

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im
Dr. von Haunerschen Kinderspital der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. D. Reinhardt

**Oxidative Modifikationen des bronchoalveolären Proteoms und der
Surfactant Proteine A und D bei chronischen Lungenerkrankungen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Vitaliy Starosta

aus

Czernowitz

2004

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Griese

Mitberichterstatter: Prof. Dr. S. Werner
Prof. Dr. J. Behr

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2004

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	10
1.1 Oxidativer Stress	10
1.2 Die Rolle des oxidativen Stresses bei Cystischer Fibrose	13
1.3 Surfactant Proteine	14
1.4 Struktur, Synthese und Organisation der Surfactantproteine A und D	15
1.5 Funktion der Surfactantproteine A und D	17
1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Patientenkollektiv	21
2.1.1 Cystische Fibrose	21
2.1.2 Chronische Bronchitis	23
2.1.3 Tracheostoma	25
2.1.4 Interstitielle Pneumonie	26
2.1.5 Pneumonie	27
2.1.6 GERD	27
2.1.7 PAP	28
2.2 Durchführung der bronchoalveolären Lavage	29
2.3 Biochemische Methoden	30
2.3.1 Oxidation	30
2.3.2 Quantitative Bestimmung der Carbonylgruppen in Proteinen. Prinzip	30

2.3.3	Bestimmung der Proteincarbonyle	31
2.3.4	Standard für Carbonylbestimmungen	31
2.3.5	Kolorimetrische Bestimmung der Proteincarbonyle	32
2.3.6	Quantitative Bestimmung der Proteincarbonyle im dot-Blot-Verfahren	33
2.4	Assay für Thiole	36
2.4.1	Prinzip	36
2.4.2	Ellman's Assay für die Eichung des L-Cystein Thiolsstandards	37
2.4.3	Bestimmung der Thiole in Proben	38
2.5	Lipoperoxid Assay	39
2.5.1	Prinzip	39
2.5.2	Peroxid Standard	39
2.5.3	Lipidperoxidbestimmung in den Proben	40
2.6	Gesamtproteinbestimmung	40
2.7	Dot-Blot Assay für die quantitative SP-D Bestimmung	41
2.8	Gelfiltration	43
2.9	Reinigung von Surfactant-Protein D	43
2.10	1-D Gelelektrophorese und Westernblotanalyse	46
2.11	2-D Gelelektrophorese und Westernblotanalyse	50
2.12	2-D-Elektrophorese mittels horizontalem Multiphore II System	54
2.13	„In-Strip“-Derivatisierung der Proteine mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin für die 2-D-Elektrophorese	60
2.14	Agglutination von Pseudomonas aeruginosa durch SP-D	61
2.15	Liste der verwendeten Antikörper und Standardproteine	62
2.16	Statistische Analyse	63
3.	Ergebnisse	64
3.1	Bestimmung des oxidativen Status des Gesamtproteoms in BAL bei verschiedenen Lungenerkrankungen	64

3.1.1	Untersuchung verschiedener Patientengruppen	64
3.1.2	Gesamtzellzahl der Lavage	65
3.1.3	Anzahl an Neutrophilen in der BAL	66
3.1.4	Relativer Anteil an Neutrophilen	67
3.1.5	Recovery	68
3.1.6	Zellvitalität	68
3.2	Untersuchungen innerhalb der CF-Patienten	69
3.2.1	Altersabhängigkeit	69
3.3	Korrelationsuntersuchungen	72
3.3.1	Untersuchung aller Patientengruppen zusammengefasst zu einer Gruppe	72
3.4	Untersuchung der Proteinoxidation bei CF-Patienten	73
3.4.1	Korrelation zwischen Zellen und Proteincarbonylen	73
3.4.2	Lungenfunktionsparameter und Proteincarbonyle in BALF	74
3.4.3	Unterteilung der CF-Patienten nach dem FEV ₁	75
3.4.4	Unterteilung der CF-Patienten nach dem relativen Gehalt an Neutrophilen	76
3.5	Darstellung oxidativer Änderungen des Gesamtproteoms von BAL bei verschiedenen Lungenerkrankungen mittels 2-D Elektrophorese	78
3.6	Darstellung nitrifikativer Änderungen im Gesamtproteom von BAL bei verschiedenen Lungenerkrankungen mittels 2-D Elektrophorese	81
3.7	Oxidative Modifikationen des SP-A auf 2-D Gelen von Patienten mit verschiedenen Lungenerkrankungen	83
3.7.1	Lungenalveolarproteinose (PAP)	83
3.7.2	Cystische Fibrose	86
3.7.3	Chronische Bronchitis	89
3.8	Oxidative Modifikationen von SP-D	90
3.8.1	Lungenalveolarproteinose	90
3.8.2	Interstitielle Pneumonitis und Pneumonien	91
3.8.3	CF und Tracheostoma	92

3.8.4	GERD und chronische Bronchitis	93
3.8.5	Untersuchung der Oxidierbarkeit von SP-D in vitro mit 2-D-SDS-PAGE	94
3.8.6	Untersuchung der Oxidierbarkeit von SP-D in vitro mit 1-D-SDS-PAGE und dot-blotting	95
3.9	Analyse des Verteilungsmusters oxidiertes Proteine auf den Western Blots	96
3.9.1	Beschreibung der Differenzen zwischen 2-D oxyBlots von Proben mit verschiedenem Oxidationsgrad	96
3.9.2	Empfindlichkeit einzelner Proteine gegenüber oxidativen Veränderungen	97
3.10	Untersuchung des Einflusses der Behandlung mit GSH auf oxidative Parameter in BAL der CF Patienten	99
3.10.1	Carbonylgruppen in Proteinen	99
3.10.2	Thiolgruppen in Proteinen	99
3.10.3	Lipidperoxidkonzentration in der BAL	100
3.10.4	Proteinkonzentration in BAL	100
3.11	Darstellung des Einflusses der antioxidativen Behandlung mit Hilfe der 2-D-SDS-PAGE	101
3.12	Einfluss der Oxidation auf die makromolekulare Organisation von SP-D	109
3.12.1	Natives SP-D	110
3.12.2	Oxidiertes SP-D	110
3.12.3	Chronische Bronchitis	112
3.12.4	CF-Patienten mit niedrigem Gehalt an neutrophilen Granulozyten in BAL	112
3.12.5	CF-Patienten mit hohem Gehalt an neutrophilen Granulozyten in BAL	113
3.13	Beeinflussung der Funktion von SP-D	114
4	Diskussion	116
4.1	Bestimmung des oxidativen Status des Gesamtproteoms in BAL bei verschiedenen Lungenerkrankungen	116
4.1.1	Gruppe der CF-Patienten	116
4.1.2	Andere chronische Lungenerkrankungen	117
4.2	Untersuchung der oxidativen Änderungen mit der 2-D-Elektrophorese	119
4.3	Untersuchung des Einflusses einer Behandlung mit inhalativem Glutathion (GSH) auf oxidative Parameter in der BAL von Patienten mit CF	120

4.4	Oxidative Modifikationen des SP-A	121
4.5	Oxidative Modifikationen des SP-D	122
4.6	Beeinflussung der makromolekularen Organisation von SP-D durch Oxidation	122
4.7	Beeinflussung der funktionellen Eigenschaften von SP-D	123
5	Zusammenfassung. Summary	124
6	Literaturverzeichnis	126
7	Danksagung	138
8	Anhang	149
9	Lebenslauf	151

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ARDS	Atemnotsyndrom des Erwachsenen (<i>adult respiratory distress syndrome</i>)
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit
BMI	body-mass index
BSA	bovines Serum Albumin
CB	Chronische Bronchitis
CD	Cluster of differentiation
CF	Cystische Fibrose
CFTR	cystic fibrosis transmembrane regulator
CRD	carbohydrate recognition domain
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
DTT	Dithiotreitol
EAA	Exogen allergische Alveolitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FEV1	forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde
FVC	Forcierte Vitalkapazität
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GERD	Gastro-Ösophageale Reflux Erkrankung (<i>gastro esophageal reflux disease</i>)
GSH	Glutathion
GZZ	Gesamtzellzahl
IEF	isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunoglobulin
IL-	Interleukin-
ILE	Interstitielle Lungenerkrankung
kDa	Kilodalton
M.W.	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
MEF	maximale expiratorische Atemstromstärke (<i>flow</i>)
min	Minute(n)
MPO	Myeloperoxidase
OD	optische Dichte
PAP	Alveolarproteinose (<i>pulmonary alveolar proteinosis</i>)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNS	Reaktive Stickstoffradikale (<i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale (<i>reactive oxygen species</i>)
SDS-PAGE	Sodium Dodezylsulfat Polyakrylamid Gelelektrophorese (<i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>)
SP-A	Surfactantprotein A
SP-B	Surfactantprotein B
SP-C	Surfactantprotein C
SP-D	Surfactantprotein D
TBS	mit Tris gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris buffered saline</i>)
TS	Tracheostoma

1 Einleitung

1.1 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffarten spielen eine wichtige Rolle für die Ätiologie und den Verlauf mehrerer entzündlicher Krankheiten¹. ROS (Reaktive Sauerstoffarten) entstehen bei einer großen Zahl von physiologischen und pathologischen Prozessen. Bedeutsame Mengen an ROS entstehen laufend als Nebenprodukte des normalen Zellmetabolismus in den Mitochondrien²⁻⁴(Abb.1.1).

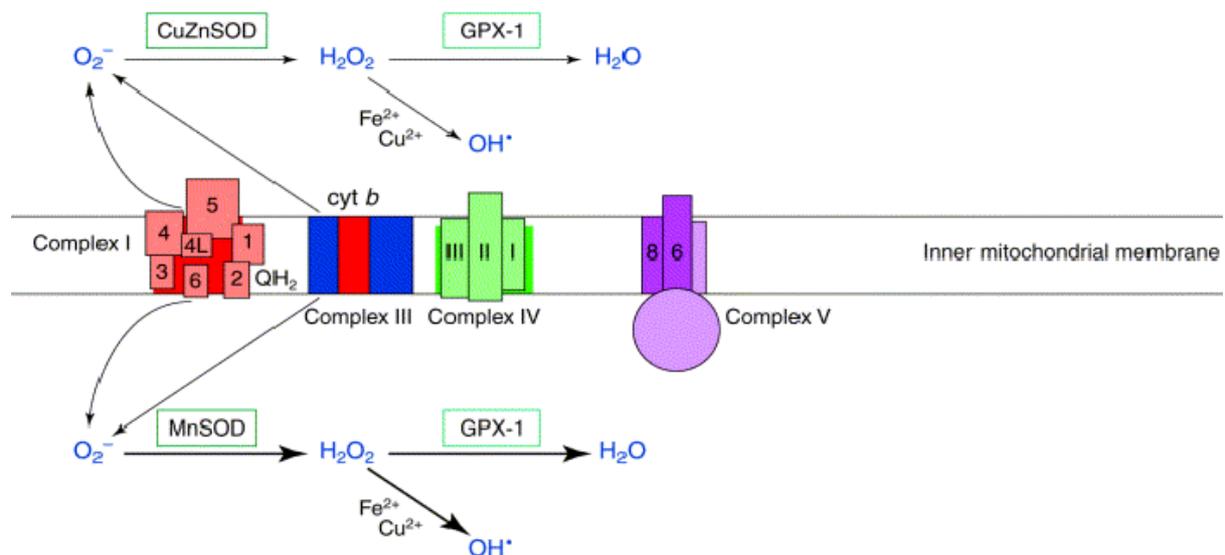


Abbildung 1.1 Bildung der ROS in Mitochondrien. Die mitochondriale Atemkette ist als Komplex dargestellt, der in die innere mitochondriale Membran eingebaut ist. Komplex I (NADH-Ubiquinon Oxidoreductase), Komplex III (Ubiquinol-Cytochrom c Oxidoreductase), Komplex IV (Cytochrom c Oxidase) und Komplex V (H^+ -translocating ATP Synthetase) sind gezeigt⁵. SOD-Superoxiddismutase, GPX-Glutathionperoxidase.

ROS können alle Gruppen von biologischen Molekülen (Proteine, Lipide, DNA) direkt oder indirekt oxidativ schädigen. Insbesondere die Oxidation der Proteine kann direkt durch Schäden am Molekül und Ausfall der Katalysatorfunktion eine weitergehende pathologische Folge haben. Initiiert wird der von Radikalen vermittelte Schaden an Proteinen oft durch Lipide und Zucker. Zugrundeliegende Mechanismen sind Elektronleakage, Metallionen-abhängige Reaktionen und Autooxidation. Die folgende Protein-Oxidation ist O_2 -abhängig und resultiert in der Bildung mehrerer, sich fortpflanzender Alkoxy (RO^\cdot) Radikale⁶. Unter den reaktiven Produkten können Protein-Hydroperoxyde ($ROOH$) weitere radikale Flüsse durch die Reaktion mit Transitionsmetallionen erzeugen. Zum Schutz der Zelle existieren intrazelluläre Enzyme, die reaktive Arten, wie z.B. Protein-Hydroperoxyde zu unreaktiven Hydroxiden reduzieren können. Oxidierte Proteine sind oft funktionell beeinträchtigt und

daher vermehrt für Proteasen empfindlich. Auf diese Weise können die Zellen stark oxidierte Proteine entfernen.

Carbonyl-(R-C=O) Gruppen (Aldehyde und Ketone) werden auf Protein-Seitenketten (besonders Pro, Arg, Lys, und Thr) erzeugt, wenn sie oxidiert werden (Abb.1.2). Der Gehalt an Proteincarbonylen ist ein allgemeines Kennzeichen und der am häufigsten verwendete Indikator für Proteinoxidation. Eine Anhäufung von Proteincarbonylen ist bei mehreren menschlichen Krankheiten einschließlich Cystische Fibrose, Diabetes mellitus, chronisch entzündliche Darmerkrankungen und Arthritis beobachtet worden⁷.

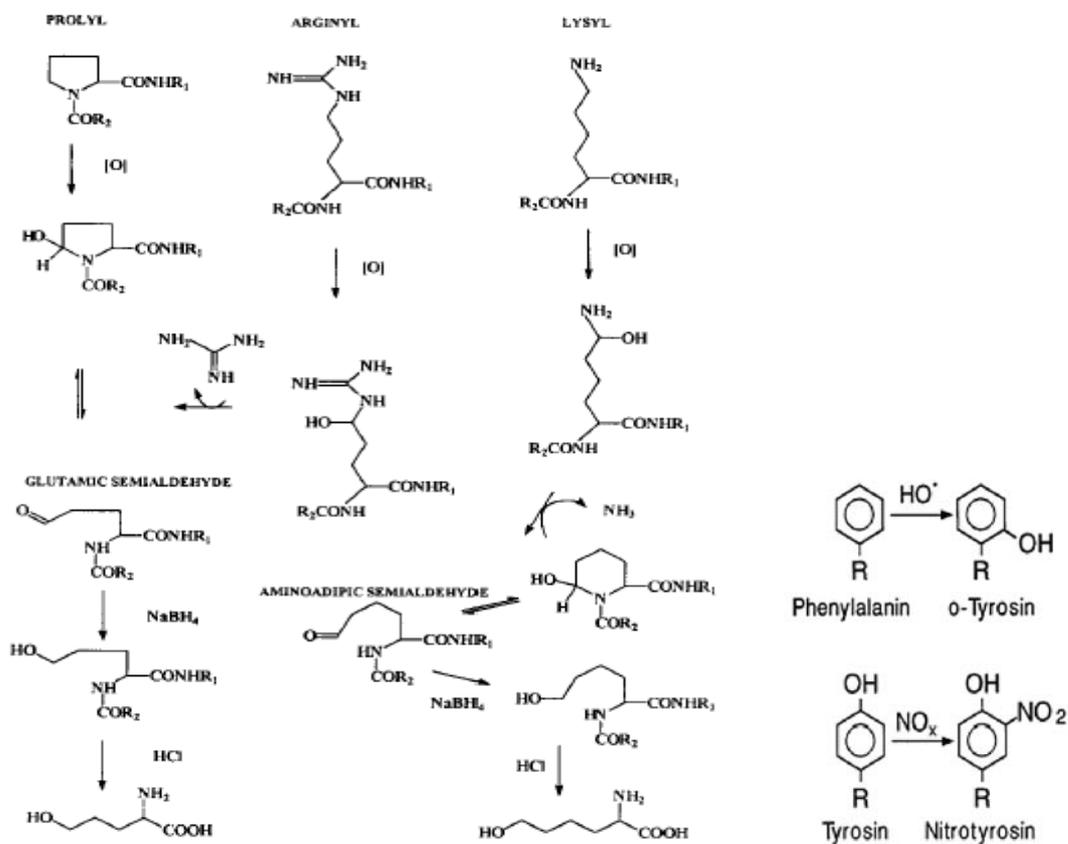


Abbildung 1.2 Beispiel der Entstehung von Proteincarbonylen bei den Aminosäureseitenketten von Prolin, Arginin und Lysin und Produkte der chemischen Reduktion mit Natriumborhydrid (NaBH₄). Aus ⁸ mit Veränderungen (links). Generation des 3-Nitrotyrosin (rechts).

Tabelle 1.1 Mögliche oxidative Veränderungen verschiedener Aminosäuren nach ⁹.

Aminosäure	Produkte
Cystein	Oxidation der Sulfhydrylgruppen (Cys-SH) mit der Bildung der (Cys-SOH), (Cys-SO ₂ H) oder (Cys-SO ₃ H) Derivaten Bildung der Disulfidbrücken (Cys-S-S-Cys) zwischen nebeneinanderstehenden Cys in einem Protein (intramolekulares Cross-linking) oder zwischen zwei Proteinen (intermolekulares Cross-linking) Bildung der Mischungsdisulphide (Cys-S-S-Glutathion) zwischen Sulphydrylgruppe und Glutathion (S-glutathionylation)
Glutaminsäure, Tyrosin, Lysin, Leucin, Valin, Prolin, Isoleucin	Hydroperoxide
Histidine	2-oxo-Histidine
Lysin, Arginin, Prolin, Threonin	Bildung der Carbonylderivate mittels des direkten oxidativen Angriffs der Seitenketten der Aminosäuren (Semialdehyde von Lys, Glutamin Semialdehyde von Arg, 2-Pyrrolidon von Pro, and 2-amino-3- ketobutyrische Säure von Thr)
Lysin, Cystein, Histidin	Bildung der Carbonylderivate nach der Reaktion mit reaktiven Carbonylsubstanzen, die von der Oxidation der Carbohydrate stammen: (Glycooxidation Produkte), Lipide (Malondialdehyd, 4-Hydroxynonenal, Acrolein)
Methionin	Methionin sulphoxid
Phenylalanin	o-Tyrosin, m-Tyrosin
Tryptophan	N-Formylkynureine, Kynurenin, 5-Hydroxytryptophan, 7-Hydroxytryptophan
Tyrosin	3,4-Dihydroxyphenylalanin, 3-Chlorotyrosin, 3-Nitrotyrosin, Dityrosin (Tyr-Tyr Cross-link)

Aufgrund der hohen O₂ –Konzentration ist die Lunge empfindlich gegen Inflammation und resultierende Oxidation. An reaktiven Sauerstoffarten (ROS) spielen vor allem Superoxid (O₂^{•-}), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Hydroxyl-Radikale (OH[•]), an reaktiven Stickstoffarten (RNS) Stickstoffoxid (NO), Peroxynitrit (ONOO⁻) and Stickstoffdioxid eine wichtige Rolle¹⁰. Oxidantien werden von phagozytierenden Zellen als Folge der inflammatorischen Antwort erzeugt (Abb.1.3). Sie dienen der Erregerabwehr. Oxidantien, die bei vermindertem antioxidativen Schutz produziert werden, können allerdings auch schwere Lungenschädigungen verursachen.

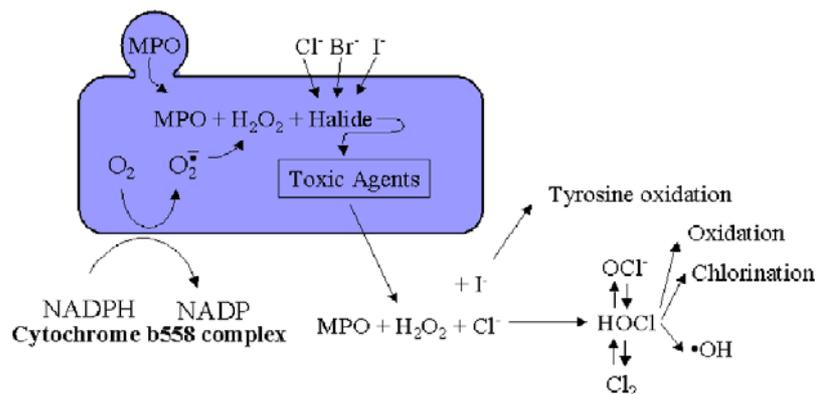


Abbildung 1.3 Darstellung der Erzeugung der Radikale in Neutrophilen. MPO-Myeloperoxidase.

Zusätzlich spielt NO eine vielseitige Rolle als Mediator des inflammatorischen Prozesses. Die potenziellen Quellen des NO in der Lunge sind aktivierte Neutrophile¹¹, Makrophagen¹², alveoläre Typ II Zellen und endotheliale Zellen¹³. Die NO-Synthese wird im Laufe von Inflammationsreaktion durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) verstärkt. iNOS wurde in Atemwegszellen von Patienten mit ARDS^{14,15}, bakterieller Pneumonie¹⁶, Sarkoidose¹⁷, idiopathischer Lungenfibrose und Asthma gefunden. Die Bildung von charakteristischen Modifikationen in Proteinen wie 3-Nitrotyrosine wird kennzeichnend für die endogene Bildung von NO⁻-stammenden Oxidantien betrachtet. Erhöhte Niveaus an 3-Nitrotyrosine sind bei verschiedenen Lungenerkrankungen, die mit Entzündungen verbunden sind, beschrieben worden. Obwohl induzierbare NOS (iNOS) innerhalb von epithelialen Atemwegszellen vorhanden sind, ist ihre Expression innerhalb des Atemwegsepithels von CF Patienten deutlich reduziert¹⁸. Im Sputum sind Nitrate plus Nitrite dagegen während akuter Lungeninfektion erhöht¹⁹. Folglich ist die Rolle der NO[•] oder der von NO⁻-abstammenden Oxidantien in der Pathologie der CF noch nicht ganz geklärt.

Neutrophile und andere mononukleäre Zellen brauchen die Anwesenheit zusätzlicher Moleküle, um die inflammatorische Antwort vollständig zu entwickeln. Hierzu gehören Moleküle der interzellularen Adhäsion (ICAM-1), Selektine und Integrine (CD11/CD18). Zusätzlich zur direkten Toxizität reaktiver Sauerstoffmetaboliten werden auch mehrere für die entzündliche Antwort verantwortliche Gene hochreguliert (wie z.B. Nuklear-Faktor- κ B (NF κ B)). Hierdurch kommt es zu einer Verstärkung der Entzündungsantwort durch Hochregulation verschiedener proinflammatorischer Cytokine und Enzyme wie IL-2, IL-6, TNF- α , iNOS und der Transkription von Genen für Leukozyten-Adhäsions-Moleküle wie E-Selectin, ICAM-1, und VCAM-1²⁰.

1.2 Die Rolle des oxidativen Stresses bei Cystischer Fibrose

Cystische Fibrose (CF) ist eine autosomal rezessive genetische Erkrankung, die durch Veränderungen im CF transmembran-Regulator (CFTR) Gen verursacht wird. Daraus resultieren die Veränderungen im epithelialen Cl⁻ und Wassertransport, vergrößerte Schleimviskosität, reduzierte mukoziliäre Reinigung und verminderte antibakterielle Abwehr innerhalb der Atemwege. Das CFTR-Protein transportiert als Anionenkanal vor allem Chlorid aber auch andere größere organische Anionen, wie z.B. reduziertes Glutathion. Patienten mit CF sind anfälliger für bakterielle Atemwegsinfektionen, meistens durch Staphylokokkus aureus, Haemophilus influenzae oder Pseudomonas aeruginosa. Die Patienten versterben meist an respiratorischer Insuffizienz, die Ergebnis der wiederholten schweren und

chronischen Atemwegsinfektionen ist. Mehrere exokrine Organe, einschließlich der Bauchspeicheldrüse und der Leber sind ebenfalls betroffen. In Ländern, in denen diese Patienten optimal betreut werden, hat sich die Überlebensrate im Durchschnitt auf etwa 30 Jahre erhöht.

Wenn Pathogene auf die Atemwege einwirken, ist die neutrophile Infiltration bei CF-Patienten besonders hoch und so können z.B. sehr junge Patienten die Bakterien sogar ohne Antibiotika beseitigen²¹. Im Krankheitsverlauf nimmt jedoch die Fähigkeit zur Abwehr ab und trotz einer extrem hohen neutrophilen Infiltration können die Bakterien nicht mehr eliminiert werden²². Ein Hauptbestandteil der neutrophil-vermittelten Immunabwehr ist die Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten, wie Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und hypochlorer Säure (HOCl).

Von den antioxidativ wirksamen Substanzen ist bekannt, dass sich initial bei hohem oxidativem Stress die Spiegel von reduziertem extrazellulärem Glutathion (GSH) in der Lunge zunächst erhöhen²³. Es kommt dann rasch zu einem Mangel an extrazellulärem GSH^{24;25}. Daher überwiegen bei CF in der Lunge Funktionsstörungen. Zusätzlich sezernieren *Pseudomonas aeruginosa* und andere CF-pathogene Erreger Siderophoren wie Pyocyanin und Pyochelin, die auch Oxidantien erzeugen und so zum epithelialen Schaden bei CF beitragen.

Das Vorhandensein von oxidativem Stress in den Atemwegen von CF Patienten wird durch verschiedene Berichte belegt, die einen verminderten Antioxidantien-Status und Hochindizes der Oxidation von Lipiden, Proteinen, oder DNA zeigten^{24;26;27}. Die Malabsorption fettlöslicher Antioxidanten wie Vitamin E und A tragen zu einem reduzierten Antioxidantien-Status innerhalb der Atemwege von CF Patienten bei²⁸.

1.3 Surfactant Proteine

Surfactant ist ein komplexes Gemisch, das aus Phospholipiden, neutralen Lipiden und Proteinen besteht. Es wird von Typ II Pneumozyten gebildet und in die Lungenalveolen sezerniert, wo es die Oberflächenspannung an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht auf ein Minimum senkt und somit das Kollabieren der Alveolen während der Expiration verhindert.

Die Lipide haben einen Anteil von ca. 90% an Surfactant, wobei Phospholipide am stärksten vertreten sind. Den Hauptanteil an den Phospholipiden macht Phosphatidylcholin aus, das zu 65% in gesättigter Form (Dipalmitoylphosphatidylcholin) vorliegt. Insbesondere diese gesättigte Form ist sehr wichtig zur Herstellung einer niedrigen Oberflächenspannung.

Die Proteine machen ca. 10% des Surfactant aus. Es werden zwei Typen von Surfactantproteinen unterschieden: die hydrophilen Surfactantproteine SP-A und SP-D und die hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C. Insbesondere den Surfactantproteinen SP-A und SP-D wird eine wichtige Bedeutung im Immunsystem der Lunge zugeschrieben²⁹⁻³².

1.4 Struktur, Synthese und Organisation der Surfactantproteine A und D

Die beiden hydrophilen Glykoproteine SP-A und SP-D gehören zur Familie der Collectine. Dazu zählen auch das Mannan-bindende Lectin (MBL), das bovine Conglutinin und das Collectin 43 (CL-43). Diese Moleküle hat man Collectine genannt, da sie in ihrer Struktur sowohl einen kollagenartigen Anteil aufweisen als auch einen Lektinanteil haben, mit dem sie kalziumabhängig Kohlenhydratsequenzen erkennen und binden können (carbohydrate recognition domain, CRD). Collectine spielen eine Rolle in der angeborenen, unspezifischen Immunabwehr³³⁻³⁵.

Die einzelne Polypeptidkette der Collectine besitzt am C-terminalen Ende die Kohlenhydratbindungsstelle (CRD), anschließend eine kurze Verbindungsdomäne (neck region), dann eine kollagenähnliche Region (collagen-like domain) und schließlich eine kurze N-terminale, glycinreiche Disulfid-Domäne (N-terminal domain). Jeweils drei solcher Monomere sind zu einem Trimer vereint.

SP-A besteht aus 18 einzelnen monomeren SP-A-Molekülen, wobei das SP-A-Monomer ein Molekulargewicht von ungefähr 26-35 kDa hat. Sechs Trimere sind über die Kollagendomäne wie ein Blumenstrauß organisiert und bilden das polymere SP-A.

Ein einzelnes SP-D-Monomer hat ein Molekulargewicht von ca. 43 kDa. SP-D ist aus 12 SP-D-Molekülen zusammengesetzt, wobei auch hier wieder drei Monomere zu einem Trimer angeordnet sind und vier Trimere das kreuzartige SP-D-Polymer bilden. Die kollagenähnliche Region des SP-D ist viel länger als die von SP-A³⁶.

Weiterhin wurde ein SP-D-Monomer mit einem Molekulargewicht von 50 kDa beschrieben. Diese Form entsteht durch posttranslationale Glykosylierung und wird nicht zu höhermolekularen Oligomeren organisiert³⁷.

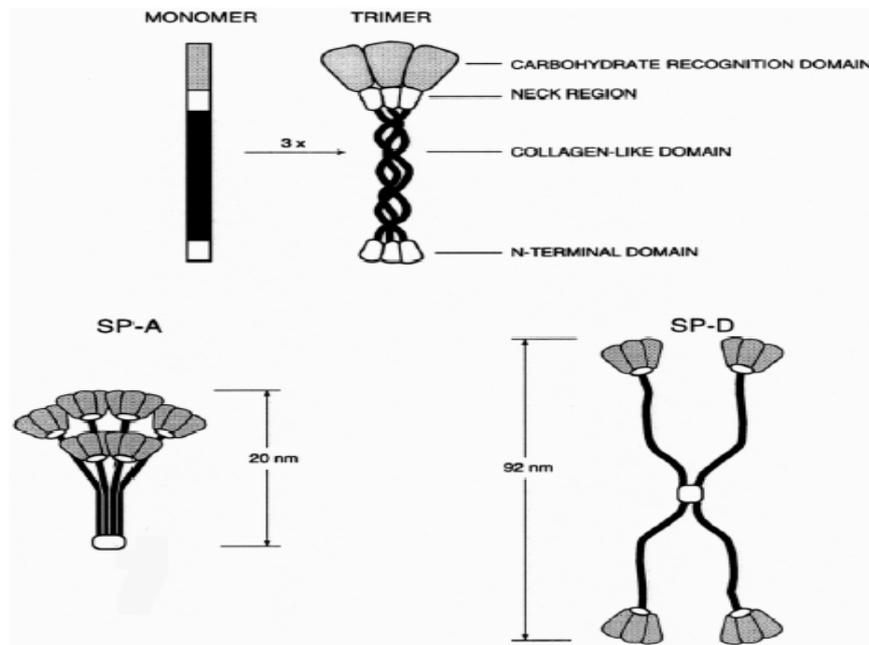
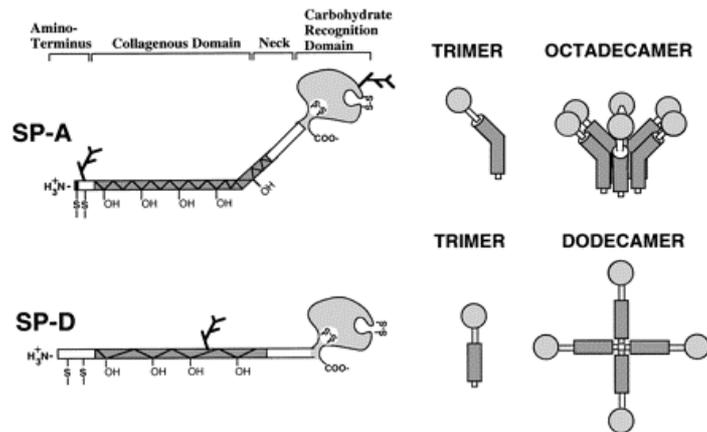


Abbildung 1.4 Struktur von SP-A und SP-D

1. Herstellung der C-terminalen Domäne
2. Trimerisation der Neckregion
3. Triple Helix Formation und Disulphid Crossbindung zwischen Monomeren
4. Assoziierung der Trimeren durch Disulphidbrücken in Dodecamere
5. Reifung durch Glykosilierung

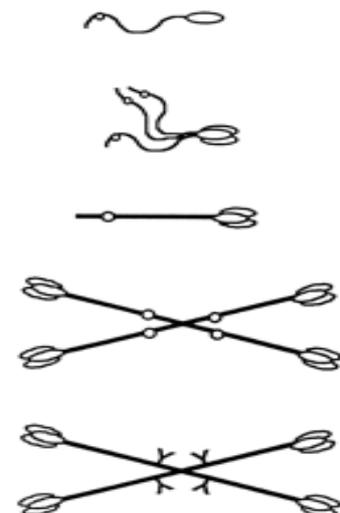


Abbildung 1.5 Reifung des Surfactant Protein D nach ³⁸ mit Änderungen.

Die Gene für SP-A und SP-D wurden auf dem langen Arm des Chromosoms 10 (10q22.2-23.1) lokalisiert^{39;40}. Humanes SP-A wird von zwei Genen, SP-A1 und SP-A2 codiert, während SP-D nur von einem einzelnen Gen codiert wird^{41;42}.

SP-A und SP-D werden in der Lunge sowohl von Typ-II-Pneumozyten als auch in den Clara-Zellen der Bronchioli gebildet, SP-A wird auch in trachealen Drüsenzellen exprimiert. Beim Menschen wird SP-A unabhängig von den lamellären Einschlüssen in Typ-II-Zellen transloziert und ist dann im Alveolarraum an tubuläres Myelin gebunden. SP-D ist im endoplasmatischen Retikulum der Typ-II-Zellen gefunden worden. Der größte Teil von SP-D liegt in löslicher Form im wässrigen Überstand, SP-A nahezu vollständig als Lipid-Protein-Komplex vor⁴³⁻⁴⁵.

SP-D bzw. ihre mRNA wird nicht nur in der Lunge, sondern auch in den Epithelien nahezu aller inneren Organe nachgewiesen^{46;47}.

1.5 Funktion der Surfactantproteine A und D

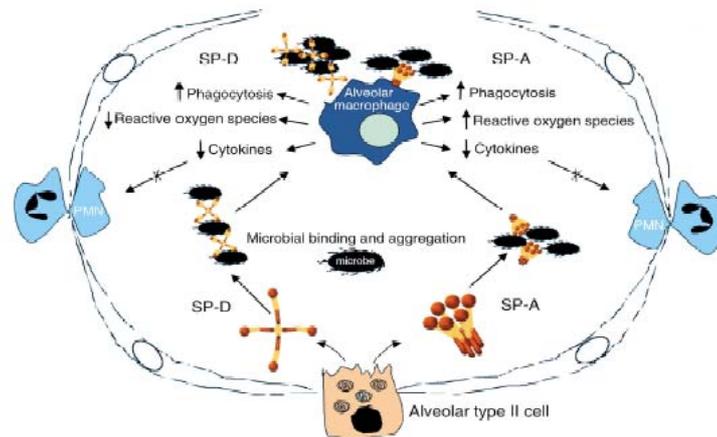


Abbildung 1.6 Schema der Rolle der SP-A und SP-D in der alveolären Verteidigung nach⁴⁸.

SP-A und SP-D können eine Vielzahl von Mikroorganismen wie Viren, Bakterien und Pilze, aber auch Lipopolysaccharide (LPS, Endotoxin) und Allergene binden^{49;50}. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass eine der Hauptfunktionen der beiden hydrophilen Surfactantproteine in der angeborenen, unspezifischen Immunabwehr liegt. In den meisten Fällen spielt bei der Bindung der Pathogene die CRD eine wichtige Rolle⁵¹. Die Bindung der Collectine an die Krankheitserreger führt in einigen Fällen zu deren Agglutination, wodurch die Mikroorganismen über die mukoziliäre Clearance leichter entfernt werden können⁵².

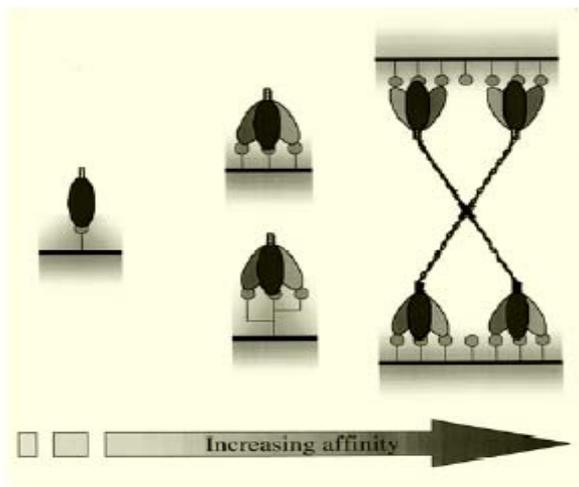


Abbildung 1.7 Erhöhte Affinität durch Multimerisation. Erhöhung in Affinität für SP-D Bindung zum Ligand z.B. Bakterie.

Monomer (links) , Trimer, Multimer und entsprechende Zunahme der Affinität sind gezeigt. Nach ³¹.

Sowohl SP-A als auch SP-D interagieren über spezifische Bindungsstellen mit Makrophagen. Dadurch kann die Phagozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen gesteigert werden. Darüberhinaus können SP-A und SP-D durch Bindung an Makrophagen deren Chemotaxis verstärken^{53;54}. Neben der Beeinflussung der Phagozytose und Chemotaxis ist für SP-A und SP-D auch eine Verstärkung des „respiratory burst“ der Makrophagen nachgewiesen: durch die Bildung reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen kann die Elimination von Mikroorganismen unterstützt werden^{55;56}.

Andererseits wird die von den T-Zellen ausgehende Immunantwort durch SP-A und SP-D moduliert, um eine Überreaktion des Immunsystems zu verhindern. Erreicht wird dies durch eine verminderte Ausschüttung von Zytokinen und eine Proliferationshemmung der T-Zellen^{57;58}.

Um die Funktion der Surfactantproteine SP-A und SP-D in vivo untersuchen zu können, wurden Studien mit Knockout-Mäusen durchgeführt. Bei Mäusen ohne SP-A war die Surfactanthomöostase und die Atemfunktion nicht wesentlich beeinträchtigt, allerdings waren die Mäuse anfälliger für bakterielle Infektionen^{59;60}.

Mäuse ohne SP-D hingegen zeigten Störungen in der Surfactanthomöostase und das Auftreten von atypischen Alveolarmakrophagen. Außerdem kam es zu einer chronischen Inflammationsreaktion mit Fibrose- und Emphysembildung⁶¹⁻⁶⁴.

Die Oxidantien-Produktion und die Bildung reaktiver Sauerstoff-Arten waren in Lungen von SP-D (-/-) Mäusen vergrößert, die NF-kappaB und die MMP Expression waren aktiviert. SP-D spielt unerwartet eine hemmende Rolle in der Regulierung von NF-kappaB in alveolären Makrophagen⁶⁵.

Tabelle 1.2 Biochemische und biophysische Eigenschaften der Surfactantproteine nach ³³.

Eigenschaft	SP-A	SP-D
Genprodukt	2	1
Monomer Größe	30-35 kDa	43 kDa
N-verbundene Zucker	1 bei Asn187 in CRD	1 bei Asn70 in Collagen-Domäne
Predominanter Stand der Oligomerisation	6 Trimere=18 Ketten	4 Trimere=12 Ketten
Stoke's Radius	110-120 Å	178 Å
Sedimentationskoeffizient	14S	S _{20,w} =8,9
Ladung (pI)	Sauer (4,2-5,0)	Basisch (5,2-8+)
Länge der dreifachen Helixdomäne	20 nm	46 nm
Max. Distanz zwischen CRD	20 nm	110 nm

Die hydrophile Surfactantproteine SP-A und SP-D können die Surfactant-Phospholipide und Makrophagen direkt vor oxidativem Schaden schützen. Beide Proteine blockieren die Anhäufung von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen und konjugierten Dienen während der Kupfer-induzierten Oxidation. Der Wirkungsmechanismus ist noch nicht klar, schließt jedoch die Metallionen Chelation oder oxidative Modifizierung der Proteine nicht ein⁶⁶.

SP-A kann schädliche oxidative Wirkungen auf die biophysikalische Eigenschaften von Surfactant hemmen.

Tabelle 1.3 Die Rolle der Collectine bei der Lungenhomöostase nach ⁶⁷.

	SP-A	SP-D
Abwehrfunktion		
Agglutination	-	++
Opsonisierung	++	+
Verminderte Virusinfektivität	+	++
Modulierung der Entzündung	+	+
Surfactantfunktion		
Bildung des tubulären Myelins	+	-
Inaktivierung durch Seruminhibitoren	+	-
Surfactanthomöostase, knock out Mäuse	-	+
Lungenstruktur		
Regulation der Lungenremodellierung	-	+

1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit war eine Vergleichsanalyse der Proteinoxidation in der BALF bei Patienten mit verschiedenen inflammatorischen Lungenerkrankungen.

Wir stellten die Hypothese auf, dass bei entzündlichen Lungenerkrankungen, die vorwiegend von neutrophiler Inflammation begleitet werden, eine Abhängigkeit zwischen dem Ausmaß der Oxidation der Proteine der BALF und der Inflammation besteht. Dabei wurde auch untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen Proteinoxidation und Lungenfunktion gibt.

Es standen BAL-Proben von Patienten mit CF vor und nach Inhalation von Glutathion zur Verfügung. Hier wurde der Einfluss der Therapie auf verschiedene Marker des oxidativen Status untersucht.

Darüber hinaus wurden Surfactantproteine A und D hinsichtlich Änderungen ihrer Struktur und Funktion im Zusammenhang mit ihrer Oxidation untersucht.

Es ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Wie groß ist das Ausmaß der Oxidation der Proteine des BALF von Patienten mit verschiedenen Lungenerkrankungen?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen Zahl der neutrophilen Granulozyten in der BALF und Ausmaß der Proteinoxidation?
- Gibt es Unterschiede in Abhängigkeit von der Lungenfunktion?
- Welche Proteine sind gegenüber Oxidation besonders sensitiv?
- Was sind die Auswirkungen einer antioxidativen Behandlung mit inhalativem Glutathion bei Patienten mit Mukoviszidose?
- Ändert sich die makromolekulare Organisation von SP-D nach der Oxidation?
- Ändern sich die funktionellen Eigenschaften von SP-D nach der Oxidation?

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

2.1.1 Cystische Fibrose

Es wurden insgesamt 55 Patienten mit Mukoviszidose im Alter von 5,2 bis 36,7 Jahren (Median-15,3) untersucht. Die Diagnose wurde auf Grund der Anamnese, des klinischen Befundes sowie des positiven Schweißtestes und des Nachweises Mukoviszidose-spezifischer Genveränderungen verifiziert.

Alle Patienten waren im Rahmen verschiedener klinischer Studien untersucht worden. Das Einverständnis für die Untersuchung der Lavageproben hinsichtlich des oxidativen Status lag vor. Die Studien waren durch die Ethikkommission der LMU genehmigt worden. Bei allen Patienten wurden in der Bronchoskopie entzündliche Veränderungen unterschiedlichen Schweregrades gefunden.

Tabelle 2.1 CF-Patienten

Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)	BMI (kg/m ²)	CFTR
CF-1	m	32,3	25,38	2789+5G-A
CF-2	w	27,6	20,32	G551D
CF-3	m	18,8	19,74	DF508
CF-4	w	15,5	22,89	dF508/dF508
CF-5	m	14,0	14,98	dF508
CF-6	m	12,3	14,82	DF508
CF-7	w	14,3	20,77	dF508/df508
CF-8	m	9,9	16,43	KM 19-2/XV2-1
CF-9	w	14,1	16,17	df508
CF-10	w	16,3	20,88	DF 5808
CF-11	m	12,9	15,21	DF508
CF-12	m	13,6	14,84	DF508
CF-13	w	14,0	16,94	dF508
CF-14	m	11,7	15,77	DF 508
CF-15	w	12,8	18,97	DF508
CF-16	w	17,4	23,15	dF508/dF508
CF-17	m	17,1	18,13	fehlt
CF-18	w	13,7	20,79	DF 508
CF-19	m	8,5	17,59	dF508
CF-20	w	13,8	18,33	dF508
CF-21	w	13,9	20,45	DF 508
CF-22	w	7,7	14,76	DF508
CF-23	m	11,0	13,97	DF508
CF-24	m	11,9	18,43	DF 508
CF-25	m	9,3	15,61	DF 508
CF-26	w	9,6	15,15	dF508
CF-27	m	21,7	33,60	unbekannt

CF-28	m	18,1	22,10	dF508
CF-29	w	9,0	14,79	DF508
CF-30	m	15,1	23,18	dF508
CF-31	m	11,1	15,83	dF508
CF-32	m	20,0	33,02	unbekannt
CF-33	m	5,2	14,61	dF508
CF-34	w	15,5	17,72	DF 508
CF-35	w	17,1	21,77	DF508
CF-36	m	13,1	15,55	R5553Xhetero
CF-37	w	13,1	16,97	DF508
CF-38	w	12,2	17,09	DF508
CF-39	w	17,1	16,34	dF508/dF508
CF-40	m	15,5	15,27	dF508/dF508
CF-41	w	17,0	25,47	dF508/dF508
CF-42	w	36,4	19,88	dF508/dF508
CF-43	m	19,1	19,79	dF508/dF508
CF-44	m	35,5	22,02	R 347 P Q 493x
CF-45	m	36,7	22,93	dF508/dF508
CF-46	m	24,1	18,77	dF508/dF508
CF-47	m	21,7	18,83	dF508/-
CF-48	w	18,0	19,57	dF508/dF508
CF-49	w	26,8	22,64	dF508/-
CF-50	m	16,8	20,44	dF508/-
CF-51	w	21,9	20,23	dF508/-
CF-52	m	29,5	22,79	R553/-
CF-53	w	18,0	23,42	dF508/dF508
CF-54	m	19,4	fehlt	dF508/-
CF-55	w	21,0	fehlt	dF508/dF508

Abkürzungen: BMI= body mass index, CFTR-cystic fibrosis transmembrane regulator

2.1.2 Chronische Bronchitis

Die 20 Patienten aus der Bronchitis-Gruppe litten vor der BAL an einem chronischen Husten von mindestens dreimonatiger Dauer. Die Kinder waren zum Zeitpunkt der BAL zwischen 1,9 und 15,2 Jahren alt (Median 6,8).

Als chronische Bronchitis wurden chronische oder chronisch rezidivierende Atemwegssymptome wie Husten oder Rasselgeräuschen mit oder ohne Atemwegsobstruktionen, mit oder ohne Infektassoziation und nach Ausschluss von Mukoviszidose, immotilem Ziliensyndrom und Fehlbildungen der Atemwege definiert. Von den behandelnden Ärzten wurde nicht die Bezeichnung Asthma vergeben.

Bei allen Kindern wurden in der Bronchoskopie entzündliche Veränderungen unterschiedlichen Schweregrades gefunden.

Die klinischen Parameter sind in der Tabelle dargestellt.

Tabelle 2.2 Kinder mit chronischer Bronchitis

Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)	Bronchoskopiebefund	Schweißtest
B1	m	8,0	Geringe Bronchitis mit wenig glasigem Sekret	normal
B2	w	7,2	Deutliche Tracheobronchitis, ausgeprägte eitrig-schleimige Tracheobronchitis v. a. in Trachea und linkem Bronchialsystem	normal
B3	w	11,2	Zeichen der chronischen Tracheobronchitis mit weißlich-glasigem Schleim; ringförmige Einengung des rechten ML-Bronchus durch Leiste, ca. auf 30% verengt	n.d.
B4	m	5,3	Hauptbronchusstenose links ca. 80%	n.d.
B5	w	15,2	Ausgeprägte chronische Tracheobronchitis, atrophierend, deutl. zähes weißliches Sekret	normal
B6	m	2,5	Subglottische Candidiasis, Tracheobronchitis	normal
B7	w	7,2	Trachea mit Zeichen der ausgeprägten Tracheobronchitis mit Sekret und Hyperämie, eitrig wirkendes Sekret	normal

B8	m	7,9	Diskrete Entzündungszeichen der supraglottischen Schleimhaut, geringgradige Konturunregelmäßigkeiten der Stimmlippen beidseits; ausgeprägte Tracheobronchitis; Hinweis auf ösophagotracheale Fistel	n.d.
B9	m	1,9	Nur geringe Schleimhautentzündung	normal
B10	w	5,3	Ausgeprägte entzündliche Veränderungen an Trachea und Bronchien; pulsierende Stenose der Trachea von ca. 20%	n.d.
B11	w	9,6	Tracheobronchialbaum bis auf leichte Hyperämie, unauffällig	normal
B12	m	9,3	Mäßige chronische Entzündungsreaktion in der Trachea; in den Bronchien viel gelblich-weißliches Sekret; normale Anatomie; Stenose in 2 Subsegmentbronchien	normal
B13	w	3,4	Einengung der Trachea im Bereich der Truncus bracheocephalicus von ca. 50%, 20%iges Restlumen d. li. Stammbronchus	n.d.
B14	m	4,6	Ober-, Mittel- und Unterlappen-Bronchien-entzündlich veränderte Schleimhaut	normal
B15	w	6,4	Mäßig entzündetes Bronchialsystem mit unauffälliger Anatomie; größte Entzündungsaktivität im rechten Unter- und Mittellappen	normal
B16	w	5,4	ausgeprägte Tracheobronchitis mit Schleimhautatrophie, kaum Sekret	normal
B17	m	2,0	n.b.	normal
B18	m	2,4	Leichte Hyperämie und etwas glasiges Sekret, jedoch kein Hinweis auf eitriges Sekretion oder rezidivierende Aspiration	normal
B19	w	11,3	Subglottische Stenose von etwa 20%; deutliche entzündliche Schleimhautreaktion distal	n.d.
B20	m	12,0	Tracheobronchitis, erhebliche Adenoide	n.d.

Abkürzungen: n.b.-nicht bekannt, n.d.-nicht durchgeführt

2.1.3 Tracheostoma

Die 15 Patienten aus der Tracheostoma-Gruppe litten vor der BAL an verschiedenen Grunderkrankungen. Bei diesen Kindern wurde eine bronchoalveoläre Lavage zur Quantifizierung der broncho-alveolären Entzündungsreaktion durchgeführt. Die Kinder waren zwischen 0,5 und 18,5 Jahren alt (Median 4,5).

Alle Kinder hatten 4 Wochen vor der Untersuchung keine akuten Symptome von Seiten der Atemwege.

Tabelle 2.3 Patienten mit Langzeittracheostoma

Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)	TS-Dauer	Ursache für TS	Grunderkrankung
T-1	w	4,5	11	4,5	Gaumenspalte	Pierre-Robin-Syndrom
T-2	m	5,2	20	5,1	Laryngomalazie	Spina bifida, Hydrocephalus
T-3	m	2,3	11	2,2	Larynxanomalie	Mikrozephalus
T-4	m	18,8	25	1,5	hoher Querschnitt nach neurochirurgischer OP	Mukopolysaccharidose Typ IV
T-5	w	6,2	15	4,9	ehemaliges FG, Larynxstenose	frühgeborene
T-6	w	11,5	25	10,9	Laryngomalazie	Z.n. Herz-OP bei PDA, VSD
T-7	w	4,9	11	4,4	Muskeldystrophie	Dysmorphie-Syndrom, Lungenhypoplasie
T-8	w	2,8	12	2,5	subglottisches Hämangiom	VSD
T-9	m	1,8	14	0,2	Rhabdomyosarkom Unterkiefer links	keine
T-10	w	9,2	22	7,7	subglottisches Hämangiom	Aortenisthmusstenose
T-11	w	0,8	7,5	0,7	glottische und subglottische Hämangiome	rez. Bronchopneumonien, VSD
T-12	m	2,3	15	0	Ateminsuffizienz	Arthrogryposis multiplex congenita Typ I
T-13	m	3,8	15	2,2	Larynxdiaphragma	Fraser-Syndrom
T-14	m	6,5	17	6,2	Larynxanomalie	Dysostosis mandibulofacialis
T-15	m	0,5	5	0,4	Laryngomalazie, Larynxstenose	Mikrodeletion 22q11

Abkürzungen: TS-Tracheostoma, TS-Dauer (Bestehen des Tracheostomas bei Lavage), FG (Frühgeborenes), OP (Operation), PDA (persistierender Ductus arteriosus), ASD (Vorhofseptum-defekt), VSD (Ventrikelseptumdefekt).

2.1.4 Interstitielle Pneumonitis

Interstitielle Lungenerkrankungen sind interstitielle Pneumopathien unterschiedlicher Ätiologie, die im Kindersalter viel seltener als bei Erwachsenen sind. Klinisch ausgeschlossen wurden chronische Bronchitiden und suppurative Lungenerkrankungen. Die Gruppe der interstitiellen Pneumonien umfasste ein heterogenes Spektrum von Krankheiten.

Die 12 Patienten dieser Gruppe waren zwischen 4,5 und 15,5 Jahre alt (Median-9,7). Zusätzlich zum charakteristischen klinischen Verlauf fanden sich die typischen radiologischen Veränderungen. Im Röntgenthorax waren dies retikuläre, feinstreifige oder feinfleckigen Aufhellungen. Auch diffuse „Milchglastrübungen“ wurden dazugerechnet. Im CT wurden retikuläre Verdichtungen, streifige oder knotige Veränderungen verschiedener Grösse, emphysematöse Bezirke, „Milchglastrübungen“, verbreiterte, irreguläre interlobäre Septen, pleurale und fissurale Oberflächen und Bronchialwandverdickungen dazu gerechnet⁶⁸. Auf Grund der Seltenheit sind fast alle dieser Kinder als Einzelfälle zu betrachten. Eine Reihe dieser Patienten wurde exemplarisch als Fallbeschreibungen ausgearbeitet.

