

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im
Dr. von Haunerschen Kinderspital der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Christoph Klein

**Störungen im Surfactantmetabolismus-
Klinische und biochemische Charakterisierung der juveni-
len pulmonalen Alveolarproteinose**

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

vorgelegt von

Jan Frederik Ripper

aus

Rüsselsheim

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Griese

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Oliver Eickelberg
Priv. Doz. Dr. Michael A. Weber

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 05.05.2011

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern

	Abkürzungsverzeichnis	07
1	Einleitung	08
2	Zielsetzung	10
3	Material und Methoden	11
3.1	Material	11
3.2	Häufig verwendete Lösungen, Antikörper und Chemikalien	11
3.2.1	PBS-Puffer	11
3.2.2	Coomassie-Stammlösung	11
3.2.3	Antikörper	11
3.3	Probengewinnung durch BAL und zytologische Beurteilung	12
3.4	Trennung der BALF in large- und small aggregates	13
3.5	Quantitative Proteinbestimmung	13
3.6	Lipidextraktion	14
3.6.1	Nach Bligh-Dyer-Folch	14
3.6.2	Nach Beers et al	15
3.7	Präzipitationen	16
3.7.1	Methanol-Chloroform nach Wessels und Flugge (modifiziert)	16
3.7.2	Immunopräzipitation	17
3.7.2.1	Weiterverarbeitung der Fraktionen der Immunopräzipitation	17
3.7.2.2	Probenaufarbeitung für die Massenspektrometrie	18
3.7.3	Trichloressigsäurepräzipitation	19
3.8	Proteinanalyse mittels Gelelektrophorese und Slot Blot	20
3.8.1	Färbemethoden der Gele	20
3.8.1.1	Coomassie-Färbung	20
3.8.1.2	Silberfärbung	20
3.8.2	Immunodetektion	21
3.8.3	Westernblot	22
3.8.4	Slot Blot	23
3.8.5	1-D-Gelelektrophorese	24
3.8.6	2-D-Gelelektrophorese	26
3.9	Chromatographie	28
3.9.1	Gelfiltration mittels Sepharyl S-200 HR Säule	28

3.9.2	Kationenaustauschchromatographie mittels Mini S PE 4.6/50 Säule	29
3.9.3	Anionenaustauschchromatographie mittels Mini Q PE 4.6/50 Säule	31
3.10	HPLC	33
3.11	Statistische Auswertungen	35
4	Ergebnisse	36
4.1	Klinischer Langzeitverlauf und Effizienz unterschiedlicher Therapiemöglichkeiten bei juveniler PAP	36
4.1.1	Klinischer Langzeitverlauf der untersuchten PAP-Kinder	36
4.1.1.1	Patient 1- PAP durch Mutation im SFTPC-Gen	36
4.1.1.2	Patient 2- PAP durch Mutation im GM-CSF R α -Gen	43
4.1.1.3	Patient 3- PAP unklarer Genese (GM-CSF-Autoantikörper negativ)	54
4.1.1.4	Patient 4- PAP im Rahmen einer Niemann-Pick TypC2-Erkrankung	60
4.1.2	Effizienz unterschiedlicher Therapiemöglichkeiten bei PAP-Kindern	64
4.1.2.1	Bronchoalveoläre Lavage (BAL)	64
4.1.2.1.1	Beurteilung der Effektivität der BAL anhand des Sauerstoffbedarfs	64
4.1.2.1.2	Beurteilung anhand des Röntgenthorax	65
4.1.2.2	GM-CSF-Therapie	68
4.1.2.2.1	Klinischer Verlauf bei Patientin 2	68
4.1.2.2.2	Auswertung der bronchoalveolären Lavagen bei Patientin 2	72
4.1.2.2.3	Klinischer Verlauf bei Patientin 4	76
4.1.2.3	Glucocorticoidstoßtherapie	77
4.1.2.3.1	Therapieeffekt bei Patient 1	77
4.2	Darstellung und Isolation einer aberranten Pro-SP-C-Proteinbande aus einer BALF des Patienten 1	79
4.2.1	Auswahl geeigneter Antikörper gegen Pro-SP-C und Pro-SP-B	80
4.2.1.1	Pro-SP-C	80
4.2.1.2	Pro-SP-B	81
4.2.2	Verteilung von Pro-SP-C, Pro-SP-B und SP-B in der Unter-, Mittel- und Oberphase der Lipidextraktion im neutralen, sauren und basischen Milieu	82
4.2.2.1	Pro-SP-C	82
4.2.2.2	Pro-SP-B	84

4.2.2.3	SP-B	87
4.2.2.4	Coomassie-Färbung	88
4.2.3	Verteilung von Pro-SP-C und Pro-SP-B in large / small aggregates	89
4.2.4	Löslichkeit von Pro-SP-C und Pro-SP-B in unterschiedlichen Lösungsmitteln	90
4.2.5	Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration zur Anreicherung von Pro-SP-C und Pro-SP-B	92
4.2.5.1	Kationenaustauschchromatographie	92
4.2.5.2	Anionenaustauschchromatographie	97
4.2.5.3	Gelfiltration	100
4.2.6	Pro-SP-C-Isolierung mittels HPLC	103
4.2.6.1	Säule: 15 RPC ST 4.6/100	103
4.2.6.2	Säule: μ RPC C2/C18	105
4.2.7	2-D-Gelelektrophorese zur Proteintrennung in unterschiedlichen pH-Bereichen	108
4.2.7.1	pH-Bereich 3,0-10,0	108
4.2.7.2	pH-Bereich 3,5-6,0	111
4.2.7.3	pH-Bereich 4,0-7,0	113
4.2.8	Immunopräzipitation	114
4.2.9	Massenspektrometrie eines Elektrophoresegelelbereichs von Fraktionen der Immunopräzipitation	118
5	Diskussion	119
6	Zusammenfassung	128
7	Literaturverzeichnis	129
8	Danksagung	136

Abkürzungsverzeichnis

AK.....	Antikörper
BAL.....	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit
BMI	Body-Mass-Index
CEA	Carcino-Embryonales-Antigen
CIPO.....	Chronische intestinale Pseudoobstruktion
FEV ₁	Forciertes Expiratorisches Volumen in einer Sekunde
FT-ICR-MS	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Koloniestimulierender Faktor
GM-CSF R α	Alpha-Kette des GM-CSF-Rezeptors
HPLC.....	High Pressure Liquid Chromatography
JCML	Juvenile Chronisch Myeloische Leukämie
kD	Kilodalton
KL-6.....	Kerbs von Lungren 6 Antigen
LDH	Lactatdehydrogenase
MEF _{25/50/75}	Maximaler Expiratorischer Fluss bei 25/50/75% der forcierten VC
NSIP	Unspezifische Interstitielle Pneumonie
PAP	Pulmonale Alveolarproteinose
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SP-A/B/C/D.....	Surfactantproteine A/B/C/D
VC	Vitalkapazität
WLL.....	Whole lung lavage, Ganzlungenlavage

1 Einleitung

Bei den pulmonalen Alveolarproteinosen (PAP) handelt es sich um seltene Lungenerkrankungen, die auf Störungen im Surfactantmetabolismus beruhen. Sie sind gekennzeichnet durch die Anhäufung eines amorphen, PAS-positiven Materials in den Alveolen mit konsekutiver Hypoxämie. Bei dem sich ansammelnden Material handelt es sich um abnormen Surfactant, der vor allem aus (Phospho-)Lipiden und Surfactantproteinen besteht. Erstmals wurde die Erkrankung 1958 von Rosen et al⁴¹ bei Erwachsenen beschrieben.

Es hat sich gezeigt, dass für die Pathogenese der Erkrankung die Funktion der Alveolarmakrophagen im Surfactantmetabolismus wichtig ist. Eine Dysfunktion scheint ein zentraler Aspekt in der Krankheitsentstehung zu sein.

Zudem spielt das Zytokin GM-CSF eine Rolle. Ein relativer Zytokinmangel ist wohl für die Krankheitsentstehung von Bedeutung. So ist eine eingeschränkte bzw. fehlende Funktion der beta-Kette des GM-CSF/II-3/II-5-Rezeptors auf mononukleären Zellen bei einigen Kindern mit PAP beschrieben worden.¹⁶ Bei den meisten adulten PAP-Patienten lassen sich Autoantikörper gegen GM-CSF nachweisen²⁷.

Die Alveolarproteinosen werden in kongenitale, erworbene und sekundäre Formen eingeteilt⁴³.

Von Brasch et al wurde ein detaillierterer Klassifikationsvorschlag für Erkrankungen bei Neugeborenen, Säuglingen und Kindern veröffentlicht¹⁴. Zielsetzung war, unter Berücksichtigung möglichst vieler Befunde (Klinik, Biochemie, Molekulargenetik, Histologie) eine genauere Beschreibung zu geben und damit eine Anpassung der Therapie zu ermöglichen.

Die Behandlung orientiert sich am Schweregrad der Krankheit. Goldstandard ist weiterhin die Ganzlungenlavage. Bei einem Teil der Patienten ist eine einzige Lavage ausreichend, während andere Patienten im Verlauf weitere Lavagen benötigen. Zudem gibt es weitere experimentelle Behandlungsansätze, zu denen auch die Verabreichung von GM-CSF (subkutan oder inhalativ) zählt. In einer Studie an 25 Patienten mit rekombinantem GM-CSF, welches subkutan verabreicht wurde, ließ sich in 48% der Fälle eine Verbesserung der Symptomatik und der radiologischen Befunde ermitteln⁴⁸. Weitere Behandlungsoptionen stellen unter anderem eine Lungentransplantation bzw. die Durchführung einer Plasmapherese dar.

Jaques de Blic veröffentlichte einen Review über PAP bei Kindern⁸. Darin werden 23 Kinder mit PAP vorgestellt. Bei sechs trat die Alveolarproteinose im Rahmen einer Grunderkrankung (JCML, sideroblastische Anämie (2x), neonatale CMV Infektion, lysinurische Proteinintoleranz, CIPO + Lungenfibrose) auf.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, die pulmonale Alveolarproteinose bei Kindern klinisch und biochemisch näher zu charakterisieren. Neben klinischen Verlaufsbeobachtungen an vier Patienten spielten biochemische Untersuchungen eine zentrale Rolle.

In dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen führten durch Kombination von biochemischen Verfahren (Immunopräzipitation, Methanol–Chloroform-Präzipitation, 1-D-Gelelektrophorese, sowie Westernblotanalysen) mit massenspektrometrischen Untersuchungen (FT-ICR-MS) zur Identifikation der Aminosäuresequenzen in aberranten Zwischenprodukten der SP-B bzw. SP-C-Prozessierung aus Lavagen des Patienten 1¹⁹.

Bei Patient 1 beruht die pulmonale Alveolarproteinose (PAP) auf der Mutation I73T im Surfactantprotein C – Gen (SFTPC). Die sich daraus ergebenden Veränderungen der Surfactantzusammensetzung wurden bereits von Griese / Brasch et al beschrieben¹³. Es zeigte sich eine intraalveoläre Anhäufung von Surfactantprotein A, Vorläufer von Surfactantprotein B, reifes Surfactantprotein B, mono- und dimeres Surfactantprotein C sowie eine irregulär prozessierte Surfactantprotein C Vorstufe.

Der klinische Langzeitverlauf einer PAP auf der Basis einer GMCSF-Rezeptor-Mutation (Patientin 2) und einer PAP auf dem Boden einer Mutation im Niemann-Pick 2- Gen (Patientin 4)²¹ werden beschrieben.

2 Zielsetzung

Die hier vorliegende Arbeit hat das Ziel, das sehr seltene Krankheitsbild der Alveolarproteinose bei Kindern klinisch und biochemisch näher zu charakterisieren.

Eine zentrale Rolle spielten dabei biochemische Untersuchungen von bronchoalveolären Lavagen eines Patienten mit einer Mutation im Surfactantprotein C – Gen.

Fragestellung:

- Lässt sich die durch die Mutation I73T in der bronchoalveolären Lavage gefundene aberrante Vorläuferform des Surfactantprotein näher charakterisieren?

Eine weitere Aufgabe, der diese Arbeit nachgeht, ist, die Erkrankungsgruppe klinisch näher zu charakterisieren.

Fragestellungen:

- Wie beeinflussen Standard- und experimentelle Therapien den Erkrankungsverlauf bei Kindern mit PAP unterschiedlicher Genese?
- Wie effektiv ist die bronchoalveoläre Lavage als Goldstandard der Therapie?
- Zeigen sich Veränderungen in der bronchoalveolären Lavage beim parallelen Einsatz von GM-CSF bei einer Patientin mit GM-CSF-Rezeptor-Mutation?
- Welchen Effekt zeigt eine Glucocorticoidstoßtherapie bei einem Patienten mit Surfactantprotein C – Mutation?

3 Material und Methoden

3.1 Material

Ausgangsmaterial für die biochemischen Versuche in dieser Arbeit war jeweils BALF des in der Arbeit näher beschriebenen Patienten 1 (siehe 4.1.1.1). Zur Probengewinnung siehe 3.3.

3.2 häufig verwendete Lösungen, Antikörper und Chemikalien

3.2.1 PBS-Puffer

NaCl	137mM	8,00g/l
KCl	2,68mM	0,200g/l
Na ₂ HPO ₄	5,36mM	1,44g/l
KH ₂ PO ₄	1,76mM	0,240g/l
H ₂ O		in 800ml H ₂ O lösen, mit NaOH auf pH 7,4 einstellen und auf 1l auffüllen.

Tab. 3.1: Zusammensetzung PBS-Puffer.

3.2.2 Coomassie-Stammlösung

Herstellung gemäß Neuhoff et al³³:

Ammoniumsulfat	10g
85%ige Phosphorsäure	2g in 100ml H ₂ O
CBB G-250 (Merck, No. 115444)	1g in 20ml H ₂ O

Tab. 3.2: Zusammensetzung Coomassie-Stammlösung.

3.2.3 Antikörper

	Bezeichnung	Verdünnung
Primärantikörper		
anti-SP-C	NPROSP-C2-9	1:2500
anti-SP-C	NPROSP-C10-23	1:5000
anti-SP-C	hCPROSP-C	1:2500

	Bezeichnung	Verdünnung
Primärantikörper (Fortsetzung)		
anti-SP-C	Whitsett; 68514	1:2500
anti-SP-B	Guttentag; CTERMB	1:5000
anti-SP-B	Chemicon; AB 3430	1:5000
anti-SP-B	Chemicon; 3432	1:5000
Sekundärantikörper		
Goat anti-rabbit IgG-HRP Konjugat		1:20000

Tab. 3.3: Verwendete Antikörper.

3.3 Probengewinnung durch BAL und zytologische Beurteilung

Die pädiatrischen PAP Patienten wurden durch einen Pulmonalarterienkatheter, fixiert im rechten bzw. linken Stammbronchus, lavagiert. Es wurde viermal eine auf Körpertemperatur vorgewärmte 0,9% Kochsalzlösung instilliert und sofort wieder abgesaugt. Das Volumen betrug jeweils 1 ml/kg Körpergewicht, bei den adulten Patienten aber nicht mehr als 50 ml. Die Aufbereitung des zurückerhaltenen Volumens der ersten Spülung erfolgte separat von den übrigen drei Spülportionen als erste Fraktion. Eine mikrobiologische Untersuchung der ersten Fraktion fand statt. Die restlichen drei Volumina wurden zu einer Pool Fraktion zusammengefasst. Die anschließende therapeutische Lavage mit jeweils 50ml 0,9%iger Kochsalzlösung erfolgte, bis die abgesaugte BALF nach visueller Prüfung ausreichend klar erschien. Die zurückerhaltenen Volumina wurden in ca. 500ml große Aliquots aufgeteilt.

Die erste Fraktion und die Pool Fraktion wurden separat über sterilisierte Gaze-Filter gereinigt. Größere Verunreinigungen konnten dadurch beseitigt werden. Anschließend wurde ein Aliquot für die mikrobiologische und virologische Untersuchung entnommen. Die Gesamtzellzahlbestimmung erfolgte mikroskopisch mit einer Neubauer- Zählkammer. Eine zehnmünütige Zentrifugation bei 200x g diente der Zellgewinnung. Der Überstand wurde jeweils abgenommen, aliquotiert und zusammen mit den Flaschen der therapeutischen Lavage bei -80°C eingefroren. Die Aufarbeitung der Zellen beinhaltete das zweimalige Waschen mit Hankscher Lösung, anschließende Zentrifugation sowie die Einstellung der Zellkonzentration mit Hankscher Lösung auf 200.000 Zellen pro Milliliter zur Anfertigung von Cytospinpräparaten. Für die Cytospins wurden jeweils 100.000 Zellen pro Objektträger eingesetzt. Zur Zelldiffe-

renzierung kam eine Färbung nach May-Grünwald-Giemsa zur Anwendung. Diese Untersuchung erfolgte sowohl für die erste Fraktion als auch für die Pool Fraktion. Die erste Fraktion enthält den überwiegenden Teil der abgeschilferten Epithelzellen³⁹, die Pool Fraktionen einen etwas höheren Anteil an Lymphozyten³⁶.

3.4 Trennung der BALF in large- und small aggregates

Material

- Zentrifuge (Heraeus, Megafuge 1.0 R)
- Spritzenvorsatzfilter (Sartorius, 16555 K)
- Zentrifugenröhrchen (Beckman, 361693)
- Ultrazentrifuge Avanti J30 (Beckman, 363121)

Methode

Zunächst werden die Zellen mittels zehninütiger Zentrifugation bei 200x g sedimentiert. Der Überstand wird über eine Membran (Spritzenvorsatzfilter, Sartorius) gefiltert und anschließend in Beckman Tubes für 40 Minuten bei 38400x g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet besteht aus den large aggregates (LA), der Überstand aus small aggregates (SA). Dieser Schritt wird mehrmals wiederholt.

3.5 Quantitative Proteinbestimmung

Material

- BioRad Proteinassay Farbstoffreagenz (Bio-Rad Laboratories GmbH)
- Mikrotiterplatten (Greiner, 96 Vertiefungen, niedrigaffin, transparent)
- Anthos htIII Mikrotiterplattenleser, Anthos Labtec Instruments, Typ 12600
- BSA V, Paesel + Lorei (4607/0433)
- Aqua ad inj. (Braun Melsungen AG, 3703452)
- PBS-Puffer: siehe 3.2.1 PBS-Puffer

Methode

Der BioRad Protein Assay nach der Methode von Bradford¹² wird zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in der BALF verwendet.

Das BioRad Reagenz wird dabei 1:5 mit Aqua ad inj. verdünnt und filtriert, um Präzipitate abzutrennen. Anschließend wird es zu jeder Probe sowie zu der Standardreihe, bestehend aus abnehmenden BSA-Konzentrationen in PBS - Puffer (5000µg/ml, 2500µg/ml, 1250µg/ml, 625µg/ml, 312,5µg/ml, 156,25µg/ml, 78,125µg/ml), hinzugegeben. Die Messung der Standards erfolgt als Doppelbestimmung, die der Proben als Dreifachbestimmung. 5µl der Proben bzw. des Standards werden dann mit 100µl des BioRad Reagenzes (1:5 verdünnt) versetzt.

Im Mikrotiterplattenleser wird anschließend die optische Dichte (OD₆₀₀) abzüglich des Leerwertes (Leerwert = BioRad Reagenz + PBS) ermittelt und die Probenkonzentration mit Hilfe der Standardreihe in Proteinkonzentrationen umgerechnet.

3.6 Lipidextraktion

3.6.1 Nach Bligh–Dyer–Folch

Material

- Methanol p.a. (Merck 1.06009.1000)
- Chloroform p.a. (Merck 1.02431.1000)
- Aqua ad injectabilia (Braun Melsungen AG, 3703452)
- Zentrifuge (Heraeus, Megafuge 1.0 R)
- Vortex Genie 2 (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz)
- Verschraubbare Reagenzgläser (Schott)
- Pasteurpipetten (Assistent, 567/2)

Methode

Die Abtrennung der lipophilen (Phospholipide, SP-B, SP-C) von den hydrophilen Bestandteilen der Lavage erfolgt mit Hilfe der Methode von E.C. BLIGH und W.J. DYER⁹ und einer anschließenden Folch Waschung¹⁸. Die Extraktion wird im Sauren (Zugabe von 200µl 6M HCl zur Probe), im Alkalischen (Zugabe von 200µl 1M NaOH zur Probe) und im Neutralen durchgeführt. Zu Beginn werden sämtliche zur Verwen-

ding kommende Glasgefäße mit Chloroform gespült, um sie von Lipidrückständen zu befreien. Die Probe, Chloroform und Methanol werden im Verhältnis 0,8:1:2 (V/V/V) gemischt und anschließend zehn Minuten lang gevortext. Nach weiterer Zugabe von einem Volumen H₂O und einem Volumen Chloroform wird erneut 10 Minuten gevortext und anschließend die Probe zehn Minuten lang bei 1.000x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Flüssigkeitsstand wird außen am Reagenzröhrchen markiert. Danach wird die phospholipidhaltige Unterphase in ein neues Reagenzglas abpipettiert und das hierdurch fehlende Volumen durch die Lösung nach Folch ersetzt.

CHCl ₃	86% (V/V)
CH ₃ OH	14% (V/V)
H ₂ O	1% (V/V)

Tab. 3.4: Zusammensetzung der Folchlösung.

Nach erneutem Vortexen und Zentrifugieren 1.000x g bei Raumtemperatur werden die sich nunmehr ergebenden Phasen (Unter-, Mittel-, Oberphase) getrennt. Die Unterphase wird mit der Unterphase der ersten Zentrifugation vereinigt. Es folgt das Eindampfen der vereinten Phasen unter Stickstoffatmosphäre.

3.6.2 Nach Beers et al

Material

- Methanol p.a. (Merck, 1.06009.1000)
- Chloroform p.a. (Merck, 1.02431.1000)
- Salzsäure rauchend 37% (Merck, 1.00317.1000)
- Aqua ad injectabilia (Braun Melsungen AG, 3703452)
- Zentrifuge (Heraeus, Megafuge 1.0 R)
- Vortex Genie 2 (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz)
- Verschraubbare Reagenzgläser (Schott)
- Pasteurpipetten (Assistent, 567/2)
- Spritzenvorsatzfilter (Sartorius, 16555 K)

Methode

Zur Trennung der lipophilen (Phospholipide, SP-B, SP-C) und hydrophilen Bestandteile der Lavage wird die Methode von M.F. Beers modifiziert⁵. Zu Beginn werden sämtliche verwendeten Glasgefäße mit Chloroform gespült, um sie von Lipidrückständen zu befreien. Als Probenmaterial dient aufgetaute BALF. Die darin enthaltenen Zellen werden durch Zentrifugieren über zehn Minuten bei 200x g entfernt. Der Überstand wird anschließend mit Hilfe eines Spritzenvorsatzfilters filtriert.

Die Probe und die Extraktionslösung (CHCl₃:CH₃OH:HCl = 3:2:0,005N) wird im Verhältnis 1:2 gemischt und danach für zehn Minuten gevortext. Im Anschluss wird die Probe zehn Minuten mit 1.000x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die drei entstehenden Phasen (Unter-, Mittel- und Oberphase) werden durch Abpipettieren voneinander getrennt. Bei größeren Probenmengen werden die jeweiligen Phasen gepoolt. Die Proben werden dann unter Stickstoffbegasung bei 40°C eingedampft.

3.7 Präzipitationen

3.7.1 Methanol-Chloroform nach Wessels und Flugge (modifiziert)

Material

- Methanol p.a. (Merck, 1.06009.1000)
- Chloroform p.a. (Merck, 1.02431.1000)
- Aqua ad injectabilia (Braun Melsungen AG, 3703452)
- Zentrifuge (Eppendorf, 5417 C)
- Vortex Genie 2 (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz)

Methode

Es kommt eine modifizierte Methode von Wessel und Flugge zur Anwendung⁴⁹. Zu 200µl Probe werden zunächst 800µl Methanol hinzugegeben und gevortext. Danach kommen 200µl Chloroform dazu. Es wird erneut gevortext. Nun werden 600µl H₂O hinzugefügt bevor noch einmal gevortext wird. Die Probe wird zwei Minuten bei 14000x g zentrifugiert, die Oberphase abgezogen und verworfen. Es werden als nächstes 600µl Methanol zur Unterphase hinzugefügt und erneut zwei Minuten bei

14000x g zentrifugiert. Anschließend wird die Flüssigkeit vorsichtig vollständig abgezogen. Der Rückstand wird luftgetrocknet.

Für die Gelelektrophorese wird der Rückstand in der entsprechenden Menge Probenpuffer resuspendiert.

3.7.2 Immunopräzipitation

3.7.2.1 Weiterverarbeitung der Fraktionen der Immunopräzipitation

Material

- Protein G – Sepharose (Sigma-Aldrich, 3296)
- Pro-SP-C-Antikörper (Chemicon, AB 3786)
- Zentrifuge (Eppendorf, 5417C)
- PBS - Puffer: siehe 3.2.1 PBS-Puffer
- PBS-T Puffer (PBS – Puffer + 0,05 % Tween – 20)

Methode

Ausgangsmaterial ist ein 25ml BALF – Lyophilisat. Dieses wird zunächst in 1ml PBS-T gelöst und über Nacht bei 4°C gelagert.

Der unlösliche Rest wird danach abzentrifugiert und bei -20°C aufbewahrt. 50µl des gelösten Lyophilisats werden für einen späteren Westernblot bei -20°C gelagert [Probe A].

Im Anschluss wird die Protein G Suspension wie folgt vorbereitet: 100µl Protein G Suspension werden mit 1,5ml PBS-T – Puffer versetzt, geschwenkt und anschließend fünf Minuten bei 1000x g zentrifugiert. Der Überstand wird abgezogen und verworfen. Anschließend wird zu dem entstandenen Protein G – Pellet das gelöste BALF – Lyophilisat gegeben und dieses für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit Hilfe des Laufrads durchmischt. Es wird anschließend wieder für fünf Minuten bei 1000x g zentrifugiert. Das entstandene Pellet 1 wird für einen späteren Westernblot bei -20°C gelagert [Probe B]. Zu dem Überstand werden 5µl Antikörper gegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Laufrad inkubiert.

50µl der Lösung werden für den Westernblot bei -20°C gelagert [Probe C]. Es wird eine weitere Protein G Suspension vorbereitet. Zu dem entstandenen Protein G –

Pellet wird der Rest der Lösung gegeben und zwei Stunden auf dem Laufrad bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation (5min, 1000x g). Der Überstand wird abgezogen und davon wieder 50µl für den Westernblot lyophilisiert [Probe D], der Rest bei -20°C gelagert. Anschließend wird das entstandene Pellet dreimal mit 1,5ml PBS-T gewaschen. Dazu wird je 1,5ml PBS-T zugegeben, geschwenkt, zentrifugiert (5min, 1000x g) und der Überstand (Waschfraktion WF 1-3) abgezogen. 50µl der ersten Waschfraktion (WF 1) werden für den Westernblot lyophilisiert [Probe E]. Das erhaltene Pellet 2 wird für die darauffolgende Westernblotanalyse benutzt [Probe F].

Es folgt eine unter 3.8.5 genauer beschriebene 1-D-Gelelektrophorese. Es werden folgende Fraktionen aufgetragen:

- Marker,
- 20µl des in 30µl Probenpuffer resuspendierten Lyophilisats des Ausgangsmaterials [Probe A],
- 20µl des in 80µl Probenpuffer resuspendierten Pellets 1 [Probe B],
- 20µl des in 30µl Probenpuffer resuspendierten Lyophilisats der Überstand + Antikörper Lösung [Probe C],
- 20µl des in 30µl Probenpuffer resuspendierten Lyophilisats des Überstandes [Probe D],
- in 20µl resuspendiertes Lyophilisat der Waschfraktion 1 [Probe E],
- 20µl des in 80µl Probenpuffer resuspendierten Pellets 2 [Probe F],
- 20µl eines in 30µl resuspendierten BALF – Lyophilisats,
- 20µl eines 50µl Lyophilisats einer Antikörperstammlösung (100µl PBS-T + 0,5µl AK), das in 30µl Probenpuffer resuspendiert wurde,
- 20µl eines in 80µl Probenpuffer resuspendierten Protein G Pellets (Aufarbeitung siehe oben).

Als Primärantikörper wird der Chemicon AB 3786 verwendet.

3.7.2.2 Probenaufarbeitung für die Massenspektrometrie

Material

- Methanol p.a. (Merck, 1.06009.1000)
- Chloroform p.a. (Merck, 1.02431.1000)
- Aqua ad injectabilia (Braun Melsungen AG, 3703452)

- Zentrifuge (Eppendorf, 5417 C)
- Vortex Genie 2 (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz)
- Vakuum Konzentrator (Bachhofer, BA-VC-300H)
- Vakuumpumpe (WKF, L 05-60)

Methode

Als Ausgangsmaterial dienen folgende Fraktionen aus den vorausgegangenen Immunopräzipitationsversuchen:

- 2,0ml WF 1 (siehe 3.7.2)
- 1,5ml WF 1 (siehe 3.7.2)
- 0,5ml D (siehe 3.7.2)

Das Ausgangsmaterial wird gepoolt, auf zwei Aliquots aufgeteilt und anschließend lyophilisiert. Mit den Lyophilisaten wird eine Methanol-Chloroform-Präzipitation durchgeführt (siehe 3.7.1). Es schließt sich eine 1-D-Gelelektrophorese der Präzipitate an (siehe 3.8.5). Dazu werden die Präzipitate in je 25µl Probenpuffer gelöst. Das Gel wird im Anschluss Coomassie gefärbt und der Bereich um 17kD zur Massenspektrometrie geschickt.

Zur Kontrolle, ob das gesuchte ProSP-C im Ausgangsmaterial enthalten ist, werden je 2ml der im Probenpuffer gelösten Präzipitate für eine Westernblotanalyse (siehe 3.8.5) zurückgehalten.

3.7.3 Trichloressigsäurepräzipitation

Material

- Trifluoressigsäure (Merck, 8.08260.0100)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Merck, 1.08382.0500)
- Urea (Pharmacia Biotech, 17-1319-01)
- Aceton (Merck, 10.00014.1000)
- Zentrifuge (Eppendorf, 5417C)

Methode

Zunächst wird eine 100%ige TCA - Stammlösung (10g/10ml) hergestellt. Ein 100µl - Probenlysat wird in 800µl Puffer (20mM Tris + 6M Harnstoff, pH 8,5) gelöst und

200µl TCA-Stammlösung hinzugegeben, so dass die TCA – Endkonzentration 20% beträgt.

Danach kommt die Probe eine Stunde auf Eis. Die Probe wird anschließend zehn Minuten bei 20800x g zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert. Das Pellet wird mit -20°C kaltem Aceton gewaschen, erneut zentrifugiert (10min, 20800x g) und anschließend der Überstand abgezogen. Das Pellet wird im Abzug getrocknet.

Mit einer Gelelektrophorese wird das Pellet weiterverarbeitet (siehe 3.8.5).

3.8 Proteinanalyse mittels Gelelektrophorese und Slot Blot

3.8.1 Färbemethoden der Gele

3.8.1.1 Coomassie-Färbung

Material

- Methanol p.a. (Merck, 1.06009.1000)
- Coomassie-Stammlösung (siehe 3.2.2)

Methode

Die Coomassie-Färbung der Gele erfolgt gemäß Neuhoff et al³³. 20ml Stammlösung werden mit 5ml Methanol versetzt. Die Gele werden damit über Nacht in einem verschlossenen Gefäß auf dem Rüttler inkubiert.

Um die überschüssige Farbe zu entfernen, werden die Gele anschließend kurz mit 25%igem Methanol gespült. Sie werden in 25%igem Methanol gelagert.

Die Gele werden mit dem FluorS Multi Imager eingescannt und mit der Software Bio-rad Quantity One ausgewertet.

3.8.1.2 Silberfärbung

Material

- Essigsäure (Merck, 100063)
- Fixierungslösung:

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

Tab. 3.5: Zusammensetzung Fixierungslösung.

- Inkubationslösung:

Natriumacetat	17g
Ethanol	75ml
Natriumthiosulfat	0,5g
H ₂ O	auf 250ml auffüllen

Tab. 3.6: Zusammensetzung Inkubationslösung.

- Silberlösung:

Silbernitrat	0,5g
Formaldehyd 37%	50µl
H ₂ O	250ml

Tab. 3.7: Zusammensetzung Silberlösung.

- Entwicklerlösung:

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

Tab. 3.8: Zusammensetzung Entwicklerlösung.

Methode

Für die Silberfärbung wird die Methode nach Heukeshoven / Dernick angewendet²⁵.

