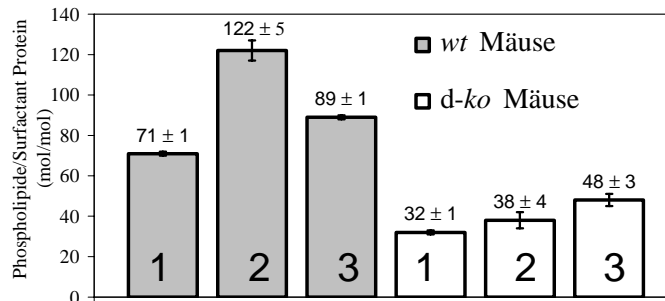


Abbildung 4.0 Anzahl Phospholipidmoleküle pro Surfactant Protein in der Lavage aus *wt* und *d-ko* Mäusen. Fehlerbalken: Gaußsche Fehlerfortpflanzung.

Aus der Lavage wurden die hydrophoben Komponenten isoliert (Kapitel 2.2). Dieser hydrophobe Extrakt enthält die Phospholipide, SP-B und SP-C als hydrophobe Bestandteile des Lungensurfactant. Diese gewährleisten während des Atmungszyklusses, dass die alveolare Oberfläche mit Lungensurfactant bedeckt bleibt und somit die Oberflächenspannung bei der Ausatmung erniedrigt ist. Um Veränderungen dieser essentiellen Komponenten für das Lungensurfactant zu untersuchen, wurden die isolierten Phospholipide und Surfactant Proteine des hydrophoben Extrakts analog zur Lavage mit biochemischen Methoden quantifiziert, bevor sie auf ihre Funktion und Eigenschaften biophysikalisch analysiert worden sind. Die hydrophoben Extrakte aus *wt* Mäusen weisen ein Mittelwert von 499 ± 27 mol/mol auf, wobei die Materialien der *d-ko* Mäuse einen Werte von 211 ± 58 mol/mol zeigen (Abb. 4.1).

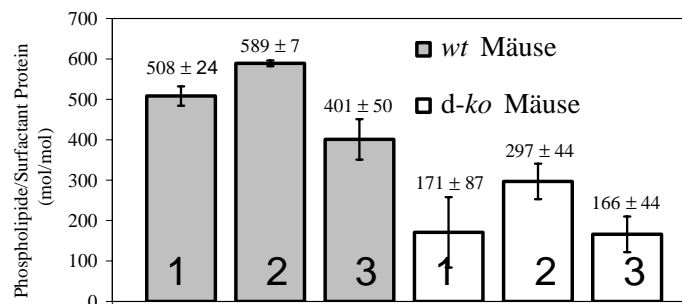


Abbildung 4.1: Anzahl der auf ein Surfactant Protein normierter Phospholipidmoleküle im hydrophoben Extrakt, Fehlerbalken: Gaußsche Fehlerfortpflanzung.

Der Vergleich der Zusammensetzung der Lavage und des hydrophoben Extraktes zeigt ein signifikant höheres Lipid/Protein-Verhältnis der *wt* Mäuse gegenüber den *d-ko* Mäusen. Die Abtrennung der hydrophilen Bestandteile des Lungensurfactant, bei der Isolierung des hydrophoben Extraktes, führt zu einem Anstieg des Lipid/Protein-Verhältnisses sowohl bei den *wt* als auch bei den *d-ko* Mäusen.

4.3 Zusammensetzung des hydrophoben Extraktes

Zur Ermittlung der Phospholipidzusammensetzung des hydrophoben Extraktes aus *wt* und *d-ko* Mäusen wurden die Lipide mittels Butanol-Extraktion aus der Lavage isoliert und mit Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie (HPTLC) aufgetrennt (Kapitel 2.3.3, Abb. 4.2). Anhand der Ergebnisse der mitgeführten Standards ließen sich fünf Phospholipidklassen identifizieren: Sphingomyelin (SM), PC, Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerol (PG), wobei PE und PG ein nahezu identisches Laufverhalten zeigten. Unterhalb der Bande des Cholesterols befinden sich nicht-lipidische Verunreinigungen (V).

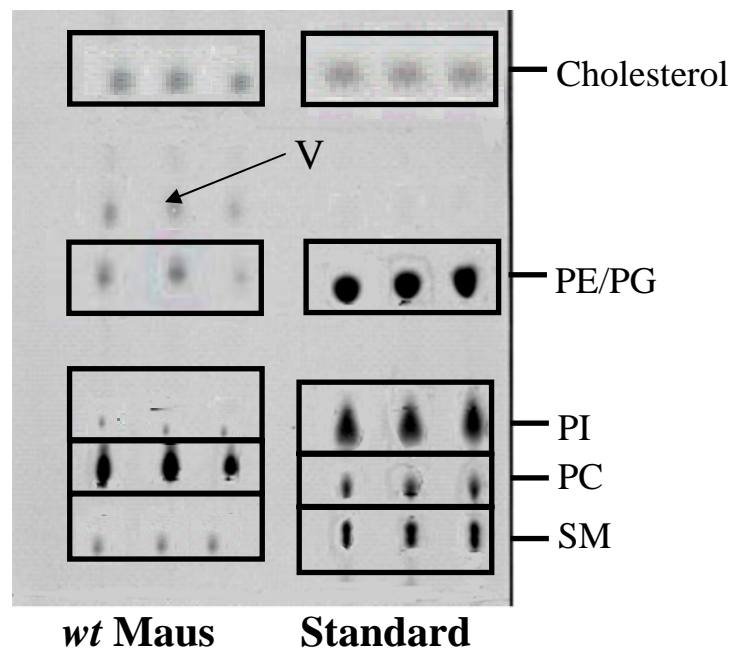


Abbildung 4.2 HPTLC des hydrophoben Extraktes: links *wt* Maus, rechts: Lipidstandard

In Abb. 4.3 ist die Lipidzusammensetzung der *wt* und *d-ko* Maus dargestellt. Aufgeführt sind die Anteile PC, PI, PE/PG, SM und Cholesterol im hydrophoben Extrakt aus beiden Mäusen. Der prozentuale Anteil des Cholesterols berechnet sich aus der Gesamtmasse der nachgewiesenen Phospholipide. Innerhalb des hydrophoben Extraktes aus Mäuse gleichen Typs traten nur geringe Schwankungen von maximal 5 % der einzelnen Lipidanteile auf.

Die Hauptkomponente im hydrophoben Extrakt aus der *wt* und der *d-ko* Maus ist das PC mit 84 bzw. 75,6 Gew.%. Zusätzlich enthalten ist PG und PE. Die Summe beider Phospholipide führt zu Werten von 10,5 bzw. 13,3 Gew.%. Der Prozentsatz an SM beträgt 3,2 bzw. 9,1 Gew.%, während PI den geringsten Anteil mit 2,3 bzw. 2,0 Gew.% aufweist. Cholesterol, als Hauptbestandteil der neutralen Lipide, ist mit 5,5 bzw. 13,8 Gew.% innerhalb des hydrophoben Extraktes aus der *wt* und *d-ko* Maus enthalten. Der Vergleich beider Mäusetypen zeigt einen Rückgang des PC-Gehaltes in der *d-ko* Maus, während der PE/PG-, SM- und der Cholesterolanteil ansteigt. Eine geringfügige Änderung fällt im PI-Anteil auf. Dieses Phospholipid weist einen Anteil von 2,3 Gew.% im Lipid/Protein-Gemisch der *wt* Maus auf, während es im hydrophoben Extrakt der *d-ko* Maus mit 2,0 Gew.% enthalten ist. Mit Ausnahme von Cholesterol besitzen alle Werte der *d-ko* Maus geringe Standardabweichungen.

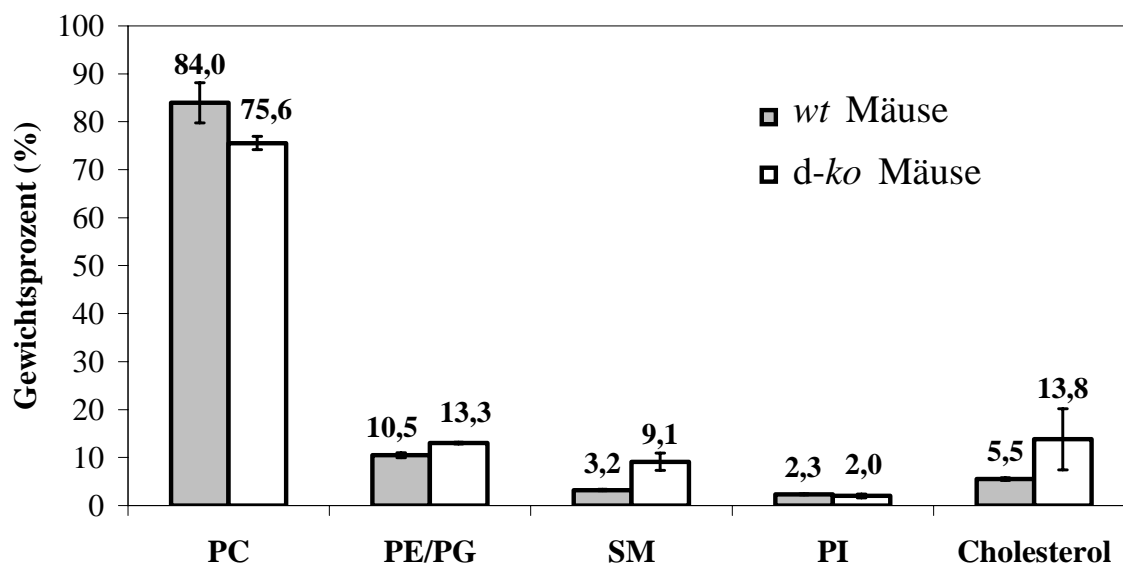


Abbildung 4.3 Vergleich der Lipidzusammensetzung des hydrophoben Extraktes aus *wt* und *d-ko* Maus. Fehlerbalken: Standardabweichung

4.4 Druck/Flächen-Diagramme

Nachdem gezeigt wurde, dass die biochemischen Veränderungen der *d-ko* Maus in einer veränderten Surfactantzusammensetzung resultieren, wurde geprüft, ob durch diese veränderte Zusammensetzung die Funktionalität des hydrophoben Extraktes beeinträchtigt wird. Hierzu wurde die Filmwaage als Modell der Lungenkompression und -expansion während des Atmungszyklusses verwendet.

Die hydrophoben Extrakte wurden auf eine Reinstwasser-Subphase bei einer Temperatur von 20 °C gespreitet und komprimiert bzw. expandiert. Die dazugehörigen Druck/Flächen-Diagramme sind in Abbildung 4.4 dargestellt. Abbildung 4.4 **a** zeigt als Referenz die Isotherme des hydrophoben Extraktes aus einer *wt* Maus, wobei in 4.4 **b** das Druck/Flächen-Verhalten des hydrophoben Extraktes aus einer *d-ko* Maus dargestellt ist. Die Kompression des hydrophoben Extraktes aus der *wt* Maus führt bei einer mittleren molekularen Fläche von etwa 225 Å²/Molekül bis zu einer mittleren molekularen Fläche von 70 Å² zu einem kontinuierlichen Druckanstieg. Bei einem Druck von Druck > 47 mN/m besitzt die Isotherme ein ausgeprägtes Plateau. Dieses erstreckt sich bei den hier gewählten Kompressionsbedingungen über einen Bereich mittlerer molekularer Flächen von etwa 70 bis 25 Å²/Molekül. Die anschließende Expansion führt zu einer drastischen Reduzierung des Oberflächendruckes, der bei 100 Å²/Molekül den Nullwert erreicht. Das Inlett präsentiert die dreimalige Kompression und Expansion des hydrophoben Extraktes aus *wt* Maus bis zu einem Oberflächendruck von 20 mN/m. Die Hysteresen sind nahezu deckungsgleich. Folglich wird während der kontinuierlichen Kompression und Expansion bis zu einem Oberflächendruck von 20 mN/m kein Material in der Subphase gelöst.

Der kontinuierliche Druckanstieg des hydrophoben Extraktes aus der *d-ko* Maus beginnt bei einer Fläche von etwa 270 Å²/Molekül und endet bei etwa 70 Å²/Molekül. Die nun auftretende Schulter zeigt einen Bereich mittlerer Kompressibilität von etwa 70 bis 40 Å²/Molekül, bevor der Bereich mit niedriger Kompressibilität folgt. Diese niedrige Kompressibilität zeichnet sich durch ein starkes Ansteigen des Druckes (51 mN/m) bei geringer Flächenverkleinerung aus. Die Expansion führt zur Reduzierung des Oberflächendruckes, welcher bei 220 Å²/Molekül den Nullwert erreicht. Das Inlett

präsentiert die dreimalige Kompression und Expansion des hydrophoben Extraktes aus *d-ko* Maus bis zu einem Oberflächendruck von 20 mN/m.

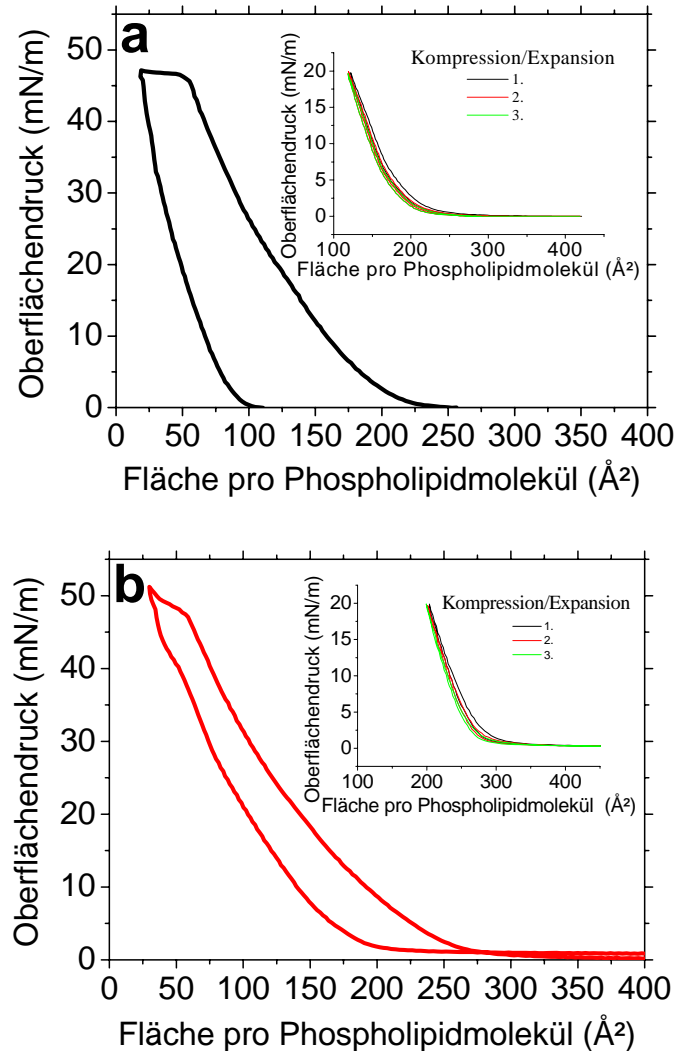


Abbildung 4.4 Kompressions-/Expansions-Zyklus des hydrophoben Extraktes aus einer (a) *wt* und (b) *d-ko* Maus. Die Inletts zeigen die dreimalige Kompression und Expansion bis zu einem Oberflächendruck von 20 mN/m. Die Messungen des hydrophoben Extraktes dreier unterschiedlicher Tiere gleichen Typs zeigten keine signifikanten Abweichungen.

Die beiden Isothermen weisen deutliche Abweichungen im Verhalten während der Kompression bei einem Druck > 47 mN/m auf. Im Gegensatz zum hydrophoben Extrakt aus der *d-ko* Maus, dessen Isotherme eine Schulter zeigt, präsentiert das Material aus der *wt* Maus ein ausgeprägtes Plateau bei hohen Oberflächendrücken. Die Inletts in den Diagrammen 4.4 weisen die schon in den Isothermen zu erkennende Flächenverschiebung des hydrophoben Extraktes der *d-ko* Maus auf. Während der kontinuierliche Druckanstieg der Hysterese des *wt* bei etwa $250 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ beginnt,

ist bei den Hysterese der d-ko Maus schon bei ca. $300 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ ein Anstieg des Oberflächendrucks bei Reduzierung der molekularen Fläche zu beobachten. Keinen Unterschied weisen die hydrophoben Extrakte im Verlust von Lipiden und Proteinen durch Lösen in der Subphase während der Kompression und Expansion auf. Bis zu diesem Oberflächendruck ist sowohl beim *wt* als auch bei der d-ko Maus kein signifikanter Versatz der Isothermen zu erkennen.

4.5 Charakterisierung des Phasenverhaltens mit der FM

Mit der Fluoreszenz-Mikroskopie (FM) wurde untersucht, ob die veränderte Zusammensetzung und das veränderte Kompressionsverhalten des hydrophoben Extraktes aus der d-ko Maus im Vergleich zur *wt* Maus in einem veränderten Phasenverhalten resultiert. Dazu wurden FM-Bilder bei unterschiedlichen Oberflächendrücken aufgenommen und die Anzahl, Größe sowie die Struktur der Domänen des flüssig expandierten (eng. *liquid expanded*, l_e)/flüssig kondensierten (eng. *liquid condensed*, l_c) Koexistenzgebiets verglichen. Im Vergleich mit dem vorher beschriebenen *in vitro* Modellsystem des Lungensurfactant ist eine Unschärfe der Aufnahmen zu erkennen (Abb. 4.5), die auf den größeren Anteil an ungesättigten Phospholipiden und die damit verbundene Fluidität zurückzuführen ist. Es sind jeweils Messungen an den hydrophoben Extrakten aus drei *wt* bzw. d-ko Mäusen durchgeführt worden.

In Abbildung 4.5 sind exemplarisch die Aufnahmen des ersten und zweiten Kompressions- und Expansionszyklusses des hydrophoben Extraktes aus einer *wt* Maus gezeigt. Die Bilder stellen das Phasenverhalten während der Kompression und Expansion im Plateaubereich sowie bei Oberflächendrücken von 35 und 25 mN/m dar. Die durchschnittliche Domänengröße und Anzahl der dunklen l_c Bereiche nimmt mit ansteigendem Oberflächendruck im ersten Zyklus zu. So sind bei einem Druck von 25 mN/m eine große Anzahl von l_c Bereichen vorhanden, die einen mittleren Durchmesser von nur ca. $5 \mu\text{m}$ besitzen. Zusätzlich sind aber auch Domänen in der l_c Phase zu finden, die einen Durchmesser von etwa $10 \mu\text{m}$ besitzen. Mit ansteigendem Oberflächendruck nimmt die Anzahl und Größe dieser Domänen zu, so dass sie im Plateaubereich einen durchschnittlichen Durchmesser von etwa $10\text{-}15 \mu\text{m}$ besitzen. Auf Grund der

Formierung der Multischichten sollte in diesem Bereich die Fluoreszenzintensität der hellen l_c Phase am größten sein. Zusätzlich verhindert die hohe Fluidität des Oberflächenfilms den Selbstquenchingprozess der Sonde im Plateaubereich. Bei der anschließenden Expansion ist ein vermehrtes Auftreten kleiner schwarzer Domänen zu erkennen, wobei die Gesamtfläche des Films, die im expandierten Zustand vorliegt, mit sinkendem Oberflächendruck zunimmt.

Bei der zweiten Kompression treten bei einem Oberflächendruck von 25 mN/m vereinzelt l_c Domänen auf, die mit einem Durchmesser von etwa 10-15 μm im Vergleich zum ersten Zyklus wesentlich größer sind. Es ist auch zu beobachten, dass parallel zum ersten Zyklus die durchschnittliche Größe der l_c Domänen mit ansteigendem Oberflächendruck bis zum Plateaubereich zunimmt. Während der Expansion ist der Anteil der l_c Phase des Oberflächenfilms größer im Vergleich zur Plateauregion. Interessanterweise treten beim zweiten Zyklus nach der Expansion punktförmige Aggregate mit hoher Fluoreszenzintensität auf (25 mN/m). Sie sind jedoch nicht an die l_c Domäne gebunden, sondern befinden sich innerhalb des l_c Bereiches. Diese Aggregate können durch die Entmischung der Fluoreszenzsonde innerhalb des hydrophoben Extraktes entstehen. Weiterhin ist es möglich, dass die Fluoreszenzsonde eine Affinität zu bestimmten Lipiden aufweist, die zu einer Akkumulation nach der Expansionsphase führt.

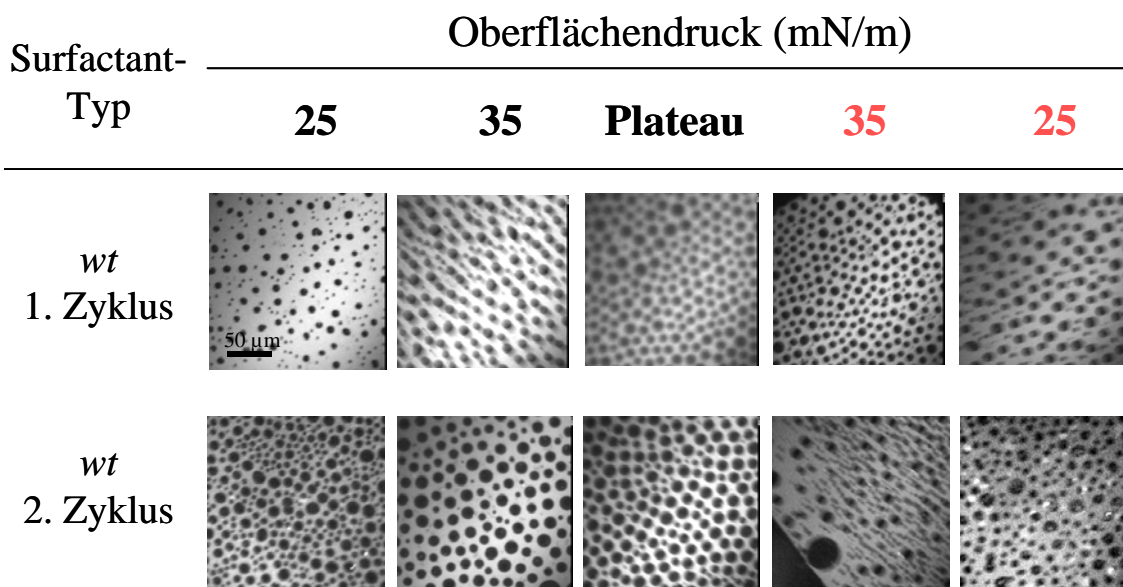


Abbildung 4.5 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des hydrophoben Extraktes aus einer *wt* Maus. Die Messung ist auf einer Reinstwasser-Subphase durchgeführt worden ($T = 20\text{ }^\circ\text{C}$).

In Abbildung 4.6 sind die FM-Aufnahmen des hydrophoben Extraktes aus einer *d-ko* Maus dargestellt. Im ersten Zyklus sind kleine l_c Domänen mit einem Durchmesser $< 5 \mu\text{m}$ zu sehen, die im Bereich des Oberflächendrucks von 25–35 mN/m in der Anzahl zunehmen. Im Plateaubereich sind größere l_c Domänen mit einem Durchmesser von etwa $10 \mu\text{m}$ zu erkennen, die jedoch im Vergleich zu den Oberflächendrücken von 25 und 35 mN/m in geringerer Anzahl auftreten. Des Weiteren sind im Plateau stäbchenförmige Domänen durch Zusammenlagerung der l_c Bereiche zu erkennen. Die Expansion des Films im ersten Zyklus führt analog zu den Oberflächendrücken der Kompressionsphase zur Entstehung vieler kleiner l_c Bereiche. Der zweite Zyklus zeigt schon bei niedrigen Oberflächendrücken große ungleichmäßig geformte schwarze Domänen mit einem Durchmesser von etwa $15 \mu\text{m}$. Mit ansteigendem Oberflächendruck, bis hin zum Plateaubereich, nimmt ihre Anzahl geringfügig zu. Innerhalb des Plateaubereiches sind, wie beim hydrophoben Extrakt aus der *wt* Maus, im zweiten Zyklus der Expansion (25 mN/m) die punktförmigen Aggregate mit sehr hoher Fluoreszenzintensität zu beobachten. Während der Expansionsphase sind bei dem Oberflächendruck von 35 mN/m noch ungleichmäßig geformte schwarze Domänen zu erkennen, die jedoch in ihrer Anzahl bei Drücken von 25 mN/m abnehmen.

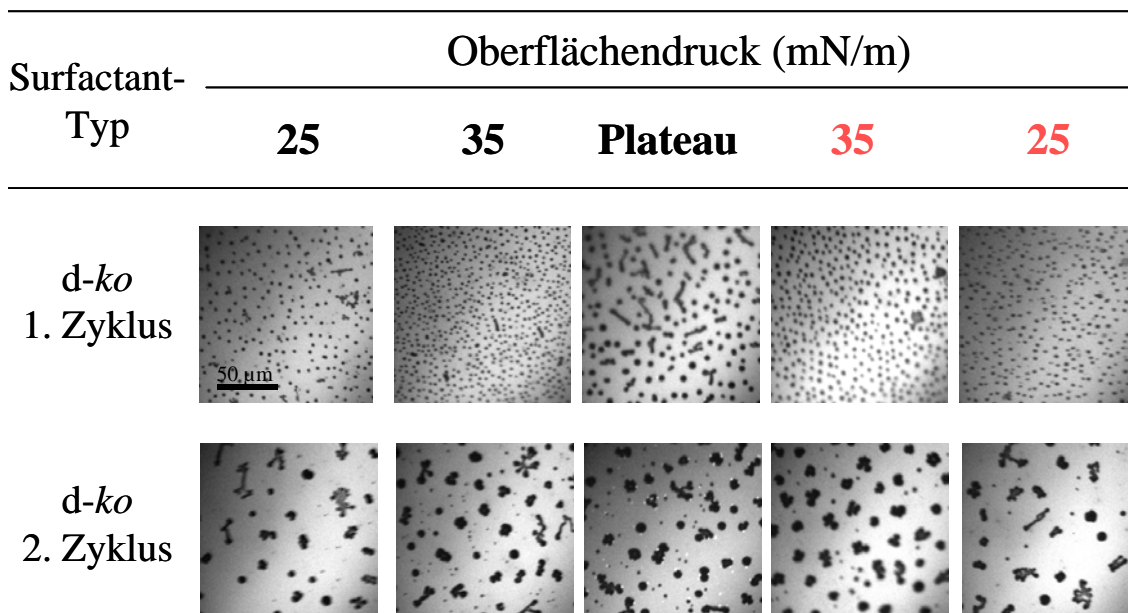


Abbildung 4.6 FM-Aufnahmen des hydrophoben Extraktes aus einer *d-ko* Maus. Die Messung ist auf einer Reinstwasser-Subphase durchgeführt worden ($T = 20^\circ\text{C}$).

Der Vergleich der FM-Aufnahmen des hydrophoben Extraktes aus der *wt* und d-*ko* Maus zeigt Unterschiede in der Anzahl, der Größe und Struktur der l_c Domänen. Bei dem Material der *wt* Maus sind bei der Expansion und Kompression in beiden Zyklen nur runde gleichmäßig geformte Domänen zu erkennen. Im Unterschied dazu zeigt der hydrophobe Extrakt aus der d-*ko* Maus insbesondere im zweitem Zyklus ungleichmäßig geformte Strukturen. Aus der höheren Anzahl der l_c Domänen im hydrophoben Extrakt aus der *wt* Maus, im Vergleich zu dem Material aus der d-*ko* Maus, lässt sich folgern, dass der Lipid/Protein-Film der *wt* Maus wesentlich rigider ist. Das im Plateaubereich des hydrophoben Extraktes aus der *wt* Maus formierte gleichmäßige l_c/l_e Koexistenzgebiet ist bei der d-*ko* Maus nicht zu erkennen.

4.6 SFM-Untersuchungen des hydrophoben Extraktes

Zur intensiveren Untersuchung der Topologie des Oberflächenfilms innerhalb der Plateuregion der Isotherme wurde die Raster-Kraft-Mikroskopie (SFM) verwendet. Der hydrophobe Extrakt aus der *wt* Maus und der d-*ko* Maus wurde im *tapping mode* unter Wasser untersucht. Hierzu erfolgte der hydrophobe Transfer im Plateaubereich der Isotherme (47 mN/m) in einer Reinstwasser-Subphase bei einer Temperatur von 20 °C. Um die Ergebnisse statistisch abzusichern sind jeweils die hydrophoben Extrakte, isoliert aus drei verschiedenen *wt* und d-*ko* Mäusen, für die SFM-Messungen verwendet worden.

In Abbildung 4.7 **a** ist exemplarisch die SFM-Aufnahme des hydrophoben Extraktes aus einer *wt* Maus dargestellt. Die unterschiedlich großen runden Domänen sind innerhalb des Scanbereichs ($25 \mu\text{m}^2$) willkürlich im Monofilm verteilt. Diese besitzen Durchmesser von einigen Nanometern, bis zu $0,5 \mu\text{m}$. Die Profilanalyse zeigt maximale Höhenunterschiede von $30 \pm 2 \text{ nm}$ zwischen den Domänen und der Monoschicht (Abb. 4.7 **b**), wobei die Höhen Werte aufweisen, welche ein Vielfaches von 6 nm betragen. Dies entspricht der Annahme, dass die Domänen Protrusions darstellen, die aus einer Vielzahl von Lipiddoppelschichten mit einer Höhe von 6 nm aufgebaut sind. Die teilweise ungleichmäßigen Randbereiche der Protrusions entstehen durch starke Interaktionen des *cantilevers* mit der Probenoberfläche und sind bei Messungen unter Wasser in diesem Betriebsmodus unvermeidbar.

