

Aus dem Forschungszentrum Borstel

Leibniz Lungenzentrum

Leitung: Prof. Dr. Ulrich Schaible

Programmbereich Infektionen

Forschungsgruppe Zelluläre Pneumologie

Leitung: Prof. Dr. Cordula Stamme

**Surfactantprotein A steigert den Abbau LPS-  
induzierter TLR4 Proteinexpression in primären  
Alveolarmakrophagen unter Beteiligung von Rab7  
und  $\beta$ -Arrestin2**

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Medizin

Vorgelegt von

Katja Freundt

aus Berlin

Lübeck 2022

1. Berichtstatter\*in: Prof. Dr. med. Cordula Stamme

2. Berichtstatter\*in: PD Dr. med. Ingo Menrath

Tag der mündlichen Prüfung: 12.05.2023

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 12.05.2023

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

<b>I</b>	<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>3</b>
<b>II</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>6</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung und Fragestellung.....</b>	<b>9</b>
1.1	Bakterielle Pneumonien.....	9
1.2	Pulmonale Abwehrmechanismen.....	10
1.2.1	Alveolarmakrophagen.....	10
1.3	Pulmonaler Surfactant.....	11
1.3.1	Surfactantprotein (SP)-A.....	12
1.3.2	SPA-defiziente Mäuse.....	16
1.4	Gramnegative Bakterien und Lipopolysaccharid (LPS).....	16
1.5	Toll-Like-Rezeptor 4 (TLR4).....	17
1.6	β-Arrestin2.....	19
1.7	Rab7.....	20
1.8	Fragestellung und Ziele der Arbeit.....	21
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
2.1	Tiere.....	23
2.1.1	Ratten.....	23
2.2.2	Mäuse.....	23
2.2	Humane Zellen.....	24
2.3	Material.....	24

2.3.1	Geräte und Ausrüstung.....	24
2.3.2	Reagenzien, Chemikalien und Kitsysteme.....	27
2.3.3	Puffer und Lösungen.....	29
2.3.4	Inhibitoren.....	34
2.3.5	Antikörper.....	34
2.3.5.1	Primäre Antikörper.....	34
2.3.5.2	Sekundäre Antikörper.....	35
2.3.6	Software.....	35
2.4	Methoden.....	36
2.4.1	Isolierung von humanem SP-A.....	36
2.4.2	Lipopolysaccharid.....	37
2.4.3	Bronchoalveoläre Lavage von Mäusen und Ratten.....	37
2.4.4	Stimulation von Alveolarmakrophagen.....	38
2.4.5	Zelllysate.....	38
2.4.6	SDS-PAGE und Immunoblot Analyse.....	39
2.4.7	Konfokalmikroskopie.....	40
2.4.8	ELISA.....	41
2.4.9	Statistische Analyse.....	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>
3.1	SP-A hemmt die LPS-induzierte Steigerung der TLR4 Proteinexpression in primären humanen Alveolarmakrophagen.....	42

3.2	SP-A hemmt die LPS-induzierte Steigerung der TLR4 Proteinexpression in primären Alveolarmakrophagen von Mäusen und Ratten unabhängig von der TLR4 Proteintranslation.....	44
3.3	Rab7 ist beteiligt am SP-A-gesteigerten Abbau der LPS-induzierten TLR4 Proteinexpression.....	47
3.4	SP-A steigert Kolokalisation von TLR4 und Lysosom in primären Alveolarmakrophagen unter Beteiligung von Rab7.....	50
3.5	Rab7 ist beteiligt an der SP-A-vermittelten Hemmung der LPS-induzierten TNF- $\alpha$ Freisetzung.....	54
3.6	$\beta$ -Arrestin2 ist notwendig für den SP-A-gesteigerten Abbau der LPS-induzierten TLR4 Proteinexpression.....	56
3.7	$\beta$ -Arrestin2 ist notwendig für die SP-A-vermittelte Rab7 Proteinexpression in Anwesenheit von LPS.....	60
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>62</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>73</b>
	<b>Danksagungen.....</b>	<b>86</b>
	<b>Publikationsliste.....</b>	<b>87</b>

## II Abkürzungsverzeichnis

AEC I and II	alveolar epithelial cells type I and II
AM	Alveolarmakrophagen
APS	Ammoniumpersulfat
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BPI	bactericidal permeability increasing protein
BCA-Assay	Bicinchoninsäure-Assay
BSA	Bovines Serumalbumin
$\beta$ -Arr2 <sup>-/-</sup> Mäuse	$\beta$ -Arrestin2 defiziente Mäuse
C1qRp	C1q receptor for phagocytosis
CAP	community-acquired pneumonia
CD-14	cluster of differentiation 14
CHX	Cycloheximid
CPAP	continuous positive airway pressure
CRD	carbohydrate-recognition domain
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	Diamidin-2-Phenylindol
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FBS	Fetal bovine serum
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

HAP	hospital-acquired pneumonia
HRP	horse radish peroxidase
IL-6	Interleukin 6
I $\kappa$ B- $\alpha$	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha
IRF3	Interferon regulatory factor 3
kDa	Kilodalton
LB	Laemmli Buffer
LBP	LPS-binding-protein
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	mitogen-activated protein
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MD-2	myeloider Differenzierungsfaktor 2
MyD88	myeloider Differenzierungsfaktor 88
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa B
OGP	Octyl $\beta$ -D-glucopyranoside
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PRRs	pattern recognition receptors
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RPMI Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium

SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electroporesis
SIRP- $\alpha$	signal regulatory protein $\alpha$
SP (A-D)	Surfactantproteine (A-D)
SP-A <sup>-/-</sup> Mäuse	Surfactant Protein-A-defiziente Mäuse
SPR 210	210 kD SP-A-binding protein
TBS	TRIS buffered saline
TBS-T	TRIS buffered saline Tween
TBW	TRIS buffered water
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIRAP	TIR Domain Containing Adaptor Protein
TLRs	Toll-Like-Rezeptoren
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
TRAM	TRIF related adaptor molecule
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VAP	ventilator-associated pneumonia
WHO	World Health Organization

## 1 Einleitung und Fragestellung

### 1.1 Bakterielle Pneumonien

Pneumonien gehen nach wie vor mit einer hohen Letalität einher und sind weltweit die häufigste Todesursache im Rahmen infektiöser Erkrankungen (Cilloniz et al., 2016). Im Jahr 2019 starben 2.6 Millionen Menschen weltweit an Pneumonien, was ca. fünf Prozent aller Todesfälle entspricht (WHO, 2020). Durch höhere Lebenserwartung und entsprechende Komorbiditäten der Bevölkerung werden infektiöse Lungenerkrankungen in Zukunft weiter an Relevanz zunehmen. Klinisch wird zwischen ambulant erworbenen (CAP, community-acquired pneumonia) und nosokomialen (HAP, hospital-acquired pneumonia sowie VAP, ventilator-associated pneumonia) Pneumonien unterschieden (Hager et al., 2014). CAP und HAP/VAP unterscheiden sich vor allem in ihrer mikrobiellen Ätiologie. Weltweit ist *Streptococcus pneumoniae* mit 10-20% der häufigste nachgewiesene Erreger der CAP. Im Rahmen einer HAP und VAP überwiegen mit 50-80% der nachgewiesenen Erreger gramnegative Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Haemophilus influenzae* und *Klebsiella pneumoniae* (Cilloniz et al., 2016). Da ein spezifischer Keimnachweis oft nicht gelingt, stellt die kalkulierte Therapie mit Antibiotika bei allen Pneumonieformen unabhängig von der Genese die gängige Behandlungsmethode dar und richtet sich nach dem zu erwartendem Keimspektrum. Die therapeutische Effektivität der Antibiotika nimmt jedoch durch zunehmende Antibiotika-Resistenzbildung kontinuierlich ab (Leibovici et al., 2016; Tacconelli et al., 2017; Cilloniz et al., 2019). Für die Identifikation zusätzlicher Therapieoptionen ist es demnach unerlässlich, die körpereigenen pulmonalen Abwehrmechanismen besser zu verstehen und endogene Verteidigungsproteine, die antibakterielle Immunantworten induzieren und regulieren, zu charakterisieren (Parker et al., 2016).

## 1.2 Pulmonale Abwehrmechanismen

Die am Gasaustausch beteiligte Oberfläche der Lunge beträgt je nach inspiratorischer Tiefe 50-100 m<sup>2</sup>. Da diese Fläche täglich ca. 15.000 Liter ventilierter Atemluft und somit kontinuierlich Reizen aus der Umwelt ausgesetzt ist, hat sich ein komplexes pulmonales Verteidigungssystem entwickelt, welches das Gewebe vor Bakterien, Viren, Schadstoffen und Allergenen schützt. Dieses System muss eine Balance zwischen effektiver Abwehr und Reduktion von gewebeschädigenden inflammatorischen Prozessen schaffen (Wright, 2004). Die Aufrechterhaltung der pulmonalen Homöostase wird in den proximalen Atemwegen neben der epithelialen Barriere in erster Linie über die mukoziliäre Clearance erreicht (Voynow und Rubin 2009). Becher- und Keulenzellen sowie submuköse Drüsen der oberen Atemwege produzieren Mukus, der über die Zilien Pathogene proximalwärts transportiert und im Rachen verschluckt wird. Im Alveolarraum gewährleisten Alveolarepithelzellen Typ I und Typ II (AEC, alveolar epithelial cells type I and II) sowie phagozytäre Alveolarmakrophagen und Neutrophile die angeborene Immunabwehr (Whitsett und Alenghat, 2015). Epithel- und immunkompetente Zellen sezernieren antimikrobielle Substanzen wie Defensine, Lysozym, BPI (bacteria permeability increasing protein) und Laktoferrin (Rogan et al., 2006). AEC Typ II synthetisieren, sezernieren und recyceln pulmonalen Surfactant, einen Lipid-Proteinkomplex mit zentralen biophysikalischen und immunologischen Funktionen (Wright, 2004; Sender und Stamme, 2014).

### 1.2.1 Alveolarmakrophagen

Unter physiologischen Bedingungen konstituieren Alveolarmakrophagen 90-95% der residenten Leukozyten im Alveolarraum. Als Teil der zellulären angeborenen Immunantwort ist ihre primäre Funktion die Eliminierung von Mikroorganismen oder infizierten Zellen (Geissmann et al., 2010). Residente Makrophagen der unterschiedlichen Organe unterscheiden sich aufgrund des gewebsspezifischen Umgebungsmilieus und der an sie gestellten Anforderungen in ihrem funktionellen

Phänotyp (Mosser und Edwards, 2008). Das spezifische Umgebungsmilieu von Alveolarmakrophagen ist pulmonaler Surfactant und die besondere Anforderung ist eine adäquate Immunreaktion auf die vielfältigen Antigene in der ventilierten Atemluft. Im Sinne einer Immuntoleranz gegenüber harmlosen Antigenen zeigen Alveolarmakrophagen unter Ruhebedingungen bzw. in Abwesenheit einer relevanten Infektion eine reduzierte Aktivierbarkeit durch Antigene und eine verminderte phagozytäre Kapazität. Im Rahmen einer Infektion hingegen, z. B. bei einer Pneumonie, zeigen aktivierte Alveolarmakrophagen einen aggressiveren, pro-inflammatorischen Phänotyp. Dieser funktionelle Switch wird durch lösliche Faktoren im Alveolarraum streng reguliert und dient der Verhinderung überschießender immunologischer Prozesse durch aktivierte Alveolarmakrophagen (Hussell und Bell, 2014). Zu diesen regulierenden, lungen-spezifischen Faktoren gehören auch die löslichen Surfactantproteine.

### 1.3 Pulmonaler Surfactant

Seit Mitte des 20. Jahrhunderts ist bekannt, dass pulmonaler Surfactant, der die luminale Oberfläche der Alveolen auskleidet, biophysikalische Eigenschaften besitzt, die den extraterinen Gasaustausch erst ermöglichen (Pattle, 1955; Clements, 1957). Postuliert wurde das Vorhandensein einer solchen Substanz, die später als Surfactant (**surface active agent**) bezeichnet wurde, erstmalig von dem Schweizer Internisten Kurt von Neergaard (v. Neergard, 1929). Von Neergard stellte 1929 fest, dass man einen niedrigeren Druck für die Entfaltung von Tierlungen benötigte, wenn man diese mit Flüssigkeit statt mit Luft füllte, da durch das Aufheben der Luft-Flüssigkeits-Grenze die Oberflächenspannung als entgegen wirkende Kraft wegfiel. Von Neergaard erstellte entsprechende Druck-Volumen-Kurven mit Luft und Flüssigkeit und kam zu folgenden Ergebnissen. Die Oberflächenspannung trägt erheblich mehr als die Gewebeelastizität dazu bei, dass die Lunge sich zusammenzieht. Eine reduzierte Oberflächenspannung wäre also von Vorteil für die adäquate Expansion der Lunge sowie vor allem für das Verhindern des Kollabierens der Alveolen am Ende der Expiration. Definitiv nachgewiesen wurden oberflächenaktive Moleküle 1955 von dem Briten Richard

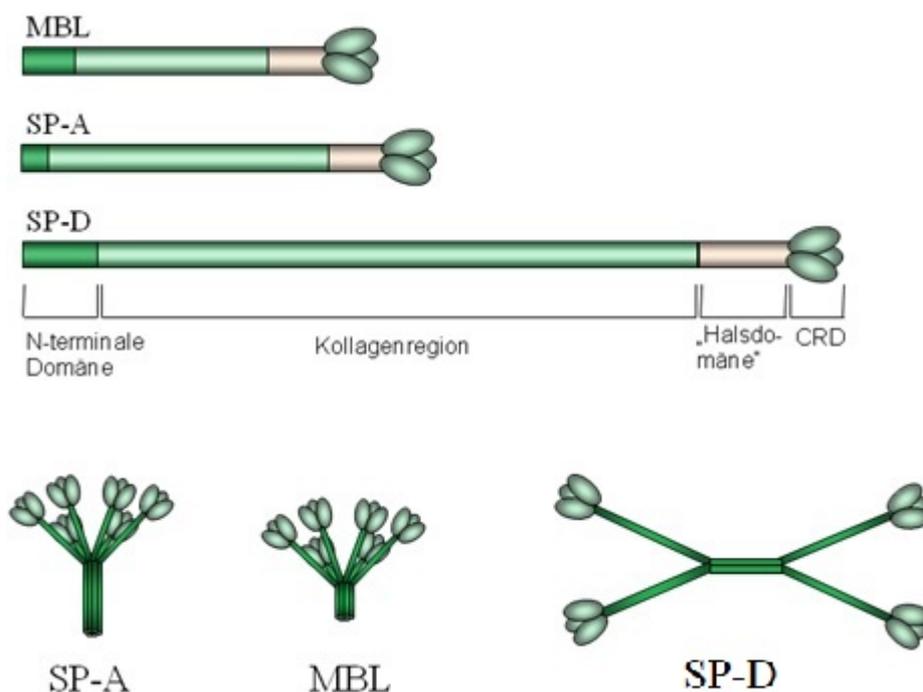
Pattle (Pattle, 1955) und weiter charakterisiert durch den US-amerikanischen Mediziner John A. Clements (Clements, 1957). Pulmonaler Surfactant setzt, als Lipid-Proteinkomplex, vor allem am Ende der Expiration die Oberflächenspannung an der Luft-Flüssigkeitsgrenze herab und verhindert so das Kollabieren der Alveolen (Lopez-Rodriguez und Pérez-Gil, 2014). Diese Erkenntnisse in der Atemmechanik waren von großer Relevanz für das Verständnis und die Behandlung des Atemnotsyndroms frühgeborener Kinder (Halliday, 2008). Frühgeborene leiden aufgrund der unvollständigen Lungenreife, und somit fehlender Surfactantproduktion von AEC II Zellen, an schweren respiratorischen Defiziten, da am Ende der Expiration die Alveolen kollabieren und eine Inspiration stark erschwert wird. Konsekutiv kommt es dadurch zu Hypoxie bei erschwertem Gasaustausch sowie zu Atelektasen. Mitte bis Ende des 20. Jahrhundert wurden verschiedene synthetische und natürliche Surfactantpräparate zunächst im Tiermodell getestet, später bei Neugeborenen eingesetzt. Hierbei erwiesen sich natürliche, proteinhaltige Surfactants deutlich überlegen gegenüber synthetischen, proteinfreien Surfactantpräparaten. Therapeutisch wird heute vor allem boviner oder porciner Surfactant über einen Tubus verabreicht und zur Vermeidung von Atelektasen ein kontinuierlich positiver Atemwegsdruck (CPAP, continuous positive airway pressure) eingesetzt. Durch den Einsatz der Surfactanttherapie konnte die Mortalität und das Auftreten des pulmonalen Air-Leak-Syndroms von Frühgeborenen gleichermaßen um ca. 50% gesenkt werden (Halliday, 2008; Leitlinie der Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin, 2017).

### **1.3.1 Surfactantprotein (SP)-A**

Surfactant besteht zu ca. 90% aus Lipiden, von denen wiederum 70% Phosphatidylcholine sind, und zu 10% aus Proteinen (Veldhuizen et al., 1998). Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) bildet 40% der Surfactant-Gesamtmasse und ist entscheidend für die reduzierte Oberflächenspannung bei der Expiration (Wüstneck et al., 2005). Neben anderen gesättigten und ungesättigten Phosphatidylcholinen wird die Lipidfraktion des Surfactant noch durch andere

Phospholipide, Cholesterol und Neutralfette gebildet (Pérez-Gil, 2008; Lopez-Rodriguez und Pérez-Gil, 2014). Es wurden vier Surfactantproteine (SP) identifiziert ((SP) A-D). SP-B und SP-C haben über ihre Interaktion mit den Phospholipiden in erster Linie, aber nicht ausschließlich, biophysikalische Funktionen, wohingegen SP-A und SP-D wichtige Bestandteile der angeborenen und erworbenen pulmonalen Immunabwehr sind (Nathan et al., 2016). Surfactantproteine und -lipide werden in Typ II Pneumozyten der Alveolen synthetisiert. Auf bestimmte Reize, wie tiefe Inspiration, werden die Surfactantbestandteile aus speziellen sekretorischen Organellen in den Alveolarraum freigesetzt. Bis auf SP-C werden die Surfactantproteine auch in Keulenzellen und submukösen Zellen der oberen Atemwege gebildet. Es ist außerdem bekannt, dass SP-A und SP-D auch in lungenfernen Geweben wie Gehirn, Hoden, Prostata, Pankreas und Herz exprimiert werden (Madhukaran et al., 2015; Rokade und Madan, 2016). Die physiologischen Funktionen extrapulmonal exprimierter Surfactantproteine sind Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten (Yang et al., 2017; Zhang et al., 2018). Strukturell handelt es sich bei SP-A und SP-D um C-Typ-Kollektine (C-Typ, calcium-dependent, Kalzium-abhängig). Die meisten Kollektine sind membranständig, MBL (Mannose-bindendes Lektin) ist neben SP-A und SP-D das einzige andere bekannte lösliche C-Typ-Kollektin des Menschen (Wright, 2004). MBL wird als Akute-Phase-Protein von der Leber gebildet und ist im Serum nachweisbar (Kalia et al., 2021). Typisch für C-Typ-Kollektine ist eine aminoternale Kollagenregion sowie eine Calcium-abhängige (C-Typ) Domäne zur Erkennung von Kohlenhydraten (CRD, carbohydrate-recognition domain). Die CRD ist über eine alpha-helikale Coiled-Coil-Struktur (Hals-Domäne) mit der Kollagenhelix verbunden. Die Monomere sind als primäre Translationsprodukte zwischen 26 und 43 kDa groß und bilden spontan über das Zusammenführen ihrer Hals-Domänen Trimere aus drei identischen Peptidketten. SP-A und MBL bilden oligomere Strukturen (400-700 kDa), welche aus 6 der oben genannten Trimere bestehen. Es handelt sich somit bei SP-A und MBL um Oktadecamere, deren einem Blumenstrauß ähnelnde Quartärstruktur die Bindung von Pathogenen oder deren Partstrukturen steigert. SP-D besteht aus vier trimeren Untereinheiten und bildet ein kreuzförmiges Dodecamer (Wright, 2004) (**Abbildung 1.1**). Der Komplementfaktor C1q ähnelt strukturell SP-A, allerdings fehlt C1q die CRD, weswegen C1q nicht zu den

Kollektinen zählt (Malhotra et al., 1994). Über die CRD binden SP-A und SP-D an eine Vielzahl klinisch relevanter Bakterien, Viren, Pilze, Allergene sowie an apoptotische Zellen. Die Kollektine sind somit direkt antimikrobiell aktiv und an der Opsonisierung beteiligt. Die Phagozytose von Pathogenen und apoptotischen Zellen durch Zellen der angeborenen Immunabwehr wird gesteigert. Zusätzlich entfalten Surfactantproteine ihre immunologischen Funktionen durch die Beeinflussung der Produktion von Zytokinen sowie pro- bzw. antiinflammatorischen Mediatoren der Zielzellen (Wright, 2004; Nayak et al., 2012).



**Abbildung 1.1:** Lösliche C-Typ-Kollektine (modifiziert nach Wright, 2004)

Bisher konnte kein spezifischer Rezeptor für SP-A und SP-D identifiziert werden. Beide Proteine interagieren mit einer Vielzahl zellulärer Rezeptoren und Bindungspartner (Jakel et al., 2013) (**Abbildung 1.2**). SP-A und die strukturell ähnlichen Proteine C1q und MBL binden über ihre Kollagenregion an den Calreticulin-CD91-Komplex, der an der Phagozytose apoptotischer Zellen beteiligt ist (Vandivier et al., 2002). SP-A und SPD binden mit ihrer CRD an SIRP- $\alpha$  (signal regulatory protein  $\alpha$ ) und reduzieren über die nachgeschalteten Signalkaskaden die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren in der Zielzelle (Gardai et al., 2003).

SP-A und SP-D binden außerdem an unterschiedlichen Domänen des löslichen Lipopolysaccharid (LPS)-Rezeptors CD-14 (cluster of differentiation 14) und modifizieren dadurch die LPS/CD-14-Interaktion (Sano et al., 2000). Die löslichen Kollektine und C1q interagieren mit dem C1qRp (C1q receptor for phagocytosis) (McGreal et al., 2002). Ein vielversprechender Kandidat für einen spezifischen SP-A-Rezeptor auf AEC Typ II und Alveolarmakrophagen ist der Myosin 18A-Rezeptor, der ehemals als SPR 210 (210 kD SP-A-binding protein) aus der Makrophagen-Zelllinie U937 isoliert wurde (Chroneos et al., 1996). Nach Inhibition dieses Rezeptors konnte beispielsweise die SP-A-vermittelte Aufnahme von *Mycobacterium bovis* in Alveolarmakrophagen gehemmt werden (Yang et al., 2005). Eine weitere Möglichkeit ist der Komplementrezeptor CR3, auch CD11b oder CD18 genannt (Gil et al., 2009). Die Expression dieses Rezeptors an der Zellmembran von Alveolarmakrophagen ist in SP-A-defizienten Mäusen signifikant reduziert und kann durch die Gabe von SP-A teilweise wiederhergestellt werden. Auch die direkte Calcium-abhängige Bindung von SP-A an Toll-Like-Rezeptor 4 (TLR4) und MD-2 (myeloider Differenzierungsfaktor 2) wurde beschrieben, konnte bisher aber nicht abschließend nachgewiesen werden (Yamada et al., 2006; Jakel et al., 2013).