Das Gel wird zunächst für 30 Minuten in der Fixierlösung fixiert, bevor es für weitere 30 Minuten mit der Inkubationslösung versetzt wird. Nach dem Waschen (dreimal 15 Minuten mit H₂O) erfolgt die Versilberung. Dazu wird das Gel 20 Minuten in der Sil-

berlösung gebadet. Danach erfolgt die Entwicklung der Gele mit der Entwicklungslösung. Diese werden gewechselt sobald braune Schlieren sichtbar sind. Die Zugabe von 5%iger Essigsäure stoppt die Entwicklung, wenn die gewünschte Bandenintensität erreicht ist. In 1%iger Essigsäure werden die Gele gelagert. Die Gele werden mit dem FluorS Multi Imager eingescannt und mit der Software BioRad Quantity One ausgewertet.

3.8.2 Immunodetektion

Material

- PBS-Puffer (siehe 3.2.1)
- Blocking-Puffer (PBS Puffer mit 5% BSA)
- PBS-T Puffer (PBS Puffer mit 0,05% Tween-20)
- Antikörperlösung (Antikörper verdünnt in PBS Puffer + 1% BSA)
- Antikörperlösung (Antikörper verdünnt in PBS-T Puffer + 1% BSA)
- Bovines Serum Albumin V, BSAV (Paesel 42160223)
- ECL Chemilumineszenzlösung (Amersham RPN2106)
- Entwicklungskassette (Amersham RPN11646)
- Röntgenfilme (Amersham RPN 2103)
- Entwicklungsmaschine (AGFA CP 1000)

Methode

Die Membran wird zunächst für 60min mit dem Blocking-Puffer (5% BSA in PBS) versetzt, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Danach erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper (erster Antikörper 1:2500 bzw. 1:1500 verdünnt in PBS + 1% BSA) über Nacht bei 4°C. Die ungebundenen Antikörperanteile werden durch dreimaliges, fünfminütiges Waschen mit PBS-T entfernt. Der Sekundärantikörper (1:20000 verdünnt in PBS-T + 1% BSA) wird danach für 60 Minuten zugegeben. Es folgt ein erneutes, dreifaches Waschen mit PBS-T für je 5 Minuten bevor die Detektion durchgeführt wird. Dazu werden die Membranen mit der ECL Chemilumineszenzlösung aktiviert und anschließend auf Röntgenfilm entwickelt. Die entwickelten Filme werden mit dem FluorS Multi Imager eingescannt und mit der Software BioRad Quantity One ausgewertet.

3.8.3 Westernblot

Material

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

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

Tab. 3.9: Zusammensetzung Transferpuffer.

Methode

Zunächst werden die PVDF-Membranen mit Methanol benetzt und anschließend in den Blotpuffer eingelegt.

Das Blotten erfolgt mit NuPAGE Transfer Buffer unter Verwendung der Xcell II Blot Module von Invitrogen mit folgender Einstellung: 25V, 160mA, 60 Minuten.

3.8.4 Slot Blot

Material

- Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus (Biorad)
- Methanol p.a. (Merck, 1.06009.1000)
- PVDF (Millipore, Immobilon IPVH 00010)
- Blocking-Puffer (PBS Puffer mit 5% BSA)
- PBS - Puffer (siehe 3.2.1)
- PBS-T Puffer (PBS Puffer mit 0,05% Tween-20)
- 1. Antikörperlösung (Antikörper 1:2500 bzw. 1:50000 verdünnt in PBS Puffer + 1% BSA)
- 2. Antikörperlösung (Antikörper 1:20000 verdünnt in PBS-T Puffer + 1% BSA)
- Bovines Serum Albumin V, BSAV (Paesel 42160223)
- ECL Chemilumineszenzlösung (Amersham RPN2106)
- Entwicklungskassette (Amersham RPN11646)
- Röntgenfilme (Amersham RPN 2103)
- Entwicklungsmaschine (AGFA CP 1000)

Methode

Als Proben werden die gesammelten Fraktionen der HPLC, der Gelfiltration und der Anionenaustauschchromatographie verwendet.

Zunächst wird das Dot-Blot Gerät gründlich in einmolarer Natronlauge für 30min gereinigt. Die PVDF - Membran wird mit Methanol benetzt und anschließend in PBS gelegt. Die Filterpapiere werden ebenfalls in PBS getränkt.

Drei Filterpapiere und die PVDF-Membran werden benötigt, um das Gerät zusammenzubauen.

Zu Beginn werden die Probenslots mit 1ml PBS pro Slot gewaschen, bevor die eigentlichen Proben in die Slots kommen und die Flüssigkeit mittels Vakuumpumpe abgesaugt wird. Die in den Proben enthalten Proteine binden an der Membran. Der Probentransfer wird wiederholt bis das komplette Probenvolumen auf die Membran aufgebracht ist. Zum Abschluss erfolgt ein erneuter Durchlauf mit 1ml PBS pro Slot.

Mit der Membran wird entsprechend dem Westernblotprotokoll der Gelfiltration verfahren:

Die Membran wird zunächst für 60 Minuten mit dem Blocking-Puffer (5% BSA in PBS) versetzt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper (erster Antikörper in PBS + 1% BSA) über Nacht bei 4°C. Der ungebundene Antikörperanteil wird durch dreimaliges, fünfminütiges Waschen mit PBS-T entfernt. Der Sekundärantikörper (in PBS-T + 1% BSA) wird danach für 60 Minuten zugegeben. Es folgt ein erneutes, dreifaches Waschen mit PBS-T für je fünf Minuten bevor die Detektion stattfindet. Dazu werden die Membranen mit der ECL Chemilumineszenzlösung aktiviert und anschließend auf Röntgenfilm entwickelt. Die entwickelten Filme werden mit dem FluorS Multi Imager eingescannt und mit der Software Quantity One bearbeitet.

3.8.5 1-D-Gelelektrophorese

Material

- NuPAGE MES Running Buffer (Invitrogen, NP0002)
- NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen, NP0007)
- Aqua ad injectabilia (Braun Melsungen AG, 3703452)
- NuPAGE Reducing Agent (Invitrogen, NP0004)

- Probenpuffer:

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

Tab. 3.10: Zusammensetzung Probenpuffer.

- NuPAGE Novex 10% Bis-Tris Gel (Invitrogen, NP0315)
- MultiMark Multi-Colored Standard (Invitrogen, LC5725)
- Xcell SureLock Mini Cell Kammer (Invitrogen, EI 0001)
- Xcell II Mini Cell Kammer (Invitrogen, EI 9001)
- PowerEase 500 Power Supply (Invitrogen, EI8700)
- Wasserbad (Paratherm S100 Julabo)
- Zentrifuge (Eppendorf, 5417 C)

Methode

Probenvorbereitung:

Die Probenvorbereitung variiert bei den verschiedenen Versuchen. Zumeist wird entweder native Lavageflüssigkeit, die zuvor mittels Zentrifugation von den enthaltenen Zellen getrennt und anschließend mit der Vakuumzentrifuge lyophilisiert wurde, verwendet, oder die durch das modifizierte Lipidextraktionsverfahren nach Beers⁵ (siehe 3.6.2) erhaltene Mittelphase hat die Probe für die Gelelektrophorese gebildet.

Gelelektrophorese:

Die Proben werden in der entsprechenden Menge Probenpuffer (im Normalfall 30µl pro Aliquot) resuspendiert und gevortext. Nach kurzer Zentrifugation (10.000x g, 20s) werden sie zehn Minuten bei 70°C im Wasserbad inkubiert, danach erneut kurz gevortext und zentrifugiert bevor sie auf das Gel kommen.

Die Elektrophorese erfolgt in Mini Cell Kassetten mit folgenden Geräteeinstellungen: 200V, 100mA, 35 Minuten. Als Marker dienen 4µl MultiMark Multi-Colored Standard von Invitrogen. Bei dem Laufpuffer handelt es sich um MES Puffer.

Nach der Elektrophorese werden die Gele entweder gefärbt (siehe 3.8.1) oder es erfolgt ein Proteintransfer (siehe 3.8.3) auf eine PVDF-Membran.

3.8.6 2-D-Gelelektrophorese

Material

- ZOOM IPGRunner Cassette (Invitrogen ZM0003)
- ZOOM IPGRunner Mini-Cell (Invitrogen ZM0001)
- NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris ZOOM Gel (Invitrogen NP0330)
- ZOOM Strip pH 3-10 (Invitrogen ZM0011)
- Immobiline Dry Strip Gels pH 3-5,6 (Amersham, 17-6003-53)
- Immobiline Dry Strip Gels pH 4-7 (Amersham, 17-6001-10)
- Agarose (Invitrogen 15510019)
- Probenpuffer:

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

Tab. 3.11: Zusammensetzung Probenpuffer.

- Äquilibrierungspuffer 1:

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

Tab. 3.12: Zusammensetzung Äquilibrierungspuffer 1.

- Äquilibrierungspuffer 2:

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

Tab. 3.13: Zusammensetzung Äquilibrierungspuffer 2.

Methode

Probenvorbereitung:

Die mit Hilfe der nach Beers et al⁵ (siehe 3.6.2) erhaltene Mittelphase bildet die Probe für die 2-D-Gelelektrophorese.

Die Probe wird im Probenpuffer resuspendiert. Pro Streifen werden 155µl Puffer benötigt. Diese werden dann in einen Quellkanal einpipettiert und ein isoelektrischer Fokussierungsstreifen nachgeschoben. Die ZOOM IPGRunner Cassette wird anschließend versiegelt und acht bis 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Fokussierung:

Nach Entfernung der Versiegelung erfolgt die isoelektrische Fokussierung in der ZOOM IPGRunner Mini-Cell unter folgenden Bedingungen: 500V, 1mA/Streifen, 0,5W/Streifen, 3h.

Anschließend werden die Streifen erneut für 20 Minuten bei 2000V, 1mA, 1W mit Hilfe der Pharmacia Biotech Geräte Elektrophoresis Power Supply und Multiphor II fokussiert.

Äquibrierung:

Nach erfolgreicher Fokussierung werden die Streifen aus der Kassette genommen und zunächst 15 Minuten lang in der Äquibrierungslösung 1 horizontal geschüttelt. Nach weiteren 15 Minuten in Equilibrierungslösung 2 wird jeweils ein Streifen in eine ZOOM Gelkassette (NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris) horizontal eingelegt und mit heißer 0,5%iger Agaroselösung (50mg in 10ml MES-Puffer) überschichtet.

Gelelektrophorese:

Nach Trocknung der Agarose wird eine Gelelektrophorese in Mini Cell Kassetten durchgeführt. Als wide-range Indikator diente Multi Mark Multi-Colored Standard von Invitrogen. Die Elektrophorese findet unter folgenden Laufbedingungen statt: 200V, 120mA, 25W, 40 Minuten. Nach dem Elektrophoreselauf erfolgt entweder eine Gel-färbung (siehe 3.8.1) oder ein Proteintransfer (siehe 3.8.3) auf eine PVDF-Membran.

3.9 Chromatographie

3.9.1 Gelfiltration mittels Sepharyl S-200 HR Säule

Material

- Pufferpaar:

A	Natriumacetat	20mM	1,64g/l
	Urea	6M	360,36g/l
	H ₂ O		in H ₂ O lösen, auf pH 5,0 einstellen und auf 1l auffüllen

Tab. 3.14: Zusammensetzung Puffer A.

B	Natriumacetat	20mM	1,64g/l
	Urea	6M	360,36g/l
	Natriumchlorid	1M	58,44g/l
	H ₂ O		in H ₂ O lösen, auf pH 5,0 einstellen und auf 1l auffüllen

Tab. 3.15: Zusammensetzung Puffer B.

- Natriumacetat (Merck, 1.06268.1000)
- Natriumchlorid (Merck, 1.06404.1000)
- Urea (Pharmacia Biotech, 17-1319-01)
- Aqua ad inj. (Braun Melsungen AG, 3703452)
- Säulenkartusche: HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech, 18-1470-01)
- Sephacryl S-200 HR (Amersham Biosciences, 17-0584-10)
- Äkta Purifier (Amersham Pharmacia Biotech)
- Ultrafree-0,5 Centrifugal Filter Device (Millipore, UFV5BCC25)
- Zentrifuge (Eppendorf, 5417 C)

Methode

Als Ausgangsmaterial dienen Mittelphasen aus Lavageaufbereitungen mit 5 bzw. 25ml Ausgangsmaterial (Aufbereitung siehe 3.6.2). Die MP wird in 1ml des Laufpuffers resuspendiert, auf die Säule gegeben und Fraktionen gesammelt. Danach wird die Säule mit 20% Ethanol gewaschen.

Programm:

Säule	50ml
Wellenlänge	280nm
Flussrate	0,4ml/min
Fraktionsgröße	1ml

Tab. 3.16: Programmparameter.

Mit den Fraktionen wird anschließend eine 1D-Gelelektrophorese (siehe 3.8.5) bzw. ein Sot-Blot (siehe 3.8.4) durchgeführt.

Um mit den Fraktionen eine Gelelektrophorese durchführen zu können, werden sie mittels Millipore Ultrafree-0.5 Centrifugal Filter Device mit Biomax-5K NMWL Membran einkonzentriert und entsalzt (10min, 12000U/min, 0,5ml pro Zeiteinheit).

3.9.2 Kationenaustauschchromatografie mittels Mini S PE 4.6/50 Säule

Material

- Pufferpaar:

A	Natriumacetat	20mM	1,64g/l
	Urea	6M	360,36g/l
	H ₂ O		in H ₂ O lösen, auf pH 5,0 einstellen und auf 1l auffüllen

Tab. 3.17: Zusammensetzung Puffer A.

B	Natriumacetat	20mM	1,64g/l
	Urea	6M	360,36g/l
	Natriumchlorid	1M	58,44g/l
	H ₂ O		in H ₂ O lösen, auf pH 5,0 einstellen und auf 1l auffüllen

Tab. 3.18: Zusammensetzung Puffer B.

- Natriumacetat (Merck, 1.06268.1000)
- Natriumchlorid (Merck, 1.06404.1000)
- Urea (Pharmacia Biotech, 17-1319-01)
- SDS (Pharmacia Biotech, 17-1313-01)

- Aqua ad inj. (Braun Melsungen AG, 3703452)
- Säule: Mini S PE 4.6/50 (Pharmacia Biotech, 17-5005-01)
- Äkta Purifier (Amersham Pharmacia Biotech)
- Ultrafree-0,5 Centrifugal Filter Device (Millipore, UFV5BCC25)
- Microcon YM-3 (Millipore, 42403)
- Zentrifuge (Eppendorf, 5417 C)
- Vakuum Konzentrat (Bachhofer, BA-VC-300H)
- Vakuumpumpe (WKF, L 05-60)

Methode

Ausgangsmaterial für die Chromatographie ist die aus der Lipidextraktion nach Beers et al⁵ (siehe 3.6.2) erhaltene Mittelphase. Diese wird je nach Versuch auf verschiedene Weisen aufbereitet, bevor die Probe (1ml pro Lauf) auf die Säule gegeben wird. Sie ist gelöst worden:

- in 3ml Puffer A + 0,1% SDS,
- in 2ml Puffer A,
- zum Entsalzen erneut in 2µl Aqua. Daraufhin erneutes Lyophilisieren und Zugabe von 1,3ml Puffer A.
- zum Entsalzen erneut in 2µl Aqua. Anschließend weiteres Lyophilisieren, Durchführung einer Methanol-Chloroform-Präzipitation und Lösung des entstandenen Pellets in 1,2ml Puffer A.
- in 500µl Puffer A. Es folgt eine Entsalzung mit Microcon YM3 und Auffüllung des Konzentrats mit Puffer A auf 1,2ml.

Die Chromatographie erfolgt mit Hilfe des Äkta-Gerätes der Firma Amersham Pharmacia Biotech. Es werden Fraktionen gesammelt.

Programm „prospc2“:

Säule	s.o.
Wellenlänge	280nm
Startkonzentration B	0%
Flussrate	0,8ml/min
Equilibrate with	4
Fraktionsgröße	2ml

Fraktionssammelbeginn	0% B
Fraktionssammelende	100% B
Gradientenstart nach	10min
auf 80% B nach	41,5min
auf 100% nach	45,5min
auf 0% nach	48min
Clean with	2
Reequilibrate with	2

Tab. 3.19: Programmparameter.

Die als interessant angesehenen Fraktionen werden weiterverarbeitet. Auch die Weiterverarbeitung variiert von Versuch zu Versuch. Folgende Möglichkeiten kommen zur Anwendung:

- Lyophilisieren,
- Methanol-Cloroform-Präzipitation aus 100µl,
- Fraktionen werden gruppiert, mit Microcon YM3 entsalzt / konzentriert und lyophilisiert,
- teilweises Poolen der Fraktionen, anschließend einkonzentrieren / entsalzen mit Millipore 5K und lyophilisieren,
- erneutes Auftragen auf die Säule und Fraktionen sammeln. Diese werden dann ebenfalls z.T. zusammengefasst, mit Microcon YM3 entsalzt / konzentriert, lyophilisiert.

Im Anschluss kommt immer eine 1-D-Gelelektrophorese (siehe 3.8.5) und Westernblotanalyse (siehe 3.8.3) zum Einsatz.

3.9.3 Anionenaustauschchromatografie mittels Mini Q PE 4.6/50 Säule

Material

- Pufferpaar:

A	Tris	20mM	2,42g/l
	Urea	6M	360,36g/l
	H ₂ O		in H ₂ O lösen, auf pH 8,5 einstellen und auf 1l auffüllen.

Tab. 3.20: Zusammensetzung Puffer A.

B	Tris	20mM	2,42g/l
	Urea	6M	360,36g/l
	Natriumchlorid	1M	58,44g/l
	H ₂ O		in H ₂ O lösen, auf pH 8,5 einstellen und auf 1l auffüllen.

Tab. 3.21: Zusammensetzung Puffer B.

- PBS-Puffer (siehe 3.2.1)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Merck, 1.08382.0500)
- Natriumchlorid (Merck, 1.06404.1000)
- Urea (Pharmacia Biotech, 17-1319-01)
- Aqua ad inj. (Braun Melsungen AG, 3703452)
- Säule: Mini Q PE 4.6/50 (Pharmacia Biotech, 17-5004-01)
- Äkta Purifier (Amersham Pharmacia Biotech)
- Spritzenvorsatzfilter (Sartorius, 16555 K)
- Ultrazentrifuge Avanti J30 (Beckman, 363121)
- Centrifuge Tubes (Beckman, 361693)

Methode

Als Ausgangsmaterial dient ein Mittelphasen-Lyophilisat, das aus einer large-aggregate (LA) Präparation (siehe 3.4) aus 50ml bronchoalveolärer Lavage mit anschließender Lipidextraktion modifiziert nach Beers⁵ (3.6.2) stammt.

Die erhaltene Mittelphase wird auf zwei Röhrchen aufgeteilt und unter Stickstoffatmosphäre eingedampft.

Ein Röhrchen wird anschließend mit 2ml Puffer A versetzt. Pro Lauf kommt 1ml der Probe auf die Säule.

Bevor die Probe in das Gerät gespritzt wird werden ein Pumpwash sowie eine Äquilibriumierung durchgeführt. Als Laufprogramm dient zum einen „prospc2“ (siehe 3.9.2), zum anderen eine manuelle Chromatographie mit einem Stufengradienten. Dabei werden folgende Gradientenschritte gewählt: 5%-, 10%-, 15%-, 20%-, 25%-, 30%-, 40%-, 50%-, 60%-; 80% Puffer B, anschließend 2M NaCl. Zwischen den Gradientenstufen laufen jeweils 2ml Puffer A. Es werden Fraktionen gesammelt. Die Reinigung der Säule nach dem Lauf erfolgt in folgenden drei Schritten:

- Pumpwash und 10min Flow 0,5 mit 2M NaCl,

- Pumpwash und 10min Flow 0,5 mit Aqua ad iniectionabilia,
- Pumpwash und 10min Flow 0,5 mit Ethanol.

Die Fraktionen des „prospc2“ Laufs werden mit einem Slot-Blot (siehe 3.8.4) weiterverarbeitet.

Mit 200µl der relevanten Fraktionen der manuellen Chromatographie werden zunächst eine Methanol-Chloroform-Präzipitation (siehe 3.7.1) durchgeführt und anschließend eine 1-D-Gelelektrophorese (siehe 3.8.5) und Westernblotanalyse (siehe 3.8.3) gemacht.

3.10 HPLC

Material

- Vakuum Konzentrator (Bachhofer, BA-VC-300H)
- Vakuumpumpe (WKF, L 05-60)
- Spritzenvorsatzfilter (Sartorius 16555 K)
- Ultrazentrifuge Avanti J30 (Beckman, 363121)
- Centrifuge Tubes (Beckman, 361693)
- Zentrifuge (Eppendorf, 5417C)
- LaChrom HPLC System (Merck)
- Rheodyne manual injector, 7725 I (Merck)
- Pump, L-7100 (Merck)
- Vacuum Entgaser, L-7614 (Merck)
- UV-Detektor, L-7400 (Merck)
- Säulentermostat Jetstream plus (Thermotechnik Products GmbH, Langenzersdorf, Österreich)
- Säule: SOURCE 15RPC ST 4.6/100 (Pharmacia Biotech, 17-5068-01)
- Säule: µRPC C2/C18 ST 4.6/100 (Pharmacia Biotech, 17-5057-01)
- HSM D-7000 Software Chromatography Data Station (Hitachi Instruments, San José, USA)
- H₂O, LiChrosolv[®] (Merck, 1.15333.2500)
- Acetonitril, LiChrosolv[®] (Merck, 1.00029.1000)
- 2-Propanol, LiChrosolv[®] (Merck, 1.01040.1000)
- Trifluoressigsäure (TFA), HPLC grade, Ampullen (Fluka 91707)

- Lösungsmittel 1: [ProSP-C-Isolierung]

A	Acetonitril + 0,1% TFA
B	H ₂ O + 0,1% TFA
C	2-Propanol + 0,1% TFA

Tab. 3.22: Zusammensetzung Lösungsmittel 1.

- Lösungsmittel 2: [proSP-C-Isolierung.C2/C18 - 06]

A	Acetonitril + 0,1% TFA
B	H ₂ O + 0,1% TFA
C	2-Propanol + 0,1% TFA

Tab. 3.23: Zusammensetzung Lösungsmittel 2.

Methode

Probenvorbereitung:

Es werden verschieden aufbereitete Proben als Ausgangsmaterial verwendet: Zum einen wird ein 1ml BALF-Lyophilisat in 100µl H₂O + 0,1%TFA gelöst. Dazu werden die Zellen von der aufgetauten Lavage abzentrifugiert (10min, 200 xg) und 1ml Aliquots in der Vakuumzentrifuge lyophilisiert. Die Lyophilisate werden dann mit den entsprechenden Lösungen versetzt.

Zum anderen kommt ein Mittelphasen-Lyophilisat zur Anwendung, das aus einer unter 3.4 beschriebenen large-aggregate (LA) Präparation der bronchoalveolären Lavage mit anschließender Lipidextraktion modifiziert nach Beers⁵ (siehe 3.6.2) stammt. Von der erhaltenen Mittelphase werden 250µl Aliquots gemacht und lyophilisiert. Die Proben werden mit je 100µl H₂O + 0,1% TFA resuspendiert, gevortext und anschließend im 37°C Wasserbad erwärmt. Danach werden sie fünf Minuten bei 14000U/min zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wird erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Pro Lauf werden 20µl des Überstandes injiziert.

Als dritte Möglichkeit der Probenaufbereitung wird mit dem nach der Ultrazentrifugation zur large-aggregate Präparation (siehe 3.4) erhaltenen Überstand ebenfalls eine Lipidextraktion nach Beers⁵ (modifiziert) (siehe 3.6.2) durchgeführt. Die Mittelphase wird in 140µl Portionen aliquotiert und lyophilisiert. Der weitere Ablauf bis zur Injektion entspricht dem des vorherigen Absatzes.

Einstellungen:

Am geeignetsten haben sich die folgenden zwei Einstellungen erwiesen:

- (proSP-C.Isolierung): Säule: SOURCE 15RPC ST 4.6/100, Säulentemperatur 20°C, Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase 1,0ml/min, Injektionsvolumen 20µl, Programmdauer 35min.
- (proSP-C.Isolierung.C2/C18 - 06): Säule. : µRPC C2/C18 ST 4.6/100, Säulentemperatur 20°C, Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase 0,8 ml/min, Injektionsvolumen 20µl, Programmdauer 35min.

Ein erster Lauf pro Versuch dient jeweils dazu, ein Chromatogramm zu erhalten und an Hand dessen die zu sammelnden Fraktionen festzulegen. Die in wiederholten Läufen erhaltenen und sich entsprechenden Fraktionen werden gepoolt und lyophilisiert. Es schließt sich eine 1-D-Gelelektrophorese (siehe 3.8.5) und Westernblotanalyse (siehe 3.8.3) oder ein Slot Blot (siehe 3.8.4) zur Analyse der Fraktionen an.

3.11 Statistische Auswertungen

Die in der Arbeit enthaltenen statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe der Software Graph Pad Prism[®] 4.03 (Graph Pad Software Inc., San Diego, USA) erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Klinischer Langzeitverlauf und Effizienz unterschiedlicher Therapiemöglichkeiten bei juveniler PAP

In diesem Kapitel werden vier pädiatrische Patienten mit PAP vorgestellt, deren klinischer Langzeitverlauf untersucht wurde. Ziel war es, Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf bei unterschiedlichen zu Grunde liegenden Ursachen und die Effektivität einzelner Behandlungsmethoden ziehen zu können.

Zunächst eine schematische Übersicht über dieses Kapitel:

4.1.1 klinischer Langzeitverlauf der untersuchten PAP-Kinder
4.1.1.1 Patient 1- PAP durch Mutation im SFTPC-Gen
4.1.1.2 Patient 2- PAP durch Mutation im GM-CSF R α -Gen
4.1.1.3 Patient 3- PAP unklarer Genese (GM-CSF Autoantikörper negativ)
4.1.1.4 Patient 4- PAP im Rahmen einer Niemann-Pick TypC2-Erkrankung
4.1.2 Effizienz unterschiedlicher Therapiemöglichkeiten PAP-Kindern
4.1.2.1 bronchoalveoläre Lavage
4.1.2.2 GM-CSF Therapie
4.1.2.3 Glucocorticoidstoßtherapie

Tab. 4.1: Gliederungsübersicht.

4.1.1 Klinischer Langzeitverlauf der untersuchten PAP-Kinder

Im Folgenden werden vier Kinder mit pulmonaler Alveolarproteinose vor- und während deren Krankheitsverlauf dargestellt.

4.1.1.1 Patient 1- PAP durch Mutation im SFTPC-Gen

Der Patient ist Ende 2007 neuneinhalb Jahre alt. Er ist das zweite Kind nicht konsanguiner Eltern.

Schwangerschaft und Geburt

Nach weitgehend unauffälliger Schwangerschaft Entbindung durch Sectio am Termin. Geburtsgewicht 3500g (50. Perzentile), Körpergröße 51cm (zwischen 25. und 50. Perzentile).

Säuglingsperiode

Zunächst unauffälliges Wachstum und altersgerechte neurologische Entwicklung. Im neunten Lebensmonat Knick in der Gewichtskurve mit Abfallen unter die dritte Perzentile. Mit neun Monaten erste ambulante Vorstellung wegen rezidivierender Infekte der Atemwege und zunehmender Gedeihstörungen.

Symptombeginn und Diagnose

Anamnese: Stationäre Aufnahme im elften Lebensmonat. Im Vorfeld rezidivierende Infekte der oberen Atemwege sowie ein Gewichtsverlust von 0,5kg innerhalb von acht Wochen. Häufige nächtliche Stöhn- und Weinattacken. Zunehmende Appetitlosigkeit und raschere Ermüdbarkeit bei altersadäquater Belastung. Kein Durchfall, Erbrechen oder Fieber.

Aufnahmestatus: Körpergröße 70cm (3. Perzentile), Körpergewicht 6,3kg (< 3. Perzentile), Kopfumfang 45cm (25. Perzentile), dystropher Junge, stabiler Allgemeinzustand, reduzierter Ernährungszustand. Palpable Lymphknoten submandibulär rechts und inguinal beidseits. Unauffällige Untersuchung von Herz, Lunge und Abdomen. Neurologisch und Entwicklungsneurologisch unauffällig.

Im Verlauf respiratorische Verschlechterung mit Tachypnoe, thorakalen Einziehungen und zunehmender Zyanose. Stabilisierung unter symptomatischer und antibiotischer Therapie. Nun dauerhafter Sauerstoffbedarf (zu diesem Zeitpunkt 1,0 l/min über Nasenbrille).

Im **Aufnahmelabor:** erhöhte LDH mit 862 U/l, Blut- und Differentialblutbild, Nieren-, Leber-, Gerinnungs- und Entzündungsparameter im Normbereich. Keine immunologischen-, endokrinologischen- oder metabolischen Auffälligkeiten.

Bildgebung: Röntgen-Thorax-Untersuchung: Verdacht auf diffuse parenchymatöse Lungenerkrankung. Spiral-CT des Thorax spricht am ehesten für eine Alveolarproteinose.

Bronchoalveoläre Lavage: trübe Lavageflüssigkeit, kein PAS-positives Material, kein granuläres Material oder wabige Strukturen.

Erneute BAL vier Monate später: geringe Mengen SP-B und SP-C im Immunoblot, Nachweis eines abnormalen pro-SP-B-Fragments (16kD) bei nicht nachweisbarem Pro-SP-C. Histopathologisch kein typisches Bild einer Alveolarproteinose.

Surfactometer: deutlich eingeschränkte Surfactantfunktion bei normalem Surfactantgehalt.

Molekulargenetik: Ausschluss einer 121ins-Mutation bei Patient und Eltern.

Durchflusszytometrie: Ausschluss eines Defekts der gemeinsamen β -Kette des GM-CSF/II-3/II-5-Rezeptors.

Offene Lungenbiopsie (14. Lebensmonat): histologische-, immunhistologische und transmissionselektronenmikroskopische Sicherung der Diagnose Alveolarproteinose, bei gleichzeitigem Bild einer nichtspezifischen interstitiellen Pneumonie.

Befund: schwergradige komplexe Lungenerkrankung mit in mehreren Alveolen feingranulärem Material mit Cholesterinkristallen, am ehesten einzuordnen bei einer abortiven Form der Alveolarproteinose mit zellreicher interstitieller Reaktion ohne stärkergradige Fibrosierung sowie eine kuboide Metaplasie der Alveolardeckepithelien. Eindeutig positive immunhistochemische Reaktion gegen SP-B und dessen Vorläuferproteine.

Es konnte im Verlauf eine **de novo Mutation im SP-C-Gen (I73T)** gefunden werden. Diese führt zu einem Aminosäureaustausch (Threonin für Isoleucin) im C-terminalen Propeptid¹³.

Weiterer Krankheitsverlauf

Abbildung 4.1 (S. 40) stellt die im Verlauf durchgeführten Therapien, wichtige klinische Ereignisse und Untersuchungen dar. In Abbildung 2 ist die Entwicklung einzelner Parameter im Krankheitsverlauf zu sehen.

Die mit der Erkrankung zunächst aufgetretene Appetitlosigkeit ging im weiteren Krankheitsverlauf in eine annähernd komplette Verweigerung der oralen Nahrungsaufnahme über. Bereits im **zwölften Lebensmonat** erhielt der Patient eine **Duodenalsonde** zur Ernährung, die später durch eine **PEG** ersetzt wurde. Auch mit Hilfe einer Esstherapie gelang es nicht, den Patienten an die orale Aufnahme größerer Nahrungsmengen zu gewöhnen. Eine Dauersondierung ist weiterhin notwendig.

Im Alter von **19 Monaten** wurde dem Patienten **Chloroquin p.o.** gegeben. Dies erfolgte vor dem Hintergrund erfolgreicher Therapieberichte mit Chloroquin bei Kindern mit interstitieller Pneumonie⁴⁴, dem Vorliegen einer nicht vollkommen typischen Klinik

einer Alveolarproteinose und dem im Biopsiebefund beschriebenen zellulären Infiltrat (Befund: siehe oben).

Mit **fünf Jahren und acht Monaten** wurde zur Abklärung des Kleinwuchses (Wachstumsstillstand seit ungefähr 2 Jahren) ein Wachstumshormonprofil erstellt. Es konnte kein Hormonmangel nachgewiesen werden. Auf eine probatorische Hormonsubstitution wurde verzichtet. Neben der Alveolarproteinose wurde die chronische Glukokortikoidtherapie als die wahrscheinlichste Ursache des Kleinwuchses angesehen. Unter allmählicher Glukokortikoidreduktion wuchs der Patient im Verlauf der folgenden acht Monate um 3,5cm.

Im Rahmen der Wachstumshormonprofilmessung fielen Hypoglykämien auf. Diese waren seit einem hypoglykämiebedingten Krampfanfall bekannt. Mit **sechs Jahren** erfolgte die Abklärung der **Hypoglykämieeigung**. Es konnte eine ketotische Hypoglykämie diagnostiziert werden. Ein Hyperinsulinismus sowie eine Störung im Bereich der Fettsäureoxidation konnten ausgeschlossen werden. Eine endokrine Störung, Glykogenspeicherkrankheiten und ein Glykogensynthesemangel (Glykogenose Typ 0) wurden als sehr unwahrscheinlich erachtet.