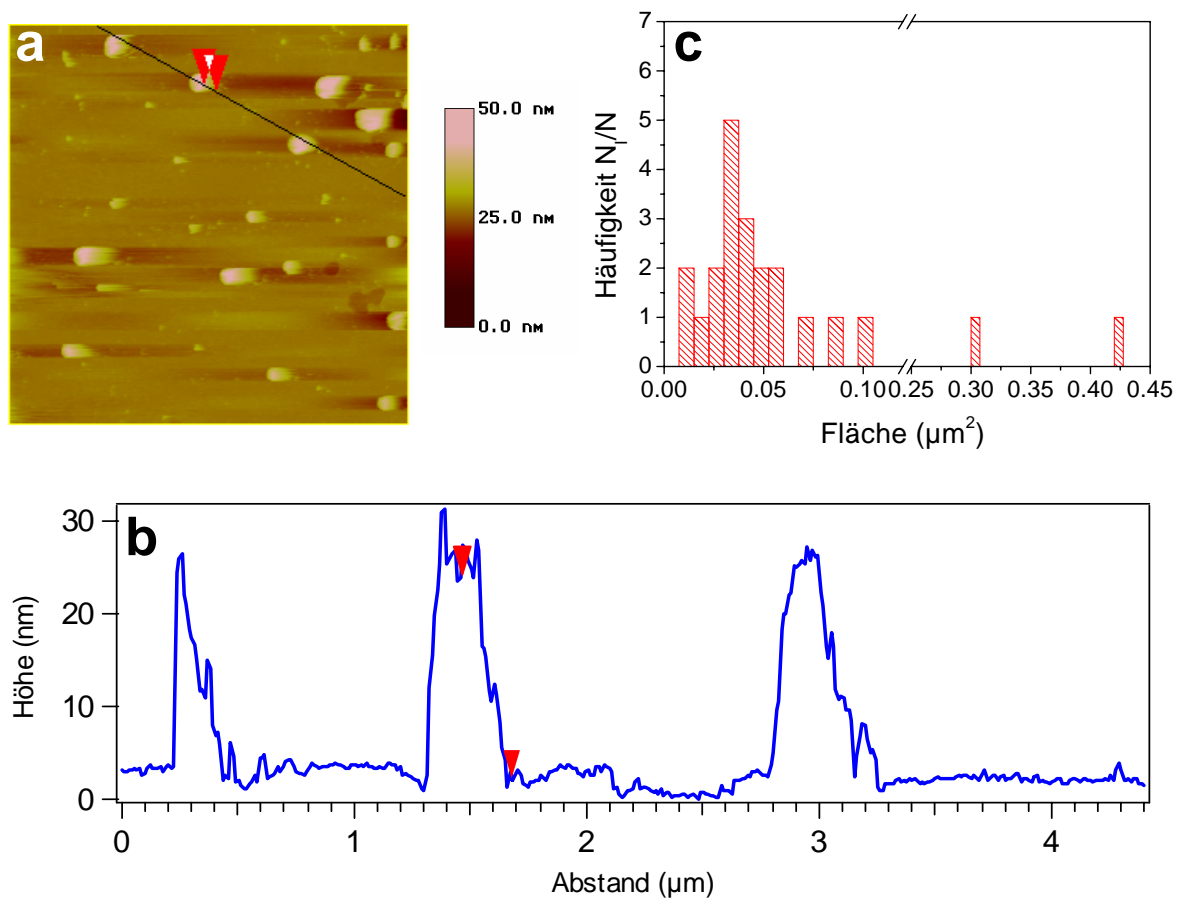


Abbildung 4.7 SFM-Untersuchung des hydrophoben Extraktes aus einer *wt* Maus. (a) Topographieaufnahme im Plateaubereich ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$). (b) Höhenprofil entlang der Linie in Bild (a). (c) Histogrammanalyse der Protrusions in Bild (a)

Das in Abbildung 4.7 c dargestellte Histogramm enthält die Flächenverteilung der Protrusions innerhalb des $25 \mu\text{m}^2$ großen Ausschnitts (Abb. 4.7 a). Das Maximum der Verteilung liegt bei $0,03 \mu\text{m}^2$, wobei die einzelnen Intervalle eine Größe von $0,0075 \mu\text{m}^2$ besitzen. Zusätzlich sind noch vereinzelt Protrusions mit einer Fläche von ca. $0,3$ und $0,42 \mu\text{m}^2$ vorhanden.

Der hydrophobe Extrakt aus der *d-ko* Maus weist nur eine geringe Anzahl an Protrusions innerhalb des $25 \mu\text{m}^2$ großen Scanbereichs auf (Abb. 4.8 a). Diese haben eine längliche, ungleichmäßige Form und einen maximalen Höheunterschied von 18 nm zum Monofilm (Abb. 4.8 b). Die durchschnittliche Fläche der Protrusions beträgt, wie die Histogrammanalyse zeigt, etwa $0,02 \mu\text{m}^2$ (Abb. 4.8 c). Die Intervalle besitzen analog zu dem Histogramm des *wt* eine Größe von $0,0075 \mu\text{m}^2$.

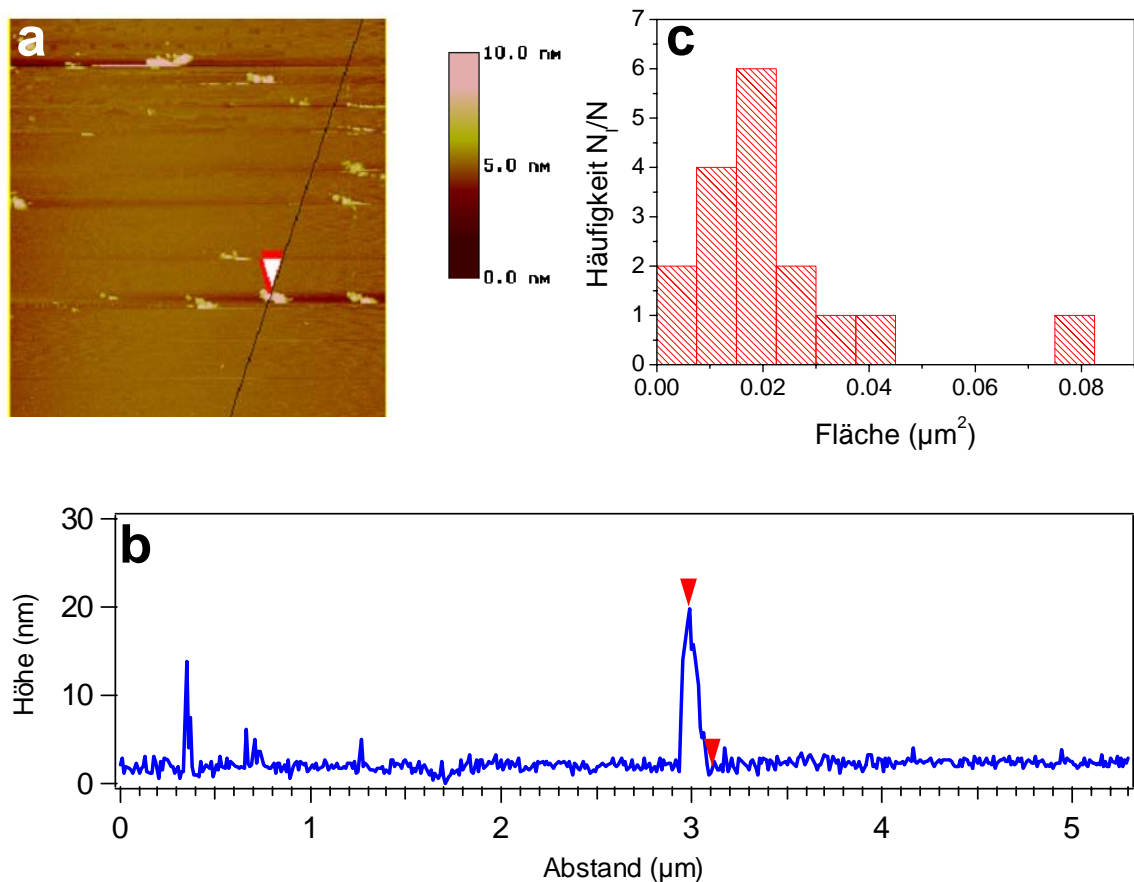


Abbildung 4.8 SFM-Untersuchung des hydrophoben Extraktes aus einer *d-ko* Maus. (a) Topographieaufnahme im Plateaubereich ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$). (b) Höhenprofil entlang der Linie in Bild (a). (c) Histogrammanalyse der Protrusions in Bild (a).

Die Protrusions des hydrophoben Extraktes aus der *d-ko* Maus unterscheiden sich in ihrer Ausdehnung, Anzahl und Höhe von denen der *wt* Maus. Die Kompression des hydrophoben Extraktes aus der *wt* Maus führt innerhalb der Plateauregion der Isotherme zu einer Vielzahl an runden Protrusions, wohingegen der hydrophobe Extrakt aus der *d-ko* Maus nur wenig ungleichmäßig geformte Multischichten aufweist. Sind beim hydrophoben Extrakt aus der *wt* Maus noch Höhen von maximal 36 nm abgebildet worden, so sind die Höhen des Materials der *d-ko* Maus mit nur maximal 18 nm halb so hoch. Hauptsächlich wurden im Plateaubereich Protrusions, bestehend aus zwei Lipiddoppelschichten, mit einer Gesamthöhe von 12 nm detektiert.

Die Histogrammanalyse der abgebildeten Protrusions des hydrophoben Extraktes aus der *d-ko* Maus in Abbildung 4.8 c bestätigt den visuellen Eindruck beim Vergleich der Abbildung 4.7 a und 4.8 a. Die Protrusions treten weniger häufig auf und das Maximum der Flächenverteilung des Histogramms ist mit $0,02 \mu\text{m}^2$ zu kleineren Flächen

verschoben. Dies bedeutet, dass, induziert durch die genetische Deletion des E- und H-FABP, eine Reduzierung in der Anzahl als auch in der Fläche der Protrusions zu verzeichnen ist.

4.7 Diskussion und Zusammenfassung

Kapitel 4 präsentiert die Ergebnisse der chemischen und biophysikalischen Untersuchungen des hydrophoben Extraktes aus Lungen von *wt* und *d-ko* Mäusen. Durch die chemische Analyse wurde ein verringertes Lipid/Protein-Verhältnis im Material der Lavage und beim hydrophoben Extrakt aus *d-ko* Mäusen im Vergleich zum *wt* Mäusen festgestellt.

Die Verhältnisse korrelieren mit den Untersuchungen aus vorangegangenen Arbeiten [1]. Wobei ausgehend von der Annahme, dass E- und H-FABP die Synthese von Phospholipiden durch Bereitstellung von Fettsäuren vermittelt, eine verringerte Aufnahme, β -Oxidation und ein verringerter Einbau in neutralen Lipiden und PC beobachtet wurde. Dieser Sachverhalt konnte in kultivierten Typ II Pneumozyten der Lunge aus *d-ko* Mäusen mit Hilfe von markierter Palmitinsäure experimentell bestätigt werden [2]. Die verminderte Aufnahme von Fettsäuren, als Bausteine der Phospholipide, hat zur Folge, dass weniger Fettsäuren den Typ II Pneumozyten zur Surfactant-Synthese zur Verfügung stehen.

Expressionsstudien der SP-mRNAs in Typ II Pneumozyten von *d-ko* Mäusen stehen im Einklang mit den verminderten Lipid/Protein-Verhältnissen, die aus der reduzierten Phospholipidsynthese resultieren. Während SP-B und SP-C nahezu gleich stark exprimiert werden, ist bei den anderen spezifischen Surfactant Proteinen eine Hochregulierung der mRNA in den *d-ko* Mäusen zu erkennen [1].

Die Zusammensetzung des hydrophoben Extraktes ist durch HPTLC untersucht worden. Die Quantifizierung der Phospholipide führte zu geringen Abweichungen der Zusammensetzung im hydrophoben Extrakt aus *wt* Maus und *d-ko* Maus. Außerdem korrelierten die Werte der erhaltenen Lipidanteile mit denen, die in der Literatur angegeben sind [3]. Interessanterweise ist der Cholesterolgehalt im hydrophoben Extrakt aus der *d-ko* Maus im Vergleich zum *wt* wesentlich höher ist. Eine Erklärung hierfür sind die unterschiedlichen Synthesewege des Cholesterols und der Phospholipide. Während z.B. das PC in Säugern aus Cholin, Acyl-CoA und Glycerin-3-phosphat synthetisiert wird, entsteht das Cholesterol ausgehend vom Acetat über andere Zwischenprodukte [4]. Eine Einschränkung innerhalb der Lipidsynthese der Typ II Pneumozyten muss folglich nicht zwangsläufig zur Einschränkung der Cholesterolsynthese führen. Es ist möglich, dass die absolute Cholesterolmenge innerhalb des Surfactantgemisches konstant bleibt, aber relativ durch die Verminderung der Phospholipidsynthese ansteigt.

Die Reduzierung des PC-Gehaltes im hydrophoben Extrakt aus der *d-ko* Maus kann durch die Ergebnisse von Guthmann et al. [2] bestätigt werden. In den Arbeiten wurde ein verminderter Fettsäureeinbau in Phosphatidylcholin beobachtet. Der Rückgang des PC-Gehaltes geht einher mit dem Anstieg des PG/PE- und SM-Anteils.

Charakteristisch ist das *squeeze-out* Plateau für Monofilme des Lungensurfactant [5-7]. Die beiden Lipid/Protein-Gemische aus *wt* und *d-ko* Maus zeigen signifikante Unterschiede im Kompressionsverhalten (Abb. 4.4). Bei hohen Oberflächendrücken ist in dem Film der *d-ko* Maus eine verminderte Ausbildung des Plateaus bei etwa 47 mN/m zu erkennen. Ein ähnliches Kompressionsverhalten konnten auch Panda et al. an den großen Surfactantaggregaten (*eng. large surfactant aggregates, LA*) aus verletzten Lungen beobachten [8]. Sie bestimmten ein erhöhtes Lipid/Protein-Verhältnis und verzeichneten in Filmwaagemessungen nach sechs Zyklen dynamischer Kompression den Verlust des Plateaus.

In den Filmwaageuntersuchungen weist der hydrophobe Extrakt aus der *d-ko* Maus eine geringere Bildung des Plateaus bei hohen Oberflächendrücken auf, so dass auf Grund der Isotherme eine Störung des selektiven *squeeze-out* von fluiden Lipiden vermutet werden kann [9]. Das Herausdrücken von fluiden Lipiden aus der Monoschicht ist notwendig, da nur DPPC in der Lage ist niedrige Oberflächenspannungen unter physiologischen Bedingungen aufrecht zu erhalten [10].

Weiterhin fällt eine Verschiebung der Isotherme des hydrophoben Extraktes aus der *d-ko* Maus zu größeren molekularen Flächen im Vergleich zum Material der *wt* Maus auf. Dieser Flächenversatz steht im Einklang mit den gemessenen Lipid/Protein-Verhältnissen, da eine erhöhte Proteinkonzentration innerhalb des Lipidgemisches zu einer Verschiebung zu größeren molekularen Flächen führt [11].

Die Mäusetypen *wt* und *d-ko* zeigten tendenziell die gleiche Zusammensetzung und ähnliche Eigenschaften an der Luft/Wasser-Grenzfläche. Dieses konnte durch separate Untersuchungen einzelner *wt* bzw. *d-ko* Proben eines Versuchstieres bestätigt werden. Jedoch ist in den physiologischen Systemen gleicher Mäusetypen eine Varianz der Surfactantkomposition bei einzelnen Tieren zu beobachten. Diese Abweichung von der gewöhnlichen Surfactantkomposition der Mäuse gleichen Typs können durch kompensatorische Effekte oder durch die physiologische Verfassung des einzelnen Versuchstieres erklärt werden. Kompensatorische Effekte konnten beispielsweise in H-(-/-) FABP *knock out* (*H-ko*) Mäusen bestätigt werden. Diese Tiere zeigten eine verminderte Fettsäureaufnahme, induziert durch das Fehlen des H-FABP. Dieser wurde durch einen kompensatorischen Effekt in Form einer erhöhten Glucoseaufnahme und Oxidation im Herzen entgegengesteuert [12].

Die Abweichungen einzelner *d-ko* Mäuse von den allgemeinen Eigenschaften dieses Typs sind in den Lipid/Protein-Verhältnissen deutlich geworden. Während der *wt* im Bereich von etwa 500 Molekülen Phospholipide zu einem Molekül Surfactant Protein liegt, zeigt der *d-ko* Typ Verhältnisse von maximal 300 zu eins. *D-ko* Mäuse mit einem untypischen hohen Lipid/Protein-Verhältnis von 730 ± 15 sind bezüglich der Oberflächenaktivität genauer untersucht worden. Hierbei konnte eine Korrelation zwischen der Analytik und den Eigenschaften an der Luft/Wasser-Grenzfläche beobachtet werden. Nur hydrophobe Extrakte mit Lipid/Protein-Verhältnissen gleich oder größer der *wt* Mäusen ist zur Ausbildung des Plateaus bei hohen Oberflächendrücken fähig (Abb. 4.9).

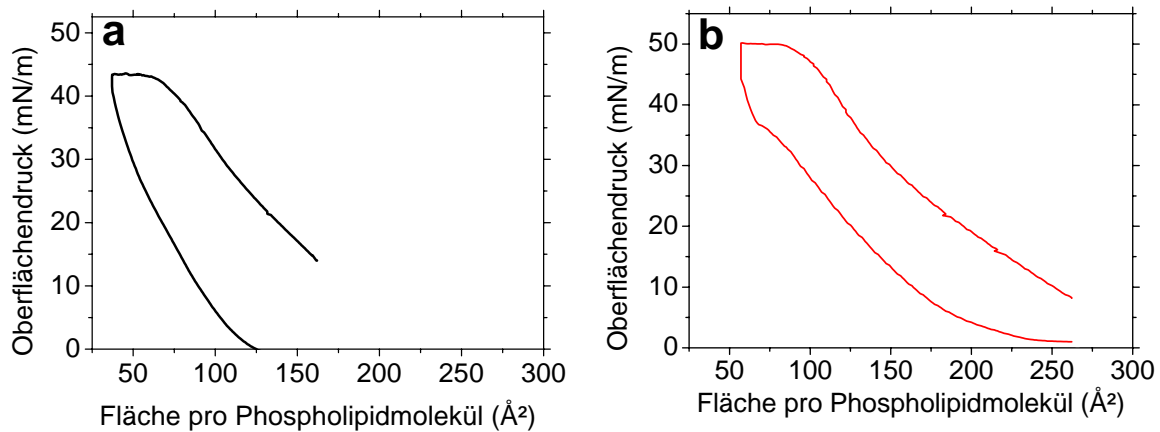


Abbildung 4.9: Kompressions- und Expansionsverhalten des hydrophoben Extraktes aus (a) *wt* und (b) *d-ko* Maus mit einem Lipid/Protein-Verhältnis oberhalb des *wt* (730 ± 15 mol/mol).

Die FM wurde verwendet um Unterschiede im Phasenverhalten von hydrophoben Extrakten an der Luft/Wasser-Grenzfläche zu untersuchen [13, 14]. Der hydrophobe Extrakt bildet während der Kompression gleichmäßig geformte l_c Phasen aus [13, 15, 16], die aus mit DPPC angereicherten Domänen bestehen [15]. Die l_e Phasen hingegen, beinhalten einen hohen Anteil an ungesättigten Lipiden und Proteinen [15, 16]. Zur Zeit kann noch keine direkte Aussage über den Zusammenhang zwischen der Formierung von l_c Domänen und dem Erreichen von hohen Oberflächendrücken, welche zur Stabilität des Oberflächenfilms der Lunge am Ende der Ausatmung notwendig ist, getroffen werden [17, 18].

Der erhöhte Proteinanteil des hydrophoben Extraktes aus der *d-ko* Maus führt zu einem höheren Anteil an l_e Domänen (Abb. 4.3). Außerdem wirkt sich der Anstieg des SM-, PG/PE-, PI- und Cholesterolgehalts im hydrophoben Extrakt aus der *d-ko* Maus positiv auf die Ausbildung der l_e Phase aus. Aus dem Vergleich der Ergebnisse der FM und der Filmwaagemessungen des Materials aus *wt* und der *d-ko* Maus kann erstmals ein direkter Zusammenhang zwischen den Anteilen der l_c und l_e Phase sowie dem Erreichen niedriger Oberflächenspannungen hergestellt werden. Nur bei einem niedrigen l_e Anteil, wie er in dem Material aus der *wt* Maus vorliegt, wird eine hohe Stabilität des hydrophoben Extraktes an der Luft/Wasser-Grenzfläche erreicht. Diese Stabilität zeichnet sich durch die Bildung von Multischichten bei Oberflächendrücken von 47 mN/m aus.

Einen Einblick in die Topologie des Oberflächenfilms geben Untersuchungen mit der SFM-Technik. Im Plateaubereich der Isotherme des hydrophoben Extraktes aus der *wt* Maus zeigt die Abbildung Protrusions bis zu Ausdehnung von $0,42 \mu\text{m}^2$, während die SFM-Auswertung des *d-ko* Films nur Protrusions mit einer maximalen Größe von $0,08 \mu\text{m}^2$ aufweist. Auf Grund des hohen Auflösungsvermögens dieser Methode konnte die Störung des selektiven *squeeze-out* von fluiden Lipiden bestätigt werden. Der hydrophobe Extrakt aus der *d-ko* Maus zeigt eine reduzierte Ausbildung von Multischichten bei hohen Oberflächendrücken im Vergleich zur *wt* Maus.

Die Ergebnisse und Interpretationen der biophysikalischen Untersuchungen des veränderten Surfactant werden auch durch molekularbiologische Ergebnisse gestützt. Die FABPs dienen in der Zelle als Transporter und als Speicher für Fettsäuren, wobei in der *d-ko* Maus zwei dieser Fettsäure bindenden Proteine, nämlich das H- und das E-FABP fehlen. Dadurch lässt sich darauf schließen, dass diese beiden Proteine ein Reservoir für gebundene Fettsäuren bilden, welche für eine ausreichende Synthese der Lipide in den Typ II Pneumozyten notwendig sind. Dies spiegelt sich in den deutlich niedrigeren Lipid/Protein-Verhältnissen des Materials aus der *d-ko* Maus im Vergleich zum hydrophoben Extrakt aus der *wt* Maus wieder, da hier nicht mehr ausreichend Fettsäuren für die Phospholipidbiosynthese zur Verfügung stehen.

Ebenfalls könnte es sein, dass die geringere Konzentration an Fettsäuren in der Zelle einen Einfluss auf die Genregulation hat [19]. Fettsäuren sind Liganden der Proliferator aktivierten Rezeptoren (PPARs), welche zahlreiche Gene der Lipidhomöostase regulieren. Für Leber (L)-FABP, welches in der Gesamtlunge detektiert worden ist, konnte eine direkte Beteiligung an der Genregulation nachgewiesen werden. Dabei bindet das L-FABP im Zytosol Fettsäuren und transportiert diese in den Kern, wo sie über direkte Protein/Protein-Wechselwirkungen an einen PPAR-Subtyp übergeben werden [20] (Abb. 4.10). Für die Maus sind drei PPAR Subtypen beschrieben worden, $\text{PPAR}\alpha$, $\text{PPAR}\beta$ und $\text{PPAR}\gamma$ [21]. Vom Letzteren entstehen durch alternative Promotornutzung und Primärtranskript-Spleißen die Isoformen $\text{PPAR}\gamma_1$ [22] und $\text{PPAR}\gamma_2$ [21].

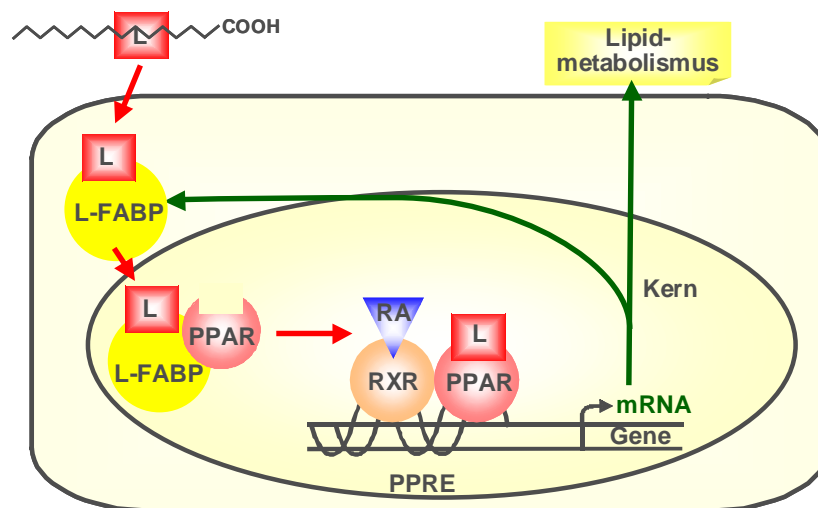


Abbildung 4.10 Darstellung des Fettsäuretransportes mit L-FABP in den Zellkern. Innerhalb der Kerns erfolgt die Übergabe der Fettsäureliganden zum PPAR, anschließend die Interaktion mit den RXR- Subtypen und letztlich die Bindung an die DNA Erkennungsdomäne (PPREs).

Zur Transkription bilden die PPARs Heterodimere mit einem der Retinsäure-X-Rezeptor (RXR) Subtypen [20, 23]. Diese Heterodimere binden an spezifische DNA Erkennungsdomänen (PPREs) verschiedener Gene. Somit regulieren die durch FABP aktivierten PPARs die Aktivierung von Enzymen, welche ein PPRE in ihrem Promotor enthalten. L-FABP wurde in der Gesamtlunge nachgewiesen. Interessanterweise enthält das Gen für L-FABP selbst ein PPRE und wird daher durch PPAR Agonisten reguliert (Abb. 4.10). Lautz [24] konnte zeigen, dass in der *d-ko* Maus sowohl die mRNA von Adipozyten (A)-FABP, L-FABP und von der Fettsäuretranslokase (FAT/CD36), die alle ein PPRE besitzen, verminderter gebildet werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass in der *d-ko* Maus die FABP/PPAR vermittelte Genregulation gehemmt ist. Auch Gene die einen Einfluss auf die Lipidhomöostase haben werden durch PPARs aktiviert und reguliert. Beispiele hierfür sind die Acyl-CoA Synthase [25], Lipoproteinlipase [26] und die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) [27]. Acyl-CoA Synthase aktiviert die Fettsäuren und die Lipoproteinlipase katalysiert die Freisetzung von Fettsäuren durch die Hydrolyse Triglyceridreicher Lipoproteine. PEPCK katalysiert die Umwandlung von Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat, wodurch die vermehrte Synthese von Glycerinphosphaten und Triacylglyceriden ermöglicht wird.

Obwohl bis heute noch nicht der genaue Mechanismus der Aufnahme von exogenen Fettsäuren zur Synthese des Lungensurfactant bekannt ist, lässt der enorme Umsatz an Phospholipiden und ihren Vorstufen auf eine Einschränkung der Surfactant-Synthese durch eine verminderte oder sogar fehlende Transkription der Gene, wie z.B. der Lipoproteinlipase, schließen.

Unter Berücksichtigung der Rolle der FABP in der Transkription von Genen ist eine Beeinflussung der Surfactant-Synthese somit durch zwei Möglichkeiten gegeben. Zum einen führt die fehlende Transportfunktion der FABP zu mangelnder Bereitstellung von Fettsäuren für die Lipidsynthese. Andererseits verändert die mangelhafte Expression von Proteinen der Lipidhomöostase die Surfactant-Synthese.

5. *In vivo* Extrakt-Modell: Charakterisierung des Surfactant von E- und H-ko Mäusen

5.1 Einleitung

In Kapitel 4 wurde dargestellt, dass die gleichzeitige Gendelektion sowohl des Epidermal (E)- als auch des Herz (H)-Fettsäurebindungsproteins (FABP) zu einer veränderten Surfactantkomposition führt. Außerdem wies der hydrophobe Extrakt aus doppel *knock out* (d-ko) Mäusen ein anderes Kompressions- und Phasenverhalten an der Luft/Wasser-Grenzfläche sowie eine verminderte Protrusionausbildung im Vergleich zu den wildtyp (*wt*) Mäusen auf.

In diesen Kapitel soll die biophysikalische Analyse des hydrophoben Extraktes getrennt von E- bzw. H-ko Mäusen Aufschluss darüber geben, ob eine gezielte Repression der E-FABP bzw. H-FABP Expression die Surfactantfunktion verändert. Zuvor soll der Einfluss der Gendelektion auf die Surfactantkomposition untersucht werden.

5.2 Lipid/Protein-Verhältnisse

Zur Analyse der Bestandteile des hydrophoben Extraktes aus E- und H-ko Mäusen wurde nach der Butanolextraktion das Material von drei Tieren verwendet (Kapitel 4.2). Es wurde die Fragestellung untersucht, ob die gezielte Repression des E-FABP oder H-FABP zu einer Veränderung der Surfactantkomposition führt. Hierzu wurde durch einen Phosphattest (Kapitel 2.3.1) die absolute Menge an Phospholipiden im hydrophoben Extrakt bestimmt. Die Anzahl der Phospholipide wurden nach der Quantifizierung der hydrophoben Surfactant Proteine (SP)-B und SP-C (Kapitel 2.3.2) für ein Proteinmolekül bestimmt.

Der Mittelwerte der Lipid/Protein-Verhältnisse des hydrophoben Extraktes aus H-ko Mäuse beträgt 442 ± 14 mol/mol. Die E-ko Mäuse zeigen niedrigere Verhältnisse, deren Mittelwert liegt bei 229 ± 21 mol(Abb. 5.0).