Tabelle 2.4 Patienten mit interstitiellen Pneumonien

Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)	Lungenschädigung	Diagnose
I.P.-1	m	14,3	interstitiell	EAA
I.P.-2	w	7,2	interstitiell	Int.Pneumonie unklarer Genese
I.P.-3	m	13,8	interstitiell	Int.Pneumonie unklarer Genese
I.P.-4	m	13,2	interstitiell	Lungenhämorrhagien, Hämoptysen, Fieber, Dyspnoe
I.P.-5	m	9,7	interstitiell	Lungenhämorrhagien, Hämoptysen, Fieber, Dyspnoe
I.P.-6	m	8,3	interstitiell	rheumatische Erkrankung mit pulmonaler Beteiligung
I.P.-7	m	fehlt	interstitiell	Lungenhämosiderose
I.P.-8	m	5,3	interstitiell	EAA
I.P.-9	m	4,5	interstitiell	Sarkoidose
I.P.-10	m	15,5	interstitiell	Lungenhämorrhagien, Hämoptysen, Fieber, Dyspnoe
I.P.-11	w	7,6	Immunsuppression	Interstitielle Pneumonie bei chronischer Granulomatose
I.P.-12	m	12,2	interstitiell	Hämoptysen, Hämoptysen bei Infekt der oberen Atemwege

Abkürzungen: EAA-exogene allergische Alveolitis

2.1.5 Pneumonie

Die Gruppe von Patienten mit Pneumonie bestand aus Kindern im Alter von 0,3 bis 10,3 Jahren (Median-5,9), die verschiedene Grunderkrankungen hatten.

In diese Gruppe wurden solche Kinder ausgewählt, die klinisch eine Pneumonie hatten und ein Infiltrat im Röntgenthorax und/oder CT-Aufnahmen innerhalb von 2 Wochen vor der BAL aufwiesen. Neben immunologisch gesunden Patienten wurden auch Kinder mit therapieresistentem Infiltrat/Pneumonie bei Immundefekt (primär oder sekundär durch immunsuppressive Therapie) eingeschlossen. Patienten mit CF, Fehlbildungen oder immotile Zilien Syndrom wurden ausgeschlossen.

Tabelle 2.5 Patienten mit Pneumonien

Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)	Diagnose	Grunderkrankung
P-1	w	6,0	Pneumonie	rez.Husten unklarer Genese
P-2	m	10,3	Pneumonie	AML
P-3	w	5,3	Pneumonie	Pneumonie
P-4	m	6,0	Pneumonie	Pneumonie
P-5	m	8,7	Immunsuppression	AML
P-6	m	2,8	Immunsuppression	AML
P-7	m	10,1	Immunsuppression	Granulozytendefekt
P-8	m	4,6	Pneumonie	Immunsuppression
P-9	w	5,9	Immunsuppression	Pneumocystis carinii-Pneumonie bei HIV
P-10	m	1,0	Pneumonie	-
P-11	m	0,3	Pneumonie	-

Abkürzungen: AML-akute myeloblastische Leukemie

2.1.6 GERD

Die Diagnose GERD wurden mittels speziellen intraösophagealen pH-Metrie bestätigt.

Alle Kinder hatten als Grunderkrankung Asthma bronchiale oder chronische Bronchitis.

Tabelle 2.6: Patienten mit GERD

Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)	Grunderkrankung
R-1	m	2,6	GÖR, intrinsisches Asthma
R-2	w	2,3	GÖR, interstitielle Pneumopathie
R-3	w	3,1	GÖR, intrinsisches Asthma
R-4	m	3,4	GÖR, intrinsisches Asthma
R-5	m	2	GÖR, intrinsisches Asthma
R-6	m	2,8	GÖR, intrinsisches Asthma, BPD
R-7	w	5,4	GÖR, intrinsisches Asthma
R-8	m	15,7	GÖR, intrinsisches Asthma
R-9	w	3,2	GÖR, intrinsisches Asthma
R-10	m	3,4	GÖR, intrinsisches Asthma

R-11	m	2,9	GÖR, chronische Bronchitis
R-12	w	5,7	GÖR, chronische Bronchitis
R-13	m	3	GÖR, intrinsisches Asthma
R-14	m	5,5	GÖR, allergisches Asthma
R-15	m	4,7	GÖR, intrinsisches Asthma
R-16	w	15,8	GÖR, idiopathische Bronchiektasie

Abkürzungen: GÖR- Gastroösophagealer Reflux, BPD-Bronchopulmonale Displasie

2.1.7 Pulmonale Alveolarproteinose (PAP)

Die Gruppe der Patienten mit PAP schließt 9 Kinder und 1 erwachsenen Patienten mit dieser seltenen Erkrankung ein. Prinzipielle therapeutische Option ist die bronchoalveoläre Lavage der gesamten Lunge, mit dem Ziel diese von überschüssigem Surfactantmaterial freizuspülen. Die Diagnose ist auf der Analyse der Lavageflüssigkeit und der Lungenbiopsie basiert.

Tabelle 2.7: Patienten mit PAP

Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)	Grund erkrankung	Diagnose	Verlauf	Therapie
AP-1	w	39,5	PAP	BAL	Dyspnoe	sequentielle BAL
AP-2	w	1,1	PAP	BAL	Dyspnoe	sequentielle BAL
AP-3	m	1,5	PAP	OLB	Dyspnoe, Husten	O ₂ , sequentielle BAL
AP-4	w	2,6	PAP	OLB, BAL	Febriles Husten, Dyspnoe	sequentielle BAL
AP-5	m	0,1	PAP congenital	BAL	Gestorben im Alter 5 Monate	Mechanische Ventilation
AP-6	m	2,4	PAP	OLB	Dyspnoe, Husten	sequentielle BAL
AP-7	m	0,8	PAP	OLB, BAL	Dyspnoe, Husten	sequentielle BAL
AP-8	m	0,6	PAP	BAL	Dyspnoe, gestorben im Alter 20 Monate	O ₂ , sequentielle BAL
AP-9	m	2,9	PAP	OLB, BAL	Dyspnoe	sequentielle BAL
AP-10	m	3,9	PAP	BAL	Dyspnoe	O ₂ , sequentielle BAL

Abkürzung: OLB-“open lung biopsy”.

Negativ- und positivkontrolle für Anti-DNPH-Immunofärbung wurde auf 2-D Gelen von Serum der gesunden Person G-1, m, 27 Jahre gemacht.

2.2 Durchführung der bronchoalveolären Lavage

Die Bronchoskopie wurde in Anästhesie mittels eines flexiblen Bronchoskops mit einem Durchmesser von 3,5 mm (Kinder < 10 Jahre) bzw. von 4,9 mm (Kinder > 10 Jahre) durchgeführt. Das Bronchoskop wurde in ein Subsegment des Mittellappens, der Lingula oder an die betroffene Region der entsprechenden Lungenhälfte lumenverschießend (sogenannte „Wedge Position“) eingeführt. Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) wurde mit 4 ml/kg Körpergewicht (jedoch maximal 50 ml) steriler Kochsalzlösung, auf Körpertemperatur vorgewärmt, in 4 Portionen á 1ml/kg durchgeführt. Die gewonnene BALF wurde durch eine Lage sterile Nitex-Gaze gefiltert. Die erste Fraktion wurde getrennt und die nachfolgenden Fraktionen wurden gepoolt weiterverarbeitet. Als „Recovery“ wurde der wiedergewonnene Anteil an der Gesamtlavage berechnet.

2.3 Methoden

2.3.1 Oxidation

Methode der *in vitro* Oxidation:

Die Proteine wurden, wenn nötig künstlich mit Hilfe des freie Radikale Generators α,α -Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride ($C_8H_{18}N_6 \cdot 2HCl$) oxidiert. Diese Substanz erlaubt eine stabile Generation freier Radikale bei 37 Grad. Durch Abkühlung auf +4 Grad kann die Reaktion gestoppt werden und der Oxidant mit der Dialyse oder im Mikrokonzentrator entfernt werden.

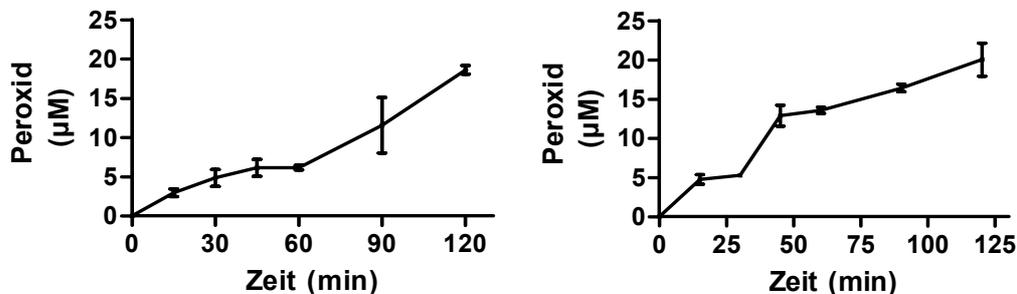
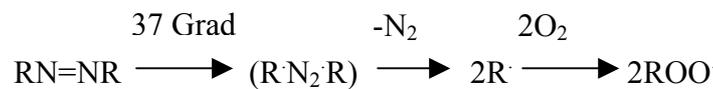


Abbildung 2.1 Darstellung der Änderung der Peroxidkonzentration nach *in vitro*-Oxidation von BAL Proben von PAP-Patienten (Proteinkonzentration 980 µg/ml) (links) und von gereinigtem SP-D (500 ng/ml) (rechts) durch Oxidation mit AAPH (12,5 mM). Die Konzentration der Peroxide wurde mittels Peroxoquant Peroxide Assay Kit (Pierce) bestimmt.

2.3.2 Quantitative Bestimmung der Carbonylgruppen in Proteinen

Es gibt eine große Vielfalt von Oxidationsprodukten, von welchen einige in Tabelle 2.8 dargestellt sind:

Tabelle 2.8 Produkte der Oxidation

Zielstruktur	Oxidativ induzierte Veränderung
Schwefelgruppen	Cys Disulfide, S-Thiolation, Met sulfoxid
Lys, Arg, Pro	Seitenkette Aldehyde, Ketone (Proteincarbonyle)
Tyrosine	Krosslinking, Chlorination, Nitrosation, Hydroxilation
aliphatische Aminosäuren	Hydro(pero)xyderivate
Aminosäure Interkonventionen	z.B. His zu Asn; Pro zu OH-Pro
Proteine und Peptide	Krosslinking, Aggregation, Zersplitterung der Peptidverbindungen

Diese Arbeit fokussiert auf der Bestimmung von Proteincarbonylen. Wesentliche Eigenschaften der Carbonyle sind in Tabelle 2.9 dargestellt.

Tabelle 2.9 Eigenschaften der Carbonylgruppen

1. Carbonylgruppen sind stabil (hilft bei der Detektion und Aufbewahrung)
2. in kleinen Mengen in fast allen Proteinproben vorhanden (~1 nmol/mg Protein ~ 0.05 mol/mol ~ 1/3000 Aminosäuren)
3. 2-bis 8-fache Erhöhung der Proteincarbonyle unter Bedingungen des oxidativen Stresses in vivo
4. können in vitro mit fast allen Arten an Oxidantien induziert werden
5. Sensitive Assays sind verfügbar (≤ 1 pmol)

2.3.3 Bestimmung der Proteincarbonyle

Die kolorimetrische Bestimmung der Proteincarbonyle basiert auf der spezifischen Eigenschaft des 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) mit Carbonylgruppen in Proteinen zu reagieren. Die entstandenen Hydrasone haben eine maximale Absorption bei 370 nm und können so quantitativ gemessen werden.

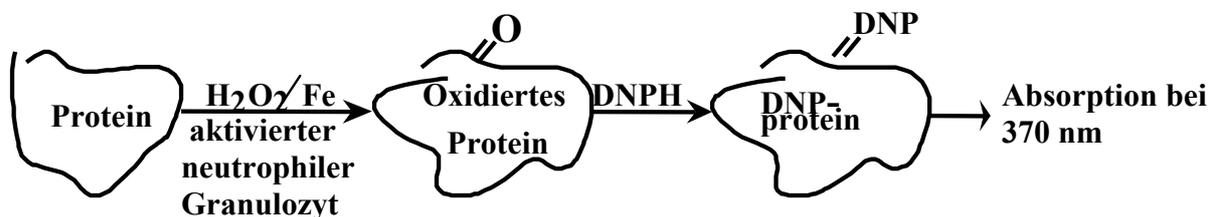


Abbildung 2.2 Prinzip der kolorimetrischen Bestimmung der Carbonylgruppen in Proteinen

2.3.4 Standard

Eine Standardreihe von Proteinen mit verschiedenem Oxidationsgrad wurde vorbereitet. Hierzu wurde bovines Serumalbumin (BSA) mit verschiedenem Gehalt an Carbonylen hergestellt. Um verschiedene Carbonylkonzentrationen zu erhalten, wurde maximal oxidiertes BSA und Natrium borohydrid-behandeltes maximal reduziertes BSA in verschiedenen Proportionen gemischt. Diese Standards wurden mit der kolorimetrischen Technik analysiert, um den Carbonylgehalt zu bestimmen.

2.3.5 Kolorimetrische Bestimmung der Proteincarbonyle⁶⁹

1) Vorbereitung des oxyBSA:

Zuerst wurde eine Lösung von BSA mit 1 mg/ml in 20 mM Tris, pH 7.4 hergestellt. Diese Lösung wurde nach der Inkubation in 1 mM H₂O₂ und 1 mM FeSO₄ bei Raumtemperatur 10 min oxidiert.

Die oxidierten Proteine wurden mit gleichem Volumen an 20% Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert. Nach der Zentrifugation bei 1000*g 10 min wurde der Überstand abgegossen und die Proteinpellets dreimal mit TCA gewaschen, um den Überschuß an H₂O₂ und FeSO₄ zu entfernen. Das Proteinpellet wurde in 85.7 mM Tris, 0.857 mM EDTA, 20mM NaOH Puffer, pH 8.5 resuspendiert. Ein weiterer Teil des Proteinpellets wurde im gleichen Puffer, der aber zusätzlich die reduzierende Substanz 20 mM NaBH₄ enthielt, resuspendiert und bei 37 Grad über 30 min inkubiert.

Die Proteinkonzentration der resuspendierten Proteine wurde nach Bradford bestimmt.

Der Carbonylgehalt des oxidierten BSA wurde dreimal im kolorimetrischen Assay ermittelt. Dazu wurden 850 µg Protein mit 500 µl 0.2% DNPH (in 2 N HCl) über 1 Stunde im Dunkeln inkubiert. Entsprechende Leerwerte wurden mit nur 2 N HCl vorbereitet. Derivatisierte Proteine und Leerwerte wurden mit 20% TCA präzipitiert und bei 11,000*g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Pellets wurden dreimal mit 1 ml Ethanol:Ethyl Acetat (1:1 v/v) gewaschen. Die Proben wurden jeweils nach der Wäsche mit dem organischen Solvent 10 min im Vortex gemischt und dann zentrifugiert (11,000*g, 3 min). Die Endpellets wurden in 0.6 ml 6 M Guanidine-HCl resuspendiert und der Carbonylgehalt wurde durch Messung der Absorption der DNP-Hydrasone bei 370 nm gemessen.

Die Ergebnisse wurden in nmol Carbonyle/mg Protein mit Hilfe des Extinktionkoeffizienten von 22,000 M⁻¹cm⁻¹ umgerechnet (s.Abb.2.4).

2.3.6 Quantitative Bestimmung der Proteincarbonyle im dot-Blot-Verfahren

Quantitative Bestimmung der Proteincarbonyle basiert auf der spezifischen Eigenschaft des 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) mit Carbonylgruppen in Proteinen zu reagieren. Die entstandenen DNP-Hydrasone werden mit anti-DNP-Antikörper spezifisch erkannt und können so im Vergleich mit der Standardreihe quantitativ gemessen werden.

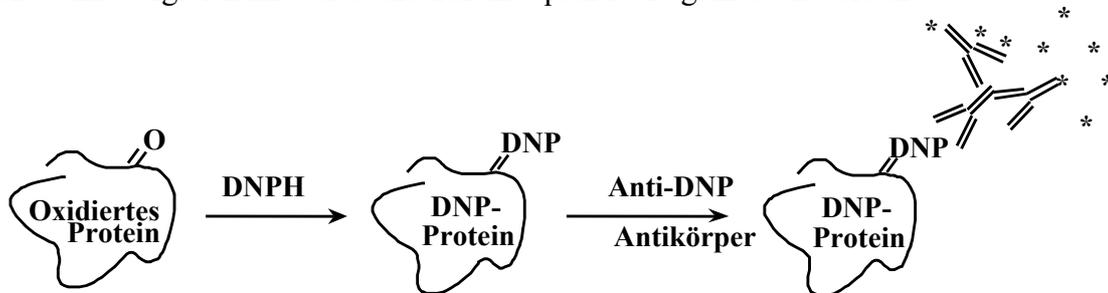


Abbildung 2.3 Prinzip der immunochemischen Bestimmung der Carbonylgruppen in Proteinen

Der BSA-Oxidationsgrad-Standard und die zu bestimmenden Proben wurden mit 85.7 mM Tris, 0.857 mM EDTA, 20 mM NaOH, pH 8.5 Puffer bis auf eine Proteinkonzentration von ca. 50 µg/ml verdünnt.

Die Proben wurden bis zum slot-blotting auf dem Eis gehalten.

Vorbereitung der PVDF Membran und Blotting.

Die PVDF Membran wurde in 100% Methanol genässt und dann in 20% Methanol-80% Tris-gepufferter Salzlösung (TBS, 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.4) 5 min durchfeuchtet und ins dot-blotting Gerät eingelegt.

Nach Waschen der dot-blot Wells mit TBS-Lösung wurden die Proben mit je 2.5 µg Protein in 100 µl Volumen der Pufferlösung in jedes Well appliziert. Mit dem Vakuum wurde das Lösungsmittel abgesaugt.

DNPH Derivatisierung der Membran

Die Membran wurde aus dem Apparat entfernt und sofort in 100% Methanol gelegt. Dann wurde die Membran in einer Lösung aus 20% Methanol-80% TBS für 5 min und dann in 2 N HCl für 5 min inkubiert.

Danach wurde die Membran in 2,4-Dinitrophenylhydrazin (100 µg/ml) in 2 N HCl genau 5 min inkubiert.

Die Membran wurde noch dreimal in 2 N HCl (je 5 min) und siebenmal in 100% Methanol (je 5 min) gewaschen.

Immunofärbung

Unspezifische Bindungsstellen der PVDF Membran wurden für 1 Stunde durch eine Lösung von 3% Gelatine in TBS blockiert. Nachdem die Membran dreimal in TBS-Tween (0.05%) gewaschen war, wurde sie 18 Stunden bei 4 Grad mit dem ersten anti-DNPH-Antikörper in 1:25,000 Verdünnung in TBS mit 3% Gelatine und 1% Tween inkubiert.

Die Membran wurde danach fünfmal je 5 min mit TBS/Gelatine/Tween/ Lösung gewaschen und mit dem zweiten Antikörper 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach sechsmaligem Waschen in TBS/Gelatine/Tween Lösung wurde die Membran entwickelt.

Entwicklung: nach Aktivierung mit der ECL Chemilumineszenzlösung wurde das Signal auf einem Röntgenfilm aufgenommen. Die fertigen Filme wurden anschließend mit dem Fluor-S-MultiImager eingescant und mit den Softwareprogrammen Melanie 3 und Quantity One ausgewertet. Die verwendeten Antikörper sind im Ergebnissteil jeweils genau beschrieben.

Ergebnisse der Vorexperimente zur kolorimetrischen und immunochemischen Carbonylbestimmung:

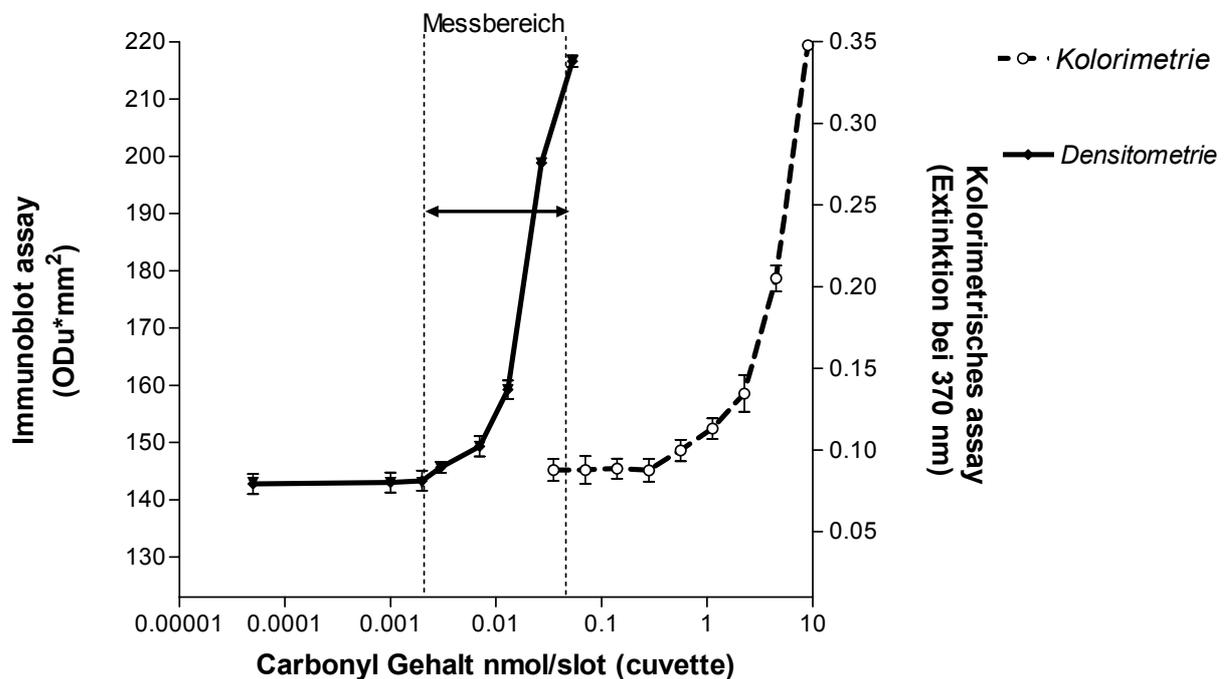


Abbildung 2.4 Standard Kurven für die Bestimmung der Proteincarbonyle mit Hilfe der immunochemischen und kolorimetrischen Methode. Daten sind in Nanomol an Carbonylen pro Slot für das Immunoblotting Assay (solide Linie) und Nanomol an Carbonylen pro Kuvette (1 ml) für das kolorimetrische Assay (Strichlinie) angegeben. ODu-Arbitrarische Einheiten der optischen Dichte.

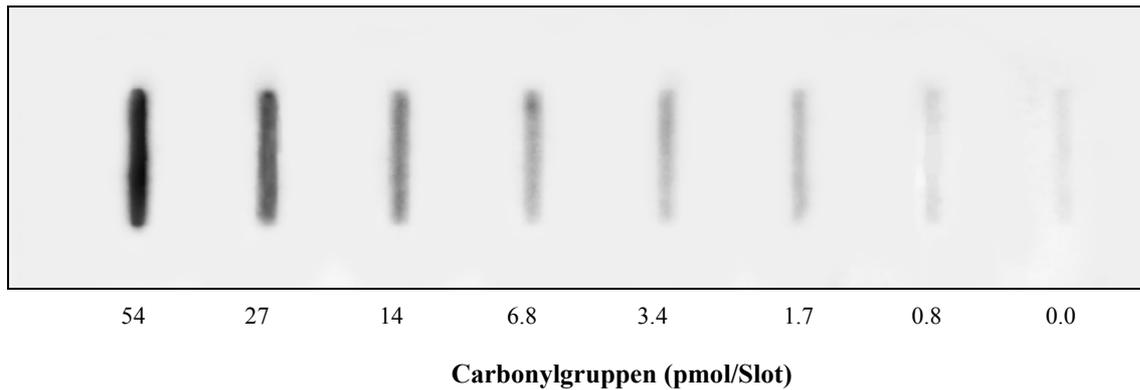


Abbildung 2.5 Darstellung der dot-blot Standardreihe des oxidierten BSA mit verschiedenem Grad der Oxidation und gleichen Proteinkonzentration.

Reproduzierbarkeit des Assays

Tabelle 2.10 Reproduzierbarkeit des Assays

Parameter	Proben		Standard	
	Interassay Variabilität** (%) N=11	Intraassay Variabilität** (%) N=6	Interassay Variabilität* (%) N=11	Intraassay Variabilität** (%) N=6
Mittelwert	21,8	15,4	9,9	3,4
Std. Abw.	18,3	7,6	4,4	2,2
Std. Fehler	5,5	3,1	1,3	0,9

*Kolorimetrisches Assay, **Immunochemisches Assay

Sensitivität des Assays

Wie es aus Abb. 2.4 zu sehen ist, ist die Sensitivität des dot-blot Assays viel höher als die Sensitivität der kolorimetrischen Bestimmung der Carbonylgruppen in Proteinen.

Der Unterschied zwischen Werten mit einem Carbonylgehalt über ca.1,7 pmol konnte bestimmt werden, allerdings beginnt der sichere lineare Messbereich bei ca. 6,8 pmol/slot.

In jedem Assay wurde versucht mittels Änderung der aufgetragenden Proteinmenge von 2,5 µg bis 5 µg die Proben im linearen Bereich in Doppelbestimmung zu messen.

2.4 Assay für Thiole

2.4.1 Prinzip

Die Menge an Thiolgruppen in Proteinen wurden mit dem Thiol und Sulphide Quantitation Kit (Molecular Probes, Eugen, OR, USA) gemessen.

Messprinzip:

In diesem Assay reduzieren die Thiole das Disulphid-gehemmte Derivat von Papain und setzen dabei das aktive Enzym stoichiometrisch frei. Die Aktivität des Enzyms wird dann mittels chromogenem Papain Substrat *N*-benzoyl-L-arginine, *p*-nitroanilide (L-BAPNA) bestimmt. L-Cystein dient als Standard und Ellman's Reagenz wird für die genaue Bestimmung der aktuellen Konzentration von L-Cysteine in der Standardlösung verwendet. Cystamin erlaubt die Detektion der schlecht zugänglichen Thiole in Proteinen oder Thiolen, die hohe pK_a Werte haben. Cystamin-disulphid tauscht mit Proteinthiolen aus, was zu 2-Mercaptoethylamin (Cysteamin) führt und das aktive Papain freigesetzt wird (Abb. 2.6).

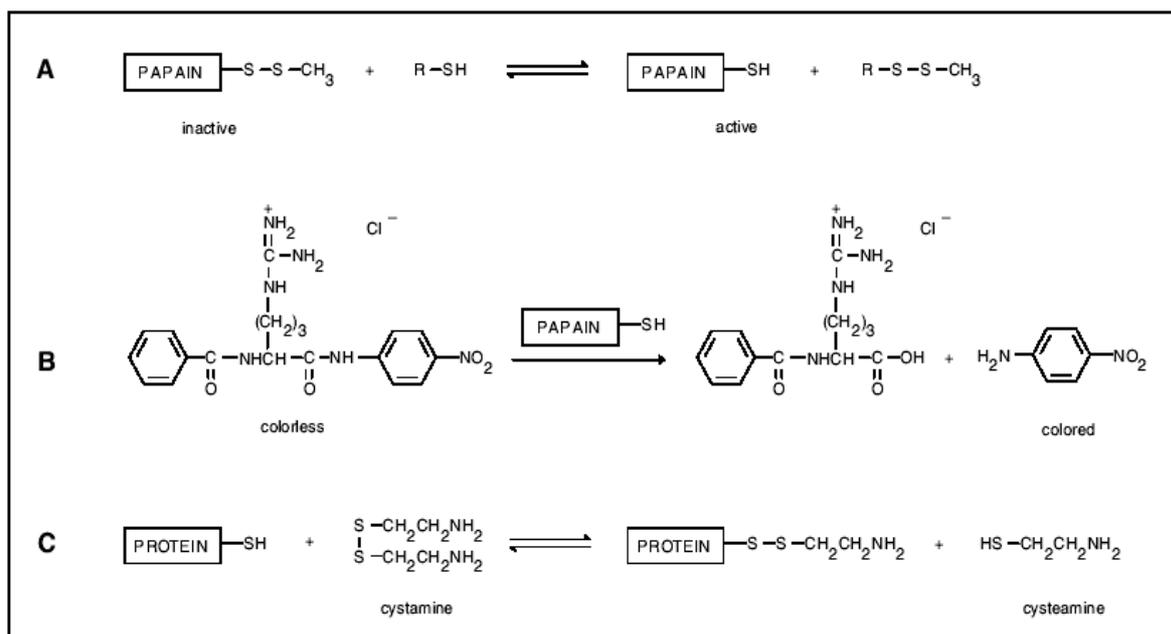


Abbildung 2.6 Schema der Reaktion bei der Detektion der Thiole

A) nicht-aktives Derivat des Papains, Papain-SSCH₃ wird in Gegenwart von Thiolen aktiviert.

B) Aktives Papain zersplittert das Substrat l-BAPNA, indem p-Nitroanilin Chromophore freigesetzt werden.

C) Proteinthiole, die oft schlecht zugänglich sind, tauschen mit Cystamin aus, um 2-Mercaptoethylamine (Cysteamin) zu generieren, was leicht zu detektieren ist.

Materialien und Reagenzien

- Papain–SSCH₃ (MW = 23,000, Component A), Lyophilisiert mit Puffer
- *N*-benzoyl-L-arginine, *p*-nitroanilid, hydrochlorid (L-BAPNA) (MW = 434.9, Component B), Bis-Tris/EDTA buffer (Component C), 40 mL of 50 mM bis-Tris, 1 mM EDTA, pH 6.3
- Cystamine, dihydrochloride (MW = 225.2, Component D)
- L-Cystein (MW = 121.2, Component E)
- Ellman's Reagenz (5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid); DTNB), (MW = 396.3, Component F)

Für das Thiolassay wurden folgende Puffersysteme benötigt:

- Puffer A: 5 mM Natriumazetat, 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, pH 4.7.
- Puffer B: 40 mM Natriumphosphat, 2 mM EDTA, pH 7.6.
- Puffer C: 5 mM Natriumazetat, pH 4.0.

2.4.2 Ellman's Assay für die Eichung des L-Cystein Thiolstandards

Prinzip:

Um die aktuelle Konzentration der Thiole in der L-Cystein Standardlösung zu bestimmen wurde Ellman's Assay durchgeführt. Da die Thiole in wässrigen Lösungen zur Oxidation neigen, konnte die aktuelle Thiolkonzentration in vorbereiteter L-Cystein Standardlösung von der nominalen Molarität signifikant abweichen. Die aktuelle Thiolkonzentration wurde deswegen vor jedem Assay bestimmt, um die richtige Standardkurve zu schaffen.

Vorgehen:

1. Arbeitslösung von 0.1 mM L-Cystein in Puffer A
2. In zwei Röhrchen wurde 0.69 ml von Puffer B gegeben.
3. In ein Röhrchen wurde 0.4 ml 0.1 mM L-Cystein Lösung und in anderes 0.4 ml des Puffers A gegeben.
4. In jedes Röhrchen wurden je 10 µl Ellman's Reagenz (100 mM DTNB in DMSO) gegeben und 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
5. Die Absorption des Blanks (H₂O) bei 412 nm wurde im Spectrophotometer als Leerwert gemessen.
6. Die Absorption der beiden Lösungen wurde bei 412 nm gemessen und der Absorptionswert der Kontrolllösung wurde von der Absorption der L-Cystein Lösung abgezogen (korrigierter Absorptionswert ΔA_{412}).
7. Die Thiolkonzentration wurde nach folgender Formel umgerechnet:

$$\text{mM Thiole} = \frac{\Delta A_{412} \times 1.1 \text{ mL}}{13,600 \times 0.4 \text{ mL}} \times 1000$$

wobei ΔA_{412} der korrigierte Absorptionswert ist, 13,600- der Extinktionskoeffizient von 5-thio-2-nitrobenzoat in Ellman's Reagenz ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$).

2.4.3 Bestimmung der Thiole in Proben

In jedem Assay wurden zwei Standardreihen mitgeführt. Der Standard wurde in Puffer A angesetzt und in sieben Verdünnungsschritten in die Wells der ersten beiden Reihen pipettiert. Somit lag die Standard-Substanz (L-Cystein) in Konzentrationen von 0.2 bis 1.5 μM auf der Platte vor. Um den Leerwert (Blank) zu erhalten, wurde in die untersten beiden Wells der ersten zwei Reihen kein L-Cystein gegeben.

Zu jeder Probe, die 50 μg Protein gelöst in Puffer A enthält, wurden 3 μl 4 mM Cystamin-Lösung zugegeben. Danach wurde in jedes Well der Platte 100 μl der Papain-SSCH₃-Arbeitslösung pipettiert.

Die Platte wurde über 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation wurden in jedes Well 100 μl 4.9 mM L-BAPNA Lösung zugegeben und noch 1 Stunde inkubiert.

Die Absorptionwerte wurden bei 410 nm im Spektrophotometer gemessen.

Die Probenwerte wurden mit den Standardwerten mit Hilfe des Graph&Prism Programms verglichen und ermittelt.

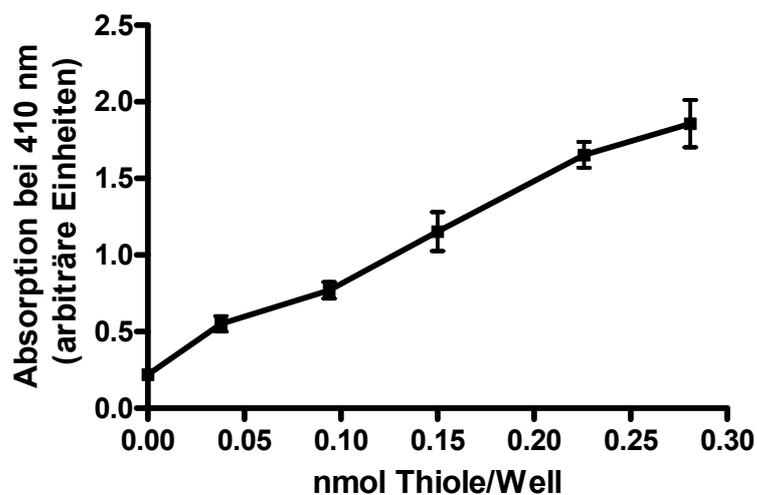


Abbildung 2.7 Standardkurve für die Bestimmung der Thiole. (Die Proteinmenge betrug 50 μg in einem Endvolumen von 200 μL).

2.5 Lipoperoxid Assay

2.5.1 Prinzip

Die Konzentration der Lipid Peroxyde in BAL wurde mit dem „Peroxoquant quantitative peroxide assay kit“ (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) bestimmt.

Prinzip:

In diesem Assay werden Hydroperoxide auf Grund der Oxidation des Fe^{2+} zu Fe^{3+} in Gegenwart von Xylenol Orange detektiert. Hydroperoxide konvertieren Fe^{2+} zu Fe^{3+} bei saurem pH. Peroxide reagieren zuerst mit Sorbitol, indem sie zu Peroxylradikal konvertiert werden, das die Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} initiiert. In Gegenwart der Schwefelsäure, bildet Fe^{3+} Komplexe mit Xylenol Orange, was zu einem violetten Produkt mit maximaler Absorption bei 560 nm führt. Im Mikrotiterplattenformat lag das beste Signal-Rausch Verhältnis bei 595 nm.

Für das Lipoperoxidassay wurden folgende Reagenzien benötigt:

Reagenz A, 1 ml, Zusammensetzung: 25 mM Ammonium ferrous (II) sulfat, 2.5 M H_2SO_4

Reagenz B, 2 x 50 ml, Zusammensetzung: 100 mM Sorbitol, 125 μM Xylenol orange in Wasser

2.5.2 Peroxid Standard

1 M Lösung vom Wasserstoffperoxid wurde vorbereitet, indem 10 μl 30 % H_2O_2 mit 88 ml H_2O gemischt worden waren. Der Arbeitsbereich des Assays lag zwischen 1 μM und 1 mM. Eine Standardkurve wurde für den Bereich von 1 bis 62,5 μM Peroxiden aufgebaut.

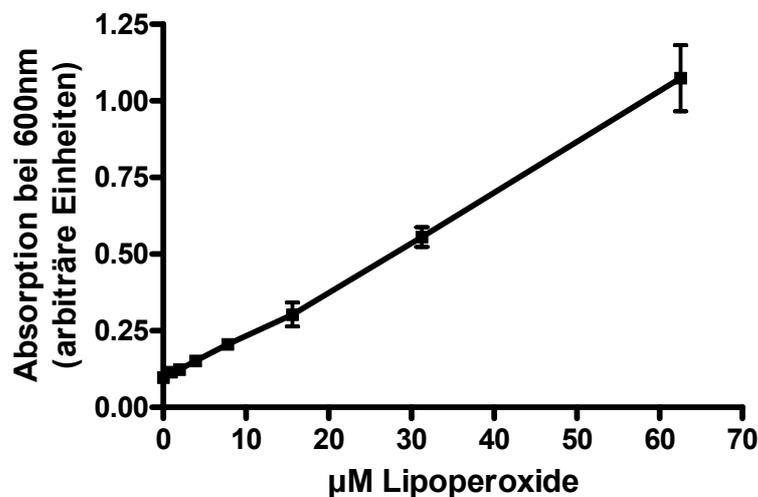


Abbildung 2.8 Standardkurve für die Bestimmung der Lipidhydroperoxide.

In jedem Assay wurden zur Bestimmung einer Standardkurve Standardreihen mitgeführt. Der Standard wurde in Wasser angesetzt und in sieben Verdünnungsschritten in die Wells der ersten beiden Reihen pipettiert. Um den Leerwert (Blank) zu erhalten, wurde in die untersten beiden Wells der ersten zwei Reihen kein Wasserstoffperoxyd gegeben. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen.

2.5.3 Lipidperoxidbestimmung in den Proben

1. 20 µl Probenvolumen wurde zu 200 µl Arbeitslösung (Lösung A + Lösung B=1:100) zugegeben.
2. Die Proben wurden gevortext und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert.
3. Die Absorption wurde bei 595 nm gemessen.
4. Die Probenwerte wurden mit den Standardwerten mit Hilfe des Graph&Prism Programms ermittelt.

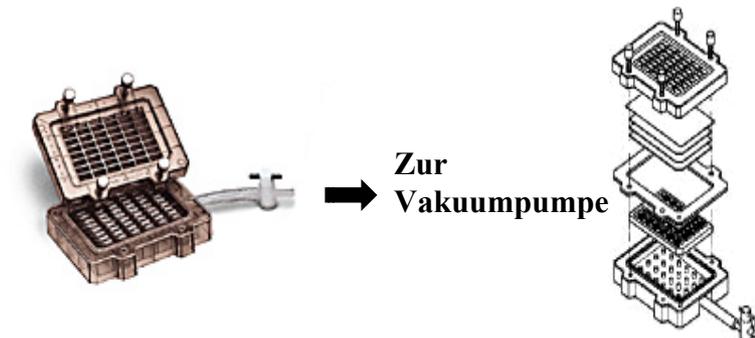
2.6 Gesamtproteinbestimmung

Prinzip: Zur Proteinlösung wird ein Farbstoffreagenz gegeben, das mit dem Protein in linearer Abhängigkeit einen gefärbten Protein-Farbstoff Komplexe bildet. Durch Vergleich mit bekannten Proteinkonzentration der Standardreihe wird die aktuelle Proteinkonzentration ermittelt.

Es wurde das Bio-Rad Proteinassay (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) verwendet. Standard war BSA in Konzentrationen von 5 mg/ml bis 10 µg/ml. Die Bestimmung erfolgte in Mikrotiterplatten (Niedrigaffin, F-Form, Greiner, München, Deutschland) bei 600 nm. Die Proben wurden jeweils dreimal aufgetragen, von den gemessenen Konzentrationen wurde der Mittelwert gebildet.

2.7 Dot-Blot Assay für die quantitative SP-D Bestimmung

Die SP-D Konzentration wurde quantitativ mit Hilfe des dot-blotting Geräts (Bio-Rad) gemessen.



Für das SP-D-dot-blot Assay wurden folgende Puffersysteme benötigt:

- TBS: 10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, pH 7.6
- TBS/Methanol Lösung = 4 :1
- Blockpuffer: Fisch Gelatine 3%/Tween 1% in TBS
- Waschpuffer: TBS-Tween 1%

Standard

Als Standard diente SP-D^{PAP}. Dabei handelt es sich um humanes SP-D, das aus bronchoalveolären Lavagen von Patienten mit Alveolarproteinose isoliert wurde.

Die Standardreihe bestand aus 8 Doppelverdünnungen. Die höchste Konzentration lag bei 10 ng SP-D/Slot. In jedem Assay wurde ein Blank ohne SP-D mitgeführt.

Arbeitsbereich der SP-D Messung lag zwischen 1 und 10 ng.

Bestimmung von SP-D in Proben

Initial wurden 20 µl der Probe auf die Membran aufgetragen. Wo es nötig war, wurden die Proben verdünnt oder in größeren Mengen verwendet.

Verfahren

Die gründliche Reinigung des dot-blot Geräts in 1 N HCl für 30 min und 1 N NaOH über 30 min war eine der Voraussetzungen für die erfolgreiche Durchführung der Messung. Da die

Sensitivität des Assays sehr hoch war, konnten kleine Reste von Protein früherer Experimenten die Ergebnisse beeinflussen.

Die PVDF Membran und 3 Filterpapiere wurden folgenderweise vorbereitet:

Die PVDF Membran wurde in 100% Methanol für 1 min genässt und danach zweimal je 5 min in Wasser gewaschen. Nach der Wäsche wurden die PVDF Membran und 3 Filterpapiere zur Equilibrierung in TBS/Methanol (4 :1) für 5 min eingelegt. Die equilibrierte Membran und das Filterpapier wurden ins dot-blot Gerät eingebaut und gut verschraubt. Jede Zelle des Geräts wurde mit 200 µl TBS Lösung gewaschen. Danach wurden Standard und Proben einpipettiert und die Pufferflüssigkeit mit Vakuum abgesaugt, sodass die Proteine auf der Blotmembran verblieben. Die Membran wurde mit 200 µl TBS Puffer nochmals gespült, aus dem Gerät genommen und in 100% Methanol für 1 min. eingelegt. Nach der Spülung mit Wasser wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit Blockpuffer/Fisch Gelatine 3%/Tween 1% in TBS für 1 Stunde blockiert. Nach der dreimaligen Wäsche in TBS-Tween wurde die Membran über Nacht bei 4 Grad mit anti-SP-D Antikörper (1:5000) in Blockpuffer inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal je 10 min. in TBS-Tween gewaschen und während 1 Stunde mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Nach der dreimaligen Wäsche in TBS-Tween wurde die Membran mit ECL-Reagenz entwickelt und das Bild mit Hilfe des Programms „Quantity One“ im Fluor-S-Multiimager eingescannt.

Die Daten wurden mit Hilfe des Programms Graph&Prism bearbeitet und graphisch dargestellt.

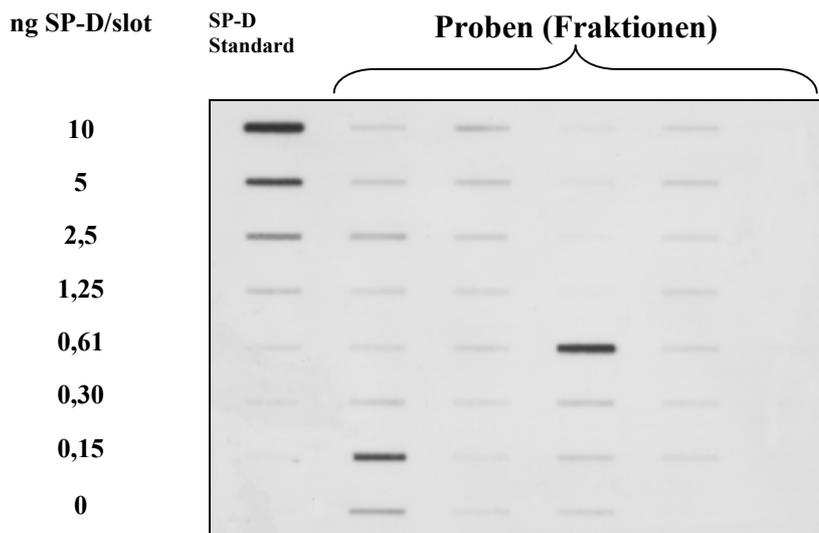


Abbildung 2.9 Darstellung der Standardreihe des SP-D und der Proben auf dem Film.

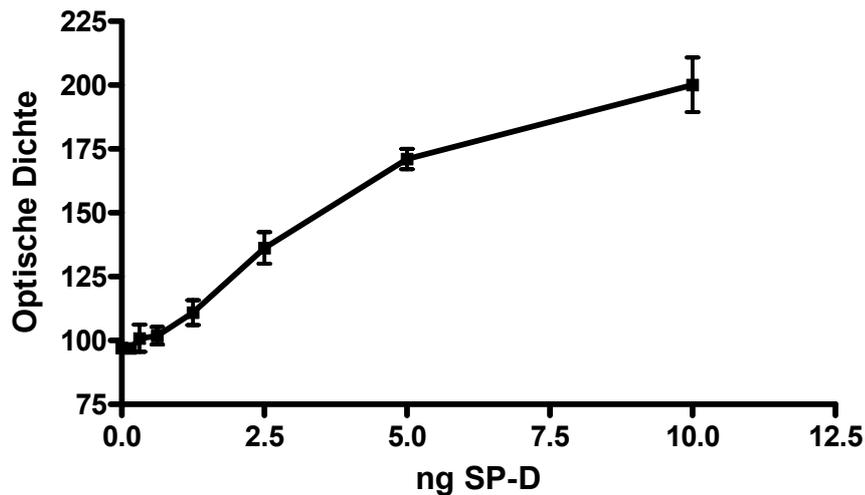


Abbildung 2.10 Standardkurve für die Bestimmung der Konzentration von SP-D im dot-blot Assay.

2.8 Gelfiltration

Um eine Auftrennung des oxidierten SP-D^{PAP} zu erzielen, wurde eine Gelfiltration mit Hilfe einer Superose 6 Säule durchgeführt.

Dazu wurden 500 ng SP-D^{PAP} und Oxidant 30-120 min bei 37 °C inkubiert. Die Oxidationsreaktion wurde mit Kühlung gestoppt. Anschließend wurden in der SDS/PAGE ein Kontrollgel des inkubierten Ansatzes angefertigt.

Der restliche Ansatz wurde über eine Superose 6 Säule gegeben und die einzelnen Fraktionen in der SDS/PAGE untersucht und bei -70 °C aufbewahrt.

2.9 Reinigung von Surfactant-Protein D nach Strong et al 1998⁷⁰

1. 1 Liter BAL Flüssigkeit wurde auf 20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,4 eingestellt und 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt zur Lösung von aggregiertem SP-D und bei 10000*g für 40 min. und 4 Grad zentrifugiert (SP-D befand sich in Überstand).
2. Überstand wurde auf 20 mM CaCl₂ und pH 7,4 eingestellt und mit Maltosylagarose (30 ml) gemischt und für 1 Stunde bei Zimmertemperatur gerührt.
3. Das Harz wurde eingesammelt, in eine Säule gepackt und solange mit TCB (20 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, 0,02% Natriumazid, pH 7,4) gewaschen, bis Hintergrund-Absorption erreicht war.

4. Die Säule wurde mit TCB und 1 M NaCl-Lösung gewaschen. Hierbei wurden unspezifisch gebundene Proteine wie Albumin und Histon entfernt.
5. SP-D wurde mit einem Puffer aus 50 mM MnCl_2 , 20 mM Tris-HCl, 0,02% Natriumazid, pH 7,4 eluiert (Abb.2.11)
6. Die gepoolten SP-D Extrakte wurden anschliessend mittels „Amicon centriplus 10 concentrators“ (Molekulargewicht cut off 10 kDa) auf 2-3 ml konzentriert.
7. Das Konzentrat wurde auf eine Superose-6-Säule (1x 30 cm), die mit 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA bei pH 7,4 equilibriert war, aufgebracht und eluiert. SP-D Elution wurde bei scheinbarem Molekulargewicht >1000 kDa beobachtet (2.12).

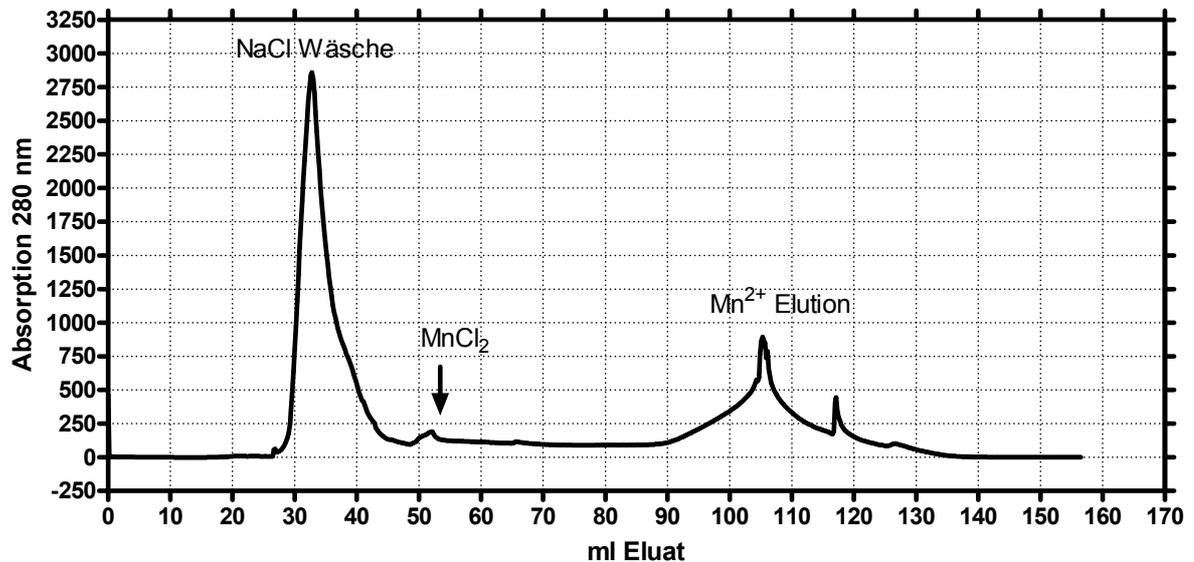


Abbildung 2.11 NaCl Wäsche und SP-D Elution aus der Maltosyl-agarose Säule.

