

---

**Differentielle Proteomanalyse von bronchoalveolärer  
Lavage-Flüssigkeit und Lungengewebe zur Identifizierung  
potentieller Biomarker für Atemwegserkrankungen  
beim Schwein**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.  
genehmigte Dissertation  
von

**Diplom-Biologe Dennis Kahlisch**

geboren am 16.09.1978 in Bremerhaven

Hannover 2009

Referent: Prof. Dr. H. Y. Naim

1. Korreferent: Prof. Dr. G.- F. Gerlach

2. Korreferent: Prof. Dr. Bernhard Huchzermeyer

Tag der Promotion: 10.08.2009

*Der unermesslich reichen, stets sich erneuernden Natur gegenüber  
wird der Mensch, soweit er auch in der wissenschaftlichen Erkenntnis  
fortgeschritten sein mag, immer das sich wundernde Kind bleiben und  
muss sich stets auf neue Überraschungen gefasst machen*

Max Planck (1858-1947)

*Meinen Eltern und  
Leila*

## **Differentielle Proteomanalyse von bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit und Lungengewebe zur Identifizierung potentieller Biomarker für Atemwegserkrankungen beim Schwein**

Dennis Kahlisch

Akute Atemwegserkrankungen sind ein schwerwiegendes Problem in der Schweineproduktion. Die bisherige Diagnose von respiratorischen Krankheiten basiert auf serologischen, kulturabhängigen oder PCR-vermittelten erregerspezifischen Nachweisen, die aufgrund ihrer häufig niedrigen diagnostischen Sensitivität bei sehr hoher diagnostischer Spezifität zwar gut für die Herdendiagnostik geeignet sind aber nur eingeschränkt Hinweise auf den Status einzelner Tiere liefern können. Weiterhin beschränkt sich die Diagnose von Infektionen nur auf die Untersuchung von bereits bekannten Pathogenen. Daher ist eine Identifizierung von Biomarkern zur Erkennung von atemwegsgesunden Schweinebeständen bei gleichzeitigem Ausschluss von chronischen und latenten Atemwegsinfektionen von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Der Einsatz derartiger Biomarker würde zu einer deutlichen Verbesserung der diagnostischen Vorgehensweise führen und somit einen erheblichen Beitrag zu einer besseren Beurteilung der Tiergesundheit leisten. Darüber hinaus erfordert eine nachhaltige Verbesserung der Lungengesundheit ein umfassendes Verständnis der molekularen Mechanismen, die bei der Pathogenese von Infektionskrankheiten eine wichtige Rolle spielen. In diesem Zusammenhang beschreiben frühere Studien eine Beteiligung von „Lipid Rafts“ in der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen.

In dieser Studie wurde ein standardisiertes Infektionsmodell mit *Actinobacillus pleuropneumoniae* eingesetzt. **Im ersten Teil der Arbeit** wurde das Proteom der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit von gesunden, akut infizierten und chronisch infizierten Tieren aus drei verschiedenen Zuchtlinien (Deutsche Landrasse, Piétrain und Hampshire) miteinander verglichen. Da Glykoproteine bei Prozessen der angeborenen Immunabwehr eine wichtige Rolle spielen, wurde die vorangegangene Studie von Hennig-Pauka et al. (Hennig-Pauka et al. 2006) dahingehend weitergeführt, dass spezifisch die glykosylierten BALF-Proteine untersucht wurden. Dabei wurden insgesamt zwölf differentiell exprimierte Glykoproteine identifiziert (Alpha-1-saures Glykoprotein, Fetuin A, Properdin, Haptoglobin Prekursor, Haptoglobin, Hämoglobin, Hyaluronidase, Inter-alpha trypsin inhibitor family heavy chain-related protein, Alpha-1-Antichymotrypsin 3, Surfactant-assoziiertes Protein D, Transferrin und Alpha-1B-Glykoprotein). Unter diesen Glykoproteinen wurde

Fetuin A aufgrund seines erniedrigten Spiegels bei chronisch kranken Tieren als ein potentieller Marker für chronische Infektionen identifiziert; das Protein Hyaluronidase stellte aufgrund seiner erhöhten Expression bei allen infizierten Schweinen - unabhängig von ihrem klinischen Gesundheitszustand - einen potentieller Marker für latente Infektionen dar. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Spiegel des Proteins Fetuin A erhöht und die Spiegel der Proteine Haptoglobin und Surfactant-assoziiertes Protein D bei den Tieren der Zuchtlinie Hampshire vor der Infektion erniedrigt waren; da die Tiere dieser Zuchtlinie keine Klinik entwickelten, könnten diese Proteine Biomarker darstellen, die potentiell Anwendung als Selektionsmarker in Zuchtprogrammen auf verbesserte Lungengesundheit finden könnten.

**Im zweiten Teil der Arbeit** wurden Gewebeproben auf Proteine untersucht, die während der Infektion eine veränderte Assoziation mit „Lipid Rafts“ aufwiesen. Dabei wurden zwei Proteine identifiziert (Laktoferrin und S100 A9), die in der akuten Krankheitsphase verstärkt in „Lipid Rafts“ aus verändertem Lungengewebe zu finden waren. Aufgrund der fehlenden Charakterisierung der Assoziation von Laktoferrin mit „Lipid Rafts“ wurde die cDNA dieses Proteins mit Hilfe eines eukaryotischen Expressionsvektors in MDCK-Zellen rekombinant exprimiert und die Ursache dieser Bindung untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass es sich um eine reversible Bindung handelt, die in Bezug auf den Transport des Proteins zur Zelloberfläche eine Bedeutung zu haben scheint. Anhand von Experimenten mit einem Glykosylierungshemmer, bei denen keine Beeinträchtigungen der Assoziation beobachtet wurden, kann eine durch Lektin-Rezeptoren vermittelte Bindung an diese Membrandomänen ausgeschlossen werden. Die Beteiligung von anderen mit „Lipid Rafts“ verankerten Rezeptoren sowie die Bedeutung der Membranassoziation von Laktoferrin hinsichtlich seiner entzündungshemmenden Eigenschaften müssen noch weiter untersucht werden.

**Schlagnworte:** porcine Atemwegserkrankung, Glykoproteinanalyse, bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit, Biomarker

**Differential proteome analysis of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissue for the identification of potential biomarkers for respiratory diseases in swine**

Dennis Kahlisch

Acute respiratory diseases pose a severe problem in animal production. Current diagnostic approaches are based on serological, culture-dependent, or PCR-based methods and - due to their low sensitivity and high specificity – are almost exclusively applicable to herd diagnostics. For single individuals within the herd only restricted information on its health status can be gained. Furthermore the diagnosis of infections is limited to known pathogens. Therefore, the identification of biomarkers for the determination of healthy swine herds by simultaneous exclusion of chronic or latent respiratory diseases is of high economical interest. Hence, the use of appropriate biomarkers could substantially improve the diagnostic procedure and contribute to a better validation of animal health. Beyond that an effective improvement of lung health requires a comprehensive understanding of molecular methods acting as a part in the pathogenesis of infectious diseases. In this regard previous studies delineate an involvement of “Lipid Rafts” in the pathogenesis of a multitude of diseases.

In this work a standardised infection model for *Actinobacillus pleuropneumoniae* was applied. Regarding the **first part of the study**, the glycoproteome of the bronchoalveolar lavage fluid of healthy, acutely infected, and chronically infected animals of three different breeding lines (German Landrace, Piétrain and Hampshire) was compared with each other. In doing so, twelve differentially expressed glycoproteins could be identified (alpha-1-acid glycoprotein, fetuin A, properdin, haptoglobin precursor, haptoglobin, hemoglobin, hyaluronidase, inter-alpha trypsin inhibitor family heavy chain-related protein, alpha-1-antichymotrypsin 3, pulmonary surfactant-associated protein D, transferrin, and alpha-1B-glycoprotein). Fetuin A levels were consistently reduced in chronically infected pigs and, therefore, it presents a potential marker for chronic infection. Hyaluronidase levels were consistently high in all pigs after experimental infection independent of their clinical status; therefore, hyaluronidase may be suited as a potential marker for latent infection. Furthermore, high pre infection levels of fetuin A as well as low pre infection levels of haptoglobin and pulmonary surfactant-associated protein D (SP-D) correlated with the absence of clinical disease in pigs of the Hampshire breeding line; therefore, these proteins could gain potential use as selection markers in breeding programmes aimed at the selection of pigs with improved respiratory health.

In the **second part of this study**, proteins of lung tissue samples showing a modified association with “Lipid Rafts” during the infection were analysed. During these analyses, two proteins (lactoferrin, S100 A9) with an increased association to “Lipid Rafts” during the different stages of infection have been identified. Due to poor characterization of lactoferrin-“Lipid Rafts” interaction, we cloned the cDNA of the protein into an eukaryotic expression vector to investigate the cause for this association in MDCK cells. We observed that this interaction is reversible and appears to have an impact on the trafficking of the protein to the cell surface. Based on experiments employing inhibitors for glycosylation - which did not cause an impairment of association - a lectin-receptor mediated binding to these membrane domains can be excluded. The involvement of other “Lipid Raft”-anchored receptors as well as the relevance of membrane-association with respect to the anti-inflammatory properties of lactoferrin remain to be investigated.

**Key words:** porcine respiratory disease, glycoprotein analysis, bronchoalveolar lavage fluid, biomarker



# Inhaltsverzeichnis

<b>A</b>	<b>Einleitung</b>	17
<b>A 1</b>	<b>Respiratorische Erkrankungen in der Schweinezucht</b>	17
	A 1.1 Wirtschaftliche Bedeutung	17
	A 1.2 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	18
	A 1.3 Die Anwendung von Krankheitsmarkern beim Schwein	20
<b>A 2</b>	<b>Die Rolle bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) in der Pathogenese und Diagnostik</b>	22
	A 2.1 Zusammensetzung der BALF	22
	A 2.2 Die Bedeutung der BALF bei der Diagnostik respiratorischer Erkrankungen	24
	A 2.3 Proteomanalyse der BALF zur Identifizierung neuer Krankheitsmarker	25
<b>A 3</b>	<b>Zellbiologische Aspekte in der Pathogenese von Infektionskrankheiten</b>	26
	A 3.1 Zusammensetzung der „Lipid Rafts“	27
	A 3.2 Die Bedeutung von „Lipid Rafts“ bei der Pathogenese	28
<b>A 4</b>	<b>Zielsetzung</b>	31
<b>B</b>	<b>Material und Methoden</b>	32
<b>B 1</b>	<b>Methodischer Überblick</b>	32
<b>B 2</b>	<b>Chemikalien, Reagenzien und labortechnisches Equipment</b>	32
<b>B 3</b>	<b>Medien, Puffer und Lösungen</b>	32

<b>B 4</b>	<b>Durchführung des Tierversuchs und Probenentnahme</b>	33
	B 4.1 Herkunft und Unterbringung der Schweine	33
	B 4.2 Aufbau der Aerosol-Infektionskammer	34
	B 4.3 Bakterienstamm, Anzucht und Vorbereitung der Kultur für die Aerosolisierung	34
	B 4.4 Experimentelle Aerosol-Infektion mit <i>A. pleuropneumoniae</i>	34
	B 4.5 Untersuchung der Tiere vor und nach der Infektion	35
	B 4.6 Entnahme von bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit (BALF)	35
	B 4.7 Sektion der Tiere und Bestimmung des Lungenläsions-Scores	36
	B 4.8 Bakteriologische Untersuchung der Gewebeproben	37
<b>B 5</b>	<b>Proteomanalyse von BALF und Lungengewebe</b>	38
	B 5.1 Vorbereitung der Proteine	38
	B 5.1.1 Auswahl der Proben	38
	B 5.1.2 Isolierung der Glykoproteine aus BALF durch Lektin-Affinitätschromatographie	38
	B 5.1.3 Isolierung von Lipid Raft assoziierten Proteinen aus Gewebe	39
	B 5.1.4 Proteinbestimmung	39
	B 5.1.5 Ausfällung und Resuspension der Proteine	40
	B 5.1.6 Proteinmarkierung durch CyDye™	40
	B 5.2 1.Dimension: Isoelektrische Fokussierung	41
	B 5.3 2.Dimension: SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	41
	B 5.4 Detektion der Proteine	42
	B 5.4.1 Silberfärbung	42
	B 5.4.2 Kolloidale Coomassiefärbung	43
	B 5.4.3 Visualisierung fluoreszenzmarkierter Proteine durch einen Laserscanner	43
	B 5.5 Auswertung der Proteindaten	43
	B 5.5.1 Quantifizierung der Daten aus den 2-D Silbergelen	43
	B 5.5.2 Statistische Auswertung der Daten aus den 2-D Silbergelen	43

B 5.5.3	Quantifizierung der Daten aus den 2-D DIGE-Gelen	44
B 5.6	In-Gel Verdau der Proteine	44
B 5.7	Proteinidentifizierung durch MALDI-TOF MS oder ESI-Q-TOF MS/MS	44
<b>B 6</b>	<b>Zellbiologische Proteinanalytik</b>	46
B 6.1	Herstellung von cDNA und Klonierung in einen eukaryotischen Expressionsvektor	46
B 6.1.1	RNA-Isolierung aus Gewebe	46
B 6.1.2	Reverse Transkription der mRNA (cDNA-Synthese)	46
B 6.1.3	Amplifikation von DNA durch Polymerase- Kettenreaktion	47
B 6.1.4	Analyse von DNA-Fragmenten mittels Agarose- Gelelektrophorese	49
B 6.1.5	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	49
B 6.1.6	DNA-Restriktionsverdau	50
B 6.1.7	TOPO-Klonierung der cDNA	50
B 6.1.8	DNA-Sequenzierung	50
B 6.1.9	cDNA-Klonierung in einen eukaryotischen Expressionsvektor	50
B 6.1.10	Bakterienkultur und Isolierung von Plasmid-DNA	52
B 6.2	Zellkultur	52
B 6.2.1	Zellkulturbedingungen	52
B 6.2.2	Verwendete Zelllinie	53
B 6.2.3	Pflege der Zellkultur	53
B 6.2.4	Herstellung stabiler MDCK-Zelllinien	53
B 6.3	Isolierung von Lipid Raft assoziierten Proteinen aus Zellkulturen	54
B 6.4	Pulse-Chase mit anschließender Immunpräzipitation	54
B 6.5	1-D SDS-PAGE	55
B 6.6	Färben, Trocknen und Exponieren der Gele	56
B 6.7	Western Immunoblot Analyse	56
B 6.8	Inhibierung der Proteinglykosylierung durch Tunicamycin	57

B 6.9	Behandlung der Proteine mit Endoglykosidase H und F	58
B 6.10	Histopathologische Untersuchung von Lungengewebe	58
<b>C</b>	<b>Ergebnisse</b>	60
<b>C 1</b>	<b>Experimentelle Aerosol-Infektion mit <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i></b>	60
C 1.1	Ermittlung der empfänglichen Zuchtlinien für <i>A. pleuropneumoniae</i>	60
C 1.2	Bakteriologischer Befund des Lungengewebes	60
<b>C 2</b>	<b>Identifizierung von Glykoproteinen aus bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit (BALF)</b>	61
<b>C 3</b>	<b>Expressionsanalyse von BALF-Glykoproteinen während des Infektionsverlaufs</b>	63
C 3.1	Zuchtlinien-spezifische Regulation der Expression von BALF-Glykoproteinen an Tag 4 im Vergleich zu Tag -7	63
C 3.2	Zuchtlinien-spezifische Regulation der Expression von BALF-Glykoproteinen an Tag 20 im Vergleich zu Tag -7	64
C 3.3	Unterschiede in der Expression von BALF-Glykoproteinen zwischen verschiedenen Zuchtlinien an den Tagen -7, 4 und 20	67
<b>C 4</b>	<b>Expressionsanalyse Lipid-Raft assoziierter Proteine während der <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> - Infektion</b>	74
C 4.1	Identifizierung von Proteinen in „Lipid Rafts“	74
C 4.2	Histopathologische Untersuchung von Lungengewebe	78
C 4.3	Charakterisierung des Glykoproteins Laktoferrin	80
C 4.3.1	In-vitro Expression von rekombinantem Laktoferrin	80
C 4.3.2	Untersuchung der Transportkinetik während der Proteinreifung	85

C 4.3.3	Untersuchung der Assoziation von Laktoferrin mit unterschiedlichen Typen von „Lipid Rafts“ unter der Verwendung verschiedener Detergenzien	86
C 4.3.4	Bestimmung des Glykosylierungstypes von porzinem Laktoferrin	88
C 4.3.5	Bestimmung des Glykosylierungszustands von „Lipid Raft“ assoziiertem Laktoferrin	90
C 4.3.6	Analyse der „Lipid Raft“ Assoziation in Abhängigkeit von der Glykosylierung	92
<b>D</b>	<b>Diskussion</b>	95
D 1	Identifizierung potentieller Krankheitsmarker in bronchoalveolärer Lungenflüssigkeit (BALF)	96
D 2	Zellbiologische Untersuchung von „Lipid Raft“ assoziierten Proteinen	99
D 2.1	Die Bedeutung von S100 A9 bei akuten Entzündungsprozessen	99
D 2.2	Die Bedeutung von Laktoferrin und seiner Assoziation mit „Lipid Rafts“ bei akuten Entzündungsprozessen	101
<b>E</b>	<b>Referenzen</b>	105
<b>F</b>	<b>Anhang</b>	123
F 1	Abbildungsverzeichnis	123
F 2	Tabellenverzeichnis	125
<b>G</b>	<b>Lebenslauf</b>	126
<b>H</b>	<b>Publikationen</b>	128
<b>I</b>	<b>Danksagung</b>	129

## Abkürzungsverzeichnis

®	eingetragenes Warenzeichen
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
2D DIGE	zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese
2D-PAGE	zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>A.</i>	<i>Actinobacillus</i>
<i>A. pp.</i>	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
Abb.	Abbildung
ACHC	α-Cyano-Hydroxymimtsäure
Apx	<i>A. pleuropneumoniae</i> Exotoxin
ARDS	akutes progressives Lungenversagen
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BALF	bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit
BCA	Bicinchoninsäure
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BVE	Bundesvereinigung der Deutschen Ernährungsindustrie
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFU	colony forming unit (Kolonien bildende Einheit)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRM	Detergenz-resistente Membranen
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
Endo	Endoglykosidase
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektronenspray-Ionisation

## Abkürzungsverzeichnis

---

et al.	et alii
g	gramm oder Schwerebeschleunigung
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde(n)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IHRP	inter-alpha-trypsin Inhibitor family heavy chain-related Protein
IPG	immobilisierter pH Gradient
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
k	Kilo
kb	Kilo Basenpaar(e)
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
m	Milli
M	Molar
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation time of flight Massenspektrometrie
MDCK	Madin Darby Canine Kidney II
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
n	nano
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
ODxxx	optische Dichte bei xxx nm
p	Pico
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCV2	Circoviren Typ II

## Abkürzungsverzeichnis

---

pl	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPLO	Ein Nährsubstrat zur Züchtung von Organismen der Pleuropneumonia-(PPLO-)Gruppe
PRDC	porcine respiratory disease complex
PRRS	Porzines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q-TOF MS	Quadrupol time-of-flight Massenspektrometrie
RHS	Respiratory health score
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur oder revers transkribiert
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SOC	komplexes Nährmedium für die Transformation von Bakterien
SP-D	Surfaktant Protein D
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TM	Warenzeichen
TOF	time-of-flight
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vs.	versus
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp



## A Einleitung

### A 1 Respiratorische Erkrankungen in der Schweinezucht

#### A 1.1 Wirtschaftliche Bedeutung

Deutschland besitzt durch seine Tierzucht und Vermarktung eine bedeutende Stellung in der europäischen und globalen Fleischwirtschaft. Im Jahr 2005 betrug seine Beteiligung an der Weltfleischproduktion 2,6 Prozent und es stellte mit 16,7 Prozent einen Hauptteil der europäischen Fleischerzeugung (Spiller und Schulze 2008). Mit einem Umsatzanteil von über 20 Prozent ist die Fleischbranche der zurzeit wichtigste Sektor der deutschen Ernährungswirtschaft und liegt deutlich vor der Milchindustrie (BVE 2007). Deutschland zählt auch im Welthandel von Schweinefleisch zu den führenden Ländern (Spiller und Schulze 2008). Die Aufrechterhaltung und der weitere Ausbau dieser marktwirtschaftlichen Stellung werden durch das häufige Vorkommen von Krankheiten in den Schweinebeständen erschwert. Immer wieder auftretende Seuchen und sinkende Fleischqualitäten belasten den Markt und sorgen für Verunsicherung beim Produzenten und Verbraucher. Neben Durchfallerkrankungen sind Infektionen des Respirationstraktes die häufigste Ursache für hohe wirtschaftliche Schäden in allen Bereichen der Fleischindustrie. Untersuchungen in Schlachtbetrieben bestätigen regelmäßig, dass 30 bis 50 Prozent der geschlachteten Schweine deutliche Lungenveränderungen aufweisen. In einzelnen Fällen werden sogar bis zu 90 Prozent beobachtet (Hoy 2001). Dabei sind bereits ab einem Wert von 10 Prozent wirtschaftliche Verluste festzustellen. Das Auftreten einer Lungenerkrankung ist für die Tierhalter oft nicht zu erkennen und wird dadurch viel zu spät behandelt. Viele Tiere werden bereits nach der Geburt infiziert und gelangen beim Weiterverkauf als klinisch unauffälliger Träger („carrier“) in die nachgelagerten Bestände. Dort breiten sich die Erreger schnell aus, so dass häufig der gesamte Bestand von der Erkrankung betroffen ist. Die dabei entstehenden wirtschaftlichen Verluste sind meistens nicht primär eine Folge von Todesfällen, sondern indirekt bedingt durch Faktoren wie erhöhte Fütterungskosten und sinkende Schlachtkörperqualität. Bis zu 70 Prozent der Verluste entstehen durch ein gehemmtes Wachstum und das dadurch verminderte Mastendgewicht (Tubbs und Deen 1997). Neben der Schweinemast ist nicht selten auch die Zucht betroffen; insbesondere hier können bedingt durch Sekundärinfektionen weitere Erkrankungen bei den Ferkeln (Meningitis, Diarrhoe) auftreten (De Jong 1992). Deutliche Beeinträchtigungen in der Leistung zeigen sich in den Zuchtbetrieben auch bei den Sauen. Bei mehr als 10 Prozent der Jungsauen können Lungenentzündungen zu einer Beeinträchtigung der Geschlechtsreife führen (Hoy 2001). Dabei nimmt die Schwere dieser Beeinträchtigung mit steigendem Alter

der Sauen zu. Die Folge ist ein im Durchschnitt um ein Ferkel kleinerer Wurf im Vergleich zu gesunden Sauen. Um die Infektionen effektiv zu bekämpfen und vorzubeugen, werden von den Tierhaltern verstärkt Antibiotika und Impfstoffe eingesetzt (Cromwell 2002, Maes et al. 2008). Diese Behandlungen können sich jedoch aufgrund von Nebenwirkungen wie Beeinträchtigung der Fresslust der Tiere auch negativ auf die Mast auswirken.

Ein großes Problem ist die frühzeitige und genaue Diagnose einer Atemwegsinfektion und der beteiligten Krankheitserreger. Häufig wird eine Erkrankung des Bestandes durch den Tierarzt zu spät diagnostiziert, wodurch die medizinischen Gegenmaßnahmen eine unvollständige oder verzögerte Wirkung zeigen und die Behandlungskosten unnötig steigen. Die regelmäßig auftretenden Berichte in den Medien über Tierseuchen und Fleischskandale üben einen negativen Einfluss auf das Vertrauen des Verbrauchers in die Lebensmittelsicherheit aus. Dieser fordert ein artgerecht erzeugtes Qualitätsprodukt zu einem niedrigen Preis und einer transparenten Wertschöpfungskette, die sich bis zum Schweinezüchter zurückverfolgen lassen soll. Durch gesetzliche Vorgaben zur Kontrolle von Tieren und Tierprodukten auf Krankheitserreger sowie durch den verstärkten Wettbewerb aus dem Ausland steht die Schweinezucht in Deutschland unter einem enormen Druck. Nur die Produktion und der Verkauf von gesunden Tieren kann die Basis für eine vertrauensvolle Geschäftsbeziehung der einzelnen Handelspartner und ein sicheres Endprodukt für den Verbraucher gewährleisten. Hierfür wäre eine Verminderung der Inzidenz von Lungenerkrankungen beim Schwein überaus vorteilhaft. Diese ist mit konventionellen Hygiene- Impf- und Behandlungskonzepten bisher nicht erreicht worden. Daher wird nach neuen Strategien gesucht, die ein möglichst frühzeitiges Erkennen und Ausschließen von infizierten Tieren ermöglichen sollen und die eine gezielte züchterische Selektion von Schweinen mit erhöhter Resistenz gegenüber Atemwegsinfektionen ermöglichen.

#### A 1.2 *Actinobacillus pleuropneumoniae*

*Actinobacillus pleuropneumoniae* ist ein unbewegliches gram-negatives Stäbchen und gehört zur Familie der *Pasteurellaceae*. Es wurde zuerst im Jahre 1964 unter dem Namen *Haemophilus pleuropneumoniae* beschrieben (Shope 1964), und ist aufgrund seiner molekularbiologischen Einordnung seit 1983 unter der Bezeichnung *Actinobacillus pleuropneumoniae* bekannt. Dieser bakterielle Erreger hat sich obligat an den Respirationstrakt des Schweins angepasst und ist verantwortlich für die Entstehung akut bis chronisch verlaufender und hoch ansteckender Lungen-Brustfellerkrankungen (Pleuropneumonien). Die Erkrankung ist inzwischen in ganz Europa über Nord- und Mittelamerika bis nach Ostasien und Australien nachgewiesen und von großer wirtschaftlicher Bedeutung (Pattison et al. 1957, Nicolet 1992). Allein in Deutschland sind bis zu zwei Drittel der Mastschweine

und rund 50 Prozent der Zuchtschweine mit *A. pleuropneumoniae* infiziert, wodurch jährlich – vor allem aufgrund der verlängerten Mastzeiten - hohe wirtschaftliche Verluste entstehen (Hoy 2001). Die Übertragung erfolgt sehr häufig direkt nach der Geburt vom Muttertier auf die Nachkommen. Dabei dringt der Erreger durch eine klassische Tröpfcheninfektion über Maul und Nasenhöhle in den Wirt ein und besiedelt die Tonsillen und Alveolarepithelien. Der Ausbruch der Krankheit ist altersunabhängig, erfolgt jedoch meistens bei Tieren in der 10. – 16. Lebenswoche (Fenwick und Henry 1994). Die Auslöser sind Stress, schlechte Umweltbedingungen und durch Viren oder Mycoplasmen bedingte Primärerkrankungen. Der Krankheitsverlauf variiert von perakut mit spontanen Todesfällen über akut bis chronisch. Bei der vorwiegend akuten Form treten die ersten Anzeichen innerhalb von drei bis fünf Tagen auf. Die typischen klinischen Symptome sind dabei Apathie, Futtermittelverweigerung, Erbrechen, Fieber und eine rasch zunehmende Dyspnoe. Charakteristisch für diesen Verlauf sind die bei der Sektion zu beobachtenden hämorrhagisch-nekrotisierenden Lungenveränderungen und fibrinöse Beläge auf der Pleura. Bei der Mehrheit der Tiere kommt es zur Rekonvaleszenz und einer damit verbundenen Immunität gegenüber dem jeweiligen Serotyp des Erregers. Bei diesen Tieren kann *A. pleuropneumoniae* über Monate hinweg in der Lunge und besonders auf den Tonsillen persistieren und wird insbesondere in immunsupprimierten Phasen des Wirtes über Aerosole auf andere Tiere übertragen (Fenwick und Henry 1994). Dadurch ist der Zukauf rekonvaleszenter oder latent infizierter Schweine die häufigste Ursache für Neuinfektionen in Tierbeständen.

Da die derzeit auf dem Markt erhältlichen Vakzine nur eine serotypspezifische Immunität verleihen hat eine Immunprophylaxe nur eingeschränkte Vorteile. Der Grund hierfür liegt in der mit 15 Serotypen hohen Diversität von *A. pleuropneumoniae* und der stark eingeschränkten oder fehlenden Kreuzprotektivität (Maas et al. 2006). Dabei treten die Serotypen 1 und 5 in den USA am häufigsten auf, während in Europa die Serotypen 2, 3, 6, 7, 8 und 9 vorherrschen.

Neben der Kapsel, die eine erhöhte Resistenz des Bakteriums vor Phagozytose und komplementvermittelter Lyse vermittelt (Inzana et al. 1988) sind weitere Virulenzfaktoren wie die an der Wirtsadhäsion beteiligten Fimbrien sowie die Lipopolysaccharide (LPS) und Proteine der äußeren Bakterienmembran beschrieben worden (Tascon et al. 1996, Stevenson et al. 2003). Durch die Freisetzung von LPS aus lysierten Bakterien kommt es während der wirtsspezifischen Immunabwehr zu einer starken Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen, die einen septischen Schock auslösen können (Hacker und Heesemann 2002). Eine bedeutende Rolle bei der Virulenz spielen insbesondere Zytotoxine, die sogenannten Apx-Toxine, die zur Familie der RTX-Toxine (Repeats in Toxin) gehören

(Welch 1991). Bei *A. pleuropneumoniae* kommen insgesamt vier verschiedene Apx-Toxine vor (Frey 1995, Schaller et al. 1999). Diese werden vom Erreger sezerniert und führen zu einer Zerstörung von Immunzellen und Erythrozyten (Kamp et al. 1997). Zusätzlich kommt es zur Auslösung eines sogenannten „oxidativen burst“ in Neutrophilen und Alveolarmakrophagen, wodurch schwere Schädigungen des Lungengewebes entstehen (Jansen et al. 1995). Die Gesamtvirulenz des Serotyps wird wesentlich durch die Kombination seiner einzelnen Apx-Toxine bestimmt. Dabei hat das Apx-I-Toxin einen stark hämolytischen und zytotoxischen Effekt auf den Wirt und wird von den Serotypen 1, 5, 9, 10 und 11 gebildet. Das Apx-II-Toxin hingegen hat eine eher milde Toxinwirkung und ist außer bei den Serotypen 10 und 14 bei allen Serotypen zu finden. Eine nicht-hämolytische, jedoch stark zytotoxische Eigenschaft wird durch das Apx-III-Toxin vermittelt, welches bei den Serotypen 2, 3, 4, 6, 8 und 15 vorkommt. Das Apx-IV-Toxin ist nur schwach hämolytisch und wird von allen Serotypen in-vivo gebildet (Frey et al. 1993). Die stärkste Virulenz wird bei Serotypen mit einer Kombination aus Apx-I- und Apx-II-Toxin beobachtet. Dabei erhöht das Vorkommen verschiedener Stämme in einem Tierbestand die Kombinationsmöglichkeiten der Toxine und somit auch die Gefahr für schwere Bestandserkrankungen.

Aufgrund seiner strengen Wirtsspezifität, seiner wirtschaftlichen Bedeutung und dem Vorhandensein eines umfangreich charakterisierten Infektionsmodells stellt der Erreger *A. pleuropneumoniae* ein geeignetes Modell zur Untersuchung von Atemwegserkrankungen beim Schwein dar. Bei diesem standardisierten Modell wird durch die Verwendung eines Aerosols die natürliche Übertragung des Pathogens sehr gut nachempfunden (Baltes et al. 2001).

### A 1.3 Die Anwendung von Krankheitsmarkern beim Schwein

Für eine möglichst frühzeitige Erkennung und Behandlung von Lungenerkrankungen in einem Tierbestand ist eine umfangreiche und vor allem spezifische Erreger-Diagnostik unentbehrlich geworden. Dabei ist man auf die gemeinsame Befunderhebung aus klinischen, pathomorphologischen und labordiagnostischen Daten angewiesen. Durch die Klinik allein wird lediglich eine Verdachtsdiagnose ermöglicht. Die typischen Anzeichen einer Atemwegserkrankung sind hierbei spontan auftretende Todesfälle bei perakut/akut verlaufenden Infektionen und Niesen, Husten, Atemnot und Fieber sowie Wachstumsstörungen aufgrund einer gestörten Futtermittelverwertung bei subakuten und chronischen Erkrankungen (Done und White 2003).

Im Tierexperiment können weitere Untersuchungen mit Röntgen oder Ultraschall durchgeführt werden, um bestehende Lungenveränderungen zu lokalisieren (Hoeltig 2009).

Weiterhin wird eine Beurteilung von Gewebeeränderungen innerhalb des Respirationstraktes und der Sekretzusammensetzung durch eine Bronchoskopie in Kombination mit der Untersuchung von Bronchialspülproben ermöglicht (Ganter et al. 1993). Kontrollmessungen der Atemwegsmechanik und des Sauerstoffgehaltes im Blut mittels Pulsoxymetrie ergänzen das klinische Bild (Reinhold 1997a, Reinhold 1997b, Ganter et al. 1995). Bei der Sektion kann durch eine visuelle und palpatorische Befunderhebung das erkrankte Lungengewebe lokalisiert und das Ausmaß der Veränderungen anhand eines Score-Systems bewertet werden (Hannan 1982). Des Weiteren ermöglicht die Gewebeentnahme eine histologische Untersuchung sowie die Isolation bakterieller und viraler Erreger (Bochev 2008).

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Schweinezucht hauptsächlich auf produktorientierte Leistungsmerkmale wie Ferkelzahl, Wachstumsleistung, Schlachtkörperwert, und Fleischqualität konzentriert. Durch diese einseitige Zuchtausrichtung kam es jedoch gleichzeitig zu einer Veränderung anderer Merkmale, die zu einer Verminderung der allgemeinen Widerstandsfähigkeit der Tiere führte (Glodek 1988). Populationsgenetische Analysen beschreiben dabei eine antagonistische genetische Korrelation zwischen der Optimierung der angestrebten Merkmale und dem Auftreten von unerwünschten Begleiterscheinungen wie Reproduktionseinbußen, Skelettproblemen und einer erhöhten Stressanfälligkeit der Tiere (Glodek 1988, Smidt et al. 1988, Bickhardt 1998). In Verbindung mit ungünstigen Umweltfaktoren (Stallklima, Herdendichte, Management) wurde dadurch auch das Auftreten von respiratorischen Erkrankungen erheblich begünstigt (Brogden und Guthmiller 2002). Daher versucht man nun, die Hintergründe dieser Merkmalsausprägungen aufzuklären und die Ergebnisse sinnvoll in die Zucht zu integrieren. Dabei bestätigen frühere Studien den Einfluss der Wirtsgenetik gegenüber der Resistenz gegenüber Infektionskrankheiten (Lunney 2007). So konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in der Empfänglichkeit von Ferkeln für *H. parasuis* - Infektionen auf einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Elterntiere zurückzuführen sind (Blanco et al. 2008). Andere Untersuchungen beschreiben eine starke Assoziation zwischen den polymorphen Formen des MUC13-Gens und dem Auftreten von Durchfallerkrankungen bei Schweinen (Zhang et al. 2008). Für eine Selektion auf eine erhöhte Resistenz gegenüber Atemwegserkrankungen fehlte es jedoch bisher an den dafür notwendigen genetischen Markern. Die Entdeckung neuer Marker erfordert eine intensive Erforschung der Regulationsprozesse auf verschiedenen Ebenen der Merkmalsausprägung. Dabei hat neben der Aufklärung der dem Merkmal zugrunde liegenden genetischen Variation (strukturelle Genomanalyse) die Untersuchung der Gen-Expression (funktionelle Genomanalyse) immer mehr an Bedeutung gewonnen (Kadarmideen et al. 2006).

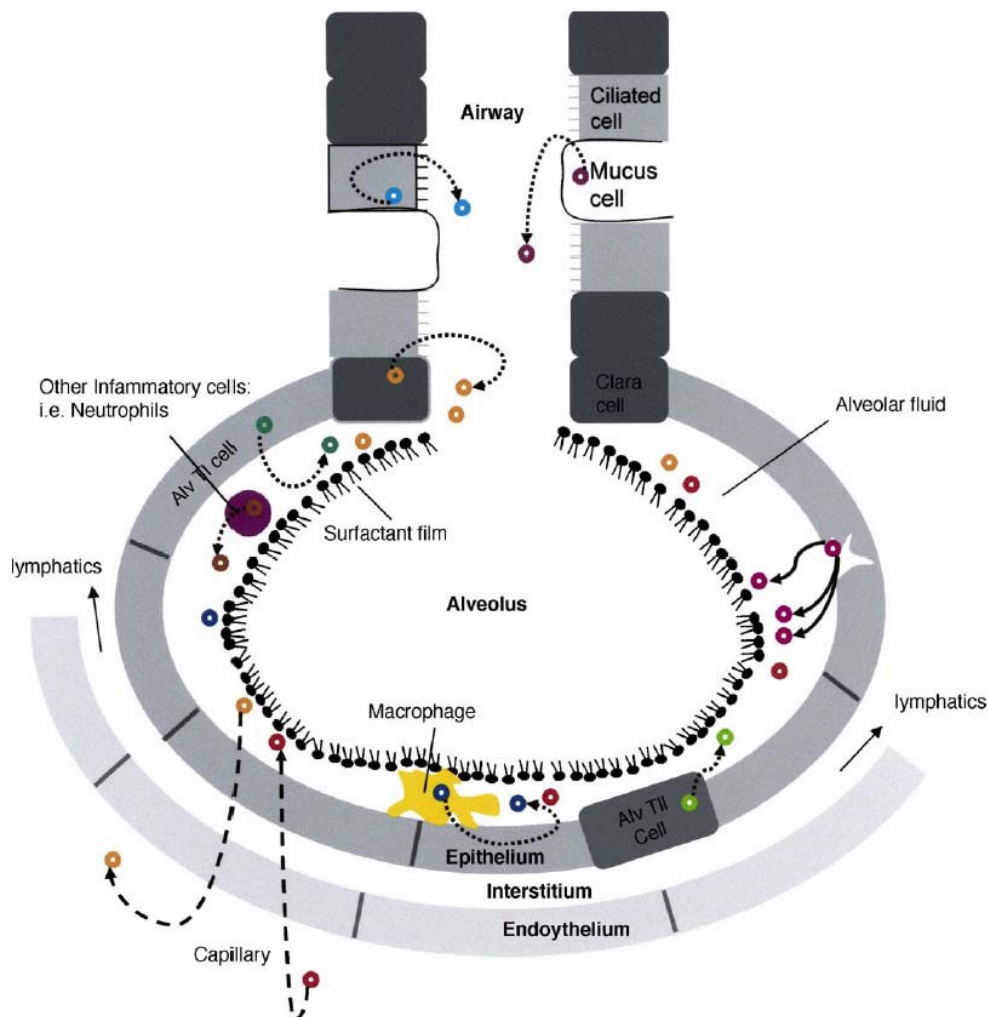
## A 2 Die Rolle bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) in der Pathogenese und Diagnostik

### A 2.1 Zusammensetzung der BALF

In den letzten Jahren hat die Identifizierung von biologischen Markern immer mehr an Bedeutung gewonnen, da diese zum einen die erregerspezifische Diagnostik erweitern (Hennig-Pauka et al. 2007, Wan et al. 2006, Lee et al. 2008, Gabay und Kushner 1999, Hennig-Pauka et al. 2006) und zum anderen als Selektionsmarker eine potentielle Anwendung in der Tierzucht finden können (Davoli und Braglia 2007). Dabei hat sich in Bezug auf Atemwegserkrankungen die Untersuchung von bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) als Mittel der Wahl durchgesetzt (Wattiez und Falmagne 2005).

Die BALF besteht aus einer löslichen und einer zellulären Komponente. Die Oberfläche der Luftwege und der Alveolen wird von einem dünnen Flüssigkeitsfilm, dem Surfactant, überzogen, durch das die bei der Atmung entstehende Oberflächenspannung reduziert wird. Das Surfactant ist auch die erste Kontaktstelle zwischen der Lunge und aus der Umwelt aufgenommenen Pathogenen und trägt dadurch als primäre Immunbarriere zum Schutz der Lunge bei (Gehr et al. 1996). Es besteht zu 90 Prozent aus Lipiden und zu 10 Prozent aus Proteinen (Griese 1999). Bei Infektionen können zusätzlich Nukleinsäuren anwesend sein (Moonens et al. 1995). Dabei ist der Anteil an Phospholipiden für die Herabsetzung der Oberflächenspannung in den Alveolen verantwortlich. Die Phospholipide bestehen zu etwa 80 Prozent aus Phosphatidylcholin, wobei das Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin einen großen Teil davon einnimmt (41-70%). Weitere Bestandteile sind Phosphatidylglycerol (10-12%), Phosphatidylserin (3-5%), Phosphatidylinositol (2-4%), Phosphatidylethanolamin und saure Phospholipide (2-7%) sowie Sphingomyelin (2-4%) und neutrale Phospholipide (Bernhard et al. 2001, Goerke 1998). Des Weiteren sind einige neutrale Lipide anwesend, die sich hauptsächlich aus Cholesterol (50-60%) und zu einem kleineren Teil aus Cholesterolestern, Di- und Triglyceriden und freien Fettsäuren zusammensetzen (Kaup und Drommer 1985, Notter 2000). Während der Lipidanteil ausschließlich vom Lungenepithel gebildet wird, stammt der Proteinanteil aus dem Blutserum und von verschiedenen Leukozyten und Epithelzellen (siehe Abbildung 1 (Wattiez und Falmagne 2005)). Als wichtige Vertreter sind hierbei vor allem die hydrophilen Surfactant-Proteine A und D aus der Collectin-Familie zu nennen, die als Bestandteil des angeborenen Immunsystems bei der pulmonalen Infektabwehr eine bedeutende Rolle spielen. Sie besitzen die Eigenschaft, bestimmte Zuckerstrukturen auf der Oberfläche von Bakterien und Viren zu binden, um dadurch die Phagozytose dieser Pathogene durch Makrophagen zu aktivieren (Bridges et al. 2000, Kuroki et al. 2007). Die hydrophoben Surfactant-Proteine B und C sind hingegen an der Verminderung der Oberflächenspannung beteiligt, indem sie den Einbau und die Verteilung

der Phospholipide innerhalb des Surfactants regulieren (Whitsett und Weaver 2002). Der zelluläre Anteil in der BALF besteht größtenteils aus den sich im Surfactant befindlichen Alveolarmakrophagen (80-95% der Zellen) sowie aus Lymphozyten (<10%), neutrophilen (<5%) und eosinophilen Granulozyten (<5%) und einigen Zellen aus dem Plasma oder Lungengewebe (Noel-Georis et al. 2002). Hinzu kommt eine Reihe von bronchialen und alveolären Epithelzellen, basophilen Granulozyten und Mastzellen (Noel-Georis et al. 2001). Durch eine infektionsbedingte Veränderung der BALF-Zusammensetzung wird eine Analyse der lokalen Immunantwort bei einer Lungenerkrankung ermöglicht. Untersuchungen der Lipidkonzentrationen, Leukozytenzählungen und der Nachweis von Proteinmarkern in der BALF sind mittlerweile ein fester Bestandteil der lungenspezifischen Diagnostik geworden (Mikuz und Gschwendtner 2000, Griese 1999).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der unterschiedlichen Herkunft von Proteinen in bronchoalveolärer Spülflüssigkeit (Wattiez und Falmagne 2005).

## A 2.2 Die Bedeutung der BALF bei der Diagnostik respiratorischer Erkrankungen

Die Untersuchung von bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit hat in den letzten Jahrzehnten immer mehr an Bedeutung gewonnen, da viele pulmonale Erkrankungen mit Veränderungen des Lungensurfactants einhergehen (Griese 1999). Eine frühe und spezifische Detektion dieser Veränderungen ist von besonderem Interesse für die genaue Diagnose und Behandlung von Lungenerkrankungen. Die sicherste Methode für die Gewinnung des Surfactants ist bis heute die Lungenspülung, da bei dieser - im Vergleich zu der Entnahme von Lungenbiopsien - keine nachteiligen Nebeneffekte zu erwarten sind. Dabei können für die jeweilige Diagnose unterschiedliche Bestandteile der BALF untersucht werden. Einige Untersuchungen befassen sich mit der Analyse des zellulären Bestandteils der BALF. So kommt es bei einer Erkrankung der Lunge zu einer veränderten Zusammensetzung der Zellen, wodurch sich der Krankheitsverlauf zytologisch untersuchen lässt (Noel-Georis et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass granulomatöse und allergisch bedingte Lungenerkrankungen mit einer erhöhten Lymphozytenzahl einhergehen. Eine hohe Anzahl an neutrophilen Granulozyten hingegen ist charakteristisch für fibrotische Prozesse und Krankheiten, die durch starke Staubbelastungen hervorgerufen werden. Bei Patienten mit Asthma, Sarkoidose oder Fibrosen konnte zudem ein Anstieg von Mastzellen beobachtet werden (Mikuz und Gschwendtner 2000). Der zytologische Befund eignet sich gut für die Diagnose von Erkrankungen bedingt durch bestimmte Pathogene (z. B. Mycobakterien oder *Aspergillus*) sowie für die Diagnose von Tumorerkrankungen und Schädigungen von alveolären Zellen (Jacobs und De Brauer 1999, Beskow et al. 2000).