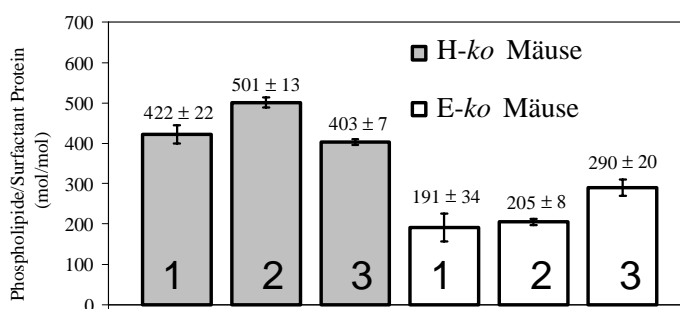


Abbildung 5.0 Lipid/Protein-Verhältnisse aus drei unabhängigen Messungen. Fehlerbalken: Gaußsche Fehlerfortpflanzung.

5.2 Druck/Flächen-Diagramm

Die auffälligste Eigenschaft der E-*ko* Mäuse ist ihr untypisches niedriges Lipid/Protein-Verhältnis, welches mit dem der d-*ko* Mäuse vergleichbar ist. Dieser Sachverhalt hat das zentrale Interesse auf die biophysikalische Untersuchung des hydrophoben Extraktes aus E-*ko* Mäusen fokussiert.

In Abbildung 5.1 ist die Isotherme des hydrophoben Extraktes aus einer E-*ko* Maus dargestellt. Die Filmkompression führt zu einem Druckanstieg bei einer Fläche von $220 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$. In diesem Bereich ist der Film hoch kompressibel, da trotz einer Flächenverkleinerung von etwa $100 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ nur ein Druckanstieg von ca. 5 mN/m zu verzeichnen ist. Ein deutlicher Druckanstieg ist zwischen 60 und $120 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ zu erkennen. Dieser kontinuierliche Druckanstieg endet bei etwa 52 mN/m . Hier wird der Film wieder kompressibler und es entsteht eine Schulter in der Isotherme, die bei einem Oberflächendruck von 56 mN/m endet. Die anschließende Expansion führt zu einem Rückgang des Oberflächendruckes bis 5 mN/m . Im Vergleich zu den im Kapitel 4 präsentierten Isothermen des hydrophoben Extraktes aus *wt* und d-*ko* Mäusen ist analog zu dem Material der d-*ko* Maus eine unzureichende Ausbildung des Plateaus zu verzeichnen.

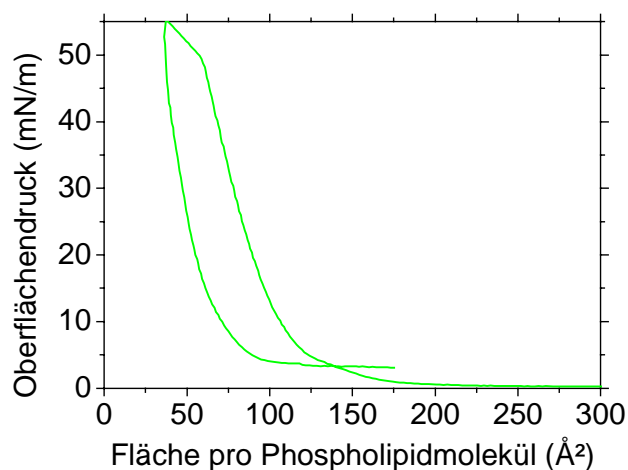


Abbildung 5.1 Kompressions- und Expansionsverhalten des hydrophoben Extraktes aus einer E-*ko* Maus

5.3 Diskussion und Zusammenfassung

Die Untersuchung des hydrophoben Extraktes aus E- und H- *ko* Mäusen basierte auf der Analyse des Lipid/Protein-Verhältnisses und des Kompressionsverhaltens. Die Lipid/Protein-Verhältnisse der H-*ko* Mäuse sind denen der *wt* Mäuse sehr ähnlich. Die Verhältnisse der E-*ko* Mäuse dagegen liegen im Bereich der d-*ko* Mäuse. Die Analytik der Lipid/Protein-Verhältnisse korreliert mit den Ergebnissen die für Makrophagen, Typ II Pneumozyten und Fibroblasten erhalten wurden. Die Quantifizierung des E-FABP ergab eine große Menge dieses Proteins innerhalb der Typ II Pneumozyten, wohingegen H-FABP nur in untergeordnetem Maße nachgewiesen werden konnte [1,2]. Da die Typ II Pneumozyten essentiell für die Surfactant-Synthese sind, steht die Veränderung der biophysikalischen Eigenschaften des hydrophoben Extraktes auf Grund der Gendeletion von E-FABP im Einklang mit der überwiegenden Expression dieses Proteins im Vergleich zum H-FABP.

Die in der Literatur bekannte Kompensation des E-FABP durch erhöhte Expression des H-FABP kann nicht bestätigt werden [3]. Eine verstärkte Expression des H-FABP würde zur vermehrten Synthese von Phospholipiden führen, welches das Lipid/Protein-Verhältnis im hydrophoben Extrakt beeinflussen würde. Außerdem sollte das

Kompressionsverhalten des hydrophoben Extraktes aus E-ko Mäusen dann eine Analogie zu dem Material aus *wt* Mäusen aufweisen.

Die Kompression des hydrophoben Extraktes aus E-ko Mäusen zeichnet sich wie das Material der *d-ko* Mäuse durch eine verminderte Ausbildung des Plateaus bei hohen Oberflächendrücken aus. Analog zum Material der *d-ko* Mäuse führt ein niedriges Lipid/Protein-Verhältnis zu einer unzureichenden Ausbildung des Plateaus bei hohen Oberflächendrücken.

E-FABP bindet spezifisch langkettige, gesättigte Fettsäuren [5]. Folglich resultiert eine Gendelektion von E-FABP in einem verminderten Transport dieser Fettsäuren zum Lipidsyntheseort innerhalb der Typ II Pneumozyten. Zur Synthese gesättigter Phospholipide wie z.B. 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholin (DPPC) ist die Bereitstellung der gesättigten Palmitinsäure zwingend erforderlich.

Eine verminderte Synthese von DPPC innerhalb der Lunge hat gravierende Auswirkungen auf deren Funktion, da nur wenige Lipide, darunter DPPC, in der Lage sind, bei Temperaturen von 37 °C Oberflächenspannungen nahe Null mN/m zu erreichen [4].

Eine Störung des *squeeze out* von fluiden Lipiden auf Grund der unzureichenden Ausbildung der l_c Domänen ist erdenklich. Da zur Formierung der Multischichten neben den fluiden Bereichen auch eine ausreichende Festigkeit des Oberflächenfilms vorhanden sein muss. Der verminderte DPPC-Gehalt in dem hydrophoben Extrakt des Surfactant führt zu reduzierten Ausbildung der flüssig kondensierten (l_c) Phase im Plateaubereich, da diese hauptsächlich aus DPPC besteht [6-9].

6. *In vivo* Extrakt-Modell: Einfluss von Pioglitazon auf das Surfactant von *d-ko* Mäusen

6.1 Einleitung

In den frühen 80er Jahren wurde in Japan der Wirkstoff Pioglitazon entwickelt [1]. Dieser dient zur Behandlung von Typ-2 Diabetes bei Patienten, deren Blutzucker durch eine allgemeine Behandlung nicht ausreichend gut einstellbar ist.

Interessanterweise konnten durch die Behandlung mit Pioglitazon auch Erfolge bei anderen Erkrankungen, die in engem Zusammenhang mit der Insulin-Resistenz stehen, verzeichnet werden. Hierzu zählen z.B. der arterielle Bluthochdruck (Hypertension) und die krankhafte Veränderung des Blutfettgehaltes (Dyslipämie) [2].

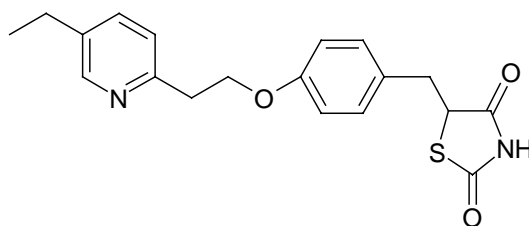


Abbildung 6.0 Struktur von Pioglitazon

Der genaue Wirkungsmechanismus des Pioglitazon in der Behandlung der Diabetes bzw. der Begleiterkrankungen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass die vermehrte Aufnahme von Fettsäuren in Adipozyten zu einer Reduzierung der Konzentration der Fettsäuren im Blutspiegel führt. Dies hat zur Folge, dass weniger freie Fettsäuren für das umliegende Gewebe zur Verfügung stehen. Der desensibilisierende Effekt der freien Fettsäuren in Muskeln und Leber wird so durch die Behandlung mit Pioglitazon reduziert und die Insulinsensitivität erhöht [2].

Der zelluläre Mechanismus der Wirkung von Pioglitazon basiert auf der Wechselwirkung mit einem ligandaktiviertem Kernrezeptor, dem sogenannten Proliferator aktivierten Rezeptor γ (PPAR γ). Dieser Rezeptor nimmt nach heutigen

Wissenstand eine zentrale Rolle in der Regulation des Glukose- und Lipidstoffwechsels ein. Durch die Interaktion des PPAR γ mit Pioglitazon werden vermehrt Proteine gebildet, die für die Übertragung des Insulinsignals innerhalb der Zelle und für das Einschleusen von Glukose in die Zelle verantwortlich sind [2].

In vorausgegangenen Arbeiten wurde die Wirkung des Pioglitazon als selektiver PPAR γ Ligand in doppel *knock-out* (d-ko) Mäusen untersucht. Die Beimischung von Pioglitazon zum Tierfutter der d-ko Mäuse führte zu einer Veränderung des biochemischen Phänotyps. Mit Pioglitazon behandelte d-ko Mäuse zeigten im Vergleich zu den unbehandelten d-ko Mäusen eine erhöhte Expression der Proteine, die in den Fettsäuretransport und Signaltransduktionsweg zur Synthese von Proteinen der Lipidhomöostase involviert sind (Kapitel 4.7). Darüber hinaus konnte der Herz (H)-/Epidermal (E)-ko Effekt, d.h. die reduzierte Palmitataufnahme in Typ II Pneumozyten kompensiert und die Synthese von Phosphatidylcholin (PC) verstärkt werden [3, 4]. Diese Kompensation und die verstärkte Synthese von PC wird als Heilungseffekt beschrieben.

Diese Aufhebung des d-ko biochemischen Phänotyps durch Aktivierung mit Pioglitazon soll nun durch Untersuchungen des Surfactant bestätigt werden. Hierzu wurden die hydrophoben Extrakte aus behandelten Tieren isoliert und auf deren Zusammensetzung sowie deren Eigenschaften an der Luft/Wasser-Grenzfläche untersucht.

6.2 Lipid/Protein-Verhältnisse

Die biochemische Analyse des Lipid/Protein-Verhältnisses des hydrophoben Extraktes hat erste Hinweise auf den Einfluss des Pioglitazon auf die Synthese des Lungensurfactantmaterials gegeben. Da der Wirkstoff eine gesteigerte Synthese von PC innerhalb der Typ II Pneumozyten induziert, führt dies auch zu einem erhöhten Lipid/Protein-Verhältnis des hydrophoben Extraktes (Abb. 6.1). Der Mittelwert des Lipid/Protein-Verhältnisses der Tiere mit Spezialfutter liegt bei 395 ± 36 mol/mol während die hydrophoben Extrakte der unbehandelten d-ko Mäuse im Durchschnitt ein Lipid/Protein-Verhältnisse von 227 ± 55 mol/mol aufweisen. Das Verhältnis ist

signifikant bei den *d-ko* Mäusen erhöht, die mit dem Wirkstoff Pioglitazon behandelt worden sind.

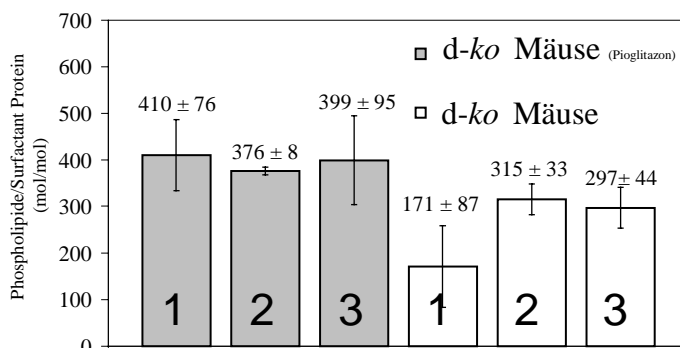


Abbildung 6.1 Normiertes Lipid/Protein-Verhältnis: *d-ko* Mäuse + Pioglitazon; *d-ko* Mäuse. Fehlerbalken: Gaußsche Fehlerfortpflanzung.

6.3 Druck/Flächen-Diagramme

In Kapitel 4 und 5 wurde die Korrelation zwischen dem Kompressionsverhalten und der Zusammensetzung des hydrophoben Extraktes beschrieben. Ein niedriges Lipid/Protein-Verhältnis, wie es bei den Materialien der *d-ko* Mäusen ersichtlich ist, führt zu unzureichender Ausbildung des Plateaus der Isotherme bei hohen Oberflächendrücken. Der Heilungseffekt durch das Pioglitazon kann durch die Erhöhung der Phospholipidkonzentration, im Vergleich zur unbehandelten der *d-ko* Maus, und durch die Annäherung der Konzentration an die der *wt* Maus gezeigt werden. Diese Veränderung, induziert durch das Pioglitazon, sollte sich in der Formierung des Plateaus der Isotherme manifestieren.

Der hydrophobe Extrakt aus einer mit Pioglitazon behandelten *d-ko* Maus wurde auf einer Reinstwasser-Subphase bei einer Temperatur von 20 °C untersucht. Es zeigt sich während der Kompressionsphase von 300 bis 100 Å²/Molekül ein kontinuierlicher Druckanstieg (Abb. 6.2), wobei bei 200 Å²/Molekül die Isotherme eine Schulter aufweist. In dem Bereich der molekularen Flächen von 25 bis 75 Å² ist das typische Surfactantplateau zu erkennen. In diesem hochkompressiblen Abschnitt findet nur eine geringe Druckveränderung trotz Flächenverkleinerung statt. Bei weiterer Kompression

wird der Oberflächenfilm rigide und es folgt ein starker Druckanstieg bevor der Film wieder expandiert wurde.

Als Referenz dient die im Inlett dargestellte Filmwaagemessung des hydrophoben Extraktes aus einer *d-ko* Maus. Die Isotherme weist einen kontinuierlichen Druckanstieg bei $270 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ auf. Charakteristisch für die Isotherme des hydrophoben Extraktes aus *d-ko* Mäusen ist die Schulter bei 47 mN/m . Dieser Bereich mittlerer Kompressibilität erstreckt sich von 70 bis $40 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$. Anschließend erfolgt die Expansionsphase, welche bei $220 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ den Nullwert der Oberflächenspannung erreicht (Kapitel 4).

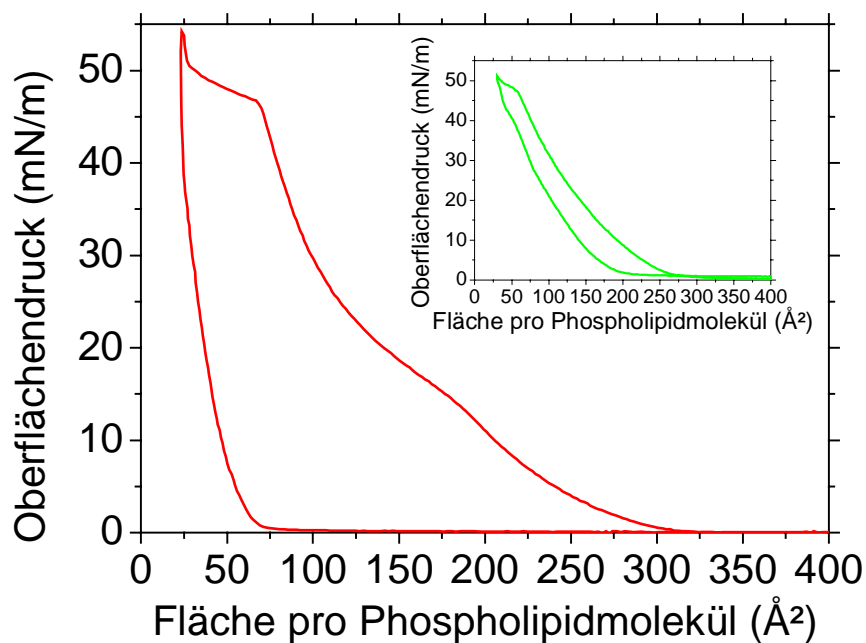


Abbildung 6.2 Kompression und Expansion des hydrophoben Extraktes einer mit Pioglitazon behandelten *d-ko* Maus. Das Inlett zeigt als Referenz die *d-ko* Maus ohne Pioglitazonfütterung.

Bei der Gegenüberstellung der beiden Druck/Flächen-Diagramme fällt die Verschiebung der Isotherme des hydrophoben Extraktes der behandelten *d-ko* Maus zu größeren molekularen Flächen auf. Während die Referenzisotherme bei etwa $270 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ einen kontinuierlichen Druckanstieg aufweist, beginnt dieser beim Material der behandelten *d-ko* Maus schon bei einer Fläche von $320 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$. Bei hohen Oberflächendrücken von etwa 47 mN/m besitzt der hydrophobe Extrakt aus der *d-ko* Maus ein anderes Druck/Flächen-Verhalten, da in diesem Bereich die

Referenzisotherme statt der Ausbildung eines Plateaus nur eine Schulter aufweist. Weiterhin ist ein Unterschied in der Elastizität des Films zu erkennen. Während bei der Expansion des Materials aus der Pioglitazon behandelten Maus ein drastischer Druckabfall festzustellen ist, zeigt die Referenz ein Expansionsverhalten, welches der Kompression entspricht.

6.4 Charakterisierung des Phasenverhaltens mit der FM

Zur weiteren Untersuchung des Heilungseffektes wurde mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie (FM) das Phasenverhalten des hydrophoben Extraktes aus mit Pioglitazon behandelten Tieren bei unterschiedlichen Oberflächendrücken untersucht (Abb. 6.3). Mit dieser Methode soll überprüft werden, welchen Einfluss die veränderte Komposition des hydrophoben Extraktes auf das Phasenverhalten hat.

Die Inlettes der FM-Aufnahmen zeigen als Referenz den hydrophoben Extrakt einer d-ko Maus. Die l_e/l_c Koexistenzgebiete stellen das in Kapitel 4.5 beschriebene Phasenverhalten des hydrophoben Extraktes aus einer d-ko Maus dar.

Die FM-Aufnahmen der hydrophoben aus d-ko Tiere, welche mit Pioglitazon gefüttert worden sind, zeigen sowohl im ersten als auch im zweiten Zyklus fast nur gleichmäßig geformte, runde, flüssig kondensierte (l_c) Domänen. Diese nehmen in ihrer Größe und Anzahl mit steigendem Oberflächendruck zu. So besitzen die meisten Domänen bei 25 mN/m noch Größen unterhalb von 10 μm , während sich insbesondere im zweiten Zyklus bei weiterer Kompression des Oberflächenfilms vereinzelt Domänen von 25 μm Durchmesser gebildet haben. Mit steigendem Oberflächendruck findet somit während des ersten und zweiten Zyklusses eine Reduzierung der flüssig expandierten (l_e) Phase statt. Im Bereich des Plateaus ist die Fluoreszenzintensität innerhalb der l_e Phase im Vergleich zu den niedrigeren Oberflächendrücken intensiver. Zusätzlich fällt eine Akkumulation der Fluoreszenzsonde bei unterschiedlichen Oberflächendrücken durch helle, weiße, punktförmige Bereiche auf.

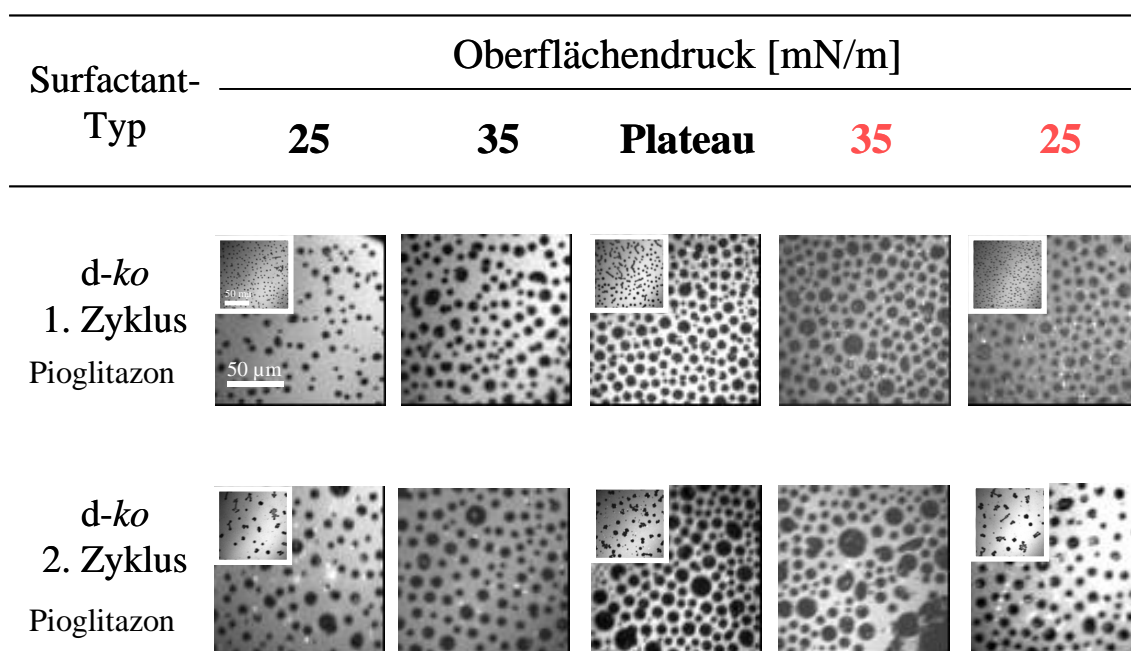


Abbildung 6.3 Phasenverhalten des hydrophoben Extraktes aus einer *d-ko* Maus unter dem Einfluss des Wirkstoffes Pioglitazon. Die Inlets zeigen als Referenz, das typische Phasenverhalten der *d-ko* Maus ohne Pioglitazonfütterung.

6.5 SFM-Untersuchungen des hydrophoben Extraktes

Hervorgerufen durch das Pioglitazon konnte ein gesteigertes Lipid/Protein-Verhältnis bestimmt werden, welches zu einem unterschiedlichen Kompressions- und Expansionsverhalten sowie Phasenverhalten im Vergleich zur *d-ko* Maus ohne Pioglitazonfütterung führt. Welchen Einfluss diese veränderten Eigenschaften des hydrophoben Extraktes auf die Formierung der Multischichten bei hohen Oberflächendrücken hat, wurde mit der Raster-Kraft-Mikroskopie (SFM) untersucht.

Hierzu wurde durch einen hydrophoben Übertrag der Lipid/Protein-Film im Plateaubereich auf ein Mica *Sheet* übertragen. Die Fläche und die Anzahl der Multischichten wurden anschließend statistisch ausgewertet (Abb. 6.4).

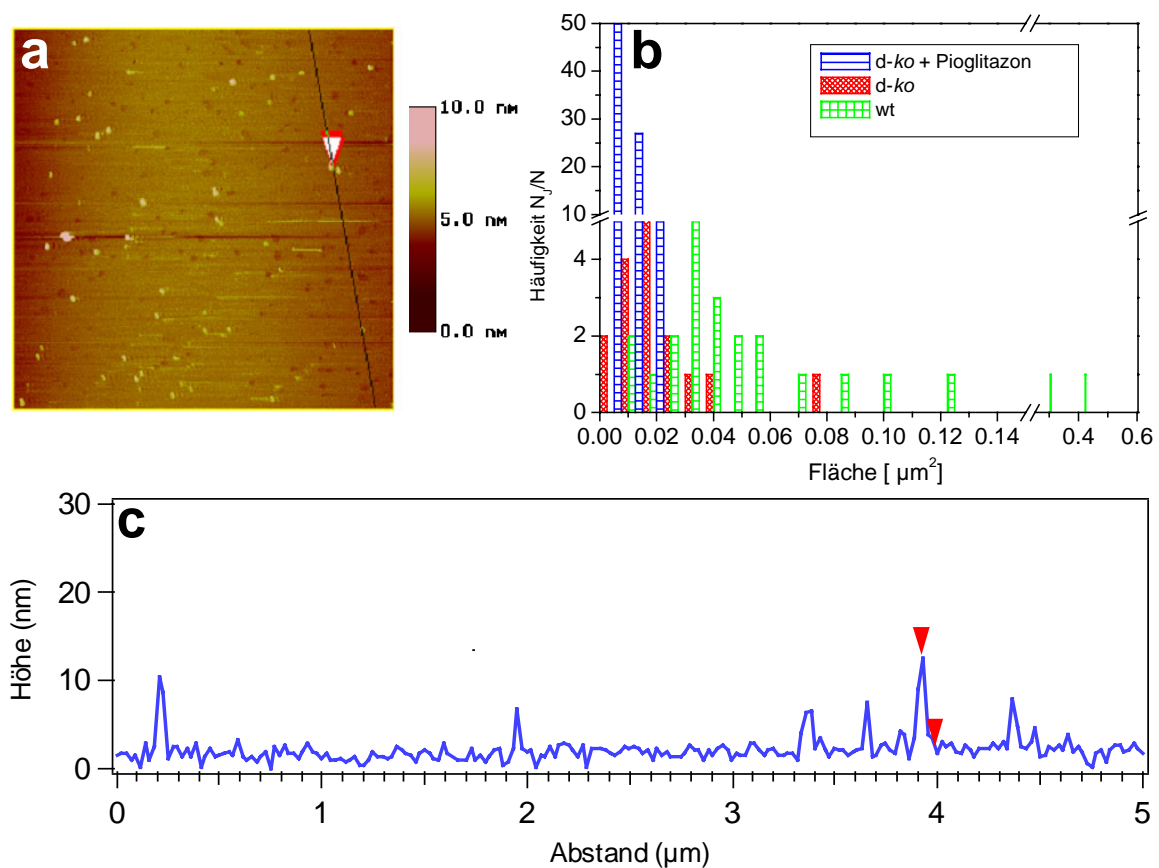


Abbildung 6.4 SFM-Untersuchung des hydrophoben Extraktes einer *d-ko* Maus nach Pioglitazon-Fütterung. (a) Topographie des Oberflächenfilms im Plateau der Isotherme. (b) Das Höhenprofil zeigt eine Multischicht mit einer Höhe von 12 nm. (c) Das Histogramm stellt die Flächenverteilung der Protrusions des hydrophoben Extraktes nach Pioglitazonfütterung dar. Ergänzend sind noch die Verteilungen der *wt* und *d-ko* Maus aufgeführt.

Charakteristisch für die Topologie des Oberflächenfilms im Plateaubereich ist die Vielzahl punktförmiger kleiner Protrusions (Abb. 6.4 a). In der Regel besitzen diese Protrusions Höhen von 12 und 18 nm (Abb. 6.4 b), wobei auch vereinzelt maximale Höhen von 24 nm abgebildet wurden. Mit der statistischen Analyse der Flächenverteilung konnte gezeigt werden, dass die meisten Multischichten eine Ausdehnung von $0,1 \mu\text{m}^2$ besitzen. Zusätzlich wird deutlich, dass Pioglitazon die Formierung von Protrusions fördert, da im Vergleich zur *d-ko* Maus ohne Pioglitazonfütterung eine vermehrte Anzahl an Multischichten auftritt. Diese sind jedoch auf die Fläche bezogen wesentlich kleiner im Vergleich zum Material aus dem *wt* (Abb. 6.4 c). In der Gegenüberstellung der Strukturen der Protrusions aus den hydrophoben Extrakten der unterschiedlichen Mäusetypen wird deutlich, dass sowohl

der hydrophobe Extrakt aus der *wt* Maus als auch das Material aus der behandelten *d-ko* Maus runde Protrusions bei hohen Oberflächendrücken bildet. Nur das Lipid/Protein-Gemisch, welches aus der Lunge der *d-ko* Maus isoliert worden ist, führt zu unregelmäßig geformten Protrusions (Kapitel 4). Somit unterstützt die Geometrie der Multischichten die These, dass Pioglitazon die Phospholipidsynthese in den Typ II Pneumozyten verstärkt und zur Ausbildung von gleichmäßig geformten runden Protrusions führt.

6.6 Diskussion und Zusammenfassung

Obwohl die experimentelle *in vivo* Überprüfung noch durchgeführt werden muss, zeigen die hier durchgeführten Modelle und experimentellen Befunde, dass Fettsäurebindungsproteine (FABP)

- (i) die Aufnahme von Fettsäuren und deren Transfer zwischen Membranen verstärkt,
- (ii) den Fettsäuretransfer von Membranen durch die flüssige Phase katalysiert und
- (iii) die Lipidsynthese und Abbau als Donor und Akzeptor von Fettsäuresubstrat ermöglicht [5-9].

H-FABP transferiert Fettsäuren zum Ort ihres Abbaus [10], während E-FABP hohe Affinitäten zu gesättigten Fettsäuren, wie z.B. Palmitinsäure zeigt. Die hohe Konzentration der E-FABP mRNA in den Typ II Pneumozyten der Mauslunge [3], lässt den Schluss zu, dass E-FABP eine wichtige Funktion in der Palmitinsäureaufnahme und der Bereitstellung dieser Fettsäuren z.B. für die 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholin (DPPC)-Synthese hat.