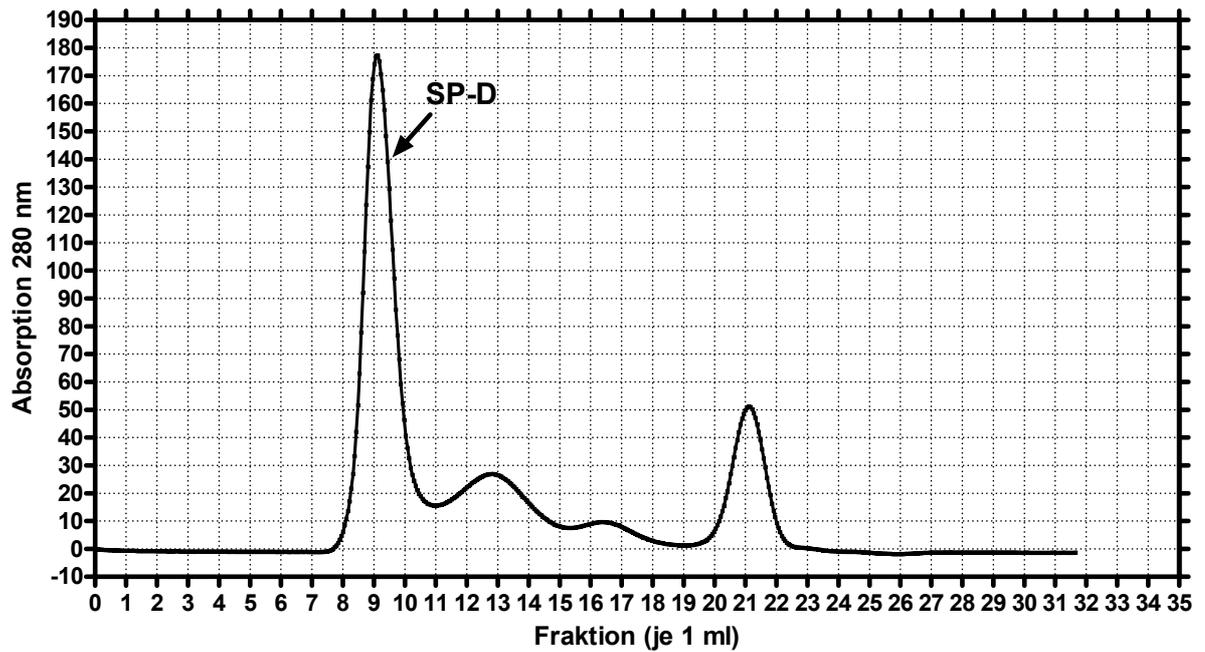


Abbildung 2.12 Gelfiltration von SP-D mittels Superose-6-Säule

Die Reinheit der SP-D wurde mittels 1-D-SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung geprüft (Abb.2.13)

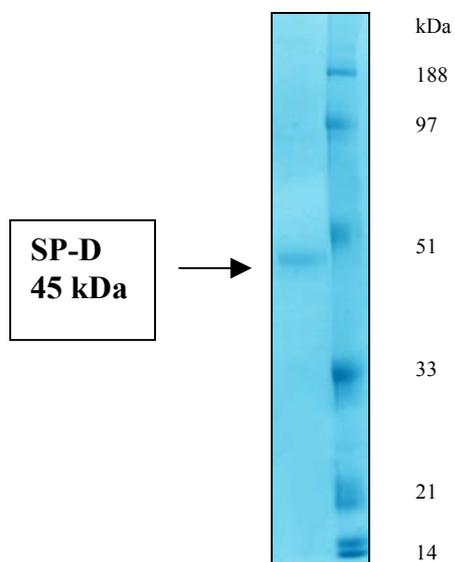


Abbildung 2.13 1-D-SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung von 9-ten Fraktion des Eluates der Superose-6-Säule

2.10 1-D Gelelektrophorese und Westernblotanalyse

Material:

Elektrophorese:

- Microcon Zentrifugenfilter, Ausschlussgrenze 3000 Dalton (Millipore)
- PAGE MOPS Running Buffer (Invitrogen, NP0001)

Zusammensetzung:

MOPS (3-(N-morpholino)propan sulfonische Säure	104,6 g
Tris	60,6 g
SDS	10,0 g
EDTA	3,0 g
Wasser	Ad 500 ml

- PAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen, NP0007)

Zusammensetzung:

Glycerol	4,0 g
Tris Basis	0,682 g
Tris HCl	0,666 g
LDS	0,800 g
EDTA	0,006 g
Serva Blue G250	0,75 ml 1%
Phenol Red	0,25 ml 1%
Wasser	Bis 10 ml

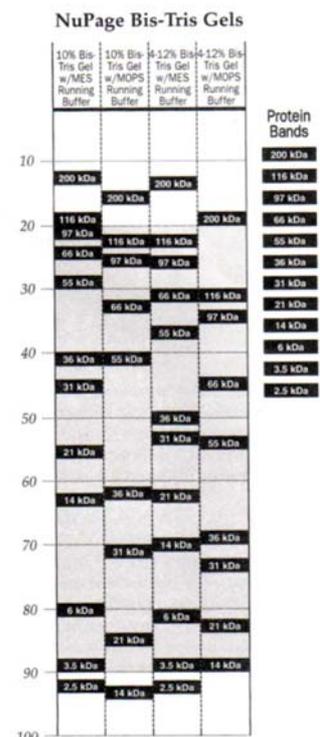
- Aqua ad injectabilia (Braun Melsungen AG, No. 3703452)
- PAGE Reducing Agent (Invitrogen, NP0004)

Probenpuffer:

LDS Sample Buffer	25%
Reducing Agent	10%
H ₂ O	65%

- NuPAGE Novex 10% Bis-Tris Gel (Invitrogen, NP0315)
- NuPAGE Antioxidant (Invitrogen, NP0005)
- Xcell SureLock Minicell Kammer (Invitrogen, EI 0001)
- PowerEase 500 Power Supply (Invitrogen, EI8700)
- Wasserbad (Paratherm S100 Julabo)
- MultiMark Multi-Colored Standard (Invitrogen, LC5725)

Abbildung 2.14 Multimark Multi-Colored Standard (rechts).
Relative Lokalisierung der Marker Protein Banden



Westernblot:

- Xcell II Blot Module (Invitrogen, EI9051)
- NuPAGE Transfer Buffer (Invitrogen, NP0006)
- PVDF-membran (Millipore, Immobilon IPVH 00010)

Zusammensetzung:

Bicine	10,2 g
Bis-Tris	13,08 g
EDTA	0,75 g
Wasser	Bis 125 ml

Transferpuffer:

NuPAGE Transfer Buffer	5%
Methanol	20%
H ₂ O	75%

Silberfärbung:

- Fixierungslösung:

Ethanol	30%
Essigsäure konzentriert	10%
H ₂ O	60%

- Inkubationslösung:

Natriumacetat	68 g
Ethanol	300 ml
Natriumthiosulfat	2 g
H ₂ O	Ad 1000 ml

- Silberlösung:

Silbernitrat	2 g
Formaldehyd 37%	200 µl
H ₂ O	Ad 1000 ml

- Entwicklerlösung:

Natriumcarbonat	25 g
Formaldehyd 37%	100 µl
H ₂ O	Ad 1000 ml

Immunodetektion:

- Fischgelatine (Sigma G-7765)
- TBS-Puffer:

Tris-HCl	4 mM
NaCl	100 mM
Tween 20	0,05 %
in H ₂ O lösen	auf pH 7,4 einstellen

- PBS-Puffer:

Na ₂ HPO ₄	12 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	3 mM
NaCl	150 mM
in H ₂ O lösen	auf pH 7,4 einstellen

- Bovines Serum Albumin V, BSAV (Paesel No. 42160223)
- ECL Chemilumineszenzlösung (Amersham RPN2106)
- Entwicklungskassette (Amersham RPN11646)
- Röntgenfilme (Amersham RPN 2103)
- Entwicklungsmaschine (AGFA CP 1000)

Methode:

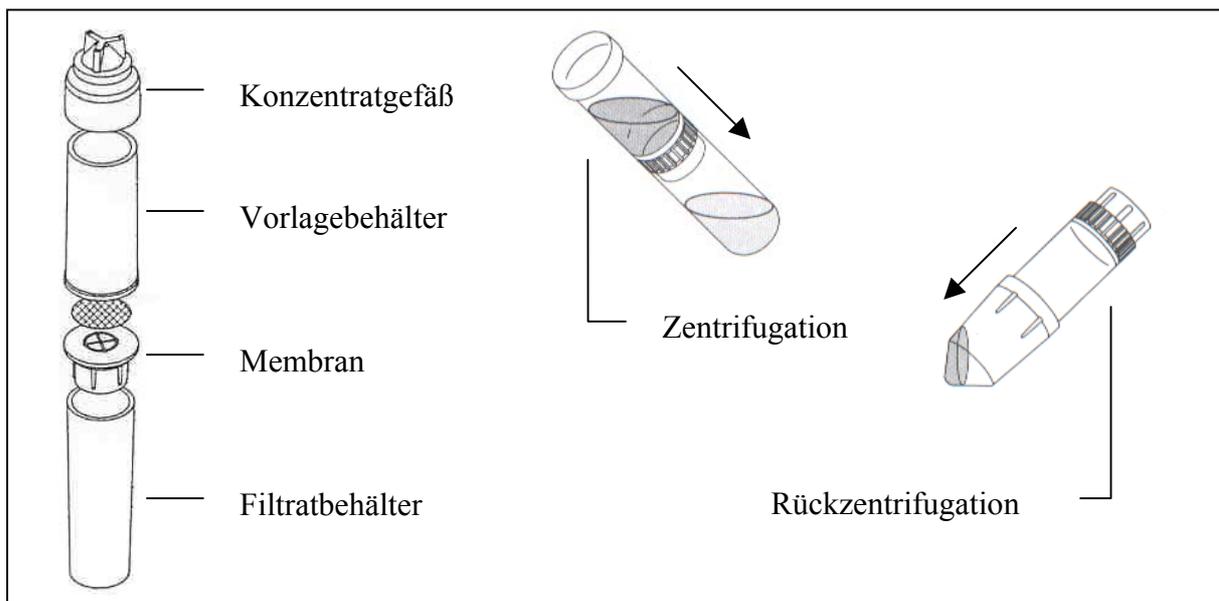


Abbildung 2.15 Mikrokonzentrator

Probenvorbereitung: Die nativen BAL Proben wurden mit Hilfe von Zentrifugenröhrchen entsalzt, indem die Probe für ca. 30 min bei Raumtemperatur bei 14000 g zentrifugiert wurde und anschließend einmal mit 500 µl Aqua ad injectabilia wieder aufgefüllt und erneut für 30 min nachgespült wurde. Um das Konzentrat vollständig aus dem Vorlagegefäß zu gewinnen wurde das mit dem Konzentratgefäß verschlossene Vorlagegefäß umgedreht und 2 Minuten lang bei 1.600 Umdrehungen pro Minute rückzentrifugiert (Abb.2.12).

Anschließend wurde von den Proben der Gesamtproteingehalt gemessen (siehe oben) und die gewünschte Auftragsmenge aliquotiert. Die Proben wurden in der Vakuumzentrifuge lyophilisiert und dann in jeweils 22 µl Probenpuffer aufgenommen. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren bei 1000g für 20 Sekunden wurden die Proben 10 Minuten lang im 70°C Wasserbad inkubiert. Nach erneutem Vortexen und Zentrifugieren wurden die Proben auf das Gel aufgetragen.

Gelelektrophorese: Für SP-A und SP-D wurde MOPS Laufpuffer verwendet. Als Molekulargewichtsmarker diente MultiMark-12. Für stabile reduzierende Bedingungen sorgte die Zugabe von NuPAGE Antioxidant zum Laufpuffer. Die Elektrophorese erfolgte in den Mini Cell Kassetten bei: 200 V und 100 mA für 35 min. Nach dem Elektrophoreselauf erfolgte entweder eine Silberfärbung der Gele oder ein Proteintransfer (Westernblot) auf eine PVDF-Membran.

Silberfärbung: Für die Silberfärbung wurde die Methode nach Heukeshoven / Dernick (1985) angewendet. Das Gel wurde 30 Minuten in der Fixierungslösung fixiert und anschließend weitere 30 Minuten in der Inkubationslösung inkubiert. Nach dreimaligem 15 minütigem Waschen mit Wasser wurde das Gel 20 Minuten lang in der Silberlösung versilbert. Nach Zugabe der Entwicklerlösung wurde zwischen 3 und 10 Minuten gewartet, je nach Farbintensität der Banden, und dann die Färbereaktion durch Zugabe von 5%iger Essigsäure gestoppt.

Westernblott: Der Proteintransfer erfolgte im vertikalen „SemiDry“ Verfahren unter Nutzung des Xcell II Blot Modules auf eine PVDF-Membran für 60 Minuten bei 30V und 170 mA im NuPAGE Transfer Buffer.

Immunodetektion: Die Membran wurde 3 Stunden in PBS Puffer mit 3% Fischgelatine inkubiert um eine Absättigung der freien Bindungsstellen zu erreichen. Über Nacht erfolgte

die Inkubation mit dem 1. Antikörper in PBS Puffer mit 5% Fischgelatine. Nach Entfernen von überschüssigen, nicht gebundenen Antikörpern durch viermaliges Waschen mit TBS Puffer für jeweils 15 Minuten wurde mit dem 2. Antikörper (Meerrettichperoxidase konjugiert) in TBS Puffer für 2 Stunden inkubiert. Die Membran wurde erneut viermal mit TBS gewaschen und schließlich nach Aktivierung mit der ECL Chemilumineszenzlösung auf Röntgenfilmen entwickelt. Die fertigen Filme wurden anschließend mit dem FluorS Multi Imager eingescannt und mit den Softwareprogrammen Melanie3 und Quantity One ausgewertet. Die verwendeten Antikörper sind im Ergebnissteil jeweils genau beschrieben.

2.11 2-D Gelelektrophorese und Westernblotanalyse

Material:

Elektrophorese:

- Microcon Zentrifugenfilter, Ausschlussgrenze 3000 Dalton (Millipore)
- ZOOM Strip pH 3-10 (Invitrogen ZM0011)
- ZOOM IPGRunner Cassette (Invitrogen ZM0003)
- NuPAGE Novex 4-12%Bis-Tris ZOOM Gel (Invitrogen NP0330)

Probenpuffer:

Harnstoff	42,04 g
Thioharnstoff	15,24 g
H ₂ O	ad 53 ml
Mit Serdolit Ionenaustauscher 15 min rühren dann filtrieren	2 g
CHAPS	2 g
DTT	1 g
ZOOM Carrier Ampholytes 3-10	2 ml
Pefablock	43 mg
H ₂ O	ad 100 ml

- Equilibrierungspuffer 1:

LDS Sample Buffer	1,25 ml
Reducing Agent	500 µl
H ₂ O	3,25 ml

- Equilibrierungspuffer 2:

LDS Sample Buffer	1,25 ml
Iodoacetamid	116 mg
H ₂ O	3,75 ml

- Agarose (Invitrogen 15510019)

Westernblot:

- Xcell II Blot Module (Invitrogen, EI9051)
- NuPAGE Transfer Buffer (Invitrogen, NP0006)

Transferpuffer:

NuPAGE Transfer Buffer	5%
Methanol	20%
H ₂ O	75%

- PVDF-membran (Millipore, Immobilon IPVH 00010)

Silberfärbung:

- Fixierungslösung:

Ethanol	30%
Essigsäure konzentriert	10%
H ₂ O	60%

- Inkubationslösung:

Natriumacetat	68 g
Ethanol	300 ml
Natriumthiosulfat	2 g
H ₂ O	Ad 1000 ml

- Silberlösung:

Silbernitrat	2 g
Formaldehyd 37%	200 µl
H ₂ O	Ad 1000 ml

- Entwicklerlösung:

Natriumcarbonat	25 g
Formaldehyd 37%	100 µl
H ₂ O	Ad 1000 ml

Immunodetektion:

- Fischgelatine (Sigma G-7765)
- TBS-Puffer:

Tris-HCl	4 mM
NaCl	100 mM
Tween 20	0,05 %
in H ₂ O lösen	auf pH 7,4 einstellen

- PBS-Puffer:

Na ₂ HPO ₄	12 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	3 mM
NaCl	150 mM
in H ₂ O lösen	auf pH 7,4 einstellen

- Bovines Serum Albumin V, BSAV (Paesel No. 42160223)
- ECL Chemilumineszenzlösung (Amersham RPN2106)
- Entwicklungskassette (Amersham RPN11646)
- Röntgenfilme (Amersham RPN 2103)
- Entwicklungsmaschine (AGFA CP1000)

Methode:

Probenvorbereitung: Die nativen BAL Proben wurden mit Hilfe von Zentrifugenröhrchen entsalzt, indem die Probe bei 14000 g zentrifugiert wurde und anschließend einmal mit 500 µl Aqua ad injectabilia nachgespült wurde. Um das Konzentrat vollständig aus dem Vorlagegefäß zu gewinnen wurde das mit dem Konzentratgefäß verschlossene Vorlagegefäß umgedreht und 2 Minuten lang bei 1.600 Umdrehungen pro Minute rückzentrifugiert.

Siehe Abb. 2.12 Mikrokonzentrator

Anschließend wurde von den Proben der Gesamtproteingehalt gemessen und die gewünschte Auftragsmenge von 80µg aliquotiert. Die Proben wurden in der Vakuumzentrifuge

lyophilisiert und dann in jeweils 155 µl Probenpuffer resuspendiert. Jeweils eine Probe wurde vollständig in einen Quellkanal einpipettiert und jeweils ein isoelektrischer Fokussierungsstreifen nachgeschoben. Die Kassette wurde versiegelt und 8 -16 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Fokussierung: Nach Entfernen der Versiegelung erfolgte die isoelektrische Fokussierung in der ZOOM Mini-Cell unter folgenden Bedingungen: 500V, 1mA/Streifen, 3 Stunden.

Equilibrierung: Nach erfolgreicher Fokussierung wurden die Streifen aus der Kassette genommen und 15 Minuten lang in der Equilibrierungslösung 1 horizontal geschüttelt. Nach weiteren 15 Minuten in Equilibrierungslösung 2 wurde jeweils ein Streifen in eine ZOOM Gelkassette horizontal eingelegt und mit heißer 0,5%iger Agaroselösung überschichtet.

Gelelektrophorese: Nach Trocknen der Agarose wurde eine vertikale Gelelektrophorese mit MOPS Puffer durchgeführt. Als wide-range Indikator diente MultiMark- 12. Für stabile reduzierende Bedingungen sorgte die Zugabe von NuPAGE Antioxidant zum Laufpuffer. Die Elektrophorese erfolgte in den Mini Cell Kassetten unter folgenden Laufbedingungen: 200 V, 100 mA, 42 min. Nach dem Elektrophoreselauf erfolgte entweder eine Silberfärbung der Gele oder ein Proteintransfer (Westernblot) auf eine PVDF-membran.

Silberfärbung: Für die Silberfärbung wurde die Methode nach Heukeshoven / Dernick (1985) angewendet. Das Gel wurde 30 Minuten in der Fixierungslösung fixiert und anschließend weitere 30 Minuten in der Inkubationslösung inkubiert. Nach dreimaligem 15 minütigem Waschen wurde das Gel 20 Minuten lang in der Silberlösung versilbert. Nach Zugabe der Entwicklerlösung wurde zwischen 3 und 10 Minuten gewartet, je nach Farbtintensität der Banden und dann die Färbereaktion durch Zugabe von 5%iger Essigsäure gestoppt.

Westernblott: Der Proteintransfer erfolgte im vertikalen „SemiDry“ Verfahren unter Nutzung des Xcell II Blot Modules auf eine PVDF-membran für 60 Minuten bei 30V und 170 mA im NuPAGE Transfer Buffer.

Immunodetektion: Die Membran wurde 3 Stunden in PBS Puffer mit 3% Fischgelatine inkubiert, um eine Absättigung der freien Bindungsstellen zu erreichen. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper in PBS Puffer mit 5% Fischgelatine. Nach Entfernen

von überschüssigen, nicht gebundenen Antikörpern durch viermaliges Waschen mit TBS Puffer jeweils 15 Minuten wurde mit dem 2. Antikörper (Meerrettichperoxidase konjugiert) in TBS Puffer für 2 Stunden inkubiert. Die Membran wurde erneut viermal mit TBS gewaschen und schließlich nach Aktivierung mit der ECL Chemilumineszenzlösung auf Röntgenfilmen entwickelt. Die fertigen Filme wurden anschließend mit dem FluorS Multi Imager eingescannt und mit den Softwareprogrammen Melanie3 und Quantity One ausgewertet. Die verwendeten Antikörper sind im Ergebnissteil jeweils genau beschrieben.

2.12 2-D-Elektrophorese mittels horizontalen Multiphore II System

Material:

- Bachhofer Vakuum Konzentrator, Typ: BA-VC-300H
- Vakuumpumpe, WKF Typ: L 05-60
- Eppendorf 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Multiphor II Basiskonfiguration, Multiphor II Elektrophorese Einheit Pharmacia Biotech (Nr. 18-1018-06)
- Immobiline Reswelling Tray Pharmacia Biotech (Nr. 18-1013-74)
- Kühleinheit Multi Temp II 200-220 V, Pharmacia Biotech (Nr. 18-1102-78)
- Kabelbinder, Pharmacia Biotech (Nr. 18-1104-27)
- Kühlschläuche, 8/12 mm, Pharmacia Biotech (Nr. 80-1106-56)
- Verbindungsset für Kühlschläuche, Pharmacia Biotech (Nr. 18-1104-26)
- Isolation für Kühlschläuche, 14/27 mm, Pharmacia Biotech (Nr. 80-1116-11)
- Netzgerät EPS 3500 xl, 35-3500 V, 1-150 mA (voll programmierbar), Pharmacia Biotech (Nr. 19-3500-01)
- Immobiline DryStrip, pH 3-10 L, 13 cm, Pharmacia Biotech (Nr. 17-6001-14)
- IEF Elektrodenstreifen, Pharmacia Biotech (Nr. 18-1004-40)
- Linearschüttler, Landgraph Laborgeräte Typ 3006 (Nr. 3006)
- Pharmalyte 3-10 für IEF, Pharmacia Biotech (Nr. 17-0456.01)
- Faltenfilter 595 ½, Λ 150 mm (Nr. 311645)

Chemikalien:

- Merck:
 - Essigsäure/Eisessig 100 % (Nr. 1.00063.1000)
 - Formaldehyd min. 37 % (Nr. 4000.0250)
 - Glycerin (wasserfrei) (Nr. 1.12011.1000)
 - Natriumcarbonat (wasserfrei) p.A. (Nr. 6392.0500)
 - Natriumchlorid (Nr. 1.06404.1000)
 - Natriumthiosulfat-Pentahydrat Suprapur (Nr. 1.06509.0100)
 - Pefabloc SC (Nr. 1.24839.0100)
 - Salzsäure rauchend 37 % (Nr. 1.00317.1000)
 - Silbernitrat p.a. (Nr. 1.01512.0100)
 - Tris(hydroxymethyl)-aminomethan⁷ p.a. (Nr. 1.08382.0500)

- Plus one:
- DryStrip Cover Fluid (Nr. 17-1335-01)
- DTT (Nr. 17-1318-02)
- Glycin (Nr. 17-1323-01)
- SDS (Nr. 17-1313-01)
- Repel-Silane ES (Nr. 17.1332.01)
- Harnstoff/Urea (Nr. 17-1319-01)
- Sigma:
- Bromphenol Blau (Nr. B-8026)
- Chaps (Nr. C-9426)
- Iodacetamid (Nr. I-1149)
- LMW Marker, Dalton Mark VII-L für SDS Gel 14,2-66 kD (Nr. M-3913 / SDS-7)

Elektrophoresis

- Fluka: - Kerosin (Nr. 60710)
- Serva: - Serdolit MB-1 Ionenaustauscher p.a. (Nr. 40701)
- Millipore Wasser
- Microcon Zentrifugenfilter, Ausschlussgrenze 3000 Dalton(Millipore)
- Excel XL 12-14 polyacrylamide Gel (Amersham Biosciences)
- IPG Strip pH 3-10 (Amersham Biosciences)

Quellpuffer:

Harnstoff	10,8 g
Thioharnstoff	4,56 g
H ₂ O	25,6 ml
Mit Serdolit Ionenaustauscher 15 min rühren dann filtrieren	1 g
Davon 29,8 ml entnehmen und folgendes zugeben:	
CHAPS	150 mg
DTT	120 mg
Carrier Ampholytes 3-10 oder 3,5-5 entsprechend dem Streifen	150 µl

Probenpuffer:

Harnstoff	42,04 g
Thioharnstoff	15,24 g
H ₂ O	ad 53 ml
Mit Serdolit Ionenaustauscher 15 min rühren dann filtrieren	2 g
CHAPS	2 g
DTT	1 g
Carrier Ampholytes 3-10	2 ml
Pefablock	43 mg
H ₂ O	ad 100 ml

▪ Equilibrierungspuffer 1:

Harnstoff	36 g
Glycerin	30 g
SDS	2 g
Trenngelpuffer	3,3 ml
H ₂ O	45,7 ml
+	
DTT	50 mg zu 5 ml Puffer

▪ Equilibrierungspuffer 2:

Harnstoff	36 g
Glycerin	30 g
SDS	2 g
Trenngelpuffer	3,3 ml
H ₂ O	45,7 ml
+	
Iodoacetamide	> 200 mg zu 5 ml Puffer

Trenngelpuffer:

Tris-HCl	18,2 g
SDS	0,4 g
H ₂ O	70 ml
pH	8,8

Westernblot:

- NovaBlot-Platten für “Semidry” Blotting Verfahren (Amersham Biosciences)

Transferpuffer:

Glycine	14.4 g
SDS	1.0 g
Methanol	200 ml
H ₂ O	800 ml

- PVDF-membran (Millipore, Immobilon IPVH 00010)

A) Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Am Tag zuvor mußten die Immobiline DryStrip Gelstreifen auf ihre ursprüngliche Dicke von 0,5 mm gequollen werden. Dazu wurde die Quellkassette-Immobiline Reswelling Tray verwendet. Über Nacht wurden die Gelstreifen bei Zimmertemperatur zum Quellen stehen gelassen.

Am nächsten Morgen wurden die Streifen rausgenommen und gründlich mit Millipore abgewaschen, so dass keine Quelllösung mehr auf den Gelstreifen verblieb. Diese wäre sonst während der IEF auskristallisiert und hätte die IEF stören können. Anschließend wurden die Gelstreifen auf ein mit Millipore getränktes Filterpapier gelegt.

Der Immobiline DryStrip Rahmen wurde luftblasenfrei auf die mit Kerosin benetzte Keramik Kühlplatte der Multiphor II Elektro-phorese Kammer gelegt. Dabei muss die Anode (roter Draht) in Richtung der Kühlschläuche zeigen. Die Platte wurde auf 20°C gekühlt und

der Rahmen mit c.a. 10 ml DryStrip Cover Fluid (Silikonöl) gefüllt, die Schablone für die Gelstreifen anschließend in den Rahmen gelegt. Eingefangene Luftblasen störten hierbei nicht. Die gequollenen Gelstreifen wurden dann mit der Gelseite nach oben in die Vertiefungen der Schablone gegeben. Das beschriftete Ende zeigte zur Kathode (schwarzer Draht). Die Gelstreifen mußten sich in der Mitte zwischen Anode und Kathode befinden, da sonst Kurzschlußgefahr bestand. Die Probenaufgabebecherhalteschiene wurde so aufgesetzt, dass die Becher in Richtung Anode zeigten und genau über den Gelstreifen positioniert waren. Die Probenaufgabebecher wurden kurz angedrückt. Vor der Prüfung auf Dichtigkeit wurden 2 IEF-Elektrodenstreifen zurechtgeschnitten, mit Millipore getränkt, überschüssiges Wasser mit einem Filterpapier entfernt und auf die beiden Gelstreifenenden gelegt. Die Elektroden wurden verschoben bis sie über den Streifen zu liegen kamen und dann abgesenkt bis ein Kontakt hergestellt war. Die Streifen waren damit fixiert. Anschließend wurden etwa 75 ml DryStrip Cover Fluid (Silikonöl) in den Rahmen gegeben bis alle Streifen bedeckt waren. Waren die Probenaufgabebecher dicht und floss Strom, wurden die Proben, die in Solubilisierungslösung aufgenommen worden waren, hineinpipettiert und mit 1-2 Tropfen DryStrip Cover Fluid (Silikonöl) überschichtet.

Laufbedingungen: (pH 3-10, 13 cm, 20°C, 50 µl Auftragsvolumen)

Zeit	0,5 h	1 h	1 h	4 h(oder 24 Std. für pH 4-5)
Spannung	150 V	300 V	600 V	3500 V
Stromstärke	0,05 – 0,1 mA / Streifen			
Leistung	5 W	5 W	5 W	5 W

Ein erster Wechsel der IEF-Elektrodenstreifen erfolgte nach 2,5 Stunden, die folgenden Wechsel jeweils nach weiteren 2 Stunden. Nach dem Lauf wurden die Gelstreifen kurz auf einem feuchten Filterpapier abgetropft und dann bei -70°C eingefroren.

B) Horizontale SDS Gel Elektrophorese

Es konnten jeweils 2 Fokussierungsgelstreifen auf ein SDS-Gel aufgelegt werden.

Je 2 Gelstreifen wurden in ein Reagenzglas gegeben und dort 10 min in 10 ml der Lösung 1 auf einem Linearschüttler geschwenkt. Nach Ablauf der Zeit wurden sie für weitere 10 min in 10 ml der Lösung 2 geschwenkt und dann mit Millipore abgespritzt. Wichtig war hierbei, daß

die Zeiten genau eingehalten wurden. Die Streifen konnten nun auf das SDS-Gel aufgelegt werden.

Ein SDS-Gel wurde genommen und mit der Gelseite nach oben auf die mit Kerosin benetzte Keramikkuhlplatte der Multiphor II Elektrophorese Einheit gegeben. Dabei ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen eingefangen werden. Nun wurden 2 IEF-Streifen mit der Gelseite nach unten aufgelegt. Dazu mußten sie vom sauren Ende (pH 3) auf die passende Länge zurechtgeschnitten und so auf die untere Hälfte des SDS-Gel aufgelegt werden, dass das saure Ende (pH 3) zur Seite der Kühltische zeigt und mehr als 1 cm Abstand zur unteren Gelbegrenzung aufweist. Die Enden der IEF-Streifen wurden mit einem Messer im Gel gekennzeichnet, um die Gele später bezüglich des isoelektrischen Punktes auswerten zu können. Der untere Elektrodenschwamm ist die Kathode, der Obere die Anode. Zwischen die beiden IEF-Streifen wurde ein Probenaufgabebecher aufgelegt und 10 µl LMW-Marker hineinpipettiert. An das basische Ende der IEF-Streifen (pH10) wurde ein kleines Filterpapierchen gestellt. Die Elektrodenschwämme wurden anschließend etwa 1 cm auf das SDS-Gel gelegt und der Lauf gestartet.

Laufbedingungen:

Zeit	1 h	2,5 – 3 h
Spannung	100 V	600 V
Stromstärke	30 mA / Gel	
Leistung	30 W	30 W

Nach 1 Stunde wurde der Lauf jeweils unterbrochen. Die beiden Filterpapiere, die beiden IEF-Streifen und der Probenaufgabebecher wurden entfernt. Dabei sollte die im Probenaufgabebecher verbliebene Flüssigkeit mit einem Filterpapier aufgesogen werden, um ein Verlaufen zu vermeiden und die Auflagefläche der IEF-Streifen kurz mit einem Filterpapier, das in Millipore getränkt wurde, abgetupft werden. Der untere Elektrodenschwamm wurde dann 1 cm weiter nach oben auf das Gel über die vorherige Lage der IEF-Streifen gelegt. Der Lauf wurde anschließend solange fortgesetzt, bis die blaue Front den oberen Elektrodenschwamm fast erreicht hatte. Nach Beendigung des Laufes wurden die Gele von der Kühlplatte genommen und mindestens 1 Stunde in die Fixierlösung gelegt.

2.13 „In-Strip“-Derivatisierung der Proteine mit dem 2,4-Dinitrophenylhydrazin für 2-D-Elektrophorese⁷¹

Nach der isoelektrischen Fokussierung in erster Dimension wurden die getrennte Proteine mit der Lösung der 10 mM 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2 N HCl 15 min bei 25 Grad derivatisiert. Nach der Reaktion wurden die Streifen mit neutralisierender 2 M Tris-Base/30% Glycerol Lösung für 15 min gewaschen. Dabei wandelte sich die Farbe der Streifen von gelb nach braun um. Danach erfolgte die übliche Elektrophorese in 2-ter Dimension entweder im vertikalen (Zoom Gele) oder im horizontalen (Excel SDS Gele) Format.

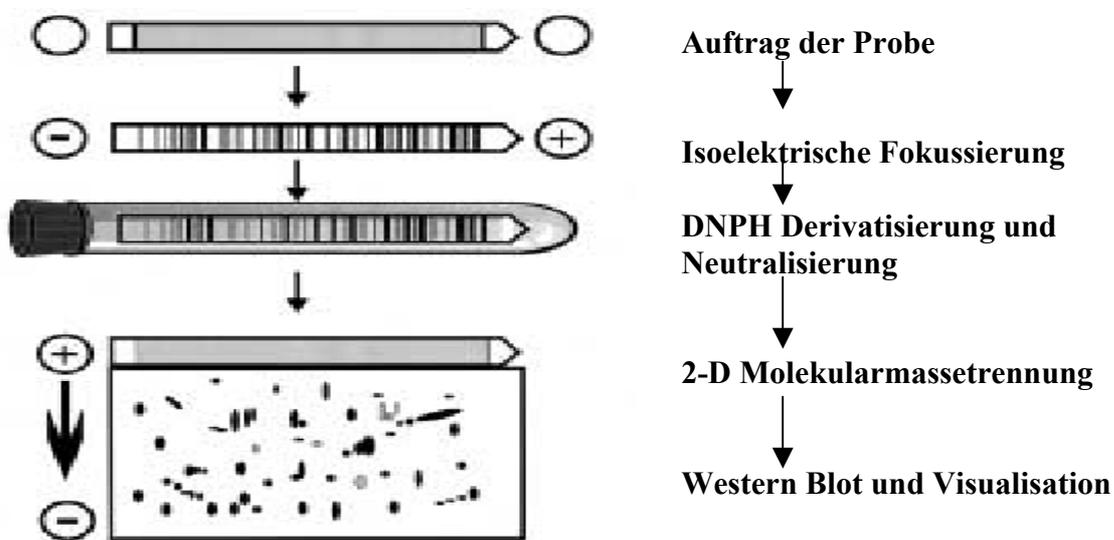


Abbildung 2.16 Schematische Darstellung der „In-Strip“-Derivatisierung der Proteine mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin

Die sogenannte „In-Strip“-Derivatisierung hat den Vorteil das die Proteine vor der Fokussierung nicht gestört werden und ihre Sensitivität ist viel höher als bei Derivatisierung nach Western Blotting.

Zur prä-SDS-PAGE – Derivatisierung wurden die Proteine mit DNPH vor der Elektrophorese inkubiert. Hierzu wurde eine Lösung von 6% SDS/5%Trifluoressigsäure/5mM DNPH verwendet. Nach Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur, wurde die Mischung mit 2M Tris in 30% Glycerol neutralisiert. Hierbei nimmt die Lösung eine orange Farbe an.

Die Proteine waren dann entsprechend ihrer Molekularmasse mittels 1-D SDS-PAGE getrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Carbonylgehalt wurde dann mit einem Anti-DNPH-Antikörper detektiert.

2.14 Agglutination von *Pseudomonas aeruginosa* durch SP-D

Die Fähigkeit von SP-D Bakterien zur Agglutination zu bringen wurde als funktionelles Assay verwendet⁷².

Die verwendeten Puffersysteme waren:

TBS (Tris-buffered-saline: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4)

TBS/Ca²⁺ (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 7,4)

1. Anzüchten von *Pseudomonas aeruginosa*:

Pseudomonas aeruginosa wurde über Nacht bei 37°C auf Nähragar (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) angezüchtet. Für alle Versuche wurde der gleiche Bakterienstamm verwendet.

2. Erstellen einer Bakteriensuspension:

Die Bakterien wurden von der Platte geerntet und in ein 50 ml Polypropylen-Gefäß (Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland) mit 20 ml TBS-Puffer gegeben. Das Gefäß wurde so lange geschüttelt bis eine homogene Suspension entstand. Um eine konstante Konzentration an Bakterien zu erzielen wurde die Extinktion der Suspension in einem Photometer (Eppendorf Gerätebau GmbH, Hamburg, Deutschland) bei 623 nm gemessen und auf 2,0 eingestellt.

3. Reinigung von *Pseudomonas aeruginosa*:

Um die Suspension von eventuellen Verunreinigungen, wie z.B. Nähragarresten zu säubern wurden die Bakteriensuspension zentrifugiert (4000 U/min, 10 Minuten) (Heraeus, Hanau, Deutschland), der Überstand verworfen. Das Sediment wurde erneut mit 20 ml TBS-Puffer in Suspension gebracht. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt.

4. Konzentrierung von *Pseudomonas aeruginosa*:

Nach der Reinigung der Bakterien wurde die Suspension erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert und das Sediment in 800 µl TBS/TC-Puffer aufgelöst, so daß eine Extinktion von 50 erzielt werden konnte.

5. Bestimmung der Agglutination:

Es wurde versucht durch Vermischung der Bakteriensuspension mit rekombinantem humanem SP-D (Dr. E. Crouch, St. Louis, MO, USA) (Standard SP-D) und mit bronchoalveolären Lavagen eine Agglutination der Pseudomonaden herbeizuführen. Um eine gleichmäßige Verteilung beider Komponenten zu gewährleisten, wurden sie in einem 1,5 ml Polypropylen-Gefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) vermischt und erst danach auf einen Objektträger pipettiert. Standard SP-D war in TBS-Puffer, dem 10 mM

EDTA zugegeben wurde, gelöst. Von der Bakteriensuspension wurden jeweils 1,5 µl, vom Standard SP-D und von der BAL wurden jeweils 13,5 µl eingesetzt. Um zu kontrollieren, daß es nicht zu einer spontanen Agglutination von Pseudomonaden kommt, wurde 1,5 µl Baktriensuspension mit 13,5 µl TBS-Puffer, dem 10 mM EDTA zugegeben war, vermischt und ebenso auf einen Ojektträger pipettiert. Es zeigte sich hierbei aber in keinem Fall eine spontane Agglutination.

6. Auswertung:

Nach 4 Minuten wurde der Objektträger unter dem Mikroskop (Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Deutschland) betrachtet und das Ergebnis digital gespeichert (Paint Shop Pro 6, Jasc Software Inc., Eden Prairie, MN, USA).

2.15 Liste der verwendeten Antikörper und Standardproteine

Tabelle 2.11 Verwendete Antikörper

Antikörper	Typ	Hersteller	Stadt	Land
Anti-DNPH	Aus Kaninchen, D-9656	Sigma	München	D
Anti-SP-A	Kaninchen anti Mensch (pkl.)	Byk Gulden	Konstanz	D
Anti-SP-D	Kaninchen anti Mensch (pkl.)	Davids Biotechnologie	Regensburg	D
Anti-Ig	Ziege anti Kaninchen (HRP)	Dianova GmbH	Hamburg	D
Anti-3-Nitrotyrosin	Aus Kaninchen, A-21285	Molecular Probes, Mo Bi Tec GmbH	Göttingen	D

Tabelle 2.12 Verwendete Standardproteine

Protein	Typ	Von	Reinheit
SP-D	menschlich	Patientenlavage AP-4	Geprüft mit Coomassiefärbung auf 1-D (siehe Abb.2.13)

2.16 Statistische Analyse

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit Graph Pad Prism 4.01 (San Diego, CA, USA) sowie Microsoft Excel 2000 (San Francisco, CA, USA). Für den Vergleich von mehreren Patientengruppen wurde zunächst der Kruskal-Wallis-Test eingesetzt. Falls sich damit ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) ergab, wurde ein Vergleich aller Paare mit Hilfe des Post-Tests nach Dunn angeschlossen. Waren lediglich zwei Gruppen zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney-Test für ungebundene oder Wilcoxon-Test für gebundene Stichproben verwendet. Das Konfidenzintervall betrug jeweils 95%. Aus Ergebnissen von Mehrfachmessungen einer Probe wurde jeweils der Mittelwert berechnet und gegebenenfalls der Standardfehler (SEM) angegeben. Innerhalb einer untersuchten Patientengruppe wurden der Median sowie die 25%- und 75%- Perzentilen berechnet. Für die Korrelationsanalysen zwischen unterschiedlichen Parametern der Patientenvorgängen wurde der zweiseitige Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Als relativer Variationskoeffizient wird der Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert bezeichnet. Er wird in Prozent angegeben. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Bestimmung des oxidativen Status des Gesamtproteoms in BAL bei verschiedenen Lungenerkrankungen

3.1.1 Untersuchung verschiedener Patientengruppen

Als Marker des oxidativen Status der Proteine in BAL wurde der „Goldstandard“ der Proteinoxidation, die Bestimmung des Carbonylgehaltes gewählt. Mittels sensitivem Dot-Blot Assay wurde der Carbonylgehalt der BAL-Proteinproben bei Patienten aus verschiedenen Erkrankungsgruppen quantitativ gemessen.

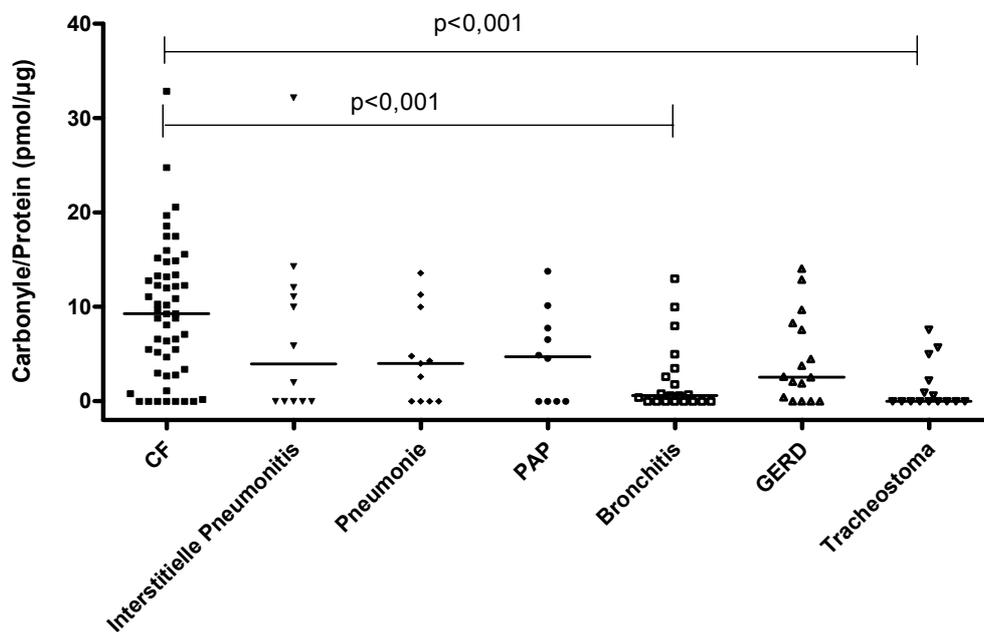


Abbildung 3.1 Carbonylgehalt in Proteinen aus BAL bei verschiedenen Patientengruppen

Tabelle 3.1 Median- und Mittelwerte des Carbonylgehaltes bei verschiedenen Patientengruppen

	CF	Interstitielle Pneumonitis	Pneumonie	PAP	Bronchitis	GERD	Tracheostoma
Variablenzahl	52	12	11	10	20	16	15
Minimum	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
25% Percentile	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0
Median	9,3	3,9	4,0	4,7	0,6	2,6	0,0
75% Percentile	13,4	11,6	10,0	8,9	3,1	7,9	2,2
Maximum	32,9	32,2	13,6	13,8	13,0	14,1	7,6
Mittelwert	9,4	7,3	4,6	4,8	2,4	4,4	1,5
Std. Abw	7,2	9,6	4,9	4,9	3,8	4,7	2,5
Std. Fehler	0,9	2,8	1,5	1,5	0,85	1,2	0,7

In Abbildung 3.1 erkennt man, dass der Median des Carbonylgehaltes in der Gruppe der CF-Patienten (9,3 pmol/μg Protein) höher liegt als bei den anderen Gruppen. Der Kruskal-Wallis-Test mit Post-Test nach Dunn ergibt jedoch einen signifikanten Unterschied nur zwischen den Gruppen der CF-Patienten und Gruppen der Patienten mit Bronchitis und Tracheostoma ($p < 0,001$).

3.1.2 Gesamtzellzahl der Lavage

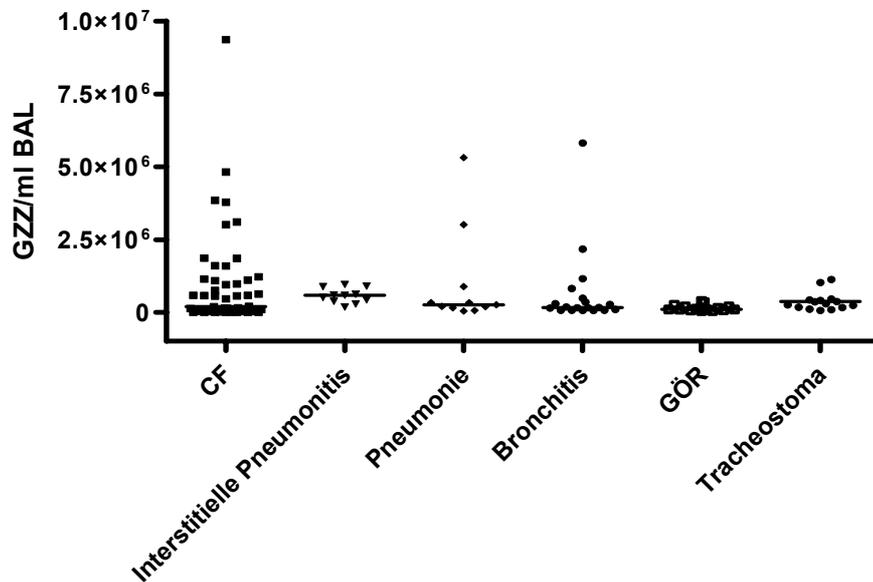


Abbildung 3.2 Gesamtzellzahl in BAL bei verschiedenen Patientengruppen

Tabelle 3.2 Median- und Mittelwerte der Gesamtzellzahl bei verschiedenen Patientengruppen

	CF	Interstitielle Pneumonitis	Pneumonie	Bronchitis	GÖR	Tracheostoma
Variablenzahl	50	11	11	19	15	15
Minimum	200,0	180000	35000	55000	38000	60000
25% Percentile	24300	375000	150000	70000	65000	156000
Median	191900	580000	250000	155000	98000	288000
75% Percentile	$1,121e+006$	875000	880000	480000	198000	420000
Maximum	$9,350e+006$	950000	$5,300e+006$	$5,800e+006$	380000	$1,123e+006$
Mittelwert	946752	570455	974545	656921	147400	364800
Std. Abw	$1,660e+006$	254848	$1,667e+006$	$1,349e+006$	106825	312912
Std. Fehler	234821	76839	502724	309368	27582	80794

Der Kruskal-Wallis-Test ergibt zwischen den Gruppen keinen signifikanten Unterschied für die Gesamtzellzahl.

3.1.3 Anzahl an Neutrophilen in der BAL

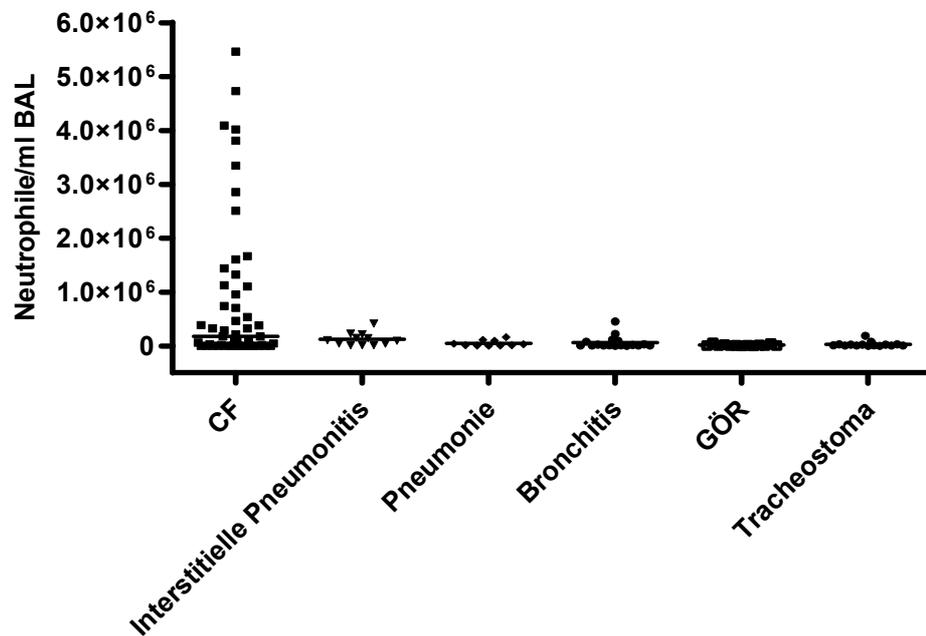


Abbildung 3.3 Absolute Neutrophilenzahl in BAL bei verschiedenen Patientengruppen. P-Wert für Kruskal-Wallis Test <0,05

Tabelle 3.3 Median- und Mittelwerte der absoluten Neutrophilenzahl bei verschiedenen Patientengruppen

	CF	Interstitielle Pneumonitis	Pneumonie	Bronchitis	GÖR	Tracheostoma
Variablenzahl	51	12	10	17	13	14
Minimum	1,2	7200	550,0	280,0	0,0	840,0
25% Percentile	562,5	23800	3465	1200	1166	3050
Median	174000	99000	16550	11600	5390	14520
75% Percentile	1,119e+006	177500	98000	82010	17725	26442
Maximum	5,450e+006	408500	158400	446875	54880	185592
Mittelwert	883679	118958	43958	60737	12631	28911
Std. Abw	1,411e+006	118225	55033	115165	17278	48794
Std. Fehler	197621	34129	17403	27932	4792	13041

Wie in Abbildung 3.3 zu erkennen ist, liegt der Median der absoluten Neutrophilenzahl in der Tracheostoma Kontrollgruppe bei 14520 Zellen pro ml Lavageflüssigkeit.

Den höchsten Wert hat die CF-Gruppe mit 174000 Zellen/ml. Der Kruskal-Wallis-Test ergibt jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, weil die Streuung sehr groß ist.

3.1.4 Relativer Anteil an Neutrophilen

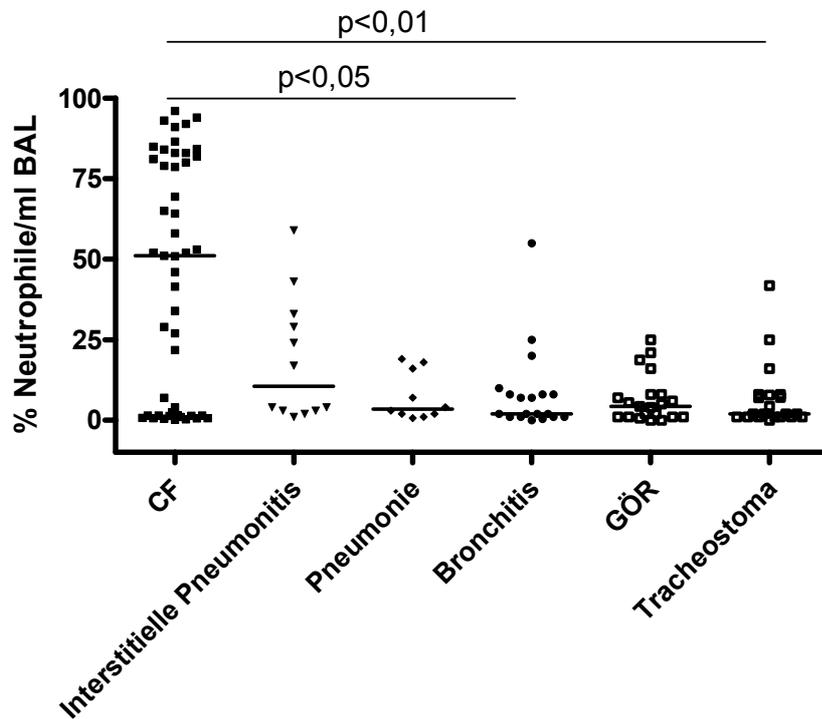


Abbildung 3.4 Relativer Anteil an Neutrophilen (%) in BAL bei verschiedenen Patientengruppen. P für Kruskal-Wallis Test mit Post-test nach Dunn

Tabelle 3.4 Median- und Mittelwerte der relativen Neutrophilenzahl bei verschiedenen Patientengruppen

	CF	Interstitielle Pneumonitis	Pneumonie	Bronchitis	GÖR	Tracheostoma
Variablenzahl	48	12	10	19	21	21
Minimum	0,2	1,0	0,7	0,0	0,0	0,0
25% Percentile	1,5	3,0	1,5	1,0	1,000	1,0
Median	51,1	10,5	3,5	2,0	4,300	2,0
75% Percentile	81,5	31,0	17,0	8,0	8,000	7,9
Maximum	96,0	59,0	19,0	55,0	25,00	41,8
Mittelwert	44,1	18,5	7,3	8,4	6,533	6,6
Std. Abw	36,4	19,2	7,4	13,1	7,384	10,1
Std. Fehler	5,3	5,5	2,3	3,0	1,611	2,2

Bezüglich des Anteils der neutrophilen Granulozyten an der Gesamtzellzahl in der BAL Flüssigkeit erhält man mit dem Kruskal-Wallis-Test einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p=0,002$). Obwohl der Median des Anteils der neutrophilen Granulozyten in der Gruppe der CF-Patienten deutlich höher liegt als bei anderen Gruppen, ergibt der Post-Test nach Dunn lediglich zwischen der Gruppe mit langfristiger Tracheostomaversorgung ($p<0,01$) und Kindern mit chronischer Bronchitis eine signifikante Differenz ($p<0,05$).

3.1.5 Recovery

Die Recovery oder Rückgewinnungsrate, d.h. das Verhältnis von bei der bronchoalveolären Lavage abgesaugten zum instillierten Flüssigkeitsvolumen, beträgt in der Tracheostoma-Kontrollgruppe im Median 43%, bei den Kindern aus anderen Krankheitsgruppen weicht dieser Parameter nicht signifikant ab (Abb.3.5).

3.1.6 Zellvitalität

In Abbildung 3.5 erkennt man, dass der Median der Zellvitalität bei den Kontrollen (80%) nicht höher liegt als bei den anderen Gruppen. Der Kruskal-Wallis-Test ergibt hier auch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

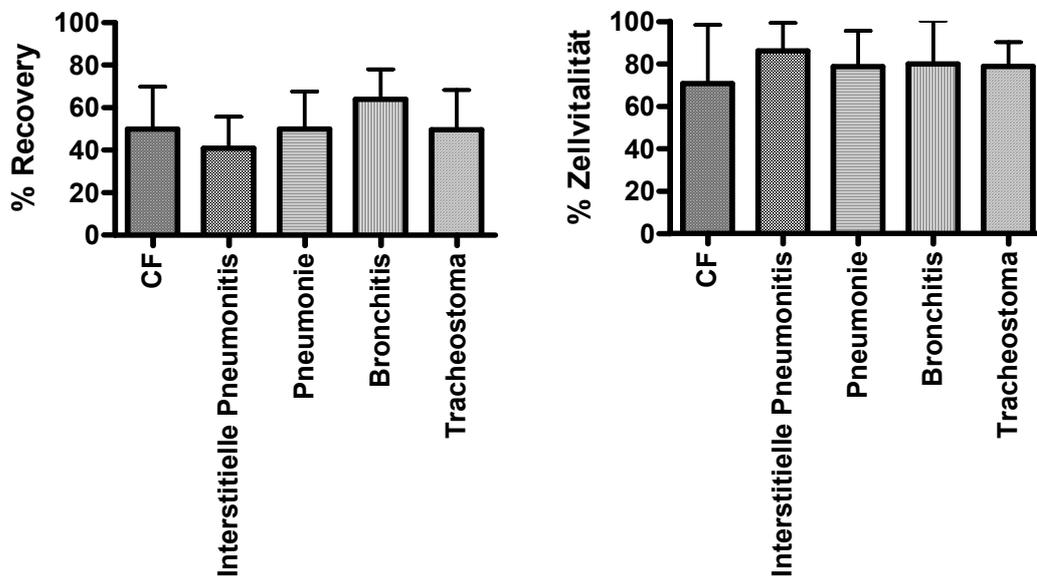


Abbildung 3.5 Recovery und Zellvitalität in Lavagen von verschiedenen Patientengruppen

Tabelle 3.5 Medianwerte der relativen Neutrophilenzahl bei verschiedenen Patientengruppen

		CF	Interstitielle Pneumonitis	Pneumonie	Bronchitis	Tracheostoma
Variablenzahl		50	10	10	15	15
Recovery %	Minimum	7,5	23,0	23,0	41,0	24,0
	Median	52,8	40,0	48,5	67,0	43,0
	Maximum	83,0	73,0	81,0	87,0	78,0
Zellvitalität %	Minimum	6,0	58,0	43,0	50,0	64,0
	Median	75,5	88,0	83,0	82,0	80,0
	Maximum	98,0	99,0	100,0	100,0	90,0

3.2 Untersuchungen innerhalb der CF-Patienten

3.2.1 Altersabhängigkeit

Es wurde festgestellt, dass die CF-Patienten signifikant älter waren als die Patienten aus anderen Krankheitsgruppen. Dabei, wie aus dem Bild 3.6 zu sehen ist, gibt es signifikante positive Korrelationen zwischen dem Alter und dem Ausmaß der Proteinoxidation in der Gruppe der CF-Patienten. Folgerichtig ist es nicht ganz korrekt, die Gruppe der CF-Patienten mit anderen Gruppen zu vergleichen.

Der Alters-Median der CF-Patienten betrug 15,3 Jahre. Dementsprechend wurden diese in zwei Subgruppen unterteilt, eine unterhalb und eine oberhalb dieses Wertes.

Die Lungenfunktion bzw. die Proteincarbonylwerte in der Gruppe der jüngeren Patienten waren gleich bzw. niedriger als in der Gruppe der älteren Patienten (Abb. 3.6).