Lungenerkrankungen gehen auch mit einer Veränderung des Lipidgehalts und der Proteinzusammensetzung einher (Griese 1999). Bei Patienten mit Acute Respiratory Distress Syndrom (ARDS) konnte gezeigt werden, dass die Erkrankung durch eine Abnahme von Phosphatidylcholin und Phosphatidylglycerol und einer gleichzeitigen Zunahme von Phosphatidylinositol charakterisiert ist (Gregory et al. 1991). Bei Patienten mit HIV und gleichzeitiger *Pneumocystis carinii*-Pneumonie wurde aufgrund der erhöhten Phospholipase-2-Aktivität ein um 50 Prozent reduzierter Gesamtlipidanteil in der BALF beobachtet (Hoffman et al. 1992). Der Proteinanteil in der BALF besteht hauptsächlich aus Albumin (~50%), Transferrin (~5,6%), Alpha-1-Antitrypsin (~3,5%) und den Immunglobulinen A und G (zusammen ~30%; (Bell et al. 1981, Wu et al. 2005). Diese Proteine sind ebenfalls im Serum zu finden und gelangen durch Diffusion über die Blut-Luft-Schranke in die Lunge. Es wird vermutet, dass die Immunglobuline A und G zusammen mit Transferrin einen Schutz vor bakteriellen und viralen Infektionen vermitteln (Muller und von Wichert 1985). Die Anwesenheit von Alpha-1-Antitrypsin verhindert hingegen eine Schädigung des



Lungengewebes durch die Hemmung der von Entzündungszellen freigesetzten Proteasen (Gadek et al. 1981). Es konnte weiter gezeigt werden, dass bei den meisten interstitiellen Lungenerkrankungen ein starker Anstieg an Serum-ähnlichen Proteinen in der BALF zu beobachten ist (Bell et al. 1981). Zudem kommt es während der Entzündung zu einem massiven Eindringen von Phagozyten in das Gewebe, die eine Vielzahl an antimikrobiellen Proteinen, wie z.B. Laktoferrin oder Lysozym, sezernieren (Levy 2004). In diesem Zusammenhang kommt es auch zu einer Freisetzung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten wie Superoxid, Wasserstoffperoxid oder Nitritoxid durch Makrophagen sowie neutrophile und eosinophile Granulozyten (Lang et al. 2002, Sittipunt et al. 2001).

### A 2.3 Proteomanalyse der BALF zur Identifizierung neuer Krankheitsmarker

Eine frühzeitige Erkennung der an der Pathogenese von Krankheiten beteiligten Faktoren erfordert ein genaues Verständnis der dem Entzündungsprozess zugrunde liegenden molekularen Mechanismen. Die Expression von Proteinen unterliegt einer ständig ablaufenden und von äußeren und inneren Einflüssen geprägten Regulation. Dadurch lässt sich anhand einer Proteomanalyse der Verlauf einer Krankheit auf molekularer Ebene untersuchen (Hochstrasser et al. 2002). Zudem handelt es sich bei den meisten Lungenproblemen um multifaktorielle Erkrankungen, die sich nicht durch die Analyse einzelner Faktoren charakterisieren lassen (Culpitt et al. 1999, Wattiez und Falmagne 2005).

Eines der Hauptanliegen der Proteomanalyse von BALF ist der Vergleich zwischen dem Proteom von erkrankten Patienten mit dem von gesunden Kontrollpersonen mit dem Ziel, ein spezifisches Expressionsprofil der mit der Krankheit assoziierten Proteine zu bestimmen (Hanash 2003). In diesem Zusammenhang hat sich die zweidimensionale Auftrennung von BALF-Proteinen mit anschließender Massenspektrometrie als geeignete Methode für die Identifizierung von potentiellen Krankheitsmarkern bewährt (Noel-Georis et al. 2002, Wattiez und Falmagne 2005). Mit dieser Methode wurden in der Humanmedizin bereits viele Studien durchgeführt, um die Pathogenese von interstitiellen Lungenerkrankungen besser zu verstehen (Lenz et al. 1993, Noel-Georis et al. 2002). Auch wird durch die Proteomanalyse von BALF eine Untersuchung der Immunantwort der Lunge auf bestimmte Umweltallergene ermöglicht. Hier konnte in einer Studie bei einem Vergleich zwischen Patienten mit Asthma bzw. Atemproblemen und gesunden Kontrollpersonen eine differentielle Expression der Proteine Lipocalin-1, Cystatin S, IgBF und Transthyretin gezeigt werden (Lindahl et al. 1999). In einer anderen Studie konnten durch eine nano-LC-MS/MS basierte Proteomanalyse mehr als 1500 Proteine in BALF detektiert werden, von denen nach einer Allergenexposition bei Asthma-Patienten mehr als 10 Prozent eine signifikante Aufregulation aufwiesen (Wu et al. 2005). Darüber hinaus können durch die Proteomik auch posttranslationale Modifizierungen

von Proteinen untersucht werden (Veenstra 2003). Dies ist von besonderer Bedeutung, da einige entzündungsrelevante Proteine während des Krankheitsverlaufs speziellen Modifizierungen unterliegen, durch die sie den Krankheitsverlauf beeinflussen können. So konnte gezeigt werden, dass das Glykosylierungsmuster vom Alpha-1-sauren Glykoprotein in Abhängigkeit von der Erkrankung verändert werden kann (Fournier et al. 2000). Andere Studien berichten über eine proteolytische Spaltung des Proteins SP-D bei Zystischer Fibrose (von Bredow et al. 2003) sowie über das krankheitsbedingte Auftreten verschiedener Isoformen von Proteinen, wie z. B. bei dem Protein SP-A (He 2003).

Auch in der Veterinärmedizin findet die Proteomanalytik ihre Anwendung. Hier konnte unter anderem in einer Studie das antibakterielle Peptid PR-39 identifiziert werden, dass als erster Proteinmarker für eine chronische Lungenerkrankung bei Schweinen genutzt wird (Hennig-Pauka et al. 2006, Hennig-Pauka et al. 2007).

### A 3 Zellbiologische Aspekte in der Pathogenese von Infektionskrankheiten

Die Entwicklung geeigneter Strategien für eine nachhaltige Verbesserung der Lungengesundheit erfordert eine umfassende Untersuchung und Aufklärung der zellbiologischen und pathophysiologischen Hintergründe der Erkrankung. Die Kenntnisse über die an der Wirtsabwehr beteiligten Faktoren und Regulationsprozesse bilden dabei die wissenschaftliche Grundlage für die Entwicklung von Gegenmaßnahmen für die Praxis. In Bezug auf die Kontrolle von akuten Atemwegserkrankungen spielen die Mechanismen des angeborenen Immunsystems zusammen mit der lokalen Immunantwort der Lunge eine wichtige Rolle (Bartlett et al. 2008). Bei der Abwehr von bakteriellen und viralen Pathogenen sind vor allem die glykosylierten Proteine von großer Bedeutung (Reading et al. 1997, Bals und Hiemstra 2004). Glykosylierungen finden in den Zellen von Säugetieren bei ungefähr 50 Prozent aller Proteine statt und sind an einer Vielzahl von zellbiologischen Vorgängen beteiligt, wie z. B. bei der Zellerkennung, bei Adhäsionsprozessen und bei Zell-Zell-Interaktionen (Varki 1993, Isaji et al. 2004, Stanley 2002). So konnte in einer Studie bei Rindern gezeigt werden, dass das Glykoprotein Laktoferrin anti-invasive Eigenschaften gegenüber diversen *Pseudomonas aeruginosa* und *Burkholderia cenocepacia* Stämmen aufweist (Berlutti et al. 2008). Des Weiteren werden eine Reihe von Atemwegspathogenen bereits in der frühen Phase der Infektion durch Proteine der Collectin-Familie erkannt und neutralisiert (Haagsman et al. 2008). Für das lungenspezifische Surfactant Protein D (SP-D) wurde in einer Studie eine erhöhte Expression im akuten und chronischen Stadium einer *A. pleuropneumoniae*-Infektion nachgewiesen. Dabei wurde vermutet, dass SP-D eine

Verbindung zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem ermöglicht, in dem es sich an der Antigenpräsentation für Lymphozyten beteiligt (Soerensen et al. 2005).

### A 3.1 Zusammensetzung der „Lipid Rafts“

Ein wichtiger Punkt ist die Beteiligung von Membranmikrodomänen an der Pathogenese infektiöser Krankheiten. Diese auch als „Lipid Rafts“ bezeichneten Strukturen sind funktionelle Domänen der Zellmembran, die bei komplexen physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen (Simons und Ehehalt 2002). Biologische Membranen bestehen neben ihrem Proteinanteil hauptsächlich aus Phospholipiden, die sich in Glycerophospholipide (Phosphatidylserin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin) und Sphingolipide (Sphingomyelin, Cerebroside, Ganglioside) unterteilen lassen. Zusätzlich ist das neutrale Lipid Cholesterol anwesend, dass durch seine Einlagerung zwischen die Fettsäureketten der Lipide die Lipiddoppelschicht stabilisiert und zu einer erhöhten Membranfluidität beiträgt (Finegold 1993). Während die Außenseite der Zellmembran vorwiegend aus Glykoproteinen, Glykolipiden und den Phospholipiden Sphingomyelin und Phosphatidylcholin besteht, ist die Innenseite reich an Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin (Abb. 2; (Rothman und Lenard 1977). Das Konzept der „Lipid Rafts“ ist eine modifizierte Version des „Flüssig-Mosaik-Modells“ von Singer und Nicolson, bei dem ursprünglich davon ausgegangen wurde, dass sich sämtliche Lipide und Proteine der Doppelmembran in einer nicht-organisierten „liquid disordered phase“ aufhalten und sich zweidimensional zu beiden Seiten bewegen können (Singer und Nicolson 1972). Diese Beweglichkeit kommt dabei durch die einzelnen Lipidkomponenten zustande, die oberhalb ihres jeweiligen Schmelzpunktes innerhalb der Membran frei beweglich sind. Das Ausmaß dieser Fluidität ist diesbezüglich abhängig von der Zusammensetzung der Lipide (Holthuis et al. 2001). Im Jahre 1988 wurde von Kai Simons und Gerrit van Meer das Biomembranmodell durch den Nachweis von „Lipid Rafts“ erweitert, die sich als organisierte „liquid ordered phase“ direkt innerhalb der „liquid disordered phase“ befindet und dort frei umher treibt (Simons und van Meer 1988). „Lipid Rafts“ weisen einen erhöhten Gehalt an Cholesterol und Sphingolipiden auf. Durch die Anwesenheit von gesättigten Phospholipiden sind die Fettsäuren in diesen Membranbereichen enger gepackt als die der umliegenden Membranlipide. Während sich die Sphingolipide zusammen mit dem Cholesterol als Zusammenschluss auf der äußeren Seite der Membran konzentrieren, enthält die innere Seite mehr Glycerophospholipide und ebenfalls Cholesterol. Das Cholesterol sorgt dabei für die Ausbildung einer geordneten Flüssigkeitsphase, die eine geringere Fluidität als die umgebenden Membranbereiche besitzt (Brown und London 2000). Die Phasenseparierung und die dichte Packung der Lipide sind vermutlich die Ursache für die charakteristische Unlöslichkeit von „Lipid Rafts“ in

nichtionischen Detergenzien wie Triton X-100 (Rajendran und Simons 2005) bei 4°C. Dabei werden die isolierten Membranfraktionen auch als Detergenz-resistente Membranen (DRM) bezeichnet (Lingwood und Simons 2007). „Lipid Rafts“ sind dynamische Strukturen, wodurch sich ihre Zusammensetzung aus Proteinen und Lipiden verändern kann. Tyrosinkinasen aus der Src-Familie, spezielle Transmembranproteine und GPI-verankerte Proteine weisen sehr häufig eine Assoziation mit „Lipid Rafts“ auf (Chatterjee und Mayor 2001, Simons und Toomre 2000, Alfalah et al. 1999). Als Antwort auf bestimmte Signale (Antikörper, Liganden, Lektine) können unterschiedliche „Lipid Rafts“ miteinander fusionieren und einen größeren „Cluster“ formen, wodurch die darin vorhandenen Proteine aufkonzentriert werden und in räumliche Nähe zueinander gelangen (Simons und Ehehalt 2002). Dadurch kommt es zu einer Bildung funktionell wichtiger Reaktionsplattformen für die Aktivierung von intrazellulären Signaltransduktionswegen und Prozessen des Vesikeltransports (Ikonen 2001, Simons und Toomre 2000). Ein infektionsbedingtes „Clustering“ und eine damit verbundene Veränderung der Proteinzusammensetzung in den „Lipid Rafts“ können dabei nicht ausgeschlossen werden.

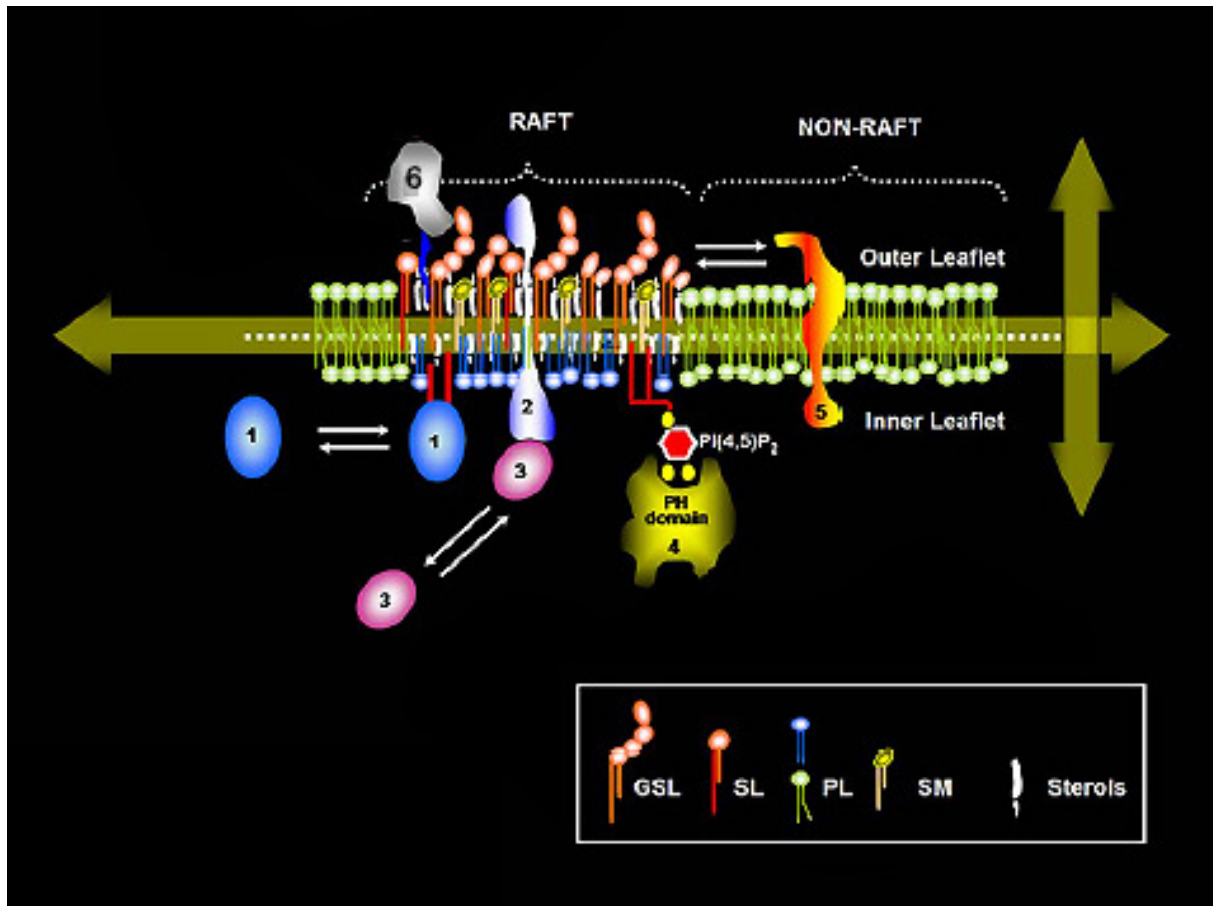
### A 3.2 Die Bedeutung von „Lipid Rafts“ bei der Pathogenese

„Lipid Rafts“ liefern potentielle Angriffspunkte für eine Vielzahl bakterieller und viraler Krankheitserreger und spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von humanen Erkrankungen (Zaas et al. 2005a, Simons und Ehehalt 2002). Dazu gehört zum Beispiel die Assoziation von „Lipid Rafts“ mit den viralen Proteinen Hämagglutinin und Neuraminidase, die auf der Oberfläche von Influenza-Viren zu finden sind (Zhang et al. 2000). Diese Hüllproteine werden innerhalb der Membranmikrodomänen angereichert und dienen bei der Knospung als Plattform für die Verpackung der Viruspartikel (Nayak und Hui 2004). Auch einige Komponenten des HIV-1 sind in der Lage, durch ihre Verbindung mit „Lipid Rafts“ die Pathogenität des Virus zu beeinflussen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass der Aminoterminus des viralen Gag-Proteins mit „Lipid Rafts“ an der Zellmembran assoziiert und eine wichtige Rolle bei der HIV-1-Replikation einnimmt (Ono und Freed 2001). Dabei wird davon ausgegangen, dass es während der Knospung der Zellmembran durch die Sortierung des Gag-Proteins in diesen Domänen zu einem Einbau von Cholesterol, Sphingolipiden und GPI-verankerten Proteinen in die Virenhülle kommt (Nguyen und Hildreth 2000). In früheren Studien wurde bereits ein hoher Gehalt von Cholesterol und Sphingolipiden in der Lipiddoppelschicht des HIV-1 nachgewiesen (Aloia et al. 1993). Bei einer Entfernung des zellulären Cholesterols kam es hingegen zu einer deutlichen Abnahme der Produktion von HIV-1-Partikeln (Ono und Freed 2001). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CD4 und chemokine Rezeptoren in den „Lipid Rafts“ von humanen CD4<sup>+</sup>-Zellen anwesend sind und dem Virus den Zugang in die Zelle ermöglichen (Popik et al. 2002).

Darüber hinaus haben eine Reihe von bakteriellen Krankheitserregern Mechanismen entwickelt, um über einen „Lipid Rafts“-vermittelten Weg in die Zellen des Wirtes zu gelangen. Eines der ersten Bakterien, bei denen diese Eigenschaft entdeckt wurde, war *E. coli* (Baorto et al. 1997). In Bezug auf Harnwegsinfektionen konnte in einer Studie veranschaulicht werden, dass *E. coli* durch die Expression des speziellen FimH-Adhäsins das Wachstum auf mukosalen Oberflächen ermöglicht wird (De Man et al. 1990). Obwohl *E. coli* ursprünglich als ein extrazelluläres Pathogen beschrieben wurde, konnte seine Replikation innerhalb verschiedener Zelltypen wie z.B. Makrophagen oder Mastzellen nachgewiesen werden (Baorto et al. 1997, Shin et al. 2000). Die Aufnahme in die Zellen wurde dabei durch einen FimH-Rezeptor (CD48) vermittelt, der mit seinem GPI-Anker mit „Lipid Rafts“ assoziiert war (Baorto et al. 1997). Ein weiterer Vertreter ist das häufig an pulmonalen Erkrankungen beteiligte bakterielle Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* (Govan und Nelson 1992, Garau und Gomez 2003). Es wird vermutet, dass das Bakterium einen stimulierenden Einfluss auf „Lipid Rafts“-assoziierte Rezeptoren ausübt und durch eine Anreicherung von Ceramiden eine Umstrukturierung der „Rafts“ zu größeren Signalplattformen bewirkt (Grassme et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass das Eindringen von *P. aeruginosa* in humane Epithelzellen durch die Aktivierung der Src-Tyrosinkinase p60Src und p59Fyn vermittelt wird (Esen et al. 2001). In einer anderen Studie wurde eine Tyrosin-vermittelte Phosphorylierung des Proteins Caveolin-2 als Regulator für die Aufnahme von *P. aeruginosa* in Typ-I-Pneumozyten mittels Endozytose beschrieben (Zaas et al. 2005b).

Es gibt ebenfalls Hinweise auf eine Beteiligung von „Lipid Rafts“ an der Entstehung von Prionenerkrankungen. Pathogene Prionen sind Proteine, die im menschlichen oder tierischen Organismus zu tödlich verlaufenden Enzephalopathien führen können. Eine Region des GPI-verankerten zellulären Prion-Proteins vermittelt dabei den spezifischen Transport zu Caveolae, einem speziellen Typ von „Lipid Rafts“, der eine sackförmige Einbuchtung der Plasmamembran darstellt (Kaneko et al. 1997). Dadurch kommt es zu einer Konversion des Proteins in eine pathogene Isoform. Es konnte gezeigt werden, dass eine Absenkung des Cholesterols in der Zelle zu einer Hemmung dieser Konversion führt (Taraboulos et al. 1995). Ein weiteres Beispiel ist die Alzheimer-Krankheit, bei der „Lipid Rafts“ einen bedeutenden Einfluss auf die Regulation des Transports und der Reifung von Proteinen haben. Bei dieser neurodegenerativen Erkrankung kommt es bei der Pathogenese zu einer Ablagerung von fehlerhaft gefalteten  $\beta$ -Amyloid-Peptiden und Neurofibrillen im Gehirn. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Bildung dieser Peptide durch eine Spaltung des Amyloid-Precursor-Proteins mit  $\beta$ -Sekretasen innerhalb von „Lipid Rafts“ erfolgt (Ehehalt et al. 2003). Befindet sich das Vorläuferprotein hingegen außerhalb der „Rafts“, so findet

eine Spaltung mit  $\alpha$ -Sekretasen statt, wodurch die Bildung des amyloidogenen Peptids verhindert wird.



**Abb. 2: Strukturmodell von „Lipid Rafts“ in der Zellmembran** (Lucero und Robbins 2004). Die innere und äußere Membran der „Rafts“ weisen eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung auf. Während die Außenmembran hauptsächlich aus Sphingolipiden (SL), Glykosphingolipiden (GSL) und Sphingomyelin (SM) aufgebaut ist, sind in der Innenmembran mehr Glycerophospholipide (PL) zu finden. Auf beiden Seiten gibt es Einlagerungen von Cholesterin (Sterols). Dabei können Proteine auf unterschiedliche Weise mit „Lipid Rafts“ assoziiert sein: (1) Acylierung, (2) Transmembrandomäne, (3) Protein-Protein-Interaktion, (4) Protein-Lipid-Interaktion, (5) Temporäre Assoziation, (6) GPI-Verankerung. Innerhalb der Membran sind horizontale Wechselwirkungen wie das Fusionieren mehrerer „Rafts“ zu einem Cluster möglich. Vertikale Wechselwirkungen hingegen erlauben Interaktionen zwischen dem extrazellulären Raum und dem Inneren der Zelle (Signaltransduktion, Vesikeltransport).

## A 4 Zielsetzung

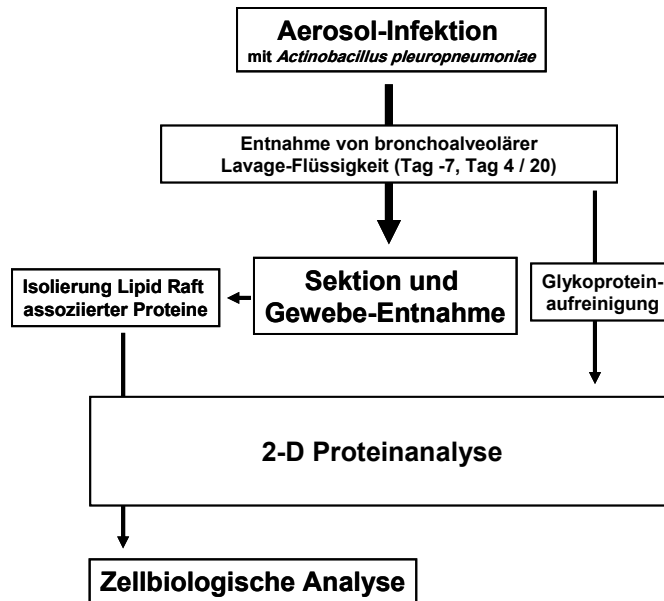
Die Identifizierung von Biomarkern zur Erkennung insbesondere chronischer und latenter Atemwegsinfektionen beim Schwein ist von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Daher wurde **im ersten Teil dieser Arbeit** die differentielle Expression von Proteinen in BALF während einer experimentell durchgeführten *A. pleuropneumoniae*-Infektion untersucht. Aufbauend auf einer vorangegangenen Untersuchung von Gesamtprotein in BALF (Hennig-Pauka et al. 2006), wurde in dieser Studie die Analyse von glykosylierten Proteinen durchgeführt, da diese bei Prozessen der angeborenen Immunabwehr eine besonders wichtige Rolle spielen. Dabei wurden Unterschiede in den Expressionsprofilen zwischen gesunden und infizierten Tieren gesucht; diese unterschiedlich exprimierten Proteine stellen dann potentielle neue diagnostische Biomarker für die Erkennung von Lungeninfektionen dar. Zusätzlich wurde die BALF von drei verschiedenen Schweinezuchtlinien während der einzelnen Infektionsstadien miteinander verglichen. Damit sollte zum einen sichergestellt werden, dass die möglichen Biomarker nicht nur Zuchtlinien-spezifisch reguliert werden. Da weiterhin eine der drei verwendeten Zuchtlinien (Hampshire) eine signifikant erhöhte Resistenz aufwies, konnten zum anderen durch Vergleich der Expressionsprofile vor der Infektion mögliche Resistenz-assoziierte Proteinmarker identifiziert werden, die zukünftig eine Anwendung bei der züchterischen Selektion finden könnten.

Eine Vielzahl von Studien beschreibt die Beteiligung von „Lipid Rafts“ an der Pathogenese von Krankheiten. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden **im zweiten Teil dieser Arbeit** Proteine identifiziert, die während einer *A. pleuropneumoniae*-Infektion differentuell mit „Lipid Rafts“ assoziieren; abschließend wurden diese Proteine *in silico* auf ihre mögliche Bedeutung hin analysiert und eines der Proteine wurde zellbiologisch weitergehend untersucht.

## B Material und Methoden

In diesem Kapitel wurden einige der Protokolle aus früheren Dissertationsschriften des Institutes für Mikrobiologie bzw. des Institutes für Physiologische Chemie übernommen.

### B 1 Methodischer Überblick



**Abb. 3:** Flussdiagramm zur Veranschaulichung der Vorgehensweise bei der Biomarkersuche und der zellbiologischen Charakterisierung von Lipid Raft assoziierten Proteine.

### B 2 Chemikalien, Reagenzien und labortechnisches Equipment

Die in dieser Studie verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karsruhe, Deutschland), GE Healthcare (Freiburg, Deutschland) und New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland) bezogen. Das labortechnische Equipment und spezielle Reagenzien werden in Klammern stehend angegeben.

### B 3 Medien, Puffer und Lösungen

Die in dieser Studie eingesetzten Nährmedien, Puffer und Lösungen werden an geeigneter Stelle im Text erwähnt. Die Medien für Bakterien wurden von der Firma Difco (Augsburg, Deutschland) und die Zellkulturmedien von der Firma PAA (Marburg, Deutschland) bezogen.



## B 4 Durchführung des Tierversuchs und Probenentnahme

**Tabelle 1: Zeitlicher Ablauf des Tierversuchs**

Tag	Durchführung
- 21	Ankunft der Tiere
zwischen -7 und -1	Entnahme der BALF-Proben (Tag -7)
0	Aerosol-Infektion mit <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
4 oder 20	Entnahme der BALF-Proben (Tag 4 bzw. Tag 20), Einschläfern der Tiere, pathomorphologische Untersuchung der Lunge, Entnahme der Gewebeproben

### B 4.1 Herkunft und Unterbringung der Schweine

Für diese Studie wurden insgesamt 103 Schweine aus drei unterschiedlichen Zuchtlinien (51 Deutsche Landrasse, 28 Pietrain, 24 Hampshire) eingesetzt. Zum Zeitpunkt der Infektion waren die Tiere sechs bis sieben Wochen alt und kamen aus einem Bestand, der im ELISA negativ auf Antikörper gegen die *A. pleuropneumoniae* Exotoxine ApxIIA (Leiner et al. 1999) und ApxIVA (Dreyfus et al. 2004) getestet wurde. Die Tiere wurden mit 8 m<sup>2</sup> Lebensraum für 10 Schweine entsprechend den Richtlinien der European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (European Treaty Series, Nummer 123 [<http://conventions.coe.int/treaty/EN/treaties/html/123.htm>] und 170 [<http://conventions.coe.int/treaty/EN/treaties/html/170.htm>]; Bewilligungsnummer: 33-42502-05 / 941) gehalten. Um den Einfluss von Stressfaktoren auf die Untersuchungsergebnisse möglichst gering zu halten, wurden die Tiere im Alter von vier Wochen direkt nach der Ankunft in verschiedene Gruppen aufgeteilt und zwei bis drei Wochen bis zum Infektionstermin an die Haltungsbedingungen gewöhnt. Die klinischen Untersuchungen begannen eine Woche vor der Infektion bis zum Tag der Sektion, d.h. 4 Tage bzw. 20 Tage nach der Infektion.

#### B 4.2 Aufbau der Aerosol-Infektionskammer

Die Infektion wurde in einer Aerosol-Infektionskammer durchgeführt, die durch die Impfstoffwerk Dessau Tornau GmbH (Dessau, Deutschland) nach den Vorgaben aus einer Studie konstruiert wurde (Jacobsen et al. 1996). Diese Kammer ermöglichte die gleichzeitige Infektion von bis zu fünf Schweinen im Alter von 6-12 Wochen. Die Oberseite der Kammer besaß ein Acrylfenster, wodurch die Tiere während der Aerosolisierung beaufsichtigt werden konnten. An der Kammer befanden sich zwei Luftventile mit Filter, von denen eines mit einem Kompressor verbunden war (KNF Neuberger, Freiburg, Deutschland), um die Luft in der Kammer auszutauschen. Alle Schlauchverbindungen bestanden entweder aus autoklavierbarem Silikon oder Teflon. Während des Infektionsvorgangs wurde die Bakteriensuspension durch eine Düse (Modell Nr. 97058, Düsen-Schlick, Untersiemau, Deutschland) mit Hilfe eines Kompressors als Aerosol versprüht (Baltes et al. 2002).

#### B 4.3 Bakterienstamm, Anzucht und Vorbereitung der Kultur für die Aerosolisierung

Für die experimentelle Aerosol-Infektion wurde der *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotyp 7 Stamm AP76 verwendet (Anderson et al. 1991), der bei Schweinen zu einem überwiegend akuten, nicht-letalen Krankheitsverlauf führt (Teutenberg-Riedel et al., unveröffentlicht). Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen (37°C und 5% CO<sub>2</sub>) in PPLO Medium (Difco, Augsburg, Deutschland) zusammen mit NAD (10µg/ml; Merck AG, Darmstadt, Deutschland) und Tween<sup>®</sup>80 (0,1%). Für die Aerosol-Infektion wurden 45 ml des supplementierten PPLO Mediums mit 5 ml einer Übernachtskultur des *A. pleuropneumoniae*-Stamms inokuliert. Die Kultur wurde für etwa zwei Stunden bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 inkubiert. Danach wurde die Kultur auf Eis gekühlt, 1:300 mit eiskaltem NaCl (150 mM) verdünnt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten. Unmittelbar vor der Aerosolisierung wurde die Bakteriensuspension 1:100 mit eiskaltem NaCl (150 mM) verdünnt, so dass eine Dosis von 13 ml (für fünf Schweine) einer Menge von etwa  $1 \times 10^5$  koloniebildenden Einheiten/ml entsprach. Während der Infektion befanden sich bei dieser Dosis eine Menge von etwa  $1 \times 10^2$  *A. pleuropneumoniae*-Zellen pro Liter Aerosol in der Kammer. Eine derartige Menge des Stamms AP76 induziert bei Schweinen eine vorwiegend schwere, jedoch selten letale Lungenerkrankungen (Baltes et al. 2002).

#### B 4.4 Experimentelle Aerosol-Infektion mit *A. pleuropneumoniae*

Es wurden jeweils fünf Schweine zur gleichen Zeit in der Kammer infiziert. Um eine möglichst gleichmäßige Verteilung des Aerosols in der Kammer zu erhalten, wurde die Düse

auf den Wert „5“ gestellt und das den Flüssigkeitsfluss regulierende Ventil auf den Wert „75“. Die Aerosolbildung erfolgte für 2 min bei einem Druck von 2 Bar. Zehn Minuten nach dem vollständigen Vernebeln der 13 ml Dosis wurde die Luft in der Kammer zehnmal innerhalb 20 Minuten ausgetauscht bevor die Kammer geöffnet wurde und die Tiere in ihre Ställe zurückgebracht wurden.

#### B 4.5 Untersuchung der Tiere vor und nach der Infektion

Von der Woche vor der Aerosol-Infektion an bis hin zum Tag der Sektion wurden die Schweine täglich untersucht. Die klinische Untersuchung umfasste dabei die Beurteilung des Allgemeinbefindens der einzelnen Tiere als auch eine Bewertung der typischen Krankheitssymptome wie Apathie, Futtermittelverweigerung, Erbrechen, Husten, Fieber und Dyspnoe. Zusätzlich wurde an Tag -7 (pre-infectionem) und an den Tagen 4 und 20 (post infectionem) eine Untersuchung der Lunge durch Ultraschall und Röntgen durchgeführt. Aus allen Daten wurde ein Respiratory Health Score (RHS) gebildet. Die Ermittlung und Auswertung dieser Daten waren Bestandteil einer Begleitstudie und können der entsprechenden Veröffentlichung entnommen werden (Hoeltig 2009).

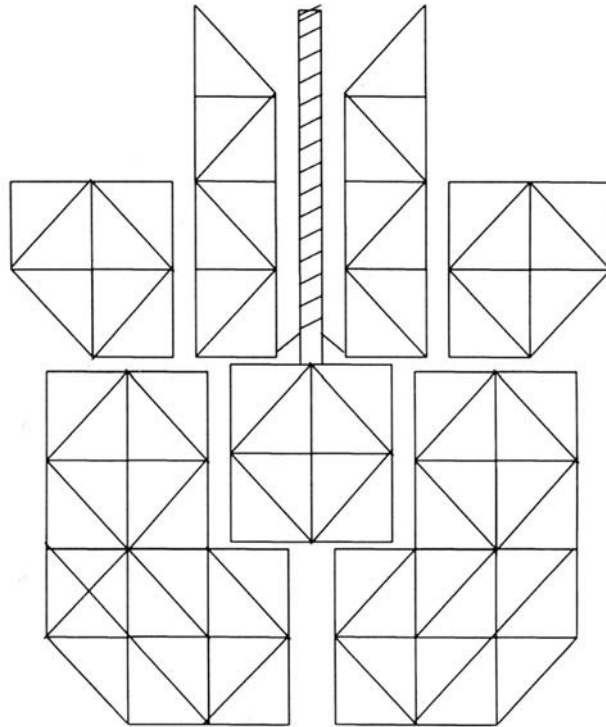
#### B 4.6 Entnahme von bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit (BALF)

Die Bronchialspülprobe gestattete es, kurzfristig narkotisierte Schweine zu untersuchen, um einen Überblick über die aktuell im Lungen-Surfactant vorliegenden Proteine zu erhalten. Die Proben wurden jeweils bei gesunden, uninfizierten Tieren an Tag -7 entnommen, sowie bei infizierten Tieren an Tag 4 bzw. 21 direkt vor der Sektion. Zu Beginn wurden die Tiere durch eine intramuskuläre Injektion von Azaperon (2 mg /kg Körpergewicht) und Ketamin (15 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Die ruhiggestellten Schweine wurden auf einer Hängematte in Bauchlage gebracht, so dass ihre Beine durch die vier in der Matte vorgefertigten Löcher nach unten hingen. Der Oberkiefer wurde durch ein Seil nach oben fixiert, so dass der Rücken bei Ansicht von oben und von der Seite aus eine klare Rückenlinie zeigte. Die Zunge des Schweins wurde zur Seite gelegt und anschließend ein Zungenspatel in Verbindung mit einem Laryngoskop (Heine Optotechnik, Herrsching, Deutschland) unter Sichtkontrolle über den Zungengrund in Richtung Kehledeckel geführt. Der Kehledeckel wurde mittels Laryngoskop nach unten gezogen, so dass der freie Rand des Kehledeckels sichtbar war. Anschließend wurde der Zungenspatel über den freien Rand des Kehlkopfes in die Stimmritze geführt. Über die Führung des Zungenspatels wurde nun ein flexibles fiberoptisches Bronchoskop des Typs XP20, P20, P20D, PE2 oder IT3 (Olympus, Hamburg, Deutschland) im Schutz eines Plastikschlauches gegen Bisschädigungen in die Stimmritze geschoben und mit Hilfe einer Kamera bis in den Bronchus trachealis eingeführt. Ein

Volumen von 100 ml steriler Kochsalzlösung (150 mM) wurde in fünf Fraktionen zu jeweils 20 ml in den Lungenlappen gespült und mit Hilfe einer Vakuumpumpe (Endoaspirator, Georg Pauldrach, Hannover, Deutschland) wieder abgesaugt. Dabei wurde direkt nach der Zugabe der Lösung ein Unterdruck von 0,2 bis 0,5 Bar erzeugt und in einigen Schüben so viel Flüssigkeit wie möglich wieder zurückgewonnen. Die BALF wurde nach der Entnahme sofort auf Eis gelagert. Das Bronchoskop wurde vor seinem nächsten Einsatz mechanisch gereinigt, mit Leitungswasser gespült und desinfiziert. Für die Desinfektion wurde der Innenraum des Bronchoskopes an einen Spülkreislauf angeschlossen und die Apparatur für 15 min in ein Desinfektionsbad gelegt. Danach wurde alles sorgfältig mit Leitungswasser ausgespült und durch komprimierte Luft getrocknet. Um die zellulären Bestandteile der BALF zu entfernen, wurden diese bei 18.000 x g und 4°C in einer Zentrifuge (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) sedimentiert. Der Überstand wurde bis zu seiner Verwendung bei -70°C gelagert.

#### B 4.7 Sektion der Tiere und Bestimmung des Lungenläsions-Scores

Die Schweine wurden durch eine intravenöse Injektion mit 10 ml Pentobarbital (Eutha 77<sup>®</sup>) euthanasiert. Die durch die *A. pleuropneumoniae* Infektion entstandenen Lungenläsionen wurden adspektorisch und palpatorisch begutachtet und ihr Schweregrad nach der Methode von Hannan *et al.* (Hannan 1982) bewertet. Dieses Score-System wurde als Referenz-Methode für Impfstoffversuche mit *A. pleuropneumoniae* in das Europäische Arzneibuch (<http://www.pheur.org>) aufgenommen. Bei der Bestimmung wurden die Größe und die Position der Läsionen in einer Abbildung vermerkt, auf der die sieben Lungenlappen in Form von Dreiecken abgebildet waren (Abb. 4). Pro Lungenlappen war ein maximaler Score von 5 möglich (daraus ergibt sich ein maximaler Score von 35 bei Veränderung der gesamten Lunge). Für die bakteriologische Untersuchung wurde von jeder Lappenspitze und von den Tonsillen eine Gewebeprobe entnommen. Zusätzlich kam eine Probe mit verändertem Gewebe hinzu, sofern diese noch nicht durch eine der anderen Proben repräsentiert wurde. Für die Proteomanalyse wurde jeweils verändertes und unverändertes Lungengewebe entnommen, ein kleiner Teil (0,5 g) davon abgetrennt und der Rest bei -196°C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zu seiner weiteren Verwendung wurden dieser bei -70°C gelagert. Die kleine Gewebeprobe wurde hingegen sofort für die Analyse vorbereitet.



**Abb. 4: Schemazeichnung zur Ermittlung des Lungenläsions-Scores.** Dargestellt ist die Trachea mit den sechs Lungenlappen und dem Anhangslappen. Die geschädigten Lungenbereiche werden markiert, ausgezählt und als Anteil der Dreiecke pro Lungenlappen bewertet. Pro Lappen kann ein maximaler Score von 5 erreicht werden, für die gesamte Lunge ein Score von 35.

#### B 4.8 Bakteriologische Untersuchung der Gewebeproben

Von jedem der bei der Sektion entnommenen Gewebeproben der sieben Lungenlappen wurde jeweils ein fraktionierter Ausstrich auf einem *A. pleuropneumoniae* Selektivnährboden (Jacobsen et al. 1996) angefertigt. Im Falle, dass erkranktes Lungengewebe vorhanden war, jedoch in keiner dieser Proben vorlag, wurde eine weitere Probe mit verändertem Gewebe entnommen und ausgestrichen. Um mögliche Begleitinfektionen erkennen zu können, wurde zusätzlich ein Ausstrich auf Columbia-Schafblutagar angefertigt. Wenn Kolonien von *A. pleuropneumoniae* in der ersten oder zweiten Fraktionierung auftraten, wurde die Reisolation mit einem Pluszeichen bewertet. War *A. pleuropneumoniae* nicht oder nur im direkten Organabklatschbereich vorhanden wurde die Reisolierung als negativ bewertet. Die positiven Kolonien wurden zusätzlich auf supplementiertem PPLO-Agar subkultiviert und die Identität durch einen Urease-Assay (Jacobsen et al. 2005) und einer PCR-Analyse mit den Primern ApxII-A1 und ApxII-A2 bestimmt (Tonpitak et al. 2002). Für den Urease-Test wurden die Kolonien einer Kulturplatte mit jeweils 10 ml einer Urease-Test-Agarose (0,5% [w/v] Agarose, 20 mg/ml Harnstoff, 100 µg/ml Phenolrot) überschichtet und für 1 - 5 min bei 37°C inkubiert. Eine purpurfarbene Färbung der Kolonie in Ringform deutete auf eine Urease-Aktivität hin, eine gelbe Färbung hingegen auf negative Kolonien.

## B 5 Proteomanalyse von BALF und Lungengewebe

### B 5.1 Vorbereitung der Proteine

#### B 5.1.1 Auswahl der Proben

Aufgrund einer signifikanten Korrelation zwischen dem RHS-Score und dem Lungenläsions-Score (Hoeltig 2009), wurden die Proben gemäß der bei der Sektion ermittelten Lungenveränderungen ausgewählt. Dabei wurden bei den Zuchtlinien Deutsche Landrasse und Piétrain die Tiere mit stark veränderten Lungen ausgewählt; bei der Zuchtlinie Hampshire waren keine Tiere mit veränderten Lungen verfügbar. Für die Analyse der Veränderung der Glykoprotein-Expression in BALF während des Krankheitsverlaufes wurden insgesamt neun Tiere aus jeder Zuchtlinie ausgewählt. In Bezug auf den Tag der Sektion (Tag 4 / 20) hatten die Tiere der Deutschen Landrasse durchschnittliche Scores von jeweils 10,6 und 11,8, Tiere der Pietrain-Linie Scores von 8,6 und 3,8 und Tiere der Hampshire-Linie Scores von 0,2 und 0. Für die Analyse der unterschiedlichen Glykoprotein-Expression zwischen den Zuchtlinien an den Tagen -7, 4 oder 20, wurden jeweils drei aufgereinigte BALF-Proben einer Rasse miteinander gepoolt. Dabei standen für den Tag 4 bei der Pietrain-Linie nur zwei Tiere zur Verfügung. Hier hatten die Tiere der Deutschen Landrasse von Tag 4 bzw. Tag 20 durchschnittliche Scores von jeweils 9,9 und 9,9, Tiere der Pietrain-Linie Scores von 10,1 und 9,9 und Tiere der Hampshire-Linie Scores von 0,2 und 0. Für die Analyse der Lipid Raft assoziierten Proteine wurde von jeder Zuchtlinie ein akut infiziertes Tier (Tag 4) mit einem Lungenläsions-Score von mindestens 5 ausgewählt.

#### B 5.1.2 Isolierung der Glykoproteine aus BALF durch Lektin-Affinitätschromatographie

Zu dem zellfreien BALF-Überstand aus Abschnitt C 4.7 wurden zunächst Protease-Inhibitoren gegeben (25 µM PMSF, 375 µM Trypsin-Chymotrypsin Inhibitor, 25 nM Pepstatin, 250 nM Antipain, 250 nM Leupeptin, 375 µM Aprotinin; Endkonzentrationen). Um die Gefahr einer unspezifischen Protein-Wechselwirkung während der Chromatographie möglichst gering zu halten, wurde die Salzkonzentration der Proben mit 5 M NaCl auf 500 mM angehoben. Eine Chromatographiesäule wurde mit 1 ml Concanavalin A Sepharose 4B befüllt (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) und mit 10 Volumen Bindepuffer equilibriert (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MnCl<sub>2</sub>, pH 7,4). Durch eine Pumpe (Modell EP-1 Econo Pump, Bio-Rad, München, Deutschland) wurde die BALF mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 15 cm/h bei einer Temperatur von 8 - 10°C auf die Säule gegeben. Danach wurde die Säule mit 10 Volumen Bindepuffer gewaschen und die Glykoproteine mit 10 Volumen Elutionspuffer eluiert (20 mM Tris, 500 mM Methyl-alpha-D-Mannopyrannosid, pH 7,4). Das Eluat wurde mit Protease-Inhibitoren versetzt und störende Salze und Zucker durch eine Dialyse entfernt. Dafür wurde ein Dialyseschlauch mit einem Cut-Off von 7000

Dalton verwendet (Spectra/Por<sup>®</sup> 7, Spectrum Laboratories, Breda, Niederlande) und über Nacht gegen eine leicht gepufferte Lösung (20mM TrisHCl, pH 7,4) in einem Verhältnis von 1:2500 dialysiert. Die Proben wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung in Anwesenheit von Protease-Inhibitoren bei -70°C aufbewahrt.