Innerhalb dieser Dissertation wurde dies bestätigt, da das Fehlen dieser beiden Proteine zu einem Rückgang des Lipid/Protein-Verhältnisses führt (Abb. 6.1).

In vorausgegangenen Arbeiten wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Veränderung der Surfactantkomposition durch das Fehlen des E- und H-FABP beeinflussbar ist. Dies wurde in dieser Arbeit manifestiert. Mit Hilfe eines *back-up* Systems, bei dem

Pioglitazon und PPAR γ eine Schlüsselrolle einnehmen, wurde eine erhöhte Phospholipidkonzentration im hydrophoben Extrakt aus mit Pioglitazon gefütterten *d-ko* Mäusen gemessen. Diese erhöhte Phospholipidkonzentration führte zur Annäherung an die Lipid/Protein-Verhältnissen der hydrophoben Extrakte aus *wt* Mäusen.

Die durch Pioglitazon hervorgerufene Veränderung im hydrophoben Extrakt ist konform mit dem kürzlich abgeschlossenen biochemischen Untersuchungen. Diese Untersuchungen wurden an isolierten Typ II Pneumozyten aus behandelten *d-ko* Mäusen durchgeführt. Hierbei wurde ein gesteigerter Einbau von exogener Palmitinsäure in Di-, Triglyceride, PC und DPPC festgestellt. Allerdings konnten auch hier die Einbauraten von Palmitinsäuren in PC und Triglyceriden innerhalb der Pneumozyten aus *wt* Mäusen nicht erreicht werden [3].

Die biophysikalischen Untersuchungen führten zur Aufklärung des Einflusses, den die veränderte Zusammensetzung des hydrophoben Extraktes auf die Eigenschaften an der Luft/Wasser-Grenzfläche hat.

Die Kompression des Materials aus mit Pioglitazon behandelten *d-ko* Mäusen verdeutlicht, dass das erhöhte Lipid/Protein-Verhältnis im Vergleich zum hydrophoben Extrakt aus unbehandelten *d-ko* Mäusen die Formierung des Plateaus bei Oberflächendrücken von etwa 47 mN/m fördert. Außerdem sind aber auch Stabilitätsunterschiede im Plateau des Materials aus *wt* Mäusen und behandelten *d-ko* Mäusen zu erkennen. Der hydrophobe Extrakt aus behandelten Mäusen weist im Gegensatz zu dem Material aus *wt* Mäusen noch einen geringen Anstieg des Oberflächendruckes bei der Reduzierung der molekularen Oberfläche auf (Abb. 6.2). Bei 16 mN/m tritt eine Schulter in der Isotherme auf, was auf eine erhöhte Konzentration der hydrophoben Surfactant Proteine im Lipid/Protein-Gemisch hindeutet. Unterstützt wird diese Vermutung durch die reinen SP-B und SP-C Isothermen, da diese ein analoges Druck/Flächen-Verhalten bei etwa 20 mN/m vorweisen [11]. Weiterhin ist es auch möglich, dass nur die Lipide für die Ausbildung der Schulter verantwortlich sind. Der Grund hierfür ist, dass Phospholipide wie DPPC während der Kompression zur Formierung eines l/l_c Koexistenzgebiet beitragen. Dieses Koexistenzgebiet manifestiert sich in der Ausbildung eines Plateaus innerhalb der Isotherme. Im Falle des DPPC tritt dieses bei einer Temperatur von 20 °C und einen Oberflächendruck von 5 mN/m auf. Die Länge des Plateaus, sowie die Oberflächendrücke, bei denen es erscheint sind durch die Temperatur der Subphase und

die Anwesenheit von zusätzlichen Lipiden beeinflussbar. Unter Berücksichtigung dieser Eigenschaften, könnte die Schulter durch den Einfluss eines Phospholipids aus den hydrophoben Extrakten behandelter *d-ko* Mäusen auftreten.

Die Untersuchungen mit Hilfe der FM geben Aufschluss über das Phasenverhalten des hydrophoben Extraktes bei unterschiedlichen Oberflächendrücken. Innerhalb der l_c Phase liegen die fluiden, ungesättigten Lipide und Proteine in geringer Packungsdichte vor, wohingegen die l_c Phase hohe Konzentrationen an gesättigten Lipiden, wie DPPC, aufweist [12]. 80 % des extrazellulären Surfactant besteht aus PC, wobei DPPC mit einem Anteil von 40 % vertreten ist [13]. Aus diesem Grunde ist bei der Zunahme der Phospholipidsynthese durch Pioglitazon von einer verstärkten DPPC-Synthese auszugehen, welches sich in einem vermehrten Auftreten der dunklen l_c Phase manifestieren sollte. Die FM bestätigte diese Hypothese. Das erhöhte Lipid/Protein-Verhältnis des hydrophoben Extraktes aus behandelten *d-ko* Mäusen beeinflusst die Größe sowie die Anzahl der l_c Domänen. Die l_c Phase ist über den gesamten Druckbereich in Form von runden Domänen verteilt, die zu denen des Materials aus der *wt* Maus vergleichbar sind. In der direkten Gegenüberstellung sind die l_c Bereiche im Durchmesser sogar teilweise größer (Kapitel 4.5).

Im Vergleich zur unbehandelten *d-ko* Maus sind die l_c Domänen sowohl in der Anzahl als auch in der Größe und Form unterschiedlich.

Eine Vielzahl an Protrusions im Plateaubereich der Isotherme ist im Oberflächenfilm des Materials aus einer behandelten *d-ko* Maus mit der SFM abgebildet worden (Abb. 6.4 c). Diese unterscheiden sich in der Struktur von den Protrusions der *d-ko* Maus, sind jedoch vergleichbar zu den Multischichten des Materials aus der *wt* Maus. Die Geometrie unterstützt die Aussage, dass Pioglitazon die Synthese der Phospholipide in *d-ko* Mäusen verstärkt, was als Heilungseffekt beschrieben wird.

Außerdem weist die Struktur der Multischichten Ähnlichkeit mit den Protrusions eines DPPC/DPPG/SP-B (80:20:0,2 mol %)-Films auf [14]. Eine Begründung für dieser Geometrie ist unter der Annahme möglich, dass die veränderte Surfactantzusammensetzung die Formierung der Protrusions, wie sie beim SP-B beschrieben werden, in diesem hydrophoben Extrakt begünstigt.

Die Ausbildung des stabilen Plateaus des hydrophoben Extraktes aus *d-ko* Mäusen mit Pioglitazonfütterung ist nicht über die Formierung der einzelnen Protrusions auf Grund ihrer geringen Größe erklärbar. Vielmehr muss die Menge der gebildeten Multischichten berücksichtigt werden. Diese ist durch die Flächenverteilung der Protrusions innerhalb des SFM-Scanbereiches bestimmt worden. Trotz der geringeren Größe der Protrusions im Vergleich zum Material der *d-ko* und *wt* Maus (Abb. 6.4 c) ist die prozentuale Gesamtfläche durch das erhöhte Lipid/Protein-Verhältnis, induziert durch den Heilungseffekt des Pioglitazon, angestiegen (Abb. 6.5).

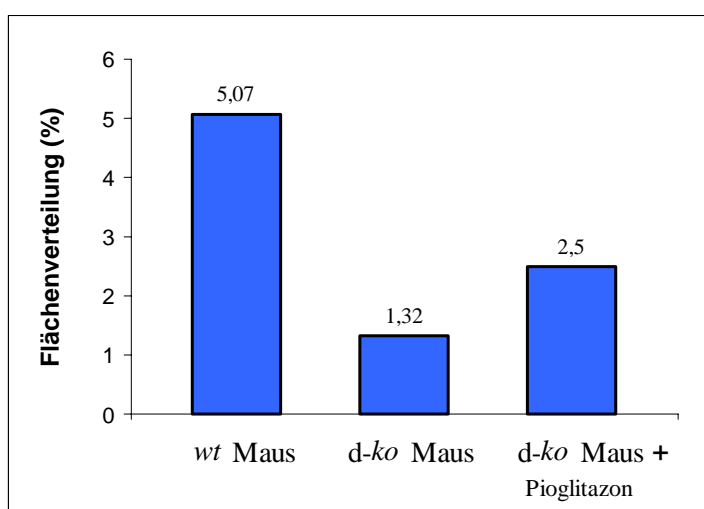


Abbildung 6.5 Flächenverteilung der Protrusions an der Gesamtfläche innerhalb der $25 \mu\text{m}^2$ Aufnahme (Abb. 4.7 a, Abb. 4.8 a und Abb. 6.3 a).

Die molekularbiologische Interpretation des Einfluss des Pioglitazon auf das Surfactant der *d-ko* Mäuse basiert auf der Bindung und Aktivierung des PPAR γ . Hierbei wird vermutet, dass zur Kompensation der E- und H-FABP Gendelektion das Protein Calvoin-1, ein Isotyp der 21-24 kDa Calvoline, den Transport des Pioglitazon in den Typ II Pneumozyten der *d-ko* Tiere übernimmt. Grundlage dieser Vermutung ist, dass die Proteine Bindungsaffinitäten zu Fettsäuren [15, 16] besitzen und an dem Transport von Lipiden zu Lipidkörpern beteiligt ist [17]. Diese Vermutung wurde zusätzlich bekräftigt, da ein Ansteigen der Expression von mRNA gemessen worden ist [3, 4]. Diese mRNA kodiert die Caveolin-1 und Fettsäuretranslokase (FAT) in Typ II Pneumozyten von *d-ko* Mäusen.

Nach dem von Stremmel vorgestelltem Mechanismus [18] kann das Pioglitazon von Translokatoren wie FAT [19] und Plasma Membran FABP (FABP_{pm}) [20] auf Calvulin-1 übertragen werden. Anschließend werden in diesem Mechanismus Vesikel abgeschnürt, die das "lösliche" Calvulin-1 für intrazellulären Transport enthalten. Daraufhin erfolgt die Interaktion mit PPAR γ . Wie in Kapitel 4.7 erwähnt, kann dieser Kernrezeptor durch die Übertragung von FABP gebundenen, langkettigen Fettsäuren aktiviert werden. Anstelle der Fettsäure kann jedoch auch eine Bindung an Pioglitazon erfolgen, was anschließend zu Heterodimeren mit den Retinsäure-X-Rezeptor (RXR) Subtypen [21, 22] führt. Dieser Komplex bindet dann analog zum Fettsäure-PPAR γ -RXR Komplex an spezifische DNA Bereiche und induziert die Transkription der PPAR γ verantwortlichen Bereiche (PPRE) (Abb. 6.6).

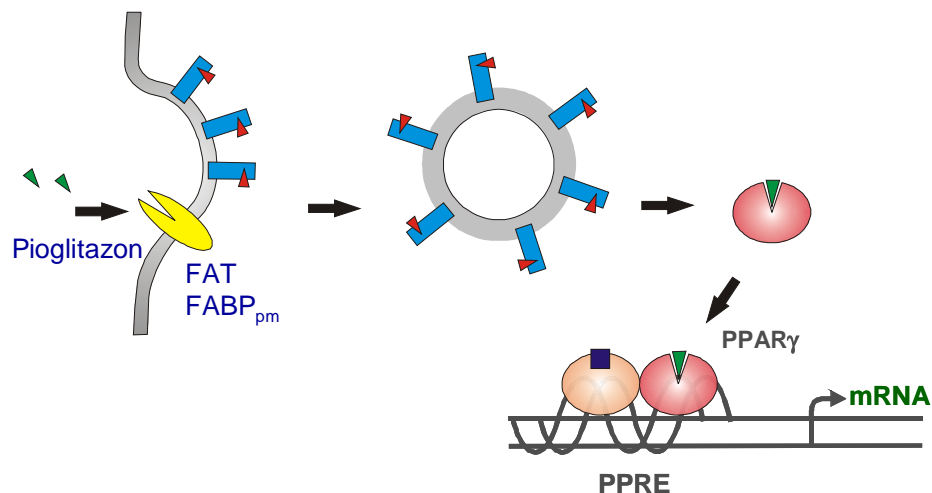


Abbildung 6.6 Signalweg von Pioglitazon mit Calvulin-1 [11].

In unterschiedlichen Zellmodellen (Preadipozyten, Fibroblasten und Myoblasten) konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit der Gruppe der Thiazolidindione (= Glitazone) zur Expression von unterschiedlichen Genen wie Lipoproteinlipase oder Glukosetransporterprotein (GLUT4) führt [23-25]. Die Expression der Lipoproteinlipase induziert die Spaltung der Triglyceride in Glycerin und freie Fettsäuren, welche als Bausteine für die Lipidsynthese und ihren Vorläufern verwendet werden. Es ist wahrscheinlich, dass eine verstärkte Bereitstellung von Fettsäuren für die Phospholipidsynthese in den Typ II Pneumozyten die Surfactant-Synthese intensiviert. Die erhöhte Synthese der Phospholipide manifestiert sich in den Lipid/Protein-Verhältnissen der hydrophoben Extrakte aus den *d-ko* Mäuse mit Pioglitazonfütterung.

Neben E-FABP und H-FABP, welche in unterschiedlichen Mengen in den Lungenzellen quantifiziert worden sind, wurde auch das Leber (L)-FABP in der Gesamtlunge detektiert [26]. Dieses macht neben dem Konzept von Stremmel et al. [18] auch einen weiteren Mechanismus möglich. Hierbei kann L-FABP als Transporter von PPAR γ Agonisten in dem Zellkern dienen und dadurch deren Aktivierung initiieren. Zusätzlich besitzt das L-FABP ein PPRE im Promotorbereich für die Expression dieses Proteins, was einen signalverstärkenden Mechanismus darstellt. [26]. Somit kann die Aktivierung des PPAR γ , welches zu einer vermehrten Phospholipidsynthese in den *d-ko* Mäusen führt, über das L-FABP und Calvoin-1 erfolgen.

Es ist bewiesen, dass PPAR γ in Gewebe und Zellen mit einem verstärkten Lipidmetabolismus auftritt und einen großen Einfluss auf die Lipidspeicherung hat. *In vitro* Experimente zeigten, dass die spezifische Aktivierung des PPAR γ zur Differenzierung der Fibroblasten zu Adipozyten (Fettzellen) und der Preadipozyten zu Adipozyten führt. Die Differenzierung zu Adipozyten geht einher mit der vermehrten Speicherung von Fettsäuren [27]. Obwohl die innerhalb der Typ II Pneumozyten durchgeführte Synthese der Phospholipide und ihre Speicherung als *lamellar bodies* eine hohe Homologie zu der Synthese von Triacylglyceriden und ihre Akkumulierung als Lipidkörper aufweist, ist bis heute noch kein direkter Einfluss des PPAR γ auf die Typ II Pneumozyten und deren Surfactant-Synthese bekannt.

Die in diesem Kapitel dargestellten Veränderungen in der Surfactantfunktion zeigen einen direkten Einfluss des PPAR γ auf das Lungensurfactant. Die durch Pioglitazon induzierte Expression führt zu einer Annäherung der Eigenschaften des hydrophoben Extraktes aus *d-ko* Tieren an denen der Materialien aus *wt* Maus. Der *d-ko* Effekt, d.h. reduziertes Lipid/Protein-Verhältnis, Abwesenheit des Plateaus, unterschiedliches Phasenverhalten und verminderte Protrusionsbildung konnte durch den Heilungseffekt, induziert durch Pioglitazon teilweise kompensiert werden.

7. *In vivo* Extrakt-Modell: Auswirkungen des ARDS auf das Surfactant

7.1 Einleitung

Der Organismus kann durch vielfältige äußere Einflüsse in Stresssituationen versetzt werden. Vor allem Entzündungsreaktionen der Lunge beeinträchtigen dabei die Funktion des Lungensurfactant. Zu den Faktoren, die derartige Entzündungsreaktionen auslösen können, zählen u. a. Massentransfusion von Blutkonserven, Schock, Einatmen von Fremdkörpern, wie Nahrung oder Erbrochenem (Aspiration), Lungenentzündung (Pneumonien), Rauchvergiftungen und bakterielle Toxine. Diese Entzündungsreaktion kann im Mausmodell durch intratrachealer Injektion von Lipopolysaccharid (LPS)-Lösung ausgelöst werden [1, 2] und ist bei Menschen als Atemnotsyndrom des Erwachsenen (eng. *adult respiratory distress syndrome*, ARDS) bekannt.

Bei bakterieller Infektion des Respirationsapparates, wie auch bei der Anwesenheit von Fremdstoffen in der Lunge, werden der alveolare Oberflächenfilm und die Typ II Pneumozyten verletzt. Um der Entzündungsreaktion entgegenzuwirken wird die Surfactant-Produktion in den nicht zerstörten Typ II Pneumozyten gesteigert.

Durch den Mangel der Bereitstellung von Fettsäuren ist innerhalb der Typ II Pneumozyten der *doppel-knock out* (*d-ko*) Mäuse eine verminderte Phospholipidsynthese nachgewiesen worden. Veränderungen des Surfactant durch die eingeschränkte Syntheseleistung sollen durch Stresssituationen wie ARDS verstärkt in den Vordergrund treten.

Untersuchungen am hydrophoben Extrakt, innerhalb des verwendeten ARDS-Mausmodells, von verschiedenen genetisch modifizierten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp (*wt*), sollen darüber Aufschluß geben, ob es zu Veränderungen der Surfactantkomposition kommt, die mit der Filmwaagetechnik nachgewiesen werden sollen. Zusätzlich wird der Einfluss der genetischen Deletion von Epidermal (E)- und Herz (H)-Fettsäurebindungsproteinen (FABPs) auf die Surfactanteigenschaften untersucht.

7.2 Lipid/Protein-Verhältnisse

Zur Analyse des hydrophoben Extraktes wurde das Lipid/Protein-Verhältnis von *E-ko*_(ARDS), *d-ko*_(ARDS) und *wt*_(ARDS) Mäusen unter dem Einfluss von LPS als Modell des ARDS untersucht. Die Entzündungsreaktion führte zu großen Unterschieden in den Lipid/Protein-Verhältnissen der hydrophoben Extrakte aus *wt*_(ARDS) Mäusen (Abb. 7.0). Es sind sowohl hohe Verhältnisse von 730 ± 98 mol/mol und 572 ± 44 mol/mol, aber auch niedrige Werte von 157 ± 16 mol/mol bestimmt worden.

Die normierten Mittelwerte der gesunden *wt* Mäuse liegen im Bereich von etwa 500 Molekülen Phospholipide zu einem Molekül Surfactant Protein (Kapitel 4.2). Der Vergleich der Materialien aus unbehandelten *wt* Mäusen und *wt*_(ARDS) Mäusen stellt somit ein deutlich erniedrigtes und zwei erhöhte Lipid/Protein-Verhältnisse dar, wobei die letzteren die Aussage stützen, dass im Falle des ARDS die Surfactant-Synthese intensiviert wird.

Aus der Analyse des hydrophoben Extrakte aus *E-ko*_(ARDS) und *d-ko*_(ARDS) Mäusen ergeben sich Werte von 281 ± 22 ; 245 ± 7 und 324 ± 30 mol/mol bzw. 310 ± 4 ; 355 ± 75 und 70 ± 11 mol/mol. Die Lipid/Protein-Verhältnisse der hydrophoben Extrakte dieser beiden Mäusetypen sind vergleichbar und mit einer Ausnahme, den Werten der Materialien aus unbehandelten Mäusen ähnlich. Sowohl ohne als auch mit alveolarer Entzündung liegen die Verhältnisse bei etwa 300:1 mol/mol (Abb. 4.1, Kapitel 4.2). Bei diesen *ko*_(ARDS) Mäusen führt die ARDS-Infektion zu keinen signifikanten Änderungen in der Komposition des hydrophoben Extraktes.

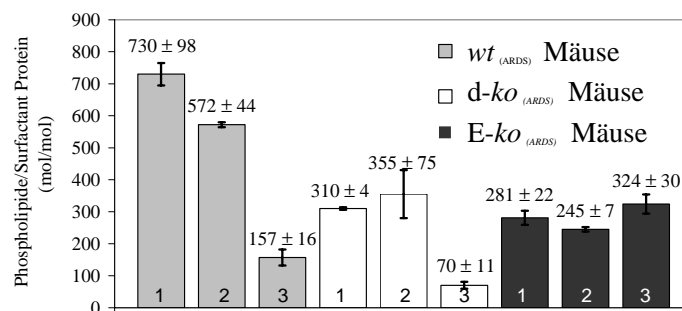


Abbildung 7.0 Lipid/Protein-Verhältnisse des hydrophoben Extraktes aus drei *wt*_(ARDS), *E-ko*_(ARDS) und *d-ko*_(ARDS) Mäusen. Fehlerbalken: Gaußsche Fehlerfortpflanzung.

7.3 Druck/Flächen-Diagramme

Um zu überprüfen, ob ein Einfluss des ARDS auf die Oberflächenaktivität des hydrophoben Extraktes existiert, wurde das Kompressionsverhalten der hydrophoben Extrakte aus unbehandelten *wt* Mäusen und *wt*_(ARDS) Mäusen bei einer Temperatur von 20 °C auf Reinstwasser untersucht. (Abb. 7.1).

Die Isotherme des hydrophoben Extraktes der *wt* Maus weist einen hoch kompressiblen Bereich bei niedrigen Oberflächendrücken aus. Zwischen den molekularen Flächen von 280 und 160 Å²/Molekül ist nur ein geringer Anstieg des Oberflächendruckes von 5 mN/m zu beobachten. Bei etwa 70 Å²/Molekül tritt das charakteristische Surfactantplateau auf, welches sich durch eine geringe Veränderung des Oberflächendruckes bei Reduzierung der molekularen Fläche des Lipid/Protein-Gemisches auszeichnet. Bei weiterer Kompression wird der Oberflächenfilm rigide, was sich in einem starken Anstieg des Druckes im Bereich von 40 Å²/Molekül widerspiegelt.

Die Kompressionsisotherme des hydrophoben Extraktes der *wt*_(ARDS) Maus zeigt einen geringen Anstieg des Oberflächendruckes von etwa 5 mN/m zwischen 220 und 140 Å²/Molekül. Anschließend folgt ein kontinuierlicher Druckanstieg, bevor das charakteristische Surfactantplateau bei 80 Å²/Molekül erreicht wird. Bei weiterer Kompression ist im Bereich von 45 Å²/Molekül ein starker Druckanstieg zu beobachten. Bei diesen molekularen Flächen wird der hydrophobe Extrakt auch wieder expandiert.

Der Vergleich der Isothermen von Surfactantmaterial der *wt* und der *wt*_(ARDS) Maus, weist im Rahmen der Messungenauigkeit einen nahezu identischen Kurvenverlauf auf. Ein geringer Unterschied ist nur in der Verschiebung der Isotherme der unbehandelten *wt* Maus bei hohen Oberflächendrücken zu erkennen. Sowohl ohne als auch mit induziertem ARDS bilden die hydrophoben Extrakte bei etwa 50 mN/m Multischichten aus, die als Plateauregion innerhalb der Isotherme sichtbar werden. Die Gegenüberstellung der Isothermen beider hydrophober Extrakte zeigt, dass das induzierte ARDS in der *wt*_(ARDS) Maus im Druck/Flächen-Verhalten des hydrophoben Extraktes nicht nachweisbar ist.

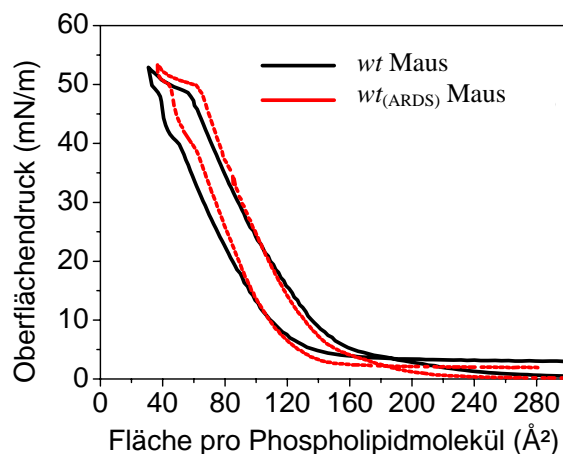


Abbildung 7.1 Isothermen des hydrophoben Extraktes von *wt* Mäusen mit und ohne induzierten ARDS.

7.3.1 Kompressions- und Expansionsverhalten

Da auf Grund des ARDS keine signifikanten Unterschiede im Verhalten an der Luft/Wasser-Grenzfläche beobachtet werden konnten, wurde zur weiteren Untersuchung des hydrophoben Extrakts aus *wt*, *E-*, *H-* und *d-ko* Mäusen mit und ohne Einfluss des ARDS die Messmethode modifiziert.

Das Lipid/Protein-Gemisch wurde wie zuvor auf die Subphase gespreitet und dann aber mehrmals komprimiert und expandiert. Durch die wiederholte Formierung von Multischichten und das Zurückspreiten in die Monoschicht bei niedrigen Oberflächendrücken wurde das Material einer stärkeren Belastung ausgesetzt. Die Unterschiede im Kompressionsverhalten der hydrophoben Extrakte aus den verschiedenen Mäusetypen, wie. z.B. Fluidität oder Ausbildung des Plateaus sollten, sich hierdurch in den Isothermen manifestieren. Beginnend mit einem Vordruck von 20 mN/m wurden 10 Kompressions- und Expansionszyklen durchgeführt (Abb. 7.2 a).

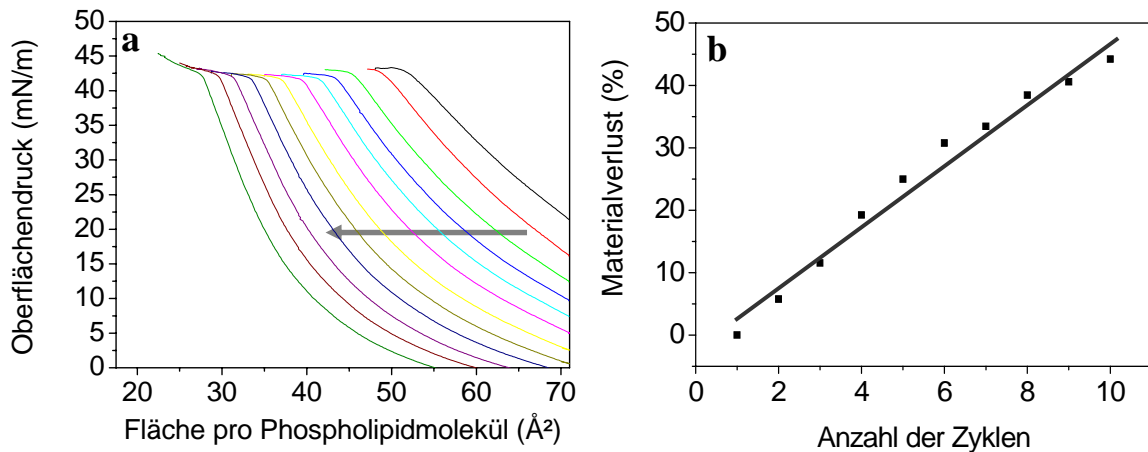


Abbildung 7.2 (a) Wiederholte Komprimierung und Expansion des hydrophoben Extraktes aus einer *d-ko*(ARDS) Maus. Zur besseren Darstellung werden im Druck/Flächen-Diagramm nur die Isothermen während der Kompression gezeigt. Der graue Pfeil präsentiert die aufsteigende Zyklenzahl. (b) Das Diagramm stellt den Materialverlust während der 10 Zyklen dar.

Durch Verlust von Lipiden und Proteinen des hydrophoben Extraktes kann eine Verschiebung der Kompressionsisothermen zu kleineren molekularen Flächen beobachtet werden. Die Lipide und Proteine lösen sich bei hohen Oberflächendrücken in der Subphase und stehen zum Einbau in den Lipid/Protein-Monofilm während der folgenden Kompression nicht mehr zur Verfügung. Wird der Flächenwert der ersten Isotherme bei einem Druck von 30 mN/m als 100 Prozent angesehen, können die Flächenverschiebungen durch Materialverlust der nachfolgenden Kompressionen als prozentuale Anteile angegeben werden (Abb. 7.2).

Aus den Kompressionsisothermen sowie dem linearen Anstieg der verdrängten Fläche mit ansteigender Zyklenzahl lässt sich ein nahezu konstanter Verlust der Lipide und Proteine des hydrophoben Extraktes aus der *d-ko*(ARDS) Maus erkennen (Abb. 7.2). Ein analoges Verhalten ist auch beim hydrophoben Extrakt aus der *H-ko*(ARDS) und der *d-ko*(ARDS) Maus zu beobachten. Die Materialien der anderen Mäusetypen nähern sich dagegen einem asymptotischen Grenzwert an, unabhängig von einer ARDS-Infektion (Abb. 7.3). Bei diesen Werten sind die Hysteresen nahezu deckungsgleich und es wird kein weiteres Material mehr in die Subphase verdrängt.

Nur der hydrophobe Extrakt der *H-ko* Maus weist den Einfluss der ARDS-Infektion nach, da nur dieses Material signifikante Änderungen im Vergleich zum hydrophoben Extrakt der unbehandelten Maus zeigt. Mit etwa 35 % der verdrängten Fläche bei 30 mN/m liegt der Materialverlust wesentlich niedriger im Vergleich zu den anderen Mäusetypen, unabhängig von der ARDS-Infektion. Hier kommt es zu einer Verringerung der Fläche um 40-50 % bezogen auf die Ausgangsfläche (Abb. 7.3).

