

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Hauner'schen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Die Surfactant-Proteine B und C und ihre Vorstufen
in bronchoalveolärer Lavage von Kindern
mit verschiedenen Lungenkrankheiten

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

vorgelegt von

Silja Schumacher
aus München

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Griese

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. R. Wank
Priv. Doz. Dr. med. P. Fraunberger

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 23.03.2006

1. Einleitung	6
1.1. Surfactant	6
1.2. Surfactant-Protein B	7
1.3. Surfactant-Protein C	7
1.4. Pulmonale Alveolarproteinose im Kindes- und Erwachsenenalter	8
1.5. Pulmonale Alveolarproteinose des Neugeborenen und SP-B-Defizienz	9
1.6. Zielsetzung	9
2. Material und Methoden	10
2.1. Patienten und Kontrollgruppe	10
2.2. Bronchoalveoläre Lavage	11
2.3. Lipidextraktion nach Blich-Dyer	12
2.4. Phosphatassay nach Duck-Chong	12
2.5. Gesamtproteinbestimmung nach Bradford	13
2.6. ELISA SP-B/ SP-C	14
2.7. 1-D-Gelelektrophorese	14
2.8. Western Blotting	16
2.9. Deglycosylierung	19
2.10. Silberfärbung nach Heukeshoven-Dernick	20
2.11. Statistik	21
3. Ergebnisse	22
3.1. Protein- und Phospholipidgehalt der BAL	22
3.1.1. Gesamtproteingehalt	24
3.1.2. SP-B-Gehalt	24
3.1.3. SP-C-Gehalt	25
3.1.4. Phospholipidgehalt	26

3.1.5. Protein-/Phospholipid-Verhältnis	27
3.2. Vergleich der klinischen Parameter	28
3.2.1. Kontrollen, obstruktive Bronchitis und nicht-obstruktive Bronchitis	28
3.2.1.1. Alter, Zellbild und Recovery der BAL	28
3.2.1.2. Klinische Untersuchung und Anamnesebefunde	30
3.2.2. CAP, PAP und URD	31
3.3. 1-D-Gelelektrophorese und Western Blotting	34
3.3.1. SP-B	34
3.3.2. SP-C	38
3.3.3. Pro-SP-B Whitsett	42
3.3.4. Pro-SP-C Whitsett	46
3.3.5. CTERMB	50
3.3.6. NFLANK	55
3.3.7. CFLANK	59
3.3.8. NFPROX	63
3.3.9. NPRO-SP-C-C2	66
3.4. Gefundene SP-B-Vorstufen im Überblick	70
3.5. Gefundene SP-C-Vorstufen im Überblick	71
3.6. Vergleich der Banden in Unter- und Oberphase und BAL	73
3.7. Korrelation zwischen Bandenintensität und ELISA	80
3.8. Deglycosylierung	82
3.9. Silberfärbung	82
4. Diskussion	84
4.1. Protein- und Phospholipidgehalt der BAL	84
4.2. Vergleich der klinischen Parameter	84
4.2.1. Alter, Zellbild und Recovery der BAL bei Kontrollen, obB und nobB	84

4.3. 1-D-Gelelektrophorese und Western Blotting	85
4.3.1. SP-B	85
4.3.2. SP-C	85
4.3.3. Pro-SP-B Whitsett	86
4.3.4. Pro-SP-C Whitsett	87
4.3.5. CTERMB	87
4.3.6. NFLANK	88
4.3.7. CFLANK	89
4.3.8. NFPROX	89
4.3.9. NPRO-SP-C-C2	90
4.4. Gefundene SP-B-Vorstufen im Überblick	91
4.5. Gefundene SP-C-Vorstufen im Überblick	91
4.6. Vergleich der Banden in Unter- und Oberphase und BAL	92
4.7. Korrelation zwischen Bandenintensität und ELISA	92
4.8. Deglycosylierung	93
4.9. Silberfärbung	93
5. Zusammenfassung	94
6. Literaturverzeichnis	96
7. Anhang	101
7.1. Danksagung	101
7.2. Lebenslauf	102

1 Einleitung

1.1 Surfactant

Der Begriff Surfactant bedeutet **surface active agent**, also „oberflächenaktive Substanz“ (30). Es handelt sich dabei um ein Gemisch aus ca. 90% Phospholipiden und ca. 10% Proteinen, das die Oberfläche der Alveolen der Lunge bedeckt.

Die Hauptaufgabe des Surfactants liegt in der Erniedrigung der Oberflächenspannung der Alveolen um etwa den Faktor 70, so dass ein endexpiratorischer Alveolenkollaps verhindert wird (29).

Die Surfactant-Phospholipide und -Proteine werden im endoplasmatischen Retikulum der Typ-II-Alveolar-Zellen synthetisiert, zum Golgiapparat transportiert und dort als Lamellarkörperchen gespeichert. Durch Exozytose werden die Lamellarkörperchen aus der Zelle ausgeschleust und bilden das tubuläre Myelin, das die Lipidschicht an der Grenze zum Alveolarraum darstellt. Zum größten Teil wird Surfactant von den Typ-II-Alveolarzellen, zum kleineren Teil jedoch auch von Alveolarmakrophagen wieder aufgenommen und recycelt (36).

Vier Surfactant-assoziierte Proteine sind bisher identifiziert und nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit SP-A, SP-B, SP-C und SP-D bezeichnet worden (28).

Während es sich bei SP-A und SP-D um hydrophile Proteine handelt, sind SP-B und SP-C hydrophob und haben zur Hauptaufgabe, Phospholipide in die Grenzschicht zwischen Luft und Flüssigkeit einzubauen und das tubuläre Myelin zu stabilisieren (36).

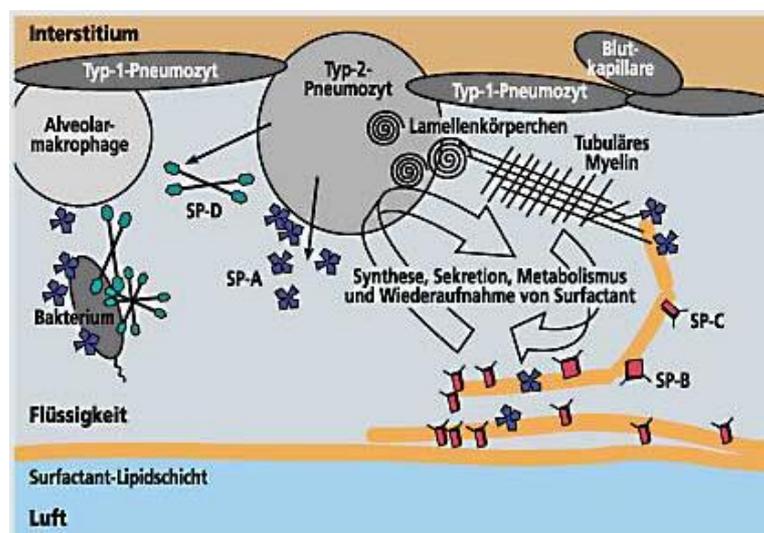


Abbildung 1.1-1 Darstellung des Alveolarraums und des Metabolismus der Surfactantproteine (aus 14).

1.2 Surfactant-Protein B

Das Gen für SP-B ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 2, in Position 2p12-p11.2, lokalisiert (41), ist 9,5 kb groß und besteht aus 11 Exons, wobei die Exons 6 und 7 mit dem reifen Peptid korrespondieren (27). In Versuchen mit humanen fetalen Typ-II-Zellen konnte gezeigt werden, dass zunächst ein 381 AS langes und nach Abspaltung eines 23 AS langen Signalpeptids ein 42 kDa schweres Pro-SP-B entsteht. Danach wird der N-Terminus abgespalten und es entsteht ein 25 kDa schweres Zwischenprodukt. Daraufhin verbleibt nach Abspaltung des C-Terminus das reife SP-B, das aus 79 AS besteht und ein Molekulargewicht von 8,7 kDa hat (18). Als zusätzliche Zwischenstufe wurde 1998 eine 9 kDa schwere Form gefunden (16).



Abbildung 1.2-1 Die Prozessierung der SP-B-Proform zum reifen SP-B. Die Dreiecke markieren Glykosylierungsstellen (nach 16).

1.3 Surfactant-Protein C

Auf dem kurzen Arm des Chromosoms 8, in Position 8p21, ist das Gen für SP-C lokalisiert, welches 3,5 kb groß ist und aus 6 Exons besteht, wobei das Exon 2 mit dem reifen SP-C korrespondiert (12). Das zunächst gebildete Pro-SP-C hat ein Molekulargewicht von 22 kDa und wird zuerst durch Abspaltung des C-Terminus zu einem 6 kDa schweren Zwischenprodukt, dann durch Abspaltung des N-Terminus zum reifen SP-C prozessiert, das aus 35 AS besteht und ein Molekulargewicht von 4,2 kDa besitzt (36). Zusätzlich wurden Zwischenprodukte mit 16 und 7 kDa nachgewiesen (35).

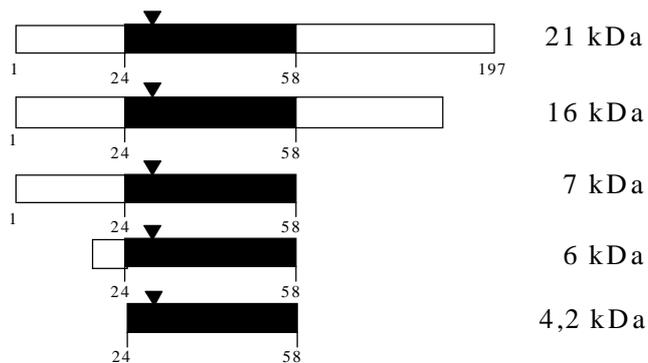


Abbildung 1.3-1 Die Prozessierung der SP-C-Proform zum reifen SP-C. Die Dreiecke markieren Palmitoylierungsstellen (nach 35)

1.4 Pulmonale Alveolarproteinose im Kindes- und Erwachsenenalter

Die pulmonale Alveolarproteinose ist eine Erkrankung, die erstmals 1958 von Rosen et al. (31) beschrieben wurde. Hierbei liegt eine Störung des Surfactant-Metabolismus vor, wobei mehrere Formen unterschieden werden. Bei der kindlichen bzw. juvenilen und der adulten Form liegt die Störung in der Wiederaufnahme von Surfactant in die Zelle, so dass es zur Ansammlung von Phospholipiden und Proteinen in der Lunge mit nachfolgender Hypoxie kommt (15).

Die kindlichen Patienten fallen im Alter von einigen Monaten bis Jahren durch Gedeihstörung, Husten, reduzierte Belastbarkeit und Hepatosplenomegalie auf, einige auch durch rezidivierende Bronchitiden und Pneumonien.

In letzter Zeit konnten bei einem Teil dieser Patienten Mutationen im SP-C-Gen nachgewiesen werden (38).

Die adulte Form wird bei dem Großteil der Patienten im dritten bis vierten Lebensjahrzehnt manifest, mit Symptomen wie Husten, Dyspnoe, Gewichtsverlust und Hämoptyse, später auch Zyanose und Trommelschlegelfinger. Die Therapie der Wahl bei dieser kindlichen und adulten Form der Erkrankung ist die wiederholte komplette Lungenlavage (14, 5).

1.5 Pulmonale Alveolarproteinose des Neugeborenen und SP-B-Defizienz

Die neonatale bzw. konnatale Form der Erkrankung wurde erstmals 1968 von Wilkinson et al. (46) beschrieben. Bei einem Teil dieser Patienten lässt sich eine SP-B-Defizienz nachweisen. Bei diesem erstmals 1993 von Noguee et al. (24) beschriebenen Krankheitsbild kommt es im Gegensatz zu den anderen Formen der Alveolarproteinose nicht zur Speicherung von Phospholipiden, sondern nur von Proteinen im Alveolarraum (42). Eine Untersuchung der Alveolarflüssigkeit mittels bronchoalveolärer Lavage zeigt hier ein Fehlen von SP-B und den Nachweis von inkomplett bzw. abnorm prozessierten Vorformen von SP-C (42). Bereits neonatal führt diese Erkrankung zu schwerer respiratorischer Insuffizienz mit nur vorübergehendem Ansprechen auf die Gabe von Surfactant, und die Patienten versterben innerhalb der ersten Lebenswochen bis -jahre (24). Ursächlich findet sich bei diesen Patienten eine Mutation im SP-B-Gen, wobei sich schätzungsweise bei 2/3 dieser Kinder die Mutation 121ins2 (1549C→GAA) nachweisen lässt, die nach einem autosomal-rezessiven Modus vererbt wird (45). Mehr als 30 weitere Mutationen sind im Zeitraum von 1989 bis 2003 beschrieben worden (1, 9, 11, 20, 23, 25, 26, 27, 33, 37, 39, 40, 43, 47).

Die einzige, jedoch bislang nur vereinzelt durchgeführte, Therapiemöglichkeit der SP-B-Defizienz ist die Lungentransplantation (17). Weder die Substitution von SP-B, noch die komplette Lungenlavage haben hierbei einen therapeutischen Nutzen. Erfolgversprechend könnte möglicherweise die Entwicklung einer Therapie durch Gentransfer in die Typ-II-Zellen der Lunge sein.

1.6 Zielsetzung

Die Untersuchung der bronchoalveolären Lavage ist eine geeignete Methode, um die Surfactantproteine B und C und ihre Vorstufen im Alveolarraum darzustellen. Da es bei einer Störung im Metabolisierungsprozess des Surfactant zur Anhäufung verschiedener Zwischenstufen bzw. aberrant prozessierter Vorstufen kommt, muss sich durch das Proteinmuster der BAL eine Aussage über eine vorliegende Störung machen lassen. Inwieweit das möglich ist und wie das typische Proteinmuster in der BAL bei Kindern mit unterschiedlichen Lungenkrankheiten aussieht, soll in dieser Arbeit gezeigt werden. Dabei wird das Proteinmuster in der BAL von Kindern mit verschiedenen Formen der Alveolarproteinose, unklarer Lungenkrankheit und chronischer Bronchitis dargestellt und mit dem gesunder Kinder verglichen (13). Außerdem sollen Unterschiede in der Nachweisbarkeit der Proteine nach unterschiedlicher Aufarbeitung des Materials dargestellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten und Kontrollgruppe

Es wurde die bronchoalveoläre Lavage von insgesamt 82 Kindern untersucht, die im Alter zwischen wenigen Lebenstagen und 16,7 Jahren lavagiert wurden.

2.1.1 Chronische Bronchitis

Die Gruppe der Patienten mit chronischer Bronchitis besteht aus 39 Patienten, die im Zeitraum von 1997 bis 1999 im Dr. v. Hauner'schen Kinderspital der Universität München mit der Diagnose einer chronischen Bronchitis eine bronchoalveoläre Lavage erhielten und von denen ausreichend Material für die geplanten Untersuchungen vorhanden war. Die Kinder wurden je nach Vorliegen oder Fehlen einer bronchialen Obstruktion in die Gruppe der obstruktiven Bronchitis (obB) oder in die Gruppe der nicht-obstruktiven Bronchitis (nobB) eingeteilt. Diese bronchiale Obstruktion wurde entweder vom niedergelassenen Kinderarzt oder vom Klinikarzt vor Durchführung der Lavage durch den auskultatorischen Nachweis von Giemen und/ oder eine FEV₁-Reduktion in der Lungenfunktion diagnostiziert. Die klinischen Daten wurden den Krankenakten entnommen sowie durch Gespräche mit den Eltern erfasst.

Die Gruppe der obstruktiven Bronchitis umfasst 27 Kinder im Alter von 0,3 bis 15,2 Jahren (Median 4,6 Jahre). Die Gruppe der nicht-obstruktiven Bronchitis beinhaltet 12 Kinder im Alter von 0,5 bis 16,7 Jahren (Median 5,9 Jahre).

2.1.2 CAP, PAP und URD

Die Patienten der Gruppen CAP, PAP und URD wurden im Zeitraum von 1998 bis 2001 an verschiedenen Kinderkliniken in Frankreich, den Niederlanden, der Schweiz und Deutschland bronchoalveolär lavagiert und durch das Laboratoire de Biochimie des Hopital d'Enfants Armand-Trousseau in Paris auf genetische Mutationen untersucht, die zu SP-B-Defizienz führen (37, 38). Das zugeschickte Material der bronchoalveolären Lavage wurde hinsichtlich der Surfactant-Proteine analysiert.

Die Gruppe CAP besteht aus 8 Patienten mit kongenitaler Alveolarproteinose. Bei 6 von ihnen (CAP 02, 03, 04, 05, 06, 08) wurde eine SP-B-Defizienz diagnostiziert, bei 4 von diesen (CAP 02, 03, 05, 06) durch eine nachgewiesene Mutation im SP-B-Gen.

Die Gruppe PAP umfasst 13 Patienten mit juveniler Alveolarproteinose. Bei drei Patienten dieser Gruppe (PAP 02, 08, 10) konnte durch das Laboratoire de Biochimie des Hopital d'Enfants Armand-Trousseau in Paris eine Mutation im SFTPC-Gen nachgewiesen werden (38).

Die Gruppe URD beinhaltet 7 Patienten, bei denen trotz ähnlicher Symptomatik keine Alveolarproteinose nachgewiesen werden konnte.

2.1.3 Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe besteht aus 15 Kindern, bei denen eine Lungenerkrankung ausgeschlossen werden konnte und die sich elektiven chirurgischen Eingriffen in Intubationsnarkose unterzogen. Die Patienten und die Eltern wurden über das Vorgehen aufgeklärt, und es wurde eine Einverständniserklärung eingeholt, bevor an die Operation anschließend eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt wurde. Das Alter der Kinder betrug zum Zeitpunkt der Lavage zwischen 0,5 und 12,3 Jahre (Median 5,4 Jahre).

2.2 Bronchoalveoläre Lavage

In Narkose und Relaxierung wurde über den Endotrachealtubus ein Ballonkatheter in einen Lungenlappen eingeführt und dessen Blockade durch ein an der Carina liegendes Bronchoskop überwacht. Auf Körpertemperatur angewärmtes NaCl 0,9% wurde in der Menge 1 ml/kg Körpergewicht instilliert und abgesaugt, wobei dies viermal durchgeführt wurde. Das zurückerhaltene Volumen aus der 2.-4. Fraktion wurde gepoolt, und durch Zentrifugation von den zellulären Bestandteilen getrennt. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -70°C aufbewahrt.

In Ausnahmefällen, bei sehr schwer kranken Neugeborenen, wurden nach Instillation von 1ml NaCl 0,9%/kg Körpergewicht repetitive tracheale Absaugungen durchgeführt, und das Material wurde über einige Stunden oder Tage gesammelt (37).

2.3 Lipidextraktion nach Bligh und Dyer

Um die BAL in die lipophile Unter- und die lipophobe Oberphase zu trennen, wurde die Lipidextraktion nach Bligh und Dyer angewandt (3). Eine Menge von z.B. 2 ml BAL wurde dazu unter dem Abzug in mit Chloroform (MERCK, Darmstadt) ausgespülte Gläser gegeben und mit Chloroform und Methanol (MERCK, Darmstadt) im Verhältnis 1(Probe):1,25(Chloroform):2,5(Methanol) 10 Minuten lang mit dem Vortexer (Baxter Diagnostics Inc., Deerfield, IL, USA) auf höchster Stufe gemischt. Anschließend wurden Chloroform und Aqua dest. im Verhältnis 1(Probe):1,25(Chloroform):1,25(Aqua dest.) zugegeben, und die Flüssigkeit wurde für weitere 10 Minuten gemischt. Die Gläser wurden kurz belüftet, mit einer Markierung auf Höhe des Flüssigkeitsstandes versehen und bei 2400 Umdrehungen/Minute für 5 Minuten zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R). Mit Glas-Einmal-Pipetten wurde die Unterphase abpipettiert und in mit Chloroform ausgespülte Reagenzgläser (Assistent/Schott) gegeben. Die verbliebene Oberphase wurde bis zur Markierung mit Folch-Lösung aufgefüllt, die sich aus 1 ml Aqua dest., 14 ml Methanol und 86 ml Chloroform zusammensetzt. Nach erneuter Mischung auf dem Vortexer und anschließender Zentrifugation mit 2400 Umdrehungen/Minute für 5 Minuten wurde die Unterphase abpipettiert und zu der vorher extrahierten Unterphase gegeben. Die so getrennten Unter- und Oberphasen wurden entweder bei -20°C aufbewahrt oder gleich im auf 40°C geheizten Evaporator (Liebisch) unter Stickstoffzufuhr (N_2) über knapp über der Flüssigkeit angebrachte Drähte eingedampft und wiederum bei -20°C aufbewahrt.

2.4 Phosphatassay nach Duck-Chong

Für die Bestimmung des Phosphatgehalts der BAL-Unterphasen durch den Phosphatassay nach Duck-Chong (8) wurden Reagenzgläser verwendet, die über Nacht mit Schwefelsäure und 5% Salpetersäure (beides MERCK, Darmstadt) gebeizt wurden, bevor sie gut mit Aqua dest. ausgespült und getrocknet wurden.

Die eingedampften Unterphasen wurden mit $1000\ \mu\text{l}$ Methanol/Chloroform im Verhältnis 2:1 resuspendiert und gemischt. Hiervon wurden zweimal $150\ \mu\text{l}$ mit einem mit Chloroform gespülten Assipettor (Assipettor-digital, Assistent) entnommen, in Reagenzgläser gegeben, und jeweils $30\ \mu\text{l}$ Magnesiumnitrat (10% $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in Methanol) wurden hinzugefügt. Bei einer Temperatur von 95°C wurden die Reagenzgläser im Heizblock erhitzt, bis die Flüssigkeit vollständig verdampft war. Anschließend wurden die Proben durch Erhitzen in der Flamme eines Bunsenbrenners für einige Sekunden verascht.

Zur Herstellung der Phosphat-Standardreihe wurden jeweils dreimal 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 und 0,5 μg KH_2PO_4 (MERCK, Darmstadt) mit je 1 ml 1 M HCl (MERCK, Darmstadt) vermischt. Die Reagenzgläser mit den veraschten Proben wurden ebenfalls mit je 1 ml 1 M HCl gefüllt und wie die Gläser mit der Standardreihe für 15 Minuten bei 95°C im Heizblock erhitzt. Anschließend wurde der Inhalt sämtlicher Gläser halbiert, wobei die eine Hälfte für evtl. Verdünnungen der Proben zunächst aufgehoben wurde. Der anderen Hälfte wurden je 15 μl Tritonlösung [1% Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO, USA) in Aqua dest.] und je 1 ml einer Ammoniummolybdat-Malachitgrün-Lösung zugegeben. Diese Lösung wurde hergestellt aus 0,9 g Malachitgrün (BDH Laboratory Supplies Pool, England) in 300 g Aqua dest., das mit 4,2 g Ammoniummolybdat (Sigma, St. Louis, MO, USA) in 100 ml 4,5 M HCl gemischt und nach 2 Stunden Stehen bei Raumtemperatur durch Filterpapier (Rundfilter, Assistent) gefiltert wurde.

Aus den Reagenzgläsern wurden nun je zweimal 280 μl entnommen und in eine Mikrotiterplatte (PS Mikroplatte F, Greiner) pipettiert. Die Extinktion wurde mit dem Mikrotiterplattenlesegerät anthos ht III (anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld) bei 650 nm gemessen. Bei Werten außerhalb des Standardbereichs wurde ein Teil der aufgehobenen Probe mit HCl verdünnt und wie oben beschrieben bearbeitet. Mit Hilfe der Software Graph Pad Prism 3.00 für Windows (GraphPad Software, San Diego California USA) wurde der Phosphatgehalt der Proben berechnet, und es wurde durch Multiplikation mit 25 auf den Phospholipidgehalt geschlossen.

Zur Pipettierung von lösungsmittelhaltigen Flüssigkeiten wurden Pipetten der Firmen Unimetrics Corporation (Shorewood, IL, USA) und Hamilton (Bonaduz, Schweiz) sowie Glas-Einmal-Pipetten verwendet. Für die übrigen Pipettierungen wurden Pipetten, Dispenser und Pipettenspitzen der Firmen Eppendorf AG (Hamburg), Gilson (Villiers-le-Bel, Frankreich) und Brand (Wertheim) benutzt.

2.5 Gesamtproteinbestimmung nach Bradford

Für die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration der Nativ-BALs wurde das Verfahren nach Bradford (4) angewandt.

Folgender Puffer wurde vorbereitet:

PBS-Puffer:

0,178 g/l	Na ₂ HPO ₄
1,56 g/l	NaH ₂ PO ₄
8,76 g/l	NaCl
In 1l Aqua dest. gelöst auf pH 7,4 titriert	

Die Reagenzien für den Puffer stammten von der Firma MERCK, Darmstadt, das pH-Meter CG840 war von der Firma Schott.

Je 2x 5 µl von den zu messenden BAL-Proben wurden für eine Doppelbestimmung in eine Mikrotiterplatte (PS Mikroplatte F, Greiner) pipettiert. Ebenso wurden je 2x 5 µl einer Standardreihe, ebenfalls in Doppelbestimmung, mit BSA (Bovines Serum-Albumin, Paesel und Lorei) in PBS-Puffer in Proteinkonzentrationen von 5 mg/ml, 2500 µg/ml, 1250 µg/ml, 625 µg/ml, 312,5 µg/ml, 156,3 µg/ml, 78,2 µg/ml und 0 µg/ml aufgetragen. Jeder Probe und jedem Standard wurden 100 µl des 1:5 mit PBS verdünnten Farbstoffreagenz (BioRad, Richmond, CA, USA) zugegeben, und die Extinktion wurde im Mikrotiterplattenlesegerät anthos ht III (anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld) bei 600 nm gemessen. Mit Hilfe der Standardreihe wurden die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt.

2.6 SP-B-/SP-C-ELISA

Die SP-B- und SP-C-Bestimmung mittels ELISA aus nativer BAL wurde freundlicherweise durch Herrn Dr. R. Schmidt, Labor Prof. Seeger, Med. Klinik II, Universität Giessen, durchgeführt (32).

2.7 1-D-Gelelektrophorese

Vor der Verwendung für die 1-D-Gelelektrophorese wurden die Proben in entsprechender Konzentration (25 µg Phospholipide bei Verwendung der Unterphase, 5 µg bei Verwendung der Oberphase und 5 bzw. 10 µg Protein bei Verwendung der BAL) pipettiert und lyophilisiert (Bachhofer Vakuumkonzentrator). Eingedampfte Unterphasen wurden vorher in Methanol/Chloroform (2:1) resuspendiert, und die entsprechende Menge wurde in mit ca. 200 µl Isopropanol (MERCK) gefüllte Safe-Lock-Tubes (Eppendorf AG, Hamburg) gegeben, bevor sie lyophilisiert wurde.

Für die Elektrophorese wurde das NuPAGE Bis-Tris Electrophoresis System (Invitrogen, Carlsbad, USA) mit NuPAGE 10% Bis-Tris-Gelen (10 cm x 10 cm; 1,0 mm) verwendet.

Folgende Puffer wurden vorbereitet:

Probenpuffer:

10 %	NuPAGE 10x Reducing Agent
25 %	NuPAGE LDS Sample Buffer
65 %	Aqua ad inj.

MES-Laufpuffer:

50 ml	NuPAGE 20x MES Running Buffer
950 ml	Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen)

Zunächst wurden die lyophilisierten Proben in jeweils 22 µl Probenpuffer resuspendiert und zusammen mit einem SP-B- (20 ng) und einem SP-C-Standard (25 ng rSP-C Surfactant, Byk Gulden) sowie mit einer Leerprobe (22 µl Probenpuffer ohne Probe) für 10 Minuten im Wasserbad bei 70°C erwärmt. Der LDS Sample Buffer im Probenpuffer sorgte durch den Gehalt an LDS für eine Denaturierung der Proteine. Währenddessen wurden ein bzw. zwei Gele in das NuPAGE Xcell Mini-Cell-Gerät eingebaut und die Kammern mit MES-Puffer gefüllt. Anschließend wurden die Proben, die Standards und die Leerprobe in die Geltaschen pipettiert. In eine Lane wurden 7 µl eines Molekulargewichtsmarkers (Mark12 Wide Range Protein Standard oder SeeBlue Pre-Stained Standard, Invitrogen, USA) gegeben. Nun wurden 500 µl NuPAGE Antioxidans in die innere Kammer gegeben, um reduzierende Bedingungen herzustellen, und das Gerät wurde bei einer Spannung von 200 V und einer Laufzeit von 35 Minuten gestartet. Die auf diese Weise auf den Gelen aufgetrennten Proteine wurden anschließend entweder wie im Kapitel 2.10 beschrieben mit Silberfärbung sichtbar gemacht oder durch das im Kapitel 2.8 beschriebene Western Blotting auf Membranen transferiert. Die Abbildung 2.7-1 zeigt den Molekulargewichtsmarker M12 nach Silberfärbung, der den Gelübersichten im Ergebnisteil vorangestellt wurde. Falls die MW-Angaben im Ergebnisteil schwer leserlich sind, können sie der Abbildung 2.7-1 entnommen werden.

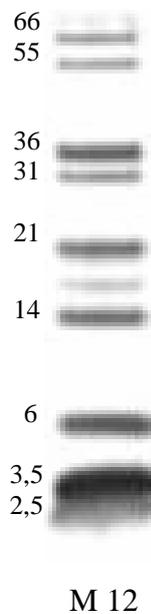


Abbildung 2.7-1 Der Molekulargewichtsmarker M 12 nach Silberfärbung.

2.8 Western Blotting

Für das Western Blotting wurden das NuPAGE Xcell Mini-Cell-Gerät mit dem NuPAGE Blot Module sowie PVDF Membran (Immobilon Transfer Membranes, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) und Blotting Pads der Firma NuPAGE verwendet.

Folgende Lösungen wurden vorbereitet:

Transfer-Puffer:

40 ml	NuPAGE 20x Transfer Buffer
200 ml	Methanol (MERCK)
760 ml	Aqua ad iniectabilia (Braun)

PBS-Puffer:

1704 mg/l	Na ₂ HPO ₄ (MERCK)
414 mg/l	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O (MERCK)
8766 mg/l	NaCl (MERCK)
In 1l Aqua dest. gelöst auf pH 7,4 titriert	

TBS-Puffer:

484,6 mg/l	Tris
5844 mg/l	NaCl
In 2-3l Aqua dest. gelöst auf pH 7,4 titriert	
0,5 g/l	Tween 20

Das für den TBS-Puffer verwendete Tris stammte von der Firma Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden), das Tween 20 von der Firma Sigma (St. Louis, MO, USA).

Die zugeschnittenen PVDF Membranen wurden vor der Verwendung für kurze Zeit in Methanol und danach in Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen) gelegt und anschließend für einige Minuten in Transferpuffer gegeben.

Nach der Vorschrift der Firma Invitrogen wurden nach der Elektrophorese die Gele mit den PVDF Membranen, umgeben von Filterpapier (Whatman, Maidstone, England) und Blotting Pads in das Blot-Modul geschichtet. Die innere Kammer wurde mit Transferpuffer und die äußere Kammer mit Aqua dest. gefüllt. Die Transferzeit betrug 1 Stunde, die Spannung 30 V. Anschließend wurden die Membranen für die Dauer von 3 Stunden bei Raumtemperatur in jeweils 100 ml PBS mit 3 % Fisch-Gelatine (Sigma, St. Louis, MO, USA) geschwenkt und die unspezifischen Bindungsstellen dadurch geblockt. Mit TBS-Puffer wurden die Membranen dann gespült und für etwa 16 Stunden gekühlt, sanft geschüttelt und mit dem 1. Antikörper inkubiert, der in der jeweiligen Konzentration in 20 ml PBS mit 0,5 % BSA (Bovines Serum-Albumin, Paesel und Lorei) gegeben worden war.