#### B 5.1.3 Isolierung von Lipid Raft assoziierten Proteinen aus Gewebe

Für die Isolierung der Membranmikrodomänen war es besonders wichtig, die frisch bei der Sektion entnommenen Gewebeproben von veränderten und unveränderten Lungenbereichen direkt und ohne zwischenzeitliches Einfrieren weiterzuverarbeiten. Dazu wurden jeweils 0,5 g des Gewebes mit einer Schere zerkleinert und in ein Reagenzglas mit 4,5 ml vorgekühltem PBS (NaCl: 0,8%, KCl: 0,02%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0,144%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,02%) und Protease-Inhibitoren gegeben (25 µM PMSF, 375 µM Trypsin-Chymotrypsin Inhibitor, 25 nM Pepstatin, 250nM Antipain, 250 nM Leupeptin, 375 µM Aprotinin; Endkonzentrationen). Bei allen folgenden Schritten wurden die Proben bei 4°C gehalten. Das Gewebe wurde nun in mehreren Schritten durch einen ULTRA-TURRAX homogenisiert (IKA<sup>®</sup>-Werke, Staufen, Deutschland). Danach wurde mit einer 5 ml Omnifix<sup>®</sup> - Spritze und einer 0,8 x 40mm Sterican<sup>®</sup> - Kanüle (BRAUN, Melsungen, Deutschland) die Flüssigkeit zwanzig Mal aufgezogen und wieder abgelassen, um den folgenden Zellaufschluss zu erleichtern. Nach der Zugabe von 0,5 ml einer 10%-igen Triton X-100/PBS-Lösung wurden die Proteine für drei Stunden auf einer Wippe solubilisiert. Danach erfolgte eine Vorzentrifugation für 20 min bei 10.000 x g in einer Ultrazentrifuge (Optima, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland), um unlöslichen Zelldebris zu entfernen. Dann wurde der Überstand für 1,5 h bei 100.000 x g zentrifugiert, um die Detergenz-unlösliche Membranfraktion (DRM) zu erhalten. Daraufhin wurde der Überstand verworfen, das Zentrifugierrohrchen mit PBS gewaschen und das DRM-Pellet in 500 µl 1% SDS/PBS aufgenommen. Die Proben wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung in Anwesenheit von Protease-Inhibitoren bei -70°C aufbewahrt.

#### B 5.1.4 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde durch ein BCA Proteinbestimmungs-Kit ermittelt (Micro BC Assay, Uptima Interchim, Montluçon, Frankreich). Diese Anwendung basiert auf demselben Prinzip wie der Lowry-Assay, bei dem ebenfalls eine Umwandlung von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup> unter alkalischen Bedingungen stattfindet (Smith et al. 1985). Die Bicinchoninsäure chelatiert dabei Cu<sup>+</sup>-Ionen mit einer sehr hohen Spezifität und formt einen wasserlöslichen, lila-farbenen Komplex. Der Assay wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt und die

spezifische Verfärbung der Proben in einem ELISA-Lesegerät (Infinite<sup>®</sup>, TECAN, Crailsheim, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen.

#### B 5.1.5 Ausfällung und Resuspension der Proteine

Die Glykoproteine aus der BALF wurden vor ihrer gelelektrophoretischen Auftrennung in Anwesenheit von 10% TCA bei 4°C über Nacht ausgefällt. Für die konventionelle 2-D Gelelektrophorese wurden bezüglich der BALF-Analyse 150 µg Protein/Probe für analytische Gele und 450 - 600 µg Protein/Probe für präparative Gele ausgefällt. Für die „Lipid Raft“-Analyse wurden hingegen 200 µg Protein/Probe verwendet. Bei der 2-D DIGE wurden etwa 50 - 75 µg Protein/Probe jedoch insgesamt 150 µg pro Probenpool (3 x 50 µg bzw. 2 x 75 µg) eingesetzt. Bei den „Lipid Raft“ assoziierten Proteinen hingegen musste der Gehalt an SDS in der Lösung reduziert werden, damit es aufgrund des ionischen Charakters des Detergenz zu keiner Beeinflussung der isoelektrischen Fokussierung kam. Daher wurde hier zusätzlich mit Aceton ausgefällt (Puchades et al. 1999). Dabei wurden 9 Volumina Präzipitationslösung (Aceton, 10% TCA, 0,07% 2-Mercaptoethanol; Endkonzentration) mit der Probe gemischt und für 1 h bei -20°C ausgefällt. Bei beiden Methoden wurde die Probe danach bei 18.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet mit eiskaltem Aceton durch Vortexen gewaschen und abzentrifugiert. Danach wurde ein zweites Mal gewaschen, indem die Probe für insgesamt 30 min bei -20°C gekühlt und alle 10 min für 30 sec gevortext wurde. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet. Waren die Proteine nicht für eine CyDye<sup>™</sup>-Markierung vorgesehen, so wurde das Pellet in 100 µl Rehydratationspuffer aufgenommen (2 M Thio-Urea, 7 M Urea, 4% [w/v] CHAPS, 18 mM DTT, 2 % IPG-Puffer 3-11 NL) und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Unlösliche Partikel wurden durch eine Zentrifugation für 5 min bei 16.000 x g entfernt.

#### B 5.1.6 Proteinmarkierung durch CyDye<sup>™</sup>

In diesem Fall wurde das Proteinpellet nach der Fällung und zweimaligem Waschen in 100 µl Lysispuffer aufgenommen (30 mM TrisHCl [pH 8,0], 2 M ThioUrea, 7 M Urea, 4% [w/v] CHAPS). Die Proteinkonzentration betrug je nach Ansatz zwischen 1,8 mg/ml und 3 mg/ml. Die Durchführung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland). Für eine effiziente Markierung der Proteine wurde durch eine 50 mM NaOH-Lösung der pH-Wert auf 8,5 angehoben. Zu jedem Proteinpool mit jeweils 150 µg Protein wurde 1 µl der CyDye-Gebrauchslösung (CyDye in Dimethylformamid (250 pmol/µl) gegeben und für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Dabei wurden die zu vergleichenden Proteinpools jeweils mit einem anderen Farbstoff markiert. Die Reaktion wurde durch die



Zugabe von 1 µl Lysinlösung (10 mM) und einer weiteren Inkubation für 10 min im Dunkeln gestoppt. In dieser Form konnten die Proteine bis zu 6 Monate bei -70°C aufbewahrt werden. Am Tag ihrer Verwendung wurden die Proteinproben, die auf einem Gel miteinander verglichen werden sollten, miteinander gepoolt und mit DTT und IPG-Puffer supplementiert (siehe Abschnitt C 5.1.4). Unlösliche Partikel wurden durch eine Zentrifugation für 5 min bei 16.000 x g entfernt.

### B 5.2 1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Am Vorabend wurden die Gelstreifen für die Fokussierung (Immobiline DryStrips 3-11 NL 24cm, GEHealthcare, Freiburg, Deutschland) in einem Volumen von jeweils 450 µl Rehydratationspuffer (2 M Thio-Urea, 7 M Urea, 4% (w/v) CHAPS, 18 mM DTT, 2% IPG Puffer 3-11 NL) für 10-18 h in einem Immobiline DryStryp Reswelling Tray (GE Healthcare) rehydriert. Danach wurden die Streifen auf das Ettan™ IPGphor™ Cup Loading Manifold (GE Healthcare) gelegt und die vorbereiteten Proteinproben in die im Bereich der Anode befindlichen Sample-Cups gegeben. Die Fokussierung wurde für 21 h in einem elektrischen Feld durch ein regulierbares Spannungsgerät durchgeführt (Ettan™ IPGphor™, GE Healthcare). Dabei wurden folgende Einstellungen verwendet: 3 h bei 150 V, 3 h bei 300 V, 6 h bei einem 1000 V Gradienten, 3 h bei einem 8000 V Gradienten und 6 h bei 8000 V. Als Vorbereitung für die zweite Dimension wurden die Streifen zweimal für 15 min equilibriert. Dabei enthielt die Lösung 100 mM TrisHCl (pH 8,0), 6 M Urea, 30% (v/v) Glycerol und 2% SDS zusammen mit 0,5% (w/v) Dithiothreitol für den ersten Equilibrierungsschritt und 4,5% (w/v) Iodoacetamid für den zweiten Equilibrierungsschritt.

### B 5.3 2. Dimension: SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Am Vortag wurden Polyacrylamidgele mit einem Anteil von 12,5% (v/v) Acrylamid (SERVA, Heidelberg, Deutschland) und 0,33% Bisacrylamid (SERVA, Heidelberg, Deutschland) gegossen und nach der Polymerisation bei 4 - 8°C über Nacht aufbewahrt. Dabei wurden niedrig fluoreszierende Glasplatten und als Gießstation ein Ettan™ DALTsix Gel Caster (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) verwendet. Die Fokussierstreifen aus der ersten Dimension wurden waagrecht auf die Oberfläche der Gele gebracht, so dass keine Luftblasen zwischen den Streifen und den Gelen zu sehen waren. Mit Hilfe einer 0,5%-igen Agarose-Lösung wurden beide Gele überschichtet. Die Elektrophorese wurde bei einer Temperatur von 15°C und einer konstanten Stromstärke von 50 mA über Nacht in einem Ettan™ DALTsix Electrophoresis System (GE Healthcare) durchgeführt. Am folgenden Tag wurde die Spannung auf 300 V erhöht, bis die Lauffront der Gele am unteren Ende der Glasplatten zu sehen war.

**Tabelle 2: Zusammensetzung der SDS-Gele für die zweidimensionale Gelelektrophorese von Proteinen**

Gel-Komponenten	SDS-Gel (12,5%)
H <sub>2</sub> O (ml)	140
30% [w/v] Acrylamid (ml)	188
1,5 M Tris pH 8,8 (ml)	120
10% SDS (ml)	4,5
TEMED (µl)	62
10% APS (ml)	4,5

## B 5.4 Detektion der Proteine

### B 5.4.1 Silberfärbung

Für die Anwendung einer Färbelösung mit einer Nachweisgrenze bis zu 2 ng Protein wurde folgendes Protokoll angewendet (Rabilloud 1999). Bei Gelen, die miteinander verglichen werden sollten, wurden exakt die gleichen Inkubationszeiten und Lösungsvolumina verwendet. Die zu färbenden Gele wurden für mindestens 3 x 30 min bzw. über Nacht auf dem Schwenktisch fixiert (30% Ethanol, 5% Essigsäure). Falls zuvor eine Coomassie-Färbung durchgeführt wurde, war keine zusätzliche Fixierung notwendig. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min in destilliertem Wasser wurden die Gele für genau eine Minute mit einer 0,02%-igen [v/v] Natriumthiosulfatlösung vorbehandelt. Nach zweimaligem Waschen für eine Minute wurde für mindestens 30 min eine Imprägnierlösung (0,025% [v/v] Formaldehyd, 12,5 mM Silbernitrat) auf die Gele gegeben. Danach folgte für 10 sec ein weiterer Waschgang. Nach Zugabe der Entwicklerlösung (0,2 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,01% [v/v] Formaldehyd, 0,025% einer 10%-igen Thiosulfatlösung/l) wurde 5-12 min gewartet, bis die Proteinspots gut vor dem Hintergrund sichtbar waren. Die Reaktion wurde mit einer Stopplösung (0,3 M TrisHCl, 2% [v/v] Essigsäure) beendet und die Gele für 30-60 min darin geschwenkt. Danach wurden die Gele mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen.

#### B 5.4.2 Kolloidale Coomassiefärbung

Zur Herstellung und Anwendung einer Färbelösung mit einer Nachweisgrenze von mindestens 25 ng Protein wurde folgendes Protokoll angewendet: Zu einem Volumen von 500 ml destilliertem Wasser wurden 170 g Ammoniumsulfat gegeben und der Ansatz unter leichtem Erhitzen gerührt. Sobald sich alles gelöst hatte, wurden 30 ml o-Phosphorsäure und sehr langsam ein Volumen von 340 ml Methanol hinzugegeben. Nach dem Auffüllen der Lösung auf ein Volumen von einem Liter mit destilliertem Wasser wurde 1 g Coomassie Blue G-250 hinzugegeben. Die Lösung wurde daraufhin von der Heizplatte entfernt und für 1 h weiter gerührt. Bei der Anwendung wurde das Gel zuvor für mindestens 30 min in 45% Methanol und 1% Essigsäure fixiert. Das Gel wurde über Nacht in der Färbelösung gelassen und mit Hilfe einer Wippe leicht geschwenkt. Das Entfärben erfolgte mit destilliertem Wasser.

#### B 5.4.3 Visualisierung fluoreszenzmarkierter Proteine durch einen Laserscanner

Die Gele wurden auf einem Typhoon Trio™ Scanner (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) mit einer Auflösung von 100 Punkten/cm eingescannt. Dabei wurden Filter eingesetzt mit spezifischen Anregungs- und Emissions-Wellenlängen für Cy2 (Filter: 520 BP 40; 488 nm / 520 nm), Cy3 (Filter: 580 BP 30; 532 nm / 580 nm) und Cy5 (Filter: 670 BP 30; 633 nm / 670 nm). Die Intensität der Pixelwerte wurde in der Weise angepasst, so dass das maximale Volumen jedes Scanbildes einen Wert zwischen 50.000 und 90.000 hatte.

#### B 5.5 Auswertung der Proteindaten

##### B 5.5.1 Quantifizierung der Daten aus den 2-D Silbergele

Die Gele wurden auf einem ScanExpress™ A3 Scanner (Mustek, Neuss, Deutschland) mit einer Auflösung von 400 dpi eingescannt. Die Proteinspots der 2-D Silbergele wurden mit Hilfe der ImageJ V.1.41 Software (Image Processing and Analysis in Java; <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.htm>) quantifiziert (Abramoff 2004).

##### B 5.5.2 Statistische Auswertung der Daten aus den 2-D Silbergele

Die statistische Auswertung erfolgte durch das Programm SAS (Statistical Analysis Software, SAS, Heidelberg, Deutschland). Die Überprüfung der Daten auf Signifikanz wurde durch einen gepaarten T-Test unter der Annahme einer Normalverteilung für die Residualwerte ermittelt.

### B 5.5.3 Quantifizierung der Daten aus den 2-D DIGE-Gelen

Die Proteindaten aus den 2-D DIGE-Gelen wurden zu Beginn mit Hilfe der Image-Quant™ V.5.2 Software (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) ermittelt, um beim Scannen die richtige Laserintensität einzustellen und die Bilder abzuspeichern. Die quantitative Analyse wurde hingegen mit der DeCyder™ V.6.5 Software (GE Healthcare) nach den Hinweisen des Herstellers durchgeführt.

### B 5.6 In-Gel Verdau der Proteine

Verwendet wurden hierbei Proteinspots aus 2-D DIGE Gelen bzw. aus präparativen 2-D Gelen, die zuvor durch eine kolloidale Coomassielösung angefärbt wurden. Die ausgewählten Spots wurden ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und die Peptide nach der Methode von Wilm und Mann (Shevchenko et al. 1996) aus dem Gelstück extrahiert. Nach dem Herausschneiden aus dem Gel wurden die Spots zunächst durch Waschen mit 50 mM Ammoniumbicarbonat von Staub befreit. Danach wurde mit Hilfe von 50 mM Ammoniumbicarbonat / 50% [v/v] Acetonitril das Coomassie Blau herausgewaschen. Nach einer Dehydrierung mit Acetonitril, wurden die Proteine in den Gelstücken durch eine 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung mit 10 mM DTT zunächst bei 56°C für 1h reduziert und danach durch Zugabe einer 100 mM Iodoacetamidlösung bei 25°C für 45 min im Dunkeln alkyliert. Danach wurde zweimal mit 50 mM Ammoniumbicarbonat gewaschen und mit Acetonitril dehydriert. Zu den dehydrierten Gelstücken wurde dann ein 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Puffer zusammen mit 10 ng/ $\mu\text{l}$  Trypsin (Sequenzierqualität; Promega, Mannheim, Deutschland) gegeben und der Ansatz bei 37°C für 12 – 16 h inkubiert. Die Peptide wurden darauf in drei Schritten durch 20, 50, und 80% [v/v] Acetonitril zusammen mit 0,5% [v/v] Ameisensäure extrahiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Proben für jeweils 30 min in ein Ultraschallbad gestellt. Die einzelnen Fraktionen wurden gepoolt und das Lösungsmittel in einer beheizbaren Vakuumzentrifuge entfernt. Die getrockneten Peptide wurden in 3 – 5  $\mu\text{l}$  50 % [v/v] Acetonitril und 0,1% [v/v] Ameisensäure gelöst und bis zu ihrer Verwendung bei 4 – 8°C aufbewahrt.

### B 5.7 Proteinidentifizierung durch MALDI-TOF MS oder ESI-Q-TOF MS/MS

Die Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation Time-of-Flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie (MS) wurde mit einem Voyager-DE™ Pro (Applied Biosystems, Forster City, USA) durchgeführt. Als Vorbereitung wurde 1  $\mu\text{l}$  der Peptidlösung zusammen mit 1  $\mu\text{l}$  der Matrix gemischt ( $\alpha$ -Cyano-Hydroxymizsäure [ACHC, Bruker Daltonics, Billerica, USA], 5 mg/ml in 50% [v/v] Acetonitril mit 0,1% [v/v] Trifluoressigsäure [TFA]) und auf die Probenplatte pipettiert. Die Peptidspektren wurden im positiven Reflektionsmodus mit

durchschnittlich 1000 Laserschüssen pro Probe ermittelt. Die Kalibrierung der Massenspektren erfolgte durch die Kalibriermischungen CalMix1 und CalMix2 (Applied, Biosystems). Die Auswertung wurde mit der Applied Biosystems Data Explorer® V.4.8 Software durchgeführt und damit Peptidmassenlisten für den Datenbankabgleich generiert. Dabei wurden die folgenden Einstellungen verwendet: 1. advanced baseline correction setting peak width = 31, flexibility = 0,5, degree = 0,1; 2. noise filter setting noise removal std. dev. To remove = 2; 3. peak deisotoping; 4. calibration by importing a calibration spectrum. Die resultierende Peptidmassenliste wurde darauf in Microsoft® Office Excel transferiert und ein Teil davon für die Proteinsuche verwendet. Für die Suche wurde der Peptidmassenfingerprint-Algorithmus der Mascot Homepage (<http://www.matrixscience.com>) verwendet und die NCBI (National Centre for Biotechnology Information) nicht-redundante Proteindatenbank gewählt. Die Einstellungen berücksichtigten Carbamidomethylierungen an Cysteinresten, Oxidationen an Methioninresten und ein maximales Fehlschneiden durch Trypsin von 1. Es wurde eine Abweichung von 0,2 Dalton zwischen der tatsächlichen und der gemessenen Masse toleriert. Ein Protein galt als identifiziert, wenn der Score für die Wahrscheinlichkeit unter der Signifikanzgrenze lag ( $p < 0,05$ ). Die Identifizierung wurde zum Teil durch Übereinstimmungen des berechneten Molekulargewichtes und des isoelektrischen Punktes mit den Spotpositionen auf dem Gel bestätigt. Der Einfluss der Glykosylierung wurde jedoch für diese Werte in den Datenbanken generell nicht mit berücksichtigt, so dass es hier durchaus zu Abweichungen kommen konnte, obwohl das Protein richtig identifiziert wurde.

Alternativ wurde die Proteinidentifizierung anhand von Elektronen-Spray Injektions Quadrupol Time-of-Flight Massenspektrometrie (MS/MS) durchgeführt. Dafür wurden 4 µl der Peptidlösung in eine kleine Kapillare gefüllt (Nanoflow Probe Tip – long, Waters, Milford, Massachusetts, USA). Die Peptidsequenzen wurden durch Fragmentierungsdaten aus einer Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) auf einem ESI-Q-TOF Massenspektrometer (Q-TOF Ultima, Waters) ermittelt. Dabei wurde der positive Reflektionsmodus verwendet. Identifiziert wurden die Proteine durch die ProteinLynx Global Server Software (Version 2,1, Waters), bei der in der vollständigen NCBI-Datenbank gesucht wurde (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/FASTA/nr.gz>; Download vom 12.03.2007). Eine Hintergrundsubtraktion wurde für das Übersichtsspektrum durchgeführt, jedoch nicht für das MS/MS-Spektrum. Der Savitzky-Golay Algorithmus wurde für das Smoothing mit zwei Iterationen angewendet. Das Smoothing-Fenster wurde auf drei Kanäle eingestellt. Für das Deisotoping und das Centroiding wurde die kleinste Peakweite der Elektronenspraydaten auf vier Kanäle gestellt. Centroid Top war 80%, die Auflösung bei 10.000 und der NP-Multiplier bei 1. Für MS/MS-Spektren wurde das Deisotoping (Medium) bei einem Grenzwert von 1% durchgeführt. Bei der Datenbanksuche wurde die Peptidtoleranz auf 100 ppm gestellt und

die Fragmenttoleranz auf 0,1 Dalton mit einem geschätzten Kalibrierfehler von 0,0025 Dalton. Der Molekulargewichtsbereich wurde auf 0 bis 400.000 Dalton festgelegt und der pI-Bereich auf 0 bis 14. Die „minimum peptides to match“ - Einstellung war 1 und die „maximum hits to return“ - Einstellung war 20. Als primäres Verdau-Enzym wurde Trypsin gewählt und ein einmaliges Fehlschneiden erlaubt. Die mögliche fixierte Modifizierung war Carbamidomethyl C, die mögliche variable Modifizierung hingegen Oxidation M. Es wurde eine automatische Überprüfung der Daten durchgeführt.

## B 6 Zellbiologische Proteinanalytik

### B 6.1 Herstellung von cDNA und Klonierung in einen eukaryotischen Expressionsvektor

#### B 6.1.1 RNA-Isolierung aus Gewebe

Als Ausgangsmaterial dienten 100 mg Gewebe aus der Leber eines Schweins der Piétrain-Zuchtlinie. Für die Isolierung der RNA wurde ein modifiziertes Protokoll des RNeasy Plus Kits (QIAGEN, Hilden, Deutschland) verwendet. Um die Gefahr einer Degradation der RNA möglichst gering zu halten, wurden alle Arbeitsschritte bei 4°C durchgeführt. Beim Zellaufschluss wurde das Gewebe zusammen mit 1 ml RLT-Puffer in ein Röhrchen mit Lysing Matrix A (Qbiogene, Heidelberg, Deutschland) gegeben und in einem FastPrep® -Gerät (Qbiogene) zweimalig für jeweils 40 sek bei Stufe 6 zerkleinert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 12.000 x g wurde der Überstand zur Homogenisierung in eine QIAshredder Spinsäule gegeben (QIAGEN). Nach erneutem Zentrifugieren für 2 min wurde die DNA in dem Homogenisat durch eine weitere Membran entfernt. Danach wurde das aufgereinigte Homogenisat mit 70%-igem Ethanol versehen und das Präzipitat in einer RNeasy Spinsäule aufgefangen und mit den Puffern RW1 und RPE gewaschen. Die aufgereinigte RNA wurde in 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Es folgte eine photometrische Bestimmung des Nukleinsäuregehalts der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die RNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -70°C gelagert.

#### B 6.1.2 Reverse Transkription der mRNA (cDNA-Synthese)

Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits (Fermentas, Ontario, USA) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden 5 µg Gesamt-RNA mit Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primern versehen und für 5 min bei 70°C inkubiert. Nach der Zugabe von Reaktionspuffer, dNTPs und einem Ribolock™ -Ribonuklease Inhibitor erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 37°C. Danach kam die Reverse Transkriptase

RevertAid™ H Minus M-MuLV (Fermentas) hinzu und es folgten Inkubationszeiten von 1 h bei 42°C für die Polymerisation und von 10 min bei 72°C für das Stoppen der Reaktion. Die cDNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

### B 6.1.3 Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde in einem Thermocycler (Eppendorf Mastercycler, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Es wurden Reaktionsansätze von jeweils 25 µl Gesamtvolumen verwendet. Für die Amplifikation von cDNA wurde das Enzym *Pfu* Ultra® II Fusion HS DNA Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) zusammen mit dem Enzym *Taq* Polymerase (Invitrogen, Eggenstein, Deutschland) verwendet, für die analytische Amplifikation von DNA hingegen die *Taq* Polymerase alleine. Die Zusammensetzung der Ansätze und die einzelnen Arbeitsschritte des Thermocyclers sind der jeweiligen Tabelle zu entnehmen. Für die Überprüfung von Transformanten wurden einzelne Bakterienkolonien in 100 µl destilliertem Wasser gelöst und davon 5 µl bei der PCR als Template eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde immer destilliertes Wasser anstelle von Template eingesetzt.

**Tabelle 3: Verwendete PCR-Primer und deren Eigenschaften.**

Primer	Sequenz / Eigenschaften
oLFcDNA1	5'-TATATCTCGAGATGAAGCTCTTCATCCCCGC-3' GC-Gehalt: 55%; T <sub>m</sub> : 59,4°C
oLFcDNA2	5'-ATAATCTCGAGCCTCATCATGAAGGCACAGG-3' GC-Gehalt: 55%; T <sub>m</sub> : 59,4°C
M13 forward	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' GC-Gehalt: 56%; T <sub>m</sub> : 51°C
M13 revers	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' GC-Gehalt: 47%; T <sub>m</sub> : 50°C
LFpcDNA4-1	5'-CAAGTACGCCCCCTATTGAC-3' GC-Gehalt: 55%; T <sub>m</sub> : 63°C
LF-2 forward	5'-TGCCATCCAGGGCCTG-3' GC-Gehalt: 69%; T <sub>m</sub> : 62°C

## Material und Methoden

LF-2 revers	5'-AACCACACTTGCCCGCAGT-3' GC-Gehalt: 58%; T <sub>m</sub> : 62°C
ApxII-A1	5'-GCTATGATTCCGGGTCAAGGA-3' GC-Gehalt: 50%; T <sub>m</sub> : 58°C
ApxII-A2	5'-TCATTACCGGTTCTCCAAC-3' GC-Gehalt: 50%; T <sub>m</sub> : 58°C
GAPDH-1	5'-CCTGCCGTCTGGAGAAAC-3' GC-Gehalt: 61%; T <sub>m</sub> : 62°C
GAPDH-2	5'-TTGAGGGCAATGCCAGCC-3' GC-Gehalt: 61%; T <sub>m</sub> : 62°C

**Tabelle 4: Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze.**

PCR-Komponenten	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen pro Reaktion (cDNA-Synthese)	Volumen pro Reaktion (Kontroll-PCR)
H <sub>2</sub> O	-	-	13,75 µl	11,15 µl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM	-	0,75 µl
DMSO	-	-	1,25 µl	-
Reaktionspuffer	10 x	1 x	2,5 µl	2,5 µl
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,5 µl	0,5 µl
Primer forward	5 pmol/µl	0,5 pmol/µl	2,5 µl	2,5 µl
Primer revers	5 pmol/µl	0,5 pmol/µl	2,5 µl	2,5 µl
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	5 units/µl	0,5-1 unit/Ansatz	0,2 µl (Zugabe am Ende der Reaktion)	0,1 µl
<i>Pfu</i> Ultra II Fusion HS DNA-Polymerase	-	-	1 µl	-
Template-DNA	-	-	1 µl	5 µl
Endvolumen	-	-	25 µl	25 µl



**Tabelle 5: Verwendete Primer-Kombinationen und PCR-Programme.**

Anwendung	Primerpaar	PCR-Programm
cDNA-Synthese	oLFcDNA1, oLFcDNA2	2' 95°C, (30" 95°C, 30" 54°C, 1:30" 72°C) x 40, 3' 72°C + 10' 72°C nach Zugabe von <i>Taq</i> Polymerase
Kontroll-PCR „Klonierung-TOPO“	M13 forward, M13 revers oLF-2 forw, M13 revers	2' 95°C, (30" 95°C, 1' 55°C, 2' 72°C) x 35, 10' 72°C
Kontroll-PCR „Klonierung-pcDNA4“	LFpcDNA4-1, LF-2 revers	2' 95°C, (30" 95°C, 1' 55°C, 2' 72°C) x 35, 10' 72°C
Kontroll-PCR „ <i>A. pp.</i> -Nachweis“	ApxII-A1, ApxII-A2	3' 94°C, (30" 94°C, 1' 55°C, 2' 72°C) x 35, 10' 72°C
Kontroll-PCR „DNA-Nachweis“	GAPDH-1, GAPDH-2	3' 95°C, (30" 95°C, 1' 57°C, 1' 72°C) x 35, 10' 72°C

#### B 6.1.4 Analyse von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Analytische Gele wurden mit 0,5 x TBE-Puffer hergestellt, präparative Gele hingegen mit 1 x TAE-Puffer. Pro 50 ml Gel wurde 1 µl einer 1%-igen [w/v] Ethidiumbromid-Stammlösung hinzugegeben. DNA-Fragmente mit einer Größe von >1000bp wurden in einem 0,8%-igen Gel aufgetrennt, Fragmente mit einer Größe von 200 bp – 1000 bp in einem 1,5%-igen Gel. Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 5 V/cm Gelkammerlänge angelegt. Die Analyse erfolgte mittels einer UV-Lichtbank und eines Photo-Imagers (Bio-Rad, München, Deutschland). Als Standard-Referenzmarker wurde entweder ein 100 bp DNA Marker oder ein 5000 bp Marker (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) verwendet.

#### B 6.1.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Aufreinigung erfolgte durch das NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II Kit (Clontech, California, USA) nach den Angaben des Herstellers. Dabei wurde das Gelstück mit dem DNA-Fragment mit einem DNA-freien Skalpell ausgeschnitten und zusammen mit dem NT-Puffer für 10 min bei 50°C gelöst. Die Lösung wurde dann an auf eine NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II Spin-Säule gegeben und die DNA durch eine Zentrifugation für 1 min bei 11.000 x g an eine Silica-Membran gebunden. Nach einem Waschvorgang mit NT3-Puffer wurde die Membran getrocknet und die DNA mit 30 µl NE-Puffer eluiert.

#### B 6.1.6 DNA-Restriktionsverdau

Um die DNA-Fragmente für die Klonierung vorzubereiten, wurden diese durch die Restriktionsendonuklease XhoI (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) verdaut. Dafür wurden 1 - 5 µg DNA zusammen mit dem Reaktionspuffer (10 mM TrisHCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,9) in einem 50 µl Ansatz über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Auftrennung über ein Agarose-Gel und eine Aufreinigung des DNA-Fragments durch eine Silica-Membran.

#### B 6.1.7 TOPO-Klonierung der cDNA

Die Klonierung mit Hilfe des TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kits (Invitrogen, Eggenstein, Deutschland) wurde mit leichten Modifizierungen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Ein Volumen von 4 µl des PCR-Produktes wurde mit Salzlösung und dem pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup> Vektor versehen und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden kompetente One Shot<sup>®</sup> *E. coli*-Zellen (Invitrogen) auf Eis aufgetaut. Danach wurde der gesamte Ansatz auf die Zellen gegeben und für 30 min bei gelegentlichem Schütteln des Gefäßes auf Eis inkubiert. Dann wurde ein Hitzeschock für 30 sec bei 42°C ohne Schütteln durchgeführt, die Zellen mit 250 µl raumtemperiertem S.O.C. Medium (Invitrogen) versetzt und für 1 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde ein Volumen von 50 µl des Ansatzes auf vorgewärmten und zuvor mit jeweils 40 µl IPTG (100mM) und 64 µl X-GAL (25mg/ml) beschichteten Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten (LB-Medium, 1,5% [w/v] Agar) ausgestrichen (100 µg/ml Ampicillin). Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag auf Koloniewachstum hin kontrolliert. Für die weitere Verwendung wurden pro Ansatz 10 – 20 ungefärbte Kolonien gepickt, der Erfolg der Klonierung mittels PCR kontrolliert und positiv getestete Kolonien weiter kultiviert.

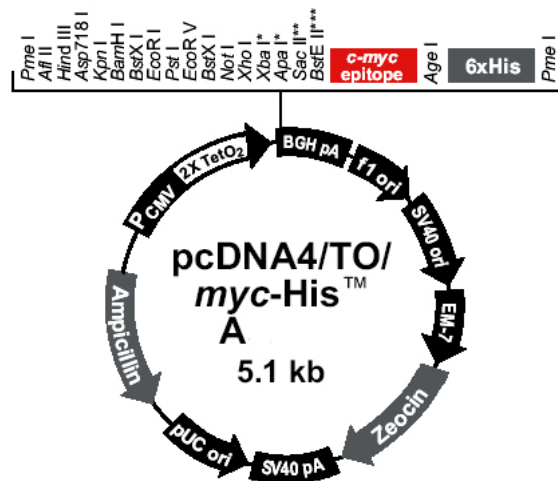
#### B 6.1.8 DNA-Sequenzierung

Die Nukleotidsequenzierungen wurden durch die Firma SEQLAB durchgeführt (Göttingen, Deutschland). Die Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe der Chromas Life Software ([www.technelysium.com](http://www.technelysium.com)) und über das Local Alignment Search Tool (BLAST) der NCBI-Homepage.

#### B 6.1.9 cDNA-Klonierung in einen eukaryotischen Expressionsvektor

Als Vorbereitung wurden jeweils 5 µg des pcDNA4/TO/*myc*-His<sup>™</sup>-Vektors (Invitrogen, Eggenstein, Deutschland) und 5 µg des TOPO-Vektors mit der integrierten cDNA über Nacht mit der Restriktions-endonuklease XhoI verdaut (siehe Abschnitt B 6.1.6). Der pcDNA4-

Vektor und das cDNA-Insert wurden am Folgetag über ein präparatives Agarose-Gel aufgetrennt und über eine Silica-Membran gereinigt (siehe Abschnitte B 6.1.4 und B 6.1.5). Um eine Re-Ligation des Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Enden durch Zugabe von 1 µl Alkalischer Phosphatase (CIP; New England Biolabs, Frankfurt am Main; Deutschland) und einer Inkubation von 1 h bei 37°C dephosphoryliert. Für die Ligation war es wichtig, dass das Insert deutlich im Überschuss vorlag. Es wurden zwei Ansätze mit unterschiedlichem Vektor-zu-Insert Verhältnis zusammen mit zwei Kontrollen in einem Volumen von jeweils 20 µl angesetzt und über Nacht bei 16°C inkubiert (siehe Tabelle 6). Zusätzlich wurden eine Negativkontrolle ohne Enzym und eine CIP-Kontrolle, die auf den vollständigen Plasmid-Verdau hin geprüft wurde, mitgeführt. Daraufhin wurden jeweils 5 µl der Ansätze für eine Transformation eingesetzt und die Zellen auf vorgewärmten LB-Agarplatten (100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen. Am folgenden Tag wurden die Platten untersucht, die Kolonien gepickt und der Erfolg der Klonierung mittels PCR kontrolliert. Positiv getestete Bakterienkolonien wurden weiter kultiviert.



**Abb. 5: Eigenschaften des eukaryotischen Expressionsvektors pcDNA4/TO/myc-His™.** Die Schnittstelle für das Restriktionsenzym XhoI befindet sich in der Multiple Cloning Site. Bei der Expression des Gens wird an das Protein aminoterminal ein „Tag“ angehängt, um es später durch einen „Tag“-spezifischen Antikörper detektieren zu können. Für die Selektion der mit diesem Vektor transfizierten Zelllinien befindet sich zusätzlich ein Resistenzgen für das Antibiotikum Zeocin® im Plasmid.

**Tabelle 6: Zusammensetzung der Ansätze für die Ligation und die Kontrollen.**

Ligations-Komponenten	Negativkontrolle	CIP-Kontrolle	Ligation 1	Ligation 2
Vektor (µl)	2,5	2,5	2,5	2,5
Insert (µl)	-	-	2,5	7,5
H <sub>2</sub> O	7,5	7,5	5	-
2 x Ligasepuffer	10	10	10	10
T <sub>4</sub> - Ligase	-	+	+	+

### B 6.1.10 Bakterienkultur und Isolierung von Plasmid-DNA

Das Bakterium *E. coli* wurde in LB-Medium (Bacto®Trypton: 10 g/l, Hefeextrakt: 5 g/l, NaCl: 5 g/l) kultiviert. Hierfür wurde eine Einzelkolonie einer fraktioniert beimpften LB-Platte in 2,5 ml LB-Medium resuspendiert und über Nacht bei 37°C als Standkultur bebrütet. Von dieser Vorkultur wurden dann 0,5 ml als Inokulum zu 50 ml LB-Medium gegeben und im Rotationsschüttler bei 37°C bis zu der gewünschten optischen Dichte (OD<sub>660</sub>) inkubiert. *E. coli*-Stämme, die durch Transformation von Plasmiden eine Antibiotikaresistenz trugen, wurden in Medium mit dem Antibiotikum Ampicillin (Endkonzentration von 100 µg/ml) kultiviert. Die *E. coli*-Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation geerntet. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus den Zellen wurde mit Hilfe des NucleoBond® -Plasmid-Aufreinigungskits (Clontech, California, USA) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurde zunächst durch alkalische Lyse, selektive Fällung und anschließende Zentrifugation die genomische DNA von der Plasmid-DNA getrennt und die letztere danach über eine Silica-Membran aufgereinigt. Es folgte eine photometrische Bestimmung des Nukleisäuregehalts der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Plasmid-DNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

## B 6.2 Zellkultur

### B 6.2.1 Zellkulturbedingungen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 95%-iger Luftfeuchtigkeit und 5%-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre unter sterilen Bedingungen bei 37°C im Inkubator (BioSafe Eco, Integra Bioscience, Fernwald, Deutschland). Alle Arbeiten mit den Zellen wurden an einer Sterilbank (Holten Laminair, Thermo Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Verwendete Lösungen

und Pipettenspitzen sowie Glasgeräte wurden im autoklavierten bzw. im sterilisierten Zustand benutzt.

#### B 6.2.2 Verwendete Zelllinie

Bei den zellbiologischen Experimenten wurde mit Madin Darby Canine Kidney II - Zellen (MDCK-Zellen; American Type Culture Collection, Rockville, USA) gearbeitet. Hierbei handelt es sich um Nierenepithelzellen, die im Jahr 1958 von S. H. Madin und N. B. Darby aus einer Cockerspanielhündin isoliert wurden und welche in-vitro einen Monolayer ausbilden (Richardson et al. 1981).

#### B 6.2.3 Pflege der Zellkultur

Das Kulturmedium (DMEM Low Glucose; PAA, Marburg, Deutschland) der Zellen wurde zu 10% mit fötalem Kälberserum (PAA, Pasching, Austria) und zu 1% mit einer Penicillin / Streptomycinlösung (PAA) supplementiert und alle 2 - 3 Tage gewechselt. Nach dem Absaugen des verbrauchten Mediums kamen, nach einmaligem Waschen mit einfach konzentriertem PBS-Puffer, 10 ml neues Medium auf die Zellen. Ein konfluent gewachsener Monolayer wurde abgelöst und auf neue Kulturschalen aufgeteilt. Dafür wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung (PAA, Pasching, Austria) abgelöst, abzentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert. Ein mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette gewährleistete dabei eine möglichst homogene Verteilung. Die Zellen wurden je nach Bedarf in einem Verhältnis von 1:10 oder auch höher verdünnt und auf die Kulturschalen aufgeteilt. Als Vorbereitung für die Experimente wurde die Zellzahl mit einer Neubauerkammer bestimmt und in Abhängigkeit vom Experiment entweder  $2,5 \times 10^6$  oder  $5 \times 10^6$  Zellen pro Kulturschale eingesetzt.

#### B 6.2.4 Herstellung stabiler MDCK-Zelllinien

Zur Vorbereitung wurden am Vorabend  $2,5 \times 10^6$  Zellen auf eine neue Zellkulturschale ausgesät. Die Transfektion wurde am Folgetag mit Hilfe des FUGENE<sup>®</sup> HD Transfection Reagent Kits (Roche, Grenzach, Deutschland) mit leichten Modifizierungen des Herstellerprotokolls durchgeführt. Dazu wurden 10 µg der Plasmid-DNA in 500 µl Zellkulturmedium in Abwesenheit von FKS und Antibiotikum verteilt und 30 µl der Transfektionslösung dazugegeben (Verhältnis Reagenz/DNA: 6:2). Nach kurzem Vortexen wurde der Ansatz für 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen, damit sich ein Komplex aus dem Reagenz und der DNA bilden konnte. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 5 ml frischem Zellkultur-Vollmedium versehen und der DNA/Reagenz-Komplex dazugegeben und verteilt. Es folgte eine Inkubation für 48 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Bis zu diesem Punkt ist das Protokoll identisch mit dem für eine transiente Transfektion.

Danach wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:35 verdünnt auf eine 24-Well Platte aufgeteilt und in Zellkulturmedium zusammen mit dem Antibiotikum Zeocin™ (Endkonzentration: 400 µg/ml; Invitrogen, Eggenstein, Deutschland) für zwei Wochen inkubiert. Dabei wurde alle 3 – 4 Tage das Medium gewechselt. Zeocin™ ist ein Mitglied der Bleomycin / Phleomycin –Familie der aus Streptomyzeten isolierten Antibiotika und weist eine starke Toxizität gegenüber Bakterien-, Pilz-, Pflanzen- und Säugetierzellen auf (Perez et al. 1989, Calmels et al. 1991, Drocourt et al. 1990, Gatignol et al. 1987, Mulsant et al. 1988). Dadurch starben alle MDCK-Zellen ab, die nicht das Plasmid mit dem Resistenzgen stabil aufgenommen hatten. In den Wells, in denen sich Zellen vermehrt haben, wurden diese bei erreichter Konfluenz im Verhältnis 1:10 verdünnt. Nach einer weiteren Woche wurden die Zellen nach einer Trypsinierung wieder auf 10 cm großen Zellkulturschalen ausgesät und die Gen-Expression anhand eines Western-Immunoblots überprüft. Um die Zelllinien stabil zu halten, wurde weiterhin etwas Zeocin™ zum Zellkulturmedium gegeben (Endkonzentration: 200 µg/ml).

### B 6.3 Isolierung von Lipid Raft assoziierten Proteinen aus Zellkulturen

Die Zellen wurden zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und in 1 ml Lysispuffer (PBS, 1% [v/v] Triton X-100) zusammen mit Proteaseinhibitoren (25 µM PMSF, 375 µM Trypsin-Chymotrypsin Inhibitor, 25 nM Pepstatin, 250nM Antipain, 250 nM Leupeptin, 375 µM Aprotinin; Endkonzentrationen) auf Eis lysiert. Alternativ wurde anstelle von Triton X-100 das Detergenz Tween®20 oder Lubrol eingesetzt (1% [v/v]). Bei allen folgenden Schritten wurden die Proben bei 4°C gekühlt. Danach wurde das Zelllysate mit einer 5 ml Omnifix® -Spritze und einer 0,8 x 40mm Sterican® - Kanüle (BRAUN, Melsungen, Deutschland) zwanzig Mal aufgezogen und wieder abgelassen, um den Zellaufschluss zu erleichtern. Die Proteine wurden dann für 1,5 h auf einer Wippe solubilisiert. Danach erfolgte eine Vorzentrifugation für 20 min bei 10.000 x g in einer Ultrazentrifuge (Optima, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland), um unlöslichen Zelldebris zu entfernen. Danach wurde der Überstand für 1,5 h bei 100.000 x g zentrifugiert, um die Detergenz-unlösliche Membranfraktion (DRM) zu erhalten. Das DRM-Pellet wurde zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und in 500 µl Standard-Lysispuffer (25 mM TrisHCl, 50 mM NaCl, 0,5% Deoxycholat, 0,5% Triton X-100, pH 8,0) gelöst. Die Proben wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung in der Anwesenheit von Protease-Inhibitoren bei -70°C aufbewahrt.