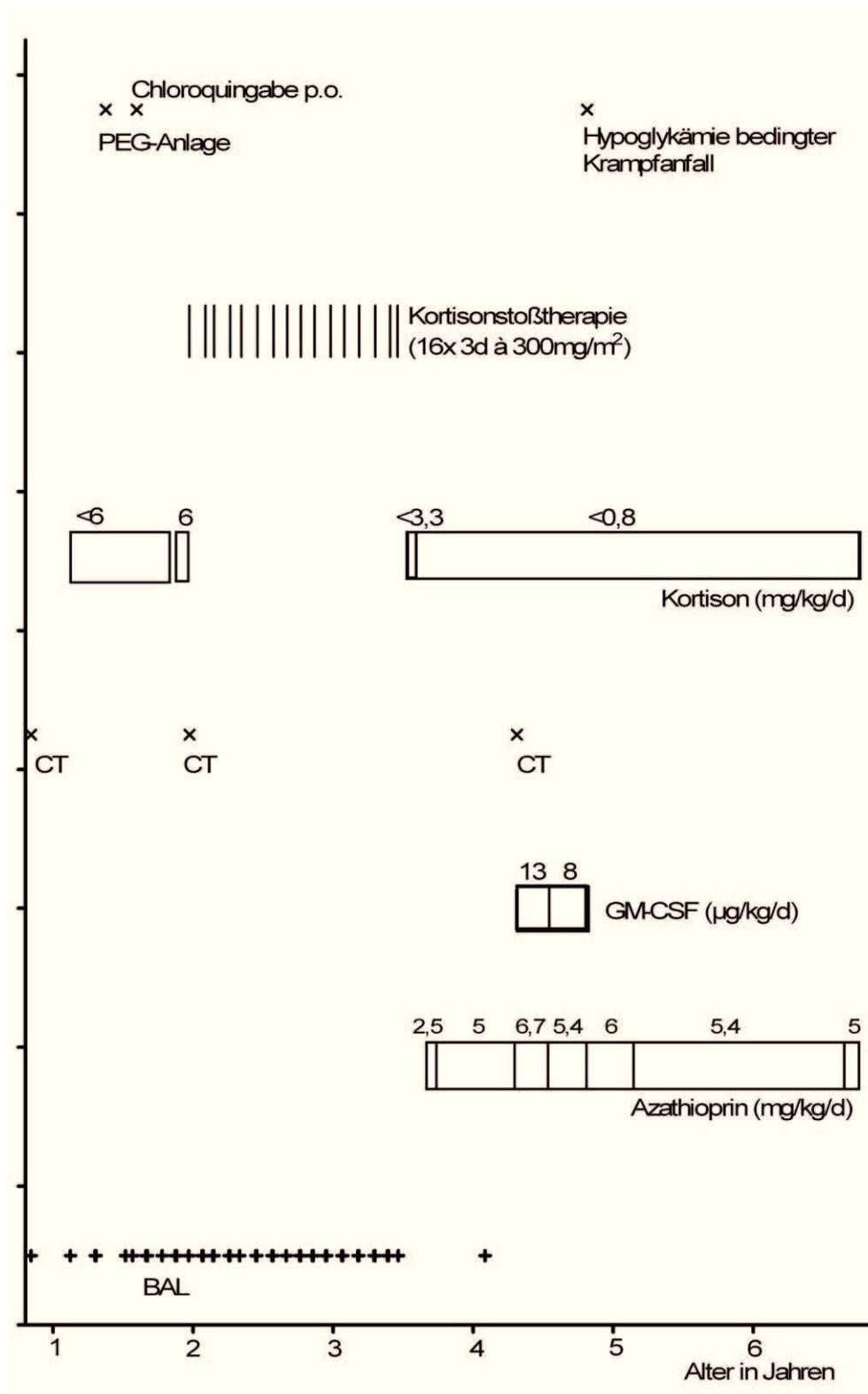


Abb. 4.1: Überblick über die im Beobachtungszeitraum durchgeführten Therapien, wichtige klinische Ereignisse und Untersuchungen.

BAL = bronchoalveoläre Lavage, CT = Computertomographie, GM-CSF = Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender-Faktor, PEG = perkutane endoskopische Gastrostomie.

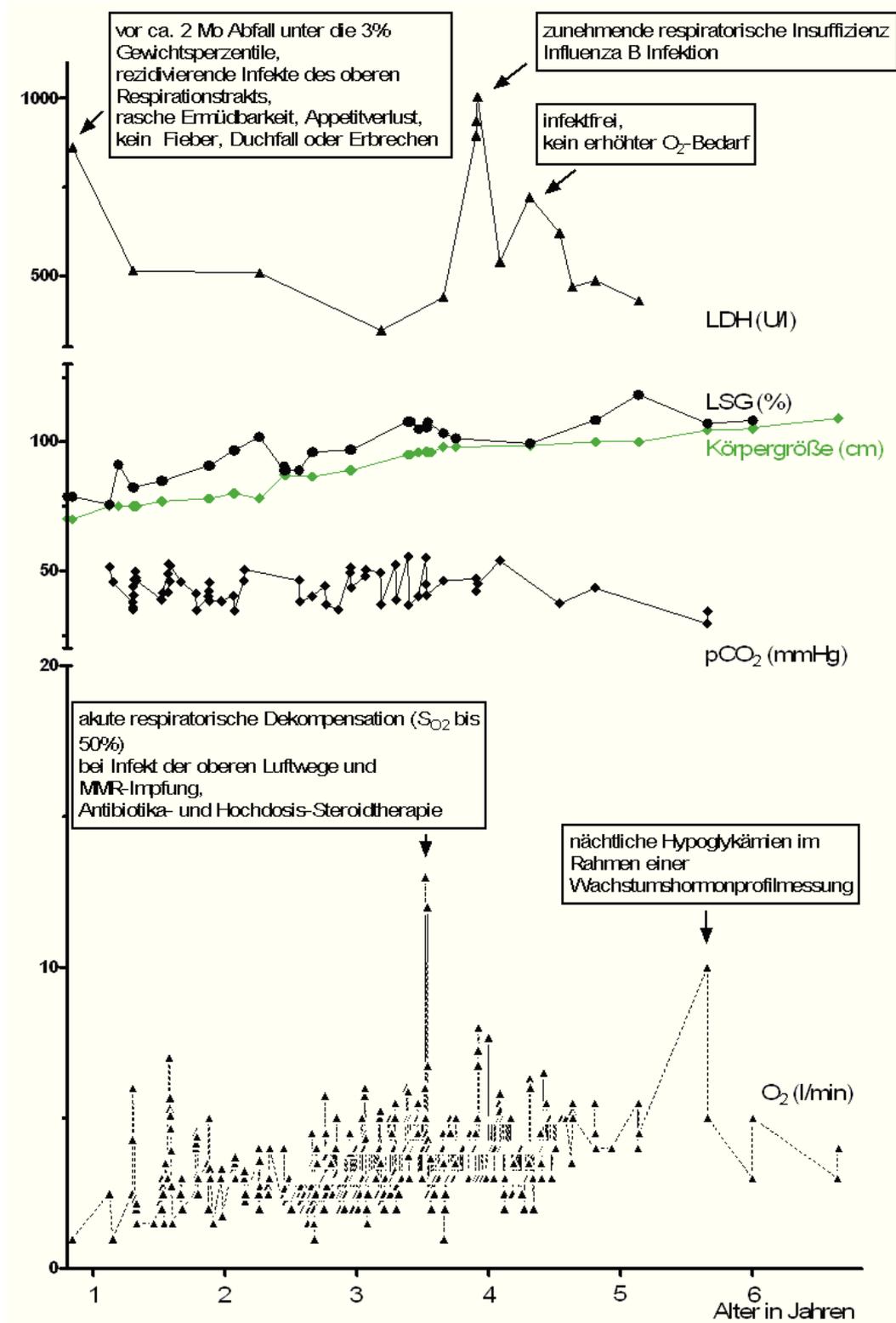


Abb. 4.2: Entwicklung ausgewählter Parameter im Krankheitsverlauf.
LDH = Lactatdehydrogenase, LSG = Längensollgewicht, pCO₂ = CO₂ Partialdruck.

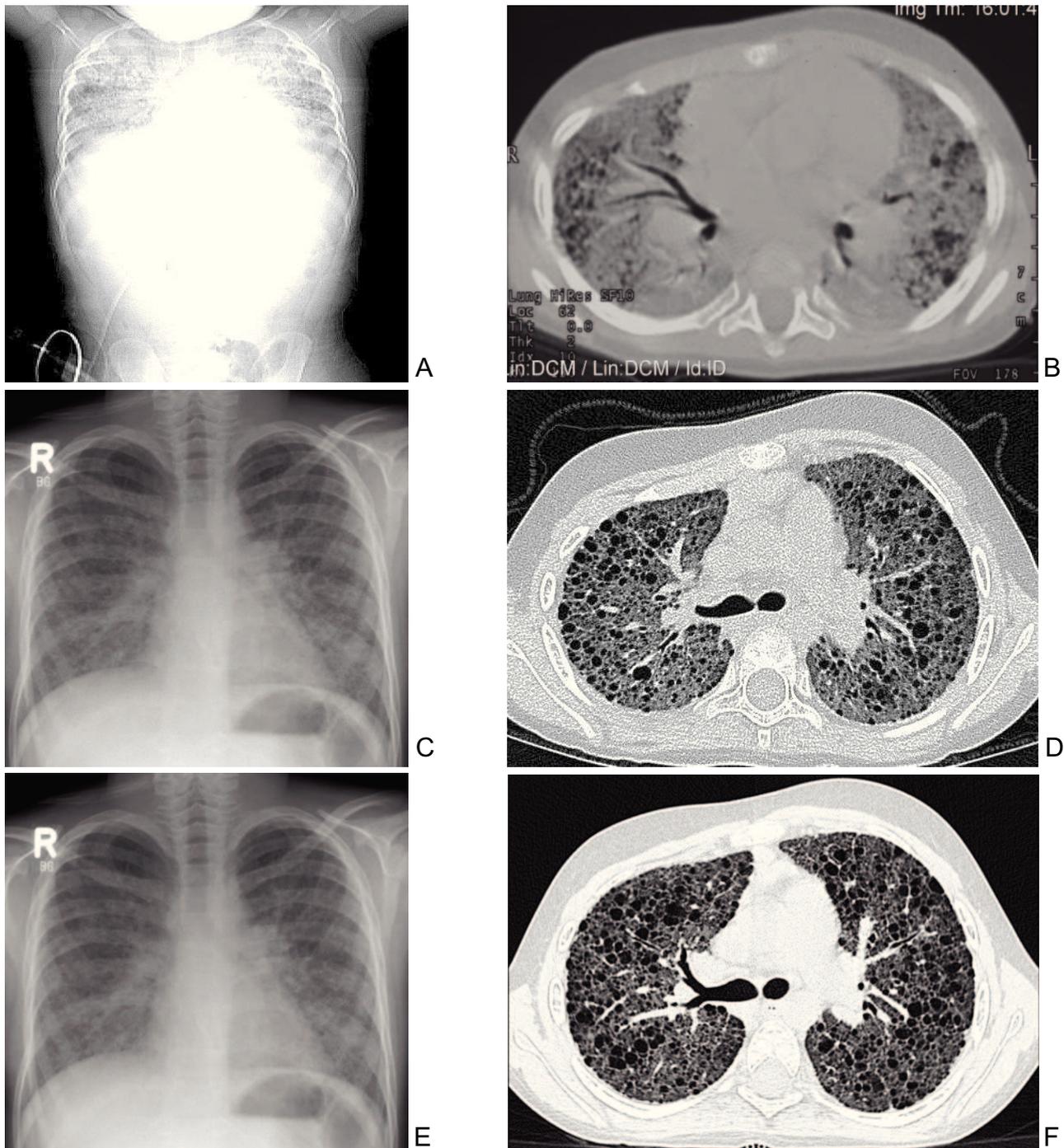


Abb. 4.3: CT-Thorax und Röntgen-Thorax Bilder des Patienten 1. **A, C, E:** Röntgen-Thoraces: **A:** 13 Monate nach Diagnosestellung. **C:** 5 9/12 Jahre nach Diagnosestellung. **E:** 9 7/12 Jahre nach Diagnosestellung. **B, D, F:** CT-Thoraces: **B:** 13 Monate nach Diagnosestellung. **D:** 7 5/12 Jahre nach Diagnosestellung. **F:** 8 3/4 Jahre nach Diagnosestellung.

4.1.1.2 Patient 2- PAP durch Mutation im GM-CSF R α -Gen

Es handelt sich um ein Mitte 2009 elf Jahre und drei Monate altes Mädchen türkischer Herkunft. Sie ist das zweite Kind konsanguiner Eltern (Großmutter väterlicherseits entspricht Urgroßtante mütterlicherseits).

Schwangerschaft und Geburt

Die Schwangerschaft verlief unauffällig. Spontane Geburt in der 40. Schwangerschaftswoche. Geburtsgewicht 3270g (50. Perzentile), Körpergröße 52cm (50. Perzentile), Nabelschnur-pH 7,44, APGAR-Wert unauffällig.

Säuglingsperiode

Im Alter von **acht Monaten** wurde die Patientin wegen einer obstruktiven Bronchitis erstmals stationär aufgenommen. Unter Inhalationstherapie kam es zu einer deutlichen Besserung.

Symptombeginn und Diagnose

Anamnese: Mit **zweieinhalb Jahren** entwickelte sich ein nicht produktiver, tageszeitunabhängiger Husten mit zum Teil Fieber über einige Tage. Im Rahmen der Hustenattacken zeigte sich eine orale Zyanose. Es entwickelte sich eine zunehmende Tachydyspnoe. Eine dreimalige orale Antibiotikatherapie brachte keine klinische Besserung. Zudem kam es zu einer Gewichtsabnahme von 3kg innerhalb eines Monats.

Aufnahmestatus: Zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme präsentierte sich ein dystrophes Mädchen in deutlich reduziertem Allgemein- und Ernährungszustand mit Tachypnoe, Lippenzyanose (SaO₂ 71%) sowie interkostalen und jugulären Einziehungen. Körpergewicht 11,4kg (3.-10. Perzentile), Körpergröße 93cm (50. Perzentile), Kopfumfang 47cm (auf der 10. Perzentile).

Im **Labor** zeigten sich ein normales Blut- und Differentialblutbild, keine Entzündungszeichen, normale Elektrolyte, Leber- und Nierenwerte. Die LDH war erhöht (maximal 449U/l). Darüber hinaus wurden mehrmals erhöhte Werte des carcinoembryonalen-Antigens (CEA) gemessen.

Bildgebung: In Röntgenthoraxuntersuchungen zeigten sich interstitielle Verdichtungen sowie eine retikuläre Zeichnungsvermehrung beidseits. In einem Spiral-CT des

Thorax ließ sich ein reticuläres Muster mit mattglasigen Trübungen fast der gesamten Lungen nachweisen.

Eine **bronchoalveoläre Lavage** (BAL) erbrachte ein für eine Alveolarproteinose charakteristisches, trüb-milchiges Sekret. Immunologisch ließ sich SP-A, SP-B und SP-C in großen Mengen nachweisen. Mikroskopisch zeigte sich massenhaft extrazelluläres eosinophiles Material, eine deutliche lymphozytäre und neutrophile Reaktion sowie Makrophagen mit einer deutlichen zytoplasmatischen Speicherung.

Das Ergebnis einer **transbronchialen Lungenbiopsie** war mit einer Alveolarproteinose vereinbar. Es zeigten sich hierbei alveoläre Makrophagen, eine intraalveoläre, eiweißreiche, PAS-positive Flüssigkeit sowie Zeichen einer uncharakteristischen chronischen Bronchitis.

Genetisch konnte eine 121ins2 Mutation des SP-B-Gens ausgeschlossen werden.

Auch konnten eine lysinurische Proteinintoleranz, eine Mukoviszidose, eine Sarkoidose, ein α 1-Antitrypsinmangel sowie ein Immundefekt ausgeschlossen werden.

Es fand sich allerdings eine GM-CSF R α Mutation (Veröffentlichung in Vorbereitung).

Weiterer Krankheitsverlauf

Abbildung 4.4 (S. 47) gibt einen Überblick über die im Verlauf durchgeführten Therapien, wichtige klinische Ereignisse und Untersuchungen. In den Abbildungen 4.5 A-C ist die Entwicklung einzelner Parameter im Krankheitsverlauf dargestellt.

Im Alter von **drei Jahren und zwei Monaten** erhielt die Patientin auf Grund mangelnder Gewichtszunahme eine **PEG**.

Mit **fünf Jahren und fünf Monaten** kam es zu **mehreren Krampfanfällen**. Erstmals kam es zu Hause aus dem Schlaf heraus zu einem Krampfanfall. Dieser äußerte sich durch Augenverdrehen nach links und Somnolenz. Initial war die Patientin sehr schlapp, im Verlauf beugte sie die Arme, fäustelte und streckte die Beine. Die SaO₂ fiel bis auf 60% unter 10l/min O₂ ab. Es wurde ein Atemstillstand beobachtet. Die Episode dauerte zwischen fünf und zehn Minuten. Es erfolgte weder ein Zungenbiss noch ein Einnässen. Unter stationärer Beobachtung zeigte die Patientin mehrere Adams-Stokes-artige Attacken nach vorangegangenem Pressen (oder ähnlichem) mit Krampfepisoden, wobei einmalig bei deutlicher Bradykardie eine Herzdruckmassage durchgeführt werden musste. Im Anschluss zeigten sich keine neurologischen Defizite. Die Krampfanfälle wurden als Zustände akuter Hypoxie im Rahmen der Grunderkrankung interpretiert. Differentialdiagnostisch zu erwägende pulmonal-

hypertensive Krisen ließen sich mittels Echokardiographie und Herzkatheteruntersuchung nicht nachweisen.

Im Intervall wurde eine **offene Lungenbiopsie** zur Klärung des Lungenzustandes durchgeführt. Im Bereich einer bekannten Lungenzyste im linken Unterlappen konnten Aspergillen in Form eines Aspergilloms in einem Abstrich und in der Kultur nachgewiesen werden. Es wurde ein großer Teil des linken Unterlappens reseziert, da dieser sich intraoperativ sehr vulnerabel und größtenteils zerstört präsentierte. Histologisch ergab sich das typische Bild einer Alveolarproteinose ohne massive Zeichen einer begleitenden Entzündung.

Nach mehrfachem Verschluss der über ein Gastrostoma liegenden Jejunalsonde wurde diese durch die Anlage eines **Jejunostomas** im Alter von **sechs Jahren und vier Monaten** ersetzt.

Mit **sieben Jahren und sieben Monaten** kam es zu einer **Parainfluenza-Infektion mit Ausbildung eines ARDS**. Die stationäre Aufnahme erfolgte wegen respiratorischer Verschlechterung mit einem Sauerstoffbedarf von 10l/min. Es bestanden keine Infektzeichen. Nach einer komplikationslosen BAL sank der Sauerstoffbedarf auf minimal 4l/min ab, ehe er erneut intermittierend anstieg. Vier Tage nach der BAL kam es zu einer plötzlichen respiratorischen Insuffizienz mit Sättigungsabfall, die eine sofortige Notfallintubation notwendig machte. Bei Verdacht auf beginnende Pneumonie wurde eine intravenöse Antibiotikatherapie begonnen. Initial war die Beatmungssituation stabil. Im Verlauf kam es allerdings zu einem progredienten CO₂-Anstieg und ARDS-typischer Veränderungen im Röntgenbild. Trotz Anpassung des Beatmungsregimes kam es zu einer Hyperkapnie mit pCO₂-Werten bis maximal 170mmHg. Erst durch Hochfrequenzoszillation konnte eine Besserung erreicht werden. Eine kreislaufunterstützende Therapie mit Noradrenalin (max. 0,45µg/kg/min) und Dobutamin (max. 15µg/kg/min) war für insgesamt fünf Tage notwendig. Wegen deutlicher Rechtsherzbelastungszeichen wurde NO verabreicht. Im Trachealsekret konnte Parainfluenza Typ 2 isoliert werden, woraufhin eine Therapie mit Ribavirin begonnen und die intermittierend auftretenden Obstruktionen mit Theophyllin behandelt wurden. Nach 22 Tagen konnte die Patientin problemlos extubiert werden. Der Sauerstoffbedarf bei Entlassung betrug 3l/min.

In der Folge zeigte sich bei der Patientin ein stabiler pulmonaler Verlauf. Die Patientin konnte bei guten Sättigungen (>92%) **Sauerstoffpausen** zum Teil über mehrere

Stunden einlegen. Erst sechseinhalb Monate nach der letzten Lavage wurde wieder eine BAL wegen zunehmendem Sauerstoffbedarf (bis 8l/min) notwendig.

Im **neunten Lebensjahr** wurden insgesamt neun Lavagen durchgeführt. Der Sauerstoffbedarf war im Vorfeld jeweils deutlich angestiegen. Mit **acht Jahren und acht Monaten** musste die Patientin i.v.-antibiotisch wegen eines schweren pulmonalen Infekts behandelt werden.

Im **zehnten Lebensjahr** war keine BAL notwendig. Der Sauerstoffbedarf lag bei maximal fünf Litern. Zum Teil wäre eine weitere Sauerstoffreduktion möglich gewesen, allerdings verweigerte die Patientin dies und gab deutliche Angst gegenüber einer Reduktion an. Mit **neun Jahren und elf Monaten** konnte eine **erste Spirometrie** durchgeführt werden. Diese zeigte deutliche Zeichen einer Restriktion. Dies bestätigte sich bei Verlaufsuntersuchungen. Der FEV₁-Wert (Abb. 4.5D, S. 50) zeigte eine steigende Tendenz.

Mit **zehn Jahren und einem Monat** musste wegen Sauerstoffbedarfs bis zu 10 l/min nach über zwölfmonatiger Pause wieder eine BAL durchgeführt werden. Im Verlauf des **elften Lebensjahres** wurde die Patientin regelmäßig einer BAL unterzogen (maximaler Abstand zweier Lavagen: fünfeinhalb Wochen). Einmalig wurde dabei der Versuch unternommen, die Effektivität der Materialentfernung aus den Lungen mittels simultanen Einsatzes einer Schüttelweste zu erhöhen. Dies musste allerdings wegen erheblicher Gefahr einer Tubusdislokation abgebrochen werden.

Durch die regelmäßige Durchführung einer BAL sank der Sauerstoffbedarf deutlich. Zuletzt konnte tagsüber zum Teil ganz auf Sauerstoff verzichtet werden. Eine Lungenfunktion mit Broncholyse zeigte keine signifikanten Veränderungen des FEV₁. Im Bereich der kleinen und mittleren Atemwege (MEF₂₅, MEF₅₀, MEF₇₅) kam es allerdings zu deutlichen Änderungen.

Eine Veröffentlichung zu der Erkrankung der Patientin ist in Vorbereitung.

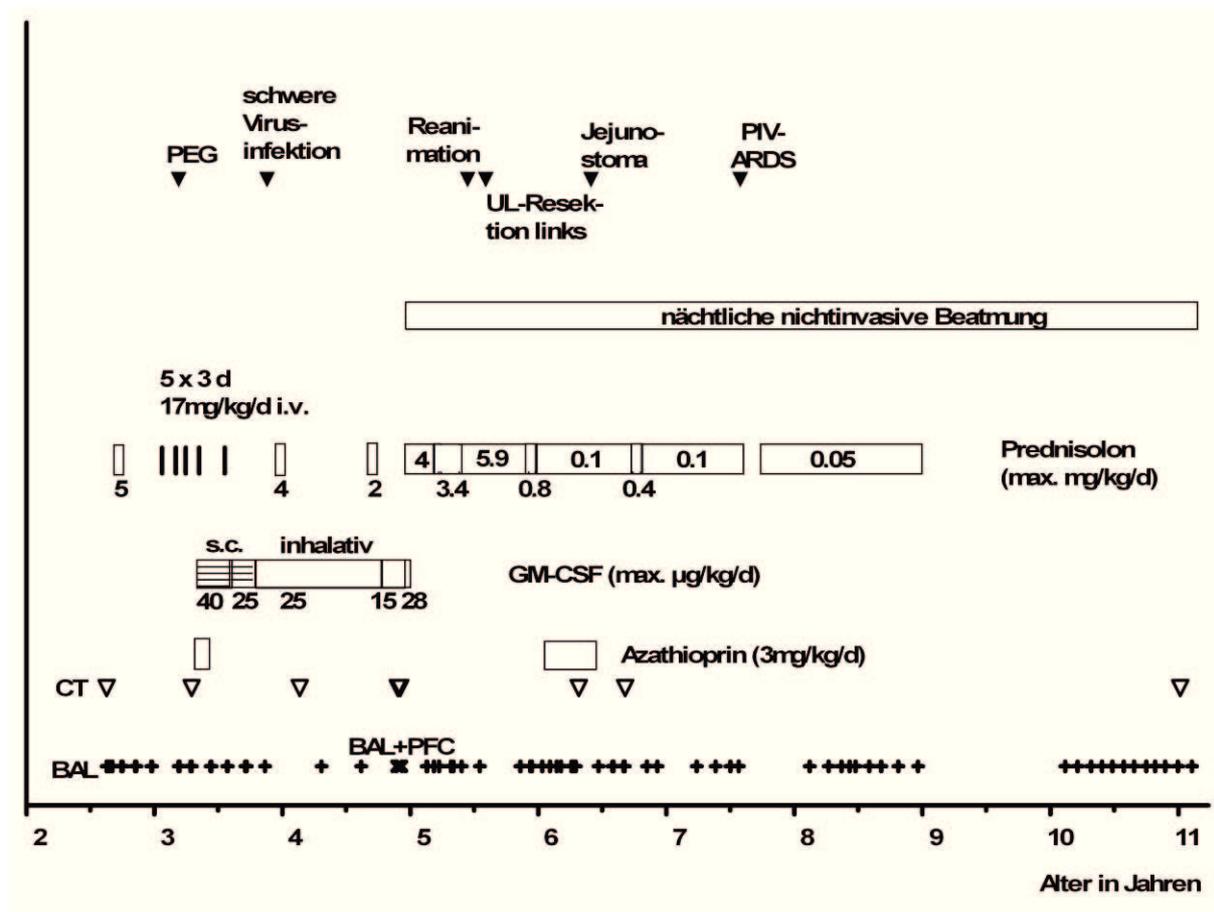


Abb. 4.4: Überblick über die im Beobachtungszeitraum durchgeführten Therapien, wichtige klinische Ereignisse und Untersuchungen.

BAL = bronchoalveoläre Lavage, BAL + PFC = bronchoalveoläre Lavage inklusive Perflurocarbon-spülung, CT = Computertomographie, GM-CSF = Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender-Faktor, PEG = perkutane endoskopische Gastrostomie, ARDS = acute respiratory distress syndrome = akutes Lungenversagen

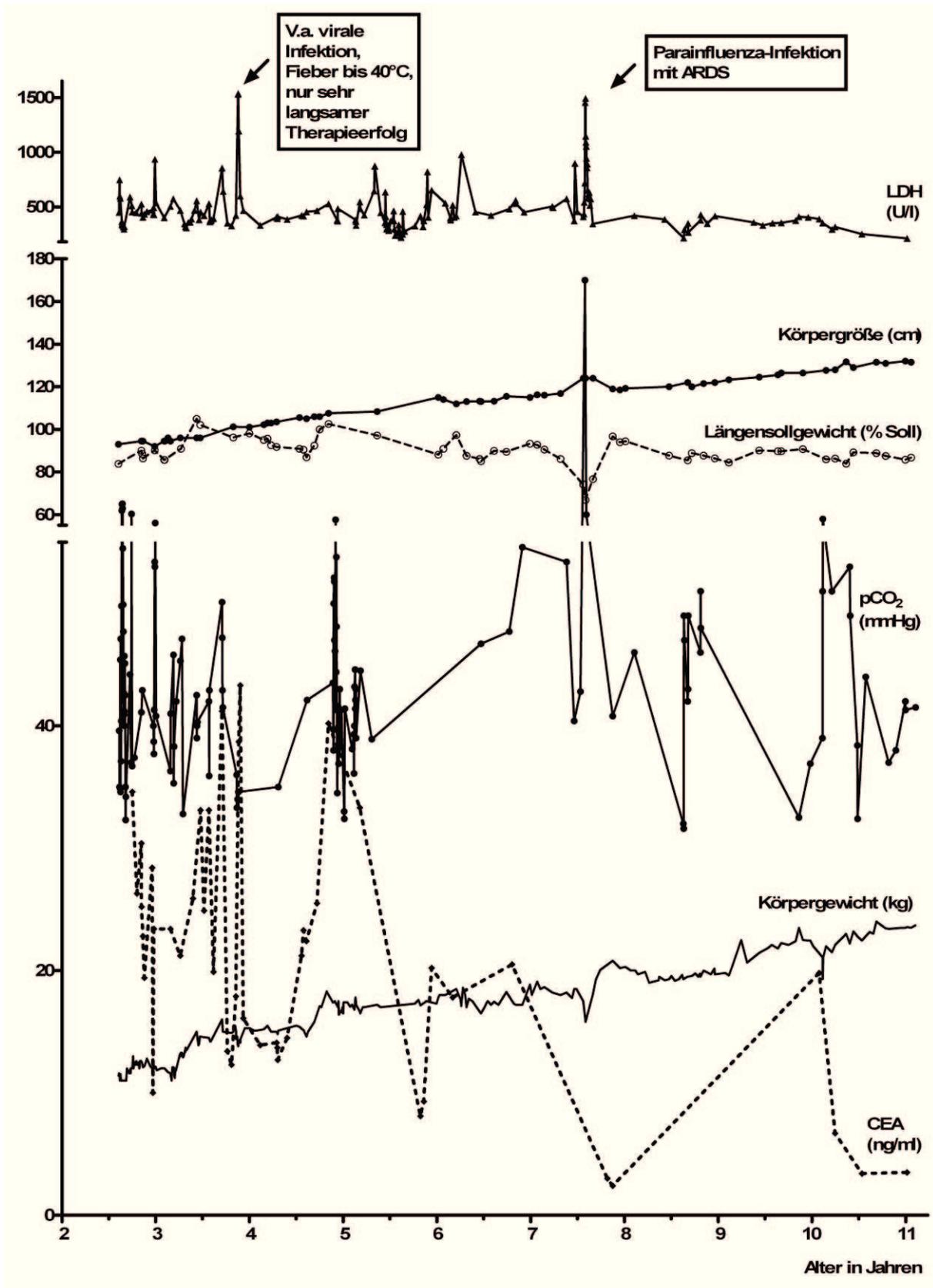


Abb. 4.5A: Entwicklung von CEA, Körpergewicht, Körpergröße, Längensollgewicht, LDH und pCO₂ im Krankheitsverlauf.

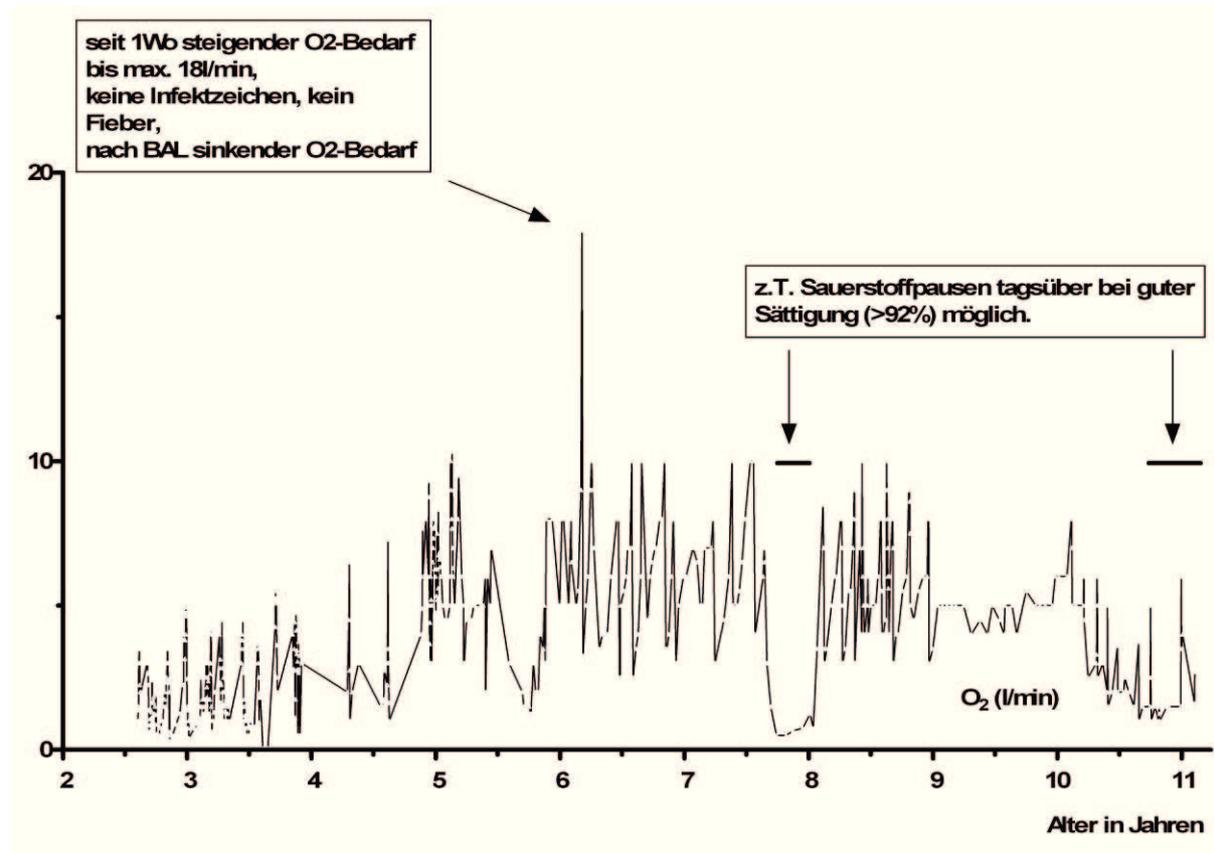


Abb. 4.5B: Sauerstoffbedarf im Verlauf.