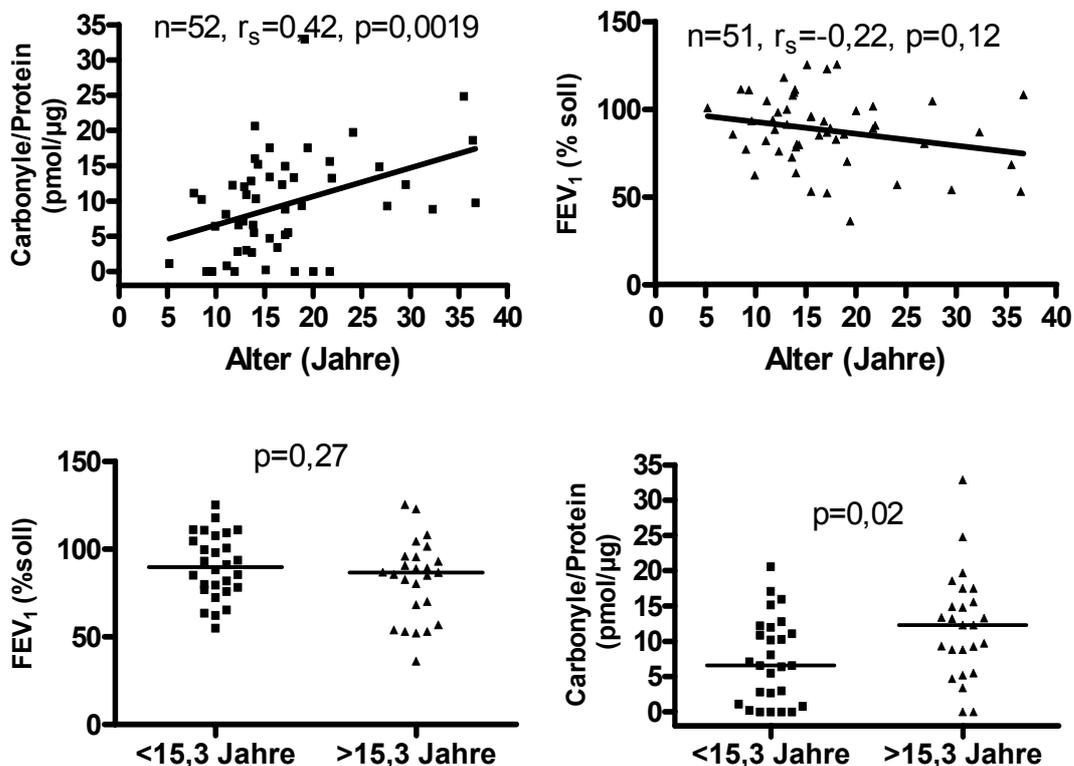


Abbildung 3.6 Korrelation zwischen Proteinoxidation und Alter der CF-Patienten (oben links), zwischen FEV₁ und Alter (oben rechts). Vergleich des FEV₁ (unten links) und Proteinoxidation (unten rechts) in jungen und älteren Patienten

Es wurden dann solche Patienten ausgewählt, die jünger als das Medianalter waren und ein pathologisches FEV₁ (<80%) hatten. Diese wurden mit den älteren Patienten mit normalem FEV₁(>80%) verglichen. Dabei zeigte sich, dass junge Patienten einen numerisch höheren

Medianwert der Proteincarbonylen hatten. Ein signifikanter Unterschied bestand wohl aufgrund der niedrigen Fallzahl nicht (Abb. 3.7).

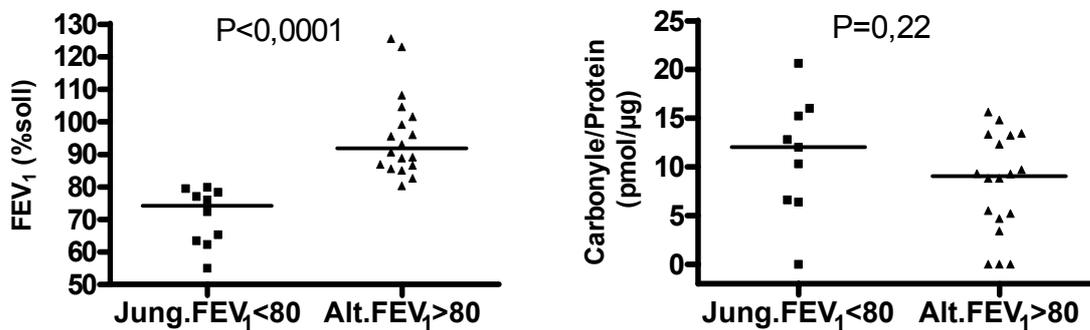


Abbildung 3.7 Vergleich der FEV₁ und Proteinoxidation von jungen bzw. älteren Patienten mit pathologischer bzw. normaler Lungenfunktion .

Im Vergleich der jungen und älteren Patienten mit normaler und pathologischer Lungenfunktion wurden Unterschiede im Carbonylgehalt bei Patienten mit pathologischer Lungenfunktion gefunden. Dies weist auf eine mögliche Verminderung der Toleranz des oxidativen Stresses mit dem Alter hin. Bei Patienten mit normaler Lungenfunktion wurde keine solche Differenz beobachtet.

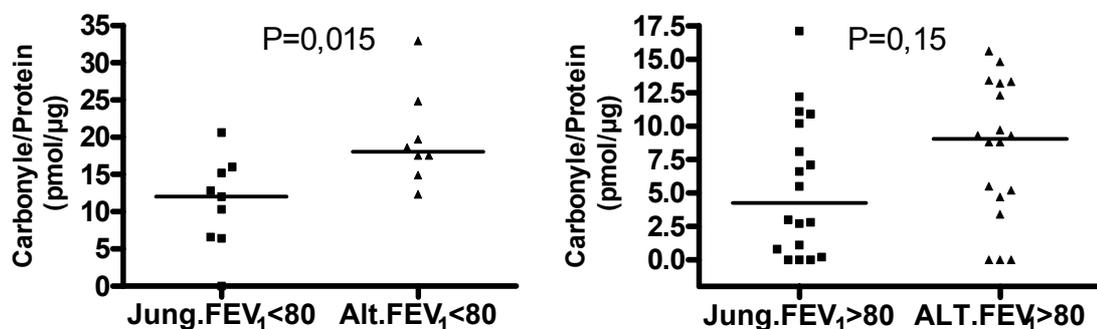


Abbildung 3.8 Vergleich der Proteinoxidation in jungen und älteren Patienten mit der normalen und pathologischen Lungenfunktion (andere Gestaltung des Vergleichs).

Auch die Faktorenanalyse bestätigt, dass die Carbonylvariable für 88,5% der Gesamtvarianz der Lungenfunktion verantwortlich ist, die Altersvariable ist nur für 62,5% verantwortlich. Daher kann man vermuten, dass nicht das Alter, sondern die Lungenfunktion (bzw. die sie determinierenden Prozesse) grössere Auswirkungen auf die Proteinoxidation in der Lunge hat, obwohl die Bedeutung des Alters für die Anhäufung oxidierter Proteine nicht ganz auszuschließen ist.

Tabelle 3.6: Medianwerte und 25%-75% Perzentile aller Variablen der CF-Patienten eingeteilt nach FEV₁ und Anteil der Neutrophilen in BALF

	Geschlecht (m/w)	Alter † (Jahre)	BMI (kg/m ²)	FVC (% soll)	FEV1 (% soll)	MEF 25 (% soll)	MEF 75-25 (% soll)	Gesamt recovery (%)	Gesamtzellzahl (/ml BAL)	Neutrophile (/ml BAL)	Vitalität Pool (%)	Makrophagen (%)	Lymphozyten (%)	Neutrophile (%)	Eosinophile (%)	Carbonyle (pmol/µg Protein)
FEV1<80%	10/8	14,9 (13,8-21,8)	16,7 (15,1-20,3)	71,2 (63,0-83,0)	64,4 (53,5-76,4)	20,4 (16,5-29,5)	36,7 (26,3-63,6)	41,0 (24,1-60,5)	1023000 (95700-3940000)	583000 (132820-3940000)	77 (59-84,0)	16,0 (7,5-50,3)	4,3 (2,5-6,0)	78,6 (42,5-88,5)	1 (0,1-2,0)	15,6 (11,3-19,5)
FEV1>80%	16/15	15,5 (5,2-36,7)	19,7 (17,0-22,4)	98,6 (88,4-110,0)	95,6 (87,4-107,8)	64,3 (39,1-84,9)	87,2 (59,3-100,1)	57 (42,2-66,4)	136000 (24300-1025000)	12528 (186,2-382200)	72,5 (62,5-84,0)	66,0 (25-91)	4 (2-8,7)	21,8 (1,3-69,4)	0,3 (0-1,2)	6,9 (1,9-11,0)
P***		0,4	0,13	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	0,1	0,02	0,005	0,78	0,03	0,75	0,01	0,45	0,0002
Neutrophile>10%	15/16	15,5 (7,7-36,7)	19,8 (16,3-22,6)	85 (72-99,8)	80,2 (63,5-93,6)	31,1 (20,0-63,8)	59,6 (36,7-87,2)	48,1 (26-60,8)	958000 (340000-2971000)	555835 (183350-1713000)	77 (69-83)	20,5 (10-42,4)	4 (1,4-6)	74 (51,0-84,1)	0,75 (0,2-2,8)	11,55 (7,7-16,5)
Neutrophile<10%	10/5	13,1 (5,2-21,7)	17,0 (15,55-22,1)	96,4 (88,5-101,3)	99,3 (92,1-107,6)	76,9 (56,8-96,4)	93,3 (77,9-103,4)	59,2 (43,5-71,5)	24300 (2500-72750)	221,1 (29,5-721,3)	75 (66-85)	91 (88-93,9)	7,3 (2,7-11)	1,35 (0,6-1,5)	0 (0-0,5)	0,5 (0-3,8)
P***		0,025	0,28	0,026	0,0012	0,0003	0,0064	0,052	P<0.0001	P<0.0001	0,99	P<0.0001	0,02	P<0.0001	0,008	P<0.0001

Tabelle 3.7: Medianwerte und 25%-75% Perzentile aller Variablen aller Patientengruppen

	Geschlecht (m/w)	Alter** † (Jahre)	Gesamt recovery (%)	Gesamtzellzahl (/ml BAL)	Neutrophile (/ml BAL)	Vitalität Pool (%)	Makrophagen (%)	Lymphozyten (%)	Neutrophile (%)	Eosinophile (%)	Basophile (%)	Plasmazellen (%)	Carbonyle (pmol/µg Protein)
CF	29/28	15,3 (5,2-36,7)*	52,8 (36,5-64,6)	300000 (37500-1216000)	172900 (505,3-848850)*	75,5 (65,5-83,5)	45 (12,3-88,4)	4 (2-7,7)*	51 (1,5-81,5)*	0,4 (0-1,7)	0,0	0,0	9,3 (3,2-14,1)*
Interstitielle Pneumonie	10/4	9,7 (4,5-15,5)	40* (26-49)	585000 (400000-887500)	99000 (23800-177500)	88 (84-94,5)	50 (37,5-63)	19,5 (5,5-39,5)	10,5 (3-31)	2 (1-4)	0 (0-1)	0 (0-1,5)	3,95 (0-11,6)
Pneumonie	10/3	5,9 (0,3-9,3)	48,5 (38-65,5)	250000 (150000-880000)	16550 (3465-98000)	83 (70-91)	71,5 (55-84,5)	9 (4-32,5)	3,5 (1,5-17)	0 (0-1,5)	0 (0-0,1)	0 (0-0)	4 (0-10)
Bronchitis	10/12	6,8 (1,9-15,2)	67 (50-72)	155000 (70000-480000)	11300 (1200-82010)	82 (70-90)	82 (69-92)	10 (6-16)	2 (1-8)	0 (0-2)	0 (0-0)	0 (0-0)	0,6 (0-3,05)
Tracheostoma	8/9	2,5 (0-10,9)	43 (36-76)	288000 (156000-420000)	14520 (3050-26442)	80 (72-85)	82,5 (66,5-91,2)	10,75 (5-22)	2 (1-7,9)	0,1 (0-1)	0 (0-0)	0,0	0 (0-2,2)
P**** gegen Tracheostoma		<0,0001	NS	NS	NS‡	NS	NS	<0,05	<0,05	NS	NS	NS	>0,001

*-signifikanter Unterschied gegen Tracheostoma, **-Medianwert +Minimum und Maximum sind angegeben, ***-p-Wert nach Mann-Whitney

Test, ****-p-Wert nach Kruskal-Wallis Test

†-Alter ist in Beziehung zum BAL-Termin angegeben, ‡-die Differenz ist zwischen CF-Gruppe und TS im Vergleich einzelner Gruppen signifikant (p<0,05).

3.3 Korrelationsuntersuchungen

3.3.1 alle Patientengruppen zusammengefasst zu einer Gruppe

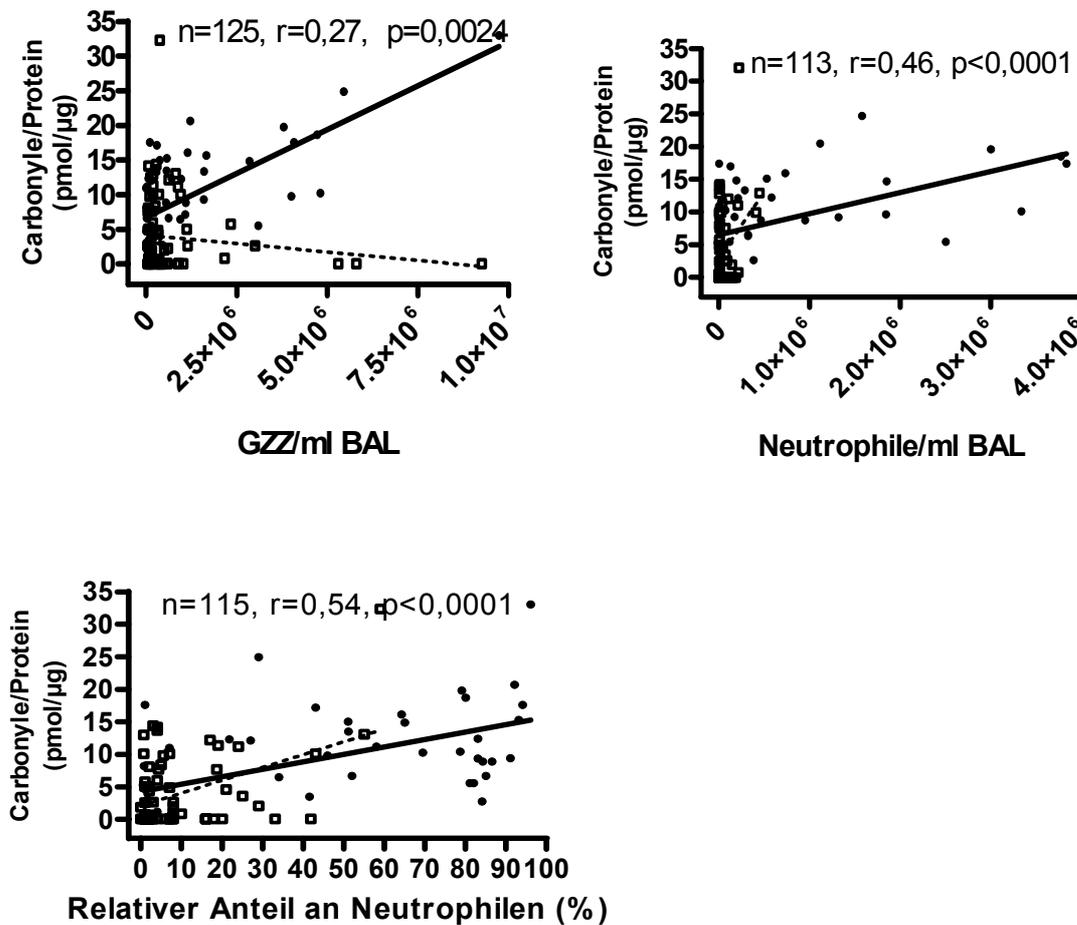


Abbildung 3.9 Korrelation zwischen Proteincarbonylen und Zellzahl in BAL

Alle Patientengruppen wurden kombiniert (durchgehende Regressionsgerade). Die Gruppe der CF-Patienten (gestrichelte Regressionsgerade). CF-Patienten (Kreise). Patienten aus allen anderen Patientengruppen (Quadrate).

In der Gesamtgruppe aller Patienten bestanden positive Korrelationen zwischen dem Gehalt an Proteincarbonylen und allen drei zytologischen Parametern. Diese Zusammenhänge ergeben sich vor allem durch die Gruppe der CF-Patienten, da sie nach Ausschluss dieser Gruppe nicht mehr bestehen.

3.4 Untersuchung der CF-Patienten

3.4.1 Korrelation zwischen Zellen und Proteincarbonylen

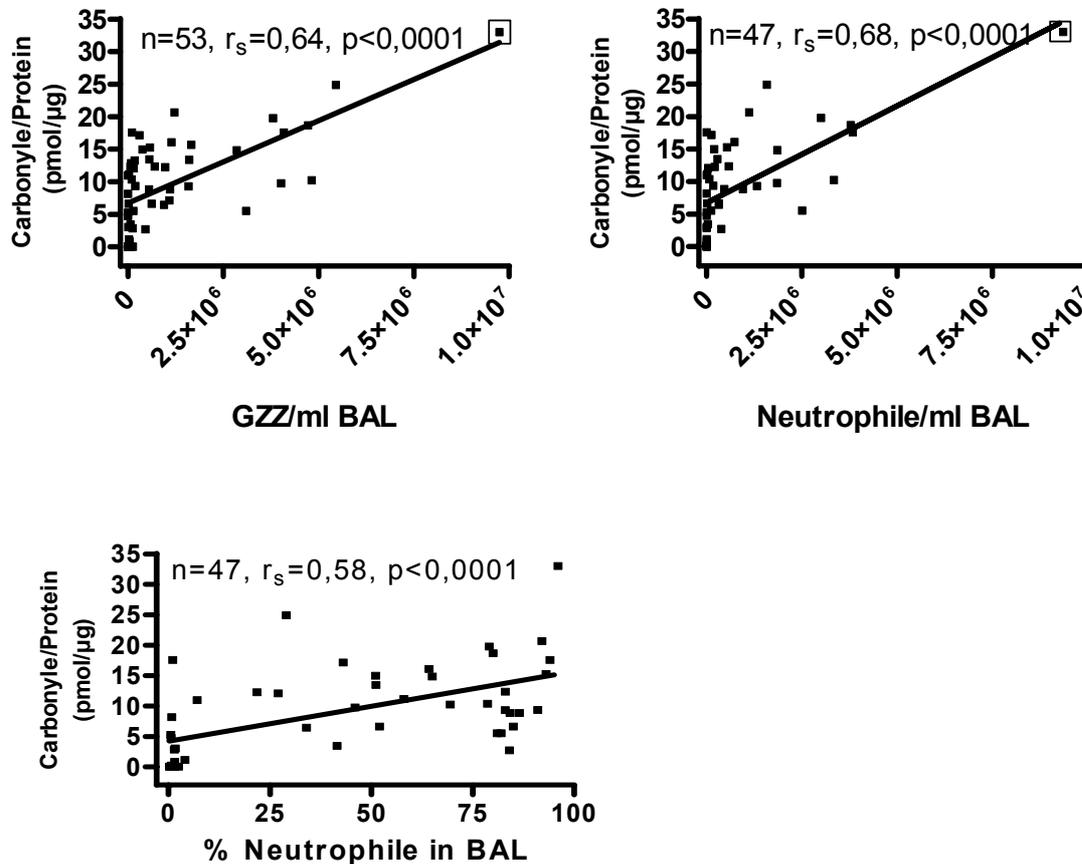


Abbildung 3.10 Korrelation zwischen Proteincarbonylen und Zellzahl in BALF von CF Patienten. Lineare Regressionsanalyse.

In der Gruppe der CF-Patienten besteht eine positive Korrelation zwischen den Proteincarbonylen und der Zellzahl in Lavageflüssigkeit: Korrelation zwischen Proteincarbonylen und der Gesamtzellzahl ($r=0,64, p<0,0001$), zwischen Proteincarbonylen und absoluter Neutrophilenzahl ($r=0,68, p<0,0001$) und zwischen Proteincarbonylen und relativer Neutrophilenzahl ($r=0,58, p<0,0001$). Die Korrelation bleibt unverändert nach dem Abzug des Ausreißers, der auf dem Bild mit einem Quadrat gekennzeichnet ist ($r=0,62, p<0,0001$ für Gesamtzellzahl, $r=0,66, p<0,0001$ für Neutrophilenzahl).

3.4.2 Lungenfunktionsparameter und Proteincarbonyle in BALF

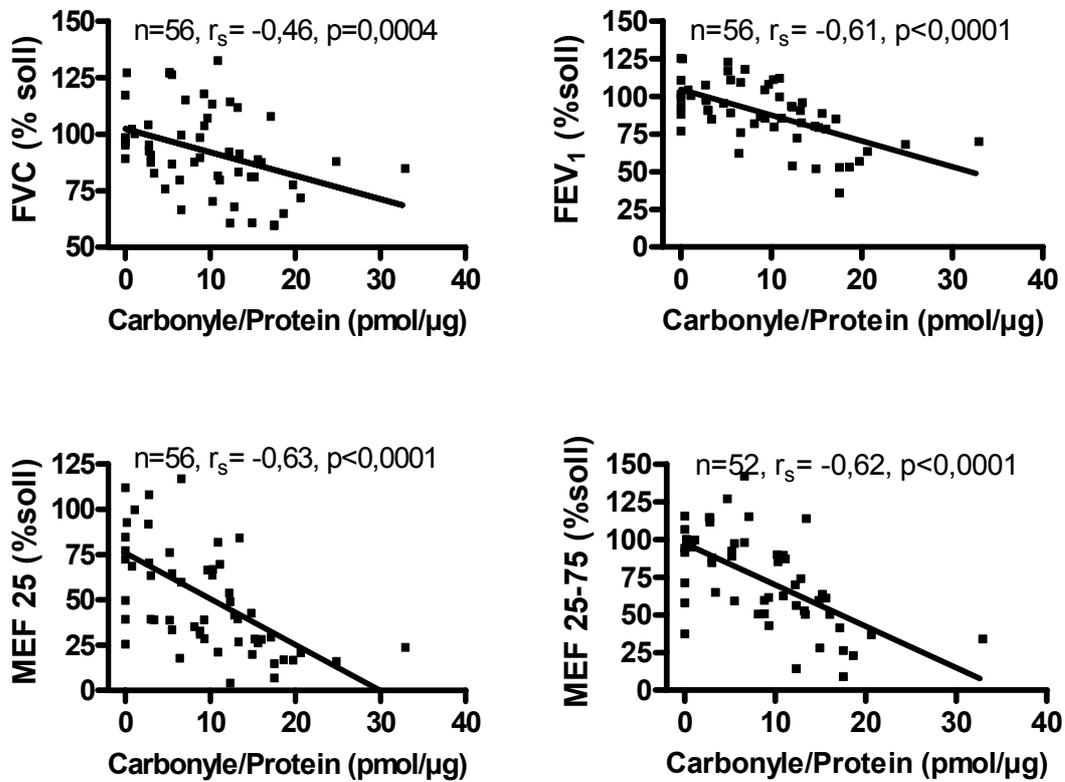


Abbildung 3.11 Korrelation zwischen Proteincarbonylen und Lungenfunktion bei CF Patienten

Wie es aus der Abb. 3.11 zu sehen ist, korreliert der Proteincarbonylgehalt in BALF der CF-Patienten umgekehrt proportional mit der Lungenfunktion. Dabei war die Korrelation mit allen vier Parametern signifikant.

3.4.3 Unterteilung der CF-Patienten nach dem FEV₁

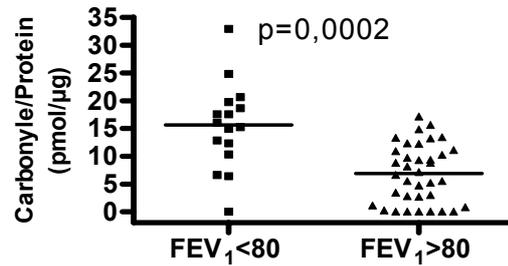


Abbildung 3.12 Differenz im Proteincarbonylgehalt in CF-Patientengruppen mit normaler und pathologischer Lungenfunktion (FEV₁). Mann-Whitney Test. FEV₁<80 heißt <80 % des individuellen Referenzwertes

Nach der Unterteilung aller CF-Patienten anhand des FEV₁ unterschieden sich die Carbonylgehalte zwischen den Gruppen mit normaler und pathologischer Lungenfunktion ($p=0,0006$).

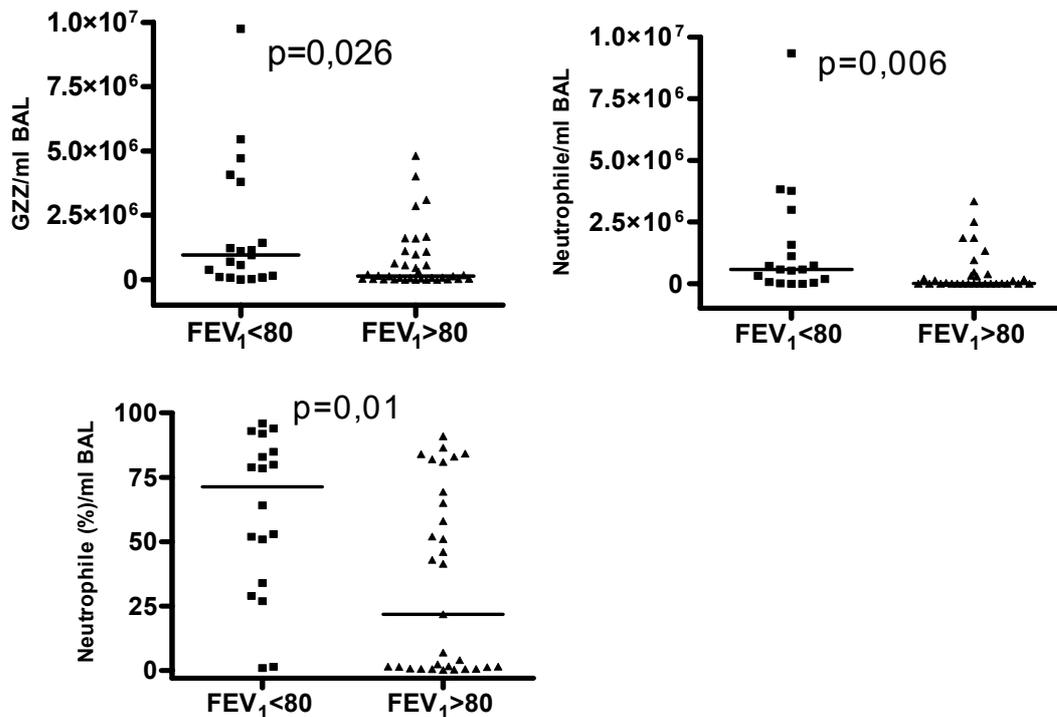


Abbildung 3.13 Zellparameter in BAL der CF-Patientengruppen mit normalen und pathologischen Lungenfunktionswerten (FEV₁). Mann-Whitney Test. FEV₁<80 heißt <80 % des individuellen Referenzwertes

Auch die Gesamtzellzahl, die Neutrophilenzahl und deren relativer Anteil unterschieden sich in Abhängigkeit von der Lungenfunktion. Der Unterschied war am deutlichsten bei der Zahl der neutrophilen Granulozyten. Alter und BMI unterschieden sich nicht in Abhängigkeit von der Gruppierung nach FEV₁< oder > 80% des Solls.

3.4.4 Unterteilung der CF-Patienten nach dem relativen Gehalt an Neutrophilen

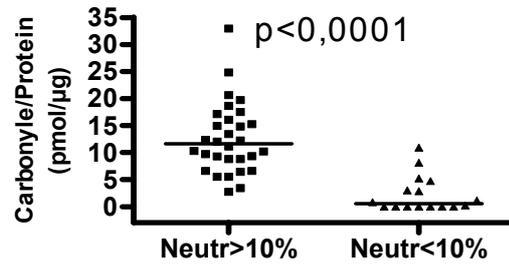


Abbildung 3.14 Proteincarbonylgehalt bei CF-Patienten mit hohem (>10%) und niedrigem (<10%) Neutrophilengehalt in der BAL

CF-Patienten mit hohem relativem Gehalt an Neutrophilen hatten mehr Carbonyle/Protein als solche mit niedrigem Gehalt.

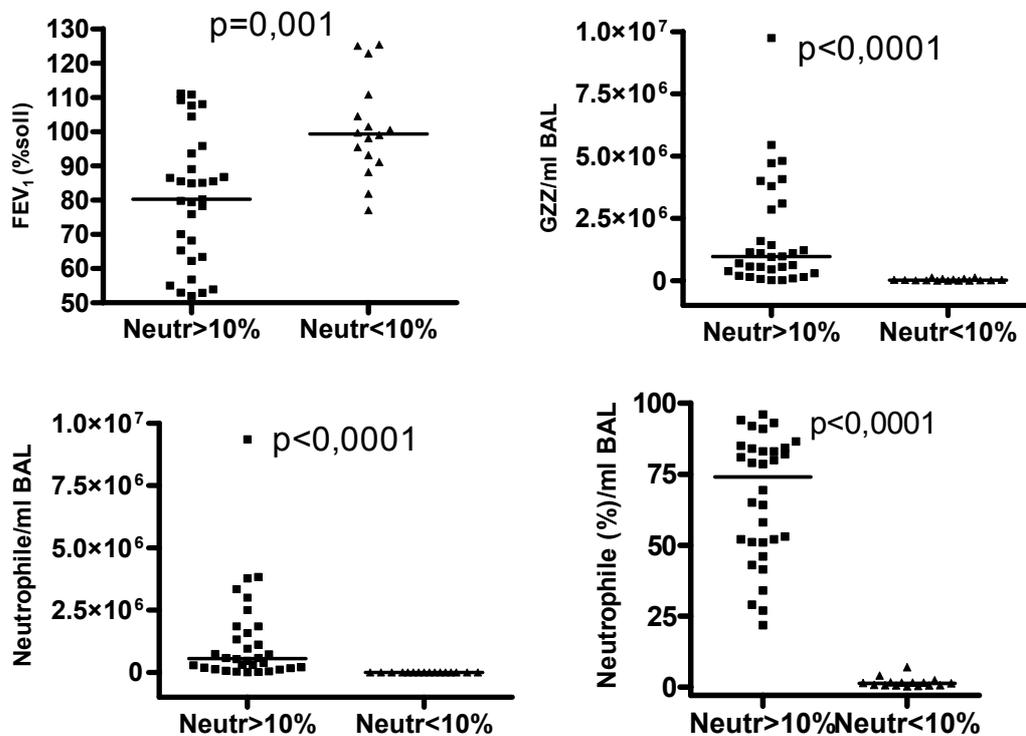


Abbildung 3.15 Lungenfunktion, Gesamtzellzahl, abs. und rel. Zahl an Neutrophilen in BALF bei CF Patienten mit hohem (>10%) und niedrigem (<10%) Neutrophilengehalt in der BAL. Mann-Whitney Test.

Auch die Unterschiede in der Lungenfunktion, der Gesamtzellzahl und den Neutrophilenzahlen waren signifikant.

Zwischen Lungenfunktion, absoluter und relativer Neutrophilenzahl in BALF bestand eine negative Korrelation.

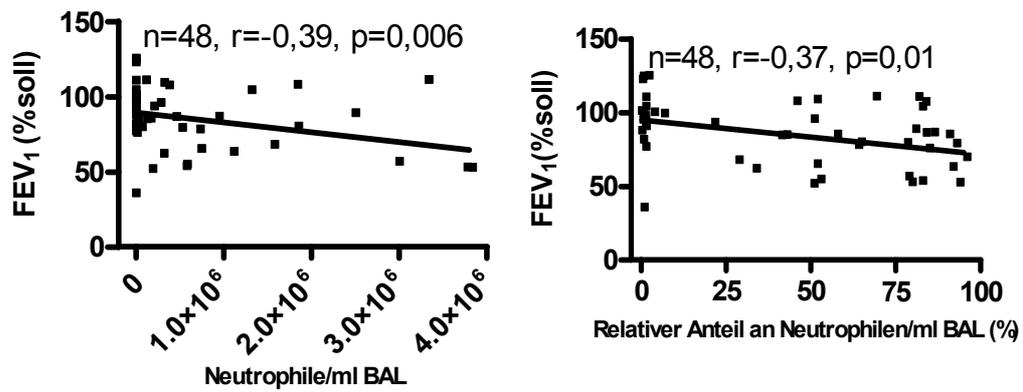


Abbildung 3.16 Korrelation zwischen FEV₁ und absoluter Neutrophilenzahl in BAL von CF-Patienten (links). Korrelation zwischen FEV₁ und relativer Neutrophilenzahl in BAL von CF-Patienten (rechts).

3.5 Darstellung oxidativer Änderungen des Gesamtproteoms von BAL bei verschiedenen Lungenerkrankungen mittels 2-D Elektrophorese

Bei den in Tab.1-10 markierten Patienten wurde exemplarisch eine BAL-Proteom Analyse mittels 2-D Elektrophorese zur Bestimmung des Umfangs der Oxidation und die Ermittlung oxidations-empfindlicher Proteine durchgeführt.

Die BAL-Proteom Analyse wurde, wie im Methodenteil beschrieben, mittels des ZOOM-Elektrophorese Systems durchgeführt.

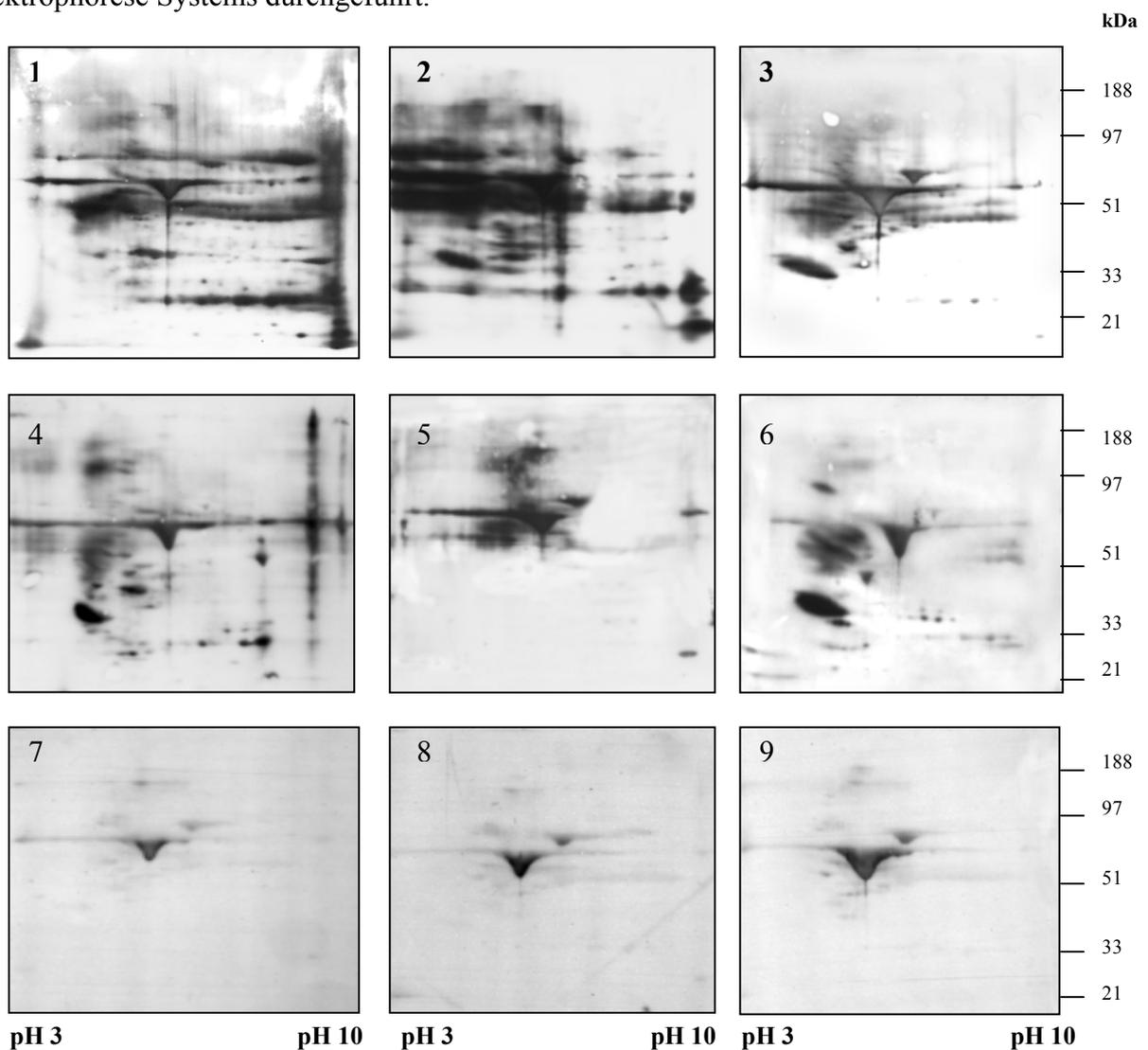


Abbildung 3.17 2-D-Analyse der oxidierten Proteine auf Western Blots dargestellt mit Anti-dinitrophenylhydrazin Antikörpern. Auf jedem Gel wurden 80 µg Protein aufgetragen.

Von links nach rechts, von oben nach unten:

Tabelle 3.8 Auswertung zur Abbildung 3.17:

	Patient	Spotzahl	Spotfläche (mm ²)	Spotvolumen (OD*mm ²)	Carbonylwert (pmol/μg)
1.	CF Patient CF-39 mit hohem Oxidationsgrad	289	337,2	48503	14,0
2.	CF Patient CF-3 mit niedrigerem Oxidationsgrad	217	344,8	53563	9,3
3.	CF Patient CF-32 mit niedrigem Oxidationsgrad	101	194,0	30233	0,0
4.	Patient I.P.-7 mit Interstitieller Pneumonitis	139	173,0	25344	10,0
5.	Patient P-5 mit Pneumonie	69	150,3	24508	0,0
6.	Patient AP-1 mit PAP	119	230,1	30566	4,9
7.	Patient B-4 mit Bronchitis	15	26,9	4363	0,0
8.	Patient R-2 mit GERD	10	33,8	4007	0,0
9.	Patient T-2 mit Tracheostoma	41	69,4	8662	0,6

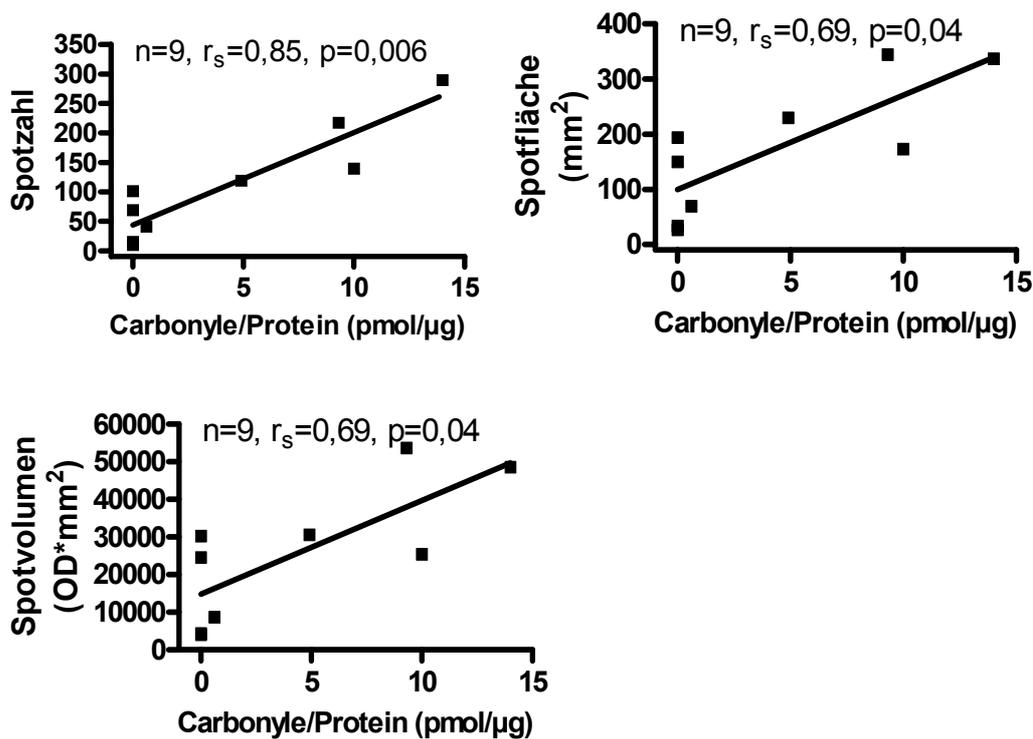


Abbildung 3.18 Korrelation (Spearman) zwischen Proteincarbonylen in der Probe und den Spotparametern der 2-D-oxyBlots.

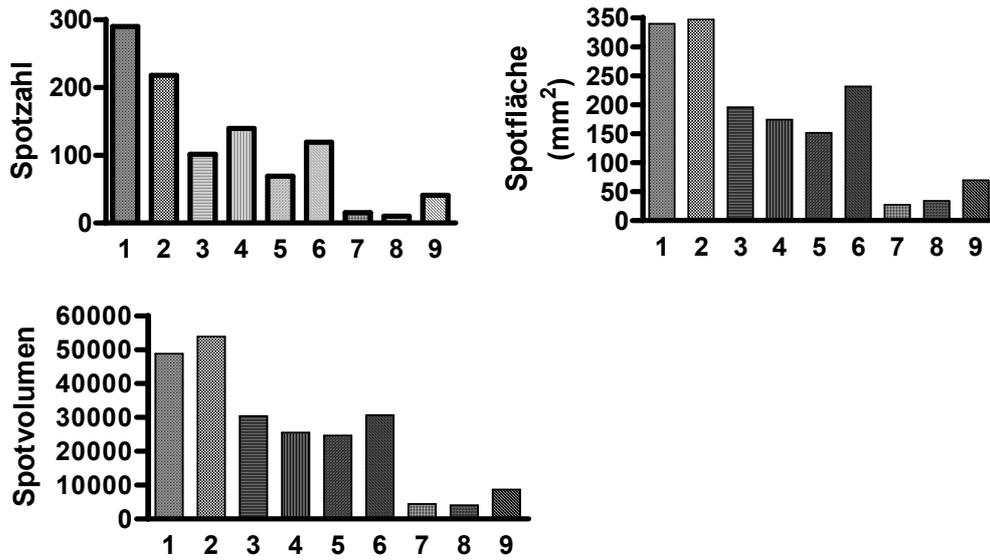


Abbildung 3.19 Spotparameter auf 2-D-oxyBlots von Proben mit verschiedenem Oxidationsgrad (Nummerierung entsprechend der Tabelle).

Negative und positive Kontrolle der Anti-DNPH-Immunofärbung

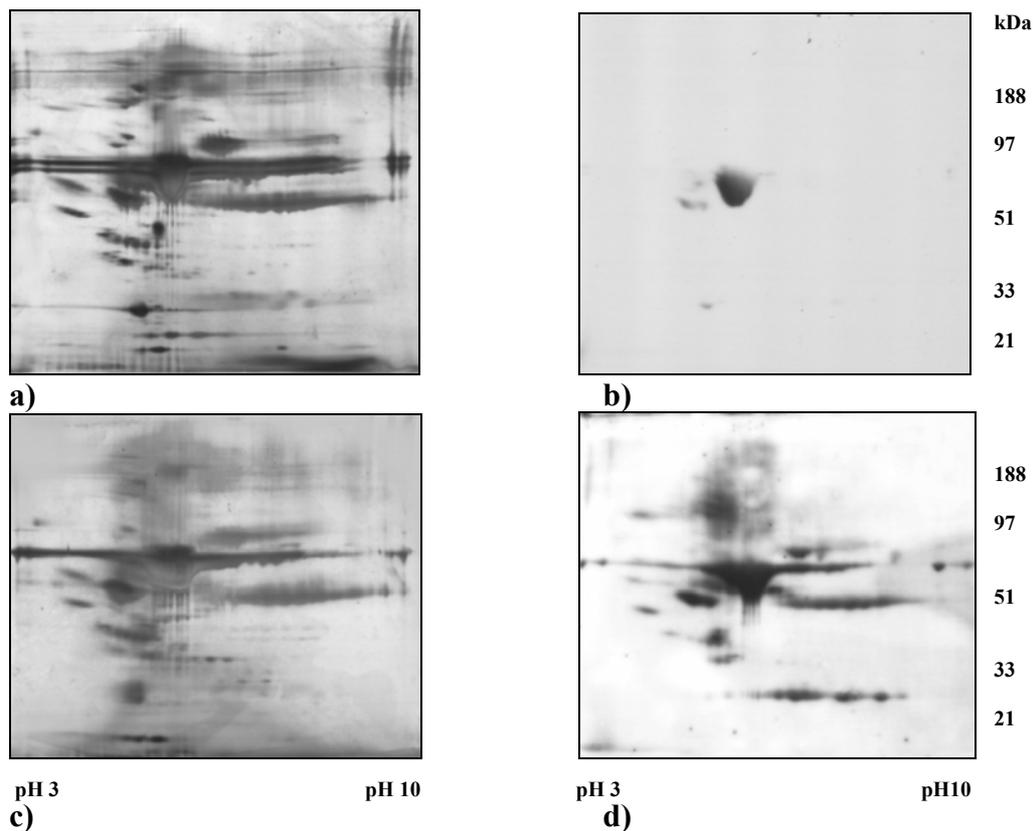


Abbildung 3.20 2-D-SDS-PAGE und Western oxyBlot von Serumproteinen der gesunden Person

- a) 2-D Gel der Serumproteine von gesunder Person. Silberfärbung
- b) Western oxyBlot der Serumproteine von gesunder Person. Anti-DNPH-Immunofärbung
- c) 2-D Gel der Serumproteine von gesunder Person, oxidiert in vitro. Silberfärbung
- d) Western oxyBlot der Serumproteine von gesunder Person, oxidiert in vitro. Anti-DNPH-Immunofärbung

3.6 Darstellung nitrifikativer Änderungen im Gesamtproteom von BAL bei verschiedenen Lungenerkrankungen mittels 2-D Elektrophorese

Es wurde als ein anderes Kennzeichen des oxidativen Stresses von Proteinen, deren Nitrifikation untersucht. Hierzu wurde der Gehalt an 3-Nitrotyrosin bestimmt.

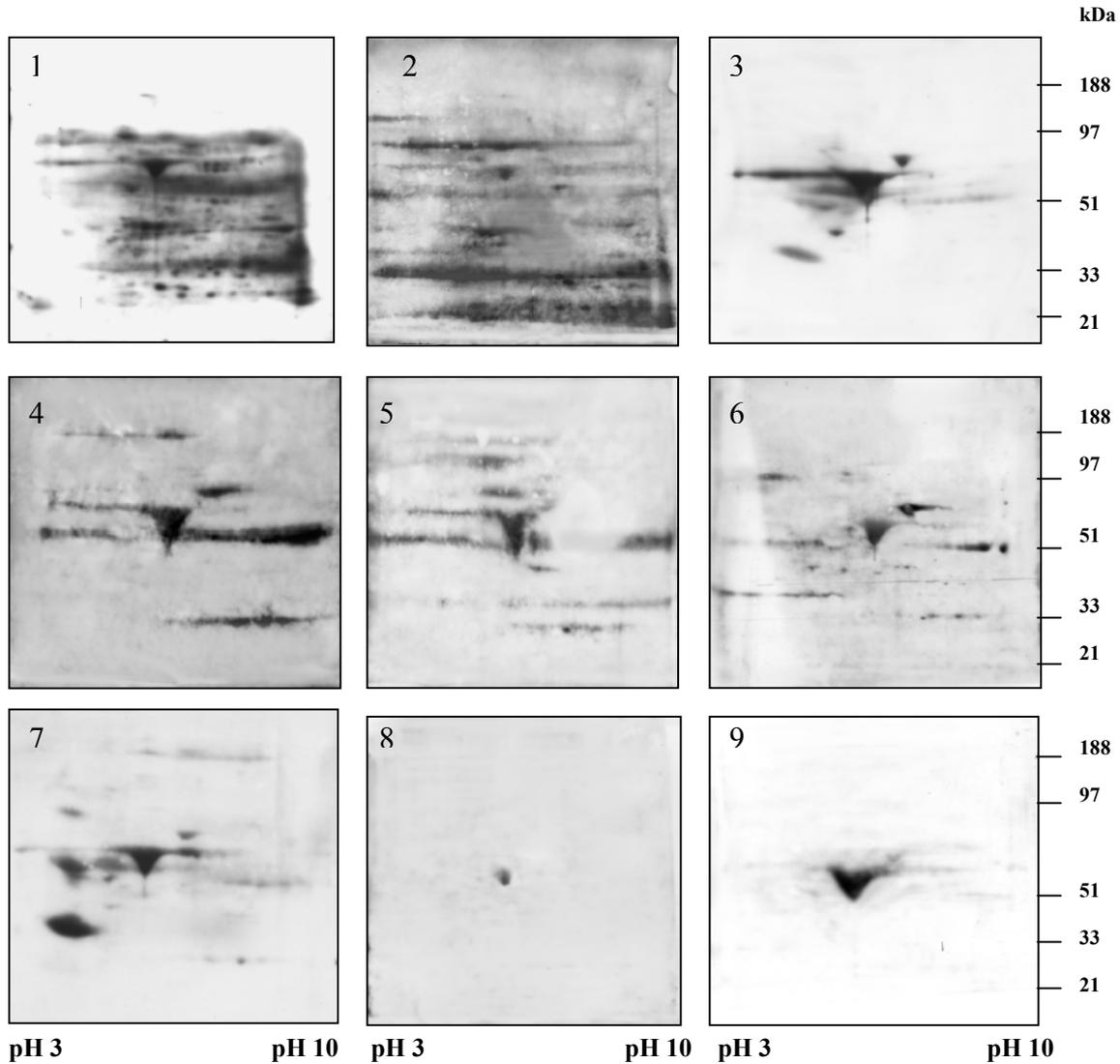


Abbildung 3.21 2-D-Analyse der oxidierten Proteine auf Western Blots mit Anti-nitrotyrosin Antikörpern
Tabelle 3.9 Auswertung zur Abbildung 3.20

	Patientengel	Spotzahl	Spotfläche (mm ²)	Spotvolumen (OD*mm ²)	Carbonyle (pmol/μg)
1	CF-39 mit CF	240	250,2	40318	17,0
2	CF-5 mit CF	242	330,1	65342	20,0
3	CF-32 mit CF	70	88,2	11524	0,0
4	I.P.-1 mit Interstitieller Pneumonie	43	116,4	20920	0,0
5	P-3 mit Pneumonie	53	118,0	16742	0,0
6	R-4 mit GERD	82	70,5	10408	0,4
7	AP-4 mit PAP	88	95,0	13479	13,8
8	B-5 mit Bronchitis	60	55,0	6660	5,0
9	T-2 mit Tracheostoma	30	45,3	7299	0,6

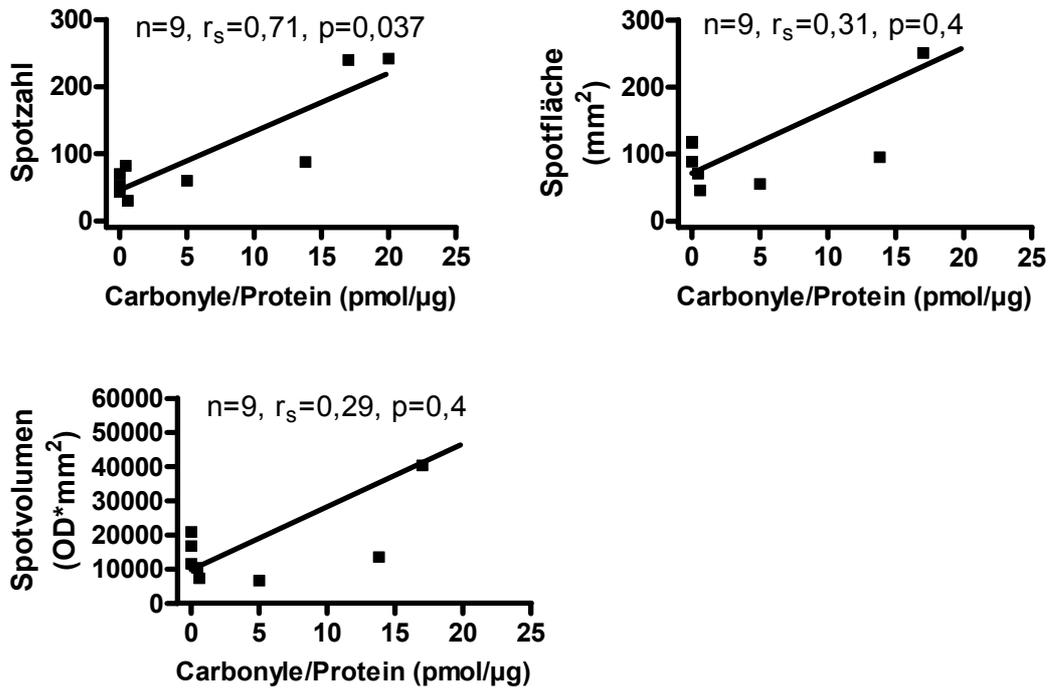


Abbildung 3.22 Vergleich Spotparameter auf 2-D-Nitrotyrosin Blots von Proben mit verschiedenem Oxidationsgrad. (Nummerierung entsprechend der Tabelle)

3.7 Oxidative Modifikationen des SP-A auf 2-D Gelen von Patienten mit verschiedenen Lungenerkrankungen.

3.7.1 Lungenalveolarproteinose

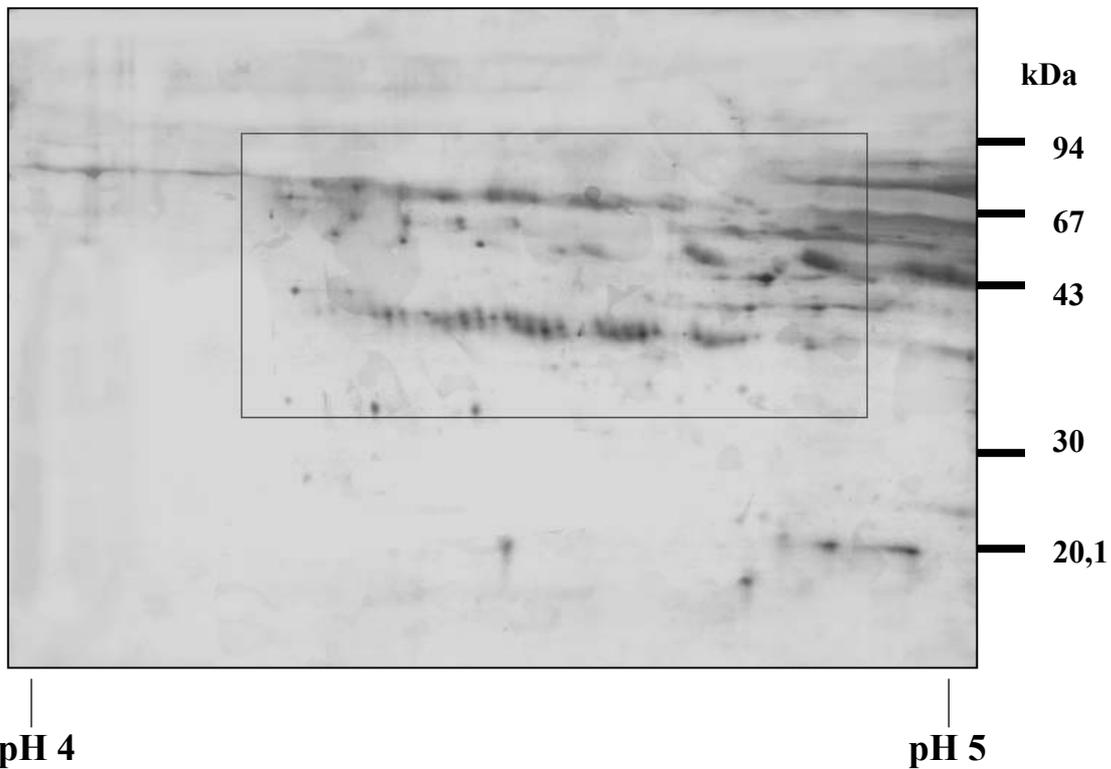


Abbildung 3.23 Lungenalveolarproteinose. Patient AP-1. 2-D-Gel pH 4-5, 18 cm.