Folgende Antikörper (AK) wurden hierbei verwendet:

Tabelle 2.8-1 Übersicht über die verwendeten Antikörper:

AK gegen	Bindung an	Konzentration	durchgeführt bei
SP-B (c329) [D]		1:10000	Kontrollen, obB, nobB, CAP, PAP, URD
SP-C (22/96) [C]		1:10000	Kontrollen, obB, nobB, CAP, PAP, URD
Pro-SP-B (55522) [E]	unklar	1:10000	obB, nobB, CAP, PAP, URD
Pro-SP-B CTERMB [B]	Leu ₃₃₀ -Leu ₃₄₉	1:5000	Kontrollen, obB (1-19), CAP, PAP, URD
Pro-SP-B NFLANK [B]	Gln ₁₈₆ -Gln ₂₀₀	1:2000	obB (1-19), CAP, PAP, URD
Pro-SP-B CFLANK [B]	Gly ₂₈₄ -Ser ₃₀₄	1:1000	obB (1-19), CAP, PAP, URD
Pro-SP-B NFPROX [B]	Ser ₁₄₅ -Leu ₁₆₀	1:2000	obB (1-19), CAP, PAP, URD
Pro-SP-C (68514) [E]	unklar	1:10000	obB, nobB, CAP, PAP, URD
Pro-SP-C NPROSP-C2 [A]	E ₁₀ -Q ₂₃	1:5000	Kontrollen, obB (1-19), CAP, PAP, URD

Die Buchstaben in eckigen Klammern stehen für die Herkunft des jeweiligen Antikörpers:

A: Prof. M. Beers, Department of Medicine, Universität Pennsylvania, Philadelphia, USA

B: Prof. S. Guttentag, Children's Hospital, Universität Pennsylvania, Philadelphia, USA

C: Prof. K. Schäfer, Byk-Gulden AG, Konstanz

D: Dr. Y. Suzuki, Universität Kyoto, Japan (34)

E: Prof. J. Whitsett, Department of Pediatrics, College of Medicine, Universität Cincinnati, USA

Tabelle 2.8-2 Übersicht über die zu den entsprechenden Antikörpern benutzten Peptide:

AK	Peptid
Pro-SP-B CTERMB	LDREKCKQFVEQHTPQLLTL
Pro-SP-B NFLANK	QARPGPHTQDLSEQQ
Pro-SP-B CFLANK	GPRSPTGEWLPRDSECHLCMS
Pro-SP-B NFPROX	SRQPEPEQEPGMSDPL
Pro-SP-C NPROSP-C2	CGG ESPPDYSTGPRSQ

Die Abbildungen 2.8-1 und 2.8-2 stellen Pro-SP-B und Pro-SP-C dar, mit den Bindungsstellen für die verwendeten Antikörper.

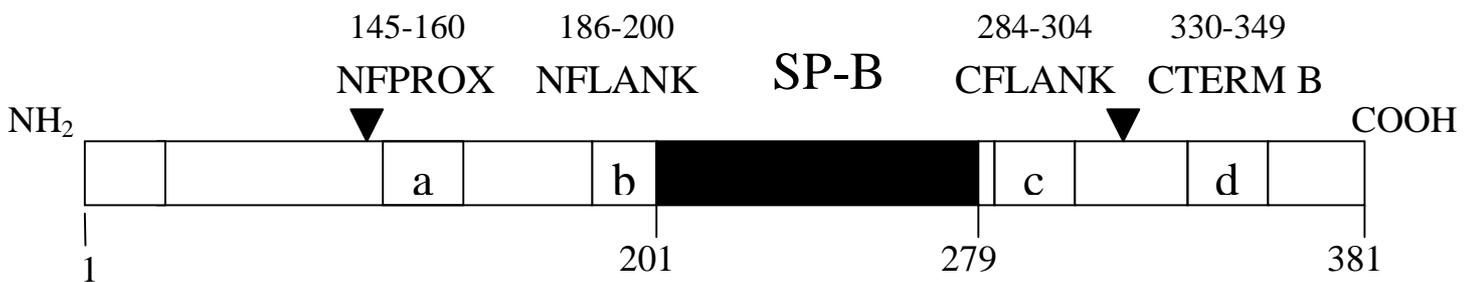


Abbildung 2.8-1 Bindungsstellen der AK NFPROX (a), NFLANK (b), CFLANK (c) und CTERMB (d) an Pro-SP-B. Die Ziffern stehen für die Aminosäuren, die Dreiecke stellen Glykosylierungsstellen dar.

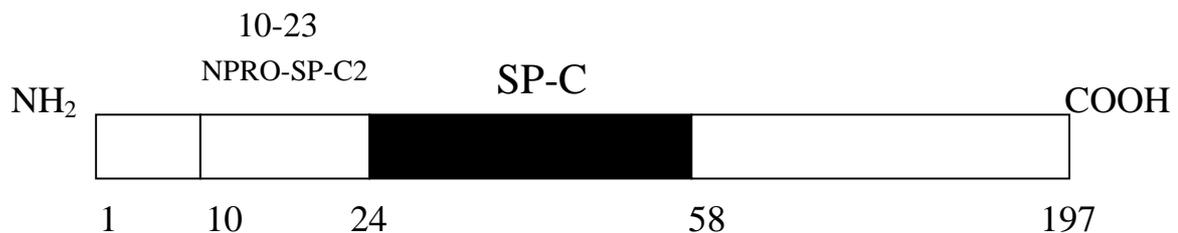


Abbildung 2.8-2 Bindungsstelle für den AK NPRO-SP-C2 an Pro-SP-C. Die Ziffern stehen für die Aminosäuren.

Nach etwa 16 Stunden Inkubation wurden die Membranen 4 x 15 Minuten lang in TBS gewaschen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit einem polyklonalen IgG (goat anti-rabbit, Meerrettich-Peroxidase konjugiert, Dianova, Hamburg) in der Konzentration 1:100000 in TBS inkubiert. Nach 4 weiteren Waschgängen von jeweils 15 Minuten in TBS wurden die Membranen mit dem ECL Assay (enhanced chemiluminescence, Amersham Pharmacia Biotech, UK) entwickelt. Dabei wurden die Membranen für eine Minute in Luminol und Enhancer (1:1) eingelegt und anschließend in einer Entwicklungskassette (Hypercassette, Amersham, Little Chalfont, England) von Entwicklungsfolie bedeckt für die Dauer von 30

Sekunden bis 5 Minuten mit Röntgenfilmen (Hyperfilm ECL, Amersham, Little Chalfont, England) inkubiert. Die belichteten Filme wurden für 3 Minuten in ein Entwicklungsbad gegeben, dann nach kurzem Eintauchen in Leitungswasser für 4 Minuten in Fixierer und anschließend für 10 Minuten in Leitungswasser gegeben, bevor sie getrocknet wurden. Die Membranen wurden danach in TBS eingelegt und bei Bedarf mit dem nächsten Antikörper inkubiert.

Die Filme wurden mit dem Fluor-S MultiImager (BioRad, Richmond, CA, USA) eingescannt und bearbeitet, und das Molekulargewicht der sichtbaren Proteine wurde mit der Software Multi Analyst (BioRad, Richmond, CA, USA) ermittelt.

Um festzustellen, ob es sich bei den Banden um für den Antikörper spezifische Banden handelt, wurden den Antikörpern CTERMB, NFLANK, CFLANK, NFPROX und NPROSP-C2 in einem zweiten Versuch entsprechende Peptide zugegeben, die in der Tabelle 2.8-2 dargestellt sind. Hierzu wurde vor der Inkubation der Membranen eine Peptid-PBS-BSA-Mischung in der Konzentration von 1 μ M bzw. 10 μ M hergestellt, der dann der Antikörper zugegeben wurde. Es wurde davon ausgegangen, dass das Peptid den Antikörper an der spezifischen Bindungsstelle blockiert und spezifische Banden dadurch nur bei der Inkubation mit dem Antikörper sichtbar waren, nicht aber oder zumindest deutlich schwächer bei der Inkubation mit dem Antikörper-Peptid-Gemisch.

Während die Pro-Formen nur als positiv oder negativ bewertet wurden, wurden die Banden von SP-B und SP-C nach ihrer Intensität eingeteilt. Auf jedem Gel zum Nachweis von SP-B und SP-C wurden ein SP-B-Standard mit 20 ng und ein SP-C-Standard mit 25 ng aufgetragen. Die Bandenintensität wurde nach folgendem Schema beurteilt:

++++	Stärker sichtbar als Standard
+++	Vergleichbar mit Standard
++	Schwächer sichtbar als Standard
+	Gerade noch sichtbar
-	Nicht sichtbar

2.9 Deglycosylierung

Um festzustellen, ob es sich bei den mit dem Antikörper CTERMB gefundenen Pro-Formen um glycosylierte Peptide handelt, wurde bei einem Patienten mit dem Enzym N-Glycosidase

F, rekombinant (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) eine Deglycosylierung durchgeführt. (21, 44)

Folgender Inkubationspuffer wurde hergestellt:

100 mM	Na-Phosphat (MERCK)
25 mM	EDTA (Pharmacia)
0,5 %	TritonX-100 (Sigma)
0,1 %	SDS
In 100 ml Aqua ad iniectabilia gelöst und auf pH 7,2 titriert	
1 % (0,89 ml)	2-Mercaptoethanol (MERCK)

1 Einheit N-Glycosidase F wurde in 500 µl Inkubationspuffer gegeben und die lyophilisierte Lavage wurde in 20 µl hiervon resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Stunden bei 37°C wurde die Probe erneut lyophilisiert. Anschließend wurde wie oben beschrieben die Elektrophorese durchgeführt und die Banden wurden mit dem Antikörper CTERMB dargestellt.

2.10 Silberfärbung

Für die Silberfärbung der Proteine wurde eine modifizierte Methode nach Heukeshoven/Dernick (19) angewandt.

Folgende Lösungen wurden vorbereitet (Reagenzien der Firma MERCK):

A

60 ml	Ethanol
20 ml	Essigsäure
mit Aqua dest. auf 200 ml auffüllen	

C

0,4 g	AgNO ₃
In 200 ml Aqua dest. lösen	
40 µl	Formaldehyd (37%)

B

17 g	Na-Acetat
60 ml	Ethanol
mit Aqua dest. auf 200 ml auffüllen	
0,4 g	Na ₂ S ₂ O ₃

D

7,5 g	Na ₂ CO ₃
In 300 ml Aqua dest. lösen	
30 µl	Formaldehyd (37%)

Das Gel wurde direkt nach der Elektrophorese für 30 Minuten in die Lösung A gegeben und anschließend in der Lösung B 1 Stunde lang inkubiert. Dann wurde es 3 mal in jeweils 200 ml Aqua dest. gewaschen und für die Dauer von 20 Minuten mit der Lösung C versilbert. Darauf folgte die Entwicklung in zunächst 100 ml der Lösung D, die nach 30 Sekunden bei beginnender Braunfärbung durch die restlichen 200 ml ersetzt wurde, in der das Gel für die Dauer von 7 Minuten belassen wurde. Dann wurde die Reaktion gestoppt, indem das Gel zweimal für je 5 Minuten in 5 %ige Essigsäure gegeben wurde. Das Gel wurde in 1 %iger Essigsäure aufbewahrt, und das Molekulargewicht der Banden wurde mit dem Fluor S-MultiImager (BioRad, Richmond, CA, USA) und der Software Multi Analyst (BioRad, Richmond, CA, USA) ermittelt.

2.11 Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mit der Software Graph Pad Prism 3.00 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Unterschiede in den parameterfreien Werten der unterschiedlichen Gruppen wurden mit dem Test nach Kruskal-Wallis berechnet. Zum paarweisen Vergleich der Gruppen wurde der Nachfolgetest nach Dunn (10) verwendet. Korrelationen wurden nach Kendall berechnet.

Alle Testergebnisse, deren $P < 0,05$ war, wurden als signifikant bezeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Protein- und Phospholipidgehalt der BAL

Tabelle 3.1-1 Gesamtprotein, SP-B und SP-C bei Kontrollen und allen Patientengruppen im Vergleich:

		Protein (µg/ml)	SP-B (ng/ml)	SP-C (ng/ml)
Kontrollen	n	14	12	12
	MW±Standardfehler Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	90,2±19,9 62,4 (51,1;123,2) [21,1-274,6]	589,3±76,9 505,2 (376,0;833,3) [253,1-1059,0]	362,5±60,3 339,9 (228,2;382,2) [151,9-963,9]
obB	n	27	27	27
	MW±Standardfehler Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	93,4±10,0 77,2 (56,5;145,2) [17,2-207,1]	378,5±72,6 242,2 (178,9;506,9) [34,7-1809,0]	357,6±77,3 238,2 (183,9;414,6) [36,9-2107,0]
nobB	n	12	12	12
	MW±Standardfehler Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	116,6±20,7 98,7 (52,2;177,5) [32,2-245,6]	1127,0±404,4 522,1 (213,6;1783,0) [123,6-4312,0]	1191,0±437,1 416,2 (241,6;1948,0) [96,2-4212,0]
CAP	n	8	7	7
	MW±Standardfehler Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	564,7±219,6 318,2 (270,3;580,5) [131,5-2048,0]	803,9±338,6 616,6 (170,1;1930,0) [117,1-2620,0]	481,7±192,1 493,4 (76,0;1056,0) [38,5-1477,0]
PAP	n	13	10	10
	MW±Standardfehler Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	768,7±197,6 654,6 (193,3;1326,0) [87,4-2099,0]	1998±368,4 1806,0 (1031,0;3378,0) [409,0-3850,0]	1226±387,2 1066,0 (246,1;1835,0) [167,5-4129,0]
URD	n	6	3	3
	MW±Standardfehler Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	397,5±45,7 449,4 (273,9;469,2) [184,1-474,3]	376,0±33,92 363,9 [324,3-439,9]	736,9±344,9 782,0 [118,3-1310,0]
	P (Kruskal-Wallis)	< 0,0001	0,0003	0,073

Tabelle 3.1-2 Phospholipide und Protein-Phospholipid-Verhältnis bei Kontrollen und allen Patientengruppen im Vergleich:

		PL (µg/ml)	Protein/PL
Kontrollen	n MW±Standardfehler Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	0	0
obB	n MW±Standardfehler Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	27 34,8±3,9 28,0 (20,2;51,5) [7,1-81,7]	27 3,1±0,3 2,9 (2,2;3,8) [0,8-6,2]
nobB	n MW±Standardfehler Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	12 42,6±7,9 35,8 (19,6;64,7) [11,8-92,9]	12 3,8±1,1 2,2 (1,6;4,5) [1,1-14,9]
CAP	n MW±Standardfehler Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	7 166,5±71,3 46,3 (22,4;403,0) [17,6-492,9]	7 6,9±1,7 6,5 (4,5;12,4) [1,0-14,1]
PAP	n MW±Standardfehler Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	12 253,6±73,9 158,3 (92,5;294,2) [36,5-841,0]	12 3,9±1,2 2,5 (1,1;4,6) [0,8-14,9]
URD	n MW±Standardfehler Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	6 186,0±93,2 110,3 (31,8;416,0) [28,0-631,0]	5 7,5±2,8 6,7 [0,9-16,6]
	P (Kruskal-Wallis)	< 0,0001	0,163

Tabelle 3.1-3 Darstellung der signifikant unterschiedlichen Gruppenpaare:

Dunn's Multiple Comparison Test		P
Gesamtprotein	Kon vs CAP	P < 0.01
	Kon vs PAP	P < 0.001
	Kon vs URD	P < 0.01
	obB vs CAP	P < 0.01
	obB vs PAP	P < 0.001
	obB vs URD	P < 0.01
	nobB vs CAP	P < 0.05
	nobB vs PAP	P < 0.01
	nobB vs URD	P < 0.05
SP-B	obB vs PAP	P < 0.001
SP-C	obB vs PAP	P < 0.05
Phospholipide	obB vs PAP	P < 0.001
	nobB vs PAP	P < 0.01

3.1.1 Gesamtproteingehalt

Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts der BAL zeigt signifikant unterschiedliche Werte, wie in der Tabelle 3.1-1 dargestellt. Bei dem paarweisen Vergleich der Gruppen mit dem Test nach Dunn ist für die Kontrollkinder im Vergleich zu den Gruppen CAP, PAP und URD der Proteingehalt mit einem $P < 0,01$ signifikant geringer, ebenso für die Gruppe obB im Vergleich zu den Gruppen CAP, PAP und URD. Der Proteingehalt der Gruppe nobB gegenüber den Gruppen CAP, PAP und URD ist mit einem $P < 0,05$ signifikant geringer. Die genauen Werte sind der Tabelle 3.1-3 zu entnehmen. Die Abbildung 3.1-1 zeigt den Gesamtproteingehalt bei den verschiedenen Gruppen.

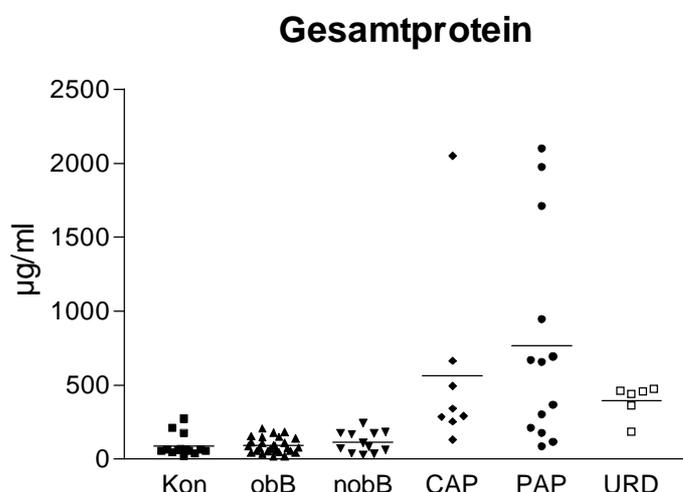


Abbildung 3.1-1 Gesamtproteingehalt der BAL bei Kontrollen, obB, nobB, CAP, PAP und URD mit jeweiligem Mittelwert.

3.1.2 SP-B-Gehalt

Der SP-B-Gehalt der BAL ist bei der Gruppe PAP im Vergleich zu den Kindern mit obstruktiver Bronchitis signifikant höher mit einem P-Wert von weniger als 0,001 (siehe Tabelle 3.1-1 und Tabelle 3.1-3). Bei den anderen Gruppen lassen sich keine signifikanten Unterschiede im Gehalt von SP-B messen. Die Abbildung 3.1-2 zeigt den SP-B-Gehalt für alle Gruppen.

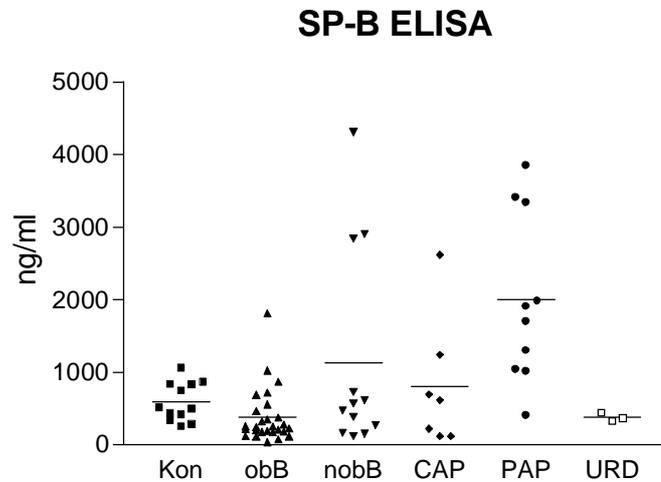


Abbildung 3.1-2 SP-B-Gehalt der BAL bei Kontrollen, obB, nobB, CAP,PAP und URD mit jeweiligem Mittelwert.

3.1.3 SP-C-Gehalt

Der Vergleich aller Gruppen bezüglich des SP-C-Gehalts der BAL zeigt mit dem Test nach Kruskal-Wallis mit einem P von 0,073 keinen signifikanten Unterschied. Mit dem Folgetest nach Dunn findet sich in der Gruppe PAP ein deutlich höherer Gehalt an SP-C in der BAL als bei der Gruppe obB ($P < 0.05$). Siehe auch Tabelle 3.1-1 und 3.1-3.

Die Abbildung 3.1-3 stellt den SP-C-Gehalt der verschiedenen Gruppen dar.

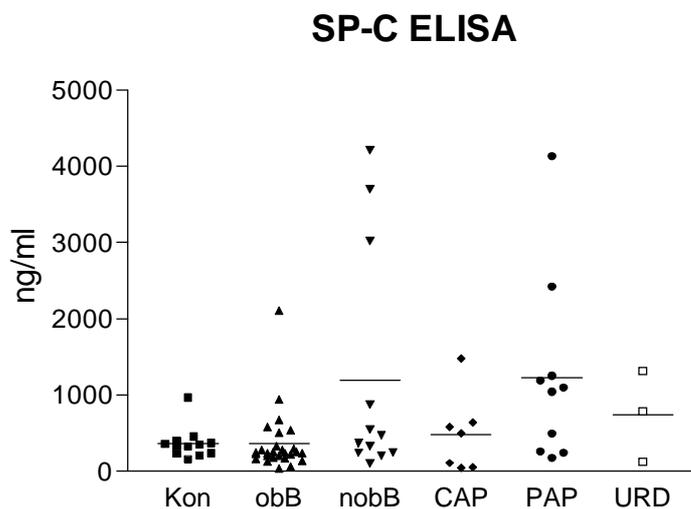


Abbildung 3.1-3 SP-C-Gehalt der BAL bei Kontrollen, obB, nobB, CAP, PAP und URD mit jeweiligem Mittelwert.

3.1.4 Phospholipidgehalt der BAL

Bei der Messung des Phospholipidgehalts in der BAL zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen mit einem P von weniger als 0,0001. Dabei ist ein deutlich höherer Gehalt an Phospholipiden in der Gruppe PAP im Vergleich zu der Gruppe obB ($P < 0.001$) und zu der Gruppe nobB ($P < 0.01$) nachweisbar, wie die Tabellen 3.1-2 und 3.1-3 zeigen.

Die Abbildung 3.1-4 stellt den Gehalt an Phospholipiden in der BAL bei den verschiedenen Gruppen dar.

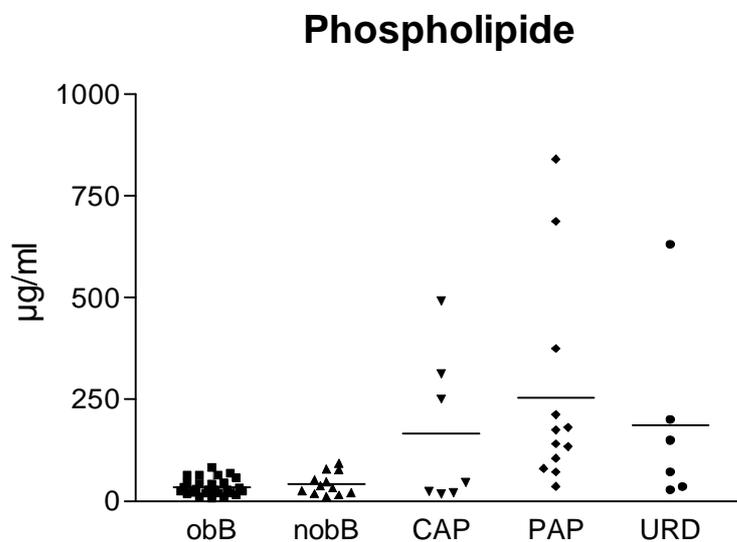


Abbildung 3.1-4 Phospholipidgehalt der BAL bei den Gruppen obB, nobB, CAP, PAP und URD mit jeweiligem Mittelwert.

3.1.5 Protein-/Phospholipidverhältnis der BAL

Das Verhältnis zwischen Protein und Phospholipiden in der BAL unterscheidet sich bei den verschiedenen Gruppen nicht signifikant voneinander. Das P nach Kruskal-Wallis beträgt dabei 0,163, wie die Tabelle 3.1-2 zeigt.

Die Abbildung 3.1-5 zeigt das Protein-/Phospholipid-Verhältnis bei den verschiedenen Gruppen.

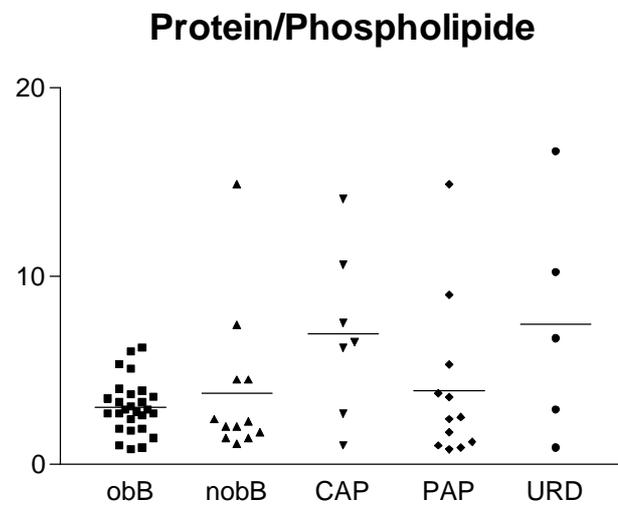


Abbildung 3.1-5 Protein-/Phospholipid-Verhältnis bei obB, nobB, CAP, PAP und URD mit jeweiligem Mittelwert.

3.2 Vergleich der klinischen Parameter

3.2.1 Kontrollen, obstruktive Bronchitis und nicht-obstruktive Bronchitis

3.2.1.1 Alter, Zellbild und Recovery der BAL

Tabelle 3.2-1 Alter, Zellgehalt, Zellvitalität und Recovery bei Kontrollen, obstruktiver Bronchitis und nicht-obstruktiver Bronchitis

	Kontrollen			obB		
	n	Mittelwert± Standardfehler	Med. (25.;75.Per.) [Min-Max]	n	Mittelwert± Standardfehler	Med. (25.;75.Per.) [Min-Max]
Alter (Jahre)	15	5,8±1,0	5,4 (2,2;9,9) [0,5-12,3]	27	5,1±0,8	4,6 (2,2;7,9) [0,3-15,2]
Gesamtzellzahl/µl	15	139,5±17,3	115,0 (91,3;190,0) [49,0-263,0]	26	203,8±32,1	157,0 (86,3;270,0) [21,0-812,5]
Makrophagen (%)	14	85,7±2,6	87,0 (82,5;92,0) [59,0-98,0]	26	75,5±3,5	79,5 (67,5;88,0) [22,0-95,0]
Lymphozyten (%)	14	12,3±2,2	11,5 (7,0;14,5) [1,0-34,0]	26	12,2±1,7	10,0 (4,0;16,0) [1,0-35,0]
Neutrophile (%)	14	1,5±0,3	1,0 (1,0;2,0) [0,0-4,0]	26	10,9±3,6	3,0 (1,5;10,5) [0,0-76,0]
Eosinophile (%)	14	0,4±0,3	0,0 (0,0;0,5) [0,0-4,0]	26	1,2±0,3	0,0 (0,0;2,5) [0,0-6,0]
Zellvitalität (%)	14	87,7±2,7	90,0 (80,0;97,5) [68,0-100,0]	25	80,2±2,7	82,0 (70,0;90,0) [50,0-100,0]
Recovery (%)	15	50,9±3,5	48,0 (42,5;63,5) [22,0-75,0]	26	54,5±3,0	54,5 (40,5;69,0) [28,0-85,0]

	nobB			P (Kruskal-Wallis)
	n	Mittelwert± Standardfehler	Med. (25.;75.Per.) [Min-Max]	
Alter (Jahre)	12	6,5±1,5	5,9 (1,9;10,4) [0,5-16,7]	0,702
Gesamtzellzahl/µl	12	190,8±33,2	175,0 (100,0;265,0) [54,0-445,0]	0,475
Makrophagen (%)	12	71,8±7,5	85,5 (57,0;91,0) [25,0-98,0]	0,167
Lymphozyten (%)	12	14,4±2,6	13,0 (7,1;22,5) [2,0-30,0]	0,724
Neutrophile (%)	12	11,4±4,3	2,5 (0,7;24,0) [0,0-37,5]	0,0503
Eosinophile (%)	11	1,3±0,9	0,4 (0,0;1,0) [0,0-10,0]	0,222
Zellvitalität (%)	12	84,2±2,8	88,5 (77,5;92,0) [65,0-94,0]	0,180
Recovery (%)	10	55,5±4,2	54,5 (44,5;71,0) [33,0-72,0]	0,803

In der Tabelle 3.2-1 sind das Alter zum Zeitpunkt der BAL, der Zellgehalt mit Differentialzellbild, die Zellvitalität und die Recovery der BAL für die Kontrollen, die Patienten mit obstruktiver Bronchitis und solche mit nicht-obstruktiver Bronchitis dargestellt. Dabei zeigt sich weder für das Alter noch für den Zellgehalt, die Zellvitalität oder die Recovery ein signifikanter Unterschied. Lediglich beim Paarvergleich für die Anzahl der neutrophilen Granulozyten ergibt sich eine signifikant niedrigere Menge an diesen Zellen in der Gruppe der Kontrollen gegenüber der Gruppe mit obstruktiver Bronchitis ($P < 0.05$).

Die Abbildungen 3.2-1 bis 3.2-8 zeigen das Alter, die Gesamtzellzahl, die Zahl an Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophilen sowie die Zellvitalität und die Recovery bei den Kontrollen, der Gruppe der obstruktiven Bronchitis und der Gruppe der nicht-obstruktiven Bronchitis.