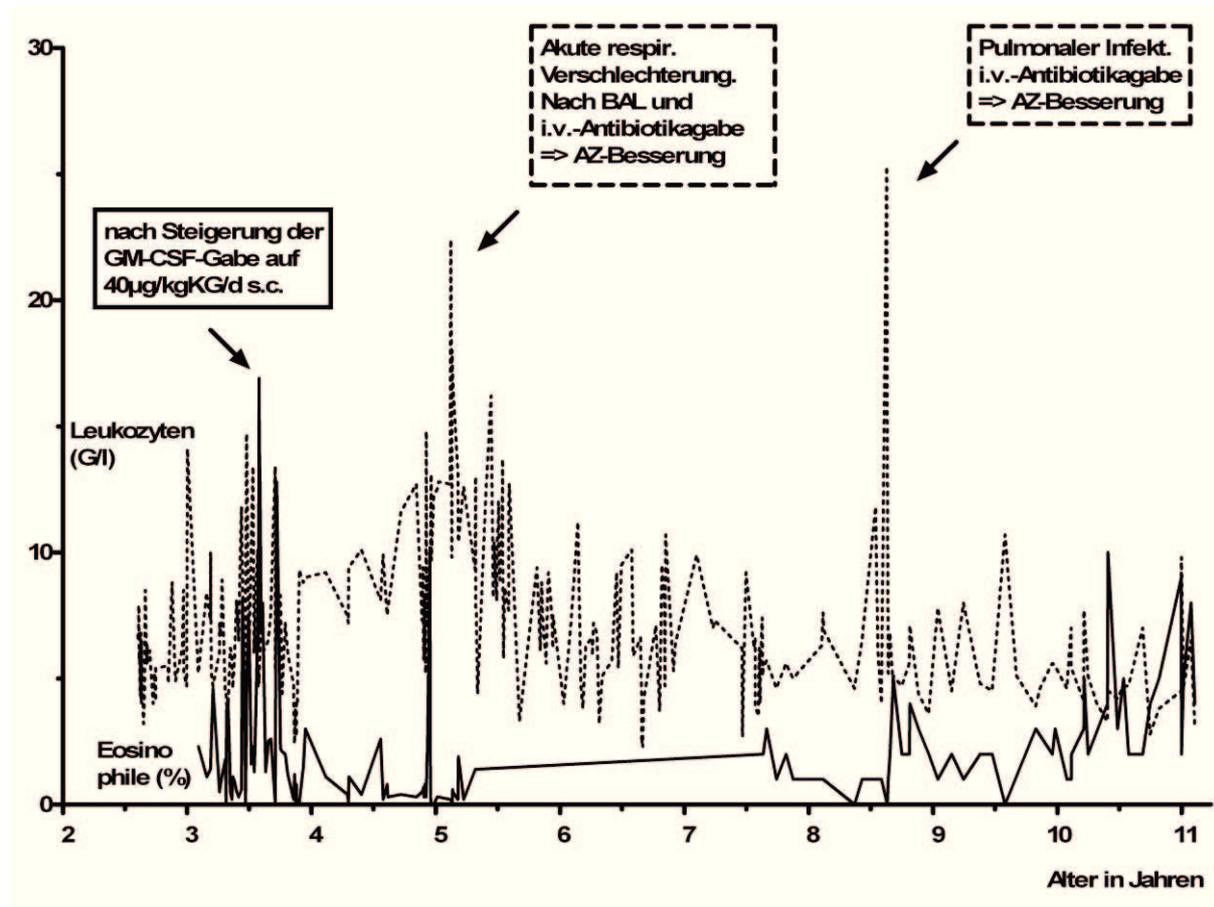


Abb. 4.5C: Leukozyten (WBC) und Eosinophile im Verlauf.

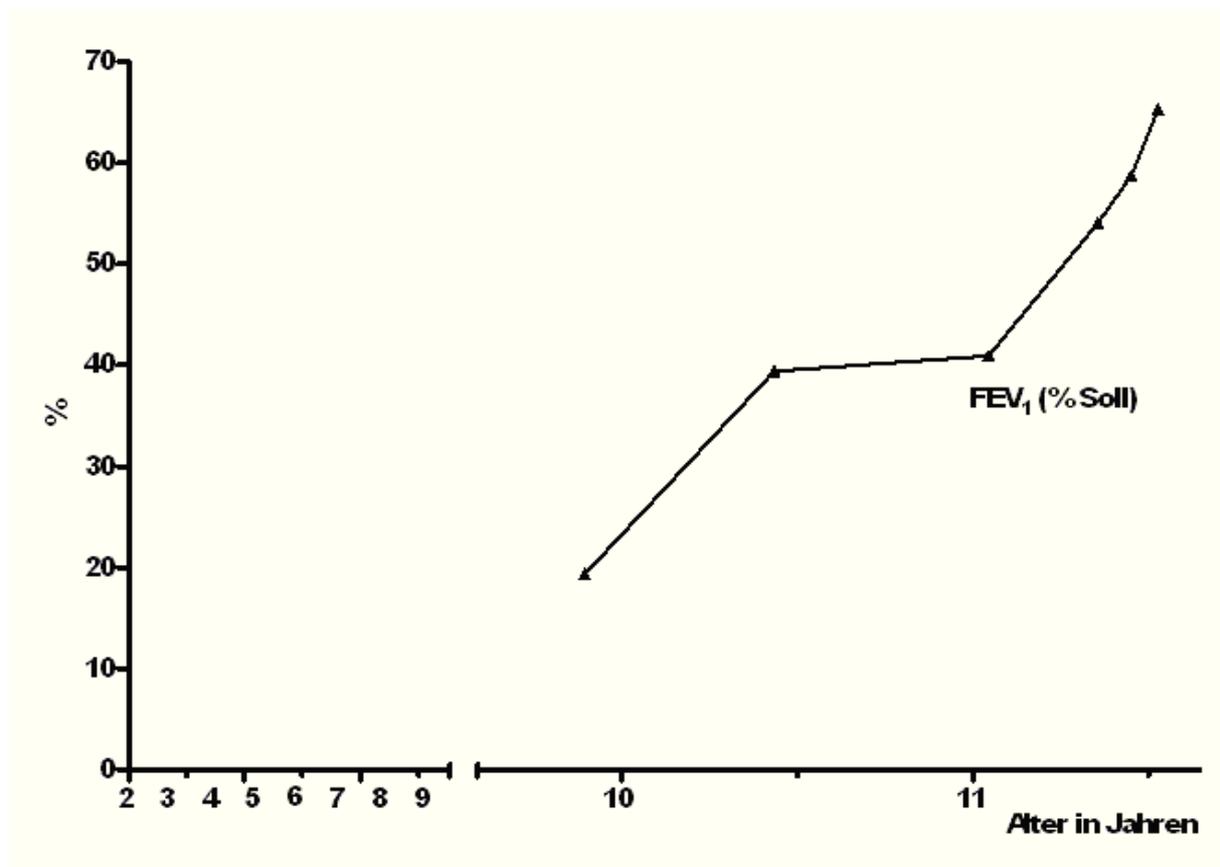


Abb. 4.5D: FEV₁ im Verlauf.

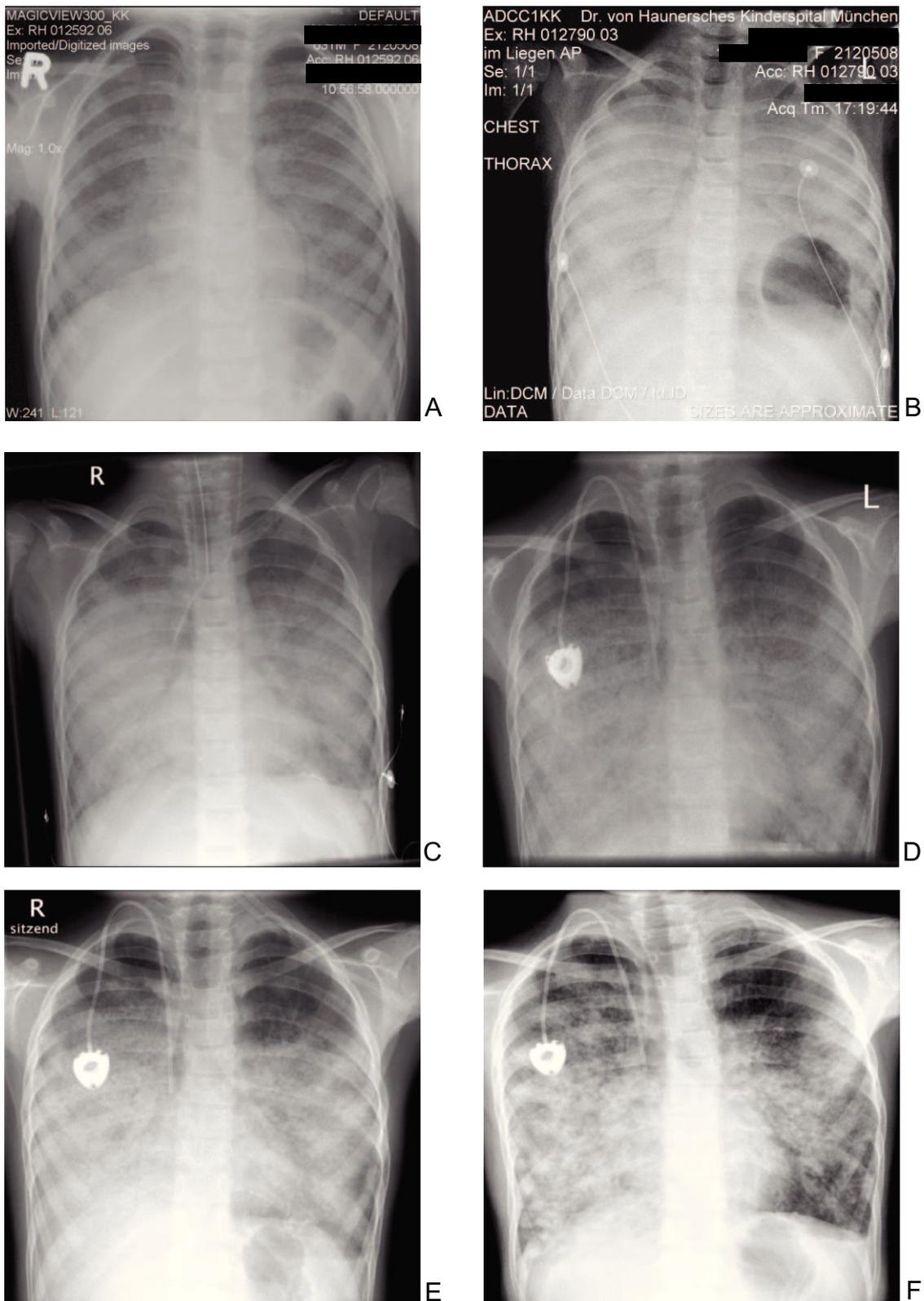


Abb. 4.6A: Röntgen-Thorax Untersuchungen der Patientin 2. **A:** bei Diagnosesicherung mittels transbronchialer Lungenbiopsie. **B:** 3 Jahre nach Diagnose. **C:** 4 Jahre nach Diagnose. **D:** 5 Jahre nach Diagnose. **E:** 6 Jahre nach Diagnose, **F:** 7 Jahre nach Diagnose.

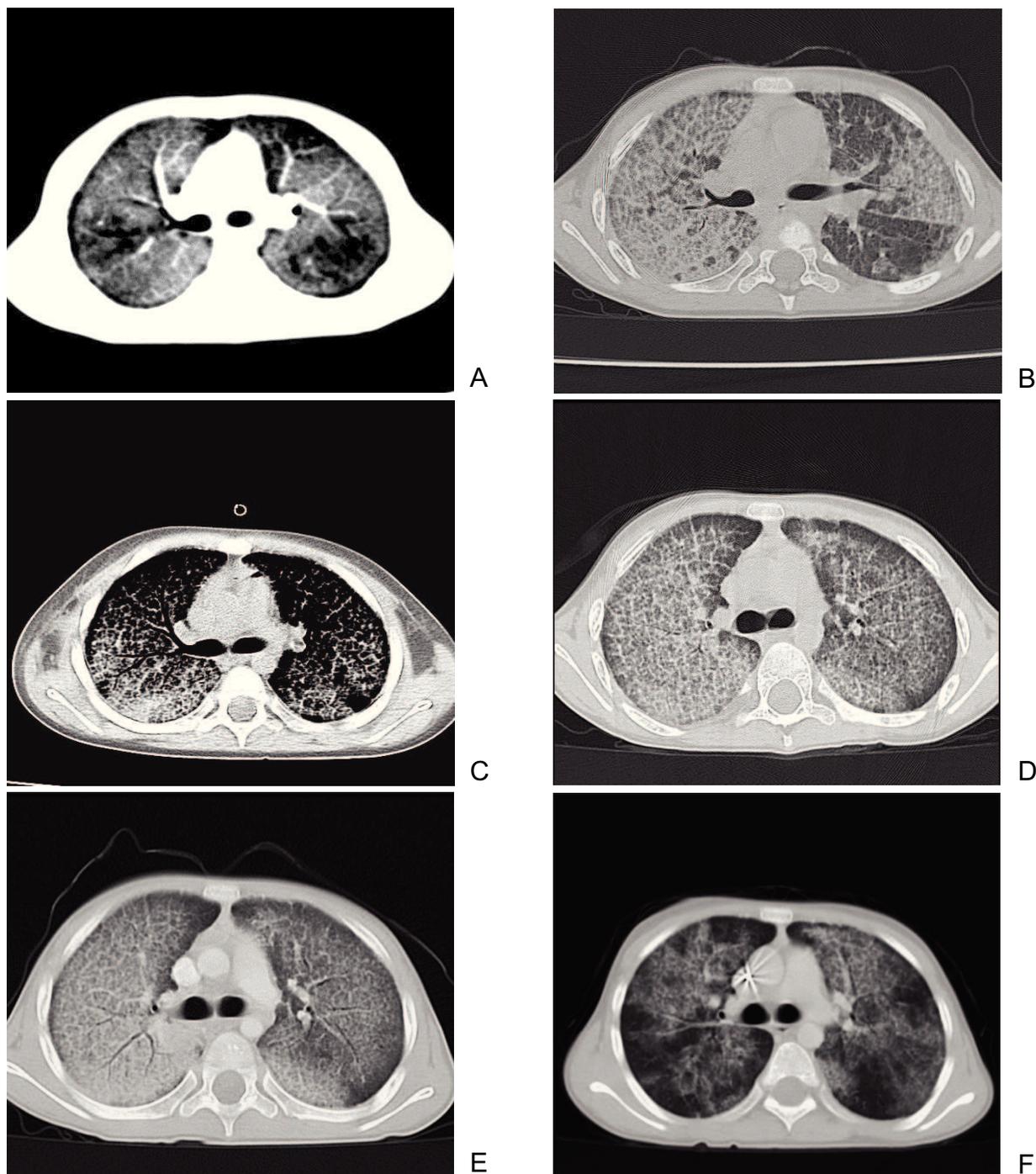


Abb. 4.6B: CT-Thorax Bilder der Patientin 2. **A:** Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im Alter von 2 $\frac{3}{4}$ Jahren. **B:** 1 $\frac{1}{2}$ Jahre nach Diagnosestellung. **C:** 2 $\frac{1}{4}$ Jahre nach Diagnosestellung **D:** 3 $\frac{3}{4}$ Jahre nach Diagnosestellung. **E:** 4 Jahre nach Diagnosestellung. **F:** 8 $\frac{1}{2}$ Jahre nach Diagnosestellung.

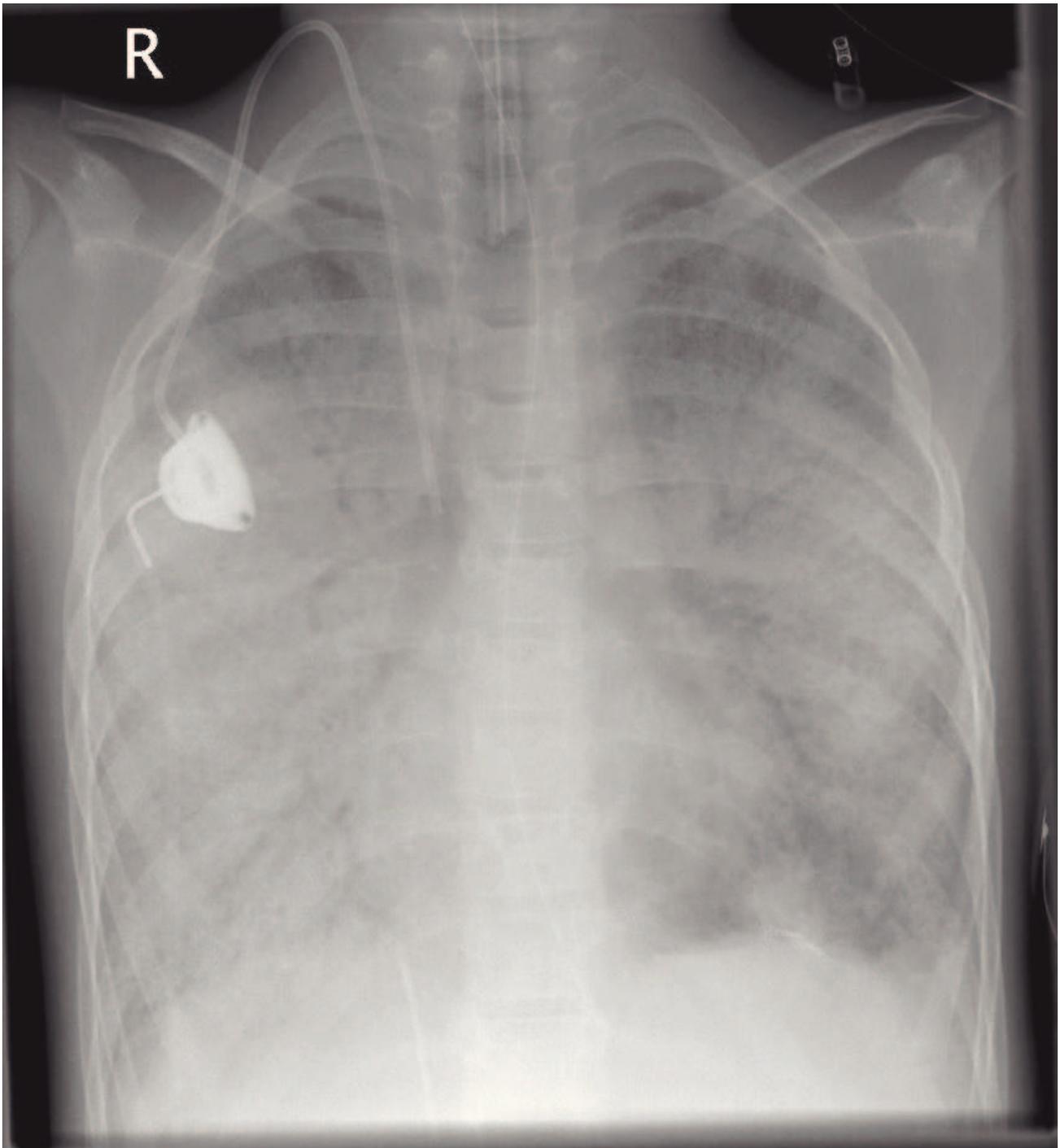


Abb. 4.6C: Röntgen-Thorax der Patientin 2 während des ARDS.

4.1.1.3 Patient 3- PAP unklarer Genese (GM-CSF Autoantikörper negativ)

Die dritte Patientin ist ein Mitte 2007 elfeinhalb Jahre altes Mädchen. Sie ist das dritte Kind nicht konsanguiner Eltern. Ihre beiden älteren Brüder sind gesund.

Schwangerschaft und Geburt

Unauffälliger Schwangerschafts- und Geburtsverlauf. Spontane Geburt am Termin. Geburtsgewicht 3980g (90. Perzentile). Geburtslänge 57cm (> 97. Perzentile). Guter Zustand des Neugeborenen.

Säuglingsperiode

Unauffällig.

Symptombeginn und Diagnose

Anamnese: Mit acht Jahren schwere Bronchitis mit hohem Fieber. Seitdem zunehmende Müdigkeit, nächtliches Schwitzen und nur geringe Gewichtszunahme trotz Wachstums. Ein halbes Jahr später Entwicklung eines rezidivierenden, nächtlichen, trockenen Hustens. Im Monat vor der Aufnahme war dieser stärker und praktisch täglich, v.a. in den frühen Morgenstunden vorhanden. Aufnahme wegen AZ-Verschlechterung mit starkem Husten, Dyspnoe, Fieber, Lippenzyanose und Sättigungsabfällen. Initiale antibiotische Therapie ohne wesentliche Besserung der Symptome. Vor einem Jahr war Schimmel im Kinderzimmer aufgefallen. Die Familie ist mittlerweile umgezogen.

Aufnahmestatus: neunjähriges Mädchen, Körpergewicht: 24,6kg (10. - 25. Perzentile), Körpergröße: 132,5cm (50. Perzentile), Kopfumfang 53cm (75. - 90. Perzentile), Atemfrequenz 40/min, Herzfrequenz 122/min, SaO₂ 85% unter Raumluft bzw. 94% unter 2l/min O₂, Fieber. Reduzierter Allgemeinzustand, BMI 14, kachektisch. Anstrengungsdyspnoe, Kurzatmigkeit, Tachypnoe, normales Atemgeräusch über beiden Lungen. Herz, Kreislauf unauffällig. Lymphknoten angulär, zervikal, axillär und inguinal leicht vergrößert, druckdolent und gut verschieblich.

Im **Labor** erhöhte Infektparameter.

Die **Lungenfunktion** zeigt eine mittelschwere bis schwere restriktive Ventilationsstörung ohne Anhalt für obstruktive Komponente.

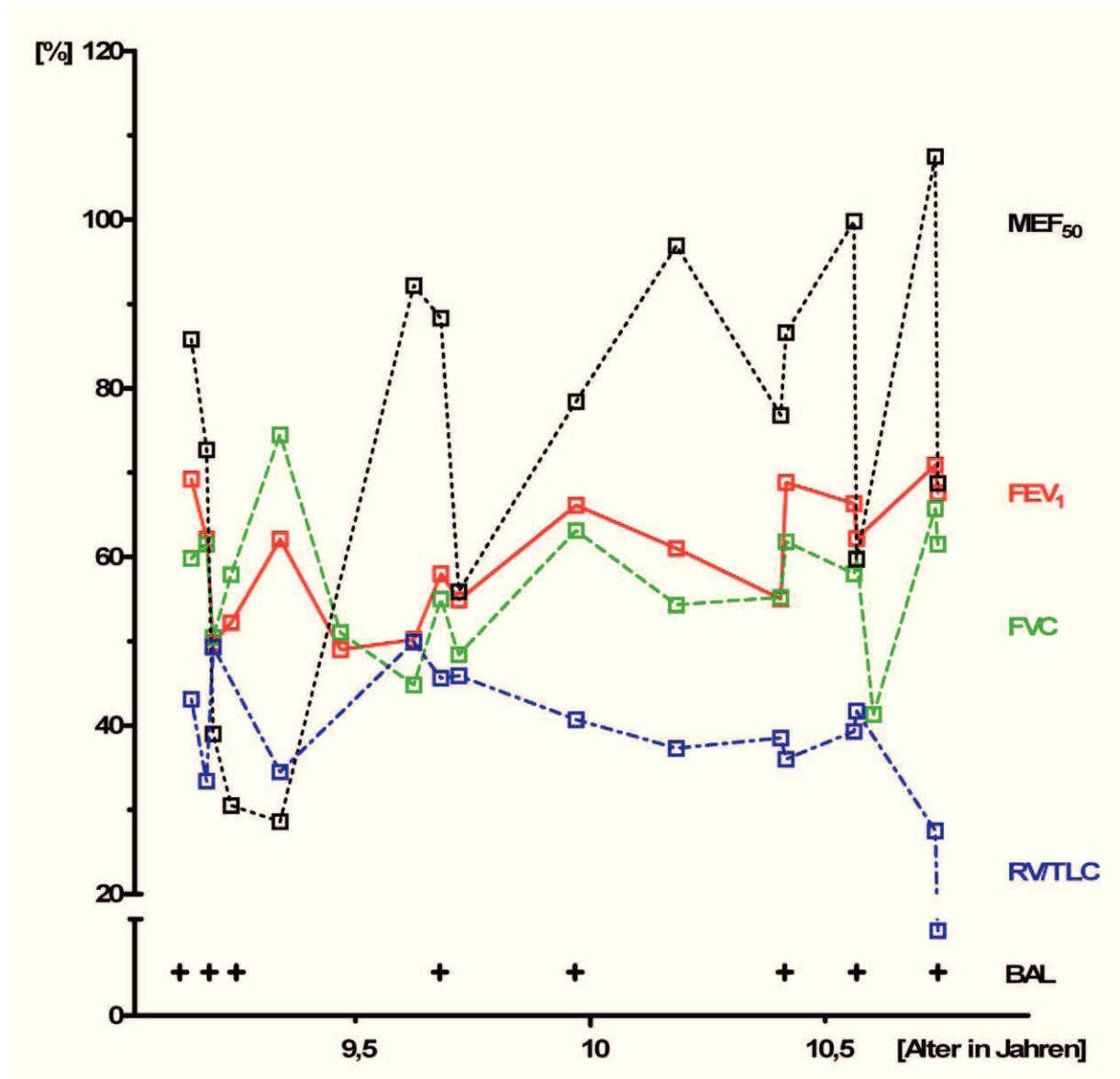


Abb. 4.7A: Lungenfunktion der Patientin im Verlauf.

FEV₁ = forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde; FVC = forcierte Vitalkapazität; MEF₅₀ = maximaler expiratorischer Flow bei 50% der FVC; RV = Residualvolumen; TLC = totale Lungenkapazität

Bildgebung: Röntgen-Thorax-Untersuchung: diffuses interstitielles Verschattungsmuster. CT-Thorax-Untersuchung: „crazy paving“ Muster bei Alveolarproteinose. Relativ symmetrische und gleichmäßige Verteilung über der gesamten Lunge.

Bronchoalveoläre Lavage: milchig trübe, sehr eiweißreiche Flüssigkeit.

Lungenbiopsie (thorakoskopisch): In einem Läppchen nahezu vollständige Füllung der Alveolen durch feingranuläres PAS-positives Material entsprechend dem typischen Bild einer Alveolarproteinose. Immunhistochemisch identisches Spektrum wie

bei der Typ III Alveolarproteinose im Erwachsenenalter. Keine Hinweise auf hereditäre SP-B-Defizienz, SP-C-Gen-Mutation, ABCA-3-Mutation sowie begleitende interstielle Lungenerkrankung.

Weiterer Krankheitsverlauf

In Abbildung 4.7B (S. 57) ist der Krankheitsverlauf der Patientin dargestellt. Abbildung 4.8 (S. 58) zeigt die Entwicklung der GM-CSF-Auto-Antikörper im Serum der Patientin. Die Bestimmung erfolgte laut Lazin et al²⁹.

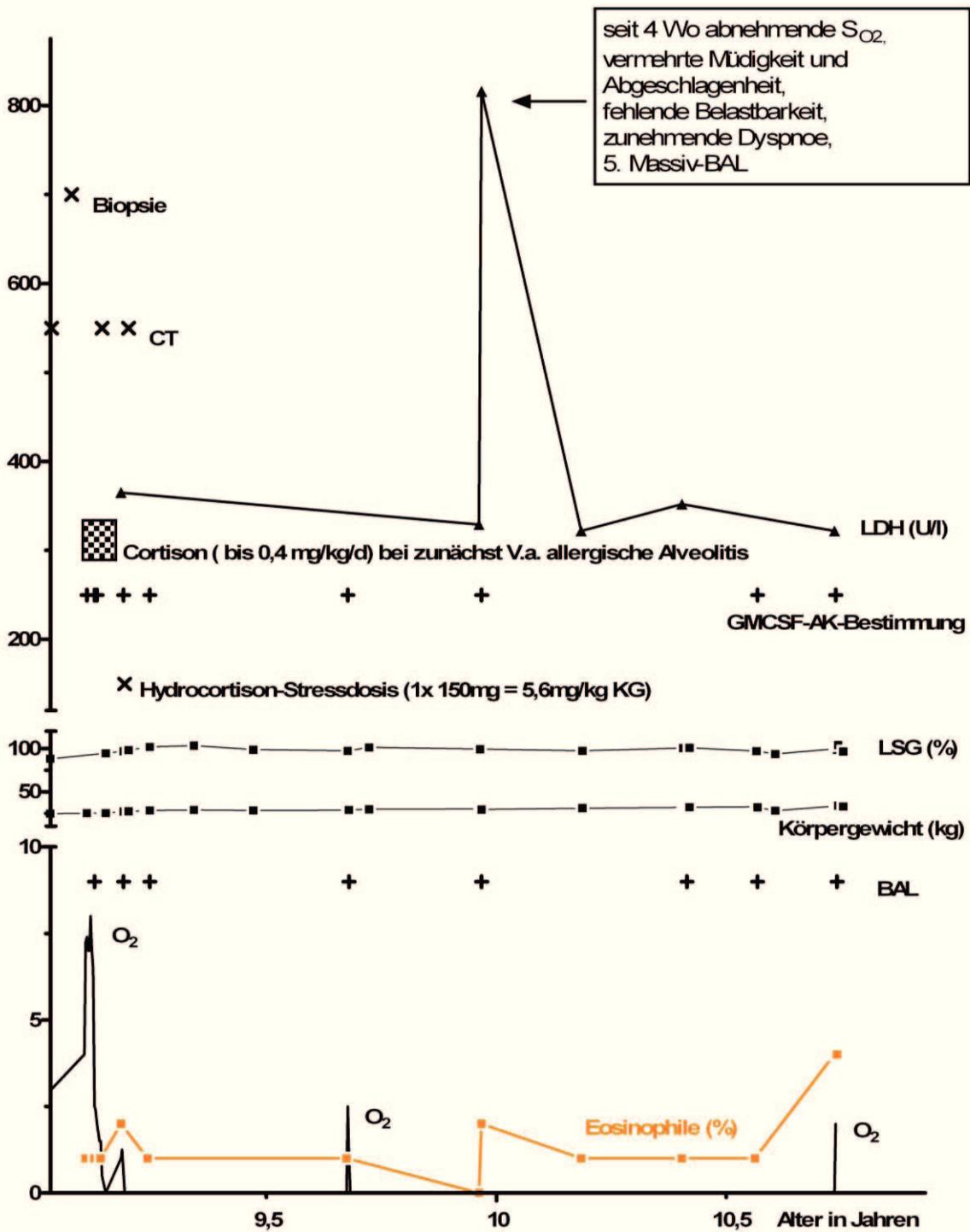


Abb. 4.7B: Überblick über die im Beobachtungszeitraum durchgeführten Therapien, wichtige klinische Ereignisse und Untersuchungen.