### B 6.4 Pulse-Chase mit anschließender Immunpräzipitation

Um die intrazelluläre Sortierung eines Proteins biochemisch untersuchen zu können, musste dieses zuvor radioaktiv markiert werden. Die Methode der radioaktiven Markierung von

Proteinen mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin für die Autoradiographie wurde von Torian und Kenny (Torian und Kenny 1986) beschrieben. Bei der Durchführung sämtlicher Versuche wurde die modifizierte Form nach Naim et al. angewendet (Naim et al. 1991). Dazu wurden am Vorabend  $5 \times 10^6$  MDCK-Zellen ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 10 ml Methionin-freiem Medium versehen (MEM; PAA, Marburg, Deutschland), um den intrazellulären Methioninpool aufzubrechen. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  wurde das Medium abgesaugt und durch 3,5 ml neues MEM-Medium in Verbindung mit einer darin 1:1000 verdünnten  $^{35}\text{S}$ -Methionin-Lösung ( $80\mu\text{Ci L}^{-1}$  [ $^{35}\text{S}$ ]-Methionin) ersetzt. In Abhängigkeit zur gewünschten Markierungsdauer, befanden sich die Kulturschalen in einem Inkubator bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ . In dem Experiment wurden die Zellen zuerst für eine kurze Periode in dem radioaktiven Medium gehalten (*Pulse*) und dann für eine längere Zeit in nicht-radioaktivem Zellkulturmedium inkubiert (*Chase*). Dies ermöglichte einen Vergleich der Kinetik des intrazellulären Transports des Proteins. Die *Pulse*-Zeit betrug bei den Versuchansätzen jeweils 1,5 h, die *Chase*-Zeiten 0 h, 1 h, 3 h oder 6 h. Von jeder Probe wurde das Zellkulturmedium, das Zelllysat, der Überstand nach der Ultrazentrifugation auch die DRM-Fraktion weiterverwendet (Herstellung siehe Abschnitt C 6.3). Die Immunpräzipitation wurde mit Hilfe von Dynabeads<sup>®</sup> Protein A (Invitrogen, Eggenstein, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden die Beads viermal mit 1% Triton X-100/PBS gewaschen und in einem Verhältnis von 1:2 darin verdünnt. Zuerst wurden  $0,8\ \mu\text{l}$  eines anti-„Tag“ Antikörpers (Invitrogen) auf jeweils 1 ml Probe gegeben und für 1 h bei  $4 - 8^\circ\text{C}$  auf einem Drehkarussell inkubiert. Daraufhin wurden  $30\ \mu\text{l}$  der verdünnten Beads pro Milliliter Probe dazugegeben und die Ansätze über Nacht weiter inkubiert. Die Beads wurden dann zuerst dreimal mit Waschpuffer I (PBS, 0,1% Triton X-100, pH 7) und dann dreimal mit Waschpuffer II (PBS, 0,1% Triton X-100, 0,3 M NaCl, pH 7) gewaschen und in  $50\ \mu\text{l}$  Lämmli-Puffer für 10 min bei  $95^\circ\text{C}$  aufgekocht. Die Proben wurden auf ein 8%-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

## B 6.5 1-D SDS-PAGE

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurden SDS-Polyacrylamidgelle mit einem diskontinuierlichem Puffersystem verwendet (Laemmli 1970). Um eine Denaturierung der Proteine zu erreichen, wurden die Proben in  $50\ \mu\text{l}$  dreifach Lämmli-Puffer + 150mM DTT gelöst und 10 min bei  $95^\circ\text{C}$  erhitzt. Die Proben wurden anschließend auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel ist in Tabelle 7 dargestellt. Die Konzentration für das Trenngel betrug 8%, wodurch eine Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 50 – 200 kDa ermöglicht wurde. Für immunpräzipitierte Proteine erfolgte der Lauf über Nacht in großen Gelen mit dem Protean<sup>®</sup> II Xi Cell-Systems (Bio-Rad, München, Deutschland) in Elektrophoresepuffer mit einer Geschwindigkeit von

konstant 7 mA pro Gel. Für eine Western Blot-Analyse wurden hingegen die Elektrophorese in kleinen Gelen mit dem Protean® II Minigel-System für etwa 90 min bei einer konstanten Spannung von 100 – 150 V durchgeführt. Entweder wurden die Proteine anschließend fixiert und gefärbt oder auf eine Membran geblottet.

**Tabelle 7: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen.**

Gel-Komponenten	Trenngel (8%)	Sammelgel
H <sub>2</sub> O (ml)	14,5	15,6
30% [w/v] Acrylamid (ml)	8,2	3,9
1,5 M TrisHCl pH 8,8 (ml)	7,7	-
1 M TrisHCl pH 6,8 (ml)	-	2,9
10% SDS (µl)	310	230
TEMED (µl)	23	23
10% APS (µl)	310	230

### B 6.6 Färben, Trocknen und Exponieren der Gele

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der immunpräzipitierten Proteine wurden die Gele für 30 Minuten in einer Coomassie-Färbelösung (0,1% [w/v] Coomassie Brilliant Blau R-250, 25% Isopropanol, 5% Essigsäure) inkubiert. Überschüssig vorhandener Farbstoff wurde durch Entfärber (25% Isopropanol, 5% Essigsäure) so lange entfernt, bis die Banden des Markers sichtbar waren. Die Trocknung erfolgte auf Whatman-Papier im Vakuumtrockner für zwei Stunden bei 90 Grad Celsius. Nach dem Abkühlen wurden die Gele für drei Tage auf einem Phosphor-Screen (Fuji, Düsseldorf, Deutschland) unter Ausschluss von Licht aufbewahrt. Die Entwicklung des Screens fand in einem Phosphor-Imager (Molecular Imager® FX; Bio-Rad, München, Deutschland) mit Hilfe der Quantity One® Software (Bio-Rad) statt.

### B 6.7 Western Immunoblot Analyse

Zur spezifischen Identifizierung mittels Antikörper wurden die Proteine nach ihrer gelelektrophoretischen Auftrennung in einem SDS-Gel auf eine Roti® PVDF-Membran (ROTH, Karlsruhe, Deutschland) transferiert. Dazu wurde diese zuvor für 5 sec in Methanol



aktiviert und danach in einem Bad aus Transferpuffer (25 mM TrisHCl, 115mM Glycin, 20% Methanol) luftblasenfrei auf das Mini-Gel gelegt. Zusammen mit jeweils zwei Lagen getränktem Whatman-Papier und einem Schwamm pro Seite wurde der Ansatz in eine Blotkammer (Bio-Rad) eingespannt und bei 4°C für 1,5 h bei konstant 240 mA geblottet. Danach wurde die PVDF-Membran sofort entfernt und in einem Blockpuffer (PBS, 0,05% [v/v] Tween<sup>®</sup>20, 0,5% [w/v] Gelatine) über Nacht bei 4 – 8°C auf einem Schwenktisch inkubiert. Danach erfolgten insgesamt sechs Waschvorgänge für 3 x 5 sec, 1 x 5 min, 1 x 10 min und 1 x 15 min mit Waschpuffer (PBS, 0,05% [v/v] Tween<sup>®</sup>20). Der erste Antikörper wurde in einer Lösung aus 2% Milchpulver (Sucofin; TSI, Zeven, Deutschland) in Waschpuffer verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur mit der Blotmembran auf einer Wippe inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper für 1 h inkubiert. Danach wurde der Blot ein letztes Mal für 30 min gewaschen und das gesuchte Protein mit Hilfe des Pierce ECL Western Blotting Substrates (Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland) und dem Molecular Imager<sup>®</sup> ChemiDoc XRS System (Bio-Rad, München, Deutschland) detektiert.

**Tabelle 8: Spezifität, Bezugsquelle und Verdünnung der beim Western Blot verwendeten Antikörper.**

Antikörper	Spezifität	Bezugsquelle	Verdünnung
anti- <i>myc</i> antibody	Monoklonal Maus, c-myc-Epitop	Invitrogen (Eggenstein, Deutschland)	1:5000
goat anti-mouse IgG-HRP	Polyklonal Ziege, anti-Maus	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)	1:10000

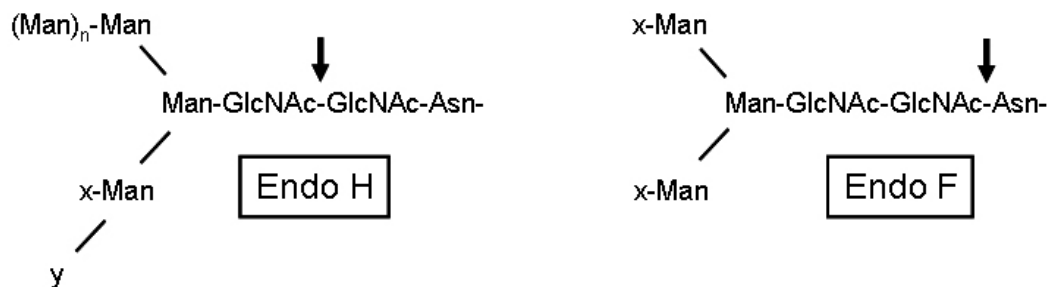
### B 6.8 Inhibierung der Proteinglykosylierung durch Tunicamycin

Um die Auswirkungen einer Glykosylierung auf die biosynthetischen Eigenschaften von Proteinen zu untersuchen, können durch die Zugabe spezieller Verbindungen zu einer Zellkultur spezielle Glykosylierungsvorgänge unterbunden werden. Die Anwendung von Tunicamycin führt zu einer Hemmung der N-Glykosylierung. Tunicamycin ist ein Nukleosid-Antibiotikum, das aus *Streptomyces lysosuperficus* isoliert wurde. Es hemmt die GlcNAc-1-P-Transferase und damit den ersten Schritt in der Verknüpfung Fettsäure-Saccharid und somit den Transfer von GlcNAc-1-P aus UDP-GlcNAc auf Dolicholphosphat, an das dann die weiteren Zucker des Oligosaccharides geknüpft werden müssen (Elbein 1984). Dafür wurden am Vorabend  $2,5 \times 10^6$  MDCK-Zellen ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>

inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen zweimal mit jeweils 5 ml PBS gewaschen und frisches Zellkulturmedium zusammen mit Tunicamycin [5µg/ml] dazugegeben. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die Proteine isoliert (siehe Abschnitt B 6.3).

### B 6.9 Behandlung der Proteine mit Endoglykosidase H und F

Die potentiellen Glykosylierungsstellen eines Proteins lassen sich mit Hilfe seiner Aminosäuresequenz durch Programme wie NetNGlyc 1.0 bzw. NetOGlyc 3.1 vorhersagen (Sun et al. 2007). Der biochemische Nachweis der Glykosylierung hingegen wird durch die Endoglykosidasen H und F ermöglicht. Dabei spaltet die Endoglykosidase H (Endo H) ausschließlich mannosereiche Zuckerketten eines Glykoproteins ab, wie sie vornehmlich im ER vorkommen, während die komplex glykosylierten Zuckerketten nicht beeinflusst werden. Eine Abspaltung sowohl der mannosereichen als auch der komplexen Zuckerketten wird durch die Endoglykosidase F (Endo F) erreicht. Die Durchführung erfolgte nach der TCA-Präzipitation von jeweils 80 µg Protein. Dabei wurde das Proteinpellet zunächst in Anwesenheit von Denaturierungspuffer für 10 min bei 95°C erhitzt. Danach wurden 500 units Endo H (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) zugegeben und in Anwesenheit von Reaktionspuffer (50 mM Natriumcitrat, pH 5,5) für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Alternativ wurden 500 units Endo F (New England Biolabs) in Reaktionspuffer-Puffer (50 mM Natriumcitrat, 1% NP-40, pH 7,5) verwendet. Der jeweilige Ansatz wurde in Lämmli-Puffer für 5 min bei 95°C erhitzt und durch SDS-PAGE aufgetrennt.



**Abb. 6: Schnittstellen der Endoglykosidasen H und F.** Das Enzym Endo H schneidet nur High Mannose- ( $n = 2-150$ ,  $x = (\text{Man})_{1-2}$ ,  $y = \text{H}$ ) und Hybrid-Zuckerstrukturen ( $n = 2$ ,  $x$  und / oder  $y = \text{AcNeu-Gal-GlcNAc}$ ) von Glykoproteinen. Das Enzym Endo F hydrolysiert dagegen nahezu alle Formen der N-Zuckerketten von Glykoproteinen ( $x = \text{H}$  oder Zucker).

### B 6.10 Histopathologische Untersuchung von Lungengewebe

Für die histopathologische Untersuchung wurde bei der Sektion verändertes und unverändertes Lungengewebe von infizierten Tieren entnommen, in flüssigem Stickstoff

eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Mit Hilfe eines Kryostats wurden mehrere 4 – 8  $\mu\text{m}$  dicke Gefrierschnitte von den einzelnen Proben angefertigt, auf SuperFrost<sup>®</sup> Plus-Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) gezogen, getrocknet und in Aceton fixiert. Für einen Teil der Schnitte wurde mit einem Färbeautomaten (Modell ST 4040; Leica, Wetzlar, Deutschland) eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt und die Proben in einem Objektträger-Eindeckautomat eingedeckt (Promounter RCM 2000; Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland). Der andere Teil der Schnitte wurde immunhistologisch durch die Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode (ABC-Methode) untersucht (Hsu et al. 1981). Dabei fanden alle Arbeiten bei Raumtemperatur statt und es wurde nach jedem Schritt mehrmals mit PBS gewaschen. Zunächst wurde die endogene Peroxidase in 0,05%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Methanol für 30 min bei Raumtemperatur inaktiviert. Es folgte eine Inkubation der Schnitte mit dem Primär-Antikörper für 1 h in einer feuchten Kammer. Daraufhin wurde der Sekundär-Antikörper für 30 min auf die Proben gegeben. Nach der Behandlung mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Vectastain<sup>®</sup> ABC Kit, PK4000; Vector Laboratories, Burlingame, USA) für 30 min wurden die Schnitte in gefiltertem 3`3 Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid, gelöst in PBS mit 0,05%igem  $\text{H}_2\text{O}_2$  für 5 Minuten auf einem Magnetrührer inkubiert. Dann wurden die Proben mit Hämalaun für 10 min gegengefärbt und für weitere 10 min in Leitungswasser gewaschen. Nach dem Entwässern der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils 3 min in 50-, 70-, 80-, 96%-igem Ethanol, für 2 x 3 min in 100%-igem Isopropanol und für 3 x 5 min in Xylol-Ersatz als Intermedium, wurden die Proben im Automaten eingedeckt. Die Auswertung der gefärbten Gewebeschnitte erfolgte unter Verwendung eines Mikroskops (Modell Axiophot; Zeiss, Jena, Deutschland). Als Kontrolle dienten Gewebeschnitte derselben Proben, die nur einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen wurden.

**Tabelle 9: Spezifität, Bezugsquelle und Verdünnung der bei der histologischen Analyse verwendeten Antikörper.**

Antikörper	Spezifität	Bezugsquelle	Verdünnung
lactoferrin antibody, primär	Polyklonal Kaninchen, anti-Mensch	antibodies-online (Aachen, Deutschland)	1:50, 1:100, 1:500
goat anti-rabbit-biotin, sekundär	Polyklonal Ziege, anti-Kaninchen	Vector Laboratories (Burlingame, USA)	1:100

## C Ergebnisse

### C 1 Experimentelle Aerosol-Infektion mit *Actinobacillus pleuropneumoniae*

#### C 1.1 Ermittlung der empfänglichen Zuchtlinien für *A. pleuropneumoniae*

In Abhängigkeit von dem ermittelten Respiratory Health Score (RHS), wurden die Tiere in vier unterschiedliche Kategorien eingeteilt (Tabelle 10). Dabei zeigte sich, dass 52 Prozent der Tiere aus der Hampshire Zuchtlinie nicht erkrankten und bei keinem Tier dieser Zuchtlinie eine hochgradige Erkrankung festgestellt werden konnte. Bei den beiden anderen Zuchtlinien (Deutsche Landrasse und Piétrain) hingegen war der überwiegende Teil der Tiere erkrankt. Hier wiesen 39 Prozent der Tiere der Deutschen Landrasse und 29 Prozent der Piétrain-Schweine eine hochgradige Erkrankung auf. Die Ermittlung und Auswertung dieser Daten waren Bestandteil einer Begleitstudie und können der entsprechenden Veröffentlichung entnommen werden (Hoeltig 2009).

**Tabelle 10: Einteilung der Tiere aus den drei Zuchtlinien in verschiedene Erkrankungs-Kategorien.**

Zuchtlinie	nicht erkrankt	geringgradig erkrankt	mittelgradig erkrankt	hochgradig erkrankt
Deutsche Landrasse	18,20%	18,20%	25,00%	38,60%
Pietrain	14,30%	32,10%	25,00%	28,60%
Hampshire	52,40%	33,30%	14,30%	0%

#### C 1.2 Bakteriologischer Befund des Lungengewebes

Für den Nachweis von *A. pleuropneumoniae* in Lungengewebe und den Tonsillen wurden nach der Sektion Gewebeproben auf Nährböden ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Zusätzlich wurde die Anwesenheit der bakteriellen Urease kontrolliert und eine PCR durchgeführt. Bei allen neun untersuchten Tiere der Zuchtlinien Deutsche Landrasse und Piétrain konnte *A. pleuropneumoniae* im Lungengewebe nachgewiesen werden. Der Nachweis aus Tonsillen fiel für ein Tier der Deutschen Landrasse an Tag 20, für zwei Piétrain-Schweine an Tag 4 und für vier Schweine an Tag 20 negativ aus. Bei Tieren der Hampshire Zuchtlinie konnte *A. pleuropneumoniae* weder in der Lunge noch in den Tonsillen nachgewiesen werden (Tabelle 11).

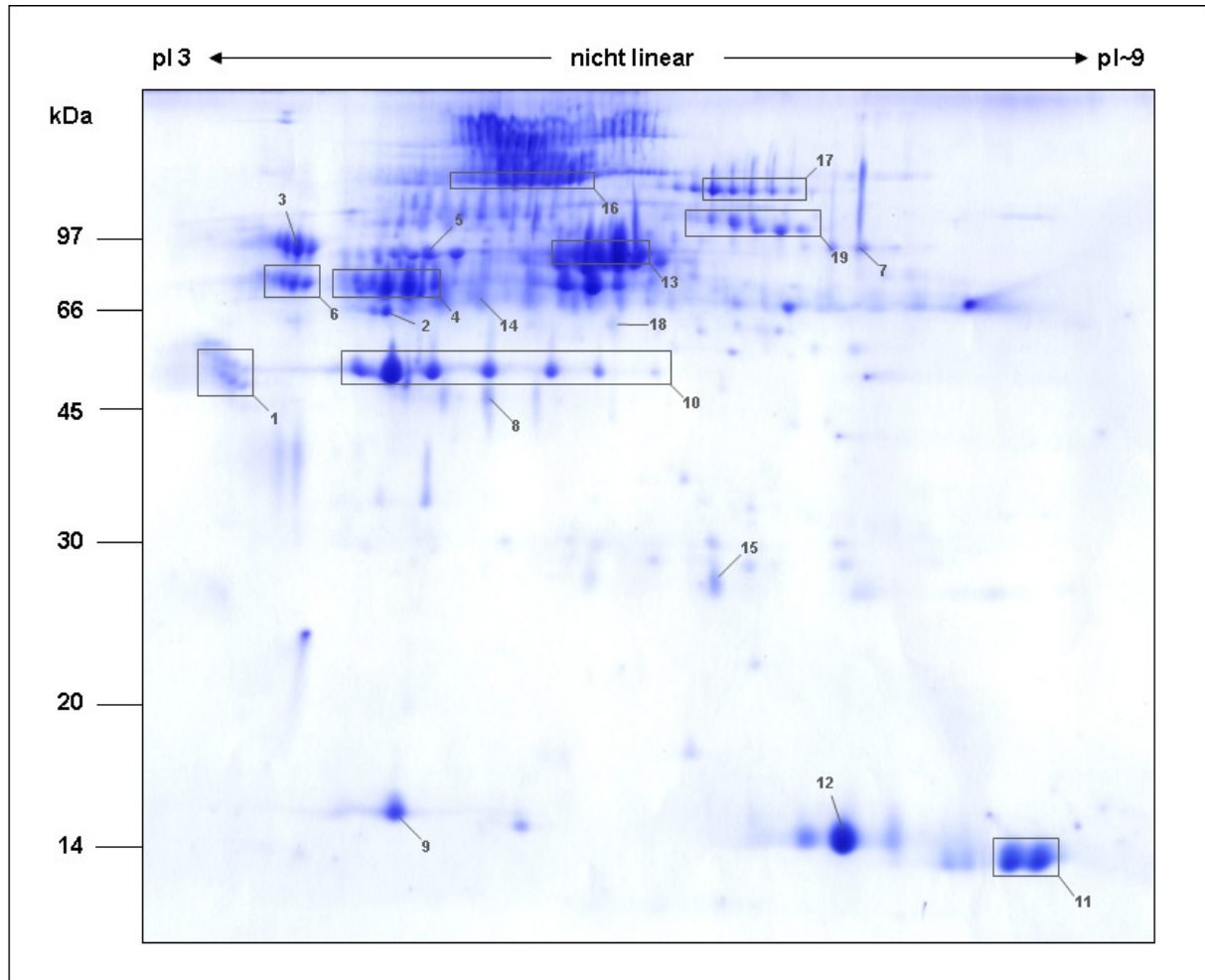
**Tabelle 11: Nachweis von *A. pleuropneumoniae* in Lungengewebe und Tonsillen.** Die Anwesenheit des bakteriellen Pathogens wurde durch eine klassische Kultivierung auf Agar-Nährböden als auch durch einen Enzymtest und einer PCR überprüft. Positive Ergebnisse wurden durch Plusssymbole (+) gekennzeichnet, negative Ergebnisse durch Minussymbole (-). Aus jeder Zuchtlinie wurden jeweils die Proben von neun Schweinen getestet.

	Sektionstag	Kultureller-Nachweis		Urease-Nachweis		PCR-Nachweis	
		Lunge	Tonsille	Lunge	Tonsille	Lunge	Tonsille
Deutsche Landrasse	4	+	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+	+
	20	+	+	+	+	+	+
	20	+	+	+	+	+	+
	20	+	-	+	-	+	-
	20	+	+	+	+	+	+
Pietrain	4	+	-	+	-	+	-
	4	+	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+	+
	4	+	-	+	-	+	-
	20	+	-	+	-	+	-
	20	+	-	+	-	+	-
	20	+	+	+	+	+	+
	20	+	-	+	-	+	-
Hampshire	4	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-

## C 2 Identifizierung von Glykoproteinen aus bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit (BALF)

Um sich bei den nachfolgenden Untersuchungen auf die Glykoproteine konzentrieren zu können, mussten diese zuvor von den anderen BALF-Proteinen getrennt werden. Durch die Anwendung einer auf dem Lektin Concanavalin A basierenden Affinitäts-Chromatographie wurden alle Proteine aufgereinigt, die in ihrer Glykanstruktur die Zucker Mannose oder Glukose aufwiesen. Danach wurde das Glykoproteingemisch durch eine zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 7). Das Expressionsmuster zeigt die Anwesenheit von Glykoproteinen mit einer Größe von etwa 12 bis >97 kDa und einem isoelektrischen Punkt zwischen 3 und 9. Dabei wies der überwiegende Teil der Proteine ein Molekulargewicht von

über 45 kDa auf und wurde gleich durch mehrere Isoformen vertreten. Diese im Gel perlchnurartig hintereinander angeordneten Spots zeigten jeweils ein ähnliches Molekulargewicht, jedoch Unterschiede in ihrem isoelektrischen Punkt. Für die Identifizierung wurden die durch kolloidales Coomassie Blau angefärbten Proteine aus dem Gel herausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und die Peptide durch Massenspektrometrie analysiert. Dabei konnten insgesamt 19 Glykoproteine identifiziert werden (Tabelle 12).



**Abb. 7: Übersichtskarte von glykosylierten Proteinen in BALF.** Das Gel zeigt durch kolloidales Coomassie angefärbte Glykoproteine des Lungen-Surfactants eines Schweins aus der Piétrain Zuchtlinie zwanzig Tage nach der Infektion mit *A. pleuropneumoniae*. Die Proteine wurden durch Concanavalin A Lektin-Chromatographie aufgereinigt und in der ersten Dimension in einem Immobiline® Dry Strip (pH 3-11, nicht-linear) isoelektrisch fokussiert. Bei der zweiten Dimension wurde die Auftrennung in einem 12,5%-igen SDS-Gel durchgeführt. Zahlen markieren die durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine.

**Tabelle 12: Identifizierte Glykoproteine in BALF.** Die Identität der Proteine wurde mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS, ESI Q-TOF MS/MS) und einer nachfolgenden Datenbankrecherche (MASCOT, BLAST) ermittelt.

Proteinspot	Proteinname	Accession Number	theor. pI	theor. MW (kDa)	Peptid-Übereinstimmung	Sequenz-Abdeckung (%)
1 A/B/C/D	alpha-1-acid glycoprotein	Q_29014	5,83	20,899	2/2/2	12/12/12/12
2	alpha-1-antitrypsin	CAA61259	5,77	47,164	8	22
3	alpha-1-antichymotrypsin	CAC06757	5,28	24,660	2	7
4 A/B/C/D/E/F/G	alpha-1-antichymotrypsin 3	CAC06756	5,77	22,883	8/16/19/14/10/13/3	12/42/44/34/33/29/17
5 B	alpha-1B glycoprotein (canis familiaris)	XP_541346	5,54	55,580	1	2
6 A/B	alpha-2-HS-glycoprotein / fetuin A	P29700	5,74	38,400	1/2	6/6
7	complement component 3	NP_999174	6,09	188,229	13	11
8	ficolin	NP_999033	5,63	35,173	11	33
9	haptoglobin precursor	Q8SPS7	6,93	38,457	1	4
10 A/B/C/D/E/F/G	haptoglobin	NP_999165	6,93	38,457	10/9/10/11/10/10/8	34/23/35/33/34/35/27
11 D/E	hemoglobin, alpha-subunit	P_01965	8,76	15,087	8/8	64/64
12 B	hemoglobin	1QPW_D	7,21	16,025	2	15
13 A/B/C/D/E	hemopexin / hyaluronidase	NP_999118	6,59	52,071	2/15/16/16/10	8/29/26/32/23
14	Ig heavy chain variable region	CAJ45440	4,85	13,573	8	65
15	Ig lambda chain C region	P01846	6,75	11,168	4	65
16	inter-alpha trypsin inhibitor family heavy chain related protein	NP_00100153	6,42	102,254	15/16/18/18/19/25/24/31/24/21/19	15/20/19/19/23/28/26/34/30/24/26
A/B/C/D/E/F/G/H/I/J/K	properdin, B-factor	NP_001095294	7,45	87,179	18/16/18/11/11	31/21/24/18/15
17 D/E/F/G/H	pulmonary surfactant-associated protein D	NP_999275	8,57	37,961	1	5
18	transferrin	CAA30943	7,08	76,901	12/16/7/20/18/15	25/22/11/30/27/19
19 B/C/D/E/F/G						

### C 3 Expressionsanalyse von BALF-Glykoproteinen während des Infektionsverlaufs

Die Schweine unterschiedlicher Zuchtlinien (Deutsche Landrasse, Piétrain, Hampshire) wurden experimentell mit *A. pleuropneumoniae* infiziert und die Lunge an Tag 7 vor der Infektion (Tag -7) und am Tag 4 bzw. Tag 20 nach der Infektion gespült. Nach einer chromatographischen Aufreinigung der BALF wurden die Glykoproteine über eine zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteinmuster miteinander verglichen. Pro Zuchtlinie und Vergleich wurden jeweils drei biologische Replikate angefertigt. Dabei waren deutliche Unterschiede sowohl zwischen den Rassen, als auch zwischen einzelnen Individuen innerhalb einer Rasse zu beobachten. Unter Berücksichtigung des Krankheitsverlaufs wiesen die Tiere der Hampshire Zuchtlinie im Vergleich zu Piétrain und der Deutschen Landrasse ein deutlich verändertes Expressionsprofil auf.

#### C 3.1 Zuchtlinien-spezifische Regulation der Expression von BALF-Glykoproteinen an Tag 4 im Vergleich zu Tag -7

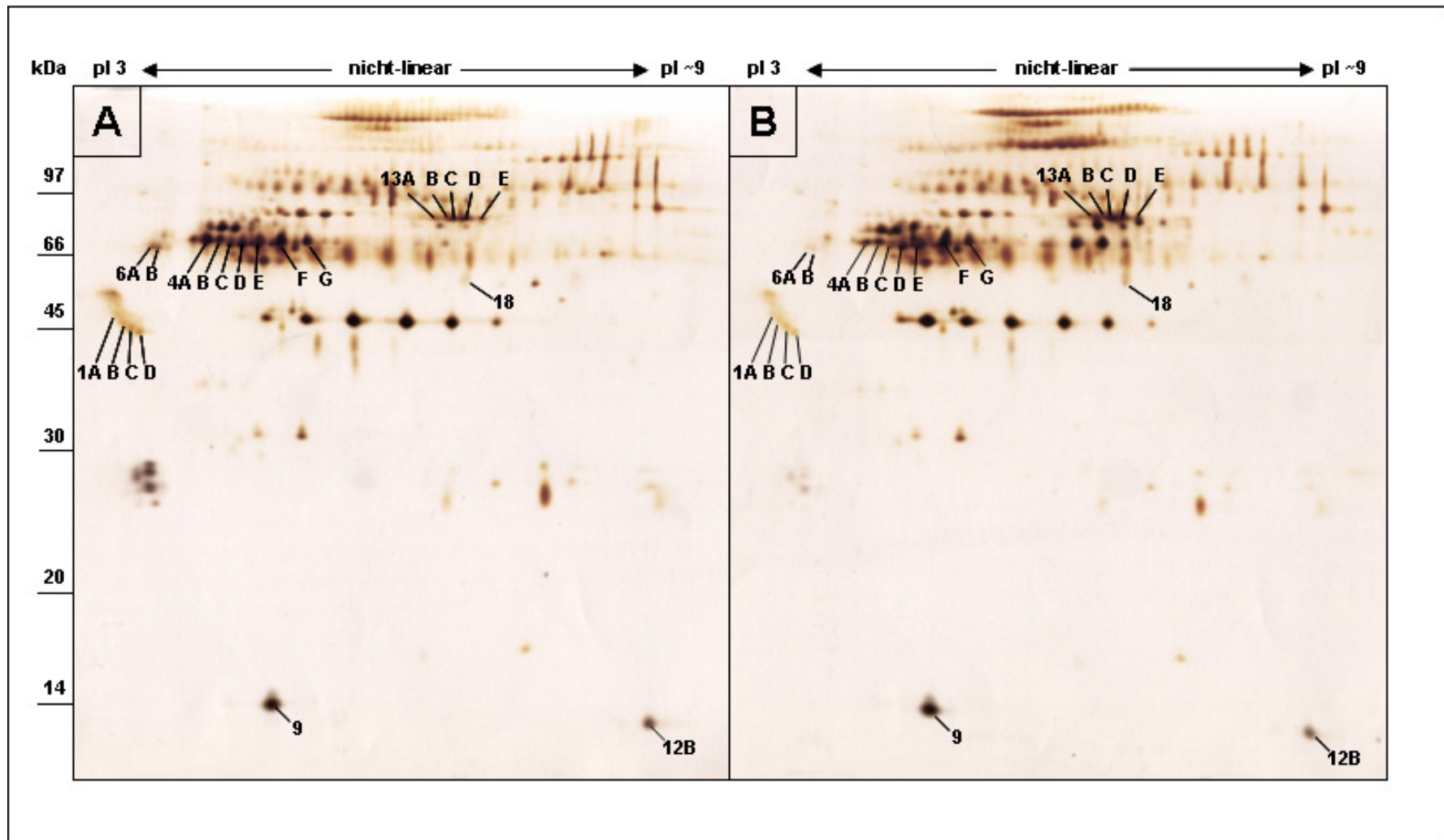
Die glykosylierten Proteine aus der BALF von klinisch gesunden Schweinen (Tag -7) und von akut erkrankten Tieren (Tag 4) wurden über eine 2-D PAGE aufgetrennt und quantifiziert (Abb. 8). Bei einem Vergleich der Expressionsmuster konnte für insgesamt sieben Glykoproteine eine differentielle Expression bei den drei Zuchtlinien nachgewiesen werden (Abb. 9). Durch die massenspektrometrische Analyse der Proteinspots wurden diese als

Alpha-1-saures Glykoprotein, Fetuin A, Haptoglobin Prekursor, Hämoglobin, Hyaluronidase, Alpha-1-Antichymotrypsin 3 und Surfactant-assoziiertes Protein D (SP-D) identifiziert (siehe Tabelle 12). In Schweinen der Zuchtlinie Deutsche Landrasse wurden drei Proteine signifikant reguliert. Dabei war die Konzentration des Proteins Alpha-1-saures Glykoprotein 2-fach und die von Hyaluronidase 1,9-fach höher an Tag 4 im Vergleich zu Tag -7. Zusätzlich gab es bei Alpha-1-Antichymotrypsin 3 einen leichten Anstieg der Expression. Das Surfactant Protein D wurde hingegen 17,6-fach herunterreguliert. Bei Tieren der Zuchtlinie Piétrain gab es eine 2,8-fache Abnahme des Alpha-1-sauren Glykoproteins und eine 1,5-fache Abnahme an Alpha-1-Antichymotrypsin 3. In Schweinen der Hampshire Zuchtlinie gab es an Tag 4 keine statistisch relevante Regulation bei einem der sieben Glykoproteine.

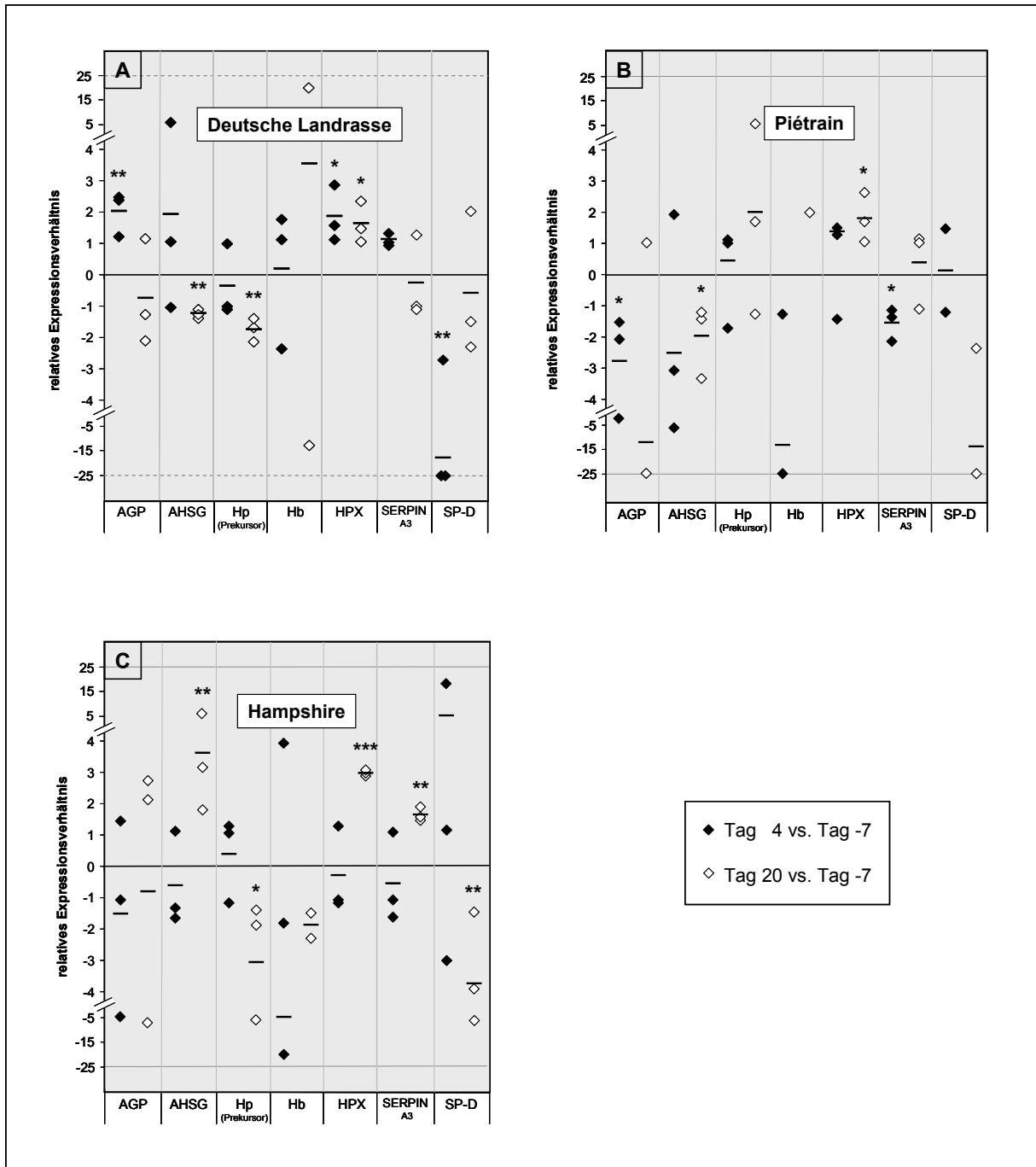
### C 3.2 Zuchtlinien-spezifische Regulation der Expression von BALF-Glykoproteinen an Tag 20 im Vergleich zu Tag -7

Bei dem Vergleich von Glykoproteinen aus BALF von klinisch gesunden Tieren (Tag -7) und von chronisch erkrankten Tieren (Tag 20) wurde die Expression der gleichen sieben Proteine ermittelt, die auch schon in dem Abschnitt C 3.1 untersucht wurden (Abb. 9). In Schweinen der Deutschen Landrasse konnte für drei Proteine eine signifikante Regulation an Tag 20 nachgewiesen werden. Dabei wurden Fetuin A und Haptoglobin jeweils 1,2-fach bzw. 2-fach herunterreguliert und Hyaluronidase 1,8-fach hochreguliert. Bei Tieren der Piétrain Zuchtlinie gab es eine 2-fache Abnahme von Fetuin A und eine 1,6-fache Zunahme von Hyaluronidase. In Hampshire Schweinen wurden insgesamt fünf Glykoproteine signifikant reguliert. Dabei wurden die Proteine Fetuin A, Hyaluronidase und Alpha-1-Antichymotrypsin 3 jeweils 3,6-fach, 3-fach und 1,7-fach hochreguliert. Zusätzlich wurde Haptoglobin 3-fach und das Surfactant-assoziierte Protein D 3,8-fach herunterreguliert.





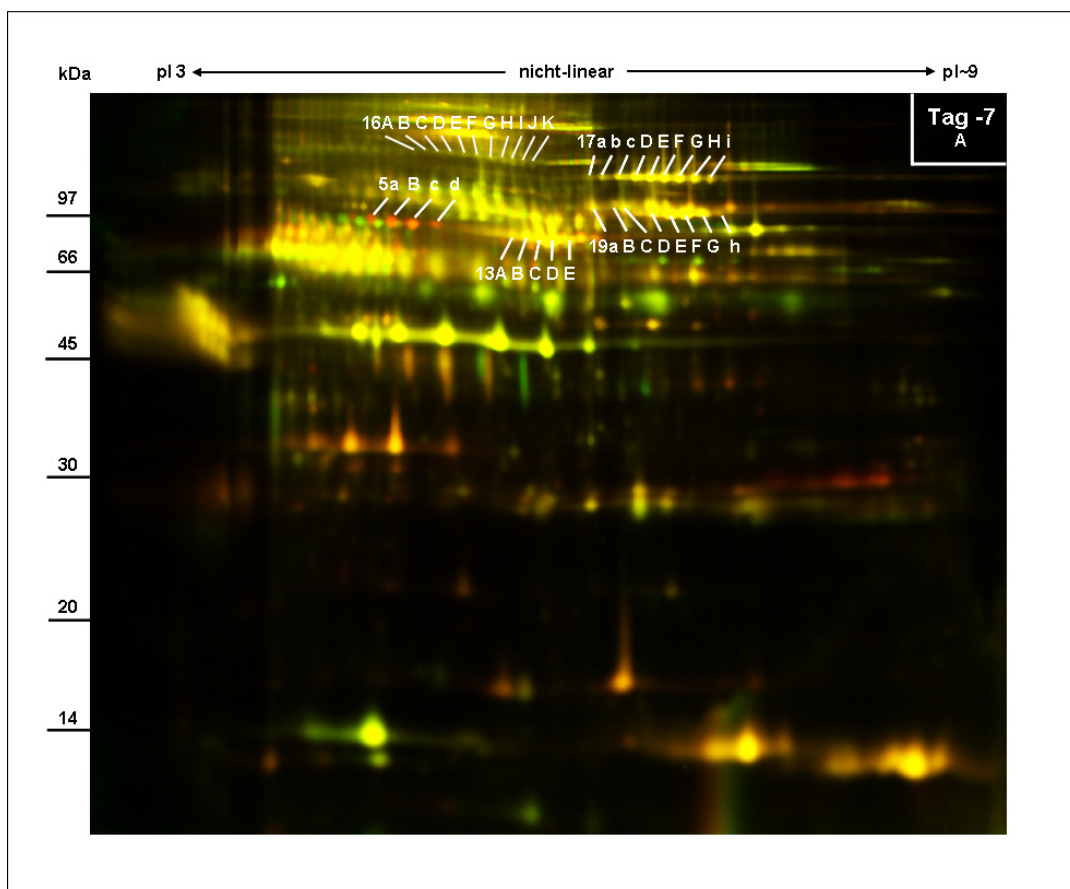
**Abb. 8:** Silbergefärbte Gele der 2-D PAGE von BALF-Glykoproteinen eines repräsentativen Schweins aus der Piétrain Zuchtlinie vor (Tag -7) und nach der Infektion (Tag 4) mit *A. pleuropneumoniae*. Die Proteine wurden durch Concanavalin A Lektin-Chromatographie aufgereinigt und in der ersten Dimension in einem Immobiline® Dry Strip (pH 3-11, nicht-linear) isoelektisch fokussiert. Bei der zweiten Dimension wurde die Auftrennung in einem 12,5%-igen SDS-Gel durchgeführt. Die Identität der differenziell exprimierten Glykoproteine wurde mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS, ESI Q-TOF MS/MS) und einer anschließenden Datenbankrecherche (MASCOT, BLAST) bestimmt.

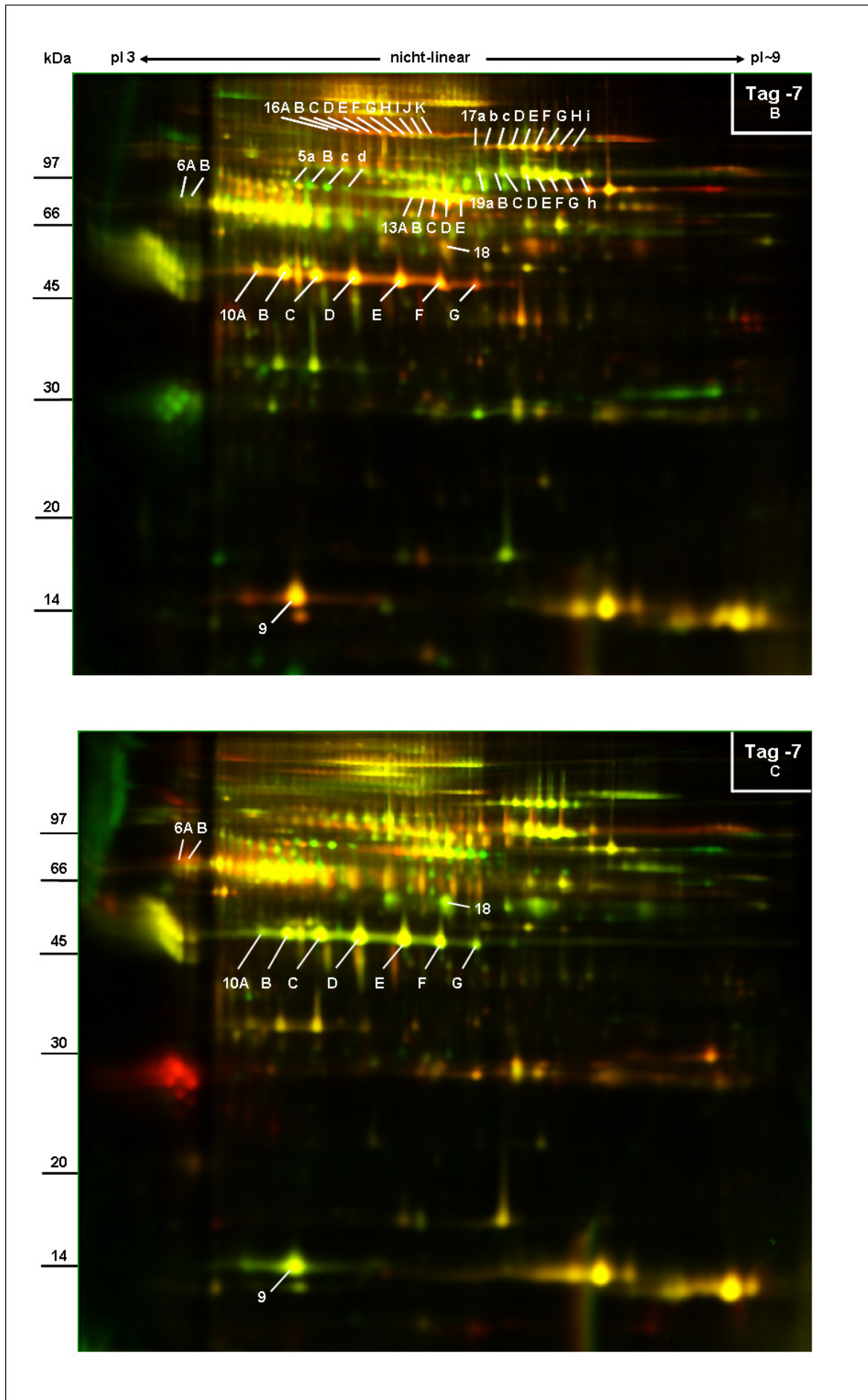


**Abb. 9: Zuchtlinien-spezifische Regulation der BALF-Glykoproteine von infizierten Tieren an Tag 4/Tag 20 im Vergleich zu dem jeweiligen Tier vor der Infektion an Tag -7.** Von jeweils drei Schweinen aus jeder Zuchtlinie wurden an den Tagen -7 und 4, oder -7 und 20 die BALF-Glykoproteine isoliert, über 2-D Gelelektrophorese aufgetrennt und silbergefärbt. Die Spots von differenziell exprimierten Proteinen wurden durch das Programm ImageJ quantifiziert. Konnte für ein Protein an den beiden Vergleichstagen keine Expression nachgewiesen werden, so wurde diese Messung in der Auswertung nicht berücksichtigt. Die Rauten-Symbole markieren das relative Verhältnis der Expression eines Proteins an Tag 4 bzw. Tag 20 im Vergleich zu Tag -7. Die Mittelwerte werden durch schwarze Balken angedeutet. Signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet (\*  $\leq 0.05$ , \*\*  $\leq 0.01$ , \*\*\*  $\leq 0.001$ ). AGP: Alpha-1-saures Glykoprotein, AHSG: Fetuin A, Hp: Haptoglobin Precursor, Hb: Hämoglobin, HPX: Hyaluronidase, SERPIN A3: Alpha-1-Antichymotrypsin 3, SP-D: Surfactant-assoziiertes Protein D.