120 µg Protein reduziert und denaturiert wurde auf einem IPG Streifen pH 4-5L 18 cm isoelektrisch fokussiert (Multiphore II). Die SDS-PAGE wurde auf SDS-12-14%-Gradienten Excell Gel durchgeführt. Silberfärbung nach Heukeshoven-Dernick.

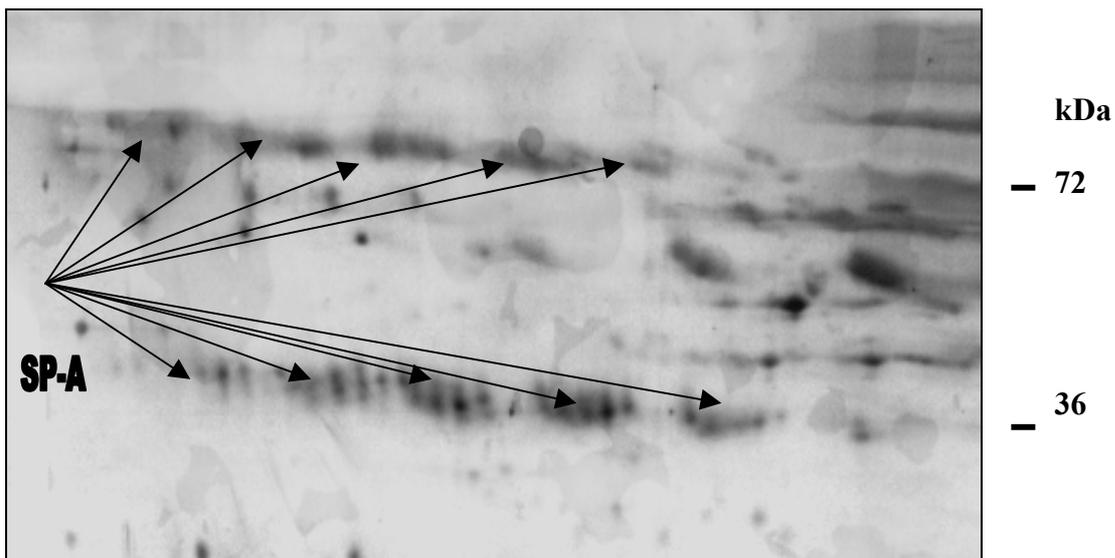


Abbildung 3.24 Ein Teil des 2-D Geles (vergrößert), in dem sich SP-A befindet. Kettenförmiges Signal im Bereich von pH 4,3 bis 4,9 mit einem Molekulargewicht von ca. 36 und 72 kDa. Das Protein besteht aus 5 Isoformen, die auf dem Gel in reduzierter (36 kDa) und nicht komplett reduzierter (72 kDa) Form präsent sind.

Im nächsten Schritt haben wir die oxidativen Veränderungen des SP-A mittels 2-D-Gelelektrophorese untersucht. Die Western Blots sind zuerst mit anti-DNPH-Antikörpern und nach Abklingen des Signals mit spezifischen anti-SP-A-Antikörpern untersucht worden.

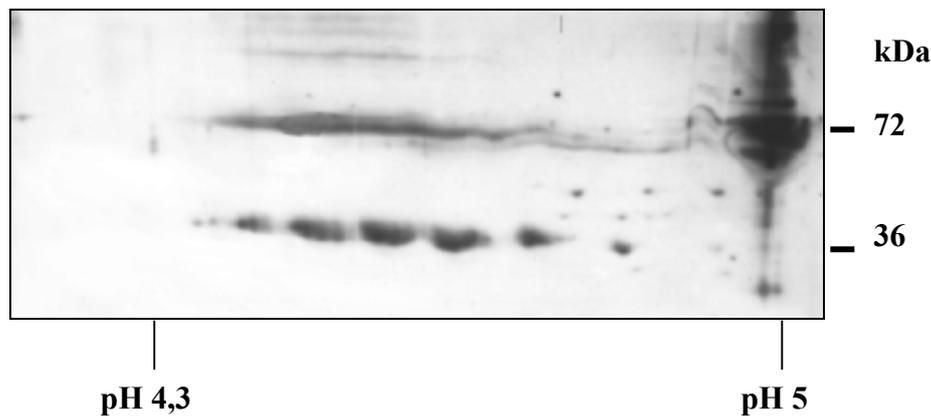


Abbildung 3.25 Lungenalveolarproteinose. Patient AP-1. Westernblot. Anti-DNPH-Immunofärbung.
Oxidative Veränderungen der Proteine sind auf dem Blot an der Stelle, wo sich SP-A befindet gut zu erkennen.

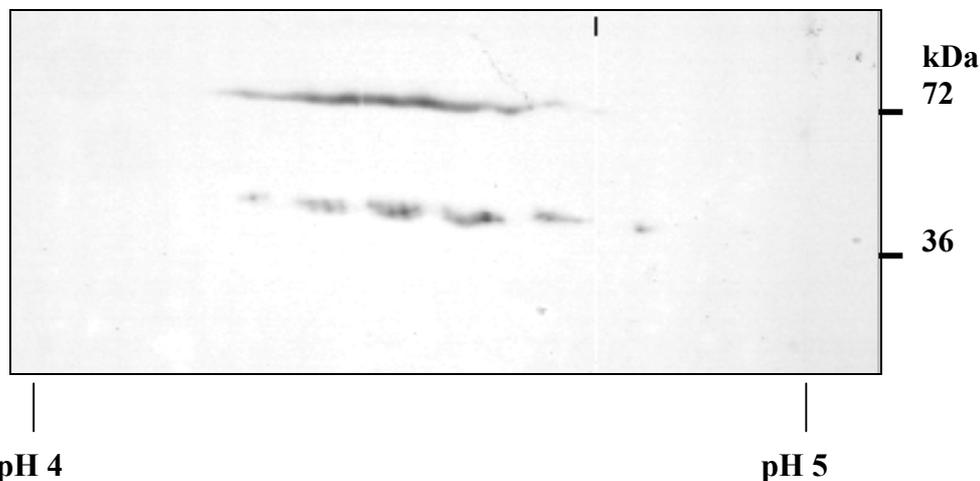


Abbildung 3.26 Lungenalveolarproteinose. Patient AP-1. Westernblot. Anti-SP-A immunofärbung

Unter reduzierenden Bedingungen erscheint SP-A in 2-D Blots in zwei Formen. Monomere mit einem Molekulargewicht von ca. **36 kDa** und Dimere mit ca. **72 kDa** haben einen isoelektrischen Bereich von pH 4,3-5,0. Dimere stellen nicht komplett reduzierbares SP-A dar, wobei sich nicht alle Disulfidbrücken zwischen Monomeren zu Sulfhydrylgruppen reduzieren ließen. Die 2-D Gele und Western Blots der Patienten mit Lungenalveolarproteinose sind besonders reich an SP-A. Die Ansammlung von SP-A in den Alveolen ist für diese Krankheit spezifisch.

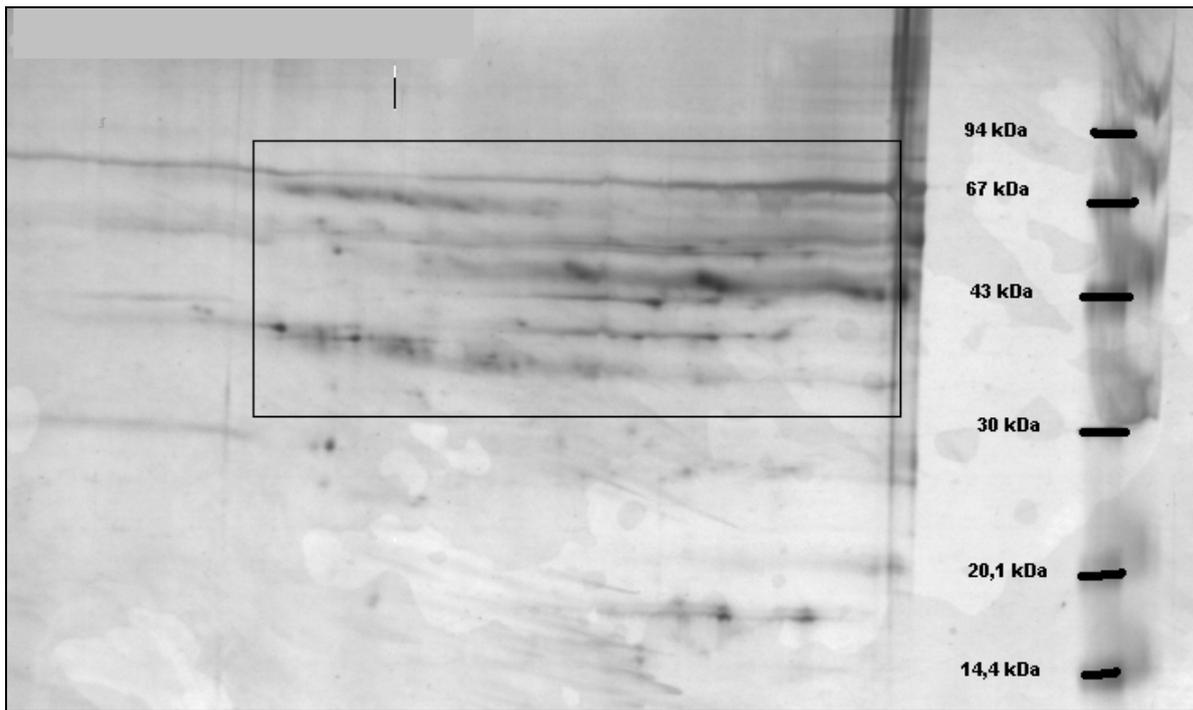


Abbildung 3.27 Lungenalveolarproteinose. Patient AP-1. Oxidation der Proteine in vitro. 2-D-Gel pH 4-5, 18 cm. BAL wurde mittels AAPH (12,5 mM) in vitro oxidiert. Dann wurden 120 µg Protein reduziert und denaturiert isoelektrisch auf einem IPG Streifen pH 4-5L, 18 cm fokussiert (Multiphore II). Die SDS-PAGE wurde auf SDS-12-14%-Gradienten Excell Gel durchgeführt. Silberfärbung nach Heukeshoven-Dernick.



pH 4,29

pH 5,0

Abbildung 3.28 Ein Teil des 2-D Geles (vergrößert), in dem sich oxidiertes SP-A befindet.

Nach der Oxidation in vitro sind die Proteinspots auf dem Gel nicht so scharf wie im nativen Zustand, was auf mögliche Änderung des isoelektrischen Punktes des Proteins durch die Oxidation der Seitenketten der Aminosäuren und durch gestörte Wechselwirkungen innerhalb der Proteine (Oxidation der –SH Gruppen usw.) zurückzuführen ist.

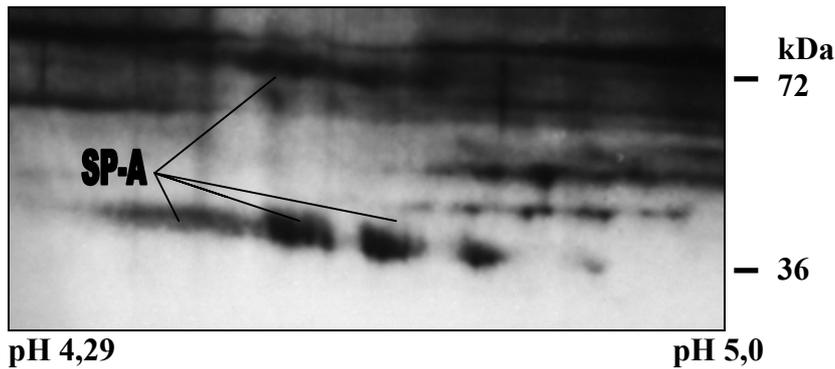


Abbildung 3.29 Western Blotting des 2-D Geles mit der in vitro oxidierten Probe von Patient AP-1 mit Lungenalveolarproteinose. Anti-DNPH-Immunofärbung.

Auf dem Blot sind viel mehr oxidierte Proteine zu sehen als im nativen Zustand. Auch SP-A erscheint hier in stark oxidiert Form. Der stärkere Grad der Oxidation ist an der Verminderung der benötigten Expositionszeit zu erkennen.

3.7.2 Cystische Fibrose

Bei CF-Patienten ist der SP-A Gehalt der BAL deutlich erniedrigt. Daher ist es relativ schwer gute Darstellungen von SP-A auf 2-D Gelen zu erhalten. Ferner kann es auch durch den Krankheitsprozess proteolytisch und wahrscheinlich oxidativ zerstört sein. Dies wurde hier untersucht.

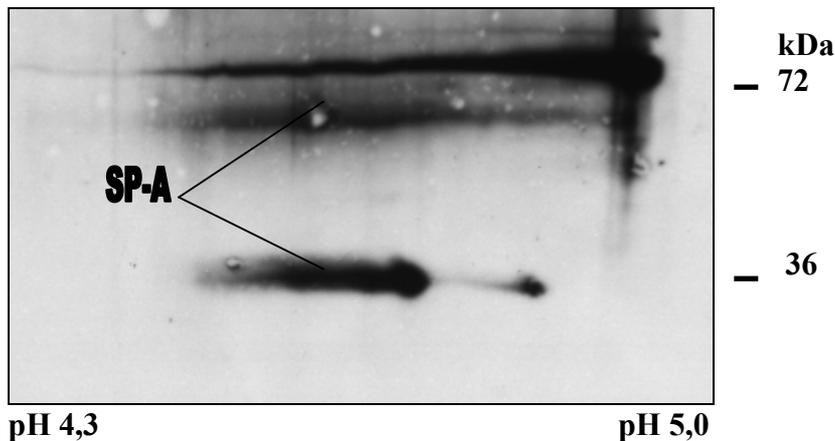


Abbildung 3.30 Anti-DNPH-Immunofärbung: Western Blotting des 2-D Geles von Patient CF-31.

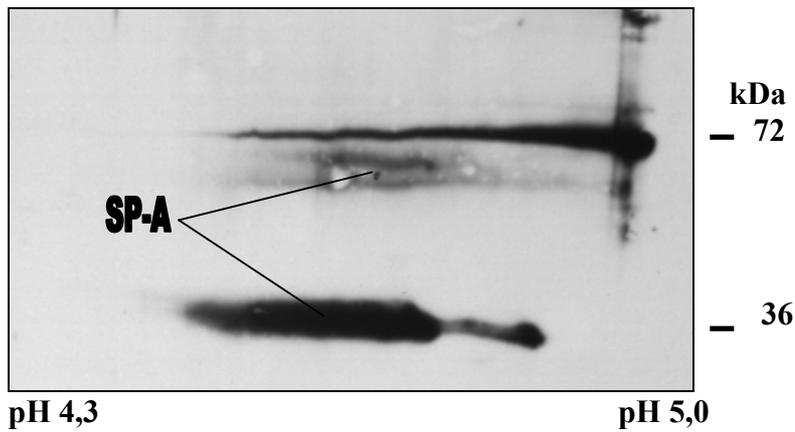


Abbildung 3.31 Anti-SP-A-Immunofärbung: Western Blotting des 2-D Geles von Patient CF-31.
 Blot Abb. 3.30 wurde mit spezifischen Anti-SP-A Antikörpern immunogefärbt.

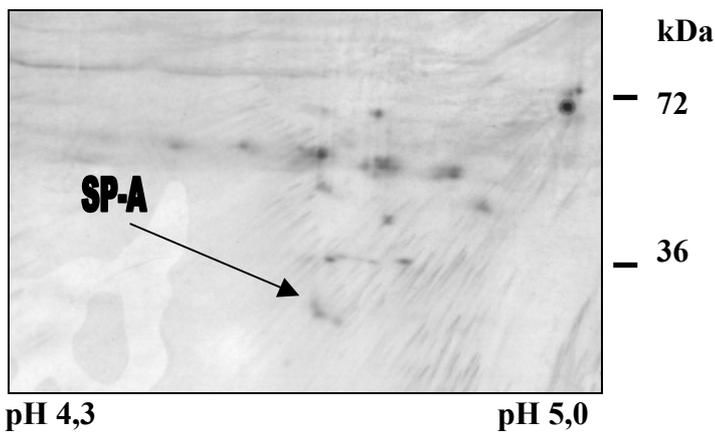


Abbildung 3.32 2-D Gel des Patient CF-25 mit CF. Silberfärbung nach Heukeshoven-Dernick.
 120 µg Protein reduziert und denaturiert wurde isoelektrisch auf einem IPG Streifen pH 4-5L, 18 cm fokussiert (Multiphore II). Die SDS-PAGE wurde auf SDS-12-14%-Gradienten Excell Gel durchgeführt.

Bei diesem Patienten sieht man in der Silberfärbung nur ein Fragment des SP-A.

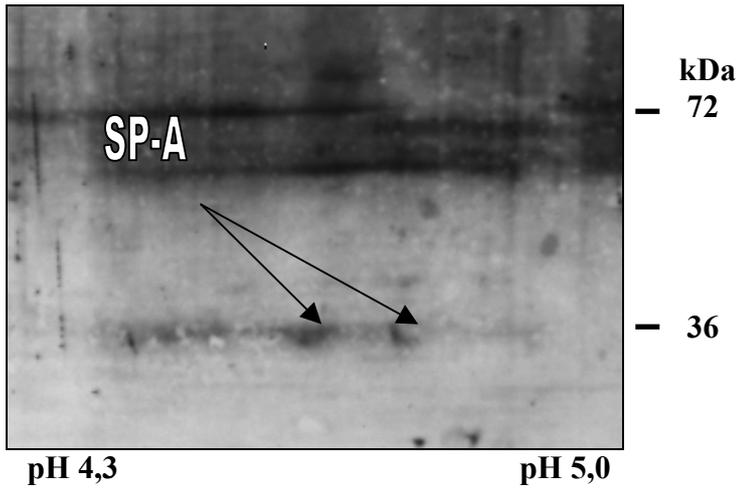


Abbildung 3.33 Anti-DNPH Immunofärbung Western Blot vom Patient CF-25 mit CF:

Auch in dieser Probe lassen sich ausgeprägte oxidative Modifikationen des SP-A mit Anti-DNPH Antikörpern auf dem Western Blot erkennen.

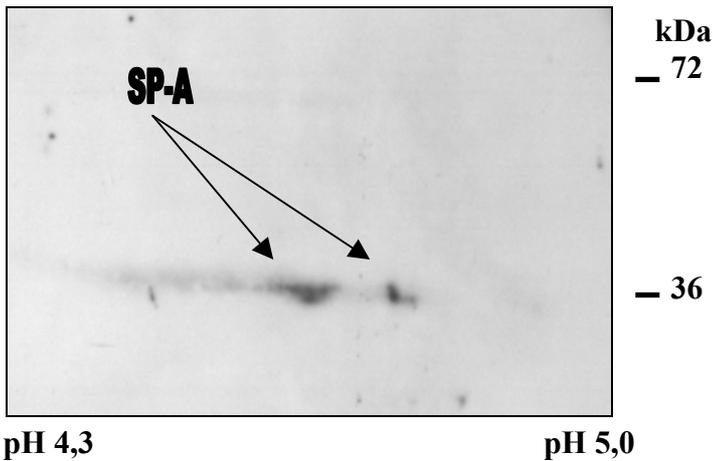


Abbildung 3.34 Anti-SP-A Immunofärbung: Western Blot vom Patient CF-25 mit CF .
Blot Abb. 3.33 wurde mit spezifischen Anti-SP-A Antikörpern immunogefärbt.

Die Immunofärbung mit Antikörpern ist deutlich sensitiver als die Silberfärbung, sodass man nun zusätzliche SP-A Spots erkennen kann, die auf dem Silbergel nicht zu sehen sind.

3.7.3 Chronische Bronchitis

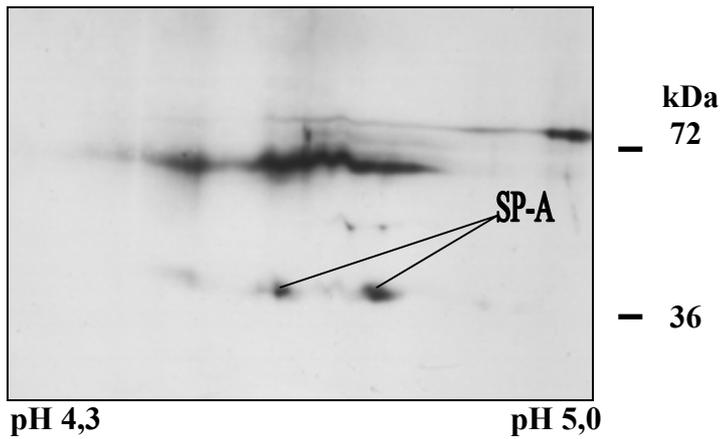


Abbildung 3.35 Western blotting vom 2-D Gel des Patienten mit Bronchitis B-1. Anti-DNPH Immunofärbung.

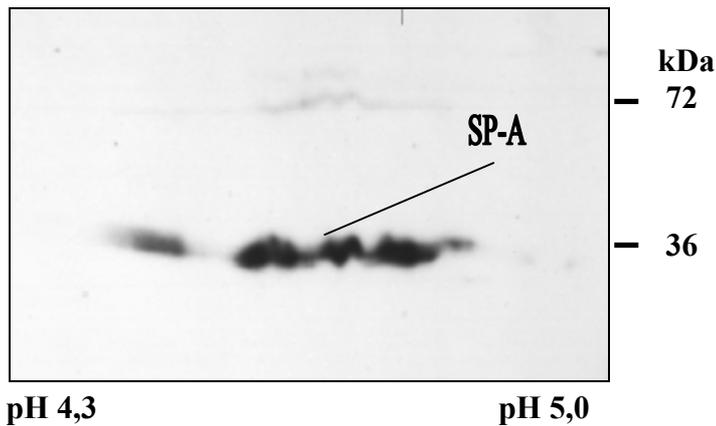


Abbildung 3.36 Western blotting vom 2-D Gel des Patienten mit Bronchitis B-1. Anti-SP-A Immunofärbung

Bei einer Probe eines Patienten mit Bronchitis ist bei vergleichbarer Expositionszeit die Fläche von oxidiertem SP-A offensichtlich kleiner als die Gesamtfläche des SP-A auf dem Western Blot, der mit anti-SP-A Antikörpern immunogefärbt worden war.

3.8 Oxidative Modifikationen von SP-D

3.8.1 Lungenalveolarproteinose

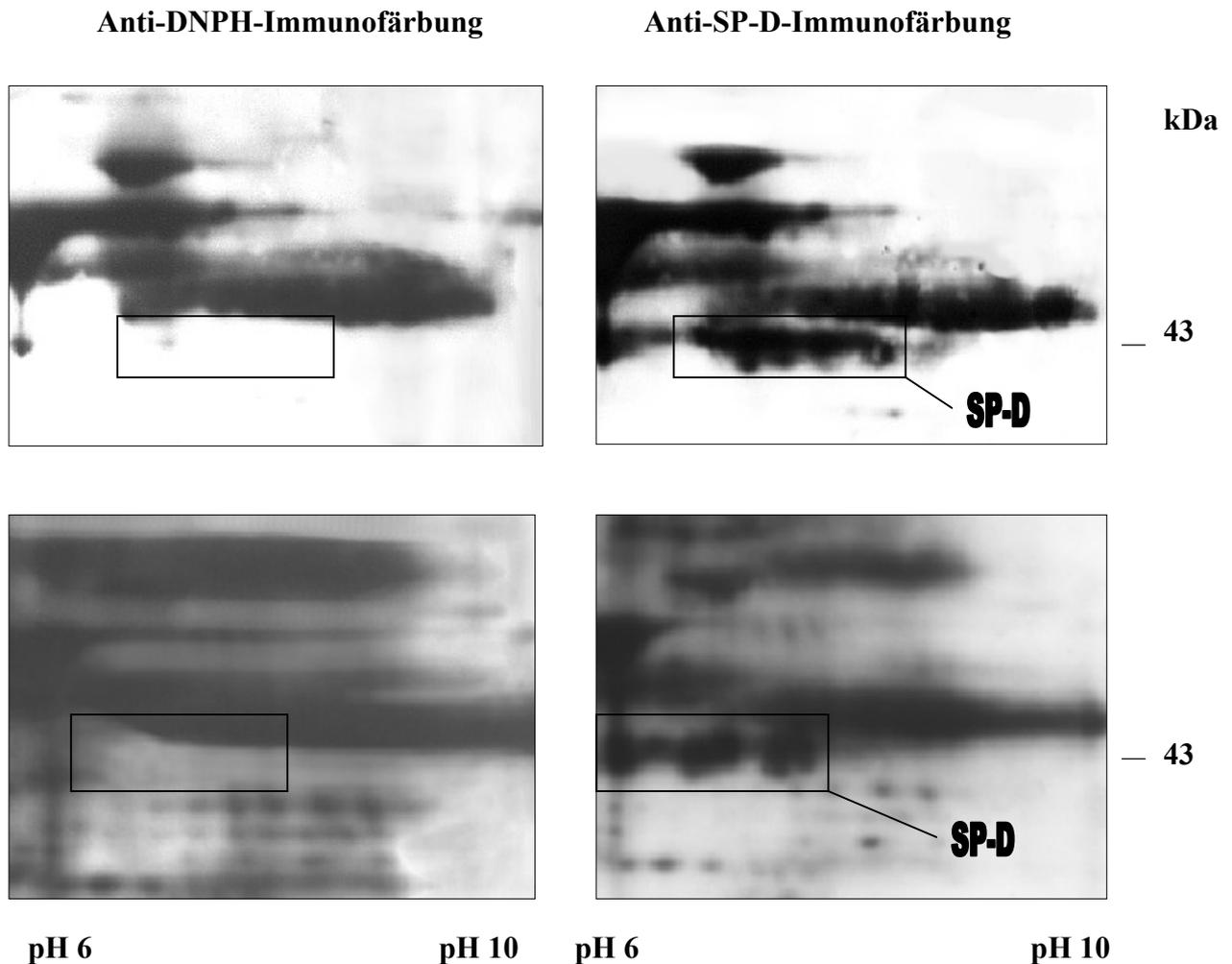


Abbildung 3.37 Western Blot. Lungenalveolarproteinose. Patient AP-1. Native Probe (oben), in vitro oxidierte Probe (unten)

Die oxidativen Veränderungen des SP-D wurden auch mittels 2-D-Elektrophorese untersucht. Die Western Blots sind zuerst mit anti-DNPH-Antikörpern und danach mit spezifischen anti-SP-D-Antikörpern inkubiert worden.

Unter reduzierenden Bedingungen erscheint auch SP-D in 2-D Blots in zwei Formen. Monomere mit einem Molekulargewicht von ca. **43 kDa** (vorwiegend) und Dimere von ca. **86 kDa** (seltener) haben einen isoelektrischen Bereich von pH 6,0-9,0.

Im nativen Zustand des SP-D finden sich keine Zeichen der Oxidation an der Stelle an der SP-D gefunden wird. Auch nach in vitro Oxidation der Proteinprobe, obwohl die oxidativen Änderungen anderer Proteine klar zu sehen sind, war kein Signal von oxidiertem SP-D zu beobachten.

3.8.2 Interstitielle Pneumonitis und Pneumonie

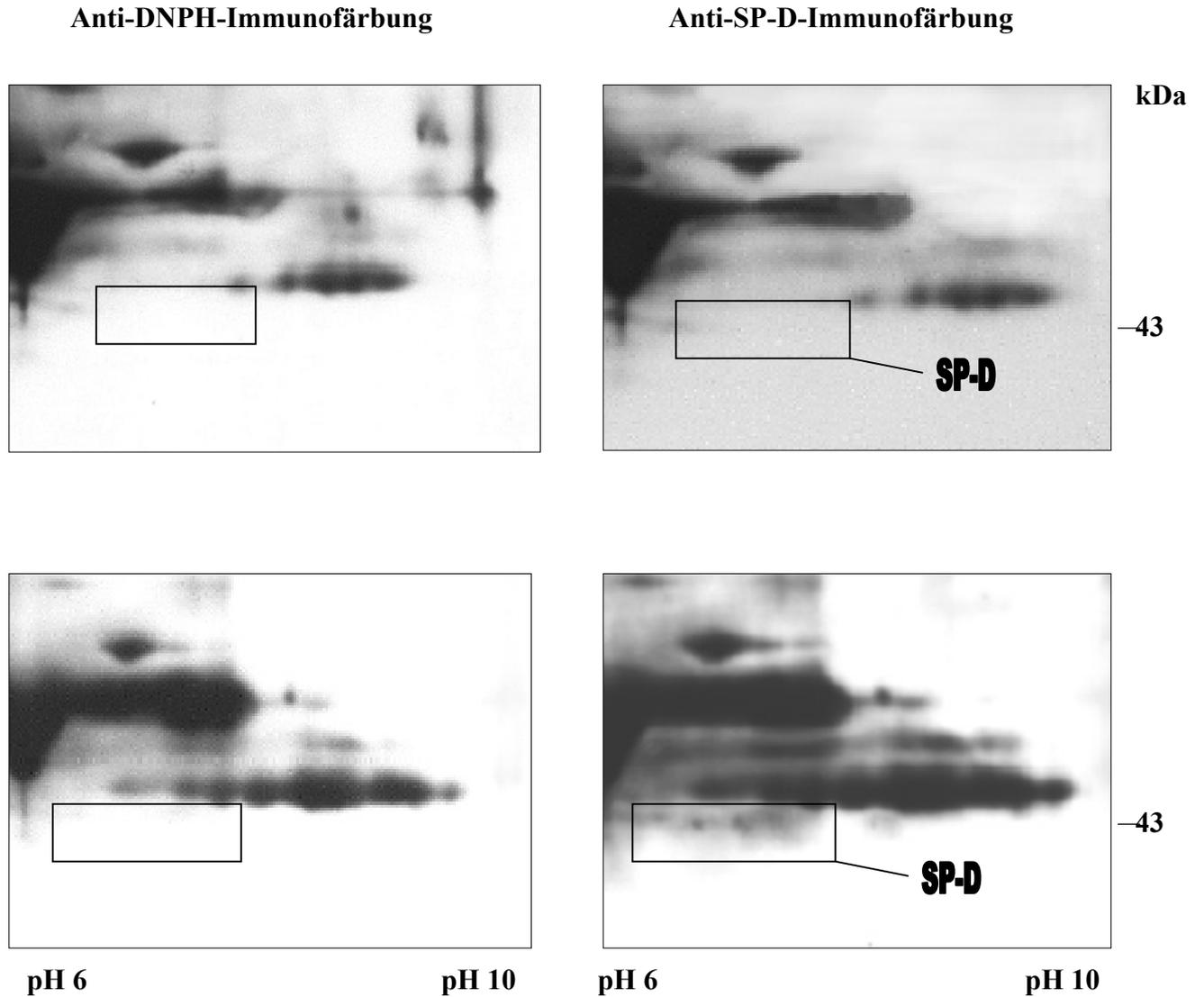


Abbildung 3.38 Western Blot. Interstitielle Pneumonitis Patient IP-1 (oben), Pneumonie Patient P-4 (unten).

Dieselben Verhältnisse wurden in der Probe von Patienten mit interstitieller Pneumonitis oder Pneumonie vorgefunden: obwohl SP-D im Blot präsent war, wurden die oxidativen Modifikationen nicht gefunden.

3.8.3 CF und Tracheostoma-Patienten

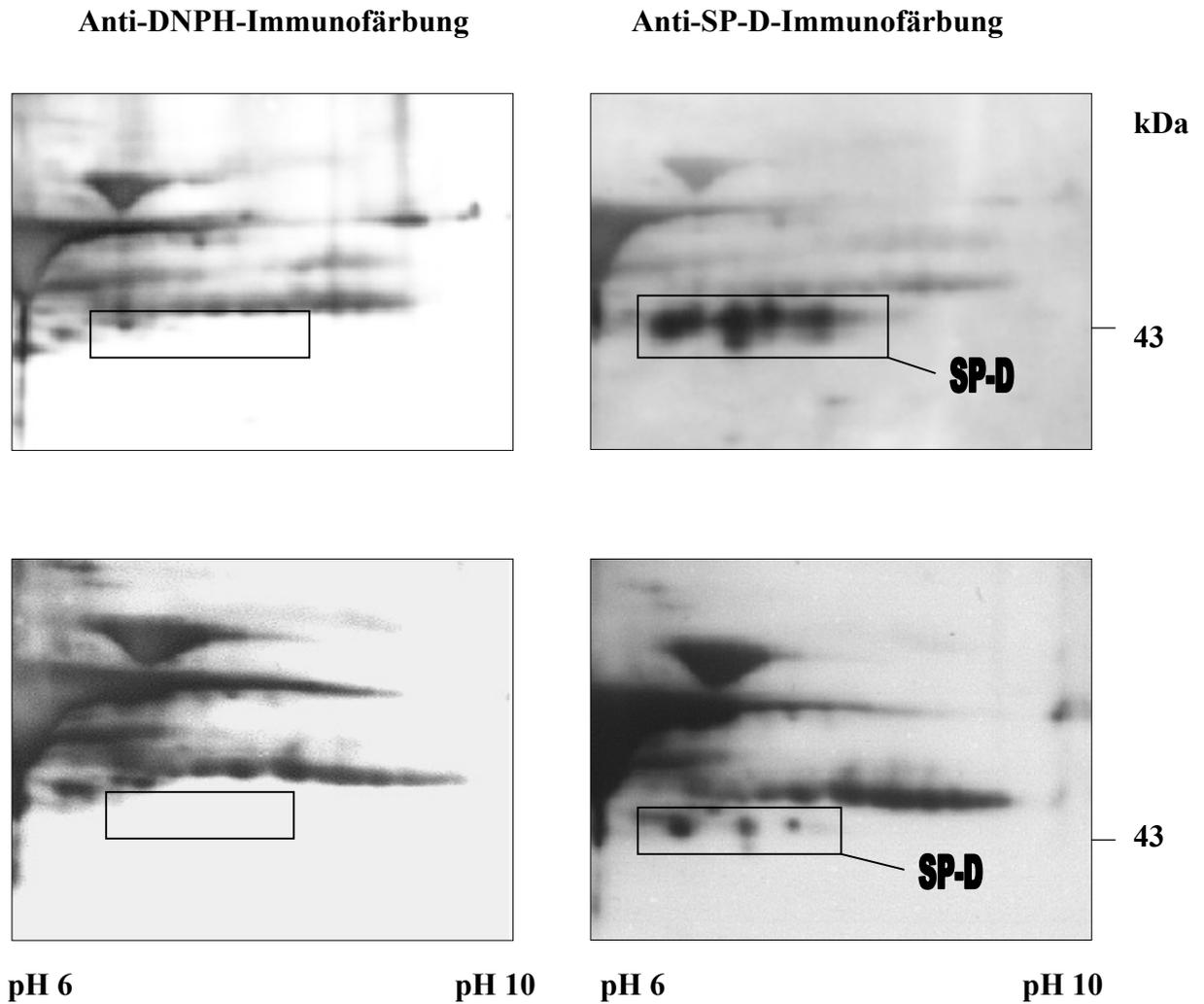


Abbildung 3.39 Western Blot. CF Patient CF-32 (oben) und Tracheostoma Patient T-1 (unten).

Bei CF konnte SP-D mit Hilfe der 2-D Elektrophorese nur bei Patienten mit niedriger Krankheitsaktivität gefunden werden. Sobald die Patienten eine ausgeprägte Entzündungsreaktion in der BAL zeigten, war kein SP-D mehr nachweisbar. Bei diesem Patienten waren ebenso wie bei dem Patienten mit Tracheostoma, keine Zeichen der Oxidation von SP-D vorhanden.

3.8.4 GERD und Patienten mit chronischer Bronchitis

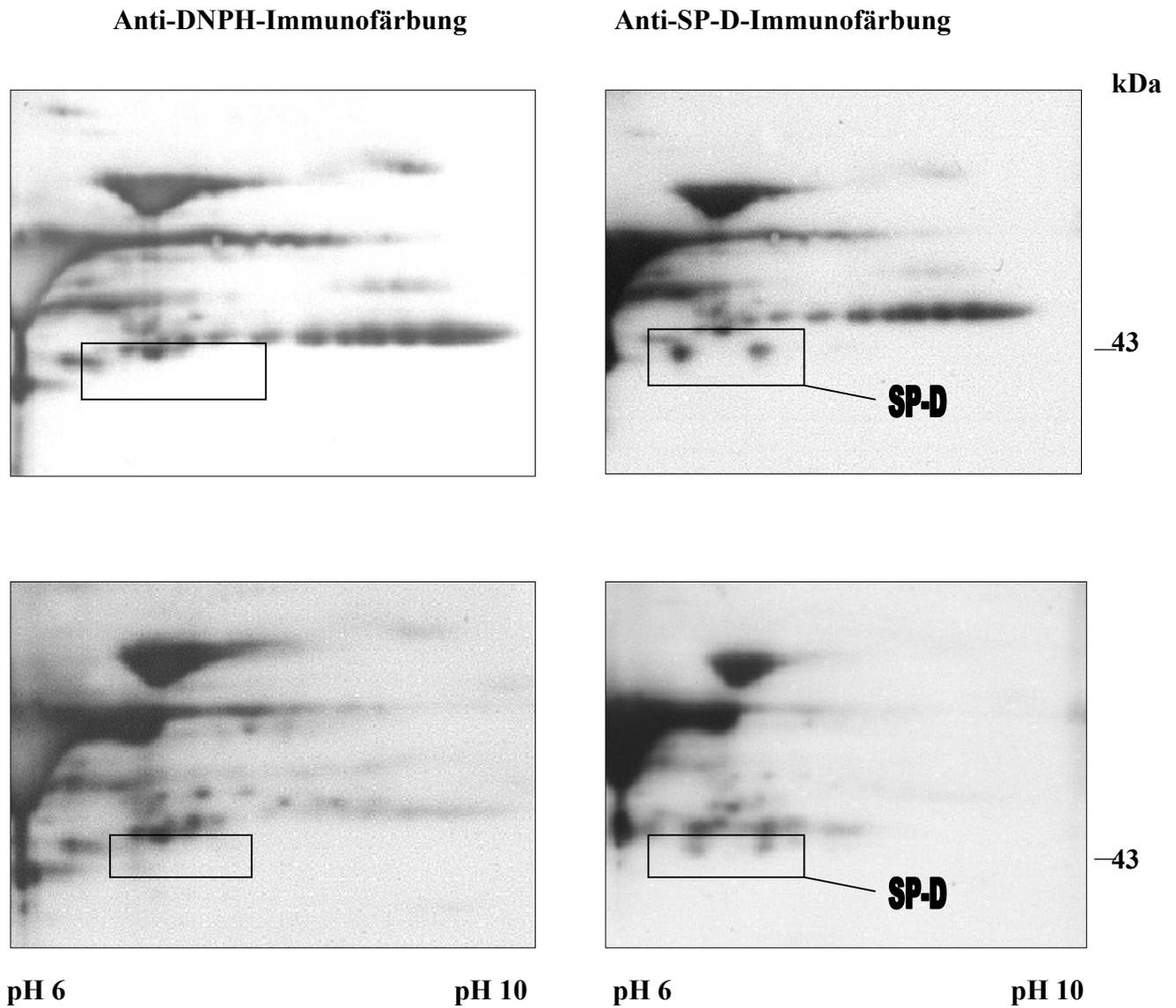


Abbildung 3.40 Western Blot. GERD Patient R-2 (oben), chronische Bronchitis Patient B-4 (unten).

Bei den Patienten mit gastro-ösophagealem Reflux und chronischer Bronchitis wurde in ähnlicher Weise SP-D in der typischen Lokalisation nachgewiesen. Kein Anhalt für oxidative Veränderungen der Primärketten von SP-D.

3.8.5 Untersuchung der Oxidierbarkeit von SP-D in vitro mit 2-D-SDS-PAGE

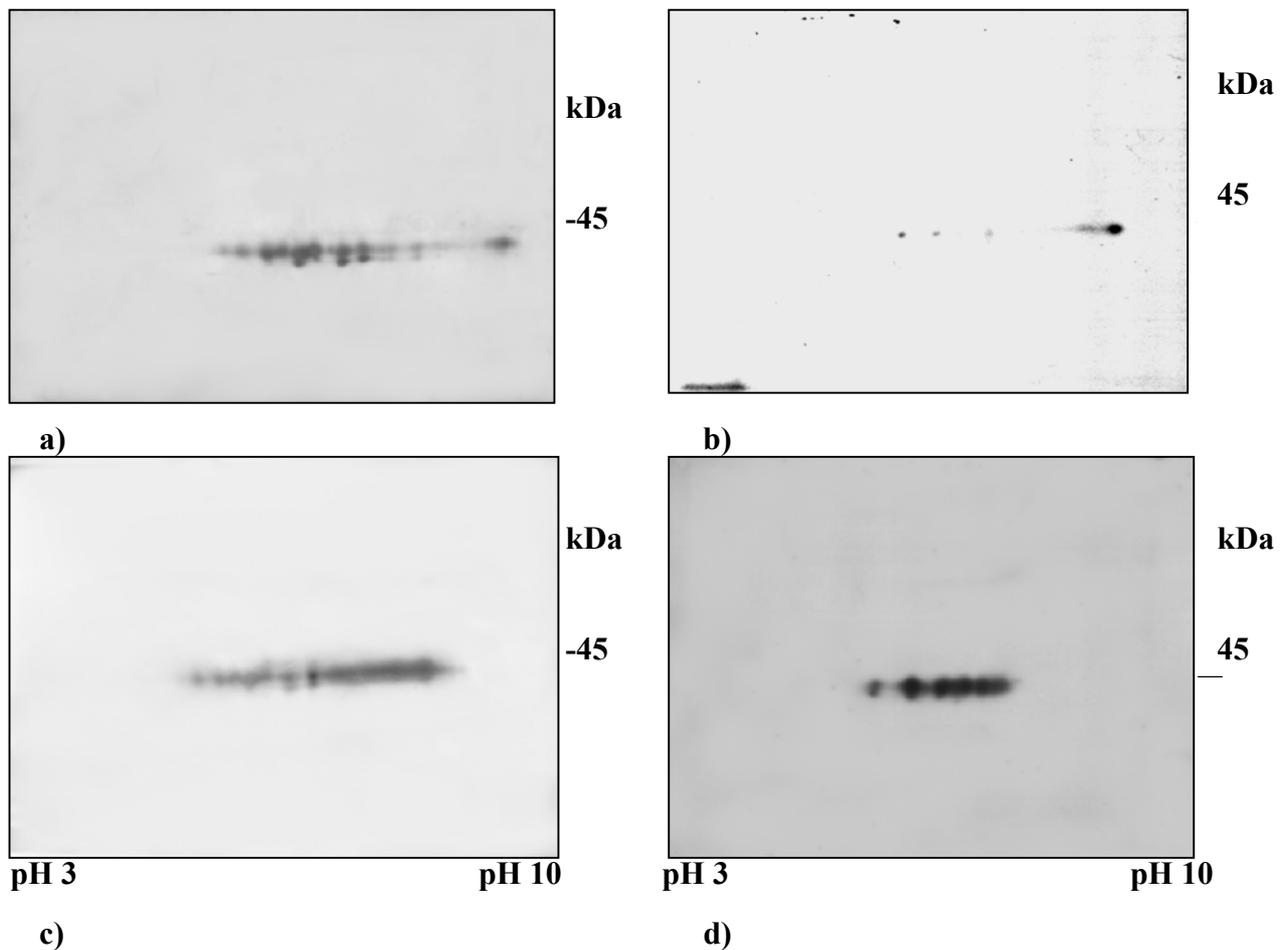


Abbildung 3.41 Isoliertes SP-D. Natives oder in vitro oxidiertes (AAPH, 37mM, 2 Std.) SP-D (5 μ g)

- a) SP-D isoliert aus der BAL von Patienten AP-4. 2-D Gel pH 3-10. Silberfärbung
- b) Western Blot von isoliertem SP-D. Anti-DNPH-Immunofärbung
- c) Western Blot von isoliertem SP-D. Anti-SP-D-Immunofärbung
- d) Western Blot von isoliertem SP-D, das in vitro oxidiert wurde. Anti-DNPH-Immunofärbung

Sofern die SP-D Primärkette über Aminosäuren (Lys, Tre, Pro), deren Seitenketten bei der Oxidation in Carbonylgruppen umgewandelt werden können, verfügt, müssen theoretisch bei SP-D bei der starken Oxidation Carbonylgruppen erzeugt werden.

In dieser Untersuchung wurde versucht eine größere Menge von isoliertem SP-D auf das Gel aufzutragen und mögliche Veränderungen unter starker Oxidation zu untersuchen.

Wie es in Abb.3.40b zu sehen ist, ist im nativem Zustand SP-D kaum oxidiert. Es wurde eine 30-minütige Exposition benötigt, um ein schwaches Signal zu erhalten.

Nach der relativ starken Oxidation ist das Signal schon stark (zum Vergleich wurde auch 30 min exponiert) und bedeckt fast die ganze Fläche von SP-D, das auf Abb.3.40c zu sehen ist.

3.8.6 Untersuchung der Oxidierbarkeit von SP-D in vitro mit 1-D-SDS-PAGE und Dot-blotting

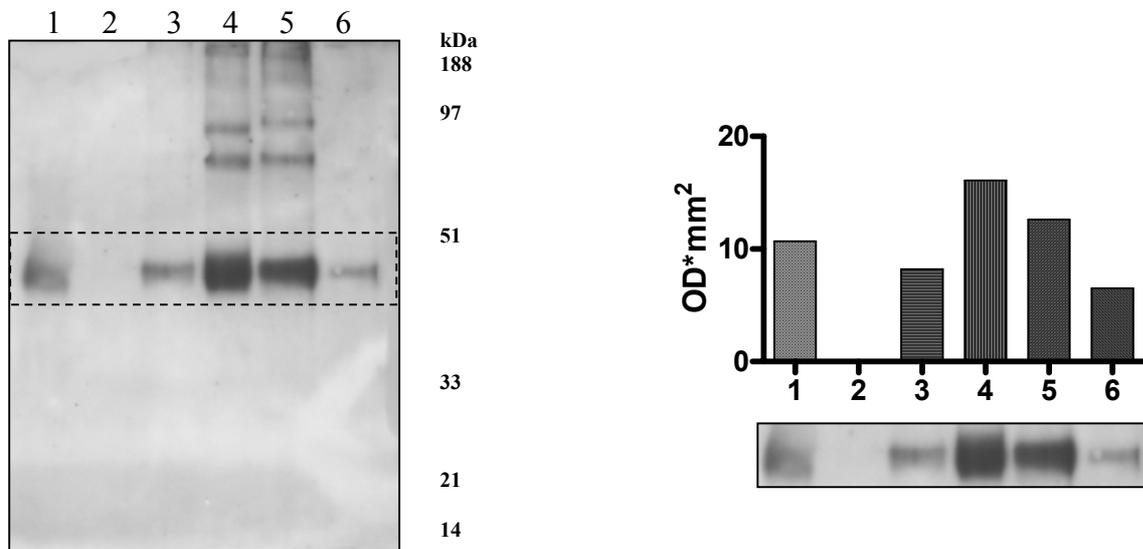


Abbildung 3.42 1-D-SDS-PAGE von SP-D mit pre-Elektrophorese DNPH-Derivatisierung

- 1- Natives SP-D 1µg
- 2- SP-D, reduziert mit NaBH₄
- 3- SP-D in vitro oxidiert mit 10 mM AAPH
- 4- SP-D in vitro oxidiert mit 37 mM AAPH
- 5- SP-D in vitro oxidiert mit 74 mM AAPH
- 6- SP-D in vitro oxidiert mit 37 mM AAPH+ 4mM DTT

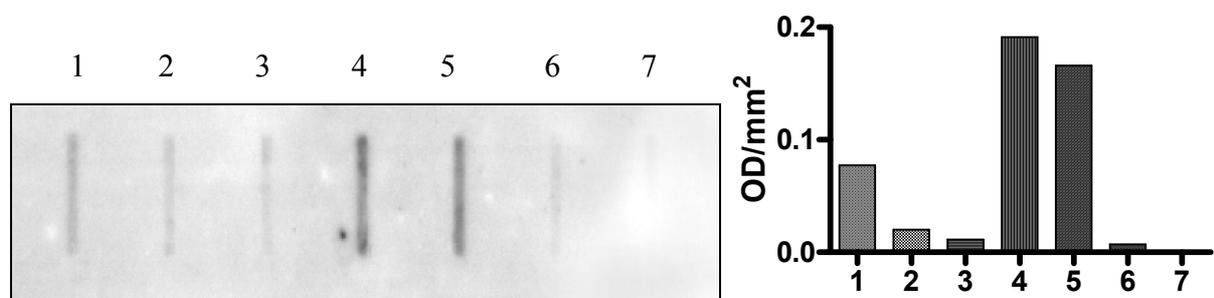


Abbildung 3.43 Dot-Blotting von SP-D mit pre-Blot DNPH-Derivatisierung

- 1-Natives SP-D 100 ng
- 2-SP-D, reduziert mit NaBH₄
- 3-SP-D in vitro oxidiert mit 10 mM AAPH
- 4- SP-D in vitro oxidiert mit 37 mM AAPH
- 5- SP-D in vitro oxidiert mit 74 mM AAPH
- 6-SP-D in vitro oxidiert mit 37 mM AAPH+ 4mM DTT
- 7-Puffer

3.9 Analyse des Verteilungsmusters oxidierter Proteine auf den Western Blots
3.9.1 Beschreibung der Differenzen zwischen 2-D oxyBlots von Proben mit verschiedenem Oxidationsgrad

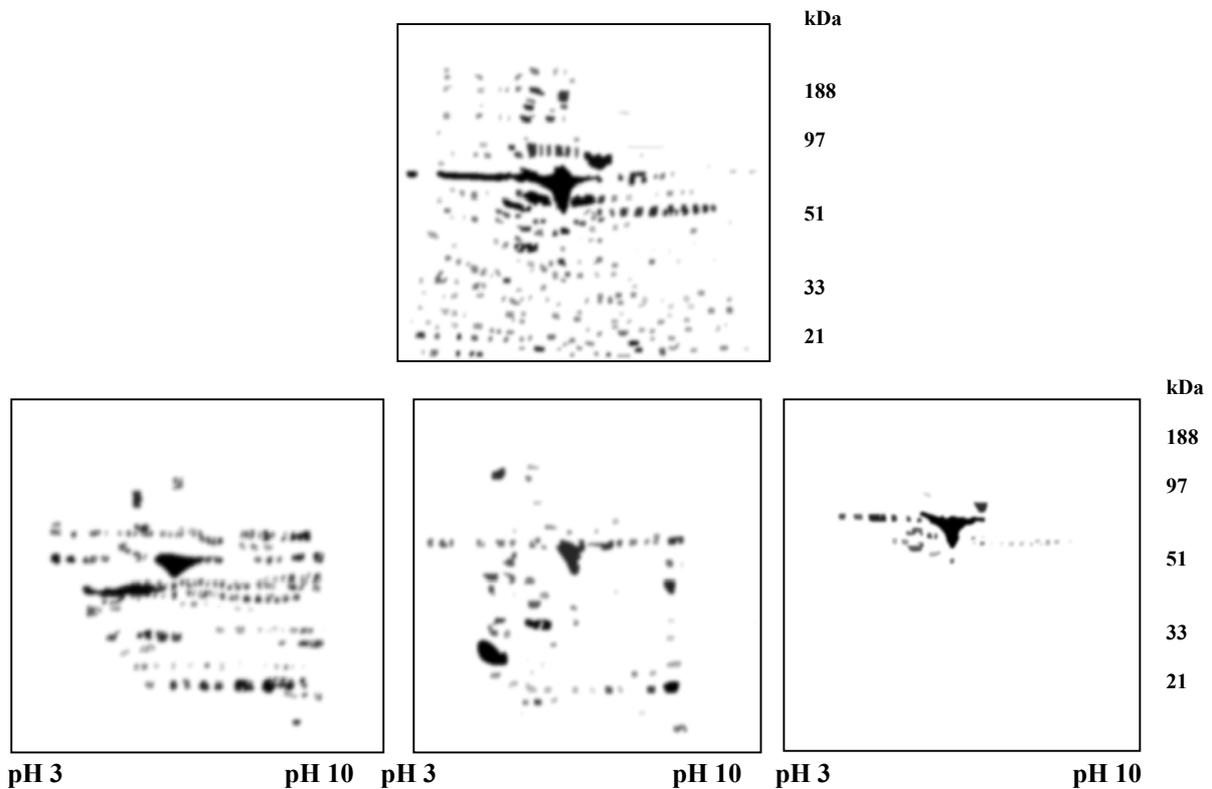


Abbildung 3.44 Darstellung der synthetischen Gele, konstruiert aus Silbergelen (oben) und Westernblots von Proben mit verschiedenem Oxidationsgrad (unten).