BAL = bronchoalveoläre Lavage, CT = Computertomographie, GM-CSF-AK= Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender-Faktor-Autoantikörper, LSG = Längensollgewicht

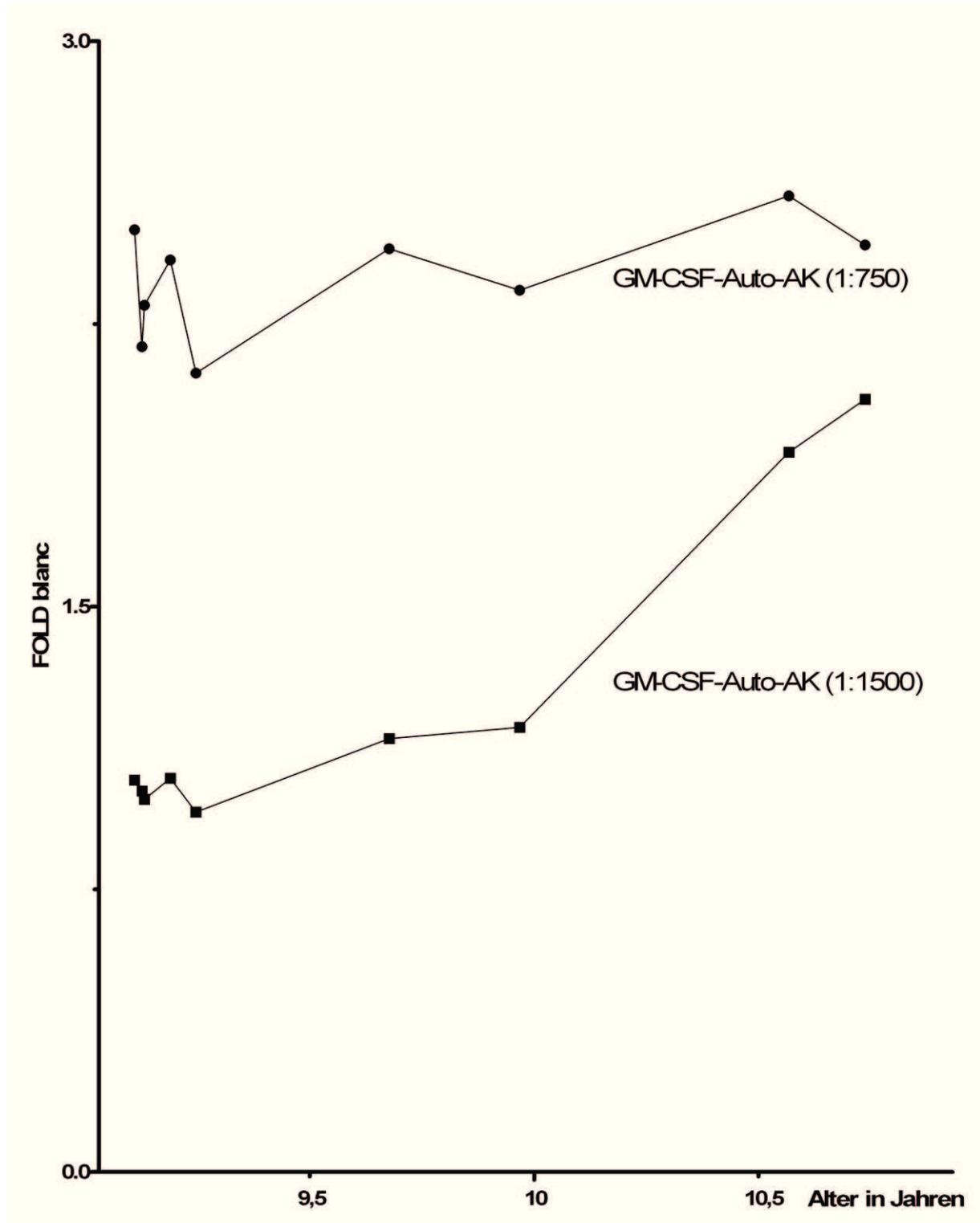


Abb. 4.8: GM-CSF-Auto-Antikörper-Titer im Serum im Verlauf. Bestimmung laut Latzin et al²⁹. Angabe in Vielfachen des Blindwertes bei entsprechender Verdünnung (siehe in Klammern). Alle Messwerte liegen unter dem angegebenen Cut Off (Median + 2 SD).
GM-CSF-Auto-AK= Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender-Faktor-Autoantikörper

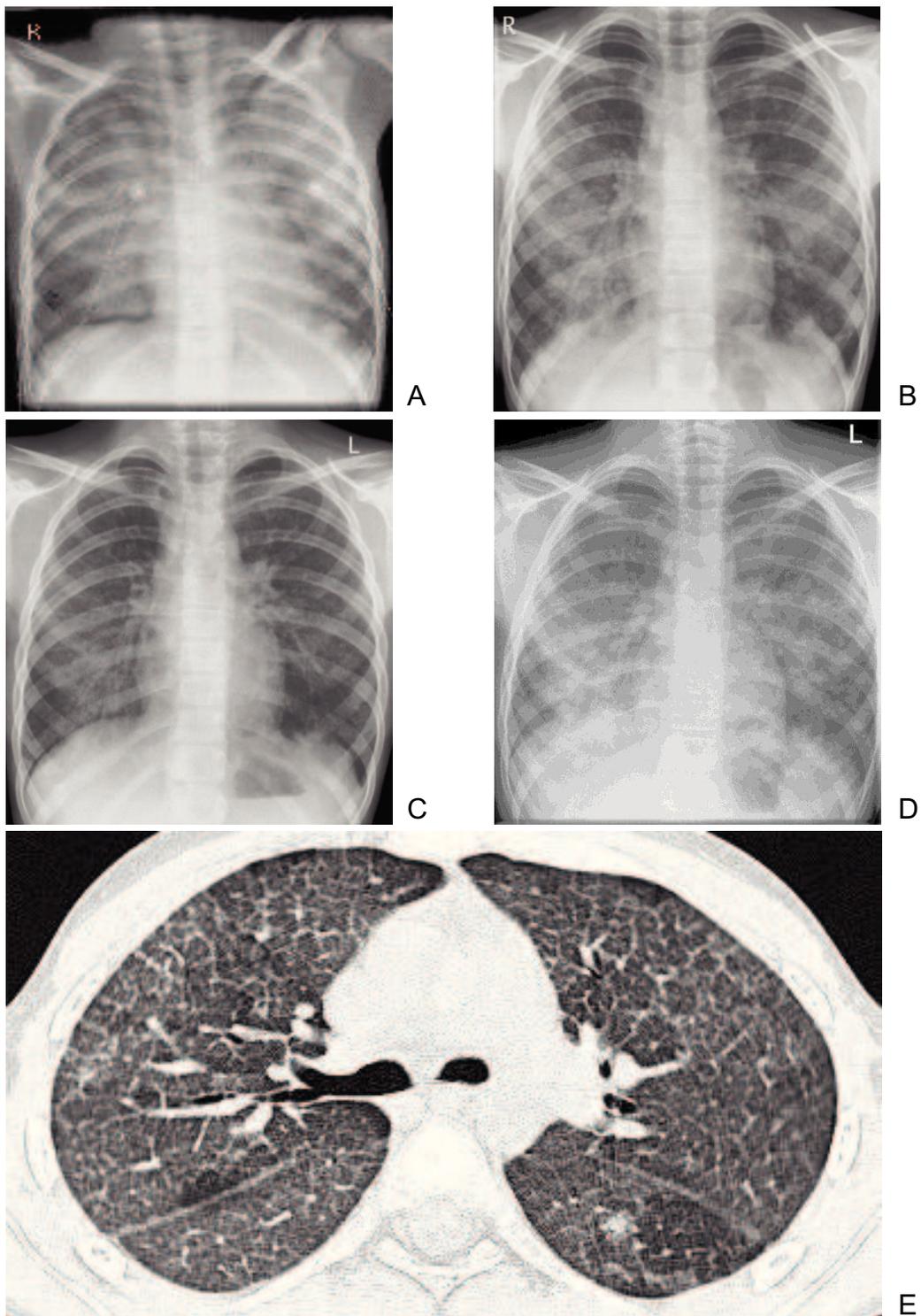


Abb. 4.9: A–D: Röntgen-Thoraces der Patientin 3. **A:** vor Beginn der Massiv-BALs, 1 Monat nach Diagnosestellung mit 9 Jahren. **B:** 1 Jahr nach Diagnosestellung. **C:** 1 ½ Jahre nach Diagnosestellung. **D:** 2 Jahre nach Diagnosestellung. **E:** CT-Thorax der Patientin 3, 2 Monate nach Diagnosestellung.

4.1.1.4 Patient 4- PAP im Rahmen einer Niemann-Pick TypC2-Erkrankung

In Abbildung 4.10 ist der klinische Verlauf einer aus Mexiko stammenden Patientin mit sekundärer pulmonalen Alveolarproteinose dargestellt. Als Grunderkrankung wurde Niemann-Pick TypC2 diagnostiziert. Die Patientin verstarb im Alter von neun Monaten.

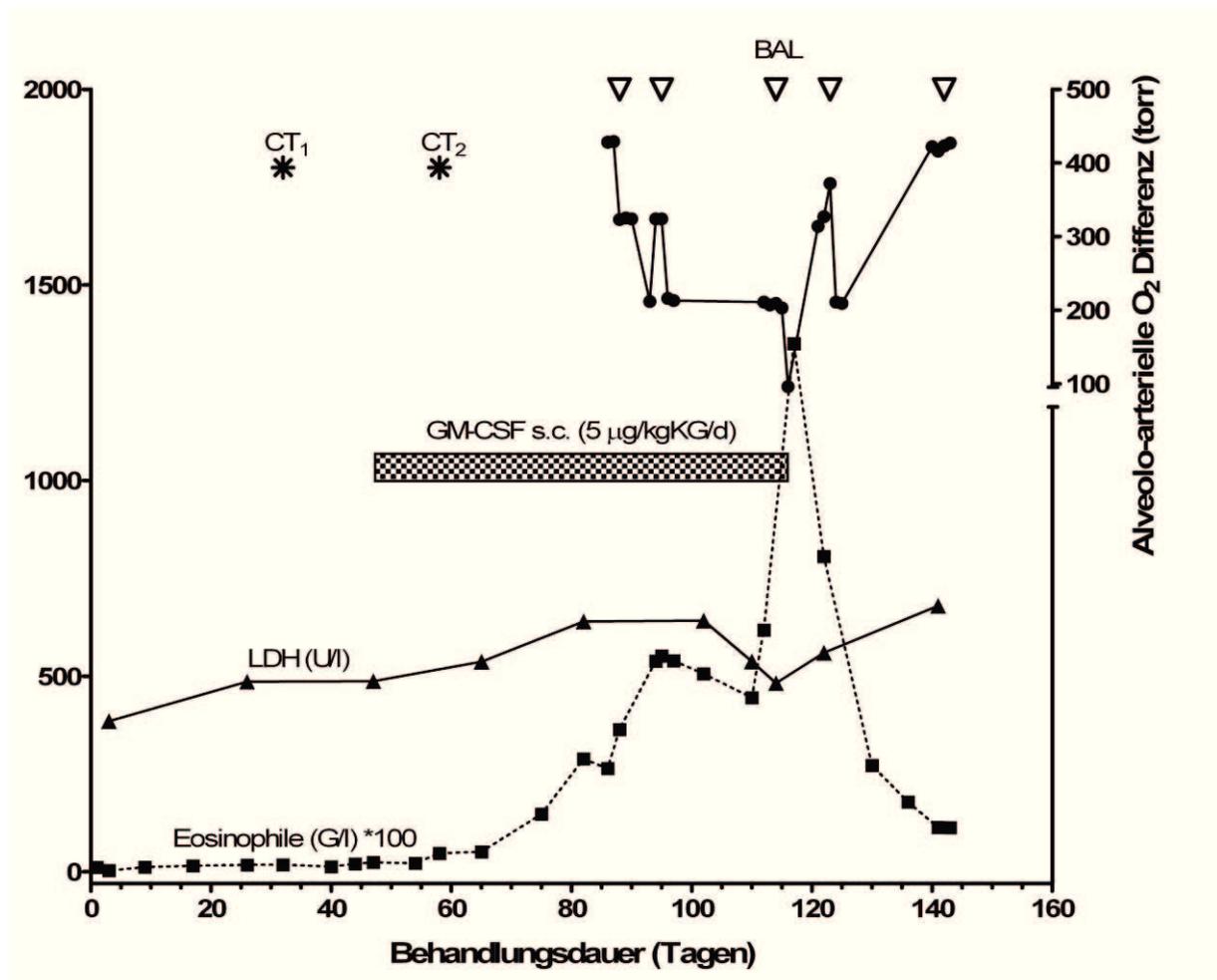


Abb. 4.10: Verlaufsdarstellung einer Patientin mit sekundärer pulmonalen Alveolarproteinose bei Niemann-Pick TypC2.

BAL = bronchoalveoläre Lavage, CT = Computertomographie, GM-CSF = Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender-Faktor, LDH = Lactatdehydrogenase

Schwangerschaft und Geburt

Geburt am Termin nach unauffälliger Schwangerschaft. Geburtsgewicht 3700g (75.Perzentile), Körpergröße 53cm (75.Perzentile), APGAR-Wert 8/9 (erste / zehnte Minute).

Gesunde, nicht konsanguine Eltern. Mutter 26 Jahre alt, Vater 25 Jahre alt. Die fünfjährige Schwester ist gesund.

Symptombeginn und Diagnose

Anamnese: Die ersten Symptome waren zunehmende Tachypnoe, Gedeihstörungen und unzureichende Nahrungsaufnahme seit dem zweiten Lebensmonat. Im vierten Monat Progression der Symptome mit Dyspnoe, distaler Zyanose, Fieber und nicht-produktivem Husten. Es folgte die stationäre Aufnahme.

Aufnahmestatus: Körpergröße 97cm (>97. Perzentile), Körpergewicht 5000g (3. Perzentile), reduzierter Ernährungszustand, Sauerstoffsättigung bei Raumluft 75%, Hypoxämie (P_{aO_2} 36,2 mmHg), Temperatur 37,7°C, interkostale Einziehungen, Trommelschlegelfinger, Fingerzyanose, auskultatorisch abgeschwächtes Atemgeräusch mit diffusen, feinen Rasselgeräuschen in den basalen Lungenabschnitten. Herz auskultatorisch unauffällig. Hepatosplenomegalie.

Labor: Hämoglobin zwischen 8,0 und 16,4g/dl, Leukozyten zwischen 3,3 und 75G/l (der Anstieg erfolgte nach GM-CSF-Gabe). Lactatdehydrogenaseanstieg von 345U/l bei Aufnahme auf 682U/l während des Aufenthalts. Blutfette: Triglyceride 380mg/dl (normal <150mg/dl), Gesamtcholesterin 169mg/dl (normal <170mg/dl), LDL 115mg/dl (normal <110 mg/dl), HDL 31mg/dl (normal >35 mg/dl). Normale Leberwerte.

Negative Tests auf CMV, RSV, Parainfluenzae A und B, Adenovirus, HIV. Normale Blut und Urinwerte für Aminosäuren, organische Säuren, Laktat, Pyruvat, Glykosaminoglykane und Oligosaccharide. Unauffälliger Schweißtest.

Bildgebung: Röntgen-Thorax-Untersuchung (Abbildung 4.11, S. 63): bilateral diffuse, mikronoduläre Infiltrate in den basalen Abschnitten der linken sowie in oberen Abschnitten der rechten Lunge. HR CT der Lunge: bilateral ausgedehnte alveoläre Verdichtungen.

Bronchoalveoläre Lavage: milchig trübe Lavageflüssigkeit; amorphes, eosinophiles, PAS-positives Material; vergrößerte schaumige Vakuolen enthaltende Makrophagen.

Offene Lungen-, Leber und Milzbiopsie: kombiniertes Bild aus pulmonaler Alveolarproteinose und Niemann-Pick-Krankheit.

Die Lungenbiopsie zeigte mit granulärem, eosinophilem, PAS-positivem Material gefüllte Alveolarräume sowie intraalveoläre vakuolisierte Pneumozyten und Makrophagen. In der Leber konnten vakuolisierte Kupfferzellen in den Hepatozyten nachge-

wiesen werden. In den Milzsinusoiden fanden sich zahlreiche große klare Zellen mit intrazytoplasmatischen Vakuolen.

In der Elektronenmikroskopie zeigten sich Lipideinschlüsse in den Niemann-Pick-Zellen der Leber und Milz.

Die Sphingomyelinaseaktivität der Leukozyten im peripheren Blut war normwertig.

Weiterer Krankheitsverlauf

Wegen der sich verschlechternden respiratorischen Situation wurden im Verlauf mehrere bronchoalveoläre Lavagen durchgeführt. Dafür wurde vor der ersten Lavage ein Tracheostoma angelegt. Radiologisch zeigten sich allerdings weiterhin die beschriebenen Infiltrate. Auch die Blutgaswerte besserten sich durch die Lavagen nicht (mittlerer P_{aO_2} 45,8 mmHG \pm 9,6). Die Patientin musste die letzten zwei Lebensmonate beatmet und parenteral ernährt werden. Im Anschluss an die fünfte bronchoalveoläre Lavage entwickelte sich ein Pneumothorax, der Zustand der Patientin verschlechterte sich weiter und sie verstarb am darauf folgenden Tag. Eine Autopsie wurde von den Eltern abgelehnt.

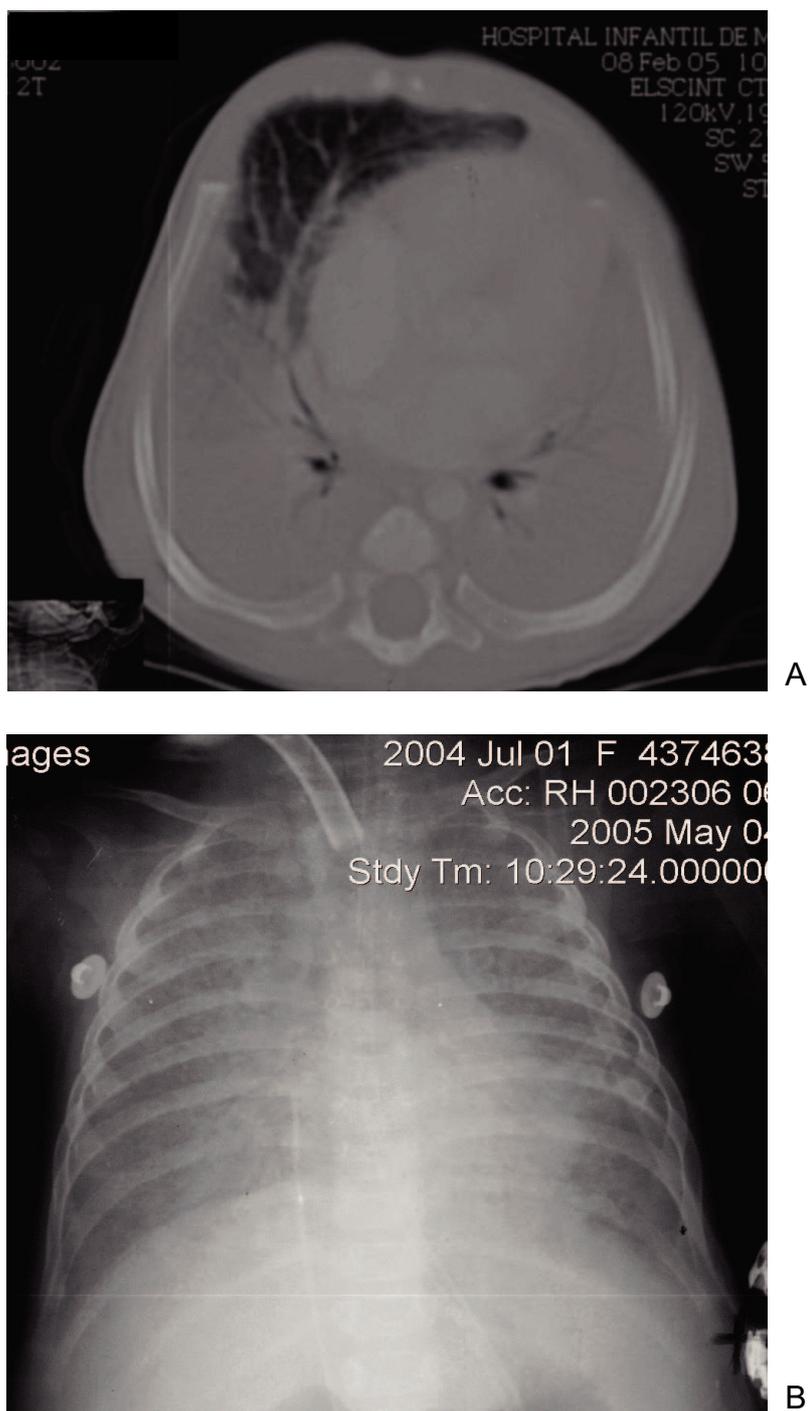


Abb. 4.11: CT-Thorax und Röntgen-Thorax der Patientin 4. **A:** CT-Thorax 1 Monat nach Diagnosestellung. **B:** Thorax 4 Monate nach Diagnosestellung.

4.1.2 Effizienz unterschiedlicher Therapiemöglichkeiten bei PAP-Kindern

4.1.2.1 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Die bronchoalveoläre Lavage ist die am meisten verbreitete und weiterhin effektivste Form der Therapie der pulmonalen Alveolarproteinose, neben der Behandlung der Grunderkrankung bei sekundären Formen⁴⁷.

Die Effizienz dieses Verfahrens soll im Folgenden an den beschriebenen Patienten dargestellt werden.

4.1.2.1.1 Beurteilung der Effektivität der BAL anhand des Sauerstoffbedarfs

Abbildung 4.12 (S.66) gibt einen Überblick über die Veränderung des Sauerstoffbedarfs im Rahmen der Lavage.

Zum Vergleich wurden jeweils die Sauerstoffwerte am Vortag sowie einen Tag nach Lavage verwendet. Zweizeitige Lavagen wurden als eine Lavage betrachtet.

Insgesamt wurde der Sauerstoffbedarf im Rahmen von 78 Lavagen bei den Patienten 1 bis 3 untersucht.

Bei 24 untersuchten Lavagen des Patienten 1 zeigte sich in 15 Fällen (62,5%) ein Rückgang des Sauerstoffbedarfs nach der Lavage, in acht Fällen (33,3%) zeigte sich ein Anstieg, in einem Fall (4,2%) ein unveränderter Sauerstoffbedarf. In der Gruppe der erfolgreichen Behandlungen (definiert als Rückgang des Sauerstoffbedarfs nach Lavage) ist der Sauerstoffbedarf im Mittel um 1,7l/min von 4,1 auf 2,4l/min zurückgegangen.

Bei Patientin 2 wurden insgesamt 49 Lavagen analysiert. In 40 Fällen (81,6%) zeigte sich ein Rückgang, in fünf Fällen (10,2%) ein Anstieg sowie in vier Fällen (8,2%) ein unveränderter Sauerstoffbedarf. Im Rahmen der erfolgreichen Interventionen ging der Sauerstoffbedarf im Mittel um 2,8l/min von 6,4 auf 3,6l/min zurück.

Bei Patientin 3 bestand lediglich bei den ersten beiden von insgesamt fünf Lavagen ein initialer Sauerstoffbedarf. Nach der ersten Intervention sank der Sauerstoffbedarf von 7,0 auf 2,5l/min. Eine weitere Lavage 23 Tage später verringerte den anfänglichen Sauerstoffbedarf von 1l/min auf 0l/min. Der einmalig beobachtete Anstieg des Sauerstoffbedarfs nach der Intervention ist auf die Lavage selbst zurückzuführen. Drei Tage nach Durchführung der Lavage bestand wie initial kein Sauerstoffbedarf mehr.

Als Gründe für einen erhöhten Sauerstoffbedarf nach Lavage ließ sich neben eines initial nach Lavage erhöhten Bedarfs das Auftreten von Infekten (fünf Fälle) eruieren. Die regelmäßige Durchführung einer BAL bei Patientin 2 ab dem elften Lebensjahr führte zu einer deutlichen Stabilisierung des Krankheitsverlaufs (siehe Abbildung 4.5B, S. 49). Die Abstände betragen minimal 25 und maximal 40 Tage.

4.1.2.1.2 Beurteilung anhand des Röntgenthorax

Abbildung 4.13 zeigt drei Röntgenthorax Bilderpaare der Patientin 3 jeweils vor und nach einer Ganzlungenlavage. Es lässt sich in allen Fällen eine deutliche Verbesserung des Befundes beobachten.

Die aufgeführten Ergebnisse zeigen bei den untersuchten Patienten einen positiven Effekt der bronchoalveolären Lavage auf die pulmonale Situation. Es kommt regelmäßig zu einem Rückgang des Sauerstoffbedarfs der Patienten nach BAL sowie zu einer deutlichen Besserung des Röntgenthoraxbefundes.

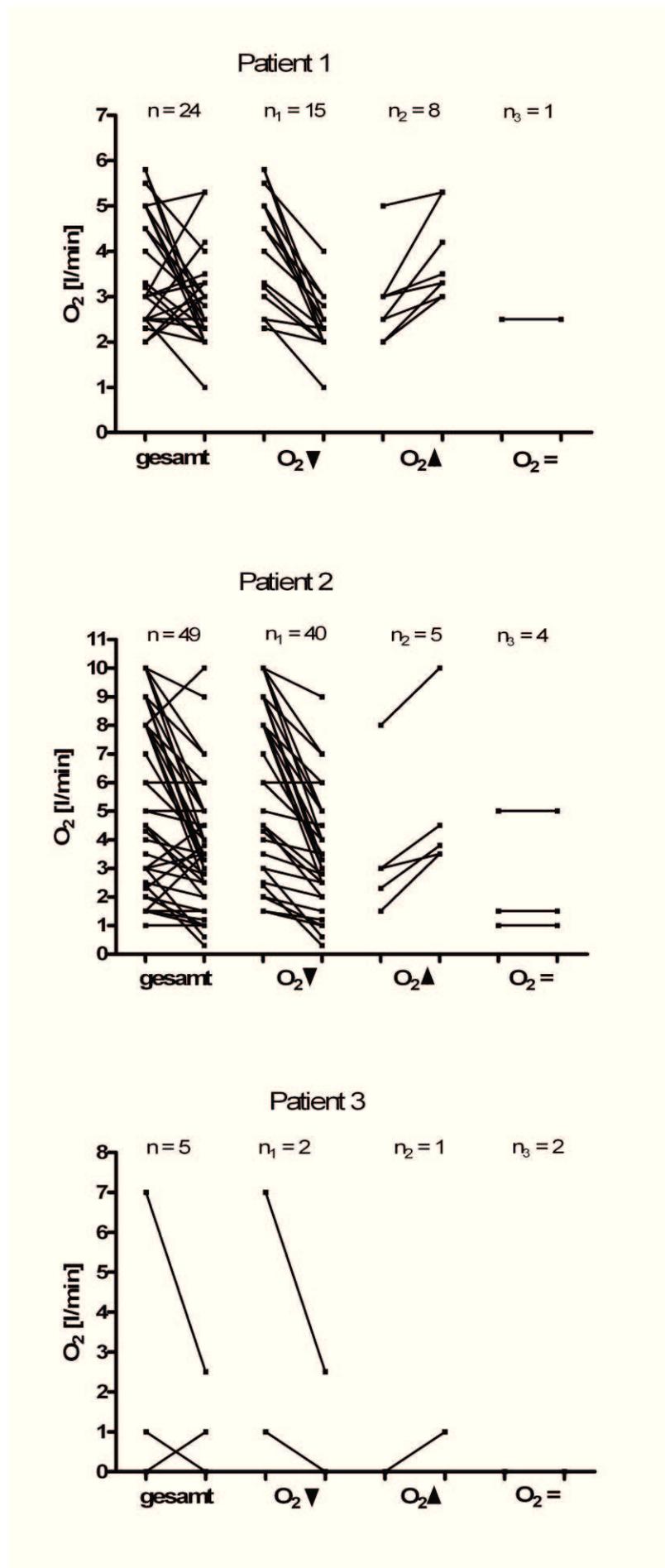


Abb. 4.12: Übersicht über die Entwicklung des Sauerstoffbedarfs vor und nach Durchführung einer bronchoalveolären Lavage bei den Patienten 1 bis 3.

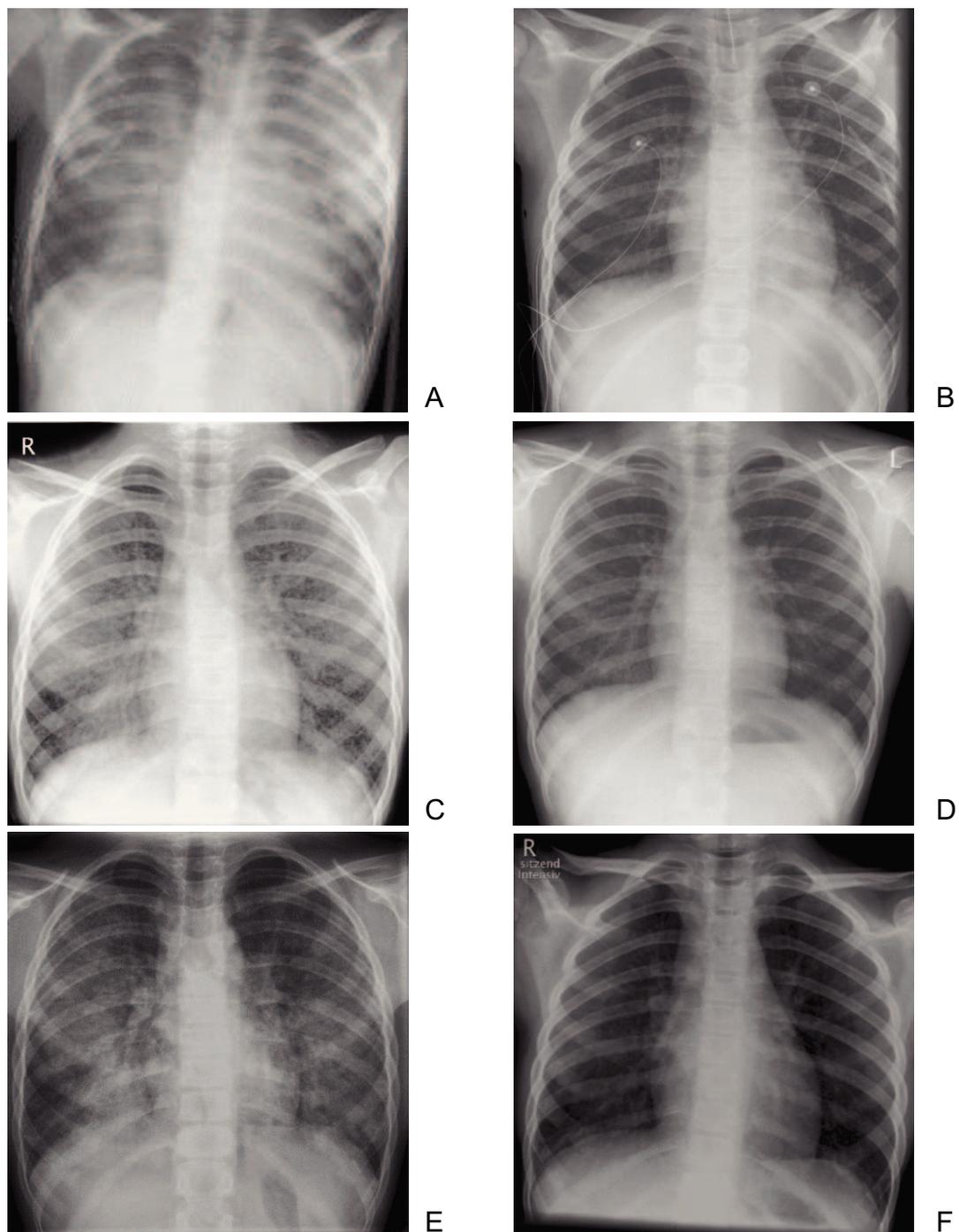


Abb. 4.13: Röntgen-Thoraces der Patientin 3. **A, B:** vor und nach erster Massiv-BAL. **C, D:** vor und nach zweiter Massiv-BAL. **E, F:** vor und nach dritter Massiv-BAL.

4.1.2.2 GM-CSF Therapie

Bei drei der unter 4.1.1 vorgestellten Kinder wurde ein Therapieversuch mit rekombinantem GM-CSF unternommen. Im Folgenden wird dieser Zeitraum der Patientin 2 detailliert dargestellt (siehe auch Abbildung 4.14B, S. 70).

4.1.2.2.1 Klinischer Verlauf bei Patientin 2

Als Reaktion auf die subkutane GM-CSF-Gabe kam es zunächst zu einem Anstieg der Eosinophilen im peripheren Blut. Nach fünf Monaten subkutaner Gabe erfolgte die Umstellung auf eine inhalative Applikation. Es zeigten sich daraufhin im Verlauf deutlich niedrigere Prozentsätze an Eosinophilen im peripheren Blut.

Der Sauerstoffbedarf der Patientin sank unter dem Therapieversuch mit dem Zytokin nicht dauerhaft (Abbildung 4.14C, S. 71). Eine zwischenzeitliche Stabilisierung auf niedrigem Niveau (0,5l/min) konnte längerfristig nicht gehalten werden.

Auch der zunächst beobachtete Rückgang des CEA Spiegels stieg im Verlauf wieder an. An einer Kohorte von 223 adulten Patienten mit autoimmuner PAP in Japan wurde gezeigt, dass CEA mit der Schwere der Erkrankung korreliert. Gleiches gilt für LDH, allerdings ist die Korrelation hier schwächer²⁷.