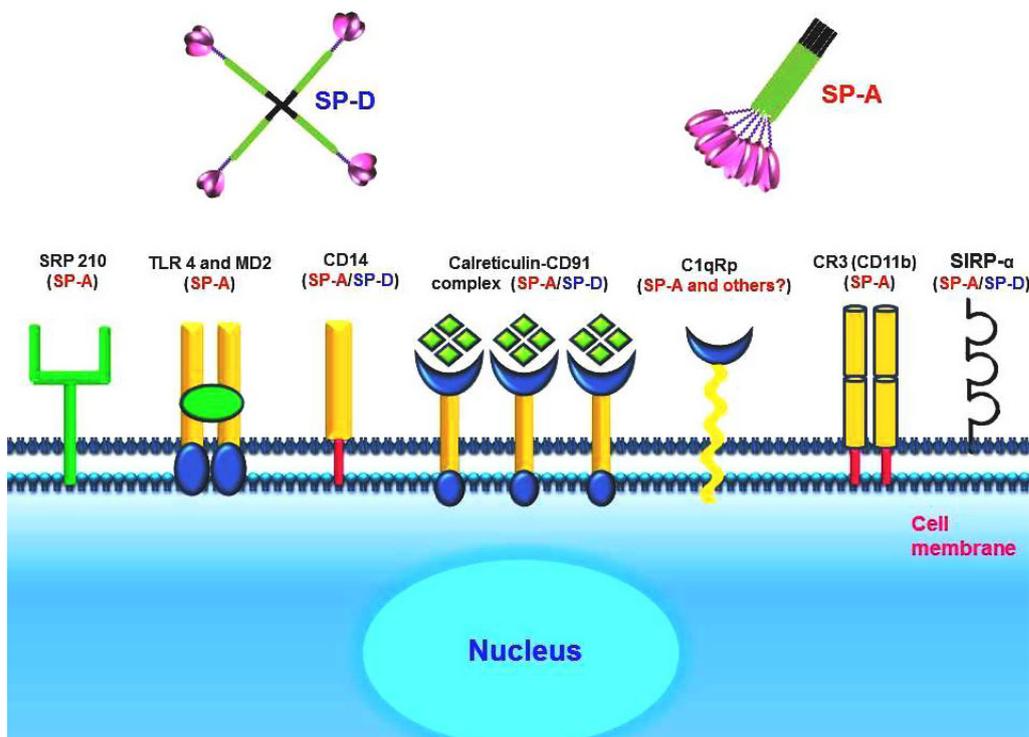


Abbildung 1.2: SP-A- und SP-D-Rezeptorkandidaten. (Jakel et al, 2013)

### 1.3.2 SP-A-defiziente Mäuse

SP-A-defiziente Mäuse stehen der Wissenschaft seit 1996 zur Verfügung (Korfhagen et al., 1996). SP-A-defiziente Mäuse haben eine normale Lungenfunktion und einen physiologischen Surfactantmetabolismus, d. h. die biophysikalischen Eigenschaften des Surfactants sind unverändert (Ikegami et al., 1998). Demgegenüber bestätigen in vitro Daten und daraus folgende in vivo Infektionsexperimente eine deutlich gesteigerte Suszeptibilität der SP-A-defizienten Maus gegenüber intratracheal applizierten Pathogenen, die sich in einer pulmonalen Inflammation und einer signifikant reduzierten phagozytären Kapazität von Alveolarmakrophagen sowie einer verminderten Pathogen-Clearance manifestiert (LeVine et al., 2000; Li et al., 2002). SP-A hat eine Schlüsselrolle in der Eingrenzung pro-inflammatorischer Signalwege und in der Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der Immunhomöostase in der gramnegativen Infektion (Quintanilla et al., 2015; Yang et al., 2017; Zhang et al., 2017) sowie nach der Applikation von isoliertem LPS, dem dominanten Virulenzfaktor gramnegativer Bakterien (Borron et al., 2000; George et al., 2008).

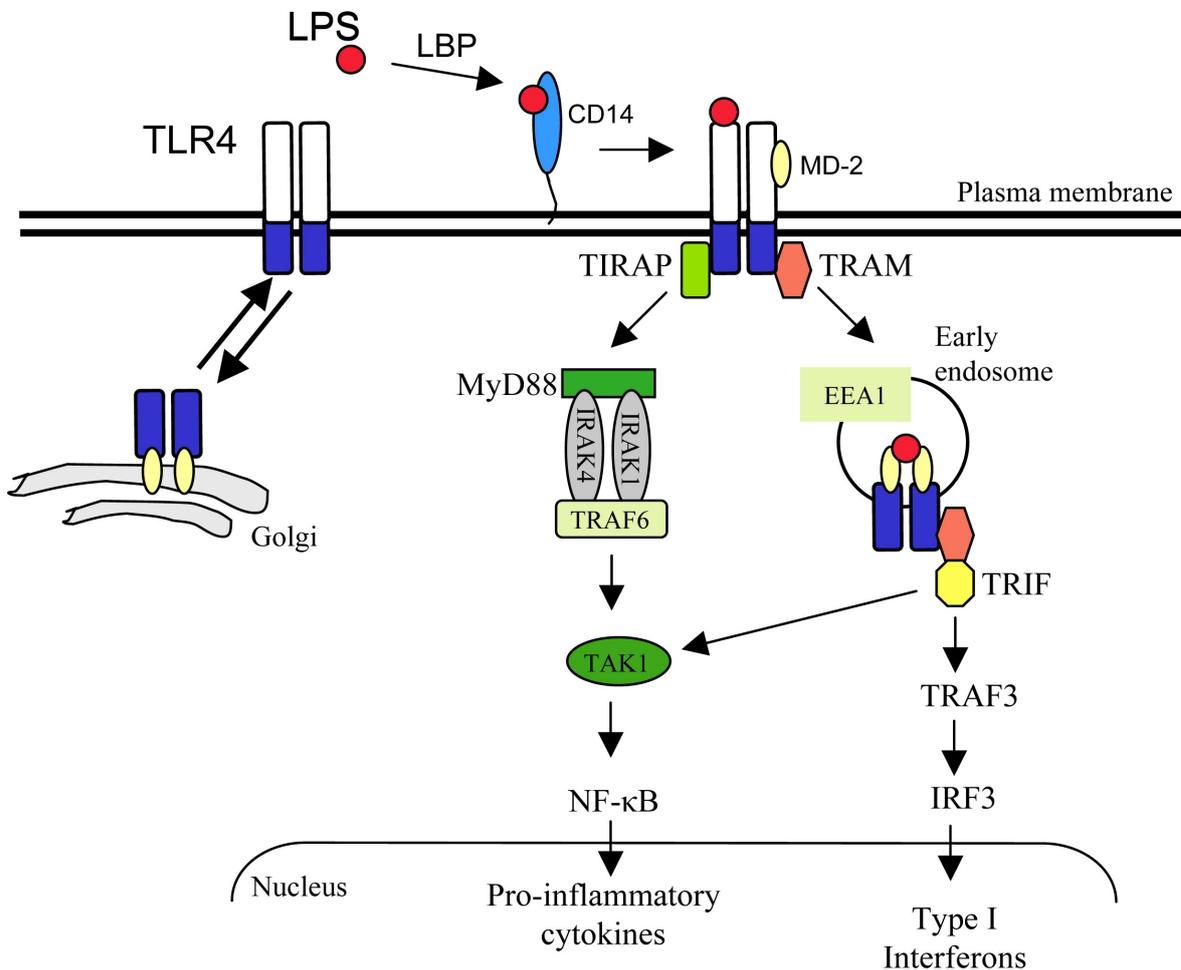
### 1.4 Gramnegative Bakterien und Lipopolysaccharid (LPS)

Pneumonien, die durch gramnegative Bakterien, wie *Pseudomonas aeruginosa* oder *Klebsiella pneumoniae* verursacht werden, haben bei steigender Prävalenz von CAP, HAP und VAP eine zunehmende Relevanz für Morbidität und Mortalität (Cilloniz et al., 2016; Cilloniz et al., 2019). Der zentrale Virulenzfaktor gramnegativer Bakterien ist das in deren Zellwand befindliche hitzestabile LPS, das beim Zerfall der Bakterien frei wird. LPS besteht aus einer Lipid-, einer Kern- und einer Polysaccharidregion. Der Lipidteil (Lipid A) ist das pathogene Endotoxin und ist je nach Bakterienart ein effektiver Stimulator des angeborenen Immunsystems. Extrazellulär bindet LPS über das LPS-binding-protein (LBP) an membrangebundenes oder gelöstes CD14, um dann an der Oberfläche der Zellen des Immunsystems mit TLR4 zu interagieren (Alexander und Rietschel, 2001).

## 1.5 Toll-Like-Rezeptor 4 (TLR4)

TLRs (Toll-Like-Rezeptoren) sind die bisher am besten charakterisierte Rezeptorgruppe des angeborenen Immunsystems und gehören zu den sogenannten PRRs (pattern recognition receptors). Es gibt insgesamt 10 TLR-Familien mit spezifischen Liganden und Funktionen. TLRs spielen eine zentrale Rolle bei der Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (pathogen associated molecular pattern, PAMP) und anschließender angeborener Immunantwort, Induktion von Entzündung und Initiierung der erworbenen Immunantwort. TLRs werden von fast allen Immun- und Strukturzellen exprimiert und erkennen eine Vielzahl verschiedener Zellwandbestandteile von Bakterien und Pilzen, bakterieller Lipoproteine sowie bakterieller und viraler Nukleinsäuren (Barton und Medzhitov, 2002; Kagan und Barton, 2015). Die Lokalisation von TLRs in den verschiedenen Zellkompartimenten ist von entscheidender Relevanz im Rahmen der Signaltransduktion (**Abbildung 2**). Einige TLRs befinden sich in endolysosomalen Kompartimenten, die anderen an der Zelloberfläche. Auch TLRs, die eigentlich auf der Zelloberfläche vorkommen, können dem endozytären Weg folgen und intrazellulär an der Signaltransduktion beteiligt sein (McGettrick und O'Neill, 2010). Nach LPS-Exposition ist der Transport von TLR4 vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran gesteigert (Latz et al., 2002), ein Prozess, der unter anderem durch das Glykoprotein MD2 reguliert wird (Nagai et al., 2002). TLR4 bindet CD-14-gebundenes LPS an der Zelloberfläche und aktiviert über die Adaptorproteine MyD88 (myeloider Differenzierungsfaktor 88) und TIRAP (TIR Domain Containing Adaptor Protein) die Aktivierung von NF- $\kappa$ B (Nuclear factor kappa B) und somit die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 und TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ). Diesem Vorgang an der Membran sequenziell nachgeschaltet folgt die Clathrin-abhängige Aufnahme des TLR4-Rezeptorkomplexes als frühes Endosom über die Adaptorproteine TRAM (TRIF related adaptor molecule) und TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ) mit anschließender Translokation von IRF3 (Interferon regulatory factor 3) und gesteigerter Bildung von Typ I Interferonen (Barton und Kagan, 2009). Ein Teil der TLR4-Rezeptoren gelangt vom frühen Endosom zurück zum Golgi-Apparat und wird recycelt. Ein anderer Teil folgt dem endosomalen Weg und wird im Endolysosom abgebaut. Letztgenannter Vorgang

ist funktionell von zentraler Bedeutung, da es bei Hemmung am TLR4-Abbau beteiligter Proteine zu einer signifikanten Steigerung der LPS-induzierten inflammatorischen Signalkaskade kommt (Husebye et al., 2006).



**Abbildung 2:** TLR4-Signaltransduktion (modifiziert nach McGettrick und O'Neill, 2010)

Die Wirkung des Lungen-spezifischen Umgebungsmilieus auf die TLR4 Proteinexpression und Lokalisation in Alveolarmakrophagen ist Gegenstand aktueller Forschung. Unter basalen, physiologischen Bedingungen wirkt sich SP-A kaum oder nur sehr transient auf die TLR4 Proteinexpression in humanen Makrophagen aus (Henning et al., 2008). In Anwesenheit von LPS beeinflusst SP-A jedoch die TLR4 Proteinexpression und die subzelluläre TLR4 Lokalisation in primären Alveolarmakrophagen (Sender et al., 2013). Alveolarmakrophagen, die vor der Zugabe von LPS mit SP-A inkubiert wurden, zeigten eine deutlich reduzierte Steigerung der TLR4 Proteinexpression (Sender et al., 2013). Zudem

wurde die LPS-induzierte Kolokalisation von TLR4 mit dem frühen Endosom reduziert und die Kolokalisation von TLR4 mit dem Post-Golgi-Kompartiment gesteigert (Sender et al., 2013). Beide Vorgänge sind abhängig von  $\beta$ -Arrestin2, dessen Expression wiederum durch SP-A gesteigert wird (Sender et al., 2013).

## 1.6 $\beta$ -Arrestin2

Arrestine sind ubiquitär im menschlichen Körper vorkommende multifunktionelle Adapter- und Signalproteine, deren klassische Funktion die Desensibilisierung (to arrest, anhalten) von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) ist (Benovic et al., 1987; Attramadal et al., 1992). GPCRs sind mit über 800 identifizierten Membranrezeptoren die größte Rezeptorklasse im menschlichen Genom und die am häufigsten genutzten Rezeptoren für Medikamente (Takeda et al., 2002). Im klassischen Model ging man davon aus, dass nach Aktivierung eines GPCRs durch ein extrazelluläres Agens die intrazelluläre Signaltransduktion ausschließlich über G-Proteine, die Deaktivierung und Internalisierung des Rezeptors wiederum von Arrestinen vermittelt wird. Mittlerweise ist bekannt, dass es auch über Arrestine im Sinne einer funktionellen Selektivität (biased agonism) zur Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden kommt (Rajagopal et al., 2010). Es sind vier verschiedene Arrestin-Typen in Säugetieren bekannt (Arrestin 1-4), wobei die ersten in den Photorezeptoren des Auges identifiziert wurden; Arrestin 1 in den Stäbchen, Arrestin 4 in den Zapfen der Netzhaut. Arrestin 2 ( $\beta$ -Arrestin1) und 3 ( $\beta$ -Arrestin2) sind nicht mit dem visuellen System assoziiert und es wurden und werden für sie neue Funktionen als multifunktionelle Adapter- und Signalproteine entdeckt, die unabhängig von GPCRs sind.  $\beta$ -Arrestine sind an diversen Transportprozessen und Signalkaskaden innerhalb der Zelle beteiligt, beispielsweise im Zusammenhang mit Phosphodiesterasen, MAP-Kinasen (MAP, mitogen-activated protein) und PI3K/Akt-Signaltransduktion (PI3K, Phosphoinositide 3-kinase) (Kang et al., 2014; Smith und Rajagopal, 2016). Sie sind auch entscheidend bei der Regulation inflammatorischer Prozesse (Freedman und Shenoy, 2018).  $\beta$ -Arrestin1 und 2 kommen überall im menschlichen Körper vor, wobei  $\beta$ -Arrestin2 vermehrt in Makrophagen exprimiert

wird (Lattin et al., 2009). Beide Proteine spielen bei Entwicklung und Funktion der Lunge eine große Rolle. Mäuse, die  $\beta$ -Arrestin1 und  $\beta$ -Arrestin2 doppel-defizient sind, sterben neonatal an respiratorischer Insuffizienz korrelierend mit Surfactantmangel und signifikant reduzierter SP-A Expression (Zhang et al., 2010). Mäuse, denen nur eines der beiden  $\beta$ -Arrestine fehlt, haben zwar normal entwickelte Lungen und sind lebensfähig, allerdings zeigen selektiv  $\beta$ -Arrestin2-defiziente Mäuse deutliche immunologische Defizite im Infektionsmodell (Fan et al., 2010). Intraperitoneal injiziertes LPS führt bei diesen Mäusen zu einer erhöhten Mortalität. Ursächlich dafür scheint die fehlende  $\beta$ -Arrestin2/-TRAF6-Bindung zu sein, wodurch es zu einer verstärkten inflammatorischen Immunantwort über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und IL-6-Freisetzung kommt (Wang et al., 2006). Zudem verhindert  $\beta$ -Arrestin2 den Abbau des NF- $\kappa$ B-Inhibitors I $\kappa$ B- $\alpha$  (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha) (Witherow et al., 2004).  $\beta$ -Arrestin2 gilt somit als Negativregulator der LPS-induzierten TLR4 Aktivierung und scheint essentiell für die den Effekt von SP-A auf die TLR4 Proteinexpression und Lokalisation zu sein (Sender et al., 2013).

## 1.7 Rab7

Rab-Proteine sind kleine monomere G-Proteine (GTPasen), die grundlegend an der zellulären Membranorganisation und somit auch an Phago- und Endozytose beteiligt sind (Hutagalung und Novick, 2011). Rab-GTPasen wechseln zwischen einer inaktiven GDP-haltigen und einer aktiven GTP-Form (GTPase-Zyklus) und befinden sich auf der dem Cytosol zugewandten Seite intrazellulärer Membranen (Stenmark und Olkkonen, 2001). In ihrer aktiven Form rekrutieren sie zahlreiche Effektorproteine, die unter anderem Vesikelformation und -bewegung beeinflussen. Es gibt im menschlichen Genom mindestens 60 Rab Gene, die für die entsprechenden Rab-Proteine kodieren (Stenmark und Olkkonen, 2001; Hutagalung und Novick, 2011). Über die Regulation von Rab-abhängigen Membrantransportwegen in primären Alveolarmakrophagen ist wenig bekannt. Da SP-A die phagozytäre und endozytäre Kapazität von Alveolarmakrophagen steigert (Tenner et al., 1989; Moulakakis et al., 2016), liegt es nahe, dass SP-A die

Expression, Membranassoziation und Aktivierung von Rab-GTPasen moduliert. Im endozytären Pathway wird das jeweilige Cargo sequentiell über Rab4, Rab5 und Rab11 Domänen in der Recyclingroute transportiert (Sönnichsen et al., 2000), in der Abbauroute von Rab5 zu Rab7 Domänen (Rink et al., 2005). Schlüsselfaktor für die Transportregulation lysosombestimmten Cargos ist Rab7 (Bucci et al., 2000). Es wurde gezeigt, dass SP-A spezifisch und transient die Proteinexpression von Rab7 und Rab7b in primären Alveolarmakrophagen von Ratten und Mäusen erhöht (Sender et al., 2011). Die Expression von lysosomassoziiertem Rab7 in Alveolarmakrophagen von SP-A-defizienten Mäusen ist reduziert und kann durch SP-A-Gabe wiederhergestellt werden (Sender et al., 2011). Zudem ist die SP-A-vermittelte Steigerung des Transportes von *E. coli* zum Lysosom abhängig von Rab7 (Sender et al., 2011). Auch die intrazelluläre TLR4-Lokalisation wird über RabGTPasen reguliert. Rab7 führt zu einem erhöhten lysosomalen Abbau von TLR4 in RAW264.7 Zellen (Wang et al., 2007). Die Möglichkeit, dass SP-A das Trafficking von TLR4 über die Regulation von Rab GTPasen moduliert und dadurch das LPS Signaling in Alveolarmakrophagen modifiziert, ist bisher nicht untersucht worden.

## 1.8 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Aufgrund zunehmender antibiotischer Resistenzen im Rahmen gramnegativer Pneumonien, die eine Hauptursache globaler Morbidität und Mortalität sind, ist es essentiell, die körpereigenen pulmonalen Abwehrmechanismen besser zu verstehen, um deren potenzielle Modulation in Zukunft therapeutisch nutzbar zu machen. Das pulmonale C-Typ-Kollektin SP-A hat zentrale Funktionen in der basalen und inflammatorischen Lungenhomöostase. Unter anderem beeinflusst SP-A die Produktion von pro- bzw. antiinflammatorischen Mediatoren pulmonaler Struktur- und Immunzellen. Dazu gehören insbesondere Alveolarmakrophagen, die ein wesentlicher Bestandteil der zellulären angeborenen Immunabwehr der Lunge sind. LPS, der dominante Virulenzfaktor gramnegativer Bakterien, bindet an TLR4 an der Oberfläche von Zellen des angeborenen Immunsystems und

induziert über nachgeschaltete Signalkaskaden unter anderem die Steigerung der TLR4 Proteinexpression und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine.

Vorausgegangene Studien hatten gezeigt, dass SP-A die LPS-induzierte Steigerung der TLR4 Proteinexpression in primären Alveolarmakrophagen von Mäusen und Ratten hemmt (Sender et al., 2013), sowie die Proteinexpression der lysosomassoziierten Rab-GTPase Rab7 (steigert den Abbau von TLR4) und des multifaktoriellen Adaptor- und Signalproteins  $\beta$ -Arrestin2 (Negativregulator der TLR4 Aktivierung) steigert (Sender et al., 2011; Sender et al., 2013).

Basierend auf diesen Studien lautete die zentrale Hypothese der vorliegenden Arbeit, dass SP-A unter Beteiligung von Rab7 und  $\beta$ -Arrestin2 den Abbau von LPS-induziertem TLR4 steigert (Freundt et al., 2022).

Um diese Hypothese zu adressieren, lauteten die Ziele der Arbeit folgendermaßen:

1. Translationale Charakterisierung der SP-A-vermittelten Hemmung der LPS-induzierten Steigerung der TLR4 Proteinexpression in primären humanen Alveolarmakrophagen gesunder Freiwilliger
2. Identifikation des SP-A-gesteigerten TLR4 Abbaus versus gehemmter TLR4 Translation
3. Identifikation der Rolle von Rab7 in SP-A-vermittelter Hemmung der LPS-induzierten TLR4 Expression und lysosomaler Lokalisation
4. Bestimmung der Bedeutung von  $\beta$ -Arrestin2 in der SP-A-vermittelten TLR4 Proteinexpression und Lokalisation
5. Identifikation der funktionellen Relevanz der SP-A-vermittelten Hemmung der LPS-induzierten TLR4 Proteinexpression anhand des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tiere

Die Lungenorganentnahmen bei Ratten und Mäusen wurden vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigt (V 312.7224.123-3).

#### 2.1.1 Ratten

Männliche pathogenfreie Sprague-Dawley-Ratten (250-400g) wurden bei Charles River (Sulzfeld, Deutschland) erworben. Männliche und weibliche pathogenfreie Lewis-Ratten (250-400g) wurden vom Forschungszentrum Borstel (FZ-Borstel) zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.2 Mäuse

C57BL/6J Wildtyp-Mäuse, Surfactant Protein-A-defiziente Mäuse (SP-A<sup>-/-</sup> Mäuse) (Li et al., 2002) und  $\beta$ -Arrestin2 defiziente Mäuse ( $\beta$ -Arr2<sup>-/-</sup> Mäuse) (Bohn et al., 1999) wurden im Forschungszentrum Borstel gezüchtet und unter pathogenfreien Bedingungen in der Tierhaltung des Institutes gehalten. Ursprünglich wurden die SP-A<sup>-/-</sup> Mäuse freundlicherweise von Prof. Dr. B. Müller (Universität Marburg) und die  $\beta$ -Arr2<sup>-/-</sup> Mäuse von Prof. Dr. R. Lefkowitz (Duke University, USA) zur Verfügung gestellt. Zum Zeitpunkt der Organentnahme waren die Mäuse zwischen 6 und 24 Wochen alt. Bei homozygot SP-A- bzw.  $\beta$ -Arrestin2-defizienten Mäusen war kein originäres SP-A bzw.  $\beta$ -Arrestin2 mehr vorhanden (Genotypisierung).

