

Aus der  
Klinischen und Experimentellen Pathologie  
am Forschungszentrum Borstel  
Prof. Dr. Dr. E. Vollmer

---

Transkriptionelle Aktivität  
der Surfactant-Apoproteine A1 und A2  
in nicht kleinzelligen  
Bronchialkarzinomen  
und tumorfreien Lungengeweben

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der medizinischen Fakultät -

vorgelegt von  
Michaela Stoffers  
aus Bad Segeberg

Lübeck  
2004

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. Dr. med. vet. Ekkehard. Vollmer

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. Klaus Dalhoff

Tag der mündlichen Prüfung:

14.03.2005

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den

14.03.2005

gez. Prof. Dr. med. Peter Dominiak  
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

# Abstract

## **Transcriptional activity of surfactant-apoproteins A1 and A2 in cases of non-small-cell lung cancer and associated tumor-free lung tissues.**

Michaela Stoffers, Division of Clinical and Experimental Pathology, Research Center Borstel

**Objektive:** To investigate the balance of surfactant-apoprotein A1 and A2 (SP-A1 & SP-A2) at transcriptional level in tumor and tumor-free lung-tissues of patients with non-small-cell lung cancer.

**Design:** Laboratory study

**Material:** Nonfixed snap-frozen tumor and tumor-free sections of lungs, excised from 29 patients with adenocarcinomas of the lung and 11 patients with squamous cell carcinomas (control group).

**Method:** RT-PCR using a SP-A1/SP-A2 consensus sequence, followed by enzymatic restriction. As significance-test Wilcoxon-matched-pair-test was used.

**Main outcome measures:** The expression of SP-A1- and SP-A2- mRNA in examined tissues, normalisation of these results and calculation of the ratio SP-A1/SP-A2 as measurement which was employed afterwards. Only

---

probes which showed equal results in both restrictions are chosen to scrutinize the significance of the results.

**Results:** There was a significant difference ( $p = 0,05$ ) in expression of SP-A1/SP-A2-mRNA in intra-individual tumor and tumor-free lung-tissues of adenocarcinoma patients. Additionally the standard deviation from the median rises in higher grades of tumor dedifferentiation. In cases of squamous cell carcinomas this was not observed.

**Conclusions:** A novel method to investigate the transcriptional activity of surfactant-apoproteins A1 and A2 in frozen lung tissues was established. It was shown, that the relation of SP-A1 to SP-A2-mRNA is significantly influenced in cases of adenocarcinomas of the lung and that the variation of SP-A-mRNA expression rises in cases of higher tumor-grading. Furthermore, this method will be applied in forthcoming studies to investigate the expression of surfactant-proteins in biopsies of interstitial lung diseases. Here, the influence of glucocorticoids is of special interest, since these are known to modulate surfactant protein-synthesis in lung.

# Inhaltsangabe

## Transkriptionelle Aktivität der Surfactant-Apoproteine A1 und A2 in nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen und tumorfreien Lungengeweben

Michaela Stoffers, Institut für Pathologie des Forschungszentrum Borstel

**Zielsetzung:** Die Untersuchung des transkriptionellen Verhältnis der Surfactant-Apoproteine A1 und A2 (SP-A1 & SP-A2) im Tumor und in tumorfreien Geweben von Patienten mit nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen.

**Studienart:** experimentelle Laborarbeit

**Material:** Schockgefrorene Proben unfixierter Lungenresektionspräparate von 29 Patienten mit Adenokarzinomen der Lunge und 11 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen (Kontrollgruppe).

**Methode:** RT-PCR unter Verwendung eines SP-A1/SP-A2 Konsensusfragmentes gefolgt von enzymatischen Restriktionsanalysen. Als Signifikanz-Test wurde der Wilcoxon-matched-pair-test angewendet.

**Meßwerte:** Die Expression von SP-A1- und SP-A2- mRNA in den untersuchten Geweben, Normalisation dieser Werte und Berechnung der Ratio SP-A1/SP-A2 als endgültig bewertetes Ergebnis. Nur Proben die gleichsin-

---

nige Ergebnisse in beiden Restriktionen zeigten wurden zur Bestimmung des Signifikanzgrades herangezogen.

**Ergebnis:** Es wurde ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,05$ ) der Expression von SP-A1/SP-A2 in den intraindividuellen tumorhaltigen und tumorfreien Geweben der untersuchten Adenokarzinome gezeigt. Die Standardabweichung der Ratio SP-A1/SP-A2 vom Median aller Werte der Gruppe steigert sich im Tumor und im tumorfreien Gewebe mit zunehmendem Entdifferenzierungsgrad der Adenokarzinome. Plattenepithelkarzinome zeigten dieses nicht.

**Zusammenfassung:** Eine neuartige Methode zur Erforschung der transkriptionellen Aktivität der Surfactant-Apoproteine A1 und A2 wurde etabliert. Es wurde gezeigt, dass die Relation von SP-A1-mRNA zur SP-A2-mRNA im Falle der Adenokarzinome der Lunge signifikant beeinflusst ist, und dass die Variation der SP-A-mRNA Expression mit höherer Entdifferenzierung zunimmt. Diese Methodik soll in weiteren Studien genutzt werden, um die Surfactant Expression an Gewebebiopsien von interstitiellen Lungenerkrankungen zu untersuchen. Hier ist insbesondere der Einfluss von Glukokortikoiden von Interesse, da diese bekanntermaßen regulatorisch auf die Surfactantprotein Expression wirken.

# Inhaltsverzeichnis mit Glossar

<b>Abstract</b>	<b>I</b>
<b>Inhaltsangabe</b>	<b>III</b>
<b>Glossar</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Surfactant-Apoprotein A . . . . .	1
1.2 Nicht kleinzellige Bronchialkarzinome . . . . .	6
1.3 Fragestellung . . . . .	8
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>10</b>
2.1 Gewebeproben . . . . .	10
2.2 RNA-Isolation . . . . .	11
2.3 Densitometrie . . . . .	12
2.4 cDNA-Synthese . . . . .	12
2.5 RT-Polymerasekettenreaktion . . . . .	13
2.5.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion . . . . .	13
2.5.2 Primer Design . . . . .	14
2.5.3 Vorversuche zur Optimierung der RT-PCR . . . . .	15
2.5.4 RT-PCR auf SP-A 310 bp . . . . .	16
2.6 Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	17
2.7 Restriktion . . . . .	18

2.7.1	Prinzip der Restriktion . . . . .	18
2.7.2	Restriktion der SP-A 310 bp RT-PCR-Produkte . . . . .	19
2.8	Auswertung . . . . .	21
2.8.1	Auswertungsprogramm Band Leader . . . . .	21
2.8.2	Auswertung Agarosegelelektrophoresebilder . . . . .	21
2.8.3	Datenauswertung in Microsoft®-Excel . . . . .	22
2.9	Statistische Auswertung . . . . .	25
2.9.1	Statistische Merkmale . . . . .	25
2.9.2	Signifikanzprüfung . . . . .	26
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>28</b>
3.1	Adenokarzinome . . . . .	28
3.2	Plattenepithelkarzinome . . . . .	29
3.3	Statistische Merkmale . . . . .	30
3.4	Signifikanzprüfung . . . . .	36
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>37</b>
4.1	Methode im Vergleich . . . . .	37
4.2	Regulation der Surfactant-Apoproteine . . . . .	39
4.3	Surfactantproteine in pulmonalen Tumoren . . . . .	42
4.4	Vergleich der erhobenen Ergebnisse mit Literaturangaben . . . . .	44
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>49</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>51</b>
	<b>Anhang</b>	<b>64</b>
<b>A</b>	<b>Material</b>	<b>64</b>
A.1	Materialliste Reagenzien . . . . .	64
A.2	Puffer und Lösungen . . . . .	65
A.3	Geräte . . . . .	67



A.4 Software . . . . .	67
<b>B Sequenzen</b>	<b>68</b>
B.1 RT-PCR Produkt Sequenz . . . . .	68
B.2 Restriktionsbande 310 bp . . . . .	71
<b>C Abbildungen der</b>	
<b>Agarosegelelektrophoresegele</b>	<b>74</b>
<b>D Abbildungen</b>	
<b>der Band Leader-Profile</b>	<b>76</b>
<b>Danksagung</b>	<b>78</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>79</b>
<b>Publikation</b>	<b>80</b>

# Abkürzungen & Erläuterungen

3'-UTR	3'- untranslated region
A	Adenin
AAH	atypische adenomatöse Hyperplasie
Apoprotein	Eiweißanteil zusammengesetzter Proteine
ARDS	Akute respiratorische Insuffizienz (adult respiratory distress syndrome)
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
DEPC-Wasser	mit Diäthylpyrokarbonat (diethyl pyrocarbonate) behandeltes Wasser = RNase freies Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Enzym zum selektiven Verdau von DNA
DTT	Dithiothreitol = chemische Substanz zur Reduktion von Disulfidbrücken

EDTA	Etylendiamintetraacetat
G	Guanin
IL	Interleukin
Ki67	proliferationsassoziiertes Kernantigen
LPS	Lipopolysaccharid
mRNA	messenger RNA
nANS	neonatales Atemnotsyndrom
NCI-H441-Zellen	humane pulmonale Adenokarzinomzelllinie (Zellkultur)
Northern-Blot	Nachweismethode für RNA, mittels markierter komplementärer RNA-Sonde
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PCR-Cycler	programmierbare PCR-Maschine
PCR-Tube	spezielles Eppendorfreaktionsgefäß mit 0,5 ml Volumen zum Einsatz in PCR-Maschinen
PE-10	immunhistochemisch verwendeter monoklonaler Antikörper zum Nachweis von SP-A
Primer	Startermolekül für PCR
PSAP	Pulmonary surfactant apoprotein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	RNA spaltendes Enzym
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

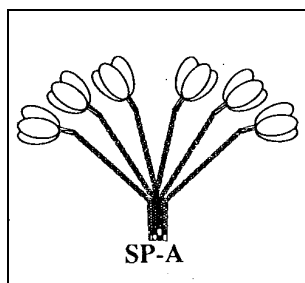
SFTPA1	Homo sapiens surfactant, pulmonary-associated protein A1
SFTPA2	Homo sapiens surfactant, pulmonary-associated protein A2
SP-A	Surfactant-Apoprotein A
SP-B	Surfactant-Apoprotein B
SP-C	Surfactant-Apoprotein C
SP-D	Surfactant-Apoprotein D
Surfactant	Surface active agents
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i> (thermophiles Bakterium)
Template	DNA-Matrix (Kopiervorlage für PCR)
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor Alpha
Western-Blot	Nachweismethode für Proteine mittels spezifischer Antikörperreaktion
$\lambda$ -DNA	prokaryontische DNA
<i>Nhe</i> I	Restriktionsenzym von <i>Neisseria mucosa heidelbergensis</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Surfactant-Apoprotein A

Die menschliche Lunge hat eine etwa 50-100 m<sup>2</sup> große Oberfläche für den Gasaustausch (Aufnahme von Sauerstoff und Abgabe von Kohlendioxid). Diese Oberfläche verteilt sich auf ca. 300 Millionen Lungenbläschen (Alveolen), die nahezu kugelförmig sind. An der Grenzfläche Luft/Lungengewebe findet der Gasaustausch statt [83]. Die Oberflächenspannung dieser Grenzfläche bestimmt im Wesentlichen den atemmechanischen Widerstand der Lunge [70]. An dieser Grenzfläche befindet sich eine Substanz, welche die Oberflächenspannung des Flüssigkeitsfilms in den Lungenbläschen deutlich herabsetzt, und damit vor allem einem Kollaps der Alveolen in der Expiration entgegen wirkt [73]. Diese komplexe Substanz nennt man Surface active agents (kurz: Surfactant), welche von Typ II Alveolarzellen gebildet und sezerniert wird [7]. Surfactant ist für einen schnellen und permanenten Austausch von oberflächenaktiven Molekülen an der Luft/Flüssigkeits -Grenzfläche verantwortlich. Es handelt sich um ein amphiphiles Gemisch aus Proteinen (etwa 10%), Phospholipiden (etwa 90 %, überwiegend Lecitin = Dipalmitol-Phosphatidylglycerol) und einem geringen Anteil an Kohlenhydraten und Ionen [45]. Die Proteine unterteilt man in 4 spezifische Surfactant-Apoproteine (SP-A, SP-B, SP-C und SP-D). SP-A (siehe Abb. 1) ist ein wasserlösliches Protein des Surfactant, welches mengenmäßig den Hauptanteil der Surfactantproteine stellt. Das Glykoprotein hat im Nativzustand ein Molekulargewicht von ca. 650 kDa. Es besteht aus 18 Monomeren mit einem Molekular-

gewicht von je 28-36 kDa. SP-B (8 kDa) und SP-C (4 kDa) sind hydrophob. SP-D (520 kDa) ist ein Glykoprotein mit Sequenz- und Strukturähnlichkeiten zu SP-A [46].



**Abb. 1:** Surfactant Apoprotein A aus [39]

SP-A wird der Gruppe der Collectine zugeordnet [39]. Diese Gruppe von löslichen Proteinen enthält Kollagenregionen und Lecitindomänen. Collectine sind im allgemeinen in nicht Antigen-spezifische Immunreaktionen involviert und binden an Kohlenhydrat- oder Lipidstrukturen. Zum Beispiel können sie als Opsonine diverse Bakterien und Viren binden [33, 39]. Eine weitere Funktion des Surfactants ist die lokale Infektabwehr durch SP-A und SP-D, welche eine Aktivierung von Phagozyten und eine erleichterte mukoziliäre Aktivität vermitteln [33, 58]. Dies gewinnt besondere Bedeutung bei der intrapulmonalen Abwehr von pathogenen Mikroorganismen [1, 33, 39]. Verschiedene Forschungsgruppen konnten bisher einen immunmodulatorischen Einfluß des Surfactant Protein A nachweisen [6, 13, 34]. In *in vitro* Studien zur Untersuchung des inflammatorischen Effektes ( $\text{TNF}\alpha$ -,  $\text{IL-1}\beta$ - und  $\text{IL-6}$  Expression) durch LPS unter Anwesenheit von Surfactant Protein A zeigte sich eine Reduktion der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen durch pulmonale Makrophagen und einer verminderten Kohlenmonoxidsynthese [6]. Ein proliferationshemmender Effekt auf humane T-Lymphozyten und eine Reduktion der  $\text{IL-2}$ -Produktion durch SP-A wurde nachgewiesen [13]. Modulationseffekte des Surfactantprotein A auf die inflammatorische Induktion durch  $\text{TNF-}\alpha$  sind bekannt [34]. Umgekehrt beeinflussen Zytoki-

ne die Zelldifferenzierung und Surfactantexpression in gesunden Geweben und Tumoren der Lunge [5, 63]. Insgesamt wird diese immunmodulatorische Funktion als ein Schutz der Lunge vor einer chronischen Aktivierung der Abwehrzellen durch inhalative Antigene angesehen. Einer progressiven Zerstörung des Lungengewebes und damit einer Respirationsstörung wird dadurch vorgebeugt. Im Rattenmodell kann man eine Expression von SP-A auch im Dünn- und Dickdarm via RT-PCR und Western-Blot beobachten [82]. Die Funktion im Gastrointestinaltrakt ist noch nicht geklärt, jedoch wird eine ähnliche immunologische Funktion analog des SP-A im pulmonalen Gewebe angenommen [82] .

Der Mensch und die ihm verwandten Primaten haben im Gegensatz zu anderen Spezies zwei unterschiedliche Genloci für die Kodierung des Surfactantproteins A, die sich auf dem Chromosom 10 (10q22-q23) befinden [21, 23, 36, 49, 61]. Die Identifikation der für das Surfactant kodierenden Gene gelang erstmals 1985 [94]. Versuchstiere wie Mäuse, Ratten oder Schweine besitzen nur einen Genlocus für die Kodierung des Surfactantproteins A, und sind daher als Modell für die Untersuchung der transkriptionellen Aktivität der Surfactantproteine in der humanen Lunge nicht geeignet. Die ausführliche Nukleotidsequenz des humanen Surfactant-Apoprotein-A1 und Surfactant-Apoprotein-A2 Genes ist publiziert in [49]. Diese Gene nennt man SP-A1 und SP-A2. Die zwei funktionellen Gene SP-A1 und SP-A2 sowie ein weiteres Pseudogen unterliegen diversen transkriptionellen Variationen [23, 22, 48, 47, 61]. Sequenzanalysen der kodierenden Gene für SP-A1 und SP-A2 sowie von cDNA (complementary DNA) für SP-A1 und SP-A2 zeigen im Vergleich miteinander 4 verschiedene Klassen von Transkripten des SP-A2-Genes und 5 verschiedene Klassen von Transkripten des SP-A1-Genes [47] (siehe Abb.2). Der Hauptunterschied zwischen SP-A2 und SP-A1 mRNA Transkripten ist, dass SP-A2 Transkripte Sequenzen aus 6 Exons enthalten. Ein Exon in SP-A2 (Exon II von VI) kodiert außerdem eine 5'-untranslated Sequenz und ist zwischen dem Exon I und dem Exon II des SP-A1- Genes lokalisiert [49]. Im Gegensatz dazu enthält die Mehrzahl der Transkripte

des SP-A1-Genes Sequenzen aus 5 Exons. Eine kleiner Anteil der mRNA Transkripte sowohl von SP-A1 als auch SP-A2 enthält Sequenzen von wechselnden Exons [47]. Die Proteine die durch die beiden unterschiedlichen Gene für SP-A1 und SP-A2 kodiert werden differieren in 8 Aminosäuren [49, 94].

Nucleotide differences in the human SP-A alleles*																							
Amino Acid	4	9	19	45	50	54	62	66	71	73	81	85	91	94	114	133	202	203	216	219	223		
SP-A1																							
6A (16)	C	A	C	G	C	<u>CT</u>	G	TG	A	G	A	T	C	G	T	G	C	G	C	C	C	C	
6A <sup>0</sup> (13)	C	A	T	C	C	TG	A	TG	A	G	A	T	C	G	T	A	C	C	C	C	C	C	
6A <sup>1</sup> (17)	T	A	T	G	G	<u>CT</u>	A	TG	A	G	A	T	C	G	T	A	C	C	C	C	C	C	
6A <sup>2</sup>	C	A	T	G	G	<u>CT</u>	A	TG	A	G	A	T	C	G	T	A	C	C	C	C	C	C	
6A <sup>3</sup>	C	A	T	G	C	<u>CT</u>	A	TG	A	G	A	T	C	G	T	A	C	C	C	C	C	C	
6A <sup>4</sup>	C	A	T	G	C	<u>CT</u>	G	TG	A	G	A	T	C	G	T	A	C	C	C	C	T	C	
SP-A2																							
1A (16)	C	C	C	G	G	<u>CT</u>	G	CA	G	A	G	C	C	A	C	A	T	G	T	C	C		
1A <sup>0</sup> (14) <sup>†</sup>	C	A	C	G	G	<u>CT</u>	G	CA	G	A	G	C	C	A	C	A	T	G	T	C	C		
1A <sup>1</sup>	C	C	C	G	G	<u>CT</u>	G	CA	G	A	G	C	C	A	C	A	T	G	T	C	C		
1A <sup>2</sup>	C	C	C	G	G	<u>CT</u>	G	CA	G	A	G	C	C	A	C	A	T	G	T	C	C		

\* The alternative codons for each amino acid position are shown at the top of the table. The changing nucleotide(s) is underlined. The position of the amino acids in the protein sequence is shown (amino acid 1 is the initiator methionine). The alleles for SP-A1 and SP-A2 are shown. The nucleotide present at a given position is shown in the body of the table.  
<sup>†</sup> Allele 1A<sup>0</sup> was also identified in the present study.