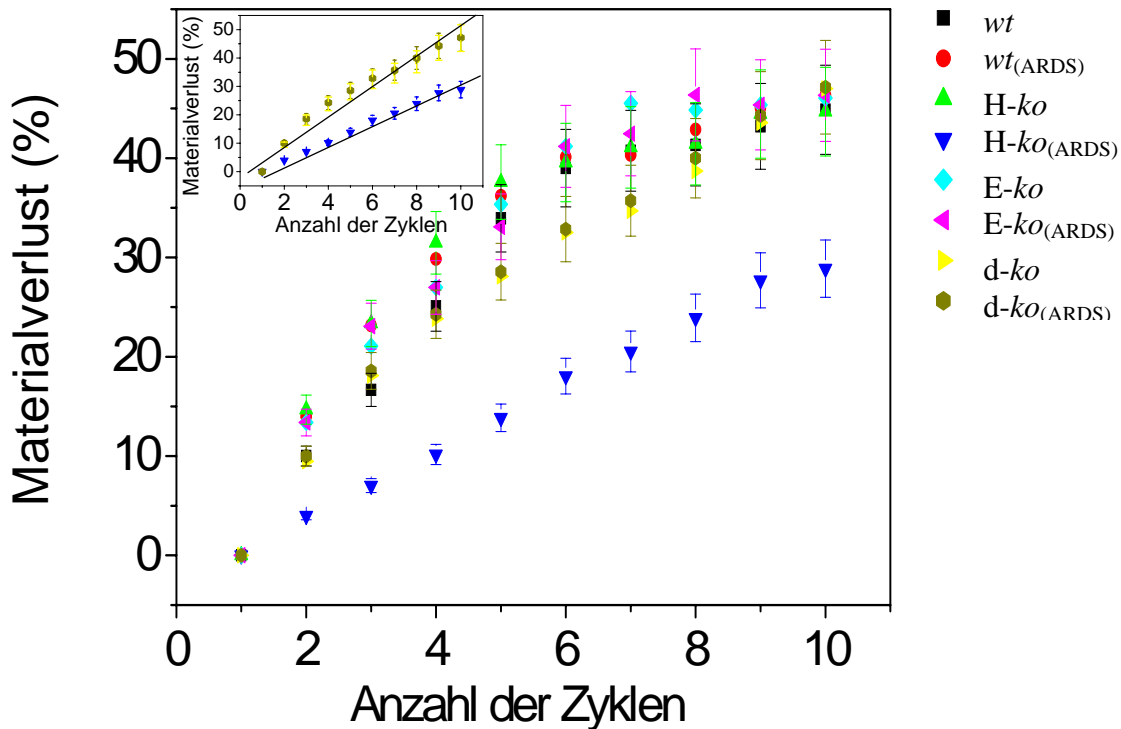


Abbildung 7.3 Darstellung der verdrängten Fläche in Abhängigkeit der Kompressions- und Expansionszyklen unterschiedlicher Mäusetypen, die mit und ohne LPS-Lösung behandelt worden sind. Das Inlett präsentiert die lineare Abhängigkeit des Verlustes von Lipiden und Proteinen während der Kompression und Expansion des hydrophoben Extraktes aus *d-ko*(\pm ARDS) und *H-ko*(ARDS).

7.3 Diskussion und Zusammenfassung

Die Bestimmung der Lipid/Protein-Verhältnisse und die anschließende Untersuchung des Kompressionsverhaltens zeigen die Auswirkungen des ARDS auf die Komposition und Funktion des hydrophoben Extraktes aus *wt*, *E-* und *H-* und *d-ko* Mäusen.

Eine Veränderung der Surfactant Protein und Phospholipidzusammensetzung der bronchoalveolaren Lavage tritt im Falle des ARDS auf. So wird häufig von einer geringeren Konzentration des SP-A, SP-B und SP-C in extrazellulären, alveolaren Lungensurfactant im Vergleich zu den Kontrolltieren berichtet [3-6]. Die Veränderungen gehen mit abnormaler Oberflächenaktivität des Surfactant und Veränderungen des alveolaren Gewebes einher [7].

Hierbei muss beachtet werden, dass das ARDS in unterschiedliche Phasen unterteilt werden kann [8]. In der akuten Phase werden vasoaktive Substanzen (Substanzen, die den Gefäßtonus beeinflussen), wie z.B. Sauerstoffradikale, Prostaglandine (Schmerz-, Entzündungs- und Fieber-Botenstoffe) und Gerinnungsfaktoren freigesetzt. Dadurch kommt es zur Schädigung der alveolkapillären Membran mit Permeabilitätsstörung, interstitiellen bzw. intraalveolären Lungenödem und Ausbildung hyaliner Membranen. Die anschließende subakut chronische oder auch proliferative Phase ist gekennzeichnet durch auftretende Lungenfibrose (Umbau des Lungengewebes in Bindegewebe mit anschließender Vernarbung). Im Endstadium, in dem Atelektasen und Mikrozirkulationsstörungen auftreten, kommt die Sekretion des Surfactant auf Grund der Zerstörung der Typ II Pneumozyten fast vollständig zum Erliegen. Die Ergebnisse der Analyse des hydrophoben Extraktes geben diesen Krankheitsverlauf wieder. Die beiden hohen Lipid/Protein-Verhältnisse aus *wt*_(ARDS) Mäusen beschreiben den Ausbruch der bakteriellen Infektion. Dieser ist gekennzeichnet durch einen geringen Rückgang des SP-B und SP-C bei angestiegener Phospholipidkonzentration. Indem die Surfactant-Synthese stimuliert wird steuert der Organismus der bakteriellen Infektion entgegen.

Bei einem niedrigen Lipid/Protein-Verhältnis, welches im hydrophoben Extrakt einer *d-ko*_(ARDS) Maus und *wt*_(ARDS) Maus gemessen worden ist, sollte die Krankheit soweit fortgeschritten sein, dass ein Großteil der Typ II Pneumozyten beschädigt ist. Dadurch ist die Synthese des Lungensurfactant nicht mehr gewährleistet. In dieser Phase sind nur noch niedrige Konzentrationen der essentiellen Phospholipide des Surfactants in der Lunge und damit auch nach der Isolierung im hydrophoben Extrakt vorhanden.

Maßgeblich an der Verminderung der Phospholipidkonzentration sind die für die Reduzierung der Oberflächenspannung essentiellen Lipide PG und PC beteiligt. Während für das PC ein Rückgang von 18 % bestimmt werden konnte, war die Reduzierung des PG-Anteils mit 56 % in der Lavage von ARDS Patienten im Vergleich zu gesunden Menschen wesentlich gravierender. Diese Veränderungen gehen einher mit

der unzureichenden Fähigkeit des Lipid/Protein-Gemisches niedrige Oberflächenspannungen zu bilden. Das ist auf die relative Zunahme der als *minor components* bekannten Lipide PE, PS, PI und Lyso-PC zurückzuführen [4-6].

Mäuse, die mit LPS-Lösung behandelt worden sind, weisen eine kontinuierliche Abnahme des Phospholipidgehalts in der bronchoalveolaren Lavage auf [9]. Diese Verringerung ist konform mit den gemessenen niedrigen Lipid/Protein-Verhältnissen des hydrophoben Extraktes aus der *d-ko*_(ARDS) Maus mit 70 ± 11 und 157 ± 16 mol/mol aus der *wt*_(ARDS) Maus (Abb.7.0). Für unbehandelte Mäuse dieses Typs sind Verhältnisse von etwa 300 bzw. 500 Molekülen Phospholipiden zu einem Molekül Surfactant Protein bestimmt worden. Zusätzlich weisen Untersuchungen mit dem LPS induzierten ARDS Mausmodell nur geringe signifikante Änderungen der Proteinkonzentration bis 12 h nach der Verabreichung auf. Anschließend folgt jedoch eine extreme Zunahme nach Verabreichung innerhalb der bronchoalveolaren Lavage (bis 96 h) [9]. Diese Quantifizierungen der Protein-Konzentration unterstützt zusätzlich die niedrigen Verhältnisse der hydrophoben Extrakte.

Die Verhältnisse der hydrophoben Extrakte aus zwei *d-ko*_(ARDS) und den *E-ko*_(ARDS) Mäusen sind denen der unbehandelten Tiere ähnlich (Kapitel 5.2, 4.2). Mit diesen Tieren konnte kein Einfluss der LPS-Lösung, als Modell des ARDS, auf die Zusammensetzung des hydrophoben Extraktes dargestellt werden.

Zur Untersuchung der Wirkung des ARDS auf die Funktion des hydrophoben Extraktes aus *wt* Mäusen an der Luft/Wasser-Grenzfläche wurden die Materialien von jeweils einer unbehandelten und behandelten Maus komprimiert und expandiert. Die Isothermen zeigen nur geringe Unterschiede dar, die im Rahmen der Messungenauigkeit liegen. Der Grund hierfür ist, dass die Infektion und die damit verbundene Zerstörung des Lungensurfactant noch nicht so weit fortgeschritten ist, dass die Veränderungen mit der Filmwaage detektierbar sind.

Die Abhängigkeit des Kompressions- und Expansionsverhalten zu dem Lipid/Protein-Verhältnis, und damit zu der physischen Verfassung des Tieres, konnte mit dem hydrophoben Extrakt einer behandelten *d-ko* Maus unterstützt werden. Die durch LPS induzierte Entzündung des Surfactantfilms war vermutlich weit fortgeschritten und

fürte zu einem niedrigen Lipid/Protein-Verhältnis (70 ± 12 mol/mol). Die Kompression dieses hydrophoben Extraktes führte zum Fehlen des Plateaus bei hohen Oberflächendrücken (Abb. 7.4).

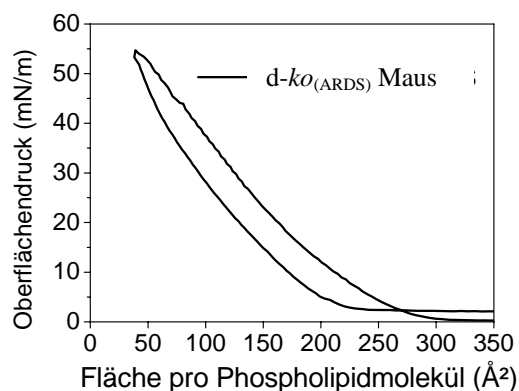


Abbildung 7.4 Isotherme des hydrophoben Extraktes einer *d-ko* Maus unter dem Einfluss des ARDS

Durch die niedrigere Kompressionsgeschwindigkeit, im Vergleich zu den in Kapitel 4 aufgeführten Isothermen, weist der hydrophobe Extrakt aus der *d-ko*(ARDS) Maus die Bildung des Plateaus bei hohen Oberflächendrücken auf (Abb. 7.2 **a**). Außerdem ist eine Verschiebung zu kleineren molekularen Flächen während der wiederholten Kompression und Expansion zu beobachten (Abb. 7.2 **b**). Die daraus resultierende Flächenverdrängung tritt auf Grund des *squeeze-out* von fluiden, ungesättigten Lipiden aus der Monoschicht im Plateaubereich auf. Da das Material während der Expansion in die Monoschicht nicht wieder inkooperiert, steht es somit für die erneute Kompression des Oberflächenfilms nicht mehr zur Verfügung [10, 11].

Die Kompressions- und Expansionshysterese beider hydrophober Extrakte aus *d-ko*(\pm ARDS) Mäusen zeichnen sich durch einen linearen Materialverlust aus (Abb. 7.3). Hierfür verantwortlich sind sowohl das fehlende H-FABP als auch das E-FABP. E-FABP zeichnet sich durch eine hohe Bindungsspezifität zu gesättigten Fettsäuren aus, während H-FABP eine hohe Affinität gegenüber langkettigen, ungesättigten Fettsäuren (n-6) besitzt [13]. Auf Grund der fehlenden Transportfunktion des E- und H-FABP innerhalb der Typ II Pneumozyten in *d-ko* Mäusen können diese Fettsäuren nicht für die Lipidsynthese verwendet werden. Hierdurch verändert das Surfactant seine Komposition, so dass der isolierte hydrophobe Extrakt extrem instabil bei hohen

Oberflächendrücken ist. Dieses verdeutlicht sich durch einen kontinuierlichen Materialverlust in der Subphase während der wiederholten Kompression und Expansion.

Der hydrophobe Extrakt des H-*ko*_(ARDS) Typs zeigt eine geringere Flächenverdrängung mit 28 % im Vergleich zu den anderen Mäusetypen, unabhängig davon, ob diese mit LPS-Lösung behandelt worden sind (Abb. 7.3). Eine Erklärung hierfür ist die fehlende Transportfunktion des H-FABP innerhalb der Lungenfibroblasten. H-FABP ist in diesen Zellen in größeren Mengen quantifiziert worden. [12]. Da die Fibroblasten verstärkt bei Reparaturprozessen auftreten und dabei die Typ II Pneumozyten mit Lipidsubstraten versorgen, könnte die verminderte Synthese der Lipidsubstrate durch das fehlende H-FABP einen Einfluss auf den Reparaturprozess des Lungensurfactant während der induzierten bakteriellen Infektion haben.

Eine weitere mögliche Ursache für die unterschiedliche Oberflächenaktivität des hydrophoben Extraktes aus behandelten H-*ko* Mäusen ist die oben beschriebene Bindungsspezifität des H-FABP gegenüber langkettigen, ungesättigten Fettsäuren (n-6) [12]. Aufgrund fehlender Transportfunktion des H-FABP können diese Fettsäuren nicht als Bausteine für die Lipidsynthese verwendet werden. Die geringere kontinuierliche Flächenverdrängung durch den verminderten Anteil an fluiden, ungesättigten Lipiden im hydrophoben Extrakt ist aus diesen Gründen erklärbar.

Einen Hinweis auf die fehlende Elastizität und Fluidität des H-*ko* Surfactantfilms konnte im Tierversuch bestätigt werden. Bei dieser Untersuchung wurde eine Änderung des zur Lunge gehörenden (pulmonalen) Druckgradienten induziert.

Der Druckgradient führt zu einer Zu-/Abnahme des Lungenvolumens. Die Dehnung bzw. Schrumpfung der Lunge ist abhängig von der Größe sowie den Gewebeeigenschaften des Organs. Das Verhältnis zwischen der Veränderung des Lungenvolumens und der Druckdifferenz, die diese Veränderung bewirkt, wird als respiratorische Compliance C bezeichnet. Die Compliance ist ein Maß für die Elastizität der Lunge. Je elastischer die Lunge (und der Thorax), d.h. je größer die Veränderung des Lungenvolumens pro Einheit der Druckdifferenz, um so größer ist die Compliance.

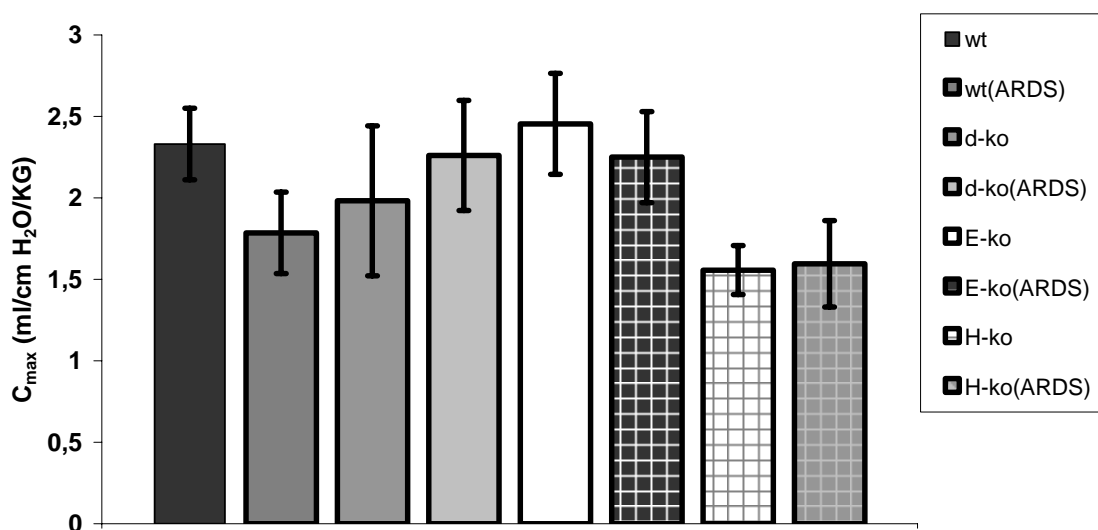


Abbildung 7.5 Compliancemessungen von *wt* und genetisch modifizierter Mäusen. Die Mäuse sind sowohl mit als auch ohne Behandlung von LPS-Lösung vermessen worden.

Untersuchungen von B. Lachmann¹, der die maximale Lungencompliance von verschiedenen Mäusetypen sowohl mit als auch ohne induziertem ARDS analysierte, wiesen keine signifikanten Änderungen in der Dehnbarkeit der Lunge der *d-ko* Mäuse und *E-ko* Mäuse auf. Die erkrankten *wt*(ARDS) Mäuse besitzen eine geringere Dehnbarkeit der Lunge im Vergleich zu den gesunden Tieren, jedoch ist kein signifikanter Unterschied zu den *d-ko*(ARDS) Maus und *E-ko*(ARDS) Maus zu beobachten. Nur der Mittelwert der Compliance der Lunge des *H-ko* Typs ist in der Gegenüberstellung zu den anderen wesentlich niedriger, welches durch die fehlende Elastizität und Fluidität erklärbar ist. (Abb. 7.5).

Im Vergleich zu den Filmwaagemessungen, bei dem die hydrophoben Extrakte der *H-ko*(± ARDS) Mäuse ein anderes Kompressions- und Expansionsverhalten an der Luft/Wasser-Grenzfläche durch die LPS-Lösung aufwiesen, zeigen die Messungen der *H-ko* Mäuse unabhängig von dem ARDS gleiche Eigenschaften, d.h. nahezu identische Compliancewerte.

Grundsätzlich führt das induzierte ARDS zu großen Abweichungen in der Komposition des hydrophoben Extraktes aus *wt* und *d-ko* Mäusen. Eine gesteigerte Synthese der Phospholipide, induziert durch das ARDS in Form eines erhöhten Protein/Lipid-Verhältnisses, konnte nur in zwei *wt* Mäusen detektiert werden.

¹ Institut für Anästhesiologie, Erasmus University, Rotterdam, Niederlande

Eine Aufwertung des *d-ko* Effektes durch Stimulierung der Phospholipidsynthese innerhalb der Typ II Pneumozyten durch das ARDS in *d-ko* Mäusen konnte nicht manifestiert werden. Gründe hierfür sind die nicht reproduzierbaren Krankheitsverläufe, die sowohl die Komposition als auch die Funktion des hydrophoben Extraktes an der Luft/Wasser-Grenzfläche beeinflussen. Lediglich der hydrophobe Extrakt der *H-ko* Maus konnte einen Einfluss des ARDS beweisen.

8. Abschlussdiskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurde in unterschiedlichen Modellsystemen der Einfluss der Lungensurfactantkomposition auf die korrekte Funktion biophysikalisch untersucht. Mit einem *in vitro* Modellsystem konnte der Einfluss von Cholesterol und 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin (POPE) auf ein Lipid- und Lipid/Protein-Film gezeigt werden, während zur Untersuchung der Veränderungen des Gesamtsurfactant ein *in vivo* Extrakt als Modellsystem verwendet wurde [1]. Mit Hilfe dieser Systeme konnte die enge Korrelation zwischen dem Lipidmetabolismus, der strukturellen Organisation und der dazugehörigen korrekten Funktion des alveolaren Lungensurfactant aufgeführt werden.

Das Lungensurfactant ist ein komplexes Lipid/Protein-Gemisch. Die einzelnen Komponenten beeinflussen den Surfactantfilm in der Struktur, Elastizität und Funktion. Über die Aufgabe des *minor components* POPE und des neutralen Lipids Cholesterol innerhalb des Lungensurfactant ist wenig bekannt. Nur für Cholesterol konnte gezeigt werden, dass die Beimischung dieses neutralen Lipids zum Lungensurfactantextrakt aus Kälbern einer Vergrößerung der Protrusions induziert [2].

Innerhalb dieser Arbeit wurde der Einfluss von POPE und Cholesterol auf ein Modellsystems des Lungensurfactants bestehend aus der Lipid/Protein-Mischung 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholin (DPPC)/1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylglycerol (DPPG)/Surfactant Protein (SP)-C (80:20:0,4 mol %) untersucht. Als Referenz wurde das proteinfreie System DPPC/DDPG (80:20 mol %) verwendet (Kapitel 3). Cholesterol stabilisiert Lipiddoppelschichten und soll ihre Bildung fördern, während POPE auf Grund der Geometrie des Moleküls die mizellartigen Randbereiche der Protrusions stabilisieren soll und so die Struktur der Lipiddoppelschichten beeinflusst.

Mittels der Filmwaagetechnik konnte der in der Literatur bekannte fluidisierende Einfluss von POPE bei niedrigen Oberflächendrücken verdeutlicht werden [3, 4]. Die Untersuchungen mit dem Fluoreszenzmikroskop zeigten, dass POPE die

Phasenübergänge flüssig expandiert (l_e)/flüssig kondensiert (l_c) stabilisiert. Die l_e Domänen bestehen vermutlich aus hohen POPE reichen Regionen, da die ungesättigte Fettsäure zu einer weniger dichten Packung der POPE Moleküle im Vergleich zu Phospholipiden mit gesättigten Fettsäuren führt. Diese geringe Packungsdichte ermöglicht die Einlagerung der Fluoreszenzsonde. Der Anteil der l_e Phasen ist zusätzlich konzentrationsabhängig, da mit zunehmendem POPE-Anteil sowohl im Lipidsystem als auch im Modellsystem des Lungensurfactant die Fläche der l_e Phase ansteigt.

Mit Hilfe der Raster-Kraft-Mikroskopie (SFM) konnte gezeigt werden, dass die für das Lungensurfactant charakteristischen Multischichten durch POPE beeinflusst werden können. POPE stabilisiert die inneren mizellartigen Randbereiche und führt hierdurch zu einer verstärkten Formierung von Multischichten im Plateaubereich. Außerdem sind die Multischichten wesentlich kleiner in der Fläche im Vergleich zu den Protrusions des Modellsystems. Grundlage für die Stabilisierung der Randbereiche der Protrusions ist die Geometrie des POPE. Aufgebaut aus einer Ölsäure und einer Palmitinsäure besitzt es einen voluminösen hydrophoben Molekülteil, während der hydrophile Anteil auf Grund der Ethanolamin-Kopfgruppe relativ klein ist. Wird die Geometrie des Lipids berücksichtigt, so müssten auch Moleküle wie 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholin (POPC) oder 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin (DPPE), welche ebenfalls eine inverse Kegelstruktur zeigen, zu den ähnlichen Ergebnissen führen.

Es ist zu beachten, dass POPE auf Grund der negativen Ladung des Carbonylsauerstoffs und der positiven Ladung der Aminofunktion insgesamt neutral vorliegt. Die basischen Reste Lysin 11 und Arginin 12 des SP-C können mit den negativen Ladungen der Phospholipide wechselwirken [5]. Da jedoch die positive Ladung der Aminofunktion diese Wechselwirkung schwächt, ist eine bevorzugte Lokalisation des POPE innerhalb der Multischichten direkt am SP-C nicht sehr wahrscheinlich.

Die einzelnen Protrusions werden in ihrer Fläche reduziert, während ihre Anzahl steigt. Ursache ist die Verringerung der durchschnittlichen Fläche der SP-C-reichen Bereiche. Auf Grund der Stabilisierung der Grenze zwischen der l_e und l_c Phase durch das POPE wird ein höheres Verhältnis Umfang/Fläche induziert. Diese Vergrößerung des

Umfangs mit steigender Protrusionanzahl wird durch die Analyse der Gesamtfläche der Protrusions im Vergleich zum Modellsystem bestätigt. Die Zugabe von 30 mol % POPE führt zu einer Bedeckung von ~23 % der Gesamtfläche durch Protrusions, wobei das Modellsystem ~20 % vorweist.

Obwohl die Stabilisierung der l_e/l_c Phasengrenzen auf das Phospholipidmolekül POPE zurückzuführen ist, wird hauptsächlich für die Stabilität die Geometrie des Moleküls verantwortlich gemacht. Folglich sollten Lipide mit ähnlicher Struktur wie das DPPE oder POPC den gleichen Effekt zeigen.

Interessant bleiben weiterhin die äußeren mizellartigen Randbereiche der gebildeten Lipiddoppelschichten in den Protrusions (Abbildung 3.7 b), da dort eine zu der Geometrie des POPE inverse Struktur optimal wäre. Eine solche Struktur würde aus einer relativ voluminösen Kopfgruppe, wie z.B. Cholin, in Kombination mit nur einer gesättigten Fettsäurekette, wie z.B. die Palmitoyle Säure, gebildet. Ein Molekül, das sich auch im natürlichen Surfactant befindet und diese Bedingungen erfüllt, ist das Lyso-PC. Dieses müsste analog zum POPE zu kleineren Multischichten im Plateaubereich führen. Allerdings sollte die Beimischung von Lyso-PC sich verstärkt in der Höhe der Protrusions ausdrücken, da die äußeren Randbereiche wahrscheinlich einen größeren Einfluss auf die Höhen der Multischichten haben.

Auch die Untersuchung der Kombination beider Komponenten innerhalb des Modellsystems des Lungensurfactant wäre von Interesse. Dabei könnten Synergie- oder inhibitorische Effekte der Lipide beobachtet werden. Die Synergieeffekte sollten die Protrusions erhöhen und in ihrer Fläche verringern. Das Lyso-PC würde sich positiv auf die Höhe auswirken, wohin gegen POPE die Flächenverkleinerung begründen würde. In Gegensatz dazu ließe sich die Beeinträchtigung in der Formierung der Multischichten auf die inhibitorischen Effekte zurückführen. So könnte Lyso-PC die Formierung von Mizellen [6] bei der Protrusionbildung fördern und zu hohem Materialverlust im Plateaubereich der Isotherme führen. Dieser Effekt kann sich negativ auf die Bildung von Multischichten auswirken und sie dadurch verringern. Zusätzlich ist es nicht gesichert, dass sich Lyso-PC nur in den mizellartigen Randbereichen einlagert. Denn insbesondere bei hohen Konzentrationen ist davon auszugehen, dass sich die auftretende Inkooperation in die Lipiddoppelschichten negativ auf ihre Stabilität auswirkt.

Wichtige Informationen bzgl. der Lokalität der Phospholipide könnten mit Hilfe der Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (ToF-SIMS) erhalten werden. Indem die Intensität von verschiedenen Molekülfragmenten an unterschiedlichen Orten bestimmt wird, kann auf deren laterale Verteilung geschlossen werden. Diese Technik wurde erfolgreich in Untersuchungen am Modellsystem des Surfactant durchgeführt. Hierbei wurde das SP-C in der l_c Phase des Lipid/Protein-Gemisches identifiziert [8]. Bei der Untersuchung der *minor components* innerhalb des Modellsystems wäre das Ziel, diese Phospholipide zu lokalisieren und deren Funktion mit dem Protrusion-Modell (Abb. 3.7) aufzuklären.

Der in der Literatur bekannte kondensierende Effekt des Cholesterols [8-10] konnte durch die Verschiebung der Lipid- und Lipid/Protein-Isothermen zu kleineren molekularen Flächen beobachtet werden. Mit der Fluoreszenz-Mikroskopie (FM) konnte gezeigt werden, dass mit steigenden Cholesterolkonzentrationen die Flächenanteile der l_c Domänen innerhalb des Lipid- und Lipid/Protein-Gemisches reduziert werden (Abb. 3.3 **bc**). Cholesterol lagert sich zwischen den Phospholipiden ein und beeinträchtigt deren Kondensierung. So wird die Löslichkeit der Fluoreszenzsonde durch das Cholesterol erhöht.

Im Modellsystem mit einem Gehalt von 10 mol % Cholesterol konnte die Aussage bestätigt werden, dass Cholesterol die Doppelschichten stabilisiert. Cholesterol induziert eine Vergrößerung der Fläche der Protrusions im Vergleich zum reinen Modellsystem. Jedoch sind die Multischichten im Vergleich zu den Protrusions des Modellsystems mit maximal drei übereinander folgenden Lipiddoppelschichten wesentlich flacher. 30 mol % Cholesterol innerhalb des DPPC/DPPG/SP-C-Film führt zu einer Hemmung der Bildung von Multischichten. Diese Störung kann durch die Bildung von Cholesterolkristallen, aber auch durch die hohe Konzentration an Cholesterolmolekülen erfolgen. Weiterhin ist es möglich, dass, insbesondere bei 30 mol % Cholesterol, die starke Beeinträchtigung der Kondensierung der Phospholipide zu Übertragungsartefakten beim Langmuir-Blodgett-Transfer führt. Dies erklärt zusätzlich zu den oben genannten Gründen den geringen Bedeckungsgrad mit Protrusions. Der Bedeckungsgrad liegt bei ~5% im Vergleich zu ~27% bei 10 mol % Cholesterol. Die Ergebnisse mit 10 mol % Cholesterol sind konform mit dem kürzlich gezeigtem Einfluss des Cholesterols auf das natürliche Surfactant. Die Beimischung

dieses neutralen Lipids zum hydrophoben Extrakt aus Kälberserum führte zu einer Vergrößerung der Protrusions [2]. Die Übereinstimmung der Ergebnisse des Modellsystems mit den Untersuchungen des hydrophoben Extrakt aus Kälbern unterstreicht die Analogie der beiden Systeme. Die Vergleichbarkeit der Systeme basiert auf deren Zusammensetzung. Das Modellsystem besteht aus DPPC/DPPG/SP-C (80:20:0,4 mol %), während im hydrophoben Extrakt PC mit 61 Gew.% und PG mit 15 Gew.% [11] vorhanden ist. Basierend auf den vergleichbaren Ergebnissen und ähnlichen Zusammensetzungen zeichnet sich das DPPC/DPPG/SP-C-Gemisch als hervorragendes Modell zur Untersuchung des Lungensurfactant aus.