## 2.2 Humane Zellen

Humane Alveolarmakrophagen wurden uns freundlicherweise von der Medizinischen Klinik Borstel zur Verfügung gestellt. Die Zellen stammten zum einen von Probanden einer lungengesunden Kohorte, die sich freiwillig einer bronchoalveolären Lavage unter Sedierung unterzogen hatte, zum anderen aus der Pathologie des Forschungszentrums Borstel bzw. aus chirurgisch entferntem tumorfreiem Lungengewebe von Patienten. Die Studie zur gesunden Kohorte ist unter dem Titel „Rekrutierung und Vermessung einer Kohorte gesunder Probanden“ beim DRKS (Deutsches Register Klinischer Studien DRKS-ID: DRKS00016932) gelistet. Die gesunden Freiwilligen waren zwischen 18 und 64 Jahren alt, litten an keiner pulmonalen Vorerkrankung (COPD GOLD III/IV, Asthma bronchiale, frühere oder aktive Tuberkulose, stattgehabter Atemwegsinfekt im letzten Monat) oder Diabetes mellitus. Immunsuppression, Einnahme von Kortikoiden oder Antibiotika in den letzten zwei Monaten sowie Schwangerschaft und Stillzeit waren weitere Ausschlusskriterien. Die Patienten, denen chirurgisch Lungengewebe entnommen wurde, waren zwischen 73 und 78 Jahren alt. Die Gewinnung und Verwendung der humanen Zellen wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigt (Gesunde Kohorte Ref. 15-194; Pathologie Ref 15-163A und 17-137).

## 2.3 Material

### 2.3.1 Geräte und Ausrüstung

Name	Beschreibung	Anbieter
5415 R	Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
5810 R	Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Blue Power 500	Netzteil für die Elektrophorese und die Blottingapparatur	Serva, Heidelberg, Deutschland
ChemiDoc Imaging System	Entwickler	Bio-Rad, München, Deutschland
Costar EIA/RIA Plate für ELISA und BCA-Assay	ELISA Platte mit 96 Kammern	Corning incorporated, Corning, NY, USA
Coulter Avanti J-26XP	Zentrifuge	Beckmann, Fullerton, USA
Hofer SE 600 Series	Elektrophoreseeinheit (vertikal)	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Hofer TE 70 X	Halbtrockene Transfer Einheit (Blottingapparatur)	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Intelli-Mixer	Orbitalshaker	LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland
L7-55	Ultrazentrifuge	Beckmann, Fullerton, USA
Lab Tek II Chamber Slide w/Cover, RS Glass Slide Sterile	Glasobjektträger mit 8 Kammern für Konfokalmikroskopie	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Leica TCS SP5	Konfokalmikroskop	Leica Microsystems, Bensheim, Deutschland
Milli-Q-Academic	System zur Demineralisierung von Leitungswasser	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Tiefe 0,1 mm 0,0025 mm <sup>2</sup>	Superior Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Parafilm		Roth, Karlsruhe, Deutschland

Polystat cc2	Wasserbad	Huber, Offenburg, Deutschland
Rainin L2, L10, L20, L200, L1000	Pipetten	Mettler-Toledo, Giessen, Deutschland
Reagiergefäß Protein LB ( <i>low binding</i> )	1,5 ml  DNA-/ Dnase-/ Rnase-/ PCR-Inhibitor-frei	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Revco Ultima II	Brutschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.
Roti®-NC, Transfermembran	Nitrocellulose,  Porengröße 0,2 µm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotilab® Blottingpapier	1,0 mm dickes Blotting Papier	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Seven Easy	pH-Meter	Mettler-Toledo, Giessen, Deutschland
SONOREX Super RK255H	Ultraschallbad	Bandelin, Berlin, Deutschland
SRX-101A	Entwickler	Konica Minolta, Langenhagen, Deutschland
Tecan Nano Quant infinite M200 Pro	Spektralphotometer	Tecan, Männedorf, Schweiz
Thermomixer compact		Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ThermoShaker		Biometra, Göttingen, Deutschland
Zeiss Lichtmikroskop	Binokular, 40x Vergrößerung	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
ZelluTrans	Dialyseschlauch	Roth, Karlsruhe, Deutschland

### 2.3.2 Reagenzien, Chemikalien und Kitsysteme

Name	Anbieter
Acrylamid 30%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aqua B. Braun, steriles Wasser	B. Braun, Melsungen, Deutschland
BCA-Assay (Bicinchoninsäure-Assay) Reagent A und B	Interchim, Montlucon, Frankreich
BD OptEIA Set Mouse TNF (mono/mono) aus Capture Antibody, Detection Antibody, Enzyme Reagent und Standards	BD Biosciences, San Diego, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
BSA (Bovines Serumalbumin)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Butanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
CaCl <sub>2</sub> (Calciumchlorid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Coomassie Brilliantblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DAPI (Diamidin-2-Phenylindol)	Invitrogen, <u>Waltham, USA</u>
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
EGTA (Ethylenglycol- bis(aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Erythrosin B	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FBS (Fetal bovine serum)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Schwefelsäure)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HCl (Salzsäure)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
KCl (Kaliumchlorid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kaliumdihydrogenphosphat)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Luminol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
LysoTracker Red	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Methanol	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
MgSO <sub>4</sub> (Magnesiumsulfat)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Dinatriumcarbonat)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Dinatriumhydrogenphosphat)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
NaCl (Natriumchlorid)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaHCO <sub>3</sub> (Natriumhydrogencarbonat)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
NaOH (Natronlauge)	Marck, Darmstadt, Deutschland
Narcoren (Pentobarbital) 16g/100ml	Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
OGP (Octyl β-D-glucopyranoside)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
p-Cumarsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PFA (Paraformaldehyd)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Polymyxin Beads	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Rat TNF ELISA Set BD OptEIA aus Capture Antibody, Detection Antibody, Enzyme Reagent und Standards	BD Biosciences, San Diego, USA
RPMI 1640 (Zellkulturmedium)	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Substrate Solution BD OptEIA (TMB Substrate Reagent Set) aus Tetramethylbenzidine (TMB) und Hydrogenperoxid	BD Biosciences, San Diego, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe, Deutschland

(TRIS)	
TRIS-HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

### 2.3.3 Puffer und Lösungen

Name und Beschreibung	Herstellung
Assay Diluent	10% FBS in 1x PBS
Coating Buffer	8.40 g NaHCO <sub>3</sub>  3.56 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>  auf 1000 ml demineralisiertes Wasser  pH 9.5
Coomassielösung	2 g Coomassie Brillantblau  400 ml Methanol  100 ml Essigsäure  auf 1000 ml demineralisiertes Wasser
Coomassie Entfärber	150 ml Methanol  50 ml Essigsäure  auf 500 ml demineralisiertes Wasser
Enhanced Chemiluminescence (ECL)- Lösung 1	0.25 ml Luminol (in DMSO)  0.11 ml p-Cumarsäure (in DMSO)  2.5 ml 1M TRIS-HCl pH 8.5  0.64 ml demineralisiertes Wasser

Enhanced Chemiluminescence (ECL)- Lösung 2	16 µl 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  2.5 ml 1M TRIS-HCl pH 8.5  9.984 ml demineralisiertes Wasser
ELISA-Waschpuffer (PBS-T)	PBS mit 0,05% Tween-20
10x Geltankpuffer	144 g Glycin  30 g TRIS  10 g SDS  auf 1000 ml demineralisiertes Wasser
10x Isolationspuffer	40.91 g NaCl  1.86 g KCl  1.77 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>  11.92 g HEPES  auf 500 ml demineralisiertes Wasser
Laemmli-Puffer (LB)	0.25 g DTT  1.2 ml demineralisiertes Wasser  2 ml Sammelgelpuffer  1.6 ml Glycerol  3.2 ml 10% SDS
Lavage-Puffer für Mäuse	0.2 mM EDTA  in 1x PBS

<p>Lavage-Puffer für Ratten 1 (ohne Magnesium und Calcium) , steril filtriert</p>	<p>10 ml 600 mM Glucose          10 ml 20 mM EGTA          100 ml 10x Isolationspuffer          880 ml demineralisiertes Wasser</p>
<p>Lavage-Puffer für Ratten 2 (mit Magnesium und Calcium), steril filtriert</p>	<p>5 ml 600 mM Glucose          5 ml 130 mM MgSO<sub>4</sub>          5 ml 200 mM CaCl<sub>2</sub>          50 ml 10x Isolationspuffer          435.2 ml demineralisiertes Wasser</p>
<p>Luminol in DMSO</p>	<p>0.886 g / 20 ml DMSO</p>
<p>OGP-Lösung</p>	<p>0.588 g OGP          0.876 g NaCl          1 ml 100x TBW          99 ml Aqua B. Braun          pH 7.4</p>
<p>8% PFA</p>	<p>8 g PFA          100 ml 1x PBS          Lösen im Wasserbad bei 60-80°C          pH 7.2</p>

5 x PBS (phosphate buffered saline)	40 g NaCl  1 g KCl  4.59 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>  1 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  auf 1000 ml demineralisiertes Wasser
p-Cumarsäure in DMSO	0.296 g / 20 ml DMSO
Sammelgel	1.7 ml 30% Acrylamid  1.25 ml Sammelgelpuffer  100 µl 10% SDS  6.8 ml demineralisiertes Wasser  10 µl TEMED  100 µl 10 % APS
Sammelgelpuffer	7.88 g TRIS-HCl  100 ml demineralisiertes Wasser  pH 6.8, steril filtriert
10x TBS (Tris buffered saline)	87.66 g NaCl  30.29 g TRIS  auf 1000 ml demineralisiertes Wasser  pH 7.2

10x TBS-T (Tris buffered saline Tween)	<p>100 ml 10x TBS</p> <p>900 ml demineralisiertes Wasser</p> <p>0.1% Tween 20 (1 ml)</p>
100x TBW (Tris buffered water)	<p>13.24 g TRIS-HCl</p> <p>1.96 g TRIS</p> <p>In 200 ml Aqua B. Braun (pH 7.4), steril filtriert</p>
10x Transferpuffer	<p>144 g Glycin</p> <p>30 g TRIS</p> <p>auf 1000 ml demineralisiertes Wasser</p>
1x Transferpuffer	<p>100 ml 10x Transferpuffer</p> <p>700 ml demineralisiertes Wasser</p> <p>200 ml Methanol</p>
Trenngel	<p>10 ml 30% Acrylamid</p> <p>7.5 ml Trenngelpuffer</p> <p>300 µl 10% SDS</p> <p>11.9 ml demineralisiertes Wasser</p> <p>12 µl TEMED</p> <p>300 µl 10 % APS</p>
Trenngelpuffer	<p>36.34 g TRIS</p> <p>200 ml demineralisiertes Wasser</p> <p>pH 8.8, steril filtriert</p>

### 2.3.4 Inhibitoren

Name	Anbieter
CHX (Cylcoheximid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Rab 7 (C-19) blocking peptide	Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Rab 7 (D-4) blocking peptide	Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland

### 2.3.5 Antikörper

#### 2.3.5.1 Primäre Antikörper

Name	Anwendung	Verdünnung	Anbieter
$\beta$ -Actin (ACTBD11B7) mouse monoclonal antibody	Western Blot	1:200	Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
TLR4 (25) mouse monoclonal antibody	Western Blot  Konfokalmikroskopie	1:200 (Western Blot)  1:50 (Konfokalmikroskopie)	Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
TLR4 (H-80) rabbit polyclonal antibody	Western Blot	1:200	Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
$\beta$ -Arrestin-2 (H-9) mouse monoclonal antibody	Western Blot	1:200	Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland

### 2.3.5.2 Sekundäre Antikörper

Name	Anwendung	Verdünnung	Anbieter
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse	Konfokalmikroskopie	1:500	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Donkey anti- mouse IgG-HRP	Western Blot	1:2000	Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
m-IgGk BP-HRP	Western Blot	1:1000	Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Western Blot	1:2000	Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland

### 2.3.6 Software

Name	Anbieter
Adobe Photoshop	Adobe Systems Inc., München, Deutschland
GraphPadPrism	GraphPad, San Diego, U.S.
ImageJ	Wayne Rasbad, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, U.S.
LasAF	Leica, Wetzlar, Deutschland
Magellan	Tecan, Männedorf, Schweiz

## 2.4 Methoden

### 2.4.1 Isolierung von humanem SP-A

Humanes Surfactant Protein-A (SP-A) wurde aus therapeutischen bronchoalveolären Lavagen (BAL) von Patienten mit einer pulmonalen Alveolarproteinose isoliert (Wright et al., 1987). Alveolarproteinose ist eine seltene Erkrankung, bei der betroffene Patienten eine abnorm hohe Menge Surfactant produzieren, der in den Alveolen akkumuliert und zu einer respiratorischer Insuffizienz führt (Carey und Trapnell, 2010). Die Lavagen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. U. Costabel (Ruhrlandklinik, Universität Duisburg-Essen) zur Verfügung gestellt. Nach einer 12-stündigen Sedimentation der SP-A-enthaltenden Fraktion bei 4°C wurden jeweils 5 ml des Sediments tröpfchenweise in 250 ml Butanol gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das ausfallende Sediment, welches aus nicht in Butanol löslichen Proteinen besteht, wurde mittels zweimaliger Zentrifugation bei 11,300 rpm (revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute) für 30 Minuten gewonnen. Das entstandene Präzipitat wurde ca. 2 Stunden mit Stickstoff getrocknet und anschließend in 6 ml Octylglukopyranosid (OGP) gelöst. Die nicht in OGP löslichen Proteine wurden mittels zweimaliger Ultrazentrifugation bei 27.000 rpm für 30 Minuten gewonnen. Das entstandene Präzipitat wurde dann in 5 ml 1x TBW gelöst und 30 Minuten mit OGP schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 1.25 ml Polymyxin-Beads zur Reduktion von Endotoxin der Lösung hinzugegeben und die Lösung 72 Stunden gegen 1xTBW dialysiert, um OGP zu entfernen. Dabei wurde das 1x TBW 2x täglich gewechselt. Nach der Dialyse wurde die Lösung erneut bei 2.500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, um die Polymyxin-Beads zu entfernen. Der Überstand, der in TBW gelöste Proteine enthält, wurde dann bei 31,000 rpm für 60 Minuten zentrifugiert, um nicht in TBW gelöste Proteine zu entfernen. Der Überstand enthielt SP-A. Die Konzentration der resultierenden SP-A Präparation wurde mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) photometrisch bei 562nm bestimmt. Bei diesem Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Proteinen reduzieren die Peptidbindungen der in der Lösung enthaltenen Proteine Kupferionen, die mit

Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex bilden, der photometrisch gemessen wird (Smith et al., 1985). Die Proteinkonzentrationen der hier erfolgten SP-A-Präparationen lagen zwischen 0.7 und 2.2 mg/ml. Die Reinheit der Präparation wurde mit einem Coomassie-gefärbten SDS-PAGE bestimmt. Nach Abschluss der Präparation wurden die Proben mit dem Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test) auf kontaminierendes LPS getestet. Der LAL-Test ist ein Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von LPS. Das Lysat ist ein Extrakt von Blutzellen (Amöbozyten) von Pfeilschwanzkrebsen (*Limulus*), das mit LPS reagiert. Eine resultierende Enzymaktivierung wird photometrisch gemessen (Weary und Baker, 1977; Iwanaga et al., 1978). Den LAL-Test hat freundlicherweise Nina Grohmann (Zelluläre Mikrobiologie, FZ Borstel) durchgeführt. In den Experimenten wurden nur SP-A-Präparationen verwendet, die weniger als 0.2 pg Endotoxin/ µg SP-A enthielten.

#### **2.4.2 Lipopolysaccharid**

Glattes Lipopolysaccharid (smooth LPS) von *Salmonella friedenau* wurde mit der Phenol/Wasser-Methode extrahiert, aufgereinigt, lyophilisiert und in die Triethylamin Salzform transformiert (Galanos und Lüderitz, 1975). Die LPS Präparationen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. H. Brade (FZ Borstel) zur Verfügung gestellt. Vor der Zugabe zur Zellsuspension wurden die LPS Aliquots 9 Minuten in einem Ultraschallbad behandelt.

#### **2.4.3 Bronchoalveoläre Lavage von Mäusen und Ratten**

Die Euthanasie der Tiere erfolgte durch eine intraperitoneal verabreichte letale Dosis Pentobarbital. Ratten wurden 400 mg/kg Körpergewicht und Mäusen 100 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital injiziert. Den Ratten wurde unverdünnte Pentobarbitallösung (16 g/100 ml), den Mäusen 1:2 mit PBS verdünntes Pentobarbital injiziert. Bei unzureichender Wirkung wurde den Ratten 200 mg/kg, den Mäusen 50 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital nachinjiziert. Nach

Feststellung der Areflexie im Bereich der Zwischenzehen wurde der Bauchraum eröffnet und die Aorta durchtrennt. Bei den Ratten wurde die Lunge in toto entnommen, die Mauslunge wurde lediglich freipräpariert und in situ belassen. Nach Kanülierung der Trachea wurde die Rattenlunge fünfmalig mit jeweils 10 ml Rattenlavagepuffer 1, anschließend dreimalig mit jeweils 10 ml Rattenlavagepuffer 2 lavagiert und währenddessen massiert. Die Mauslunge wurde fünfmalig mit 1ml Lavagepuffer für Mäuse lavagiert.

#### **2.4.4 Stimulation der Alveolarmakrophagen**

Die durch die Lavage gewonnenen Alveolarmakrophagen wurden 10 Minuten bei 2500 rpm und 4°C zentrifugiert und nach Abnahme des Überstandes in Zellkulturmedium RPMI 1640 resuspendiert. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mit einer klassischen Neubauer Zählkammer unter einem Lichtmikroskop. Dabei wurden die Zellen 1:9 mit Erythrosin B für 4 Minuten bei 4°C inkubiert und die nicht rot gefärbten, vitalen Zellen gezählt. Die in RPMI resuspendierten AM wurden mit hitze-inaktiviertem 0.2 % FBS bei 37°C in Low Binding Reagenzgefäßen mit 40 µg/ml SP-A, 100 ng/ml LPS, 20 µg/ml Blocking Peptiden und 50-100 µg/ml Cycloheximid (CHX) stimuliert. Pro Bedingung wurden  $0.2 \times 10^6$  AM von Mäusen und  $1 \times 10^6$  AM von Ratten eingesetzt.

#### **2.4.5 Zelllysate**

Nach Abschluss der Stimulation wurden die Proben 10 Minuten bei 13,000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen oder für weitere Analysen bei -80°C eingefroren, Ratten-AM in 150 µl, die Maus-AM in 80 µl Laemmli-Puffer lysiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur in einem Orbitalshaker inkubiert. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren.

## 2.4.6 SDS-PAGE und Immunoblot Analyse

Zur Trennung der im Zelllysate befindlichen Proteine wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Das Detergenz Natrium-dodecylsulfat (Natrium Dodecyl Sulfate, SDS), das im Laemmli-Puffer enthalten ist, bindet proportional zur molekularen Masse an die Proteine und bewirkt eine Auffaltung der Proteinstruktur in gestreckte Polypeptidketten (Laemmli, 1970). Im elektrischen Feld wandern die von SDS umlagerten, negativ geladenen Proteine entsprechend ihrer Größe bzw. ihres molekularen Gewichtes (je kleiner und leichter, desto schneller) in Richtung der Anode und werden dadurch voneinander getrennt. Die SDS-PAGE nutzt ein vertikales, diskontinuierliches Polyacrylamidgel. Der obere Teil, der zuerst von den Proben durchlaufen wird, hat einen niedrigeren Acrylamidanteil und sorgt für eine Konzentrierung der SDS-Proteinkomplexe auf eine scharfe Bande (Sammelgel). Der untere Teil hat einen höheren Acrylamidanteil und trennt die SDS-Proteinkomplexe anhand ihrer Größe (Trenngel). In beiden Fällen wird die Polymerisation der Gele durch Tetramethylethyldiamin (TEMED) und 10% Ammoniumpersulfat (APS) initiiert. Die Polymerisationen des Trenn- und Sammelgels erfolgten je ca. 30 Minuten zwischen zwei Glasplatten als Vertikalkammer. Vor Erhärten des Sammelgels wurde ein Taschenkamm eingelegt. Nach Polymerisation der Gele wurden jeweils 40 µl Probe in die Geltaschen eingelassen. Die Proben wurden zuvor bei Bedarf aufgetaut, mit Bromphenolblau gefärbt und 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in einer Hoefer Electrophoresis Unit SE 600 Series für 30 Minuten mit 100 Volt und anschließend für 1,5 Stunden mit 200 Volt.

Für den Transfer der Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran wurden Membran, Gel und Filterpapier in Transferpuffer eingeweicht und dann in eine Hoefer TE70x semi-dry transfer unit übertragen. Die Laufzeit der Transfer-Unit betrug 60 Minuten bei 100 Volt. Nach dem Transfer wurden die Membranen mit 5% Milch in TBS-T oder 5% BSA in TBS-T eine Stunde blockiert. Anschließend wurde mit den entsprechenden primären und sekundären Antikörpern inkubiert, welche nach Herstellerangaben in ca. 10 ml 5% Milch/TBS-T verdünnt wurden. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C, die Inkubation mit dem sekundären Antikörper ca. 2 Stunden bei Raumtemperatur am

Folgetag. Die Visualisierung der Banden erfolgte mittels ECL-Entwicklung (Enhanced Chemiluminescence). Hierbei katalysiert die mit dem sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP, horse radish peroxidase) durch  $H_2O_2$  die Oxidation von Luminol. Die durch die Oxidation freiwerdende Energie führt zur Belichtung des Röntgenfilmes in der Entwicklungsmaschine (Thorpe und Kricka, 1986). Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Photoshop Elements und Image J. Die Proteinmengen in den einzelnen Bedingungen relativierten wir durch Normalisierung am jeweiligen  $\beta$ -Actin-Blot.

#### 2.4.7 Konfokalmikroskopie

AM von Wildtyp-, SP-A<sup>-/-</sup>- und  $\beta$ -Arr2<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden mit  $1 \times 10^5$  Zellen pro Bedingung auf einem Lab-Tek II-Kammerobjektträger mit 8 Vertiefungen ausgesät, 90 Minuten bei 37°C in einer 5%-CO<sub>2</sub>-Atmosphäre adhärirt und anschließend, wie oben beschrieben, stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellen mit 1  $\mu$ g/ml RPMI LysoTracker Red 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die AM mit 2-8% eisgekühltem Paraformaldehyd (PFA) 6 Minuten fixiert, mit 0.25% Triton X-100 für 8 Minuten permeabilisiert und in 10% BSA in PBS für 30 Minuten blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper anti-TLR4 (1:50, Maus monoklonal, Santa Cruz) über Nacht bei 4°C und dem fluoreszierenden sekundären Antikörper Alexa Fluor 488 (1:500, Ziegen-Anti-Maus-IgG, Molecular Probes/Invitrogen) für 1-2 Stunden am Folgetag. Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) vier Minuten gegengefärbt. Zwischen den jeweiligen Behandlungsschritten wurden die AM fünfmalig mit PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Kammern vom Objektträger gelöst, jeweils einen Tropfen Einschlussmittel (DABCO) pro Bedingung hinzugegeben und ein Deckgläschen fixiert. Betrachtet wurden die Zellen an einem Leica TCS SP 5 Konfokalmikroskop bei den Wellenlängen 488 nm für TLR4, 561nm für LysoTracker Red und 405 nm für DAPI und anschließend mit der dazugehörigen LAS AF Software die Pearson's Korrelation ermittelt.