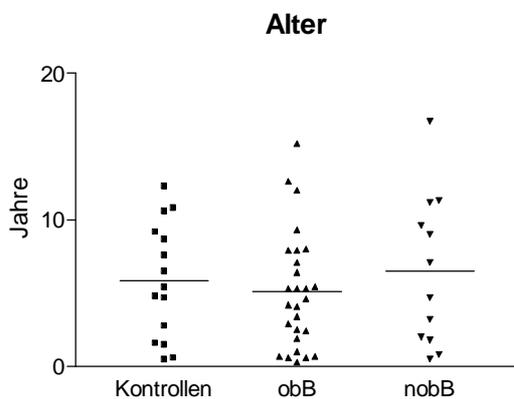


Abbildung 3.2-1 Alter zum Zeitpunkt der BAL bei Kontrollen, obstruktiver Bronchitis und nicht-obstruktiver Bronchitis mit Mittelwerten

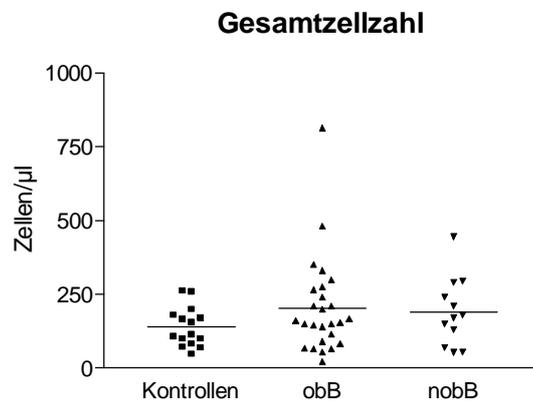


Abbildung 3.2-2 Gesamtzellzahl in der BAL bei Kontrollen, obstruktiver Bronchitis und nicht-obstruktiver Bronchitis mit Mittelwerten

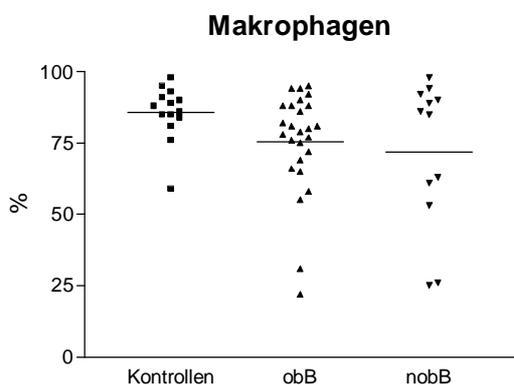


Abbildung 3.2-3 Makrophagen in der BAL bei Kontrollen, obstruktiver Bronchitis und nicht-obstruktiver Bronchitis mit Mittelwerten

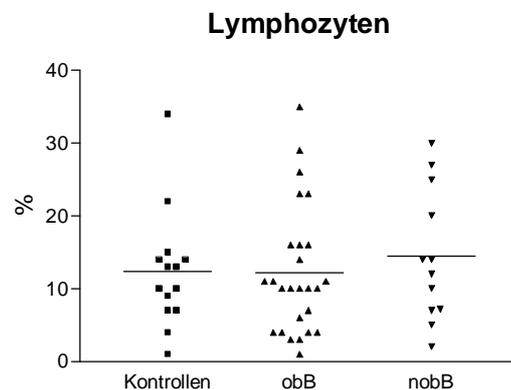


Abbildung 3.2-4 Lymphozyten in der BAL bei Kontrollen, obstruktiver Bronchitis und nicht-obstruktiver Bronchitis mit Mittelwerten

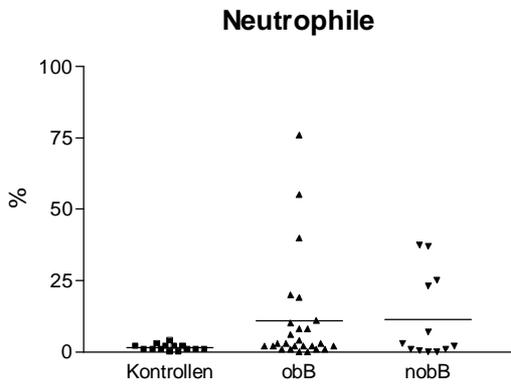


Abbildung 3.2-5 Neutrophile in der BAL bei Kontrollen, obstruktiver Bronchitis und nicht-obstruktiver Bronchitis mit Mittelwerten

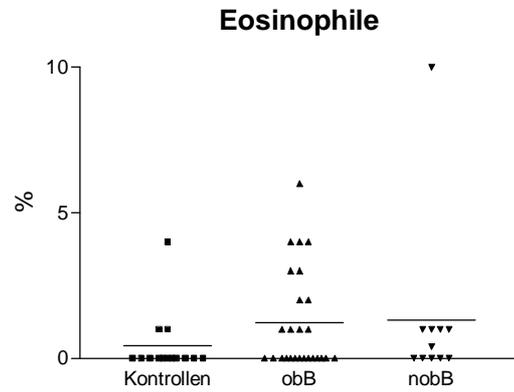


Abbildung 3.2-6 Eosinophile in der BAL bei Kontrollen, obstruktiver Bronchitis und nicht-obstruktiver Bronchitis mit Mittelwerten

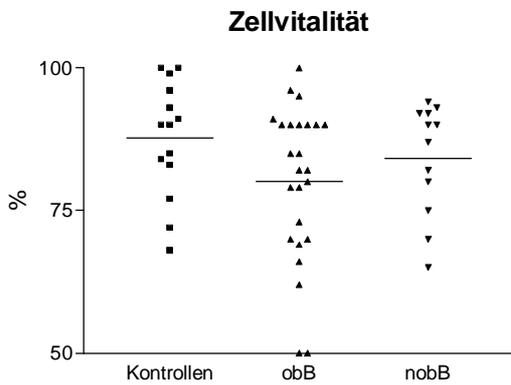


Abbildung 3.2-7 Zellvitalität in der BAL bei Kontrollen, obstruktiver Bronchitis und nicht-obstruktiver Bronchitis mit Mittelwerten

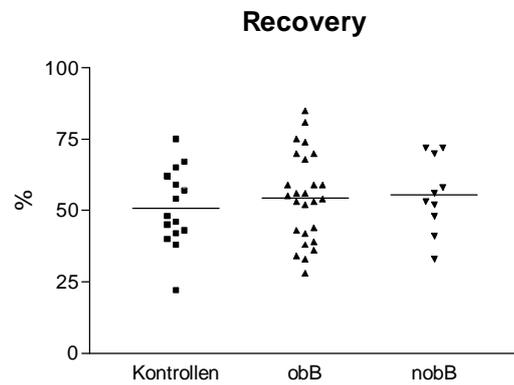


Abbildung 3.2-8 Recovery der BAL bei Kontrollen, obstruktiver Bronchitis und nicht-obstruktiver Bronchitis mit Mittelwerten

3.2.1.2 Klinische Untersuchung und Anamnesebefunde

Die Tabelle 3.2-2 zeigt Ergebnisse der klinischen Untersuchung und Anamnesebefunde bei den Kontrollen, der Gruppe mit obstruktiver Bronchitis und der Gruppe mit nicht-obstruktiver Bronchitis.

Tabelle 3.2-2 Untersuchungsbefunde und Anamnesebefunde bei Kontrollen, obstruktiver Bronchitis und nicht-obstruktiver Bronchitis

		Kontrollen	obB	nobB
Auskultation: RG's		0/10	11/24	0/8
Inhalationsbehandlung		0/15	19/27	5/10
Antibiotika		0/15	5/27	1/10
Rez. Infekte der oberen AW		5/5	21/24	8/10
Pneumonien	eine	0/15	7/27	1/10
	2 oder mehr	0/15	13/27	4/10
Asthma		0/15	16/23	3/11
Atopie		0/15	6/22	2/10
Passivrauchen		5/14	4/18	5/9
Haustiere		3/12	6/19	5/9
Familiäre Belastung	Eltern	5/14	9/23	2/11
	Großeltern	0/14	1/23	0/11
Verlauf seit BAL	gleich		3/21	1/9
	besser		16/21	8/9
	schlechter		2/21	0/9
Krankheitsdauer (Jahre)	n		24	8
	Mittelwert		3,31	2,45
	Standardfehler		0,51	0,55

3.2.2 CAP, PAP und URD

In der Tabelle 3.2-3 sind die klinischen Parameter der Patientengruppen CAP, PAP und URD dargestellt. Von 8 Patienten mit kongenitaler Alveolarproteinose sind 5 (63%) männlich, von 13 Patienten mit juveniler Alveolarproteinose sind 8 (62%) männlich und in der Gruppe URD sind dies alle 7 Patienten (100%).

7 von 8 Patienten (88%) der Gruppe CAP sind bereits verstorben, ebenso 2 von 13 Patienten (15%) der Gruppe PAP und 4 von 7 Patienten (57%) der Gruppe URD.

2 Kinder der Gruppe CAP (CAP 03 und CAP 06) weisen eine homozygot vorliegende Mutation im 121ins2-Gen auf, ein Patient aus der gleichen Gruppe (CAP 05) ist für diese Mutation heterozygot. Bei allen anderen Patienten konnte eine Mutation in diesem Gen ausgeschlossen werden.

Der Patient CAP 05 weist zusätzlich zu der heterozygot vorliegenden Mutation im 121ins2-Gen heterozygot die Mutation 457delC auf, der Patient CAP 02 trägt homozygot die Mutation 496delG, der Patient URD 01 ist homozygot für die Mutation C4517T und bei dem Patienten URD 04 wurde heterozygot die Mutation G4521A nachgewiesen.

In der Gruppe PAP wurden keine Mutationen im SFTPB-Gen gefunden, jedoch ließen sich bei drei Patienten SFTPC-Mutationen nachweisen. So zeigte sich bei dem Patienten PAP 08 die Mutation g.1286T>C, bei den Patienten PAP 02 und PAP 10 ließ sich die Mutation g.2125G>A finden (37, 38).

Tabelle 3.2-3 Klinische Parameter der Patientengruppen CAP, URD und PAP.

	m/w	Alter bei Diagnose	Herkunft	Diagnoseverfahren	Klinik bei Diagnose	CT/Rö	SFTPB-Mutation: 121-ins2 sonst. Mutation	SFTPC-Mutation	Verlauf
CAP 01	m	neonatal	Frankreich	BAL: PAS, EM	neonatal RD, O ₂ -Bedarf	AII	-/- -		† 5 Mo
CAP 02	m	neonatal	Reunion Island	BAL	neonatal RD	DSV	-/- 496delG homozygot		† 5 Wo
CAP 03	w	neonatal	Niederlande	TS	neonatal RD		+/+		†
CAP 04	w	neonatal	Frankreich	BAL	neonatal RD	WL (Rö)	-/- -		† 1 Mo
CAP 05	w	neonatal	Niederlande	BAL	neonatal RD	DSV	+/- 457delC heterozygot		† 4 Wo
CAP 06	m	neonatal	Deutschland	BAL	neonatal RD, O ₂ -Bedarf	WL (CT)	+/+		†
CAP 07	m	neonatal	Frankreich	TBB: PAS	neonatal RD, O ₂ -Bedarf, Anämie	AI (Rö)	-/ Marker exclusion		† 4 Mo
CAP 08	m	neonatal	Algerien	BAL, TBB: PAS, EM	neonatal RD	WL	-/- -		Glukokortikoide

URD 01	m	neonatal	Algerien	BAL	neonatal RD, Anämie, Neutropenie, Ikterus, Muskelhypotonie		-/ C4517T (homozygot)		† 8 Tage
URD 02	m	4 Mo	Deutschland	TS	Juvenil RD, NHL		-/ -		†
URD 03	m	neonatal	Frankreich		Neonatal RD	HMD (Rö)	-/ -		
URD 04	m	neonatal	Schweiz	BAL	Neonatal RD, FG 26 SSW, Leukodystrophie, Thymusinvolution	HMD (Rö)	-/ G4521A		† 4 Mo
URD 05	m	neonatal	Frankreich	BAL	Neonatal RD, O ₂ -Bedarf	HMD (Rö)	-/ -		† 10 Tage
URD 06	m	neonatal	Frankreich	BAL	Neonatal RD, O ₂ -Bedarf, FG 29 SSW	HMD (Rö)	-/ -		
URD 07	m	neonatal	Griechenland/ Deutschland	BAL	Neonatal RD, O ₂ -Bedarf, FG 36 SSW, primäre Reanimation	AII	-/ -		mit 2 J. unauffällig

	m/w	Alter bei Diagnose	Herkunft	Diagnoseverfahren	Klinik bei Diagnose	CT/Rö	SFTPB-Mutation: 121-ins2 sonst. Mutation	SFTPC-Mutation	Verlauf
PAP 01	m	juvenil	Türkei	Biopsie: PAS	Husten	NI	-/- Marker exclusion		Fiebriger Husten
PAP 02	w	24 Mo	Reunion Island	BAL	Dyspnoe, Gedeihstörung, Anämie	II, MLN	-/- -	g.2125G>A	Dyspnoe, Gedeihstörung, wdh BAL
PAP 03	m	19 Mo	Frankreich	OLB	Dyspnoe, Husten, O ₂ -Bedarf, Anämie, CML	AII	-/- -		Dyspnoe, Husten, O ₂ , wdh BAL
PAP 04	w	7 Mo	Deutschland	BAL	Husten	II (Rö)	-/- -		Dyspnoe, fiebriger Husten, wdh BAL
PAP 05	w	11 J.	Frankreich	OLB	DA, Gedeihstörung	AII	-/- -		DA, Gedeihstörung
PAP 06	m	2,5 Mo	Reunion Island	BAL	Dyspnoe, Husten, Gedeihstörung, O ₂ -Bedarf, Anämie, Hepatomegalie	AII	-/- -		† 15 Mo
PAP 07	m	12 Mo	Reunion Island	BAL	Dyspnoe, Husten, Gedeihstörung, O ₂ -Bedarf, Anämie, Hepatosplenomegalie	AII	-/- -		Dyspnoe, Husten, O ₂ , wdh BAL
PAP 08	m	13 Mo	Deutschland	Biopsie	Dyspnoe, Husten	AII	-/- -	g.1286T>C	Dyspnoe, Husten, wdh BAL
PAP 09	m	10 Mo	Reunion/Frankreich	BAL, OLB	DA, Husten, Gedeihstörung, O ₂ -Bedarf, Anämie	AII	-/- -		DA, Husten, Gedeihstörung, wdh BAL
PAP 10	w	8 Mo	Reunion Island	BAL	Dyspnoe, Gedeihstörung, O ₂ -Bedarf, Anämie	AII	-/- -	g.2125G>A	† 20 Mo
PAP 11	m	3 J.	Tunesien	BAL, OLB	DA	AII	-/- -		DA, wdh BAL
PAP 12	w	4 J.	Tunesien	BAL	Dyspnoe, Gedeihstörung, O ₂ -Bedarf, Anämie	AII, MLN	-/- -		Dyspnoe, O ₂ , Gedeihstörung, wdh BAL
PAP 13	m	4 J.	Reunion Island	BAL, TBB	Dyspnoe, Husten, Gedeihstörung, O ₂ -Bedarf, Lippen-, Gaumenspalte	AII	-/- -		Dyspnoe, Husten, O ₂ , Gedeihstörung

Abkürzungen: PAS=Periodic acid Schiff, EM=Elektronenmikroskopie, AI=alveoläres Infiltrat, AII=alveoläres und interstitielles Infiltrat, II=interstitielles Infiltrat, MLN=mediastinale Lymphknoten, wdh=wiederholt, CML=chron. myeloische Leukämie, Rö=Röntgen Thorax, WL=weiße Lunge, DSV=diffuse symm. Verschattung, NI=noduläres Infiltrat, OLB=offene Lungenbiopsie, TBB=transbronchiale Biopsie, DA=Dyspnoe bei Anstrengung, TS=Trachealsekret, NHL=Non-Hodgkin-Lymphom, HMD=Hyaline Membrankrankheit

3.3 1-D-Gelelektrophorese und Western Blotting

3.3.1 SP-B

3.3.1.1 Kontrollen

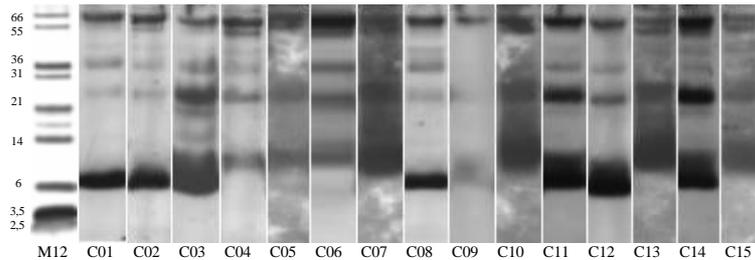


Abbildung 3.3-1 Inkubation der BALs der Kontrollgruppe mit dem AK gegen SP-B nach Inkubation mit dem AK gegen CTERMB. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Die Abbildung 3.3-1 zeigt die Inkubation der BALs der Kontrollgruppe mit dem Antikörper gegen SP-B. Dabei kann in jeder der 15 Kontroll-BALs SP-B nachgewiesen werden, wobei das Molekulargewicht im Mittel bei 8,7 kDa liegt, wie die Tabelle 3.3-1 zeigt.

Tabelle 3.3-1 Molekulargewicht des nachgewiesenen SP-B in der Gruppe der Kontrollen (n = 15).

	Mittelwert ± Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]
Molekulargewicht (kDa)	8,7 ± 0,6	7,1 (6,9;11,1) [5,9-11,6]

3.3.1.2 Obstruktive Bronchitis

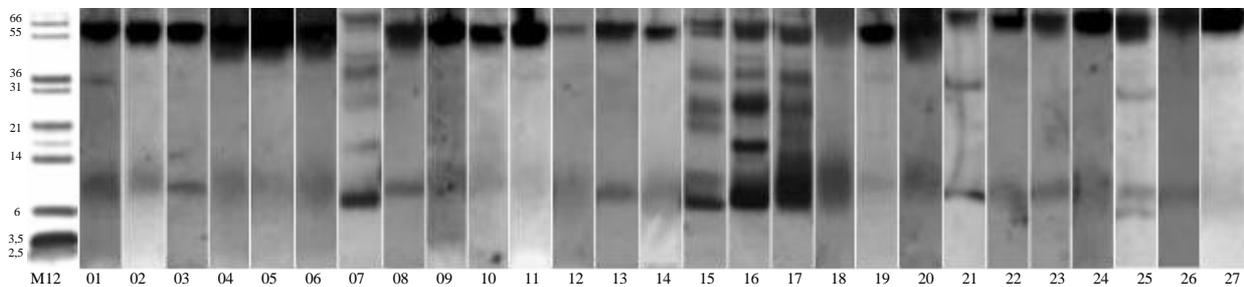


Abbildung 3.3-2 Inkubation der BAL-Unterphasen der Gruppe mit obstruktiver Bronchitis mit dem AK gegen SP-B. Die Lanes der Patienten obB 07, obB 15, obB 16 und obB 17 zeigen Lavage, wobei diese Membranen vorher mit dem AK Pro-SP-B Whitsett inkubiert wurden. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

In der Gruppe der 27 Patienten mit obstruktiver Bronchitis kann in jeder BAL SP-B nachgewiesen werden, wie die Abbildung 3.3-2 zeigt.

Tabelle 3.3-2 Molekulargewicht des nachgewiesenen SP-B in der Gruppe mit obstruktiver Bronchitis (n = 27).

	Mittelwert ± Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]
Molekulargewicht (kDa)	10,7 ± 0,3	11,0 (9,5;12,0) [8,0-13,5]

3.3.1.3 Nicht-obstruktive Bronchitis

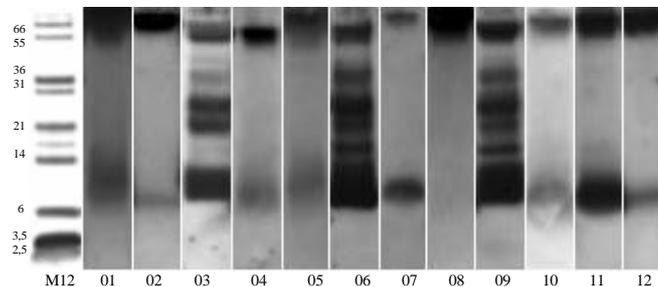


Abbildung 3.3-3 Inkubation der BAL-Unterphasen der Gruppe mit nicht-obstruktiver Bronchitis mit dem AK gegen SP-B. Die Lanes der Patienten nobB 03, nobB 06 und nobB 09 zeigen Lavage, wobei diese Membranen vorher mit dem AK Pro-SP-B Whitsett inkubiert wurden. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Auch in der Gruppe der 12 Patienten mit nicht-obstruktiver Bronchitis kann in jeder der BALs SP-B nachgewiesen werden, wie in der Abbildung 3.3-3 dargestellt ist.

Tabelle 3.3-3 Molekulargewicht des nachgewiesenen SP-B in der Gruppe mit nicht-obstruktiver Bronchitis (n = 12).

	Mittelwert ± Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]
Molekulargewicht (kDa)	10,9 ± 0,4	11,0 (9,7;12,3) [8,5-12,5]

3.3.1.4 CAP

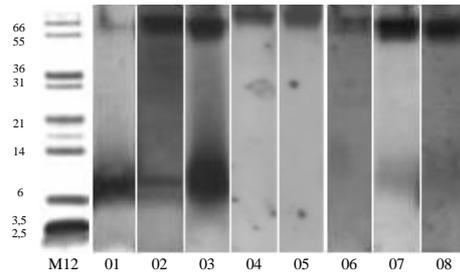


Abbildung 3.3-4 Inkubation der BAL-Unterphasen der Gruppe CAP mit dem AK gegen SP-B. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Die Abbildung 3.3-4 zeigt das SP-B in den BAL-Unterphasen der Gruppe CAP. Während bei den Patienten CAP 01, 02, 03, 07 und 08 SP-B nachgewiesen werden kann, ist in den BALs der Patienten CAP 04, 05 und 06 kein SP-B darstellbar.

Tabelle 3.3-4 Molekulargewicht des nachgewiesenen SP-B in der Gruppe CAP (n = 5).

	Mittelwert \pm Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]
Molekulargewicht (kDa)	10,6 \pm 1,1	10,8 [7,0-14,0]

3.3.1.5 PAP

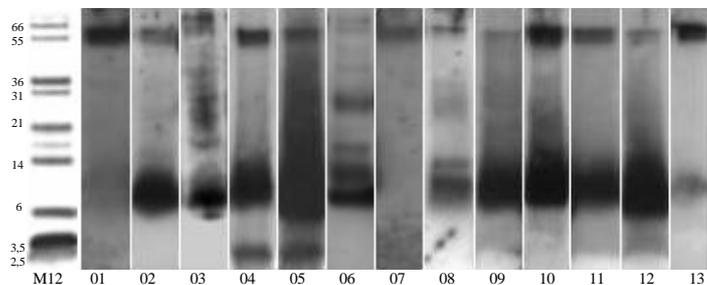


Abbildung 3.3-5 Inkubation der BAL-Unterphasen der Gruppe PAP mit dem AK gegen SP-B. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

In der Gruppe PAP ist bei allen 13 Patienten SP-B nachweisbar, wie die Abbildung 3.3-5 zeigt.

Tabelle 3.3-5 Molekulargewicht des nachgewiesenen SP-B in der Gruppe PAP (n = 13).

	Mittelwert ± Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]
Molekulargewicht (kDa)	10,5 ± 0,4	10,5 (9,0;11,8) [8,5-13,0]

3.3.1.6 URD

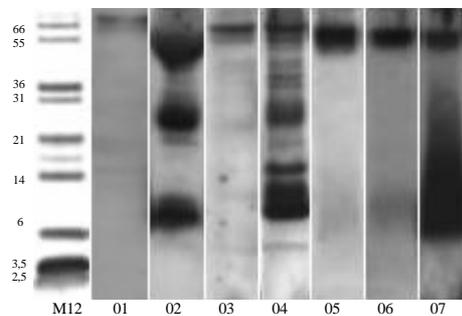


Abbildung 3.3-6 Inkubation der BAL-Unterphasen der Gruppe URD mit dem AK gegen SP-B. Die Lane des Patienten URD 04 zeigt Lavage, wobei diese Membran vorher mit dem AK Pro-SP-B Whitsett inkubiert wurde. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Die Abbildung 3.3-6 macht deutlich, dass bei 6 der 7 Patienten der Gruppe URD SP-B nachweisbar ist. Bei dem Patienten URD 03 ist nur eine sehr schwache Bande im Bereich des SP-B zu erkennen.

Tabelle 3.3-6 Molekulargewicht des nachgewiesenen SP-B in der Gruppe URD (n = 6).

	Mittelwert ± Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]
Molekulargewicht (kDa)	9,2 ± 0,8	9,8 (6,9;11,0) [6,3-11,2]

3.3.2 SP-C

3.3.2.1 Kontrollen

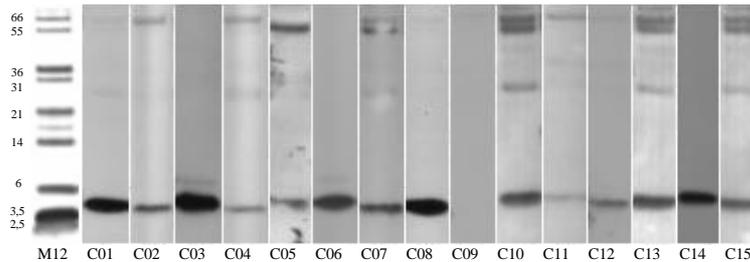


Abbildung 3.3-7 Inkubation der BALs der Kontrollgruppe mit dem AK gegen SP-C. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Die Abbildung 3.3-7 stellt das SP-C in der Gruppe der Kontrollen dar, das bei 14 der 15 Patienten nachweisbar ist. Nur bei dem Patienten C 09 ist keine Bande im Bereich des SP-C sichtbar. Der Mittelwert für die Molekulargewichte der 14 nachgewiesenen SP-C liegt bei 4,8 kDa, wie die Tabelle 3.3-7 zeigt.

Tabelle 3.3-7 Molekulargewicht des nachgewiesenen SP-C in der Gruppe der Kontrollen (n = 14).

	Mittelwert ± Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]
Molekulargewicht (kDa)	4,8 ± 0,1	4,7 (4,5;5,0) [4,3-5,8]

3.3.2.2 Obstruktive Bronchitis

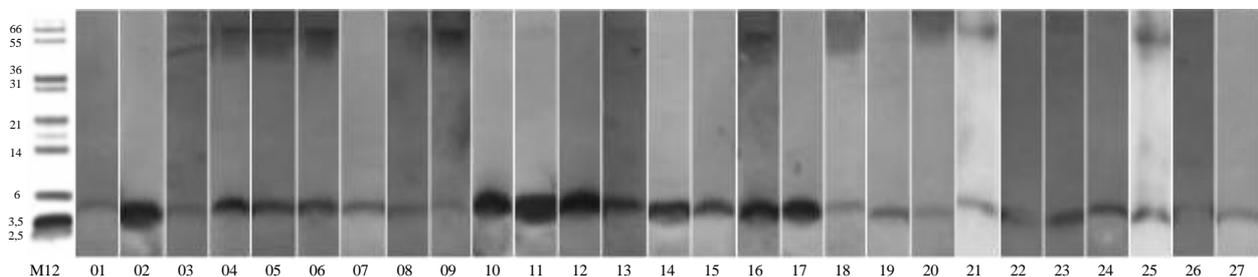


Abbildung 3.3-8 Inkubation der BAL-Unterphasen der Gruppe mit obstruktiver Bronchitis mit dem AK gegen SP-C. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

In der Gruppe der obstruktiven Bronchitis kann bei jedem der 27 Patienten SP-C nachgewiesen werden, wie die Abbildung 3.3-8 zeigt.

Tabelle 3.3-8 Molekulargewicht des nachgewiesenen SP-C in der Gruppe der obstruktiven Bronchitis (n = 27).

	Mittelwert ± Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]
Molekulargewicht (kDa)	5,2 ± 0,1	5,4 (4,8;5,4) [3,9-6,0]

3.3.2.3 Nicht-obstruktive Bronchitis

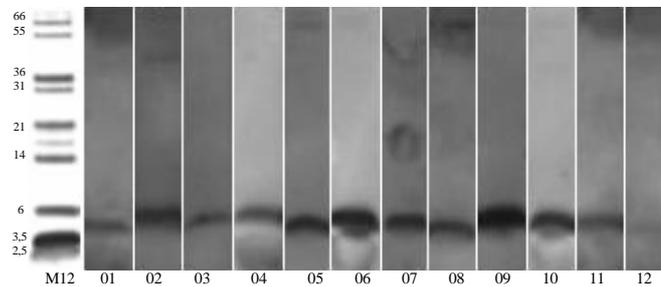


Abbildung 3.3-9 Inkubation der BAL-Unterphasen der Gruppe mit nicht-obstruktiver Bronchitis mit dem AK gegen SP-C. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

In der Gruppe der nicht-obstruktiven Bronchitis lässt sich bei jedem der 12 Patienten ein SP-C darstellen, wie aus der Abbildung 3.3-9 ersichtlich ist.

Tabelle 3.3-9 Molekulargewicht des nachgewiesenen SP-C in der Gruppe der nicht-obstruktiven Bronchitis (n = 12).

	Mittelwert ± Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]
Molekulargewicht (kDa)	5,2 ± 0,1	5,3 (4,9;5,4) [4,8-5,4]

3.3.2.4 CAP

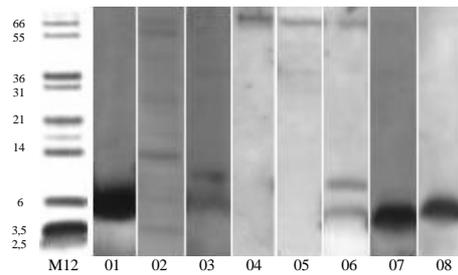


Abbildung 3.3-10 Inkubation der BAL-Unterphasen der Gruppe CAP mit dem AK gegen SP-C nach Inkubation mit dem AK Pro-SP-C. Die Membran der Lane 02 zeigt Lavage und wurde vorher mit dem AK NPRO-SP-C-C2 inkubiert. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Bei 6 der 8 Patienten der Gruppe CAP kann ein SP-C nachgewiesen werden. Der Patient CAP 02 zeigt nur eine sehr schwache Bande, bei den Patienten CAP 04 und 05 lässt sich keine Bande im Bereich des SP-C darstellen.

Tabelle 3.3-10 Molekulargewicht des nachgewiesenen SP-C in der Gruppe CAP (n = 6).

	Mittelwert ± Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]
Molekulargewicht (kDa)	5,3 ± 0,4	5,4 (4,3;6,3) [3,6-6,5]

3.3.2.5 PAP

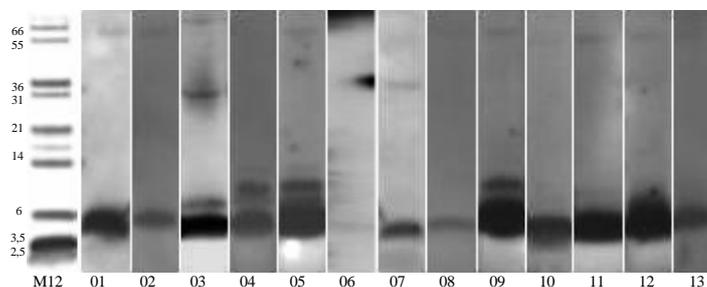


Abbildung 3.3-11 Inkubation der BAL-Unterphasen der Gruppe PAP mit dem AK gegen SP-C nach Inkubation mit dem AK Pro-SP-C. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Wie aus der Abbildung 3.3-11 ersichtlich ist, kann bei jedem der 13 Patienten der Gruppe PAP SP-C nachgewiesen werden.

Tabelle 3.3-11 Molekulargewicht des nachgewiesenen SP-C in der Gruppe PAP (n = 13).

	Mittelwert ± Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]
Molekulargewicht (kDa)	4,7 ± 0,2	4,8 (4,3;5,0) [3,6-5,4]

3.3.2.6 URD

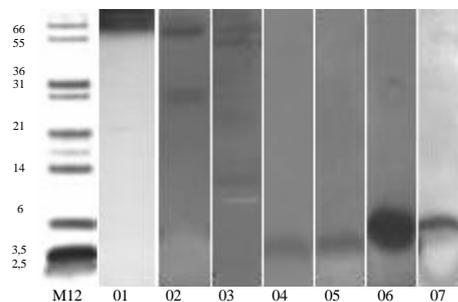


Abbildung 3.3-12 Inkubation der BAL-Unterphasen der Gruppe URD mit dem AK gegen SP-C. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Bei 4 der 7 Patienten der Gruppe URD ist SP-C nachweisbar. Bei den Patienten URD 01, 02 und 03 kann kein SP-C dargestellt werden, wie die Abbildung 3.3-12 zeigt.

Tabelle 3.3-12 Molekulargewicht des nachgewiesenen SP-C in der Gruppe URD (n = 4).

	Mittelwert ± Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]
Molekulargewicht (kDa)	5,7 ± 0,6	5,7 [4,3-7,0]

3.3.3 Pro-SP-B

3.3.3.1 Obstruktive Bronchitis

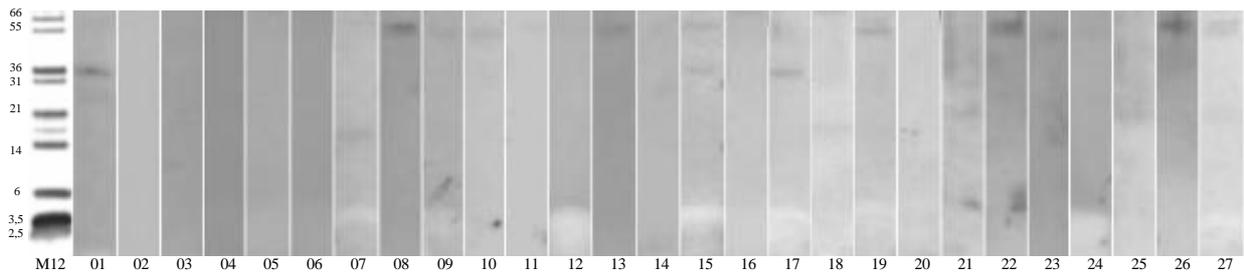


Abbildung 3.3-13 Inkubation der BAL-Unterphasen der Gruppe mit obstruktiver Bronchitis mit dem AK gegen Pro-SP-B. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Die Abbildung 3.3-13 zeigt Pro-SP-B in der BAL-Unterphase der Gruppe mit obstruktiver Bronchitis. Eine Bande bei 18 kDa ist bei den Patienten obB 07 und obB 18 darstellbar, eine Bande bei 24 kDa in der Lane des Patienten obB 27. Außerdem zeigt sich eine Bande bei 26-28 kDa bei den Patienten obB 01 und obB 18 sowie eine Bande bei 36-38 kDa bei den Patienten obB 01, obB 15 und obB 17.