### C 3.3 Unterschiede in der Expression von BALF-Glykoproteinen zwischen verschiedenen Zuchtlinien an den Tagen -7, 4 und 20

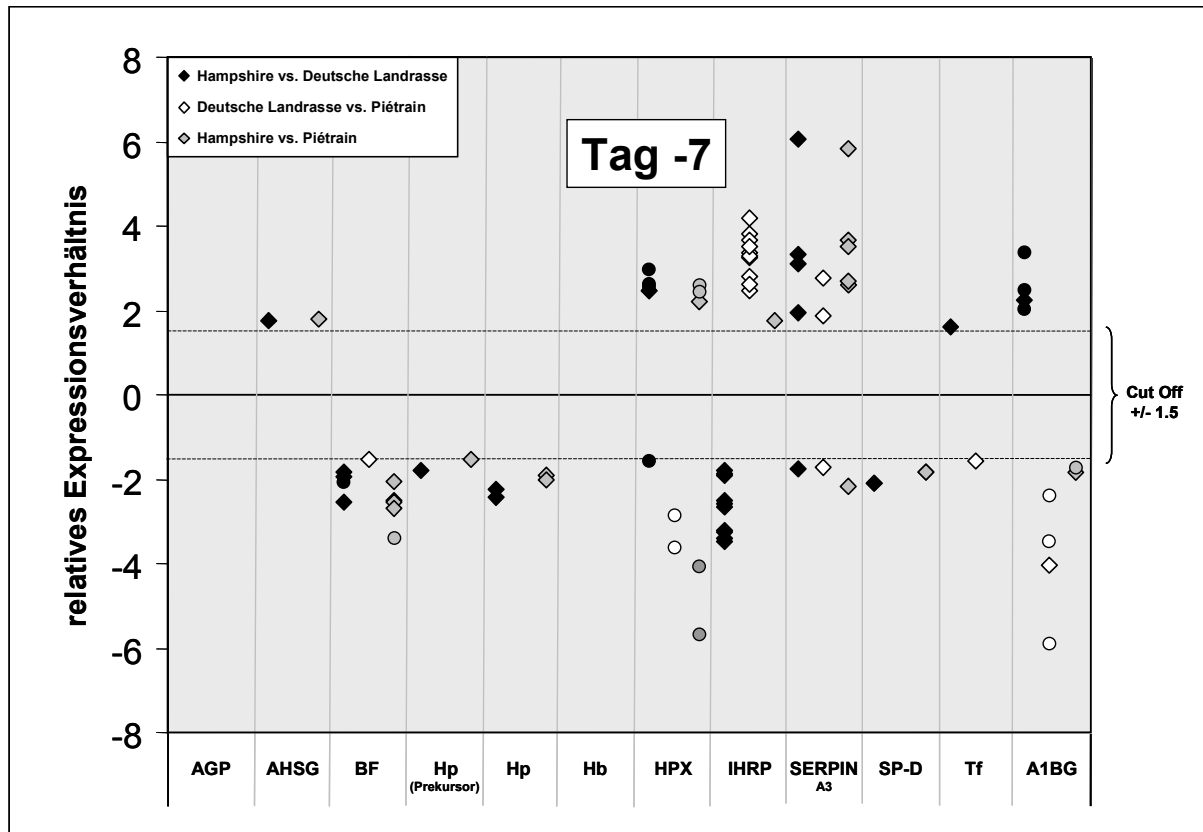
Um die speziellen Unterschiede der Glykoproteinexpression zwischen den verschiedenen Zuchtlinien an den einzelnen BALF-Entnahmetagen zu untersuchen, wurden jeweils drei Proben einer Rasse miteinander gepoolt und mit den Proteinpools der anderen Rassen über 2-D DIGE vergleichend analysiert. Dabei wurde jeder Proteinpool mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und die zu vergleichenden Proben gemeinsam zweidimensional aufgetrennt. Es wurden insgesamt 12 differentiell exprimierte Glykoproteine identifiziert: Alpha-1-saures Glykoprotein, Fetuin A, Properdin, Haptoglobin Prekursor, Haptoglobin, Hämoglobin, Hyaluronidase, Inter-alpha trypsin inhibitor family heavy chain-related protein (IHRP), Alpha-1-Antichymotrypsin 3, Surfactant-assoziiertes Protein D, Transferrin und Alpha-1B-Glykoprotein (Abb. 10, 12, 14; Tabelle 12). Für jedes Protein wurde die spezifische Expression quantifiziert und mit dem Wert der anderen Zuchtlinien in Relation gesetzt (Abb. 11, 13, 15). Dabei wurden in einigen Fällen die horizontal benachbarten Proteinspots auf dem Gel als Isoformen eines Glykoproteins gewertet, da sie zwar durch die Cy-Farbstoffe sichtbar waren, ihre Identität jedoch nicht durch die Massenspektrometrie bestätigt werden konnte. Diese wurden bei der Auswertung entsprechend gekennzeichnet.





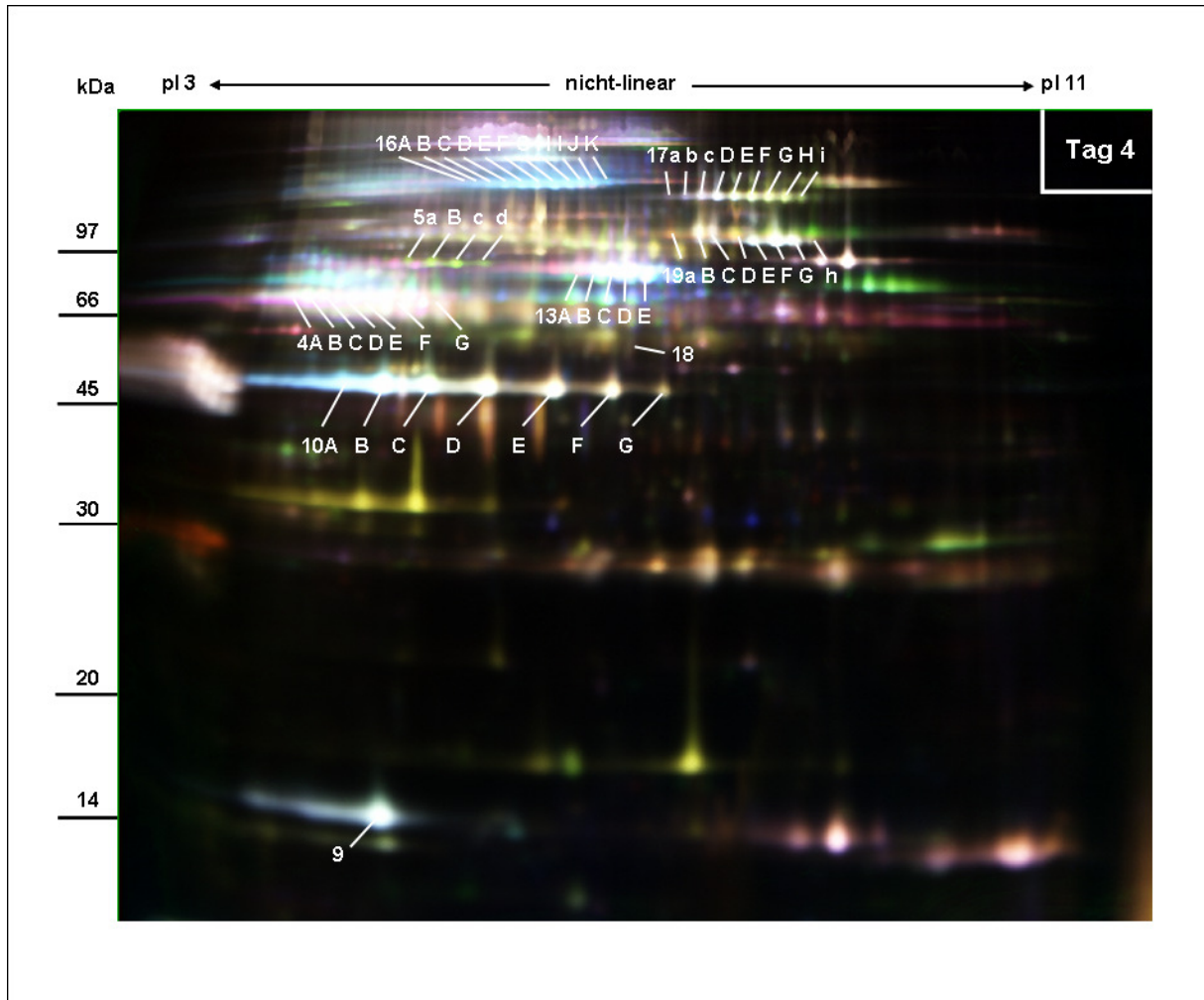
**Abb. 10: Detektion der Zuchtlinien-spezifischen Expression von BALF-Glykoproteinen bei gesunden Schweinen (Tag -7) mittels fluoreszenz-basierter 2-D Gelelektrophorese (2-D DIGE).** Die Proteinfraktionen von jeweils drei Tieren einer Rasse wurden gepoolt und vor der zweidimensionalen Auftrennung mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Auf jedem Gel wurden zwei Rassen miteinander verglichen und die durch Massenspektrometrie identifizierten, differentiell exprimierten Proteine durch Zahlen mit Großbuchstaben angegeben. Potentielle Proteinisomere, für die bei der Detektion kein signifikantes Ergebnis ermittelt werden konnte, sind durch kleine Buchstaben gekennzeichnet. (A) Deutsche Landrasse (Cy3, grün) vs. Piétrain (Cy5, rot); (B) Deutsche Landrasse (Cy5, rot) vs. Hampshire (Cy3, grün); (C) Piétrain (Cy3, grün) vs. Hampshire (Cy5, rot). Proteinannotationen: 5: Alpha-1B-Glykoprotein, 6: Fetuin A; 9: Haptoglobin Prekursor, 10: Haptoglobin, 13: Hyaluronidase, 16: IHRP, 17: Properdin, 18: Surfactant-assoziiertes Protein D, 19: Transferrin.

An Tag -7 (pre-infectionem) war bei Tieren der Hampshire Zuchtlinie die Expression des Glykoproteins Fetuin A um 1,8-fach höher als bei Tieren der Zuchtlinien Piétrain und Deutsche Landrasse. Die Konzentration von Haptoglobin, Haptoglobin Prekursor und SP-D war bei Hampshire hingegen 1,8-fach bis 2-fach niedriger als bei den anderen beiden Rassen. Die Proteine Properdin, Hyaluronidase, Transferrin und Alpha-1B-Glykoprotein wiesen bei Tieren der Deutschen Landrasse niedrigere Expressionslevel als bei Piétrain Schweinen auf. Im Gegensatz dazu waren bei IHRP deutlich höhere Werte zu beobachten (Abb. 11).



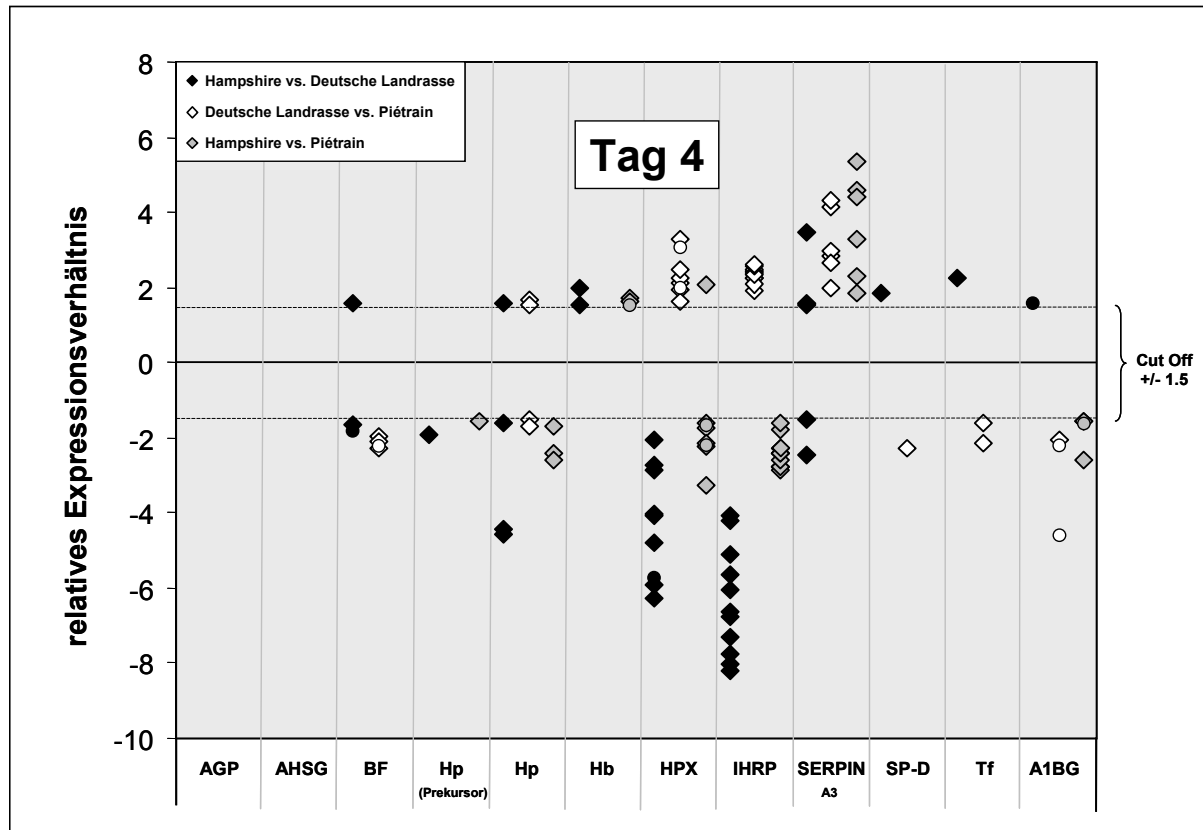
**Abb. 11: Unterschiedliche Expression von BALF-Glykoproteinen bei gesunden Schweinen (Tag -7) der Zuchtlinien Deutsche Landrasse, Piétrain und Hampshire.** Die Proteinspots differentiell exprimerter Proteine wurden mit dem Programm DeCyder™ (GE Healthcare) quantifiziert und die relativen Unterschiede zwischen den jeweiligen Vergleichen durch Rautensymbole dargestellt: Hampshire vs. Deutsche Landrasse (schwarz), Deutsche Landrasse vs. Piétrain (weiß), Hampshire vs. Piétrain (grau). Bei Proteinen mit Isoformen wurden die Proteinspots durch mehrere Symbole repräsentiert. Potentielle Proteinisomere, für die bei der massenspektrometrischen Analyse kein signifikantes Ergebnis erhalten werden konnte, werden durch Kreissymbole dargestellt. AGP: Alpha-1-saures Glykoprotein, AHSG: Fetuin A, BF: Properdin, Hp: Haptoglobin, Hb: Hämoglobin, HPX: Hyaluronidase, IHRP: Inter-alpha trypsin inhibitor family heavy chain related protein, SERPIN A3: Alpha-1-Antichymotrypsin 3, SP-D: Surfactant assoziiertes Protein D, Tf: Transferrin, A1BG: Alpha-1B-Glykoprotein.





**Abb. 12: Detektion der zuchtlinien-spezifischen Expression von BALF-Glykoproteinen an Tag 4 post infectionem mittels fluoreszenz-basierter 2-D Gelelektrophorese (2-D DIGE).** Die Proteinfraktionen von jeweils drei Tieren einer Rasse wurden gepoolt und vor der zweidimensionalen Auftrennung mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Auf dem Gel wurden alle drei Rassen miteinander verglichen und die durch Massenspektrometrie identifizierten, differenziell exprimierten Proteine durch Zahlen mit Großbuchstaben angegeben. Potentielle Proteinisomere, für die bei der Detektion kein signifikantes Ergebnis erhalten werden konnte, sind durch kleine Buchstaben gekennzeichnet. Deutsche Landrasse: Cy2 (blau); Piétrain: Cy3 (grün), Hampshire: Cy5 (rot). Proteinannotationen: 5: Alpha-1B-Glykoprotein, 4: Alpha-1-Antichymotrypsin 3, 9: Haptoglobin Prekursor, 10: Haptoglobin, 13: Hyaluronidase, 16: IHRP, 17: Properdin, 18: Surfactant-assoziiertes Protein D, 19: Transferrin.

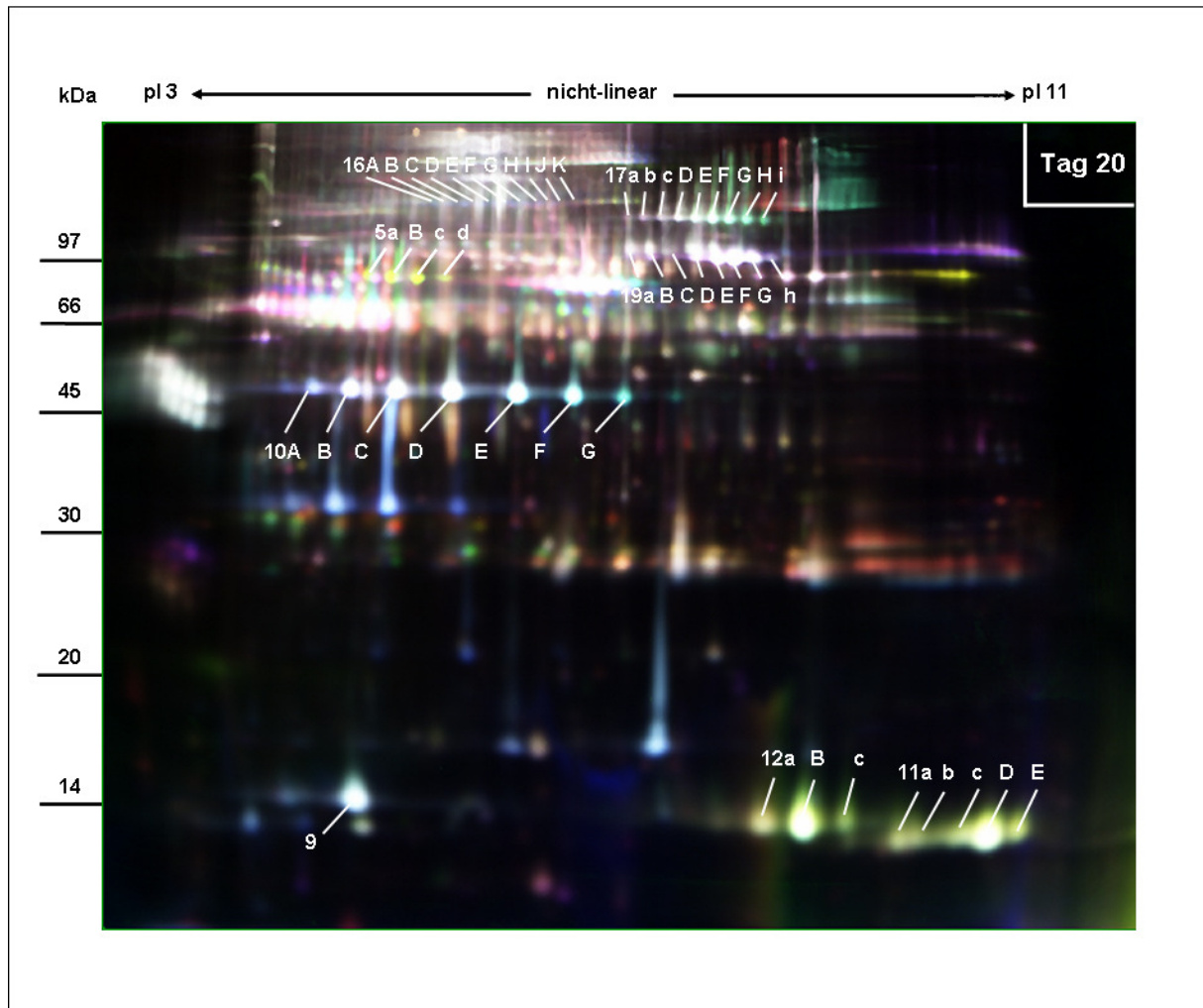
An Tag 4 post infectionem war bei Hampshire Schweinen die Konzentration an Haptoglobin Prekursor, Hyaluronidase und IHRP im Vergleich zu den anderen beiden Rassen erniedrigt. Die Proteinspiegel von Properdin, SP-D, Transferrin und Alpha-1B-Glykoprotein waren bei der Deutschen Landrasse niedriger als bei Piétrain Schweinen. Im Gegensatz dazu gab es hier erhöhte Werte bei IHRP und Alpha-1-Antichymotrypsin (Abb. 13).



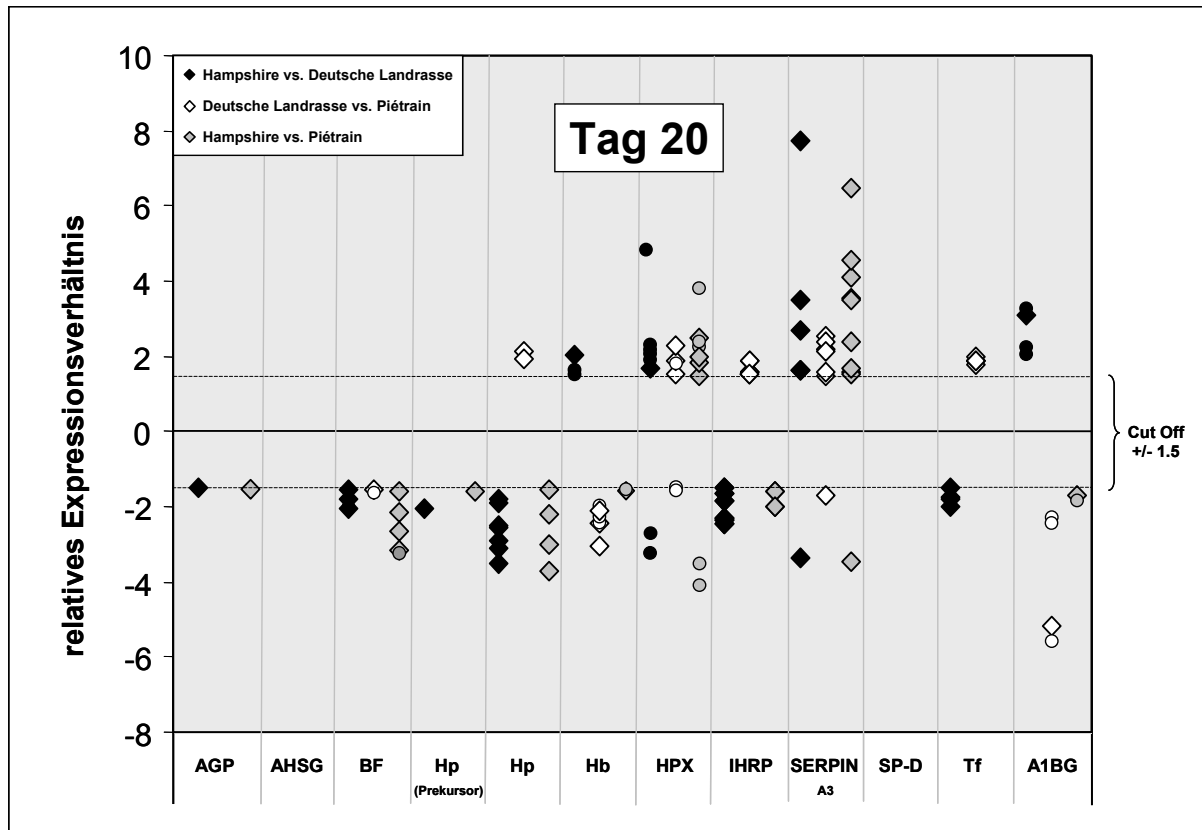
**Abb. 13: Unterschiedliche Expression von BALF-Glykoproteinen bei Schweinen der Zuchtlinien Deutsche Landrasse, Piétrain und Hampshire an Tag 4 nach der Infektion mit *A. pleuropneumoniae*.** Die Proteinspots differentiell exprimierter Proteine wurden mit dem Programm DeCyder™ (GE Healthcare) quantifiziert und die relativen Unterschiede zwischen den jeweiligen Vergleichen durch Rautensymbole dargestellt: Hampshire vs. Deutsche Landrasse (schwarz), Deutsche Landrasse vs. Piétrain (weiß), Hampshire vs. Piétrain (grau). Bei Proteinen mit Isoformen wurden die Proteinspots durch mehrere Symbole repräsentiert. Potentielle Proteinisomere, für die bei der massenspektrometrischen Analyse kein signifikantes Ergebnis erhalten werden konnte, werden durch Kreissymbole dargestellt. AGP: Alpha-1-saures Glykoprotein, AHSG: Fetuin A, BF: Properdin, Hp: Haptoglobin, Hb: Hämoglobin, HPX: Hyaluronidase, IHRP: Inter-alpha trypsin inhibitor family heavy chain related protein, SERPIN A3: Alpha-1-Antichymotrypsin 3, SP-D: Surfactant-assoziiertes Protein D, Tf: Transferrin, A1BG: Alpha-1B-Glykoprotein.

An Tag 20 post infectionem war bei der Hampshire Zuchtlinie die geringste Expression von Alpha-1B-Glykoprotein, Properdin, Haptoglobin Prekursor, Haptoglobin und IHRP zu beobachten. Im Vergleich zu Piétrain Schweinen waren bei der Deutschen Landrasse die Proteinlevel von Properdin, Hämoglobin und Alpha-1B-Glykoprotein erniedrigt und die von Haptoglobin, IHRP und Transferrin erhöht (Abb. 15).





**Abb. 14: Detektion der zuchtlinien-spezifischen Expression von BALF-Glykoproteinen an Tag 20 post infectionem mittels fluoreszenz-basierter 2-D Gelelektrophorese (2-D DIGE).** Die Proteinfraktionen von jeweils drei Tieren einer Rasse wurden gepoolt und vor der zweidimensionalen Auftrennung mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Auf dem Gel wurden alle drei Rassen miteinander verglichen und die durch Massenspektrometrie identifizierten, differentiell exprimierten Proteine durch Zahlen mit Großbuchstaben angegeben. Potentielle Proteinisomere, für die bei der Detektion kein signifikantes Ergebnis erhalten werden konnte, sind durch kleine Buchstaben gekennzeichnet. Deutsche Landrasse: Cy2 (blau); Piétrain: Cy3 (grün), Hampshire: Cy5 (rot). Proteinannotationen: 5: Alpha-1B-Glykoprotein, 9: Haptoglobin Precursor, 10: Haptoglobin, 11: Hämoglobin  $\alpha$ -Untereinheit, 12: Hämoglobin, 16: IHRP, 17: Properdin, 19: Transferrin.



**Abb. 15: Unterschiedliche Expression von BALF-Glykoproteinen bei Schweinen der Zuchtlinien Deutsche Landrasse, Piétrain und Hampshire an Tag 20 nach der Infektion mit *A. pleuropneumoniae*.** Die Proteinspots differentiell exprimierter Proteine wurden mit dem Programm DeCyder™ (GE Healthcare) quantifiziert und die relativen Unterschiede zwischen den jeweiligen Vergleichen durch Rautensymbole dargestellt: Hampshire vs. Deutsche Landrasse (schwarz), Deutsche Landrasse vs. Piétrain (weiß), Hampshire vs. Piétrain (grau). Bei Proteinen mit Isoformen wurden die Proteinspots durch mehrere Symbole repräsentiert. Potentielle Proteinisomere, für die bei der massenspektrometrischen Analyse kein signifikantes Ergebnis erhalten werden konnte, werden durch Kreissymbole dargestellt. AGP: Alpha-1-saures Glykoprotein, AHSG: Fetuin A, BF: Properdin, Hp: Haptoglobin, Hb: Hämoglobin, HPX: Hyaluronidase, IHRP: Inter-alpha trypsin inhibitor family heavy chain related protein, SERPIN A3: Alpha-1-Antichymotrypsin 3, SP-D: Surfactant-assoziiertes Protein D, Tf: Transferrin, A1BG: Alpha-1B-Glykoprotein.

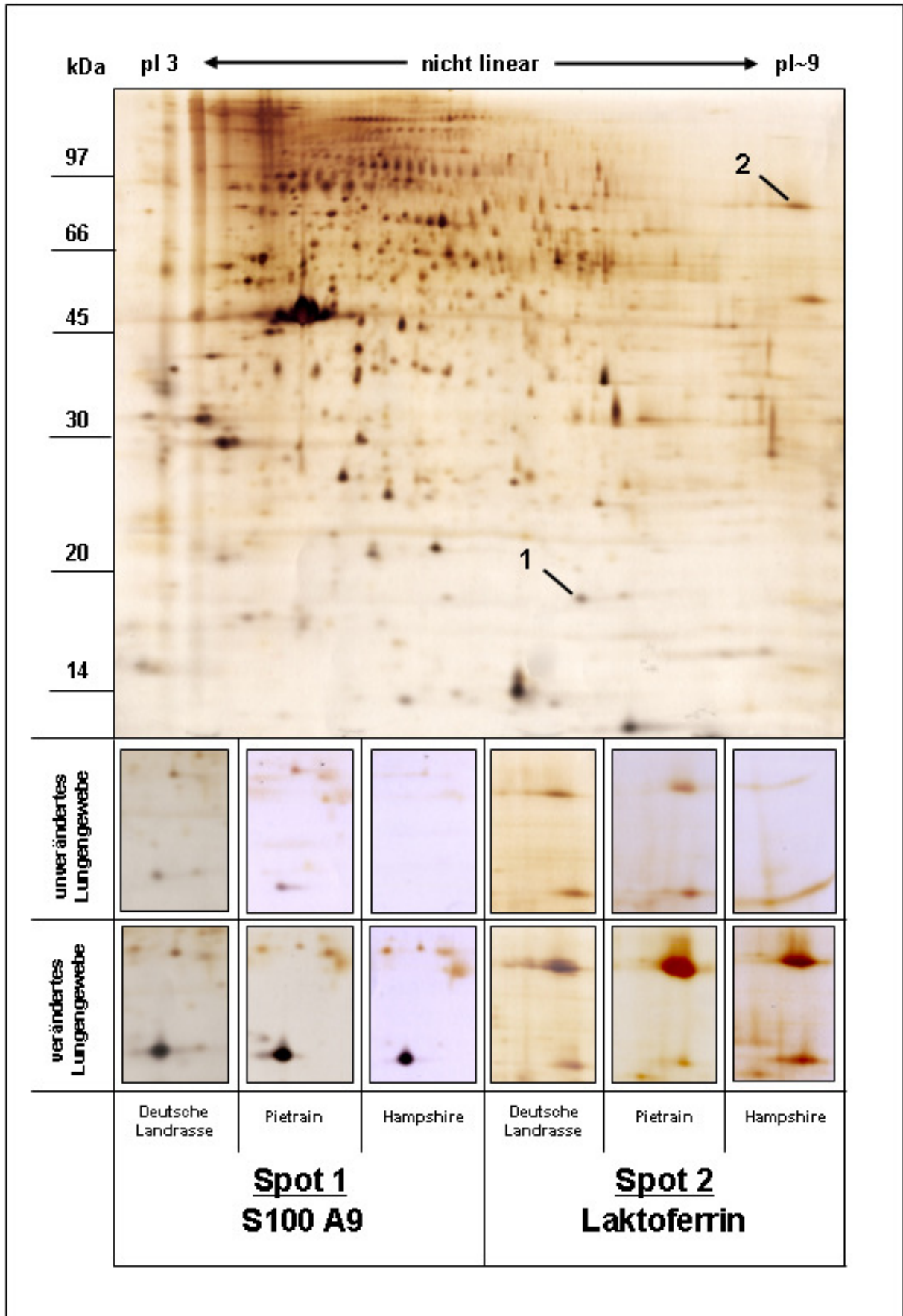
## C 4 Expressionsanalyse Lipid-raft assoziierter Proteine während der *Actinobacillus pleuropneumoniae* - Infektion

### C 4.1 Identifizierung von Proteinen in „Lipid Rafts“

Das Ziel dieses Ansatzes war es zu untersuchen, inwiefern bestimmte Proteine während einer *A. pleuropneumoniae* Infektion mit Membranmikrodomänen assoziieren. Diese auch als „Lipid Rafts“ bezeichneten Strukturen besitzen die Eigenschaft, als Antwort auf rezeptorvermittelte Signale miteinander zu fusionieren. Durch diese Clusterbildung können bestimmte Proteine in diese Membrandomänen aufgenommen werden und gelangen in räumliche Nähe zueinander. Dadurch werden Reaktionsräume geschaffen, die maßgeblich

an Prozessen wie dem Vesikeltransport und der Signaltransduktion beteiligt sind. Dabei kann eine infektionsbedingte Änderung der Zusammensetzung dieser Membrandomänen nicht ausgeschlossen werden. „Lipid Rafts“ weisen einen erhöhten Gehalt an Cholesterol und Sphingolipiden auf, weshalb sie dichter gepackt sind als Phospholipide und dadurch eine charakteristische Unlöslichkeit in nicht-ionischen Tensiden bei 4°C aufweisen. Diese Eigenschaft wurde für ihre Isolierung genutzt. Bei der Sektion wurden von infizierten Tieren unterschiedlicher Rasse Proben von verändertem und unverändertem Lungengewebe entnommen, homogenisiert und mit 1% Triton X-100 behandelt. Die Proteine der detergenten Membranen wurden anschließend über 2-D Gelelektrophorese aufgetrennt und silbergefärbt.

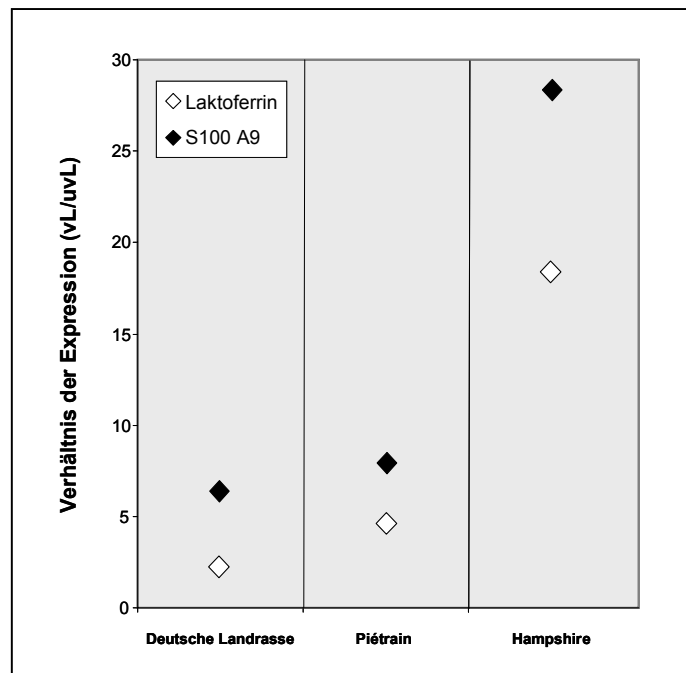
Dabei konnte an Tag 4 nach der Infektion bei allen untersuchten Tieren mit deutlichen Lungenveränderungen (Lungenläsions-Score >5) für zwei Proteine eine erhöhte Expression in verändertem Lungengewebe nachgewiesen werden (Abb.16). Durch eine massenspektrometrische Untersuchung wurden diese als S100 A9 und Lakto(trans)ferrin identifiziert (Tabelle 13). Bei dem Versuchstier der Zuchtlinien Deutsche Landrasse und Piétrain gab es eine 6,4-fache bzw. 7,9-fache Erhöhung von S100 A9 und eine 2,2-fache bzw. 4,5-fache Erhöhung von Laktoferrin. Bei Hampshire war die Expression von S100 A9 um den Faktor 28 und die von Laktoferrin um den Faktor 18,5 erhöht (Abb. 17). Als Kontrolle wurde das Proteinmuster des unveränderten Lungengewebes infizierter Tiere mit dem von Lungengewebe von gesunden, nicht-infizierten Tieren verglichen. Hierbei konnten keine Unterschiede beobachtet werden. Die Auswertung der an Tag 20 erhaltenen Proteingele ergab ebenfalls keine bedeutenden Unterschiede.



**Abb. 16: Differentielle Expression von Lipid-raft-assoziierten Proteinen in verändertem und unverändertem Lungengewebe an Tag 4 nach der Infektion mit *A. pleuropneumoniae*.** Die Proteine wurden zuerst in einem Immobiline® Dry Strip (pH 3 - 11) fokussiert, dann in einem 12,5%-igen SDS-Gel aufgetrennt und die Spots anschließend durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht. Bei allen untersuchten Tieren war bei zwei Proteinen eine deutlich erhöhte Expression in verändertem Lungengewebe zu beobachten. Das etwa 80 kDa große Protein wurde durch Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) als Laktoferrin identifiziert. Bei dem etwa 18 kDa großen Protein handelt es sich vermutlich um das kalziumbindende Protein A9 aus der S100-Familie (ESI-Q-TOF MS/MS).

**Tabelle 13: Identifizierte „Lipid-Raft“ assoziierte Proteine.** Die Identität der Proteine wurde mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS, ESI Q-TOF MS/MS) und einer nachfolgenden Datenbankrecherche (MASCOT, BLAST) ermittelt.

Proteinspot	Proteinname	Accession Number	theor. pI	theor. MW (kDa)	Peptid-Übereinstimmung	Sequenz-Abdeckung (%)
1	S100 calcium-binding protein A9 (Bos taurus)	P28783	6,29	17,114	2	12
2	lactotransferrin	BAD08651	8,62	79,551	22	34

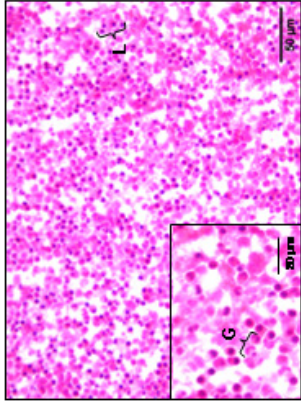
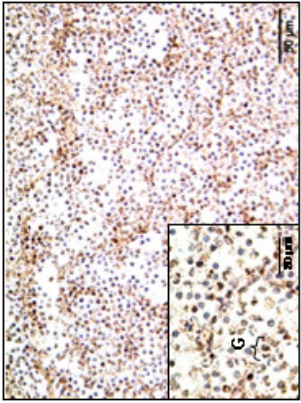
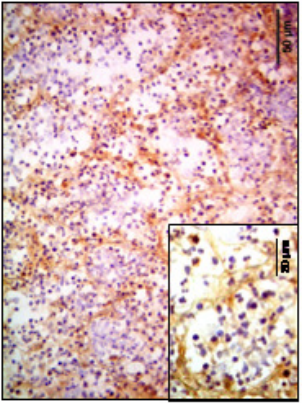
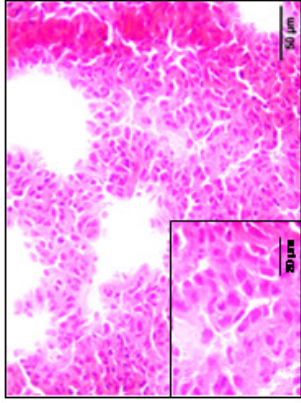
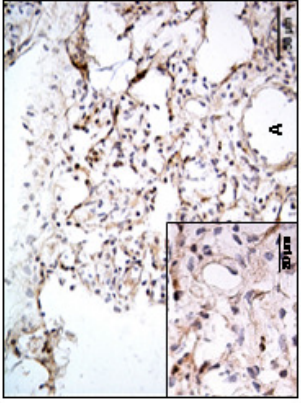
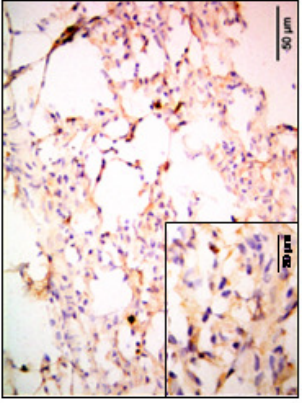
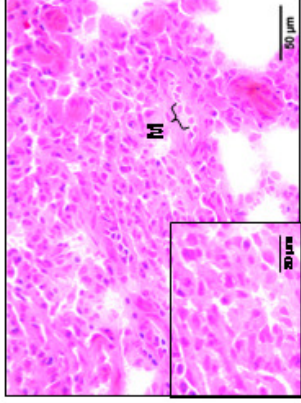
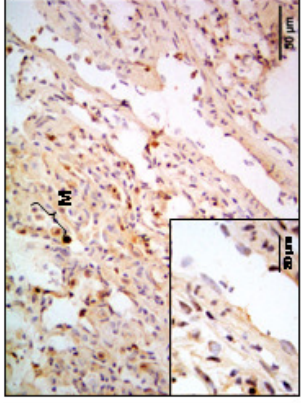
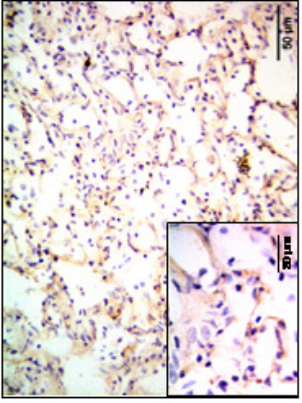


**Abb. 17: Unterschiedliche Expression der Proteine S100 A9 und Laktoferrin in verändertem Lungengewebe (vL) im Vergleich zu unverändertem Lungengewebe (uvL) an Tag 4 post infectionem.** Die Proteinspots wurden durch das Programm ImageJ quantifiziert und das relative Expressionsverhältnis ermittelt. Dabei wies das Tier aus der Hampshire Zuchtlinie für beide Proteine die höchsten Werte auf.

#### C 4.2 Histopathologische Untersuchung von Lungengewebe

Um den zellulären Ursprung der Laktoferrin-Expression genauer bestimmen zu können, wurden von den Schweinelungen Gewebeschnitte angefertigt und mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen das humane Laktoferrin ein Immunnachweis erstellt (Abb. 18). Zusätzlich wurde eine Färbung der Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin durchgeführt. Bei dem Vergleich von unverändertem Lungengewebe infizierter Tiere mit dem gesunden Lungengewebe nicht-infizierter Tiere waren keine Unterschiede zu beobachten. In beiden Fällen sind die Fibroblasten des Gewebes und vereinzelt Makrophagen zu erkennen. Bei den immunhistochemisch behandelten Ansätzen kam es aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen des Avidin-Biotin-Komplexes mit Surfactant-Komponenten zu einer leichten Hintergrundfärbung. Die Schnitte aus dem erkrankten Lungengewebe wiesen hingegen eine deutliche Anhäufung infiltrierender Immunzellen wie Lymphozyten und überwiegend neutrophile Granulozyten auf. Anhand der immunspezifischen Reaktion mit dem Antikörper konnte für die Granulozyten eine Expression von Laktoferrin nachgewiesen werden. Alveolare Epithelzellen, die ebenfalls Laktoferrin exprimieren können, zeigten keine Anfärbung.



<b>akut infiziertes Tier</b>	verändertes Lungengewebe			
	unverändertes Lungengewebe			
<b>nicht-infiziertes Tier</b>	Lungengewebe			
	<b>HE</b>	<b>anti-LF</b>	<b>Kontrolle</b>	

**Abb. 18: Histopathologischer Nachweis von porzinem Laktoferrin in Lungengewebe.** Von der bei der Sektion entnommenen Lunge wurden Gewebeschnitte angefertigt und das Laktoferrin durch eine Immunreaktion mit einem spezifischen Antikörper (anti-LF) braun angefärbt. Für den Überblick wurde zusätzlich eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) durchgeführt. In verändertem Lungengewebe war eine deutliche Anfärbung neutrophiler Granulozyten zu beobachten. Im Gegensatz dazu gab es keine Färbung in unverändertem Lungengewebe und in dem Gewebe nicht-infizierter Tiere. (A) Alveole, (G) neutrophiler Granulozyt, (L) Lymphozyt, (M) Makrophage.