### 2.4.8 ELISA

Der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) dient der Detektion und Quantifizierung von spezifischen Proteinen in Zellüberständen, Zelllysaten oder Seren. Zur Bestimmung von Tumor Necrosis Factor (TNF) in den Zellüberständen von stimulierten Ratten-AM und AM von SP-A<sup>-/-</sup> wurden entsprechende Kitsysteme der Firma BD Biosciences verwendet. Es handelt sich dabei um einen Sandwich-ELISA, bei dem zwei Antikörper verwendet werden, die spezifisch an ein zu detektierendes Antigen, hier TNF, binden. An den zweiten Antikörper bindet quantitativ ein Enzym, welches im letzten Schritt durch die Spaltung des hinzugefügten Substrates einen Farbumschlag katalysiert. Dieser Farbumschlag dient der quantitativen Bestimmung durch photometrische Messung. Im ersten Schritt wurde der *Capture Antibody* in Coating Buffer 1:250 verdünnt und jeweils 100 µl der Verdünnung pro Well auf einer 96-Well-Platte aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Abnahme des Coating Buffers wurde die Platte fünfmalig mit 300 µl 1xPBS-T gewaschen und anschließend mit 200 µl Assay Diluent für 1 Stunde blockiert. Jeweils 100 µl einer Standardreihe und in Assay Diluent 1:50 verdünnte Proben wurden nach einem weiteren Waschschrift auf die Platte aufgetragen. Nach 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur und anschließendem Waschen wurden 100 µl pro Well 1:250 verdünntem *Detection Antibody* in Assay Diluent für 1 Stunde aufgetragen. Nach erneutem Waschvorgang wurden 100 µl pro Well 1:250 verdünntem *Enzyme Reagent (Sav-HRP)* in Assay Diluent für 30 Minuten inkubiert. Nach einem letzten Waschvorgang wurden 100 µl Substrat Solution pro Well aufgetragen, 30 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend die Reaktion mit 50 µl pro Well *Stop Solution (Schwefelsäure)* gestoppt. Die photometrische Bestimmung erfolgte an einem Spektralphotometer bei 450 nm.

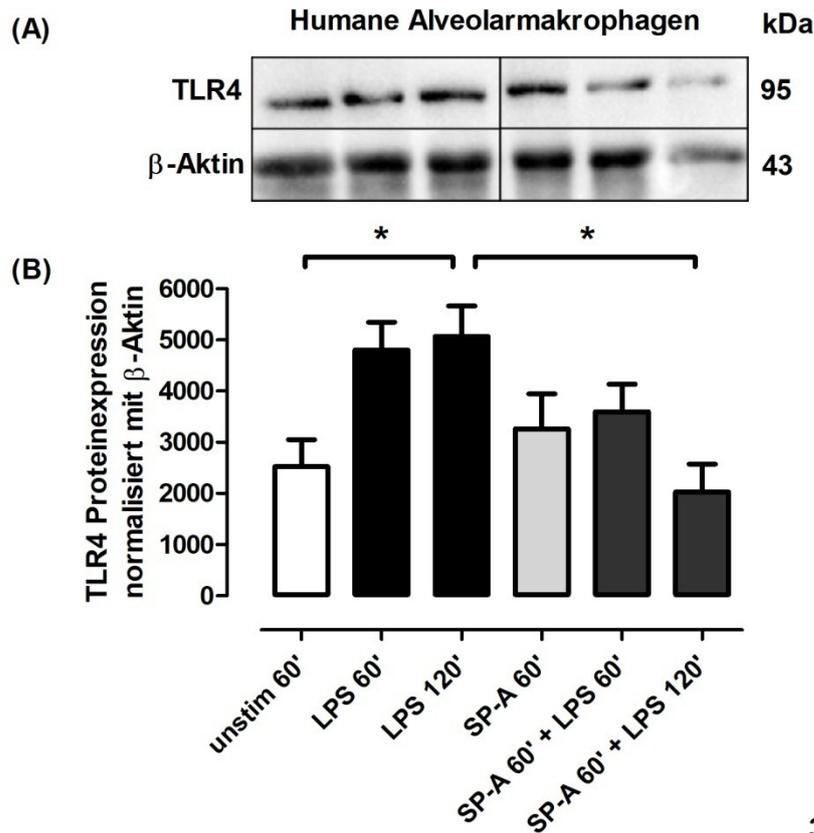
### 2.4.9 Statistische Analyse

Die Ergebnisse sind jeweils als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Die statistischen Analysen wurden mit der Analyse-Option der GraphPad Prism Software berechnet. Als signifikant wurden Ergebnisse mit  $p < 0,05$  bezeichnet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 SP-A hemmt die LPS-induzierte Steigerung der TLR4 Proteinexpression in primären humanen Alveolarmakrophagen

Toll-like Rezeptoren (TLR) sind Schlüsselinitiatoren von angeborenen und erworbenen Immunantworten (Akira und Takeda, 2004; Kieser und Kagan, 2017). TLR4 detektiert bakterielles LPS, den invarianten Virulenzfaktor gramnegativer Bakterien (Alexander und Rietschel, 2001). In vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Surfactant Protein A (SP-A) die LPS-induzierte Steigerung der TLR4 Proteinexpression in verschiedenen Organen und Zelltypen (Quintanilla et al., 2015; Yang et al., 2017; Zhang et al., 2018), darunter primäre Alveolarmakrophagen von Maus und Ratte (Sender et al., 2013) hemmt. Um die Relevanz dieser Daten für humane Zellen zu verifizieren, wurden humane Alveolarmakrophagen von lungengesunden Freiwilligen mit LPS, SP-A oder SP-A plus LPS stimuliert oder blieben unbehandelt. Die Expression von TLR4 wurde mittels Immunoblot analysiert. Die Stimulation humaner Alveolarmakrophagen mit LPS steigerte die Proteinexpression von TLR4 nach 120 Minuten signifikant ( $p < 0.05$ ) über den Kontrollwert (unbehandelte Alveolarmakrophagen). Während die alleinige Stimulation der Zellen mit SP-A die basale Expression von TLR4 nicht veränderte, hemmte die Vorinkubation der Zellen mit SP-A die LPS-induzierte Steigerung der TLR4 Proteinexpression nach 120 min signifikant ( $p < 0.05$ ) (**Abbildung 3.1**).



3.1

**Abbildung 3.1 SP-A hemmt die LPS-induzierte Steigerung der TLR4 Proteinexpression in primären humanen Alveolarmakrophagen.**

Immunoblot Analyse der TLR4 Proteinexpression in humanen Alveolarmakrophagen. Die Zellen ( $1 \times 10^6$ / 500  $\mu$ l) wurden sequenziell mit LPS (100 ng/ml), SP-A (40  $\mu$ g/ml) oder SP-A plus LPS für die angegebenen Zeiten stimuliert. Gesamtzelllysate wurden per SDS-PAGE separiert, die Detektion von TLR4 und  $\beta$ -Aktin erfolgte mittels Immunoblot. (A) Repräsentativer TLR4 und  $\beta$ -Aktin Immunoblot. (B) Nach densitometrischer Auswertung wurden die Daten von 10-14 unabhängigen Experimenten  $\beta$ -Aktin-normalisiert und statistisch mittels Varianzanalyse (einfaktorielle ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur (Mittelwert (mean)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM)) analysiert. \*  $p < 0.05$

### **3.2 SP-A hemmt die LPS-induzierte Steigerung der TLR4 Proteinexpression in primären Alveolarmakrophagen von Mäusen und Ratten unabhängig von der TLR4 Proteintranslation**

Es stellte sich die Frage, ob die Hemmung der LPS-induzierten Steigerung der TLR4 Proteinexpression in primären Alveolarmakrophagen durch SP-A auf eine Hemmung der Translation von TLR4 oder einem gesteigerten Abbau des Rezeptors zurückzuführen ist. Um die Relevanz der TLR4 Proteintranslation auf die SP-A-bedingte Hemmung der LPS-induzierten Steigerung der TLR4 Proteinexpression zu untersuchen, wurden primäre Alveolarmakrophagen von Wildtyp-, SP-A-defizienten Mäusen sowie Ratten mit LPS, LPS oder SP-A plus LPS in Gegenwart des Translationshemmers CHX stimuliert oder blieben unbehandelt. Die Expression von TLR4 wurde mittels Immunoblot analysiert. Die Stimulation der Alveolarmakrophagen mit LPS steigerte die Proteinexpression von TLR4 nach 60 Minuten bei beiden Mausgenotypen und Ratten sowie nach 180 Minuten bei Ratten signifikant ( $p < 0.05$  (Wildtypmäuse, SP-A-defiziente Mäuse),  $p < 0.01$  (Ratten)) über den Kontrollwert (unbehandelte Alveolarmakrophagen). Die Vorinkubation der Zellen mit CHX führte zu einer deutlichen Hemmung der LPS-induzierten Steigerung der TLR4 Proteinexpression in Alveolarmakrophagen der Ratte (**Abbildung 3.2.a**) und der Wildtyp- sowie der SP-A-defizienten Mäuse (**Abbildung 3.2.b und 3.2.c**). Nach CHX-vermittelter Translationshemmung war die LPS-induzierte Steigerung der TLR4 Proteinexpression in Alveolarmakrophagen der Ratte ( $p < 0.05$ ) (**Abbildung 3.2.a**), der SP-A-defizienten Maus ( $p < 0.05$ ) (**Abbildung 3.2.b**) und der Wildtypmaus ( $p < 0.01$ ) (**Abbildung 3.2.c**) signifikant reduziert durch die Zugabe von SP-A. Diese posttranslationale Hemmung der LPS-induzierten Steigerung der TLR4 Proteinexpression durch SP-A deutete auf einen durch SP-A gesteigerten Abbau von TLR4.

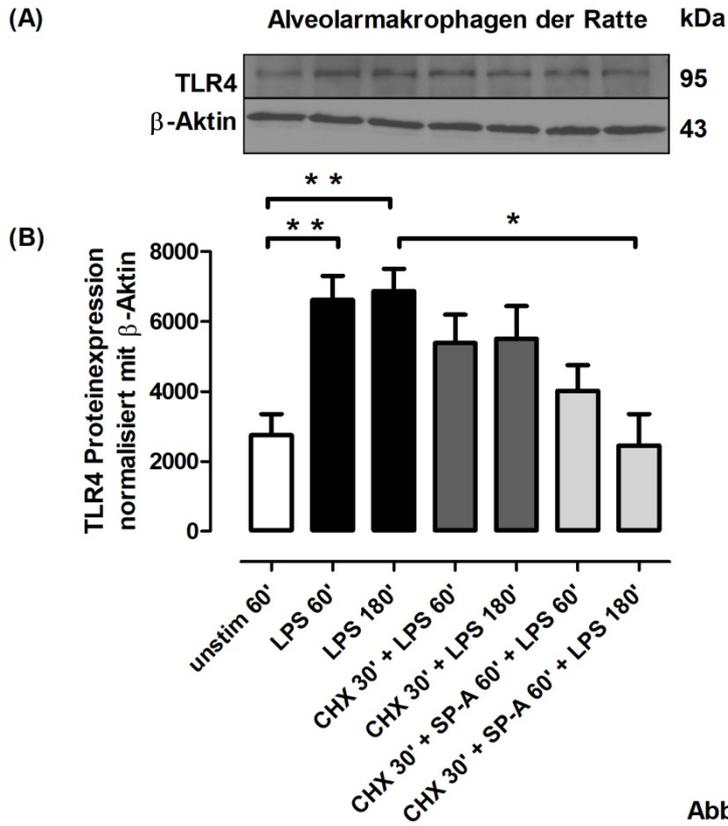


Abbildung 3.2.a

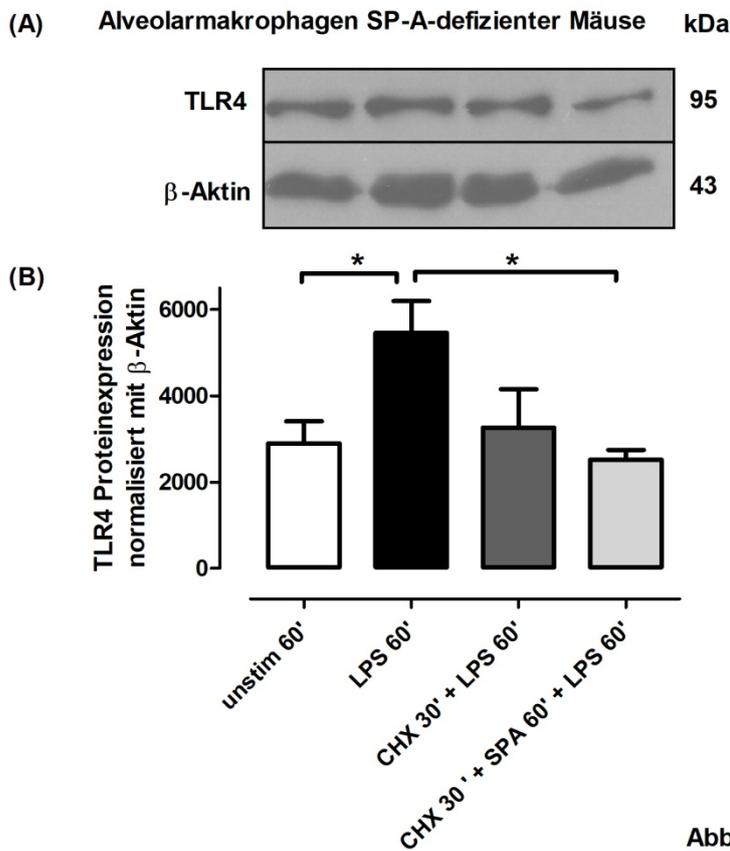


Abbildung 3.2.b

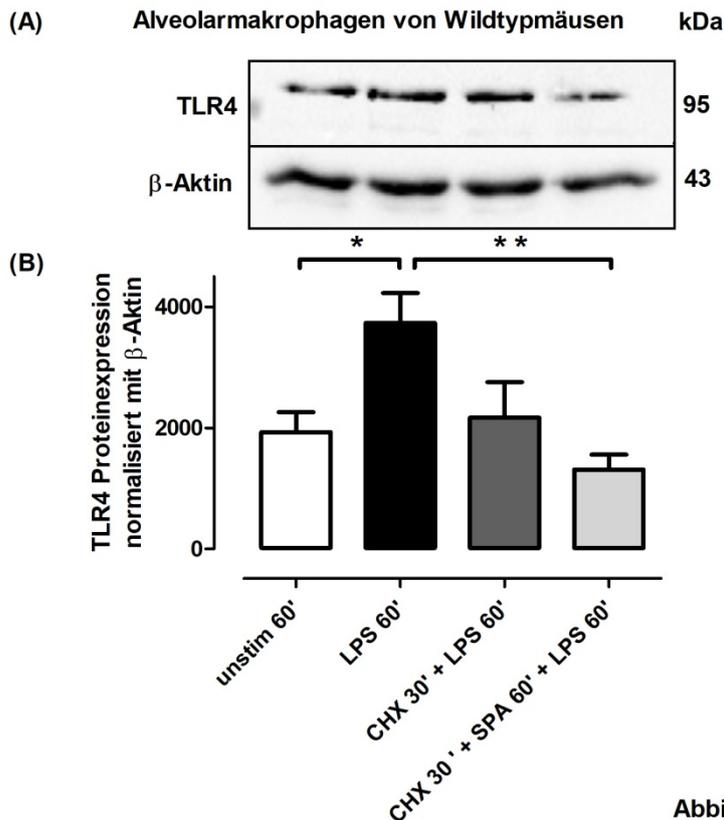


Abbildung 3.2.c

**Abbildung 3.2 SP-A hemmt die LPS-induzierte Steigerung der TLR4 Proteinexpression in primären Alveolarmakrophagen von Mäusen und Ratten unabhängig von der TLR4 Proteintranslation.**

a) Immunoblot Analyse der TLR4 Proteinexpression in Alveolarmakrophagen der Ratte. Die Zellen ( $1 \times 10^6$ / 500  $\mu$ l) wurden sequenziell mit LPS (100 ng/ml) in An- und Abwesenheit von CHX (50  $\mu$ g/ml) oder mit LPS plus SP-A (40  $\mu$ g/ml) in Anwesenheit von CHX für die angegebenen Zeiten stimuliert. Gesamtzelllysate wurden per SDS-PAGE separiert, die Detektion von TLR4 und  $\beta$ -Aktin erfolgte mittels Immunoblot. (A) Repräsentativer TLR4 und  $\beta$ -Aktin Immunoblot. (B) Nach densitometrischer Auswertung wurden die Daten von 14 unabhängigen Experimenten  $\beta$ -Aktin-normalisiert und statistisch mittels Varianzanalyse (einfaktorielle ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur (Mittelwert (mean)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM)) analysiert. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

b) Immunoblot Analyse der TLR4 Proteinexpression in Alveolarmakrophagen von SP-A-defizienten Mäusen. Die Zellen ( $2 \times 10^5$  Zellen/ 500  $\mu$ l) wurden sequenziell

wie in **a)** stimuliert. Die Daten von 9 unabhängigen Experimenten wurden statistisch wie in **a)** ausgewertet. \*  $p < 0.05$

**c)** Immunoblot Analyse der TLR4 Proteinexpression in Alveolarmakrophagen von Wildtypmäusen. Die Zellen ( $2 \times 10^5$  Zellen/ 500  $\mu$ l) wurden sequenziell wie in **a)** stimuliert. Die Daten von 14 unabhängigen Experimenten wurden statistisch wie in **a)** ausgewertet. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

### **3.3 Rab7 ist beteiligt am SP-A-gesteigerten Abbau der LPS-induzierten TLR4 Proteinexpression**

Da SP-A die LPS-induzierte Steigerung der TLR4 Proteinexpression unabhängig von der Translation hemmt, lautete die nachfolgende Hypothese, dass SP-A den Abbau von TLR4 in primären Alveolarmakrophagen steigert. Der Abbau von TLR4 erfordert den Transport von TLR4 zum Lysosom über einen endozytären Transportweg (Husebye et al., 2006). Einige Studien haben gezeigt, dass Rab GTPasen eine wichtige Rolle im TLR4 Trafficking (Husebye et al., 2010; Wang et al., 2010) bzw. Abbau (Wang et al., 2007) haben. SP-A steigert die Proteinexpression und Funktion der Lysosom-assoziierten Rab7 GTPase in primären Alveolarmakrophagen (Sender et al., 2011). Um die Rolle von Rab7 auf die SP-A-vermittelte Hemmung der LPS-induzierten Steigerung der TLR4 Proteinexpression zu testen, wurden primäre Alveolarmakrophagen von Wildtyp-, SP-A-defizienten Mäusen und Ratten mit LPS, SP-A plus LPS oder SP-A plus LPS in Gegenwart eines zellpermeablen pharmakologischen Rab7 Inhibitors (Blockierungspeptid) stimuliert oder blieben unbehandelt. Die Expression von TLR4 wurde mittels Immunoblot analysiert. Die pharmakologische Inhibition von Rab7 antagonisierte den SP-A-gesteigerten Abbau der LPS-induzierten TLR4 Expression in Alveolarmakrophagen der Ratte (**Abbildung 3.3.a**), der SP-A-defizienten Maus (**Abbildung 3.3.b**) und der Wildtypmaus (**Abbildung 3.3.c**). Diese Daten legen die Schlussfolgerung nahe, dass SP-A den lysosomalen Abbau von TLR4 unter Beteiligung von Rab7 steigert.