Mit einem *in vivo* Modellsystem konnten Unterschiede zwischen der doppel-*knock out* (*d-ko*) Maus und der wildtyp (*wt*) Maus in der Komposition und Funktion des hydrophoben Extraktes identifiziert werden. Die Ergebnisse der Filmwaage-, Fluoreszenz-Mikroskopie (FM)- und Raster-Kraft-Mikroskopie (SFM)-Messungen korrelierten mit dem biochemischen Phänotyp. Es wurde eine reduzierte Palmitat-Aufnahme, β -Oxidation und ein reduzierter Einbau von markierter Palmitinsäure in Di- und Triglyceride in isolierten Typ II Pneumozyten gemessen [12]. Der hydrophobe Extrakt aus einer *d-ko* Maus zeigte auf Grund des reduzierten Lipid/Protein-Verhältnisses, welches konform ist mit dem biochemischen Phänotyp, eine unzureichende Ausbildung des Plateaus in der Isotherme. Die Untersuchung des Plateaus mit der SFM-Technik identifizierte eine Störung in der Formierung von Multischichten des hydrophoben Extraktes aus *d-ko* Mäusen. Außerdem konnte ein unterschiedliches Phasenverhalten im Vergleich zum Material des *wt* nachgewiesen werden.

Verantwortlich für das reduzierte Lipid/Protein-Verhältnisses ist die verminderte Phospholipidsynthese, da Expressionsstudien nur eine Hochregulierung der hydrophilen SP identifizierten. Die Expression der hydrophoben SP in der *d-ko* Maus und der *wt* Maus sind vergleichbar [13]. Das unterschiedliche Kompressionsverhalten basiert auf der erhöhten Proteinkonzentration. Der angestiegene SP-Anteil im hydrophoben Extrakt aus *d-ko* Mäusen führt zu einer Verschiebung der Isotherme zu größeren Flächen und induziert die Störung in der Ausbildung des Plateaus bei hohen Oberflächendrücken. Der Grund für die unzureichende Ausbildung liegt im *squeeze-out* Prozesses, welcher das Herausdrücken von fluiden Lipide aus der Monoschicht beschreibt [14]. Durch den

verminderten Phospholipidanteil im hydrophoben Extrakt aus *d-ko* Mäusen werden weniger fluide Lipide aus der Monoschicht herausgedrückt. Dies ist an der ungenügenden Ausbildung des Plateaus zu erkennen.

Die nähere Untersuchung des veränderten Druck/Flächen-Verhaltens mit der SFM-Technik hat den unzureichenden *squeeze-out* Prozess bestätigt. Im Vergleich zum hydrophoben Extrakt aus der *d-ko* Maus weist das Material der *wt* Maus größere, runde Multischichten im Plateaubereich der Isotherme auf. Des Weiteren ist ihre Anzahl erhöht. In welchem Maße die Abweichungen der Konzentrationen einzelner Phospholipide vom Material der *wt* Mäuse Auswirkungen auf die Eigenschaften an der Luft/Wasser-Grenzfläche haben kann soll an dieser Stelle diskutiert werden. Sicherlich führen insbesondere Veränderungen des DPPC-Anteils zu großen Unterschieden im Kompressions- und Phasenverhalten sowie in der Ausbildung der Protrusions. Bestätigt wurde dies, indem die hydrophoben Extrakte aus *d-ko* Mäusen mit der FM untersucht wurden. Sie wiesen einen verminderten l_c Anteil, der hauptsächlich aus DPPC besteht, auf [7]. Die Vermutung, dass für die Ausbildung der Protrusions eine gewisse Festigkeit, d.h. eine ausgeprägte l_c Phase vorhanden sein muss, würde die verminderte Protrusionbildung erklären.

Im Gegensatz dazu wurde aufgezeigt, dass die Erhöhung des Lipid/Protein-Verhältnisses im Material aus *d-ko* Mäusen zur Ausbildung des Plateaus führt. Hierbei ist es unwahrscheinlich, dass lediglich eine Phospholipidkomponente im hydrophoben Extrakt bevorzugt angereichert worden ist. Wahrscheinlich ist vielmehr, dass Synergieeffekte der einzelnen Lipide die Ausbildung des Plateaus induzieren. Diese Fragestellung könnte beantwortet werden, indem exogene Lipide zum hydrophoben *d-ko* Extrakt mit niedrigen Lipid/Protein-Verhältnis beigemischt werden. Es ist wahrscheinlich, dass die Angleichung des Lipid/Protein-Verhältnisses zu einer Funktion des hydrophoben Extraktes führt, welches dem des *wt* entspricht. Zur Überprüfung bedarf es jedoch weiterer Experimente.

Die Ergebnisse im Kapitel 4 werden durch molekularbiologische Ergebnisse gestützt. Hierbei wird vermutet, das Epidermal (E)- und Herz (H)-Fettsäurebindungsproteine (FABP) ein Reservoir an Fettsäuren bilden, welches die hinreichende Synthese von Phospholipide in den Typ II Pneumozyten gewährleistet. Des Weiteren kann diese

verminderte Konzentration an Fettsäuren einen Einfluss auf die FABP vermittelte Genregulierung haben. Bei der Genregulierung sind Fettsäuren als Liganden der FABPs gebunden. Die Fettsäuren dienen als Agonisten der Proliferator aktivierten Rezeptoren (PPARs) und sind damit als Botenstoffe für die Transkription der mit DNA-Erkennungsdomänen (PPRE) ausgestatteten Gene verantwortlich. Hierzu zählen u.a. die Acyl-CoA Synthase [15], Lipoproteinlipase [16] und die Phosphoenolpyruvat-carboxykinase (PEPCK) [17]. Ausgehend von der Annahme, dass durch das Fehlen des E- und H-FABP vermindert Proteine exprimiert werden, kann die verminderte Phospholipidsynthese durch den Mangel der Bereitstellung von Fettsäuren, aber auch durch fehlende Transkription auftreten.

Die Beantwortung der Fragestellung, welches der beiden FABPs, E- oder H-Typ, essentiell ist für den Phänotyp, d. h. für die veränderte Funktion und Komposition des Surfactant, stand in Kapitel 5 im Vordergrund. Die Zusammensetzung und das Kompressionsverhalten zeigten, dass E-FABP für das reduzierte Lipid/Protein-Verhältnis verantwortlich ist, welches sich in der unzureichenden Ausbildung des Plateaus manifestierte. Zur vollständigen Charakterisierung des *E-ko* und *H-ko* Surfactant müssen noch zusätzliche SFM- und FM-Untersuchungen folgen. Wahrscheinlich sollte sich hier ein ähnlicher Vergleich wie *wt* und *d-ko* Maus einstellen, es bedarf allerdings weiterer Experimente zum Beweis.

Für die Veränderung des Surfactant durch die E-FABP Gendeletion sprechen zwei Faktoren: Der erste Faktor ist die Bindungsselektivität des E-FABP für langkettige, gesättigte Fettsäuren [18]. Durch den fehlenden E-FABP Transport stehen diese nicht mehr zur Phospholipidsynthese zur Verfügung. DPPC wird eine besondere Rolle im *squeeze-out* Prozess und der Reduzierung der Oberflächenspannung zugesprochen [11]. Folglich sollte eine verminderte Lipidsynthese mit gradzahligen langkettigen Fettsäuren, wie z.B. bei der Bildung des DPPC, verantwortlich sein für die unzureichende Funktion des Surfactant. Eine Quantifizierung der einzelnen Phospholipide und der gebundenen Fettsäuren mit der Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie (HPTLC) und Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) könnten Aufschluss darüber geben. Der zweite Faktor basiert auf die Quantifizierung des E- und H-FABP in den Typ II Pneumozyten. [19, 20]. Während E-FABP in großen Mengen dort detektiert werden konnte, wurde H-FABP nur in Spuren nachgewiesen.

Eine verstärkte Teilnahme des E-FABP als Transporter für Fettsäuren, die in der Surfactant-Synthese eingesetzt werden, ist daher wahrscheinlich.

Thiazolidindione, wie Pioglitazon, sind selektive Agonisten des PPAR γ Isoform und können über diese Isoform Lipid aufbauende und mobilisierende Reaktionen stimulieren. Die Aktivierung des PPAR γ erfolgt nach dem Konzept von Stremmel [21] über FAT [22], Plasma Membran FABP (FABP_{pm}) [23] und Calvoin-1. Alternativ ist aber auch eine Aktivierung mit Hilfe des L-FABP möglich [24].

In vorausgegangenen Arbeiten führte die *in vivo* Aktivierung der PPAR γ Zielgene durch Pioglitazon zu einer Aufhebung des biochemischen Phänotyps. So konnte die Palmitinsäureaufnahme, β -Oxidation und DPPC-Synthese in dem isolierten Typ II Pneumozyten der *d-ko* Mäuse wiederhergestellt werden [8, 13].

Die Bestimmung des Lipid/Protein-Verhältnisses und die biophysikalischen Untersuchungen des Surfactant aus diesen mit Pioglitazon behandelten Tieren konnten die durch den Wirkstoff induzierten Veränderungen des biochemischen Phänotyps bestätigen. Das Lipid/Protein-Verhältnis näherte sich an die Werte des *wt* an. Außerdem wies der hydrophobe Extrakt der behandelten *d-ko* Maus ein Druck/Flächen-Verhalten auf, welches im Gegensatz zum Material der unbehandelten *d-ko* Maus ein Plateau aufzeigt. Die Schulter bei einem Oberflächendruck von etwa 17 mN/m kann auf Grund der Komplexibilität des Systems verschiedene Ursachen haben. Vermutlich ist der erhöhte Proteingehalt innerhalb des hydrophoben Extraktes hierfür verantwortlich, da reines SP-B und SP-C auch in diesem Druckbereich ein ähnliches Verhalten zeigt [25]. Es ist aber auch möglich, dass diese Veränderung des Kompressionsverhaltens nur auf den Einfluss der Lipide zurückzuführen ist. Diese Annahme basiert auf Lipidmonofilmen, die zur Ausbildung von l_e/l_c Koexistenzgebieten fähig sind [26]. Die Bereiche manifestieren sich in der Isotherme in einem Plateau, welches sowohl in der Länge, als auch in der Höhe, durch die Temperatur und die Beimischung von geringen Mengen Lipiden, variabel ist. Dies bedeutet, dass zusätzlich zum Protein auch der Einfluss von Phospholipiden auf die Ausbildung der Schulter besteht. Außerdem muss noch bedacht werden, dass die Aktivierung des PPAR γ nur einen Einfluss auf die Speicherung von Fettsäuren und folglich auf die Synthese der Phospholipide hat [17]. Die hydrophoben sowie hydrophilen SP bleiben unberührt. Da bei der Kompression des

hydrophoben Extraktes aus der *d-ko* diese Schulter nicht auftritt, unterstützt dies die These, dass die Phospholipide für die Ausbildung der Schulter verantwortlich sind.

Weiterhin konnten mit der FM l_c Domänen dargestellt werden, die in ihrer Struktur eine Homologie zu den l_c Domänen des hydrophoben Extrakt aus der *wt* Maus aufweisen. Die vergleichbaren Domänen bestätigen die These, dass Pioglitazon die Lipidsynthese in den Typ II Pneumozyten stimuliert.

Im Plateau der Isotherme sind die Protrusions mit der SFM-Technik abgebildet worden. Diese zeigen eine unterschiedliche Struktur und Anzahl im Vergleich zum Material aus der *d-ko* Maus. Obwohl die Protrusions des hydrophoben Extraktes in der Fläche kleiner sind, weist auch hier die vergleichbare runde Form auf den Einfluss des Pioglitazon hin. Interessanterweise zeigen die Protrusions des hydrophoben Extraktes aus behandelten *d-ko* Mäusen Ähnlichkeiten mit den Multischichten eines DPPC/DPPG/SP-B-Gemisches (80:20:0,2 mol %) [27]. Hierbei muss die Frage beantwortet werden, welche neue Zusammensetzung das Lipid/Protein-Gemisch aufweist und ob dieses die Formierung solcher Multischichten begünstigt.

Der Einfluss des Atemnotsyndroms des Erwachsenen (ARDS) auf das Surfactant wurde in Kapitel 7 beschrieben. Hierbei wurde ein Mausmodell des ARDS verwendet, welches auf der Injektion einer Lipopolysaccharid (LPS)-Lösung in die Lunge basiert. Die induzierte Beeinflussung der Komposition und Funktion des Surfactant in Form des ARDS wurde am hydrophoben Extrakt untersucht. Da insbesondere zu Beginn der Entzündung die Surfactant-Produktion gesteigert wird, um der Infektion entgegen zu steuern, sollten Unterschiede im hydrophoben Extrakt der *wt* Mäuse und der genetisch modifizierten Mäuse deutlich nachweisbar sein. Die Grundlage für diese These ist die verminderte Phospholipidsynthese in den Typ II Pneumozyten der *d-ko* Mäuse.

Die gemessenen Lipid/Protein-Verhältnisse im hydrophoben Extrakt der $wt_{(ARDS)}$ und $d-ko_{(ARDS)}$ Mäuse weisen große Abweichungen auf. Diese können auf den unterschiedlichen Krankheitsverlauf zurückgeführt werden. Die hohen Lipid/Protein-Verhältnisse korrelieren mit dem Sachverhalt, dass der Körper zu Beginn der Infektion entgegen steuert, indem die Surfactant-Produktion gesteigert wird. Die niedrigen Verhältnisse beschreiben das fortgeschrittene Stadium der Infektion. Ein Großteil der

Typ II Pneumozyten ist zerstört und kann aus diesem Grunde die Surfactant-Synthese nicht mehr gewährleisten. Um den Zusammenhang des Krankheitsverlaufs mit den unterschiedlichen Lipid/Protein-Verhältnissen zu beweisen, bedarf es noch weiterer Untersuchungen. Dabei sollte die Anzahl der Versuchstiere erhöht werden, um die Ergebnisse statistisch abzusichern. Die höhere Anzahl an Versuchstieren ist nötig, um Beeinflussungen durch verschiedene Faktoren möglichst auszuschließen. Bei Untersuchungen von tierischem Material können verschiedene Faktoren wie Präparation, kompensatorische Effekte des Organismus, physische Verfassung des Versuchstieres und Haltungsbedingungen die Ergebnisse verfälschen.

Die Isothermen des hydrophoben Extraktes aus *wt* Mäusen mit und ohne ARDS zeigen keinen signifikanten Unterschied im Kompressions- und Expansionsverhalten. Es ist davon auszugehen, dass die Krankheit nicht soweit fortgeschritten ist, dass die Veränderungen der Komposition im Kompressionsverhalten detektierbar sind.

Bemerkenswert ist die Analogie der Compliancemesungen zu den Kompressions- und Expansions-Zyklen der Filmwaage Messungen. Über den Grund der signifikanten Abweichung des hydrophoben Extraktes aus der *H-ko*_(ARDS) Maus im Vergleich zu den anderen Mäusen soll hier diskutiert werden. Wahrscheinlich ist jedoch die präferentielle Bindung des H-FABP für ungesättigte (n-6) Fettsäuren [18] verantwortlich für die signifikante Veränderung im Druck/Flächen-Verhalten. Auf Grund der Gendelektion des H-FABP und den daraus resultierenden fehlenden Transports dieser ungesättigten Fettsäuren, können diese nicht für die Phospholipidsynthese verwendet werden. Der reduzierte Anteil an ungesättigten fluiden Lipiden manifestiert sich in dem geringen Materialverlust während der Kompressions- und Expansionszyklen.

Innerhalb der Lungenfibroblasten ist H-FABP in großen Mengen quantifiziert worden [19]. Diese Zellen treten verstärkt bei Reparaturprozessen auf und versorgen die Typ II Pneumozyten mit Lipidsubstrat. Die verminderte Bereitstellung von Lipidsubstrat, induziert durch die genetische Deletion des H-FABP, könnte somit bei Verletzungen des alveolaren Surfactant verstärkt in den Vordergrund treten. Dieses erklärt ferner das unterschiedliche Kompressions- und Expansionsverhalten des hydrophoben Extraktes aus den behandelten *H-ko* Mäusen.

Bemerkenswert ist jedoch, dass nur die hydrophoben Extrakte der *H-ko*_(ARDS) Mäuse signifikante Unterschiede im Druck/Flächen-Verhalten im Vergleich zu den anderen

Mäusen aufweisen. Dies führt in der Gegenüberstellung der beiden oben genannten Erklärungsansätze zu der Annahme, dass die eingeschränkte Funktion der Fibroblasten hierfür vermehrt verantwortlich ist.

Die Auswirkung der Repression des E- und H-FABP konnte in den Kompressions- und Expansionszyklen des hydrophoben Extraktes aus *d-ko* Mäusen dargestellt werden. Auf Grund der unterschiedlichen Komposition des hydrophoben Extraktes aus *d-ko* Mäusen im Vergleich zu *wt* Mäusen ist ein kontinuierlicher Materialverlust beobachtet worden. Dieser Verlust von Proteinen und Lipiden aus dem Oberflächenfilm in die Subphase ist unabhängig von der ARDS-Infektion. Folglich wird die veränderte Zusammensetzung des Surfactant, durch die Gendeletion des E- und H- FABP, nicht durch die ARDS-Infektion beeinflusst.

Die Untersuchungen unter Beimischung von Cholesterol und POPE zu einem artifiziellen Surfactant unterstützen die Interpretation der Ergebnisse des hydrophoben Extraktes aus Lungen von genetisch veränderten Mäusen (Kapitel 4-7). Der fluidisierende Effekt des POPE konnte in den artifiziellen DPPC/DPPG- und DPPC/DPPG/SP-C-System eindeutig dargestellt werden (Kapitel 3). Dieser Effekt äußert sich in einer Verschiebung der Isothermen zu größeren molekularen Flächen. Mit Hilfe der FM ist ein reduzierter Anteil an l_c Domänen durch die Beimischung von POPE nachgewiesen worden. Ein analoges Verhalten tritt auch im hydrophoben Extrakt auf (Kapitel 4). Obwohl das verstärkte Vorkommen der l_c Phase hauptsächlich durch den verringerten Phospholipidanteil im hydrophoben Extrakt aus *d-ko* Mäusen induziert wird, könnten auch der Konzentrationsanstieg von Phosphatidylethanolamin (PE)/Phosphatidylglycerol (PG) und Sphingomyelin (SM) hierfür verantwortlich sein. Eine Erhöhung der Konzentration dieser Phospholipide im hydrophoben Extrakt aus *d-ko* Mäusen konnte mit der Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie (HPTLC) nachgewiesen werden.

Die artifiziellen Lipid und Lipid/Protein-Gemische wiesen mit steigendem Cholesterolgehalt eine Verschiebung zu kleineren molekularen Flächen auf (Kapitel 3). Diese Verschiebung ist auf den kondensierenden Effekt des Cholesterols zurückzuführen. Obwohl im hydrophoben Extrakt der *d-ko* Mäuse ein erhöhter Anteil des Cholesterol bestimmt worden ist, konnte der kondensierende Effekt dieses Lipids

nicht nachgewiesen worden. Verantwortlich dafür ist der zu geringe Konzentrationsunterschied im hydrophoben Extrakt der *d-ko* Maus im Vergleich zu dem Material der *wt* Maus. Außerdem könnte die erhöhte Proteinkonzentration dem Kondensierungseffekt des Cholesterols entgegen wirken.

Eine Analogie konnte bei den Untersuchungen der Protrusions der POPE-Filme und des hydrophoben Extraktes aus *d-ko* Mäusen aufgezeigt werden. POPE stabilisiert die mizellartigen Randbereiche der Protrusions und verringert dadurch ihre Fläche. Die Protrusions des Materials aus *d-ko* Mäusen wiesen analog zu den Untersuchungen des Einflusses von POPE auf das Modellsystem des Lungensurfactant eine verminderte Größe der Protrusions im Vergleich zu dem hydrophoben Extrakt aus der *wt* Maus auf. Die Veränderung der Multischichten könnte unabhängig von der angestiegenen Proteinkonzentration auch auf die erhöhte Menge an PE und an anderen Phospholipiden der *minor components* zurückgeführt werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Dissertation gezeigt werden, dass es möglich ist Veränderungen des Surfactant mit biophysikalischen Techniken nachzuweisen:

- I) Die Funktion einzelner Lipide, wie Cholesterol und POPE, innerhalb des Lungensurfactant ist mit einem *in vitro* Modellsystem erklärt worden.
- II) Das *in vivo* Extrakt-Modellsystem stellte anschaulich dar, dass es möglich ist, Veränderungen der Komposition des Materials aus Mäuselungen nachzuweisen.
- III) Durch die Kombination von künstlichem System, Material aus genetisch modifizierten Tieren und *in vivo* Generierung einer ARDS-Infektion konnte mit den biophysikalischen Experimenten die Interpretation der biochemischen Veränderungen erläutert werden.
- IV) Der Heilungseffekt des Pioglitazons verdeutlicht die enge Korrelation zwischen dem Lipidmetabolismus und der strukturellen Organisation des Lungensurfactant.

Teil III

Anhang

Anhang A

Literatur

Literatur

1.Kapitel

- [1] Gehr, P., F. H. Green, M. Geiser, V. Im Hof, M. M. Lee, S. Schürch. Airway surfactant, a primary defence barrier: mechanical and immunological aspects. *J. Aerosol. Med.*, 9: 163-181 (1996)
- [2] Goerke, J., J. A. Clements, Alveolar surface tension and lung surfactant, in Handbook of Physiology - The Respiratory System III, Mechanics of breathing, ed. P. T. Macklem, J. Mead. 1986, Washington, DC: 247-261.
- [3] Clements, J. A. Surface tension of lung extracts. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 95: 170-200 (1957)
- [4] Clements, J. A., R. F. Hustead, R. P. Johnson, I. Gribetz. Pulmonary surface tension and alveolar stability. *J. Appl. Physiol.*, 16: 444-450 (1961)
- [5] Palmer, C. N., M. H. Hsu, H. J. Griffin, E. F. Johnson. Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling. *J. Biol. Chem.*, 270: 16114-16121 (1995)
- [6] Van Golde, L. M., J. J. Batenburg, B. Robertson. The pulmonary surfactant system: biochemical aspects and functional significance. *Physiol. Rev.*, 68: 374-455 (1988)
- [7] Torday, J., J. Hua, R. Slavin. Metabolism and fate of neutral lipids of fetal lung fibroblast origin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1254: 198-206 (1995)
- [8] Stern, N., S. Riklis, M. Kalina, A. Tietz. The catabolism of lung surfactant by alveolar macrophages. *Biochim. Biophys. Acta*, 877: 323-333 (1986)
- [9] Hawgood, S., J. A. Clements. Pulmonary surfactant and its apoproteins. *J. Clin. Invest.*, 86: 1-6 (1990)
- [10] Veldhuizen, E. J., H. P. Haagsman. Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics. *Biochim. Biophys. Acta*, 1467: 255-270 (2000)
- [11] Possmayer, F., Biochemistry of pulmonary surfactant during fetal development and in the perinatal period., in Pulmonary Surfactant, ed. B. Robertson, L. M. G. Van Golde, J. J. Batenburg. 1984, Amsterdam: Elsevier. 295-355.
- [12] King, R. J., Isolation and chemical composition of pulmonary surfactant. Pulmonary Surfactant, ed. B. Robertson, L. M. G. Van Golde, J. J. Batenburg. 1984, Amsterdam: Elsevier. 1-15.

- [13] Veldhuizen, R., K. Nag, S. Orgeig, F. Possmayer. The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochim. Biophys. Acta*, 1408: 90-108 (1998)
- [14] Schürch, S. Surface tension at low lung volumes: dependence on time and alveolar size. *Respir. Physiol.*, 48: 339-355 (1982)
- [15] Weibel, E. R., H. Bachofen. How to stabilize the pulmonary alveoli: surfactant or fibers. *NIPS*, 2: 72-75 (1987)
- [16] Bachofen, H., S. Schürch, F. Possmayer. Disturbance of alveolar lining layer: effects on alveolar microstructure. *J. Appl. Physiol.*, 76: 1983-1992 (1994)
- [17] Possmayer, F., Physicochemical aspects of pulmonary surfactant, in *Fetal and Neonatal Physiology*, ed. R. A. Polin, W. W. Fox, W. B. Saunders. 1997, Philadelphia: 1259-1275.
- [18] Suwabe, A., R. J. Mason, D. Smith, J. A. Firestone, M. D. Browning, D. R. Voelker. Pulmonary surfactant secretion is regulated by the physical state of extracellular phosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.*, 267: 19884-19890 (1992)
- [19] Meban, C. Effect of lipids and other substances on the adsorption of dipalmitoyl phosphatidylcholine. *Pediatr. Res.*, 15: 1029-1031 (1981)
- [20] Yu, S. H., F. Possmayer. Effect of pulmonary surfactant protein B (SP-B) and calcium on phospholipid adsorption and squeeze-out of phosphatidylglycerol from binary phospholipid monolayers containing dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta*, 1126: 26-34 (1992)
- [21] Qanbar, R., S. Cheng, F. Possmayer, S. Schurch. Role of the palmitoylation of surfactant-associated protein C in surfactant film formation and stability. *Am. J. Physiol.*, 271: L572-580 (1996)
- [22] Saulnier, P., F. Foussard, F. Boury, J. E. Proust. Structural Properties of Asymmetric Mixed-Chain Phosphatidylethanolamine Films. *J. Colloid Interface Sci.*, 218: 40-46 (1999)
- [23] Ahn, T., C. H. Yun. Phase properties of liquid-crystalline Phosphatidylcholine/Phosphatidylethanolamine bilayers revealed by fluorescent probes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 369: 288-294 (1999)
- [24] Cockshutt, A. M., F. Possmayer. Lysophosphatidylcholin sensitizes lipid extract of pulmonary surfactant to inhibition by serum proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1086: 63-71 (1991)
- [25] Vist, M. R., J. H. Davis. Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: ²H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. *Biochemistry*, 29: 451-464 (1990)

- [26] Smaby, J. M., M. M. Momsen, H. L. Brockman, R. E. Brown. Phosphatidylcholine acyl unsaturation modulates the decrease in interfacial elasticity induced by cholesterol. *Biophys. J.*, 73: 1492-1505 (1997)
- [27] Worthman, L. A., K. Nag, P. J. Davis, K. M. Keough. Cholesterol in condensed and fluid phosphatidylcholine monolayers studied by epifluorescence microscopy. *Biophys. J.*, 72: 2569-2580 (1997)
- [28] Sparr, E., K. Ekelund, J. Engblom, S. Engström, H. Wennerström. An AFM Study of Lipid Monolayers. Effect of Cholesterol on Fatty Acid. *Langmuir*, 1999: 6950-6955 (1999)
- [29] Tanaka, K., A. P. Manning, V. K. Lau, H. Yu. Lipid lateral diffusion in Dilauroylphosphatidylcholine/Cholesterol mixed monolayers at the air/water interface. *Langmuir*, 15: 600-606 (1999)
- [30] Notter, R. H., S. A. Tabak, R. D. Mavis. Surface properties of binary mixtures of some pulmonary surfactant components. *J. Lipid. Res.*, 21: 10-22 (1980)
- [31] Fleming, B. D., K. M. Keough. Surface respreading after collapse of monolayers containing major lipids of pulmonary surfactant. *Chem. Phys. Lipids*, 49: 81-86 (1988)
- [32] Notter, R. H., H. Holcomb, R. D. Mavic. Dynamic surface properties of phosphatidylglycerol-dipalmitoylphosphatidylcholine mixed films. *Chem. Phys. Lipids*, 27: 305-319 (1980)
- [33] Yu, S. H., F. Possmayer. Interaction of pulmonary surfactant protein A with dipalmitoylphosphatidylcholine and cholesterol at the air/water interface. *J. Lipid Res.*, 39: 555-568 (1998)
- [34] Yu, S. H., F. Possmayer. Effect of pulmonary surfactant protein A and neutral lipid on accretion and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine in surface films. *J. Lipid Res.*, 37: 1278-1288 (1996)
- [35] Orgeig, S., H. A. Barr, T. E. Nicholas. Effect of hyperpnea on the cholesterol to disaturated phospholipid ratio in alveolar surfactant of rats. *Exp. Lung Res.*, 21: 157-174 (1995)
- [36] Tanaka, Y., T. Takei, T. Aiba, K. Masuda, A. Kiuchi, T. Fujiwara. Development of synthetic lung surfactants. *J. Lipid Res.*, 27: 475-485 (1986)
- [37] King, R. J., D. J. Klass, E. G. Gikas, J. A. Clements. Isolation of apoproteins from canine surface active material. *Am. J. Physiol.*, 224: 788-795 (1973)
- [38] Phizackerley, P. J., M. H. Town, G. E. Newman. Hydrophobic proteins of lamellated osmiophilic bodies isolated from pig lung. *Biochem. J.*, 183: 731-736 (1979)