Abb. 2: Humane SP-A-Allele aus [49]

Die Transkription der SP-A1 mRNA beginnt überwiegend 5 Basenpaare (bp) stromabwärts des Transkriptionsbeginns von SP-A2. Der SP-A-Genort befindet sich in der Nähe der Centromerregion des Chromosom 10 in folgender Anordnung: Centromer - SP-D - SP-A2 - Pseudogen - SP-A1 - Telomer [36]. Aus Sequenzanalysen und dem Vergleich der Gensequenzen mit den Pavian-Surfactantgenloci [25, 56] ergibt sich die Hypothese, dass die Duplikation des SP-A-Gen [22, 49] entwicklungsgeschichtlich vor über 26,5 Millionen Jahren erfolgte [25, 36]. Die Regulation der SP-A1 und SP-A2 Gene während der Fetalentwicklung und bei Zugabe von Adenosin-3'5'-zyklischem Monophosphat sowie Glucokortikoiden in menschlichen adulten und fetalen Lungenzellkulturen, zeigten eine Abhängigkeit der SP-A Expression und der SP-A1/SP-A2-Ratio von cAMP und Dexamethason [62]. Diese Publikationen weisen darauf hin, das die Regulation der Transkription der Gene, die für die humanen Surfactant Proteine codieren, noch in vieler Hinsicht unklar ist.



Es wurden für einige Erkrankungen der Lunge bereits veränderte Expressionsverhältnisse von humanen Surfactant Proteinen beschrieben. In der Neonatologie verursacht der absolute Mangel an Surfactant in unreifen Lungen von Frühgeborenen ein Atemnotsyndrom (nANS), welches mit einer zunehmenden Fibrosierung der Lunge einher geht [8, 24]. Bei Erkrankungen der adulten Lunge zeigen sich bei idiopathischen Fibrosen sowie beim chronischen Emphysem der Lunge deutlich reduzierte Konzentrationen von SP-A im Vergleich zu gesunden Probanden [35, 59, 60, 28]. Im Gegensatz dazu finden sich bei Sarkoidosepatienten erhöhte SP-A-Level in bronchialen Lavagen [32, 28]. Dies wird als Zeichen der Aktivierung endogener inflammatorischer Mediatoren interpretiert. Eine Veränderung der Proteinanteile des Surfactants ist bei Patienten mit Asthma beobachtbar [16]. In Studien zur Todesursachen-abhängigen Expression von SP-A im Lungengewebe von forensisch untersuchten Toten zeigt sich eine gesteigerte Expression bei Todesursachen mit respiratorischem Stress wie Rauchgasinhalation, Aspiration und Ertrinken, aber auch bei respiratorischem Versagen infolge Metamphetaminintox [42, 96]. Gleichzeitig findet sich beim ARDS eine Veränderung der Aggregationsform der Surfactantbestandteile [29, 55, 92], die ebenso für eine reduzierte Wirkung des sezernierten Surfactants verantwortlich sein könnten wie veränderte Proteinanteile im Surfactant [20, 44, 55]. Für das SP-B Gen sind Allele bekannt, welche gehäuft bei ARDS-Patienten nachgewiesen wurden [57].

Die Untersuchung des Gleichgewichts der transkriptionellen Aktivität der Gene auf dem mRNA Level, im Lungengewebe und in Tumorgeweben von nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

## 1.2 Nicht kleinzellige Bronchialkarzinome

Tumoren entstehen aus genetisch entarteten Zellen normaler Gewebe. Die Ursachen für diese Entartungen können sowohl chemischer als auch physikalischer oder biologischer Natur sein. Das Prinzip sind Mutationen innerhalb von Genen, welche die normale Physiologie der Zellen beeinflussen. Durch Mutation kann den Zellen die Kontrolle über die Zellteilung, das Wachstum oder den kontrollierten Zelltod (Apoptose) verloren gehen. Viele solcher Gene wurden bereits typisiert und dienen als molekulare Marker der Kanzerogenese [12, 69]. Normale Zellen hören auf zu wachsen sobald sie Kontakt zu anderen Zellen bekommen. Sie heften sich anderen Zellen an und bilden geordnete Gewebeverbände. Tumorzellen fehlt diese Selbstregulation durch Interaktion mit anderen Zellen. Daher wachsen Tumoren verdrängend oder infiltrierend und oft ohne eindeutige Gewebemuster [79]. Die Klassifizierung der Tumoren richtet sich nach dem Ursprungsgewebe der entarteten Zellen. Die Bronchialkarzinome gehören zu den häufigsten Karzinomen sowohl bei Männern als auch bei Frauen [91]. Eine Hauptursache wird im Rauchen [2, 4] (polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe [90]) und in inhalierten Stäuben von Silikaten, Asbest, Chrom oder Nickel [51] gesehen. Ein zusätzlicher Faktor sind verschiedene Varianten einzelner Gene, die in der Endtoxifizierung der Noxen [4], der Zellzyklusregulation oder der immunologischen Identität [69] eine Rolle spielen. Eine Untersuchung an nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen und korrespondierenden gesunden Lungenarealen hat 92 Gensequenzen spezifiziert, in denen Tumoren von gesunden Geweben differieren [64]. Es kommt nach einer Noxenexposition meist zuerst zu einer chronischen Bronchitis und darunter zu einer malignen Entartung einer Stammzelle der Bronchialschleimhaut. Dabei ist der Übergang von der gesunden Zelle über die hyperplastische Zelle hin zur Tumorzelle fließend [68]. Daher macht man sich vor Allem die Expression physiologischer Surfactantproteine zunutze, um den Ursprung einer pulmonalen Tumorzelle zu identifizieren [11, 74]. Es lassen sich folgende histologische Tumortypen unterscheiden (nach: [79, 91]):

- 1. Plattenepithelkarzinome : ca. 25 - 40 % aller Bronchialkarzinome. Sie zeigen gegebenenfalls eine konzentrische Schichtung und zusammengelagerte Zellen die keratinisiert sind (Hornperlen). Das Ursprungsgebe ist das mehrschichtige unverhornte metaplastische Plattenepithel der Bronchien.
- 2. Adenokarzinome: ca. 25 - 40 % aller Bronchialkarzinome. Sie bestehen aus drüsenartigen Zellen, die ihren Ursprung aus Bronchialgewebsdrüsen den seromukösen Glandulae bronchiales nehmen sollen. Man findet verschiedene Wuchsformen: tubulär, papillär, azinös oder solide. Eine Sonderform des Adenokarzinoms, das bronchoalveoläre Karzinom, kleidet die Alveolen von innen mit einer Schicht Tumorzellen aus.
- 3. Kleinzellige Karzinome: ca. 20 -25 % aller Bronchialkarzinome. Die Charakteristik ist eine Zusammenballung von kleinen Tumorzellen mit hyperchromatischen Zellkernen (Nacktkerne). Das Ursprungsgebe ist das Neuroektoderm.
- 4. Großzellige Karzinome: ca. 10 - 15 % aller Bronchialkarzinome. Diese Tumoren bestehen aus undifferenzierten, zytoplasmareichen großen Zellen mit Nukleolen.

Eine SP-A Expression in pulmonalen Tumoren wurde bisher fast ausschließlich an Adenokarzinomen bzw. Adenokarzinomzelllinien beobachtet, während andere Tumortypen (Plattenepithelkarzinome, kleinzellige Bronchialkarzinome, u.a.) keine Expression von SP-A zeigten [14, 54]. Methodisch wurde hier im ersten Fall eine *in-situ* Hybridisierung an Tumor und tumorfreien Geweben durchgeführt. Im zweiten Fall eine RT-PCR als Detektionsmethode für metastasierte Adenokarzinome der Lunge verwendet. Die beobachtbare Expression von Surfactant-Protein A in Plattenepithelkarzinomen wird als Expression eingeschlossener normaler Pneumozyten Typ II angesehen [10], da Plattenepithelkarzinomzellen typischer Weise negativ für SP-A in immu-

histochemischen Untersuchungen sind [10, 17, 71] und auch in einer Untersuchung via *in-situ* Hybridisierung Plattenepithelkarzinome negativ für SP-A waren [14]. Die Fälle der Plattenepithelkarzinome dienen in dieser Untersuchung daher vor allem als Kontrollgruppe, im Hinblick auf die Unterscheidung von Einflüssen durch parakrin wirkende tumortypische Zytokine (z.B.  $\text{TNF}\alpha$  [5]) und dem Einfluß der Mutationen selbst.

Ein weiterer Aspekt sind mögliche biologische mutagene Einflüsse auf die Stammzellen des pulmonalen Gewebes. Hier konnte im Tierexperiment ein Retrovirus indentifiziert werden, welches in das Surfactantprotein-A Gen integriert wird und nachweislich zur Induktion eines Adenokarzinoms der Lunge führt [19, 75]. Strukturbestandteile dieses Retrovirus konnten auch in humanen Adenokarzinomen der Lunge identifiziert werden, wobei deren Bedeutung in Bezug auf die Tumorgenese noch unbekannt ist [75].

Die in dieser Untersuchung verwendeten Gewebe stammen von Adenokarzinomen, Plattenepithelkarzinomen und den assoziierten gesunden Lungenanteilen. Sie gehören in die Gruppe der nicht kleinzelligen Bronchialkarzinome, welche die Untergruppen 1., 2., und 4. zusammenfasst.

## 1.3 Fragestellung

Die vielfältigen Mechanismen, die zu einer Tumorentstehung führen, sind Gegenstand intensiver Forschungen. Die Zielsetzung dieser Arbeit ist die Untersuchung der transkriptionellen Aktivität der Surfactant-Apoproteine A1 und A2 in Tumoren des Lungengewebes im Vergleich zu nicht tumorbefallenen Arealen desselben Organs. Surfactant ist als das physiologische Produkt der Pneumozyten Typ II vielen Regulationsmechanismen unterlegen [5, 26, 37, 53, 62] und gilt als Markerprotein für Erkrankungen der Lunge [32, 44, 46, 54, 58, 60, 28]. Es gibt aus der Immunhistologie und *in-situ* Hybridisierung einige Hinweise darauf, dass dieses Markerprotein auch bei

Tumorerkrankungen der Lunge, und hier vor allem bei Adenokarzinomen, verändert exprimiert wird [12, 14]. Eine Studie zur Expression von SP-A in frischem pulmonalem Gewebe zeigte keine Korrelation zwischen der absoluten exprimierten SP-A-mRNA Menge und dem Verhältnis der SP-A1/SP-A2-mRNAs zueinander [48]. Eine Aussage über die transkriptionelle Aktivität kann aus einer Messung der absoluten Menge sezernierten Proteins also nicht gefolgert werden. Diese Arbeit dient der Untersuchung der Frage, ob die Kanzerogenese pulmonaler Tumoren einen Einfluß auf die transkriptionelle Aktivität des Surfactant-Apoproteins A1 und A2 hat. Dies ist von besonderer Bedeutung vor dem Hintergrund, dass die physiologische Bedeutung der Existenz zweier Surfactant-Apoproteingene mit diversen Splicingvarianten noch nicht geklärt ist [22, 48, 61]. Für zukünftige Untersuchungen soll die Methode an qualitativ und quantitativ gut zugänglichem Gewebematerial von Pneumonektomien etabliert werden, um sie später an den spärlichen Gewebemengen pulmonaler Routinebiopsien bei interstitiellen Lungenerkrankungen anzuwenden. Hier gibt es Hinweise auf eine Beeinflussung der Surfactant-Apoprotein Expression durch therapeutisch eingesetzte Glukokortikoide [35, 37, 53].

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Gewebeproben

Das verwendete Material stammt aus dem Untersuchungsgut des Institutes für Pathologie des Forschungszentrum Borstel. Die Thoraxchirurgische Abteilung des Krankenhauses Großhansdorf sendet das operative Präparat unfixiert, auf Eis gekühlt der Pathologie schnellstmöglich nach Entnahme zu. Nach dem sofortigen Zuschnitt der Gewebe für die weiteren Routineuntersuchungen erfolgt eine separate Gewinnung von Proben des Tumoreals und eines gesunden Lungenabschnittes. Die Proben werden zuerst in ein Eppendorfreaktionsgefäß eingebracht, mit der histologischen Nummer des Areals versehen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach der histologischen Untersuchung durch einen Facharzt für Pathologie erfolgt die Einordnung der Proben in einer der untersuchten Gruppen (Adenokarzinom oder Plattenepithelkarzinom) nach dem jeweiligen schriftlichen Befund. Es werden ausschließlich Proben verwendet, welche eine eindeutige histogenetische Zuordnung zu einem Tumortypus aufwiesen. Gewebe mit unklarer Differenzierung, Misch- bzw. Kombinationstumoren sowie Gewebe von groß- oder kleinzelligen Tumoren werden nicht verwendet. Die Proben der Adenokarzinome stammen von 29 Patienten, wovon 17 männlich und 12 weiblich sind, im Alter von 48 bis 77 (im Mittel 62) Jahre. Die Gewebe der Plattenepithelkarzinome stammen von 11 Patienten, wovon 10 männlich und 1 weiblich sind. Das Alter dieser Gruppe liegt zwischen 51 und 73 (im Mittel 63) Jahren.

Die Herstellerangaben der im Folgenden verwendeten Materialien und Geräte sind im Anhang A zusammengefasst aufgeführt.

## 2.2 RNA-Isolation

Zur Isolierung der RNA aus den Geweben wird das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Die Isolation erfolgt nach Herstelleranweisung [77]. Das RNeasy-Verfahren basiert auf selektiven Bindungseigenschaften von Silica-Gel-Membranen. Begonnen wird mit dem Ansatz von Lysisbuffer RLT (1 ml) +  $\beta$ -Mercaptoethanol (10  $\mu$ l), wovon je 600  $\mu$ l je Eppendorfreaktionsgefäß im Eisbad vorgelegt werden. Die Gewebeproben sind auf flüssigem Stickstoff zwischen gelagert. Mittels einer Analysenwaage wiegt man zügig je 50 mg des Gewebes ab und gibt es sofort in das Eppendorfreaktionsgefäß im Eisbad. Das exakte Auswiegen des Gewebes vermeidet die Überladung der Membran und optimiert gleichzeitig die Ausbeute an RNA. Danach wird das Gewebe in dem Eppendorfreaktionsgefäß mit einem Palletmixer (Janke & Kunkel) homogenisiert. Es erfolgt ein Zentrifugations-Schritt von 3 Minuten bei 21000 g. Der Überstand wird in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt, mit 600  $\mu$ l 70 % Ethanol versetzt und durch Umschwenken gemischt. Von dieser Menge werden 700  $\mu$ l auf eine Qiagensäule gegeben, dann 1 Minute bei 8000 g zentrifugiert, und der Durchlauf verworfen. Es folgt ein Waschschrift mit 700  $\mu$ l RW1-Puffer und Zentrifugation für 1 Minute bei 8000 g. Der Durchlauf wird verworfen, die Säule auf ein neues Sammelgefäß (Collectiontube) gesetzt und mit 500  $\mu$ l RPE-Puffer gewaschen, bei 8000 g 1 Minute zentrifugiert und der Durchlauf abermals verworfen. Dieser Waschschrift wird mit einer Zentrifugation von 21000 g für 2 Minuten wiederholt. Die Säulen werden auf ein Eppendorfreaktionsgefäß gestellt und 30  $\mu$ l DEPC-Wasser direkt auf die Membran pipettiert, 1 Minute gewartet und abschließend 2 Minuten bei 21000 g zentrifugiert. Die durchgelaufene isolierte RNA wird bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.3 Densitometrie

Die Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der isolierten RNA erfolgt mit einem Photometer (Gene Quant pro) bei 260 nm für RNA und bei 280 nm für Proteine. Dazu wird die isolierte RNA 1:50 mit DEPC-Wasser verdünnt und in dem gegen DEPC-Wasser geeichtem Gerät gemessen. Die Densitometrie wird als Kontrolle für die Qualität der Isolierung durchgeführt. Eine optische Dichte von 0,2 entspricht dabei einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}$  RNA je  $\mu\text{l}$  RNA-Isolat.

## 2.4 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese (engl. complementary DNA) mittels reverser Transkriptase (retrovirale RNA-abhängige DNA-Polymerase, SuperscriptII von Gibco) produziert aus einzelsträngiger mRNA einen Doppelstrang, welcher der für die mRNA codierenden DNA komplementär ist. Der cDNA-Synthese wird eine Behandlung des RNA-Isolates mit einer DNase (DNase I Amplification Grade von Gibco) vorgeschaltet, um eventuelle Verunreinigungen durch DNA zu eliminieren. Dazu werden 8  $\mu\text{l}$  RNA im Eisbad aufgetaut und in ein Eppendorfreaktionsgefäß (PCR-Tube 0,5 ml) im Eisbad vorgelegt. Dann werden je 1  $\mu\text{l}$  DNase (1 U/ $\mu\text{l}$ ) und DNase 10-fach Puffer (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 20 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 500 mM KCl) zugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird mittels Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  25 mM EDTA und 10 minütiger Inkubation bei 65°C in einem PCR-Cycler (Biometra UNO Thermoblock, biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) die Reaktion abgestoppt. Zur Kondensation der Flüssigkeit wird das Gefäß kurz auf Eis gelagert und zentrifugiert. Anschließend erfolgt die eigentliche cDNA-Synthese durch die reverse Transkriptase. Um die mRNA in cDNA umzuwandeln wird 1  $\mu\text{l}$  Oligo-dT 15 (500  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) eingesetzt. Oligo-dT-15 bindet am Poly-A-Schwanz des



3'-Endes der mRNA. Nach Zugabe des Oligo-dT-15 wird mittels Vortex gemischt, und nachfolgend das PCR-Tube im PCR-Cycler für 10 Minuten bei 70°C und für 10 Minuten bei 25°C inkubiert. Währenddessen wird folgender Ansatz hergestellt :

Agens	Konzentration	eingesetzte Menge pro Probe
5-fach First Strandbuffer		4 $\mu$ l
DTT	1 mM	2 $\mu$ l
dNTP's	10 mM je dNTP	1 $\mu$ l
Gesamtmenge		7 $\mu$ l

Der 5-fach First Strandbuffer und DTT (Dithiothreitol) sind Reagenzien die zum SuperScript II -Kit (Gibco) gehören. Die 7  $\mu$ l Gesamtvolumen werden nach Ablauf der obrigen Inkubationszeit zugegeben. Es folgt eine Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend gibt man 1  $\mu$ l SuperScript II (Gibco) zu, mischt mit der Pipettenspitze gut auf und inkubiert erneut im PCR-Cycler 50 Minuten bei 42°C (reverse Transkription). Abschließend wird 15 Minuten bei 70°C inkubiert, um die reverse Transkriptase zu denaturieren. Die cDNA wird bei -20°C gelagert.