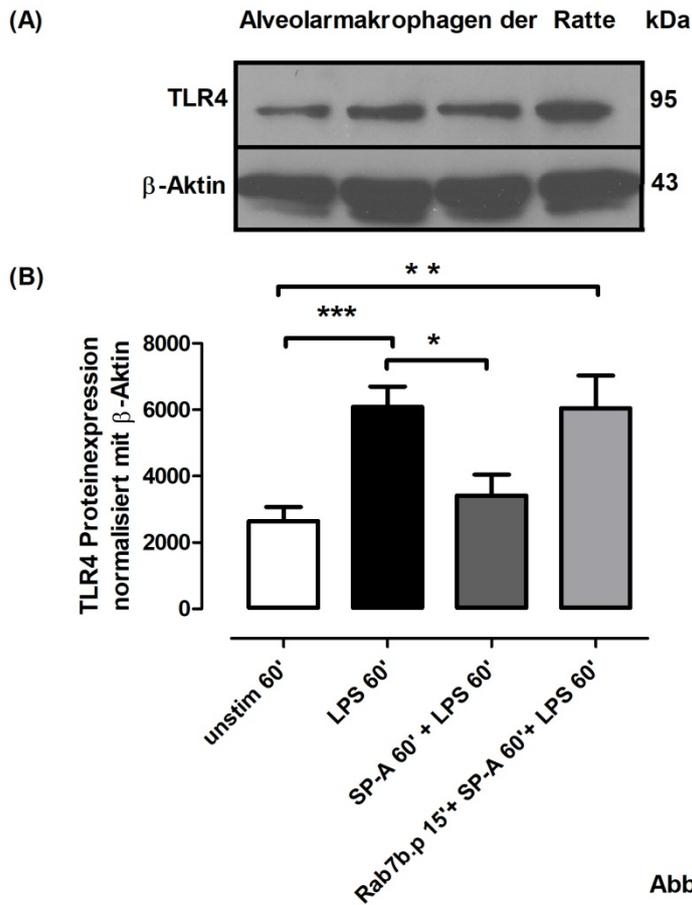


Abbildung 3.3.a

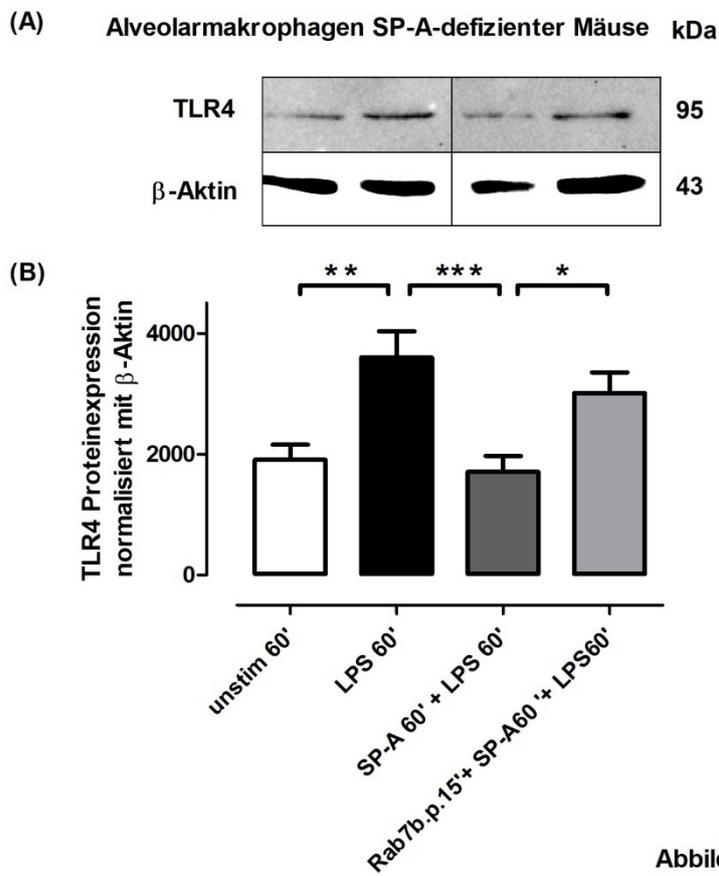


Abbildung 3.3.b

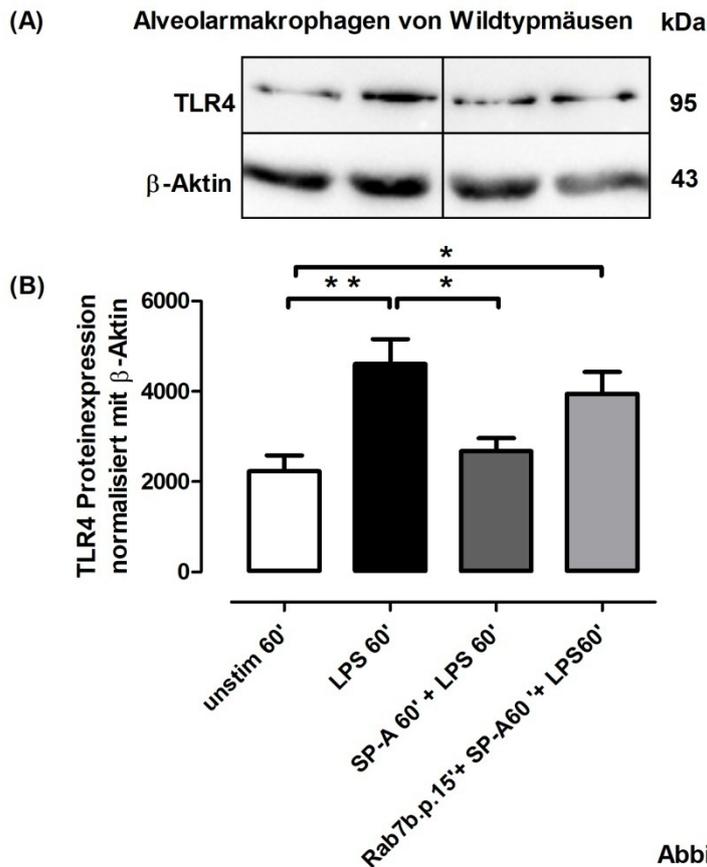


Abbildung 3.3.c

**Abbildung 3.3 Rab7 ist beteiligt am SP-A-gesteigerten Abbau der LPS-induzierten TLR4 Proteinexpression.**

**a):** Immunoblot Analyse der TLR4 Proteinexpression in Alveolarmakrophagen der Ratte. Die Zellen ( $1 \times 10^6$ / 500  $\mu$ l) wurden sequenziell mit LPS (100 ng/ml), SP-A (40  $\mu$ g/ml) plus LPS oder mit SP-A plus LPS in Anwesenheit von Rab7-Blocking-Peptid (20  $\mu$ g/ml) für die angegebenen Zeiten stimuliert. Gesamtzelllysate wurden per SDS-PAGE separiert, die Detektion von TLR4 und  $\beta$ -Aktin erfolgte mittels Immunoblot. (A) Repräsentativer TLR4 und  $\beta$ -Aktin Immunoblot. (B) Nach densitometrischer Auswertung wurden die Daten von 18 unabhängigen Experimenten  $\beta$ -Aktin-normalisiert und statistisch mittels Varianzanalyse (einfaktorielle ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur (Mittelwert (mean)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM)) analysiert. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$

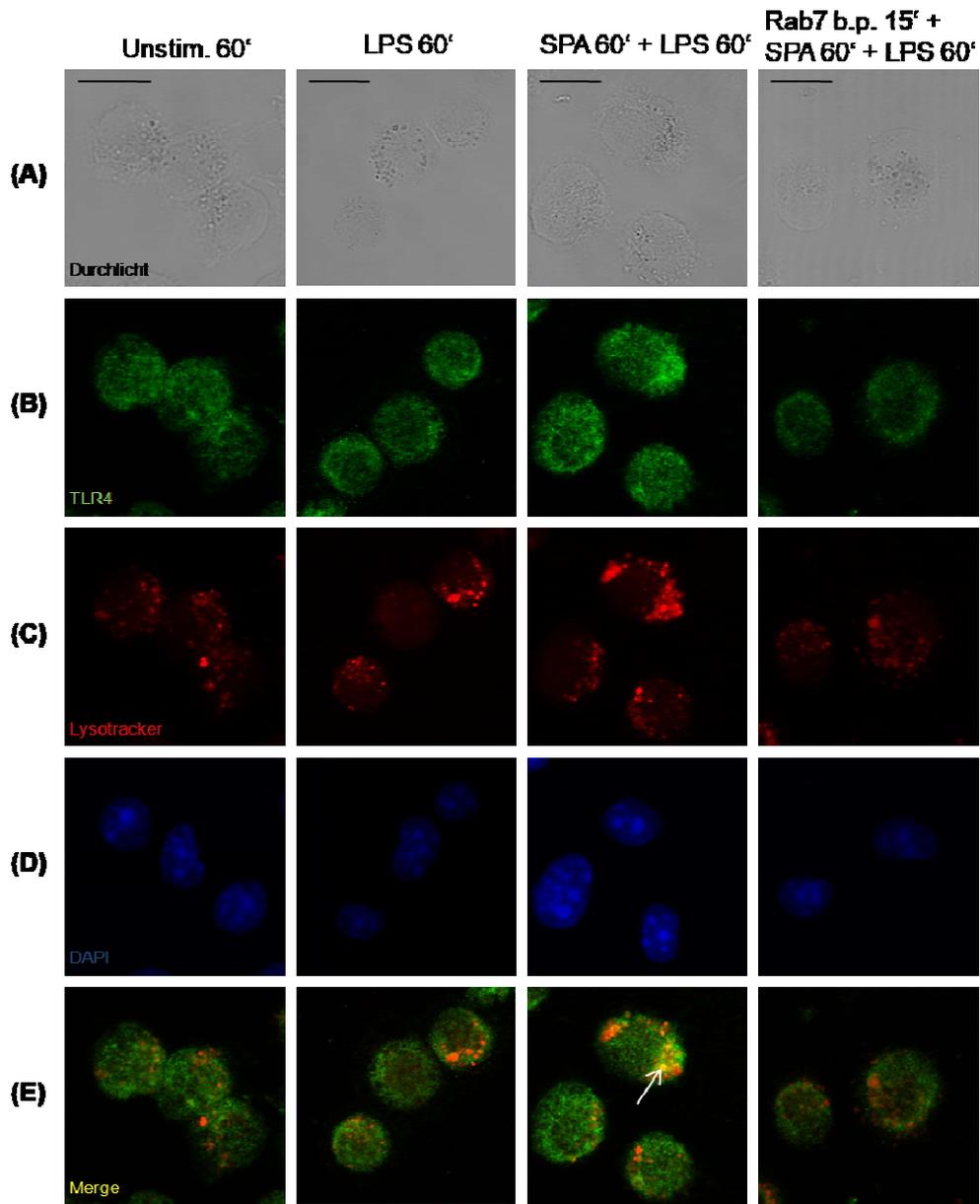
**b)** Immunoblot Analyse der TLR4 Proteinexpression in Alveolarmakrophagen von SP-A-defizienten Mäusen. Die Zellen ( $2 \times 10^5$  Zellen/ 500  $\mu$ l) wurden sequenziell

wie in **a)** stimuliert. Die Daten von 20 unabhängigen Experimenten wurden statistisch wie in **a)** ausgewertet. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$

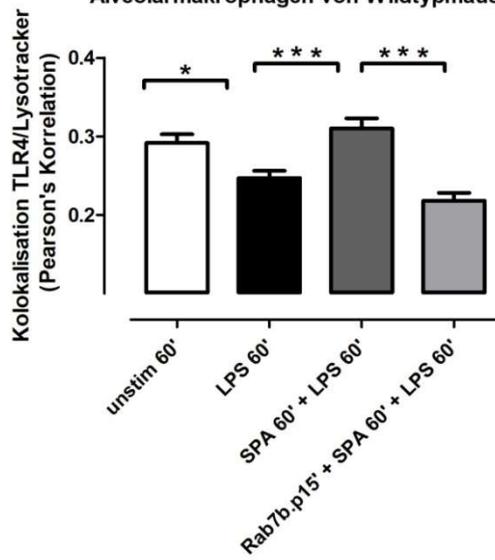
**c)** Immunoblot Analyse der TLR4 Proteinexpression in Alveolarmakrophagen von Wildtypmäusen. Die Zellen ( $2 \times 10^5$  Zellen/ 500  $\mu$ l) wurden sequenziell wie in **a)** stimuliert. Die Daten von 16 unabhängigen Experimenten wurden statistisch wie in **a)** ausgewertet. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$

### **3.4 SP-A steigert Kolokalisation von TLR4 und Lysosom in primären Alveolarmakrophagen unter Beteiligung von Rab7**

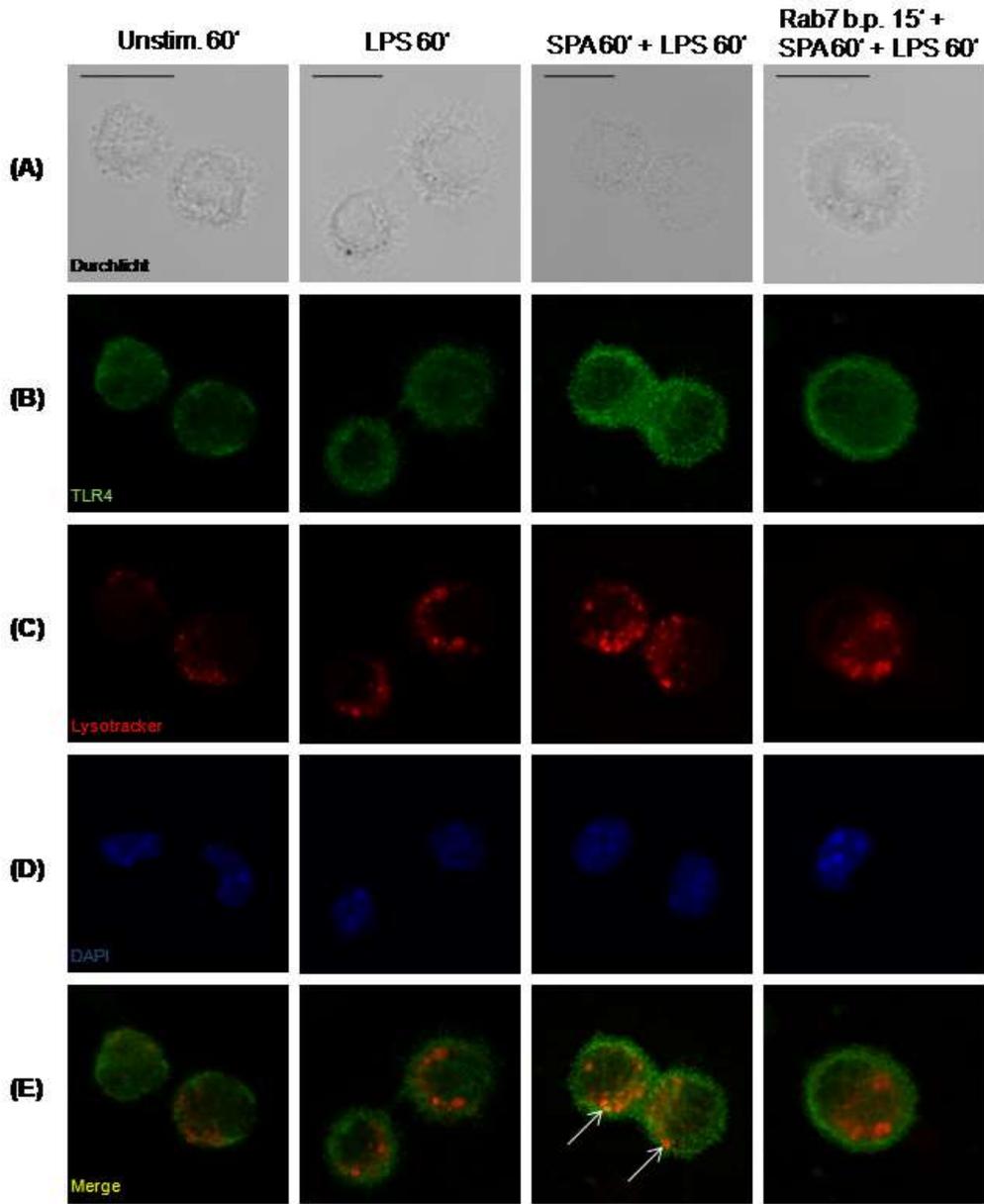
Die Beteiligung der Lysosom-assoziierten GTPase Rab7 am hemmenden Effekt von SP-A auf die LPS-induzierte Steigerung der TLR4 Proteinexpression liefert Hinweise auf einen möglichen gesteigerten lysosomalen Abbau von TLR4 durch SP-A. Um die intrazelluläre Bewegung von TLR4 zum Lysosom zu visualisieren, folgten fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der TLR4/Lysosom Kolokalisation in primären Alveolarmakrophagen. Alveolarmakrophagen von Wildtyp- und SP-A-defizienten Mäusen wurden mit LPS, SP-A plus LPS oder SP-A plus LPS in Gegenwart eines zellpermeablen pharmakologischen Rab7 Inhibitors (Blockierungspeptid) stimuliert oder blieben unbehandelt. Die Zellen wurden nach Färbung von TLR4 und Lysosom fluoreszenzmikroskopisch analysiert und die TLR4/Lysosom-Kolokalisation quantitativ ermittelt. SP-A steigerte die durch LPS gehemmte ( $p < 0.05$ ) TLR4/Lysosom Kolokalisation in primären Alveolarmakrophagen von Wildtypmäusen signifikant ( $p < 0.001$ ) (**Abbildung 3.4.a**). In primären Alveolarmakrophagen von SP-A-defizienten Mäusen konnte SP-A ebenfalls die TLR4/Lysosom Kolokalisation im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit LPS signifikant steigern ( $p < 0.001$ ) (**Abbildung 3.4.b**). Die pharmakologische Blockade von Rab7 hemmte diesen Effekt bei beiden Genotypen signifikant ( $p < 0.001$ ) (**Abbildung 3.4.a und b**).



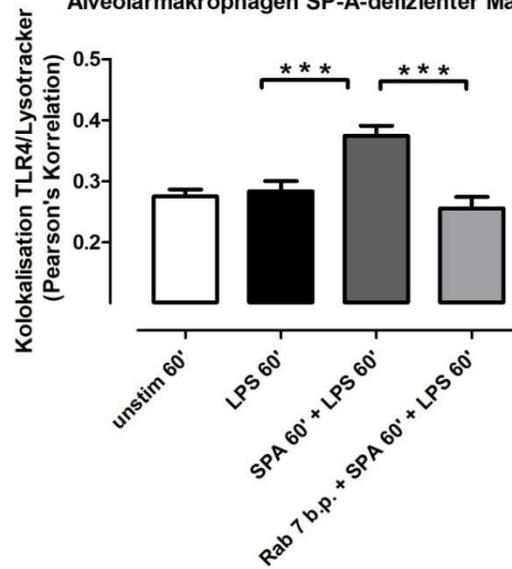
(F) Alveolarmakrophagen von Wildtypmäusen



3.4.a



(F) Alveolarmakrophagen SP-A-defizienter Mäuse



3.4.b

**Abbildung 3.4 SP-A steigert Kolokalisation von TLR4 und Lysosom in primären Alveolarmakrophagen unter Beteiligung von Rab 7.**

**a)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Analyse der TLR4/Lysosom-Kolokalisation in primären Alveolarmakrophagen von Wildtyp-Mäusen. Nach Adhärenz wurden die Zellen ( $1 \times 10^5$  Zellen/ 500  $\mu$ l) sequenziell mit LPS (100 ng/ml), SP-A (40  $\mu$ g/ml) plus LPS oder mit SP-A plus LPS in Anwesenheit von Rab7-Blocking-Peptid (20  $\mu$ g/ml) für die angegebenen Zeiten stimuliert (**Abbildung 3.4.a. A-E**). Nach Färbung der Lysosomen (Lysotracker Red), TLR4 (mouse monoclonal antibody mit Alexa Fluor 488 goat anti-mouse) und der Zellkerne (DAPI) erfolgte die konfokalmikroskopische Visualisierung bei den entsprechenden Wellenlängen (Skalierungsmarkierung: 10  $\mu$ m). Die Kolokalisationsanalyse erfolgte durch Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson (**Abbildung 3.4.a. F**). Gezeigt sind repräsentative Bilder eines Beispiels experimentes (**Abbildung 3.4.a. A-E**). Die Pfeile weisen auf die Kolokalisation von Lysosom und TLR4 (im Merge gelb dargestellt). Es wurden mindestens 71 Zellen aus drei unabhängigen Experimenten pro Bedingung ausgewertet und statistisch per Varianzanalyse (einfaktorielle ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur (Mittelwert (mean)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM)) analysiert. \*\*\*  $p < 0.001$

**b)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Analyse der TLR4/Lysosom-Kolokalisation in primären Alveolarmakrophagen von SP-A-defizienten Mäusen. Die Zellen ( $1 \times 10^5$  Zellen/ 500  $\mu$ l) wurden nach Adhärenz sequenziell wie in **a)** stimuliert und gefärbt. Die konfokalmikroskopische Visualisierung erfolgte bei den entsprechenden Wellenlängen (Skalierungsmarkierung: 10  $\mu$ m). Die Kolokalisationsanalyse erfolgte mittels Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson (**Abbildung 3.4.b. F**). Gezeigt sind repräsentative Bilder eines Beispiels experimentes (**Abbildung 3.4.b. A-E**). Die Pfeile weisen auf die Kolokalisation von Lysosom und TLR4 (im Merge gelb dargestellt). Es wurden mindestens 55 Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten pro Bedingung ausgewertet und statistisch mittels Varianzanalyse (einfaktorielle ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur (Mittelwert (mean)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM)) analysiert. \*  $p < 0.05$  \*\*\*  $p < 0.001$

### 3.5 Rab7 ist beteiligt an der SP-A-vermittelten Hemmung der LPS-induzierten TNF- $\alpha$ Freisetzung

Das pro-inflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  wird im Rahmen der TLR4-NF $\kappa$ B-Signalkaskade nach Kontakt von TLR4 mit LPS vermehrt freigesetzt (Barton und Medzhitov, 2002; Barton und Kagan, 2009). SP-A reduziert die LPS-induzierte Steigerung von TNF- $\alpha$  *in vitro* und *in vivo* (McIntosh et al., 1996; Borron et al., 2000; Gardai et al., 2003; Henning et al., 2008). Um die Rolle von Rab7 auf die SP-A-vermittelte Hemmung der LPS-induzierten TNF- $\alpha$  Freisetzung zu testen, wurden primäre Alveolarmakrophagen von SP-A-defizienten Mäusen mit LPS, SP-A plus LPS oder SP-A plus LPS in Gegenwart eines zellpermeablen pharmakologischen Rab7 Inhibitors (Blockierungspeptid) stimuliert oder blieben unbehandelt (**Abbildung 3.5.a**). Primäre Alveolarmakrophagen von Ratten wurden mit SP-A plus LPS oder SP-A plus LPS in Gegenwart des Rab7 Inhibitors stimuliert (**Abbildung 3.5.b**). Die Freisetzung von TNF- $\alpha$  im Zellmedium wurde mittels ELISA analysiert. Die pharmakologische Inhibition von Rab7 antagonisierte die SP-A-vermittelte Hemmung der LPS-induzierten TNF- $\alpha$  Freisetzung in Alveolarmakrophagen SP-A-defizienter Mäuse (**Abbildung 3.5.a**) und Ratten (**Abbildung 3.5.b**). Diese Daten legen nahe, dass der SP-A-vermittelte Abbau von TLR4 funktionelle Relevanz über eine reduzierte TNF- $\alpha$  Freisetzung hat.