- [39] Warr, R. G., S. Hawgood, D. I. Buckley, T. M. Crisp, J. Schilling, B. J. Benson, P. L. Ballard, J. A. Clements, R. T. White. Low molecular weight human pulmonary surfactant protein (SP5): isolation, characterization, and cDNA and amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 84: 7915-7919 (1987)
- [40] Whitsett, J. A., B. L. Ohning, G. Ross, J. Meuth, T. Weaver, B. A. Holm, D. L. Shapiro, R. H. Notter. Hydrophobic surfactant-associated protein in whole lung surfactant and its importance for biophysical activity in lung surfactant extracts used for replacement therapy. *Pediatr. Res.*, 20: 460-470 (1986)
- [41] Glasser, S. W., T. R. Korfhagen, T. Weaver, T. Pilot-Matias, J. L. Fox, J. A. Whitsett. cDNA and deduced amino acid sequence of human pulmonary surfactant-associated proteolipid SPL(Phe). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 84: 4007-4011 (1987)
- [42] Possmayer, F. A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 138: 990-998 (1988)
- [43] Voss, T., H. Eistetter, K. P. Schafer, J. Engel. Macromolecular organization of natural and recombinant lung surfactant protein SP 28-36. Structural homology with the complement factor C1q. *J. Mol. Biol.*, 201: 219-227 (1988)
- [44] Head, J. F., T. R. Mealy, F. X. McCormack, B. A. Seaton. Crystal structure of trimeric carbohydrate recognition and neck domains of surfactant protein A. *J. Biol. Chem.*, 278: 43254-43260 (2003)
- [45] Weis, W. I., K. Drickamer. Trimeric structure of a C-type mannose-binding protein. *Structure*, 2: 1227-1240 (1994)
- [46] Sano, K., J. Fisher, R. J. Mason, Y. Kuroki, J. Schilling, B. Benson, D. Voelker. Isolation and sequence of a cDNA clone for the rat pulmonary surfactant-associated protein (PSP-A). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 144: 367-374 (1987)
- [47] Kivirikko, K. I., R. Myllyla. Post-translational processing of procollagens. *Ann. NY Acad. Sci.*, 460: 187-201 (1985)
- [48] Malhotra, R., S. B. Laursen, A. C. Willis, R. B. Sim. Localization of the receptor-binding site in the collectin family of proteins. *Biochem. J.*, 293 (Pt 1): 15-19 (1993)
- [49] Kalina, M., H. Blau, S. Riklis, V. Kravtsov. Interaction of surfactant protein A with bacterial lipopolysaccharide may affect some biological functions. *Am. J. Physiol.*, 268: L144-151 (1995)
- [50] Van Iwaarden, J. F., J. C. Pikaar, J. Storm, E. Brouwer, J. Verhoef, R. S. Oosting, L. M. Van Golde, J. A. Van Strijp. Binding of surfactant protein A to the lipid A moiety of bacterial lipopolysaccharides. *Biochem. J.*, 303 (Pt 2): 407-411 (1994)

- [51] Borron, P., F. X. McCormack, B. M. Elhalwagi, Z. C. Chroneos, J. F. Lewis, S. Zhu, J. R. Wright, V. L. Shepherd, F. Possmayer, K. Inchley, L. J. Fraher. Surfactant protein A inhibits T cell proliferation via its collagen-like tail and a 210-kDa receptor. *Am. J. Physiol.*, 275: L679-686 (1998)
- [52] McCormack, F. X., S. Pattanajitvilai, J. Stewart, F. Possmayer, K. Inchley, D. R. Voelker. The Cys6 intermolecular disulfide bond and the collagen-like region of rat SP-A play critical roles in interactions with alveolar type II cells and surfactant lipids. *J. Biol. Chem.*, 272: 27971-27979 (1997)
- [53] Haagsman, H. P., T. Sargeant, P. V. Hauschka, B. J. Benson, S. Hawgood. Binding of calcium to SP-A, a surfactant-associated protein. *Biochemistry*, 29: 8894-8900 (1990)
- [54] Sohma, H., T. Watanabe, Y. Kuroki, H. Yoshino, N. Matsushima, M. Yazawa, T. Akino. Calcium dependent conformational changes of surfactant protein A (SP-A) and its collagenase resistant fragment with or without dithiothreitol. *Biochim. Biophys. Acta*, 1159: 150-154 (1992)
- [55] Suzuki, Y., Y. Fujita, K. Kogishi. Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 140: 75-81 (1989)
- [56] Korfhagen, T. R., A. M. Levine, J. A. Whitsett. Surfactant protein A (SP-A) gene targeted mice. *Biochim. Biophys. Acta*, 1408: 296-302 (1998)
- [57] Hawgood, S., B. J. Benson, J. Schilling, D. Damm, J. A. Clements, R. T. White. 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 84: 66-70 (1987)
- [58] Cockshutt, A. M., J. Weitz, F. Possmayer. Pulmonary surfactant-associated protein A enhances the surface activity of lipid extract surfactant and reverses inhibition by blood proteins in vitro. *Biochemistry*, 29: 8424-9 (1990)
- [59] Weaver, T. E., J. A. Whitsett. Processing of hydrophobic pulmonary surfactant protein B in rat type II cells. *Am. J. Physiol.*, 257: L100-108 (1989)
- [60] Weaver, T. E., S. Lin, B. Bogucki, C. Dey. Processing of surfactant protein B proprotein by a cathepsin D-like protease. *Am. J. Physiol.*, 263: L95-103 (1992)
- [61] Johansson, J., T. Curstedt, H. Jornvall. Surfactant protein B: disulfide bridges, structural properties, and kringle similarities. *Biochemistry*, 30: 6917-6921 (1991)
- [62] Cruz, A., C. Casals, J. Perez-Gil. Conformational flexibility of pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C, studied in aqueous organic solvents. *Biochim. Biophys. Acta*, 1255: 68-76 (1995)

- [63] Williams, M. C., S. Hawgood, R. L. Hamilton. Changes in lipid structure produced by surfactant proteins SP-A, SP-B, and SP-C. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 5: 41-50 (1991)
- [64] Noguee, L. M., G. Garnier, H. C. Dietz, L. Singer, A. M. Murphy, D. E. Demello, H. R. Colten. A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *J. Clin. Invest.*, 93: 1860-1863 (1994)
- [65] Clark, J. C., S. E. Wert, C. J. Bachurski, M. T. Stahlman, B. R. Stripp, T. E. Weaver, J. A. Whitsett. Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7794-7798 (1995)
- [66] Weaver, T. E. Synthesis, processing and secretion of surfactant proteins B and C. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1408: 173-179 (1998)
- [67] Krol, S., M. Ross, M. Sieber, S. Kunneke, H. J. Galla, A. Janshoff. Formation of three-dimensional protein-lipid aggregates in monolayer films induced by surfactant protein B. *Biophys. J.*, 79: 904-918 (2000)
- [68] Perez-Gil, J., C. Casals, D. Marsh. Interactions of hydrophobic lung surfactant proteins SP-B and SP-C with dipalmitoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylglycerol bilayers studied by electron spin resonance spectroscopy. *Biochemistry*, 34: 3964-3971 (1995)
- [69] Shiffer, K., S. Hawgood, H. P. Haagsman, B. Benson, J. A. Clements, J. Goerke. Lung surfactant proteins, SP-B and SP-C, alter the thermodynamic properties of phospholipid membranes: a differential calorimetry study. *Biochemistry*, 32: 590-7 (1993)
- [70] Johansson, J. Structure and properties of surfactant protein C. *Biochim. Biophys. Acta*, 1408: 161-172 (1998)
- [71] Gustafsson, M., T. Curstedt, H. Jornvall, J. Johansson. Reverse-phase HPLC of the hydrophobic pulmonary surfactant proteins: detection of a surfactant protein C isoform containing Nepsilon-palmitoyl-lysine. *Biochem. J.*, 326 (Pt 3): 799-806 (1997)
- [72] Stults, J. T., P. R. Griffin, D. D. Lesikar, A. Naidu, B. Moffat, B. J. Benson. Lung surfactant protein SP-C from human, bovine, and canine sources contains palmitoyl cysteine thioester linkages. *Am. J. Physiol.*, 261: L118-25 (1991)
- [73] Johansson, J., T. Szyperki, T. Curstedt, K. Wuthrich. The NMR structure of the pulmonary surfactant-associated polypeptide SP-C in an apolar solvent contains a valyl-rich alpha-helix. *Biochemistry*, 33: 6015-6023 (1994)

- [74] Kovacs, H., A. E. Mark, J. Johansson, W. F. Van Gunsteren. The effect of environment on the stability of an integral membrane helix: molecular dynamics simulations of surfactant protein C in chloroform, methanol and water. *J. Mol. Biol.*, 247: 808-822 (1995)
- [75] Johansson, J., G. Nilsson, R. Stromberg, B. Robertson, H. Jornvall, T. Curstedt. Secondary structure and biophysical activity of synthetic analogues of the pulmonary surfactant polypeptide SP-C. *Biochem. J.*, 307 (Pt 2): 535-541 (1995)
- [76] Wang, Z., O. Gurel, J. E. Baatz, R. H. Notter. Acylation of pulmonary surfactant protein-C is required for its optimal surface active interactions with phospholipids. *J. Biol. Chem.*, 271: 19104-19109 (1996)
- [77] Vandenbussche, G., A. Clercx, T. Curstedt, J. Johansson, H. Jornvall, J. M. Ruyschaert. Structure and orientation of the surfactant-associated protein C in a lipid bilayer. *Eur. J. Biochem.*, 203: 201-209 (1992)
- [78] Johansson, J., T. Curstedt. Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components. *Eur. J. Biochem.*, 244: 675-693 (1997)
- [79] Shrive, A. K., H. A. Tharia, P. Strong, U. Kishore, I. Burns, P. J. Rizkallah, K. B. Reid, T. J. Greenhough. High-resolution structural insights into ligand binding and immune cell recognition by human lung surfactant protein D. *J. Mol. Biol.*, 331: 509-523 (2003)
- [80] Crouch, E. C. Structure, biologic properties, and expression of surfactant protein D (SP-D). *Biochim. Biophys. Acta*, 1408: 278-289 (1998)
- [81] Kuan, S. F., K. Rust, E. Crouch. Interactions of surfactant protein D with bacterial lipopolysaccharides. Surfactant protein D is an Escherichia coli-binding protein in bronchoalveolar lavage. *J. Clin. Invest.*, 90: 97-106 (1992)
- [82] Van Rozendaal, B. A., C. H. Van De Lest, M. Van Eijk, H. P. Van Helden, H. P. Haagsman. Pulmonary surfactant proteins A and D are involved in the early response to intratracheally aerosolized lipopolysaccharide. *Biochem. Soc. Trans.*, 25: 656-664 (1997)
- [83] Persson, A. V., B. J. Gibbons, J. D. Shoemaker, M. A. Moxley, W. J. Longmore. The major glycolipid recognized by SP-D in surfactant is phosphatidylinositol. *Biochemistry*, 31: 12183-12190 (1992)
- [84] Kuroki, Y., S. Gasa, Y. Ogasawara, M. Shiratori, A. Makita, T. Akino. Binding specificity of lung surfactant protein SP-D for glucosylceramide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 187: 963-969 (1992)
- [85] Taneva, S., D. R. Voelker, K. M. Keough. Adsorption of pulmonary surfactant protein D to phospholipid monolayers at the air-water interface. *Biochemistry*, 36: 8173-8179 (1997)

- [86] Schürch, S., F. Green, H. Bachofen. Formation and structure of surface films: captive bubble surfactometry - I. Thermodynamic properties. *Biochim. Biophys. Acta*, 1408: 180-202 (1998)
- [87] Amrein, M., A. Von Nahmen, M. Sieber. A scanning force- and fluorescence light microscopy study of the structure and function of a model pulmonary surfactant. *Eur. Biophys. J.*, 26: 349-357 (1997)
- [88] Von Nahmen, A., M. Schenk, M. Sieber, M. Amrein. The structure of a model pulmonary surfactant as revealed by scanning force microscopy. *Biophys. J.*, 72: 463-469 (1997)
- [89] Von Nahmen, A., A. Post, H. J. Galla, M. Sieber. The phase behavior of lipid monolayers containing pulmonary surfactant protein C studied by fluorescence light microscopy. *Eur. Biophys. J.*, 26: 359-369 (1997)
- [90] Post, A., A. V. Nahmen, M. Schmitt, J. Ruths, H. Riegler, M. Sieber, H. J. Galla. Pulmonary surfactant protein C containing lipid films at the air-water interface as a model for the surface of lung alveoli. *Mol. Membr. Biol.*, 12: 93-99 (1995)
- [91] Ross, M., S. Krol, A. Janshoff, H. J. Galla. Kinetics of phospholipid insertion into monolayers containing the lung surfactant proteins SP-B or SP-C. *Eur. Biophys. J.*, 31: 52-61 (2002)
- [92] Bourdos, N., F. Kollmer, A. Benninghoven, M. Ross, M. Sieber, H. J. Galla. Analysis of lung surfactant model systems with time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Biophys. J.*, 79: 357-369 (2000)
- [93] Ockner, R. K., J. A. Manning, R. B. Poppenhausen, W. K. Ho. A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science*, 177: 56-58 (1972)
- [94] Hohoff, C., F. Spener. Fatty acid binding proteins and mammary-derived growth inhibitor. *Fett/Lipid*, 100: 252-263 (1998)
- [95] Guthmann, F., C. Hohoff, H. Fechner, P. Humbert, T. Borchers, F. Spener, B. Rüstow. Expression of fatty-acid-binding proteins in cells involved in lung-specific lipid metabolism. *Eur. J. Biochem.*, 253: 430-436 (1998)
- [96] Specht, B., N. Bartetzko, C. Hohoff, H. Kuhl, R. Franke, T. Borchers, F. Spener. Mammary derived growth inhibitor is not a distinct protein but a mix of heart-type and adipocyte-type fatty acid-binding protein. *J. Biol. Chem*, 271: 19943-19949 (1996)
- [97] Guthmann, F., C. Hohoff, H. Fechner, P. Humbert, T. Borchers, F. Spener, B. Rüstow. Expression of fatty-acid-binding proteins in cells involved in lung-specific lipid metabolism. *Eur. J. Biochem.*, 253: 430-436 (1998)

- [98] Bleck, B., C. Buhlmann, C. Hohoff, M. Müller, T. Borchers, F. Spener. Inversely related expression of epidermal- and heart-type fatty acid binding proteins during myogenic differentiation of C2C12 myoblasts. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 104: 88-97 (2002)
- [99] Glatz, J. F., J. J. Luiken, F. A. Van Nieuwenhoven, G. J. Van Der Vusse. Molecular mechanism of cellular uptake and intracellular translocation of fatty acids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 57: 3-9 (1997)
- [100] Maniscalco, W. M., J. N. Finkelstein, A. B. Parkhurst. De novo fatty acid synthesis by freshly isolated alveolar type II epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 751: 462-469 (1983)
- [101] Maniscalco, W. M., J. N. Finkelstein, A. B. Parkhurst. Effects of exogenous fatty acids and inhibition of de novo fatty acid synthesis on disaturated phosphatidylcholine production by fetal lung cells and adult type II cells. *Exp. Lung Res.*, 15: 473-489 (1989)
- [102] Guthmann, F., C. Schachtrup, A. Tolle, H. Wissel, B. Binas, H. Kondo, Y. Owada, F. Spener, B. Rustow. Phenotype of palmitic acid transport and of signalling in alveolar type II cells from E/H-FABP double-knockout mice: contribution of caveolin-1 and PPARgamma. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1636: 196-204 (2004)
- [103] Schachtrup, C. Dissertation, Universität Münster (2004)
- [104] Stremmel, W., L. Pohl, A. Ring, T. Herrmann. A new concept of cellular uptake and intracellular trafficking of long-chain fatty acids. *Lipids*, 36: 981-989 (2001)
- [105] Petty, T. L., G. W. Silver, G. W. Paul, R. E. Standfort. Abnormalities in lung elastic properties and surfactant function in adult respiratory distress syndrom. *Chest.*, 75: 571-576 (1979)
- [106] Seeger, W., G. Stöhr, H. Wolf, H. Neuhof. Alteration of Surfactant function due to protein leakage: Special interaction with fibrin monomer. *J. Appl. Physiol.*, 58: 326-338 (1985)
- [107] Holm, B. A., R. H. Notter. Effects of hemoglobin and cell membrane lipids on pulmonary surfactant activity. *J. Appl. Physiol.*, 63: 1434-1442 (1987)
- [108] Seeger, W., C. Thede, A. Gunther, C. Grube. Surface properties and sensitivity to protein-inhibition of a recombinant apoprotein C-based phospholipid mixture in vitro--comparison to natural surfactant. *Biochim. Biophys. Acta*, 1081: 45-52 (1991)
- [109] Asti, C., V. Ruggieri, S. Porzio, R. Chiusaroli, G. Melillo, G. F. Caselli. Lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. I. Concomitant evaluation of inflammatory cells and haemorrhagic lung damage. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 13: 61-69 (2000)

- [110] Lautz, K. Diplomarbeit Universität Münster (2003)
- [111] Veldhuizen, R. A., B. Welk, R. Harbottle, S. Hearn, K. Nag, N. Petersen, F. Possmayer. Mechanical ventilation of isolated rat lungs changes the structure and biophysical properties of surfactant. *J. Appl. Physiol.*, 92: 1169-1175 (2002)
- [112] Panda, A. K., K. Nag, R. R. Harbottle, K. Rodriguez-Capote, R. A. Veldhuizen, N. O. Petersen, F. Possmayer. Effect of acute lung injury on structure and function of pulmonary surfactant films. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 30: 641-650 (2004)
- [113] Schief, W. R., M. Antia, B. M. Discher, S. B. Hall, V. Vogel. Liquid-crystalline collapse of pulmonary surfactant monolayers. *Biophys. J.*, 84: 3792-806 (2003)
- [114] Harbottle, R. R., K. Nag, N. S. McIntyre, F. Possmayer, N. O. Petersen. Molecular organization revealed by time-of-flight secondary ion mass spectrometry of a clinically used extracted pulmonary surfactant. *Langmuir*, 19: 3698-3704 (2003)
- [115] Wang, Z., S. B. Hall, R. H. Notter. Dynamic surface activity of films of lung surfactant phospholipids, hydrophobic proteins, and neutral lipids. *J. Lipid Res.*, 36: 1283-1293 (1995)

2. Kapitel

- [1] Haagsman, H. P., S. Hawgood, T. Sargeant, D. Buckley, R. T. White, K. Drickamer, B. J. Benson. The major lung surfactant protein, SP 28-36, is a calcium-dependent, carbohydrate-binding protein. *J. Biol. Chem.*, 262: 13877-13880 (1987)
- [2] Breitenstein, D. Dissertation, Universität Münster (2004)
- [3] Guthmann, F., C. Schachtrup, A. Tolle, H. Wissel, B. Binas, H. Kondo, Y. Owada, F. Spener, B. Rustow. Phenotype of palmitic acid transport and of signalling in alveolar type II cells from E/H-FABP double-knockout mice: contribution of caveolin-1 and PPARgamma. *Biochim. Biophys. Acta*, 1636: 196-204 (2004)
- [4] Binas, B., H. Danneberg, J. Mcwhir, L. Mullins, A. J. Clark. Requirement for the heart-type fatty acid binding protein in cardiac fatty acid utilization. *Faseb. J.*, 13: 805-812 (1999)

- [5] Owada, Y., H. Takano, H. Yamanaka, H. Kobayashi, Y. Sugitani, Y. Tomioka, I. Suzuki, R. Suzuki, T. Terui, M. Mizugaki, H. Tagami, T. Noda, H. Kondo. Altered water barrier function in epidermal-type fatty acid binding protein-deficient mice. *J. Invest. Dermatol.*, 118: 430-435 (2002)
- [6] Lautz, K. Diplomarbeit Universität Münster (2003)
- [7] Schachtrup, C. Dissertation, Universität Münster (2004)
- [8] Oulton, M., J. Macdonald, D. T. Janigan, G. T. Faulkner. Mouse alveolar surfactant: characterization of subtypes prepared by differential centrifugation. *Lipids*, 28: 715-720 (1993)
- [9] Rouser, G., A. N. Siakotos, S. Fleisher. Quantitative analysis of phospholipid by thin-layer chromatography and phosphorus analysis of spots. *Lipids*, 1: 85-86 (1966)
- [10] Udenfriend, S., S. Stein, P. Bohlen, W. Dairman, W. Leimgruber, M. Weigle. Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range. *Science*, 178: 871-872 (1972)
- [11] Veldhuizen, R., K. Nag, S. Orgeig, F. Possmayer. The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochim. Biophys. Acta*, 1408: 90-108 (1998)
- [12] Ando, S., K. Kon, Y. Tanaka, S. Nagase, Y. Nagai. Characterization of hyperlipidemia in nagase albuminemia rat (NAR). *J. Biochem.*, 87: 1859-62 (1980)
- [13] Macala, L. J., R. K. Yu, S. Ando. Analysis of brain lipids by high performance thin-layer chromatography and densitometry. *J. Lipid Res.*, 24: 1243-1250 (1983)
- [14] Tewes, B. Dissertation, Universität Münster (2001)
- [15] Rouser, G., S. Fkeischer, A. Yamamoto. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*, 5: 494-496 (1970)
- [16] Whitsett, J. A., B. L. Ohning, G. Ross, J. Meuth, T. Weaver, B. A. Holm, D. L. Shapiro, R. H. Notter. Hydrophobic surfactant-associated protein in whole lung surfactant and its importance for biophysical activity in lung surfactant extracts used for replacement therapy. *Pediatr. Res.*, 20: 460-467 (1986)
- [17] Lösche, M., H. Möhwald. Fluorescence microscope to observe dynamical processes in monomolecular layers at the air-water interface. *Rev. Sci. Instrum.*, 55: 1968-1972 (1984)
- [18] Binning, G., H. Rohrer, C. Gerber, E. Weibel. Tunneling through a controllable vacuum gap. *Appl. Phys. Lett.*, 40: 178-180 (1982)

- [19] Binning, G., C. F. Quate, C. Gerber. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.*, 56: 930-933 (1986)
- [20] Worcester, D. L., R. G. Miller, P. J. Bryant. Atomic force microscopy of purple membranes. *J. Microsc.*, 152 (Pt 3): 817-821 (1988)
- [21] Bustamante, C., J. Vesenka, C. L. Tang, W. Rees, M. Guthold, R. Keller. Circular DNA molecules imaged in air by scanning force microscopy. *Biochemistry*, 31: 22-6 (1992)
- [22] Rief, M., H. Grubmüller. Kraftspektroskopie von einzelnen Biomolekülen. *Physikalische Blätter*, 57: 55-61 (2001)
- [23] M. Rademacher, R. W. Tillamnn, M. Fritz, H. E. Gaub. From molecules to cell: imaging soft samples with the atomic force microscope. *Science*, 257:1900-1905
- [24] Hansma, P. K., J. P. Cleveland, M. Radmacher, D. A. Walters, P. Hillner, M. Benzanilla. Tapping mode atomic force microscopy in liquids. *Appl. Phys. Lett.*, 64: 1738-1740 (1994)
- [25] Von Nahmen, A., A. Post, H. J. Galla, M. Sieber. The phase behavior of lipid monolayers containing pulmonary surfactant protein C studied by fluorescence light microscopy. *Eur. Biophys. J.*, 26: 359-69 (1997)

3. Kapitel

- [1] Von Nahmen, A., M. Schenk, M. Sieber, M. Amrein. The structure of a model pulmonary surfactant as revealed by scanning force microscopy. *Biophys. J.*, 72: 463-469 (1997)
- [2] Von Nahmen, A., A. Post, H. J. Galla, M. Sieber. The phase behavior of lipid monolayers containing pulmonary surfactant protein C studied by fluorescence light microscopy. *Eur. Biophys. J.*, 26: 359-369 (1997)
- [3] Galla, H.-J., N. Bourdos, A. Von Nahmen, M. Amrein, M. Sieber. The role of pulmonary surfactant protein C during the breathing cycle. *Thin Solid Films*, 327-329: 632-635 (1998)
- [4] Kim, K., C. Kim, Y. Byun. Preparation of dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol Langmuir-Blodgett Monolayer that suppresses Protein Adsorption. *Langmuir*, 17: 5066-5070 (2001)
- [5] Tanaka, K., A. P. Manning, V. K. Lau, H. Yu. Lipid lateral diffusion in Dilauroylphosphatidylcholine/Cholesterol mixed monolayers at the air/water interface. *Langmuir*, 15: 600-606 (1999)

- [6] Yuan, C., L. J. Johnston. Distribution of ganglioside GM1 in L-alpha-dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol monolayers: a model for lipid rafts. *Biophys. J.*, 79: 2768-2781 (2000)
- [7] Ahn, T., C. H. Yun. Phase properties of liquid-crystalline Phosphatidylcholine/Phosphatidylethanolamine bilayers revealed by fluorescent probes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 369: 288-94 (1999)
- [8] Saulnier, P., F. Foussard, F. Boury, J. E. Proust. Structural Properties of Asymmetric Mixed-Chain Phosphatidylethanolamine Films. *J. Colloid. Interface Sci.*, 218: 40-46 (1999)
- [9] Bourdos, N., F. Kollmer, A. Benninghoven, M. Ross, M. Sieber, H. J. Galla. Analysis of lung surfactant model systems with time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Biophys. J.*, 79: 357-69 (2000)

4. Kapitel

- [1] Schachtrup, C. Dissertation Universität Münster (2004)
- [2] Guthmann, F., C. Schachtrup, A. Tolle, H. Wissel, B. Binas, H. Kondo, Y. Owada, F. Spener, B. Rustow. Phenotype of palmitic acid transport and of signalling in alveolar type II cells from E/H-FABP double-knockout mice: contribution of caveolin-1 and PPARgamma. *Biochim. Biophys. Acta*, 1636: 196-204 (2004)
- [3] Veldhuizen, R., K. Nag, S. Orgeig, F. Possmayer. The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochim. Biophys. Acta*, 1408: 90-108 (1998)
- [4] Stryer, L., *Biosynthese der Vorstufe von Makromolekülen*, in *Biochemie*. 1988. 571-626.
- [5] Veldhuizen, R. A., K. Inchley, S. A. Hearn, J. F. Lewis, F. Possmayer. Degradation of surfactant-associated protein B (SP-B) during in vitro conversion of large to small surfactant aggregates. *Biochem. J.*, 295 (Pt 1): 141-147 (1993)
- [6] Schurch, S., F. Possmayer, S. Cheng, A. M. Cockshutt. Pulmonary SP-A enhances adsorption and appears to induce surface sorting of lipid extract surfactant. *Am. J. Physiol.*, 263: L210-218 (1992)
- [7] Schief, W. R., M. Antia, B. M. Discher, S. B. Hall, V. Vogel. Liquid-crystalline collapse of pulmonary surfactant monolayers. *Biophys. J.*, 84: 3792-3806 (2003)

- [8] Panda, A. K., K. Nag, R. R. Harbottle, K. Rodriguez-Capote, R. A. Veldhuizen, N. O. Petersen, F. Possmayer. Effect of acute lung injury on structure and function of pulmonary surfactant films. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 30: 641-650 (2004)
- [9] Perez-Gil, J., K. M. Keough. Interfacial properties of surfactant proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1408: 203-217 (1998)
- [10] Schurch, S., J. Goerke, J. A. Clements. Direct determination of volume- and time-dependence of alveolar surface tension in excised lungs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 3417-21 (1978)
- [11] Krol S., Dissertation Universität Münster (2000)
- [12] Schaap, F. G., B. Binas, H. Danneberg, G. J. van der Vusse, J. F. Glatz. Impaired long-chain fatty acid utilization by cardiac myocytes isolated from mice lacking the heart-type fatty acid binding protein gene. *Circ. Res.*, 85: 329-337 (1999)
- [13] Discher, B. M., W. R. Schief, V. Vogel, S. B. Hall. Phase separation in monolayers of pulmonary surfactant phospholipids at the air-water interface: composition and structure. *Biophys. J.*, 77: 2051-2061 (1999)
- [14] Nag, K., J. Perez-Gil, M. L. Ruano, L. A. Worthman, J. Stewart, C. Casals, K. M. Keough. Phase transitions in films of lung surfactant at the air-water interface. *Biophys. J.*, 74: 2983-2995 (1998)
- [15] Bourdos, N., F. Kollmer, A. Benninghoven, M. Ross, M. Sieber, H. J. Galla. Analysis of lung surfactant model systems with time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Biophys. J.*, 79: 357-369 (2000)
- [16] Harbottle, R. R., K. Nag, N. S. McIntyre, F. Possmayer, N. O. Petersen. Molecular organization revealed by time-of-flight secondary ion mass spectrometry of a clinically used extracted pulmonary surfactant. *Langmuir*, 19: 3698-3704 (2003)
- [17] Possmayer, F., Physicochemical aspects of pulmonary surfactant. 3 ed. Fetal and Neonatal Physiology, ed. R. A. Polin, W. W. Fox, S. Abman. 2004, Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1014-1034.
- [18] Piknova, B., V. Schram, S. B. Hall. Pulmonary surfactant: phase behavior and function. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 12: 487-494 (2002)
- [19] Wolfrum, C., C. M. Borrmann, T. Borchers, F. Spener. Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 2323-2328 (2001)

- [20] Specht, B., N. Bartetzko, C. Hohoff, H. Kuhl, R. Franke, T. Borchers, F. Spener. Mammary derived growth inhibitor is not a distinct protein but a mix of heart-type and adipocyte-type fatty acid-binding protein. *J. Biol. Chem.*, 271: 19943-19949 (1996)
- [21] Lemberger, T., B. Desvergne, W. Wahli. Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 12: 335-363 (1996)
- [22] Zhu, Y., C. Qi, J. R. Korenberg, X. N. Chen, D. Noya, M. S. Rao, J. K. Reddy. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7921-7925 (1995)
- [23] Mangelsdorf, D. J., R. M. Evans. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, 83: 841-850 (1995)
- [24] Lautz, K. Diplomarbeit Universität Münster (2003)
- [25] Ferre, P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes*, 53 Suppl 1: S43-50 (2004)
- [26] Schoonjans, K., B. Staels, J. Auwerx. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1302: 93-109 (1996)
- [27] Tontonoz, P., E. Hu, J. Devine, E. G. Beale, B. M. Spiegelman. PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol. Cell. Biol.*, 15: 351-357 (1995)