## 2.5 RT-Polymerasekettenreaktion

### 2.5.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction) wurde 1984 von Kary Mullis entwickelt, und stellt ein Verfahren zur selektiven Vermehrung (Amplifizierung) einer spezifischen DNA-Sequenz dar. Dazu wird wie folgt verfahren:

1. Denaturierung der DNA durch Erhitzung auf 90°C. Dabei wird die doppelsträngige DNA zu zwei Einzelsträngen aufgetrennt.
2. Abkühlung auf ca. 50°C und Hybridisierung (Annealing) zweier Primer (Oligonukleotide, die der Sequenz an den 5-Enden der einzelsträngigen Gensequenz komplementär sind) mit dem Einzelstrang.
3. Eine themostabile DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermophilus aquaticus* (Taq) bindet an den Primer und fügt zugesetzte Nucleotide an die Primersequenz an und amplifiziert so einen zu der Gensequenz komplementären Strang. Damit wird der Einzelstrang wieder doppelsträngig und der Genabschnitt selektiv vervielfältigt.
4. Diese Schritte werden mehrfach wiederholt, um eine exponentielle Vermehrung der Gensequenz zu erreichen. Zuvor schwer detektierbare DNA-Mengen werden so nachweisbar gemacht.

Bei Verwendung von cDNA als Template für die PCR nennt man diese reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR).

### 2.5.2 Primer Design

Die Primer für die nachfolgend beschriebene PCR werden von der Firma MWG Biotech GmbH bezogen. Zunächst wurde mittels eines BLAST-Search Programmes [3] unter [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) eine Gensequenz aus dem Human pulmonary surfactant apoprotein (PSAP gb n 30838) und dem surfactant-Apoproteinen A1 und A2 (SFTPA1 und SFTPA2) ausgewählt (siehe Anhang Sequenzen). Die Gensequenz wird nach einem Abschnitt im Bereich nahe des Poly-A-Schwanzes mit hohem Guanin- bzw. Cytosin-Gehalt (45-50% GC) untersucht, da die Wahl eines solchen Abschnittes günstige Bindungseigenschaften für die Primer ergibt. Die Primer weisen eine der

gewählten Gensequenz komplementäre Nukleotidsequenz auf. Folgende Primersequenzen werden ausgewählt:

Primer	Sequenz	Position im PSAP-Gen
SPAREFOR	5'-TCT TCA TCT GTG AAA TGG-G-3'	4268
SPAREREV	5'-AGG AAG ATG GGT TTG GAT-C-3'	4578

### 2.5.3 Vorversuche zur Optimierung der RT-PCR

Die verwendete PCR vermehrt ein Fragment von 310 Basenpaaren (bp). Dabei werden die beiden Transkripte für SP-A1 und SP-A2 amplifiziert. Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen dieser Untersuchung werden entsprechende Vorversuche durchgeführt. Darin werden die Parameter der Magnesiumchlorid-Menge und die Annealing-Temperatur variiert.

1. Magnesiumchlorid : 1,0  $\mu$ l; 1,5  $\mu$ l; 2,0  $\mu$ l
2. Annealing-Temperatur: 49,0°C; 50,0°C; 51,0°C

Als cDNA (Template) für diesen Versuch wird ein Gemisch aus 4 cDNA's verwendet. Diese Proben zeigen in den vorausgegangenen Elektrophoresegelele eindeutig positive und signalstarke Banden. Das veränderte Flüssigkeitsvolumen durch unterschiedliche Magnesiumchlorid-Konzentrationen wird durch veränderte Wassermengen ausgeglichen, so dass die Konzentration der übrigen Parameter und das Reaktionsvolumen konstant bleiben. Jeder Ansatz wird doppelt durchgeführt. Anhand der Signalstärke der aufgetragenen 18 Proben in der Elektrophorese zeigt sich, dass 1,5  $\mu$ l Magnesiumchlorid (50 mM MgCl) und eine Annealing-Temperatur von 50°C die optimalen Bedingungen sind.

Die Sequenz des Amplifikates wird durch eine Sequenzanalyse im Institut für Mykobakteriologie des Forschungszentrums Borstel bestimmt. Die Sequenz wird mit den Sequenzen für das humane Surfactant Protein A in der BLAST Search verglichen und eine Übereinstimmung bestätigt (siehe Anhang B: RT-PCR Produkt Sequenzen).

#### 2.5.4 RT-PCR auf SP-A 310 bp

Für die RT-PCR auf SP-A1 und SP-A2 (310 Basenpaare) werden zunächst 28,5  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser in einem PCR-Tube vorgelegt und ein Ansatz der Reagenzien (Mastermix) hergestellt. Für den Mastermix verwendet man:

Mastermix RT-PCR auf SPA 310 bp	Konzentration	eingesetzte Menge pro Probe
Primer SPAREFOR	20 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{l}$
Primer SPAREREV	20 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{l}$
dNTP's	200 mM je dNTP	1 $\mu\text{l}$
10-fach PCR-Puffer	200 mM Tris-HCl pH 8,4 500 mM KCl	5 $\mu\text{l}$
Magnesiumchlorid	50 mM MgCl	1,5 $\mu\text{l}$
Gesamtmenge		11,5 $\mu\text{l}$

Dieser Ansatz wird in PCR-Tubes pipettiert, dann jeweils 5  $\mu\text{l}$  der cDNA (Template) zugegeben und mit der Pipettenspitze gemischt. Die Polymerase (Taq-Polymerase von Gibco) wird mit den dazugehörigen Reagenzien ( $\text{MgCl}_2$ , 10x PCR-Puffer) vertrieben. Die Reagenzien werden im Mastermix verwendet, die Taq-Polymerase wird extra verdünnt und erst kurz vor dem Start der PCR dazu gegeben. Dafür wird je Probe 0,3  $\mu\text{l}$  Taq-Polymerase mit 4,7  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser verdünnt, und dazu pipettiert und mit der Pipettenspitze gemischt. Danach wird das Eppendorfreaktionsgefäß verschlossen, kurz anzentrifugiert und in den vorgeheizten PCR-Cycler (Biometra UNO

Thermoblock) gestellt. Es wird folgendes Programm gestartet:

Schritt	Vorgang	Temperatur	Zeit
1	DNA Denaturation	94°C	60 Sekunden
2	Primerannealing	50°C	60 Sekunden
3	DNA Extension	72°C	90 Sekunden
Wiederholung Schritt 1.-3. : 39 Mal			
4	Abschließende DNA Extension	72°C	15 Minuten
5	Dauerkühlung	4°C	bis zur Entnahme

Die PCR-Produkte werden bei 4°C im Kühlschrank bis zur weiteren Verwendung gelagert.

## 2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Standardmethode, um DNA verschiedener Größe aufzutrennen. Dabei wandern die DNA-Fragmente im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen. Die zurückgelegte Strecke ist abhängig von der Größe der Fragmente, der angelegten Stromstärke und der Agarosekonzentration des Geles. Die Lage der DNA im Agarosegel kann durch Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidium-Bromid im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Durch den Vergleich mit einem gleichzeitig mitlaufenden Längenstandard (Smartladder SF 200) ist es möglich die Größe der Fragmente abzuschätzen [84].

10  $\mu$ l des PCR-Produktes werden mit 1  $\mu$ l schwerer Lösung (Bromphenol-

blau mit Glycerin) vermischt und auf ein Agarosegel pipettiert. Dies stellt man wie folgt her: 2 g Agarose (Mol. Biology Grade von Eurogentec) je 100 ml TAE-Puffer 1-fach werden in einem Becherglas mittels einer Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Auf einem Magnetrührer läßt man die gelöste Agarose auf ca. 60°C abkühlen und pipettiert dann 5 µl Ethidium-Bromid (DNA-intercalierender Fluoreszenzfarbstoff) je 100 ml TAE-Puffer dazu. Das Agarosegel wird in einen vorbereiteten Elektrophorese-Gel-Schlitten mit schmalen Kamm gegossen und das Aushärten des Agarosegels abgewartet. Das feste Agarosegel wird in eine Elektrophoresekammer (Biometra Minicell) in TAE-Puffer 1-fach gelegt und der Kamm gezogen. Die PCR-Proben mit der schweren Lösung werden in die Taschen pipettiert. An den Seiten des Agarosegels wird in jeweils eine Tasche ein Längenstandard (Smartladder) pipettiert. Die Elektrophorese wird bei ca. 80 V durchgeführt. Wenn der Längenstandard ausreichend aufgetrennt ist, kann das Elektrophoresegel unter UV-Beleuchtung betrachtet werden. Die DNA der Proben stellt sich durch die Markierung mit Ethidium-Bromid fluoreszierend dar. Mittels eines Kamerasystems (Videokamera mit Frame-Grabber-Karte) kann ein Bild von dem Agarosegel gemacht werden, welches anschließend digital auf einem PC abgespeichert wird (siehe Anhang C: Abb. 6).

## 2.7 Restriktion

### 2.7.1 Prinzip der Restriktion

Restriktionsendonukleasen sind prokaryontische Enzyme, die spezifische doppelsträngige Nukleotidsequenzen der DNA erkennen und spalten. Diese Sequenzen bestehen aus wenigstens 4 Basen und zeigen eine spiegelbildliche Struktur. Der Restriktionsverdau liefert DNA-Fragmente unterschiedlicher

Größe, die gelelektrophoretisch aufgetrennt und sichtbar gemacht werden können. Seine Effizienz hängt im Wesentlichen von der Reinheit der DNA ab. Verunreinigungen mit Proteinen, hohen Salzkonzentrationen etc. behindern die Enzymreaktion erheblich und machen eine Steigerung der Enzymmenge erforderlich. Die Enzymeinheit U ist definiert als die Enzymaktivität, die 1  $\mu\text{g}$   $\lambda$ -DNA bei optimaler Reaktionstemperatur in 1 Stunde in einem Gesamtvolumen von 50-100  $\mu\text{l}$  im entsprechenden Puffer spaltet [76]. Man verwendet einen Überschuß der theoretisch erforderlichen Enzymmenge, jedoch nicht mehr als 10 % des Gesamtvolumens, da mit Zunahme der Glycerinmenge, welche in der Enzymlösung enthalten ist, die Enzymfunktion beeinträchtigt wird.

### 2.7.2 Restriktion der SP-A 310 bp RT-PCR-Produkte

Mit der RT-PCR auf SP-A 310 bp wird die cDNA Sequenz für die Gene SP-A1 und SP-A2 gleichermaßen vermehrt. Um eine Aussage über das Verhältnis der Transkription der beiden Gene zu ermöglichen wird das RT-PCR-Produkt mittels der enzymatischen Restriktion geschnitten. Die Schnittstelle wird an einer Sequenz gewählt, an der sich SP-A1 von SP-A2 unterscheidet. Enzyme, die an dieser Stelle schneiden, sind *Nhe* I und *Dde* I. Die Restriktion ergibt folgende Fragmente:

Enzym	Quelle	Erkennungsequenz	Fragmente
<i>Nhe</i> I	<i>Neisseria mucosa</i> <i>heidelbergensis</i>	5'...G CTAGC...3'	SP-A1 (310 bp) in
		3'...CGATC G...5'	248 bp und 62 bp
<i>Dde</i> I	<i>E. coli</i> mit geklontem Gen von <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	5'...C TNAG...3'	SP-A1 (310 bp) in
		3'...GANT C...5'	238 bp und 70 bp SP-A2 (310 bp) in 200 bp und 110 bp

Für die Restriktion wird eingesetzt:

Restriktion mit *Nhe I*:

Agens	Konzentration	eingesetzte Menge pro Probe
<i>Nhe I</i>	5.000 U/ml	1 $\mu$ l
10-fach NEBuffer 2		2 $\mu$ l
100-fach BSA		0,2 $\mu$ l
PCR-Produkt		16,8 $\mu$ l
Gesamtvolumen		20 $\mu$ l

Restriktion mit *Dde I*:

Agens	Konzentration	eingestzte Menge pro Probe
<i>Dde I</i>	10.000 U/ml	0,5 $\mu$ l
10-fach NEBuffer 3		2 $\mu$ l
DEPC-Wasser		0,5 $\mu$ l
PCR-Produkt		17 $\mu$ l
Gesamtvolumen		20 $\mu$ l

Zunächst wird das RT-PCR-Produkt in einem Eppendorfreaktionsgefäß (1,5 ml) im Eisbad vorgelegt. Ein Ansatz der Puffer und des BSA bzw. DEPC-Wasser wird angefertigt und in ein -20°C -Coolingelement gestellt. Dann wird das Enzym in den Ansatz gegeben und mittels Vortex gut gemischt. Der Ansatz wird weiter auf dem -20°C -Coolingelement gelagert, und davon je 3,2  $\mu$ l bzw. 3,0  $\mu$ l zu den vorgelegten PCR-Produkten gegeben. Es wird nochmals mit der Pipettenspitze gemischt und das Eppendorfreaktionsgefäß verschlossen. Die Proben werden in einem 37°C warmen Schüttelwasserbad 2 Stunden inkubiert. Die Restriktion wird gestoppt, indem das Enzym 20 Minuten bei 65°C in einem Schüttelwasserbad denaturiert wird. Nachfolgend werden die Restriktionsproben (analog der RT-PCR-Proben) komplett auf ein 2,5 % Agarosegel zur Elektrophorese aufgetragen. Die Elektrophorese wird mit niedriger Spannung begonnen (30 V) bis die Proben in das Gel eingelaufen sind. Danach kann man die Spannung erhöhen. Die Laufzeit



des Elektrophoresegeles richtet sich nach der Auftrennung der Restriktionsbanden. Die Bilddetektion erfolgt wieder mittels eines Kamerasystems (siehe Anhang C: Abb. 7).

## **2.8 Auswertung**

### **2.8.1 Auswertungsprogramm Band Leader**

Das Programm Band Leader (TechKnowledge, Copyright 1993-1994) wird angewendet, um die digitalen Bilder der Agarosegele auszuwerten.

#### **Funktionen des Band Leader**

Das Band Leader Programm enthält Anwendungen für die Bearbeitung von Bildern und Gewinnung von Informationen aus diesen, welche anwendbar für Elektrophoresegele sind. Der Band Leader errechnet aus einem durch den Anwender gewählten, rechteckigen Bereich eines digitalen Bildes ein Profil der Intensitäten der Bildpunkte in diesem Bereich. Dabei werden für jeden vertikalen Punkt des Bereiches alle horizontalen Bildpunktintensitätswerte aufsummiert. Dies ergibt ein Profil der Intensität über die vertikalen Bildpunkte. Dieses Profil wird dann als ein Histogramm Intensität (vertikal) über Laufstrecke (im Agarosegel) (horizontal) dargestellt.

### **2.8.2 Auswertung Agarosegelelektrophoresebilder**

Auswertung der Agarosegelelektrophoresebilder mit verschiedenen Funktionen (Tools):

1. Profile: Die gewählte Funktion ist das Profil. Die Bearbeitung erfolgt indem man nach Auswahl des Slot's (Spalte in der sich die Probe befindet) einen Rahmen über den gewünschten Auswertungsbereich zieht. Der Rahmen wird festgelegt und die Bildpunkte detektiert. Es erscheint ein Profil der Intensitäten der Bildpunkte des Auswertungsbereiches .
  
2. Subtraktion der Hintergrundintensität: In dem Profilefenster befindet sich eine Kurve mit Maxima (Elektrophoresebanden) und Minima (Hintergrundintensität des Agarosegels) (siehe im Anhang D Abb.8 und Abb.9). Um die Elektrophoresebanden auszuwerten subtrahiert man den Hintergrund mit der Funktion `subtract Base`. Die Position des Minimums zwischen den Maxima wird manuell angenähert und dieser Wert subtrahiert. Die Minima werden für die verschiedenen Restriktionen wie folgt einheitlich festgelegt:  
*Nhe I*: Zwischen den beiden Maxima (2 Restriktionsfragmente).  
*Dde I*: Zwischen den ersten 2 Maxima (große Restriktionsfragmente) und den folgenden 2 Maxima (kleine Restriktionsfragmente).
  
3. Daten erkennen: Man wählt hierzu die Funktion `detect Bands`. Die Daten werden sortiert nach Zeilen und Spalten.
  - 1.Zeile: verwendete Bilddatei
  - 2.Zeile: Datum
  - 1.Spalte: Art des Bildpunktes (zweidimensional)
  - 2.Spalte: Nummer des Bildpunktes
  - 3.-6. Spalte: Koordinaten des Bildpunktes
  - 7.Spalte: Wert des Bildpunktes.

### 2.8.3 Datenauswertung in Microsoft©-Excel

Die weitere Bearbeitung der Daten erfolgt mit dem Microsoft Programm Excel. Die Daten werden hierzu in eine Exceltabelle kopiert und nach der

vertikalen Reihenfolge der Bildpunkte im Gelbild (Koordinaten) sortiert. Die Zahlenwerte entsprechen der Höhe des im Band Leader analysierten Profils. Die Spalte wird nach Minima durchsucht und die darüber befindlichen Werte aufsummiert. Im Falle der Restriktion mit *Nhe* I erhält man 2 Summenwerte, im Falle der Restriktion mit *Dde* I 4 Summenwerte (2 große und 2 kleine Fragmente). Diese Summenwerte werden nun entsprechend des Fragmentes für das sie stehen durch die Basenpaarlänge des Fragmentes dividiert, um eine Normalisierung<sup>1</sup> der Werte zu erreichen. Aus diesen normalisierten Werten bildet man jetzt je nach Fragment den Quotienten SP-A1/SP-A2 für jede Restriktion wie folgt:

Enzym	PCR-Produkt	Fragmente	Lokalisation
<i>Nhe</i> I	SP-A1 (310 bp)	248 bp und 62 bp	untere Bande
	SP-A2 (310 bp)	nicht gespalten	obere Bande
<i>Dde</i> I	SP-A1 (310 bp)	238 bp und 70 bp	äußere Banden
	SP-A2 (310 bp)	200 bp und 110 bp	innere Banden

Im Falle der Restriktion mit *Dde* I werden die Bande des Fragmentes 238 bp (SP-A1) zu der Bande des Fragmentes 200 bp (SP-A2) (große Fragmente) in Relation gesetzt. Die kleinen Fragmente der Restriktion mit *Dde* I werden aufgrund der unzureichenden Trennschärfe der Agarosegelelektrophorese in diesem Bereich nicht mit in die weitere Auswertung einbezogen, da hier ein zu großer methodischer Fehler zu erwarten ist. Die Restriktion mittels *Nhe* I ergibt kein Fragment für SP-A2, daher wird die Ursprungsbande 310 bp (entspricht nach vollständiger Spaltung von SP-A1 einer Bande für SP-A2) als SP-A2 gewertet. Es wird der Quotient aus den Werten für 248 bp (SP-A1) und 310 bp (SP-A2) gebildet.

Die Bildung des Quotienten SP-A1/SP-A2 ist sinnvoll im Hinblick darauf, dass eine quantitative Aussage über die absolute SP-A-mRNA Expression

<sup>1</sup>Ethidium-Bromid interkaliert mit der cDNA, daher nehmen die Fragmente proportional zu ihrer Größe Ethidium-Bromid auf. Dies führt zu einer proportionalen Lumineszenz bei der Auswertung. Die Normalisierung führt zur Minimierung dieses Fehlers.

durch die angewendete Methode nicht möglich ist. Durch die Bildung der Ratio werden Einflußfaktoren<sup>2</sup>, die durch die Methode bedingt sind herausgekürzt, da sie auf die zwei in Relation gesetzten Werte eines Agarosegeles gleichermaßen wirken. Dieses Verfahren bewirkt eine Reduktion des methodischen Fehlers.