Die LDH- und CEA-Werte während der GM-CSF-Therapie-Periode zeigten keine signifikante Veränderung im Vergleich zu den Zeiträumen vor und nach der Therapie (Abbildung 4.14A, S. 69).

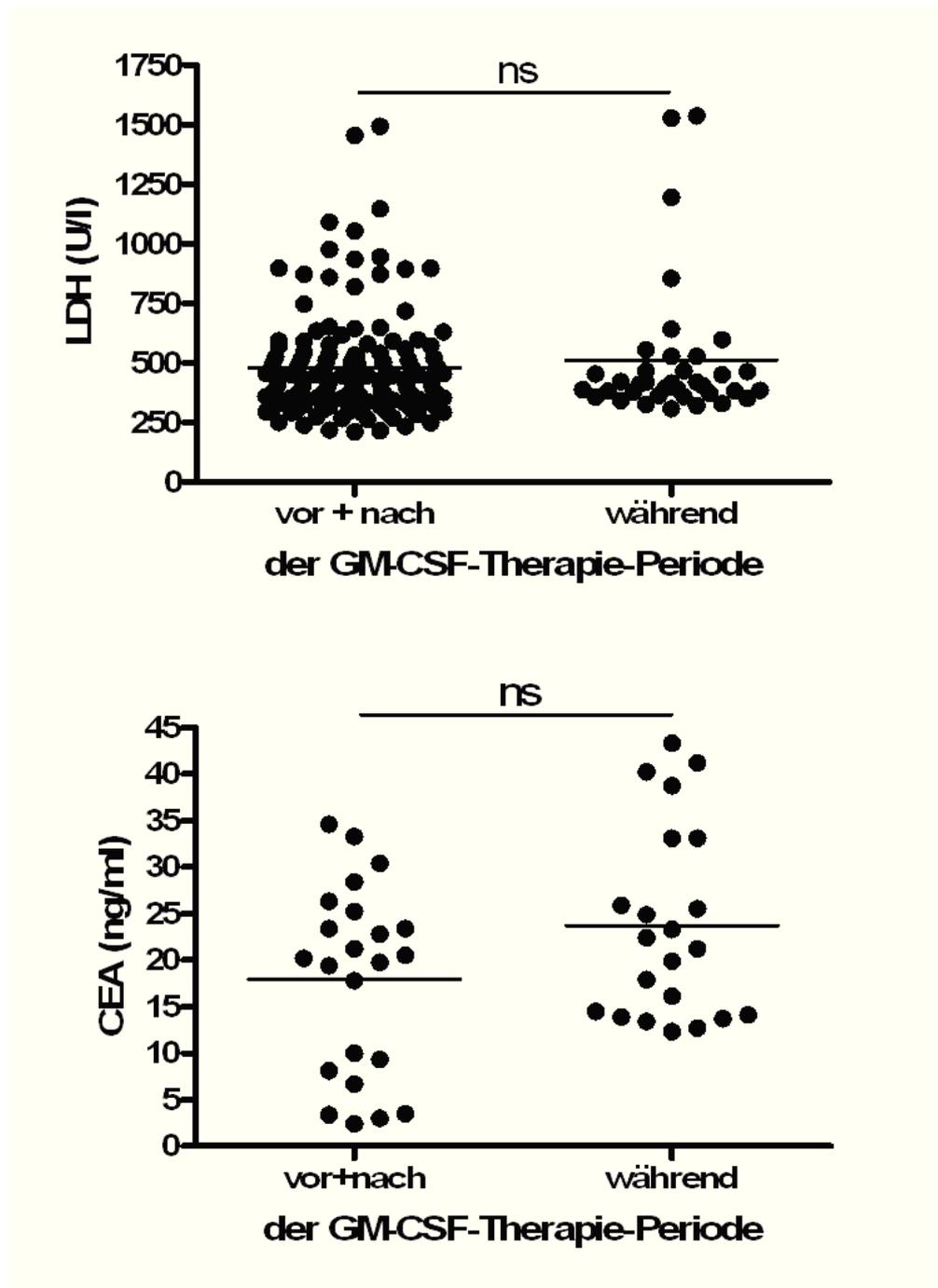


Abb. 4.14A: LDH- und CEA-Werte „vor + nach“ sowie „während“ der GM-CSF-Therapie-Periode. Auswertung mittels Mann-Whitney-Test. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. ns = nicht signifikant.

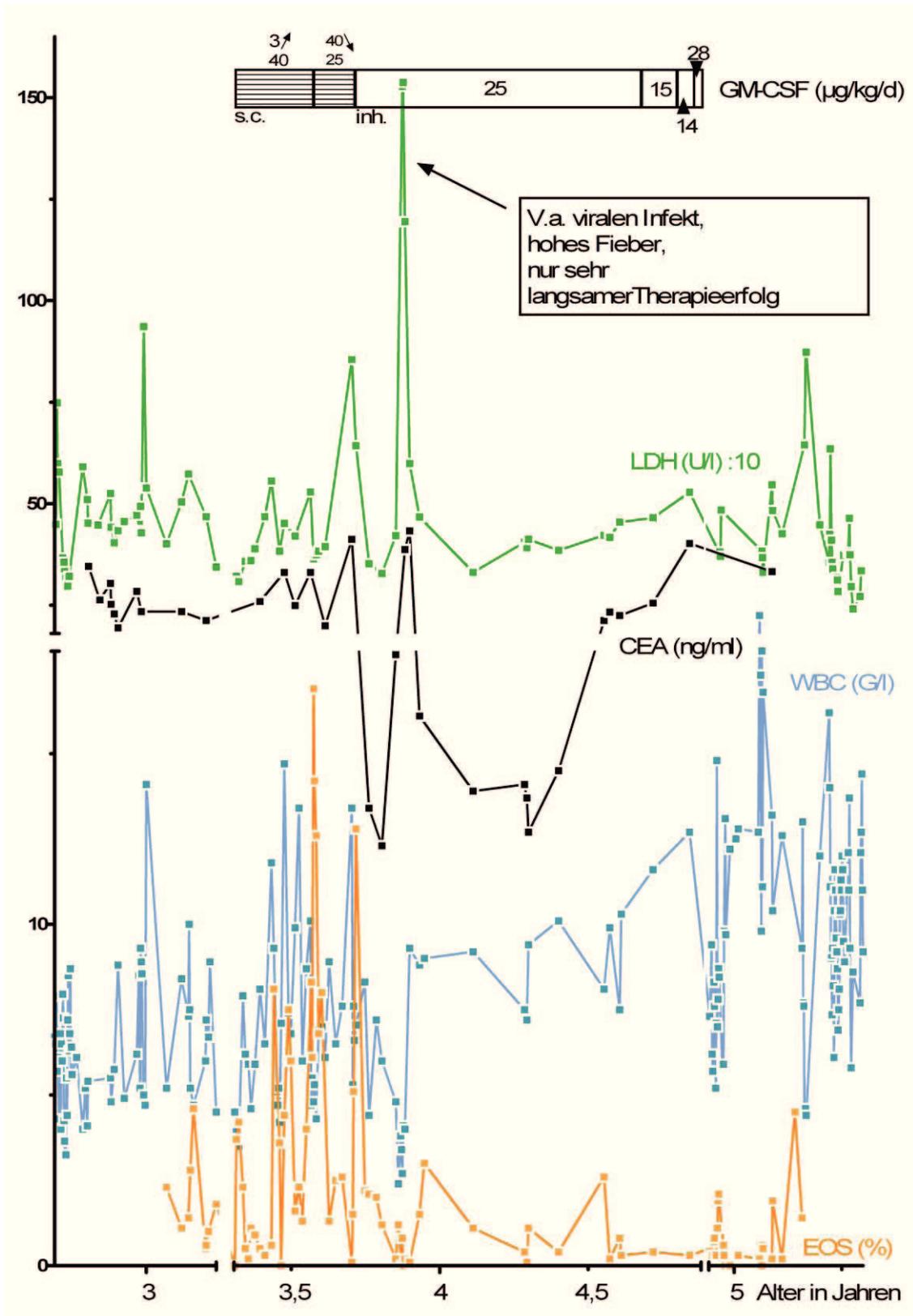


Abb. 4.14B: Verlauf klinischer Parameter der Patientin 2 zur Zeit des GM-CSF-Therapieversuchs. CEA = carcino-embryonales-Antigen, EOS = Eosinophile, GM-CSF = Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender-Faktor, LDH = Lactatdehydrogenase, WBC = weiße Blutkörperchen.

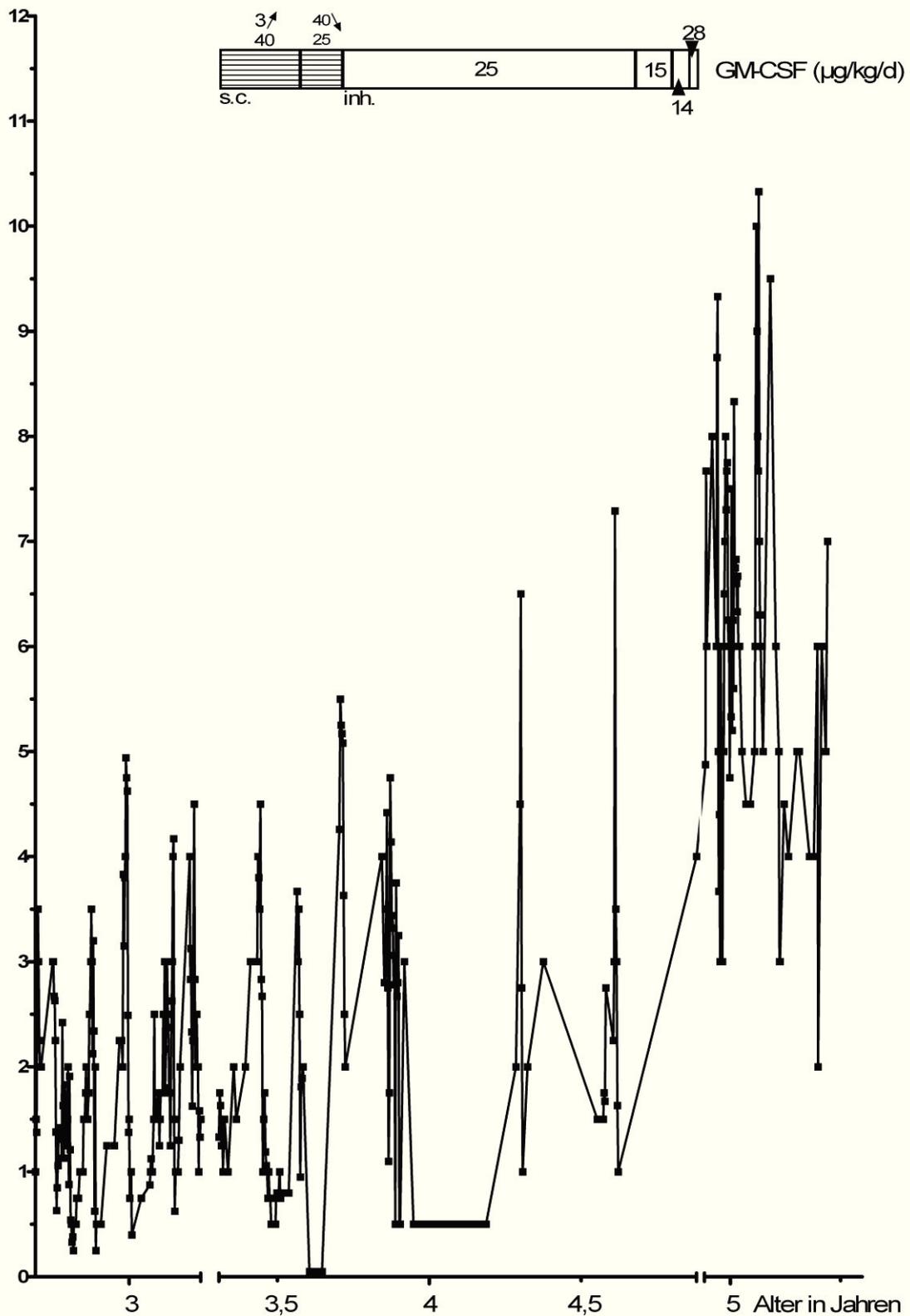


Abb. 4.14C: Verlauf klinischer Parameter der Patientin 2 zur Zeit des GM-CSF-Therapieversuchs. O₂-Bedarf (l/min).

4.1.2.2.2 Auswertung der bronchoalveolären Lavagen bei Patientin 2

Um zu beurteilen, ob sich ein positiver Effekt der GM-CSF-Gabe auch in den bronchoalveolären Lavagen zeigt, wurde neben dem Abstand der Lavagen die dabei entfernte Proteinmenge bestimmt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Graph Pad Prism 4. Bei der Betrachtung der BAL-Abstände wurden die an aufeinander folgenden Tagen durchgeführten Halblungenlavagen verschiedener Lungenflügel als eine Einheit definiert. Der Abstand errechnet sich aus den Tagen zwischen der zweiten Lavage der ersten Einheit und der ersten Lavage der darauf folgenden Einheit. Es standen jeweils sieben Daten vor und während sowie 39 Daten nach der Therapieperiode zur Auswertung zur Verfügung. Hinsichtlich der Effizienz der GM-CSF-Therapie sind die Hypothesen

- „Während der GM-CSF-Therapie verlängert sich der Abstand zwischen zwei Lavagen“
- „Während der GM-CSF-Therapie sinkt die Menge an durch die Lavage ausgewaschenem Protein“ und
- „Die Proteinmenge pro Halblungenlavage pro Tag des Lavageintervalls ist während des GM-CSF-Therapiezeitraums geringer“ untersucht worden.

Dazu wurde ein einseitiger Mann-Whitney-Test mit 95%igem Konfidenzintervall verwendet, da die Überprüfung auf das Vorliegen einer Normalverteilung nicht positiv ausfiel.

Abbildung 4.15 (S. 74/75) zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen.

Bezüglich der Lavageabstände zeigte sich während der GM-CSF-Therapie im Mittel ein höherer Lavageabstand als vor bzw. nach der Therapieperiode (Mittelwert 68,57d versus 32,68d (vorher) und 51,26d (nachher)). Der Vergleich „vor“ mit „während“ ergab ein signifikantes P. Fasst man allerdings die Vergleichszeiträume „vor“ und „nach“ zusammen, ist der Unterschied nicht signifikant.

Die Proteinmenge pro Halblungenlavage zeigte unter zunächst getrennter Betrachtung der Vergleichszeiträume erhöhte Werte im Vergleich zum Zeitraum „vorher“ und niedrigere Werte im Vergleich zum Zeitraum „nachher“ (Mittelwerte: 2803mg (vorher), 3325mg (während) und 5563mg (nachher)). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Fasst man die Vergleichszeiträume wieder zusammen, zeigt sich eine erniedrigte Proteinmenge während der GM-CSF-Therapie (Mittelwerte: 3986mg (vorher+nachher), 3325mg (während)).

Hinsichtlich der Proteinmenge pro Halblungenlavage pro Tag des Lavageintervalls zeigte sich während der Therapie ein erniedrigter Wert (Mittelwerte: 45,04mg/d (während), 51,47mg/d (vorher) bzw. 284.9mg (nachher)). Bei Zusammenfassung der Vergleichszeiträume ergab sich ebenfalls eine nicht signifikante Reduktion der Proteinmenge (Mittelwerte: 168,2mg/d (vorher+nachher), 45,04mg/d (während)).

Zwei Werte fielen auf: eine mit 7439,81mg sehr hohe Proteinmenge bei einer Lavage und ein mit 737,01mg/d hoher Wert jeweils im Vergleichszeitraum „nachher“.

Bezüglich der hohen Proteinmenge ist anzumerken, dass die Patientin sich zu diesem Zeitpunkt in einem schlechten Allgemeinzustand (Sauerstoffbedarf 8l/min) präsentierte und die letzte Lavage mit 103 Tagen überdurchschnittlich lange zurück lag. Aufgrund des schlechten Allgemeinzustandes wurden innerhalb von sechs Tagen zwei Ganzlungenlavagen durchgeführt, so dass die Proteinmenge pro Tag sehr hoch war.

Zu berücksichtigen ist außerdem, dass bei diesen Lavagen zum Abschluss jeweils 100ml Perflurcarbon instilliert und anschließend wieder abgesaugt wurden, um ein besseres Auswaschen des Surfactantmaterials zu erreichen.

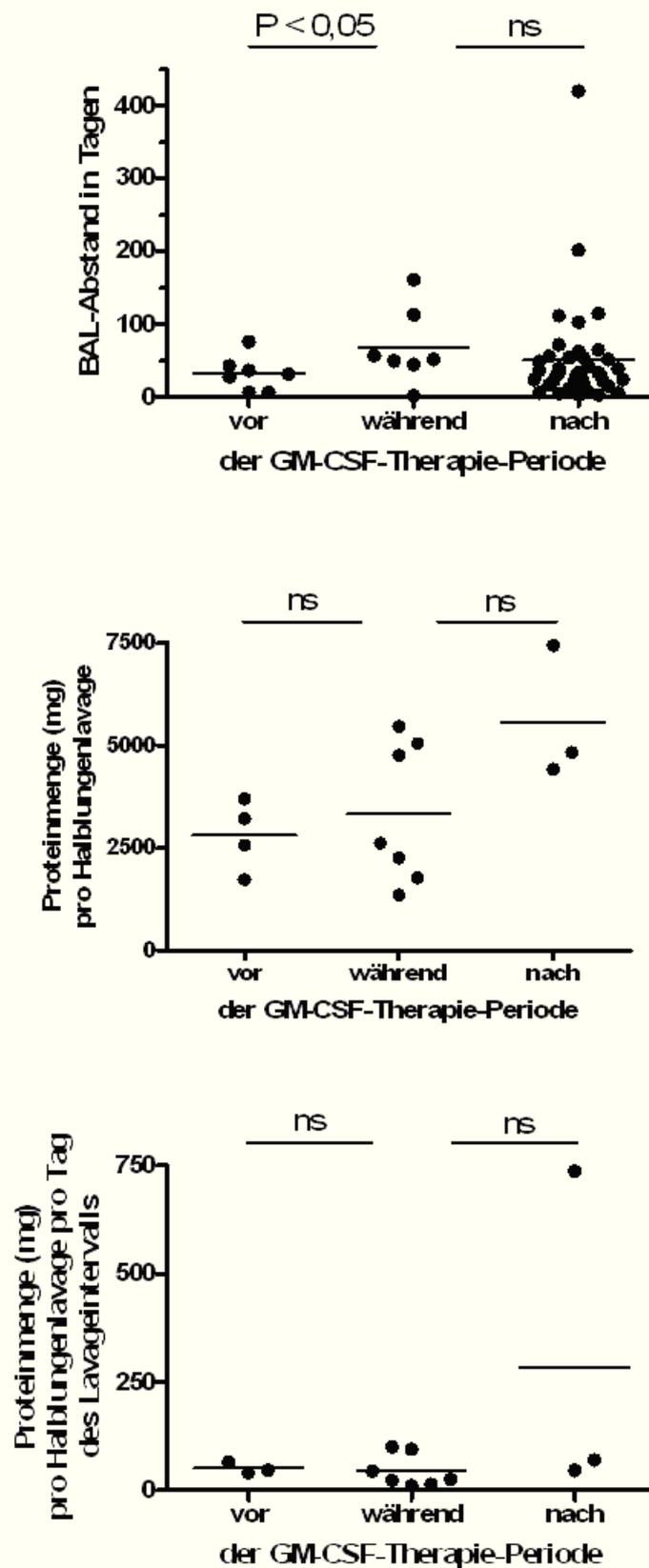


Abb. 4.15A: Abstand (d), Proteinmenge (mg), Proteinmenge/d „vor“, „während“ und „nach“ der GM-CSF-Therapie-Periode. Auswertung mittels Mann-Whitney-Test. Lediglich in Bezug auf den Abstand in Tagen zeigte sich „vor“ und „während“ Therapie ein signifikanter Unterschied ($P < 0,05$). ns = nicht signifikant

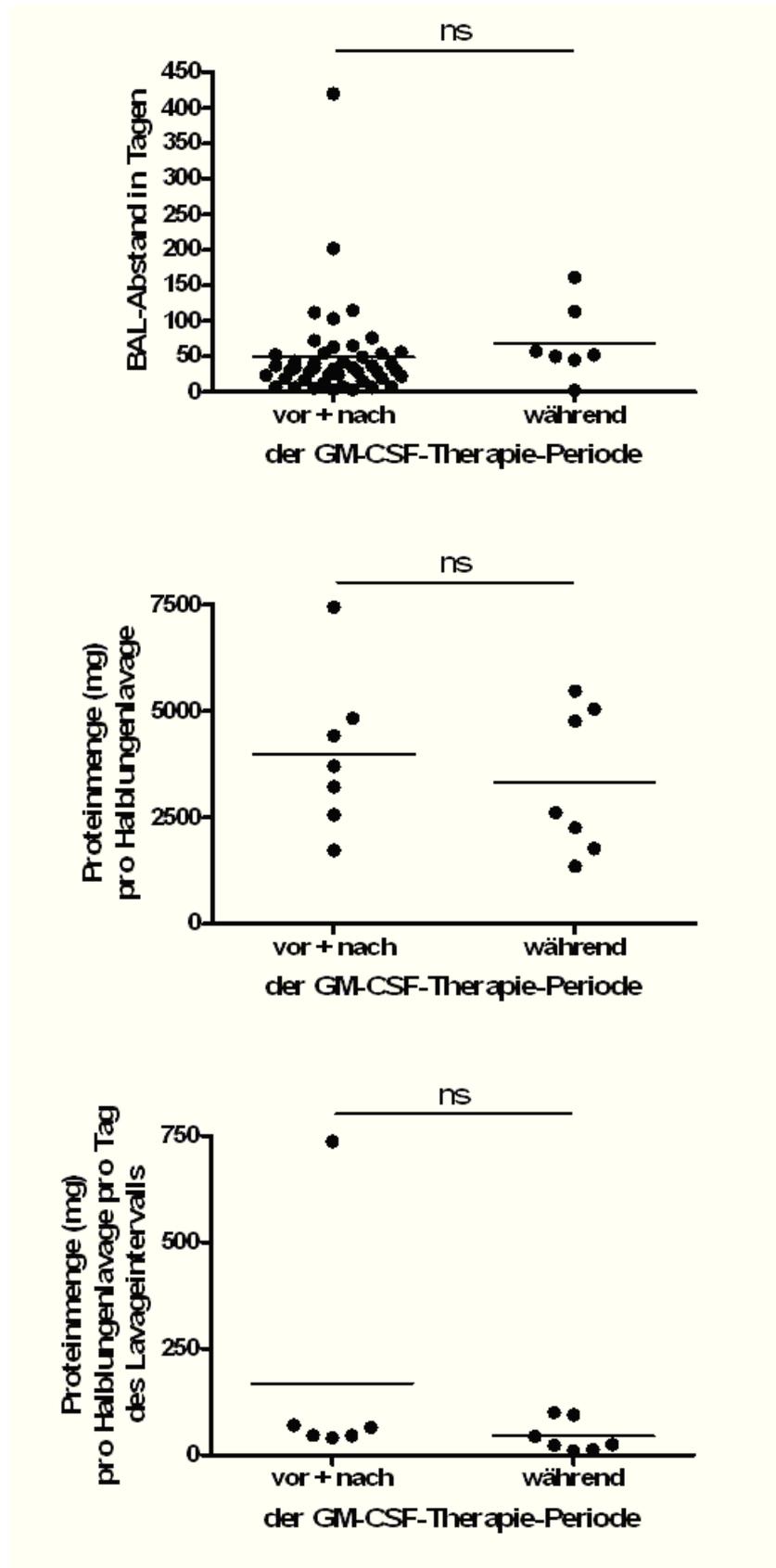


Abb. 4.15B: Abstand (d), Proteinmenge (mg), Proteinmenge/d „vor + nach“ sowie „während“ der GM-CSF-Therapie-Periode. Auswertung mittels Mann-Whitney-Test. Es zeigt sich auch hinsichtlich des Abstandes in Tagen kein signifikanter Unterschied. ns = nicht signifikant.

4.1.2.2.3 Klinischer Verlauf bei Patientin 4

Bei Patientin 4 wurde ebenfalls ein Therapieversuch mit GM-CSF durchgeführt (Abb. 4.10, S. 60). Auch bei dieser Patientin kam es reaktiv zu einem deutlichen Anstieg der Eosinophilen im Blut. Wie sich aus dem klinischen Verlauf ersehen lässt (siehe 4.1.1.4), kam es unter der Therapie zu einer weiteren Verschlechterung der respiratorischen Situation. Auch die Durchführung mehrerer bronchoalveolärer Lavagen führte nicht zu einer sichtbaren Verbesserung des Zustandes.

Zusammengefasst geben die bei der Patientin erhobenen Daten keinen Hinweis darauf, dass die GM-CSF-Therapie einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf hatte.

In Zusammenschau musste festgestellt werden, dass durch die GM-CSF-Therapie bei den Patienten sowohl klinisch als auch bei näherer Betrachtung der in diesem Zeitraum durchgeführten Lavagen bei Patientin 2 keine dauerhaft messbaren Verbesserungen erreicht werden konnten.

4.1.2.3 Glucocorticoidstoßtherapie

Sowohl Patient 1 als auch Patientin 2 erhielten im Verlauf der Erkrankung einen Therapieversuch mit Glucocorticoidstößen (Methylprednisolon 300mg/m² über jeweils 3d). Im Folgenden soll dieser Therapieabschnitt des Patienten 1 genauer analysiert werden.

4.1.2.3.1 Therapieeffekt bei Patient 1

Insgesamt fanden 16 dreitägige Methylprednisolonstoßtherapien statt. Die erste Stoßtherapie wurde nicht in Kombination mit einer bronchoalveolären Lavage durchgeführt. Der Sauerstoffbedarf des Patienten sank nach Therapie von 3,0 l/min auf 1,75 l/min ab. Die 15 weiteren Therapien waren jeweils mit einer bronchoalveolären Lavage kombiniert, was eine alleinige Beurteilung des Therapieerfolges hinsichtlich der Methylprednisolonstoßtherapie nicht zulässt. Da es sich um elektive Lavagen handelte, gibt der Abstand der einzelnen Lavagen keine zusätzlichen Informationen. In Abbildung 4.16 ist die Proteinmenge pro Halblungenlavage pro Tag des Lavageintervalls getrennt nach rechtem und linkem Lungenflügel aufgetragen.

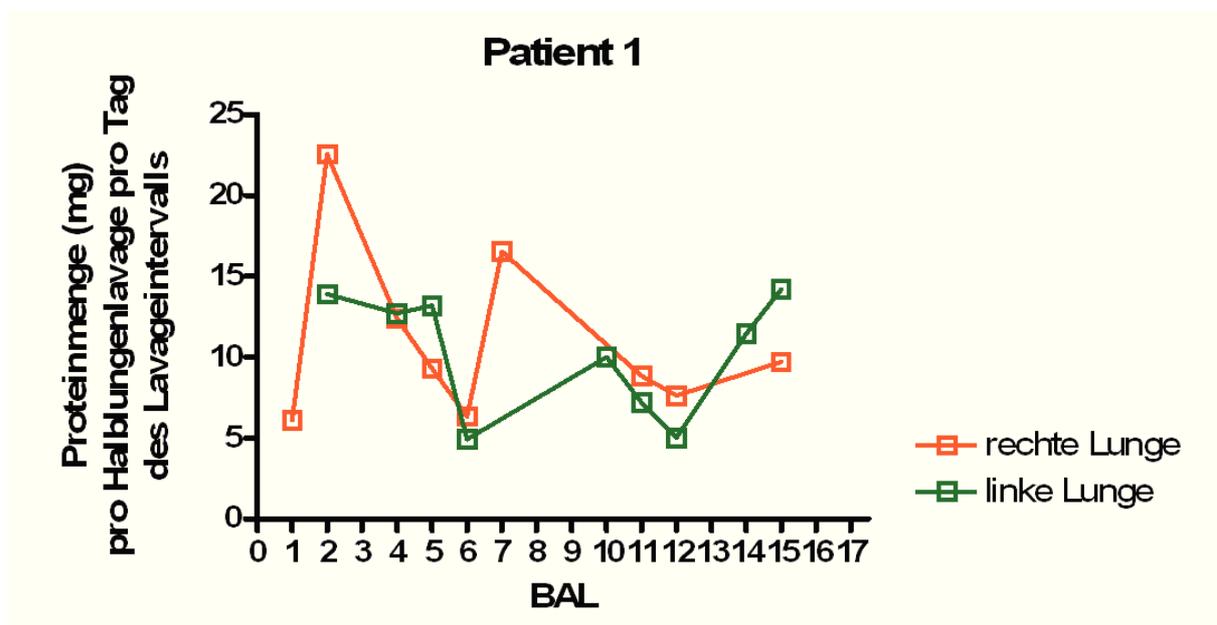


Abb. 4.16: Verlauf der lavagierten Proteinmenge pro Halblunge pro Tag des Lavageintervalls während der Methylprednisolonstoßtherapie. X-Achse: BAL während dieses Zeitraums.

Es zeigt sich eine relative stark schwankende Proteinmenge, in der rechten Lunge zwischen 6,11 und 22,56mg/d (SD 5,39), in der linken Lunge zwischen 4,93 und

14,13mg/d (SD 3,71). Außerdem lässt sich gegen Ende des Therapiezeitraums eine tendenziell ansteigende Proteinmenge registrieren.

Hinsichtlich der Beurteilung der Veränderungen der Lunge in der Computertomographie zeigt sich zehn Monate nach der letzten Methylprednisolonstoßtherapie eine nun ausgeprägte Zystenbildung der Lunge, welche als Langzeitfolge eines interstitiellen Lungenprozesses anzusehen ist. In der Voruntersuchung fielen homogene Verdichtungen des Lungengewebes sowie disseminierte Bronchiektasen auf.

Die erhobenen Daten bei Patient 1 geben keinen Anhalt dafür, dass die Durchführung der Methylprednisolonstoßtherapien den Verlauf der Erkrankung generell positiv beeinflusst hat. Zwar hat sich eine erste Gabe positiv auf den Sauerstoffbedarf ausgewirkt, allerdings zeigen die Computertomographien im Verlauf fortschreitende Lungenparenchymveränderungen.

4.2 Darstellung und Isolation einer aberranten Pro-SP-C-Proteinbande aus einer BALF des Patienten 1

Bei diesem Kind mit der SFTPC Mutation I73T wurde eine normalerweise nicht vorkommende SP-C-Proform gefunden. Ziel war es dieses aberrante Protein zu isolieren, zu charakterisieren und so Rückschlüsse auf die durch die Mutation veränderte Prozessierung von SP-C zu ziehen. Dazu wurden verschiedene biochemische Ansätze durchgeführt.

Zunächst eine schematische Übersicht über Methoden, Ziele und Ergebnisse:

Schritt	Ziel	Abschnitt	Ergebnis
1. Schritt	Auswahl geeigneter Antikörper	4.2.1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Erfolgreich
2. Schritt	Verteilung in Phasen	4.2.2	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Lokalisation des Pro-SP-C in saurer Mittelphase ▪ Lokalisation des Pro-SP-B in saurer sowie neutraler Mittelphase. ▪ Die größte Proteinmenge fand sich in der neutralen Mittelphase
3. Schritt	Verteilung in LA / SA	4.2.3	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nachweis der Proformen sowohl in large- als auch small aggregates ▪ Größere Proteinmenge in small aggregates
4. Schritt	Löslichkeit	4.2.4	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Unlösliches Pellet des Lösungsmittels 1 (Methanol : Wasser (1:1)) sowie ▪ Überstand des Lösungsmittels 3 (20mM Phosphatpuffer + 1% SDS) zeigten die stärksten Signale
5. Schritt	Isolierung mittels Chromatographie und Gelfiltration	4.2.5	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kationenaustauschchromatographie: kein Nachweis der Proformen ▪ Anionenaustauschchromatographie: kein Nachweis der Proformen ▪ Gelfiltration: keine reproduzierbaren Proteinbanden
6. Schritt	Isolierung mittels HPLC	4.2.6	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dezentere Pro-SP-C-Bande mit Säule 15 RPC ST 4.6/100 ▪ Reproduzierbare Pro-SP-C-Bande in der „Zwischenfraktion 7-8“ mit Säule μ RPC C2/C18, kein Nachweis in den erhaltenen Peaks

Schritt	Ziel	Abschnitt	Ergebnis
7. Schritt	Isolierung mittels 2-D-Gelelektrophorese	4.2.7	<ul style="list-style-type: none"> ▪ pH 3,0-10,0: anodennaher Protein-spot bei 17 kD, auslöschar durch Inkubation mit AK + Peptid ▪ pH 3,5-6,0: keine isolierten Spots, vielmehr 17 kD Bande über gesamten pH-Bereich ▪ pH 4,0-7,0: keine isolierten Spots
8. Schritt	Immuno-präzipitation	4.2.8	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Keine Anreicherung des Pro-SP-C gelungen
9. Schritt	Massenspektrometrie	4.2.9	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Partielle Identifizierung der Sequenzen der Proformen

Tab. 4.2: Gliederungsübersicht

4.2.1 Auswahl geeigneter Antikörper gegen Pro-SP-C und Pro-SP-B

4.2.1.1 Pro-SP-C

Es wurden verschiedene Antikörper gegen die Proform des SP-C mittels 1-D-Gelelektrophorese und Westernblotanalyse (siehe 3.8.5) untersucht.