5. Kapitel

- [1] Piumngam, P., C. Schachtrup, Y. Owada, H. Konda, C. Promptmas, F. Spener. Liver-type fatty acid binding proteins is a serum marker for acute lung injury in the mouse model. (2004) (Submitted)
- [2] Guthmann, F., C. Hohoff, H. Fechner, P. Humbert, T. Borchers, F. Spener, B. Rüstow. Expression of fatty-acid-binding proteins in cells involved in lung-specific lipid metabolism. *Eur. J. Biochem.*, 253: 430-436 (1998)

- [3] Owada, Y., H. Takano, H. Yamanaka, H. Kobayashi, Y. Sugitani, Y. Tomioka, I. Suzuki, R. Suzuki, T. Terui, M. Mizugaki, H. Tagami, T. Noda, H. Kondo. Altered water barrier function in epidermal-type fatty acid binding protein-deficient mice. *J. Invest. Dermatol.*, 118: 430-435 (2002)
- [4] Zasadzinski, J. A., J. Ding, H. E. Warriner, F. Bringezu, A. J. Waring. The physics and physiology of lung surfactant. *Colloid & Interface Science*, 6: 506-513 (2001)
- [5] Hanhoff, T., C. Lücke, F. Spener. Insights into binding of fatty acids by fatty acid binding proteins. *Mol. Cell. Biochem.*, 239: 45-54. (2002)
- [6] Kruger, P., M. Schalke, Z. Wang, R. H. Notter, R. A. Dluhy, M. Losche. Effect of hydrophobic surfactant peptides SP-B and SP-C on binary phospholipid monolayers. I. Fluorescence and dark-field microscopy. *Biophys. J.*, 77: 903-914 (1999)
- [7] Tontonoz, P., E. Hu, J. Devine, E. G. Beale, B. M. Spiegelman. PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol. Cell Biol.*, 15: 351-357 (1995)
- [8] Discher, B. M., W. R. Schief, V. Vogel, S. B. Hall. Phase separation in monolayers of pulmonary surfactant phospholipids at the air-water interface: composition and structure. *Biophys. J.*, 77: 2051-2061 (1999)
- [9] Harbottel, R. R., K. Nag, N. S. McIntyre, F. Possmayer, N. O. Petersen. Molecular organization revealed by time-of-flight secondary ion mass spectrometry of a clinically used extracted pulmonary surfactant. *Langmuir*, 19: 3698-3704 (2003)

6. Kapitel

- [1] Fujita, T., Y. Sugiyama, S. Taketomi, T. Sohda, Y. Kawamatsu, H. Iwatsuka, Z. Suzuoki. Reduction of insulin resistance in obese and/or diabetic animals by 5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy)benzyl]-thiazolidine-2,4-dione (ADD-3878, U-63,287, ciglitazone), a new antidiabetic agent. *Diabetes*, 9: 804-810
- [2] Stumvoll, M., H. J. Häring. Glitazones: clinical effects and molecular mechanisms. *Ann. Med.*, 34: 217-224 (2002)
- [3] Schachtrup, C. Dissertation, Universität Münster (2004)

- [4] Guthmann, F., C. Schachtrup, A. Tolle, H. Wissel, B. Binas, H. Kondo, Y. Owada, F. Spener, B. Rustow. Phenotype of palmitic acid transport and of signalling in alveolar type II cells from E/H-FABP double-knockout mice: contribution of caveolin-1 and PPARgamma. *Biochim. Biophys. Acta*, 1636: 196-204 (2004)
- [5] Storch, J., A. E. Thumser. The fatty acid transport function of fatty-acid binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1486: 28-44 (2000)
- [6] Veerkamp, J. H., M. Van, A.W. Zimmermann. Effect of fatty acid-binding proteins on intermembrane fatty acid transport studies on different types and mutant proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 267: 5959-5966 (2000)
- [7] Thumser, A. E., J. Tsai, J. Storch. Collision- mediated transfer of long chain fatty acids by neutral tissue fatty acid-binding proteins (FABP): studies with fluorescent analogs. *J. Mol. Neurosci.*, 16:143-150; discussion 151-147 (2001)
- [8] Liou, H. L., J. Storch. Role of surface lysine residues of adipocyte fatty-acid binding protein in fatty acid transfer to phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 40: 6475-6485 (2001)
- [9] Bordewick, U., M. Heese, T. Borchers, H. Robeneck, F. Spener. Compartmentation of hepatic fatty-acid-binding protein in liver cells and its effect on microsomal phosphatidic acid biosynthesis. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 370: 229-238
- [7] Taneva, S. G., J. Stewart, L. Taylor, K. M. Keough. Method of purification affects some interfacial properties of pulmonary surfactant proteins B and C and their mixtures with dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta*, 1370: 138-150 (1998)
- [8] Harbottel, R. R., K. Nag, N. S. McIntyre, F. Possmayer, N. O. Petersen. Molecular organization revealed by time-of-flight secondary ion mass spectrometry of a clinically used extracted pulmonary surfactant. *Langmuir*, 19: 3698-3704 (2003)
- [9] Veldhuizen, R., K. Nag, S. Orgeig, F. Possmayer. The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochim. Biophys. Acta*, 1408: 90-108 (1998)
- [10] van der Vusse, G. J., J. F. Glatz, H. C. Stam, R. S. Reneman. Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol. Rev.*, 72: 881-940 (1992)
- [11] Taneva, S. G., J. Stewart, L. Taylor, K. M. Keough. Method of purification affects some interfacial properties of pulmonary surfactant proteins B and C and their mixtures with dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta*, 1370: 138-50 (1998)

- [12] Harbottel, R. R., K. Nag, N. S. McIntyre, F. Possmayer, N. O. Petersen. Molecular organization revealed by time-of-flight secondary ion mass spectrometry of a clinically used extracted pulmonary surfactant. *Langmuir*, 19: 3698-3704 (2003).
- [13] Veldhuizen, R., K. Nag, S. Orgeig, F. Possmayer. The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochim. Biophys. Acta*, 1408: 90-108 (1998)
- [14] Krol, S., M. Ross, M. Sieber, S. Kunneke, H. J. Galla, A. Janshoff. Formation of three-dimensional protein-lipid aggregates in monolayer films induced by surfactant protein B. *Biophys. J.*, 79: 904-918 (2000)
- [15] Gerber, G. E., D. Mangroo, B. L. Trigatti. Identification of high affinity membrane-bound fatty acid-binding proteins using a photoreactive fatty acid. *Mol. Cell. Biochem.*, 123: 39-44 (1993)
- [16] Trigatti, B. L., R. G. Anderson, G. E. Gerber. Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 255: 34-39 (1999)
- [17] Pol, A., R. Luetterforst, M. Lindsay, S. Heino, E. Ikonen, R. G. Parton. A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J. Cell. Biol.*, 152: 1057-1070 (2001)
- [18] Stremmel, W., L. Pohl, A. Ring, T. Herrmann. A new concept of cellular uptake and intracellular trafficking of long-chain fatty acids. *Lipids*, 36: 981-989 (2001)
- [19] Abumrad, N. A., M. R. El-Maghrabi, E. Z. Amri, E. Lopez, P. A. Grimaldi. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J. Biol. Chem.*, 268: 17665-17668 (1993)
- [20] Hui, T. Y., B. I. Frohnert, A. J. Smith, J. E. Schaffer, D. A. Bernlohr. Characterization of the murine fatty acid transport protein gene and its insulin response sequence. *J. Biol. Chem.*, 273: 27420-27429 (1998)
- [21] Lemberger, T., B. Desvergne, W. Wahli. Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 12: 335-363 (1996)
- [22] Mangelsdorf, D. J., R. M. Evans. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, 83: 841-850 (1995)
- [23] Tafuri, S. R. Troglitazone enhances differentiation, basal glucose uptake, and Glut1 protein levels in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology*, 137: 4706-4712 (1996)
- [24] Teboul, L., D. Gaillard, L. Staccini, H. Inadera, E. Z. Amri, P. A. Grimaldi. Thiazolidinediones and fatty acids convert myogenic cells into adipose-like cells. *J. Biol. Chem.*, 270: 28183-28187 (1995)

- [25] Tontonoz, P., E. Hu, J. Devine, E. G. Beale, B. M. Spiegelman. PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol. Cell. Biol.*, 15: 351-357 (1995)
- [26] Guthmann, F., C. Hohoff, H. Fechner, P. Humbert, T. Borchers, F. Spener, B. Rüstow. Expression of fatty-acid-binding proteins in cells involved in lung-specific lipid metabolism. *Eur. J. Biochem.*, 253: 430-436 (1998)
- [27] Wolfrum, C., C. M. Borrmann, T. Borchers, F. Spener. Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 2323-2328 (2001)
- [28] Ferre, P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes*, 53 Suppl 1: S43-50 (2004)

7. Kapitel

- [1] Trigatti, B. L., R. G. Anderson, G. E. Gerber. Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 255: 34-39 (1999)
- [2] Asti, C., V. Ruggieri, S. Porzio, R. Chiusaroli, G. Melillo, G. F. Caselli. Lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. I. Concomitant evaluation of inflammatory cells and haemorrhagic lung damage. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 13: 61-69 (2000)
- [3] Schmidt, R., W. Steinhilber, C. Ruppert, C. Daum, F. Grimminger, W. Seeger, A. Gunther. An ELISA technique for quantification of surfactant apoprotein (SP)-C in bronchoalveolar lavage fluid. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 165: 470-474 (2002)
- [4] Gregory, T. J., W. J. Longmore, M. A. Moxley, J. A. Whitsett, C. R. Reed, A. A. Fowler, 3rd, L. D. Hudson, R. J. Maunder, C. Crim, T. M. Hyers. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J. Clin. Invest.*, 88: 1976-1981 (1991)
- [5] Gunther, A., C. Siebert, R. Schmidt, S. Ziegler, F. Grimminger, M. Yabut, B. Temmesfeld, D. Walmrath, H. Morr, W. Seeger. Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 153: 176-184 (1996)

- [6] Hallman, M., R. Spragg, J. H. Harrell, K. M. Moser, L. Gluck. Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure. Study of bronchoalveolar lavage phospholipids, surface activity, phospholipase activity, and plasma myoinositol. *J. Clin. Invest.*, 70: 673-683 (1982)
- [7] Petty, T. L., G. W. Silver, G. W. Paul, R. E. Standfort. Abnormalities in lung elastic properties and surfactant function in adult respiratory distress syndrome. *Chest*, 75: 571-576 (1979)
- [8] Ware, L. B., M. A. Matthay. The acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 342: 1334-1349 (2000)
- [9] Ingenito, E. P., R. Mora, M. Cullivan, Y. Marzan, K. Haley, L. Mark, L. A. Sonna. Decreased surfactant protein-B expression and surfactant dysfunction in a murine model of acute lung injury. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 25: 35-44 (2001)
- [10] Ding, J., D. Y. Takamoto, A. Von Nahmen, M. M. Lipp, K. Y. Lee, A. J. Waring, J. A. Zasadzinski. Effects of lung surfactant proteins, SP-B and SP-C, and palmitic acid on monolayer stability. *Biophys. J.*, 80: 2262-2272 (2001)
- [11] Nag, K., J. Perez-Gil, M. L. Ruano, L. A. Worthman, J. Stewart, C. Casals, K. M. Keough. Phase transitions in films of lung surfactant at the air-water interface. *Biophys. J.*, 74: 2983-2995 (1998)
- [12] Guthmann, F., C. Hohoff, H. Fechner, P. Humbert, T. Borchers, F. Spener, B. Rüstow. Expression of fatty-acid-binding proteins in cells involved in lung-specific lipid metabolism. *Eur. J. Biochem.*, 253: 430-436 (1998)
- [13] Hanhoff, T., C. Lücke, F. Spener. Insights into binding of fatty acids by fatty acid binding proteins. *Mol. Cell. Biochem.*, 239: 45-54. (2002)

8. Kapitel

- [1] Ding, J., D. Y. Takamoto, A. Von Nahmen, M. M. Lipp, K. Y. Lee, A. J. Waring, J. A. Zasadzinski. Effects of lung surfactant proteins, SP-B and SP-C, and palmitic acid on monolayer stability. *Biophys. J.*, 80: 2262-2272 (2001)
- [2] Schief, W. R., M. Antia, B. M. Discher, S. B. Hall, V. Vogel. Liquid-crystalline collapse of pulmonary surfactant monolayers. *Biophys. J.*, 84: 3792-3806 (2003)
- [3] Ahn, T., C. H. Yun. Phase properties of liquid-crystalline Phosphatidylcholine/Phosphatidylethanolamine bilayers revealed by fluorescent probes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 369: 288-294 (1999)

- [4] Saulnier, P., F. Foussard, F. Boury, J. E. Proust. Structural Properties of Asymmetric Mixed-Chain Phosphatidylethanolamine Films. *J. Colloid. Interface. Sci.*, 218: 40-46 (1999)
- [5] Johansson, J., G. Nilsson, R. Stromberg, B. Robertson, H. Jornvall, T. Curstedt. Secondary structure and biophysical activity of synthetic analogues of the pulmonary surfactant polypeptide SP-C. *Biochem. J.*, 307 (Pt 2): 535-541 (1995)
- [6] Teruel, J. A., F. Soler, J. C. Gomez-Fernandez. On the effect of lysophosphatidylcholine, platelet activating factor and other surfactants on calcium permeability in sarcoplasmic reticulum vesicles. *Chem. Phys. Lipids.*, 1:1-7 (1991)
- [7] Bourdos, N., F. Kollmer, A. Benninghoven, M. Ross, M. Sieber, H. J. Galla. Analysis of lung surfactant model systems with time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Biophys. J.*, 79: 357-369 (2000)
- [8] Kim, K., C. Kim, Y. Byun. Preparation of dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol Langmuir-Blodgett Monolayer that suppresses Protein Adsorption. *Langmuir*, 17: 5066-5070 (2001)
- [9] Tanaka, K., A. P. Manning, V. K. Lau, H. Yu. Lipid lateral diffusion in Dilauroylphosphatidylcholine/Cholesterol mixed monolayers at the air/water interface. *Langmuir*, 15: 600-606 (1999)
- [10] Yuan, C., L. J. Johnston. Distribution of ganglioside GM1 in L-alpha-dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol monolayers: a model for lipid rafts. *Biophys. J.*, 79: 2768-2781 (2000)
- [11] Veldhuizen, R., K. Nag, S. Orgeig, F. Possmayer. The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochim. Biophys. Acta*, 1408: 90-108 (1998)
- [12] Guthmann, F., C. Schachtrup, A. Tolle, H. Wissel, B. Binas, H. Kondo, Y. Owada, F. Spener, B. Rustow. Phenotype of palmitic acid transport and of signalling in alveolar type II cells from E/H-FABP double-knockout mice: contribution of caveolin-1 and PPARgamma. *Biochim. Biophys. Acta*, 1636: 196-204 (2004)
- [13] Schachtrup, C. Dissertation Universität Münster (2004)
- [14] Perez-Gil, J., K. M. Keough. Interfacial properties of surfactant proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1408: 203-217 (1998)
- [15] Ferre, P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes*, 53 Suppl 1: S43-50 (2004)

- [16] Schoonjans, K., B. Staels, J. Auwerx. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1302: 93-109 (1996)
- [17] Tontonoz, P., E. Hu, J. Devine, E. G. Beale, B. M. Spiegelman. PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol. Cell. Biol.*, 15: 351-357 (1995)
- [18] Hanhoff, T., C. Lücke, F. Spener. Insights into binding of fatty acids by fatty acid binding proteins. *Mol. Cell. Biochem.*, 239: 45-54 (2002)
- [19] Guthmann, F., C. Hohoff, H. Fechner, P. Humbert, T. Borchers, F. Spener, B. Rüstow. Expression of fatty-acid-binding proteins in cells involved in lung-specific lipid metabolism. *Eur. J. Biochem.*, 253: 430-436 (1998)
- [20] Piumngam, P., C. Schachtrup, Y. Owada, H. Konda, C. Promptmas, F. Spener. Liver-type fatty acid binding proteins is a serum marker for acute lung injury in the mouse model. (2004) (Submitted)
- [21] Stremmel, W., L. Pohl, A. Ring, T. Herrmann. A new concept of cellular uptake and intracellular trafficking of long-chain fatty acids. *Lipids*, 36: 981-989 (2001)
- [22] Abumrad, N. A., M. R. El-Maghrabi, E. Z. Amri, E. Lopez, P. A. Grimaldi. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J. Biol. Chem.*, 268: 17665-17668 (1993)
- [23] Hui, T. Y., B. I. Frohnert, A. J. Smith, J. E. Schaffer, D. A. Bernlohr. Characterization of the murine fatty acid transport protein gene and its insulin response sequence. *J. Biol. Chem.*, 273: 27420-27429 (1998)
- [24] Guthmann, F., C. Hohoff, H. Fechner, P. Humbert, T. Borchers, F. Spener, B. Rüstow. Expression of fatty-acid-binding proteins in cells involved in lung-specific lipid metabolism. *Eur. J. Biochem.*, 253: 430-436 (1998)
- [25] Taneva, S. G., J. Stewart, L. Taylor, K. M. Keough. Method of purification affects some interfacial properties of pulmonary surfactant proteins B and C and their mixtures with dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta*, 1370: 138-50 (1998)
- [26] Möhwald, H. Phospholipid and Phospholipid-Protein Monolayers at the air/water interface. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 41: 441-76 (1990)
- [27] Krol, S., M. Ross, M. Sieber, S. Kunneke, H. J. Galla, A. Janshoff. Formation of three-dimensional protein-lipid aggregates in monolayer films induced by surfactant protein B. *Biophys. J.*, 79: 904-918 (2000)

Anhang B

Abbildungsverzeichnis

1.0	Luftwege und Ausschnitt eines Bronchiolus mit begleitender Lungenarterie.....	1
1.1	Alveole mit Surfactant-Stoffwechsel.....	4
1.2	Aufbau der Glycerophospholipide.....	5
1.3	Zusammensetzung des <i>murinen</i> Surfactant.....	6
1.4	Kristallstruktur des Trimers im SP-A.....	11
1.5	Protein-Struktur des SP-B.....	12
1.6	Anlagerung von SP-B in den Randbereichen der Doppelschichten.....	13
1.7	Konformation und Strukturmerkmale des SP-C.....	15
1.8	Kristallstruktur des Trimers im SP-D.....	17
1.9	Surfactant Modell und EM-Aufnahme einer Alveole mit Multischichten.....	18
1.10	Veränderung der Surfactant-Subtypen-Verteilung durch ARDS.....	21
2.0	Kompressionsisotherme einer Lipidmonoschicht.....	31
2.1	Langmuir- und Wilhemy-Sytem.....	32
2.2	Struktur von BODIPY-PC [®]	35
2.3	Versuchsaufbau und Schema der FM an der Luft/Wasser-Grenzfläche.....	36
2.4	Langmuir-Blodgett-Transfer.....	38
2.5	Raster-Kraft-Mikroskop: <i>cantilever</i> und Abrasterung einer Probe.....	40
2.6	Aufbau und des Schema eines Raster-Kraft-Mikroskops.....	41
2.7	<i>Tapping mode</i>	43
2.8	Statistische Analyse: Anpassung zweier Gauss-Funktionen an die Originaldaten.....	45
3.0	Isothermen der Cholesterol- und POPE-haltigen DPPC/DPPG- und DPPC/DPPG/SP-C-Filme.....	49
3.1	FM-Bilder des DPPC/DPPG/Cholesterol- und DPPC/DPPG/SP-C/ Cholesterol-Gemische..	50
3.2	FM-Bilder des DPPC/DPPG/POPE- und DPPC/DPPG/SP-C/POPE-Gemisches.....	51
3.3	Statistische Auswertung zur Bestimmung der hellen Domänen.....	52/53
3.4	SFM-Aufnahmen des DPPC/DPPG/SP-C-Systems mit 10, 30 mol % Cholesterol sowie 10 und 30 mol % POPE.....	53
3.5	Höhenprofile.....	55
3.6	SFM-Abbildung zur Auswertung der Flächenanteile der Protrusions.....	57
3.7	Protrusion-Modell: Einfluss von Cholesterol und POPE.....	62
4.0	Verhältnis Phospholipide/Protein in der Lavage von <i>wt</i> und <i>d-ko</i> Mäusen.....	67
4.1	Verhältnis Phospholipide/Protein im hydrophoben Extrakt von <i>wt</i> und <i>d-ko</i> Mäuse.....	67
4.2	HPTLC des hydrophoben Extraktes von einer <i>wt</i> Maus.....	68
4.3	Vergleich der Phospholipidzusammensetzung: <i>wt</i> und <i>d-ko</i> Maus.....	69
4.4	Vergleich der Isothermen des hydrophoben Extraktes von <i>wt</i> und <i>d-ko</i> Maus.....	71
4.5	FM-Aufnahmen des hydrophoben Extraktes (<i>wt</i> Maus).....	73
4.6	FM-Aufnahmen des hydrophoben Extraktes (<i>d-ko</i> Maus).....	74
4.7	SFM-Untersuchung des hydrophoben Extraktes (<i>wt</i> Maus).....	76
4.8	SFM-Untersuchung des hydrophoben Extraktes (<i>d-ko</i> Maus).....	77
4.9	Isothermen des hydrophoben Extraktes von <i>wt</i> und <i>d-ko</i> Maus mit einem Lipid/Protein-Verhältniss oberhalb des <i>wt</i>	81
4.10	FABP vermittelte Genregulierung.....	83
5.0	Verhältnis Phospholipide/Protein im hydrophoben Extrakt von E- und H- <i>ko</i> Mäusen.....	86
5.1	Isotherme des hydrophoben Extraktes von einer E- <i>ko</i> Maus.....	87

6.0	Struktur von Pioglitazon.....	89
6.1	Lipid/Protein-Verhältnis: <i>d-ko</i> Mäuse mit und ohne Pioglitazon.....	91
6.2	Isotherme des hydrophoben Extraktes von einer mit Pioglitazon behandelten <i>d-ko</i> Maus.....	92
6.3	FM-Aufnahmen des hydrophoben Extraktes (<i>d-ko</i> Maus mit Pioglitazon).....	94
6.4	SFM-Untersuchung des hydrophoben Extraktes (<i>d-ko</i> Maus mit Pioglitazon).....	95
6.5	Flächenverteilung der Protrusions: <i>wt</i> , <i>d-ko</i> und <i>d-ko</i> Maus mit Pioglitazon.....	99
6.6	Signalweg von Pioglitazon mit Calvulin-1.....	100
7.0	Lipid/Protein-Verhältnisse der <i>wt</i> , <i>E-ko</i> und <i>d-ko</i> Mäuse nach Induzierung des ARDS.....	103
7.1	Isothermen des hydrophoben Extraktes von zwei <i>wt</i> Mäuse mit und ohne induzierten ARDS.....	105
7.2	Hysteresen: Kompressions- und Expansions-Zyklen des hydrophoben Extraktes einer <i>d-ko</i> Maus mit Lipid/Protein-Verlust.....	106
7.3	Lipid/Protein-Verlust der unterschiedlichen Mäuse.....	107
7.4	Isotherme des hydrophoben Extraktes von einer <i>d-ko</i> Maus unter dem Einfluß des ARDS.....	110
7.5	Compliancemessungen.....	112

Anhang C

Materialien und Geräte

C.1 Materialien und ihre Bezugsquellen

Chloroform, HPLC Grade	Sigma, Deisenhof, D
Methanol, HPLC Grade	Sigma, Deisenhof, D
Cholesterol	Sigma, Deisenhof, D
Fluorescamin	Sigma, Deisenhof, D
DPPC	Avanti Polar Lipids, Pelham, USA
DPPG	Avanti Polar Lipids, Pelham, USA
DMPE	Avanti Polar Lipids, Pelham, USA
POPE	Avanti Polar Lipids, Pelham, USA
DPPS	Avanti Polar Lipids, Pelham, USA
DPPI	Avanti Polar Lipids, Pelham, USA
Sphingomyelin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Perchlorsäure	Merck, Frankfurt, D
BODIPY-PC [®]	Avanti Polar Lipids, Pelham, USA
Mucosol	Sigma, Deisenhof, D
Mica Sheets	Provac AG, Schweiz
<i>kimwipes</i> -Wischtücher	Merck, Frankfurt, D
Ammonium-Molybdat	Sigma, Deisenhof, D
Ascorbinsäure	Merck, Frankfurt, D
SDS	Sigma, Deisenhof, D
BSA	Sigma, Deisenhof, D
Natriumdihydrogenphosphat-2-hydrat	Merck, Frankfurt, D
Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat	Merck, Frankfurt, D
Cholesterin Farbstest	Merck, Frankfurt, D
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, D
Ameisensäure	Merck, Frankfurt, D
n-Hexan	Merck, Darmstadt, D
Diisopropylether	Merck, Frankfurt, D
Dichlormethan	Merck, Frankfurt, D
<i>cantilever</i> (Luft)	Nanoscience Instruments, Phoenix, USA
<i>cantilever</i> (Wasser)	Veeco Metrology Group, Santa Barbara, USA

C.2 Geräte und ihre Bezugsquellen

Raster-Kraft-Mikroskop	Digital Instruments, Santa Barbara, USA
Fluoreszenz-Mikroskop STM5-MJS	Olympus, Hamburg, D
Mikroskopiertisch	Riegeler & Kirstein, Mainz, D
Langmuir-Filmwaage	Lauda, Lauda-Königshofen, D
Wilhelmy-Filmwaage	Riegeler & Kirstein, Mainz, D
Mikroliterspritze	Merck, Darmstadt, D
HPTLC-Platten	Merck, Darmstadt, D
Reinstwasseranlage Milli Q RO 10 Plus und Milli Q Plus 185	Millipore, Eschborn, D
Zentrifugen	Beckmann, München, D
Thermostat, RMS	Lauda, Lauda-Königshofen, D

Anhang D

Danksagung

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Galla für die Möglichkeit in einem Umfeld arbeiten zu können, dass die Eigenständigkeit und die Umsetzung eigener Ideen unterstützt. Des weiteren möchte ich mich für die Hilfs- und die Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Prof. Dr. Spener und Herrn Dr. Christian Schachtrup danke ich für die gute Kooperation. Das interdisziplinäre Arbeiten hat mir sehr viel Spaß bereitet. Zusätzlich hat es mir gezeigt, wie wichtig es ist Probleme aus verschiedenen Sichtweisen zu sehen.

Ich danke allen (ehemaligen und aktuellen) Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, die zu einem netten Arbeitsklima beigetragen haben. Wissenschaftliche Probleme wurden in einzelnen Gesprächen diskutiert und führten zu Lösungen, die mich immer wieder neu motivierten.

Insbesondere sei hier Lutz Hilterhaus erwähnt. Mit seiner Unterstützung konnte ich die Untersuchungen des Cholesterols und POPEs noch innerhalb der Promotionszeit abschließen. Bedanken möchte ich mich auch für die Durchsicht meiner Arbeit.

Sebastian Schrot möchte ich danken für die Unterstützung bei den SFM-Messungen. Ohne ihn wären die vielen Stunden am Gerät nur halb so lustig gewesen.

Silke Steffens möchte ich danken für die Durchsicht und Korrektur meiner Arbeit. Daniel Breitenstein möchte ich danken für die tolle Zusammenarbeit insbesondere zu Beginn der Promotion.

Mein Dank geht an allen Mitgliedern des Institut für Biochemie für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Betriebsklima.

Meinen Freunden möchte ich für die vielen unterstützenden Worte danken. Insbesondere sei hier Stefan Thomalla erwähnt, der immer ein offenes Ohr hatte, wenn die Frustrationsgrenze erreicht war. Meiner Freundin Sonja möchte ich danken, für ihr Verständnis, die vielen aufbauenden Worte und ihre Geduld insbesondere am Ende der Promotionszeit.

Meinen Lieblingsschwager für das Leihen des Laptops. Er hat seinen Dienst bravourös erfüllt.

Rainer möchte ich danken für den mobilen Speicherbaustein, hab ihn doch etwas länger benötigt als ich gedacht habe.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern schulde ich mehr als Dank für die Unterstützung meines Studiums.

Anhang E

Lebenslauf

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE INFORMATION

- **Name:** Stefan Malcharek
- **Staatsangehörigkeit:** deutsch
- **Geburtsdatum:** 19. Dezember 1974
- **Geburtsort:** Herten
- **Eltern:** Hannelore Malcharek und Detlef Malcharek
- **Familienstand:** ledig

AUSBILDUNG

Schule	1981-1985	Grundschule: Augustaschule in Herten
	1985-1991	Erich Klausenerschule in Herten
	1992-1994	Fachhochschulreife: Hans-Böckler-Kollegschule in Marl
Ausbildung:	1991-1994	Ausbildung zum Chemikanten bei der Hüls AG in Marl
Studium:	Oktober 1994	Aufnahme des Chemiestudiums an der Gesamthochschule in Essen
	1997	Vordiplom Chemie
	1997-2000	Fortsetzung des Studiums mit Zusatzfach Biochemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster
	2000-2001	Diplomarbeit an der Universität in Massachusetts im Arbeitskreis von Prof. Dr. Donald Melchior. Thema "Fluorosomen zur quantitativen Bestimmung der Inkorporation von lipophilen Substanzen in Lipidmembranen"
	Mai 2001	Beginn der Dissertation am Institut für Biochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster unter der Leitung von Prof. Dr. Hans-Joachim Galla

TÄTIGKEITEN & FÖRDERUNGEN

April. 2002	Mitarbeit im Jung Chemiker Forum Münster
Mai 2003	Reisestipendium der Deutschen Gesellschaft für Biophysik zur 4. Europäischen Biophysiktagung in Alicante/Spanien