3.3.3.2 Nicht-obstruktive Bronchitis

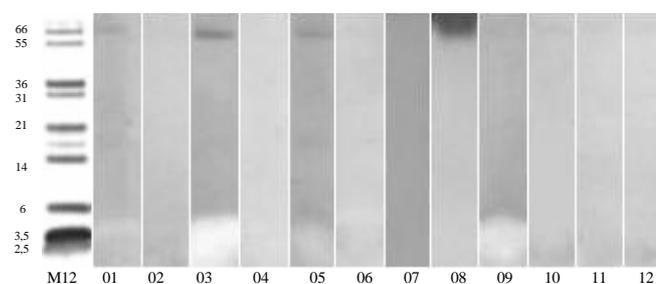


Abbildung 3.3-14 Inkubation der BAL-Unterphasen der Gruppe mit nicht-obstruktiver Bronchitis mit dem AK Pro-SP-B. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

In der Gruppe der nicht-obstruktiven Bronchitis lässt sich, wie die Abbildung 3.3-14 zeigt, keine Bande darstellen.

3.3.3.3 CAP

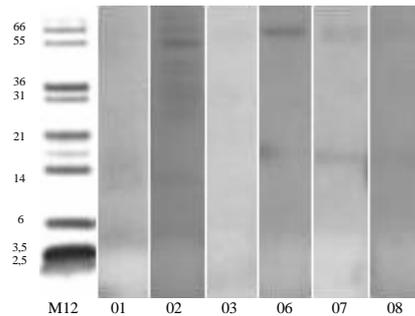


Abbildung 3.3-15 Inkubation der BAL-Unterphasen der Gruppe CAP mit dem AK Pro-SP-B. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa. Bei den Patienten CAP 04 und 05 wurde wegen Materialmangels keine Inkubation mit diesem AK durchgeführt.

Aus der Gruppe CAP wurden die Membranen von 6 Patienten mit dem Antikörper Pro-SP-B inkubiert. Wie die Abbildung 3.3-15 zeigt, findet sich eine Bande bei 12-14 kDa bei den Patienten CAP 01 und CAP 02, eine Bande bei 18 kDa bei dem Patienten CAP 07 und eine Bande bei 26-45 kDa bei dem Patienten CAP 02.

3.3.3.4 PAP

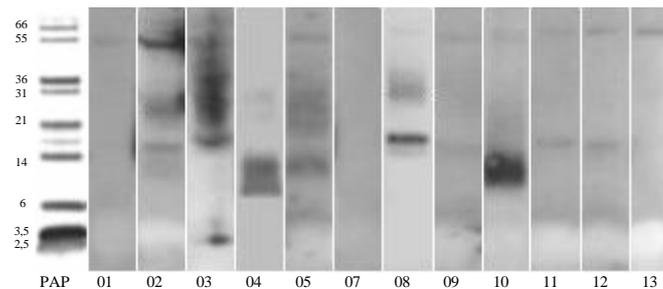


Abbildung 3.3-16 Inkubation der BAL-Unterphasen der Gruppe PAP mit dem AK Pro-SP-B. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa. Bei dem Patienten PAP 06 wurde wegen Materialmangels keine Inkubation mit diesem AK durchgeführt.

Die Abbildung 3.3-16 zeigt die mit dem Antikörper Pro-SP-B reagierenden Banden der Unterphase in der Gruppe PAP. Dabei lässt sich einmal eine Bande bei 8 kDa bei dem Patienten PAP 04 darstellen und eine Bande bei 12 kDa bei den Patienten PAP 04, PAP 05 und PAP 10. Eine Bande bei 14 kDa findet sich einmal bei dem Patienten PAP 08 und eine Bande bei 18 kDa lässt sich bei den Patienten PAP 02, PAP 08, PAP 09, PAP 11 und PAP 12 nachweisen. Bei 26 kDa findet sich bei den Patienten PAP 02, PAP 04 und PAP 08 eine

Bande. Außerdem lässt sich eine Bande bei 28 kDa bei dem Patienten PAP 04 darstellen sowie eine Bande bei 21-28 kDa bei dem Patienten PAP 05.

3.3.3.5 URD

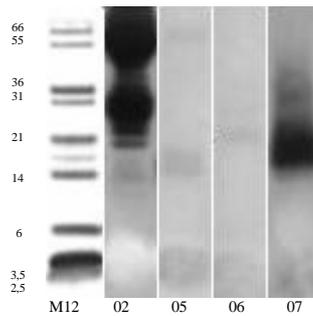


Abbildung 3.3-17 Inkubation der BAL-Unterphasen der Gruppe URD mit dem AK Pro-SP-B. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa. Bei den Patienten URD 01, 03, 04 wurde wegen Materialmangels keine Inkubation mit diesem AK durchgeführt.

Die Abbildung 3.3-17 zeigt die Inkubation der Unterphasen von 4 der Patienten der Gruppe URD mit dem Antikörper Pro-SP-B. Bei dem Patienten URD 02 finden sich Banden bei 12, 14, 21, 25, 26-36, 38 und >40 kDa. Bei dem Patienten URD 05 lässt sich eine Bande bei 14-18 kDa darstellen, bei dem Patienten URD 06 eine Bande bei 22-24 kDa und bei dem Patienten URD 07 eine Bande bei 12 kDa sowie eine Bande bei 14-26 kDa.

3.3.3.6 Vergleich der Bandenverteilung

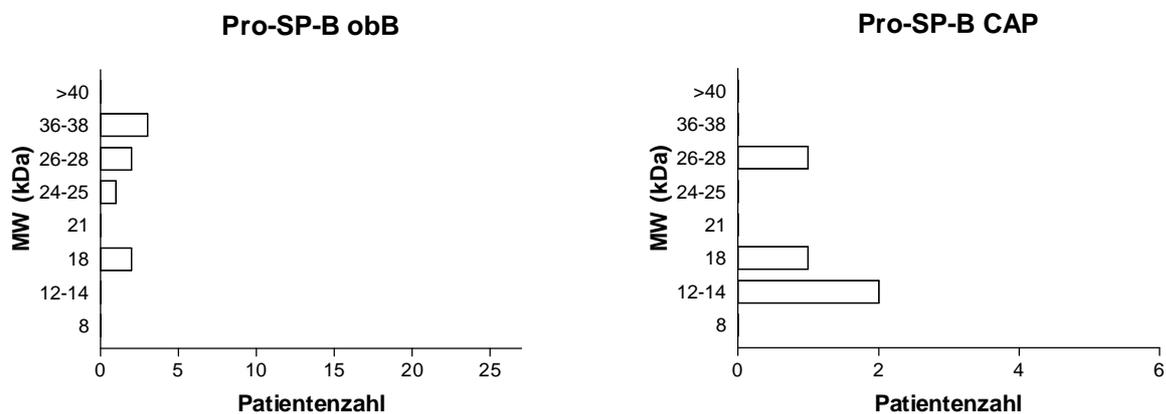


Abbildung 3.3-18 Darstellung der Bandenverteilung in den Gruppen obB und CAP

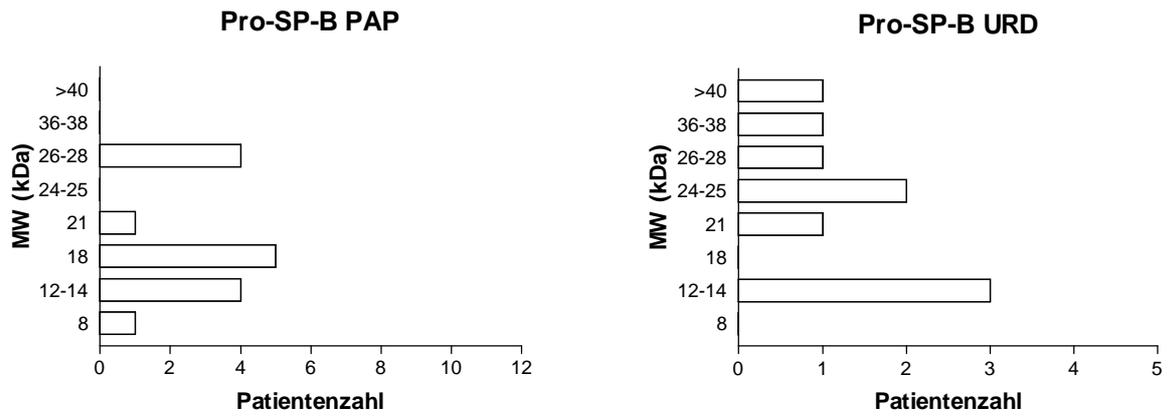


Abbildung 3.3-19 Darstellung der Bandenverteilung in den Gruppen PAP und URD

3.3.4 Pro-SP-C

3.3.4.1 Obstruktive Bronchitis

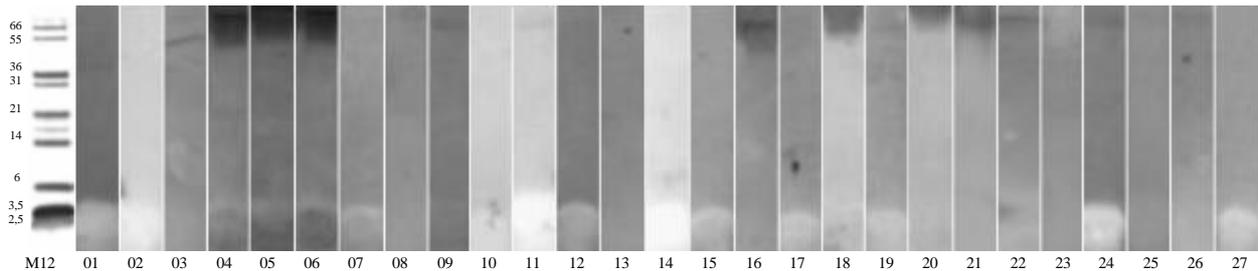


Abbildung 3.3-20 Inkubation der BAL-Unterphasen der Gruppe mit obstruktiver Bronchitis mit dem AK gegen Pro-SP-C. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Wie die Abbildung 3.3-20 deutlich macht, finden sich in der Gruppe der Patienten mit obstruktiver Bronchitis keine Banden bei Inkubation der BAL-Unterphasen mit dem Antikörper Pro-SP-C.

3.3.4.2 Nicht-obstruktive Bronchitis

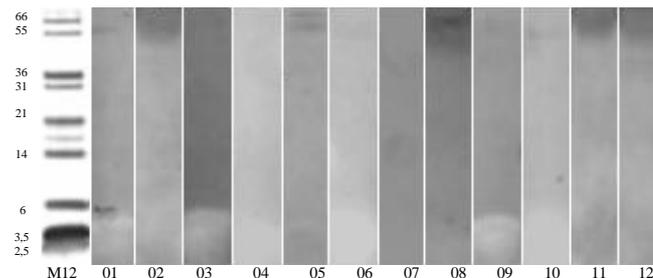


Abbildung 3.3-21 Inkubation der BAL-Unterphasen der Gruppe mit nicht-obstruktiver Bronchitis mit dem AK Pro-SP-C. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

In der Gruppe der Patienten mit nicht-obstruktiver Bronchitis können mit dem Antikörper Pro-SP-C keine Banden dargestellt werden, wie die Abbildung 3.3-21 zeigt.

3.3.4.3 CAP

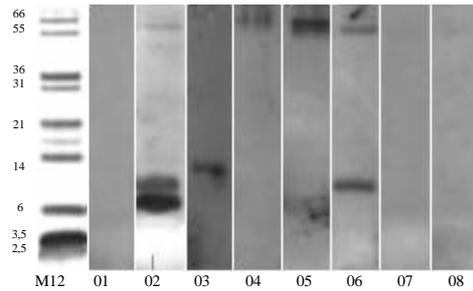


Abbildung 3.3-22 Inkubation der BAL-Unterphasen der Gruppe CAP mit dem AK Pro-SP-C. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

In der Gruppe CAP kann, wie die Abbildung 3.3-22 zeigt, eine Bande bei 8 kDa bei dem Patienten CAP 02 sowie eine Bande bei 10 kDa bei den Patienten CAP 02 und CAP 06 dargestellt werden. Im Bereich von 12 kDa findet sich eine Bande bei dem Patienten CAP 03.

3.3.4.4 PAP

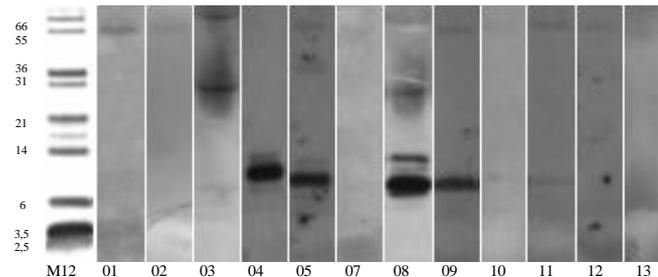


Abbildung 3.3-23 Inkubation der BAL-Unterphasen der Gruppe PAP mit dem AK Pro-SP-C. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa. Bei dem Patienten PAP 06 wurde wegen Materialmangels keine Inkubation mit diesem AK durchgeführt.

Die Abbildung 3.3-23 zeigt die Inkubation der Unterphasen von 12 Patienten der Gruppe PAP mit dem Antikörper Pro-SP-C. Dabei kann bei den Patienten PAP 03, PAP 04, PAP 05 und PAP 08 eine Bande bei 8 kDa gefunden werden. Die Patienten PAP 04, PAP 05, PAP 08, PAP 09 und PAP 11 weisen eine Bande bei 10 kDa auf, die Patienten PAP 04, PAP 05 und PAP 08 zusätzlich bei 12 kDa. Der Patient PAP 08 zeigt außerdem eine Bande bei 14 kDa.

3.3.4.5 URD

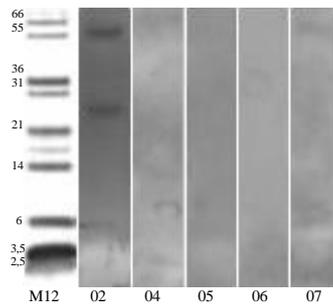


Abbildung 3.3-24 Inkubation der BAL-Unterphasen der Gruppe URD mit dem AK Pro-SP-C. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa. Bei den Patienten URD 01 und 03 wurde wegen Materialmangels keine Inkubation mit diesem AK durchgeführt.

In der Gruppe URD findet sich, wie die Abbildung 3.3-24 zeigt, eine Bande bei 28-30 kDa bei dem Patienten URD 02.

3.3.4.6 Vergleich der Bandenverteilung

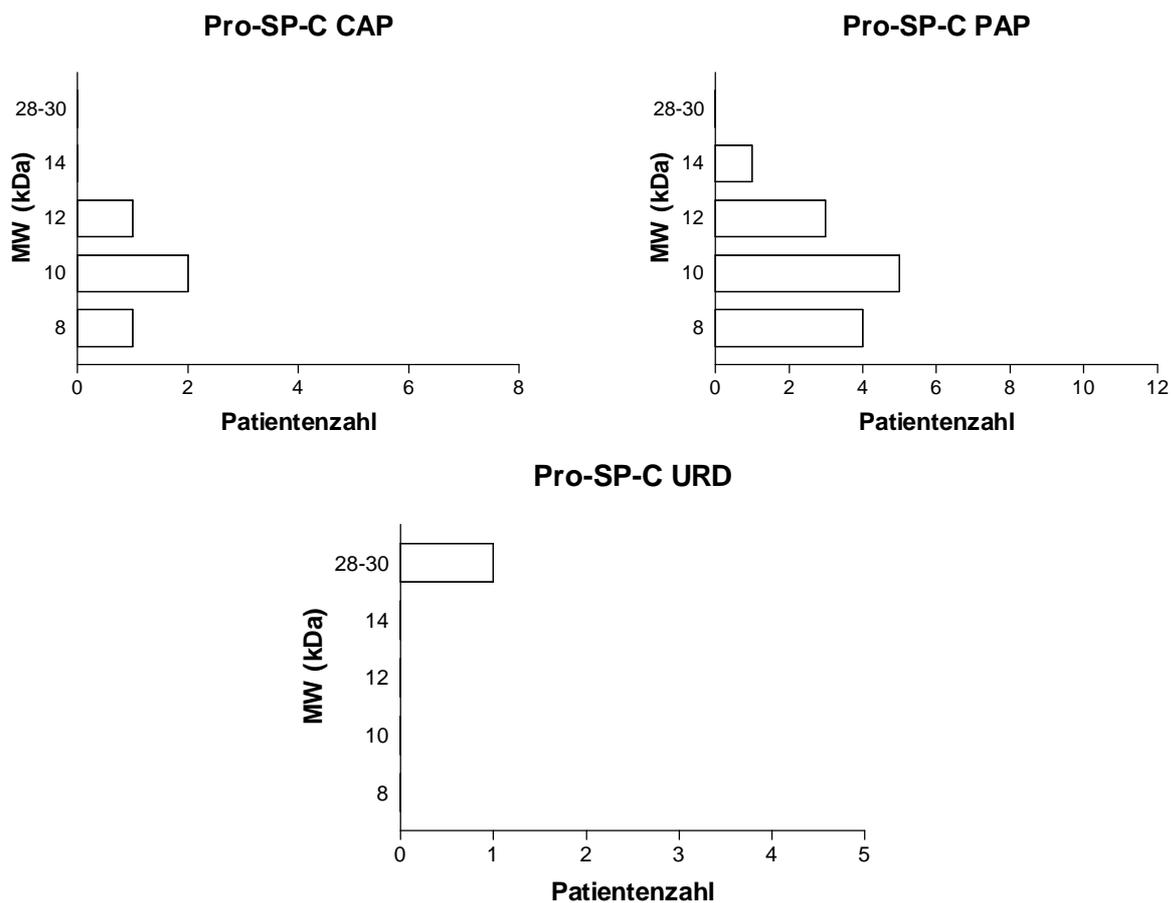


Abbildung 3.3-25 Darstellung der Bandenverteilung in den Gruppen CAP, PAP und URD nach Inkubation mit dem Antikörper Pro-SP-C

In der Tabelle 3.3-13 ist die Häufigkeit der einzelnen Banden nach Inkubation mit dem Antikörper Pro-SP-C in den verschiedenen Gruppen dargestellt.

Tabelle 3.3-13 Übersicht über die Bandenverteilung bei Inkubation mit Pro-SP-C. In Klammern steht die Patientenzahl.

kDa	obB (27)	nobB (12)	CAP (8)	PAP (12)	URD (5)
14	0%	0%	0%	8% (1)	0%
12	0%	0%	13% (1)	25% (3)	0%
10	0%	0%	25% (2)	42% (5)	0%
8	0%	0%	13% (1)	33% (4)	0%

3.3.5 CTERMB

3.3.5.1 Kontrollen

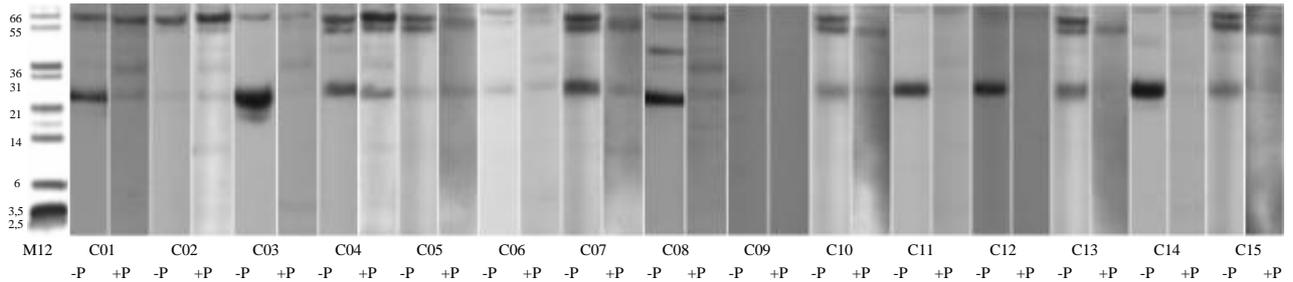


Abbildung 3.3-26 CTERMB in der BAL ohne (-P) und mit (+P) Peptid in der Gruppe der Kontrollen. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Tabelle 3.3-14 Molekulargewicht und Häufigkeit der Banden bei Inkubation mit CTERMB in der Gruppe der Kontrollen

Molekulargewicht (kDa)		Anzahl
Mittelwert \pm Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	
19,2	19,2	1/15
24,8 \pm 0,5	24,5 (23,2;26,3) [22,4-28,2]	12/15
39,6	39,6	1/15

Die Abbildung 3.3-26 zeigt die Inkubation der Kontroll-BALs mit CTERMB, jeweils ohne und mit Peptid. In die Tabelle 3.3-14 sind die Banden eingegangen, deren Spezifität durch Inkubation mit Antikörper und dem zugehörigen Peptid bewiesen werden kann. Die BAL C 03 zeigt eine Bande bei 19 kDa, die BAL C 08 weist eine Bande bei 40 kDa auf. Bei 12 der 15 Kontrollkinder (alle bis auf C 02, C 05 und C 09) kann eine Bande bei 25 kDa gefunden werden.

3.3.5.2 Obstruktive Bronchitis

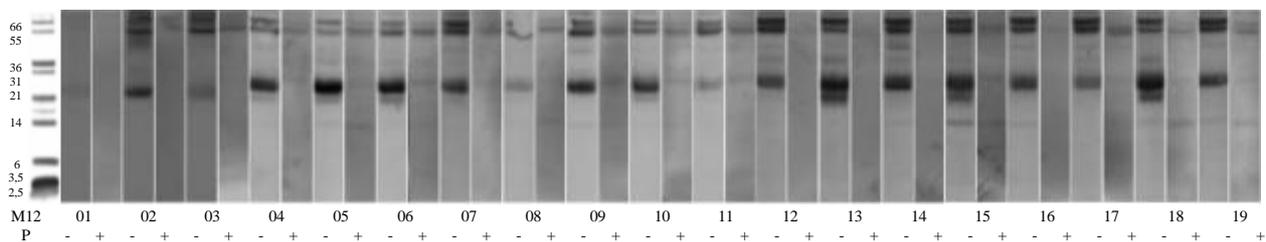


Abbildung 3.3-27 CTERMB in der BAL ohne (-P) und mit (+P) Peptid in der Gruppe der Patienten mit obstruktiver Bronchitis. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Tabelle 3.3-15 Molekulargewicht und Häufigkeit der Banden bei Inkubation mit CTERMB in der Gruppe der Patienten mit obstruktiver Bronchitis

Molekulargewicht (kDa)		Anzahl
Mittelwert \pm Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	
21,1 \pm 0,2	21,2 (20,9;21,6) [20,4-21,6]	7/19
25,0 \pm 0,2	25,0 (24,3;25,7) [23,7-26,4]	19/19
34,5 \pm 0,2	34,5 [34,0-34,9]	4/19
41,5	41,5	1/19

Wie die Abbildung 3.3-27 und die Tabelle 3.3-15 zeigen, findet sich bei 7 der 19 Patienten mit obstruktiver Bronchitis (bei obB 04, 05, 06, 10, 13, 15 und 18) eine Bande bei 21 kDa. Alle 19 Patienten haben eine Bande bei 25 kDa und 4 Kinder (obB 12, 13, 14 und 18) weisen ein Bande bei 34 kDa auf. Eine Bande bei 41 kDa findet sich einmal bei dem Patienten obB 14.

3.3.5.3 CAP

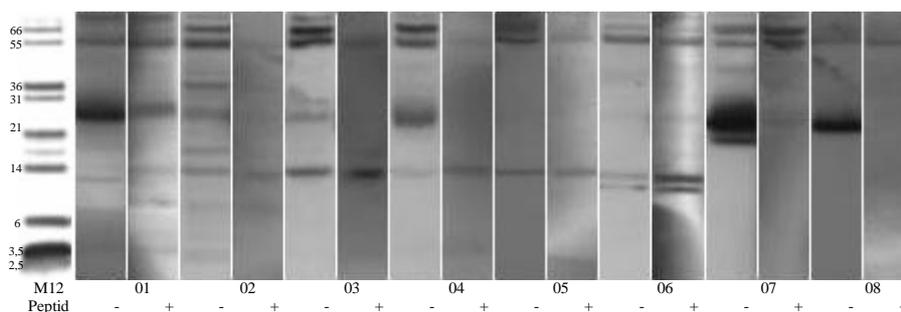


Abbildung 3.3-28 CTERMB in der BAL ohne (-P) und mit (+P) Peptid in der Gruppe CAP. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Tabelle 3.3-16 Molekulargewicht und Häufigkeit der Banden bei Inkubation mit CTERMB in der Gruppe CAP

Molekulargewicht (kDa)		Anzahl
Mittelwert \pm Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	
20,1 \pm 1,4	20,1 [18,7-21,5]	2/8
26,1 \pm 0,6	26,3 (24,5;27,6) [23,9-28,2]	6/8
36,1	36,1	1/8

In der Gruppe CAP findet sich bei 2 Patienten (CAP 02 und 07) eine Bande bei 20 kDa. 6 Patienten (CAP 01, 02, 03, 04, 07 und 08) weisen eine Bande bei 26 kDa auf, und ein Patient (CAP 02) hat zusätzlich eine Bande bei 36 kDa, wie aus der Abbildung 3.3-28 und der Tabelle 3.3-16 ersichtlich ist.

3.3.5.4 PAP

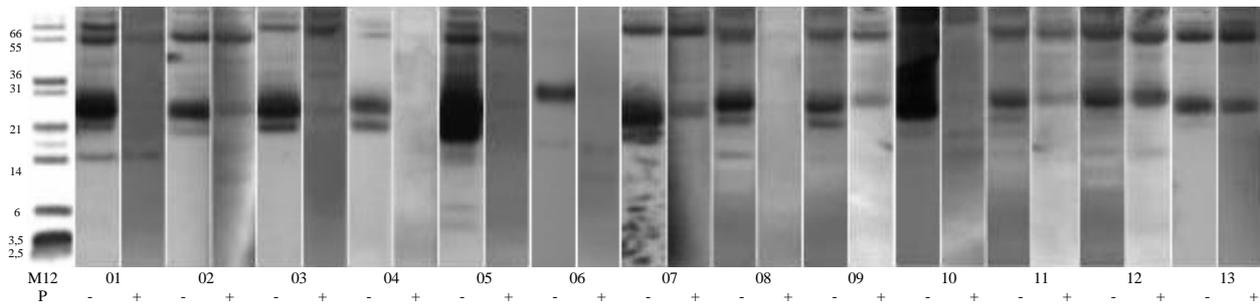


Abbildung 3.3-29 CTERMB in der BAL ohne (-P) und mit (+P) Peptid in der Gruppe PAP. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Tabelle 3.3-17 Molekulargewicht und Häufigkeit der Banden bei Inkubation mit CTERMB in der Gruppe PAP

Molekulargewicht (kDa)		Anzahl
Mittelwert \pm Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	
14,2 \pm 0,6	14,2 [13,6-14,7]	2/13
21,2 \pm 0,4	21,6 (19,6;22,4) [18,8-22,6]	10/13
25,4 \pm 0,2	25,4 (25,0;26,1) [24,1-26,3]	13/13
33,7	33,7	1/13
40,6	40,6	1/13

Wie die Abbildung 3.3-29 und die Tabelle 3.3-17 zeigen, finden sich bei 2 Patienten (PAP 05 und 08) eine Bande bei 14 kDa. 10 Patienten (PAP 01, 02, 03, 04, 05, 07, 08, 09, 11, 13) haben eine Bande bei 21 kDa, und alle 13 Patienten weisen eine Bande bei 25 kDa auf. Bei dem Patienten PAP 05 lassen sich zusätzlich eine Bande bei 34 kDa und eine Bande bei 41 kDa darstellen.

3.3.5.5 URD

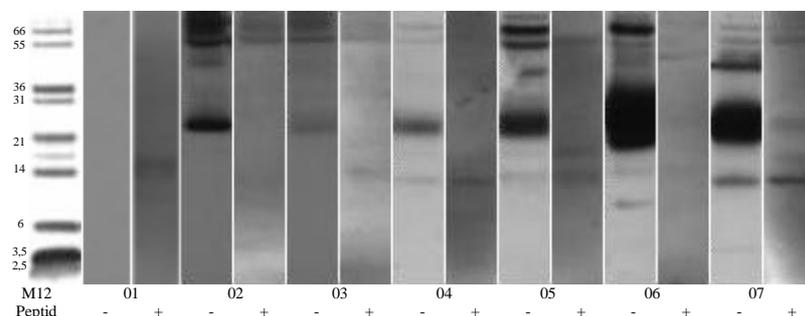


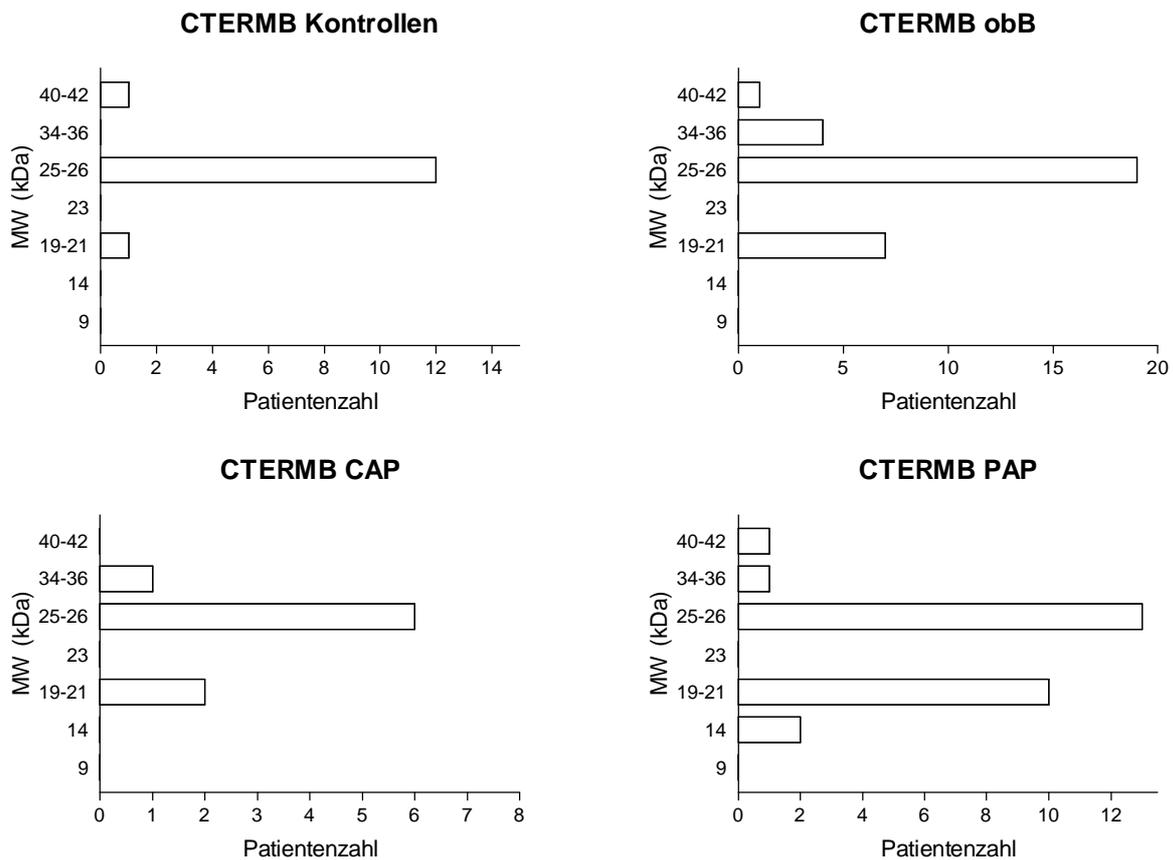
Abbildung 3.3-30 CTERMB in der BAL ohne (-P) und mit (+P) Peptid in der Gruppe URD. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Tabelle 3.3-18 Molekulargewicht und Häufigkeit der Banden bei Inkubation mit CTERMB in der Gruppe URD

Molekulargewicht (kDa)		Anzahl
Mittelwert \pm Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	
9,4	9,4	1/7
23,3	23,3	1/7
25,5 \pm 0,6	25,6 [24,1-27,7]	6/7
42,6 \pm 0,4	42,4 [41,3-44,1]	4/7

Die Abbildung 3.3-30 und die Tabelle 3.3-18 zeigen die Banden bei Inkubation der BAL der Gruppe URD mit dem Antikörper CTERMB. Dabei lassen sich bei dem Patienten URD 06 eine Bande bei 9 kDa und eine Bande bei 23 kDa nachweisen. 6 Patienten (URD 02, 03, 04, 05, 06 und 07) haben eine Bande bei 25 kDa, und 4 Patienten (URD02, 05, 06 und 07) zeigen eine Bande bei 42 kDa.