## Alveolarmakrophagen SP-A-defizienter Mäuse

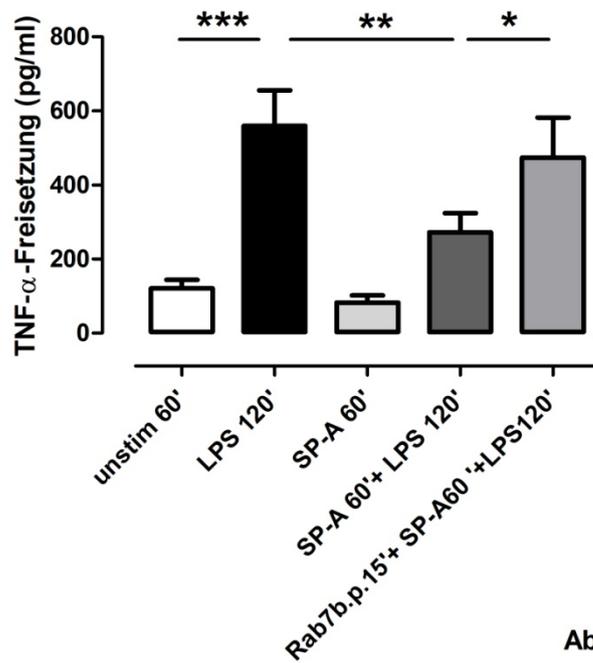


Abbildung 3.5.a

## Alveolarmakrophagen der Ratte

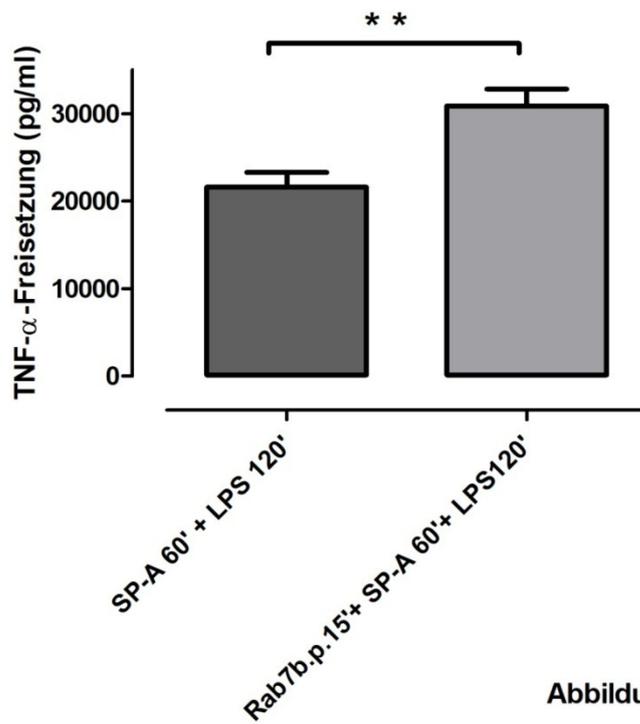


Abbildung 3.5.b

### **Abbildung 3.5 Rab7 ist beteiligt an der SP-A-vermittelten Hemmung der LPS-induzierten TNF- $\alpha$ Freisetzung.**

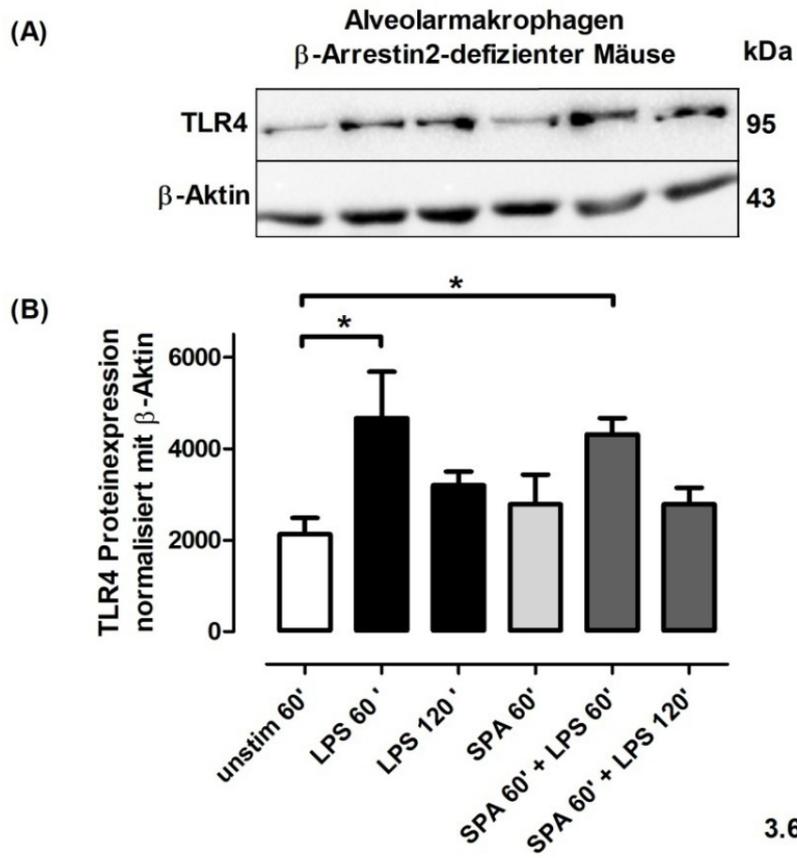
**a)** ELISA Analyse der TNF- $\alpha$  Freisetzung in Alveolarmakrophagen von SP-A-defizienten Mäusen. Die Zellen ( $2 \times 10^5$  Zellen/ 500  $\mu$ l) wurden sequenziell mit LPS (100 ng/ml), SP-A (40  $\mu$ g/ml) plus LPS oder mit SP-A plus LPS in Anwesenheit von Rab7-Blockingpeptid (20 $\mu$ g/ml) für die angegebenen Zeiten stimuliert. Die Konzentration von sekretiertem TNF- $\alpha$  im Überstand wurde mittels ELISA bestimmt. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$

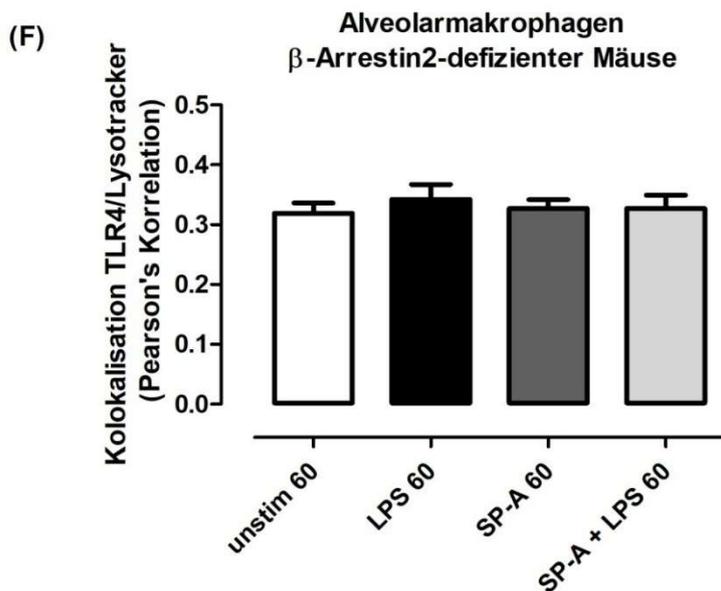
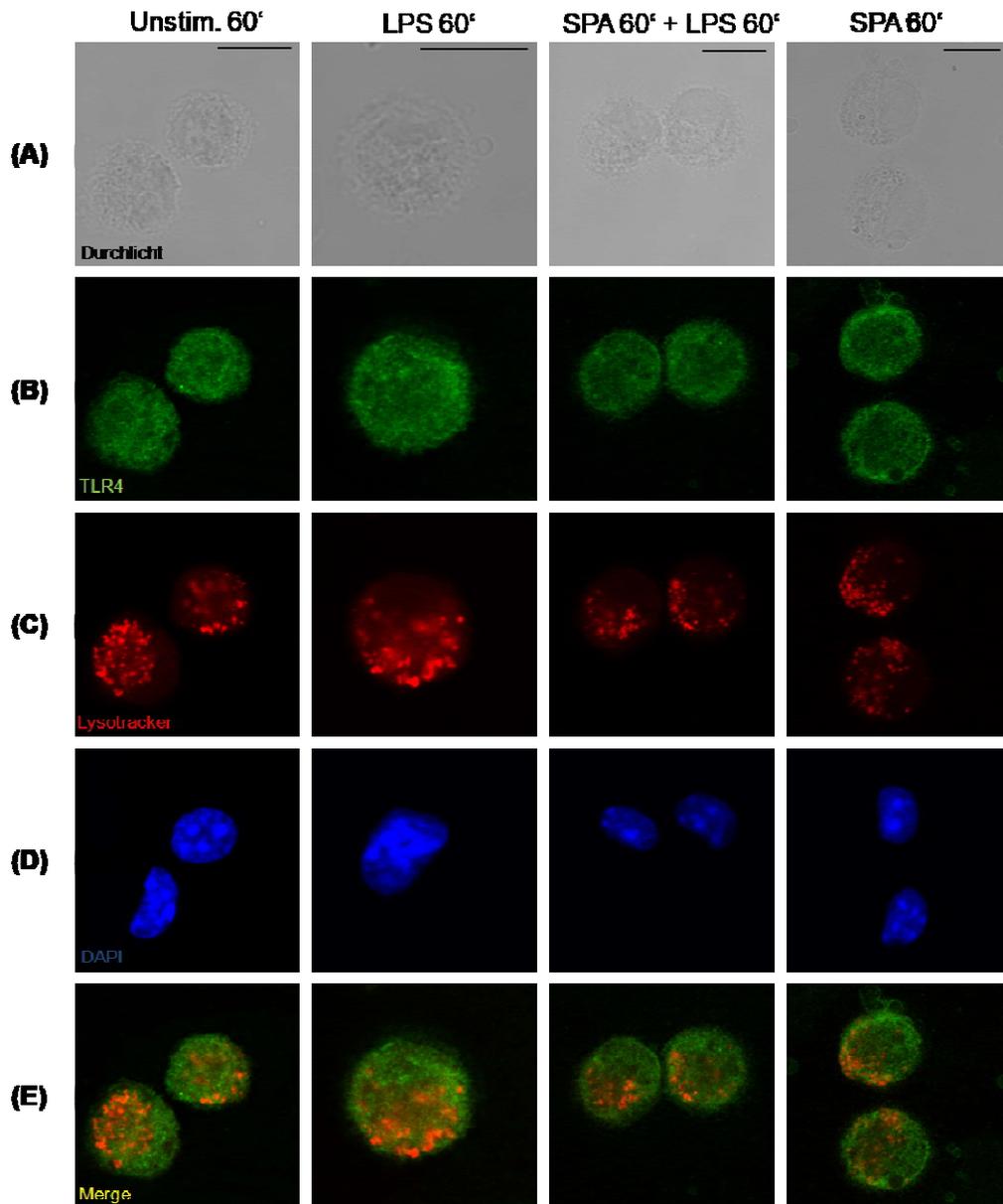
**b)** ELISA Analyse der TNF- $\alpha$  Freisetzung von Alveolarmakrophagen der Ratte. Die Zellen ( $1 \times 10^6$ / 500  $\mu$ l) wurden sequenziell mit SP-A plus LPS oder mit SP-A plus LPS in Anwesenheit von Rab7-Blockingpeptid (20 $\mu$ g/ml) für die angegebenen Zeiten stimuliert. Die Konzentration von sekretiertem TNF- $\alpha$  im Überstand wurde mittels ELISA bestimmt. \*\*  $p < 0.01$

### **3.6 $\beta$ -Arrestin2 ist notwendig für den SP-A-gesteigerten Abbau der LPS-induzierten TLR4 Proteinexpression**

Das zytosolische Gerüst- und Signalprotein  $\beta$ -Arrestin2 ist ein *in vitro* und *in vivo* Negativregulator der LPS-induzierten TLR4 Aktivierung (Gao et al., 2004; Witherow et al., 2004). SP-A steigert die Expression von  $\beta$ -Arrestin2 in Alveolarmakrophagen und  $\beta$ -Arrestin2 ist notwendig für die SP-A-vermittelte Reduktion der TLR4 Aktivierung in einem Mausmodell der intratrachealen LPS Applikation (Sender et al., 2013). Um die Relevanz von  $\beta$ -Arrestin2 für den hemmenden Effekt von SP-A auf die LPS-induzierte Steigerung der TLR4 Proteinexpression zu untersuchen, wurden Alveolarmakrophagen  $\beta$ -Arrestin2-defizienter Mäuse mit LPS, SP-A oder SP-A plus LPS stimuliert oder blieben unbehandelt. Die Expression von TLR4 wurde mittels Immunoblot analysiert. In Abwesenheit von  $\beta$ -Arrestin2 war der inhibierende Effekt von SP-A auf die LPS-induzierte TLR4 Proteinexpressionssteigerung aufgehoben (**Abbildung 3.6.a**). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von wie oben stimulierten Alveolarmakrophagen  $\beta$ -Arrestin2-defizienter Mäuse zeigten nach Stimulation mit SP-A keine gesteigerte Kolokalisation von TLR4 und Lysosom (**Abbildung 3.6.b**).

$\beta$ -Arrestin2 scheint demnach notwendig für den SP-A-gesteigerten Abbau von TLR4 zu sein.





3.6.b

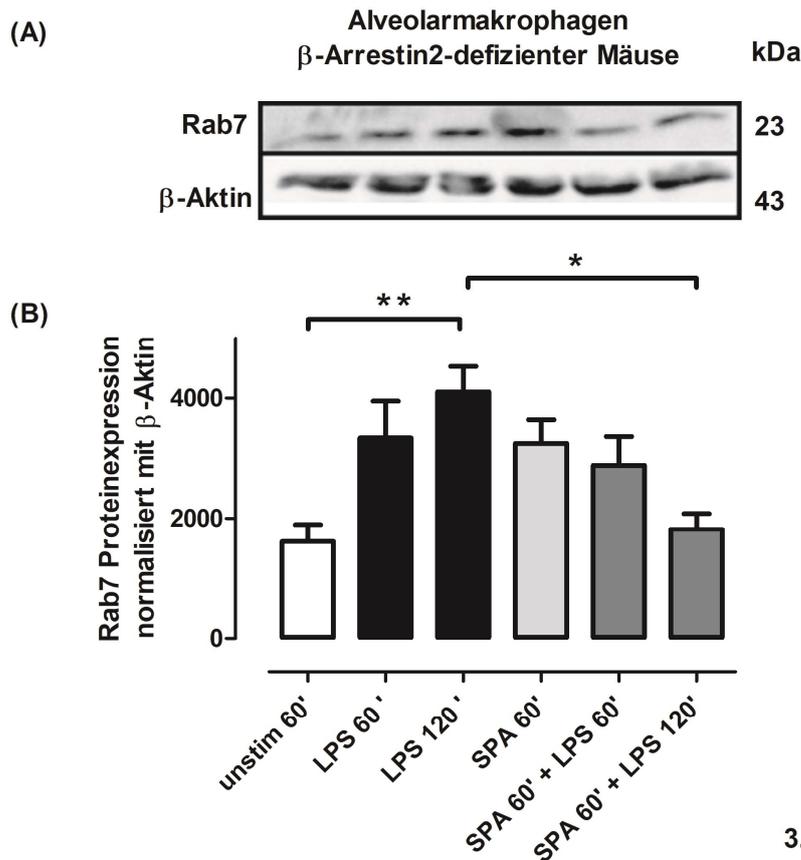
**Abbildung 3.6  $\beta$ -Arrestin2 ist notwendig für den SP-A-gesteigerten Abbau der LPS-induzierten TLR4 Proteinexpression.**

**a)** Immunoblot Analyse der TLR4 Proteinexpression in Alveolarmakrophagen  $\beta$ -Arrestin2-defizienter Mäuse. Die Zellen ( $2 \times 10^5$  Zellen/ 500  $\mu$ l) wurden sequenziell mit LPS (100 ng/ml), SP-A (40  $\mu$ g/ml) oder SP-A plus LPS für die angegebenen Zeiten stimuliert. Gesamtzelllysate wurden per SDS-PAGE separiert, die Detektion von TLR4 und  $\beta$ -Aktin erfolgte mittels Immunoblot. (A) Repräsentativer TLR4 und  $\beta$ -Aktin Immunoblot. (B) Nach densitometrischer Auswertung wurden die Daten von 9 unabhängigen Experimenten  $\beta$ -Aktin-normalisiert und statistisch mittels Varianzanalyse (einfaktorielle ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur (Mittelwert (mean)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM)) analysiert. \*  $p < 0.05$

**b)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Analyse der TLR4/Lysosom-Kokalisation in primären Alveolarmakrophagen  $\beta$ -Arrestin2-defizienter Mäuse. Nach Adhärenz wurden die Zellen ( $1 \times 10^5$  Zellen/ 500  $\mu$ l) sequenziell mit LPS (100 ng/ml), SP-A (40  $\mu$ g/ml) plus LPS oder mit SP-A plus LPS in Anwesenheit von Rab7-Blockingpeptid (20  $\mu$ g/ml) für die angegebenen Zeiten stimuliert (**Abbildung 3.6.b. A-E**). Nach Färbung der Lysosomen (Lysotracker Red), TLR4 (mouse monoclonal antibody mit Alexa Fluor 488 goat anti-mouse) und der Zellkerne (DAPI) erfolgte die konfokalmikroskopische Visualisierung bei den entsprechenden Wellenlängen (Skalierungsmarkierung: 10  $\mu$ m). Die Kokolisationsanalyse erfolgte durch Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson (**Abbildung 3.6.b. F**). Gezeigt sind repräsentative Bilder eines Beispiexperimentes (**Abbildung 3.6.b. A-E**). Es wurden mindestens 51 Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten pro Bedingung ausgewertet und statistisch per Varianzanalyse (einfaktorielle ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur (Mittelwert (mean)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM)) analysiert.

### **3.7 $\beta$ -Arrestin2 ist notwendig für die SP-A-vermittelte Rab7 Proteinexpression in Anwesenheit von LPS**

Sowohl  $\beta$ -Arrestin2 als auch Rab7 sind am SP-A-gesteigerten Abbau der LPS-induzierten TLR4 Proteinexpression beteiligt. Die genauen Signalwege sind unbekannt. In vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl SP-A als auch LPS die Proteinexpression von Rab7 in primären Alveolarmakrophagen von Wildtypmäusen und Ratten steigert (Sender et al., 2011). Die Folgehypothese lautete, dass  $\beta$ -Arrestin2 bei diesem Prozess beteiligt ist. Um die Relevanz von  $\beta$ -Arrestin2 auf die SP-A-bedingte Steigerung der Rab7 Proteinexpression zu untersuchen, wurden primäre Alveolarmakrophagen von  $\beta$ -Arrestin2-defizienten Mäusen mit LPS, SP-A oder SP-A plus LPS stimuliert oder blieben unbehandelt. Die Expression von Rab7 wurde mittels Immunoblot analysiert. Die Stimulation der Alveolarmakrophagen mit LPS steigerte die Proteinexpression von Rab7 nach 120 Minuten signifikant ( $p < 0.01$ ) über den Kontrollwert (unbehandelte Alveolarmakrophagen). Nach Vorinkubation mit SP-A konnte die LPS-bedingte Steigerung der Rab7 Proteinexpression signifikant gehemmt werden ( $p < 0.05$ ). Diese Daten liefern Hinweise darauf, dass SP-A und LPS getrennt unabhängig Rab7 steigern. In Kombination von SP-A und LPS scheint auf einen  $\beta$ -Arrestin2-abhängigen Signalweg umgeschaltet zu werden, sodass in Abwesenheit von  $\beta$ -Arrestin2 LPS- und SPA Rab7 nicht steigern (**Abbildung 3.7**).



**Abbildung 3.7 β-Arrestin2 ist notwendig für die SP-A-vermittelte Rab7 Proteinexpression in Anwesenheit von LPS.**

Immunoblot Analyse der Rab7 Proteinexpression in Alveolarmakrophagen β-Arrestin2-defizienter Mäuse. Die Zellen ( $2 \times 10^5$  Zellen/ 500  $\mu$ l) wurden sequenziell mit LPS (100 ng/ml), SP-A (40  $\mu$ g/ml) oder SP-A plus LPS für die angegebenen Zeiten stimuliert. Gesamtzelllysate wurden per SDS-PAGE separiert, die Detektion von Rab7 und β-Aktin erfolgte mittels Immunoblot. (A) Repräsentativer Rab7 und β-Aktin Immunoblot. (B) Nach densitometrischer Auswertung wurden die Daten von 10 unabhängigen Experimenten β-Aktin-normalisiert und statistisch mittels Varianzanalyse (einfaktorielle ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur (Mittelwert (mean)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM)) analysiert. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$

## 4 Diskussion

Bakterielle Pneumonien sind trotz moderner Diagnostik und Therapie eine Hauptursache globaler Morbidität und Mortalität (WHO, 2020). Die Gründe dafür sind zum einen steigende Inzidenzen durch höheres Lebensalter der Infizierten vor allem in den westlichen Industriestaaten, zum anderen schwerwiegendere Verläufe in Verbindung mit anderen chronischen Erkrankungen sowie zunehmende Antibiotikaresistenzen vor allem im Bereich gramnegativer Bakterien (Cilloniz et al., 2016; Tacconelli et al., 2018). Obwohl ambulant erworbene Pneumonien in den meisten Fällen weiterhin durch grampositive Bakterien wie *Streptococcus pneumoniae* ausgelöst werden, treten auch hier immer häufiger gramnegative Keime mit diversen Antibiotikaresistenzen auf (Cilloniz et al., 2019). Im Bereich der nosokomialen Pneumonien stellen bereits seit längerem multiresistente gramnegative Keime die Medizin vor große Herausforderungen. Nosokomiale Pneumonien sind die häufigsten im Krankenhaus erworbenen Infektionen und sind mit der höchsten Mortalität assoziiert (Cilloniz et al., 2016). Seit den 50er Jahren wurden Beta-Laktam-Antibiotika wie Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme weltweit routinemäßig eingesetzt, um Pneumonien mit gramnegativen Keimen wie *Enterobacteriae*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Klebsiella pneumoniae* zu behandeln. Oft gelingt kein spezifischer Keimnachweis mit Antibiogramm, sodass der kalkulierte Einsatz von Breitbandantibiotika seit den 80er Jahren zu zunehmender Resistenzentwicklung dieser Keime gegen Beta-Laktam-Antibiotika führt (Bassetti et al., 2016). Diese Resistenzentwicklung, der Mangel an neuen Antibiotika sowie das sich ändernde Patientenlientel wie ältere, multimorbide oder immunsupprimierte Patienten, erfordern es zunehmend, endogene pulmonale Abwehrmechanismen besser zu verstehen, um deren Beeinflussung in Zukunft therapeutisch nutzbar machen zu können.

Pulmonaler Surfactant ist ein intraalveolärer Komplex aus Lipiden und Proteinen, der zum einen durch seine biophysikalischen Eigenschaften die extrauterine Atmung ermöglicht und zum anderen maßgeblich an der pulmonalen Immunabwehr beteiligt ist (Wright, 2004; Chroneos et al., 2010). Die löslichen C-Typ-Collectine SP-A, die Hauptproteinkomponente von Surfactant, und SP-D

modulieren zentrale Makrophagenfunktionen wie Chemotaxis, Phagozytose, und inflammatorische Immunantwort. Beide Collectine steigern die Phagozytose von Bakterien, Viren und Allergen über Opsonisierung und die Regulation von Rezeptorexpression. Beide Collectine binden darüber hinaus auch direkt an Pathogene und sind somit unmittelbar antimikrobiell aktiv (Wright, 2004; Nayak et al., 2012).

SP-A vermittelt Immunschutz gegen zahlreiche respiratorische Pathogene, steigert deren Clearance, begrenzt die lokale Entzündungsreaktion und induziert die Gewebereparatur (Wright, 2004; Chroneos et al., 2010; Casals et al., 2018). SP-A hat eine Schlüsselrolle in der Begrenzung TLR4-vermittelter Inflammation und in der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase in Infektionsmodellen mit gramnegativen Bakterien oder LPS, ihrem invarianten Virulenzfaktor. (Borron et al., 2000; George et al., 2008; Sender et al., 2013; Coya et al., 2015).

CD-14-gebundenes LPS vermittelt MD-2-abhängig die Aktivierung von TLR4 und führt unter Einbeziehung der Adaptorproteine MyD88 und TIRAP zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, der die Transskription pro-inflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 und TNF $\alpha$  steigert (Akira und Takeda, 2004; Kieser und Kagan, 2017) (**Abbildung 1.3**). Die resultierende pro-inflammatorische Antwort dient der Eliminierung gramnegativer Bakterien und ist somit von zentraler Bedeutung für die Bekämpfung pulmonaler Pathogene (Wang et al., 2002) (Schurr et al., 2005) (Liaunardy-Jopeace und Gay, 2014). Überschießende, nicht mehr kontrollierbare pro-inflammatorische Reaktionen, wie sie beispielsweise bei der Sepsis vorkommen, können jedoch das Gewebe nachhaltig schädigen oder im schlimmsten Fall zerstören, weswegen endogene gegenregulatorische Mechanismen unerlässlich sind (Waage et al., 1989; Cook et al., 2004). Einer dieser Gegenregulationsmechanismen ist die MD-2 und CD-14-abhängige Endozytose mit anschließendem lysosomalen Abbau oder endozytärem Recycling des aktivierten TLR4- Liganden-Komplexes (Nagai et al., 2002) (Husebye et al., 2006; Zaroni et al., 2011). Die Expression, die intrazelluläre Lokalisation und der Abbau von TLR4 sind zentrale Ansatzpunkte für Gegenregulationen der proinflammatorischen TLR4-Signalkaskade (Liaunardy-Jopeace und Gay, 2014) .