Tabelle 3.10 Quantifizierung der Parameter der oxidierten Proteinspots auf den Oxiblots von Proben mit verschiedenem Oxidationsgrad

	Silbergel (synthetisch) n=2	Hochoxidierte Probe Western Blot (synthetisch) n=2	Mitteloxydierte Probe Western Blot (synthetisch) n=2	Niedrigoxydierte Probe Western Blot (synthetisch) n=3
Patientenprobe	CF-32, CF-40	CF-40, CF-5	I.P-7, AP-1	CF-32, T-1, B-4
Zahl der Spots	247	167	72	35
Gesamtfläche der Spots(mm²)	275	136	102	76

Wie auf der Abb.3.44 zu sehen ist, ist die Zahl der Proteinspots auf dem synthetischen Silbergel am größten. Bei oxidativen Einflüssen in der Lunge im Rahmen neutrophiler Entzündung bei verschiedenen Krankheiten kommt es zur partiellen Oxidation der Proteine. Die Zahl und Gesamtfläche der oxidierten Proteinspots nimmt entsprechend dem Oxidationsgrad zu.

3.9.2 Empfindlichkeit einzelner Proteine gegenüber oxidativen Veränderungen

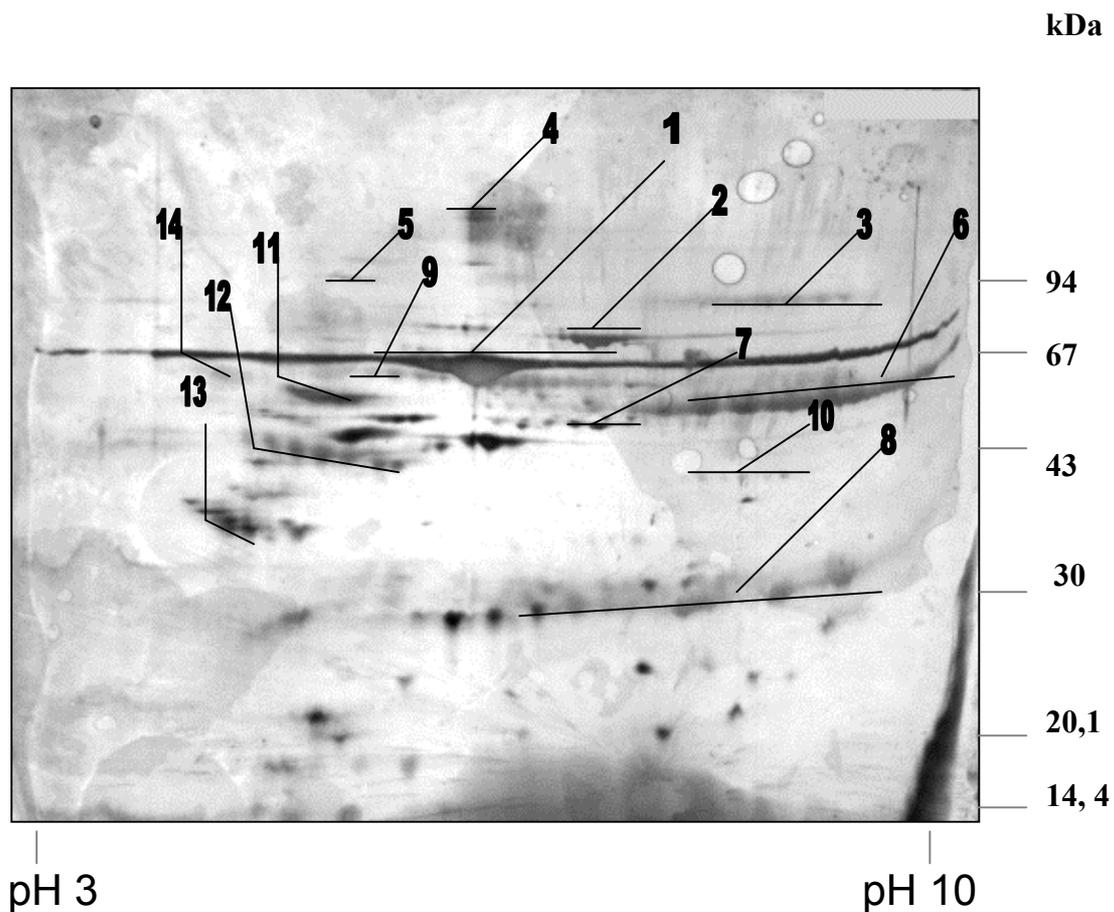


Abbildung 3.45 2-D Gel eines Patienten mit Lungenalveolarproteinose. Patient AP-1. Silberfärbung nach Heukeshoven-Dernick. Identifikation der Proteine durch MW und IEP (3-10) sowie anhand der Peptidsequenz in der Massenspektroskopie(*).

1. Albumin*
2. Transferrin*
3. Ig schwere Kette γ dimer
4. α -2-Macroglobulin
5. Ceruloplasmin
6. Ig schwere Kette γ
7. Fibrinogen β Kette
8. Ig leichte Kette κ, λ
9. Ig schwere Kette α
10. Ig schwere Kette γ intermediate segment
11. α -1 Antitrypsin
12. Haptoglobin β Kette
13. SP-A*
14. SP-A dimer

Sensitivität der primären Proteinkette zur Oxidation

Tabelle 3.11 Sensitivität der primären Proteinkette zur Oxidation

Fast immer oxidiert waren:	Leicht oxidierbar waren:	Schwer oxidierbar war:
Albumin Transferrin	α -1-Antitrypsin SP-A Ceruloplasmin Ig schwere Kette γ Ig leichte Kette κ, λ Ig schwere Kette γ intermediate segment Und andere Proteine	SP-D

Tabelle 3.12 Lokalisation und die Häufigkeit des Vorhandenseins des Proteins auf den Oxiblots

Protein	pI	MW(kDa)	Present in Oxyblots	%
Albumin	5,5-5,8	66-67	20/20	100
Transferrin	6,1-6,5	74-84	20/20	100
Ig schwere Kette γ dimer	6,5-8,3	98-112	7/8	87
α -2-Macroglobulin	5,3-5,5	207-214	13/15	86
Ceruloplasmin	4,9-5,3	127-160	8/15	53
Ig schwere Kette γ	6,2-8,2	51-55	15/20	75
Fibrinogen β Kette	6,3-6,6	56	11/20	55
Ig leichte Kette κ, λ	4,9-9,3	23-27	11/20	55
Ig schwere Kette α	5-5,4	61-62	13/15	86,6
Ig schwere Kette γ intermediate segment	6,7-7,3	38	9/16	56,3
α -1 Antitrypsin	4,8-5,2	53-58	13/20	65
Haptoglobin β Kette	4,7-5,6	40-44	9/20	45
SP-A	4,5-4,9	30-36	5/9	55,5

3.10 Untersuchung des Einflusses einer Behandlung mit inhalativem GSH auf oxidative Parameter in der BAL der CF Patienten

In Rahmen der sog. "Glutathion"-Studie wurde der Einfluss einer antioxidativen Therapie mit inhalativem Glutathion auf die Parameter des oxidativen Stresses in den Lungen von CF-Patienten untersucht. Dazu wurde Glutathion-Na Salz (GSH) (pH=7,4) mit einer speziellen Methodik dreimal je 200 oder 300 mg pro Tag im Laufe von 2 Wochen von CF-Patienten inhaliert. In der BALF wurden die Parameter der Protein- und Lipidoxidation bestimmt.

3.10.1 Carbonylgruppen in Proteinen

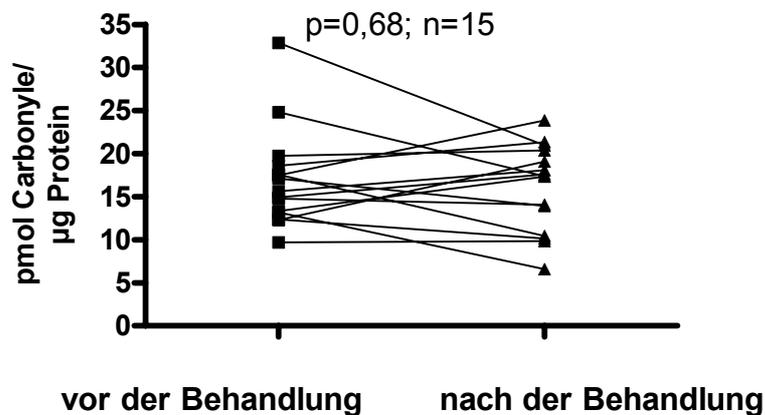


Abbildung 3.46 Proteincarbonylgruppenniveau vor und nach der inhalativen Behandlung mit GSH von CF Patienten. Im Vergleich mittels Wilcoxon Test ergaben sich keine signifikanten Änderungen in der Proteinoxidation (Median, Range: 15,6 (9,7;32,8) vs. 17,4 (6,6;23,9) pmol/µg) vor und nach der Behandlung.

3.10.2 Thiolgruppen in Proteinen

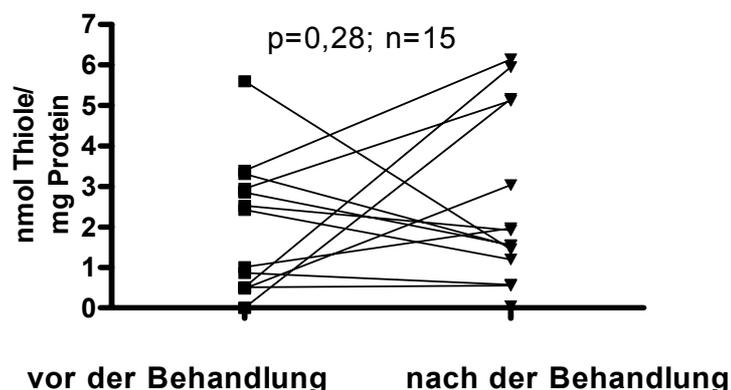


Abbildung 3.47 Proteinthiolgruppenniveau vor und nach der inhalativen Behandlung mit GSH von CF Patienten. Im Vergleich mittels Wilcoxon Test ergaben sich keine signifikanten Änderungen in den Proteinthiolen (Median, Range: 2,4 (0,0;5,6) vs. 1,7 (0,04;6,1) nmol/mg) vor und nach der Behandlung.

3.10.3 Lipidperoxidkonzentration in der BAL

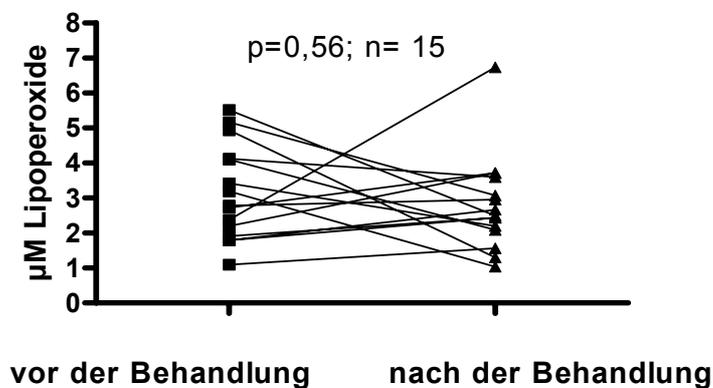


Abbildung 3.48 Konzentration der Lipidperoxide in der BAL vor und nach einer inhalativen Behandlung mit GSH bei CF Patienten. Wilcoxon Test (Median, Range: 2,8 (1,1;5,5) vs. 1,7 (1,0;6,7) µM) vor und nach der Behandlung.

3.10.4 Proteinkonzentration in BAL

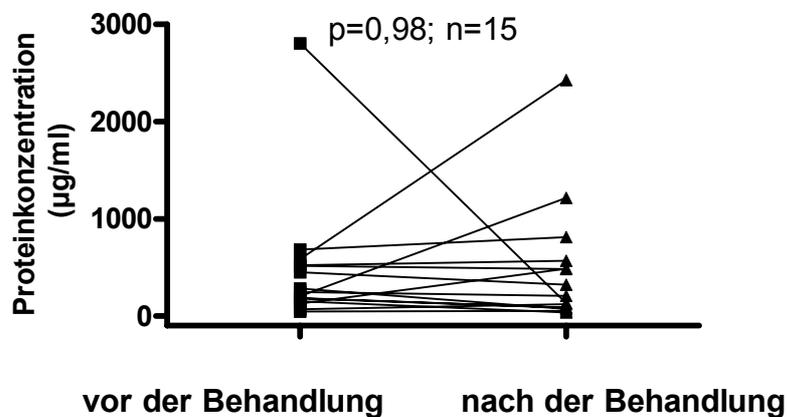


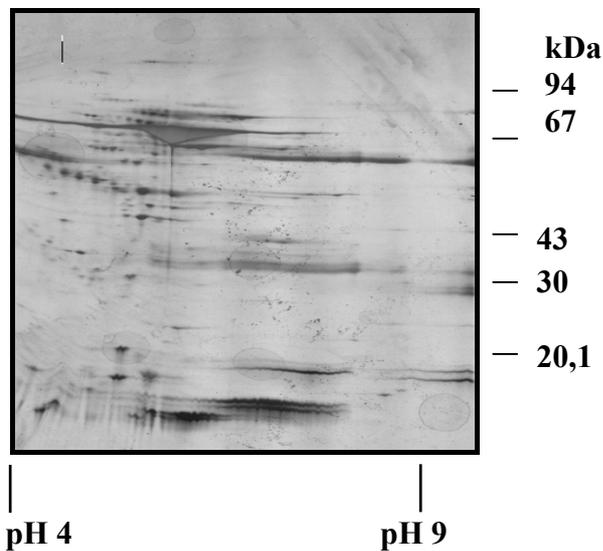
Abbildung 3.49 Proteinkonzentration in BAL vor und nach der Behandlung mit GSH von CF Patienten. Wilcoxon Test (Median, Range: 247 (46,4;2804) vs. 207 (37,2;2428) µg/ml) vor und nach der Behandlung.

3.11 Darstellung des Einflusses der antioxidativen Behandlung mit Hilfe der 2-D-SDS-PAGE

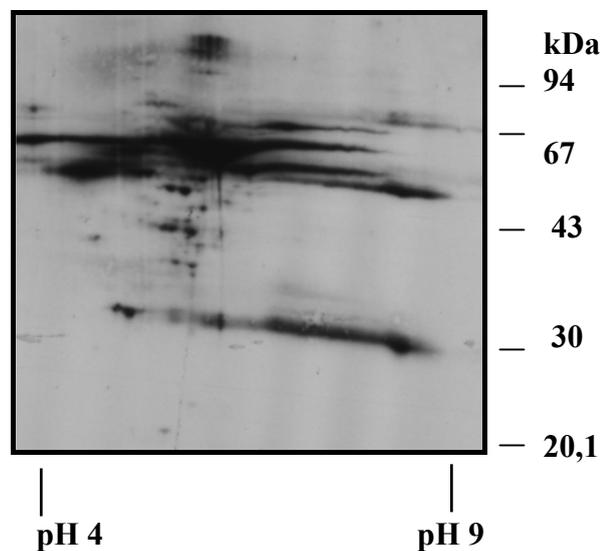
Bei einzelnen Patienten mit CF ist der Einfluss einer Inhalation von Glutathion auf den oxidativen Proteinstatus mittels 2-D Elektrophorese untersucht worden. Die BAL Proben vor und nach Behandlung wurden auf die IEF-Streifen pH 3-10 aufgetragen und fokussiert. Einerseits wurde das Proteinmuster auf dem 2-D Gel, das silbergefärbt worden war, andererseits wurden Streifen mit DNPH derivatisiert, und die Verteilung der oxidierten Proteine nach dem Blotting des parallel gelaufenen Gels untersucht.

Silberfärbung

a) Vor GSH Inhalation



Carbonyl- oxyBlot



b) 3 Wochen nach GSH Inhalation

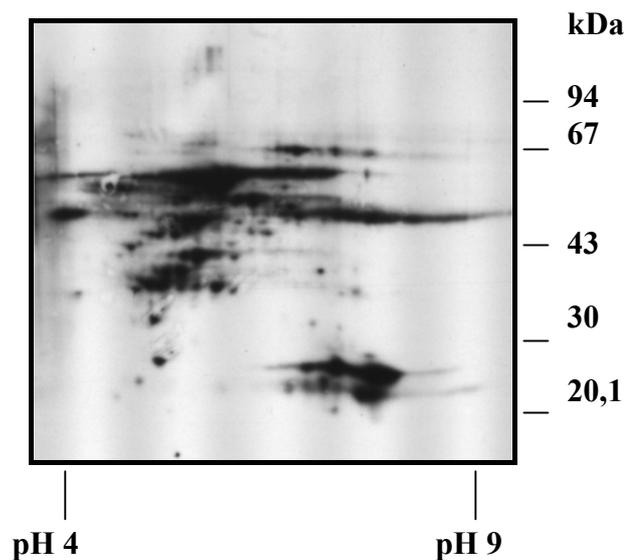
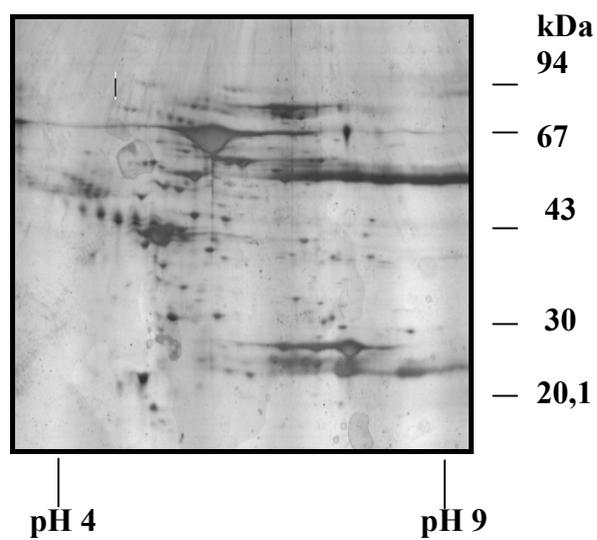


Abbildung 3.50 GSH-Patient CF-52. 2-D Gel pH 3-10, 13 cm und entsprechender Western Blot.

BAL-Proteome Analyse des GSH-Patienten CF-52 .

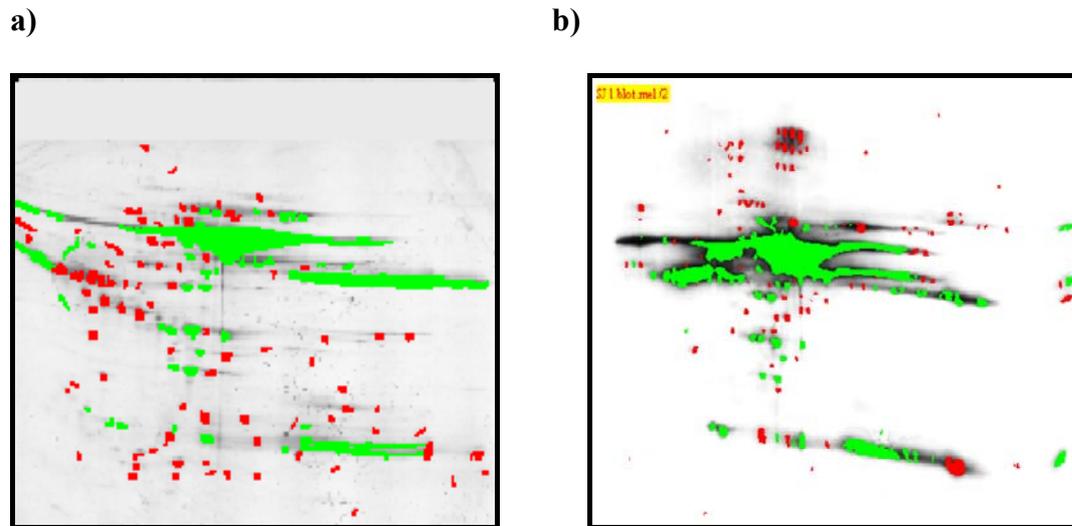


Abbildung 3.51 Matching Ergebnisse zwischen Silbergel CF-52 und oxyBlot CF-52 vor Behandlung:

Mit grüner Farbe sind entsprechende Spotpaare bezeichnet. Matching Parameter: 38,2%, 59,6%, 60,9% für Spotzahl, Spotfläche und Spotvolumen (% von Parametern aller Spots im Silbergel) entsprechend.

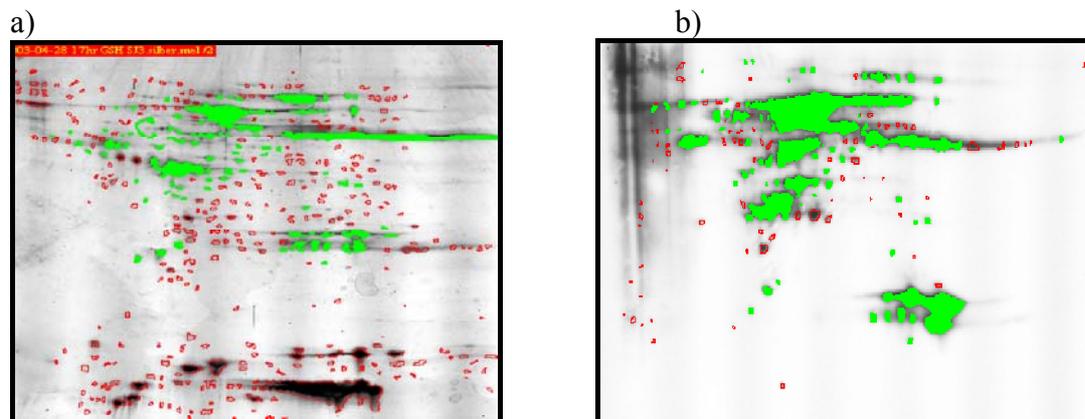


Abbildung 3.52 Matching Ergebnisse zwischen Silbergel CF-52 und oxyBlot CF-52 nach Behandlung:

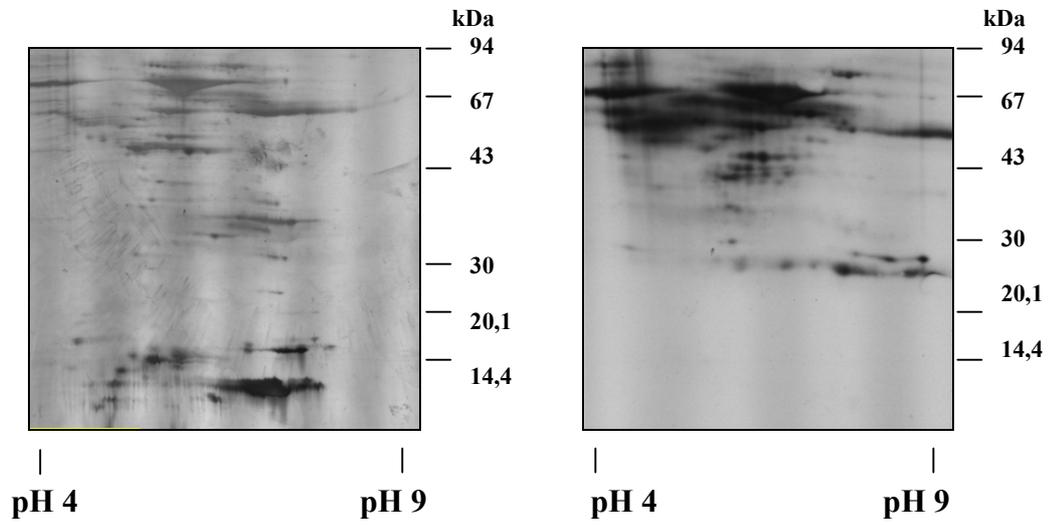
Mit grüner Farbe sind entsprechende Spotpaare bezeichnet. Matching Parameter: 46,9%, 54,28%, 70,12% für Spotzahl, Spotfläche und Spotvolumen (% von Parametern aller Spots im Silbergel) entsprechend.

Die Bilder von silbergefärbten Gelen und entsprechenden Oxyblots wurden mit dem Programm „Melanie 3“ bearbeitet um den semiquantitativen Vergleich zwischen Gelen und Blots zu ermöglichen. Mit dem Matching-Verfahren findet man entsprechende Spotpaare in verschiedenen Gel/Blot Bildern. Die Matching-Parameter sind hier nach der Formel: $\% (P) = \frac{(P)}{\text{aller Spots im Silbergel}} * 100\%$ berechnet worden.

Silberfärbung

Carbonyl- oxyBlot

a) Vor GSH Inhalation



b) 2 Wochen nach GSH Inhalation

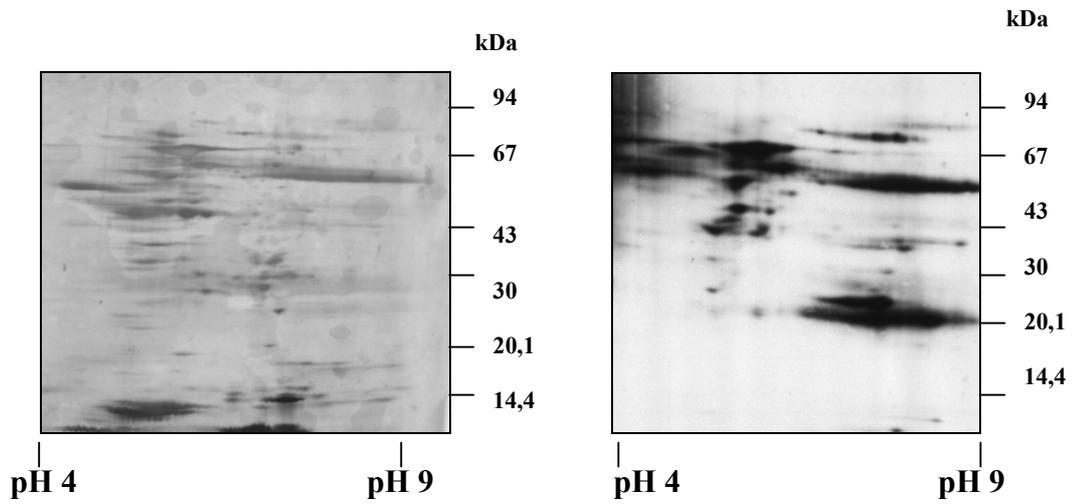


Abbildung 3.53 GSH-Patient CF-42. 2-D Gel pH 3-10, 13 cm

BAL-Proteome Analyse von GSH-Patient CF-42 .

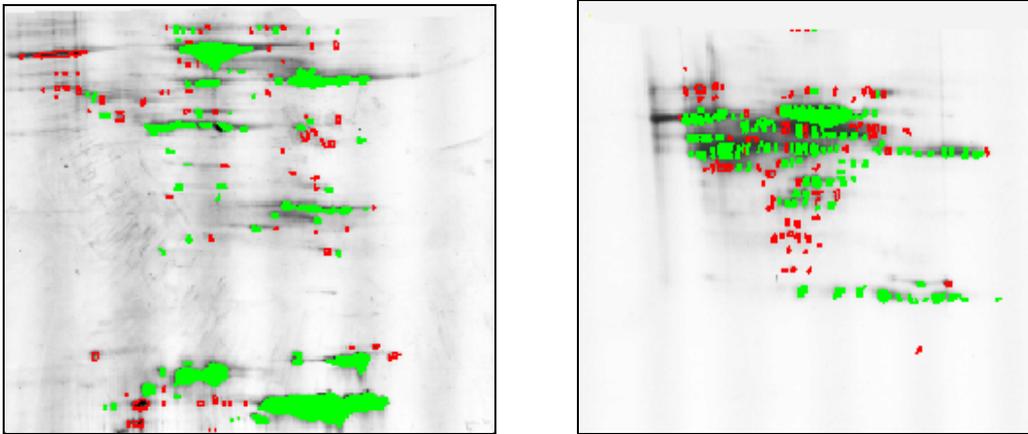


Abbildung 3.54 Matching Ergebnisse zwischen Silbergel CF-42 und oxyBlot CF-42 vor Behandlung:

Mit grüner Farbe sind entsprechende Spotpaare bezeichnet. Matching Parameter: 28%, 28,2%, 26,7% für Spotzahl, Spotfläche und Spotvolumen (% von Parametern aller Spots im Silbergel) entsprechend.

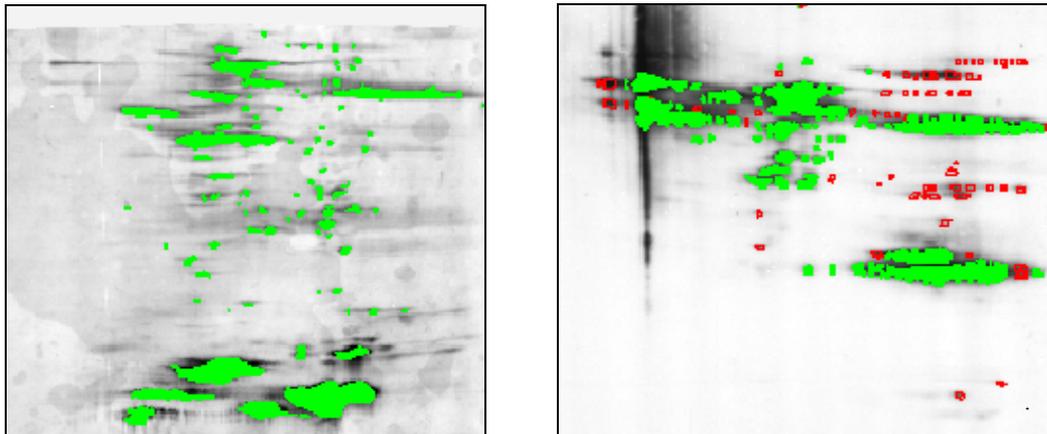


Abbildung 3.55 Matching Ergebnisse zwischen Silbergel CF-42 und oxyBlot CF-42 nach Behandlung:

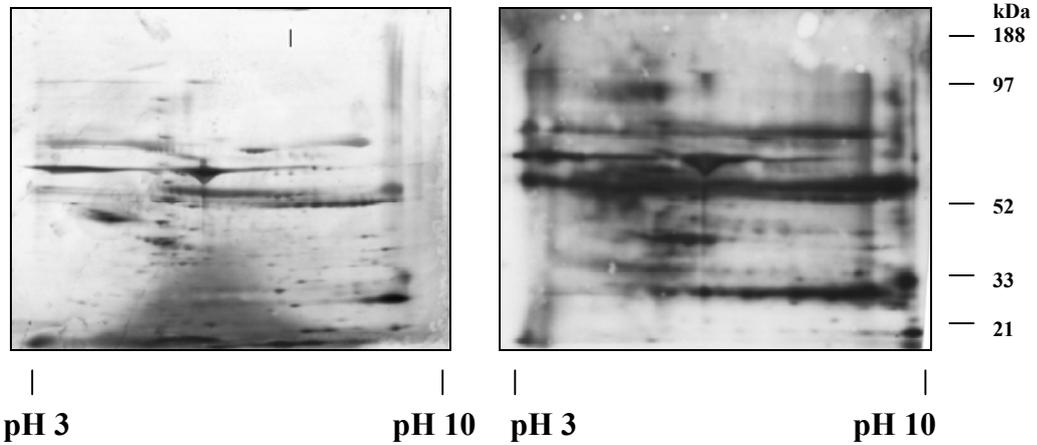
Mit grüner Farbe sind entsprechende Spotpaare bezeichnet. Matching Parameter: 32,3%, 38,5%, 32,2% für Spotzahl, Spotfläche und Spotvolumen (% von Parametern aller Spots im Silbergel) entsprechend.

Mit der 2-D-Elektrophorese kann man auch Änderungen der Oxidation einzelner Proteine finden. Trotz der intensiven antioxidativen Behandlung wurde in unserer Untersuchung in Proben von CF-Patienten keine Änderungen in der Verteilung der oxidierten Proteine im Vergleich vor und nach der Behandlung festgestellt.

Silberfärbung

Carbonyl- oxyBlot

a) Vor GSH Inhalation



b) 2 Wochen nach GSH Inhalation

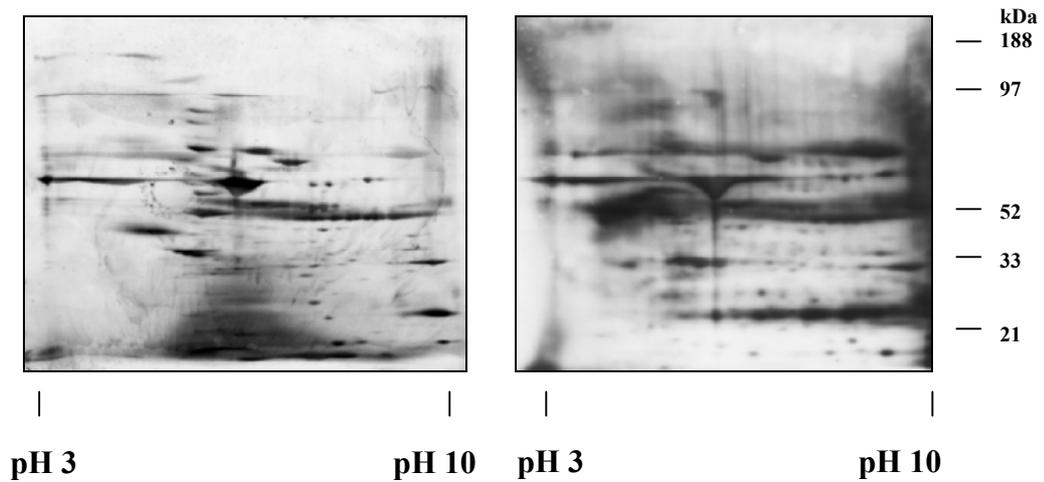


Abbildung 3.56 GSH-Patient CF-40. 2-D Gel pH 3-10, 7 cm.

Die Gele und oxyBlots wurden hier mit einer anderen ZOOM-2-D-Elektrophorese Technik gemacht. Es wurde eine bessere Auflösung erreicht und viele Proteine, die auch in kleinen Mengen in BAL vorkommen, sind auf dem Gel zu sehen. Die Gesamtverteilung oxidierter Proteine änderte sich nicht signifikant im Vergleich zu der Verwendung von Horizontalelektrophorese auf Multiphor II.

BAL-Proteome Analyse der GSH-Patient CF-40

Patient CF-40. Silberfärbung

Patient CF-40. Oxyblot

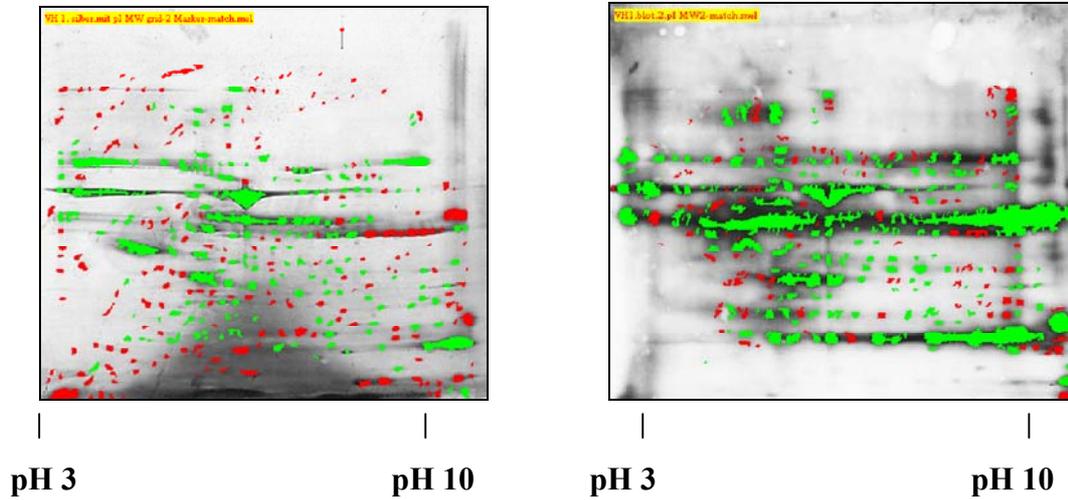


Abbildung 3.57 Matching Ergebnisse zwischen Silbergel CF-40 und oxyBlot CF-40 vor Behandlung:

Mit grüner Farbe sind entsprechende Spotpaare bezeichnet. Matching Parameter: 47%, 56,14%, 59,1% für Spotzahl, Spotfläche und Spotvolumen (% von Parametern aller Spots im Silbergel) entsprechend.

Patient CF-40. Silberfärbung

Patient CF-40. Oxyblot

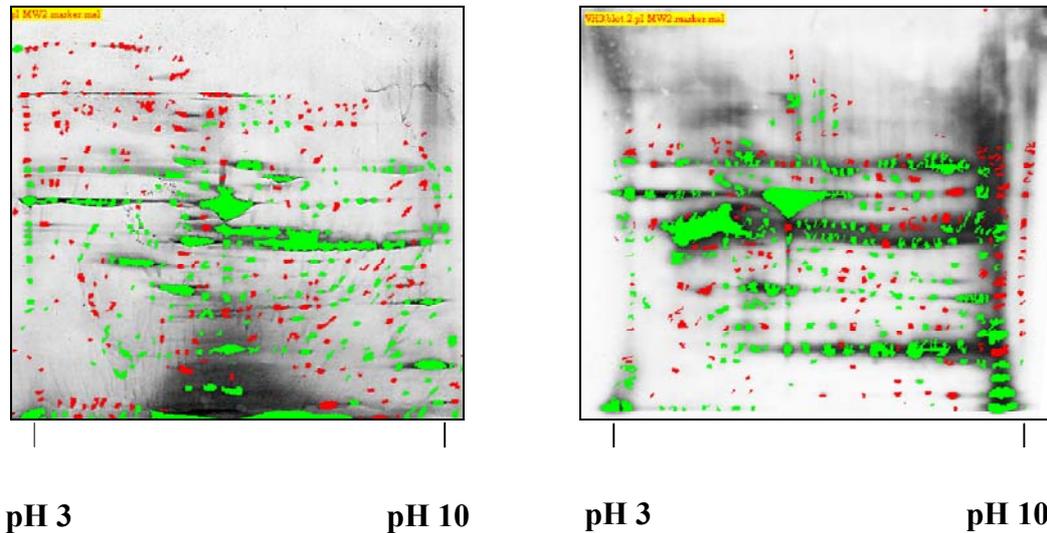


Abbildung 3.58 Matching Ergebnisse zwischen Silbergel CF-40 und oxyBlot CF-40 nach Behandlung:

Mit grüner Farbe sind entsprechende Spotpaare bezeichnet. Matching Parameter: 50,1%, 69,9%, 80,5% für Spotzahl, Spotfläche und Spotvolumen (% von Parametern aller Spots im Silbergel) entsprechend.

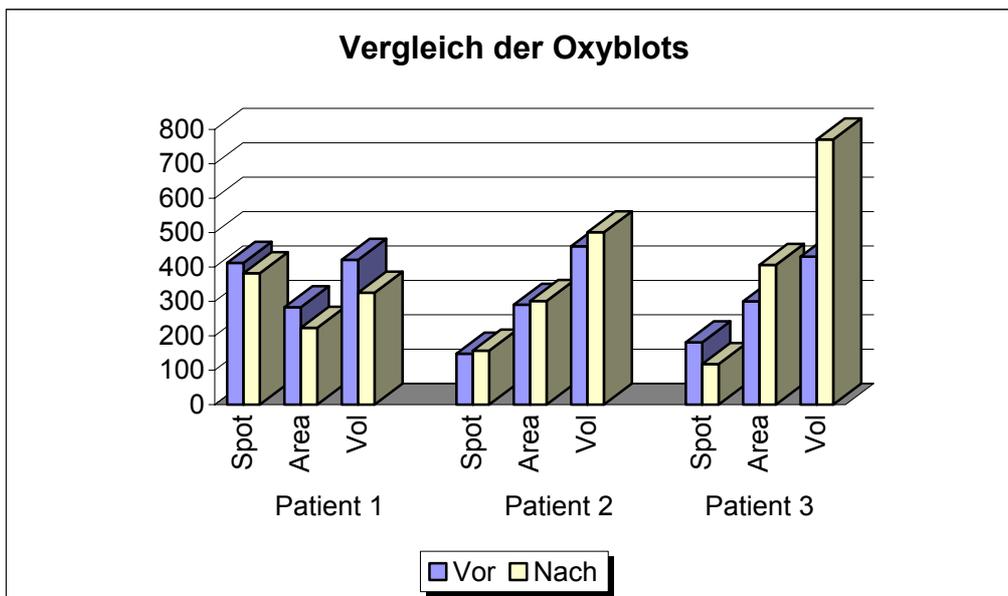
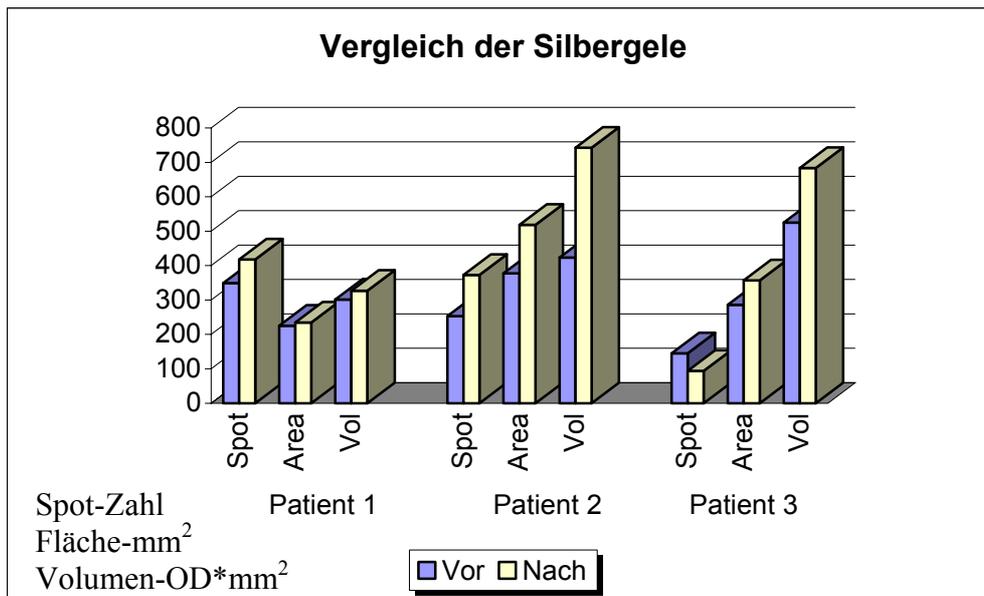


Abbildung 3.59 Vergleich der Gel/Blotparameter vor und nach der Behandlung mit GSH.
Tabelle 3.13 Die Differenz in Spotzahl, Area und Volumen vor und nach der Behandlung.
 Unterschiede sind nicht signifikant ($p > 0,05$)

Patient	Parameter	Silberfärbung		oxyBlot		
		Vor	Nach	Vor	Nach	
1	CF-40	Spotzahl	349	418	412	382
		Fläche(mm ²)	225,5	234,7	283	223,1
		Volumen	301,50	327,07	420,71	325,30
2	CF-52	Spotzahl	253	373	148	157
		Fläche(mm ²)	377,6	518,7	290,3	301,1
		Volumen	423,35	742,83	460,41	500,88
3	CF-42	Spotzahl	145	94	181	118
		Fläche(mm ²)	286	357,1	300	406,2
		Volumen	524,99	683,76	430,17	770,67

Tabelle 3.14 Ergebnisse des Matchings zwischen Silbergelen und entsprechenden Oxyblots der 3 untersuchten Patienten vor und nach der Behandlung mit inhaliertem Glutathion. % Zahl zeigt die mittlere Spotzahl, Fläche oder Volumen auf dem silbergefärbten Gel, dass den oxidierten Spots in Oxyblots entspricht. Die Unterschiede sind nicht signifikant.

	Spotzahl (%)		Spotfläche (%)		Spotvolumen (%)	
	vor	nach	vor	nach	vor	nach
N	3	3	3	3	3	3
Mittelwert	37,7	43,1	47,9	54,2	48,9	60,9
Std. Abw.	9,5	9,5	17,2	15,7	19,3	25,4
Std. Fehler	5,5	5,5	9,9	9,1	11,1	14,5

Folgerungen aus den Untersuchungen des Einflusses der antioxidativen Behandlung

Inhalatives Glutathion bewirkte in der beschriebenen Dosis und Behandlungsdauer keine Änderung der Parameter des oxidativen Stresses in der BALF wie Proteincarbonyle, Proteinthiole und Lipidhydroperoxide und zeigte auch keine Änderung des Verteilungsmusters der oxidierten Proteine auf 2-D-Gelen.

3.12 Einfluss der Oxidation auf die makromolekulare Organisation von SP-D

Die Proteine sind mit der Methode der 2-D-Elektrophorese nur im reduzierten und denaturierten Zustand untersucht worden. Die native Proteinstruktur wurde mit Hilfe der Gelfiltration untersucht. Zunächst wurde festgestellt, ob sich durch Oxidation in vitro die makromolekulare Struktur von SP-D ändert.

Gereinigtes SP-D, das von PAP-Patienten isoliert wurde, wurde im nativen und oxidierten Zustand auf die Säule gegeben. Die Konzentration von SP-D in den einzelnen Fraktionen wurde dann mittels dot-Blot bestimmt. Die Säule wurde mit Proteinen der verschiedenen Molekularmasse geeicht.

SP-D Oligomere					
Die Zahl der Monomere	24mer	12mer	6mer	3mer	1mer
Struktur					
Erwartete Molekularmasse	1080	540	270	135	45

Kalibrierung der Molekularmasse

Mol.Masse:

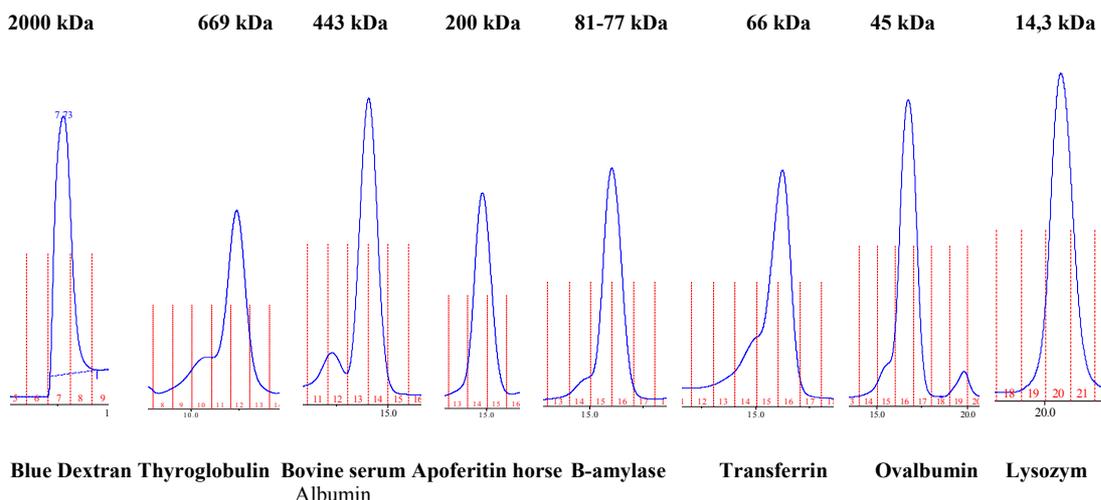


Abbildung 3.60 Struktur und erwartete Molekulare Masse von SP-D-Oligomeren.

3.12.1 Natives SP-D

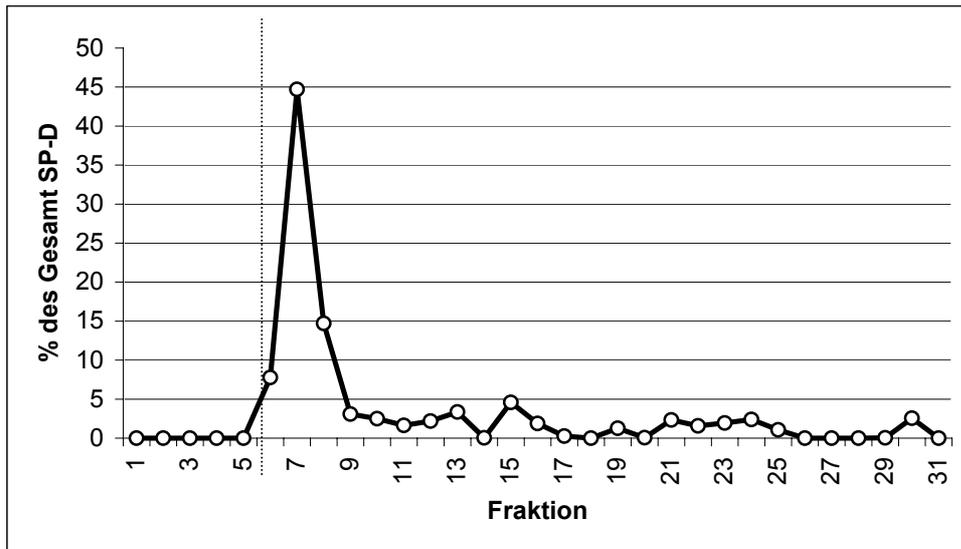


Abbildung 3.61 Gelfiltration der SP-D- Standardprobe, isoliert aus der Lavage des Patienten BF mit Lungenalveolarproteinose. 500 ng SP-D wurde auf die Säule gegeben, 1 ml Fraktionen gesammelt und die SP-D Konzentration in jeder einzelnen Fraktion mittels dot-Blot bestimmt.

3.12.2 Oxidiertes SP-D

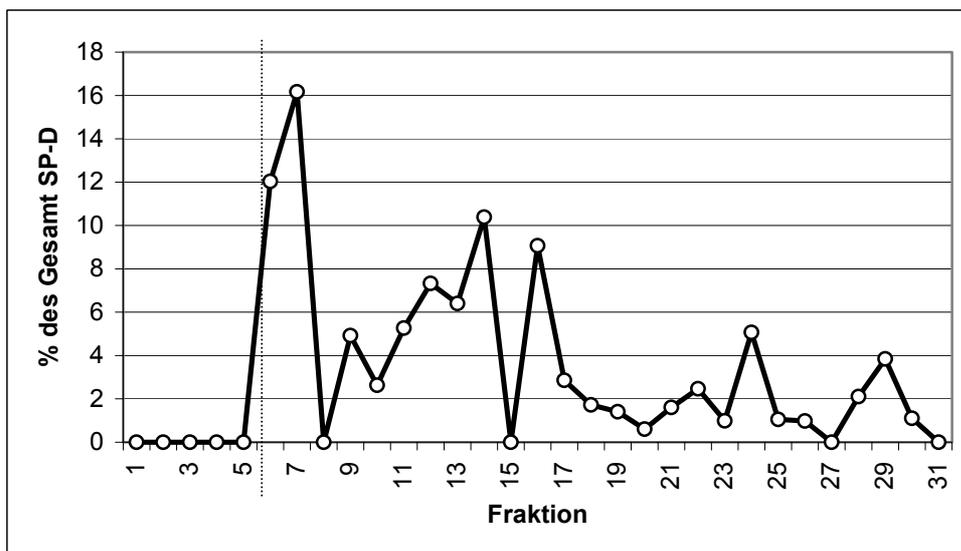


Abbildung 3.62 Gelfiltration der SP-D- Standardprobe, isoliert aus der Lavage des Patienten BF mit Lungenalveolarproteinose. Zuvor waren 500 ng SP-D in vitro mittels AAPH (12,5 mM) für 2 Stunden oxidiert worden.

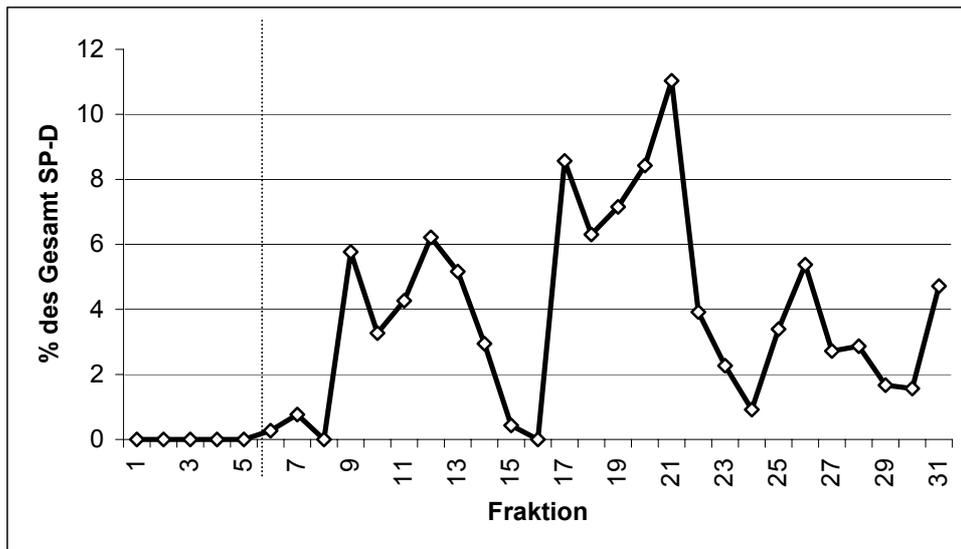


Abbildung 3.63 Gelfiltration der SP-D-Standardprobe, isoliert aus der Lavage des Patienten BF mit Lungenalveolarproteinose. 500 ng SP-D wurden in vitro mittels AAPH (36 mM) über 2 Stunden oxidiert.

SP-D kommt im nativen Zustand zum überwiegenden Teil als Multimer mit einer molekularen Masse von ca. 2000 kDa (vermutlich 12 und 24-mer) vor.

Bei der Oxidation von nativem SP-D nimmt die Konzentration dieser Multimeren ab und das Protein findet sich in Fraktionen mit niedrigerem Molekulargewicht.

Bei ausgeprägter Oxidation mit höherer Konzentration des Oxidationsmittels findet man kein SP-D mehr in der hochmolekularen Organisationsform. Die höchsten Spitzen sind nun in Fraktion 16 und 21 zu sehen. Das entspricht Di- und Monomeren von SP-D. Eine weitere Spitze in Fraktion 26 kann durch das Vorhandensein von Degradationsprodukten erklärt werden.

Diese Experimente zeigen, dass es unter oxidativen Bedingungen zum Abbau der hochmolekularen SP-D Komplexe kommt und so die quartäre Organisation von SP-D geändert wird.