## C 4.3 Charakterisierung des Glykoproteins Laktoferrin

### C 4.3.1 In-vitro Expression von rekombinantem Laktoferrin

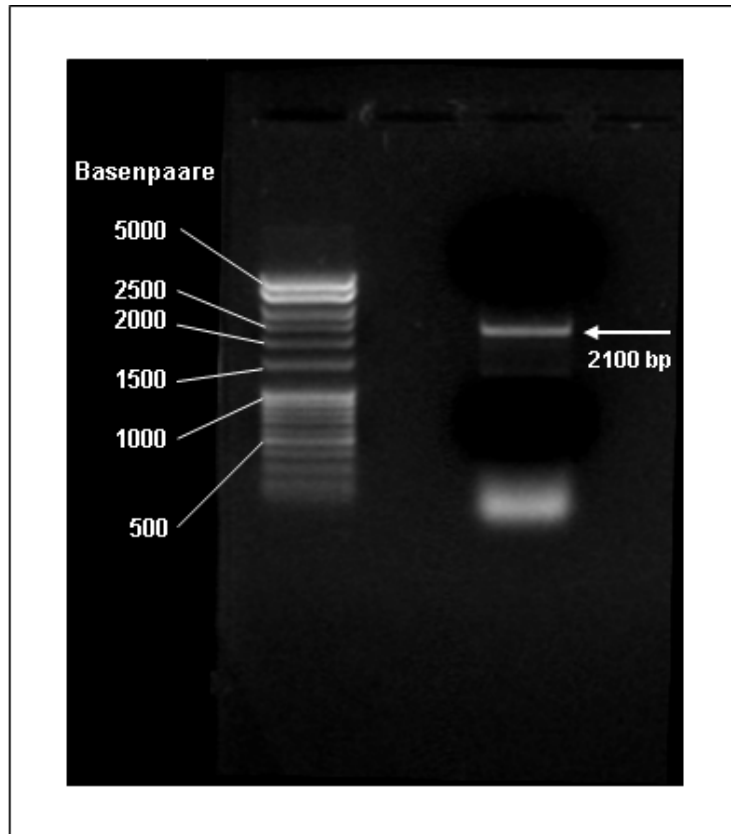
Für die zellbiologische Charakterisierung von Laktoferrin wurde die cDNA in MDCK-Zellen eingeschleust und das Protein stabil exprimiert. Dafür wurde zunächst die mRNA aus porzinem Leber-Gewebe isoliert und aufgereinigt. Um zu vermeiden, dass die Präparation mit genomischer DNA kontaminiert wird, wurde bei der Durchführung zusätzlich eine DNA-spezifische Silica-Membran verwendet. Die Abwesenheit von DNA wurde durch eine PCR mit spezifischen Primern für das ubiquitäre Gen der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) kontrolliert und bestätigt (nicht dargestellt). Die Messung der Reinheit der Nukleinsäure am Photometer ergab ein Verhältnis der  $OD_{260}/OD_{280}$  von 1,89 und lag somit in dem Sollbereich von 1,8 bis 2,1 (Sambrook und Russell 2001).

Bei der Amplifikation der cDNA für Laktoferrin wurde zur Vermeidung von Fehlpaarungen eine Polymerase mit Lesekorrektur verwendet. Am Ende der PCR-Reaktion wurde dem Ansatz kurzzeitig *Taq*-Polymerase hinzugefügt, um die für die TOPO-Klonierung notwendigen Adenin-Nukleotide am Ende der Fragmente zu erhalten. Das DNA-Produkt wurde über ein Agarosegel (Abb. 19) und eine Silica-Membran aufgereinigt und in den TOPO-Vektor zwischenkloniert. Von den nach der Transformation positiven *E. coli*-Kolonien wurden zehn Kolonien gepickt und über eine PCR-Reaktion die Aufnahme der Laktoferrin-cDNA in den Vektor zweifach überprüft (Abb. 20). Bei neun Kandidaten konnte das Insert mit einer Größe von ca. 2200 Basenpaaren nachgewiesen werden. Der Kandidat 9 wies hingegen keine Bande auf. Für die Kandidaten 6 und 7 fiel die zweite Überprüfung negativ aus. Alle anderen Proben zeigten die gesuchte DNA-Bande bei 1300 Basenpaaren. Von Klon 2 wurde eine Plasmid-Präparation durchgeführt und die Sequenz der cDNA überprüft. Die Sequenzierung ergab eine 99%-ige Übereinstimmung mit dem Laktoferrin (AC: BAD08651), das in der massenspektrometrischen Untersuchung identifiziert worden war (Abb. 21). An der Position 664 gab es einen Aminosäureaustausch von Alanin (neutral) zu Threonin (neutral). Danach wurde die cDNA aus dem TOPO-Vektor herausgeschnitten, in den Expressionsvektor pcDNA4/TO/*myc*-His<sup>™</sup> ligiert und der Erfolg der Klonierung durch PCR überprüft (Abb. 22).

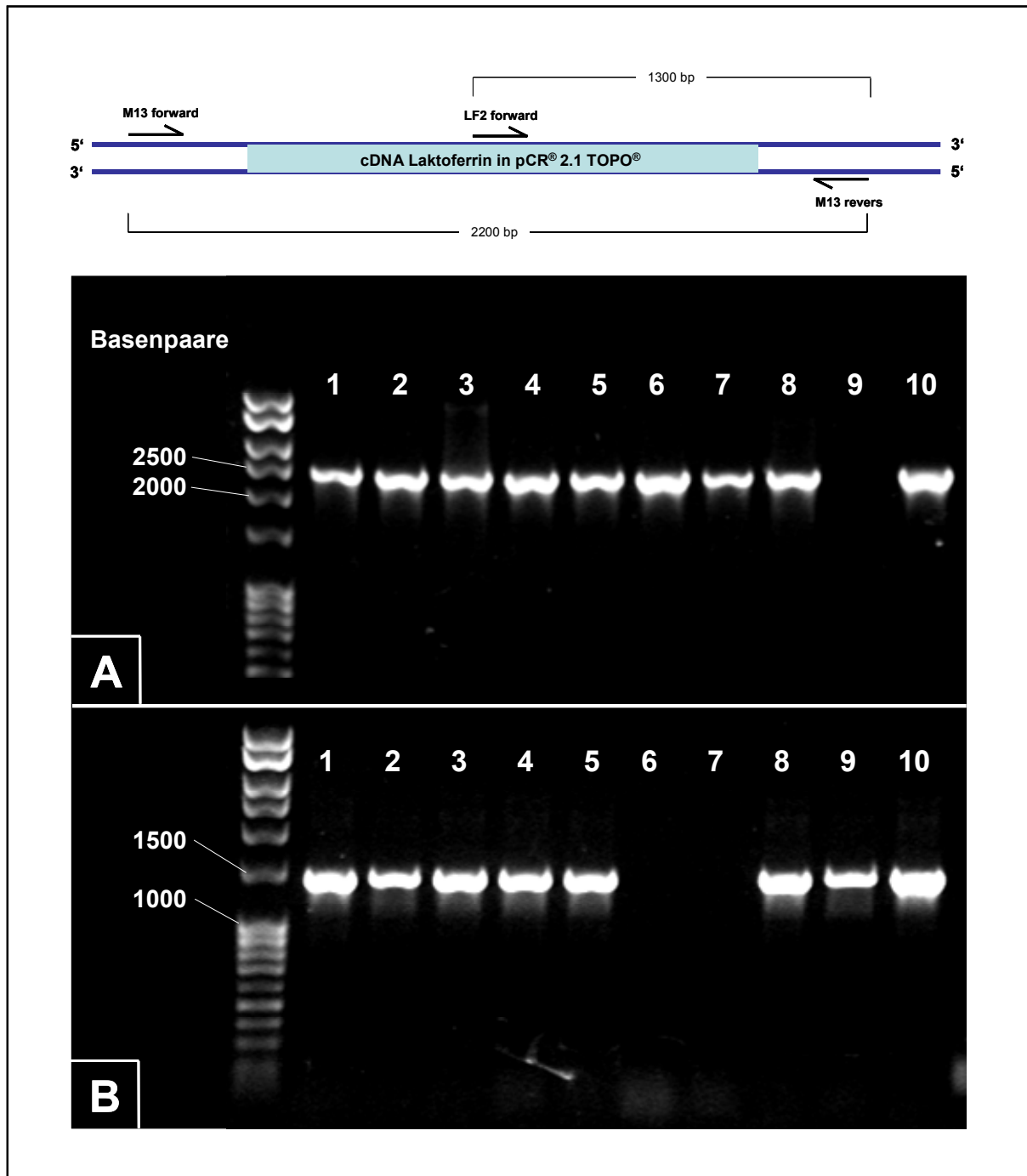
Die Expression der cDNA wurde zunächst anhand einer transienten Transfektion in MDCK-Zellen und einem anschließenden Western Blot von den ins Medium sekretierten Proteinen überprüft. Als Kontrolle diente das Medium unbehandelter MDCK-Zellen (Abb. 23). Danach wurden die Zellen stabil transfiziert und auf eine 24er Wellplatte gesplittet. Unter dem Selektionsdruck des Antibiotikums Zeocin<sup>®</sup> starben alle Zellen ab, die das Plasmid nicht aufgenommen hatten. In den Wells 5, 11, 18, und 22 hingegen waren morphologisch gesunde Zellen zu beobachten, die keine Einschränkung in ihrer Proliferation aufwiesen.



Nach zwei Wochen wurde von diesen Kandidaten Zelllysat hergestellt und die Expression von Laktoferrin im Western Blot überprüft. Dabei wiesen die Zellen aus Well 5 und Well 18 eine deutliche Expression im Vergleich zu den anderen beiden Proben auf. Die stärkste Expression konnte für die Zellen aus Well 5 nachgewiesen werden. Diese wurden weiterkultiviert und für alle folgenden Experimente verwendet (Abb. 23).



**Abb. 19: Amplifikation der cDNA für das Protein Laktoferrin.** Das Template stammte aus der reversen Transkription von mRNA aus Lebergewebe eines mit *A. pleuropneumoniae* infizierten Tieres. Durch die Verwendung der Primer oLFcDNA1 und oLFcDNA2 wurde an beiden Sequenzenden Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease *XhoI* (Erkennungssequenz: 5'-C<sup>^</sup>TCGAG-3') angefügt. Der gesamte PCR-Ansatz wurde über ein 0,8%-iges Agarose-Gel aufgetrennt und die spezifische Bande bei ca. 2100 bp ausgeschnitten. Nach der Aufreinigung des DNA-Fragments wurde dieses zunächst in den pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup> Vektor zwischenkloniert und dann in den Vektor pcDNA4/TO/*myc*-His<sup>™</sup> ligiert.



**Abb. 20: Zweifache Kontroll-PCR der Klonierung von Laktoferrin-cDNA in den pCR® 2.1 TOPO® Vektor.** Nach der Klonierung wurden zehn Bakterienkolonien gepickt und auf die Aufnahme des Inserts hin überprüft. Für die erste PCR-Reaktion (A) wurde das Primerpaar aus M13 forward und M13 revers verwendet. Hierbei wurde bei neun der zehn Kandidaten das erwartete DNA-Produkt mit einer Größe von ca. 2200 bp gebildet. Die zweite PCR-Reaktion (B) wurde mit dem Primerpaar aus LF-2 forward und M13 revers durchgeführt. Dort zeigten acht Kandidaten die gesuchte Bande bei 1300 bp. Für den weiteren Verlauf der Klonierung wurde mit Klon 2 weitergearbeitet.

```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

BAD08651      MKLFIPALLFLGTLGLCLAAPKKGVRWCVISTA EYSKCRQWQSKIRRTNPIFCIRRASPT
Klon_2        MKLFIPALLFLGTLGLCLAAPKKGVRWCVISTA EYSKCRQWQSKIRRTNPIFCIRRASPT
*****

BAD08651      DCIRAIAAKRADAVTLDGGLVFEADQYKLRPVAAE IYGTEENPQTYYYAVAVVKKGFNFQ
Klon_2        DCIRAIAAKRADAVTLDGGLVFEADQYKLRPVAAE IYGTEENPQTYYYAVAVVKKGFNFQ
*****

BAD08651      LNQLQGRKSCHTGLGRSAGWNIPIGLLRRFLDWAGPPEPLQKAVAKFFSQSCVPCADGNA
Klon_2        LNQLQGRKSCHTGLGRSAGWNIPIGLLRRFLDWAGPPEPLQKAVAKFFSQSCVPCADGNA
*****

BAD08651      YPNLCQLCIGKGDKACSSQEPYFGYSGAFNCLHKGIGDVA FVKESTVFENLPQKADR
Klon_2        YPNLCQLCIGKGDKACSSQEPYFGYSGAFNCLHKGIGDVA FVKESTVFENLPQKADR
*****

BAD08651      KYELLCPDNTRKPV EAFRECHLARVP SHAVVARSVNGKENS IWELLYQS QKKFGKSNPQE
Klon_2        KYELLCPDNTRKPV EAFRECHLARVP SHAVVARSVNGKENS IWELLYQS QKKFGKSNPQE
*****

BAD08651      FQLFGSPGQQKDLLFRDATIGFLKIPSKIDSKLYLGLPYLTA IQGLRETA AEVEARQAKV
Klon_2        FQLFGSPGQQKDLLFRDATIGFLKIPSKIDSKLYLGLPYLTA IQGLRETA AEVEARQAKV
*****

BAD08651      VCAVGPEELRKCRQWSSQSSQNLNCSLASTTEDCIVQVLKGEADAMS LDGGFIYTAGKC
Klon_2        VCAVGPEELRKCRQWSSQSSQNLNCSLASTTEDCIVQVLKGEADAMS LDGGFIYTAGKC
*****

BAD08651      GLVPVLAENQKSRQSSSDCVHRPTQGYFAVAVVRKANGGITWNSVRGTKSCHTAVDRTA
Klon_2        GLVPVLAENQKSRQSSSDCVHRPTQGYFAVAVVRKANGGITWNSVRGTKSCHTAVDRTA
*****

BAD08651      GWNIPMGLLVNQTGSKCFDEFFSQSCAPGSQPGSNLCALCVGNDQGV DKCVPNSNERYYG
Klon_2        GWNIPMGLLVNQTGSKCFDEFFSQSCAPGSQPGSNLCALCVGNDQGV DKCVPNSNERYYG
*****

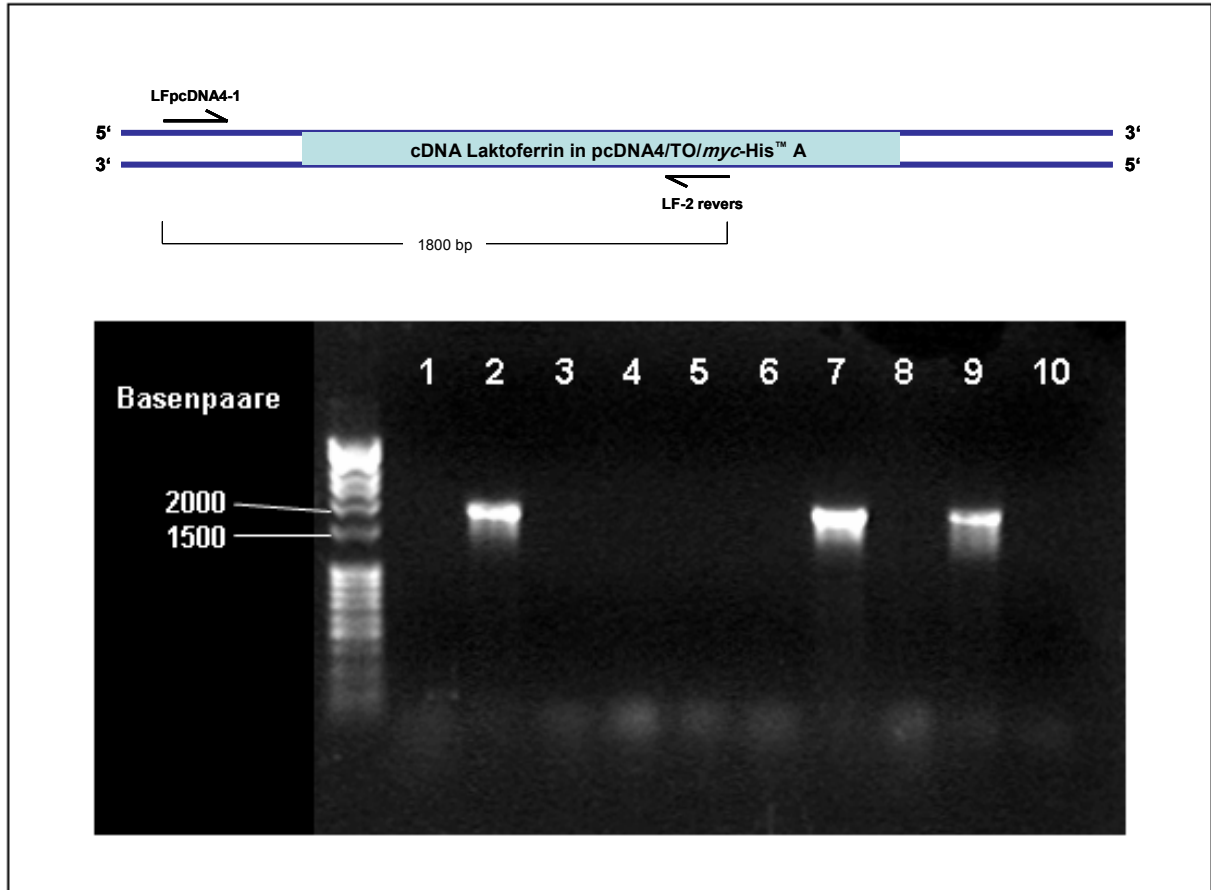
BAD08651      YTGAFRCLAENAGDVA FVKDVTVLDNTNGQNT EEWARELRSDDFELLCLDGRKPVTEAQ
Klon_2        YTGAFRCLAENAGDVA FVKDVTVLDNTNGQNT EEWARELRSDDFELLCLDGRKPVTEAQ
*****

BAD08651      NCHLAVAPSHAVVSRKEKAAQVEQVLLTEQAQFGRYKDCPKFCLFRSETKNLLFNDNT
Klon_2        NCHLAVAPSHAVVSRKEKAAQVEQVLLTEQAQFGRYKDCPKFCLFRSETKNLLFNDNT
*****

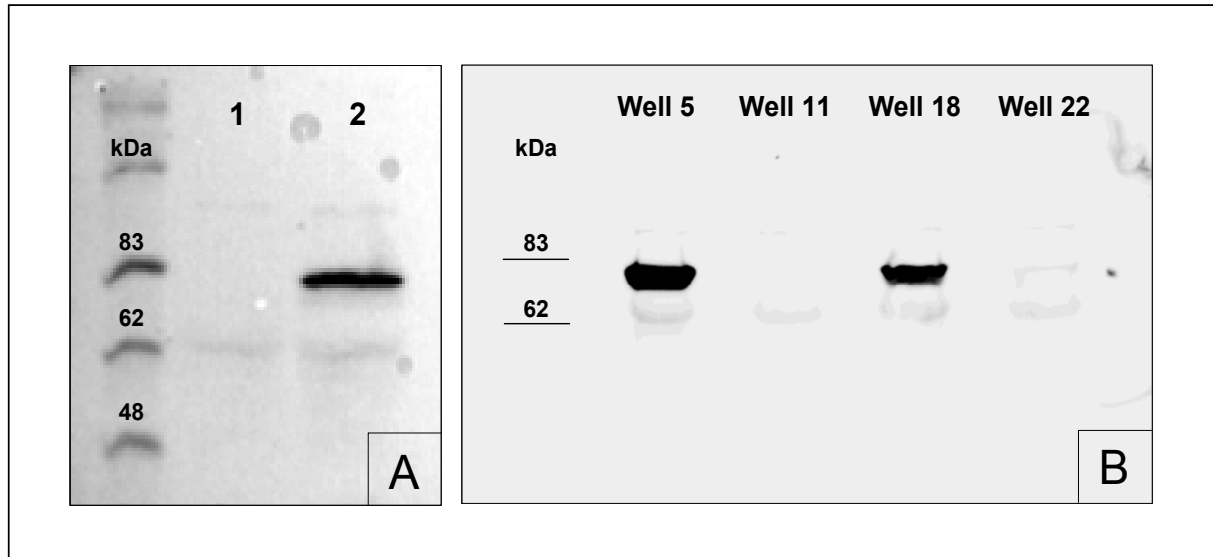
BAD08651      ECLAQLQGKTTYEKYLGSEYVTAIANLKQCSVSPLEACAFMMR
Klon_2        ECLTQLQGKTTYEKYLGSEYVTAIANLKQCSVSPLEACAFMMR
***:*****

```

**Abb. 21: Überprüfung der klonierten Laktoferrin-cDNA.** Die Sequenz wurde translatiert und durch einen Datenbankabgleich (BLAST) übergeprüft. Dabei gab es eine 99% Übereinstimmung mit dem NCBI-Eintrag für Laktoferrin (Zugangsnummer: BAD08651). Es gab lediglich einen Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin an der Position 664 in der Aminosäuresequenz.



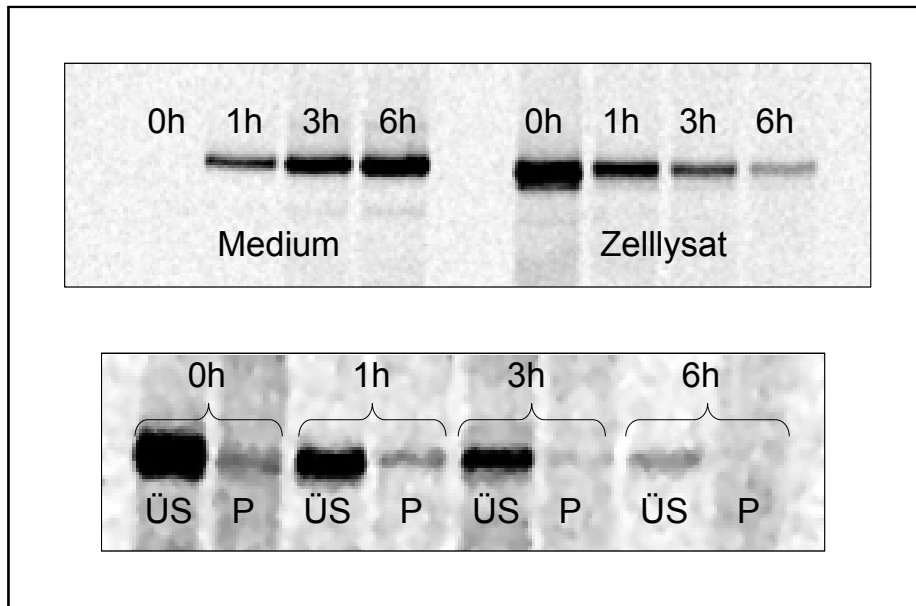
**Abb. 22: Kontroll-PCR der Klonierung von Laktoferrin-cDNA in den Expressionsvektor pcDNA4/TO/myc-His™.** Nach der Umklonierung aus dem TOPO-Vektor wurden nach der Transformation zehn Bakterienkolonien gepickt und auf die Aufnahme des Inserts hin überprüft. Für die PCR-Reaktion wurde das Primerpaar aus LFpcDNA4-1 forward und LF-2 revers verwendet. Hierbei wurde bei drei der zehn Kandidaten das erwartete DNA-Produkt mit einer Größe von ca. 1800 bp gebildet. Für Klon 2 wurde eine Bakterienkultur angesetzt und anschließend die Plasmid-DNA isoliert.



**Abb. 23: Überprüfung der rekombinanten Expression von Laktoferrin in MDCK-Zellen mittels Western Blot.** (A) Die Expression wurde zunächst durch eine transiente Transfektion überprüft; 1: Medium nicht-transfizierter Zellen, 2: Medium transfizierter Zellen. (B) Die stabil transfizierten Zellen wurden auf eine 24-er Wellplatte ausgesät und mit Hilfe eines Antibiotikums selektiv kultiviert. Nach zwei Wochen war nur noch in den Wells 5, 11, 18, und 22 ein Zellwachstum zu beobachten. Bei der Untersuchung der Zelllysate konnte für die Zellen aus Well 5 die stärkste Laktoferrin-Expression nachgewiesen werden.

#### C 4.3.2 Untersuchung der Transportkinetik während der Proteinreifung

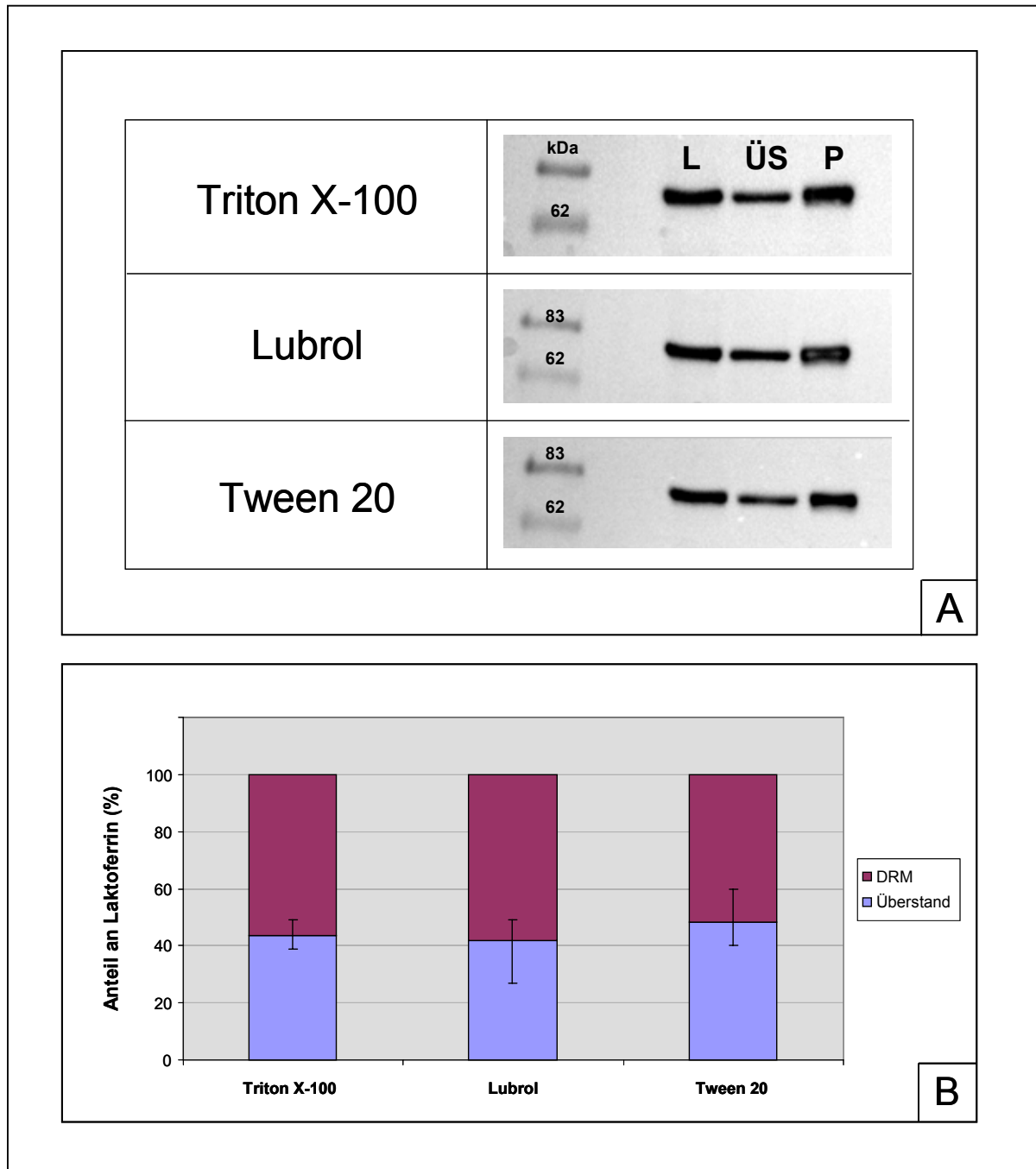
Um die Assoziation von Laktoferrin mit den „Lipid Rafts“ während seiner Reifung in der Zelle zu beurteilen, wurde das Protein radioaktiv markiert und seine Transportkinetik in einem „Pulse-Chase“ Experiment beobachtet (Abb. 24). Während der Pulse-Phase wurde in alle neu synthetisierten Proteine die Aminosäure  $^{35}\text{S}$ -Methionin eingebaut. In der „Chase“-Phase wurde das Zellkulturmedium ausgewechselt, so dass wieder nicht-markiertes Methionin für die Synthesen verwendet wurde. Während der „Chase“-Zeiten von 0 h bis 6 h war ein kontinuierlicher Anstieg von Laktoferrin im Medium zu beobachten. Im Gegensatz dazu gab es im Zelllysate eine stetige Abnahme des Proteins. Bei dem Vergleich der Überstände nach der Ultrazentrifugation mit den Detergenz-resistenten Membranen (DRM-Pellet) war der größere Anteil von Laktoferrin deutlich in der Überstand-Fraktion lokalisiert. In beiden Fraktionen gab es bei ansteigender Chase-Zeit eine kontinuierliche Abnahme der Laktoferrinkonzentration.



**Abb. 24: Transportkinetik von Laktoferrin während der intrazellulären Reifung.** Stabil transfizierte MDCK-Zellen wurden mit einem  $^{35}\text{S}$ -Methionin-haltigen Kulturmedium für 1,5 h markiert (Pulse) und danach in normalem Kulturmedium inkubiert (Chase). Nach unterschiedlichen „Chase“-Zeiten (0 h, 1 h, 3 h, 6 h) wurden die Zellen lysiert und eine Präparation der „Lipid-rafts“ durchgeführt. Für die unterschiedlichen Fraktionen wurde anschließend das Laktoferrin immunpräzipitiert. ÜS: Überstand nach Ultrazentrifugation des Zelllysats, P: Pellet der „Lipid Rafts“ (DRM).

#### C 4.3.3 Untersuchung der Assoziation von Laktoferrin mit unterschiedlichen Typen von „Lipid Rafts“ unter der Verwendung verschiedener Detergenzien

Neben den klassischen sphingolipid- und cholesterolreichen Triton-X-100 „Lipid Rafts“ gibt es weitere Membranzusammensetzungen, die eine Unlöslichkeit in anderen Detergenzien aufweisen. Diese Lipidkompositionen sind jeweils spezifisch für die Membranen bestimmter Zellkomponenten. Eine Assoziation des Laktoferrins mit diesen Detergenz-resistenten Membranen kann daher Auskunft über den Ort und somit auch über den Zeitpunkt seiner Assoziation während seiner Reifung geben. Daher wurden drei unterschiedliche „Lipid-Raft“-Präparationen mit den Detergenzien Triton X-100, Lubrol und Tween 20 durchgeführt und das Verhältnis des jeweiligen Laktoferrinanteils zwischen dem DRM-Pellet und der Überstandfraktion untersucht (Abb. 25). Bei dem Ansatz mit Triton X-100 befanden sich durchschnittlich 44 Prozent des Proteins im Überstand und 56 Prozent im Pellet. Bei der Lubrol-Präparation waren es im Überstand 42 Prozent und im Pellet 58 Prozent. Die geringste DRM-Assoziation zeigte sich hingegen bei dem Tween 20-Ansatz mit 52 Prozent Laktoferrinanteil in der Pellet- und 48 Prozent in der Überstandsfraktion.

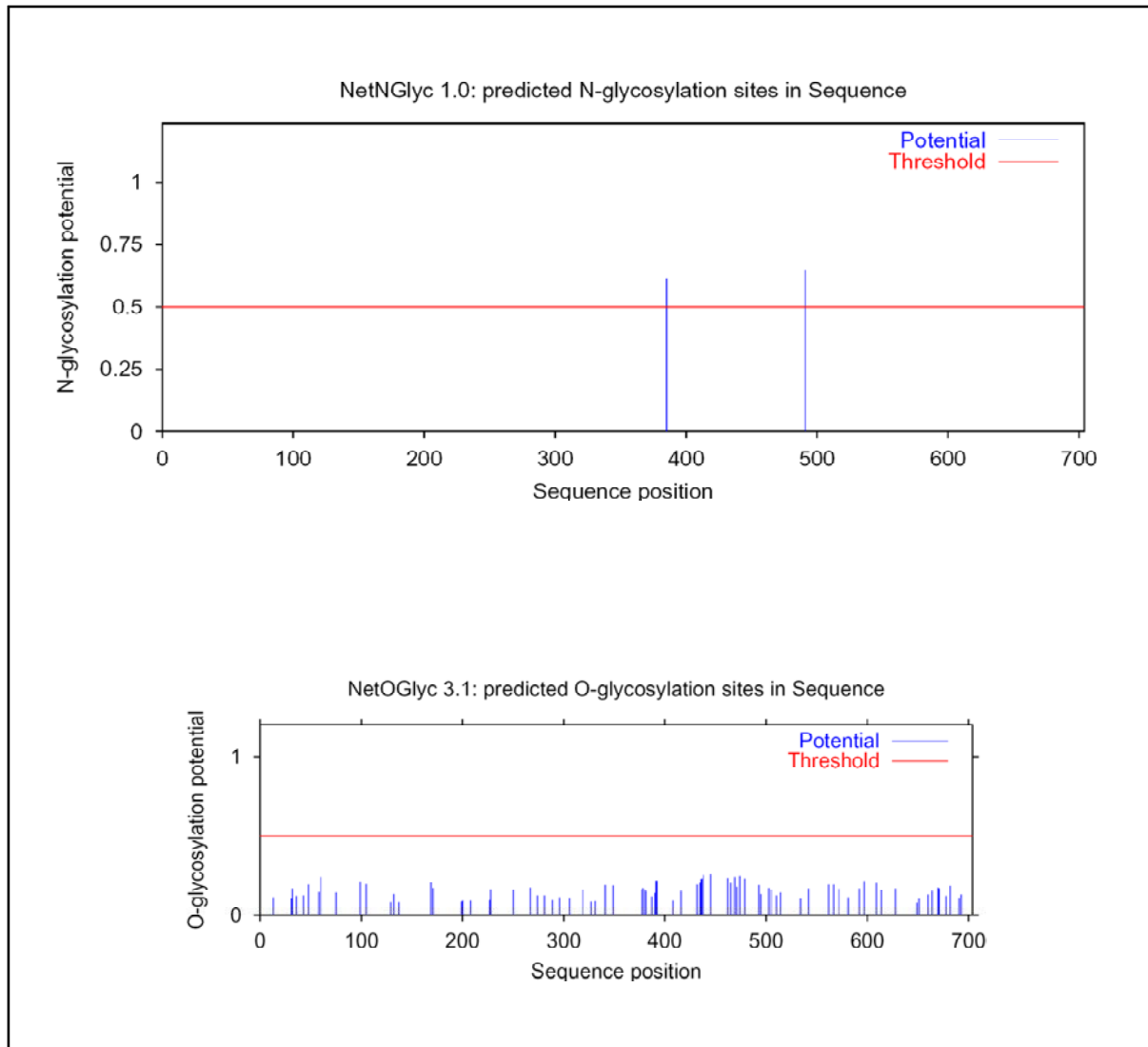


**Abb. 25: Assoziation von Laktoferrin mit unterschiedlichen „Lipid Rafts“.** Für die Präparation der DRM-Fractionen wurden die Detergenzien Triton-X 100, Lubrol und Tween 20 verwendet. (A) Die Proteine der Lysat-, der Überstand- und der Pelletfraktion wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und das Laktoferrin mittels Western Blot detektiert. L: Lysat, ÜS: Überstand, P: DRM-Pellet (B) Der Laktoferrinanteil im Überstand und im DRM-Pellet wurde quantifiziert und das jeweilige Verhältnis ermittelt.

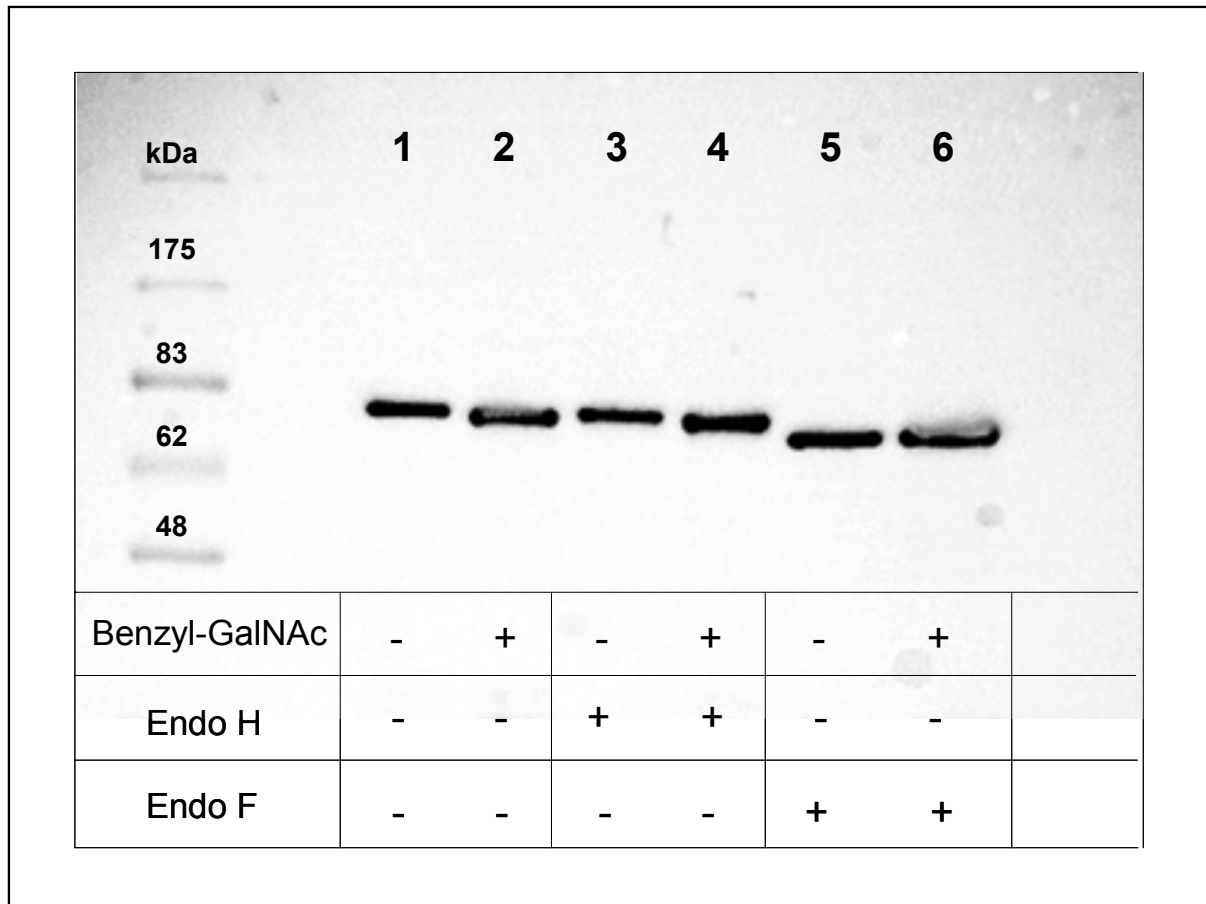
#### C 4.3.4 Bestimmung des Glykosylierungstypes von porzinem Laktoferrin

Um eine Beteiligung der Zuckerstrukturen von Laktoferrin an seiner Assoziation mit „Lipid Rafts“ näher untersuchen zu können, wurde zunächst geprüft, um welche Art der Glykosylierung es sich dabei handelt. Dafür wurde die cDNA-Sequenz in die dazugehörige Aminosäuresequenz translatiert und mit Hilfe geeigneter Software die potentiellen Glykosylierungsstellen vorhergesagt (Abb. 26). Im ersten Fall wurden durch das Programm NetNGlyc nach einem Sequenzmotiv für N-Glykosylierungen (Asn-X-Thr/Ser) gesucht. Hier gab es eine Vorhersage für die Position 385 (Sequenz: N-C-S-L) und für die Position 491 (Sequenz: N-Q-T-G). Im zweiten Fall wurden mit dem Programm NetOGlyc die potentiellen O-Glykosylierungsstellen (Thr/Ser) überprüft. Hier konnte keine potentielle Glykosylierungsstelle ermittelt werden. Diese Aussagen wurden durch ein biochemisches Experiment überprüft (Abb. 27). Dafür wurden Laktoferrin-exprimierende MDCK-Zellen mit dem O-Glykosylierungshemmer BenzylGalNAc behandelt und das sezernierte Protein aus dem Kulturmedium im Western Blot analysiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte MDCK-Zellen. In zwei weiteren Ansätzen wurden die beiden Proben zusätzlich mit der Endoglykosidase H oder der Endoglykosidase F behandelt. Der erste Ansatz zeigte bei den mit BenzylGalNAc behandelten Zellen (Spur 2) eine kleinere Bande für Laktoferrin als bei den unbehandelten Zellen (Spur 1). Wurden die Proben zusätzlich mit der Endoglykosidase H behandelt, so wies das Ergebnis keinen Unterschied zu dem vom ersten Versuch auf. Auch hier gab es bei den Proben mit dem Glykosylierungshemmer (Spur 4) eine kleinere Bande als bei der Kontrolle (Spur 3). Bei den mit der Endoglykosidase F behandelten Zellen gab es in beiden Fällen (Spur 5, Spur 6) eine Laktoferrin-Bande, die deutlich niedriger war als bei allen anderen Versuchsansätzen.





**Abb. 26: Vorhersage der Glykosylierung von porzinem Laktoferrin.** Mit Hilfe der Programme NetNGlyc und NetOGlyc wurde die Aminosäuresequenz von Laktoferrin auf potentielle Glykosylierungsstellen überprüft. Dabei wurden zwei Positionen für eine N-Glykosylierung ermittelt, jedoch keine Position für eine O-Glykosylierung.

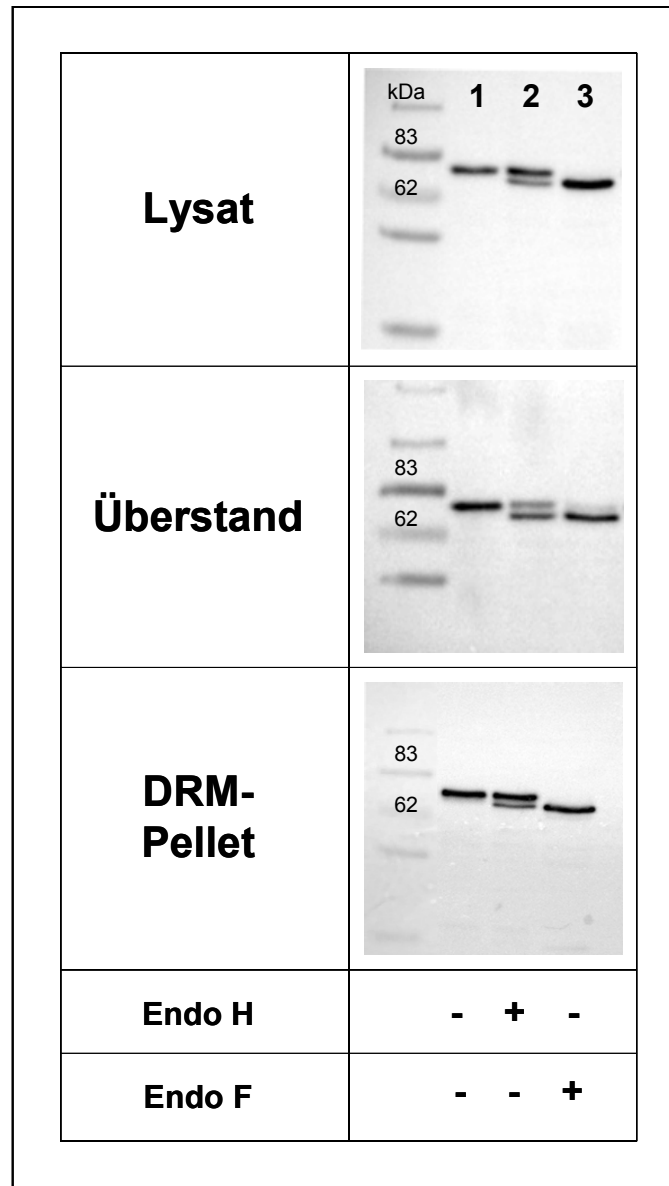


**Abb. 27: Nachweis des Glykosylierungstyps von porzinem Laktoferrin.** Die Behandlung der MDCK-Zellen mit BenzylGalNAc führte zu einem verminderten Molekulargewicht von Laktoferrin (Spur 2) und unterscheidet sich zur Kontrolle, bei der die Zellen unbehandelt blieben (Spur 1). Eine Zugabe der Endoglykosidase H zum Versuchansatz zeigte keine Wirkung (Spur 3, Spur 4). Im Gegensatz dazu führte die Zugabe der Endoglykosidase F in beiden Fällen zu einer deutlich kleineren Variante des Proteins (Spur 5, Spur 6).