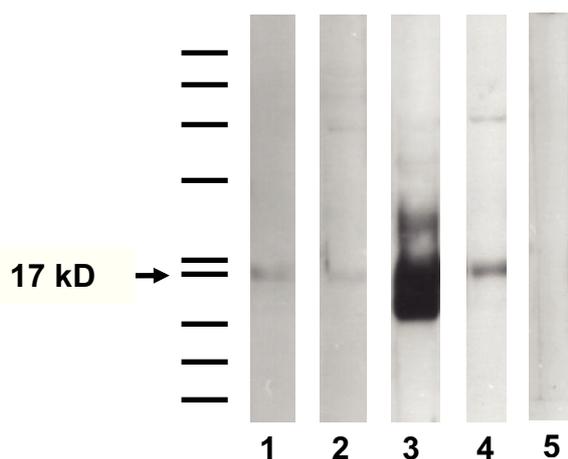


Abb. 4.17: 1-D-Gelelektrophorese einer BALF des Patienten 1. Der Pfeil zeigt eine Bande im 17kD Bereich der Proform des SP-C. Details siehe Text.

Von den getesteten Antikörpern zeigten N proSP-C (10-23) [1], N ProC (2-9) [2], hCTERM (162-175) [3] und proSP-C (Whitsett 68514) [4] eine Bande bei 17kD. Die

Bande durch N ProC (2-9) war allerdings sehr schwach. Lediglich hc ProSP-C (59-72) [5] ergab keine Bande im gesuchten Bereich.

Genauere Angaben zu den verwendeten Antikörpern finden sich unter 3.2.3 Antikörper.

4.2.1.2 Pro-SP-B

Zur Abgrenzung Pro-SP-B und Pro-SP-C wurden auch gegen die Proform des SP-B Antikörper-Tests durchgeführt. Es wurden CTermB [1], Chemicon (AB 3430) [2], Chemicon (AB 3432, C-102) [3], NX (=Hawgood N-terminal gegen Pro-SP-B) [4] und RS (=Hawgood C-terminal gegen Pro-SP-B) [5] verwendet.

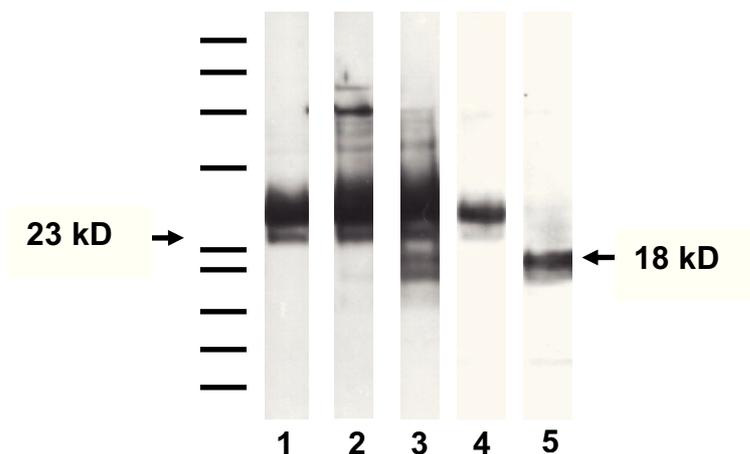


Abb. 4.18: 1-D-Gelelektrophorese einer BALF des Patienten 1. Die Pfeile zeigen Banden bei 18 bzw. 23 kD, dem Größenbereich der SP-B Proform.

Alle getesteten Antikörper bis auf RS (=Hawgood C-terminal gegen Pro-SP-B) [5] ergaben eine Bande im 23 kD Bereich. RS detektierte eine Bande bei 18 kD.

Da CTermB diese 18 kD Bande nicht zeigte wurde gefolgert, dass RS eine bereits am C-Terminus modifizierte Proform von SP-B detektiert, bei der die Bindungsstelle des Antikörpers CTermB bereits abgetrennt ist.

4.2.2 Verteilung von Pro-SP-C, Pro-SP-B und SP-B in der Unter-, Mittel- und Oberphase der Lipidextraktion im neutralen, sauren und basischen Milieu

Um eine differentielle Anreicherung von Pro-SP-C zu erreichen, wurde eine BALF des Patienten 1 entweder einer Lipidextraktion nach Bligh – Dyer – Folch^{9, 18} (siehe 3.6.1) oder nach Beers et al⁵ (siehe 3.6.2) unterzogen, bevor eine 1-D-Gelelektrophorese und Westernblotanalyse (siehe 3.8.5) durchgeführt wurde.

4.2.2.1 Pro-SP-C

Mit der Extraktion nach Bligh-Dyer-Folch^{9, 18} ergaben sich zunächst Banden bei 17 kD in der neutralen Mittelphase (MPn) und der sauren Unterphase (UPs), nicht jedoch in der sauren Mittelphase (MPs) bzw. der neutralen Unterphase (UPn). Die Bande in der sauren Unterphase ließ sich allerdings nicht reproduzieren (Abb. 4.19).

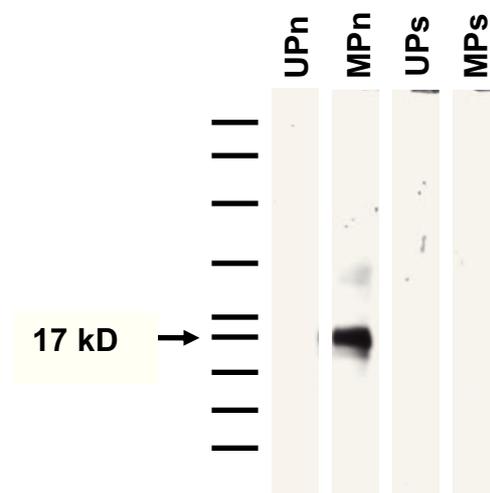


Abb. 4.19: 1-D-Gelelektrophorese und Westernblotanalyse mittels NProSP-C nach Bligh-Dyer-Folch Lipidextraktion. In der neutralen Mittelphase (MPn) zeigte sich eine Bande bei 17kD, nicht jedoch in den anderen Phasen.

Nach der Extraktion nach Beers⁵ wurde zunächst in einem Experiment eine 1-D-Gelelektrophorese mit den erhaltenen Phasen durchgeführt.

Es zeigte sich eine nicht reproduzierbare Bande in der sauren Unterphase. Weitere 17kD Banden fanden sich in der sauren und neutralen Mittelphase sowie in der neutralen Oberphase. Zudem wurde überprüft, ob die Zugabe von BSA bzw PBS-Puffer zur BALF vor der Extraktion an der Bandenlokalisierung und –stärke etwas änderte (Abb. 4.20).

Die Auswertung ergab kräftigere Banden in den angesäuerten MP. Die Mittelphasen, denen PBS zugesetzt wurde, zeigten sowohl im angesäuerten als auch im neutralen Milieu die schwächsten Banden. Die Bande in der neutralen OP (nicht dargestellt) erklärte sich am ehesten durch eine Vermischung bei der Phasentrennung.

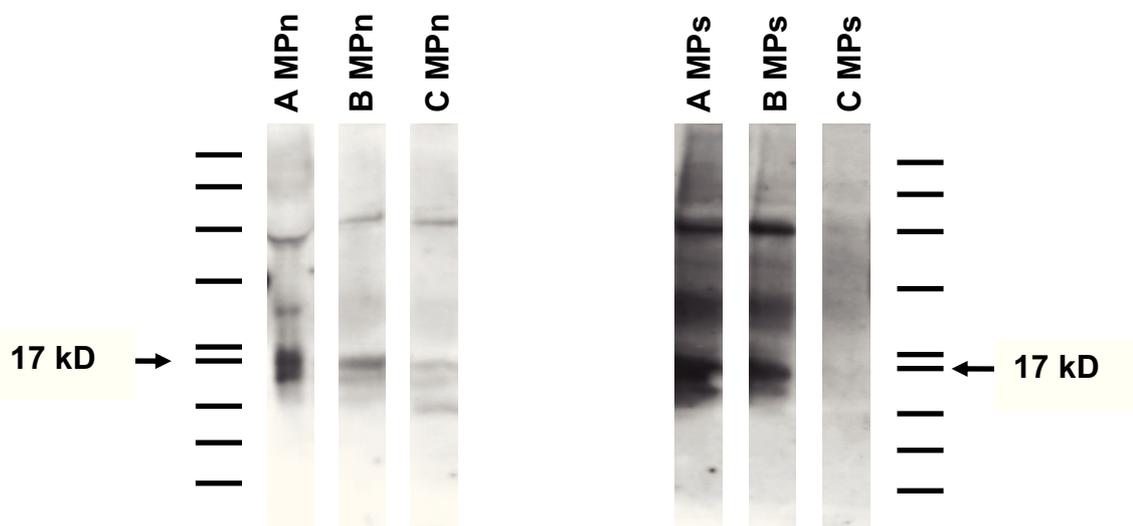


Abb. 4.20: 1-D-Gelelektrophorese und Westernblotanalyse mit dem AK NProSP-C nach Lipidextraktion nach Beers et al⁵ und sofortiger Weiterverarbeitung im Neutralen (links) und Sauren (rechts). Reproduzierbare Banden zeigten sich in den Mittelphasen. A = BALF + BSA, B = BALF, C = BALF + PBS.

In einem weiteren Experiment wurde lyophilisierte BALF benutzt. Nach Zugabe der Extraktionslösung wurde für insgesamt 5min bei 4°C gevortext. Danach wurde für 10min zentrifugiert und Überstand (SN) und Pellet (P) getrennt.

Dieser Versuch zeigte entsprechende Banden im Sauren (sowohl Pellet als auch Überstand) sowie im Pellet des neutralen Milieus. Im Überstand der neutralen Probe ließ sich dagegen keine 17kD Bande nachweisen.

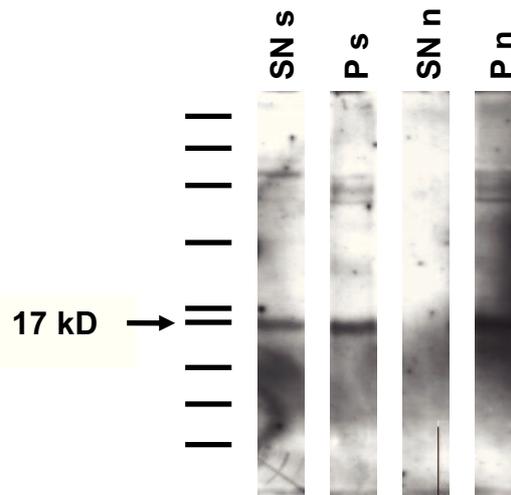


Abb. 4.21: 1-D-Gelelektrophorese und Westernblotanalyse mit dem AK NProSP-C nach Lipidextraktion nach Beers et al im Neutralen und Sauren; vortexen und kühlen; Banden zeigten sich im Sauren, sowie im Pellet des neutralen Milieus.

Kräftige und damit proteinreichere Banden lassen sich in der angesäuerten Mittelphase bei Extraktion nach Beers nachweisen. Durch den Zusatz von BSA, PBS, die Kühlung auf 4°C bzw. den Zwischenschritt der Separation in Pellet und Überstand lassen sich keine stärkeren Banden im Sinne einer Anreicherung nachweisen.

4.2.2.2 Pro-SP-B

Bei der Proform des SP-B wurde nahezu analog zu Pro-SP-C vorgegangen. Zunächst wurde eine Bligh-Dyer-Folch^{9, 18} Lipidextraktion genutzt.

Eine markante Bande bei 23kD ergab sich nur in der neutralen MP, nach 30min Belichtung waren aber auch Banden in der sauren MP und UP sowie in der neutralen UP zu sehen. Der Versuch wurde wiederholt um herauszufinden, ob die Beobachtung, dass sich durch Ansäuern die Proform teilweise in die UP verschieben lässt, zu bestätigen. Das Wiederholungsexperiment zeigte reproduzierbare Banden allerdings nur in der sauren und neutralen Mittelphase.

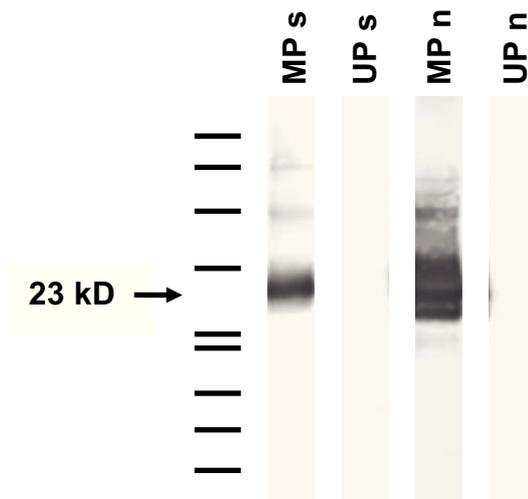


Abb. 4.22: 1-D-Gelelektrophorese und Westernblotanalyse mit dem AK CTermB nach Bligh-Dyer-Folch Lipidextraktion im Neutralen und Sauren; Banden bei 23kD Bereich in den Mittelphasen.

Die Extraktion nach Beers et al⁵ lieferte zunächst 23kD Banden in allen drei neutralen Phasen sowie in der Unter- und Oberphase im Sauren. Das Nichtvorhandensein der Bande in der sauren Mittelphase konnte nicht erklärt werden. In der Wiederholung gelang es nicht, die Banden in der Unterphase zu reproduzieren. Es zeigten sich aber Banden in folgenden Phasen: neutrale und saure Mittelphase, neutrale Oberphase. Zudem wurde erneut überprüft, ob die Zugabe von BSA bzw. PBS-Puffer zur BALF vor der Extraktion an der Bandenlokalisierung und –stärke etwas änderte. In der sauren mit PBS versetzten Mittelphase konnte die Proform nicht detektiert werden, ansonsten zeigten sich in allen Mittelphasen annähernd gleich starke Banden. Die Bande in der neutralen OP erklärte sich am ehesten durch eine Vermischung bei der Phasentrennung.

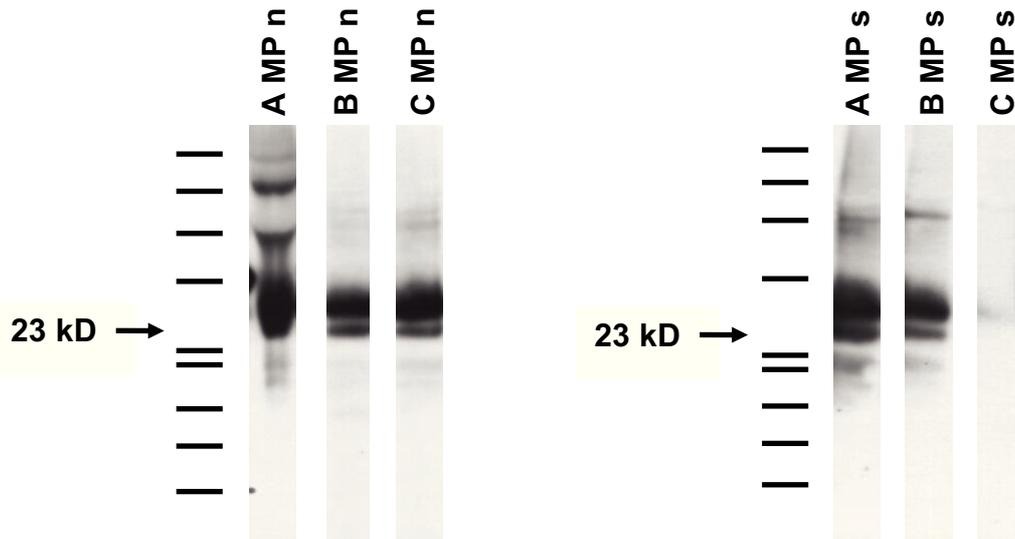


Abb. 4.23: 1-D-Gelelektrophorese und Westernblotanalyse mit dem AK CTermB nach Lipidextraktion nach Beers et al⁵ und sofortiger Weiterverarbeitung im Neutralen (links) und Sauerem (rechts). Reproduzierbare Banden zeigten sich in den Mittelphasen. A = BALF + BSA, B = BALF, C = BALF + PBS.

Wie schon bei Pro-SP-C ist es auch bei der Proform des SP-B nicht möglich, durch Ansäuerung das Protein in die Unterphase zu überführen. Durch Zusatz von BSA bzw. PBS erhält man keine stärkeren Banden, d.h. durch Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen oder Bereitstellung von Trägerprotein ließ sich die Ausbeute der Zielproteine nicht erhöhen.

4.2.2.3 SP-B

Das Vorgehen entsprach dem der Punkte 4.2.2.1 und 4.2.2.2. Mit der Lipidextraktion nach Bligh – Dyer – Folch^{9, 18} ergab sich eine markante Bande im 8kD Bereich nur in der neutralen Mittelphase. In der sauren Unter- und Mittelphase zeigten sich lediglich leichte Schatten.

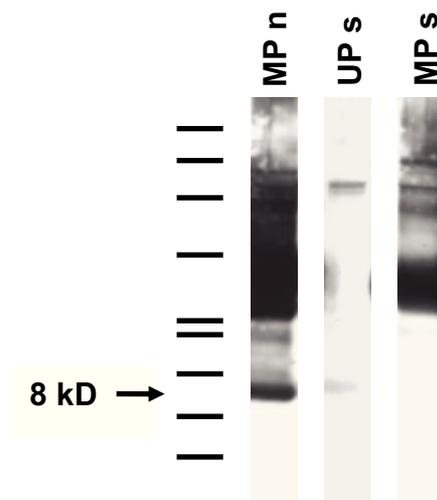


Abb. 4.24: 1-D-Gelelektrophorese und Westernblotanalyse mit dem AK anti-SP-B(C329) nach Bligh-Dyer-Folch Lipidextraktion im Neutralen und Sauren; markante Banden im 8kD Bereich nur in der neutralen MP.

Nach Extraktion nach Beers et al⁵ zeigte sich im neutralen Milieu die stärkste 8kD Bande in der Mittelphase. Durch Ansäuern ließ sich diese in die Unterphase verschieben. Dieses Ergebnis war reproduzierbar.

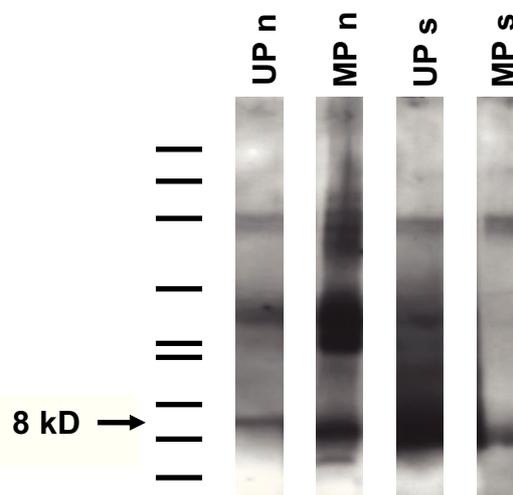


Abb. 4.25: 1-D-Gelelektrophorese und Westernblotanalyse mit dem AK anti-SP-B(C329) nach Lipidextraktion nach Beers et al⁵ und sofortiger Weiterverarbeitung im Neutralen (n) und Sauren (s). Durch Ansäuern gelang es die 8kD Bande in die UP zu verschieben.

Nach Extraktion nach Beers et al⁵ lässt sich SP-B durch Ansäuerung von der Mittelphase in die Unterphase überführen.

4.2.2.4 Coomassie-Färbung

Eine mit der Lipidextraktion nach Bligh-Dyer-Folch^{9, 18} (siehe 3.6.1) erhaltene Phasenpräparation wurde für ein Coomassiegel verwendet, um eine Aussage über die Proteinmenge in den entsprechenden Phasen machen zu können.

Dabei zeigten sich starke Banden nur in der neutralen MP was zu dem Schluss führte, dass nur dort größere Proteinmengen enthalten waren.

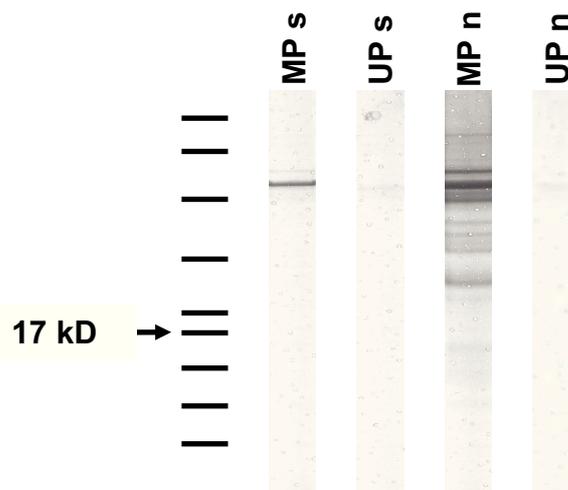


Abb. 4.26: Coomassie-Gelfärbung. Größere Proteinmengen zeigen sich in der neutralen Mittelphase.

Lediglich die neutrale Mittelphase ergab starke Proteinbanden in der Färbung, d.h. in dieser Phase fanden sich größere Proteinmengen.

4.2.3 Verteilung von Pro-SP-C und Pro-SP-B in large / small aggregates

Die BALF wurde zunächst, wie auch unter 3.4 beschrieben, in ihre Subfraktionen (large aggregates [LA], small aggregates [SA] und den Überstand [SN]) getrennt. Mit den erhaltenen Fraktionen wurde eine 1-D-Gelelektrophorese durchgeführt (3.8.5) um zu sehen, ob sich die Proformen der Surfactantproteine B und C in einer Fraktion besonders zahlreich anreichern lassen.

Es ergaben sich sowohl bei den large aggregates als auch bei den small aggregates entsprechende Banden bei 17 bzw. 23kD. Im Überstand wurde nur eine sehr schwache Bande detektiert. Allerdings könnte dies auch an der geringen Probenmenge gelegen haben, die sich auf dem Gel befand. Nur 0,4% des ursprünglichen BALF Volumens wurde an Überstand aufgetragen.

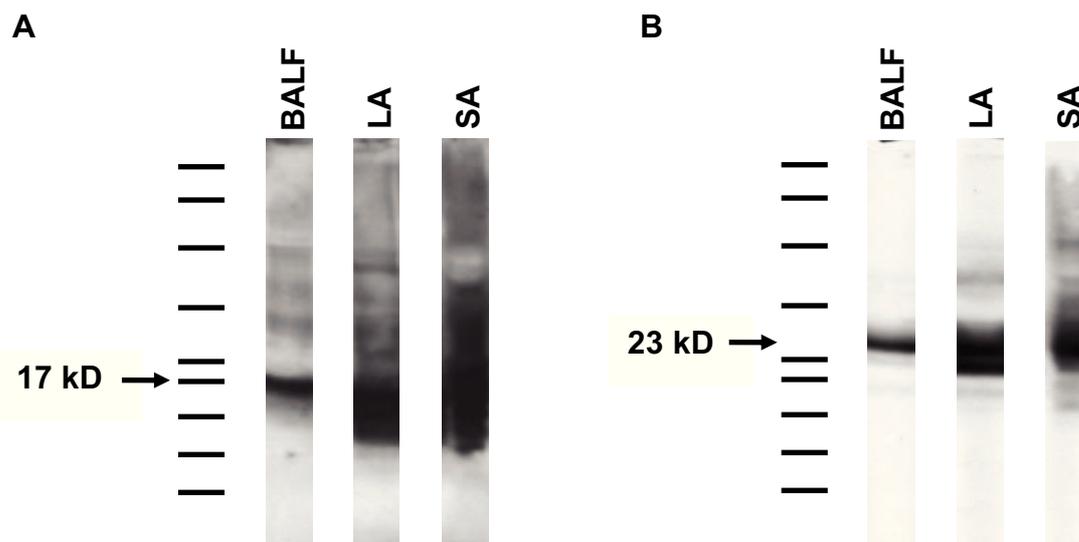


Abb. 4.27: 1-D-Gelelektrophorese und Westernblotanalyse mit den Antikörpern NPro-SP-C (A) und CTermB (B) nach Aufteilung der BALF in ihre Subfraktionen. BALF zum Vergleich. Es zeigen sich Banden im 17kD (A) und 23kD (B) Bereich der LA- und SA Fraktionen.

Um einen Überblick über die Proteinmenge im interessanten Bereich um 17 bzw. 23kD zu bekommen, wurde ein Coomassie-Gel angefertigt. Insgesamt war die Proteinmenge in diesen Bereichen gering, die stärksten Banden waren in der SA-Fraktion lokalisiert:

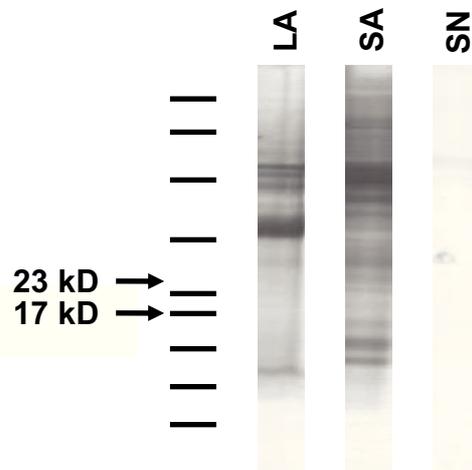


Abb. 4.28: Coomassie-Gelfärbung. Insgesamt geringe Proteinmengen im Bereich um 17 bzw. 23kD. Die stärksten Banden zeigen sich in der small aggregate-Fraktion.

Die Zielproteine ließen sich sowohl in den small- als auch large aggregates nachweisen. Die größte Proteinmenge fand sich in der Fraktion der small aggregates.

4.2.4 Löslichkeit von Pro-SP-C und Pro-SP-B in unterschiedlichen Lösungsmitteln

Als Ausgangsmaterial dienten 50ml BALF. Es wurde damit eine Extraktion nach Beers et al⁵ durchgeführt (siehe 3.6.2) und die entstandene Mittelphase auf vier Eppendorfhütchen aufgeteilt. Folgende Lösungsmittel, zu denen zusätzlich Proteinaseinhibitor gegeben wurde, wurden verwendet:

- Methanol : Wasser = 1:1 (V:V) [Lösungsmittel 1]
- 20mM Phosphatpuffer + 1% Tween-20 [Lösungsmittel 2]
- 20mM Phosphatpuffer + 1% SDS [Lösungsmittel 3]
- 20mM Phosphatpuffer [Lösungsmittel 4]

Rein visuell ließ sich die Löslichkeit nur schwer beurteilen, da bei allen vier Ansätzen flockige Rückstände zurückblieben. Deshalb wurden eine 1-D-Gelelektrophorese und Westernblotanalyse durchgeführt.

Dazu wurden die Proben 10min bei 20800U/min zentrifugiert und anschließend jeweils Pellet und Überstand aufgetragen. Die Aussagekraft des Überstandes aus der Fraktion „20mM Phosphatpuffer + 1% Tween-20“ war allerdings eingeschränkt, da sich die Probe im Verlauf der Vorbereitung auf die Elektrophorese beim Erwärmen grünlich verfärbte und sehr zähflüssig wurde.

Es zeigten sich die stärksten Banden sowohl für Pro-SP-B als auch für Pro-SP-C im Pellet des Lösungsmittels 1 sowie im Überstand (SN) des Lösungsmittels 3.

Schwächere Banden zeigten sich für Pro-SP-C auch im Pellet der Lösung 3 sowie im Pellet des Lösungsmittels 4. Pro-SP-B ergab schwache Banden im Überstand der Lösung 1 sowie in den Pellets der Lösungen 2, 3 und 4.

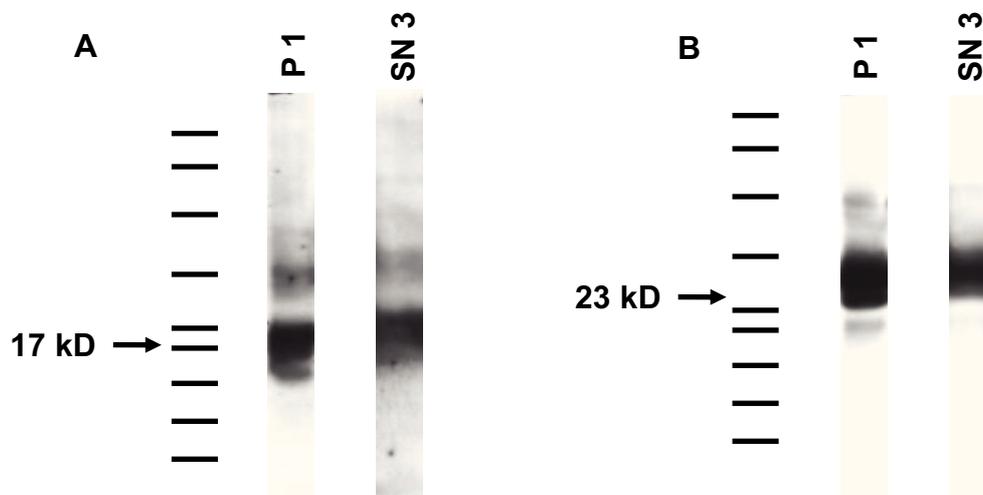


Abb. 4.29: 1-D-Gelelektrophorese und Westernblotanalyse mit den AK NProSP-C (A) und CTermB (B) nach Lösung der BALF in verschiedenen Lösungsmitteln und anschließender Trennung in Pellet (P) und Überstand (SN). Lösungsmittel 1: Methanol : Wasser = 1:1; Lösungsmittel 3: 20mM Phosphatpuffer + 1% SDS.

Die stärksten Signale der Zielproteine zeigten sich im Pellet des Lösungsmittels 1 sowie im Überstand des Lösungsmittels 3.

4.2.5 Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration zur Anreicherung von Pro-SP-C und Pro-SP-B

4.2.5.1 Kationenaustauschchromatographie

Als Puffer wurde zunächst 20mM Natriumacetat (pH 5,0) verwendet. Pro-SP-C hat einen isoelektrischen Punkt (pI) von 6,655 (Berechnung anhand der Aminosäuresequenz mittels des Programms iep aus dem Sequenzanalysepaket EMBOSS). Bei einem pH von 5,0 sollte das Pro-SP-C positiv geladen sein. Es ist daher anzunehmen, dass es an eine Kationenaustauschsäule bindet. Ausgangsmaterial war eine MP – Präparation nach Beers et al⁵ (siehe 3.6.2) aus 16ml BALF, die in 1ml Puffer + 0,03% SDS gelöst wurde.

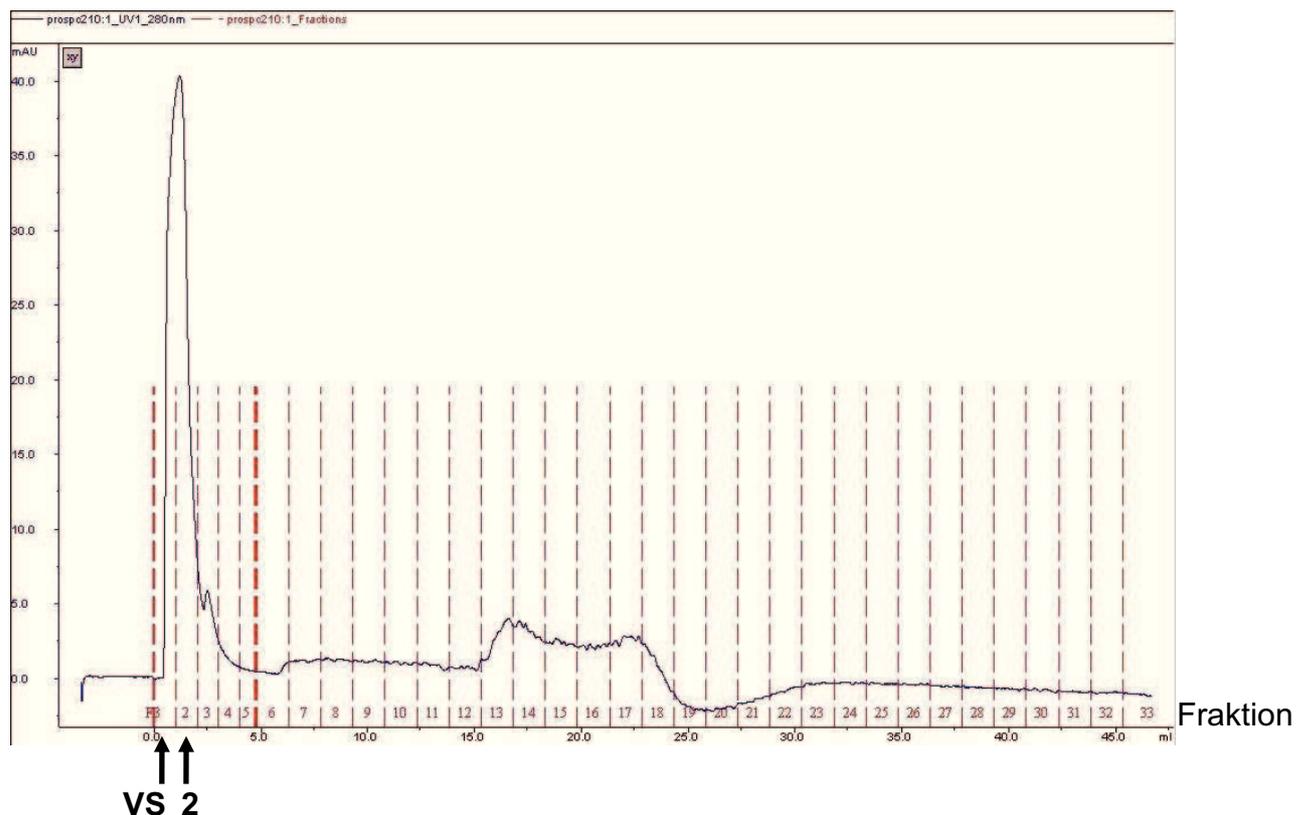


Abb. 4.30: Chromatogramm der in Puffer + 0,03% SDS gelösten Mittelphase. In den Fraktionen „Vorsäule (VS)“ und „2“ ließ sich in der Westernblotanalyse eine Bande unter Verwendung von Antikörpern gegen Pro-SP-C (17kD) und Pro-SP-B (23kD) nachweisen.