Nach Gewinnung aller Summenwerte und Quotienten werden diese Daten erneut sortiert. Die Sortierung erfolgt nach Art der Probe (Tumorgewebe oder tumorfreies Gewebe) und Art der durchgeführten Restriktion (*Nhe* I und *Dde* I große Fragmente). Die Quotienten werden nachfolgend einer der Ergebnisgruppen zugeordnet. Die Ergebnisgruppen sind wie folgt festgelegt:

1. Erhöhung des Quotienten SP-A1/SP-A2 im Tumorgewebe gegenüber dem tumorfreien Gewebe.
2. Erhöhung des Quotienten SP-A1/SP-A2 im tumorfreien Gewebe gegenüber dem Tumorgewebe.
3. Ein nahezu gleicher Quotient (Abweichung unter  $\pm 5\%$ ) SP-A1/SP-A2 sowohl im Tumorgewebe als auch im tumorfreien Gewebe.

Nach der Eingruppierung der Werte wird beurteilt, ob die Ergebnisse in den Restriktionen mit *Nhe* I und *Dde* I gleichsinniges oder gegensinniges Verhalten zeigen. Ausschließlich Werte mit gleichsinnigem Verhalten werden zur weitere Beurteilung und Diskussion herangezogen. Diese werden im Folgenden als kohärente Werte bezeichnet. Werte, die gegensinniges Verhalten zeigen, sind von der weiteren Beurteilung ausgeschlossen, da hier ein methodischer Fehler angenommen wird. Mögliche Ursachen für ein gegensinniges Verhalten der Ergebnisse in den beiden angewendeten Restriktionen sind beispielsweise Veränderungen in der Enzymaktivität während der Restriktion, alternative Splicingvarianten des SP-A, welche der Restriktion nicht zugäng-

---

<sup>2</sup>Denkbare Faktoren sind z.B. die Gewebebeschaffenheit, die Lagerungsbedingungen des Materials, veränderte Enzymaktivitäten der verwendeten Transkriptasen ect.

lich sind, und der grundsätzliche Unterschied im Restriktionsverhalten der verwendeten Enzyme. Hierauf wird im Diskussionsteil der vorliegenden Arbeit näher eingegangen.

## 2.9 Statistische Auswertung

### 2.9.1 Statistische Merkmale

Für alle errechneten Quotienten SP-A1/SP-A2 wird getrennt nach Tumortypus und Restriktionstypus eine Berechnung der folgenden statistischen Merkmale vorgenommen [78, 88]:

- geometrischer Mittelwert:

$$G = \sqrt[n]{x_1 x_2 x_3 \dots x_n}$$

- arithmetischer Mittelwert :

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

- Median:

$$Z = x_{mu} + \frac{\frac{n}{2} - \sum_{i=1}^{m-1} f_i}{f_m}$$

- Standardabweichung:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

- Varianz:

$$s^2 = \frac{1}{n - 1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

## 2.9.2 Signifikanzprüfung

Für die Prüfung der Signifikanz der Resultate wird der Wilcoxon-Matched-Pair-Test (Lagetest) durchgeführt [18]. Es handelt sich um einen Test zur parameterfreien Prüfung gepaarter Stichproben quantitativer Daten, der mit einer Effizienz von etwa 95 % zu den schärfsten parameterfreien Verfahren gehört. Dieses Prüfverfahren ist unabhängig von einer bestimmten Verteilungsform (z.B. Normalverteilung). Da eine Normalverteilung der Werte nicht voraus gesetzt werden kann, findet dieser parameterfreie und verteilungsfreie Test Anwendung.

In die Berechnung der Signifikanz werden ausschließlich Werte einbezogen, die in den Restriktionen mit *Nhe* I und *Dde* I (große Fragmente) gleichsinnige Ergebnisse zeigten. Werte mit gegensinnigen Ergebnissen werden nicht auf Signifikanz getestet, da hier ein methodischer Fehler anzunehmen ist .

Zunächst bildet man den arithmetischen Mittelwert aus den Quotienten SP-A1/SP-A2 der Restriktionen mit *Nhe* I und *Dde* I für jede Probe einzeln. Die arithmetischen Mittelwerte der tumorfreen Gewebe werden dann von den arithmetischen Mittelwerten der assoziierten Tumorgewebe subtrahiert. Diese Differenz wird nach ihrem Betrag sortiert, und den Proben ein Rangwert entsprechend der Sortierung zugeordnet (aufsteigende Rangfolge). Die

Rangwerte werden für die Gruppen ( $> 0$  bzw.  $< 0$ ) addiert. Man erhält als Summen die Werte  $T_1$  und  $T_2$ . Als Prüfgröße dient der kleinere der beiden  $T$ -Werte. Es gilt stets:

$$T_1 + T_2 = \frac{n(n+1)}{2} \quad , \text{ mit } n = \text{Stichprobenumfang}$$

mit dem Erwartungswert im Fall einer gleichen Verteilung:

$$E(T) = \frac{n(n+1)}{4} \quad , \text{ mit } n = \text{Stichprobenumfang}$$

Je mehr das berechnete  $T$  von  $E(T)$  abweicht, um so geringer ist die Wahrscheinlichkeit dafür, dass ein solcher Unterschied bei gleichen Verteilungen durch Zufall zustande kommt. Das Kriterium für die statistische Entscheidung lautet deshalb:

- Wenn  $T > T_{kritisch}$ , dann Annahme von  $H_0$  ,
- wenn  $T \leq T_{kritisch}$ , dann Zurückweisung von  $H_0$  .

$H_0$  ist die Nullhypothese: Die Variable (die Ratio SP-A1/SP-A2) hat unter beiden Bedingungen (Tumor und tumorfrei) die gleiche Verteilung.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Adenokarzinome

Die Ergebnisse der 29 Tumoren und tumorfreien Lungengewebebeobachtungen stellen sich wie folgt dar:

1. 14 Proben zeigen in beiden Restriktionen eine Erhöhung der Ratio SP-A1/SP-A2 im Tumorgewebe versus des tumorfreien Areal.
2. 7 der Proben zeigen in beiden Restriktionen eine Erhöhung der Ratio SP-A1/SP-A2 im tumorfreien Areal versus des Tumorgewebes.
3. Die übrigen Proben zeigen unterschiedliche Ergebnisse.
  - 6 der Proben zeigten in der Restriktion mit *Nhe* I eine höhere Expression der Ratio SP-A1/SP-A2 im Tumorgewebe versus des tumorfreien Gewebes. In der Restriktion mit *Dde* I zeigt sich jedoch eine größere Expression von SP-A1/SP-A2 im tumorfreien Gewebe gegenüber dem Tumorgewebe.
  - 2 Proben zeigen eine größere Expression der Ratio SP-A1/SP-A2 im tumorfreien Gewebe versus dem Tumorgewebe in der Restriktion mit *Nhe* I. In der Restriktion mit *Dde* I zeigt sich eine gesteigerte Expression von SP-A1/SP-A2 im Tumorgewebe versus des tumorfreien Gewebe.



Im Folgenden werden die 21 Ergebnisse aus 1. und 2. als kohärente Ergebnisse bezeichnet. Nur diese kohärenten Ergebnisse werden zur weiteren Beurteilung der Adenokarzinomfälle herangezogen.

Ein nahezu gleicher Quotient (Abweichung unter  $\pm 5\%$ ) SP-A1/SP-A2 sowohl im Tumorgewebe als auch im tumorfreien Gewebe lag nicht vor.

## 3.2 Plattenepithelkarzinome

Diese Gruppe enthält 11 Tumoren und ihre zugehörigen tumorfreien Lungenareale. Es finden sich folgende Ergebnisse:

1. 3 Proben zeigen in beiden Restriktionen eine Erhöhung der Ratio SP-A1/SP-A2 im Tumorgewebe versus des tumorfreien Areal.
2. 3 der Proben zeigen in beiden Restriktionen eine Erhöhung der Ratio SP-A1/SP-A2 im tumorfreien Areal versus des Tumorgewebes.
3. 5 Gewebeproben zeigen eine Erhöhung der Ratio SP-A1/SP-A2 in der Restriktion mit *Nhe* I im Tumorgewebe versus des tumorfreien Areal. Im Gegensatz dazu findet sich in der Restriktion mit *Dde* I eine Erhöhung der Ratio SP-A1/SP-A2 im tumorfreien Areal versus des Tumorgewebes.

Im Folgenden werden die 6 Ergebnisse aus 1. und 2. als kohärente Ergebnisse bezeichnet. Nur diese kohärenten Ergebnisse werden zur weiteren Beurteilung der Plattenepithelkarzinomfälle herangezogen.

Ein nahezu gleicher Quotient (Abweichung unter  $\pm 5\%$ ) SP-A1/SP-A2 sowohl im Tumorgewebe als auch im tumorfreien Gewebe findet sich nicht in dieser Gruppe.

### 3.3 Statistische Merkmale

Das Verhalten der Quotienten SP-A1/SP-A2 in den beiden Tumortypen und den Untergruppen der Restriktionsart (*Nhe* I und *Dde* I große Fragmente) folgt bei den statistischen Merkmalen arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Varianz und Median dem Verhältnis:

tumorfrei  $\leq$  gesamte Gruppe  $\leq$  Tumor.

Die einzige Ausnahme von diesem gleichförmigen Verhalten stellt die Restriktion mit *Dde* I (große Fragmente) bei den Plattenepithelkarzinomen dar. Hier zeigt sich für alle oben angegebenen Merkmale:

Tumor  $\leq$  gesamte Gruppe  $\leq$  tumorfrei.

Eine Auflistung der Werte im einzelnen findet sich in Tabelle 3.1 und 3.2.

Die statistischen Größen der Gewebe mit kohärentem Verhalten in beiden Restriktionsformen werden zusätzlich gesondert berechnet. Dazu werden aus den jeweiligen Werten der Ratio SP-A1/SP-A2 aus beiden Restriktionen (*Nhe* I, *Dde* I große Fragmente) der arithmetische Mittelwert gebildet. Dieser Mittelwert wird zur Signifikanzprüfung und zur Berechnung der statistischen Merkmale dieser Gruppe verwendet. Die statistischen Merkmale dieser Gruppe verhalten sich analog den initialen Parametern. Auffällig ist, dass die Werte der Plattenepithelkarzinome nach Ausgrenzung der nicht kohärenten Fälle eine deutliche Verbesserung in Varianz und Standardabweichung verzeichnen. Erklärt wird dies unter anderem durch die Nichteinbeziehung eines extremen Ausreißers aus den Daten. Diese Restriktion ist die Tumorprobe eines Plattenepithelkarzinoms, welche im Anhang C: Abb.7, 3. Spalte der Restriktion mit *Nhe* I abgebildet ist. Die zusammengefassten Ergebnisse sind dargestellt in Tabelle: 3.3.

Bei einer Darstellung der kohärenten Werte geordnet nach Tumortyp und histologischem Grading des Tumors fällt auf, dass die Standardabweichung der Werte vom Median mit zunehmendem Entdifferenzierungsgrad der Adeno-

Tumortypus	Tabelle 3.1:		
	gesamt	tumorfrei	Tumor
Adenokarzinome (n = 21)			
Restriktion mit <i>Nhe I</i>			
geometrischer Mittelwert	1,24	1,08	1,41
arithmetischer Mittelwert	1,41	1,24	1,58
Median	1,25	1,22	1,38
Standardabweichung	0,74	0,67	0,77
Varianz	0,55	0,45	0,59
Restriktion mit <i>Dde I</i>			
geometrischer Mittelwert	1,07	1,03	1,11
arithmetischer Mittelwert	1,29	1,18	1,40
Median	1,18	1,17	1,29
Standardabweichung	0,75	0,56	0,89
Varianz	0,56	0,31	0,79

karzinome in Tumor- und tumorfreiem Gewebe deutlich zunimmt (siehe Abb.4).

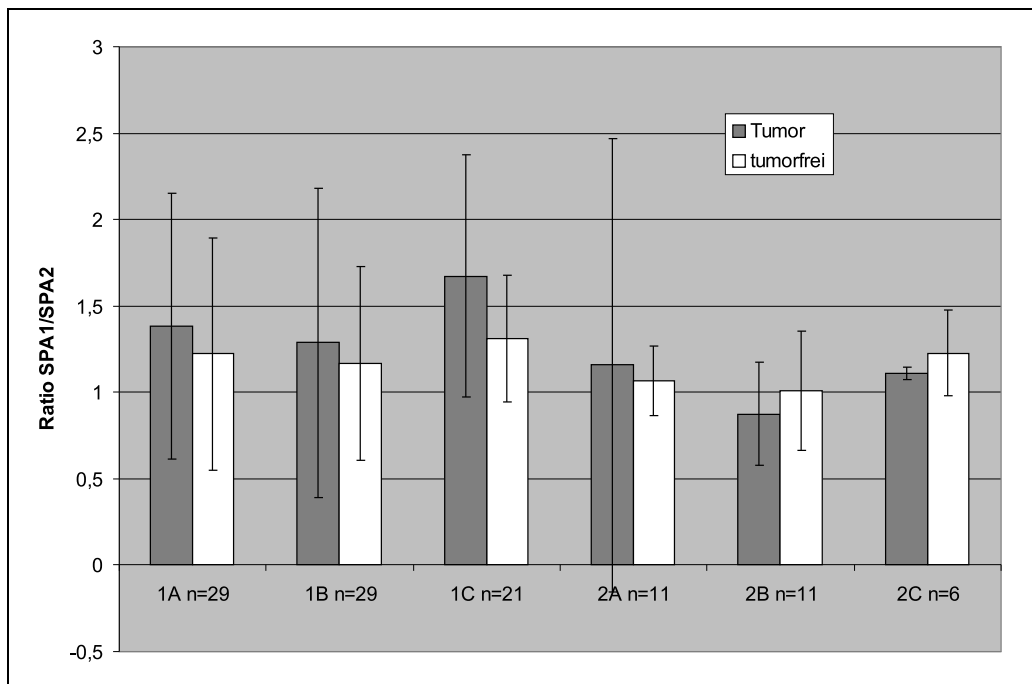
Bei den Plattenepithelkarzinomen ist ein solcher Effekt nicht zu beobachten. Die Standardabweichung unterscheidet sich nur wenig im Vergleich der einzelnen histologischen Gradings und kaum von der Standardabweichung der tumorfreien Gewebe vom Median (siehe Abb.5).

Tabelle 3.2:

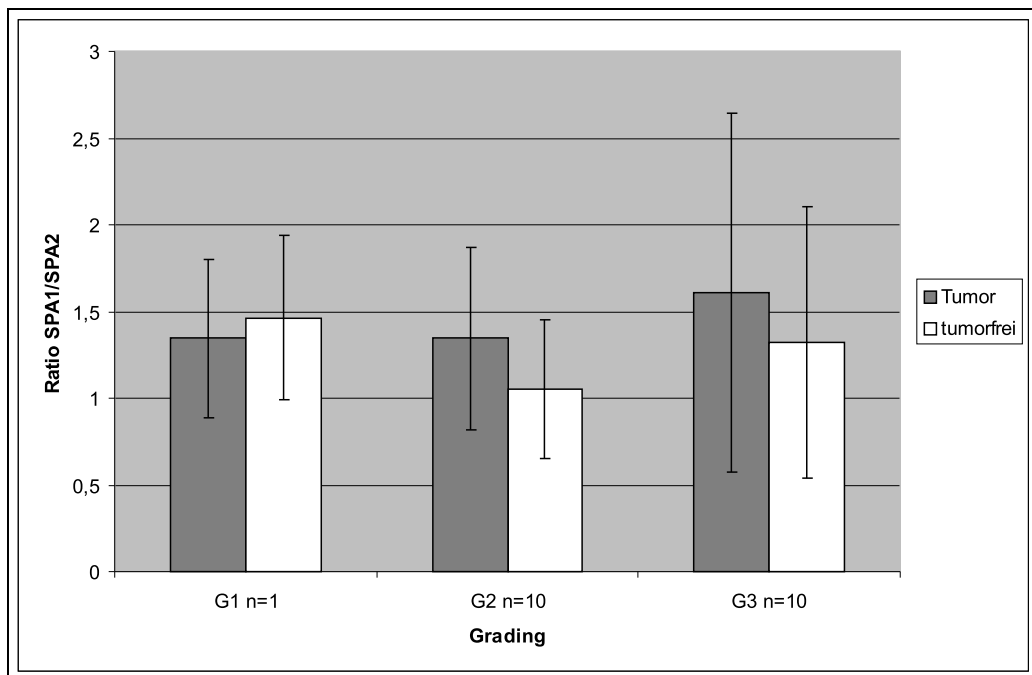
Tumortypus	gesamt	tumorfrei	Tumor
Plattenepithelkarzinome (n = 11)			
Restriktion mit <i>Nhe I</i>			
geometrischer Mittelwert	1,20	1,08	1,33
arithmetischer Mittelwert	1,35	1,09	1,60
Median	1,14	1,07	1,16
Standardabweichung	0,95	0,20	1,31
Varianz	0,90	0,04	1,72
Restriktion mit <i>Dde I</i>			
geometrischer Mittelwert	0,97	1,10	0,85
arithmetischer Mittelwert	1,02	1,15	0,90
Median	0,98	1,01	0,88
Standardabweichung	0,34	0,35	0,30
Varianz	0,12	0,12	0,09

Tabelle 3.3:

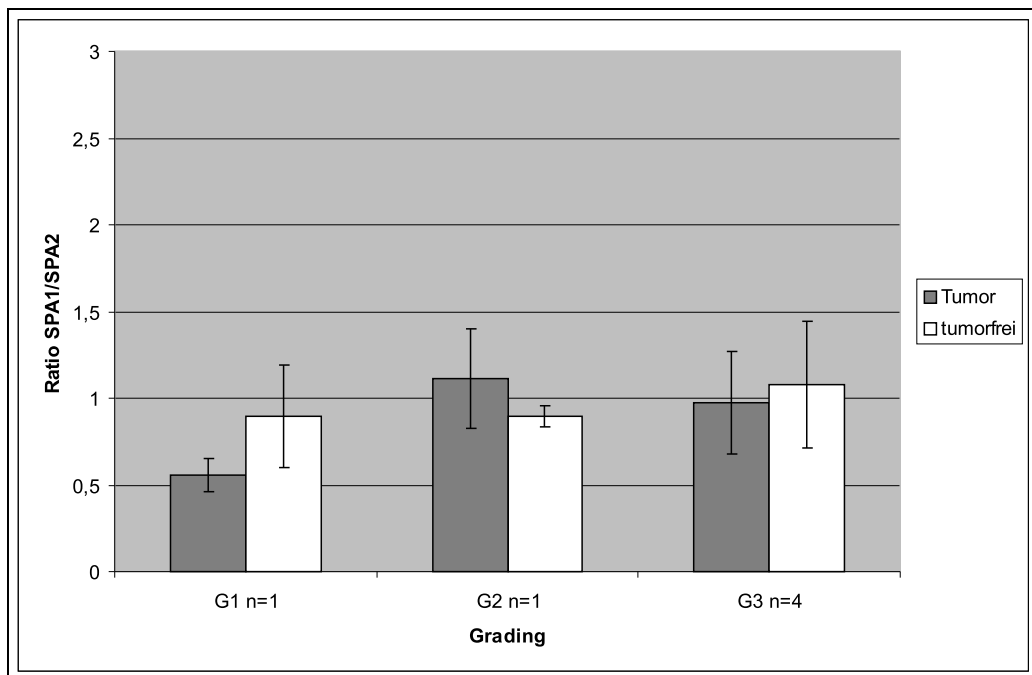
Tumortypus	gesamt	tumorfrei	Tumor
Adenokarzinome (n = 21)			
kohärente Werte			
geometrischer Mittelwert	1,55	1,37	1,66
arithmetischer Mittelwert	1,65	1,41	1,77
Median	1,46	1,31	1,67
Standardabweichung	0,62	0,37	0,69
Varianz	0,38	0,13	0,49
Plattenepithelkarzinome (n = 6)			
kohärente Werte			
geometrischer Mittelwert	1,13	1,15	1,11
arithmetischer Mittelwert	1,14	1,17	1,11
Median	1,13	1,23	1,11
Standardabweichung	0,16	0,25	0,04
Varianz	0,03	0,06	0,001



**Abb. 3:** Datenübersicht: Dargestellt ist der Median innerhalb der Gruppe und die Standardabweichung, 1A: Alle erhobenen Daten für die Adenokarzinome in der Restriktion mit *Nhe* I; 1B: Alle erhobenen Daten für die Adenokarzinome in der Restriktion mit *Dde* I; 1C: Daten für die Gruppe der kohärenten Ergebnisse der Adenokarzinome in der Restriktion mit *Nhe* I und *Dde* I; 2A: Alle erhobenen Daten für die Plattenepithelkarzinome in der Restriktion mit *Nhe* I; 2B: Alle erhobenen Daten für die Plattenepithelkarzinome in der Restriktion mit *Dde* I; 2C: Daten für die Gruppe der kohärenten Ergebnisse der Plattenepithelkarzinome in der Restriktion mit *Nhe* I und *Dde* I; n = Anzahl der Proben; Eine Tumorprobe hat keine Grading-Einordnung und ist daher nicht dargestellt.