3.3.5.6 Vergleich der Bandenverteilung



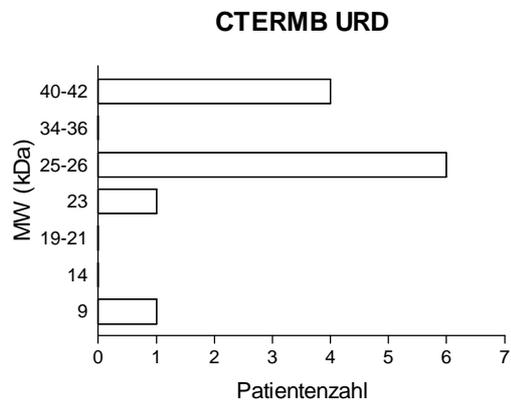


Abbildung 3.3-31 Darstellung der Bandenverteilung in der Kontrollgruppe und den Gruppen obB, CAP, PAP und URD

In der Tabelle 3.3-19 ist die Häufigkeit der einzelnen Banden nach Inkubation mit dem Antikörper CTERMB in den verschiedenen Gruppen dargestellt.

Tabelle 3.3-19 Übersicht über die Bandenverteilung bei Inkubation mit CTERMB. In Klammern steht die Patientenzahl.

kDa	Kontrollen (15)	obB (19)	CAP (8)	PAP (13)	URD (7)
40-42	7% (1)	5% (1)	0%	8% (1)	57% (4)
34-36	0%	21% (4)	13% (1)	8% (1)	0%
24-26	80% (12)	100% (19)	75% (6)	100% (13)	86% (6)
23	0%	0%	0%	0%	14% (1)
19-21	7% (1)	37% (7)	25% (2)	77% (10)	0%
14	0%	0%	0%	15% (2)	0%
9	0%	0%	0%	0%	14% (1)

3.3.6 NFLANK

3.3.6.1 Obstruktive Bronchitis

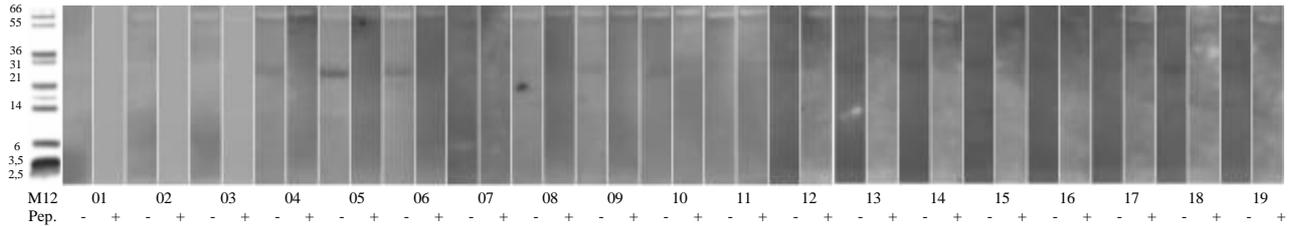


Abbildung 3.3-32 NFLANK in der BAL ohne (-P) und mit (+P) Peptid in der Gruppe der Patienten mit obstruktiver Bronchitis. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Tabelle 3.3-20 Molekulargewicht und Häufigkeit der Banden in der Gruppe der Patienten mit obstruktiver Bronchitis bei Inkubation mit NFLANK

Molekulargewicht (kDa)		Anzahl
Mittelwert \pm Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	
24,4 \pm 0,3	24,4 [23,8-25,1]	4/19

Bei Inkubation der BAL der Gruppe obB mit dem Antikörper NFLANK lässt sich, wie die Abbildung 3.3-32 und die Tabelle 3.3-20 zeigen, nur bei 4 Patienten (obB 04, 05, 06 und 09) eine Bande bei 24 kDa darstellen.

3.3.6.2 CAP

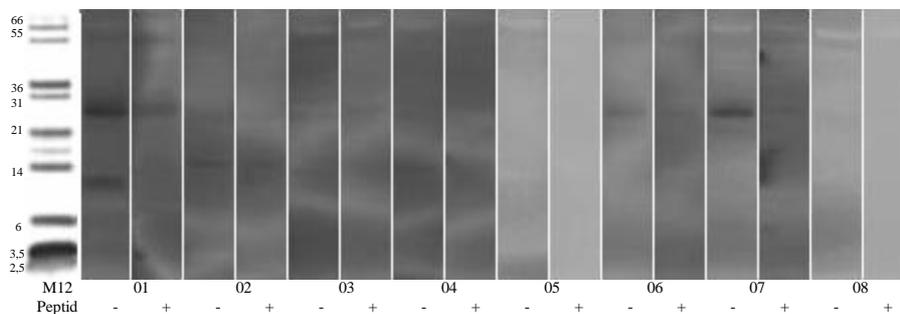


Abbildung 3.3-33 NFLANK in der BAL ohne (-P) und mit (+P) Peptid in der Gruppe CAP. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Tabelle 3.3-21 Molekulargewicht und Häufigkeit der Banden in der Gruppe CAP bei Inkubation mit NFLANK

Molekulargewicht (kDa)		Anzahl
Mittelwert \pm Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	
11,8	11,8	1/8
25,5 \pm 0,5	25,1 [25,0-26,5]	3/8

Wie aus der Abbildung 3.3-33 und der Tabelle 3.3-21 hervorgeht, findet sich in der Gruppe CAP bei Inkubation mit dem Antikörper NFLANK eine Bande bei 12 kDa bei dem Patienten CAP 01. Bei 25 kDa lässt sich bei 3 Patienten (CAP 01, 06 und 07) eine Bande darstellen.

3.3.6.3 PAP

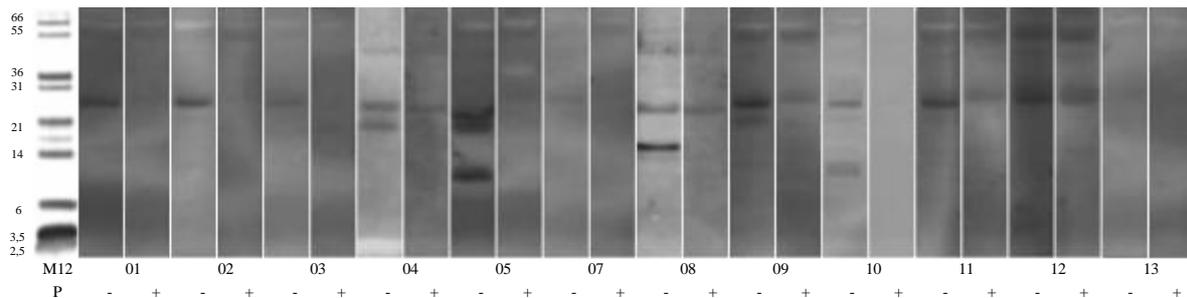


Abbildung 3.3-34 NFLANK in der BAL ohne (-P) und mit (+P) Peptid in der Gruppe PAP. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa. Bei dem Patienten PAP 06 wurde wegen Materialmangels keine Inkubation mit diesem AK durchgeführt.

Tabelle 3.3-22 Molekulargewicht und Häufigkeit der Banden in der Gruppe PAP bei Inkubation mit NFLANK

Molekulargewicht (kDa)		Anzahl
Mittelwert \pm Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	
9,1 \pm 0,1	9,1 [9,0-9,2]	2/12
13,4	13,4	1/12
15,1	15,1	1/12
20,4 \pm 0,8	20,2 [19,1-21,9]	3/12
25,2 \pm 0,4	25,4 (24,9;26,2) [22,4-26,6]	11/12

Bei Inkubation mit dem Antikörper NFLANK findet sich, wie die Abbildung 3.3-34 und die Tabelle 3.3-22 zeigen, bei 2 Patienten (PAP 05 und 10) eine Bande bei 9 kDa. 1 Patient (PAP 08) weist eine Bande bei 13 kDa und eine Bande bei 15 kDa auf. 3 Patienten (PAP 04, 05 und 09) haben eine Bande bei 20 kDa und in 11 Fällen (PAP 01, 02, 03, 04, 05, 07, 08, 09, 10, 11 und 12) lässt sich eine Bande bei 25 kDa nachweisen.

3.3.6.4 URD

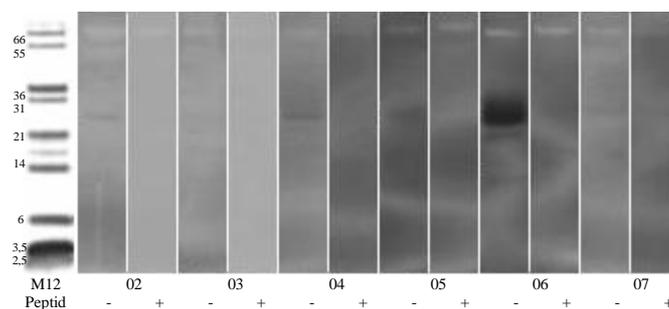


Abbildung 3.3-35 NFLANK in der BAL ohne (-) und mit (+) Peptid in der Gruppe URD. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa. Bei dem Patienten URD 01 wurde wegen Materialmangels keine Inkubation mit diesem AK durchgeführt.

Tabelle 3.3-23 Molekulargewicht und Häufigkeit der Banden in der Gruppe URD bei Inkubation mit NFLANK

Molekulargewicht (kDa)		Anzahl
Mittelwert \pm Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	
20,9	20,9	1/6
24,9 \pm 0,2	24,8 [24,5-25,4]	4/6

Wie die Abbildung 3.3-35 und die Tabelle 3.3-23 zeigen, findet sich bei dem Patienten URD 06 eine Bande bei 21 kDa, und 4 Patienten (URD 02, 04, 05 und 06) haben eine Bande bei 25 kDa.

3.3.6.5 Vergleich der Bandenverteilung

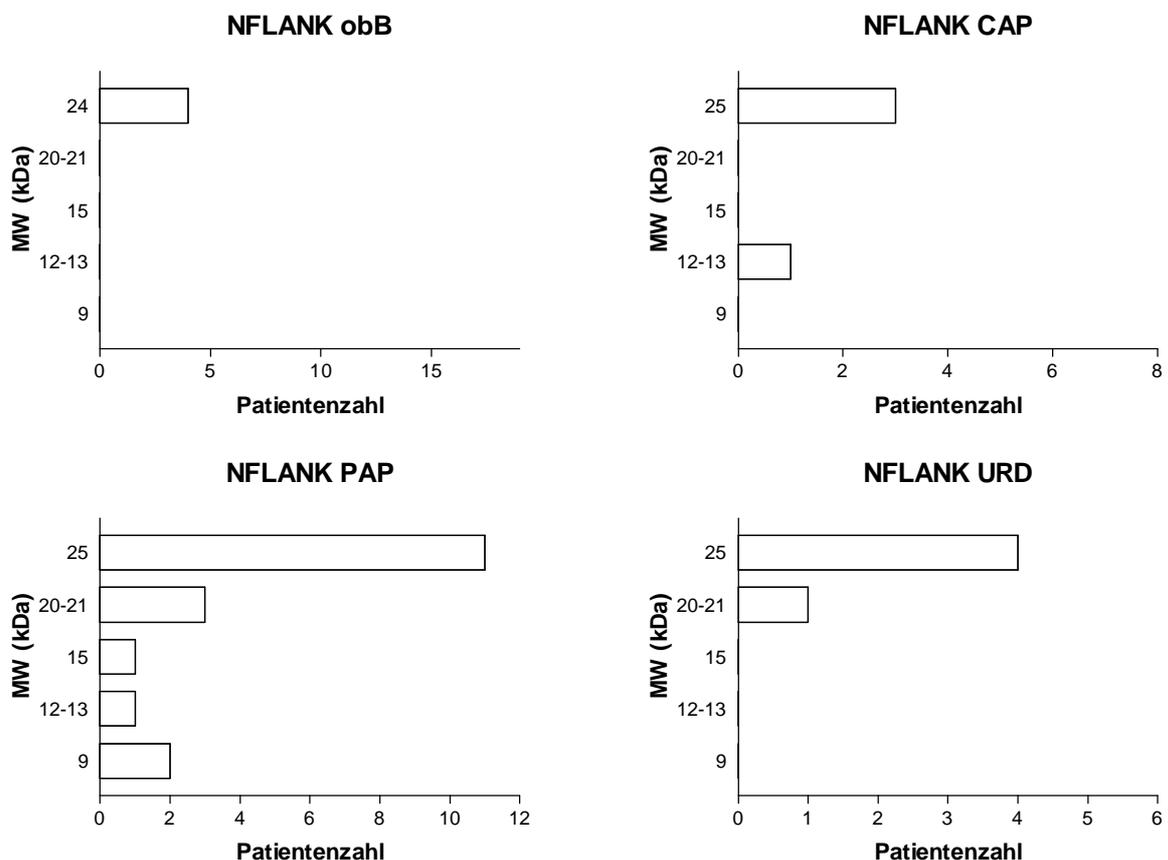


Abbildung 3.3-36 Darstellung der Bandenverteilung in den Gruppen obB, CAP, PAP und URD

In der Tabelle 3.3-24 ist die Häufigkeit der einzelnen Banden nach Inkubation mit dem Antikörper NFLANK in den verschiedenen Gruppen dargestellt.

Tabelle 3.3-24 Übersicht über die Bandenverteilung bei Inkubation mit NFLANK. In Klammern steht die Patientenzahl.

kDa	obB (19)	CAP (8)	PAP (12)	URD (6)
24-26	21% (4)	38% (3)	92% (11)	67% (4)
20-21	0%	0%	25% (3)	17% (1)
15	0%	0%	8% (1)	0%
12-13	0%	13% (1)	8% (1)	0%
9	0%	0%	17% (2)	0%

3.3.7 CFLANK

3.3.7.1 Obstruktive Bronchitis

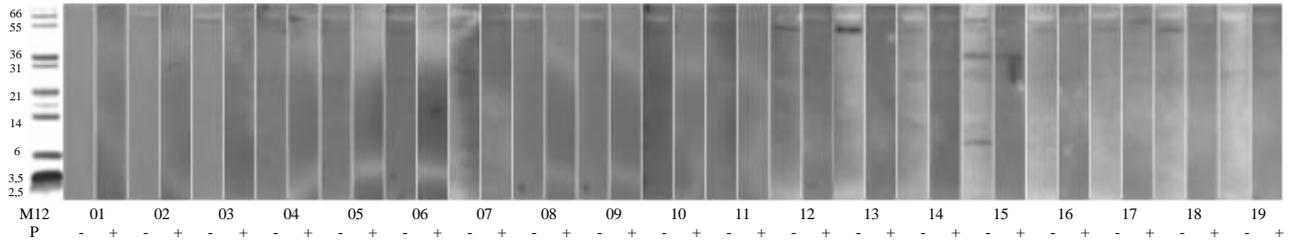


Abbildung 3.3-37 CFLANK in der BAL ohne (-P) und mit (+P) Peptid in der Gruppe der Patienten mit obstruktiver Bronchitis. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Tabelle 3.3-25 Molekulargewicht und Häufigkeit der Banden in der Gruppe der Patienten mit obstruktiver Bronchitis bei Inkubation mit CFLANK

Molekulargewicht (kDa)		Anzahl
Mittelwert \pm Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	
8,6	8,6	1/19

Bei Inkubation der BAL der Gruppe obB mit dem Antikörper CFLANK lässt sich, wie die Abbildung 3.3-37 und die Tabelle 3.3-25 zeigen, nur bei dem Patienten obB 15 eine Bande bei 9 kDa nachweisen.

3.3.7.2 CAP

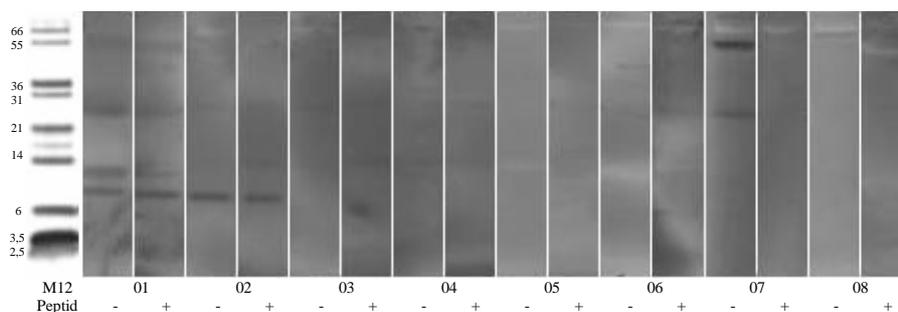


Abbildung 3.3-38 CFLANK in der BAL ohne (-P) und mit (+P) Peptid in der Gruppe CAP. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Tabelle 3.3-26 Molekulargewicht und Häufigkeit der Banden in der Gruppe CAP bei Inkubation mit CFLANK

Molekulargewicht (kDa)		Anzahl
Mittelwert \pm Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	
11,1	11,1	1/8
25,0	25,0	1/8

Wie aus der Abbildung 3.3-38 und der Tabelle 3.3-26 zu entnehmen ist, findet sich in der Gruppe CAP bei Inkubation mit dem Antikörper CFLANK eine Bande bei 11 kDa bei dem Patienten CAP 01. Bei 25 kDa hat der Patient CAP 07 eine Bande.

3.3.7.3 PAP

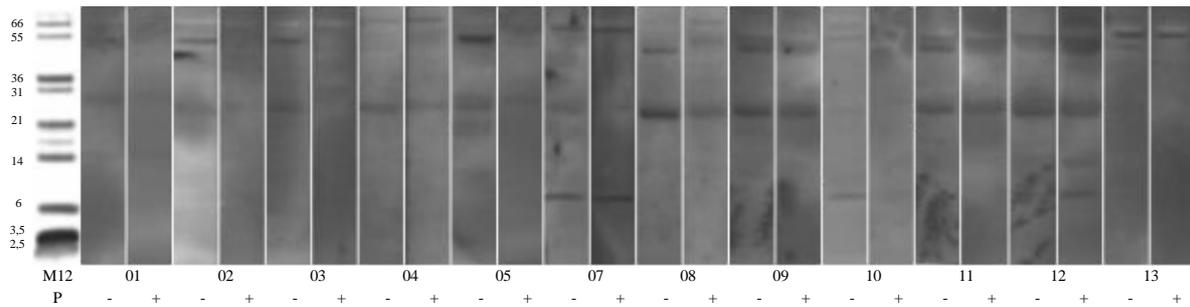


Abbildung 3.3-39 CFLANK in der BAL ohne (-P) und mit (+P) Peptid in der Gruppe PAP. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa. Bei dem Patienten PAP 06 wurde wegen Materialmangels keine Inkubation mit diesem AK durchgeführt.

Tabelle 3.3-27 Molekulargewicht und Häufigkeit der Banden in der Gruppe PAP bei Inkubation mit CFLANK

Molekulargewicht (kDa)		Anzahl
Mittelwert \pm Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	
8,2	8,2	1/12
20,8	20,8	1/12
25,0 \pm 0,1	25,0 [24,9-25,0]	2/12

In der Gruppe PAP findet sich, wie die Abbildung 3.3-39 und die Tabelle 3.3-27 zeigen, bei dem Patienten PAP 10 eine Bande bei 8 kDa. Der Patient PAP 05 weist eine Bande bei 21 kDa auf, und bei 2 Patienten (PAP 03 und 05) lässt sich eine Bande bei 25 kDa nachweisen.

3.3.7.4 URD

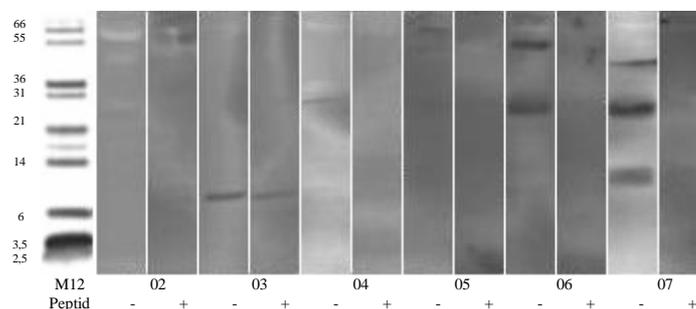


Abbildung 3.3-40 CFLANK in der BAL ohne (-P) und mit (+P) Peptid in der Gruppe URD. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa. Bei dem Patienten URD 01 wurde wegen Materialmangels keine Inkubation mit diesem AK durchgeführt.

Tabelle 3.3-28 Molekulargewicht und Häufigkeit der Banden in der Gruppe URD bei Inkubation mit CFLANK

Molekulargewicht (kDa)		Anzahl
Mittelwert \pm Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	
10,1	10,1	1/6
25,3 \pm 0,4	25,4 [24,6-25,8]	3/6

Wie die Abbildung 3.3-40 und die Tabelle 3.3-28 zeigen, findet sich bei dem Patienten URD 07 eine Bande bei 10 kDa, und bei 3 Patienten (URD 04, 06 und 07) kann eine Bande bei 25 kDa dargestellt werden.

3.3.7.5 Vergleich der Bandenverteilung

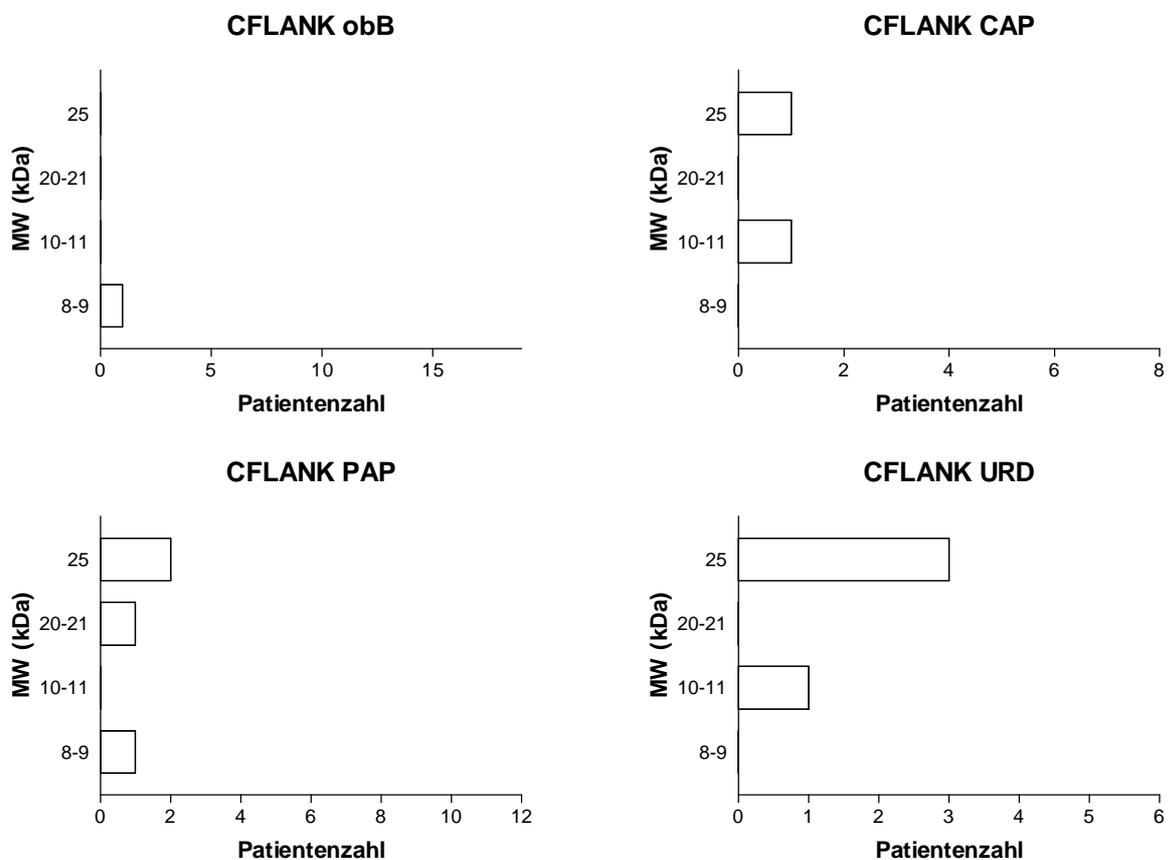


Abbildung 3.3-41 Darstellung der Bandenverteilung in den Gruppen obB, CAP, PAP und URD

In der Tabelle 3.3-29 ist die Häufigkeit der einzelnen Banden nach Inkubation mit dem Antikörper CFLANK in den verschiedenen Gruppen dargestellt.

Tabelle 3.3-29 Übersicht über die Bandenverteilung bei Inkubation mit CFLANK. In Klammern steht die Patientenzahl.

kDa	obB (19)	CAP (8)	PAP (12)	URD (6)
25	0%	13% (1)	17% (2)	50% (3)
19-21	0%	0%	8% (1)	0%
10-11	0%	13% (1)	0%	17% (1)
8-9	5% (1)	0%	8% (1)	0%

3.3.8 NFPROX

3.3.8.1 Obstruktive Bronchitis

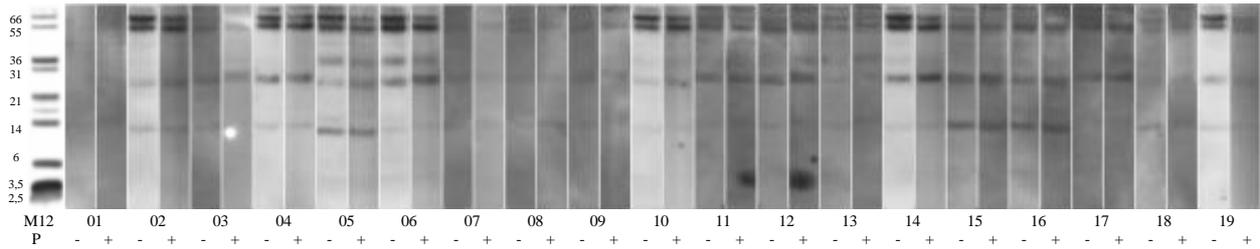


Abbildung 3.3-42 NFPROX in der BAL ohne (-P) und mit (+P) Peptid in der Gruppe der Patienten mit obstruktiver Bronchitis. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Bei Inkubation der BAL der Gruppe obB mit dem Antikörper NFPROX lässt sich, wie die Abbildung 3.3-42 zeigt, keine Bande nachweisen, die durch Blockade mit dem entsprechenden Peptid bestätigt werden kann.

3.3.8.2 CAP

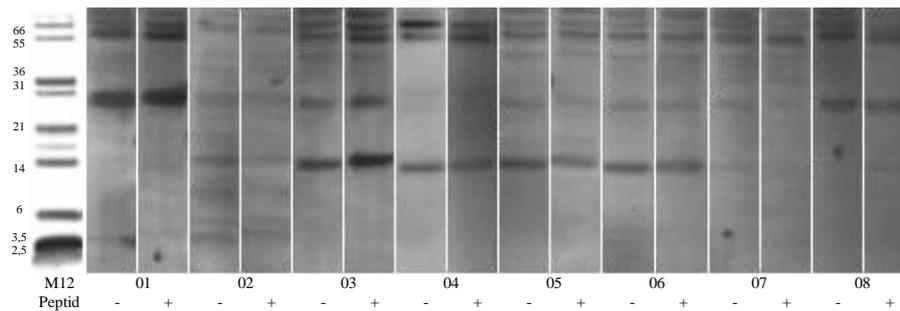


Abbildung 3.3-43 NFPROX in der BAL ohne (-P) und mit (+P) Peptid in der Gruppe CAP. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Wie aus der Abbildung 3.3-43 ersichtlich ist, findet sich in der Gruppe CAP bei Inkubation mit dem Antikörper NFPROX keine Bande, die durch Blockade mit dem entsprechenden Peptid bestätigt werden kann.

3.3.8.3 PAP

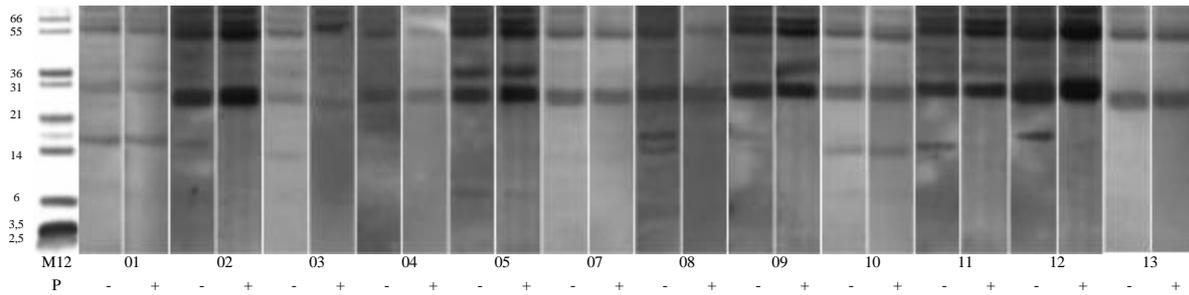


Abbildung 3.3-44 NFPROX in der BAL ohne (-P) und mit (+P) Peptid in der Gruppe PAP. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa. Bei dem Patienten PAP 06 wurde wegen Materialmangels keine Inkubation mit diesem AK durchgeführt.

Tabelle 3.3-30 Molekulargewicht und Häufigkeit der Banden in der Gruppe PAP bei Inkubation mit NFPROX

Molekulargewicht (kDa)		Anzahl
Mittelwert ± Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	
12,8 ± 0,4	13,2 [12,0-13,3]	3/12
15,4 ± 0,4	15,0 [14,9-16,8]	5/12
19,0	19,0	1/12

In der Gruppe PAP findet sich, wie die Abbildung 3.3-44 und die Tabelle 3.3-30 zeigen, bei 3 Patienten (PAP 03, 08 und 09) eine Bande bei 13 kDa. 5 Patienten (PAP 02, 08, 09, 11 und 12) weisen eine Bande bei 15 kDa auf, und bei dem Patienten PAP 04 lässt sich eine Bande bei 19 kDa nachweisen.

3.3.8.4 URD

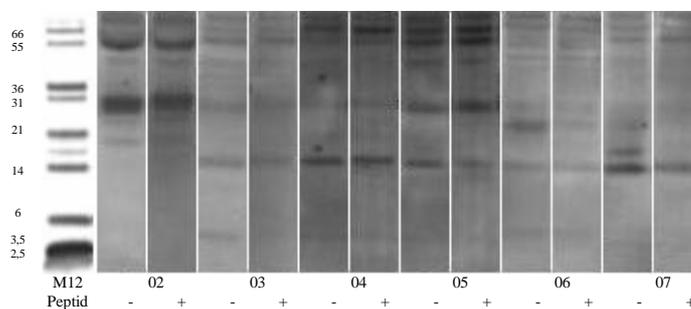


Abbildung 3.3-45 NFPROX in der BAL ohne (-P) und mit (+P) Peptid in der Gruppe URD. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa. Bei dem Patienten URD 01 wurde wegen Materialmangels keine Inkubation mit diesem AK durchgeführt.

Tabelle 3.3-31 Molekulargewicht und Häufigkeit der Banden in der Gruppe URD bei Inkubation mit NFPROX

Molekulargewicht (kDa)		Anzahl
Mittelwert ± Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	
3,6	3,6	1/6
15,1 ± 0,1	15,1 [15,0-15,2]	2/6
20,7	20,7	1/6

Wie in der Abbildung 3.3-45 und der Tabelle 3.3-31 dargestellt ist, findet sich bei dem Patienten URD 03 eine Bande bei 4 kDa. 2 Patienten (URD 02 und 07) haben eine Bande bei 15 kDa. Außerdem zeigt der Patient URD 06 eine Bande bei 21 kDa.