3.12.3 Chronische Bronchitis

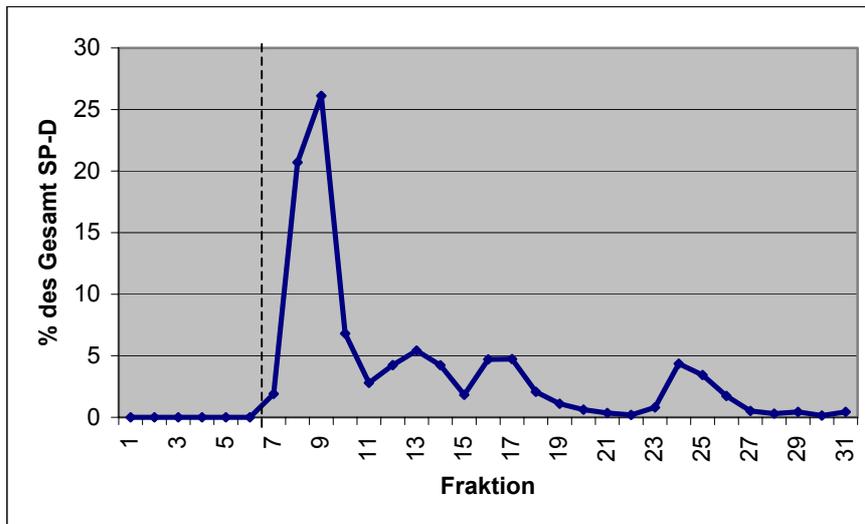


Abbildung 3.64 Chronische Bronchitis. Gesamtkurve aus Gelfiltrationen (GF) von 6 Patienten

3.12.4 CF-Patienten mit niedrigem Gehalt an neutrophilen Granulozyten in BAL

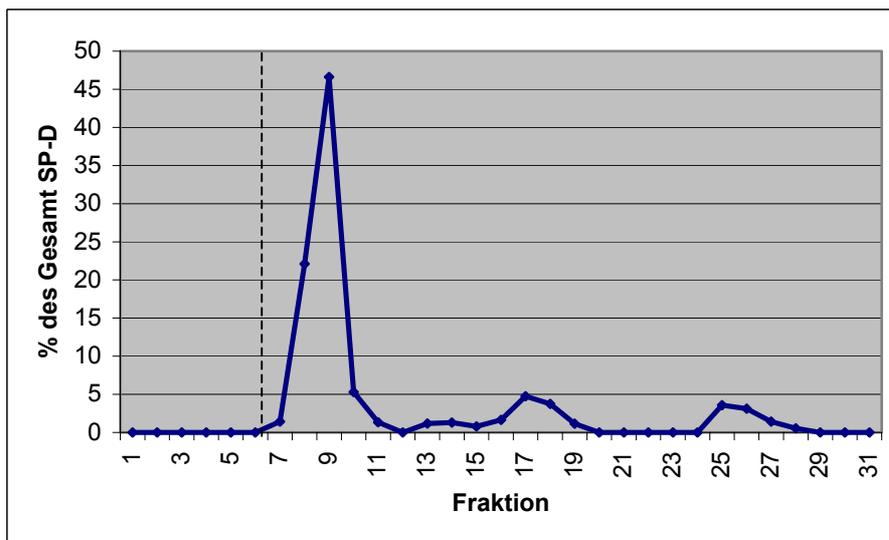


Abbildung.3.65 CF mit niedrigem Gehalt an neutrophile Granulozyten. Gesamtkurve aus GF von 3 Patienten

Mittels Gelfiltration wurde die makromolekulare Organisation von SP-D in 3 Patientengruppen untersucht: eine Gruppe mit chronischer Bronchitis, eine Gruppe von CF-Patienten mit niedrigem und eine mit hohem Gehalt an neutrophilen Granulozyten. Die Konzentration von SP-D wurde in jeder Fraktion mittels dot-Blot bestimmt.

Ähnliche makromolekulare Organisation von SP-D wurde bei chronischer Bronchitis und bei CF mit niedrigem Neutrophilengehalt gefunden. In diesen Gruppen dominierten hochmolekulare SP-D Formen, die meistens in Fraktionen 8-10 gefunden wurden.

3.12.5 CF-Patienten mit hohem Gehalt an neutrophilen Granulozyten in BAL

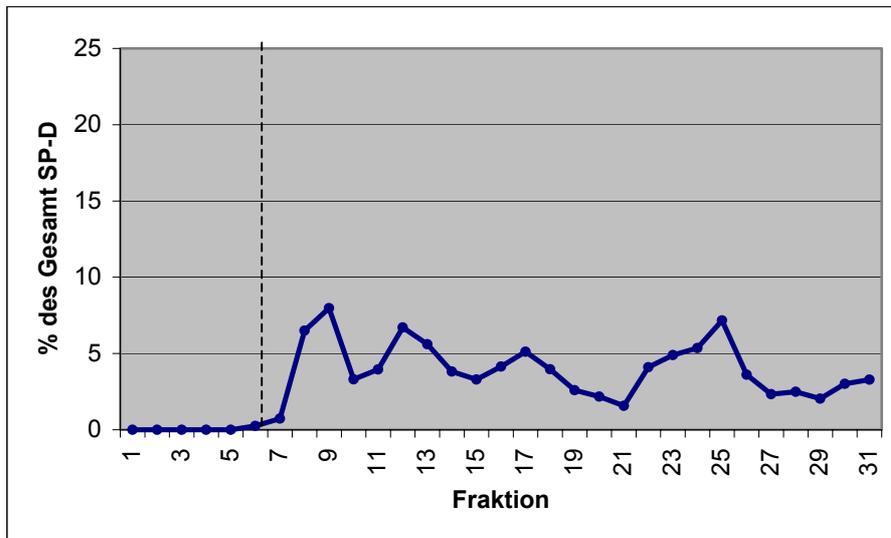


Abbildung 3.66 CF mit hohem Gehalt an neutrophile Granulozyten Gesamtkurve aus GF von 7 Patienten

Ein signifikant niedrigerer Gehalt an hochmolekularen SP-D Formen ($p < 0,05$) die eine Molekularmasse von >1000 kDa hatten, wurde bei CF-Patienten mit hohem Gehalt an neutrophilen Granulozyten in BAL gefunden. Gleichzeitig hatten diese Patienten einen signifikant höheren Oxidationsgrad ihrer Proteine in der BAL.

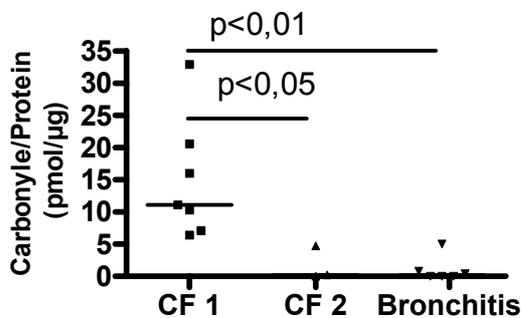


Abbildung 3.67 Carbonylgehalt in untersuchten Patientengruppen

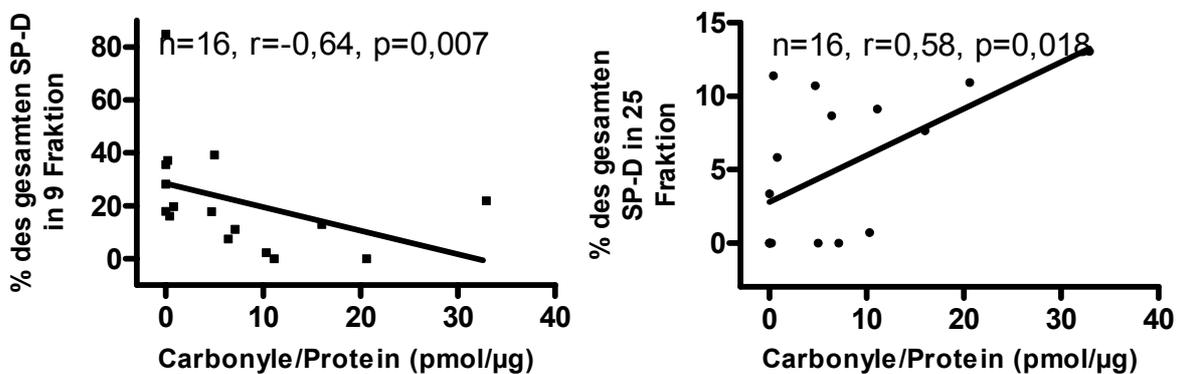


Abbildung 3.68 Korrelation zwischen Proteinoxidation und dem Gehalt von SP-D in verschiedenen Fraktionen.

3.13 Untersuchung der funktionellen Eigenschaften von SP-D

Agglutination

SP-D^{PAP} führt zu einer deutlichen Agglutination von *Pseudomonas aeruginosa* (Stamm 16) (Abb. 3.69). Nach Oxidation mittels AAPH vermochte das so behandelte SP-D die Bakterien zu agglutinieren (Abb.3.70).

Als Kontrolle diente reine Bakteriensuspension; hier wurde keine Agglutination beobachtet.

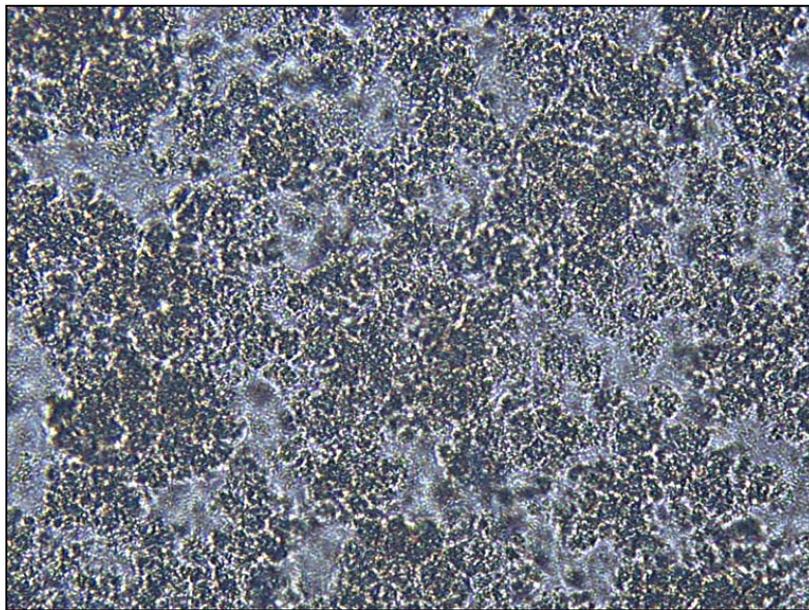


Abbildung 3.69 Agglutination von *Ps. aeruginosa* durch SP-D^{PAP}
SP-D^{PAP} (5 µg/ml), *Ps. aeruginosa* (OD 1,5) Stamm 16 in TBS
Agglutination von Bakterien.

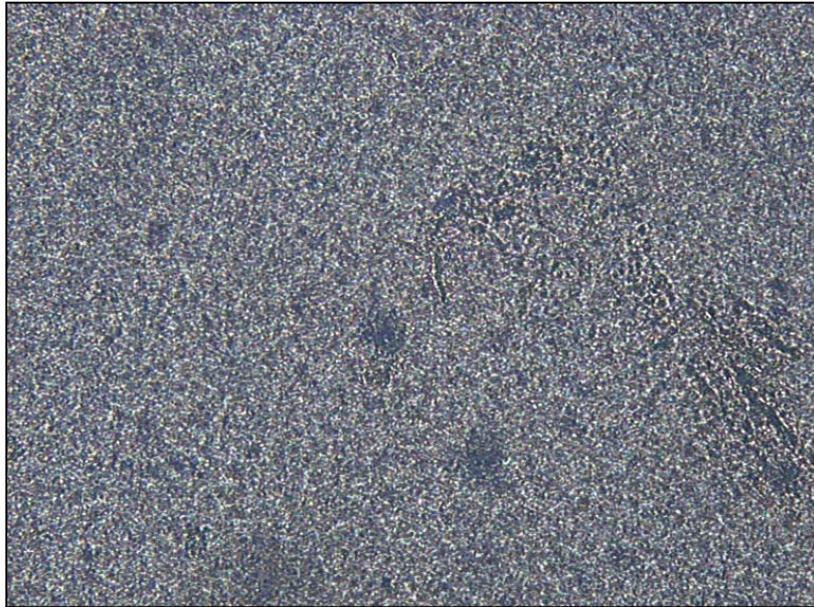


Abbildung 3.70 Agglutinationsverhalten des in vitro oxidierten SP-D^{PAP}
SP-D^{PAP} (5 µg/ml) nach 120 min Inkubation mit syntetischem Oxidationsmittel AAPH (12,5 mM) und *Ps.aeruginosa* Stamm 16 (OD 2) in TBS, keine Agglutinate.

4 Diskussion

Sauerstoff ist für die Oxidation organischer Substanzen zur Energieerzeugung im Zellstoffwechsel notwendig. Schon unter normalen Bedingungen werden laufend toxische Sauerstoffmetabolite während dieses aeroben Metabolismus generiert. Die resultierenden ROS spielen eine wichtige Rolle bei der Modulation physiologischer Funktionen, können aber auch destruktiv sein, wenn ihre Produktion überschüssig ist. Ähnliches gilt für die RNS, die sowohl physiologisch regulierend wirken als auch bei übermäßigem Anfall destruktiv sein können^{73;74}.

Toxische Sauerstoffmetabolite werden zusätzlich in großer Menge bei Inflammationsreaktionen generiert. Leukozyten, Makrophagen und Mastzellen generieren diese in großem Umfang zur Erregerabwehr, gleichzeitig können jedoch auch Strukturproteine getroffen werden und so Lungenschädigungen induziert werden⁷⁵. Um diese oxidative Schädigungen zu minimieren, verfügt der Organismus über integrierte antioxidative enzymatische Schutzsysteme und lösliche Antioxidantien. Diese Systeme können die reaktiven Produkte entgiften. Wenn die oxidative Belastung zu groß wird und die Kapazität der antioxidativen Systeme überschritten wird, schädigen die resultierenden Sauerstoffradikale zelluläre Strukturen, Proteine, Lipide, Kohlenhydrate und DNA. Die pathophysiologischen Konsequenzen dieser Prozesse sind eine verstärkte Inflammation und Gewebeschädigung⁷⁶.

4.1 Bestimmung des oxidativen Status des Gesamtproteoms in der BAL bei verschiedenen Lungenerkrankungen

4.1.1 CF-Patienten

In der Literatur gibt es bisher indirekte Hinweise, dass toxische Sauerstoffmetabolite, die durch eine ausgeprägte neutrophile Inflammationsreaktion erzeugt werden, zur Lungenschädigung bei CF beitragen. So wurden hohe Sputumkonzentrationen an extracellulärer Myeloperoxidase (MPO), die H₂O₂ in reaktive Sauerstoffmetabolite umwandelt, bei CF Patienten beschrieben. Die Lungenfunktion korrelierte umgekehrt zur Menge an MPO⁷⁷. Eine erhöhte Lipidperoxidation, eine reduzierte Kapazität zum Abfangen der freien Radikale und ein veränderter Plasma- Antioxidantenstatus sind ebenfalls berichtet worden⁷⁸. Messungen in Bronchiallavage liegen bisher nicht vor. In unserer Untersuchung wurden BAL von CF-Patienten mit einem breiten Erkrankungsspektrum untersucht.

Bei CF-Patienten war die BAL-Gesamtzellzahl, die absolute Zahl und der Prozentanteil an neutrophilen Granulozyten proportional zum Ausmaß der Proteinoxidation. Ferner korrelierte der Gehalt an Carbonylgruppen in BALF Proteinen negativ mit allen vier Lungenfunktionsparametern. Patienten mit pathologischer Lungenfunktion ($FEV_1 < 80\%$) hatten deutlich höhere Proteincarbonylwerte ($p=0,0006$) als Patienten mit normaler Lungenfunktion ($FEV_1 > 80\%$). Diese Differenz ist zum Teil darauf zurückzuführen, dass die Subgruppe mit pathologischer Lungenfunktion signifikant höhere Gesamtzellzahlen, absolute Neutrophilenzahlen und einen höheren Anteil an neutrophilen Granulozyten in BALF hatte. Auch die Patienten mit Neutrophilenanteilen über 10% hatten signifikant höhere Proteincarbonylwerte. Diese Patienten hatten auch eine deutlich schlechtere Lungenfunktion ($p=0,004$) und eine signifikant höhere Gesamtzellzahl und absolute Neutrophilenzahl. Signifikante negative Korrelationen bestanden ferner zwischen Lungenfunktion, absoluter ($p=0,0007$) und relativer ($p=0,0012$) Neutrophilenzahl.

Es gibt Anhaltspunkte für eine Altersabhängigkeit des Anteils oxidiertes Proteine⁷⁹⁻⁸¹. Auch in unserer Gruppe der CF-Patienten nahm die Menge an Proteincarbonylen mit dem Alter zu. Wir haben daher untersucht, welche weiteren Faktoren eine Rolle spielen. In einer Faktorenanalyse, die die Faktoren Carbonylgehalt, Alter und Lungenfunktion berücksichtigte, zeigte sich, dass die Variation in der Lungenfunktion stärker durch die Variable „Carbonylgehalt“ bestimmt wurde als durch die Variable „Alter“. Da bei CF die pathologischen Prozesse in der Lunge durch eine ausgeprägte neutrophile Inflamationsreaktion, die bereits seit jüngster Kindheit etabliert ist, bewirkt werden, ist es wahrscheinlicher, dass dieser Variable der größere Einfluss zukommt.

4.1.2 Andere chronische Lungenerkrankungen

In der Literatur finden sich für einzelne auch hier untersuchte Erkrankungen Daten zum oxidativen Status und zur Proteinoxidation. Aufgrund unterschiedlicher Methoden, ist es nicht einfach den oxidativen Status direkt miteinander zu vergleichen.

In dieser Arbeit wurde der pulmonale oxidative Status durch Messung der oxidierten Proteine in der BALF bestimmt. Es zeigte sich, dass die Proteinoxidation mit einem Medianwert von 9,3 pmol/ μ g am ausgeprägtesten in der Gruppe der CF Patienten war. Innerhalb dieser Gruppe gab es zwar eine erhebliche Streuung der Einzelwerte, Patienten mit chronischer Bronchitis und Tracheostoma hatten jedoch signifikant niedrigere Werte. Dieser Unterschied blieb nicht bestehen, wenn die Gruppen hinsichtlich ihres Alters vergleichbar strukturiert wurden.

In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben über die Bedeutung der Proteinoxidation bei Lungenerkrankungen. Eine deutliche Oxidation von Proteinen bei CF wurde sowohl in Tierexperimenten²⁶ als auch in Untersuchungen an Menschen belegt¹⁸. Bei interstitiellen Lungenerkrankungen sind die Änderungen im oxidativen Status nicht eindeutig. So ist bekannt, dass die Lungenfibrose (IPF, interstitial pulmonary fibrosis) durch eine vergrößerte spontane Produktion von Oxidantien durch entzündliche Zellen in der Lunge und die Anwesenheit hoher Konzentrationen an Myeloperoxidase in der BALF charakterisiert ist. Den Oxidantien wird eine Rolle bei der Verursachung der epithelialen Schädigung zugeschrieben^{82;83}. Dies wurde in der BAL erwachsener Patienten mit idiopathischer Fibrose und Sarkoidose (SARC) bestätigt. Der Gesamtgehalt an oxydierten Proteinen betrug 0.84 ± 0.2 nmol Carbonyl/mL BALF bei IPF und 0.73 ± 0.16 nmol/mL bei SARC. Die Kontrollwerte lagen bei 0.3 ± 0.07 nmol Carbonyl/mL BALF. Die Summe an oxydierten Proteinen korrelierte positiv mit der Zahl von Eosinophilen und polymorphonucleären Neutrophilen bei IPF und SARC⁸⁴. Bei Patienten mit IPF wurde eine enge Beziehung zwischen dem Anteil an oxidierten Protein-Methionin und der Zahl der Neutrophilen gefunden⁸⁵. Die von uns untersuchten Kinder mit interstitiellen Lungenerkrankungen wiesen jedoch keine signifikanten Unterschiede im Oxidationsgrad im Vergleich zu Tracheostomapatienten, die als Kontrollgruppe fungierten, auf. Dabei ist zu berücksichtigen, dass unsere Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen keine gleichförmige Gruppe darstellen. Ferner war der Schweregrad der Lungenerkrankung unserer Patienten erheblich leichter, als der der erwachsenen IPF-Patienten.

Unsere Patienten mit chronischer Bronchitis und GERD unterschieden sich nicht im Ausmaß der Oxidation der BAL Proteine von der Kontrollgruppe. Dies steht im Gegensatz zu Daten in der Literatur, die eine gestörte antioxidative Bilanz in der BALF von Kindern mit chronischer Bronchitis zeigen⁸⁶.

So ist für Patienten mit Asthma eine vermehrte oxidative Schädigung bestimmter Proteine in BALF beschrieben⁸⁷. Schock et al. haben die Proteinoxidation bei Kindern mit Asthma und bei gesunden Kindern untersucht. In dieser Arbeit lagen die Carbonyle mit $0.970\text{-}1.635$ nmol/mg für Kinder mit Asthma in einer vergleichbaren Größenordnung wie die ihrer Normalwerte ($0.280\text{-}4.529$ nmol/mg)^{88;89}.

4.2 Untersuchung der oxidativen Änderungen mit der 2-D-Elektrophorese

Ausgewählte CF-Patienten wurden hinsichtlich des Verteilungsmusters oxidierter Proteine mittels Western Blot untersucht. CF-Patienten mit niedrigem Oxidationsgrad hatten eine deutlich niedrigere Spotzahl, Spotfläche und Volumen als solche mit hohem Oxidationsgrad. Die Western Blot Analyse von Patienten mit Bronchitis, GERD und Tracheostoma, bei denen die Entzündung des Bronchialsystems nicht so ausgeprägt war wie bei den CF-Patienten, zeigte, dass vor allem Plasmaproteine (z.B. Albumin und Transferrin), die mit dem Exsudat in den Bronchoalveolarraum gelangen, oxidiert werden.

Die Zahl oxidierter Proteine korrelierte besser als die Spotfläche oder das Spotvolumen mit den separat gemessenen Proteincarbonylwerten. Dies ist auf methodische Probleme, d.h. auf eine unterschiedliche Präzision bei der Quantifizierung dieser Parameter auf den Western Blots zurückzuführen.

Es wurde weiter die Frage untersucht, inwieweit die Prozesse der Oxidation und Nitrifikation in vivo parallel verlaufen. Dazu wurde auch die Verteilung nitrifizierter Proteine mittels 2-D-Elektrophorese ermittelt und mit dem Muster oxidierter Proteine verglichen. Es wurde eine positive Korrelation zwischen der Anzahl nitrifizierter Proteine und oxidierter Proteine beobachtet. Die Korrelationen der anderen Spotparameter waren nicht signifikant. Auch hier sind methodische Probleme, wie z.B. eine schlechtere Abgrenzbarkeit der Spots auf den Nitroblots, ursächlich.

Zusammengefasst zeigen unsere Untersuchungen in Übereinstimmung mit den Literaturdaten, dass es während einer neutrophilen Inflammationsreaktion zu einer ausgeprägten Oxidation von Proteinen kommt. Teleologisch sind diese Prozesse wohl auf eine lokale Erhöhung der Aktivität freier Sauerstoffradikale zur Erregerabwehr am Ort der Entzündung gerichtet^{90,91}. Gleichzeitig kann aber dadurch auch das körpereigene Gewebe geschädigt werden. Dies tritt dann vermehrt auf, wenn durch die Oxidation gegenregulatorische Mechanismen nicht eingeschaltet werden, die das Fortschreiten der Entzündung hemmen⁹². Bei cystischer Fibrose ist die Inflammationsreaktion extrem überschießend⁹³ und führt so zur Schädigung und letztlich Zerstörung des körpereigenen Lungengewebes^{94,95}. Diese Hypothese wird durch die hier erhobenen Daten zum engen Zusammenhang zwischen abnehmender Lungenfunktion und zunehmendem Oxidationsgrad gestützt. Daher erscheinen sowohl antiinflammatorische Strategien therapeutisch sinnvoll als auch eine Verstärkung antioxidativer und/oder antiproteolytischer Maßnahmen. Ein derartiger Ansatz besteht in der Inhalation reduzierender

Substanzen zur Kompensation überschüssiger oxidativer Aktivität. Die Auswirkung einer derartigen Intervention wurde ebenfalls untersucht.

4.3 Untersuchung des Einflusses einer Behandlung mit inhalativem Glutathion (GSH) auf oxidative Parameter in der BAL von Patienten mit CF

Die chronische Atemwegsentzündung bei CF ist durch eine Anhäufung extrem großer Mengen aktivierter neutrophiler Granulozyten und gleichzeitig durch eine persistierende bakterielle Infektion charakterisiert. Mit dieser Entzündung ist eine abnormale Zunahme und Persistenz des oxidativen Stresses assoziiert. Dies konnte vielfach durch unterschiedliche Marker, einschließlich eines hohen Niveaus an Protein-Oxidation¹⁸, an langlebigen Oxidantien⁹⁶, an pro-oxidativen Cytokinen⁹⁷, oxidativen Schäden der DNA⁹⁸ und an Lipidperoxidationsprodukten demonstriert werden⁹⁹. Die Zusammenhänge zwischen Defekt im CFTR-Gen bei Patienten mit CF und der chronischen Lungeninfektion sind immer noch weitgehend ungeklärt. Bisher wurde meist angenommen, dass eine verminderte antioxidative Kapazität sekundäre Folge des chronischen Übermaßes an oxidativen Stress ist. Kürzlich wurde jedoch auch gezeigt, dass CFTR selbst Glutathion in den Alveolarraum transportiert¹⁰⁰ und daher dort ein primäres Defizit vorliegen könnte.

Bei erwachsenen Patienten mit CF wurden verminderte Konzentrationen an Glutathion sowohl im Plasma als auch in der Lavageflüssigkeit gefunden²⁴. Glutathion kann oxidierte Moleküle reduzieren und so zu einer Verminderung oxidativer Prozesse beitragen. Die Normalisierung des Glutathiongehaltes der broncho-alveolären Flüssigkeit ist daher ein vielversprechender therapeutischer Ansatz. Eine frühere Studie mit sieben CF-Patienten hat die Durchführbarkeit und Toleranz eines Glutathion-Aerosols bereits gezeigt¹⁰¹.

In unserer Studie wurde untersucht, ob die Behandlung mit inhalativem Glutathion bei Patienten mit CF das Ausmaß des oxidativen Stresses in der Lunge verändern kann. Als Parameter wurde der Gehalt an Proteincarbonylen, Proteinthiolen und an Lipidhydroperoxiden in der BALF quantifiziert. Ferner wurden die Veränderungen im BAL Proteom und das Verteilungsmuster der oxidierten Proteine untersucht.

Trotz der Applikation hoher Dosen an GSH, wurden keine signifikanten Veränderungen im Gehalt an Proteincarbonylen, Proteinthiolen und den Lipidhydroperoxiden beobachtet. Offensichtlich reichte die applizierte reduktive Kapazität nicht aus, das vorhandene pro-oxidative Gleichgewicht zu beeinflussen und zu Änderungen der erhobenen oxidativen Parameter zu führen. Leider gibt es keine andere vergleichbare Studie bei CF.

Ferner gibt es in der Literatur einige Daten, die zum Teil kontrovers sind, die zeigen, dass eine intensiviertere Behandlung von CF-Patienten mit großen Mengen antioxidativ wirksamer Vitamine zu einer signifikanten Verminderung der Lipidoxidation im Plasma führt. Dabei wurde jedoch keine signifikante Veränderung der Proteinoxidation im Plasma beobachtet¹⁰². Roum et al.¹⁰¹ haben die Verminderung der Bildung oxidativer Radikale durch die Zellen aus den Lungen von CF-Patienten nach Glutathion- Inhalation untersucht. Leider berichten die Autoren nicht über den Zustand von Redox-Parametern in BALF vor und nach der Behandlung. Aus Untersuchungen von Plasma ist allerdings bekannt, dass auf den dort ermittelten oxidativen Status von CF-Patienten therapeutisch Einfluss genommen werden kann. So kann eine alimentäre Zufuhr erhöhter Mengen an Antioxidantien zu einer Verbesserung der antioxidativen Kapazität des Blutes und zu einer Normalisierung des Malondialdehyd-Status im Blut führen¹⁰³. Dagegen berichten Wood et al.¹⁰⁴, dass sich der oxidative Stress nach einer Behandlung sogar erhöht, was durch eine Steigerung des Plasmagehaltes an 8-iso-PGF-2 α und Plasmafettsäuren ermittelt wurde. Gleichzeitig verbesserte sich die Lungenfunktion nach einer 2-wöchigen antibiotischen Behandlung. Bei einzelnen Patienten wurde untersucht, ob sich möglicherweise einzelne Proteine besonders ändern. Semiquantitativ ließ es sich auch hier zeigen, dass es zu keinen signifikanten Veränderungen in der Proteincarbonylierung während der GSH-Behandlung kommt. So änderten sich die Spotzahl (247 vs. 219), die Fläche (291,1mm² vs. 310,1 mm²) und das Volumen (437,1 OD*mm² vs. 532,3 OD*mm²) der oxidierten Proteine nicht.

4.4 Oxidative Modifikationen von SP-A

Lungensurfactant bedeckt die Oberfläche der Lungenalveolen und kann das erste Ziel reaktiver Sauerstoffradikale sein¹⁰⁵. Der zentrale Effekt der Oxidantien auf das Lungensurfactantsystem ist die Oxidation der Surfactanproteine und eine Peroxidation der Surfactantphospholipide¹⁰⁶. Ferner zeigen einige Studien, dass die Oxidation von SP-A in vitro mit Ozone¹⁰⁷, Stickstoffdioxid¹⁰⁸ und reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffradikalen¹⁰⁹ dessen funktionelle Eigenschaften einschließlich Lipidaggregation, Mannosebindungskapazität, Stimulierung der Produktion zellulärer Zytokine und die Phagozytose beeinträchtigen können¹¹⁰. Auch eine in vivo Oxidation von SP-A hatte funktionelle Auswirkungen¹¹¹.

Bei Patienten mit Alveolarproteinose konnte SP-A auf den 2-D-SDS-Gelen, die von Streifen mit engem pH-Gradienten (pH 4-5) gemacht wurden, in Form von 5 Isoformen mit einer Molekularmasse von 36 kDa (vollständig reduziert) und 72 kDa (nicht reduziert) im pH

Bereich von 4,3 bis 4,9 dargestellt werden. Das SP-A von Patient AP-1 war bereits im nativen Zustand partiell oxidiert. Nach in vitro Oxidation dieser Probe wurden die Spots auf dem mit Silber gefärbtem Gel nicht so scharf und auf dem Western Blot konnte man oxidiertes SP-A in der Umgebung anderer stark oxidiierter Proteine sehen. Diese Ergebnisse zeigen, dass bei PAP SP-A bereits ohne zusätzliche Oxidation oxidiert ist, wenn auch der Oxidationsgrad nicht maximal ist. Dies stimmt mit den Befunden der Literatur überein¹¹². Höhere Niveaus der Oxidation von SP-A sind nach der Oxidation bestätigt worden¹¹³.

Auch bei der Untersuchung von CF-Patienten fand sich SP-A auf den Western Blots in oxidiert Form. Ferner war die Gesamtmenge an SP-A bei CF-patienten reduziert und zwar proportional zur proteolytischen Aktivität in der Probe¹¹⁴. Demgegenüber war SP-A bei Patienten mit chronischer Bronchitis, bei welchen die Proteinoxidation unterhalb der Messgrenze lag, nur teilweise oxidiert.

4.5 Oxidative Modifikationen des SP-D

Ganz anders sind die Ergebnisse zur oxidativen Modifikation von SP-D. SP-D stellte sich wie bekannt in der 2-D-Elektrophorese in Form von Spots bei ca. 43 kDa und im pH Bereich von 6,0 bis 8,0 dar. In allen von uns untersuchten Proben wurde SP-D nie im oxidierten Zustand auf den Western Blots detektiert. Dies belegt eine hohe Resistenz der SP-D Primärkette gegenüber oxidativen Einflüssen. Durch eine Oxidation von Patientenprobe in vitro konnten auch keine oxidative Veränderungen des SP-D gefunden werden, obwohl gleichzeitig viele andere Proteine stark oxidiert wurden. SP-D soll selbst potente antioxidative Eigenschaften besitzen ohne das es bei diesen Vorgängen selbst oxidiert wird. Die genauen Mechanismen, die dies bewirken, sind allerdings noch nicht bekannt¹¹⁵. Nur bei starker Oxidation in vitro von größeren Mengen an SP-D konnte Carbonylbildung festgestellt werden.

4.6 Beeinflussung der makromolekularen Organisation von SP-D durch Oxidation

Im Gegensatz zur Primärkette von SP-D scheint dessen tertiäre und quartäre Struktur viel sensitiver gegenüber Oxidation zu sein. Die Versuche mit Gelfiltration haben gezeigt, dass SP-D im nativen Zustand überwiegend in hoch-polymerisierter Form vorkommt. SP-D eluiert in einer einzelnen Fraktion, die eine Molekularmasse von etwa 1000 kDa hat und daher wahrscheinlich einem 24-mer entspricht. Durch Oxidation kommt es zu einer Depolymerisation dieser Strukturen. Bei mäßiger Oxidation überwiegen 12-16-mere Formen. Nach stärkerer Oxidation in vitro verschwinden die hochpolymerisierten Formen von SP-D

komplett und es gibt nur noch Monomere und möglicherweise weiter degradierte Formen. Die Möglichkeit der Veränderung der räumlichen Struktur von SP-D ist bei Patienten mit GÖR bereits gezeigt worden¹¹⁶, aber die Rolle von Oxidation für diesen Prozess war unbekannt. Daher könnten ähnlich wie die für SP-A zuvor beschriebenen oxidative Einflüsse möglicherweise auch bei SP-D mit relevanten Funktionseinbußen verknüpft sein¹¹⁷.

4.7 Beeinflussung der funktionellen Eigenschaften von SP-D

Es wurden daher die funktionellen Eigenschaften von SP-D im Zusammenhang mit der Oxidation untersucht. Es konnte eine deutliche Verminderung des Agglutinationsvermögens von SP-D beobachtet werden. Ein ähnlicher Funktionsverlust wurde auch nach limitierter Proteolyse des SP-D beobachtet¹¹⁸.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine chronische inflammatorische Reaktion im bronchoalveolären Bereich der Lunge zu einer oxidativen Schädigung der dort lokal ansässigen Proteine führt. Dabei sind neutrophile Granulozyten, bzw. die von ihnen produzierten Radikale, von entscheidender Bedeutung. Sehr ausgeprägte oxidative Modifikationen wurden bei Patienten mit Mukoviszidose beobachtet und es bestand ein linearer Zusammenhang zum Ausmaß der Einschränkung der Lungenfunktion. Eine antioxidative Behandlung mit inhaliertem Glutathion bei Patienten mit CF änderte jedoch eine Reihe von Parametern des oxidativen Stresses in der Lunge nicht. Die nachgewiesenen oxidativen Veränderungen der Surfactantproteine A und D können eine Rolle bei der Beeinträchtigung der unspezifischen, Collectin-vermittelten Immunabwehr in der Lunge spielen.

5 Zusammenfassung

Die bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit von 138 Kinder mit verschiedenen inflammatorischen Lungenerkrankungen wurde untersucht, um das Ausmaß des oxidativen Stresses in der Lunge zu bestimmen. Dazu wurde als Parameter der Proteinoxidation der Gehalt an Proteincarbonylen mittels sensitivem dot-Blot Assay gemessen. Der oxidative Stress war am höchsten in der Gruppe der CF-Patienten. Bei diesen Patienten bestanden direkte Zusammenhänge zwischen dem Ausmaß an Proteinoxidation und dem Gehalt an neutrophilen Granulozyten in der BAL sowie eine umgekehrte Proportionalität zwischen Lungenfunktion und Proteinoxidation. Mit Hilfe der 2-D- Elektrophorese wurde das Verteilungsmuster und die Empfindlichkeit verschiedener Proteine in Proben mit unterschiedlichem Oxidationsgrad bestimmt. Während die Plasmaproteine in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit wie z.B. Albumin und Transferrin gegenüber einer Oxidation besonders sensitiv waren, fanden sich bei SP-D keine Zeichen der Oxidation der Primärkette. Im Gegensatz dazu war SP-A relativ empfindlich gegenüber oxidativem Stress. Der Einfluss einer antioxidativen Therapie mit inhalativem Glutathion wurde bei CF-Patienten durch Bestimmung der Proteincarbonyle, Proteinthiole und Lipidhydroperoxyde in der BALF vor und nach der therapeutischer Intervention untersucht. Es ließ sich kein Einfluss des inhalierten GSH auf die untersuchten Parameter feststellen.

Auch wenn die Primärkette von SP-D sehr resistent gegenüber oxidativen Einflüssen war, verursachten oxidative Einflüsse jedoch deutliche Veränderungen seiner makromolekularen Organisation. Es kam zur Depolimerisation der durch Disulphidbrücken gestützten Struktur von SP-D. So geschädigtes SP-D hatte wesentliche funktionelle Eigenschaften verloren und vermochte Bakterien nicht mehr zu agglutinieren.

Lokaler oxidativer Stress spielt bei verschiedenen Lungenerkrankungen im Kindersalter eine wichtige Rolle und ist besonders ausgeprägt bei einer chronischen, neutrophilen Inflammationsreaktion. Gezielte erfolgreiche therapeutische Interventionen sind derzeit nicht einfach zu realisieren.

Summary

Bronchoalveolar lavage (BAL) liquid of 138 children with different inflammatory lung diseases was examined to determine the magnitude of the oxidative stress in the lungs. The content of protein carbonyls was measured by means of a sensitive dot-blot assay as a parameter of protein oxidation. The oxidative stress was highest in the group of the patients with cystic fibrosis (CF). In these patients direct correlations existed between the magnitude of protein oxidation and the content of neutrophil granulocytes in the BAL as well as a reverse proportionality between lung function and protein oxidation. The pattern of distribution and the sensitivity of different proteins to oxidation were determined in samples with different degree of oxidation by means of the 2-D-electrophoresis. Plasma proteins present in BAL fluid, e.g. albumin and transferrin, were especially sensitive to oxidation. Oxidation of the SP-D primary chain was achieved only by relatively strong oxidation in vitro. In contrast to SP-D, SP-A was very sensitive to the oxidative stress. The influence of antioxidative therapy with inhaled glutathione was examined in CF patients by measurement of protein carbonyls, protein thiols and lipid hydroperoxyds in BAL fluid before and after the therapeutic intervention. GSH inhaled for two weeks had no effect on the parameters assessed. Even if the primary chain of SP-D was very resistant towards oxidative influences, oxidation caused nevertheless clear changes of the macromolecular organization of SP-D. It led to the depolymerisation of the SP-D structure which is usually supported by disulfid bridges. SP-D damaged in this way had lost essential functional properties and was no more capable to agglutinate bacteria. Local oxidative stress plays an important role in different lung diseases in childhood and is especially pronounced in the presence of chronic, neutrophilic inflammation. Successful specific therapeutic interventions are nowadays not easily realized.

6 Literaturverzeichnis

1. Berlett, B. S. and E. R. Stadtman. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J.Biol.Chem.* 1997; 272:33-20316.
2. Inoue, M., E. F. Sato, M. Nishikawa, A. M. Park, Y. Kira, I. Imada, and K. Utsumi. 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr.Med Chem.* 10:2495-2505.
3. Raha, S. and B. H. Robinson. 2001. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *Am J Med Genet.* 106:62-70.
4. Liu, Y., G. Fiskum, and D. Schubert. 2002. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem.* 80:780-787.
5. Raha, S. and B. H. Robinson. 2000. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem.Sci.* 25:502-508.
6. Stadtman, E. R. and R. L. Levine. 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino.Acids* 25:207-218.
7. Dalle-Donne, I., R. Rossi, D. Giustarini, A. Milzani, and R. Colombo. 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin.Chim.Acta* 329:23-38.
8. Requena, J. R., C. C. Chao, R. L. Levine, and E. R. Stadtman. Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001; 98:1-74.
9. Dalle, D., I. D. Giustarini, R. Colombo, R. Rossi, and A. Milzani. Protein carbonylation in human diseases. *Trends mol.med.* 2003; 9:4-176.
10. Dean, R. T., S. Fu, R. Stocker, and M. J. Davies. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem.J.* 1997 May 15; 324:-18.
11. Fierro, I. M., V. Nascimento-DaSilva, M. A. Arruda, M. S. Freitas, M. C. Plotkowski, F. Q. Cunha, and C. Barja-Fidalgo. 1999. Induction of NOS in rat blood PMN in vivo and in vitro: modulation by tyrosine kinase and involvement in bactericidal activity. *J Leukoc.Biol.* 65:508-514.

12. Ischiropoulos, H., L. Zhu, and J. S. Beckman. 1992. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch.Biochem.Biophys.* 298:446-451.
13. David-Dufilho, M., A. Brunet, C. Privat, and M. A. Devynck. 2001. Analysis of agonist-evoked nitric oxide release from human endothelial cells: role of superoxide anion. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 28:1015-1019.
14. Cochrane, C. G., R. Spragg, and S. D. Revak. 1983. Pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome. Evidence of oxidant activity in bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin.Invest* 71:754-761.
15. Sittipunt, C., K. P. Steinberg, J. T. Ruzinski, C. Myles, S. Zhu, R. B. Goodman, L. D. Hudson, S. Matalon, and T. R. Martin. 2001. Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 163:503-510.
16. Tracey, W. R., C. Xue, V. Klinghofer, J. Barlow, J. S. Pollock, U. Forstermann, and R. A. Johns. 1994. Immunochemical detection of inducible NO synthase in human lung. *Am J Physiol* 266:L722-L727.
17. Moodley, Y. P., R. Chetty, and U. G. Lalloo. 1999. Nitric oxide levels in exhaled air and inducible nitric oxide synthase immunolocalization in pulmonary sarcoidosis. *Eur.Respir J* 14:822-827.
18. Van der Vliet, A., N. Nguyen Mai, M. Shigenaga, J. P. Eiserich, G. P. Marelich, and C. E. Cross. 2000. Myeloperoxidase and protein oxidation in cystic fibrosis. *Am.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol.* 279:L537-L546.
19. Linnane, S. J., V. M. Keatings, C. M. Costello, J. B. Moynihan, C. M. O'Connor, M. X. Fitzgerald, and P. McLoughlin. Total sputum nitrate plus nitrite is raised during acute pulmonary infection in cystic fibrosis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1998; 158:1-212.
20. Li, N. and M. Karin. Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? *FASEB J.* 1999; 13:10-1143.
21. Armstrong D.S., Grimwood K., Carlin J.B., Carzino R., Gutiérrez J.P., Hull J., Olinsky A., Phelan E.M., C. Robertson, and P. Phelan. 1997. Lower airway

- inflammation in infants and young children with cystic fibrosis. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 156:1197-1204.
22. Kharazmi, A., C. Rechnitzer, P. O. Schiotz, T. Jensen, L. Baek, and N. Hoiby. Priming of neutrophils for enhanced oxidative burst by sputum from cystic fibrosis patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Eur.J.Clin.Invest* 1987 Jun; 17:3-61.
 23. Cantin, A. M., S. L. North, R. C. Hubbard, and Crystal R.G. 1987. Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J Appl Physiol.* 63:152-157.
 24. Roum, J., R. Buhl, N. McElvaney, Z. Borok, and R. G. Crystal. 1993. Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. *J.Appl.Physiol.* 75:2419-2424.
 25. Brown, R. K., H. Wyatt, J. F. Price, and F. J. Kelly. Pulmonary dysfunction in cystic fibrosis is associated with oxidative stress. *Eur.Respir.J.* 1996; 9:2-339.
 26. Velsor, L. W., A. Van Heeckeren, and B. J. Day. 2001. Antioxidant imbalance in the lungs of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein mutant mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281:L31-L38.
 27. McGrath, L. T., P. Mallon, L. Dowey, B. Silke, E. McClean, M. McDonnell, A. Devine, S. Copeland, and S. Elborn. Oxidative stress during acute respiratory exacerbations in cystic fibrosis. *Thorax* 1999 Jun; 54:6-23.
 28. Gao, L., K. Kim, J. Yankaskas, and H. Forman. 1999. Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia. *Am.J.Physiol.* 277:L113-L118.
 29. Griese, M. 1992. Lungensurfactant und Immunsystem. *Monatsschr.Kinderhkd.* 140:57-61.
 30. Griese, M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur.Respir.J.* 1999 Jun; 13:6-76.
 31. Lawson, P. R. and K. B. M. Reid. 2000. The roles of surfactant proteins A and D in innate immunity. *Immunol.Rev.* 2000; 173: 66-78:-Reviews.
 32. Haagsman, H. P. and R. V. Diemel. Surfactant-associated proteins: functions and structural variation. *Comp Biochem.Physiol A Mol.Integr.Physiol* 2001 May; 129:1-108.

33. Crouch, E. 1998. Collectins and pulmonary host defense. *Am.J.Resp.Cell Mol.Biol.* 19:177-210.
34. Crouch, E. and J. R. Wright. 2001. Surfactant proteins A and D and pulmonary host defense. *Annu.Rev.Physiol.* 2001; 63: 521-554:Review
35. Mason, R., K. Greene, and D. R. Voelker. 1998. Surfactant protein A and surfactant protein D in health and disease. *Am.J.Physiol.* 275:L1-L13.
36. Haagsman, H. P. and R. V. Diemel. Surfactant-associated proteins: functions and structural variation. *Comp Biochem.Physiol A Mol.Integr.Physiol* 2001 May; 129:1-108.
37. Mason, R. J., L. D. Nielsen, Y. Kuroki, E. Matsuura, J. H. Freed, and J. M. Shannon. 1998. A 50-kDa variant form of human surfactant protein D. *Eur Respir J* 12:1147-1155.
38. Brown-Augsburger, P., D. Chang, K. Rust, and E. C. Crouch. 1996. Biosynthesis of surfactant protein D. Contributions of conserved NH₂-terminal cysteine residues and collagen helix formation to assembly and secretion. *J Biol.chem.* 271:18912-18919.
39. Crouch, E., K. Rust, R. Veile, H. Donis-Keller, and L. Grosso. Genomic organization of human surfactant protein D (SP-D). SP-D is encoded on chromosome 10q22.2-23.1. *J.Biol.Chem.* 1993 Feb 5; 268:4-83.
40. Kolble, K. and K. B. Reid. The genomics of soluble proteins with collagenous domains: C1q, MBL, SP-A, SP-D, conglutinin, and CL-43. *Behring Inst.Mitt.* 1993 Dec;93-96.
41. McCormick, S. M., V. Boggaram, and C. R. Mendelson. Characterization of mRNA transcripts and organization of human SP-A1 and SP-A2 genes. *Am.J.Physiol* 1994 Apr; 266:4-66.
42. Floros, J., S. DiAngelo, M. Koptides, A. M. Karinch, P. K. Rogan, H. Nielsen, R. G. Spragg, K. Watterberg, and G. Deiter. Human SP-A locus: allele frequencies and linkage disequilibrium between the two surfactant protein A genes. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1996 Oct; 15:4-98.

43. Crouch, E., D. Parghi, S. F. Kuan, and A. Persson. Surfactant protein D: subcellular localization in nonciliated bronchiolar epithelial cells. *Am.J.Physiol* 1992 Jul; 263:1-6.
44. Voorhout, W. F., T. Veenendaal, Y. Kuroki, Y. Ogasawara, L. M. van Golde, and H. J. Geuze. Immunocytochemical localization of surfactant protein D (SP-D) in type II cells, Clara cells, and alveolar macrophages of rat lung. *J.Histochem.Cytochem.* 1992 Oct; 40:10-97.
45. Kuroki, Y., M. Shiratori, Y. Ogasawara, A. Tsuzuki, and T. Akino. Characterization of pulmonary surfactant protein D: its copurification with lipids. *Biochim.Biophys.Acta* 1991 Nov 5; 1086:2-90.
46. Madsen, J., A. Kliem, I. Tornoe, K. Skjodt, C. Koch, and U. Holmskov. Localization of lung surfactant protein D on mucosal surfaces in human tissues. *J.Immunol.* 2000 Jun 1; 164:11-70.
47. van Rozendaal, B. A., L. M. van Golde, and H. P. Haagsman. Localization and functions of SP-A and SP-D at mucosal surfaces. *Pediatr.Pathol.Mol.Med.* 2001 Jul-Aug; 20:4-39.
48. McCormack, F. X. and J. A. Whitsett. The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. *J.Clin.Invest* 2002 Mar; 109:6-12.
49. Haagsman, H. P. 264. Interactions of surfactant protein A with pathogens. *Biochim.Biophys.Acta* 1998 Nov 19; 1408:2-3.
50. Reid, K. B. 290. Interactions of surfactant protein D with pathogens, allergens and phagocytes. *Biochim.Biophys.Acta* 1998 Nov 19; 1408:2-3.
51. Vaandrager, A. B. and L. M. G. Van Golde. Lung surfactant proteins A and D in innate immune defense. *Biol.Neonate.* 2000; 77:Suppl-13.
52. Hartshorn, K. L., E. Crouch, M. R. White, M. L. Colamussi, A. Kakkanatt, B. Tauber, V. Shepherd, and K. N. Sastry. 958. Pulmonary surfactant proteins A and D enhance neutrophil uptake of bacteria. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 1998; 274:6.
53. Wright, J. R. Immunomodulatory functions of surfactant. *Semin.Respir.Crit Care Med.* 1995; 16:1-68.

54. Vaandrager, A. B. and L. M. G. Van Golde. Lung surfactant proteins A and D in innate immune defense. *Biol.Neonate* 2000; 77:Suppl-13.
55. Hickman-Davis, J. M., F. C. Fang, C. Nathan, V. L. Shepherd, D. R. Voelker, and J. R. Wright. 517. Lung surfactant and reactive oxygen-nitrogen species: Antimicrobial activity and host-pathogen interactions. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2001; 281:3.
56. Blau, H., S. Riklis, J. F. Van Iwaarden, F. X. McCormack, and M. Kalina. 1198. Nitric oxide production by rat alveolar macrophages can be modulated in vitro by surfactant protein A. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 1997; 272:6.
57. Borron, P., F. X. McCormack, B. M. Elhalwagi, Z. C. Chroneos, J. F. Lewis, S. Zhu, J. R. Wright, V. L. Shepherd, F. Possmayer, K. Inchley, and L. J. Fraher. Surfactant protein A inhibits T cell proliferation via its collagen-like tail and a 210-kDa receptor. *Am.J.Physiol* 1998 Oct; 275:4-86.
58. Borron, P. J., E. C. Crouch, J. F. Lewis, J. R. Wright, F. Possmayer, and L. J. Fraher. Recombinant rat surfactant-associated protein D inhibits human T lymphocyte proliferation and IL-2 production. *J.Immunol.* 1998; 161:9-4603.
59. Korfhagen, T. R., A. M. LeVine, and J. A. Whitsett. 296. Surfactant protein A (SP-A) gene targeted mice. *Biochim.Biophys.Acta Mol.Basis.Dis.* 1998; 1408:2-3.
60. LeVine, A. M., M. D. Bruno, K. M. Huelsman, G. F. Ross, J. A. Whitsett, and T. R. Korfhagen. Surfactant protein A-deficient mice are susceptible to group B streptococcal infection. *J.Immunol.* 1997 May 1; 158:9-40.
61. Korfhagen, T. R., M. D. Bruno, G. F. Ross, K. M. Huelsman, M. Ikegami, A. H. Jobe, S. E. Wert, B. R. Stripp, R. E. Morris, S. W. Glasser, C. J. Bachurski, H. S. Iwamoto, and J. A. Whitsett. Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996 Sep 3; 93:18-19.
62. Botas, C., F. Poulain, J. Akiyama, C. Brown, L. Allen, J. Goerke, J. Clements, E. Carlson, A. M. Gillespie, C. Epstein, and S. Hawgood. Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998; 95:20-11874.

63. Ikegami, M., T. R. Korfhagen, J. A. Whitsett, M. D. Bruno, S. E. Wert, K. Wada, and A. H. Jobe. 247. Characteristics of surfactant from SP-A-deficient mice. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 1998; 275:2.
64. Wert, S. E., M. Yoshida, A. M. LeVine, M. Ikegami, T. Jones, G. F. Ross, J. H. Fisher, T. R. Korfhagen, and J. A. Whitsett. Increased metalloproteinase activity, oxidant production, and emphysema in surfactant protein D gene-inactivated mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000; 97:11-5977.
65. Yoshida, M., T. R. Korfhagen, and J. A. Whitsett. Surfactant protein D regulates NF-kappa B and matrix metalloproteinase production in alveolar macrophages via oxidant-sensitive pathways. *J.Immunol.* 2001 Jun 15; 166:12-19.
66. Bridges, J. P., H. W. Davis, M. Damodarasamy, Y. Kuroki, G. Howles, D. Y. Hui, and F. X. McCormack. Pulmonary surfactant proteins A and D are potent endogenous inhibitors of lipid peroxidation and oxidative cellular injury. *J.Biol.Chem.* 2000 Dec 8; 275:49-55.
67. McCormack, F. X. and J. A. Whitsett. The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. *J.Clin.Invest* 2002 Mar; 109:6-12.
68. V.Chernik, T. F. B. & E. K. 1998. *Disorders of the Respiratory Tract in Children* , 6th ed. Philadelphia: Saunders.
69. Robinson, C. E., A. Keshavarzian, D. S. Pasco, T. O. Frommel, D. H. Winship, and E. W. Holmes. 1999. Determination of protein carbonyl groups by immunoblotting. *Anal.Biochem.* 266:48-57.
70. Strong, P., U. Kishore, C. Morgan, B. A. Lopez, M. Singh, and K. B. Reid. 1998. A novel method of purifying lung surfactant proteins A and D from the lung lavage of alveolar proteinosis patients and from pooled amniotic fluid. *J Immunol Methods* 220:139-149.
71. Conrad, C. C., J. Choi, C. A. Malakowsky, J. M. Talent, R. Dai, P. Marshall, and R. W. Gracy. 2001. Identification of protein carbonyls after two-dimensional electrophoresis. *Proteomics.* 1:829-834.