**Abb. 4:** Datenübersicht sortiert nach Tumorgrading: Adenokarzinome in der Restriktion mit *Nhe* I und *Dde* I (kohärente Ergebnisse). Dargestellt ist der Median innerhalb der Gruppe und die Standardabweichung, n= Anzahl der bewerteten Fälle.



**Abb. 5:** Datenübersicht sortiert nach Tumorgrading: Plattenepithelkarzinome in der Restriktion mit *Nhe* I und *Dde* I (kohärente Ergebnisse). Dargestellt ist der Median innerhalb der Gruppe und die Standardabweichung, n = Anzahl der bewerteten Fälle.

### 3.4 Signifikanzprüfung

Die Prüfung der Signifikanz mittels Wilcoxon-Matched-Pair-Test ergibt im Falle der geprüften 21 Adenokarzinome und ihren assoziierten tumorfreien Geweben einen signifikanten Unterschied (bei einseitiger Fragestellung:  $T = 57$ ,  $\alpha = 2,5 \%$ ,  $p = 0,025$ ; bei zweiseitiger Fragestellung:  $T = 57$ ,  $\alpha = 5\%$ ,  $p = 0,05$ ) zwischen den Gruppen Tumor und tumorfreies Gewebe.

Die Signifikanzprüfung bei den kohärenten 6 Plattenepithelkarzinomen und den zugehörigen tumorfreien Geweben ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $T = 9$ ,  $\alpha \geq 5 \%$ ,  $p \geq 0,05$ ).



## 4 Diskussion

### 4.1 Methode im Vergleich

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die transkriptionelle Aktivität der Surfactant-Apoproteine A1 und A2 in Proben von 29 Adenokarzinomen und 11 Plattenepithelkarzinomen sowie den jeweils assoziierten tumorfreien Lungenarealen auf mRNA-Ebene untersucht. Die verwendete Methode der RT-PCR mit nachfolgender Restriktion durch die Enzyme *Nhe* I und *Dde* I ist durchführbar mit moderatem materiellen und apparativen Aufwand im Gegensatz zur aufwendigen Serienanalyse der Genexpression (SAGE) [69] oder Gen-Sequenzierung [48, 64]. Hierbei kann sich die RT-PCR mit nachfolgender Restriktion Methode nicht mit der hohen Genauigkeit der SAGE oder der Gen-Sequenzierung messen. Die verwendete Methode eignet sich aber gut, um einen generellen Eindruck über die physiologischen Vorgänge in Tumoren pulmonalen Ursprungs zu gewinnen. Die RT-PCR wird als etablierte Methode in der Molekularbiologie angewandt, um Vorgänge auf RNA-Ebene zu untersuchen [41, 42]. Die Detektion spezifischer Gensequenzen via RT-PCR gilt als sensitivere Technik im Vergleich mit Serienschnitt oder Immunhistochemie [72]. Die Überlegenheit der RT-PCR bei der Detektion von konventionell nicht erkennbaren Mikrometastasen nichtkleinzelliger pulmonaler Karzinome verdeutlicht den Unterschied zu den übrigen Methoden: 12 von 23 Mikrometastasierungen wurden über RT-PCR aufgedeckt, während mit Immunhistochemie 6, mit Northern Blot Analyse 7 und mit *in-situ* Hybridisierung 8 Mikrometastasierungen nachgewiesen werden konnten [11]. In

Kombination mit der Restriktionsanalyse lassen sich amplifizierte Sequenzen trennen, die sich nur in wenigen Nukleotiden unterscheiden, wie im Falle von SP-A1 und SP-A2 [61]. Sie bietet im Gegensatz zur häufig verwendeten Immunhistologie [50, 96] oder *in-situ* Hybridisierung [14, 65] die Möglichkeit, eine quantitative Analyse durchzuführen. Ein weiterer Vorteil ist die Verwendung frischer (Schock-gefrorener) unfixierter Gewebe [77], welche ein gut geeignetes Material darstellen, um eine Aussage über die *in vivo* Verhältnisse von adulten humanen Lungengewebe zu machen. Dabei sollte eine Berücksichtigung der Zeitspanne und der Lagerungsbedingungen des Gewebes zwischen Entnahme und Aufarbeitung [40], sowie der anatomischen Region aus der das Gewebe entnommen wird, erfolgen, da diese Einfluß auf die nachweisbare mRNA-Menge haben können [41]. Für die Verwendung der Methode werden Gewebe benötigt, die ausreichend mRNA enthalten. Dies kann durch nekrotische Zersetzung oder endzündliche Veränderung des Gewebes beeinträchtigt werden. Tumoren mit niedrigem Differenzierungsgrad exprimieren weniger mRNA physiologischer Gene wie SP-A1 und SP-A2 [52, 95]. Dies hat zur Folge, dass Gewebe entdifferenzierter Tumoren (G3) häufiger in dieser Untersuchung nicht verwendet werden konnten, weil die SP-A-mRNA quantitativ nicht für eine RT-PCR genügte. Ein zusätzliches methodisches Problem besteht in der Vielzahl von Splicingvarianten des SP-A1 und SP-A2 [23, 22, 48, 47, 61]. Die Restriktion mit *Dde* I konnte in den meisten Fällen die SP-A RT-PCR Produkte (310 bp) nicht vollständig schneiden. Es ist anzunehmen, dass es sich hierbei um alternative Splicingvarianten des SP-A handelt, da die Sequenzanalyse des nicht geschnittenen Produktes gleichermaßen SP-A1- und SP-A2-Homologie zeigte (siehe Anhang Sequenzen: Restriktionsbande 310 bp). Auf eine weitere Sequenzanalyse über Klonierung des Genmaterials bezüglich dieser alternativen Splicingvarianten des SP-A wurde im Rahmen dieser Untersuchung aus Gründen des methodischen und materiellen Aufwandes zunächst verzichtet. Einige dieser Splicingvarianten sind assoziiert mit einer gesteigerten Expression von mRNA, die allerdings keinen Einfluß auf die SP-A1/SP-A2 mRNA Ratio hat [48]. Die SP-A1/SP-A2 mRNA Ratio variiert individuell physiologisch von 0,94 bis

6,80 bei gesunden Geweben [48]. Die Betrachtung der SP-A1/SP-A2 mRNA Ratio erfolgte daher in dieser Arbeit immer vergleichend zwischen Tumor und tumorfreiem Gewebe eines Individuums, um diesen individuellen Faktor als Einflußgröße auszuschließen. Vor der Diskussion der erhobenen Daten erfolgt eine Zusammenfassung der vielfältigen Regulationsmechanismen und Gewebe abhängigen Faktoren.

## 4.2 Regulation der Surfactant-Apoproteine

Die Regulation der Surfactant-Proteine erfolgt unter anderem über Glukokortikoide [37, 53], cAMP [62], epidermal growth factor [53, 66], und Insulin [53, 67]. In Untersuchungen zum Effekt von Glukokortikoiden auf NCI-H441-Zellen (humane Adenokarzinomzelllinie) findet sich ein inhibitorischer Effekt auf die Promotoraktivität des SP-A1-Gens, bedingt durch unterschiedliche Transskriptionsaktivität der für die cis/trans-Struktur der Proteine verantwortlichen Regionen des SP-A1 -Gens [37]. In Konsensus damit stehen weitere Ergebnisse an der gleichen Zelllinie in Bezug auf inhibitorische Glukokortikoideffekte für die 3'-UTR der mRNA des SP-A [38]. Ursächlich dafür sind geringe Differenzen in der Gensequenz der 3'-UTR der SP-A-Genloci, die via transiente Transfektion der 3'-UTR-Konstrukte in NCI-H441-Zellen identifiziert wurden [93]. Es wurde dabei eine stark verminderte Expression der SP-A mRNAs unter Einfluß von Dexamethason beobachtet, die in den einzelnen Splicingvarianten unterschiedlich ausgeprägt war. Dies hat möglicherweise einen Einfluß auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, da eine Veränderung der SP-A1/SP-A2 mRNA Ratio durch eine präoperative oder intraoperative Glukokortikoidapplikation induziert werden könnte. Über diesen Faktor sind keine Angaben unmittelbar verfügbar.

Der Einfluss einer medikamentösen Therapie von Tumorpatienten wurde in einer Studie an Lungentumorpatienten beobachtet. Hier fand sich keine ge-

nerelle Veränderung der Alveolarzellen und der Surfactantzusammensetzung in bronchoskopischen Lavagen vor Chemotherapie, jedoch eine Reduktion der Surfactantbestandteile (Phosphatidylcholin u.a.) nach Applikation von 2 Zyklen Chemotherapie mit MACC<sup>1</sup> [80]. Bei nicht kleinzelligen Karzinomen wird eine Chemotherapie nur bei nicht resektablen Tumoren (Extensive disease) oder in ausgewählten Fällen zur neoadjuvanten Therapie eingesetzt [9], weshalb ein direkter Einfluß bzgl. dieser Arbeit nicht zu erwarten ist. Die Studie zeigt jedoch, dass Substanzen mit toxischer oder mutagener Potenz einen Einfluß auf die Surfactantexpression haben können.

Als toxische und mutagene Substanz bei der Induktion einer Tumorgene- se erscheint vor allem Tabakrauchen als wichtiger Faktor von Bedeutung zu sein [2, 4]. Die stärkste Assoziation zum Tabakrauchen als Noxe besteht beim Plattenepithelkarzinom und dem kleinzelligen Karzinom der Lunge [2, 79]. Eine Assoziation zwischen einer veränderten mRNA Ratio SP-A1/SP-A2 und dem (Rauchertumor) Plattenepithelkarzinom lässt sich aus dieser Arbeit aufgrund der kleinen Anzahl kohärenter Ergebnisse in den Restriktionen nicht signifikant darstellen. Jedoch zeigt sich insgesamt eine niedrige mRNA Ratio SP-A1/SP-A2 und eine weniger stark ausgeprägte Variation innerhalb der Plattenepithelkarzinomgruppe verglichen mit der Adenokarzinomgruppe (siehe Abb. 3). Plattenepithelkarzinome und adenosquamöse Karzinome zeigen bei immunhistiochemischen Untersuchungen keine Expression von SP-A im Gegensatz zu hyperplastischen Zellen bei tumorassoziierter interstitieller Pneumonie und Adenokarzinomzellen [14, 17]. Zu beachten gilt, dass die gesamte Lunge eines Rauchers durch die Rauchgasinhalation beeinflusst wird, womit sich wiederum die geringen Differenzen zwischen den Gewebetypen Tumor und tumorfrei erläutern ließen. Ein weiterer Faktor ist der permanente Reiz, der durch die Rauch-induzierte chronische inflammatorische Reaktion der Bronchialwege entsteht und eine Induktion inflammatorischer Zytokine zur Folge hat [96].

---

<sup>1</sup>Methotrexat, Doxorubicin HCL, Cyclophosphamid und Lomustin

Inflammatorische Zytokine beeinflussen die Zelldifferenzierung und Surfactantexpression in gesunden Geweben und Tumoren der Lunge [5, 63]. In vitro Studien an Pneumozytenisolaten aus tumorbefallenen und tumorfreien Lungenextirpaten zeigten eine Reduktion der Phosphatidylcholinproduktion (Vorstufe des Surfactants) unter Anwesenheit erhöhter  $\text{TNF}\alpha$ -Spiegel [5]. Dieser Effekt erklärt zum Teil die reduzierte Expression von Surfactant in Tumorgewebe, aber auch in durch  $\text{TNF}\alpha$  parakrin beeinflussten gesunden Lungenarealen von Tumorpatienten [5]. Der Abstand zwischen Tumorprobe und tumorfreier Gewebeprobe kann daher ein beeinflussender Faktor auf die individuelle SP-A1/SP-A2 Ratio sein, der qualitativ aber schwer zu beurteilen ist. Einzelne Ausreisser der Daten, die vor allem in der Restriktion mit *Nhe I* bei den Plattenepithelkarzinomen zu einer großen Standardabweichung führen (siehe Abb. 3), werden mit dieser Beobachtung erklärbar. Eines dieser Gewebe weist in der Histologie Nekrosen auf, die eine starke Expression von  $\text{TNF}\alpha$  bedingen könnten. Die Expression von SP-A ist demzufolge in diesem Tumorgewebe sehr schwach (siehe im Anhang Gelbilder Abb.7, 3. Spalte) und verzerrt dadurch die Ratio für SP-A1/SP-A2 im Vergleich mit dem tumorfreien Gewebe.

Ein großes Interesse der Forschung besteht im Hinblick auf die Induktion einer Apoptose von Tumorzellen im Sinne einer Therapie. Fetale Zelldifferenzierung und Tumorgenese werden dabei als Ansatzpunkt der Forschung betrachtet [15, 87]. Eine Inkubation mit 9-cis-Retinolsäure und all-trans-Retinolsäure<sup>2</sup> hat in in vitro Studien an NCI-H441-Zelllinien (humane Adenokarzinomzelllinie) keinen Einfluß auf die synthetisierte SP-A-mRNA-Menge, obwohl im Gegensatz dazu eine Inhibition der SP-A und SP-C Expression in humanen fetalen Lungenzellen durch diese Substanzen nachgewiesen wurde. Eine indirekte Beeinflussung via Zell- oder Gewebebestandteile ist dabei nicht ausgeschlossen [26]. NCI-H441-Zellen zeigen unter Einfluß von cAMP, Dexamethason und Insulin eine differente Ratio SP-A1/SP-A2

---

<sup>2</sup>Derivate des Retinol = Vitamin A; spielen eine regulatorische Rolle beim Wachstum und der Differenzierung von epithelialen Zellen und verschiedenen Organen [30].

gegenüber gleichartig stimulierten humanen Fetalzellen [53]. In dem Experiment zeigte sich außerdem eine Inkohärenz der Ratio SP-A1/SP-A2 innerhalb der einzelnen Gewebetypen. Dies verdeutlicht die vielfältigen Einflußfaktoren, die offenbar für die Regulation der Ratio SP-A1/SP-A2 verantwortlich sind [48]. Diese kontroversen Ergebnisse lassen die Diskrepanz zwischen Tumorzellen und Fetalzellen, sowie zwischen Kulturzellen und Zellen aus dem Gewebeverband erkennen [53, 67]. Die Ergebnisse der bisherigen Forschungen sind daher schwer vergleichbar und nur bedingt auf die in vivo Verhältnisse über-tragbar.

Insgesamt ist die Regulation der Surfactantproteine einem multifaktoriellen Mechanismus unterlegen, bei dem cAMP, und diverse Zytokine wie z.B.  $\text{NF}\kappa\text{B}$ ,  $\text{Bt}_2\text{cAMP}$ , TTF-1, IL-1,  $\text{TNF}\alpha$  und die Sauerstoffsättigung des Gewebes einen modulatorischen Einfluß haben [43].

## 4.3 Surfactantproteine in pulmonalen Tumoren

Die Verwendung von humanen pulmonalen Adenokarzinomzellen als Modell in vitro findet in der gegenwärtigen Erforschung von physiologischen und molekularbiologischen Eigenschaften der Lunge breite Anwendung [5, 15, 38, 37, 53, 67, 69]. In der Tat sind viele der Strukturen und Eigenschaften physiologischer Pneumozyten ebenfalls bei Tumorzellen der Lunge nachweisbar, am häufigsten jedoch bei Adenokarzinomen [31]. Eine immunhistochemische Untersuchung von präneoplastischen Veränderungen der Atemwege deutet darauf hin, dass eine Differenzierung der neoplastischen Vorstufen von Bronchialkarzinomen nach der WHO-Klassifikation bei Verwendung eines Markers gegen das proliferationsassoziierte Kerantigen Ki67 möglich ist [65]. Eine Detektion der physiologischen Surfactantproteine als Marker humaner Lungentumoren via RT-PCR offenbarte konventionell lichtmikroskopisch nicht nachweisbare Mikrometastasen [11]. Die Sensitivität des immunhistochemi-

schen Nachweises ist abhängig von dem verwendeten Antikörper und der Präsenz des gesuchten Antigens im Untersuchungsmaterial. In postmortalen Lungentumorgeweben ist die Sensitivität durch immunhistochemischen Nachweis von Surfactant-Apoprotein im Vergleich mit Lectitinen bedingt durch postmortale Veränderungen geringer [40, 89]. Der am meisten verwendete Antikörper zum immunhistochemischen Nachweis von SP-A ist PE-10, der eine sehr gute Spezifität aufweist, und vor allem positive Reaktionen bei pulmonalen Adenokarzinomen zeigt [71]. Ein weiterer häufig verwendeter immunhistochemischer Marker ist TTF-1 (Thyroid transcription factor-1), welcher ebenfalls als sehr spezifisch für Lungengewebe gilt, aber zusätzlich bei Schilddrüsengewebe positiv reagiert [10, 50, 81]. In Studien zum Vergleich von SP-A und TTF-1 an 109 verschiedenen Lungentumoren zeigte sich außerdem eine positive Reaktion des TTF-1 in 89% der kleinzelligen Lungentumoren, die zu 100% negativ für SP-A waren [95]. Andere gebräuchliche immunhistochemische Marker sind die Neuronen spezifische Enolase, Onkoproteine (k-ras, c-erb-2, c-myc, L-myc und N-myc), Antionkogene (p53, Rb) oder Apoptosemarker (bcl-2, bax). Diese Marker genügen jedoch nicht, um Lungentumoren von Tumoren anderen Ursprungsortes suffizient zu differenzieren [86]. SP-A und TTF-1 sind in der Identifizierung von Tumoren pulmonalen Ursprungs spezifischer [10, 50, 81, 86]. Insbesondere kann die kombinierte Anwendung von PE-10 (für SP-A) und TTF-1 hilfreich sein bei der Differenzierung von Adenokarzinomen unklarer Herkunft [27]. Die Expression von SP-A in Adenokarzinomen pulmonalen Ursprungs kann im immunhistochemischen Nachweis in der Intensität stark variieren und ist vor allem Abhängig vom Grad der Differenzierung des Tumorgewebes (83% positiver SP-A-Nachweis in gut differenzierten Tumoren, 55% bei moderat differenzierten Tumoren und 0% bei schlecht differenzierten Tumoren) [68, 95]. Die atypische adenomatöse Hyperplasie (AAH) gilt als Vorstufe in der Entwicklung eines Adenokarzinoms, die eine starke Expression von SP-A zeigt. In Kombination von Immunhistochemie und elektronenmikroskopischer Untersuchung von Adenokarzinomen unterschiedlicher Differenzierung und atypischer adenomatöser Hyperplasie zeigt sich eine diffuse Expression von SP-A

in AAH und eine fokale Expression von SP-A in Adenokarzinomen [52].