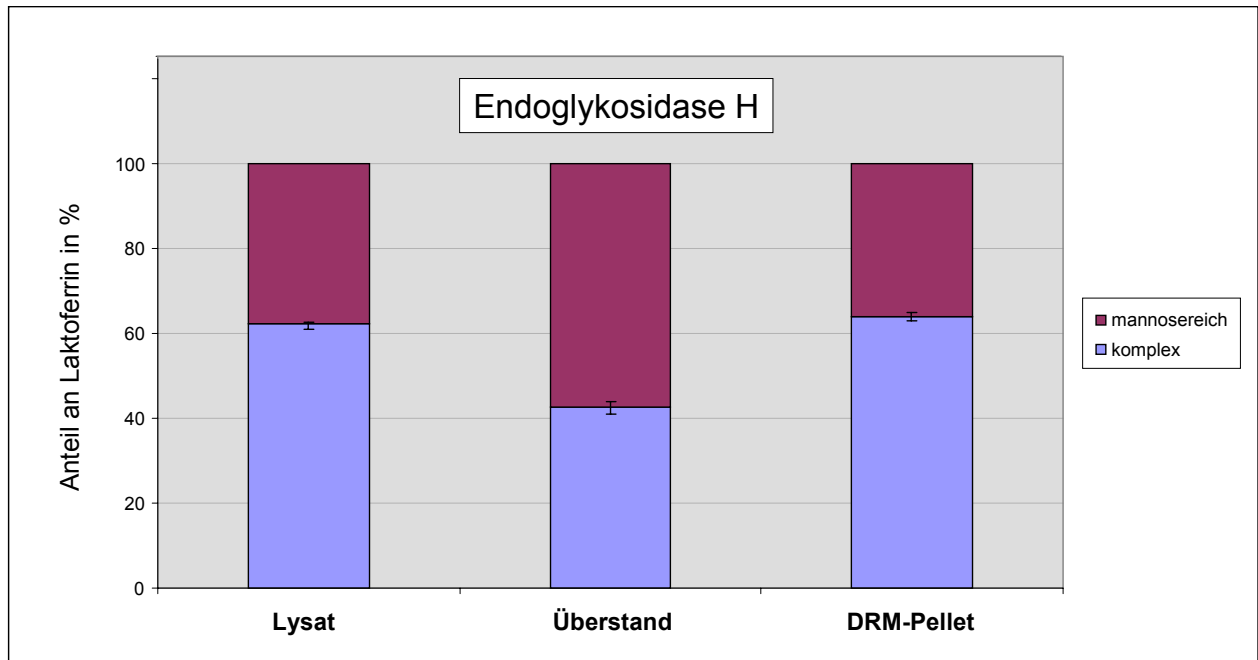
#### C 4.3.5 Bestimmung des Glykosylierungszustands von „Lipid Raft“ assoziiertem Laktoferrin

Ziel dieses Versuches war es herauszufinden, in welchen Phasen der Glykosylierung das Laktoferrin eine Assoziation mit Membranmikrodomänen eingeht. Dabei wurden die einzelnen Proteinfractionen (Zelllysate, Überstand, DRM-Pellet) mit Endoglykosidase H bzw. F behandelt und mittels Western Blot untersucht (Abb. 28, 29). Dabei war im Vergleich zur Kontrolle (Spur 1) bei allen mit Endo F behandelten Proben eine deutliche Abnahme des Molekulargewichtes zu beobachten (Spur 3). Bei den mit Endo H behandelten Proteinfractionen gab es hingegen unterschiedliche Ergebnisse. Im Zelllysate lag das Laktoferrin durchschnittlich zu 62 Prozent in seiner komplex glykosylierten Form und zu 38 Prozent in seiner mannosereichen Form vor. In der Überstandsfraction waren 43 Prozent des Proteins komplex glykosyliert und 57 Prozent mannosereich. Im Vergleich wies das im DRM-

Pellet vorkommende Laktoferrins zu 64 Prozent eine komplexe und zu 36 Prozent eine mannosereiche Glykosylierung auf.



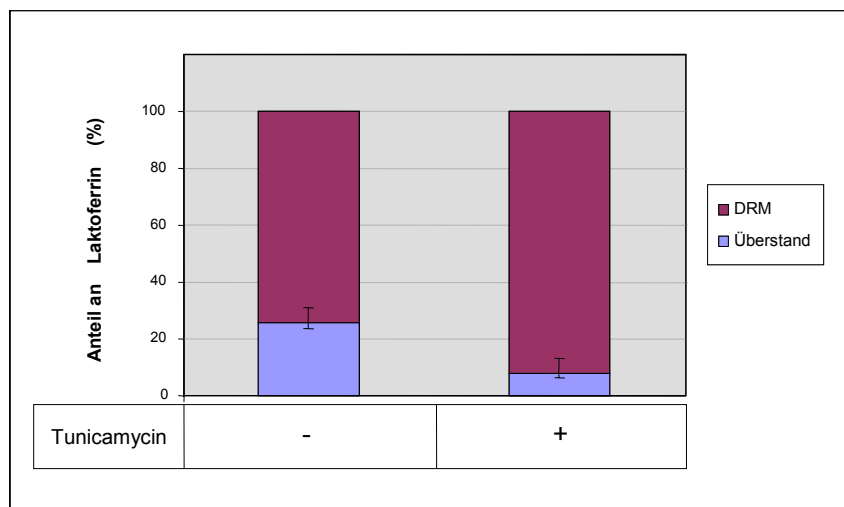
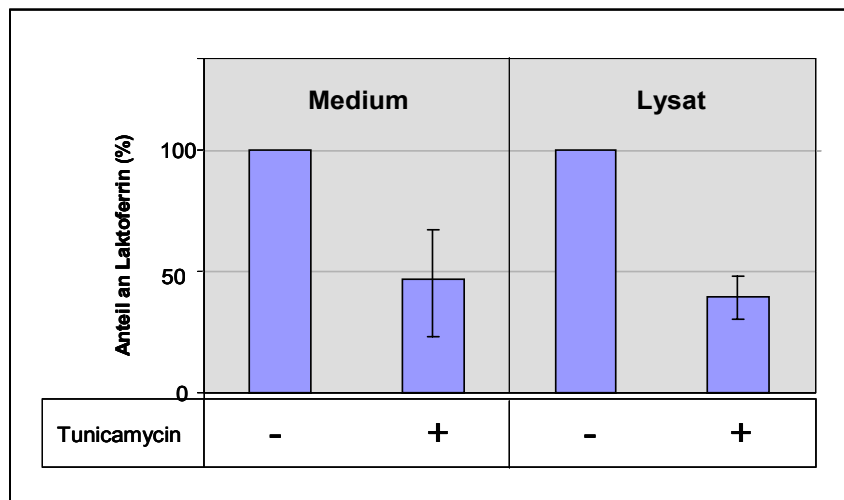
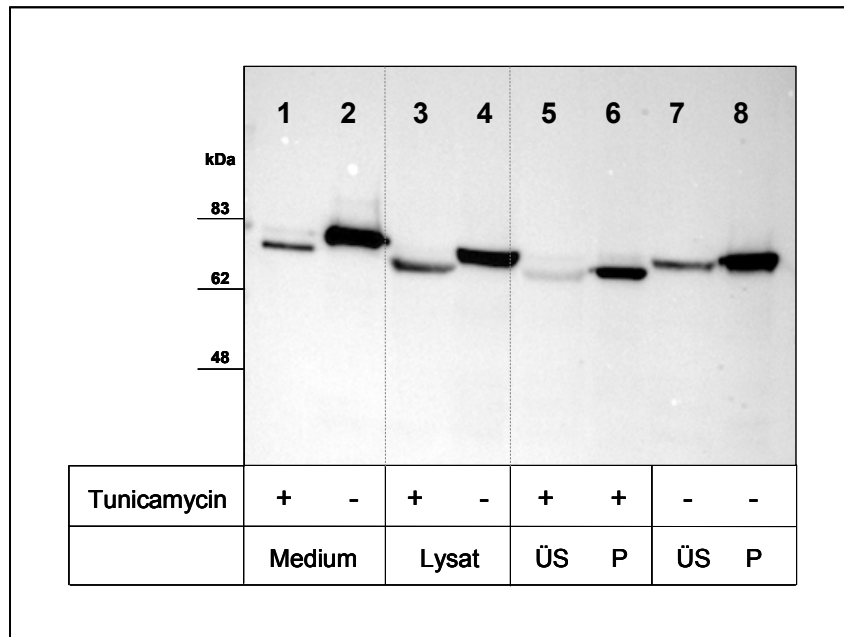
**Abb. 28: Bestimmung der Glykosylierungsform von Laktoferrin in den Proteinfractionen Lysat, Überstand und DRM-Pellet.** Die Proben wurden jeweils mit Endoglykosidase H (Endo H) oder Endoglykosidase F (Endo F) versehen und mittels Western Blot untersucht. Während die Banden in Spur 3 keine Auffälligkeiten untereinander zeigten, gab es deutliche Unterschiede bei den Banden in Spur 2. Hier war nur ein Teil des Laktoferrins für die Glykosidase zugänglich.



**Abb. 29: Unterschiede in der Zugänglichkeit von Laktoferrin gegenüber der Endoglykosidase H geben Auskunft über den Glykosylierungstyp in den jeweiligen Proteinfractionen.**

#### C 4.3.6 Analyse der „Lipid Raft“-Assoziation in Abhängigkeit von der Glykosylierung

Um die Bedeutung der Glykosylierung von Laktoferrin bei der „Lipid Raft“-Assoziation zu untersuchen, wurden die stabil transfizierten MDCK-Zellen mit dem Antibiotikum Tunicamycin behandelt (Abb. 30). Dies hat eine hemmende Wirkung auf die Verknüpfung von N-Acetylglukosamin an Dolicholphosphat und verhindert so das Anhängen N-glykosidischer Verbindungen an das Protein. Danach wurde in den Proteinfractionen aus Medium, Zelllysat, Überstand und DRM-Pellet das unglykosylierte Protein im Western Blot detektiert und mit einer unbehandelten Probe als Kontrolle verglichen. Bei der Untersuchung des Laktoferrinanteils in Medium und Lysat war eine starke Abnahme in den behandelten Zellen zu beobachten. Im Vergleich zur Kontrolle ging die Expression im Medium um durchschnittlich 53 Prozent und im Zelllysat um durchschnittlich 63 Prozent zurück. Um den Grad der Assoziation mit den „Lipid Rafts“ vergleichen zu können, wurde jeweils das Verhältnis aus Überstand und DRM-Pellet gebildet und miteinander verglichen. Hier zeigte sich eine Zunahme der Assoziation mit den „Lipid Rafts“ bei den behandelten Proben um 24 Prozent.



**Abb. 30: Bedeutung der Glykosylierung von Laktoferrin bei der Assoziation mit „Lipid Rafts“.** Unter Verwendung des Antibiotikums Tunicamycin wurde die N-Glykosylierung gehemmt und der Anteil des Proteins in den einzelnen Fraktionen mit dem von unbehandelten Kontrollproben verglichen. Dabei war nach der Behandlung der Laktoferrinanteil im DRM-Pellet deutlich erhöht

## D Diskussion

Die Identifizierung von Biomarkern zur Erkennung von atemwegsgesunden Schweinebeständen bei gleichzeitigem Ausschluss chronischer und latenter Atemwegsinfektionen ist von großer wirtschaftlicher Bedeutung in der Tierzucht. Bisher basiert ein derartiges Gesundheitsscreening auf serologischen, kulturabhängigen oder PCR-vermittelten erregerspezifischen Nachweisen, die aufgrund ihrer i. d. R. niedrigen diagnostischen Sensitivität bei sehr hoher diagnostischer Spezifität zwar gut für die Herdendiagnostik geeignet sind aber nur eingeschränkt Hinweise auf den Status einzelner Tiere liefern können. Weiterhin werden nur die Infektionen erkannt, auf die die Untersuchungen abzielen. Der Einsatz von geeigneten Biomarkern könnte die diagnostische Vorgehensweise deutlich verbessern und somit einen erheblichen Beitrag zu einer besseren Beurteilung der Tiergesundheit leisten. So wurde kürzlich in einer Studie von Hennig-Pauka et al. das antimikrobielle Peptid PR-39 als ein möglicher Biomarker identifiziert, dessen Konzentration in der BALF eine signifikante Korrelation mit latenten oder chronischen Lungeninfektionen aufwies – und zwar unabhängig vom ursächlichen Erreger (Hennig-Pauka et al. 2006, Hennig-Pauka et al. 2007). Da zudem bekannt ist, dass Glykoproteine bei Prozessen der angeborenen Immunabwehr von besonderer Bedeutung sind, wurde der Ansatz von Hennig-Pauka im ersten Teil der vorliegenden Arbeit dahingehend weitergeführt, dass spezifisch die differentielle Expression von Glykoproteinen in BALF untersucht wurde.

Die Entwicklung neuer Strategien für eine nachhaltige Verbesserung der Lungengesundheit erfordert ein umfassendes Verständnis der zellbiologischen und pathophysiologischen Hintergründe der Erkrankung; in diesem Zusammenhang belegen frühere Studien die Bedeutung von „Lipid Rafts“ in der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen, wie zum Beispiel HIV-Infektionen oder Alzheimer (Fantini et al. 2002). „Lipid Rafts“ stellen eine dynamische Anordnung von Proteinen und Lipiden in der eukaryotischen Zellmembran dar und spielen eine wichtige Rolle sowohl bei der Adhäsion von Pathogenen und Toxinen wie auch bei der Signaltransduktion und dem Proteintransport. Infektionsbedingte Modifizierungen der „Lipid Raft“-Zusammensetzung können zu einem veränderten Proteinprofil im Vergleich zum gesunden Tier führen. Eine Identifizierung dieser differentielle „Lipid Raft“ assoziierten Proteine ermöglicht somit ein tieferes Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen des Entzündungsprozesses. Daher beschäftigte sich der zweite Teil der Arbeit mit dieser Fragestellung.

Aus beiden Teilen der Arbeit könnten sich zudem Marker ergeben, die sich zu einer züchterischen Selektion auf Verbesserung der Lungengesundheit nutzen lassen.

---

## D 1 Identifizierung potentieller Krankheitsmarker in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF)

Aufgrund der unterschiedlichen Resistenz von Schweinerassen gegenüber *Actinobacillus pleuropneumoniae*-Infektionen (Hoeltig 2009), wurde die BALF von insgesamt drei verschiedenen Zuchtlinien (Deutsche Landrasse, Piétrain, Hampshire) untersucht. Die Isolation der Glykoproteine wurde dabei durch eine Affinitäts-Chromatographie mit dem Lektin Concanavalin A durchgeführt (Lee und Lee 2004). Dieses Lektin bindet spezifisch an die Glukose- und Mannosegruppen von N-glykosidisch, jedoch nicht von O-glykosidisch verknüpften Zuckerketten. Damit werden Proteine ausgeschlossen, die nur eine O-Glykosylierung aufweisen, wie die Mucin-Glykoproteine des Lungeneitheliums (Julenius et al. 2005); diese ausschließlich O-glykosylierte Proteine stellen - im Gegensatz zu Proteinen mit einer N-Glykosylierung - nur einen kleinen Teil des Glykoproteoms dar (Apweiler et al. 1999). Da an der Immunantwort hauptsächlich N-glykosylierte Proteine beteiligt sind (Turner 1992, van Eijk et al. 2002), wurden in diesem Teil der Arbeit diese Glykoproteine untersucht. Bei der Analyse der BALF wurden insgesamt siebzehn N-glykosylierte Proteine identifiziert. Dabei konnten viele zusätzlichen Proteinspots auf den Silber- oder CyDye-gefärbten Gelen detektiert werden, die jedoch aufgrund von zu geringen Proteinkonzentrationen in Verbindung mit der noch unvollständigen Annotation des Schweinegenoms durch die massenspektrometrische Analyse nicht identifiziert werden konnten.

Die Tiere, von denen die BALF-Proben für die Analyse stammten, wurden anhand des Lungenläsions-Scores ausgewählt; dieser hat sich in der Vergangenheit als zuverlässiger Parameter für die Bestimmung der Schwere von Atemwegsinfektionen bewährt (Hannan et al. 1982). Bei den Zuchtlinien Deutsche Landrasse und Piétrain konnten Schweine mit gleichartig schweren Lungenläsionen ausgewählt werden, damit war ein direkter Vergleich der Ergebnisse möglich. Im Gegensatz dazu gab es bei Tieren der Hampshire-Zuchtlinie nach Infektion keine Tiere mit einer hochgradigen Lungenerkrankung. (Hoeltig 2009). Dieses Ergebnis ist in Bezug auf den Vergleich der Glykoproteine zwischen den Zuchtlinien bei gesunden Tieren (Tag -7) von besonderer Bedeutung (Abb. 11), da Teile des BALF-Proteoms von Hampshire-Schweinen für die erhöhte Resistenz dieser Tiere verantwortlich sein könnten und somit potentielle Marker für die Zuchtselektion darstellen könnten.

Während der akuten Infektionsphase (Tag 4) wiesen die Schweine der Zuchtlinie Deutsche Landrasse im Vergleich zu gesunden Tieren (Tag -7) eine erhöhte Expression von Alpha-1-saurem Glykoprotein und Hyaluronidase auf (Abb. 9). Das Alpha-1-saure Glykoprotein ist ein hauptsächlich in Leber- und Alveolarzellen vorkommendes Akute-Phase-Protein, dessen Expression bei Entzündungen und Infektion stark hochreguliert wird (Martinez Cordero et al. 2008). Hyaluronidase hingegen bewirkt eine erleichterte Durchlässigkeit des



Lungeninterstitiums für Entzündungszellen. Dadurch kommt es ebenfalls zu einer verstärkten Infiltration des Gewebes mit Pathogenen, wodurch sich das Ausmaß der wirtsspezifischen Immunantwort erhöhen kann (Makris et al. 2004). Eine Freisetzung von antibakteriellen Enzymen (z.B. Serinproteasen) durch neutrophile Granulozyten könnte eine Erklärung für die beobachtete stark herunterregulierte Expression des Elastase-sensitiven Proteins SP-D und dem damit verbundenen Verlust seines antimikrobiellen Einflusses auf den Krankheitsverlauf darstellen (Cooley et al. 2008, Vaandrager und van Golde 2000).

Akut infizierte Schweine der Piétrain-Zuchtlinie wiesen im Vergleich zu gesunden Tieren (Tag -7) bei den Proteinen Alpha-1-saures Glykoprotein und Alpha-1-Antichymotrypsin 3 einen Expressionsabfall an Tag 4 auf (Abb. 9). Alpha-1-Antichymotrypsin 3 ist ein wichtiger Faktor bei der Hemmung von Serinproteasen, wie zum Beispiel des Cathepsin G, welches bei Entzündungen durch die Granulozyten freigesetzt wird (Janciauskiene 2001). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Cathepsin G einen Regulator für die Stimulation von Immunzellen durch neutrophile Granulozyten repräsentiert, wodurch es zu der Anregung von lokalen Entzündungsprozessen kommt (Raptis et al. 2005). Demzufolge würde ein niedriger Proteinlevel von Alpha-1-Antichymotrypsin 3 zu einer vermehrten Anwesenheit von Cathepsin G führen und somit auch zu einer verstärkten Immunantwort. Obwohl das Alpha-1-saure Glykoprotein zur Familie der Akute-Phase-Proteine gehört und eine Lebensdauer von einigen Tagen besitzt (Kaysen et al. 2001), konnte bei der Analyse eine signifikante Abnahme der Expression festgestellt werden. Das Protein besitzt mit einem Anteil von 45 Prozent am Molekulargewicht eine sehr ausgeprägte Glykosylierung, die je nach Art der Entzündung posttranslational modifiziert werden kann. Dadurch wird eine Vielfalt an funktionellen Eigenschaften ermöglicht (Fournier et al. 2000).

In der chronischen Phase der Infektion war bei Schweinen der beiden Zuchtlinien Deutsche Landrasse und Piétrain die Expression von Hyaluronidase weiterhin erhöht und signalisierte eine andauernde Rekonvaleszenz und Geweberegeneration der Lunge. Die signifikant erniedrigten Proteinspiegel von Fetuin A und Haptoglobin an Tag 20 waren ebenfalls ein Anzeichen für einen fortwährenden Entzündungsprozess. Haptoglobin spielt bei der Bindung von Häm eine entscheidende Rolle. Es konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass akute *A. pleuropneumoniae*-Infektionen zu einem Anstieg der Haptoglobin-Expression führen (Heegaard et al. 1998). Erniedrigte Konzentrationen von Haptoglobin bei chronisch kranken Tieren sind wahrscheinlich die Folge einer schweren Hämolyse, bei der viel Hämoglobin aus den Erythrozyten gebunden wird und die Leber nicht genug Haptoglobin nachliefern kann (Yang et al. 2003). Das Protein Fetuin A besitzt hemmende Eigenschaften in Bezug auf die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel IL-1 $\beta$ , TNF-alpha oder Stickstoffmonoxyd, indem es als Opsonin bei der Deaktivierung von Makrophagen fungiert (Dziegielewska et al. 1998, Wang et al. 1998). Die beobachtete Abregulation könnte also

eine Reduktion dieser hemmenden Eigenschaften und zu einer ungebremsen Aktivität von Makrophagen führen.

Bei den Schweinen aus der Hampshire-Zuchtlinie waren keine schweren Lungenveränderungen und somit auch keine Veränderung im Glykoproteinprofil an Tag 4 nachweisbar. Dagegen konnte an Tag 20 eine signifikante Regulation von Glykoproteinen beobachtet werden (Abb. 9). Ein niedriger Spiegel an SP-D und eine Überexpression von Hyaluronidase geben hier Hinweise auf eine verzögerte Infiltration von neutrophilen Granulozyten in das erkrankte Gewebe. Weiterhin auffällig waren erhöhte Expressionswerte der Proteine Fetuin A und Alpha-1-Antichymotrypsin 3, die einen negativen Einfluss auf die Aktivität von Makrophagen und die Stimulation von neutrophilen Granulozyten ausüben. Dadurch könnte die überschießende Immunantwort vermieden werden, die für die schweren klinischen Erscheinungen und die Lungenveränderungen bei Infektionen mit *A. pleuropneumoniae* verantwortlich gemacht wird (Wang et al. 1998, Janciauskiene 2001).

Im Vergleich zu den chronisch erkrankten Tieren der beiden Zuchtlinien Deutsche Landrasse und Piétrain, wiesen die klinisch gesunden Hampshire-Schweine an Tag 20 eine erhöhte Expression von Fetuin A im Vergleich zu Tag -7 auf, so dass ein niedriger Fetuin A-Spiegel als potentieller Biomarker für Lungengesundheit dienen könnte. Die bei allen Zuchtlinien vorliegende hohe Expression der Hyaluronidase an Tag 20 könnte hingegen eine potentielle Anwendung als Marker für eine überstandene Infektion dienen (Erkennung potentieller „carrier“). Diese Ergebnisse werden durch den kulturellen Nachweis gestützt, bei dem *A. pleuropneumoniae* aus dem Mandel- und Lungengewebe von Schweinen der Zuchtlinien Deutsche Landrasse und Piétrain (hohe Fetuin A und Hyaluronidas-Spiegel) erfolgreich reisoliert werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde bei den Tieren der Hampshire-Zuchtlinie (niedriger Fetuin A und hoher Hyaluronidase-Spiegel) kein *A. pleuropneumoniae* detektiert. Dies lässt vermuten, dass der *A. pleuropneumoniae* direkt nach seiner Aufnahme vom Wirt eliminiert wurde.

Deutliche Unterschiede in der Expression von Glykoproteinen wurden bei dem Vergleich der BALF zwischen den drei Rassen beobachtet (Abb. 10-15). Hier sind der vergleichsweise erhöhte Spiegel von Fetuin A und die niedrige Expression von Haptoglobin (inkl. Prekursor) und SP-D bei gesunden Tieren der Hampshire-Zuchtlinie an Tag -7 möglicherweise Indikatoren für eine erhöhte Resistenz von Schweinen gegenüber *A. pleuropneumoniae*-Infektionen (Abb. 11). So könnte die erhöhte Resistenz der Hampshire-Schweine auf das verstärkte Vorhandensein von Fetuin A und einer damit verbundenen Verminderung des von Makrophagen induzierten „oxidativen Burst“ zurückzuführen sein (Dom et al. 1992). Die vergleichsweise niedrigen Proteinspiegel von Haptoglobin (inkl. Prekursor) während des gesamten Infektionsverlaufs sowie die geringe Expression von Hyaluronidase und IHRP an Tag 4 bestätigen zusammen mit dem ermittelten Lungenläsions-Score von Null die

Abwesenheit von Entzündungsprozessen bei den untersuchten Hampshire-Tieren. Weiterhin wird die Anwendbarkeit von Fetuin A (niedrig) und Hyaluronidase (hoch) als Biomarker für Lungeninfektionen durch den Zuchtlinienvergleich unterstützt, da bei den Tieren mit deutlichen Krankheitssymptomen (Deutsche Landrasse, Piétrain) an Tag 20 für diese Proteine keine Expressionsunterschiede zu beobachten waren (Abb. 15).

Bei Betrachtung der ermittelten Ergebnisse lässt sich zusammenfassend sagen, dass die expressionsanalytische Untersuchung von Glykoproteinen aus porziner BALF eine geeignete Methode zur Identifizierung neuer Biomarkern für Lungenerkrankungen darstellt.

## D 2 Zellbiologische Untersuchung von „Lipid Raft“ assoziierten Proteinen

### D 2.1 Die Bedeutung von S100 A9 bei akuten Entzündungsprozessen

Das Protein S100 A9 gehört zur Familie der Kalzium bindenden EF-Hand-Proteine, welches vorwiegend in Granulozyten und Monozyten exprimiert wird (Heizmann et al. 2002). Charakteristisch für diese Proteine sind zwei Helix-Loop-Helix-Motive, die als funktionelle Domänen die Aufnahme von Kalzium ermöglichen und dadurch eine Konformationsänderung im Proteinmolekül bewirken (Donato 2001). Kalzium spielt in der Zelle eine wichtige Rolle als universeller Botenstoff und ist nach seiner Freisetzung als „second messenger“ an der Regulation von Signaltransduktionskaskaden beteiligt (Berridge et al. 2000). Die durch Kalzium ausgelöste strukturelle Veränderung des S100-Proteins führt zu einer Exposition von hydrophoben Domänen an der Oberfläche, wodurch sich seine Affinität für spezielle Bindungspartner erhöht (Baudier und Gerard 1983). Das im Durchschnitt 10 - 12 kDa große Protein liegt dabei in der Zelle als nicht-kovalent gebundenes Homodimer oder als Heterodimer mit anderen S100-Proteinen vor. Diese aktivierten Proteinkomplexe sind von besonderer Bedeutung bei der Regulation von Enzymaktivitäten und Transkriptionsfaktoren sowie bei Prozessen des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung (Donato 2001). Neben intrazellulären Signalfunktionen weisen einige Vertreter der S100-Gruppe ebenfalls extrazelluläre Funktionen auf, die vor allem bei der Entstehung von Entzündungen eine wichtige Rolle spielen (Donato 2003). Das S100 Protein A9 bildet mit S100 A8 und S100 A12 die Untergruppe der Calgranuline, die als extrazelluläre Mediatoren an der Aktivierung von pro-inflammatorischen Immunzellen und der Adhäsion von Phagozyten an das Endothelium beteiligt sind (Roth et al. 2003). Dabei besitzt S100 A9 eine hohe Affinität gegenüber Heparansulfat (Robinson et al. 2002) und Proteoglykanen (Srikrishna et al. 2001) endothelialer Zellen und fungiert als Regulator bei der Mac-1 (CD11b/CD18) vermittelten Adhäsion von Leukozyten (Newton und Hogg 1998). In der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Form kann S100

A9 stabile Heterodimere mit dem Protein S100 A8 formen, die in Verbindung mit spezifischen Stimulationsfaktoren von der Zelle sezerniert werden (Kerkhoff et al. 1999a). Diese können einen entscheidenden Einfluss auf die Adhäsion und die Transmigration von Leukozyten haben (Roth et al. 2003). Frühere humanmedizinische Studien belegen eine erhöhte Konzentration beider Proteine im Blutserum bei einer Vielzahl an Erkrankungen (Donato 2001). Dabei wurde dies zuerst bei Patienten mit Zystischer Fibrose entdeckt, wodurch diese Proteine auch unter dem Namen „cystic fibrosis antigen“ bekannt wurden (Bruggen et al. 1988). Zudem wird ein direkter Zusammenhang zwischen den erhöhten S100 A9-Konzentrationen in BALF und Patienten mit chronischen Lungenentzündungen vermutet (Bargagli et al. 2008). Bei der Untersuchung weiterer Krankheiten wie Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und HIV konnte ebenfalls eine positive Korrelation zwischen dem Serumspiegel der Proteine und dem Krankheitsstadium nachgewiesen werden (Lugering et al. 1995a, Lugering et al. 1995c, Lugering et al. 1995b). Die Assoziation des S100 A8/A9-Komplexes mit der zellulären Membran erfolgt hauptsächlich über mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wohingegen die Affinität gegenüber gesättigten Fettsäuren (Palmitinsäure, Stearinsäure), einfach ungesättigten Fettsäuren (Ölsäure) und einigen Eikanosiden aus der Arachidonsäure (Prostaglandin-E<sub>2</sub>, Thromboxan-B<sub>2</sub>, Leukotrien-B<sub>4</sub>) eher schwach sind (Kerkhoff et al. 1999b). Die einzelnen nicht dimerisierten Proteine gehen keine Bindungen mit Fettsäuren ein. Es konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden, dass der Komplex nach der Ca<sup>2+</sup>-Aktivierung von neutrophilen Granulozyten in einer cholesterol- und sphingolipid-unabhängigen Weise mit „Lipid Rafts“ assoziiert (Nacken et al. 2004). Andere Untersuchungen belegen zudem eine aktive Beeinflussung des Arachidonsäure-Stoffwechsels. Dabei wird die Arachidonsäure an den Komplex gebunden und so für entzündungsrelevante enzymatische Vorgänge bereitgestellt (Klempt et al. 1997, Kerkhoff et al. 2001). Es wird vermutet, dass der Proteinkomplex eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der NADPH-Oxidase spielt, indem er als „Shuttle“ für den Kofaktor Arachidonsäure dient (Kerkhoff et al. 2005). Die NADPH-Oxidase ist ein „Lipid Raft“-assoziiertes Multienzymkomplex in Phagozyten, der sich nach Aktivierung an der Zellmembran zusammensetzt und durch die Bildung von freien Sauerstoffradikalen an dem Verdau aufgenommenen Pathogene beteiligt ist (Shao et al. 2003). Durch die dadurch verstärkte Freisetzung von Superoxid und anderen Sauerstoffmetaboliten wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> („oxidativer burst“) kommt es neben der antimikrobiellen Wirkung jedoch zusätzlich zu einer massiven Schädigung des umliegenden Gewebes (Smith 1994). Der Einfluss von S100 A9 auf die NADPH-Oxidase konnte anhand von „Knockout“-Experimenten belegt werden, bei denen eine signifikante Abnahme der NADPH-Oxidase-Aktivität in Mäusen mit fehlendem S100 A9 im Vergleich zum Wildtyp beobachtet wurde (Kerkhoff et al. 2005). Das Enzym ist daher ein wichtiger Faktor bei der angeborenen Immunabwehr.

In dieser Studie konnte zwar das zum Rind homologe Protein S100 A9, jedoch nicht sein Bindungspartner S100 A8 in den „Lipid Rafts“ identifiziert werden (Abb. 16, Tabelle 13). Dies mag zum einen daran liegen, dass das Schweinegenom bisher noch nicht vollständig sequenziert ist und dadurch die Anzahl annotierter Proteine in den Datenbanken sehr begrenzt ist. Zudem besitzt das S100 A8 Protein beim Menschen und beim Rind ein Molekulargewicht von nur ungefähr 10 kDa, wodurch es ebenfalls möglich ist, dass das Protein nicht mehr innerhalb des Auflösungsbereichs des verwendeten 12,5%igen Polyacrylamidgels lag. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass bei einem identischen Molekulargewicht und isoelektrischen Punkt beide am Komplex beteiligten Proteine zu derselben Stelle im Gel gewandert sind und bei der massenspektrometrischen Analyse – bedingt durch die fehlenden Annotationen - nur eines identifiziert werden konnte. Aufgrund seiner bedeutenden Beteiligung an der Entstehung des Entzündungsprozesses und seiner starken Assoziation mit „Lipid Rafts“ während der akuten Krankheitsphase könnte das S100 A9-Protein eine potentielle Rolle als molekularer Marker für entzündetes Gewebe einnehmen.

#### D 2.2 Die Bedeutung von Laktoferrin und seiner Assoziation mit „Lipid Rafts“ bei akuten Entzündungsprozessen

Laktoferrin ist ein 72 – 85 kDa großes Glykoprotein aus der Transferrin-Familie, das Eisen in Form von  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen reversibel binden und transportieren kann (Metz-Boutigue et al. 1984). Das Protein wurde im Jahre 1939 erstmals in der Milch von Kühen entdeckt (Sorensen 1939). Die höchste Konzentration von Laktoferrin ist im Kolostrum von Säugetieren zu finden, jedoch kommt es ebenfalls in geringerer Konzentration in allen Sekreten (z.B. Tränen, Speichel, Sekrete der Bauchspeicheldrüse) und im Blutplasma vor. Laktoferrin wird hauptsächlich von exokrinen Drüsen und neutrophilen Granulozyten aber auch von bestimmten Epithelzellen gebildet (Ward et al. 1999). Aufgrund seiner erhöhten Konzentration bei Infektionen und Entzündungsprozessen wird es in manchen Studien auch als Akute-Phase-Protein bezeichnet (Kanyshkova et al. 2001). Das Protein besteht strukturell aus einer einzigen Polypeptidkette mit zwei homologen Bereichen, die jeweils ein Eisenion binden können. Laktoferrin besitzt eine große Ähnlichkeit zu Transferrin weist, jedoch eine höhere Affinität für Eisen auf und entlässt dieses erst bei einem deutlich niedrigeren pH-Wert (Baker und Baker 2005). Der im Vergleich hohe isoelektrische Punkt von 8 – 9 wird durch eine sehr basische aminoterminalen Region vermittelt, die beim Transferrin nicht vorhanden ist. Weiterhin besitzt Laktoferrin eine Vielzahl von antimikrobiellen und entzündungshemmenden Eigenschaften. Dies konnte anhand von in-vitro-Experimenten gezeigt werden, bei denen Laktoferrin durch das Wegfangen von Eisen

zu einem verminderten Wachstum von Bakterien führte (Weinberg 2004). Des Weiteren ist die aminoternale Region von Laktoferrin in der Lage, durch ihre Bindung an bestimmte Rezeptoren auf der Oberfläche von gram-negativen Bakterien, die Struktur der Zellwand zu beeinflussen. Dadurch kommt es zu einer Veränderung der Permeabilität der äußeren Membran, wodurch die Bakterien empfänglicher für antimikrobielle Enzyme wie z. B. Lysozym werden (Ellison und Giehl 1991, Leitch und Willcox 1998, Nuijens et al. 1996). Dabei konnte gezeigt werden, dass diese auch als Laktoferricin beschriebene Domäne nach ihrer Abspaltung eine weitaus stärkere Wirkung besitzt als das native Protein (Yamauchi et al. 1993, Farnaud et al. 2004). Darüber hinaus werden dem Laktoferrin eine Reihe von entzündungshemmenden Eigenschaften zugeschrieben. Durch seine hohe Affinität für Komponenten der äußeren Membran kann es an Rezeptoren und Endotoxine binden und so die Pathogen-Wirt-Interaktion beeinflussen (Legrand et al. 2005). Dies führt zu einer verminderten Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen (z. B. TNF-alpha, Interleukine) und somit zu einer Abschwächung der Immunantwort (Haversen et al. 2002). Zudem bindet Laktoferrin das am Entzündungsherd befindliche „freie“ Eisen und trägt dadurch zu einer verminderten Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen in Leukozyten bei (Ward et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde in verändertem Lungengewebe von akut durch *A. pleuropneumoniae* erkrankten Schweinen eine starke Assoziation von Laktoferrin mit „Lipid Rafts“ nachgewiesen (Abb. 16). Dabei konnte durch die immunhistologische Untersuchung gezeigt werden, dass das Protein in neutrophilen Granulozyten, jedoch nicht in den Zellen des Lungenepithels exprimiert wurde (Abb. 18). Über den Laktoferrin-Promotor ist bekannt, dass er konstitutive und induzierbare Elemente für die Transkription besitzt (Teng 2002). In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie wurde beschrieben, dass sich die Expression von Laktoferrin in Epithelzellen durch extrazelluläre Stimuli wie z. B. bakterielles LPS induzieren lässt (Li et al. 2009). Aufgrund der infektionsbedingten Anreicherung von neutrophilen Granulozyten kommt es jedoch zu einer verstärkten Freisetzung von zytotoxischen Substanzen (Proteasen, reaktive Sauerstoffmetaboliten) und dadurch zu einer Schädigung des umliegenden Gewebes (Van Wetering et al. 1997). In einer früheren Studie wurde bereits auf die Assoziation von Laktoferrin mit „Lipid Rafts“ hingewiesen (Feuk-Lagerstedt et al. 2007), jedoch sind die Hintergründe dieser Bindung und die Bedeutung in Bezug auf den Entzündungsprozess noch unbekannt.

Aufgrund der bisher nicht bekannten Ursachen für die Interaktion von Laktoferrin mit „Lipid Rafts“ wurde diese genauer untersucht. Dafür wurde die cDNA von Laktoferrin aus Gewebe vom Schwein isoliert und das Protein in MDCK-Zellen exprimiert. Für eine Beurteilung des intrazellulären Transports wurde das Protein radioaktiv markiert (Abb. 24). Innerhalb von sechs Stunden nach der Markierung war eine sehr deutliche Anreicherung des reifen,

komplex glykosylierten Proteins im Zellkulturmedium zu beobachten, wohingegen die Konzentration im Zellysate immer mehr abnahm. Die ebenfalls kontinuierliche Abnahme von Laktoferrin in der „Lipid Raft“-Fraktion weist darauf hin, dass es sich hierbei um eine reversible Bindung handelt, die sich aktiv am Transport des Proteins zur Zelloberfläche zu beteiligen scheint. Ein derartiger „Lipid Raft“-vermittelter Transport zur Zellmembran konnte bereits für einige Membranproteine (Lin et al. 1998, Jacob und Naim 2001) und GPI-verankerte Proteine gezeigt werden (Harder und Simons 1997). Durch die Verwendung verschiedener Detergenzien bei der Extraktion der Lipid-Membranen wurde daraufhin untersucht, zu welchem Zeitpunkt der Proteinsynthese in der Zelle diese Assoziation stattfindet (Abb. 25). Während die mit Triton X-100 solubilisierten „Lipid Rafts“ durch ihren hohen Gehalt an Cholesterol und Sphingolipiden die Lipidzusammensetzung im Golgi-Apparat wiedergeben, sind die in Tween 20 unlöslichen Membranen reich an Phosphatidylglycerol und Phosphatidylinositol und repräsentieren die Situation im Endoplasmatischen Retikulum (Schuck et al. 2003, Alfalah et al. 2005). Durch Lubrol isolierte „Lipid Rafts“ weisen hingegen einen höheren Gesamtanteil an Sphingomyelin und Phosphatidylcholin im Vergleich zu „Triton-Rafts“ auf (Drobnik et al. 2002). Bei dem Vergleich der Laktoferrin-Assoziation mit „Lipid Rafts“ aus Triton X-100- und Lubrol-Präparationen wurden keine wesentlichen Unterschiede beobachtet. Der Versuchsansatz mit Tween 20 zeigte hingegen eine leichte Abnahme der Laktoferrin-Konzentration im DRM-Pellet. Daraus lässt sich ableiten, dass die Assoziation von Laktoferrin mit „Lipid Rafts“ vermutlich erst im Golgi-Apparat erfolgt. Die Behandlung der durch Triton X-100 präparierten DRM-Fraktion mit Endoglykosidase H ergab, dass neben dem komplex glykosylierten Laktoferrin auch die mannosereiche Form mit „Lipid Rafts“ assoziiert (Abb. 28, 29). Da während der Proteinreifung im Golgi-Apparat die Mannosegruppen größtenteils entfernt werden und das Protein durch komplexe Glykosylierungen für Endo H nicht mehr zugänglich ist, wird die Interaktion mit der Membran vermutlich im Bereich des cis-Golgi stattfinden. Früheren Studien beschreiben eine Lektin-vermittelte Aufnahme von Glykoproteinen in „Lipid Rafts“ und ihren Transport zur Zellmembran (Fullekrug und Simons 2004, Delacour et al. 2006). Daraufhin wurde untersucht, inwiefern die Glykosylierung von Laktoferrin bei seinem Transport von Bedeutung ist (Abb. 26, 27). Zunächst wurde der Glykosylierungstyp bestimmt. Die sequenzbasierte Vorhersage für ein bis zwei N-Glykosylierungsstellen, jedoch keine O-Glykosylierungsstellen, wurde zusätzlich biochemisch überprüft und bestätigt. Die etwas tiefer liegende Bande bei den ersten beiden Versuchsansätzen ist auf den Einbau von Benzyl-GalNAc in die Kette der N-Glykane zurückzuführen, durch den eine Anknüpfung von Sialinsäure verhindert wurde. Dadurch ist in dem mit Endo F behandelten Ansatz auch kein Unterschied zu sehen, da hier die N-glykosidischen Zuckerketten komplett vom Protein abgetrennt wurden und keine O-Glykosylierung vorhanden war. Eine Hemmung der N-

Glykosylierung mit Hilfe von Tunicamycin führte zu keiner Beeinflussung der Proteinsekretion in das Zellkulturmedium (Abb. 30). Die im Vergleich zu den unbehandelten Zellen starke Abnahme der Laktoferrinkonzentration im Medium und im Zellysat beruht vermutlich auf einer generellen Beeinflussung der Proteinsynthese durch Tunicamycin. Es war jedoch eine um 24 Prozent gesteigerte Assoziation des Proteins mit „Lipid Rafts“ zu beobachten, wodurch die Annahme einer Lektin-vermittelten Interaktion ausgeschlossen werden konnte. Es wäre möglich, dass das Laktoferrin mit seinem sehr basischen aminoterminalen Bereich eine Bindung mit diesen Membranen eingehen kann und sich durch eine Änderung des Ionenmilieus an der Zelloberfläche wieder ablöst. Dabei könnte das Fehlen der Glykosylierung zu einer räumlich begünstigten Interaktion führen. Eine andere Möglichkeit wäre die Bindung von Laktoferrin an bestimmte Rezeptoren. Es gibt eine Reihe von Studien, die die Anwesenheit von Laktoferrin-Rezeptoren in Zellmembranen von eukaryotischen Zellen beschreiben (Suzuki und Lonnerdal 2002). Dabei konnte auch bei respiratorischen Epithelzellen die Anwesenheit dieser Rezeptoren demonstriert werden (Ghio et al. 1999, Elfinger et al. 2007). Vor einiger Zeit wurde in der Bürstensaummembran von Enterozyten ein Laktoferrin-Rezeptor charakterisiert, der über einen GPI-Anker mit Lipid Raft-Strukturen verbunden ist (Wrackmeyer et al. 2006). Daher ist auch ein Rezeptor-vermittelter Transport von Laktoferrin in „Lipid Rafts“ von Lungenzellen durchaus denkbar.



---

## E Referenzen

Abramoff MD, Magelhaes, P.J., Ram, S.J. . 2004. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11 (7):36-42.

Alfalah M, Jacob R, Preuss U, Zimmer KP, Naim H, Naim HY. 1999. O-linked glycans mediate apical sorting of human intestinal sucrase-isomaltase through association with lipid rafts. *Curr Biol*, 9 (11):593-596.

Alfalah M, Wetzel G, Fischer I, Busche R, Sterchi EE, Zimmer KP, Sallmann HP, Naim HY. 2005. A novel type of detergent-resistant membranes may contribute to an early protein sorting event in epithelial cells. *J Biol Chem*, 280 (52):42636-42643.

Aloia RC, Tian H, Jensen FC. 1993. Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (11):5181-5185.

Anderson C, Potter AA, Gerlach GF. 1991. Isolation and molecular characterization of spontaneously occurring cytolysin-negative mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7. *Infect Immun*, 59 (11):4110-4116.

Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. 1999. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*, 1473 (1):4-8.

Baker EN, Baker HM. 2005. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cell Mol Life Sci*, 62 (22):2531-2539.

Bals R, Hiemstra PS. 2004. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J*, 23 (2):327-333.

Baltes N, Hennig-Pauka I, Gerlach GF. 2002. Both transferrin binding proteins are virulence factors in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 infection. *FEMS Microbiol Lett*, 209 (2):283-287.

Baltes N, Tonpitak W, Gerlach G-F, Hennig-Pauka I, Hoffmann-Moujahid A, Ganter M, Rothkotter H-J. 2001. *Actinobacillus pleuropneumoniae* Iron Transport and Urease Activity: Effects on Bacterial Virulence and Host Immune Response. *Infect Immun*, 69 (1):472-478.

Baorto DM, Gao Z, Malaviya R, Dustin ML, van der Merwe A, Lublin DM, Abraham SN. 1997. Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid traffic. *Nature*, 389 (6651):636-639.

- Bargagli E, Olivieri C, Prasse A, Bianchi N, Magi B, Cianti R, Bini L, Rottoli P. 2008. Calgranulin B (S100A9) levels in bronchoalveolar lavage fluid of patients with interstitial lung diseases. *Inflammation*, 31 (5):351-354.
- Bartlett JA, Fischer AJ, McCray PB, Jr. 2008. Innate immune functions of the airway epithelium. *Contrib Microbiol*, 15:147-163.
- Baudier J, Gerard D. 1983. Ions binding to S100 proteins: structural changes induced by calcium and zinc on S100a and S100b proteins. *Biochemistry*, 22 (14):3360-3369.
- Bell DY, Haseman JA, Spock A, McLennan G, Hook GE. 1981. Plasma proteins of the bronchoalveolar surface of the lungs of smokers and nonsmokers. *Am Rev Respir Dis*, 124 (1):72-79.
- Berlutti F, Superti F, Nicoletti M, Morea C, Frioni A, Ammendolia MG, Battistoni A, Valenti P. 2008. Bovine lactoferrin inhibits the efficiency of invasion of respiratory A549 cells of different iron-regulated morphological forms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 21 (1):51-59.
- Bernhard W, Bertling A, Dombrowsky H, Vieten G, Rau G, von der Hardt H, Freihorst J. 2001. Metabolism of surfactant phosphatidylcholine molecular species in *cftr(tm1HGU/tm1HGU)* mice compared to MF-1 mice. *Exp Lung Res*, 27 (4):349-366.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1 (1):11-21.
- Beskow CO, Drachenberg CB, Bourquin PM, Britt EJ, Simsir A, Gunev I, Papadimitriou JC. 2000. Diffuse alveolar damage. Morphologic features in bronchoalveolar lavage fluid. *Acta Cytol*, 44 (4):640-646.
- Bickhardt K. 1998. Belastungsmyopathie und Osteochondrose beim Schwein - Folge von Züchtung auf Maximalleistung. *Tierärztl Umsch*, 53:129-134.
- Blanco I, Canals A, Evans G, Mellencamp MA, Cia C, Deeb N, Wang L, Galina-Pantoja L. 2008. Differences in susceptibility to *Haemophilus parasuis* infection in pigs. *Can J Vet Res*, 72 (3):228-235.
- Bochev I. 2008. Porcine respiratory disease complex (PRDC): A review. II. Diagnostics, treatment and prevention. *Bulg J Vet Med*, 11 (4):219-234.