Die Reproduzierbarkeit tierexperimenteller Daten an humanen Primärzellen ist ein unerlässlicher Schritt in Richtung humanrelevanter translationaler Forschung. Die vorliegende Arbeit zeigt erstmalig, dass SP-A in humanen Alveolarmakrophagen von gesunden Individuen die LPS-induzierte Steigerung der TLR4 Proteinexpression hemmt (**Abbildung 3.1**). Eine Reduktion der LPS-induzierten TLR4 Proteinexpression durch SP-A und die damit assoziierte Hemmung pro-inflammatorischer Immunantworten wurden in verschiedenen Zellen und Organen bereits in mehreren vorausgegangenen Studien beschrieben (Sender et al., 2013; Quintanilla et al., 2015; Yang et al., 2017; Zhang et al., 2018). So sind beispielsweise in einem Rattenmodell der nekrotisierenden Enterokolitis, eine der gefürchtetsten Komplikationen der Frühgeburtlichkeit, die intestinale TLR4 Proteinexpression, die Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin-1 und TNF $\alpha$  sowie die Mortalität nach oraler Applikation von SP-A signifikant reduziert (Quintanilla HD, 2015). Die LPS-induzierte Zunahme der TLR4 Proteinexpression ist in primären murinen intestinalen Epithelzellen von SP-A/SP-D-doppel-defizienten Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zu Wildtypmäusen und ist hemmbar durch Vorbehandlung der Zellen mit SP-A oder SP-D (Zhang et al., 2018). Ferner wird SP-A in einem Rattenmodell der Autoimmunenzephalitis der Schwere der Progression des Krankheitsverlaufs entsprechend im zentralen Nervensystem exprimiert und hemmt *in vitro* die LPS-induzierte TLR4 Proteinexpression sowie die Zytokinfreisetzung in humanen Astrozyten und Mikroglia (Yang et al., 2017). In primären Alveolarmakrophagen der Ratte hemmt SP-A die LPS-induzierte TLR4 Proteinexpression (Sender et al., 2013). Im Gegensatz zu diesen Befunden konnte bisher kein Effekt von SP-A auf die basale TLR4 Expression nachgewiesen werden. SP-A hat keinen Effekt auf die basale Oberflächenexpression von TLR4 auf fünf Tage alten, aus humanen Monozyten gereiften Makrophagen (Henning et al., 2008). Ebenfalls unter basalen Bedingungen hat SP-A nur einen minimalen Effekt auf die TLR4 mRNA Expression während der Differenzierung von Monozyten in Makrophagen (Henning et al., 2008). Die zusammengefassten Daten zeigen, dass SP-A organübergreifend LPS-induzierte TLR4 Proteinexpression begrenzt und dadurch einen ubiquitären antiinflammatorischen Regulator im Rahmen gramnegativer Infektionen darstellen könnte. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass, obwohl die Lunge das Hauptorgan der körpereigenen SP-A

Expression ist, zahlreiche extrapulmonale SP-A Expressionen und Funktionen bekannt werden (Ujma et al., 2017). Da dies vor allem mukosale Gewebe betrifft, könnte man eine generelle Abwehrkapazität des multifunktionellen Collectins vermuten.

Die Mechanismen der SP-A-vermittelten Hemmung der LPS-induzierten TLR4 Proteinexpression sind unbekannt. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass SP-A die LPS-induzierte TLR4 Proteinexpression nach Translationshemmung mit Cycloheximid in primären Alveolarmakrophagen von Ratten, SP-A-defizienten Mäusen und Wildtypmäusen weiter reduziert (**Abbildung 3.2**). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass SP-A den posttranslationalen Abbau von LPS-induziertem TLR4 steigert. Der Abbau von TLR4 erfordert zunächst den endozytären Transport von TLR4 zum Lysosom (Husebye et al., 2006; Wang et al., 2007; Palsson-McDermott et al., 2009).

Rab GTPasen, die grundlegend an der zellulären Membranorganisation beteiligt sind (Stenmark und Olkkonen, 2001; Hutagalung und Novick, 2011), regulieren auch den intrazellulären TLR4 Transport und beeinflussen die TLR4 Funktion (Husebye et al., 2010; Wang et al., 2010; Chen et al., 2019; Li et al., 2019). Nach Stimulation mit LPS steigert beispielsweise Rab10 in der Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 einen kontinuierlichen Nachschub von TLR4 vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran und begünstigt *in vivo* bei Rab10 Überexpression die Ausprägung eines LPS-induzierten Lungenversagens (Wang et al., 2010). Rab11a ist essenziell für das TLR4 Trafficking zu *Escherichia coli*-angereicherten Phagosomen in humanen Monozyten und kontrolliert dort die Aktivierung von Interferon Regulatory Factor 3 (Husebye et al., 2010). Rab21 reguliert LPS-induzierte Inflammation über Beeinflussung von TLR4 Trafficking und Signaltransduktion in murinen Makrophagen und Monozyten (Li et al., 2019). Überexpression von Rab26 reduziert die TLR4 Expression an der Zellmembran in pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (Chen et al., 2019). Rab7b, das den endozytären Transport zwischen Endosomen und Trans-Golgi-Netzwerk kontrolliert, gilt als Negativregulator der TLR4 Signaltransduktion (Wang et al., 2007; Klaver et al., 2019; Qi et al., 2019). Der parasitäre Schweinepeitschenwurm *Trichuris suis* moduliert im Darm seines Wirtes die Immunantwort unter anderem durch eine Induktion von Rab7b, die konsekutiv einhergeht mit einer reduzierten

TLR4 Expression und einer Hemmung der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Klaver et al., 2019). In einem Rattenmodell der ischämischen Hirnschädigung (Schlaganfallmodell) konnte gezeigt werden, dass die Expression von Rab7b im Gehirn steigt und dass die Überexpression von Rab7b mit reduzierter TLR4 mRNA- und Proteinexpression sowie einer Reduktion proinflammatorischer Mediatoren assoziiert ist (Qi et al., 2019).

Vorausgegangene Studien haben gezeigt, dass SP-A die Proteinexpression von Rab7 in primären Alveolarmakrophagen steigert und Rab7-abhängig den Transport von *Escherichia coli* zum Lysosom fördert (Sender et al., 2011).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Rab7 notwendig für den SP-A-vermittelten Abbau von LPS-induziertem TLR4 ist. Rab7 kontrolliert endozytäre Transportprozesse zum Lysosom und ist somit an Abbauprozessen vieler intrazellulärer Proteine beteiligt (Bucci et al., 2000; Guerra und Bucci, 2016). Die pharmakologische Hemmung von Rab7 mit zellpermeablen blockierenden Peptiden konnte den Effekt von SP-A auf die LPS-induzierte Steigerung der TLR4 Proteinexpression in primären Alveolarmakrophagen von Ratten, Wildtyp-Mäusen und SP-A-defizienten Mäusen aufheben (**Abbildung 3.3**). In fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen primärer Alveolarmakrophagen von Wildtypmäusen und SP-A-defizienten Mäusen konnte in Anwesenheit von LPS nach Stimulation mit SP-A eine gesteigerte Kolokalisation von TLR4 mit dem Lysosom gezeigt werden. Dieser Effekt konnte wiederum durch die pharmakologische Hemmung mit Rab7-blockierendem Peptid aufgehoben werden (**Abbildung 3.4**). Die Daten bestätigen die Hypothese, dass SP-A in Anwesenheit von LPS den lysosomalen Abbau von TLR4 steigert.

TNF- $\alpha$  ist ein multifunktionales, proinflammatorisches Zytokin, das im Rahmen der LPS-aktivierten TLR4/ NF- $\kappa$ B-Signalkaskade vermehrt exprimiert und freigesetzt wird. TNF- $\alpha$  hat eine Schlüsselrolle bei lokalen und systemischen Entzündungen und ist therapeutischer Ansatzpunkt bei zahlreichen chronisch inflammatorischen Erkrankungen wie Rheumatoider Arthritis oder Colitis ulcerosa (Hehlgans und Pfeffer, 2005) (Bradley, 2008; Barton und Kagan, 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte die funktionell relevante Hemmung der LPS-induzierten TNF- $\alpha$ -Freisetzung durch SP-A ebenfalls mit Rab7-blockierendem Peptid antagonisiert werden

**(Abbildung 3.5).** Mehrere Studien beschreiben antiinflammatorische Effekte von SP-A auf die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Steigerung (McIntosh et al., 1996; Borron et al., 2000; Gardai et al., 2003). SP-A reduziert die TNF- $\alpha$ -Freisetzung von LPS-stimulierten Alveolarmakrophagen (McIntosh et al., 1996). Die durch SP-A reduzierte LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Freisetzung konnte auch *in vivo* durch TNF- $\alpha$ -ELISA in bronchoalveolären Lavagen von Mäusen gezeigt werden (Borron et al., 2000). Interaktion von SP-A und SP-D mit SIRP- $\alpha$ , einem regulatorischem Membranglykoprotein, das hauptsächlich auf myeloischen Zellen, Stammzellen oder Neuronen exprimiert wird, führt über Blockade von Signalkaskaden der P38 MAP Kinase und SRC Kinasen ebenfalls zur Reduktion proinflammatorischer Zytokine (Gardai et al., 2003). Zudem reduziert SP-A die Phosphorylierung von Akt, einem entscheidenden Regulator von NF- $\kappa$ B (Henning et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass SP-A die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Freisetzung von primären murinen Alveolarmakrophagen reduziert und die pharmakologische Hemmung von Rab7 diesen Effekt aufhebt. Auch bei primären Alveolarmakrophagen der Ratte stieg die SP-A-reduzierte TNF- $\alpha$ -Freisetzung nach Gabe von Rab7-blockierendem Peptid wieder an. **(Abbildung 3.5)** Der Rab7-abhängige Effekt von SP-A auf die LPS-induzierte TLR4 Signalkaskade ist demnach funktionell relevant.

Das multifaktorielle Adaptor- und Signalprotein  $\beta$ -Arrestin2 wirkt *in vitro* und *in vivo* über verschiedene Mechanismen als Negativregulator der LPS-induzierten TLR4 Aktivierung (Gao et al., 2004; Witherow et al., 2004; Wang et al., 2006; Li et al., 2014). Beispielsweise interagiert  $\beta$ -Arrestin2 direkt mit dem NF- $\kappa$ B -Inhibitor  $I\kappa B\alpha$  und hemmt dadurch die NF- $\kappa$ B -bedingte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Gao et al., 2004; Witherow et al., 2004). Im Rahmen der TLR-IL1-Signalkaskade interagieren  $\beta$ -Arrestine mit TRAF6, einem Ubiquitin, das die Aktivierung verschiedener Proteinkinasen vermittelt, und verhindern dessen Auto-Ubiquitinierung, was die konsekutive Aktivierung des IKK-Komplexes hemmt, der NF- $\kappa$ B aktiviert (Wang et al., 2006). Ferner ist  $\beta$ -Arrestin2 essentiell für die LPS-induzierte Freisetzung von IL-10, einem wichtigen Gegenregulator der proinflammatorischen TLR4-Signalkaskade (Li et al., 2014).

Eine dieser Arbeit vorausgegangene Studie hat gezeigt, dass SP-A die Proteinexpression von  $\beta$ -Arrestin2 in primären Alveolarmakrophagen der Ratte steigert (Sender et al., 2013). Jene Studie zeigte, dass  $\beta$ -Arrestin2 notwendig für die SP-A-vermittelte Dämpfung der TLR4 Signalkaskade nach intratrachealen LPS-Gaben im Mausmodell ist und  $\beta$ -Arrestin2 essentiell für die SP-A-induzierte Reduktion der TLR4-Kolokalisation mit dem frühen Endosom ist.  $\beta$ -Arrestin2 ist somit entscheidend für die SP-A-bedingte Änderung der TLR4 Funktion und Lokalisation in primären Alveolarmakrophagen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass SP-A die LPS-induzierte TLR4 Proteinexpression in Alveolarmakrophagen von  $\beta$ -Arrestin2-defizienten Mäusen im Vergleich zu Alveolarmakrophagen von Wildtyp-Mäusen nicht hemmt. Auch die SP-A-induzierte Kolokalisation von TLR4 mit dem Lysosom in Anwesenheit von LPS bleibt in Alveolarmakrophagen von  $\beta$ -Arrestin2-defizienten Mäusen aus (**Abbildung 3.6**).

Vorausgegangene Studien haben bereits einen Zusammenhang zwischen  $\beta$ -Arrestinen und Surfactantproteinen sowie der pulmonalen Reife nachgewiesen (Zhang et al., 2010; Coulombe et al., 2019). Mäuse, die  $\beta$ -Arrestin1 und  $\beta$ -Arrestin2 doppel-defizient sind, sind aufgrund von mangelnder Lungenreife sowie stark reduzierter Surfactant- und Surfactantproteinbildung nicht lebensfähig (Zhang et al., 2010). Das Tumor-Suppressor-Protein Sash 1 (SAM- und SH3-Domänen enthaltendes Protein 1), das Schlüsselrollen bei Apoptose und Zellproliferation hat, interagiert mit  $\beta$ -Arrestin-1 und induziert so Reifung von Alveolarepithelzellen und Surfactantproduktion. Sash1-defiziente Mäuse zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie  $\beta$ -Arrestin1 und  $\beta$ -Arrestin2 doppel-defiziente Mäuse mit reduzierter Surfactantbildung und sterben ebenfalls neonatal (Coulombe et al., 2019). SP-A-defiziente Mäuse haben signifikant reduzierte  $\beta$ -Arrestin2 Proteinexpression (Sender et al., 2013).  $\beta$ -Arrestin2-defiziente Mäuse sind lebensfähig und haben phänotypisch normal entwickelte Lungen, zeigen aber deutliche immunologische Defizite im Infektionsmodell (Fan et al., 2010).

Die voran diskutierten Ergebnisse zeigen, dass in Anwesenheit von LPS sowohl Rab7 als auch  $\beta$ -Arrestin2 notwendig für den SP-A-induzierten, lysosomalen TLR4-Abbau sind. Die beteiligten Signalwege sowie der Zusammenhang von

Rab7 und  $\beta$ -Arrestin2 sind unbekannt, allerdings werden immer mehr Interaktionen und Modulationen zwischen diesen beiden Proteingruppen bekannt (Clainig, 2013). SP-A erhöht spezifisch und transient die Proteinexpression von Rab7 in Alveolarmakrophagen von Ratten und Wildtypmäusen (Sender et al., 2011). Es stellte sich die Frage, ob die SP-A-vermittelte Steigerung der Rab7 Proteinexpression ebenfalls abhängig von  $\beta$ -Arrestin2 ist. In Alveolarmakrophagen von  $\beta$ -Arrestin2-defizienten Mäusen konnte LPS und SP-A jeweils allein die Rab7 Proteinexpression steigern. Allerdings kam es, im Gegensatz zu ähnlichen Experimenten mit Alveolarmakrophagen von Wildtypmäusen (Ergebnisse hier nicht gezeigt), zu keiner signifikanten Steigerung der Rab7 Proteinexpression durch SP-A in Anwesenheit von LPS (**Abbildung 3.7**). Diese Daten deuten auf möglicherweise unterschiedliche SP-A-vermittelte Signalwege in An- oder Abwesenheit von LPS hin.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und die Daten der hier zitierten Literatur liefern Hinweise auf eine mögliche zukünftige Rolle SP-A-basierter therapeutischer Maßnahmen im Rahmen einer unkontrollierbaren TLR4-induzierten Immunantwort auf Infektionen mit gramnegativen Bakterien. Aktuelle Arbeiten beschäftigen sich bereits mit diesem Thema (Awasthi et al., 2019). So konnte beispielsweise SPA4, eine SP-A-Partstruktur, in einem Maus-Modell der gramnegativen Pneumonie mit *Pseudomonas aeruginosa* signifikant die freigesetzte TNF- $\alpha$ -Menge reduzieren und die Aufnahme und Lokalisation der Bakterien in den Immunzellen beeinflussen (Awasthi et al., 2019).

## 5.1 Zusammenfassung

Bakterielle Pneumonien durch gramnegative Erreger sind eine der Hauptursachen globaler Morbidität und Mortalität. Vor allem auf Grund deutlich zunehmender Antibiotikaresistenzen gramnegativer Bakterien ist die Entwicklung ergänzender Therapie- und Prophylaxekonzepte im Rahmen einer pulmonalen Infektion unabdingbar.

Pulmonaler Surfactant, der als Lipid-Proteinkomplex die Alveolen auskleidet, hat zentrale biophysikalische und immunologische Funktionen in der Lungenhomöostase und der körpereigenen Abwehr. Surfactantproteine beeinflussen in hohem Maße die Immunantwort auf pulmonale Pathogene und modulieren die Funktion von Alveolarmakrophagen, die neben strukturellen Epithelzellen wesentlicher Teil des zellulären angeborenen Immunsystems der Lunge sind. Alveolarmakrophagen erkennen pulmonale Pathogene über verschiedene PRRs (pattern recognition receptors). Lipopolysaccharid (LPS), das Toxin gramnegativer Bakterien wird durch den PRR Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) erkannt und führt über komplexe Signaltransduktionswege zur Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine. SP-A (Surfactantprotein A) moduliert LPS-induzierte Immunreaktionen in vivo und in vitro über zahlreiche direkte und indirekte Mechanismen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass SP-A die LPS-induzierte TLR4 Proteinexpression in primären Alveolarmakrophagen von Menschen, Ratten, Wildtyp- und SP-A-defizienten Mäusen limitiert. SP-A reduziert die TLR4 Proteinexpression nach Cycloheximid-reduzierter TLR4 Translation weiter und steigert die Kollokalisierung von TLR4 mit dem Lysosom. Sowohl der hemmende Effekt von SP-A auf die LPS-induzierte TLR4 Proteinexpression und Lokalisation als auch auf die reduzierte Freisetzung des LPS-induzierten pro-inflammatorischen Zytokins Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) kann durch pharmakologische Hemmung der Lysosom-assoziierten GTPase Rab7 aufgehoben werden. In Abwesenheit des zytosolischen Gerüst- und Signalproteins  $\beta$ -Arrestin2, das als Negativregulator der LPS-induzierten TLR4 Aktivierung bekannt ist, kann SP-A die Rab7 Proteinexpression nicht steigern, die

LPS-induzierte TLR4 Proteinexpression nicht reduzieren und keine vermehrte TLR4/Lysosom-Kolokalisation induzieren.

Die Daten zeigen, dass SP-A posttranslational die LPS-induzierte TLR4 Expression in primären Alveolarmakrophagen limitiert über einen lysosomalen Abbau unter Beteiligung von Rab7 und  $\beta$ -Arrestin2. Die Befunde können auf einen potenziellen therapeutischen Nutzen von SP-A Partstrukturen bei gramnegativen Pneumonien hindeuten.

## 5.2 Summary

Bacterial pneumonia caused by Gram-negative pathogens is a major cause of global morbidity and mortality. The development of supplementary therapy and prophylaxis concepts in the context of a pulmonary infection is essential, above all due to the definitely increasing antibiotic resistance of Gram-negative bacteria.

Pulmonary surfactant, which lines the alveoli as a lipid-protein complex, has pivotal biophysical and immunological functions in lung homeostasis and host defense. Surfactant proteins strongly influence the immune response to pulmonary pathogens and modulate the function of alveolar macrophages, which along with structural epithelial cells are an essential part of the cellular innate immune system of the lung. Alveolar macrophages recognize pulmonary pathogens via various PRRs (pattern recognition receptors). Lipopolysaccharide (LPS), the toxin of Gram-negative bacteria, is recognized by the PRR Toll-like Receptor 4 (TLR4) leading to the release of pro-inflammatory cytokines via complex signal transduction pathways. SP-A (surfactant protein A) modulates LPS-induced immune responses in vivo and in vitro through numerous direct and indirect mechanisms.

The present work shows that SP-A limits LPS-induced TLR4 protein expression in primary alveolar macrophages from humans, rats, wild-type and SP-A-deficient mice. SP-A further reduces TLR4 protein expression after cycloheximide-reduced TLR4 translation and increases colocalization of TLR4 with the lysosome. Both the

inhibitory effect of SP-A on LPS-induced TLR4 protein expression and localization and on the reduced release of the LPS-induced pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) can be reduced by pharmacological inhibition of the lysosome-associated GTPase Rab7. In the absence of the cytosolic scaffolding and signaling protein  $\beta$ -arrestin2, known to be a negative regulator of LPS-induced TLR4 activation, SP-A fails to increase Rab7 protein expression, decrease LPS-induced TLR4 protein expression, and increase TLR4/ lysosome colocalization.

The data show that SP-A posttranslationally limits LPS-induced TLR4 expression in primary alveolar macrophages via lysosomal degradation involving Rab7 and  $\beta$ -arrestin2. The findings may indicate a potential therapeutic benefit of SP-A part structures for patients suffering from Gram-negative pneumonia.

## 6 Literaturverzeichnis

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jul;4(7):499-511.

Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res*. 2001;7(3):167-202.

Attramadal H, Arriza JL, Aoki C, Dawson TM, Codina J, Kwatra MM, Snyder SH, Caron MG, Lefkowitz RJ. Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J Biol Chem*. 1992 Sep 5;267(25):17882-90.

Awasthi S, Singh B, Ramani V, Xie J, Kosanke S. TLR4-interacting SPA4 peptide improves host defense and alleviates tissue injury in a mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *PLoS One*. 2019 Jan 28;14(1):e0210979.

Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2002;270:81-92.

Barton GM, Kagan JC. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol*. 2009 Aug;9(8):535-42.

Bassetti M, Welte T, Wunderink RG. Treatment of Gram-negative pneumonia in the critical care setting: is the beta-lactam antibiotic backbone broken beyond repair? *Crit Care*. 2016 Jan 29;20:19.

Benovic JL, Kühn H, Weyand I, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Dec;84(24):8879-82.

Bohn LM, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Peppel K, Caron MG, Lin FT. Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science*. 1999 Dec 24;286(5449):2495-8

- Borron P, McIntosh JC, Korfhagen TR, Whitsett JA, Taylor J, Wright JR. Surfactant-associated protein A inhibits LPS-induced cytokine and nitric oxide production in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000 Apr;278(4):L840-7.
- Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol*. 2008 Jan;214(2):149-60.
- Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J, van Deurs B. Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell*. 2000 Feb;11(2):467-80.
- Carey B, Trapnell BC. The molecular basis of pulmonary alveolar proteinosis. *Clin Immunol*. 2010 May;135(2):223-35.
- Casals C, Campanero-Rhodes MA, García-Fojeda B, Solís D. The Role of Collectins and Galectins in Lung Innate Immune Defense. *Front Immunol*. 2018 Sep 4;9:1998.
- Chen H, Yuan M, Huang C, Xu Z, Li M, Zhang C, Gao Z, Zhang M, Xu J, Qian H, You J, He B, Wang G, Hu M. Endothelial Cell Inflammation and Barriers Are Regulated by the Rab26-Mediated Balance between  $\beta$ 2-AR and TLR4 in Pulmonary Microvessel Endothelial Cells. *Mediators Inflamm*. 2019 Apr 28;2019:7538071.
- Chroneos ZC, Abdolrasulnia R, Whitsett JA, Rice WR, Shepherd VL. Purification of a cell-surface receptor for surfactant protein A. *J Biol Chem*. 1996 Jul 5;271(27):16375-83.
- Chroneos ZC, Sever-Chroneos Z, Shepherd VL. Pulmonary surfactant: an immunological perspective. *Cell Physiol Biochem*. 2010;25(1):13-26.
- Cilloniz C, Martin-Loeches I, Garcia-Vidal C, San Jose A, Torres A. Microbial Etiology of Pneumonia: Epidemiology, Diagnosis and Resistance Patterns. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):2120.
- Cillóniz C, Dominedò C, Torres A. Multidrug Resistant Gram-Negative Bacteria in Community-Acquired Pneumonia. *Crit Care*. 2019 Mar 9;23(1):79.
- Claing A.  $\beta$ -Arrestins: modulators of small GTPase activation and function. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2013;118:149-74.