Surfactantproteine bieten sich zur Untersuchung der physiologischen Differenzierung an, da sie als physiologische Proteine in gesunden Zellen exprimiert werden und als spezifischer Marker von pulmonalen Tumoren dienen [14]. Die Expression von Surfactantproteinen in pulmonalen Tumoren wurde bisher unter diversen Gesichtspunkten untersucht [11, 14, 52, 68]. Eine Assoziation zwischen SP-B und Lungentumoren wurden bereits publiziert. Dort fand sich in einer Untersuchung von SP-B Intron Varianten in Lungentumor- und Kontroll-Patientengruppen eine Assoziation zwischen dem Polymorphismus des Genes für SP-B und Plattenepithelkarzinomen [85].

## 4.4 Vergleich der erhobenen Ergebnisse mit Literaturangaben

Die erhobenen Daten für die SP-A1/SP-A2 Ratio in den Restriktionen mit *Nhe* I und *Dde* I zeigen in 21 von 29 Adenokarzinomen und in 6 von 11 Plattenepithelkarzinomen ein kohärentes Ergebnis. Nur diese kohärenten Ergebnisse werden zur weiteren Diskussion verwendet. Zusammengefasst zeigt die Untersuchung folgende Resultate:

- Die Ratio SP-A1/SP-A2 ist in Adenokarzinomgeweben signifikant unterschiedlich zu der Ratio SP-A1/SP-A2 in den assoziierten tumorfreien Geweben (Abb. 3). Die Standardabweichung vom Median steigt dabei im Tumor und tumorfreien Gewebe mit dem Grad der Entdifferenzierung des Tumors (Abb. 4).
- Die Ratio SP-A1/SP-A2 im Tumor und tumorfreien Gewebe der Plattenepithelkarzinome unterscheidet sich nicht signifikant (Abb. 3). Die Standardabweichung vom Median ist unabhängig vom Tumorgrading



der Plattenepithelkarzinome in allen Gradingstufen etwa gleich (Signifikanzprüfung aufgrund der kleinen Stichprobe nicht möglich).

Eine Untersuchung der mRNA Ratio SP-A1/SP-A2 an gesunden Individuen mittels Genotyp-Analyse, Northern-Blot und Primer-Extension zeigte eine breite Variation der mRNA Ratio SP-A1/SP-A2 von 0,94 bis 6,80 [48]. Die mRNA Ratio SP-A1/SP-A2 in der vorliegenden Arbeit variiert von (im Mittel) 0,85 in den Tumorgeweben der Plattenepithelkarzinome bis 1,41 in den Tumorgeweben der Adenokarzinome (siehe Tabelle 3.1 und 3.2). Diese Differenz könnte zum einen an einer geringeren Sensitivität der hier verwendeten Methode liegen, zum anderen können in der hier untersuchten Stichprobe einzelne Genotypen, die mit einer niedrigen bis moderaten Expression von SP-A1/SP-A2 assoziiert sind häufiger vertreten sein, als in der gesunden Population der oben zitierten Studie. Dort ist der SP-A Genotyp ( $6A^26A^21A^01A^0$ ) mit einem niedrigen bis moderatem Level der SP-A-mRNA und der SP-A Genotyp ( $6A^26A^31A^01A^1$ ) mit einem sehr niedrigen bis sehr hohem Level an SP-A-mRNA assoziiert [48]. Die Autoren der zitierten Studie stellen die Hypothese auf, dass die beobachtete Variation der SP-A-mRNA Expression ein direktes Resultat einer genetischen Heterogenität ist. Da eine Genotypisierung in der vorliegenden Arbeit nicht erfolgt ist, kann dieser Aspekt hier nicht beurteilt werden. Ein gehäuftes Auftreten des SP-A Genotypes ( $6A^26A^31A^01A^1$ ) bei Tumorpatienten wäre eine zu prüfende Hypothese, die Aufschluss über die z.T. sehr breite Variation der SP-A1/SP-A2 mRNA Ratio geben könnte.

Die Plattenepithelkarzinomgewebe zeigen nur eine marginale Abweichung in der Expression der SP-A1/SP-A2 Ratio von den ihnen assoziierten tumorfreien Geweben (siehe Abb. 3 und Abb. 5). Die Expression von SP-A-mRNA in Plattenepithelkarzinomen wird dabei offenbar durch im Tumor eingeschlossene normale Pneumozyten Typ II verursacht. Eine Beurteilung, in welchem Maße Pneumozyten Typ II in den untersuchten Plattenepithelkarzinomgeweben vorhanden sind, läßt sich nicht treffen. Der deutliche Unterschied zwi-

schen den niedrigen Intensitäten der Plattenepithelkarzinome und den hohen Intensitäten der assoziierten tumorfreien Gewebe in den SP-A 310 bp RT-PCR Agarosegelen lässt vermuten, dass die Expression in Tumorgeweben von wenigen eingeschlossenen Pneumozyten Typ II verursacht wurde [10], vor allem weil eine Expression von SP-A in Plattenepithelkarzinomzellen bisher immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden konnte [10, 17, 71] und auch in einer Untersuchung via *in-situ* Hybridisierung Plattenepithelkarzinome negativ für SP-A waren [14]. Die alleinige Expression von SP-A-mRNA durch im Plattenepithelkarzinomgewebe eingeschlossene Pneumozyten Typ II erklärt auch die ähnliche Ratio SP-A1/SP-A2 im Tumor und tumorfreiem Gewebe. Ein weiteres Indiz für diese Hypothese ist die relative Unabhängigkeit der Expression der Ratio SP-A1/SP-A2 von dem Grading der Plattenepithelkarzinome, während bei den Adenokarzinomen die Variationsbreite des Quotienten mit dem Grading des Tumors deutlich zunimmt (siehe Abb. 4 und Abb. 5).

Die Expression der Ratio SP-A1/SP-A2 in Tumorgeweben von Adenokarzinomen unterscheidet sich mit einer Signifikanz von  $p = 0,05$  von den tumorfreien Geweben. Zusätzlich zeigt sich eine Zunahme der Heterogenität, in der Expression der mRNA Ratio SP-A1/SP-A2 in beiden Gewebetypen, mit steigendem Entdifferenzierungsgrad der Tumore. Immunhistochemische Untersuchungen an Adenokarzinomen und atypischer adenomatöser Hyperplasie stellten ebenfalls eine Veränderung der SP-A Expression zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe fest [68]. Dort zeigen sich sehr starke Signale für SP-A in normalen Pneumozyten Typ II und hyperplastischen Zellen der AAH. Dabei findet sich bereits in diesen Geweben eine starke Variation der Immunreaktivität. Die beobachteten Adenokarzinome weisen ebenfalls sehr variable Grade der Immunreaktivität für SP-A auf, die Reaktionen sind jedoch insgesamt eher niedriger als in normalen Pneumozyten Typ II oder AAH-Zellen [68]. Die Zunahme der Variation in der Expression von SP-A mit dem Grad der Entdifferenzierung wurde bereits in einer weiteren immunhistochemischen Untersuchung gezeigt [52]. Auch hier ist die

Entdifferenzierung des Tumors von einer Abnahme der Signalintensität für SP-A begleitet. Zusätzlich zeigt sich in den untersuchten Tumoren eine fokal begrenzte Expression von SP-A, während die positiven Signale für SP-A in gesunden Geweben und AAH eher diffus verteilt sind [52]. Insgesamt scheint eine Unterstützung der erhobenen Ergebnisse für die Adenokarzinomgruppe durch die aufgeführten Literaturstellen möglich, da sie ebenfalls eine Zunahme der Heterogenität in den Resultaten bei steigendem Entdifferenzierungsgrad der Adenokarzinome und die Unterscheidbarkeit von gesundem und Adenokarzinomgewebe über SP-A Expression zeigen. Die Übertragung der Aussagen aus diesen Studien ist aufgrund der differenten Methoden nur begrenzt möglich, da in den immunhistochemischen Studien keine Differenzierung zwischen SP-A1 und SP-A2 möglich ist. Außerdem wird mit diesen Methoden die Gesamtexpression des Proteins dargestellt, und nicht die SP-A1/SP-A2 mRNA Ratio, wie mit der in dieser Arbeit angewendeten Methode. Eine Aussage über die transkriptionelle Aktivität der Surfactantapoproteine A1 und A2 ist daher mit Immunhistochemie und *in-situ* Hybridisierung derzeit nicht möglich.

Die erhobenen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine signifikant veränderte transkriptionelle Aktivität der Surfactant-Apoproteine A1 und A2 in Adenokarzinomen verglichen mit ihren assoziierten normalen Lungenarealen. Ein Zusammenhang der Plattenepithelkarzinome mit der transkriptionellen Aktivität der Surfactant-Apoproteine A1 und A2 wurde nicht beobachtet. Ein direkter Zusammenhang zwischen Tumorentwicklung und Transkriptionsaktivität des Surfactant-Apoproteins A in Adenokarzinomen ist damit sehr wahrscheinlich, könnte aber nur mit Hilfe einer quantitativen Sequenzanalyse der mRNA in Tumorzellen und tumorfreien Geweben von Adenokarzinompatienten bewiesen werden. Diese Methode würde aber einen deutlich höheren materiellen, technischen und personellen Aufwand im Vergleich mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode bedeuten. Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurde dieses Verfahren in dem Labor des Institutes für Pathologie des Forschungszentrum Borstel etabliert und stellt einen neuen

Beitrag zu der Erforschung physiologischer und pathologischer Vorgänge in Lungengewebe dar. Es besteht nun die Möglichkeit diese erprobte Methode auch an den sehr kleinen Gewebemengen pulmonaler Biopsien anzuwenden, um weitere Erkenntnisse über pathophysiologische Vorgänge unter anderem zum Beispiel bei interstitiellen Lungenerkrankungen zu gewinnen, deren Assoziation mit Surfactantgenpolymorphismen vermutet wird [35, 60, 28]. Zusätzlich gibt es Hinweise auf eine Beeinflussung der Surfactant-Apoprotein Expression durch bei interstitiellen Lungenerkrankungen therapeutisch eingesetzte Glukokortikoide [35, 37, 53].

## 5 Zusammenfassung

Surfactant ist die funktionell bedeutendste Komponente bei der Reduktion der Oberflächenspannung in der Lunge. Variationen der Surfactantmenge und Zusammensetzung sind bei verschiedenen Erkrankungen der Lunge bekannt. Der Mensch und die ihm verwandten Primaten besitzen, im Gegensatz zu allen anderen Spezies, 2 Genloci für das Surfactant-Apoprotein A. Die Bedeutung dieses Faktums ist zur Zeit noch ungeklärt und Gegenstand vieler Studien zur Erforschung der pathophysiologischen Vorgänge bei Erkrankungen der menschlichen Lunge.

In der vorliegenden Arbeit wurde das transkriptionelle Verhältnis der Surfactantapoproteine A1 und A2 in Tumor- und tumorfreien Geweben von Patienten mit nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen studiert. Dazu wurden Proben unfixierter Lungenresektionspräparate von 11 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen und von 29 Patienten mit Adenokarzinomen der Lunge untersucht. Als Methoden wurden, nach Amplifikation eines SP-A1/SP-A2 Konsensusfragmentes durch RT-PCR, enzymatische Restriktionsanalysen unter Nutzung zwei verschiedener Restriktionsenzyme (*Nhe* I, *Dde* I) verwendet. Die Auswertung der Restriktions-Elektrophorese ergab Werte für SP-A1 und SP-A2, welche normalisiert und nachfolgend als Ratio SP-A1/SP-A2 verwendet wurden. Es wurden nur Proben, welche ein gleichartiges Ergebnis in beiden Restriktionen zeigten, in die Signifikanzprüfung einbezogen. Es wurde ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,05$ ) der Expression von SP-A1/SP-A2 in den intraindividuellen tumorhaltigen und tumorfreien Geweben der untersuchten Adenokarzinome gezeigt. Die Standardabweichung

chung der Ratio SP-A1/SP-A2 vom Median aller Werte der Gruppe steigert sich im Tumor und im tumorfreien Gewebe mit zunehmendem Entdifferenzierungsgrad der Adenokarzinome. Plattenepithelkarzinome zeigten dieses nicht. Dieses Ergebnis bestätigt frühere Studien, welche eine erhöhte oder veränderte Expression von Surfactantproteinen in verschiedenen Materialien von Adenokarzinompatienten nachgewiesen haben. In der vorliegenden Untersuchung wurde weitergehend gezeigt, dass die transkriptionelle Aktivität der Surfactant-Apoproteine A1 und A2 in Adenokarzinomen signifikant beeinflusst wird. Im Gegensatz dazu wurde bisher kein Fall einer Expression oder Beeinflussung von Surfactant-Apoprotein A1 oder A2 in Plattenepithelkarzinomen publiziert, was mit der vorliegenden Arbeit bestätigt wurde. Die Expression von SP-A1 und SP-A2 wird als Transkriptionsaktivität von im Tumor eingeschlossenen Pneumozyten Typ II interpretiert, welche unmittelbar den parakrinen Einflüssen durch tumortypische Zytokine unterliegen. Diese Gewebe wurden deshalb als Kontrollgruppe verwendet, da sie anders als gesunde Gewebe direkt den Einfluß solcher Zytokine erkennen lassen.

Für zukünftige Untersuchungen ist an qualitativ und quantitativ gut zugänglichem Gewebematerial von Pneumonektomien eine Methode etabliert worden, die nun an meist nur spärlichen Gewebemengen pulmonaler Routinebiopsien unter anderem bei interstitiellen Lungenerkrankungen angewendet werden kann. Hier gibt es Hinweise auf eine Beeinflussung der Surfactant-Apoprotein Expression durch therapeutisch eingesetzte Glukokortikoide.

## Literaturverzeichnis

- [1] Achler C und v Wichert P. Die Bedeutung des Surfactantsystems für die Infektabwehr. *Pneumologie* 46 (1992) 218–220.
- [2] Agudo A, Ahrens W, Benhamou E, Benhamou S, Boffetta P, Darby S C, Forastiere F, Fortes C, Gonzalez V G C A, Jöckel K H, Kreuzer M, Merletti F, Pohlable H, Richiardi L, Whitley E, Wichmann H E, Zambon P und Simonato L. Lung cancer and cigarette smoking in women: a multicenter case-control study in europe. *Int J Cancer* 88 (2000) 820–827.
- [3] Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, Zhang J, Zhang Z, Miller W und Lipman D J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25 (1997) 3389–3402.
- [4] Amos C I, Xu W und Spitz M R. Is there a genetic basis for lung cancer susceptibility? *Recent Res Cancer Res* 151 (1999) 3–12.
- [5] Arias-Diaz J, Vara E, Garcia C, Gomez M und Balibrea J L. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits synthesis of surfactant by isolated human type II pneumocytes. *Eur J Surg* 159 (1993) 541–549.
- [6] Arias-Diaz J, Garcia-Verdugo I, Caslas C, Sanchez-Rico N, Vara E und

- Balibrea J L. Effect of surfactant protein A on the production of cytokines by human pulmonary macrophages. *Shock* 14 (2000) (3) 300–306.
- [7] Askin F B und Kuhn C. The cellular origin of pulmonary surfactant. *Lab Invest* 25 (1971) 260–268.
- [8] Avery M E. Surfactant deficiency in hyaline membrane disease. *Am J Respir Crit Care Med* 161 (2000) 1074–1075.
- [9] Bartsch V. *Das Taxol-Buch*. Kap.4, 76-88. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (2000).
- [10] Bejarano P A, Baughman R P, Biddinger P W, Miller M A, Fenoglio-Preiser C, Al-Kafaji B, Di Lauro R und Whitsett J A. Surfactant proteins and Thyroid Transcription Factor-1 in pulmonary and breast carcinomas. *Mod Pathol* 9 (1996) (4) 445–452.
- [11] Betz C, Papadopoulos T, Buchwald J, Dämmrich J und Müller-Hermelink K. Sufactant protein gene expression in metastatic and micrometastatic pulmonary adenocarcinomas and other non-small cell lung carcinomas: detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 55 (1995) 4283–4286.
- [12] Bhattacharjee A, Richards W G, Staunton J, Li C, Monti S, Vasa P, aand J Beheshti C L, Bueno R, Gillette M, Loda M, Weber G, Mark E J, Lander E S, Wong W, Jhonson B E, Golub T R, Sugarbaker D J und Mayerson M. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *PNAS* 98 (2001) (24) 13790–13795.
- [13] Borron P, Veldhuizen R A W, Lewis J F, Possmayer F, Caveney A, Inchley K, MacFadden R G und Fraher L J. Surfactant associated



- protein-A inhibits human lymphocyte proliferation and IL-2 production. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15 (1996) 115–121.
- [14] Broers J L, Jensen S M, Travis W D, Pass H, Whitsett J A, Singh G, Katyal S L, Gazdar A F, Minna J D und Linnoila R I. Expression of surfactant associated protein-A and clara cell 10 kilodalton mRNA in neoplastic and non-neoplastic human lung tissue as detected by *in situ* hybridization. *Lab Invest* 66 (1992) (3) 337–346.
- [15] Chang T H und Szabo E. Induction of differentiation and apoptosis by ligands of peroxisome proliferator-aktivated Receptor  $\gamma$  in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 60 (2000) (4) 1129–1138.
- [16] Cheng G, Ueda T, Numao T, Kuroki Y, Nakajima H, Fukushima Y, Motojima S und Fukuda T. Increased levels of surfactant protein A and D in bronchoalveolar lavage fluids in patients with bronchial asthma. *Eur Respir J* 16 (2000) 831–835.
- [17] Chung J H, Kitaichi M, Ham E K und Seo J W. Immunohistochemical localization of surfactant apoproteins in usual interstitial pneumonia associated with pulmonary carcinoma. *Microsc Res Tech* 42 (1998) 234–238.
- [18] Clauß G und Ebner H. Grundlagen der Statistik für Psychologen, Pädagogen und Soziologen. Kap.2 und Kap.4. Verlag Harri Deutsch, Frankfurt a M (1972).
- [19] DeMartini J C, Bishop J V, Allen T E, Jassim F A, Sharp J M, de las Heras M, Voelker D R und Carlson J O. Jaagsiekte sheep retrovirus proviral clone JSRV(JS7), derived from the JS7 lung tumor cell line, induces ovine pulmonary carcinoma and is integrated into the surfactant protein A gene. *J Virol* 75 (2001) (9) 4239–4246.