3.3.8.5 Vergleich der Bandenverteilung

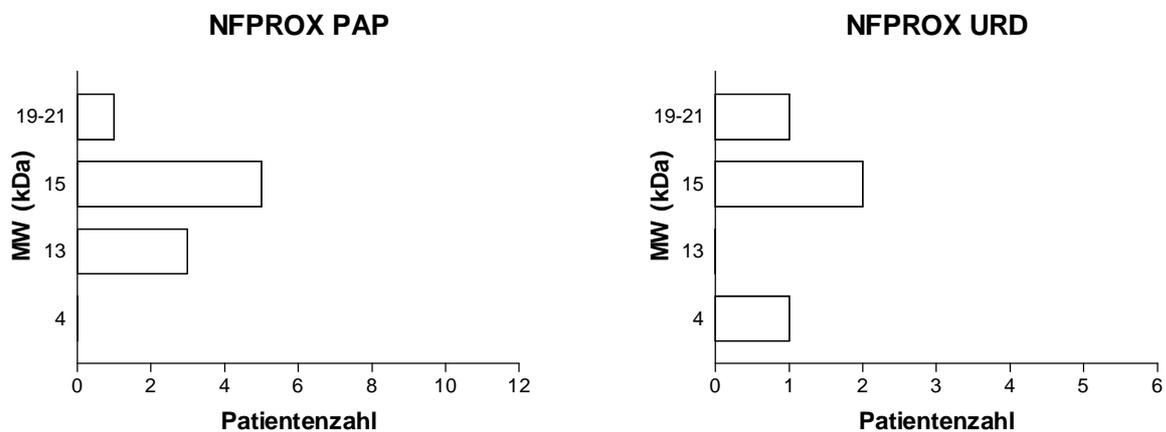


Abbildung 3.3-46 Darstellung der Bandenverteilung in den Gruppen PAP und URD

In der Tabelle 3.3-32 ist die Häufigkeit der einzelnen Banden nach Inkubation mit dem Antikörper NFPROX in den verschiedenen Gruppen dargestellt.

Tabelle 3.3-32 Übersicht über die Bandenverteilung bei Inkubation mit NFPROX. In Klammern steht die Patientenzahl.

kDa	obB (19)	CAP (8)	PAP (12)	URD (6)
19-21	0%	0%	8% (1)	17% (1)
15	0%	0%	42% (5)	33% (2)
13	0%	0%	25% (3)	0%
4	0%	0%	0%	17% (1)

3.3.9 NPRO-SP-C-C2

3.3.9.1 Kontrollen

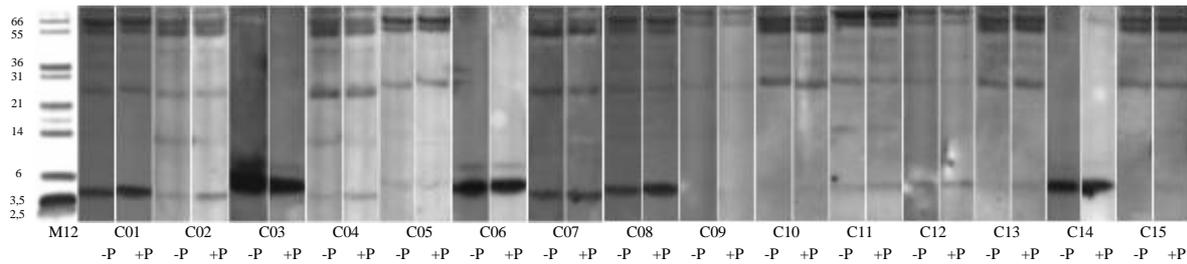


Abbildung 3.3-47 NPRO-SP-C-C2 in der BAL ohne (-P) und mit (+P) Peptid in der Gruppe der Kontrollen nach Inkubation mit dem Antikörper gegen SP-C. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Die Abbildung 3.3-47 zeigt die Inkubation der Kontroll-BALs mit NPRO-SP-C-C2 nach Inkubation mit dem Antikörper gegen SP-C, jeweils ohne und mit Peptid. Dabei lässt sich keine Bande darstellen, die durch Blockade des Antikörpers mit dem entsprechenden Peptid bestätigt werden kann.

3.3.9.2 Obstruktive Bronchitis

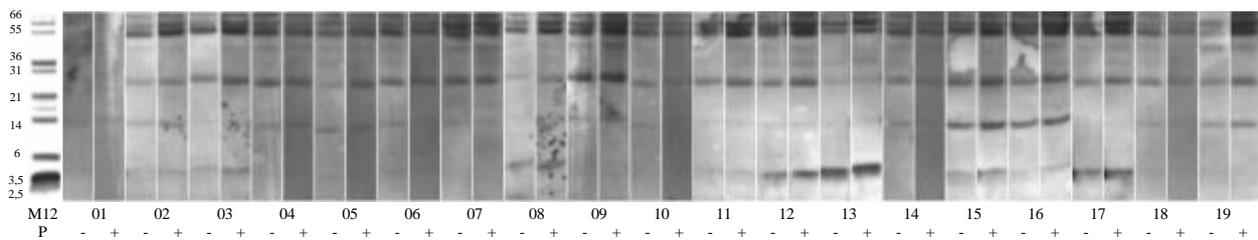


Abbildung 3.3-48 NPRO-SP-C-C2 in der BAL ohne (-P) und mit (+P) Peptid in der Gruppe der Patienten mit obstruktiver Bronchitis. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Wie die Abbildung 3.3-48 zeigt, findet sich bei den 19 Patienten mit obstruktiver Bronchitis keine Bande, die durch Blockade mit dem entsprechenden Peptid bestätigt werden kann.

3.3.9.3 CAP

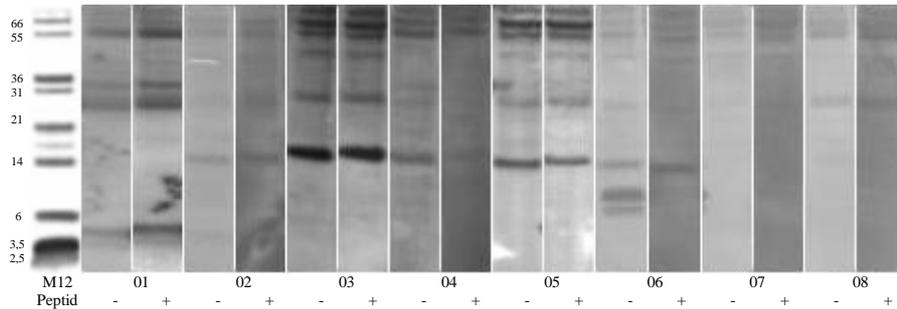


Abbildung 3.3-49 NPRO-SP-C-C2 in der BAL ohne (-P) und mit (+P) Peptid in der Gruppe CAP. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Tabelle 3.3-33 Molekulargewicht und Häufigkeit der Banden bei Inkubation mit NPRO-SP-C-C2 in der Gruppe CAP

Molekulargewicht (kDa)		Anzahl
Mittelwert ± Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	
6,6	6,6	1/8
9,0	9,0	1/8

In der Gruppe CAP finden sich bei dem Patienten CAP 06 eine Bande bei 7 kDa und eine Bande bei 9 kDa.

3.3.9.4 PAP

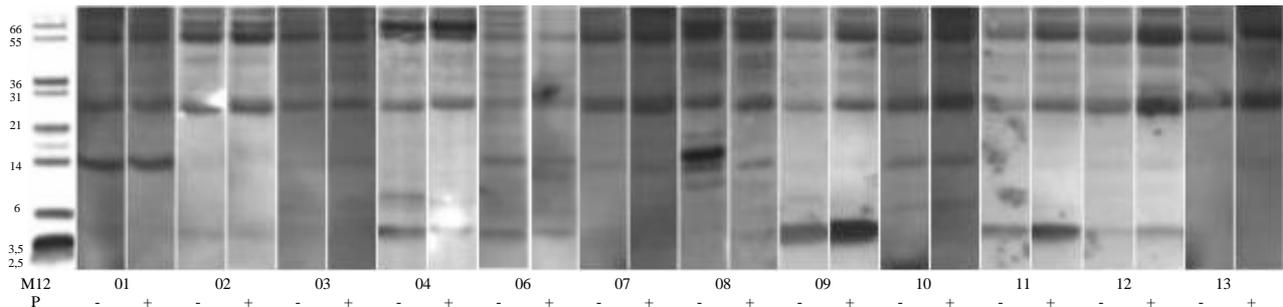


Abbildung 3.3-50 NPRO-SP-C-C2 in der BAL ohne (-P) und mit (+P) Peptid in der Gruppe PAP mit Ausnahme des Patienten PAP 05 (Material nicht ausreichend). Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Tabelle 3.3-34 Molekulargewicht und Häufigkeit der Banden in der Gruppe PAP bei Inkubation mit NPRO-SP-C-C2

Molekulargewicht (kDa)		Anzahl
Mittelwert ± Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	
6,0	6,0	1/12
10,3	10,3	1/12
15,2	15,2	1/12
19,2	19,2	1/12

Wie die Abbildung 3.3-50 und die Tabelle 3.3-34 zeigen, findet sich bei dem Patienten PAP 04 eine Bande bei 6 kDa. Der Patient PAP 08 weist 3 Banden auf, bei 10, 15 und 19 kDa.

3.3.9.5 URD

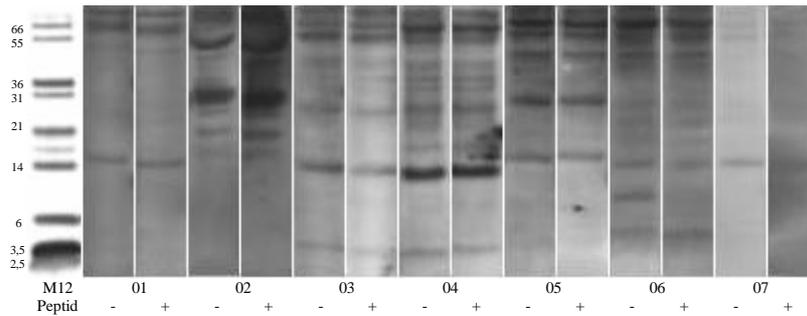


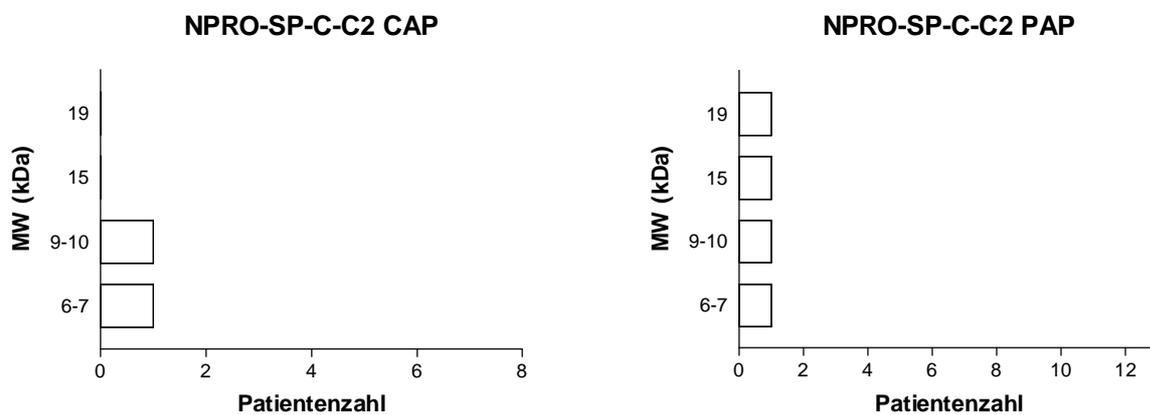
Abbildung 3.3-51 NPRO-SP-C-C2 in der BAL ohne (-P) und mit (+P) Peptid in der Gruppe URD. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Tabelle 3.3-35 Molekulargewicht und Häufigkeit der Banden in der Gruppe URD bei Inkubation mit NPRO-SP-C-C2

Molekulargewicht (kDa)		Anzahl
Mittelwert \pm Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	
8,9	8,9	1/7

Die Abbildung 3.3-51 und die Tabelle 3.3-35 zeigen, dass nur bei dem Patienten URD 06 eine Bande bei 9 kDa nachgewiesen werden kann.

3.3.9.6 Vergleich der Bandenverteilung



NPRO-SP-C-C2 URD

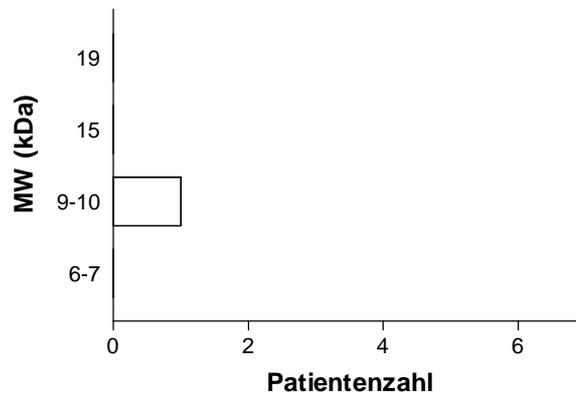


Abbildung 3.3-52 Darstellung der Bandenverteilung in den Gruppen CAP, PAP und URD

In der Tabelle 3.3-36 ist die Häufigkeit der einzelnen Banden nach Inkubation mit dem Antikörper NPRO-SP-C-C2 in den verschiedenen Gruppen dargestellt.

Tabelle 3.3-36 Übersicht über die Bandenverteilung bei Inkubation mit NPRO-SP-C-C2. In Klammern steht die Patientenzahl.

kDa	Kontrollen (15)	obB (19)	CAP (8)	PAP (12)	URD (7)
19	0%	0%	0%	8% (1)	0%
15	0%	0%	0%	8% (1)	0%
9-10	0%	0%	13% (1)	8% (1)	14% (1)
6-7	0%	0%	13% (1)	8% (1)	0%

3.4 Gefundene SP-B-Vorstufen im Überblick

NFPROX	NFLANK	CFLANK	CTERMB										
	a		b	SP-B		c		d					
Pro-SP-B mit AK-Bindungsstellen													
										MW (kDa)	AK		
										40-42	CTERMB	11%	7/62
										34-36	CTERMB	10%	6/62
										24-26	CTERMB	90%	56/62
											NFLANK	49%	22/45
											CFLANK	13%	6/45
										23	CTERMB	2%	1/62
										19-21	CTERMB	32%	20/62
											NFLANK	9%	4/45
											CFLANK	2%	1/45
											NFPROX	4%	2/45
										14-15	CTERMB	3%	2/62
											NFLANK	2%	1/45
											NFPROX	16%	7/45
										12-13	NFLANK	4%	2/45
											NFPROX	7%	3/45
											10-11	CFLANK	4%
										8-9	CTERMB	2%	1/62
											NFLANK	4%	2/45
											CFLANK	4%	2/45
										4	NFPROX	2%	1/45
										8,7-10,9	SP-B	95%	78/82

Abbildung 3.4-1 Mit den Antikörpern CTERMB, NFLANK, CFLANK und NFPROX gefundene SP-B-Vorstufen. a = NFPROX-Bindungsstelle, b = NFLANK-Bindungsstelle, c = CFLANK-Bindungsstelle, d = CTERMB-Bindungsstelle.

Anhand der Tabellen 3.3-19, 3.3-24, 3.3-29 und 3.3-32 wurde die Abbildung 3.4-1 erstellt, die eine Übersicht über die mit den Antikörpern CTERMB, NFLANK, CFLANK und NFPROX gefundenen Peptide und ihre mögliche Morphologie geben soll. Die verschiedenen Patientengruppen wurden dabei nicht berücksichtigt. Fettgedruckt bzw. dick umrandet sind diejenigen Zwischenstufen, die mit einem Antikörper in mindestens 5 % der hieraufhin untersuchten Patienten gefunden wurden. Hierzu gehören die Vorstufen bei 40-42 kDa und bei 34-36 kDa, die jeweils mit dem Antikörper CTERMB darzustellen waren, sowie die Zwischenstufe bei 24-26 kDa, die mit dem Antikörper CTERMB in 90 % der Fälle, mit NFLANK und CFLANK zu einem geringeren Anteil nachzuweisen waren. CTERMB und NFLANK erkannten beide ein Peptid bei 19-21 kDa. NFPROX wies Peptide bei 14-15 kDa und 12-13 kDa nach. In geringerer Häufigkeit wurden außerdem Peptide bei 23 kDa, 10-11 kDa, 8-9 kDa und 4 kDa gefunden. SP-B wurde in insgesamt 95 % der Patienten im Bereich 8,7 – 10,9 kDa durch den Antikörper SP-B nachgewiesen.

3.5 Gefundene SP-C-Vorstufen im Überblick

				MW (kDa)	AK		
N	SP-C			19	NPRO-SP-C-C2	2%	1/61
N	SP-C			14-15	NPRO-SP-C-C2	2%	1/61
					Pro-SP-C	2%	1/61
SP-C				12	Pro-SP-C	6%	4/64
N	SP-C			9-10	NPRO-SP-C-C2	5%	3/61
					Pro-SP-C	11%	7/64
SP-C				8	Pro-SP-C	8%	5/64
N	SP-C			6-7	NPRO-SP-C-C2	3%	2/61
SP-C				4,8-5,7	SP-C	93%	76/82

Abbildung 3.5-1 Mit den Antikörpern NPRO-SP-C-C2 und Pro-SP-C (Whitsett) gefundene SP-C-Vorstufen. N=NPRO-SP-C-C2-Bindungsstelle.

Die Abbildung 3.5-1 stellt die Peptide dar, die mit den Antikörpern NPRO-SP-C-C2 und Pro-SP-C (Whitsett) gefunden wurden. Auch hier wurden die verschiedenen Patientengruppen nicht berücksichtigt. Die Prozentzahlen geben an, in wie vielen Fällen derjenige Antikörper das jeweilige Peptid nachwies, rechts daneben stehen die absoluten Zahlen. Fettgedruckt bzw. dick umrandet sind diejenigen Peptide, die mit einem Antikörper bei mindestens 5 % der Patienten gefunden wurden. Vorstufen bei 12 und 8 kDa wurden durch den Antikörper Pro-SP-C (Whitsett) nachgewiesen, ein Peptid bei 9-10 kDa ließ sich durch beide verwendeten Antikörper darstellen. Außerdem fanden sich Vorstufen bei 19 kDa, 14-15 kDa und 6-7 kDa, jedoch in noch seltenerer Zahl. In 93% aller untersuchten Proben war SP-C zu sehen.

3.6 Vergleich der Banden in der Unter- und Oberphase und der BAL

Im folgenden werden die Unterphase, die Oberphase und die BAL einiger Patienten bei ihrer Inkubation mit den Antikörpern gegen SP-B, SP-C, Pro-SP-B (55522, Whitsett) und Pro-SP-C (68514, Whitsett) gegenübergestellt.

Patient nobB 03

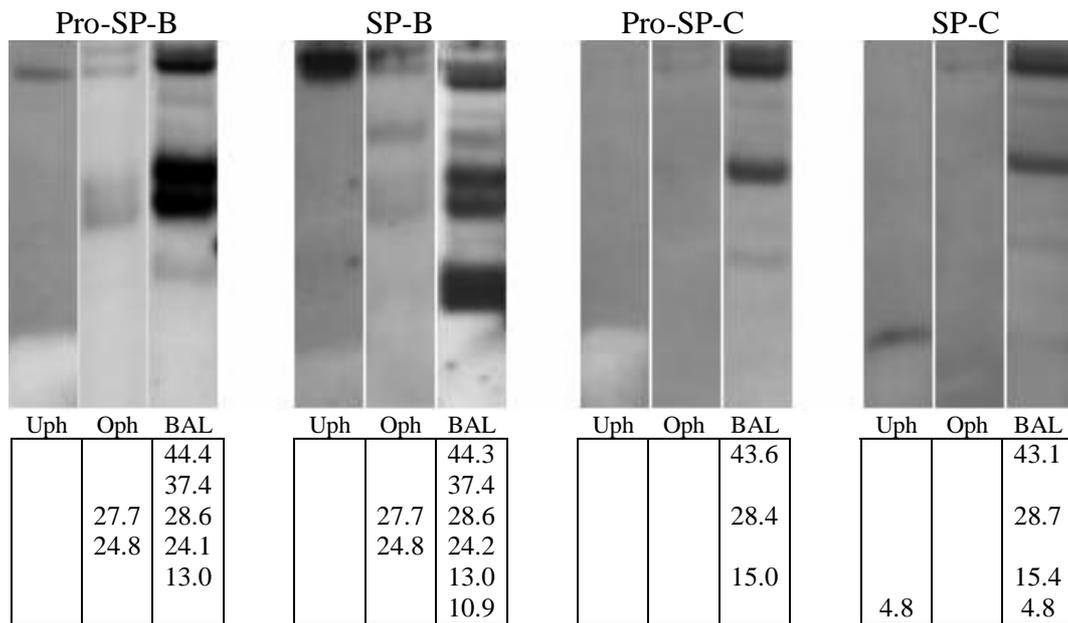


Abbildung 3.6-1 Unterphase (Uph), Oberphase (Oph) und BAL des Patienten nobB 03 bei Inkubation mit den Antikörpern gegen SP-B, SP-C, Pro-SP-B und Pro-SP-C. Die Zahlenangaben geben das Molekulargewicht der Proteine in kDa an.

Patient nobB 06

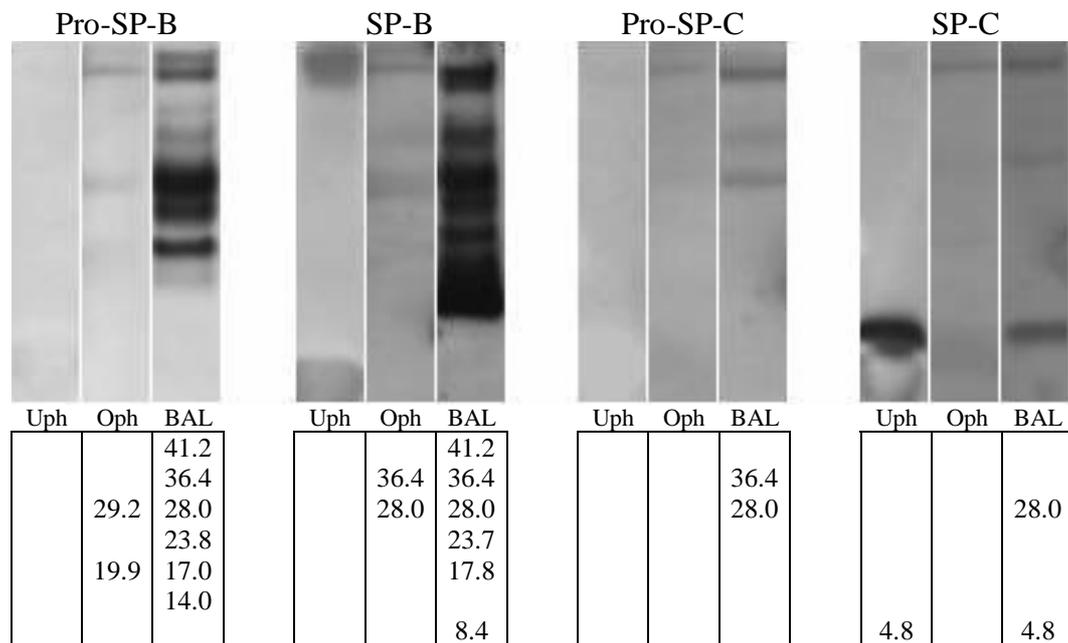


Abbildung 3.6-2 Unterphase (Uph), Oberphase (Oph) und BAL des Patienten nobB 06 bei Inkubation mit den Antikörpern gegen SP-B, SP-C, Pro-SP-B und Pro-SP-C. Die Zahlenangaben geben das Molekulargewicht der Proteine in kDa an.

Patient nobB 09

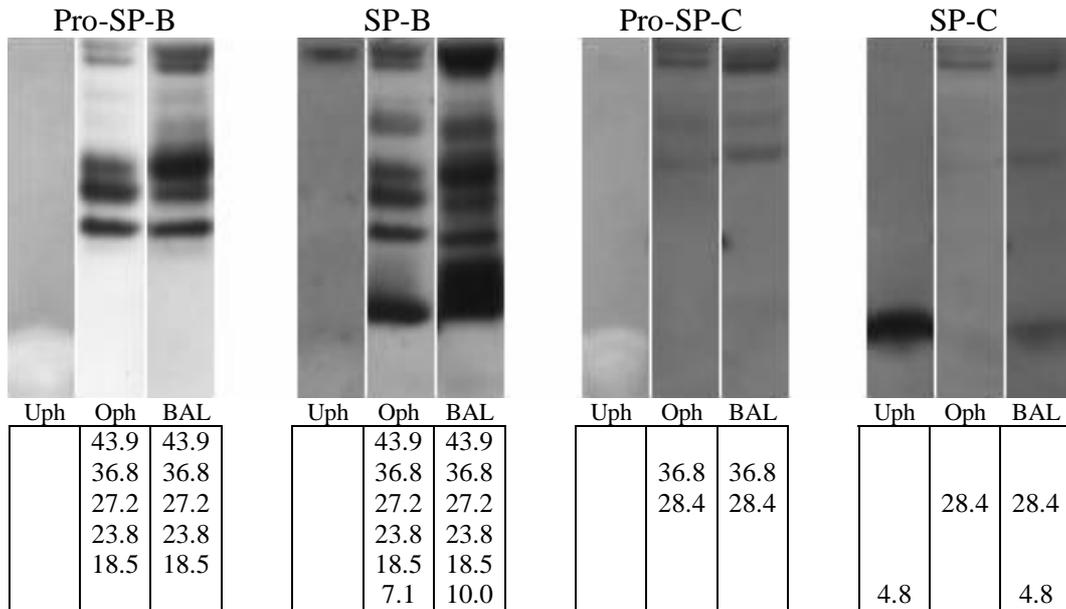


Abbildung 3.6-3 Unterphase (Uph), Oberphase (Oph) und BAL des Patienten nobB 09 bei Inkubation mit den Antikörpern gegen SP-B, SP-C, Pro-SP-B und Pro-SP-C. Die Zahlenangaben geben das Molekulargewicht der Proteine in kDa an.

Patient obB 16

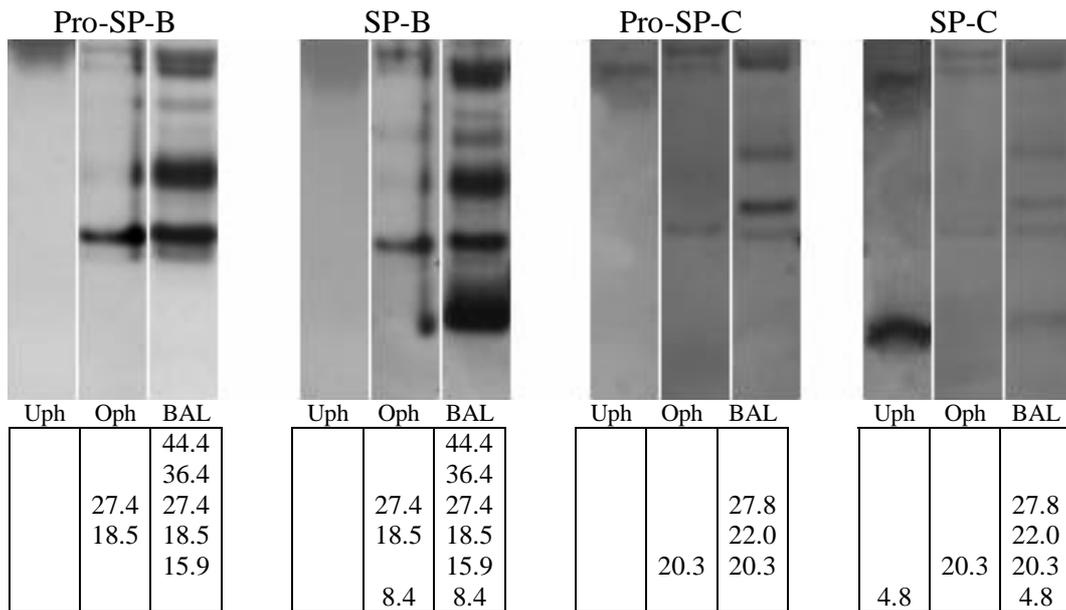


Abbildung 3.6-4 Unterphase (Uph), Oberphase (Oph) und BAL des Patienten obB 16 bei Inkubation mit den Antikörpern gegen SP-B, SP-C, Pro-SP-B und Pro-SP-C. Die Zahlenangaben geben das Molekulargewicht der Proteine in kDa an.

Patient obB 17

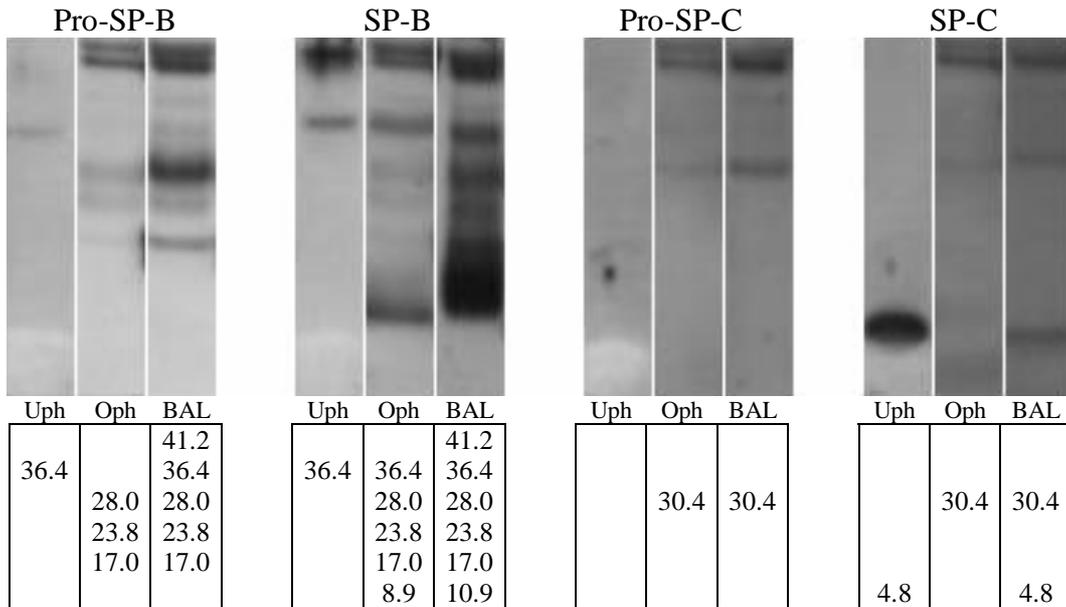


Abbildung 3.6-5 Unterphase (Uph), Oberphase (Oph) und BAL des Patienten obB 17 bei Inkubation mit den Antikörpern gegen SP-B, SP-C, Pro-SP-B und Pro-SP-C. Die Zahlenangaben geben das Molekulargewicht der Proteine in kDa an.