Clements JA. Surface tension of lung extracts. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1957 May;95(1):170-2.

Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol.* 2004 Oct;5(10):975-9.

Coulombe P, Paliouras GN, Clayton A, Hussainkhel A, Fuller M, Jovanovic V, Dauphinee S, Umlandt P, Xiang P, Kyle AH, Minchinton AI, Humphries RK, Hoodless PA, Parker JDK, Wright JL, Karsan A. Endothelial Sash1 Is Required for Lung Maturation through Nitric Oxide Signaling. *Cell Rep.* 2019 May 7;27(6):1769-1780.e4.

Coya JM, Akinbi HT, Sáenz A, Yang L, Weaver TE, Casals C. Natural Anti-Infective Pulmonary Proteins: In Vivo Cooperative Action of Surfactant Protein SP-A and the Lung Antimicrobial Peptide SP-BN. *J Immunol.* 2015 Aug 15;195(4):1628-36.

Fan H, Bitto A, Zingarelli B, Luttrell LM, Borg K, Halushka PV, Cook JA. Beta-arrestin 2 negatively regulates sepsis-induced inflammation. *Immunology.* 2010 Jul;130(3):344-51.

Freedman NJ, Shenoy SK. Regulation of inflammation by  $\beta$ -arrestins: Not just receptor tales. *Cell Signal.* 2018 Jan;41:41-45.

Galanos C, Lüderitz O. Electrodialysis of lipopolysaccharides and their conversion to uniform salt forms. *Eur J Biochem.* 1975 Jun;54(2):603-10.

Gao H, Sun Y, Wu Y, Luan B, Wang Y, Qu B, Pei G. Identification of beta-arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF-kappaB pathways. *Mol Cell.* 2004 May 7;14(3):303-17.

Gardai SJ, Xiao YQ, Dickinson M, Nick JA, Voelker DR, Greene KE, Henson PM. By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell.* 2003 Oct 3;115(1):13-23.

Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010 Feb 5;327(5966):656-61.

George CL, Goss KL, Meyerholz DK, Lamb FS, Snyder JM. Surfactant-associated protein A provides critical immunoprotection in neonatal mice. *Infect Immun*. 2008 Jan;76(1):380-90.

Gil M, McCormack FX, Levine AM. Surfactant protein A modulates cell surface expression of CR3 on alveolar macrophages and enhances CR3-mediated phagocytosis. *J Biol Chem*. 2009 Mar 20;284(12):7495-504.

Guerra F, Bucci C. Multiple Roles of the Small GTPase Rab7. *Cells*. 2016 Aug 18;5(3):34.

Hager T, Reis H, Theegarten D. Infektiöse Lungenerkrankungen [Infectious pulmonary diseases]. *Pathologe*. 2014 Nov;35(6):606-11. German.

Halliday HL. Surfactants: past, present and future. *J Perinatol*. 2008 May;28 Suppl 1(Suppl 1):S47-56.

Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*. 2005 May;115(1):1-20.

Henning LN, Azad AK, Parsa KV, Crowther JE, Tridandapani S, Schlesinger LS. Pulmonary surfactant protein A regulates TLR expression and activity in human macrophages. *J Immunol*. 2008 Jun 15;180(12):7847-58.

Husebye H, Halaas Ø, Stenmark H, Tunheim G, Sandanger Ø, Bogen B, Brech A, Latz E, Espevik T. Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J*. 2006 Feb 22;25(4):683-92.

Husebye H, Aune MH, Stenvik J, Samstad E, Skjeldal F, Halaas O, Nilsen NJ, Stenmark H, Latz E, Lien E, Mollnes TE, Bakke O, Espevik T. The Rab11a GTPase controls Toll-like receptor 4-induced activation of interferon regulatory factor-3 on phagosomes. *Immunity*. 2010 Oct 29;33(4):583-96.

Hussell T, Bell TJ. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol*. 2014 Feb;14(2):81-93.

Hutagalung AH, Novick PJ. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev*. 2011 Jan;91(1):119-49.

Ikegami M, Korfhagen TR, Whitsett JA, Bruno MD, Wert SE, Wada K, Jobe AH. Characteristics of surfactant from SP-A-deficient mice. *Am J Physiol*. 1998 Aug;275(2):L247-54.

Iwanaga S, Morita T, Harada T, Nakamura S, Niwa M, Takada K, Kimura T, Sakakibara S. Chromogenic substrates for horseshoe crab clotting enzyme. Its application for the assay of bacterial endotoxins. *Haemostasis*. 1978;7(2-3):183-8.

Jakel A, Qaseem AS, Kishore U, Sim RB. Ligands and receptors of lung surfactant proteins SP-A and SP-D. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2013 Jun 1;18(3):1129-40.

Kagan JC, Barton GM. Emerging principles governing signal transduction by pattern-recognition receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Nov 13;7(3):a016253.

Kalia N, Singh J, Kaur M. The ambiguous role of mannose-binding lectin (MBL) in human immunity. *Open Med (Wars)*. 2021 Feb 17;16(1):299-310.

Kang DS, Tian X, Benovic JL. Role of  $\beta$ -arrestins and arrestin domain-containing proteins in G protein-coupled receptor trafficking. *Curr Opin Cell Biol*. 2014 Apr;27:63-71.

Kieser KJ, Kagan JC. Multi-receptor detection of individual bacterial products by the innate immune system. *Nat Rev Immunol*. 2017 Jun;17(6):376-390.

Klaver EJ, van der Pouw Kraan TC, Laan LC, Kringel H, Cummings RD, Bouma G, Kraal G, van Die I. Trichuris suis soluble products induce Rab7b expression and limit TLR4 responses in human dendritic cells. *Genes Immun*. 2015 Sep;16(6):378-87.

Korfhagen TR, Bruno MD, Ross GF, Huelsman KM, Ikegami M, Jobe AH, Wert SE, Stripp BR, Morris RE, Glasser SW, Bachurski CJ, Iwamoto HS, Whitsett JA. Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Sep 3;93(18):9594-9.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Lattin JE, Greenwood KP, Daly NL, Kelly G, Zidar DA, Clark RJ, Thomas WG, Kellie S, Craik DJ, Hume DA, Sweet MJ. Beta-arrestin 2 is required for complement C1q expression in macrophages and constrains factor-independent survival. *Mol Immunol*. 2009 Dec;47(2-3):340-7.

Latz E, Visintin A, Lien E, Fitzgerald KA, Monks BG, Kurt-Jones EA, Golenbock DT, Espevik T. Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *J Biol Chem*. 2002 Dec 6;277(49):47834-43.

Leibovici L, Paul M, Garner P, Sinclair DJ, Afshari A, Pace NL, Cullum N, Williams HC, Smyth A, Skoetz N, Del Mar C, Schilder AG, Yahav D, Tovey D. Addressing resistance to antibiotics in systematic reviews of antibiotic interventions. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Sep;71(9):2367-9.

Leitlinie der Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin (GNPI), AWMF-Leitlinien-Register 024/021 Entwicklungsstufe: S2k, Stand 01/2017, Surfactanttherapie des Atemnotsyndroms Frühgeborener (RDS)

LeVine AM, Whitsett JA, Gwozdz JA, Richardson TR, Fisher JH, Burhans MS, Korfhagen TR. Distinct effects of surfactant protein A or D deficiency during bacterial infection on the lung. *J Immunol*. 2000 Oct 1;165(7):3934-40.

Li G, Siddiqui J, Hendry M, Akiyama J, Edmondson J, Brown C, Allen L, Levitt S, Poulain F, Hawgood S. Surfactant protein-A--deficient mice display an exaggerated early inflammatory response to a beta-resistant strain of influenza A virus. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002 Mar;26(3):277-82.

- Li H, Hu D, Fan H, Zhang Y, LeSage GD, Caudle Y, Stuart C, Liu Z, Yin D.  $\beta$ -Arrestin 2 negatively regulates Toll-like receptor 4 (TLR4)-triggered inflammatory signaling via targeting p38 MAPK and interleukin 10. *J Biol Chem*. 2014 Aug 15;289(33):23075-23085.
- Li P, Wu YH, Zhu YT, Li MX, Pei HH. Requirement of Rab21 in LPS-induced TLR4 signaling and pro-inflammatory responses in macrophages and monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 Jan 1;508(1):169-176.
- Liaunardy-Jopeace A, Gay NJ. Molecular and cellular regulation of toll-like receptor-4 activity induced by lipopolysaccharide ligands. *Front Immunol*. 2014 Oct 6;5:473.
- Lopez-Rodriguez E, Pérez-Gil J. Structure-function relationships in pulmonary surfactant membranes: from biophysics to therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jun;1838(6):1568-85.
- Madhukaran SP, Koippallil Gopalakrishnan AR, Pandit H, Marri ED, Kouser L, Jamil K, Alhamlan FS, Kishore U, Madan T. Expression of surfactant proteins SP-A and SP-D in murine decidua and immunomodulatory effects on decidual macrophages. *Immunobiology*. 2016 Feb;221(2):377-86.
- Malhotra R, Lu J, Holmskov U, Sim RB. Collectins, collectin receptors and the lectin pathway of complement activation. *Clin Exp Immunol*. 1994 Aug;97 Suppl 2(Suppl 2):4-9.
- McGettrick AF, O'Neill LA. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Curr Opin Immunol*. 2010 Feb;22(1):20-7.
- McGreal EP, Ikewaki N, Akatsu H, Morgan BP, Gasque P. Human C1qRp is identical with CD93 and the mNI-11 antigen but does not bind C1q. *J Immunol*. 2002 May 15;168(10):5222-32.
- McIntosh JC, Mervin-Blake S, Conner E, Wright JR. Surfactant protein A protects growing cells and reduces TNF-alpha activity from LPS-stimulated macrophages. *Am J Physiol*. 1996 Aug;271(2 Pt 1):L310-9.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008 Dec;8(12):958-69.

Moulakakis C, Steinhäuser C, Biedziak D, Freundt K, Reiling N, Stamme C. Surfactant Protein A Enhances Constitutive Immune Functions of Clathrin Heavy Chain and Clathrin Adaptor Protein 2. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016 Jul;55(1):92-104.

Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol.* 2002 Jul;3(7):667-72.

Nathan N, Taytard J, Duquesnoy P, Thouvenin G, Corvol H, Amselem S, Clement A. Surfactant protein A: A key player in lung homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016 Dec;81(Pt A):151-155.

Nayak A, Dodagatta-Marri E, Tsolaki AG, Kishore U. An Insight into the Diverse Roles of Surfactant Proteins, SP-A and SP-D in Innate and Adaptive Immunity. *Front Immunol.* 2012 Jun 7;3:131.

v. Neergaard, K. Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik. *Z. Ges. Exp. Med.* **66**, 373–394 (1929).

Palsson-McDermott EM, Doyle SL, McGettrick AF, Hardy M, Husebye H, Banahan K, Gong M, Golenbock D, Espevik T, O'Neill LA. TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway. *Nat Immunol.* 2009 Jun;10(6):579-86.

Parker D, Ahn D, Cohen T, Prince A. Innate Immune Signaling Activated by MDR Bacteria in the Airway. *Physiol Rev.* 2016 Jan;96(1):19-53.

Pattle RE. Properties, function and origin of the alveolar lining layer. *Nature.* 1955 Jun 25;175(4469):1125-6.

Pérez-Gil J. Structure of pulmonary surfactant membranes and films: the role of proteins and lipid-protein interactions. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Jul-Aug;1778(7-8):1676-95.

Qi J, Rong Y, Wang L, Xu J, Zhao K. Rab7b Overexpression-Ameliorated Ischemic Brain Damage Following tMCAO Involves Suppression of TLR4 and NF- $\kappa$ B p65. *J Mol Neurosci*. 2019 Jun;68(2):163-170.

Quintanilla HD, Liu Y, Fatheree NY, Atkins CL, Hashmi SS, Floros J, McCormack FX, Rhoads JM, Alcorn JL. Oral administration of surfactant protein-a reduces pathology in an experimental model of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015 May;60(5):613-20.

Rajagopal S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 May;9(5):373-86.

Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*. 2005 Sep 9;122(5):735-49.

Rogan MP, Geraghty P, Greene CM, O'Neill SJ, Taggart CC, McElvaney NG. Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence. *Respir Res*. 2006 Feb 17;7(1):29.

Rokade S, Madan T. Testicular expression of SP-A, SP-D and MBL-A is positively regulated by testosterone and modulated by lipopolysaccharide. *Immunobiology*. 2016 Sep;221(9):975-85.

Sano H, Chiba H, Iwaki D, Sohma H, Voelker DR, Kuroki Y. Surfactant proteins A and D bind CD14 by different mechanisms. *J Biol Chem*. 2000 Jul 21;275(29):22442-51.

Schurr JR, Young E, Byrne P, Steele C, Shellito JE, Kolls JK. Central role of toll-like receptor 4 signaling and host defense in experimental pneumonia caused by Gram-negative bacteria. *Infect Immun*. 2005 Jan;73(1):532-45.

Sender V, Lang L, Stämme C. Surfactant protein-A modulates LPS-induced TLR4 localization and signaling via  $\beta$ -arrestin 2. *PLoS One*. 2013;8(3):e59896.

Sender V, Moulakakis C, Stämme C. Pulmonary surfactant protein A enhances endolysosomal trafficking in alveolar macrophages through regulation of Rab7. *J Immunol*. 2011 Feb 15;186(4):2397-411.

Sender V, Stamme C. Lung cell-specific modulation of LPS-induced TLR4 receptor and adaptor localization. *Commun Integr Biol*. 2014 May 16;7:e29053.

Smith JS, Rajagopal S. The  $\beta$ -Arrestins: Multifunctional Regulators of G Protein-coupled Receptors. *J Biol Chem*. 2016 Apr 22;291(17):8969-77.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985 Oct;150(1):76-85.

Sönnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J, Zerial M. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol*. 2000 May 15;149(4):901-14.

Stenmark H, Olkkonen VM. The Rab GTPase family. *Genome Biol*. 2001;2(5):REVIEWS3007.

Takeda S, Kadowaki S, Haga T, Takaesu H, Mitaku S. Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett*. 2002 Jun 5;520(1-3):97-101.

Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outtersson K, Patel J, Cavalieri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U, Magrini N; WHO Pathogens Priority List Working Group. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018 Mar;18(3):318-327.

Tenner AJ, Robinson SL, Borchelt J, Wright JR. Human pulmonary surfactant protein (SP-A), a protein structurally homologous to C1q, can enhance FcR- and CR1-mediated phagocytosis. *J Biol Chem*. 1989 Aug 15;264(23):13923-8.

Thorpe GH, Kricka LJ. Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase. *Methods Enzymol*. 1986;133:331-53.

Ujma S, Horsnell WG, Katz AA, Clark HW, Schäfer G. Non-Pulmonary Immune Functions of Surfactant Proteins A and D. *J Innate Immun*. 2017;9(1):3-11.

Vandivier RW, Ogden CA, Fadok VA, Hoffmann PR, Brown KK, Botto M, Walport MJ, Fisher JH, Henson PM, Greene KE. Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. *J Immunol.* 2002 Oct 1;169(7):3978-86.

Veldhuizen R, Nag K, Orgeig S, Possmayer F. The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Nov 19;1408(2-3):90-108.

Voynow JA, Rubin BK. Mucins, mucus, and sputum. *Chest.* 2009 Feb;135(2):505-512.

Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Exp Med.* 1989 Jan 1;169(1):333-8.

Wang D, Lou J, Ouyang C, Chen W, Liu Y, Liu X, Cao X, Wang J, Lu L. Ras-related protein Rab10 facilitates TLR4 signaling by promoting replenishment of TLR4 onto the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Aug 3;107(31):13806-11.

Wang X, Moser C, Louboutin JP, Lysenko ES, Weiner DJ, Weiser JN, Wilson JM. Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to *Haemophilus influenzae* infection in mouse lung. *J Immunol.* 2002 Jan 15;168(2):810-5.

Wang Y, Chen T, Han C, He D, Liu H, An H, Cai Z, Cao X. Lysosome-associated small Rab GTPase Rab7b negatively regulates TLR4 signaling in macrophages by promoting lysosomal degradation of TLR4. *Blood.* 2007 Aug 1;110(3):962-71.

Wüstneck R, Perez-Gil J, Wüstneck N, Cruz A, Fainerman VB, Pison U. Interfacial properties of pulmonary surfactant layers. *Adv Colloid Interface Sci.* 2005 Dec 14;117(1-3):33-58.

Wang Y, Tang Y, Teng L, Wu Y, Zhao X, Pei G. Association of beta-arrestin and TRAF6 negatively regulates Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol.* 2006 Feb;7(2):139-47.

Weary M, Baker B. Utilization of the limulus amebocyte lysate test for pyrogen testing large volume parenterals, administration sets, and medical devices. Bull Parenter Drug Assoc. 1977 May-Jun;31(3):127-33.

Whitsett JA, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. Nat Immunol. 2015 Jan;16(1):27-35.

WHO. The top 10 causes of death. 2020

Witherow DS, Garrison TR, Miller WE, Lefkowitz RJ. beta-Arrestin inhibits NF-kappaB activity by means of its interaction with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 8;101(23):8603-7.

Wright JR, Wager RE, Hawgood S, Dobbs L, Clements JA. Surfactant apoprotein Mr = 26,000-36,000 enhances uptake of liposomes by type II cells. J Biol Chem. 1987 Feb 25;262(6):2888-94.

Wright JR. Host defense functions of pulmonary surfactant. Biol Neonate. 2004;85(4):326-32.

Yamada C, Sano H, Shimizu T, Mitsuzawa H, Nishitani C, Himi T, Kuroki Y. Surfactant protein A directly interacts with TLR4 and MD-2 and regulates inflammatory cellular response. Importance of supratrimeric oligomerization. J Biol Chem. 2006 Aug 4;281(31):21771-21780.

Yang CH, Szeliga J, Jordan J, Faske S, Sever-Chroneos Z, Dorsett B, Christian RE, Settlage RE, Shabanowitz J, Hunt DF, Whitsett JA, Chroneos ZC. Identification of the surfactant protein A receptor 210 as the unconventional myosin 18A. J Biol Chem. 2005 Oct 14;280(41):34447-57.

Yang X, Yan J, Feng J. Surfactant protein A is expressed in the central nervous system of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis, and suppresses inflammation in human astrocytes and microglia. Mol Med Rep. 2017 Jun;15(6):3555-3565.

Zanoni I, Ostuni R, Marek LR, Barresi S, Barbalat R, Barton GM, Granucci F, Kagan JC. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. Cell. 2011 Nov 11;147(4):868-80.

Zhang L, Meng Q, Yepuri N, Wang G, Xi X, Cooney RN. Surfactant Proteins-A and -D Attenuate LPS-Induced Apoptosis in Primary Intestinal Epithelial Cells (IECs). Shock. 2018 Jan;49(1):90-98.

Zhang M, Liu X, Zhang Y, Zhao J. Loss of betaarrestin1 and betaarrestin2 contributes to pulmonary hypoplasia and neonatal lethality in mice. Dev Biol. 2010 Mar 15;339(2):407-17.

## Danksagungen

Zuerst möchte ich Frau Prof. Dr. Cordula Stamme für die Möglichkeit danken, diese Arbeit in ihrer Forschungsgruppe und unter ihrer Obhut durchzuführen, für ihr Interesse und Engagement rund um dieses Thema im Besonderen und für die wissenschaftliche Arbeit im Allgemeinen, sowie die Ermutigung, über die Jahre nicht aufzugeben und dieser Arbeit treu zu bleiben. Ich danke ihr für ihre Unterstützung und die sehr gute Betreuung während dieser Zeit, für den Freiraum, den sie mir bei der Durchführung meiner Arbeit gewährte, sowie für die Gewissheit, jederzeit ein offenes Ohr für mich zu haben.

Besonderer Dank gilt Dominika Biedziak, die mich nicht nur fachlich stets wunderbar im Labor unterstützte, sondern auch menschlich immer für ein gutes Arbeitsklima und Spaß bei der Arbeit sorgte. Ich danke ihr für die vielen Versuche, die sie in meiner Abwesenheit für mich durchgeführt hat und die große Geduld, wenn mal etwas nicht geklappt hat, wie es sollte.

Mein Dank geht auch an Carina Greve, die mich vor Dominika Biedziak im Labor eingewiesen und unterstützt hat. Ich möchte auch Dr. Alexandra Lange danken, die als ehemalige Doktorandin den Kontakt zu Frau Prof. Dr. Cordula Stamme hergestellt hat.

Ich danke meinen ehemaligen und aktuellen Arbeitgebern, dass ich die Möglichkeit hatte, neben dem Beruf diese Arbeit anzufertigen. Namentlich erwähnt seien Dr. Ralf Staiger und Dr. Claudia Bierwolf, die mir den wichtigen letzten Ruck gegeben haben, trotz der stressigen Zeit während der Covid-19-Pandemie diese Arbeit fertigzustellen.

Ich danke meinem langjährigen Partner und mittlerweile Ehemann Marc Stelzner, der mich stets unterstützt und nie unter Druck gesetzt hat.

Vor allem danke ich meinen Eltern, die mir das Medizinstudium erst ermöglicht haben. Ich danke ihnen für ihre Unterstützung, ihren Zuspruch und ihr stets offenes Ohr.

## Publikationsliste

**Freundt K**, Herzmann C, Biedziak D, Scheffzük C, Gaede KI, Stamme C. **Surfactant Protein A Enhances the Degradation of LPS-Induced TLR4 in Primary Alveolar Macrophages Involving Rab7,  $\beta$ -arrestin2, and mTORC1.** Infect Immun. 2022 Feb 17;90(2):e0025021.

Moulakakis C, Steinhäuser C, Biedziak D, **Freundt K**, Reiling N, Stamme C. **Surfactant Protein A Enhances Constitutive Immune Functions of Clathrin Heavy Chain and Clathrin Adaptor Protein 2.** Am J Respir Cell Mol Biol. 2016 Jul;55(1):92-104.

Stelzner M, Lau F, **Freundt, K**, Florian B, Nguyen ML, Stamme C, Ebers, S. **Precise Detection and Treatment of Human Diseases Based on Nano Networking.** in 11th International Conference on Body Area Networks (BODYNETS 2016), pp. 58-64, EAI, Turin, Italy, December, 2016