- [20] Doyle J R, Bersten A D und Nicholas T E. Surfactant proteins-A and -B are elevated in plasma of patients with acute respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med* 156 (1997) 1217–1229.
- [21] Fisher J H, Kao F T, Jones C, White T, Benson B J und Mason R. The coding sequence for the 32.000-Dalton pulmonary surfactant-associated protein A is located on chromosome 10 and identifies two separate restriction-fragment-length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 40 (1987) (6) 503–511.
- [22] Floros J und Karinch A M. Human SP-A: then and now. *Am J Physiol* 268 (1995) L162–L165.
- [23] Floros J und Hoover R R. Genetics of the hydrophilic surfactant proteins A and D. *Biochim Biophys Acta* 1408 (1998) 312–322.
- [24] Floros J und Kala P. Surfactant proteins: molecular genetics of neonatal pulmonary diseases. *Annu Rev Physiol* 60 (1998) 365–384.
- [25] Gao E, Wang Y, McCormick S M, Li J, Seidner S R und Mendelson C R. Characterisation of two baboon surfactant protein A genes. *Am J Physiol* 271 (1996) L617–L630.
- [26] George T N und Snyder J M. Regulation of surfactant protein gene expression by retinoic acid metabolites. *Pediatr Res* 41 (1997) (5) 692–701.
- [27] Goldmann T, Galle J, Wiedorn K H, Deutschbein M E, Neuhaus M, Branscheid D und Vollmer E. Diagnostic value of immunohistochemically detected surfactant-apoprotein-A in malignant tumors located in the lungs: report of two cases. *Ann Diagn Pathol* 5 (2001) (2) 84–90.
- [28] van de Graaf E A, Jansen H M, Lutter R, Alberts C, Kobesen J, de Vries

- I J und Out T A. Surfactant protein A in bronchoalveolar lavage fluid. *J Lab Clin Med* 120 (1992) (2) 252–263.
- [29] Gregory T J, Longmore W J, Moxley M A, Whitsett J A, Reed C R, Fowler III A A, Hudson L D, Maunder R J, Crim C und Hyers T M. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 88 (1991) 1976–1981.
- [30] Gudas L J. Retinoids and vertebrate development. *J Biol Chem* 269 (1994) 15399–15402.
- [31] Hachiya T, Honda T, Kubo K und Sekiguchi M. Expression patterns of type II pneumocyte apical surface glycoconjugates in lung adenocarcinoma cells. *Virchows Arch* 434 (1999) 63–69.
- [32] Hamm H, Luhrs J, Guzman y Rotaeche J, Costabel U, Fabel H und Bartsch W. Elevated surfactant protein A in bronchoalveolar lavage fluids from sarcoidosis and hypersensitivity pneumonitis patients. *Chest* 106 (1994) (6) 1766–1770.
- [33] Hartshorn K L, Crouch E, White M R, Colamussi M L, Kakkanatt A, Tauber B, Shepherd V und Sastry K N. Pulmonary surfactant proteins A and D enhance neutrophil uptake of bacteria. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 274 (1998) L958–L969.
- [34] Hickling T P, Sim R B und Malhotra R. Induction of TNF- $\alpha$  release from human buffy coat cells by *Pseudomonas aeruginosa* is reduced by lung surfactant protein A. *FEBS Lett* 437 (1998) 65–69.
- [35] Honda Y, Kuroki Y, Shijubo N, Fujishima T, Takahashi H, Hosoda K, Akino T und Abe S. Aberrant appearance of lung surfactant protein A in sera of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and its clinical significance. *Respiration* 62 (1995) (2) 64–69.

- [36] Hoover R R und Floros J. Organization of the human SP-A and SP-D loci at 10q22-q23. Physical and radiation hybrid mapping reveal gene order and orientation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18 (1998) 353–362.
- [37] Hoover R R, Thomas K H und Floros J. Glucocorticoid inhibition of human SP-A1 promoter activity in NCI-H441 cells. *Biochem J* 340 (1999) 69–76.
- [38] Hoover R R und Floros J. SP-A 3'-UTR is involved in the glucocorticoid inhibition of human SP-A gene expression. *Am J Physiol* 276 (1999) L917–L924.
- [39] Hoppe H J und Raid K B M. Collectins - soluble proteins containing collagenous regions and lectin domains - and their roles in innate immunity. *Protein Science* 3 (1994) 1143–1158.
- [40] Ishida K, Zhu B L, Quan L, Fujita M Q und Maeda H. Pulmonary surfactant-associated protein A levels in cadaveric sera with reference to the cause of death. *Forensic Sci Int* 109 (2000) 125– 133.
- [41] Ishida K, Zhu B L und Maeda H. Novel approach to quantitative transcription PCR assay of mRNA component in autopsy material using the TaqMan fluorescent detection system : dynamics of pulmonary surfactant apoprotein A. *Forensic Sci Int* 113 (2000) 127–131.
- [42] Ishida K, Zhu B L und Maeda H. A quantitative RT-PCR of surfactant-associated protein A1 and A2 mRNA transcripts as a diagnostic tool for acute asphyxial death. *Legal Medicine* 4 (2002) (1) 7–12.
- [43] Islam K N und Mendelson C R. Potential role of nuclear factor  $\kappa$ B and reactive oxygen species in cAMP and cytokine regulation of surfactant protein-A gene expression in lung type II cells. *Mol Endocrinol* 16 (2002) (6) 1428–1440.

- [44] Jobe A H und Ikegami M. Surfactant and acute lung injury. Proceedings of the Association of American Physicians 110 (1998) (6) 489–495.
- [45] Johansson J, Curstedt T und Robertson B. The proteins of the surfactant system. Eur Respir J 7 (1994) 372–391.
- [46] Johansson J und Curstedt T. Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components. Eur J Biochem 244 (1997) 675–693.
- [47] Karinch A M und Floros J. 5'Splicing and allelic variants of the human pulmonary surfactant protein A gene. Am J Respir Cell Mol Biol 12 (1995) 77–85.
- [48] Karinch A M, deMello D E und Floros J. Effect of genotype on the levels of surfactant protein A mRNA and on the SPA2 splice variants in adult humans. Biochem J 321 (1997) 39–47.
- [49] Katyal S L, Singh G und Locker J. Characterization of a second human pulmonary surfactant-associated protein SP-A gene. Am J Respir Cell Mol Biol 6 (1992) 446–452.
- [50] Kaufmann O und Dietel M. Thyroid transcription factor-1 is the superior immunohistochemical marker for pulmonary adenocarcinomas and large cell carcinomas compared to surfactant proteins A and B. Histo-pathology 36 (2000) 8–16.
- [51] Kayser K und Hagemeyer O. Natural and synthetic mineral fibers affecting man. S.22-25. F A Brockhaus AG , B I Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich (1994).
- [52] Kitamura H, Kameda Y, Ito T, Hayashi H, Nakamura N, Nakatani Y, Inayama Y und Kanisawa M. Cytodifferentiation of atypical adenomatous

- hyperplasia and bronchoalveolar lung carcinoma: immunohistochemical and ultrastructural studies. *Virchows Arch* 431 (1997) 415–424.
- [53] Kumar A R und Snyder J M. Differential regulation of SP-A1 and SP-A2 genes by cAMP, glucocorticoids, and insulin. *Am J Physiol* 274 (1998) L177–L185.
- [54] Kuroki Y, Takahashi H, Chiba H und Akino T. Surfactant proteins A and D: disease markers. *Biochem et Biophys Acta* 1408 (1998) 334–345.
- [55] Lewis J F und Jobe A H. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 147 (1993) 218–233.
- [56] Li J, Gao E, Seidner S R und Mendelson C R. Differential regulation of baboon SP-A1 and SP-A2 genes : structural and functional analysis of 5-flanking DNA. *Am J Physiol* 275 (1998) L1078–L1088.
- [57] Lin Z, Pearson C, Chinchill V, Pietschmann S, Luo J, Pison U und Floros J. Polymorphisms of human SP-A, SP-B and SP-D genes: association of SP-B Thr131Ile with ARDS. *Clin Genet* 58 (2000) 181–191.
- [58] Mason R J, Greene K und Voelker D R. Surfactant protein A and surfactant protein D in health and disease. *Am J Physiol* 19 (1998) L1–L13.
- [59] McCormack F X, King Jr T E, Voelker D R, Robinson P C und Mason R J. Idiopathic pulmonary fibrosis. Abnormalities in the bronchoalveolar lavage content of surfactant protein A. *Am Rev Respir Dis* 144 (1991) (1) 160–166.
- [60] McCormack F X, King Jr T E, Bucher B L, Nielsen L und Mason R J. Surfactant protein A predicts survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 152 (1995) (2) 751–759.

- [61] McCormick S M, Boggaram V und Mendelson C R. Characterization of mRNA transcripts and organisation of human SP-A1 and SP-A2 genes. *Am J Physiol* 266 (1994) L354–L366.
- [62] McCormick S M und Mendelson C R. Human SP-A1 and SP-A2 genes are differently regulated during development and by cAMP and glukocorticoids. *Am J Physiol* 266 (1994) L367–L374.
- [63] McCormick C und Freschney R. Activity of growth factors in the IL-6 group in the differentiation of human lung adenocarcinoma. *Br J Cancer* 82 (2000) (4) 881–890.
- [64] McDoniels-Silvers A L, Nimri C F, Stoner G D, Lubet R A und You M. Differential gene expression in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 8 (2002) (4) 1127–1138.
- [65] Meert A P, Feoli F, Martin B, Verdebout J M, Mascaux C, Verhest A, Nidane V und Sculier J P. Ki67 expression in bronchial preneoplastic lesions and carcinoma *in situ* defined according to the new 1999 WHO/IASLC criteria: a preliminary study. *Histopathology* 44 (2004) 47–53.
- [66] Mendelson R und Boggaram V. Hormonal and developmental regulation of pulmonary surfactant synthesis in fetal lung. *Ballieres Clin Endocrinol Metab* 8 (1990) 241–266.
- [67] Miakotina O L, Dekowski S A und Snyder J M. Insulin inhibits surfactant protein A and B gene expression in the H441 cell line. *Biochem et Biophys Acta* 1442 (1998) 60–70.
- [68] Mori M, Tezuka F, Chiba R, Funae Y, Watanabe M, Nukiwa T und Takahashi T. Atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the human lung. *Cancer* 77 (1996) (4) 665–674.

- [69] Nacht M, Dracheva T, gao Y, Fujii T, Chen Y, Player A, Akmaev V, Cook B, Dufault M, Zhang M, Zhang W, Guo M, Curran J, Han S, Sidransky D, Buetow K, Madden S L und Jen J. Molecular characteristics of non-small cell lung cancer. PNAS 98 (2001) (26) 15203–15208.
- [70] von Neergaard K. Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik. Z Gesamte Exp Med 66 (1929) 373–394.
- [71] Nicholson A G, McCormick C J, Shimosato Y, Butcher D N und Sheppard M N. The value of PE-10, a monoclonal antibody against pulmonary surfactant, in distinguishing primary and metastatic lung tumours. Histopathology 27 (1995) 57–60.
- [72] Noguchi S, Aihara T, Nakamori S, Motomura K, Inaji H, Imaoka S und Koyama H. The detection of breast carcinoma micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Cancer 74 (1994) 1595–1600.
- [73] Pattle R E. Properties, function and origin of the alveolar lining layer. Nature 175 (1955) 1125–1126.
- [74] Pilling A M, Mifsud N A, Jones S A, Endersby-Wood H J und Turton J A. Expression of surfactant protein mRNA in normal and neoplastic lung of B6C3F1 mice as demonstrated by *in situ* hybridization. Vet Pathol 36 (1999) (1) 57–63.
- [75] Platt J A, Kraipowich N, Villafane F und DeMartini J C. Alveolar type II cells expressing jaagsiekte sheep retrovirus capsid protein and surfactant proteins are the predominant neoplastic cell type in ovine pulmonary adenocarcinoma. Vet Pathol 39 (2002) (3) 341–352.
- [76] Pourzand C und Cerutti P. Genotypic mutation analysis by RFLP/PCR. Mutat Res 288 (1993) 113–121.



- [77] Quiagen GmbH. RNeasy Mini Handbook. 2. Aufl. (1999).
- [78] Rinne H. Taschenbuch der Statistik. Kap A1-4. Verlag Harri Deutsch, Frankfurt a M, 2. Aufl. (1997).
- [79] Robbins S L I, Kumar V und Cotran R S. Pathologic basis of disease. Chapter 15, 720-728. W B Saunders Company, The Curtis Center Philadelphia , Pennsylvania , USA, 5. Aufl. (1994).
- [80] Rossi G A, Balbi B, Benatti U, Morelli A, Sacco O, Vassallo F und Ravazzoni C. Changes in pulmonary surfactant composition following MACC chemotherapy for lung carcinoma. Eur J Respir Dis 71 (1987) 400–409.
- [81] Rossi G, Cavazza A, Sturm N, Migaldi M, Facciolongo N, Longo L, Maiorana A und Brambilla E. Pulmonary carcinomas with pleomorphic, sarcomatoid or sarcomatous elements: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 75 cases. Am J Surg Pathol 27 (2003) (3) 311–324.
- [82] Rubio S, Lacaze-Masmonteil T, Chailley-Heu B, Kahn A, Bourbon J und Ducroc R. Pulmonary surfactant protein A (SP-A) is expressed by epithelial cells of small and large intestine. J Biol Chem 270 (1995) (20) 12162–12169.
- [83] Scheid P. Lehrbuch der Physiologie. Kap. 10 , 214-264. R Klinke und S Silbernagel, Thieme: Stuttgart; New York, 2. Aufl. (1996).
- [84] Scheinert P. Elektrophoresesysteme für Nucleinsäuren und Gelfärbemethoden. BioTec 3 (1996) 47–49.
- [85] Seifart C, Seifart U, Plagens A, Wolf M und von Wichert P. Surfactant

- protein B gene variations enhance susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in German patients. *Br J Cancer* 87 (2002) 212–217.
- [86] Sheppard M N. Specific markers for pulmonary tumors. *Histopathology* 36 (2000) 273–276.
- [87] Smith M J, Roulsculp M D, Goldsmith K T, Curiel D T und Garver Jr R I. Surfactant protein A-directed toxin gene kills lung cancer cells in vitro. *Hum Gene Ther* 5 (1994) (1) 29–35.
- [88] Spiegel M R. Statistik. Kap. 3 und Kap. 4. McGraw-Hill (Schaum's Outline) Hamburg , New York (u.a) (1990).
- [89] Sugiyama K, Kawai T, Nakanishi K und Suzuki M. Histochemical reactivities of lecithins and surfactant apoprotein in pulmonary adenocarcinomas and their metastases. *Mod Pathol* 5 (1992) (3) 273–276.
- [90] TenHave-Opbroek A A W, Shi X B und Gumberlock P H. 3-Methylchloranthrene triggers the differentiation of alveolar tumor cells from canine basal cells and altered *p53* gene promotes their clonal expansion. *Carcinogenesis* 21 (2000) (8) 1477–1484.
- [91] Thomas C, Gebert G und von Wichert P. Spezielle Pathologie. Kap. 5, 138-145. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, New York (1996).
- [92] Veldhuizen R A W, McCaig L A, Akino T und Lewis J F. Pulmonary surfactant subfractions in patients with the Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 152 (1995) 1867–1871.
- [93] Wang G, Guo X und Floros J. Human SP-A 3'-UTR variants mediate differential gene expression in basal levels and in response to dexamethasone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284 (2003) (5) L738–L748.

- [94] White R T, Miller D D J, Spratt K, Schilling J, Hawgood S, Benson B und Cordell B. Isolation and characterization of the human pulmonary surfactant apoprotein gene. *Nature* 317 (1985) 361–363.
- [95] Zamecnik J und Kodet R. Value of thyroid transcriptionfactor-1 and surfactant apoprotein A in the differential diagnosis of pulmonary carcinomas: a study of 109 cases. *Virchows Arch* 440 (2002) (4) 353–361.
- [96] Zhu B L, Ishida K, Quan L, Fujita M Q und Maeda H. Immunohistochemistry of pulmonary surfactant apoprotein A in forensic autopsy: reassessment in relation to the causes of death. *Forensic Sci Int* 113 (2000) 193–197.

# Anhang A

## Material

### A.1 Materialliste Reagenzien

#### RNA-Extraktion

RNeasy Mini Kit (50), 74104 Qiagen GmbH Hilden  
Ethanol Absolut reinst 2,5 Ltr., 1.00986.2500 Merck KGaA, Darmstadt

#### cDNA-Synthese

Gibco DNase I Amplification Grade, 18068015 Invitrogen GmbH, Karlsruhe  
Gibco SuperScript II, 18068015 Invitrogen GmbH, Karlsruhe  
EDTA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München  
Oligo(dT), MWG-Biotech GmbH, Ebersberg  
dNTP Kit, 4x25  $\mu$ mol dATP, dTTP, dGTP, dCTP, Hybaid GmbH, Heidelberg

#### RT-PCR

Gibco Taq-DNA-Polymerase, 18038-026 (inclusive  $\text{MgCl}_2$  & 10-fach Puffer)  
Invitrogen GmbH, Karlsruhe

dNTP Kit, 4x25  $\mu\text{mol}$  dATP, dTTP, dGTP, dCTP, Hybaid GmbH, Heidelberg

Primer SPAREFOR 0,2  $\mu\text{M}$ , MWG-Biotech GmbH, Ebersberg

Primer SPAREREV 0,2  $\mu\text{M}$ , MWG-Biotech GmbH, Ebersberg

## Agarosegelelektrophorese

Agarose 500 gr Molecular Biology Grade EP, 0010-05 Eurogentec Deutschland GmbH, Köln

Gibco Ethidium-Bromid, 15585-011 Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Längenstandard Smartladder SF 200 lanes, MW- 1800-02 Eurogentec Deutschland GmbH, Köln

TAE-Puffer 1-fach

## Enzymatische Restriktion

*Nhe* I 500U, R0131S New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Ts. (incl. Puffer & BSA)

*Dde* I 500U, R0175S New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Ts. (incl. Puffer)

## A.2 Puffer und Lösungen

### DEPC-Wasser

Mit Diäthylpyrokarbonat (DEPC = *diethyl pyrocarbonate*) behandeltes Wasser: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

### TAE-Puffer (50-fach)

für 1 Liter:

- 242 g Tris-Base (Endkonzentration von 40 mM) entspricht Trispuffer 99+% ( $C_4H_{11}NO_3$ ) (Cat.No.: T8524) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- 40 ml 0,5 M EDTA, pH = 8 (Endkonzentration von 2 mM)
  - 0,5 M EDTA angesetzt aus Titriplex III (Ethylendinitrilotetra-essigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat) für die Molekularbiologie ( $M(C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2 H_2O) = 372,24 \text{ g mol}^{-1}$ ) von Merck KGaA, Darmstadt (Best.Nr.: 8.19040.0100)
- + 750 ml Aqua dest.
- Zugabe von Essigsäure zur Einstellung von pH = 7,5 (entspricht 57,1 ml)
- Auf eine Gesamtmenge von 1 Liter mit Aqua dest. auffüllen.
- Autoklavierung

### TAE-Puffer (1-fach)

für 2 Liter:

- 1960 ml Aqua dest.
- 40 ml 50-fach TAE-Puffer
- Autoklavierung

## Lysis-Puffer RLT

Ansatz laut Herstellerangaben [77]:

- 10  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol per 1 ml RLT (RNeasy Mini Kit, Qiagen GmbH Hilden)

## dNTP's

für 100  $\mu\text{l}$ :

- 60  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser
- je 10  $\mu\text{l}$  10 mM pH neutral dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Hybaid GmbH, Heidelberg)

## A.3 Geräte

Palletmixer Ultra Turrax, Janke & Kunkel Ika-Werk, Staufen  
Photometer Gene Quant pro, Amersham pharmacia biotech, Bucks, GB  
PCR-Cycler Biometra UNO Thermoblock, biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen  
Elektrophoresekammer Biometra Minicell Power Pack, biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen

## A.4 Software

Band Leader programmiert von Ma'ayan Aharoni und vertrieben von Tech-Knowledge, Copyright 1993-1994  
Microsoft Programm Excel (Version 97)