Patient obB 03

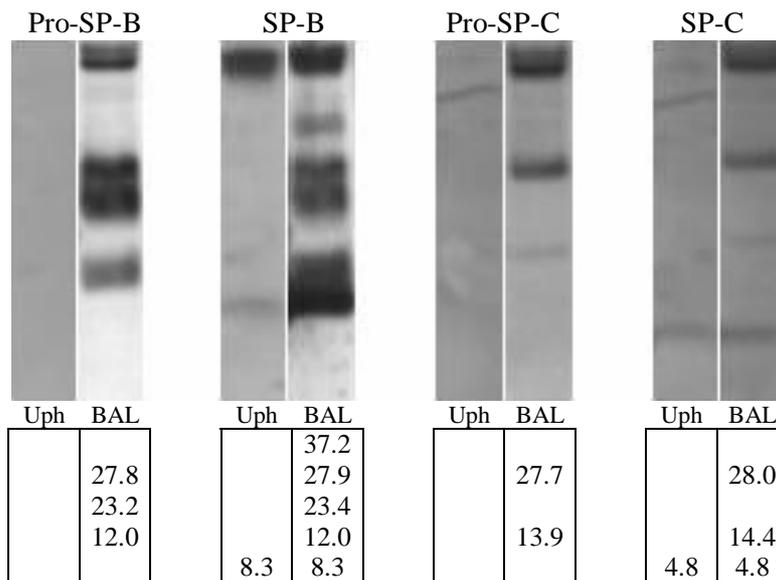


Abbildung 3.6-6 Unterphase (Uph) und BAL des Patienten obB 03 bei Inkubation mit den Antikörpern gegen SP-B, SP-C, Pro-SP-B und Pro-SP-C. Die Zahlenangaben geben das Molekulargewicht der Proteine in kDa an.

Patient obB 08

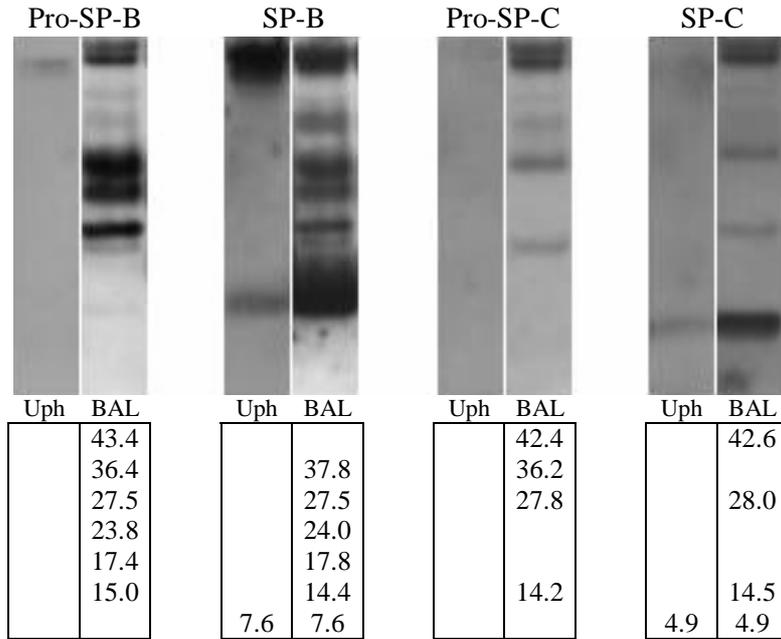


Abbildung 3.6-7 Unterphase (Uph) und BAL des Patienten obB 08 bei Inkubation mit den Antikörpern gegen SP-B, SP-C, Pro-SP-B und Pro-SP-C. Die Zahlenangaben geben das Molekulargewicht der Proteine in kDa an.

Patient nobB 07

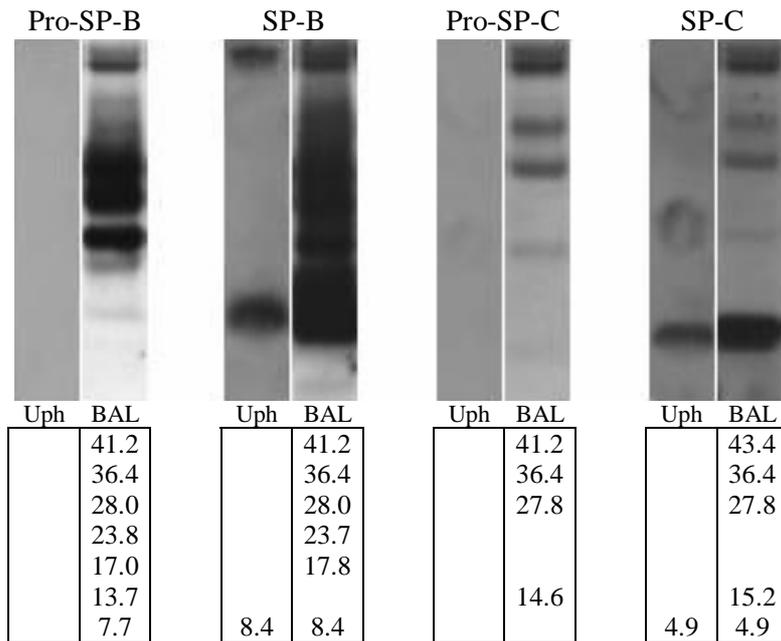


Abbildung 3.6-8 Unterphase (Uph) und BAL des Patienten nobB 07 bei Inkubation mit den Antikörpern gegen SP-B, SP-C, Pro-SP-B und Pro-SP-C. Die Zahlenangaben geben das Molekulargewicht der Proteine in kDa an.

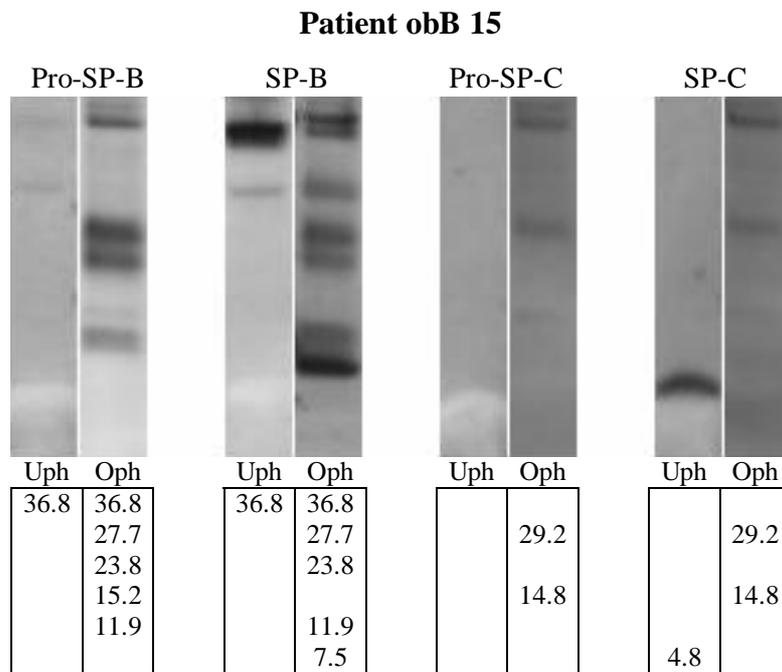


Abbildung 3.6-9 Unterphase (Uph) und Oberphase (Oph) des Patienten obB 15 bei Inkubation mit den Antikörpern gegen SP-B, SP-C, Pro-SP-B und Pro-SP-C. Die Zahlenangaben geben das Molekulargewicht der Proteine in kDa an.

3.6.1 SP-B

Wie die Abbildungen 3.6-1 bis 3.6-9 zeigen, konnte bei 6 der 9 Patienten in der Unterphase kein SP-B nachgewiesen werden (nobB 03, nobB 06, nobB 09, obB 16, obB 17 und obB 15). Die Oberphase dieser 6 Patienten wurde auf SP-B hin untersucht. Dabei ließ sich bei 2 der Patienten (nobB 03 und nobB 06) auch in der Oberphase kein SP-B darstellen, wohingegen bei den übrigen 4 Patienten (nobB 09, obB 16, obB 17 und obB 15) SP-B in der Oberphase sichtbar war.

Bei allen 8 Patienten, die auf SP-B in der BAL hin untersucht wurden (nobB 03, nobB 06, nobB 09, obB 16, obB 17, obB 03, obB 08 und nobB 07), ließ sich SP-B darstellen.

3.6.2 SP-C

Bei allen 9 der oben dargestellten Patienten ließ sich SP-C in der Unterphase darstellen, ebenso in der BAL von allen 8 daraufhin getesteten Patienten. Bei 6 Patienten wurde die Oberphase auf SP-C hin untersucht, wobei, wie die obigen Abbildungen zeigen, in keiner der Oberphasen SP-C nachgewiesen werden konnte.

3.6.3 Pro-SP-B

Die obigen Abbildungen machen deutlich, dass die meisten Banden bei Inkubation mit dem Antikörper Pro-SP-B in der BAL gefunden wurden. Jede Bande, die in der Unter- oder Oberphase sichtbar war, konnte auch in der BAL dargestellt werden. Dabei zeigte sich in der Unterphase nur bei 2 Patienten (obB 17 und obB 15) eine Bande bei 36 kDa. Die Tabellen 3.6-1 und 3.6-2 zeigen die Verteilung der Banden in der Oberphase und in der BAL.

Tabelle 3.6-1 Molekulargewicht und Häufigkeit der Banden bei Inkubation der Oberphase mit dem Antikörper Pro-SP-B

Molekulargewicht (kDa)		Anzahl
Mittelwert \pm Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	
43,9	43,9	1/6
36,8	36,8	2/6
27,9 \pm 0,3	27,7 (27,3;28,6) [27,2-29,2]	6/6
24,1 \pm 0,3	23,8 [23,8-24,8]	4/6
18,5 \pm 0,6	18,5 [17,0-19,9]	4/6
15,2	15,2	1/6
11,9	11,9	1/6
7,7	7,7	1/6

Tabelle 3.6-2 Molekulargewicht und Häufigkeit der Banden bei Inkubation der BAL mit dem Antikörper Pro-SP-B

Molekulargewicht (kDa)		Anzahl
Mittelwert \pm Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	
42,8 \pm 0,6	43,4 (41,2;44,4) [41,2-44,4]	1/8
36,6 \pm 0,1	36,4 (36,4;37,1) [36,4-37,4]	7/8
27,8 \pm 0,2	27,9 (27,5;28,0) [27,2-28,6]	8/8
23,8 \pm 0,1	23,8 (23,8;24,0) [23,2-24,1]	7/8
17,6 \pm 0,3	17,2 (17,0;18,5) [17,0-18,5]	6/8
14,3 \pm 0,9	14,0 [13,0-15,9]	3/8
12,0	12,0	1/8

3.6.4 Pro-SP-C

Bei Inkubation mit dem Antikörper Pro-SP-C verhält es sich ebenso wie bei der Inkubation mit dem Antikörper Pro-SP-B, dass alle Banden, die in der Oberphase dargestellt werden konnten, auch in der BAL sichtbar waren. In der Unterphase konnten keine Banden nachgewiesen werden. In den Tabellen 3.4-3 und 3.4-4 sind die Banden in der Oberphase und der BAL aufgeführt.

Tabelle 3.6-3 Molekulargewicht und Häufigkeit der Banden bei Inkubation der Oberphase mit dem Antikörper Pro-SP-C

Molekulargewicht (kDa)		Anzahl
Mittelwert ± Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	
36,8	36,8	1/6
29,3 ± 0,6	29,2 [28,4-30,4]	3/6
20,3	20,3	1/6
14,8	14,8	1/6

Tabelle 3.6-4 Molekulargewicht und Häufigkeit der Banden bei Inkubation der **BAL** mit dem Antikörper Pro-SP-C

Molekulargewicht (kDa)		Anzahl
Mittelwert ± Standardfehler	Median (25.;75.Per.) [Min-Max]	
42,4 ± 0,7	42,4 [41,2-43,6]	3/8
36,5 ± 0,1	36,4 [36,2-36,8]	4/8
28,3 ± 0,3	27,9 (27,8;28,4) [27,7-30,4]	8/8
20,3	20,3	1/8
14,4 ± 0,2	14,4 [13,9-15,0]	4/8

3.7 Korrelation zwischen Bandenintensität und ELISA

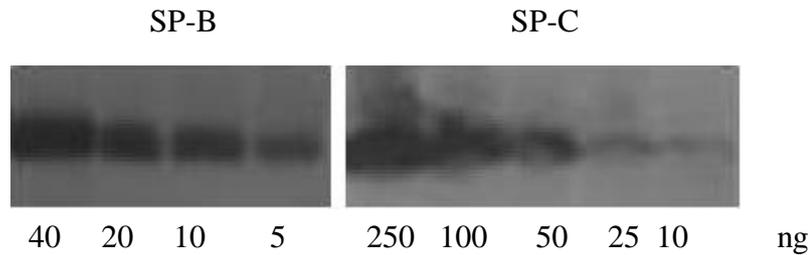


Abbildung 3.7-1 Darstellung der Standardreihe für SP-B und SP-C

In der Abbildung 3.7-1 sind die Standardreihen für SP-B und SP-C dargestellt. Dabei wird deutlich, dass 5 ng SP-B und 10 ng SP-C noch sichtbar sind. Auf jedem Gel zum Nachweis von SP-B und SP-C in den Lavagen der Patienten wurde ein SP-B-Standard mit 20 ng und ein SP-C-Standard mit 25 ng aufgetragen. Die Bandenintensität wurde nach folgendem Schema beurteilt:

++++	4	Stärker sichtbar als Standard
+++	3	Vergleichbar mit Standard
++	2	Schwächer sichtbar als Standard
+	1	Gerade noch sichtbar
-	0	Nicht sichtbar

Die Tabellen 3.7-1 und 3.7-2 zeigen die Korrelation zwischen den ELISA-Werten für SP-B und SP-C der Patientengruppen obB und nobB sowie das Verhältnis dieser zum Gesamtprotein- bzw. Phospholipidgehalt und der jeweiligen Bandenintensität in der Unterphase von 0 bis 4.

Tabelle 3.7-1 Korrelation der ELISA-Werte mit der Bandenintensität von SP-B auf dem Blot

	tau (Kendall)	p
SP-B [ng/ml]	0,39	0,0005
SP-B/Protein x 10 ³	0,16	0,15
SP-B/PL x 10 ³	0,14	0,20

Tabelle 3.7-2 Korrelation der ELISA-Werte mit der Bandenintensität von SP-C auf dem Blot

	tau (Kendall)	p
SP-C [ng/ml]	0,24	0,032
SP-C/Protein x 10 ³	0,38	0,0007
SP-C/PL x 10 ³	0,33	0,003

Wie die Tabellen 3.7-1 und 3.7-2 zeigen, besteht zwischen dem im ELISA gemessenen SP-B-Gehalt und der Bandenintensität von SP-B eine signifikante Korrelation. Ebenso verhält es sich mit den ELISA-Werten und der Bandenintensität von SP-C. Auch für das Verhältnis von SP-C zum Protein- bzw. Phospholipidgehalt der BAL lässt sich eine signifikante Korrelation zur Bandenintensität finden, nicht jedoch für das Verhältnis von SP-B zum Protein- bzw. Phospholipidgehalt der BAL.

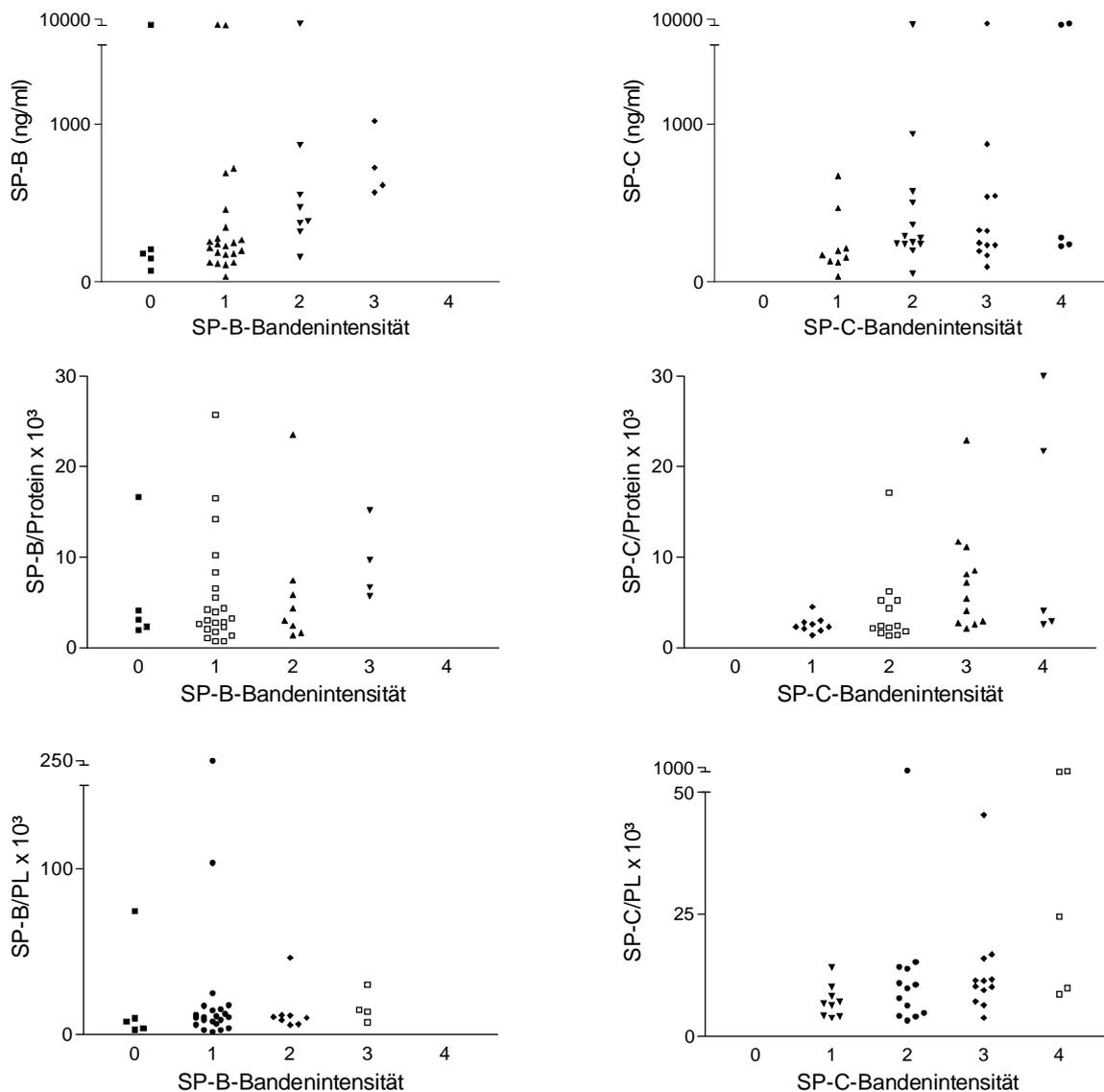


Abbildung 3.7-2 Darstellung der Korrelation zwischen SP-B- und SP-C-Gehalt im ELISA, dessen Verhältnis zu Gesamtprotein- und Phospholipidgehalt und der Bandenintensität

3.8 Deglycosylierung

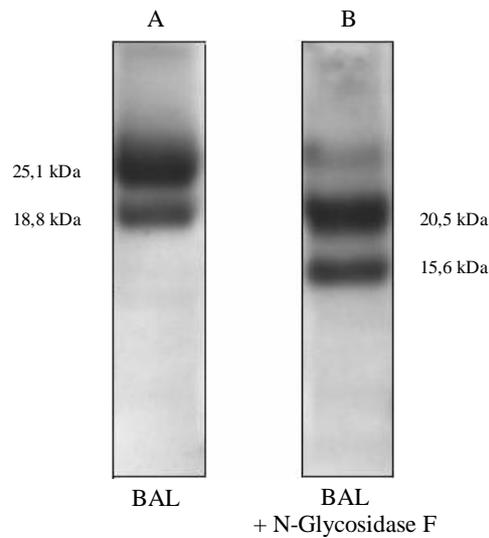


Abbildung 3.8-1 BAL des Patienten PAP 04, mit dem AK CTERMB inkubiert, ohne (A) und nach (B) Deglycosylierung mittels N-Glycosidase F

Die Abbildung 3.8-1 zeigt in der Lane A BAL des Patienten PAP 04, die mit dem Antikörper CTERMB inkubiert wurde. Die Lane B stellt BAL des gleichen Patienten dar, die vor der Inkubation mit dem Antikörper CTERMB mit dem Enzym N-Glycosidase F inkubiert wurde. Durch die Deglycosylierung lässt sich das Molekulargewicht des 25 kDa-Peptids auf 21 kDa senken und das des 19 kDa-Peptids auf 16 kDa.

3.9 Silberfärbung

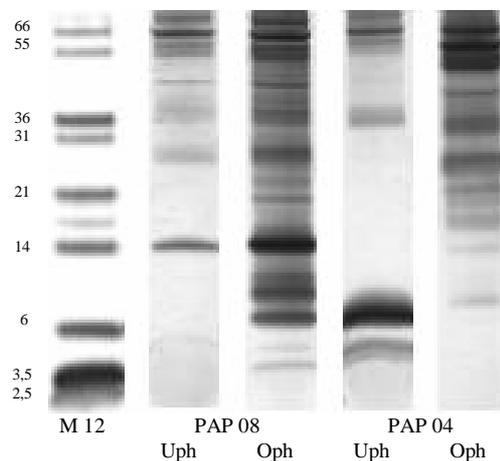


Abbildung 3.9-1 Silberfärbung der Unterphase (Uph) und Oberphase (Oph) der Patienten PAP 04 und PAP 08. Links ist der Molekulargewichtsmarker M 12 dargestellt mit MW-Angaben in kDa.

Tabelle 3.9-1 Banden in der Ober- und Unterphase nach Silberfärbung und in der BAL nach Western Blotting mit dem AK CTERMB bei den Patienten PAP 08 und PAP 04

PAP 08			PAP 04		
Silberfärbung		Western Blot	Silberfärbung		Western Blot
Oberphase	Unterphase	CTERMB	Oberphase	Unterphase	CTERMB
44,7	45,1		44,4		
42,5			39,8		
40,6	40,9				
37,1	37,9			36,8	
35,3					
30,0			30,5		
27,9	27,0	24,7	25,3		25,1
22,9			22,9		
19,9		19,2	20,3		18,8
15,7			16,0		
13,7	14,0	13,6			
10,3			10,3		
9,1				8,3	
6,4				5,5	
4,2					
2,9					

Die Abbildung 3.9-1 zeigt die Silberfärbung der Ober- und Unterphasen der BALs der Patienten PAP 08 und PAP 04. Aus der Tabelle 3.9-1 ist ersichtlich, welche der Banden auch durch Western Blotting mit dem Antikörper CTERMB erkannt werden.

4 Diskussion

4.1 Protein- und Phospholipidgehalt der BAL

Bei dem Vergleich der Konzentrationen an Proteinen und Phospholipiden in der BAL der verschiedenen Gruppen ergeben sich signifikante Unterschiede für Gesamtprotein, SP-B, SP-C und Phospholipidgehalt. So weisen die Gruppen CAP, PAP und URD einen signifikant höheren Gehalt an Gesamtprotein im Vergleich zu den Kontrollen, der Gruppe obB und der Gruppe nobB auf. Für den Gehalt an SP-B und SP-C lassen sich signifikant höhere Werte in der Gruppe PAP im Vergleich zur Gruppe obB nachweisen. Ebenso zeigt die Gruppe PAP signifikant höhere Werte an Phospholipiden im Vergleich zu den Gruppen obB und nobB. Dies stimmt mit den Beschreibungen in der Literatur überein (15).

Für den Quotienten aus Protein- und Phospholipidgehalt ergeben sich in den verschiedenen Gruppen nicht-signifikant unterschiedliche Werte. Die Mediane der Gruppen CAP und URD liegen dabei deutlich höher als in den Gruppen PAP, obB und nobB. Dieses ergibt sich daraus, dass die BALs der Gruppe PAP deutlich reicher an Proteinen und Phospholipiden sind, die BALs der Gruppen CAP und URD jedoch nur einen erhöhten Wert an Proteinen, nicht aber Phospholipiden aufweisen. Die zugrundeliegende Erkrankung führt in der Gruppe PAP zu einer Anhäufung von protein- und auch phospholipidreichem Material im Alveolarraum, bei CAP und URD zur Anhäufung von lediglich proteinreichem Material (36).

4.2 Vergleich der klinischen Parameter

4.2.1 Alter, Zellbild und Recovery der BAL bei Kontrollen, obB und nobB

Bei dem Vergleich der Kontrollen und der Gruppen obB und nobB hinsichtlich des Alters, der Zellzahl und der Recovery der BAL ergibt sich ein signifikanter Unterschied lediglich für den Gehalt an neutrophilen Granulozyten. So lassen sich in der Gruppe obB mehr dieser Zellen nachweisen als bei den Kontrollen.

4.3 1-D-Gelelektrophorese und Western Blotting

4.3.1 SP-B

In der Gruppe der Kontrollen kann in jeder BAL SP-B nachgewiesen werden. Das durchschnittliche Molekulargewicht liegt mit 8,7 kDa exakt im Bereich des in der Literatur beschriebenen Wertes (18). Das Material dieser Gruppe ist BAL, die nicht lipidextrahiert wurde. Im Gegensatz dazu wurde in den anderen Gruppen in der Regel die Lipidphase für die Bestimmung von SP-B verwendet. Dadurch enthält dieses Material mehr Phospholipide, die SP-B in der Elektrophorese weniger weit laufen lassen. So liegen die Mittelwerte für die anderen Gruppen bei 10,7 kDa (obB), 10,9 kDa (nobB), 10,6 kDa (CAP), 10,5 kDa (PAP) und 9,2 kDa (URD).

In der Gruppe obB konnte bei 4 Patienten in der Lipidphase nicht eindeutig SP-B nachgewiesen werden. Erst bei Inkubation der BAL zeigte sich auch bei diesen Patienten ein deutliches SP-B. In der Gruppe nobB verhielt es sich entsprechend mit 3 Patienten.

Die Gruppe CAP zeigt bei 3 Patienten mit der Diagnose einer SP-B-Defizienz kein SP-B, wobei von diesen nur einer (CAP 05) heterozygot die Veränderung 457delC aufweist. Bei den restlichen 5 Patienten der Gruppe CAP kann SP-B dargestellt werden, auch bei Patient CAP 02, der homozygot für die Veränderung 496delG ist. Dies kann dadurch erklärt werden, dass der Patient kurz vor der Materialentnahme exogenes Surfactant substituiert bekommen hatte. Gleiches gilt für den Patienten CAP 03. Zwischen Substitution von exogenem Surfactant und einer Materialentnahme zur Bestimmung der Surfactantproteine sollten jedoch immer mindestens eine Woche, besser zwei Wochen liegen (14).

In der Gruppe PAP ließ sich bei jedem Patienten SP-B nachweisen. Bei den Patienten der Gruppe URD ließ sich bei URD 01 kein SP-B darstellen und bei URD 03 nur ein sehr schwaches Signal. Bei dem Patienten URD 03 konnte eine SFTPb-Mutation ausgeschlossen werden. URD 01 zeigte sich homozygot für den Polymorphismus C4517T im SFTPb-Gen.

4.3.2 SP-C

In der Gruppe der Kontrollen konnte in 14 der 15 BALs SP-C nachgewiesen werden. Eine Wiederholung des Versuchs oder Untersuchung des Materials nach Lipidextraktion zum Nachweis von SP-C in der BAL des Kindes C 09 wurde wegen Materialmangel nicht durchgeführt. Das Molekulargewicht für SP-C liegt in der Gruppe der Kontrollen durchschnittlich bei 4,8 kDa. Es liegt somit höher als das in der Literatur beschriebene SP-C

mit 4,2 kDa (36). In den anderen Gruppen weist SP-C ein durchschnittliches Molekulargewicht von 5,2 kDa (obB), 5,2 kDa (nobB), 5,3 kDa (CAP), 4,7 kDa (PAP) und 5,7 kDa (URD) auf.

In den Gruppen obB und nobB konnte in jeder BAL SP-C nachgewiesen werden.

Die Gruppe CAP weist 2 Patienten auf, bei denen kein SP-C darstellbar ist. Beides sind Kinder mit SP-B-Defizienz. Bei dem Patienten CAP 04 konnte eine Mutation im SFTPC-Gen ausgeschlossen werden, der Patient CAP 05 wurde hieraufhin nicht untersucht, weist jedoch die heterozygote SFTPB-Mutation 457delC auf (37, 38).

In der Gruppe PAP fand sich bei jedem Patienten SP-C, auch bei den Patienten PAP 02, PAP 08 und PAP 10, bei denen eine Mutation im SP-C-Gen nachgewiesen werden konnte (38).

Die Gruppe URD zeigt bei den Patienten URD 01, URD 02 und URD 03 kein SP-C. Bei allen wurde eine SP-C-Gen-Mutation ausgeschlossen (38).

4.3.3 Pro-SP-B

Der Antikörper gegen Pro-SP-B (Whitsett, 55522) ist bereits in vielen Publikationen verwendet worden (9, 22, 26, 44). Allerdings ist seine Spezifität nicht genau bekannt. Hier wird zunächst nur auf den Nachweis von Banden bei Verwendung der BAL-Unterphase eingegangen werden, der Vergleich mit Oberphase und Nativ-BAL folgt später.

In der Gruppe obB ließen sich nur sehr schwache Banden darstellen. So weisen zwei Patienten eine Bande bei 18 kDa auf, ein Patient hat eine Bande bei 24 kDa, bei 26-28 kDa lässt sich bei zwei Kindern eine Bande darstellen, und drei Patienten weisen eine Bande bei 36-38 kDa auf.

Die Gruppe nobB zeigt keinen Nachweis von Banden.

In der Gruppe CAP lässt sich eine deutlichere Bande bei Patient CAP 07 im Bereich 18 kDa darstellen, die anderen gefundenen Banden sind nur sehr schwach sichtbar. Diese liegen bei 12-14 kDa und bei 26-45 kDa.

Die Gruppe PAP weist die meisten Banden mit dem Antikörper gegen Pro-SP-B auf. Einmal findet sich eine Bande bei 8 kDa, dreimal lässt sich eine Bande bei 12 kDa darstellen, eine Bande bei 14 kDa gibt es einmal. Fünfmal findet sich eine Bande bei 18 kDa, dreimal bei 26 kDa, einmal bei 28 kDa, und einmal reicht eine Bande von 21 bis 28 kDa.

In der Gruppe URD weist ein Patient zahlreiche Banden bei 12, 14, 21, 25, 26-36, 38 und >40 kDa auf, ein anderer hat eine Bande bei 14-18 kDa, ein weiterer bei 22-24 kDa, und ein Patient zeigt zwei Banden bei 12 und 14-26 kDa.

Da nicht geklärt ist, an welcher Stelle der Pro-Form der Antikörper angreift und auch die Spezifität dieses Antikörpers nicht sicher bekannt ist, können aus der Bandenverteilung nur bedingt Rückschlüsse auf die Prozessierung des Proteins gezogen werden.

4.3.4 Pro-SP-C

Mit dem Antikörper Pro-SP-C (Whitsett, 68514), der ebenfalls als erster verfügbarer Pro-SP-C-Antikörper in der Literatur viel verwendet worden ist (9, 26), können wie erwartet in den Gruppen obB und nobB keine Banden dargestellt werden.

In der Gruppe CAP finden sich Banden bei 8 kDa, 10 kDa und 12 kDa: Der Patient CAP 02 mit der SP-B-Mutation 496delG weist Proformen bei 8 und 10 kDa auf, der Patient CAP 03 mit der homozygoten Mutation 121ins2 hat eine Proform bei 12 kDa, und der Patient CAP 06, der ebenfalls homozygot für die Mutation 121ins2 ist, zeigt eine Proform bei 10 kDa. Dies zeigt, wie bereits bei ten Brinke et al. (35) beschrieben, dass es bei einer Störung im SP-B-Metabolisierungsprozess auch zur Akkumulation von aberrant prozessiertem Pro-SP-C kommt.

Die Gruppe PAP zeigt Banden bei 8 kDa, 10 kDa, 12 kDa und 14 kDa. Der Patient PAP 08, bei dem die SFTPC-Mutation g.1286T>C nachgewiesen wurde (38), weist mit diesem Antikörper Proformen bei 8, 10, 12 und 14 kDa auf. Die beiden anderen Patienten mit nachgewiesenen Mutationen im SP-C-Gen PAP 02 und PAP 10 (38) lassen keine Proformen erkennen. Der Patient PAP 03 zeigt eine sehr schwache Bande bei 8 kDa, die Patienten PAP 04 und 05 lassen Proformen bei 8, 10 und 12 kDa erkennen. Bei den Patienten PAP 09 und PAP 11 wird jeweils eine Proform bei 10 kDa sichtbar.