72. Bufler, P., B. Schmidt, D. Schikor, A. Bauernfeind, E. C. Crouch, and M. Griese. 2003. Surfactant protein A and D differently regulate the immune response to nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* and its lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol.Biol.* 28:249-256.
73. Comhair, S. A. and S. C. Erzurum. 2002. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 283:L246-L255.
74. Doelman, C. J. and A. Bast. 1990. Oxygen radicals in lung pathology. *Free Radic.Biol.Med* 9:381-400.
75. Wright, D. T., L. A. Cohn, H. Li, B. Fischer, C. M. Li, and K. B. Adler. 1994. Interactions of oxygen radicals with airway epithelium. *Environ.Health Perspect.* 102 Suppl 10:85-90.:85-90.
76. Van der Vliet and C. E. Cross. 2000. Oxidants, nitrosants, and the lung. *Am J Med* 109:398-421.
77. Koller, D. Y., R. Urbanek, and M. Gotz. Increased degranulation of eosinophil and neutrophil granulocytes in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 Aug; 152:2-33.
78. Doring, G. and D. Worlitzsch. Inflammation in cystic fibrosis and its management. *Paediatr.Respir Rev.* 2000 Jun; 1:2-6.
79. Berlett, B. S. and E. R. Stadtman. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol.Chem.* 1997; 272:33-20316.
80. Stadtman, E. R. Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radic.Biol.Med* 2002 Sep 1; 33:5-604.
81. Linton, S., M. J. Davies, and R. T. Dean. Protein oxidation and ageing. *Exp.Gerontol.* 2001; 36:9-1518.
82. Cantin, A. M., S. L. North, G. A. Fells, R. C. Hubbard, and R. G. Crystal. Oxidant-mediated epithelial cell injury in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin.Invest* 1987 Jun; 79:6-73.

83. Montaldo, C., E. Cannas, M. Ledda, L. Rosetti, L. Congiu, and L. Atzori. Bronchoalveolar glutathione and nitrite/nitrate in idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *Sarcoidosis.Vasc.Diffuse.Lung Dis.* 2002 Mar; 19:1-8.
84. Lenz, A. G., U. Costabel, and K. L. Maier. Oxidized BAL fluid proteins in patients with interstitial lung diseases. *Eur.Respir J* 1996 Feb; 9:2-12.
85. Obayashi, Y., I. Yamadori, J. Fujita, T. Yoshinouchi, N. Ueda, and J. Takahara. The role of neutrophils in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 1997; 112:5-1343.
86. Maier, K. L., L. Leuschel, and U. Costabel. 1992. Increased oxidized methionine residues in BAL fluid proteins in acute or chronic bronchitis. *Eur.Respir J* 5:651-658.
87. Foreman, R. C., P. F. Mercer, C. Kroegel, and J. A. Warner. 1999. Role of the eosinophil in protein oxidation in asthma: possible effects on proteinase/antiproteinase balance. *Int.Arch.Allergy Immunol* 118:183-186.
88. Schock, B. C., I. S. Young, V. Brown, P. S. Fitch, R. Taylor, M. D. Shields, and M. Ennis. Antioxidants and protein carbonyls in bronchoalveolar lavage fluid of children: normal data. *Pediatr.Res.* 2001 Feb; 49:2-61.
89. Schock, B. C., I. S. Young, V. Brown, P. S. Fitch, M. D. Shields, and M. Ennis. 2003. Antioxidants and oxidative stress in BAL fluid of atopic asthmatic children. *Pediatr Res.* 53:375-381.
90. Kormoczi, G. F., U. M. Wolfel, A. R. Rosenkranz, W. H. Horl, R. Oberbauer, and G. J. Zlabinger. Serum proteins modified by neutrophil-derived oxidants as mediators of neutrophil stimulation. *J Immunol* 2001 Jul 1; 167:1-60.
91. Desrochers, P. E., K. Mookhtiar, H. E. Van Wart, K. A. Hasty, and S. J. Weiss. 1992. Proteolytic inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor and alpha 1-antichymotrypsin by oxidatively activated human neutrophil metalloproteinases. *J Biol.Chem.* 267:5005-5012.
92. Wu, S. M., D. D. Patel, and S. V. Pizzo. Oxidized alpha2-macroglobulin (alpha2M) differentially regulates receptor binding by cytokines/growth factors: implications for

- tissue injury and repair mechanisms in inflammation. *J Immunol* 1998 Oct 15; 161:8-65.
93. Delacourt, C. 2003. [Inflammation and cystic fibrosis]. *Arch.Pediatr* 10 Suppl 2:338s-341s.:338s-341s.
 94. Gibson, R. L., J. L. Burns, and B. W. Ramsey. 2003. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168:918-951.
 95. Karp, C. L., L. M. Flick, K. W. Park, S. Softic, T. M. Greer, R. Keledjian, R. Yang, J. Uddin, W. B. Guggino, S. F. Atabani, Y. Belkaid, Y. Xu, J. A. Whitsett, F. J. Accurso, M. Wills-Karp, and N. A. Petasis. 2004. Defective lipoxin-mediated anti-inflammatory activity in the cystic fibrosis airway. *Nat.Immunol* 5:388-392.
 96. Witko-Sarsat, V., C. Delacourt, D. Rabier, J. Bardet, A. T. Nguyen, and B. Descamps-Latscha. 1995. Neutrophil-derived long-lived oxidants in cystic fibrosis sputum. *Am J Resp Crit Care Med* 152:1910-1916.
 97. Bonfield, T. L. 1995. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Resp Crit Care Med* 152:2111-2118.
 98. Brown, R. K., A. McBurney, J. Lunec, and F. J. Kelly. 1995. Oxidative damage to DNA in patients with cystic fibrosis. *Free Rad.Bio.Med.* 18:801-806.
 99. Van der Vliet, A., J. Eiserich, G. Marelich, B. Halliwell, and C. Cross. 1997. Oxidative stress in cystic fibrosis: does it occur and does it matter? *Adv.Pharmacol.* 38:491-513.
 100. Day, B. J., A. M. van Heeckeren, E. Min, and L. W. Velsor. 2004. Role for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein in a glutathione response to bronchopulmonary pseudomonas infection. *Infect.Immun.* 72:2045-2051.
 101. Roum, J. H., Z. Borok, N. G. McElvaney, G. J. Grimes, A. D. Bokser, R. Buhl, and R. G. Crystal. 1999. Glutathione aerosol suppresses lung epithelial surface inflammatory cell-derived oxidants in cystic fibrosis. *J Appl Physiol.* 87:438-443.

102. Range, S. P., C. Dunster, A. J. Knox, and F. J. Kelly. Treatment of pulmonary exacerbations of cystic fibrosis leads to improved antioxidant status. *Eur.Respir.J.* 1999 Mar; 13:3-4.
103. Rust, P., I. Eichler, S. Renner, and I. Elmadfa. Effects of long-term oral beta-carotene supplementation on lipid peroxidation in patients with cystic fibrosis. *Int.J.Vitam.Nutr.Res.* 1998; 68:2-7.
104. Wood, L. G., D. A. Fitzgerald, P. G. Gibson, D. M. Cooper, and M. L. Garg. Increased plasma fatty acid concentrations after respiratory exacerbations are associated with elevated oxidative stress in cystic fibrosis patients. *Am.J.Clin.Nutr.* 2002 Apr; 75:4-75.
105. Putman, E., L. M. van Golde, and H. P. Haagsman. 1997. Toxic oxidant species and their impact on the pulmonary surfactant system. *Lung* 175:75-103.
106. Uhlson, C., K. Harrison, C. B. Allen, S. Ahmad, C. W. White, and R. C. Murphy. 2002. Oxidized phospholipids derived from ozone-treated lung surfactant extract reduce macrophage and epithelial cell viability. *Chem.Res.Toxicol.* 15:896-906.
107. Wang, G., T. M. Umstead, D. S. Phelps, H. Al Mondhiry, and J. Floros. 2002. The effect of ozone exposure on the ability of human surfactant protein a variants to stimulate cytokine production. *Environ.Health Perspect.* 110:79-84.
108. Muller, B., P. Barth, and P. von Wichert. 1992. Structural and functional impairment of surfactant protein A after exposure to nitrogen dioxide in rats. *Am J Physiol* 263:L177-L184.
109. Davis, I. C., S. Zhu, J. B. Sampson, J. P. Crow, and S. Matalon. 2002. Inhibition of human surfactant protein A function by oxidation intermediates of nitrite. *Free Radic.Biol.Med* 33:1703-1713.
110. Kuzmenko, A. I., H. Wu, J. P. Bridges, and F. X. McCormack. 2004. Surfactant protein oxidation: surfactant lipid peroxidation damages surfactant protein A (SP-A) and inhibits interactions with phospholipid vesicles. *J Lipid Res.* (in press)
111. Su, W. Y. and T. Gordon. 1996. Alterations in surfactant protein A after acute exposure to ozone. *J Appl.Physiol* 80:1560-1567.

112. Wang, G., T. M. Umstead, D. S. Phelps, H. Al Mondhiry, and J. Floros. 2002. The effect of ozone exposure on the ability of human surfactant protein a variants to stimulate cytokine production. *Environ.Health Perspect.* 110:79-84.
113. Huang, W., G. Wang, D. S. Phelps, H. Al Mondhiry, and J. Floros. 2004. Human SP-A genetic variants and bleomycin-induced cytokine production by THP-1 cells: effect of ozone-induced SP-A oxidation. *Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 286:L546-L553.
114. Baker, C. S., T. W. Evans, B. J. Randle, and P. L. Haslam. Damage to surfactant-specific protein in acute respiratory distress syndrome. *Lancet* 1999 Apr 10; 353:9160-9167.
115. Bridges, J. P., H. W. Davis, M. Damodarasamy, Y. Kuroki, G. Howles, D. Y. Hui, and F. X. McCormack. Pulmonary surfactant proteins A and D are potent endogenous inhibitors of lipid peroxidation and oxidative cellular injury. *J Biol.Chem.* 2000 Dec 8; 275:49-55.
116. Griese, M., N. Maderlechner, P. Ahrens, and R. Kitz. Surfactant proteins A and D in children with pulmonary disease due to gastroesophageal reflux. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 Jun 1; 165:11-50.
117. Stuart, G. R., R. B. Sim, and R. Malhotra. Characterization of radioiodinated lung surfactant protein A (SP-A) and the effects of oxidation on SP-A quaternary structure and activity. *Exp.Lung Res.* 1996 Jul-Aug; 22:4-87.
118. Griese, M., A. Wiesener, F. Lottspeich, and C. von Bredow. Limited proteolysis of surfactant protein D causes a loss of its calcium-dependent lectin functions. *Biochim.Biophys.Acta* 2003 Jul 14; 1638:2-63.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Matthias GRIESE für seine direkte und kollegiale Art der Betreuung meiner Doktorarbeit. Seine Ratschläge und sein persönliches Engagement trugen zum Gelingen meiner Arbeit entscheidend bei. Seine freundliche und überlegte Vorgehensweise half und hilft mir aus vielen frustrierenden Situationen heraus.

Herrn Prof. Dr. Dietrich Reinhardt möchte ich für die Möglichkeit der Durchführung meiner Arbeit im Labor für pädiatrische Pneumologie am Forschungszentrum Kubus des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München danken.

Bei meinen Mitdoktoranden Christian Paschen, Eva Bielecki, Maria Wassilewa, Oliver Tafel, Tobias Winter, Valerie Kirchberger und meinem Kollegen Dr. Markus Woischnik sowie unseren technischen Assistenten Frau Andrea Schams, Ivonne Wüst und Stefanie Gruschka möchte ich mich für die vielen netten Stunden im Labor und für Ihre Hilfestellungen bedanken.

Bei meiner Ehefrau Tetyana möchte ich mich ganz besonders für ihren Beistand und ihre Fürsorge bedanken.

Ich habe die deutsche Gastfreundschaft genossen und danke dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für die finanzielle Unterstützung während meines Aufenthaltes in Deutschland.

8 Anhang

Tabelle 1

Liste der CF-Patienten (komplett)

Patient	Geschlecht	BAL Datum	Alter (Jahre)	BMI (kg/m ²)	CFTR	FVC (% soll)	FEV1 (% soll)	MEF 25 (% soll)	MEF 75-25 (% soll)	Gesamt recovery (%)	Gesamtzellzahl (/ml BAL)	Neutrophile (/ml BAL)	Vitalität (%)	Makrophagen (%)	Lymphozyten (%)	Neutrophile (%)	Eosinophile (%)	Carbonyl (pmol/µg Protein)
CF-1	m	13.08.96	32,3	25,38	2789+5G-A	89,77	86,75	31,09	59,65	89,77	1E+06	951500	58	7,7	3,2	86,5	2,6	8,8
CF-2	f	29.10.96	27,6	20,32	G551D	118	104,34	39,03	61,58	118	2E+06	1319700	76	11,2	5,5	83	0,3	9,3
CF-3	m	27.03.97	18,8	19,74	DF508	103,86	85,44	28,64	42,92	103,86	190000	172900	70	9	0	91	0	9,3
CF-4	f	13.08.96	15,5	22,89	dF508/dF508	91,45	95,82	84,53	113,78	91,45	560000	286160	65	51,1	0,7	51,1	0,5	13
CF-5	m	14.06.98	14,0	14,98	dF508	72	63,45	20,85	36,7	72	1E+06	1118720	86	4	4	92	0	21
CF-6	m	01.03.99	12,3	14,82	DF508	66,77	75,9	59,96	97,96	66,77	16800	14280	72	12	3	85	0	6,6
CF-7	f	20.07.99	14,3	20,77	dF508/dF508	81,32	79,4	28,47	63,6	81,32	570000	530670	83	1,6	5,3	93,1	0	15
CF-8	m	24.02.98	9,9	16,43	KM 19-2/XV2-1	79,94	62,24	17,9	-	79,94	946000	321640	78	53,5	10,7	34	1	6,4
CF-9	f	19.01.00	14,1	16,17	df508	70,45	79,77	67,05	85,29	70,45	91400	71840,4	6	15,4	5,6	78,6	0,4	10
CF-10	f	26.01.00	16,3	20,88	DF 5808	82,85	84,89	39,07	65,03	82,85	66800	27722	21	39,8	6,5	41,5	12,2	3,4
CF-11	m	16.06.99	12,9	15,21	DF508	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	149000	40230	fehlt	72	0	27	0	12
CF-12	m	13.06.00	13,6	14,84	DF508	68	72,33	41,84	73,98	68	80000	fehlt	88	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	13
CF-13	f	28.09.99	14,0	16,94	dF508	87,62	78,26	28,3	50,38	87,62	1E+06	733164	75	31	4,6	64,2	0,2	16
CF-14	m	30.10.96	11,7	15,77	DF 508	92,26	93,63	53,96	70,12	92,26	970000	211460	78	75,3	2,9	21,8	0	12
CF-15	f	01.10.96	12,8	18,97	DF508	115,29	117,85	132,77	115,21	115,29	1E+06	fehlt	59	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	7,1
CF-16	f	14.07.98	17,4	23,15	dF508/dF508	86,9	89	64,72	97,29	86,9	3E+06	2504520	98	14,8	2,8	81	1,4	5,5
CF-17	m	11.08.98	17,1	18,13	fehlt	98,64	86,51	32,92	50,72	98,64	550000	463100	83	12,6	2,8	84,2	0,4	8,8
CF-18	f	23.06.99	13,7	20,79	DF 508	104,35	107,58	91,99	114,47	104,35	455000	382200	77	11	0	84	5	2,7
CF-19	m	07.09.99	8,5	17,59	dF508	113,54	111,1	63,87	90,02	113,54	5E+06	3338140	83	28,8	1,4	69,4	0,4	10
CF-20	f	03.03.98	13,8	18,33	dF508	99,76	109,18	117,15	142,1	99,76	622000	323440	84	47	0,7	52	0,2	6,6
CF-21	f	24.03.97	13,9	20,45	DF 508	126,43	110,81	33,55	59,32	126,43	144000	118080	fehlt	8	4	82	5	5,5
CF-22	f	17.07.00	7,7	14,76	DF508	79,87	85,48	69,9	87,24	79,87	21600	12528	fehlt	25	2	58	15	11
CF-23	m	13.01.99	11,0	13,97	DF508	87,79	81,78	35,39	50,53	87,79	2500	20	33	95,7	3,5	0,8	fehlt	8,1
CF-24	m	23.04.97	11,9	18,43	DF 508	98,49	88,08	49,87	57,84	98,49	400	1,2	60	66	39,1	0,3	0	0
CF-25	m	30.04.97	9,3	15,61	DF 508	95,22	110,7	84,86	106,7	95,22	1600	24	68	82,5	13	1,5	0,3	0
CF-26	f	02.06.98	9,6	15,15	dF508	96,67	93,08	39,48	71,24	96,67	29700	386,1	82	88,5	10,2	1,3	0	0
CF-27	m	02.06.98	21,7	33,60	unbekannt	98,61	101,4	72,64	94,27	98,61	128000	256	84	93,4	6,4	0,2	0	0
CF-28	m	14.09.99	18,1	22,10	dF508	117,47	125,26	112,18	115,67	117,47	81500	1956	88	86,6	11	2,4	0	0
CF-29	f	23.05.00	9,0	14,79	DF508	89,29	76,95	25,67	37,37	89,29	3400	51	75	96,5	2	1,5	fehlt	0
CF-30	m	03.09.96	15,1	23,18	dF508	127,34	124,98	92,91	100,12	127,34	26600	186,2	89	87,7	11,6	0,7	0	0,2
CF-31	m	01.10.96	11,1	15,83	dF508	102,37	104,44	68,85	94,97	102,37	37500	562,5	89	91,3	7,2	1,5	0	0,8
CF-32	m	01.10.96	20,0	33,02	unbekannt	96,2	98,92	77,44	91,36	96,2	64000	448	66	88,3	11	0,7	0	0

CF-33	m	20.05.97	5,2	14,61	dF508	100,3	100,47	99,97	99,76	100,3	22000	880	83	93	2	4	1	1,1
CF-34	f	31.01.97	15,5	17,72	DF 508	75,86	95,41	139,19	126,93	75,86	200	1,2	75	94,4	4,8	0,6	0,7	4,7
CF-35	f	23.04.97	17,1	21,77	DF508	127,5	122,74	76,38	92,23	127,5	3800	19	66	90	8,7	0,5	0,2	5,2
CF-36	m	14.05.97	13,1	15,55	R5553Xhetero	81,64	99,61	81,99	89,41	81,64	500	35	70	91	2	7	0	11
CF-37	f	06.09.00	13,1	16,97	DF508	87,66	91,02	63,68	84,72	87,66	7100	113,6	86	91	7,4	1,6	fehlt	3
CF-38	f	09.09.98	12,2	17,09	DF508	92,74	98,05	108,32	111,47	92,74	120000	1680	50	95	3,4	1,4	0,2	2,8
CF-39	f	07.08.01	17,1	16,34	dF508/dF508	61	52	20	28	61	380000	193800	79	39	9	51	fehlt	14,9
CF-40	m	07.08.01	15,5	15,27	dF508/dF508	59,7	52,9	15	26,3	59,7	4E+06	3835200	77	5	1	94	fehlt	17,5
CF-41	f	01.10.96	17,0	25,47	dF508/dF508	108	85	29,5	41,5	108	300000	129000	70	34,5	22	43	0,5	17,1
CF-42	f	26.11.01	36,4	19,88	dF508/dF508	65	53	17	23	65	5E+06	3776000	88	16	3	80	1	18,6
CF-43	m	10.09.01	19,1	19,79	dF508/dF508	85	70	24	34	85	1E+07	9350400	94	4	fehlt	96	fehlt	32,9
CF-44	m	30.01.01	35,5	22,02	R 347 P Q 493x	88,1	68,2	16,1	fehlt	88,1	5E+06	1580500	77	63	6	29	2	24,8
CF-45	m	27.11.01	36,7	22,93	dF508/dF508	107,3	108	66,6	fehlt	107,3	4E+06	1844600	84	45	8	46	1	9,7
CF-46	m	19.11.01	24,1	18,77	dF508/dF508	77,8	56,8	16,8	fehlt	77,8	4E+06	3002000	75	10	6	79	4	19,7
CF-47	m	29.10.01	21,7	18,83	dF508/-	88,9	88,7	26,4	61,2	88,9	2E+06	fehlt	88	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	15,6
CF-48	f	05.11.01	18,0	19,57	dF508/dF508	83,4	82,5	26,9	50,3	83,4	2E+06	fehlt	57	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	13,3
CF-49	f	14.01.01	26,8	22,64	dF508/-	81,3	80,2	42,9	59,6	81,3	3E+06	1852500	68	28	4	65	3	14,8
CF-50	m	18.02.02	16,8	20,44	dF508/-	114,5	92,9	49,2	56,2	114,5	60000	fehlt	70	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	12,3
CF-51	f	18.02.02	21,9	20,23	dF508/-	112	90,5	39,7	52,7	112	174000	fehlt	45	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	13,2
CF-52	m	25.02.02	29,5	22,79	R553/-	60,8	53,9	4,2	14,4	60,8	700000	581000	29	10	4	83	3	12,3
CF-53	f	-	18,0	23,42	dF508/dF508	66,6	65,3	30,5	44	66,6	1E+06	746200	28	47	1	52	fehlt	-
CF-54	m	19.10.01	19,4	fehlt	dF508/-	60	36	7	9	60	100000	1000	47	97	2	1	2	17,5
CF-55	f	-	21,0	fehlt	dF508/dF508	76	55	20	28	76	1E+06	583000	81	36	10	53	1	-

Mit grauer Farbe sind die Patienten bezeichnet, von welchen Proben 2-D-Gele gemacht wurden

Tabelle 2: CF-Patienten, eingeteilt nach FEV₁

Patient	Geschlecht	BAL Datum	Alter (Jahre)	BMI (kg/m ²)	CFTR	FVC (% soll)	FEV1 (% soll)	MEF 25 (% soll)	MEF 75-25 (% soll)	Gesamt recovery (%)	Gesamtzellzahl (/ml BAL)	Neutrophile (ml BAL)	Vitalität Pool (%)	Makrophagen (%)	Lymphozyten (%)	Neutrophile (%)	Eosinophile (%)	Carbonyl (pmol/µg Protein)	
CF-Patienten mit FEV1<80%																			
CF-5	m	14.06.1998	14	14,98	df508	72	63,45	20,85	36,7	15	1216000	1118720	86	4	4	92	0	20,6	
CF-6	m	01.03.1999	12,3	14,82	DF508	66,77	75,9	59,96	97,96	fehlt	16800	14280	72	12	3	85	0	6,6	
CF-7	f	20.07.1999	14,3	20,77	df508/df508	81,32	79,4	28,47	63,6	22,1	570000	530670	83	1,6	5,3	93,1	0	15,2	
CF-8	m	24.02.1998	9,9	16,43	KM 19-2/XV2-1	79,94	62,24	17,9		71,8	946000	321640	78	53,5	10,7	34	1	6,4	
CF-9	f	19.01.2000	14,1	16,17	df508	70,45	79,77	67,05	85,29	58	91400	71840,4	6	15,4	5,6	78,6	0,4	10,3	
CF-12	m	13.06.2000	13,6	14,84	DF508	68	72,33	41,84	73,98	fehlt	80000	fehlt	88	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	12,8	
CF-13	f	28.09.1999	14	16,94	df508	87,62	78,26	28,3	50,38	77	1142000	733164	75	31	4,6	64,2	0,2	16	
CF-29	f	23.05.2000	9	14,79	DF508	89,29	76,95	25,67	37,37	64,2	3400	51	75	96,5	2	1,5	fehlt	0	
CF-39	f	07.08.2001	17,1	16,34	df508/df508	61	52	20	28	44	380000	193800	79	39	9	51	fehlt	14,9	
CF-40	m	07.08.2001	15,5	15,27	df508/df508	59,7	52,9	15	26,3	35	4080000	3835200	77	5	1	94	fehlt	17,5	
CF-42	f	26.11.2001	36,4	19,88	df508/df508	65	53	17	23	26	4720000	3776000	88	16	3	80	1	18,6	
CF-43	m	10.09.2001	19,1	19,79	df508/df508	85	70	24	34	14	9740000	9350400	94	4	fehlt	96	fehlt	32,9	
CF-44	m	30.01.2001	35,5	22,02	R 347 P Q 493x	88,1	68,2	16,1	fehlt	38	5450000	1580500	77	63	6	29	2	24,8	
CF-46	m	19.11.2001	24,1	18,77	df508/df508	77,8	56,8	16,8	fehlt	21	3800000	3002000	75	10	6	79	4	19,7	
CF-52	m	25.02.2002	29,5	22,79	R553/-	60,8	53,9	4,2	14,4	26	700000	581000	29	10	4	83	3	12,3	
CF-53	f	-	18,0	23,42	df508/df508	66,6	65,3	30,5	44	60	1435000	746200	28	47	1	52	fehlt	-	
CF-54	m	19.10.2001	19,4	fehlt	df508/-	60	36	7	9	61	100000	1000	47	97	2	1	2	17,5	
CF-55	f	-	21,0	fehlt	df508/df508	76	55	20	28	51	1100000	583000	81	36	10	53	1	-	
CF-Patienten mit FEV1>80%																			
CF-1	m	13.08.1996	32,3	25,38	2789+5G-A	89,77	86,75	31,09	59,65	39	1100000	951500	58	7,7	3,2	86,5	2,6	8,8	
CF-2	f	29.10.1996	27,6	20,32	G551D	118	104,34	39,03	61,58	48,1	1590000	1319700	76	11,2	5,5	83	0,3	9,27	
CF-3	m	27.03.1997	18,8	19,74	DF508	103,86	85,44	28,64	42,92	61,7	190000	172900	70	9	0	91	0	9,3	
CF-4	f	13.08.1996	15,5	22,89	df508/df508	91,45	95,82	84,53	113,78	65	560000	286160	65	51,1	0,7	51,1	0,5	13,4	
CF-10	f	26.01.2000	16,3	20,88	DF 5808	82,85	84,89	39,07	65,03	62,9	66800	27722	21	39,8	6,5	41,5	12,2	3,4	
CF-14	m	30.10.1996	11,7	15,77	DF 508	92,26	93,63	53,96	70,12	39,2	970000	211460	78	75,3	2,9	21,8	0	12,2	
CF-15	f	01.10.1996	12,8	18,97	DF508	115,29	117,85	132,77	115,21	fehlt	1080000	fehlt	59	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	7,1	

CF-16	f	14.07.1998	17,4	23,15	dF508/dF508	86,9	89	64,72	97,29	78,8	3092000	2504520	98	14,8	2,8	81	1,4	5,5
CF-17	m	11.08.1998	17,1	18,13	fehlt	98,64	86,51	32,92	50,72	66,7	550000	463100	83	12,6	2,8	84,2	0,4	8,8
CF-18	f	23.06.1999	13,7	20,79	DF 508	104,35	107,58	91,99	114,47	17	455000	382200	77	11	0	84	5	2,7
CF-19	m	07.09.1999	8,5	17,59	dF508	113,54	111,1	63,87	90,02	52,6	4810000	3338140	83	28,8	1,4	69,4	0,4	10,2
CF-20	f	03.03.1998	13,8	18,33	dF508	99,76	109,18	117,15	142,1	58	622000	323440	84	47	0,7	52	0,2	6,6
CF-21	f	24.03.1997	13,9	20,45	DF 508	126,43	110,81	33,55	59,32	11	144000	118080	fehlt	8	4	82	5	5,5
CF-22	f	17.07.2000	7,7	14,76	DF508	79,87	85,48	69,9	87,24	fehlt	21600	12528	fehlt	25	2	58	15	11,1
CF-23	m	13.01.1999	11	13,97	DF508	87,79	81,78	35,39	50,53	70	2500	20	33	95,7	3,5	0,8	fehlt	8,1
CF-24	m	23.04.1997	11,9	18,43	DF 508	98,49	88,08	49,87	57,84	81,3	400	1,2	60	66	39,1	0,3	0	0
CF-25	m	30.04.1997	9,3	15,61	DF 508	95,22	110,7	84,86	106,7	68,8	1600	24	68	82,5	13	1,5	0,3	0
CF-26	f	02.06.1998	9,6	15,15	dF508	96,67	93,08	39,48	71,24	57,5	29700	386,1	82	88,5	10,2	1,3	0	0
CF-27	m	02.06.1998	21,7	33,6	unbekannt	98,61	101,4	72,64	94,27	57	128000	256	84	93,4	6,4	0,2	0	0
CF-28	m	14.09.1999	18,1	22,1	dF508	117,47	125,26	112,18	115,67	44,5	81500	1956	88	86,6	11	2,4	0	0
CF-30	m	03.09.1996	15,1	23,18	dF508	127,34	124,98	92,91	100,12	34	26600	186,2	89	87,7	11,6	0,7	0	0,2
CF-31	m	01.10.1996	11,1	15,83	dF508	102,37	104,44	68,85	94,97	40	37500	562,5	89	91,3	7,2	1,5	0	0,8
CF-32	m	01.10.1996	20	33,02	unbekannt	96,2	98,92	77,44	91,36	7,5	64000	448	66	88,3	11	0,7	0	0
CF-33	m	20.05.1997	5,2	14,61	dF508	100,3	100,47	99,97	99,76	61,7	22000	880	83	93	2	4	1	1,1
CF-34	f	31.01.1997	15,5	17,72	DF 508	75,86	95,41	139,19	126,93	74,3	200	1,2	75	94,4	4,8	0,6	0,7	4,7
CF-35	f	23.04.1997	17,1	21,77	DF508	127,5	122,74	76,38	92,23	77	3800	19	66	90	8,7	0,5	0,2	5,2
CF-36	m	14.05.1997	13,1	15,55	R5553Xhetero	81,64	99,61	81,99	89,41	42,5	500	35	70	91	2	7	0	10,9
CF-37	f	06.09.2000	13,1	16,97	DF508	87,66	91,02	63,68	84,72	83	7100	113,6	86	91	7,4	1,6	fehlt	3
CF-38	f	09.09.1998	12,2	17,09	DF508	92,74	98,05	108,32	111,47	51	120000	1680	50	95	3,4	1,4	0,2	2,8
CF-41	f	01.10.96	17,0	25,47	dF508/dF508	108	85	29,5	41,5	32	300000	129000	70	34,5	22	43	0,5	17,1
CF-45	m	27.11.2001	36,7	22,93	dF508/dF508	107,3	108	66,6	fehlt	50	4010000	1844600	84	45	8	46	1	9,7
CF-47	m	29.10.2001	21,7	18,83	dF508/-	88,9	88,7	26,4	61,2	66	1660000	fehlt	88	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	15,6
CF-48	f	05.11.2001	18	19,57	dF508/dF508	83,4	82,5	26,9	50,3	57	1600000	fehlt	57	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	13,3
CF-49	f	14.01.2001	26,8	22,64	dF508/-	81,3	80,2	42,9	59,6	53	2850000	1852500	68	28	4	65	3	14,8
CF-50	m	18.02.2002	16,8	20,44	dF508/-	114,5	92,9	49,2	56,2	48	60000	fehlt	70	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	12,3
CF-51	f	18.02.2002	21,9	20,23	dF508/-	112	90,5	39,7	52,7	62	174000	fehlt	45	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	13,2

Tabelle 3: CF-Patienten, eingeteilt nach relativem Anteil der neutrophilen Granulozyten in BALF

Patient	Geschlecht	BAL Datum	Alter (Jahre)	BMI (kg/m ²)	CFTR	FVC (% soll)	FEV1 (% soll)	MEF 25 (% soll)	MEF 75-25 (% soll)	Gesamt recovery (%)	Gesamtzellzahl (/ml BAL)	Neutrophile (/ml BAL)	Vitalität Pool (%)	Makrophagen (%)	Lymphozyten (%)	Neutrophile (%)	Eosinophile (%)	Carbonyl (pmol/ μ g Protein)
CF-Patienten mit >10% Neutrophilen in BALF																		
CF-1	m	13.08.1996	32,3	25,38	2789+5G-A	89,77	86,75	31,09	59,65	39	1100000	951500	58	7,7	3,2	86,5	2,6	8,8
CF-2	f	29.10.1996	27,6	20,32	G551D	118	104,34	39,03	61,58	48,1	1590000	1319700	76	11,2	5,5	83	0,3	9,27
CF-3	m	27.03.1997	18,8	19,74	DF508	103,86	85,44	28,64	42,92	61,7	190000	172900	70	9	0	91	0	9,3
CF-4	f	13.08.1996	15,5	22,89	df508/df508	91,45	95,82	84,53	113,78	65	560000	286160	65	51,1	0,7	51,1	0,5	13,4
CF-5	m	14.06.1998	14	14,98	df508	72	63,45	20,85	36,7	15	1216000	1118720	86	4	4	92	0	20,6
CF-6	m	01.03.1999	12,3	14,82	DF508	66,77	75,9	59,96	97,96	fehlt	16800	14280	72	12	3	85	0	6,6
CF-7	f	20.07.1999	14,3	20,77	df508/df508	81,32	79,4	28,47	63,6	22,1	570000	530670	83	1,6	5,3	93,1	0	15,2
CF-8	m	24.02.1998	9,9	16,43	KM 19-2/XV2-1	79,94	62,24	17,9	-	71,8	946000	321640	78	53,5	10,7	34	1	6,4
CF-9	f	19.01.2000	14,1	16,17	df508	70,45	79,77	67,05	85,29	58	91400	71840,4	6	15,4	5,6	78,6	0,4	10,3
CF-10	f	26.01.2000	16,3	20,88	DF 5808	82,85	84,89	39,07	65,03	62,9	66800	27722	21	39,8	6,5	41,5	12,2	3,4
CF-11	m	16.06.1999	12,9	15,21	DF508	-	-	-	-	fehlt	149000	40230	fehlt	72	0	27	0	12
CF-13	f	28.09.1999	14	16,94	df508	87,62	78,26	28,3	50,38	77	1142000	733164	75	31	4,6	64,2	0,2	16
CF-14	m	30.10.1996	11,7	15,77	DF 508	92,26	93,63	53,96	70,12	39,2	970000	211460	78	75,3	2,9	21,8	0	12,2
CF-16	f	14.07.1998	17,4	23,15	df508/df508	86,9	89	64,72	97,29	78,8	3092000	2504520	98	14,8	2,8	81	1,4	5,5
CF-17	m	11.08.1998	17,1	18,13	fehlt	98,64	86,51	32,92	50,72	66,7	550000	463100	83	12,6	2,8	84,2	0,4	8,8
CF-18	f	23.06.1999	13,7	20,79	DF 508	104,35	107,58	91,99	114,47	17	455000	382200	77	11	0	84	5	2,7
CF-19	m	07.09.1999	8,5	17,59	df508	113,54	111,1	63,87	90,02	52,6	4810000	3338140	83	28,8	1,4	69,4	0,4	10,2
CF-20	f	03.03.1998	13,8	18,33	df508	99,76	109,18	117,15	142,1	58	622000	323440	84	47	0,7	52	0,2	6,6
CF-21	f	24.03.1997	13,9	20,45	DF 508	126,43	110,81	33,55	59,32	11	144000	118080	fehlt	8	4	82	5	5,5
CF-22	f	17.07.2000	7,7	14,76	DF508	79,87	85,48	69,9	87,24	fehlt	21600	12528	fehlt	25	2	58	15	11,1
CF-39	f	07.08.2001	17,1	16,34	df508/df508	61	52	20	28	44	380000	193800	79	39	9	51	fehlt	14,9
CF-40	m	07.08.2001	15,5	15,27	df508/df508	59,7	52,9	15	26,3	35	4080000	3835200	77	5	1	94	fehlt	17,5
CF-41	f	01.10.1996	17,0	25,47	df508/df508	108	85	29,5	41,5	32	300000	129000	70	34,5	22	43	0,5	17,1
CF-42	f	26.11.2001	36,4	19,88	df508/df508	65	53	17	23	26	4720000	3776000	88	16	3	80	1	18,6
CF-43	m	10.09.2001	19,1	19,79	df508/df508	85	70	24	34	14	9740000	9350400	94	4	fehlt	96	fehlt	32,9

CF-44	m	30.01.2001	35,5	22,02	R 347 P Q 493x	88,1	68,2	16,1	fehlt	38	5450000	1580500	77	63	6	29	2	24,8
CF-45	m	27.11.2001	36,7	22,93	dF508/dF508	107,3	108	66,6	fehlt	50	4010000	1844600	84	45	8	46	1	9,7
CF-46	m	19.11.2001	24,1	18,77	dF508/dF508	77,8	56,8	16,8	fehlt	21	3800000	3002000	75	10	6	79	4	19,7
CF-49	f	14.01.2001	26,8	22,64	dF508/-	81,3	80,2	42,9	59,6	53	2850000	1852500	68	28	4	65	3	14,8
CF-52	m	25.02.2002	29,5	22,79	R553/-	60,8	53,9	4,2	14,4	26	700000	581000	29	10	4	83	3	12,3
CF-53	f	-	18,0	23,42	dF508/dF508	66,6	65,3	30,5	44	60	1435000	746200	28	47	1	52	fehlt	-
CF-55	f	-	21,0	fehlt	dF508/dF508	76	55	20	28	51	1100000	583000	81	36	10	53	1	-
CF-Patienten mit <10% Neutrophilen in BALF																		
CF-23	m	13.01.1999	11	13,97	DF508	87,79	81,78	35,39	50,53	70	2500	20	33	95,7	3,5	0,8	fehlt	8,1
CF-24	m	23.04.1997	11,9	18,43	DF 508	98,49	88,08	49,87	57,84	81,3	400	1,2	60	66	39,1	0,3	0	0
CF-25	m	30.04.1997	9,3	15,61	DF 508	95,22	110,7	84,86	106,7	68,8	1600	24	68	82,5	13	1,5	0,3	0
CF-26	f	02.06.1998	9,6	15,15	dF508	96,67	93,08	39,48	71,24	57,5	29700	386,1	82	88,5	10,2	1,3	0	0
CF-27	m	02.06.1998	21,7	33,6	unbekannt	98,61	101,4	72,64	94,27	57	128000	256	84	93,4	6,4	0,2	0	0
CF-28	m	14.09.1999	18,1	22,1	dF508	117,47	125,26	112,18	115,67	44,5	81500	1956	88	86,6	11	2,4	0	0
CF-29	f	23.05.2000	9	14,79	DF508	89,29	76,95	25,67	37,37	64,2	3400	51	75	96,5	2	1,5	fehlt	0
CF-30	m	03.09.1996	15,1	23,18	dF508	127,34	124,98	92,91	100,12	34	26600	186,2	89	87,7	11,6	0,7	0	0,2
CF-31	m	01.10.1996	11,1	15,83	dF508	102,37	104,44	68,85	94,97	40	37500	562,5	89	91,3	7,2	1,5	0	0,8
CF-32	m	01.10.1996	20	33,02	unbekannt	96,2	98,92	77,44	91,36	7,5	64000	448	66	88,3	11	0,7	0	0
CF-33	m	20.05.1997	5,2	14,61	dF508	100,3	100,47	99,97	99,76	61,7	22000	880	83	93	2	4	1	1,1
CF-34	f	31.01.1997	15,5	17,72	DF 508	75,86	95,41	139,19	126,93	74,3	200	1,2	75	94,4	4,8	0,6	0,7	4,7
CF-35	f	23.04.1997	17,1	21,77	DF508	127,5	122,74	76,38	92,23	77	3800	19	66	90	8,7	0,5	0,2	5,2
CF-36	m	14.05.1997	13,1	15,55	R5553Xhetero	81,64	99,61	81,99	89,41	42,5	500	35	70	91	2	7	0	10,9
CF-37	f	06.09.2000	13,1	16,97	DF508	87,66	91,02	63,68	84,72	83	7100	113,6	86	91	7,4	1,6	fehlt	3
CF-38	f	09.09.1998	12,2	17,09	DF508	92,74	98,05	108,32	111,47	51	120000	1680	50	95	3,4	1,4	0,2	2,8

Tabelle 4: Patienten mit interstitieller Pneuminitis

Patient	Geschlecht	Alter (Jahre)	Lungenschädigung	Diagnose	BAL Datum	Recovery (%)	Gesamtzellzahl (/ml BAL)	Neutrophile (/ml BAL)	Zellvitalität (%)	Makrophagen (%)	Lymphozyten (%)	Neutrophile (%)	Eosinophile (%)	Mastzellen (%)	Plasmazellen (%)	Carbonyl (pmol/µg Protein)
I.P.-1	m	14,3	interstitiell	EAA	09.10.2000	47	580000	11600	98	63,0	34,0	2,0	2,0	0,0	0,0	0,0
I.P.-2	w	7,2	interstitiell	Unklare interstitielle Lungenerkrankung	17.07.1997	48	900000	36000	97	34,0	57,0	4,0	5,0	0,0	0,0	0,0
I.P.-3	m	13,8	interstitiell	Unklare interstitielle Lungenerkrankung	16.05.1997	fehlt	180000	7200	86	42,0	53,0	4,0	0,0	0,0	0,0	5,9
I.P.-4	m	13,2	interstitiell	Lungenhämorrhagien	02.08.2001	50	425000	140250	99	55,0	8,0	33,0	3,0	1,0	1,0	0,0
I.P.-5	m	9,7	interstitiell	Lungenhämorrhagien	13.09.2002	26	280000	8400	66	92,0	3,0	3,0	2,0	0,0	4,0	14,3
I.P.-6	m	8,3	interstitiell	rheumatische Erkrankung mit interst. pulmonaler Beteiligung	05.07.2000	23	375000	221250	84	26,0	10,0	59,0	2,0	1,0	2,0	32,2
I.P.-7	m	fehlt	interstitiell	Lungenhämosiderose	12.04.2002	26	950000	408500	92	18,0	2,0	43,0	6,0	0,0	0,0	10,0
I.P.-8	m	5,3	interstitiell	EAA	07.02.2001	73	620000	105400	90	41,0	36,0	17,0	2,0	1,0	3,0	12,1
I.P.-9	m	4,5	interstitiell	Sarkoidose	01.03.2001	40	875000	210000	85	45,0	28,0	24,0	3,0	1,0	0,0	11,1
I.P.-10	m	15,5	interstitiell	Lungenhämorrhagien	22.08.2002	38	500000	145000	58	63,0	2,0	29,0	6,0	1,0	0,0	2,0
I.P.-11	w	7,6	immunsupp	interstit. Pneumonie bei chronischer Granulomatose	25.04.2001	fehlt	590000	41300	84	62,0	43,0	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0
I.P.-12	m	12,2	int.Pneumonie	Ausschluß TBC	30.06.1997	40	9260000	92600	90	88,0	11,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabelle 5: Patienten mit Pneumonie

Patient	Geschlecht	Alter (Jahre)	Diagnose	Grund- erkrankung	BAL Datum	Recovery (%)	Gesamtzellzahl (/ml BAL)	Neutrophile (/ml BAL)	Zellvitalität (%)	Makrophagen (%)	Lymphozyten (%)	Neutrophile (%)	Eosinophile (%)	Mastzellen (%)	Plasmazellen (%)	Carbonyle (pmol/µg Protein)
P-1	w	6,0	Pneumonie	rez.Husten unklarer Genese	10.07.2000	52	55000	550	73	91,0	8,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
P-2	m	10,3	Pneumonie	AML	03.12.1997	fehlt	5300000	106000	70	68,0	30,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0
P-3	w	5,3	Pneumonie	Pneumonie	05.11.1997	53	3000000	90000		58,0	35,0	3,0	0,0	0,0	0,0	2,6
P-4	m	6,0	Pneumonie	Pneumonie	20.07.1998	45	250000	10000	100	52,0	44,0	4,0	0,0	0,0	0,0	13,6
P-5	m	8,7	Immunsuppression	AML	17.02.2000	81	35000	5600	85	64,0	10,0	16,0	0,0	0,0	0,0	0,0
P-6	m	2,8	Immunsuppression	AML	17.09.1997	23	150000	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	4,0
P-7	m	10,1	Immunsuppression	Granulozytendefekt	15.07.1999	75	880000	158400	43	75,0	2,0	18,0	5,0	0,0	0,0	0,0
P-8	m	4,6	Pneumonie	immunsupp	12.02.2001	40	190000	1330	92	92,2	5,7	0,7	1,0	0,2	0,0	10,0
P-9	w	5,9	Immunsuppression	Pneumocystis carinii- Pneumonie bei HIV	23.08.2002	36	330000	23100	83	28,0	5,0	7,0	2,0	1,0	4,0	4,8
P-10	m	1,0	Pneumonie	keine	20.01.1999	40	200000	38000	70	78,0	3,0	19,0	0,0	0,0	0,0	11,3
P-11	m	0,3	Pneumonie	keine	06.07.1998	56	330000	6600	90	75,0	23,0	2,0	0,0	0,0	0,0	4,3

Tabelle 6: Patienten mit Bronchitis

Patient	Geschlecht	BAL Datum	Alter (Jahre)	Diagnose	Recovery (%)	Gesamtzellzahl (/ml BAL)	Neutrophile (/ml BAL)	Zellvitalität (%)	Makrophagen (%)	Lymphozyten (%)	Neutrophile (%)	Eosinophile (%)	Mastzellen (%)	Plasmazellen (%)	Carbonyle (pmol/ μ g Protein)
B1	m	10.09.98	8,0	Bronchitis	fehlt	90000	900	73	92	7	1	0	0	0	0,0
B2	w	02.11.98	7,2	Bronchitis	41	180000	12600	70	63	30	7	0	0	0	0,0
B3	w	17.11.97	11,2	Bronchitis	58	70000	280	80	92	7	0	0	0	0	0,0
B4	m	02.07.98	5,3	Bronchitis	64	5800000	116000	90	80	16	2	2	0	0	0,0
B5	w	14.11.97	15,2	Bronchitis	50	65000	650	80	90	4	1	4	1	0	5,0
B6	m	30.10.97	2,5	Bronchitis	fehlt	2160000	216000	62	76	11	10	2	0	0	0,8
B7	w	06.02.02	7,2	rez. Bronchitiden	70	1144000	91520	76	83	6	8	2	1	0	2,6
B8	m	08.09.99	7,9	Bronchitis	67	65000	1300	85	88	10	2	0	0	0	0,6
B9	m	09.07.99	1,9	Bronchitis	49	265000	21200	69	79	10	8	3	0	0	0,0
B10	w	10.11.99	5,3	Bronchitis	70	55000	11000	100	66	14	20	0	0	0	0,0
B11	w	04.08.99	9,6	Bronchitis	72	55000	1100	82	85	12	2	1	0	0	8,0
B12	m	09.12.99	9,3	Bronchitis	42	812500	446875	82	31	10	55	4	0	0	13,0
B13	w	09.06.97	3,4	Bronchitis	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	0,7
B14	m	12.11.98	4,6	Bronchitis	87	145000	11600	90	81	11	8	0	0	0	0,4
B15	w	01.02.99	6,4	Bronchitis	85	150000	3000	50	82	16	2	0	0	0	0,0
B16	w	22.05.97	5,4	Bronchitis	fehlt	350000	24500	91	69	23	7	0	0	0	10,0
B17	m	05.06.97	2,0	Bronchitis	fehlt	290000	72500	92	53	20	25	1	0	0	3,5
B18	m	14.01.99	2,4	Bronchitis	77	155000	fehlt	90	94	6	0	0	0	0	1,8
B19	w	01.04.99	11,3	Bronchitis	70	150000	1500	87	95	5	1	0	0	0	0,6
B20	m	18.12.98	12,0	Bronchitis	59	480000	4800	66	95	4	1	0	0	0	0,0

Tabelle 7: Patienten mit Tracheostoma

Patient	Geschlecht	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)	TS-Dauer	Ursache für TS	Grund- erkrankung	BAL Datum	Recovery (%)	Gesamtzellzahl (/ml BAL)	Neutrophile (/ml BAL)	Zellviitalität (%)	Makrophage (%)	Lymphozyte (%)	Neutrophyle (%)	Eosinophile (%)	Basophyle (%)	Carbonyle (pmol/µg Protein)
T-1	w	4,5	11	4,5	Gaumenspalte	Pierre-Robin-Syndrom	23.01.1994	76	420000	8400	80	85	12	2	1	0	0,0
T-2	m	5,2	20	5,1	Laryngomalazie	Spina bifida, Hydrocephalus	14.01.1999	38	360000	3600	85	90	9	1	0	0	0,6
T-3	m	2,3	11	2,2	Larynxanomalie	Mikrozephalus		52	399000	3990	72	65	34	1	0	0	0,0
T-4	m	18,8	25	1,5	hoher Querschnitt nach neurochirurgischer OP	Mukopolysaccharidose Typ IV	10.09.1998	49	1020000	20400	90	96	1	2	0	0	0,0
T-5	w	6,2	15	4,9	ehemaliges FG, Larynxstenose	sonst o.B.	22.06.1998	78	233000	2330	90	94	4	1	1	0	5,7
T-6	w	11,5	25	10,9	Laryngomalazie	Z.n. Herz-OP bei PDA, VSD	10.08.1998	43	358000	27924	79	90,4	1,6	7,8	0,2	0	0,0
T-7	w	4,9	11	4,4	Muskeldystrophie	Dysmorphie-Syndrom, Lungenhypoplasie	18.06.1998	24	108000	8640	74	68	24	8	0	0	0,9
T-8	w	2,8	12	2,5	subglottisches Hämangiom	VSD	09.11.1998	78	250000	2500	69	79	20	1	0	0	0,0
T-9	m	1,8	14	0,2	Rhabdomyosarkom Unterkiefer links	sonst o.B.	07.12.1998	76	1123000	22460	80	92	6	2	0	0	5,0
T-10	w	9,2	22	7,7	subglottisches Hämangiom	Aortenisthmusstenose	29.10.1998	42	444000	185592	80	47,8	9,5	41,8	0,8	0	0,0
T-11	w	0,8	7,5	0,7	glottische und subglottische Hämangiome	rez. Bronchopneumonien, VSD	12.08.1998	36	84000	840	70	80	19	1	0	0	0,0
T-12	m	2,3	15	0	Ateminsuffizienz	Arthrogryposis multiplex congenita Typ I	06.07.1998	33	288000	20448	90	85,9	6,1	7,1	1	0	0,0
T-13	m	3,8	15	2,2	Larynxdiaphragma	Fraser-Syndrom	17.08.1998	27	156000	24960	64	41	40	16	3	0	0,0
T-14	m	6,5	17	6,2	Larynxanomalie	Dysostosis mandibulofacialis	20.07.1998	43	169000	72670	76	73,9	17	4,3	4,3	0	7,6
T-15	m	0,5	5	0,4	Laryngomalazie, Larynxstenose	Mikrodeletion 22q11	20.08.1998	50	60000	fehlt	80	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	2,2

Tabelle 8: Patienten mit GERD

Patient	Geschlecht	Alter (Jahre)	Grund erkrankung	Gesamtzellzahl (/ml BAL)	Neutrophile (/ml BAL)	Makrophagen (%)	Lymphozyten (%)	Neutrophile (%)	Eosinophile (%)	Basophile (%)	Carbonyle (pmol/ μ g Protein)
R-1	m	2,6	GÖR, intrinsische Asthma	-	-	-	-	-	-	-	3,8
R-2	w	2,3	GÖR, interst. Pneumopathie	343000	54880	72	12	16	0	0	0,0
R-3	w	3,1	GÖR, intrinsische Asthma	83000	-	-	-	-	-	-	2,1
R-4	m	3,4	GÖR, intrinsische Asthma	125000	2500	90	8	2	0	0	0,4
R-5	m	2	GÖR, intrinsische Asthma	38000	-	-	-	-	-	-	2,6
R-6	m	2,8	GÖR, intrinsische Asthma, BPD	65000	2600	88	8	4	0	0	14,1
R-7	w	5,4	GÖR intrinsische Asthma	253000	12650	87,8	7	5	0,2	0	8,3
R-8	m	15,7	GÖR, intrinsische Asthma	148000	11840	89	0	8	2	0	1,9
R-9	w	3,2	GÖR, intrinsische Asthma	193000	1351	94	5,1	0,7	0	0,2	12,9
R-10	m	3,4	GÖR, Asthma	38000	7106	60	18	18,7	0	3,3	7,6
R-11	m	2,9	GÖR, chronische Bronchitis	98000	980	84	15	1	0	0	0,0
R-12	w	5,7	GÖR, chronische Bronchitis	380000	22800	79	15	6	0	0	0,0
R-13	m	3	GÖR, intrinsische Asthma	98000	5390	82,9	11	5,5	0	0,5	9,7
R-14	m	5,5	GÖR, Allergische Asthma	53000	530	94	5	1	0	0	2,5
R-15	m	4,7	GÖR, intrinsische Asthma	198000	41580	72	7	21	0	0	4,5
R-16	w	15,8	GÖR, idiopatische Bronchiektasie	98000	0	98	2	0	0	0	0,0

Tabelle 8: Patienten mit PAP

Patient	Geschlecht	Alter (Jahre)	Grund- erkrankung	Diagnose	Verlauf	Therapie	Carbonyl- (pmol/ μ g Protein)
AP-1			PAP		Dyspnoe		4,9
AP-2	w	1,1	PAP	BAL	Dyspnoe	sequentielle BAL	6,6
AP-3	m	1,5	PAP	OLB	Dyspnoe	sequentielle BAL	0,0
AP-4	w	2,6	PAP	OLB, BAL	Dyspnoe, Husten	O ₂ , sequentielle BAL	13,8
AP-5	m	0,05	PAP congenital	BAL	Febriles Husten, Dyspnoe	sequentielle BAL	0,0
AP-6	m	2,48	PAP	OLB	Gestorben im Alter 5 Monate	Mechanische Ventilation	7,8
AP-7	m	0,8	PAP	OLB, BAL	Dyspnoe, Husten	sequentielle BAL	4,5
AP-8	m	0,6	PAP	BAL	Dyspnoe, Husten	sequentielle BAL	10,2
AP-9	m	2,9	PAP	OLB, BAL	Dyspnoe, gestorben im Alter 20 Monate	O ₂ , sequentielle BAL	0,0
AP-10	m	3,9	PAP	BAL	Dyspnoe	sequentielle BAL	0,0

Abkürzung: OLB-“open lung biopsy”.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum	30.03.1977
Geburtsort	Czernowitz
Staatsangehörigkeit	Ukrainer
Konfession	evangelisch
Familie	Frau Tetyana Svider Tochter Elisabeth Starosta

Schulbildung

1983-1993	allgemeine staatliche Schule in Czernowitz
-----------	--

Studium

1993-1999	medizinische Hochschulausbildung an der Bukovinischen Staatlichen Medizinischen Akademie (BSMA) in Czernowitz
-----------	---

1999-2000	Spezialisierung zum Kinderarzt an der BSMA
-----------	--

2000-2001	Praktische Tätigkeit als Kinderarzt in einem Czernowitzer Krankenhaus
-----------	--

2001-2002	Studium der Kinderheilkunde in der klinischen Ordinatur der BSMA
-----------	---

2002-2004	Immatrikulation an Ludwig-Maximilians-Universität München
-----------	---