# Anhang B

## Sequenzen

### B.1 RT-PCR Produkt Sequenz

SP-A-310 bp Forward:

```
GNNNNNNNGNNNNNNNNNNNAGNNNNCNTNATGCANTCGCTNTCGGAANTTGATCTGCTGTGGACAGCTATTAC
NATTCTCTCAGNTCNAAAAATACTNCCAGAANTGTTNCTATNCACCGAGGNTATTGNCTGAGCACCTATCATTG
TGGCAAGACACCTTNNCCAGAACTTCTNATACAGGATATTATGTACNATTCAATCTTTNCACNATNNNCGGGN
CCCNTATTGGNTGCTCNTTTTTTATANNAGNCTGAANCTTNNAGGNGNGNAANGNGNTGAGNNTNATTCNCA
GAGCNCGANNNNGAAAGCTGGGGACANANCCATNTTCTANAA
```

```
NNNNGCCTTGCACTNGCTCTCTGAATANNCTNAAACATTTAACTCCTCNAGCTTCAGTGTCTTATAAAAAAT
GAGGAAACAATACTGGTCCCGTGACATTGTGTAAAGATTGAATAGTACATAATATGCTGNATTAGAAGTGCTTG
TCAAGGNTCTTGGCAAATGATAGGTGCTCAGTCAATAGCCTCTGTGTATAGTAACAGNTCTGGTAGTAATTTTG
GNAGCTGGGGGATGGNAATAACTGTGACAGCAACAAGTATCTTATTCCCATTTACAGATGAAGANACACCCC
TNTTCTANAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTNNNNNNNNNN
```

Blast-Search Ergebnis (Vergleich der Sequenzen mit der Gendatenbank):

```
Human pulmonary surfactant apoprotein (PSAP) gene,
complete cds Length = 4778
Score = 91.7 bits (46), Expect = 7e-16
Identities = 98/116 (84%), Gaps = 2/116 (1%)
Strand = Plus / Plus
```







```

Query: 113   cgtgacnttgggtaaagantgnatngtacntnatatgcnggattanaaggccttgncaag 172
            ||||| ||| ||||| || || ||| | ||||| | ||| ||| ||||| |||
Sbjct: 14631 cgtgacattgtgtaaagattgaatagtacataaatatgctgtattagaagtgcttgtcaag 14572

Query: 173   ggtnttggnaantgatangngcnnagncaataaccnntgnggatagtaacnggnntggta 232
            | | |||| || ||||| | || || ||||| || || | ||||| || | |||||
Sbjct: 14571 gttcttgcaaatgataggtgctcagtcaatagcctctgtgtatagtaacagttctggta 14512

Query: 233   gnaattttgg 242
            | |||||
Sbjct: 14511 gtaattttgg 14502

```

Homo sapiens surfactant, pulmonary-associated protein A2 (SFTPA2) gene,  
complete cds Length = 18039  
Score = 81.8 bits (41), Expect = 7e-13  
Identities = 77/90 (85%), Gaps = 1/90 (1%)  
Strand = Plus / Minus

```

Query: 53     aacatttaactcctccaagcttcagtgtccttataaaaaa-tgaggaaacnatnctggnc 111
            ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 16497 aacatttcactcctctaagcttcagtgtccttataaaaaattgggtaaacactggtc 16438

Query: 112    ccgtgacnttgggtaaagantgnatngtac 141
            ||||| ||| ||||| || || |||
Sbjct: 16437 ccgtgacattgtgtaaagattgaatagtac 16408

```

## B.2 Restriktionsbande 310 bp

Die RT-PCR-Bande mit einer Größe von 310 bp wurde durch das Restriktionsenzym *Dde* I teilweise nicht vollständig geschnitten und mittels Sequenzanalyse untersucht. Der Vergleich der Sequenz in der Blast-Search ergibt eine Übereinstimmung mit dem SP-A1-Gen, dem SP-A2-Gen und dem humanen Surfactant-Apoprotein-Gen.



```
Query: 67      aaaaaatgaggaaacnatacngggcccngacnntgngnaaagantgnatngnacnntat 126
              ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 14657  aaaaaatgaggaaacaataactggtcccgtgacattgtgtaaagattgaatagtacataat 14598

Query: 127     atgcnggattanaaggnccttggcaagggtctnggcnantgatangncnaggcaatanc 186
              ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 14597  atgctgtattagaagtgcttgtcaagggttcttggcaaatgataggtgctcagtcaatagc 14538

Query: 187     cntgggnatagtaacnggtctgggagnaantttgg 222
              | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 14537  ctctgttatagtaacagttctggtagtaattttg 14502
```

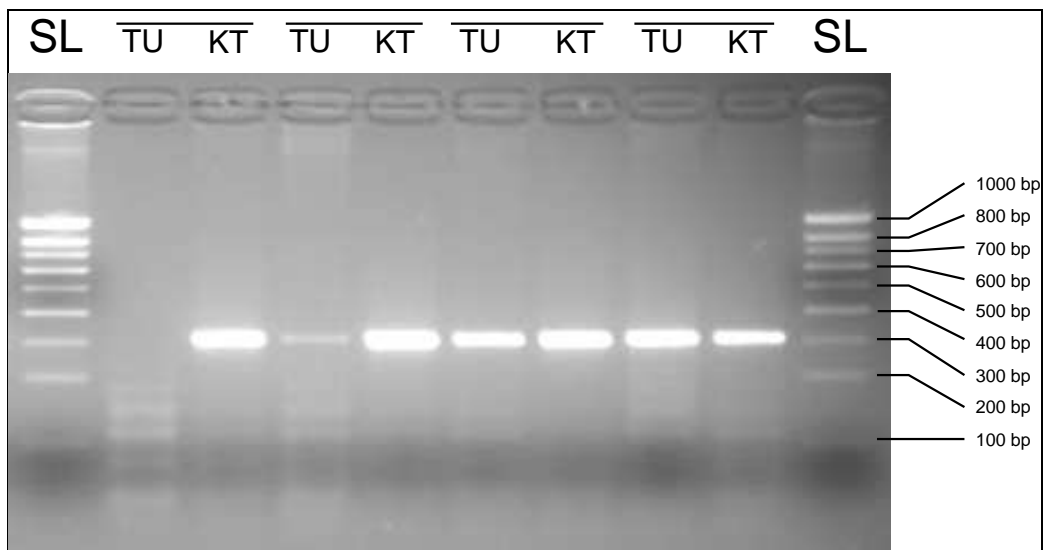
Homo sapiens surfactant, pulmonary-associated protein A2 (SFTPA2) gene,  
complete cds Length = 18039  
Score = 75.8 bits (38), Expect = 4e-11  
Identities = 58/64 (90%), Gaps = 1/64 (1%)  
Strand = Plus / Minus

```
Query: 11      ttgctctctggaataaanactnaaa-catttaactcctccaagcttcagtgctcctataaa 69
              ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 16520  ttgctctctggaataaacactcaaacatttcactcctctaagcttcagtgctcctataaa 16461

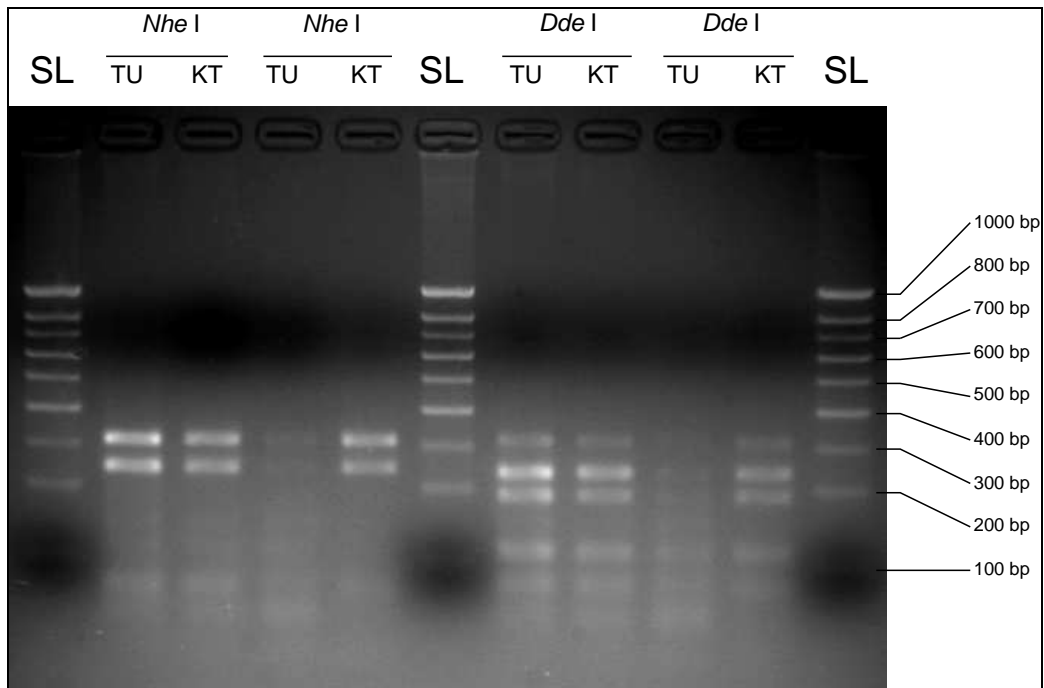
Query: 70      aat 73
              |||
Sbjct: 16460  aat 16457
```

## Anhang C

### Abbildungen der Agarosegelelektrophoresegele



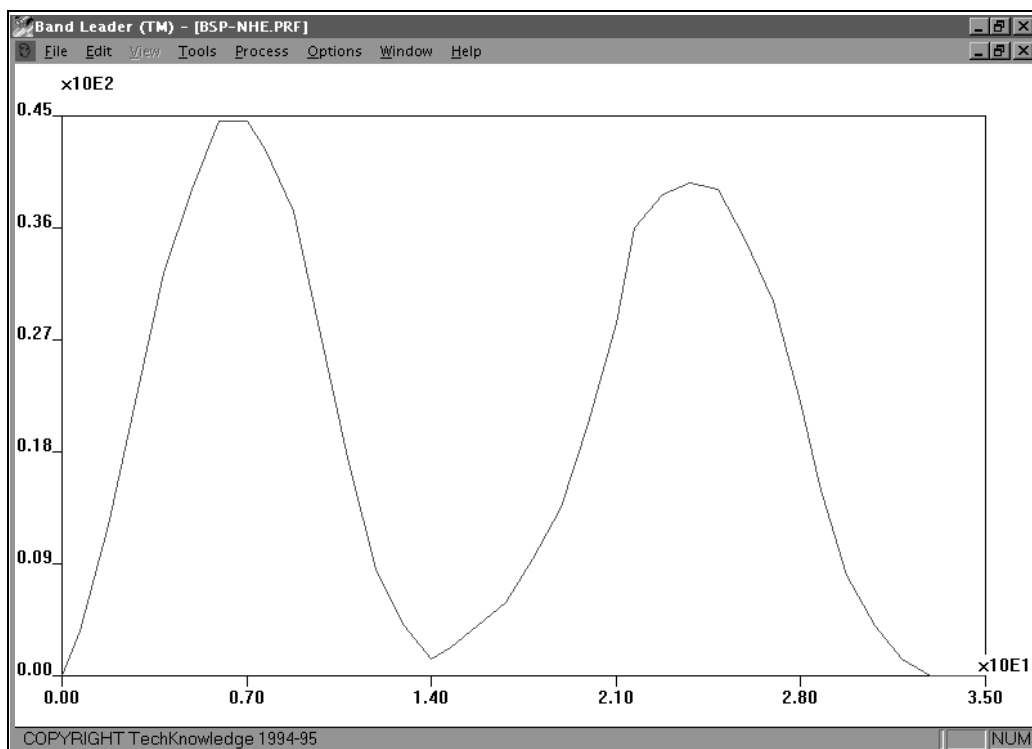
**Abb. 6:** Agarosegelelektrophorese-Bild mit Proben der RT-PCR SP-A (310 bp). Die zusammengehörigen Proben eines Patienten sind mit Balken markiert. SL = Smartladder SF (Längenstandard), TU = Probe eines Tumorgewebes, KT = Probe eines tumorfrees Gewebes



**Abb. 7:** Agarosegelelektrophorese-Bild von den Proben zweier Patienten in den Restriktionen mit *Nhe* I und *Dde* I. Banden *Nhe* I: erste Bande = SP-A2 (310 bp), zweite Bande = SP-A1 (248 bp), dritte Bande = SP-A1 (62 bp). Banden *Dde* I: erste Bande = nicht geschnittene Anteile (310 bp), zweite Bande: SP-A1 (248 bp), dritte Bande = SP-A2 (200 bp), vierte Bande = SP-A2 (110 bp), fünfte Bande = SP-A1 (70 bp). Die zusammengehörigen Proben eines Patienten sind mit Balken markiert. SL = Smartladder SF (Längenstandard), TU = Probe eines Tumorgewebes, KT = Probe eines tumorfreien Gewebes.

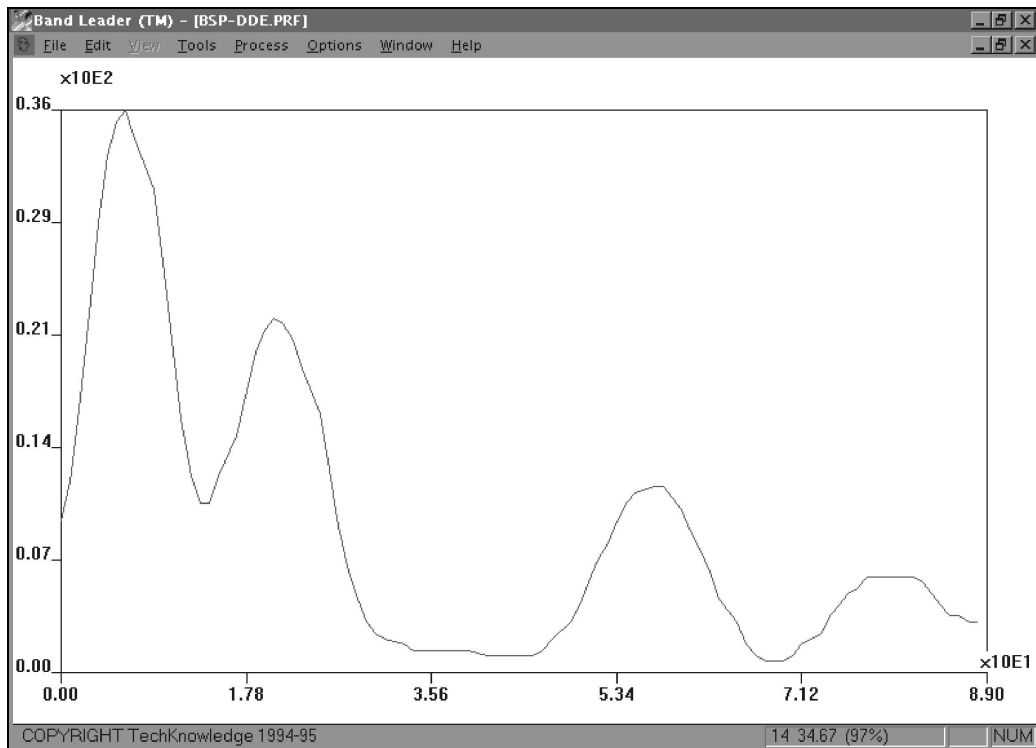
## Anhang D

### Abbildungen der Band Leader-Profile



**Abb. 8:** Band Leader-Profil einer Probe in der Restriktion mit *Nhe* I. Das erste Maximum stellt das Profil der Intensitäten in der Bande für SP-A2 (310 bp) dar; das zweite Maximum repräsentiert die Intensitäten der Bande für SP-A1 (248 bp).





**Abb. 9:** Band Leader-Profil einer Probe in der Restriktion mit *Dde* I. Das erste Maximum stellt das Profil der Intensitäten in der Bande für SP-A1 (248 bp) dar; das zweite Maximum repräsentiert die Intensitäten der Bande für SP-A2 (200 bp). Das folgende Minimum entspricht der Hintergrund-Intensität zwischen den großen und den kleinen Fragmenten der Restriktion. Das dritte Maximum steht für die Bande des kleinen SP-A2-Fragmentes (110 bp); das vierte Maximum für die Bande des kleinen SP-A1-Fragmentes (70 bp).

# Danksagung

Meinem Doktorvater und Institutsleiter Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. vet. E. Vollmer danke ich für die Überlassung des Themas, für die Möglichkeit die Experimente selbständig durchzuführen sowie für die allzeit bestehende Kommunikationsmöglichkeit.

Meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Thorsten Goldmann danke ich für seine Unterstützung bei dem Erlernen der molekularpathologischen Methoden, für seine beispiellose Hilfsbereitschaft und konstruktive Kritik.

Frau Heike Kühl danke ich im Besonderen für die freundliche Einarbeitung im Laborbetrieb und zahlreiche hilfreiche Ratschläge, die sich als unschätzbar wertvoll erwiesen.

Dem gesamten Team des Institutes für Pathologie des Forschungszentrums Borstel danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit.

Den Mitarbeitern des Institutes für Mykobakteriologie des Forschungszentrums Borstel, insbesondere Frau Dr. E. Richter und Herrn Dr. S. Niemann gilt mein Dank für die Sequenzierungen der PCR- und Restriktionsprodukte und Rat in molekularbiologischen Fragen.

Meinem Partner Lars H. Böttger danke ich für seine unermeßliche Hilfe in programmiertechnischen und mathematischen Fragen und die stetige liebevolle moralische Motivation.

Meiner ärztlichen Kollegin Frau Marion Rapp danke ich für die Durchsicht der Manuskripte und die kreativen Hinweise.

Meiner Familie und meinen engsten Freunden danke ich für den sozialen Rückhalt, der mich durch Studium und Promotion begleitet hat.

# Lebenslauf

Name: Stoffers, Michaela

Geboren: 13.03.1976 in Bad Segeberg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1982-1986: Grundschule in Bargfeld-Steegen  
1986-1992: Dietrich Bonhoeffer Realschule in Bargtheide  
1992-1995: Keisgymnasium Bargtheide I

Schulabschluß: Allgemeine Hochschulreife

01.01.-25.01.1996: SanOA der Luftwaffe in Bayreuth  
15.02.-12.04.1996: Krankenpflegepraktikum  
08.1996 - 07.1997: Freiwilliges Soziales Jahr (DRK Schleswig-Holstein)

Studium: 09.09.1997: Immatrikulation an der MU Lübeck  
22.09.1999: Ärztliche Vorprüfung  
29.08.2000: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
20.09.2002: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
30.10.2003: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

September 2000: Beginn der Doktorarbeit am Institut für Pathologie des  
Forschungszentrum Borstel unter Leitung  
von Prof. Dr.med. Dr.med.vet. E. Vollmer

ab 15.03.2004: ÄIP in der Abteilung für Chirurgie  
der Asklepiosklinik Bad Oldesloe

Seit 01.10.2004: Assistenzärztin in der Abteilung für Chirurgie  
der Asklepiosklinik Bad Oldesloe  
(Chefarzt PD Dr.med. G. Fröschle)

## Publikation

Stoffers M., Goldmann T., Brandscheid D., Galle J., Vollmer E. Transkriptionelle Aktivität der Surfactant-Apoproteine A1 und A2 in nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen und tumorfreien Lungengeweben. *Pneumologie* 58 (2004) 395-399

# Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.

Borstel, den 10. September 2004

M. Stoffers