In der Gruppe URD, in der fünf Patienten-BALs mit dem Antikörper Pro-SP-C inkubiert wurden, zeigt sich eine Bande in Höhe 28-30 kDa bei dem Patienten URD 02. Da dieses Molekulargewicht über dem des Pro-SP-C mit 21 kDa liegt, wurde dieser Bande keine Bedeutung für diese Arbeit beigemessen.

Ebenso wie bei dem Antikörper Pro-SP-B (Whitsett) ist auch bei diesem Antikörper unklar, an welche Stelle des Pro-SP-C er bindet, so dass nicht geklärt werden kann, ob es sich um C- oder N-terminale Prozessierungsprodukte handelt.

4.3.5 CTERMB

Im Gegensatz zu den Versuchen mit den Antikörpern Pro-SP-B (Whitsett) und Pro-SP-C (Whitsett), wo in der Regel Unterphase der BAL nach Lipidextraktion als Untersuchungsmaterial diente, wurde bei den im folgenden beschriebenen Versuchen mit den Antikörpern CTERMB, NFLANK, CFLANK, NFPROX und NPRO-SP-C-C2 native BAL ohne vorherige Lipidextraktion verwendet. Der Vorteil dieser Antikörper liegt darin, dass die genaue Bindungsstelle an die Proform bekannt ist und durch eine Blockierung der Bindungsstelle des Antikörpers mit dem jeweiligen Peptid eine Differenzierung in spezifische und unspezifische Banden möglich ist.

Bei Inkubation der Kontrollgruppe mit dem Antikörper CTERMB zeigt sich bei 12 von 15 Kindern eine Proform bei durchschnittlich 24,8 kDa. Zwei von diesen Kindern weisen jeweils eine weitere Proform auf, das eine bei 19 kDa, das andere bei 40 kDa. Dies zeigt, dass auch bei völlig lungengesunden Kindern meist eine Proform bei 25 kDa vorliegt, die keine diagnostische Relevanz besitzt. Auch Noguee et al. (26) berichten über eine 26 kDa-Proform bei Kontrollkindern.

In der Gruppe obB lässt sich eine Proform mit durchschnittlich 25 kDa sogar bei allen 19 Kindern nachweisen. Bei 7 Kindern findet sich eine Proform mit 21 kDa, 4 Kinder haben eine Proform mit 34,5 kDa und ein Kind zeigt eine Proform mit 41,5 kDa.

Die Gruppe CAP weist die gleichen Banden auf. So lässt sich in 6 von 8 Fällen die Proform mit durchschnittlich 26,1 kDa finden, bei zwei Kindern findet sich zusätzlich eine Proform mit 20,1 kDa, und bei dem einen von diesen lässt sich auch eine Proform bei 36,1 kDa darstellen. Bei jedem der 13 Patienten der Gruppe PAP kann eine Proform mit durchschnittlich 25,4 kDa nachgewiesen werden. Zehnmal zeigt sich eine Proform mit 21,2 kDa, zweimal eine mit 14 kDa und jeweils einmal eine bei 33,7 kDa und 40,6 kDa.

In der Gruppe URD weisen 6 der 7 Patienten die Proform mit durchschnittlich 25,5 kDa auf, viermal lässt sich eine Proform von 42,6 kDa darstellen, und jeweils einmal gibt es Proformen bei 23,3 kDa und bei 9,4 kDa. Die letzte kommt bei Verwendung dieses Antikörpers nur in der Gruppe URD vor, nicht in den anderen Gruppen.

4.3.6 NFLANK

Bei Inkubation der BALs der Gruppe obB lassen sich bei 4 von 19 Kindern Proformen bei durchschnittlich 24,4 kDa darstellen. Diese sind jedoch nur sehr schwach zu sehen.

In der Gruppe CAP findet sich bei 3 Patienten eine Bande bei durchschnittlich 25,5 kDa, einer davon hat zusätzlich eine Bande bei 12 kDa.

Häufiger treten Proformen in der Gruppe PAP auf. So lässt sich bei 11 von 12 Kindern dieser Gruppe eine Bande bei durchschnittlich 25,2 kDa nachweisen. 3 von diesen Patienten haben zusätzlich eine Proform bei 20,4 kDa, 2 davon eine bei 9,1 kDa und ein Patient hat eine schwache Bande bei 13,4 kDa und eine stärkere bei 15,1 kDa.

Für die Gruppe URD gilt, dass 4 von 6 Patienten eine Proform bei durchschnittlich 24,9 kDa haben und einer hiervon zusätzlich bei 20,9 kDa.

Bei Guttentag et al. (16) ließen sich bei Inkubation von humanem fetalem Lungengewebe in Kultur mit dem AK NFLANK ebenso Banden bei 25 und 9 kDa darstellen, zusätzlich jedoch auch noch bei 42 kDa.

4.3.7 CFLANK

In der Gruppe obB lässt sich bei Inkubation mit dem Antikörper CFLANK nur bei einem Patienten eine Proform bei 8,6 kDa finden.

Die Gruppe CAP weist zwei Kinder auf, die jeweils eine Proform haben. Einmal bei 11,1 kDa, einmal bei 25,0 kDa.

Zwei der Patienten aus der Gruppe PAP lassen Proformen bei 25,0 kDa finden, einer davon zusätzlich bei 20,8 kDa. Ein anderer aus dieser Gruppe zeigt eine Bande bei 8,2 kDa.

In der Gruppe URD wurden 6 BALs mit dem AK CFLANK inkubiert. Bei 3 Kindern zeigt sich eine Proform bei 25,3 kDa, eines hiervon hat zusätzlich eine Bande bei 10,1 kDa.

Guttentag et al. (16) wiesen mit diesem Antikörper in Kultur humaner Lunge Banden bei 42 und 25 kDa nach.

4.3.8 NFPROX

Bei Inkubation mit dem Antikörper NFPROX lassen sich in den Gruppen obB und CAP keine Proformen darstellen.

Bei den Patienten der Gruppe PAP findet sich in 5 Fällen eine Proform bei 15,4 kDa. Zwei hiervon und ein anderer haben eine Proform bei 12,8 kDa, und in einem anderen Fall lässt sich ein Peptid bei 19 kDa finden.

In der Gruppe URD weisen zwei von sechs hieraufhin untersuchten Patienten eine Proform bei 15,1 kDa auf. Ein anderes Kind zeigt eine schwache Proform von 3,6 kDa, bei einem weiteren Kind wird eine Proform bei 20,7 kDa sichtbar.

Auch bei Guttentag et al. (16) ließ sich in Kultur humaner Lunge bei Inkubation mit dem AK NFPROX eine Bande bei 19 kDa finden, die dem abgespaltenen NH₂-terminalen Propeptid entspricht. Außerdem fand sich dort eine schwache Bande bei 42 kDa, die in der vorliegenden Arbeit in keiner der untersuchten Gruppen nachweisbar war.

4.3.9 NPRO-SP-C-C2

In den Gruppen der Kontrollen und Kinder mit obstruktiver Bronchitis lassen sich bei Inkubation mit dem Antikörper NPRO-SP-C-C2 keine Proformen darstellen.

Bei einem Patienten der Gruppe CAP findet sich eine Bande bei 6,6 kDa und eine bei 9,0 kDa. Dieser Patient CAP 06 ist homozygot für die Mutation 121-ins2. Bei Inkubation mit dem AK Pro-SP-C (Whitsett) läßt sich bei diesem Patienten lediglich eine Bande bei 10 kDa darstellen.

In der Gruppe PAP weist einer von 12 hieraufhin untersuchten Patienten (PAP 04) eine Proform bei 6 kDa auf, ein anderer (PAP 08) zeigt 3 Proformen bei 10,3 kDa, 15,2 kDa und 19,2 kDa. Bei letzterem konnte die Mutation g.1286T>C im SP-C-Gen nachgewiesen werden. Bei Inkubation mit dem AK Pro-SP-C (Whitsett) zeigen sich bei diesem Kind Banden bei 8, 10, 12 und 14 kDa. Der Patient PAP 04 läßt mit diesem AK Banden bei 8, 10 und 12 kDa finden.

Die Gruppe URD läßt bei dem Patienten URD 06 eine Proform bei 8,9 kDa nachweisen, die mit dem AK Pro-SP-C (Whitsett) nicht zu sehen ist.

Die Untersuchungen mit diesen zwei Antikörpern zeigen sehr unterschiedliche Ergebnisse. Mit den Untersuchungen von Nogee et al. (26) und Beers et al. (2) stimmt das Ergebnis überein, dass bei Kontrollen keine SP-C-Proformen gefunden werden konnten. Während bei Nogee und Beers bei Patienten mit SP-B-Defizienz regulär aberrante Pro-SP-C-Formen bei 6 kDa gefunden wurden, war dies in der vorliegenden Arbeit mit dem AK NPRO-SP-C-C2 nur bei einem Patienten mit SP-B-Defizienz (CAP 06) der Fall. Mit dem AK Pro-SP-C (Whitsett) dagegen fanden sich aberrante Proformen im Bereich von 8, 10 und 12 kDa bei 3 Patienten mit SP-B-Defizienz. Beachtet werden muss hierbei allerdings, dass bei der Verwendung des

letzteren Antikörpers lipidextrahiertes Material benutzt wurde, so dass ein direkter Vergleich vorsichtig erfolgen muß.

4.4 Gefundene SP-B-Vorstufen im Überblick

Die Abbildung 3.4-1 gibt einen Überblick über alle mit den Antikörpern CTERMB, NFLANK, CFLANK und NFPROX gefundenen Peptide und deren mögliche Morphologie. Die in mehr als 5 % der mit einem Antikörper inkubierten Proben nachzuweisenden Peptide wurden fettgedruckt dargestellt bzw. dick umrandet. Hierzu gehören die Peptide bei 40-42 kDa, 34-36 kDa, 24-26 kDa, 19-21 kDa, 14-15 kDa und 12-13 kDa. Bei den letzteren beiden handelt es sich wahrscheinlich um N-terminal abgespaltene Peptide, die das reife SP-B nicht mehr beinhalten. Da das Peptid bei 19-21 kDa von allen vier Antikörpern erkannt wird, wenn auch von CFLANK und NFPROX in geringerem Maße, könnte es sich hierbei um ein sowohl am N- wie auch am C-Terminus verkürztes Peptid handeln. Das Peptid bei 24-26 kDa wird nicht von NFPROX erkannt, während die drei anderen Antikörper daran binden, so dass es sich möglicherweise um ein nur am N-Terminus verkürztes Peptid handelt. Warum die 40-42 kDa- und die 34-36 kDa-Proform nur vom Antikörper CTERMB erkannt wird, nicht jedoch von den anderen, was bei dieser Größe zu erwarten wäre, ist unklar.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurden bei Guttentag et al. (16), die mit homogenisiertem Gewebe menschlicher Lungen arbeiteten, zwar auch die Vorstufen bei 42 kDa und 25 kDa gefunden, nicht jedoch die übrigen beschriebenen. Außerdem wurde hier eine Vorstufe bei 9 kDa nachgewiesen, die in der vorliegenden Arbeit nur in sehr seltenen Fällen darstellbar war.

4.5 Gefundene SP-C-Vorstufen im Überblick

In der Abbildung 3.5-1 sind die Peptide dargestellt, die mit den Antikörpern NPRO-SP-C-C2 und Pro-SP-C (Whitsett) gefunden wurden. In mehr als 5 % wurden dabei Peptide bei 12 kDa, 9-10 kDa und 8 kDa nachgewiesen. In geringerer Anzahl waren Vorstufen bei 19 kDa, 14-15 kDa und 6-7 kDa zu sehen. Das reife SP-C konnte durch den Antikörper SP-C in 93 % der untersuchten Patienten dargestellt werden.

Bei ten Brinke et al. (35) ließen sich neben der reifen Form mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmend ebenso Vorstufen mit einem Molekulargewicht von 6 und 7 kDa finden. Auch wurden Peptide bei 21 kDa und 16 kDa beschrieben, die in der vorliegenden Arbeit mit 19 und 14-15 kDa jedoch nur in jeweils einem Fall nachweisbar waren. Die Peptide bei 8 kDa, 9-10 kDa und 12 kDa waren bei ten Brinke et al. (35) nicht darstellbar.

4.6 Vergleich der Banden in der Unter- und Oberphase und der BAL

In diesem Teil der Arbeit wurden die Ergebnisse der Inkubation verschiedener Materialien eines Patienten mit dem gleichen Antikörper verglichen. Hierfür lagen fünf Patienten vor, bei denen BAL, Unter- und Oberphase untersucht wurden, drei Patienten mit BAL und Unterphase im Vergleich und ein Patient, bei dem Unter- und Oberphase verglichen wurden. Antikörper gegen SP-B, SP-C, Pro-SP-B (Whitsett) und Pro-SP-C (Whitsett) wurden verwendet. Die Patienten entstammten den Gruppen obB und nobB.

Während SP-B bei allen Patienten in der BAL gefunden wurde, ließ es sich nur bei 3 von 9 Patienten in der Unterphase darstellen. In der Oberphase wurde es in 4 der 6 übrigen Fälle sichtbar. Das geeignetste Material zum Nachweis von SP-B scheint also BAL zu sein.

SP-C ließ sich in jeder der neun Unterphasen darstellen, ebenso in allen acht verwendeten BALs. In der Oberphase ließ es sich jedoch in keinem der sechs untersuchten Fälle nachweisen. Zum Nachweis von SP-C sollte also Unterphase oder BAL benutzt werden.

Bei Inkubation mit den Antikörpern Pro-SP-B und Pro-SP-C konnten die meisten Banden bei Verwendung der BAL dargestellt werden. In der Unterphase zeigte sich bei Inkubation mit Pro-SP-B nur in zwei Fällen eine Proform, bei Inkubation mit Pro-SP-C in keinem Fall. Jede Bande, die in der Oberphase sichtbar war, konnte auch in der BAL nachgewiesen werden.

Bei Verwendung der Antikörper Pro-SP-B und Pro-SP-C finden sich also die meisten Proformen in der BAL.

4.7 Korrelation zwischen Bandenintensität und ELISA

In diesem Teil der Arbeit wurden für die Patienten der Gruppen obB und nobB die ELISA-Werte für SP-B und SP-C mit der Bandenintensität in der Unterphase verglichen. Hier zeigte sich mit der Methode nach Kendall eine signifikante Korrelation mit der Bandenintensität,

sowohl für den Gehalt an SP-B und SP-C, als auch für das Verhältnis von SP-C zum Gesamtprotein- bzw. Phospholipidgehalt der BAL. Obwohl die semiquantitative Analyse mittels Western Blotting recht ungenau erscheint, so hat sie gegenüber dem ELISA den Vorteil, dass anhand des Molekulargewichtes bestimmt werden kann, wie viel intaktes SP-B bzw. SP-C oder aber deren Aggregate bzw. Abbauförmungen vorliegen. Der ELISA detektiert die Gesamtmenge an immunreaktivem Protein und kann dadurch zu falsch hohen Ergebnissen föhren. Beide Methoden stimmen jedoch durchaus überein, so dass mit der 1-D-Gelelektrophorese bei Verwendung der Unterphase der BAL Rückschlüsse auf den Gehalt an Surfactantproteinen B und C gezogen werden können.

4.8 Deglycosylierung

Für den Versuch der Deglycosylierung wurde zweimal BAL des Patienten PAP 04 mit CTERMB inkubiert. Dabei wurde einmal vor der Inkubation mit dem Antikörper N-Glycosidase F zugegeben, sodass die an den AS 129 und 311 gebundenen Oligosaccharide abgespalten wurden. Die Proform mit eigentlich 25,1 kDa zeigte danach ein MW von 20,5 kDa und die Proform mit 18,8 kDa wies noch 15,6 kDa auf.

Korimilli et al. (21) zeigten auf die gleiche Weise eine Reduktion der 25 kDa-Proform auf 21 kDa und außerdem eine Reduktion der 42 kDa-Proform auf 39 kDa. Hierdurch wurde gezeigt, dass es sich auch bei der aberrant prozessierten Proform von 18,8 kDa bei dem Patienten PAP 04 um ein glykosyliertes Peptid handelt.

4.9 Silberfärbung

In diesem Kapitel soll exemplarisch die Silberfärbung nach Heukeshoven/Dernick (19) anhand von zwei Patienten der Gruppe PAP dargestellt und mit der Methode des Western Blotting (Inkubation mit AK CTERMB) verglichen werden.

Von beiden Patienten wurde für die Silberfärbung nach Lipidextraktion jeweils Unter- und Oberphase verwendet. Die meisten Banden zeigten sich bei beiden Patienten bei Silberfärbung der Oberphase. Bei dem Patienten PAP 08 traten bei Inkubation mit dem AK CTERMB 3 Banden im Bereich von 25, 19 und 14 kDa auf, wobei in der Unterphase bei Silberfärbung eine Bande bei 14 kDa und eine Bande bei 27 kDa sichtbar wurden, jedoch

nicht bei 19 kDa. In der Oberphase fanden sich dagegen sämtliche Banden wieder. Die beiden Banden bei 25 und 19 kDa, die sich bei dem Patienten PAP 04 mit dem AK CTERMB im Western Blot fanden, konnten in der Oberphase durch Silberfärbung dargestellt werden, nicht jedoch in der Unterphase.

5 Zusammenfassung

Surfactant ist eine lebensnotwendige oberflächenaktive Substanz, deren Hauptaufgabe in der Erniedrigung der Oberflächenspannung der Lungenalveolen liegt. Neben den Lipiden spielen insbesondere die hydrophoben Surfactant-Proteine SP-B und SP-C hierfür eine entscheidende Rolle. Diese Peptide werden intrazellulär aus Vorstufen durch proteolytische Prozessierung gebildet. Ein Teil dieser Vorstufen kann unter normalen oder pathologischen Bedingungen in den Alveolarraum sezerniert und daher durch eine bronchoalveoläre Lavage gewonnen werden.

Während bei Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose bereits einige Erkenntnisse über das Verteilungsmuster und Prozessierungsstörungen dieser Proteine gewonnen werden konnten, ist hierüber bei lungengesunden Kindern sowie Patienten mit rezidivierenden Bronchitiden oder unklaren interstitiellen Lungenerkrankungen bisher kaum etwas bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bei Kindern mit unterschiedlichen Lungenkrankheiten und lungengesunden Kindern das Vorkommen der Proteine SP-B und SP-C sowie ihrer Vorstufen in bronchoalveolärer Lavage zu untersuchen. Dabei wurden die 1-D-Gelelektrophorese und anschließendes Western Blotting angewandt.

Prozessierungszwischenprodukte von SP-B, nämlich Pro-SP-B bei 25 kDa, wurden regelmäßig in der Lavage auch von lungengesunden Kindern gefunden.

Wirklich spezifische Pro-SP-B-Formen, die ausschließlich bei Krankheitszuständen vorkommen, konnten nicht identifiziert werden, und der Nachweis dieser Vorstufen scheint also für die Diagnostik bestimmter Krankheiten ungeeignet zu sein.

Vorstufen im Metabolisierungsprozeß von SP-C finden sich dagegen weitaus seltener, nie bei lungengesunden Kindern. Insbesondere bei Patienten mit Genmutationen im SP-B- und SP-C-Gen kommt dem Nachweis von aberrantem Pro-SP-C eine diagnostische Bedeutung zu.

Neben den weit verbreiteten Antikörpern Pro-SP-B/-C der Whitsett-Gruppe wurden in dieser Arbeit die Peptidantikörper CTERMB, NFLANK, CFLANK, NFPROX und NPRO-SP-C-C2 verwendet, deren Vorteil darin liegt, dass die genaue Bindungsstelle an die Proform bekannt

ist, und dadurch Rückschlüsse auf die Morphologie des Peptids gezogen werden können. Außerdem ist durch die Blockierung der Bindungsstelle mit dem jeweiligen Peptid eine Unterscheidung in spezifische und unspezifische Banden möglich.

In einem nächsten Schritt kann zur genaueren Identifizierung der hier gefundenen Peptide eine Sequenzierung mittels Massenspektrometrie angestrebt werden. So können weiterführende Aussagen über Veränderungen im Metabolisierungsprozeß von SP-B und SP-C direkt aus der bronchoalveolären Lavage gewonnen werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Ballard PL, Noguee LM, Beers MF, Ballard RA, Planer BC, Polk L, de Mello DE, Moxley MA, Longmore WJ. Partial deficiency of surfactant protein B in an infant with chronic lung disease. *Pediatrics* 1995; 96:1046-1052
2. Beers MF, Hamvas A, Moxley MA, Gonzales LW, Guttentag SH, Solarin KO, Longmore WJ, Noguee LM, Ballard PL. Pulmonary Surfactant Metabolism in Infants Lacking Surfactant Protein B. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22 (3):380-391
3. Bligh EC, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem Physiol* 1959; 37:911-917
4. Bradford M. A rapid and sensitive method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254
5. Colton HR, Hamvas A. Pulmonary Alveolar Proteinosis. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, editors. Nelson textbook of Pediatrics, 16th edition. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000: Chapter 403
6. Creuwels LAJM, van Golde LMG, Haagsmann HP. The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects. *Lung* 1997; 175:1-39
7. Curstedt T, Johansson J, Persson P, Eklund A, Robertson B, Löwenadler B. Hydrophobic surfactant-associated polypeptides: SP-C is a lipopeptide with two palmitoylated cysteine residues, whereas SP-B lacks covalently linked fatty acyl groups. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:2985-2989
8. Duck-Chong CG. A Rapid Sensitive Method for Determining Phospholipid Phosphorus Involving Digestion with Magnesium Nitrate. *Lipids* 1978; 14:492-497
9. Dunbar AE III, Wert SE, Ikegami M, Whitsett JA, Hamvas A, White FV, Piedboeuf B, Jobin C, Guttentag S, Noguee LM. Prolonged survival in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency associated with a novel splicing mutation. *Pediatr Res* 2000; 48:275-282

10. Dunn OJ. Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics* 1964; 6 (3):241-252
11. Floros J, Veletza SV, Kotikalapudi P, Krizkova L, Karinch AM, Friedman C, Buchter S, Marks K. Dinucleotide repeats in the human surfactant protein-B gene and respiratory-distress syndrome. *Biochem J* 1995; 305:583-590
12. Glasser SW, Korfhagen TR, Perme CM, Pilot-Matias TJ, Kister SE, Whitsett JA. Two SP-C genes encoding human pulmonary surfactant proteolipid. *J Biol Chem* 1988; 263:10326-10331
13. Griese M, Schumacher S, Tredano M, Steinecker M, Braun A, Guttentag S, Beers MF, Bahuau M. Expression profiles of hydrophobic surfactant proteins in children with diffuse chronic lung diseases. *Respir Res* 2005, 6:80-90
14. Griese M, Tredano M, Nicolai T, Bahuau M. Molekulare Grundlagen und Klinik der pulmonalen Alveolarproteinosen. *Dtsch Arztebl* 2002; 99:A1013-1023
15. Griese M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J* 1999; 13:1455-1476
16. Guttentag SH, Beers MF, Bieler BM, Ballard PL. Surfactant protein B processing in human fetal lung. *Am J Physiol* 1998; 275:L559-L566
17. Hamvas A, Noguee LM, Mallory GB Jr, Spray TL, Huddleston CB, August A, Dehner LP, deMello DE, Moxley M, Nelson R, Cole FS, Colten HR. Lung transplantation for treatment of infants with surfactant protein B deficiency. *J Pediatr* 1997; 130(2):231-239
18. Hawgood S, Latham D, Borchelt J, Daum D, White T, Benson B. Cell-specific posttranslational processing of the surfactant-associated protein SP-B. *Am J Physiol* 1993; 264: L290-L299
19. Heukeshoven J, Dernick R. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Elektrophoresis* 1988;9:28-32

20. Klein JM, Thompson MW, Snyder JM, George TN, Whitsett JA, Bell EF, Mc Cray PB Jr, Noguee LM. Transient surfactant protein B deficiency in a term infant with severe respiratory failure. *J Pediatr* 1998; 132:244-248
21. Korimilli A, Gonzales LW, Guttentag SH. Intracellular Localization of Processing Events in Human Surfactant Protein B Biosynthesis. *J Biol Chem* 2000; 275:8672-8679
22. Lin S, Phillips KS, Wilder MR, Weaver TE. Structural requirement for intracellular transport of pulmonary surfactant protein B (SP-B). *Biochimica et Biophysica Acta* 1996; 1312:177-185
23. Lin Z, Pearson C, Chinchilli V, Pietschmann SM, Luo J, Pison U, Floros J. Polymorphisms of human SP-A, SP-B and SP-D genes: Association of SP-B Thr131Ile with ARDS. *Clin Genet* 2000; 58:181-191
24. Noguee LM, de Mello DE, Dehner LP, Colten H. Deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *N Engl J Med* 1993; 328:406-410
25. Noguee LM, Garnier G, Dietz H, Singer L, Murphy AM, de Mello DE, Colten HR. A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *J Clin Invest* 1994; 93:1860-1863
26. Noguee LM, Wert SE, Proffitt SA, Hull WM, Whitsett JA. Allelic heterogeneity in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency. *Am J Crit Care Med* 2000; 161:973-981
27. Pilot-Matias T, Kister SE, Fox JL, Kropp K, Glasser SW, Whitsett JA. Structure and organization of the gene encoding human surfactant proteolipid SP-B. *DNA* 1989; 8:75-86
28. Possmayer F. Pulmonary perspective: a proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138:990-998
29. Pryhuber GS. Regulation and function of pulmonary surfactant protein B. *Mol Genet Metab* 1998; 64:217-228

30. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. - 257., neu bearb. Aufl. – Berlin; New York: de Gruyter, 1994
31. Rosen SH, Castleman B, Liebow AA. Pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med* 1958; 258:1123-1142
32. Schmidt R, Ruppert C, Daum C, Grimminger F, Seeger W, Steinhilber W, Günther A. An ELISA technique for quantification of surfactant apoprotein (SP)-C in bronchoalveolar lavage fluids. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:470-474
33. Somaschini M, Wert S, Mangili G, Colombo A, Noguee L. Hereditary surfactant protein B deficiency resulting from a novel mutation. *Intensive Care Med* 2000; 26:97-100
34. Suzuki Y, Kogishi K, Fujita Y, Kina T, Nishikawa S. A monoclonal antibody to the 15000 Da protein associated with porcine pulmonary surfactant. *Exp Lung Res* 1986; 11:61-73
35. Ten Brinke A, van Golde LMG, Batenburg JJ. Palmitoylation and processing of the lipopeptide surfactant protein C. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1583:253-265
36. Tredano M, de Blic J, Griese M, Fournet J-C, Elion J, Bahuau M. Clinical Biological and genetic Heterogeneity of the Inborn Errors of Pulmonary Surfactant Metabolism. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39 (2):90-108
37. Tredano M, Griese M, de Blic J, Lorant T, Houdayer C, Schumacher S, Cartault F, Capron F, Boccon-Gibod L, Lacaze-Masmonteil T, Renolleau S, Delaisi B, Elion J, Couderc R, Bahuau M. Analysis of 40 Sporadic or Familial Neonatal and Pediatric Cases With Severe Unexplained Respiratory Distress : Relationship to SFTPB. *Am J Med Genet* 2003; 119A:324-339
38. Tredano M, Griese M, Brasch F, Schumacher S, de Blic J, Marque S, Houdayer C, Elion J, Couderc R, Bahuau M. Mutation of SFTPC in Infantile Pulmonary Alveolar Proteinosis With or Without Fibrosing Lung Disease. *Am J Med Genet* 2004; 126A:18-26

39. Tredano M, Lacaze T, Camboni G, Houdayer C, Delaisi B, Feillet F, Feldmann D, Aymard P, Bahuau M. Molecular analysis of the SP-B gene in primitive pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Hum Genet* 1998; 63:A389 (2260)
40. Tredano M, van Elburg RM, Kaspers AG, Zimmermann LJ, Houdayer C, Aymard P, Hull WM, Whitsett JA, Elion J, Griese M, Bahuau M. Compound SFTPB 1549C→GAA (121ins2) and 457delC heterozygosity in severe congenital lung disease and surfactant protein B (SP-B) deficiency. *Hum Mutat* 1999; 14:502-509
41. Vamvakopoulos NC, Modi WS, Floros J. Mapping the human pulmonary surfactant-associated protein B gene (SFTP3) to chromosome 2p12→p11.2. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 68:8-10
42. Vorbroker DK, Profitt SA, Nogee LM, Whitsett JA. Aberrant processing of surfactant protein-C in hereditary SP-B deficiency. *Am J Physiol* 1995; 268:L647-L656
43. Weaver TE, Conkright J. Functions of surfactant proteins B and C. *Annu Rev Physiol* 2001; 63:555-578
44. Weaver TE, Whitsett JA. Processing of hydrophobic pulmonary surfactant protein B in rat type II cells. *Am J Physiol* 1989; 257:L100-L108
45. Whitsett JA, Weaver TE. Hydrophobic Surfactant Proteins in Lung Function and Disease. *N Engl J Med* 2002; 347:2141-2148
46. Wilkinson RH, Rogers RM, Maycock RL. Pulmonary alveolar proteinosis in three infants. *Pediatrics* 1968; 41:510-513
47. Williams GD, Christodoulou J, Stack J, Symons P, Wert SE, Murrell MJ, Nogee LM. Surfactant protein B deficiency: Clinical, histological, and molecular evaluation. *J Paediatr Child Health* 1999; 35:214-220

7 Anhang

7.1 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Matthias Griese für die Bereitstellung des Themas, die fachlich hervorragende Betreuung sowie die kontinuierliche Unterstützung bei der Arbeit.

Sehr herzlichen Dank möchte ich ebenso an Frau Andrea Schams und Frau Yvonne Wüst richten, die mir im Labor mit sehr großer Hilfsbereitschaft stets zur Seite standen sowie an meine Mitdoktoranden und sämtliche Mitarbeiter der Forschungsgruppe Lunge für die Unterstützung, die guten Ideen und die wunderbare Arbeitsatmosphäre.

Für ihre Hilfe bei statistischen Berechnungen danke ich Frau Dr. Imme Haubitz.

Außerdem möchte ich meiner Familie danken, insbesondere meinen Eltern, denen ich diese Arbeit widme.

7.2 Lebenslauf

Silja Christina Schumacher

Geburtsdatum: 6. Oktober 1976
Geburtsort: München
Konfession: evang.-luth.

Schule

09/83 - 07/87 Grundschule Eching
09/87 - 06/96 Dom-Gymnasium Freising, Abitur 06/96

Universität

Seit 11/96 Studium der Humanmedizin an der LMU München
08/98 Ärztliche Vorprüfung
08/99 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/02 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/03 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

03/99 Kardiologie und Pneumologie: Klinikum Großhadern, München
09/99 Kinderchirurgie: Dr. v. Hauner'sches Kinderspital, München
03/00 Gynäkologie/ Geburtshilfe: Klinik für Geburtsmedizin der Charité/ Campus Virchow, Humboldt-Universität, Berlin
08/00 Gynäkologie/ Geburtshilfe: Rotunda-Hospital in Dublin, Irland
02/01 Innere Medizin: Praxis D. Mernitz, Pneumologie, München

Praktisches Jahr

04/02 - 03/03
Chirurgie: Klinik des Dritten Ordens, München (Allgemeinchirurgie)
Kantonsspital Luzern, Schweiz (Kinderchirurgie)
Pädiatrie: Klinikum Traunstein (Allgemeine Pädiatrie)
Hospital for Sick Children, Toronto, Kanada (Infectious Diseases)
Innere Medizin: Krankenhaus München-Harlaching (Kardiologie)

ÄIP und Weiterbildung

Seit 10/03 Tätigkeit an der Kinderklinik St. Elisabeth in Neuburg an der Donau;
bis 09/04 als Ärztin im Praktikum, seit 10/04 als Assistenzärztin