- Bridges JP, Davis HW, Damodarasamy M, Kuroki Y, Howles G, Hui DY, McCormack FX. 2000. Pulmonary surfactant proteins A and D are potent endogenous inhibitors of lipid peroxidation and oxidative cellular injury. *J Biol Chem*, 275 (49):38848-38855.
- Brogden KA, Guthmiller JM. 2002. Polymicrobial diseases. Washington, D.C.: ASM Press.
- Brown DA, London E. 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem*, 275 (23):17221-17224.
- Bruggen J, Tarcsay L, Cerletti N, Odink K, Rutishauser M, Hollander G, Sorg C. 1988. The molecular nature of the cystic fibrosis antigen. *Nature*, 331 (6157):570.
- BVE: Bundesvereinigung der Deutschen Ernährungsindustrie. 2007. <http://www.bve-online.de>.
- Calmels T, Parriche M, Durand H, Tiraby G. 1991. High efficiency transformation of *Tolypocladium geodes* conidiospores to phleomycin resistance. *Curr Genet*, 20 (4):309-314.
- Chatterjee S, Mayor S. 2001. The GPI-anchor and protein sorting. *Cell Mol Life Sci*, 58 (14):1969-1987.
- Cooley J, McDonald B, Accurso FJ, Crouch EC, Remold-O'Donnell E. 2008. Patterns of neutrophil serine protease-dependent cleavage of surfactant protein D in inflammatory lung disease. *J Leukoc Biol*, 83 (4):946-955.
- Cromwell GL. 2002. Why and how antibiotics are used in swine production. *Anim Biotechnol*, 13 (1):7-27.
- Culpitt SV, Maziak W, Loukidis S, Nightingale JA, Matthews JL, Barnes PJ. 1999. Effect of high dose inhaled steroid on cells, cytokines, and proteases in induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 160 (5 Pt 1):1635-1639.
- Davoli R, Braglia S. 2007. Molecular approaches in pig breeding to improve meat quality. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 6 (4):313-321.
- De Jong MF. 1992. Progressive atrophic rhinitis. in: Leman, A.D. and Straw, B.: *Diseases of Swine*. Ames, Iowa, USA: Iowa State University press. 414-435.
- De Man P, Jodal U, Van Kooten C, Svanborg C. 1990. Bacterial adherence as a virulence factor in urinary tract infection. *APMIS*, 98 (12):1053-1060.

- Delacour D, Cramm-Behrens CI, Drobecq H, Le Bivic A, Naim HY, Jacob R. 2006. Requirement for galectin-3 in apical protein sorting. *Curr Biol*, 16 (4):408-414.
- Dom P, Haesebrouck F, Kamp EM, Smits MA. 1992. Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 and its cytolysins on porcine neutrophil chemiluminescence. *Infect Immun*, 60 (10):4328-4334.
- Donato R. 2001. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*, 33 (7):637-668.
- Donato R. 2003. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech*, 60 (6):540-551.
- Done S, White M. 2003. Porcine respiratory disease and complexes: the story to date. *In Pract*, 25 (7):410-417.
- Dreyfus A, Schaller A, Nivollet S, Segers RP, Kobisch M, Mieli L, Soerensen V, Hussy D, Miserez R, Zimmermann W, Inderbitzin F, Frey J. 2004. Use of recombinant ApxIV in serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections, development and prevalidation of the ApxIV ELISA. *Vet Microbiol*, 99 (3-4):227-238.
- Drobnik W, Borsukova H, Bottcher A, Pfeiffer A, Liebisch G, Schutz GJ, Schindler H, Schmitz G. 2002. Apo AI/ABCA1-dependent and HDL3-mediated lipid efflux from compositionally distinct cholesterol-based microdomains. *Traffic*, 3 (4):268-278.
- Drocourt D, Calmels T, Reynes JP, Baron M, Tiraby G. 1990. Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus* ble gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. *Nucleic Acids Res*, 18 (13):4009.
- Dziegielewska KM, Andersen NA, Saunders NR. 1998. Modification of macrophage response to lipopolysaccharide by fetuin. *Immunol Lett*, 60 (1):31-35.
- Eehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K. 2003. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol*, 160 (1):113-123.
- Elbein AD. 1984. Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharides. *CRC Crit Rev Biochem*, 16 (1):21-49.
- Elfinger M, Maucksch C, Rudolph C. 2007. Characterization of lactoferrin as a targeting ligand for nonviral gene delivery to airway epithelial cells. *Biomaterials*, 28 (23):3448-3455.

Ellison RT, 3rd, Giehl TJ. 1991. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J Clin Invest*, 88 (4):1080-1091.

Esen M, Grassme H, Riethmuller J, Riehle A, Fassbender K, Gulbins E. 2001. Invasion of human epithelial cells by *Pseudomonas aeruginosa* involves src-like tyrosine kinases p60Src and p59Fyn. *Infect Immun*, 69 (1):281-287.

Fantini J, Garmy N, Mahfoud R, Yahi N. 2002. Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases. *Expert Rev Mol Med*, 4 (27):1-22.

Farnaud S, Spiller C, Moriarty LC, Patel A, Gant V, Odell EW, Evans RW. 2004. Interactions of lactoferricin-derived peptides with LPS and antimicrobial activity. *FEMS Microbiol Lett*, 233 (2):193-199.

Fenwick B, Henry S. 1994. Porcine pleuropneumonia. *J Am Vet Med Assoc*, 204 (9):1334-1340.

Feuk-Lagerstedt E, Movitz C, Pellme S, Dahlgren C, Karlsson A. 2007. Lipid raft proteome of the human neutrophil azurophil granule. *Proteomics*, 7 (2):194-205.

Finegold L. 1993. Cholesterol in membrane models. Boca Raton, Fla.: CRC Press.

Fournier T, Medjoubi NN, Porquet D. 2000. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta*, 1482 (1-2):157-171.

Frey J. 1995. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol*, 3 (7):257-261.

Frey J, Bosse JT, Chang YF, Cullen JM, Fenwick B, Gerlach GF, Gygi D, Haesebrouck F, Inzana TJ, Jansen R, et al. 1993. *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolytins, pleurotoxin and their genes. *J Gen Microbiol*, 139 (8):1723-1728.

Fullekrug J, Simons K. 2004. Lipid rafts and apical membrane traffic. *Ann N Y Acad Sci*, 1014:164-169.

Gabay C, Kushner I. 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*, 340 (6):448-454.

Gadek JE, Fells GA, Zimmerman RL, Rennard SI, Crystal RG. 1981. Antielastases of the human alveolar structures. Implications for the protease-antiprotease theory of emphysema. *J Clin Invest*, 68 (4):889-898.

- Ganter M, Dudziak D, Delbeck F. 1995. [Treatment of swine with chronic pneumonia with chlortetracycline-medicated feed]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 102 (1):44-49.
- Ganter M, Kipper S, Schottger-Wegener H, Beckmann G, Bunka S. 1993. [Pneumonia diagnosis in living swine using lung lavage]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 106 (10):330-333.
- Garau J, Gomez L. 2003. *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Curr Opin Infect Dis*, 16 (2):135-143.
- Gatignol A, Baron M, Tiraby G. 1987. Phleomycin resistance encoded by the *ble* gene from transposon Tn 5 as a dominant selectable marker in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, 207 (2-3):342-348.
- Gehr P, Green FH, Geiser M, Im Hof V, Lee MM, Schurch S. 1996. Airway surfactant, a primary defense barrier: mechanical and immunological aspects. *J Aerosol Med*, 9 (2):163-181.
- Ghio AJ, Carter JD, Dailey LA, Devlin RB, Samet JM. 1999. Respiratory epithelial cells demonstrate lactoferrin receptors that increase after metal exposure. *Am J Physiol*, 276 (6 Pt 1):L933-940.
- Glodek P. 1988. [Breeding adaptation to avoid antagonisms between production and health in swine]. *Tierarztl Prax Suppl*, 3:11-15.
- Goerke J. 1998. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochim Biophys Acta*, 1408 (2-3):79-89.
- Govan JR, Nelson JW. 1992. Microbiology of lung infection in cystic fibrosis. *Br Med Bull*, 48 (4):912-930.
- Grassme H, Jendrossek V, Riehle A, von Kurthy G, Berger J, Schwarz H, Weller M, Kolesnick R, Gulbins E. 2003. Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat Med*, 9 (3):322-330.
- Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA, Whitsett JA, Reed CR, Fowler AA, 3rd, Hudson LD, Maunder RJ, Crim C, Hyers TM. 1991. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest*, 88 (6):1976-1981.
- Griese M. 1999. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J*, 13 (6):1455-1476.

Haagsman HP, Hogenkamp A, van Eijk M, Veldhuizen EJ. 2008. Surfactant collectins and innate immunity. *Neonatology*, 93 (4):288-294.

Hacker J, Heesemann J. 2002. *Molecular infection biology : interactions between microorganisms and cells*. Hoboken, NJ Heidelberg, Germany: Wiley-Liss ; Spektrum.

Hanash S. 2003. Disease proteomics. *Nature*, 422 (6928):226-232.

Hannan PC, Bhogal BS, Fish JP. 1982. Tylosin tartrate and tiamutillin effects on experimental piglet pneumonia induced with pneumonic pig lung homogenate containing mycoplasmas, bacteria and viruses. *Res Vet Sci*, 33 (1):76-88.

Harder T, Simons K. 1997. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol*, 9 (4):534-542.

Haversen L, Ohlsson BG, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Mattsby-Baltzer I. 2002. Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappa B. *Cell Immunol*, 220 (2):83-95.

He C. 2003. Proteomic analysis of human bronchoalveolar lavage fluid: expression profiling of surfactant-associated protein A isomers derived from human pulmonary alveolar proteinosis using immunoaffinity detection. *Proteomics*, 3 (1):87-94.

Heegaard PM, Klausen J, Nielsen JP, Gonzalez-Ramon N, Pineiro M, Lampreave F, Alava MA. 1998. The porcine acute phase response to infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Haptoglobin, C-reactive protein, major acute phase protein and serum amyloid A protein are sensitive indicators of infection. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 119 (2):365-373.

Heizmann CW, Fritz G, Schafer BW. 2002. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci*, 7:d1356-1368.

Hennig-Pauka I, Jacobsen I, Blecha F, Waldmann KH, Gerlach GF. 2006. Differential proteomic analysis reveals increased cathelicidin expression in porcine bronchoalveolar lavage fluid after an *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Vet Res*, 37 (1):75-87.

Hennig-Pauka I, Bremerich S, Nienhoff H, Schroder C, Verspohl J, Strutzberg-Minder K, Ganter M, Waldmann KH, Blecha F, Beyersbach M, Gerlach GF. 2007. Respiratory disease

markers in porcine bronchoalveolar lavage fluid. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 54 (8):434-440.

Hochstrasser DF, Sanchez JC, Appel RD. 2002. Proteomics and its trends facing nature's complexity. *Proteomics*, 2 (7):807-812.

Hoeltig D, Hennig-Pauka, I., Thies, K., Rehm, T., Beyerbach, M., Strutzberg-Minder, K., Gerlach, G.-F., Waldmann, K.-H., members of the FUGATO-consortium IRAS. 2009. A novel Respiratory Health Score (RHS) supports a role of acute lung damage and pig breed in the course of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *BMC Veterinary Research*.

Hoffman AG, Lawrence MG, Ognibene FP, Suffredini AF, Lipschik GY, Kovacs JA, Masur H, Shelhamer JH. 1992. Reduction of pulmonary surfactant in patients with human immunodeficiency virus infection and *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Chest*, 102 (6):1730-1736.

Holthuis JC, Pomorski T, Riggers RJ, Sprong H, Van Meer G. 2001. The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport. *Physiol Rev*, 81 (4):1689-1723.

Hoy S. 2001. Atemwegserkrankungen bei Rindern und Schweinen: Ökonomische Bedeutung. *Atemwegserkrankungen bei Rindern und Schweinen*, 3. Auflage.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 29 (4):577-580.

Ikonen E. 2001. Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol*, 13 (4):470-477.

Inzana TJ, Ma J, Workman T, Gogolewski RP, Anderson P. 1988. Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus* (*Actinobacillus*) *pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect Immun*, 56 (8):1880-1889.

Isaji T, Gu J, Nishiuchi R, Zhao Y, Takahashi M, Miyoshi E, Honke K, Sekiguchi K, Taniguchi N. 2004. Introduction of bisecting GlcNAc into integrin alpha5beta1 reduces ligand binding and down-regulates cell adhesion and cell migration. *J Biol Chem*, 279 (19):19747-19754.

Jacob R, Naim HY. 2001. Apical membrane proteins are transported in distinct vesicular carriers. *Curr Biol*, 11 (18):1444-1450.

Jacobs JA, De Brauwier E. 1999. BAL fluid cytology in the assessment of infectious lung disease. *Hosp Med*, 60 (8):550-555.



- Jacobsen I, Hennig-Pauka I, Baltés N, Trost M, Gerlach GF. 2005. Enzymes involved in anaerobic respiration appear to play a role in *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence. *Infect Immun*, 73 (1):226-234.
- Jacobsen MJ, Nielsen JP, Nielsen R. 1996. Comparison of virulence of different *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes and biotypes using an aerosol infection model. *Vet Microbiol*, 49 (3-4):159-168.
- Janciauskiene S. 2001. Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles. *Biochim Biophys Acta*, 1535 (3):221-235.
- Jansen R, Briaire J, Smith HE, Dom P, Haesebrouck F, Kamp EM, Gielkens AL, Smits MA. 1995. Knockout mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 that are devoid of RTX toxins do not activate or kill porcine neutrophils. *Infect Immun*, 63 (1):27-37.
- Julenius K, Molgaard A, Gupta R, Brunak S. 2005. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology*, 15 (2):153-164.
- Kadarmideen HN, von Rohr P, Janss LL. 2006. From genetical genomics to systems genetics: potential applications in quantitative genomics and animal breeding. *Mamm Genome*, 17 (6):548-564.
- Kamp EM, Stockhofe-Zurwieden N, van Leengoed LA, Smits MA. 1997. Endobronchial inoculation with Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* leads to pleuropneumonia in pigs. *Infect Immun*, 65 (10):4350-4354.
- Kaneko K, Vey M, Scott M, Pilkuhn S, Cohen FE, Prusiner SB. 1997. COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (6):2333-2338.
- Kanyshkova TG, Buneva VN, Nevinsky GA. 2001. Lactoferrin and its biological functions. *Biochemistry (Mosc)*, 66 (1):1-7.
- Kaup FJ, Drommer W. 1985. [The surfactant system of the lung. I. Morphology, structure and function of the surfactant system in man and animal--our findings and a review of the literature]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 98 (3):73-80.
- Kaysen GA, Dubin JA, Muller HG, Mitch WE, Levin NW. 2001. Levels of alpha1 acid glycoprotein and ceruloplasmin predict future albumin levels in hemodialysis patients. *Kidney Int*, 60 (6):2360-2366.

- Kerkhoff C, Eue I, Sorg C. 1999a. The regulatory role of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9) in the transendothelial migration of human leukocytes. *Pathobiology*, 67 (5-6):230-232.
- Kerkhoff C, Klempt M, Kaefer V, Sorg C. 1999b. The two calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9, are involved in the metabolism of arachidonic acid in human neutrophils. *J Biol Chem*, 274 (46):32672-32679.
- Kerkhoff C, Sorg C, Tandon NN, Nacken W. 2001. Interaction of S100A8/S100A9-arachidonic acid complexes with the scavenger receptor CD36 may facilitate fatty acid uptake by endothelial cells. *Biochemistry*, 40 (1):241-248.
- Kerkhoff C, Nacken W, Benedyk M, Dagher MC, Sopalla C, Doussiere J. 2005. The arachidonic acid-binding protein S100A8/A9 promotes NADPH oxidase activation by interaction with p67phox and Rac-2. *FASEB J*, 19 (3):467-469.
- Klempt M, Melkonyan H, Nacken W, Wiesmann D, Holtkemper U, Sorg C. 1997. The heterodimer of the Ca<sup>2+</sup>-binding proteins MRP8 and MRP14 binds to arachidonic acid. *FEBS Lett*, 408 (1):81-84.
- Kuroki Y, Takahashi M, Nishitani C. 2007. Pulmonary collectins in innate immunity of the lung. *Cell Microbiol*, 9 (8):1871-1879.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259):680-685.
- Lang JD, McArdle PJ, O'Reilly PJ, Matalon S. 2002. Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury. *Chest*, 122 (6 Suppl):314S-320S.
- Lee CC, Cheng YW, Liao JW, Chiang BL, Lai YL, Kang JJ. 2008. Motorcycle exhaust particles augment antigen-induced airway inflammation in BALB/c mice. *J Toxicol Environ Health A*, 71 (6):405-412.
- Lee WC, Lee KH. 2004. Applications of affinity chromatography in proteomics. *Anal Biochem*, 324 (1):1-10.
- Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. 2005. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci*, 62 (22):2549-2559.
- Leiner G, Franz B, Strutzberg K, Gerlach GF. 1999. A novel enzyme-linked immunosorbent assay using the recombinant *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxII antigen for diagnosis of pleuropneumonia in pig herds. *Clin Diagn Lab Immunol*, 6 (4):630-632.

- Leitch EC, Willcox MD. 1998. Synergic antistaphylococcal properties of lactoferrin and lysozyme. *J Med Microbiol*, 47 (9):837-842.
- Lenz AG, Meyer B, Costabel U, Maier K. 1993. Bronchoalveolar lavage fluid proteins in human lung disease: analysis by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 14 (3):242-244.
- Levy O. 2004. Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes. *J Leukoc Biol*, 76 (5):909-925.
- Li Y, Limmon GV, Imani F, Teng C. 2009. Induction of lactoferrin gene expression by innate immune stimuli in mouse mammary epithelial HC-11 cells. *Biochimie*, 91 (1):58-67.
- Lin S, Naim HY, Rodriguez AC, Roth MG. 1998. Mutations in the middle of the transmembrane domain reverse the polarity of transport of the influenza virus hemagglutinin in MDCK epithelial cells. *J Cell Biol*, 142 (1):51-57.
- Lindahl M, Stahlbom B, Tagesson C. 1999. Newly identified proteins in human nasal and bronchoalveolar lavage fluids: potential biomedical and clinical applications. *Electrophoresis*, 20 (18):3670-3676.
- Lingwood D, Simons K. 2007. Detergent resistance as a tool in membrane research. *Nat Protoc*, 2 (9):2159-2165.
- Lucero HA, Robbins PW. 2004. Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. *Arch Biochem Biophys*, 426 (2):208-224.
- Lugering N, Stoll R, Kucharzik T, Burmeister G, Sorg C, Domschke W. 1995a. Serum 27E10 antigen: a new potential marker for staging HIV disease. *Clin Exp Immunol*, 101 (2):249-253.
- Lugering N, Stoll R, Schmid KW, Kucharzik T, Stein H, Burmeister G, Sorg C, Domschke W. 1995b. The myeloid related protein MRP8/14 (27E10 antigen)--usefulness as a potential marker for disease activity in ulcerative colitis and putative biological function. *Eur J Clin Invest*, 25 (9):659-664.
- Lugering N, Stoll R, Kucharzik T, Schmid KW, Rohlmann G, Burmeister G, Sorg C, Domschke W. 1995c. Immunohistochemical distribution and serum levels of the Ca(2+)-binding proteins MRP8, MRP14 and their heterodimeric form MRP8/14 in Crohn's disease. *Digestion*, 56 (5):406-414.
- Lunney JK. 2007. Advances in swine biomedical model genomics. *Int J Biol Sci*, 3 (3):179-184.

- Maas A, Meens J, Baltés N, Hennig-Pauka I, Gerlach GF. 2006. Development of a DIVA subunit vaccine against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Vaccine*, 24 (49-50):7226-7237.
- Maes D, Segales J, Meyns T, Sibila M, Pieters M, Haesebrouck F. 2008. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet Microbiol*, 126 (4):297-309.
- Makris G, Wright JD, Ingham E, Holland KT. 2004. The hyaluronate lyase of *Staphylococcus aureus* - a virulence factor? *Microbiology*, 150 (Pt 6):2005-2013.
- Martinez Cordero E, Gonzalez MM, Aguilar LD, Orozco EH, Hernandez Pando R. 2008. Alpha-1-acid glycoprotein, its local production and immunopathological participation in experimental pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, 88 (3):203-211.
- Metz-Boutigue MH, Jolles J, Mazurier J, Schoentgen F, Legrand D, Spik G, Montreuil J, Jolles P. 1984. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur J Biochem*, 145 (3):659-676.
- Mikuz G, Gschwendtner A. 2000. [Value of bronchoalveolar lavage in the diagnosis of lung disease]. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 84:129-135.
- Moonens F, Liesnard C, Brancart F, Van Vooren JP, Serruys E. 1995. Rapid simple and nested polymerase chain reaction for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Scand J Infect Dis*, 27 (4):358-362.
- Muller B, von Wichert P. 1985. Bronchoalveolar lavage proteins. *Klin Wochenschr*, 63 (17):781-787.
- Mulsant P, Gatignol A, Dalens M, Tiraby G. 1988. Phleomycin resistance as a dominant selectable marker in CHO cells. *Somat Cell Mol Genet*, 14 (3):243-252.
- Nacken W, Sorg C, Kerkhoff C. 2004. The myeloid expressed EF-hand proteins display a diverse pattern of lipid raft association. *FEBS Lett*, 572 (1-3):289-293.
- Naim HY, Lacey SW, Sambrook JF, Gething MJ. 1991. Expression of a full-length cDNA coding for human intestinal lactase-phlorizin hydrolase reveals an uncleaved, enzymatically active, and transport-competent protein. *J Biol Chem*, 266 (19):12313-12320.
- Nayak DP, Hui EK. 2004. The role of lipid microdomains in virus biology. *Subcell Biochem*, 37:443-491.

Newton RA, Hogg N. 1998. The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the beta 2 integrin Mac-1 on neutrophils. *J Immunol*, 160 (3):1427-1435.

Nguyen DH, Hildreth JE. 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol*, 74 (7):3264-3272.

Nicolet J. 1992. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. in: Leman, A.D. and Straw, B. : Diseases of Swine. Ames, Iowa, USA: Iowa State University press. 215-225.

Noel-Georis I, Bernard A, Falmagne P, Wattiez R. 2001. Proteomics as the tool to search for lung disease markers in bronchoalveolar lavage. *Dis Markers*, 17 (4):271-284.

Noel-Georis I, Bernard A, Falmagne P, Wattiez R. 2002. Database of bronchoalveolar lavage fluid proteins. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 771 (1-2):221-236.

Notter RH. 2000. Lung surfactants : basic science and clinical applications. New York: Marcel Dekker.

Nuijens JH, van Berkel PH, Schanbacher FL. 1996. Structure and biological actions of lactoferrin. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1 (3):285-295.

Ono A, Freed EO. 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (24):13925-13930.

Pattison IH, Howell DG, Elliot J. 1957. A haemophilus-like organism isolated from pig lung and the associated pneumonic lesions. *J Comp Pathol*, 67 (4):320-330.

Perez P, Tiraby G, Kallerhoff J, Perret J. 1989. Phleomycin resistance as a dominant selectable marker for plant cell transformation. *Plant Mol Biol*, 13 (4):365-373.

Popik W, Alce TM, Au WC. 2002. Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. *J Virol*, 76 (10):4709-4722.

Puchades M, Westman A, Blennow K, Davidsson P. 1999. Removal of sodium dodecyl sulfate from protein samples prior to matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 13 (5):344-349.

Rabilloud T. 1999. Silver staining of 2-D electrophoresis gels. *Methods Mol Biol*, 112:297-305.

- Rajendran L, Simons K. 2005. Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci*, 118 (Pt 6):1099-1102.
- Raptis SZ, Shapiro SD, Simmons PM, Cheng AM, Pham CT. 2005. Serine protease cathepsin G regulates adhesion-dependent neutrophil effector functions by modulating integrin clustering. *Immunity*, 22 (6):679-691.
- Reading PC, Morey LS, Crouch EC, Anders EM. 1997. Collectin-mediated antiviral host defense of the lung: evidence from influenza virus infection of mice. *J Virol*, 71 (11):8204-8212.
- Reinhold P. 1997a. [Respiratory mechanics in animals. 1. Physiological bases and conventional measurement methods--review]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 110 (7-8):251-256.
- Reinhold P. 1997b. [Respiratory mechanics in animals. 2. The forced oscillation technique--review]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 110 (7-8):257-266.
- Richardson JC, Scalera V, Simmons NL. 1981. Identification of two strains of MDCK cells which resemble separate nephron tubule segments. *Biochim Biophys Acta*, 673 (1):26-36.
- Robinson MJ, Tessier P, Poulsom R, Hogg N. 2002. The S100 family heterodimer, MRP-8/14, binds with high affinity to heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans on endothelial cells. *J Biol Chem*, 277 (5):3658-3665.
- Roth J, Vogl T, Sorg C, Sunderkotter C. 2003. Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules. *Trends Immunol*, 24 (4):155-158.
- Rothman JE, Lenard J. 1977. Membrane asymmetry. *Science*, 195 (4280):743-753.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*. 3rd Aufl. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schaller A, Kuhn R, Kuhnert P, Nicolet J, Anderson TJ, MacInnes JI, Segers RP, Frey J. 1999. Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology*, 145 ( Pt 8):2105-2116.
- Schuck S, Honsho M, Ekroos K, Shevchenko A, Simons K. 2003. Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (10):5795-5800.
- Shao D, Segal AW, Dekker LV. 2003. Lipid rafts determine efficiency of NADPH oxidase activation in neutrophils. *FEBS Lett*, 550 (1-3):101-106.

- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, 68 (5):850-858.
- Shin JS, Gao Z, Abraham SN. 2000. Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. *Science*, 289 (5480):785-788.
- Shope RE. 1964. Porcine Contagious Pleuropneumonia. I. Experimental Transmission, Etiology, and Pathology. *J Exp Med*, 119:357-368.
- Simons K, van Meer G. 1988. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, 27 (17):6197-6202.
- Simons K, Toomre D. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1 (1):31-39.
- Simons K, Ehehalt R. 2002. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest*, 110 (5):597-603.
- Singer SJ, Nicolson GL. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175 (23):720-731.
- Sittipunt C, Steinberg KP, Ruzinski JT, Myles C, Zhu S, Goodman RB, Hudson LD, Matalon S, Martin TR. 2001. Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 163 (2):503-510.
- Smidt D, Kallweit E, Ladewig J. 1988. [Stress, health and production in swine]. *Tierarztl Prax Suppl*, 3:1-10.
- Smith JA. 1994. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol*, 56 (6):672-686.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150 (1):76-85.
- Soerensen CM, Holmskov U, Aalbaek B, Boye M, Heegaard PM, Nielsen OL. 2005. Pulmonary infections in swine induce altered porcine surfactant protein D expression and localization to dendritic cells in bronchial-associated lymphoid tissue. *Immunology*, 115 (4):526-535.
- Sorensen M, Sorensen, S.P.L. 1939. The proteins in whey. *Comptes-rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg*, 23:55-99.

Spiller A, Schulze B. 2008. Zukunftsperspektiven der Fleischwirtschaft: Verbraucher, Märkte, Geschäftsbeziehungen. Niedersächsische Staats- und Universitätsbibliothek.

Srikrishna G, Panneerselvam K, Westphal V, Abraham V, Varki A, Freeze HH. 2001. Two proteins modulating transendothelial migration of leukocytes recognize novel carboxylated glycans on endothelial cells. *J Immunol*, 166 (7):4678-4688.

Stanley P. 2002. Biological consequences of overexpressing or eliminating N-acetylglucosaminyltransferase-TIII in the mouse. *Biochim Biophys Acta*, 1573 (3):363-368.

Stevenson A, Macdonald J, Roberts M. 2003. Cloning and characterisation of type 4 fimbrial genes from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol*, 92 (1-2):121-134.

Sun Q, Liu Y, Lu W, Cheng G, Zhou H, Zhou X, Wei L, Dai Z, Guo K, Lu H. 2007. Con A affinity glycoproteomics of normal human liver tissue. *Sci China C Life Sci*, 50 (3):403-411.

Suzuki YA, Lonnerdal B. 2002. Characterization of mammalian receptors for lactoferrin. *Biochem Cell Biol*, 80 (1):75-80.

Taraboulos A, Scott M, Semenov A, Avrahami D, Laszlo L, Prusiner SB. 1995. Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol*, 129 (1):121-132.

Tascon RI, Vazquez-Boland JA, Gutierrez-Martin CB, Rodriguez-Barbosa JI, Rodriguez-Ferri EF. 1996. Virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiologia*, 12 (2):171-184.

Teng CT. 2002. Lactoferrin gene expression and regulation: an overview. *Biochem Cell Biol*, 80 (1):7-16.

Tonpitak W, Baltés N, Hennig-Pauka I, Gerlach GF. 2002. Construction of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 prototype live negative-marker vaccine. *Infect Immun*, 70 (12):7120-7125.

Torian BE, Kenny GE. 1986. A new metabolic labelling medium for *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus* using <sup>35</sup>S methionine. *Proc Soc Exp Biol Med*, 181 (4):620-623.

Tubbs R, Deen J. 1997. Economics of respiratory and enteric diseases. . AASP.

Turner GA. 1992. N-glycosylation of serum proteins in disease and its investigation using lectins. *Clin Chim Acta*, 208 (3):149-171.



Vaandrager AB, van Golde LM. 2000. Lung surfactant proteins A and D in innate immune defense. *Biol Neonate*, 77 Suppl 1:9-13.

van Eijk M, van de Lest CH, Batenburg JJ, Vaandrager AB, Meschi J, Hartshorn KL, van Golde LM, Haagsman HP. 2002. Porcine surfactant protein D is N-glycosylated in its carbohydrate recognition domain and is assembled into differently charged oligomers. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 26 (6):739-747.

Van Wetering S, Mannesse-Lazeroms SP, Dijkman JH, Hiemstra PS. 1997. Effect of neutrophil serine proteinases and defensins on lung epithelial cells: modulation of cytotoxicity and IL-8 production. *J Leukoc Biol*, 62 (2):217-226.

Varki A. 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3 (2):97-130.

Veenstra TD. 2003. Proteome analysis of posttranslational modifications. *Adv Protein Chem*, 65:161-194.

von Bredow C, Wiesener A, Griese M. 2003. Proteolysis of surfactant protein D by cystic fibrosis relevant proteases. *Lung*, 181 (2):79-88.

Wan XY, Bi LY, Zhang YL. 2006. [Protective effect of glutamine on rats with pseudomonas pneumonia]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 45 (12):1004-1007.

Wang H, Zhang M, Bianchi M, Sherry B, Sama A, Tracey KJ. 1998. Fetuin (alpha2-HS-glycoprotein) opsonizes cationic macrophage-deactivating molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (24):14429-14434.

Ward PP, Paz E, Conneely OM. 2005. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. *Cell Mol Life Sci*, 62 (22):2540-2548.

Ward PP, Mendoza-Meneses M, Mulac-Jericevic B, Cunningham GA, Saucedo-Cardenas O, Teng CT, Conneely OM. 1999. Restricted spatiotemporal expression of lactoferrin during murine embryonic development. *Endocrinology*, 140 (4):1852-1860.

Wattiez R, Falmagne P. 2005. Proteomics of bronchoalveolar lavage fluid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 815 (1-2):169-178.

Weinberg ED. 2004. Suppression of bacterial biofilm formation by iron limitation. *Med Hypotheses*, 63 (5):863-865.

Welch RA. 1991. Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol Microbiol*, 5 (3):521-528.

Whitsett JA, Weaver TE. 2002. Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. *N Engl J Med*, 347 (26):2141-2148.

Wrackmeyer U, Hansen GH, Seya T, Danielsen EM. 2006. Intelectin: a novel lipid raft-associated protein in the enterocyte brush border. *Biochemistry*, 45 (30):9188-9197.

Wu J, Kobayashi M, Sousa EA, Liu W, Cai J, Goldman SJ, Dorner AJ, Projan SJ, Kavuru MS, Qiu Y, Thomassen MJ. 2005. Differential proteomic analysis of bronchoalveolar lavage fluid in asthmatics following segmental antigen challenge. *Mol Cell Proteomics*, 4 (9):1251-1264.

Yamauchi K, Tomita M, Giehl TJ, Ellison RT, 3rd. 1993. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infect Immun*, 61 (2):719-728.

Yang F, Haile DJ, Berger FG, Herbert DC, Van Beveren E, Ghio AJ. 2003. Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 284 (2):L402-409.

Zaas DW, Duncan M, Rae Wright J, Abraham SN. 2005a. The role of lipid rafts in the pathogenesis of bacterial infections. *Biochim Biophys Acta*, 1746 (3):305-313.

Zaas DW, Duncan MJ, Li G, Wright JR, Abraham SN. 2005b. *Pseudomonas* invasion of type I pneumocytes is dependent on the expression and phosphorylation of caveolin-2. *J Biol Chem*, 280 (6):4864-4872.

Zhang B, Ren J, Yan X, Huang X, Ji H, Peng Q, Zhang Z, Huang L. 2008. Investigation of the porcine MUC13 gene: isolation, expression, polymorphisms and strong association with susceptibility to enterotoxigenic *Escherichia coli* F4ab/ac. *Anim Genet*, 39 (3):258-266.

Zhang J, Pekosz A, Lamb RA. 2000. Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. *J Virol*, 74 (10):4634-4644.

## F Anhang

### F 1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung der unterschiedlichen Herkunft von Proteinen in bronchoalveolärer Spülflüssigkeit	23
Abb. 2	Strukturmodell von „Lipid Rafts“ in der Zellmembran	30
Abb. 3	Flussdiagramm zur Veranschaulichung der Vorgehensweise bei der Biomarkersuche und der zellbiologischen Charakterisierung von Lipid Raft assoziierten Proteinen	32
Abb. 4	Schemazeichnung zur Ermittlung des Lungenläsions-Scores	37
Abb. 5	Eigenschaften des eukaryotischen Expressionsvektors pcDNA4/TO/myc-His™	51
Abb. 6	Schnittstellen der Endoglykosidasen H und F	58
Abb. 7	Übersichtskarte von glykosylierten Proteinen in BALF	62
Abb. 8	Silbergefärbte Gele der 2-D PAGE von BALF-Glykoproteinen eines repräsentativen Schweins aus der Pietrain Zuchtlinie vor (A) und nach der Infektion (A) mit <i>A. pleuropneumoniae</i>	65
Abb. 9	Zuchtlinien-spezifische Regulation der BALF-Glykoproteine von infizierten Tieren an Tag 4/Tag 20 im Vergleich zu dem jeweiligen Tier vor der Infektion an Tag -7	66
Abb. 10	Detektion der Zuchtlinien-spezifischen Expression von BALF-Glykoproteinen bei gesunden Schweinen (Tag -7) mittels fluoreszenz-basierter 2-D Gelelektrophorese (2-D DIGE)	68,69
Abb. 11	Unterschiedliche Expression von BALF-Glykoproteinen bei gesunden Schweinen (Tag -7) der Zuchtlinien Deutsche Landrasse, Piétrain und Hampshire	70
Abb. 12	Detektion der zuchtlinien-spezifischen Expression von BALF-Glykoproteinen an Tag 4 post infectionem mittels fluoreszenz-basierter 2-D Gelelektrophorese (2-D DIGE)	71
Abb. 13	Unterschiedliche Expression von BALF-Glykoproteinen bei Schweinen der Zuchtlinien Deutsche Landrasse, Piétrain und Hampshire an Tag 4 nach der Infektion mit <i>A. pleuropneumoniae</i>	72
Abb. 14	Detektion der zuchtlinien-spezifischen Expression von BALF-Glykoproteinen an Tag 20 post infectionem mittels fluoreszenz-basierter 2-D Gelelektrophorese (2-D DIGE)	73

---

Abb. 15	Unterschiedliche Expression von BALF-Glykoproteinen bei Schweinen der Zuchtlinien Deutsche Landrasse, Piétrain und Hampshire an Tag 20 nach der Infektion mit <i>A. pleuropneumoniae</i>	74
Abb. 16	Differentielle Expression von Lipid-raft-assoziierten Proteinen in verändertem und unverändertem Lungengewebe an Tag 4 nach der Infektion mit <i>A. pleuropneumoniae</i>	76,77
Abb. 17	Unterschiedliche Expression der Proteine S100 A9 und Laktoferrin in verändertem Lungengewebe (vL) im Vergleich zu unverändertem Lungengewebe (uvL) an Tag 4 post infectionem	77
Abb. 18	Histopathologischer Nachweis von porzinem Laktoferrin in Lungengewebe	79
Abb. 19	Amplifikation der cDNA für das Protein Laktoferrin	81
Abb. 20	Zweifache Kontroll-PCR der Klonierung von Laktoferrin-cDNA in den pCR® 2.1 TOPO® Vektor	82
Abb. 21	Überprüfung der klonierten Laktoferrin-cDNA	83
Abb. 22	Kontroll-PCR der Klonierung von Laktoferrin-cDNA in den Expressionsvektor pcDNA4/TO/myc-His™	84
Abb. 23	Überprüfung der rekombinanten Expression von Laktoferrin in MDCK-Zellen mittels Western Blot	85
Abb. 24	Transportkinetik von Laktoferrin während der intrazellulären Reifung	86
Abb. 25	Assoziation von Laktoferrin mit unterschiedlichen Lipid rafts	87
Abb. 26	Vorhersage der Glykosylierung von porzinem Laktoferrin	89
Abb. 27	Nachweis des Glykosylierungstyps von porzinem Laktoferrin	90
Abb. 28	Bestimmung der Glykosylierungsform von Laktoferrin in den Proteinfractionen Lysat, Überstand und DRM-Pellet	91
Abb. 29	Unterschiede in der Zugänglichkeit von Laktoferrin gegenüber der Endoglykosidase H geben Auskunft über den Glykosylierungstyp in den jeweiligen Proteinfractionen	92
Abb. 30	Bedeutung der Glykosylierung von Laktoferrin bei der Assoziation mit Lipid rafts	93,94

---

F 2	Tabellenverzeichnis	
Tab. 1	Zeitlicher Ablauf des Tierversuchs	33
Tab. 2	Zusammensetzung der SDS-Gele für die zweidimensionale Gelelektrophorese von Proteinen	42
Tab. 3	Verwendete PCR-Primer und deren Eigenschaften	47
Tab. 4	Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze	48
Tab. 5	Verwendete Primer-Kombinationen und PCR-Programme	49
Tab. 6	Zusammensetzung der Ansätze für die Ligation und die Kontrollen	52
Tab. 7	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen	56
Tab. 8	Spezifität, Bezugsquelle und Verdünnung der beim Western Blot verwendeten Antikörper	57
Tab. 9	Spezifität, Bezugsquelle und Verdünnung der bei der histologischen Analyse verwendeten Antikörper	59
Tab. 10	Einteilung der Tiere aus den drei Zuchtlinien in verschiedene Erkrankungs-Kategorien	60
Tab. 11	Nachweis von <i>A. pleuropneumoniae</i> in Lungengewebe und Tonsillen	61
Tab. 12	Identifizierte Glykoproteine in BALF	63
Tab. 13	Identifizierte Lipid-raft assoziierte Proteine	77

## G Lebenslauf

### Persönliche Daten

Nachname: Kahlisch  
Vorname: Dennis  
Geburtsdatum: 16.09.1978  
Geburtsort: Bremerhaven  
Nationalität: deutsch



### Hochschulausbildung

- 2005 – 2009 Promotionsstudiengang an der Leibniz Universität Hannover
- Doktorarbeit bei Prof. Dr. H. Y. Naim, Institut für Physiologische Chemie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover: „Differentielle Proteomanalyse von bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit und Lungengewebe zur Identifizierung potentieller Biomarker für Atemwegserkrankungen beim Schwein“
- 2000 – 2005 Diplomstudiengang im Fachbereich Biologie an der Leibniz Universität Hannover
- Diplomarbeit bei Prof. Dr. H. Y. Naim, Institut für Physiologische Chemie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover: „Anwendung von Alanin-Scan-Mutagenese zur Analyse apikaler Sortiermechanismen“

### **Wehr-/Ersatzdienst**

1999 – 2000                      Zivildienst in der Einrichtung „Haus Stella Maris“ in  
Cuxhaven-Sahlenburg

### **Schulbildung**

1991 – 1999                      Viktoria-Luise-Gymnasium in Hameln

1989 – 1991                      Orientierungsstufe in Emmerthal

1985 – 1989                      Grundschule in Grohnde, Emmerthal

## H Publikationen

### Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht bzw. auf folgenden Kongressen vorgestellt:

Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde in dem Journal „Veterinary Research“ publiziert.

Kahlisch D, Buettner FFR, Naim HY, Gerlach G-F, FUGATO-Consortium IRAS. 2009.

Glycoprotein analysis of porcine bronchoalveolar lavage fluid reveals potential biomarkers corresponding to resistance to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. Vet Res, 40:60.

In Bezug auf diese Arbeit ist ein Artikel im Magazin "Deutsche Tierärztliche Wochenschrift" erschienen.

Rehm T, Benga L, Danilowicz E, Drungowski M, Hoeltig D, Kahlisch D, Oehlmann W, Probst I, Gerlach GF; IRAS-Konsortium beitragenden Wissenschaftler. 2008. Functional genome analysis investigating resistance to respiratory tract disease in a porcine *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection model. Dtsch Tierarztl Wochenschr., 115(7):260-4.

Ein Teil der Ergebnisse meiner Doktorarbeit wurde durch ein Poster auf dem Congress of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD) in Chicago vorgestellt.

Kahlisch D, Gerlach G-F, Naim HY and the members of the IRAS consortium. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection: Identification of differentially expressed proteins by proteome analysis of BALF and lung tissue. CRWAD, Chicago Dec. 2. – 4. 2007, P 3.

Auf dem Symposium der Fachgruppe „Physiologie und Biochemie“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) wurde ein Vortrag in Leipzig gehalten.

Dennis Kahlisch, Doris Höltig, Thomas Rehm, Gerald-Friedrich Gerlach, Hassan Y. Naim. Infektion durch *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Differenzielle Proteomanalyse von bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit und Lungengewebe des Schweins. DVG, Leipzig 9.-11. März 2008, V 26

Weitere Ergebnisse wurden durch ein Poster auf dem Kongress der International Society for Animal Genetics (ISAG) in Amsterdam vorgestellt.

Kahlisch D, Gerlach G-F, Naim HY and the members of the IRAS consortium. Identification of differentially expressed proteins during an *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection by proteome analysis of BALF and lung tissue. ISAG, Amsterdam Jul. 20. – 24. 2008, P 2086



## I Danksagung

Besonders möchte ich mich bedanken bei Herrn Prof. Dr. Hassan Naim und Herrn Prof. Dr. Gerald-F. Gerlach für die Überlassung dieses interessanten und spannenden Themas sowie für die freundliche Unterstützung in jeglicher Art und für das in mich gesetzte Vertrauen.

Herzlichst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernd Huchzermeyer für die freundliche Übernahme des Prüfungsvorsitzes und die Annahme der Drittprüferschaft.

Für die gute Betreuung und Hilfsbereitschaft bei der Einarbeitung sowie für die ständige Unterstützung während der Arbeit und für viele interessante Gespräche bedanke ich mich herzlich bei Herrn Dr. Falk Büttner.

Bei Herrn Robert Kreutzer und Frau Mihaela Kreutzer vom Institut für Pathologie bedanke ich mich für die Betreuung bei den histologischen Untersuchungen.

Ganz besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Karl Rohn vom Institut für Biometrie für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Bei Mathias Weigoldt bedanke ich mich für viele unterhaltsame Stunden im Labor.

Frau Dr. Doris Höltig danke ich für die Hilfsbereitschaft bei der Probenentnahme.

Ich bedanke mich bei meinen Mitarbeitern im Institut für Physiologische Chemie, insbesondere: Arndt Rohwedder, Zeynep Hein, Yvonne Reinke, Miriam Wessels, Stefan Quentin, Marwan Alfalah, Marcus Pröpsting, Martin Heine, Jürgen Eikemeyer, Gabi Wetzel, Marc Behrend und Eva Tönnigs.

Auch möchte ich mich bedanken bei meinen Mitarbeitern im Institut für Mikrobiologie, dort insbesondere: Ibrahim Bendallah, Karla Dreckmann, Julia Heinzmann, Jochen Meens, Jörg Merkel, Shamoan Naseem, Thomas Rehm, Meike Sack, Martin Selke und Halina Tegetmeyer

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir unendlich oft in allen Lebenslagen geholfen und mein Studium großzügig finanziert haben. Für alles ganz vielen lieben Dank

Meiner Frau Leila Kahlisch danke ich für ihre immerwährende Bereitschaft zu helfen und ihre Liebe und Zuneigung.