Es ergaben sich bei der anschließenden 1-D-Gelelektrophorese verwertbare Banden im 17 bzw. 23kD Bereich nur in den Fraktionen „Vorsäule (VS)“ und „2“. Somit hatten die Proteine nicht an die Säule gebunden.

Darum wurde der Puffer geändert und fortan 20mM Natriumacetat + 6M Urea (pH 5,0) verwendet. Als Probe diente eine Mittelphasen-Präparation nach Beers⁵ (siehe 3.6.2) aus 50ml BALF.

Es ergab sich folgendes Chromatogramm:

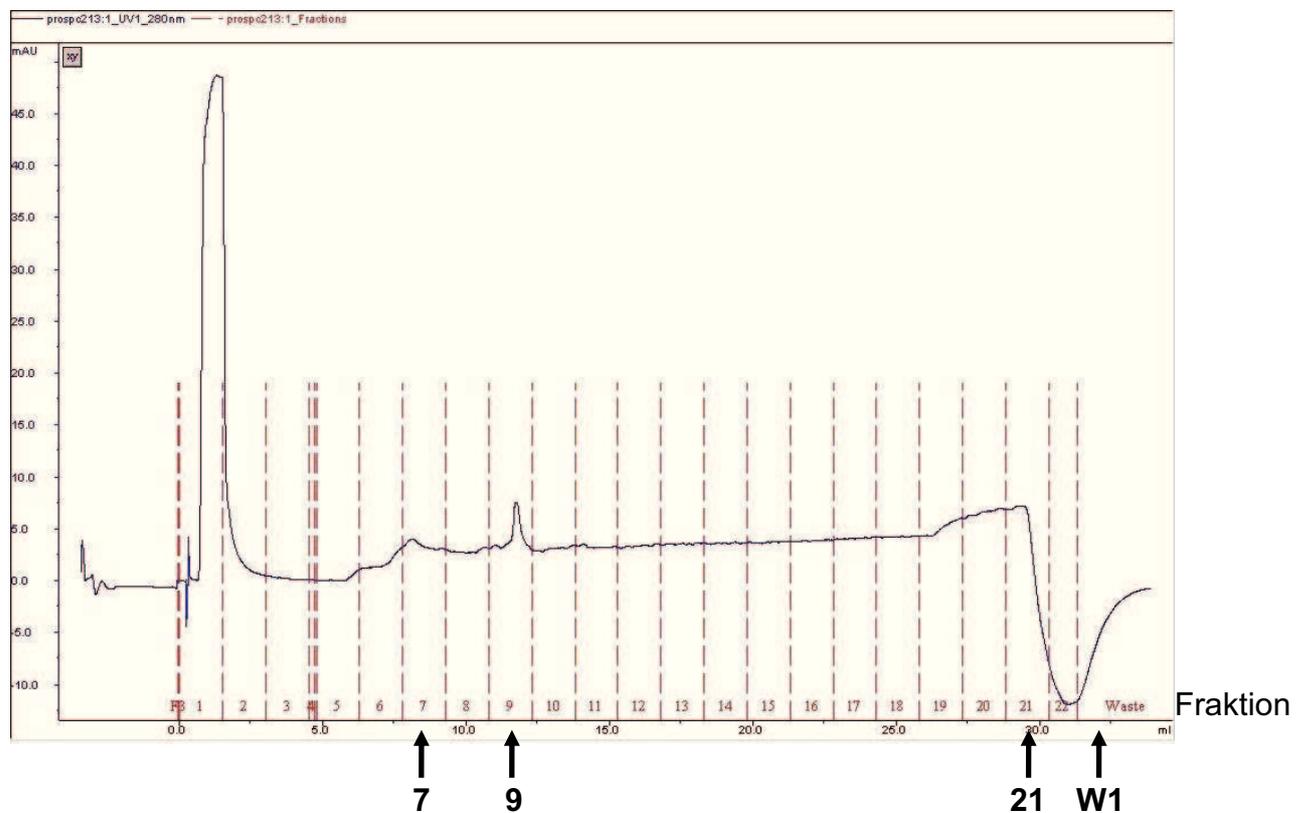


Abb. 4.31: Chromatogramm der in Puffer gelösten Mittelphase. Von 100µl der Fraktionen 7, 9, 21 und W1 wurde je eine Methanol – Chloroform – Präzipitation gemacht.

Mit 100µl der Fraktionen 7, 9, 21, W1 wurde eine Methanol-Chloroform-Präzipitation (siehe 3.7.1) gemacht und damit eine 1-D-Gelelektrophorese und Westernblotanalyse durchgeführt.

Es ergaben sich keine Banden in den Bereichen 17 bzw. 23kD.

Um mehr Material auf die Säule zu bringen, wurden Fraktionen zusammengefasst und konzentriert / entsalzt. Folgende Pools wurden festgelegt:

A	Fraktionen 1 – 4
B	Fraktionen 6 + 7
C	Fraktionen 8 – 10
D	Fraktionen 11 – 14
E	Fraktionen 15 – 18
F	Fraktionen 19 – 21
G	Waste 1 - 3

Tab. 4.3: Fraktionsübersicht

Die Westernblotanalyse zeigte eine schwache Bande im Bereich der Fraktion C.

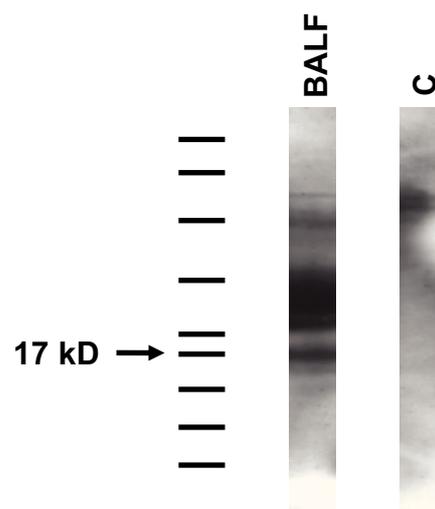


Abb. 4.32: 1-D-Gelelektrophorese und Westernblotanalyse mit dem Antikörper NPro-SP-C von den Fraktionen aus Tabelle 1. Links BALF als Vergleich, rechts Fraktionspool C. Es zeigt sich eine schwache Bande bei 17kD.

Um zu sehen ob die Bande reproduzierbar ist, wurde eine Mittelphasen-Präparation aus 25ml BALF auf die Säule gegeben. Diese ergab keine verwertbaren Peaks im Chromatogramm.

Auch ein weiterer Lauf mit einer zuvor Methanol-Chloroform-präzipitierten Mittelphase aus 25ml BALF ergab keine Peaks.

Deshalb wurde die Probenvorbereitung geändert:

Da sich die Mittelphase aus 25ml BALF bei diesem Experiment nicht vollständig in dem Probenpuffer löste, wurde sie in Pellet (P) und Überstand (SN) getrennt und beide Fraktionen identisch weiterverarbeitet. Die Proben wurden entsalzt. Vor und nach diesem Vorgang wurden die Proben auf die Menge an Zielproteinen kontrolliert. Es zeigten sich sowohl Banden im 23kD Bereich des Pro-SP-B als auch im 17kD Bereich des Pro-SP-C der Mittelphase.

Die Banden waren in der Pelletfraktion stärker als im Überstand. Des Weiteren waren die Banden nach der Entsalzung schwächer als zuvor, woraus geschlossen werden musste, dass Material durch die Entsalzungsprozedur mit Microcon YM3 verloren gegangen war.

Die mehr Material enthaltende Pelletfraktion wurde auf die Säule gegeben und erneut Fraktionen gesammelt.

Nach dem Lauf wurden mit 2M NaCl die auf der Säule gebundenen Substanzen gelöst und anschließend mit Ethanol unspezifisch gebundenes Material ausgewaschen. Auch von diesen Schritten wurden Fraktionen aufgefangen.

Es ergab sich das abgebildete Chromatogramm von diesem Lauf:

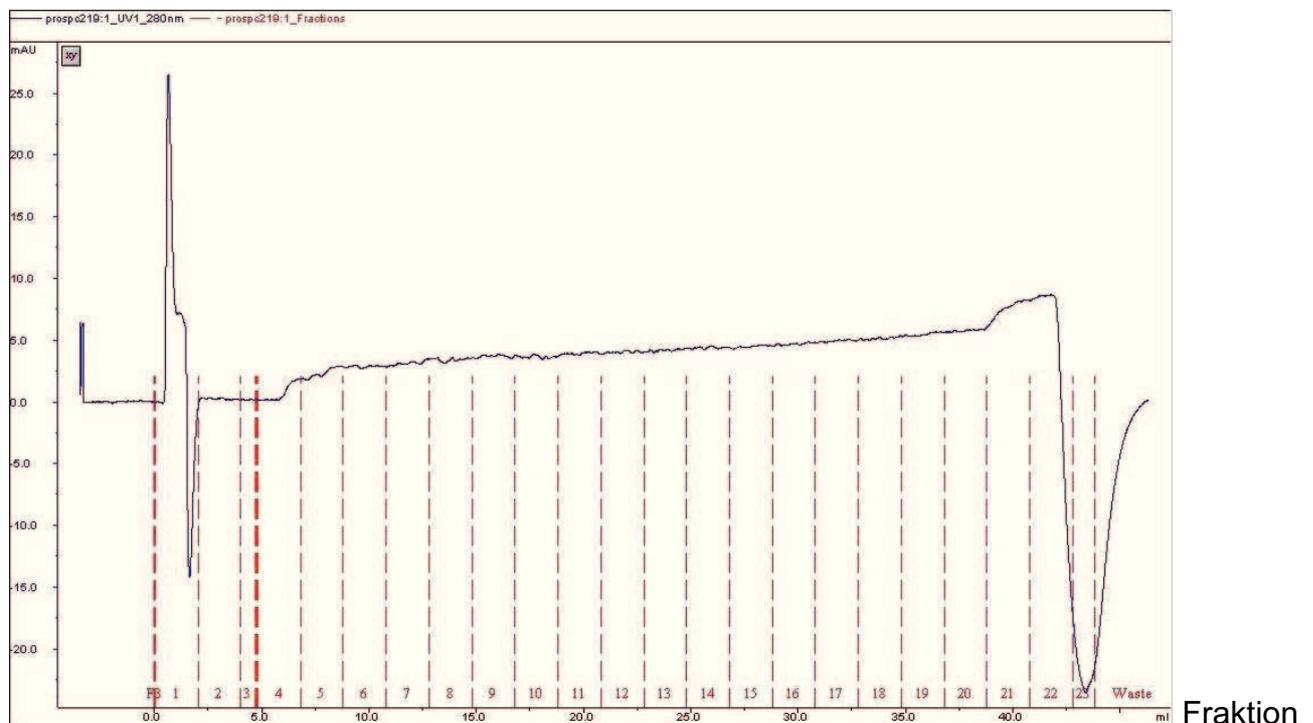


Abb. 4.33: Chromatogramm der „Pelletfraktion“.

Einige Fraktionen wurden weiterverarbeitet. Sie wurden teilweise zusammengefasst, entsalzt und konzentriert mit Millipore 5K Filter Devices:

A	50% Fraktion 1
B	100% Fraktionen 21 + 22
C	100% Fraktionen Salz 1 + 2
D	100% Ethanol 1 - 3

Tab. 4.4: Fraktionsübersicht

Es folgte eine 1-D-Gelelektrophorese und Westernblotanalyse.

Es ergaben sich keine Banden im Bereich der Proformen von SP-B oder SP-C.

Mit den verbliebenen 50% der Fraktion 1 wurde ein weiterer Lauf durchgeführt.

Die Fraktionen 1, 21 + 22, und Salz 1+ 2 wurden entsprechend der Fraktionen des vorherigen Laufes weiterverarbeitet. Auch hier ließen sich keine Banden der Proformen nachweisen.

Da mit der Kationenaustauschsäule keine Banden der Proformen reproduziert werden konnten, wurde die Trennmethode gewechselt.

4.2.5.2 Anionenaustauschchromatographie

Eine Mini Q PE 4.5/50 Säule wurde zur Chromatographie benutzt. Als Puffer diente 20mM Tris + 6M Urea bei pH 8,5. Probelauf mit Lysozym. Material war eine large aggregates Mittelphasen-Präparation aus 25ml BALF. Mit 50% des Probenmaterials ergab sich folgendes Chromatogramm:

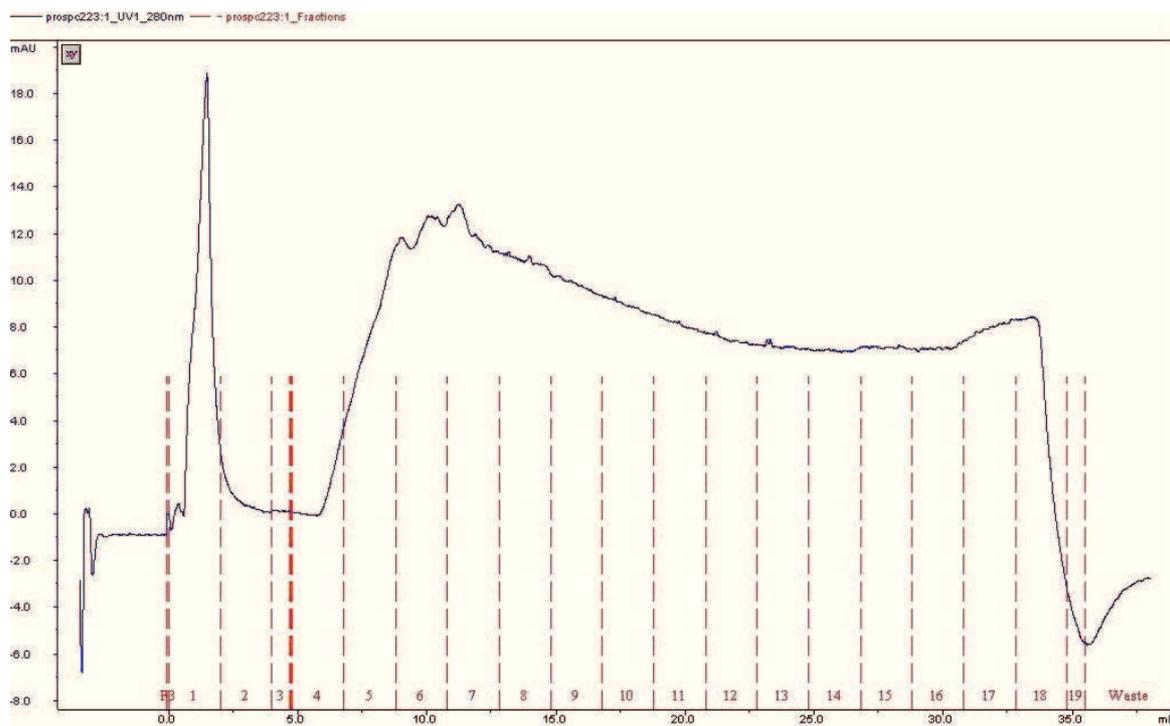


Abb. 4.34: Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie einer MP aus 25ml BALF.

Die Fraktionen 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 17 und 18 wurden einer Slot Blot Analyse unterzogen.

Es zeigte sich in einigen Fraktionen eine Signalverstärkung. Neben Pro-SP-C kam dafür aber auch eine Albumin-Kreuzreaktion in Frage.

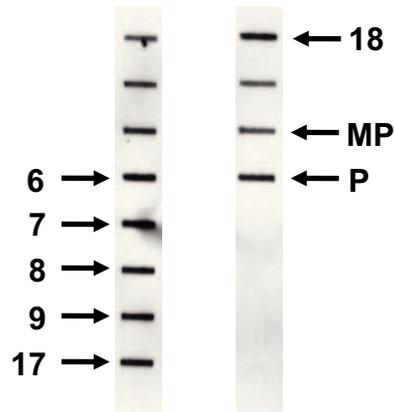


Abb. 4.35: Slot Blot Analyse der Fraktionen einer Anionenaustauschchromatographie. Antikörper: NProSP-C. In den Fraktionen 6-9, 17 und 18 zeigt sich eine Signalverstärkung. P: Positivkontrolle (BALF). MP: 100µl MP.

Um die Ergebnisse dieses Versuchs zu bestätigen, folgte eine weitere Chromatographie mit einer MP aus 50ml BALF. Dabei wurde ein manueller Stufengradient angewendet (siehe 3.9.3).

Chromatogramm:

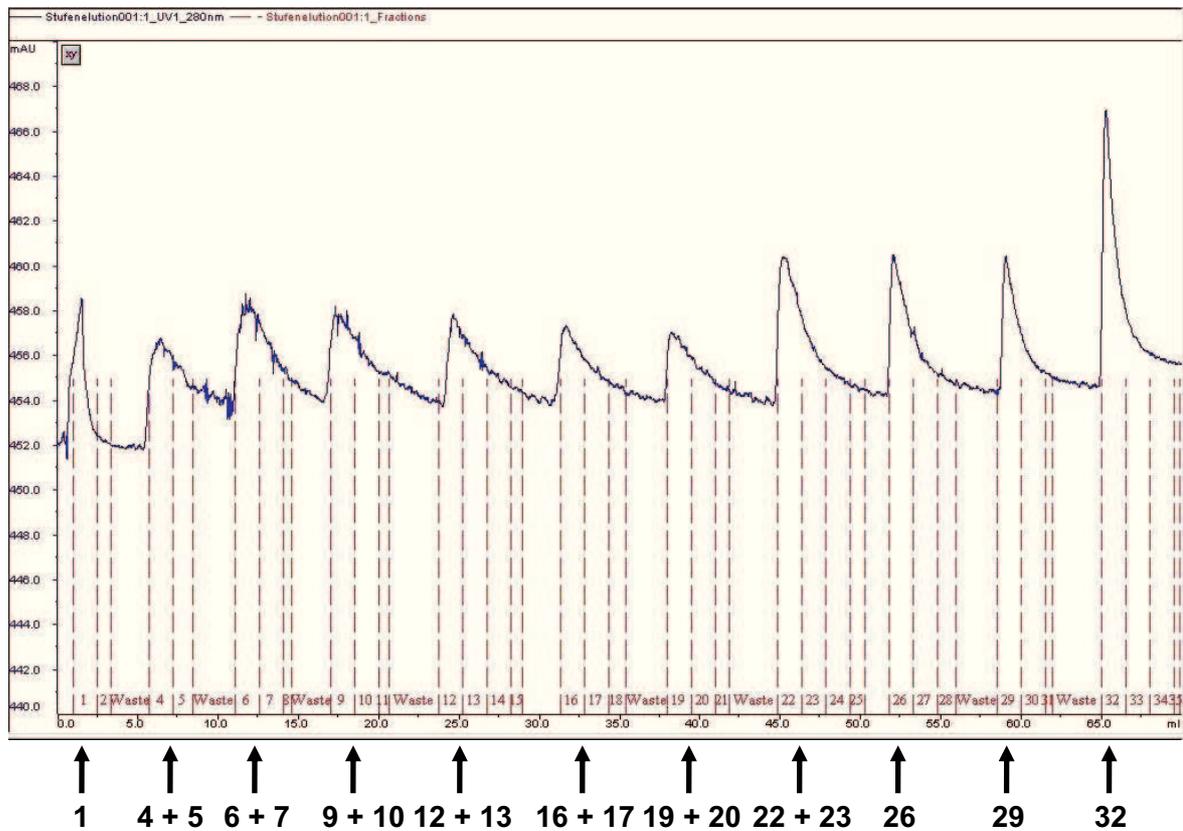


Abb. 4.36: Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie einer MP aus 25ml BALF. Manueller Stufengradient.

Es zeigten sich Peaks in den Fraktionen 1, 4+5, 6+7, 9+10, 12+13, 16+17, 19+20, 22+23, 26, 29 und 32.

Mit 200µl jeder Fraktion wurde eine Methanol-Chloroform-Präzipitation mit anschließender 1-D-Gelelektrophorese und Westernblotanalyse durchgeführt.

Auch nach 60min Detektion ergaben sich in keiner der Fraktionen Banden im 17 bzw. 23kD Bereich (Bild nicht gezeigt).

Da mit der Anionenaustauschchromatographie keine Banden der Proformen reproduziert werden konnten, wurde die Trennmethode erneut gewechselt.

4.2.5.3 Gelfiltration

Zur Gelfiltration wurde eine Sephacryl S-200 HR Säule genutzt. Als Puffer diente wie unter 4.2.5.1 20mM Natriumacetat + 6M Urea bei pH 5,0.

Die Probe bestand aus einer MP-Präparation aus 5ml BALF. Es zeigte sich folgendes Chromatogramm:

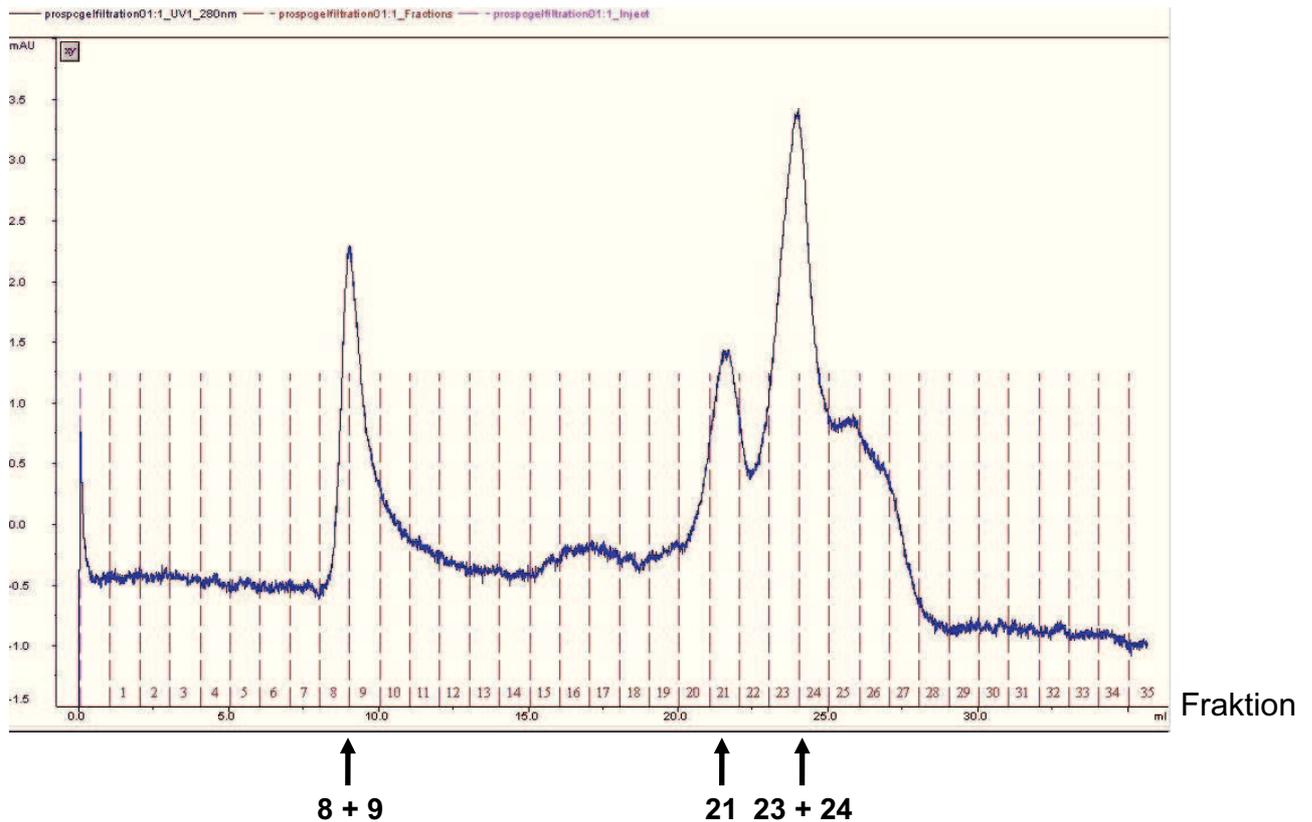


Abb. 4.37: Chromatogramm der Gelfiltration einer Mittelphase aus 5ml BALF.

Weiter analysiert wurden die Fraktionen 8 + 9, 21, 23 + 24. Sie wurden z.T. gepoolt, entsalzt und konzentriert mit Millipore 5K Filter Devices. Anschließend erfolgte eine 1-D-Gelelektrophorese mit Westernblotanalyse.

Es zeigten sich auch nach 40min Detektionszeit keine Banden im 17 bzw. 23kD Bereich.

Bei einer Wiederholung der Chromatographie wurde mit den Fraktionen 8 bis 28 eine Slot Blot Analyse (siehe 3.8.4) durchgeführt. Für Pro-SP-C ließ sich in keiner der

Fraktionen eine starke Bande detektieren, selbst die Positivkontrolle (BALF) war relativ schwach (nicht abgebildet).

Für Pro-SP-B ergaben sich in den Fraktionen 8 – 10 stärkere Banden (Abb. 4.38). Eine Albumin Kreuzreaktion muss als mögliche Erklärung in Betracht gezogen werden, da im Westernblot ein Signal auf Höhe des Albumins erkennbar war.

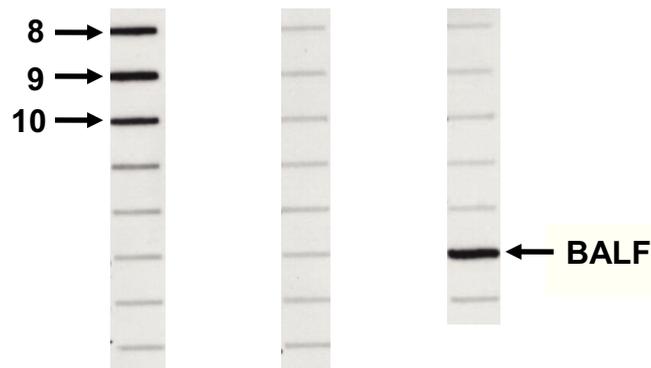


Abb. 4.38: Slot Blot Analyse der Fraktionen einer Gelfiltration. Antikörper: CTermB gegen Pro-SP-B. In den Fraktionen 8 – 10 zeigt sich eine stärkere Bande. BALF als Positivkontrolle.

Um zu überprüfen ob es sich bei den starken Banden aus dem vorherigen Versuch um Pro-SP-B handelt, wurde mit einer Mittelphase aus 25ml BALF eine weitere Chromatographie durchgeführt.

Chromatogramm:

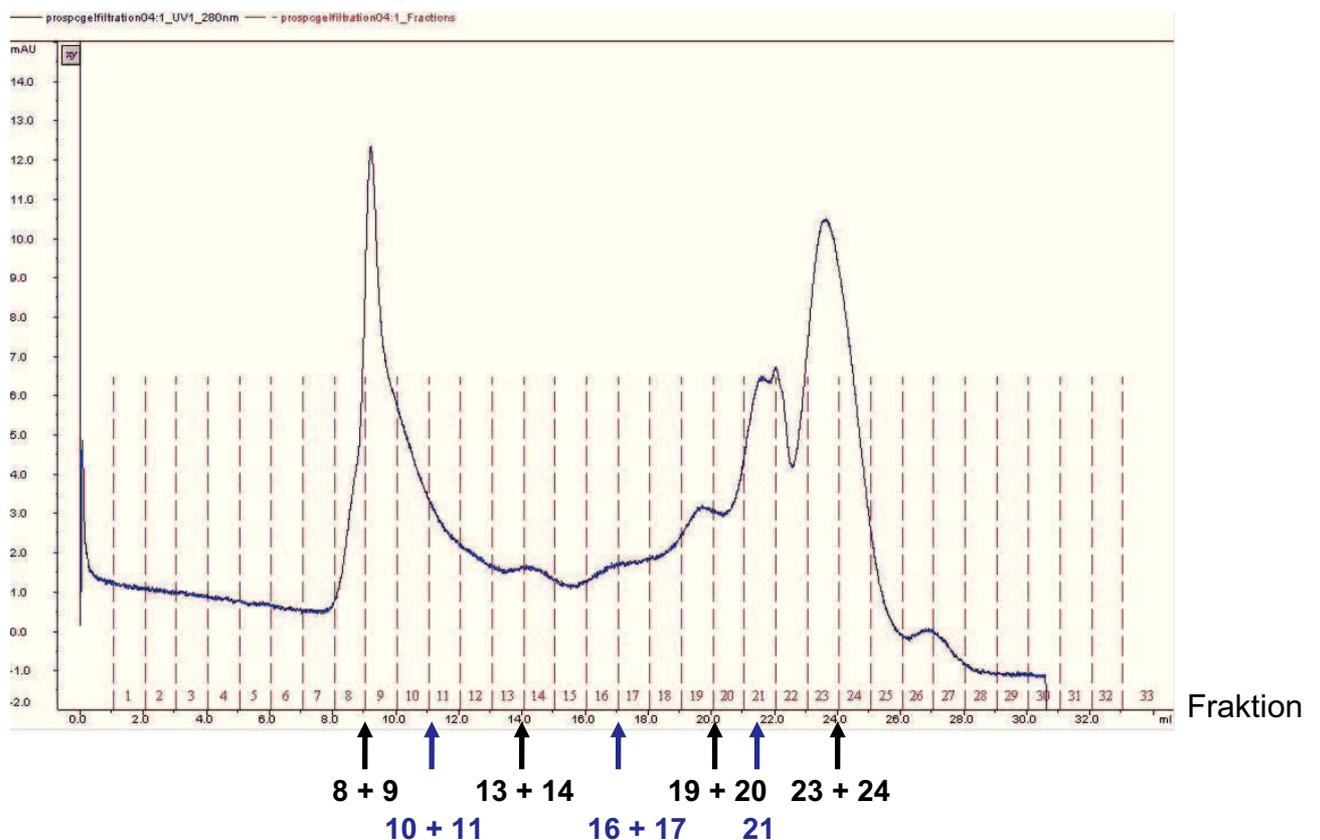


Abb. 4.39: Chromatogramm der Gelfiltration einer Mittelphase aus 25ml BALF.

Es wurden Fraktionen zu 1ml gesammelt. Einige wurden per Slot Blot auf eine PVDF-Membran übertragen.

Es ergaben sich folgende Fraktionen bzw. Fraktionspaare: 8+9, 10+11, 13+14, 16+17, 19+20, 21, 23+24. Die Slots wurden mit Bromphenolblau gefärbt, ausgeschnitten und anschließend 20min in je 50µl Gel-Probenpuffer erhitzt.

Es folgte eine 1-D-Gelelektrophorese (siehe 3.8.5). 15µl je Probe wurden für eine Coomassie- bzw. Silberfärbung (siehe 3.8.1), 35µl für eine Westernblotanalyse (siehe 3.8.3) genutzt.

In keiner der Fraktionen konnte Pro-SP-B nachgewiesen werden. Lediglich die BALF-Positivkontrolle ergab ein positives Signal.

Auch die Silber- und Coomassiefärbungen zeigten keine Banden im 17- bzw. 23kD Bereich.

Da mit der Gelfiltration keine Banden der Proformen reproduziert werden konnten, wurde die Trennmethode erneut gewechselt.

4.2.6 Pro-SP-C-Isolierung mittels HPLC

4.2.6.1 Säule: 15 RPC ST 4.6/100

Die genauen Laufbedingungen und Puffer sind unter 3.10 aufgeführt. Es wurde als Probe ein 1ml BALF-Lyophilisat, welches in 100µl Wasser + 0,1% Trifluoressigsäure gelöst wurde verwendet. 20µl davon kamen auf die Säule.

Chromatogramm:

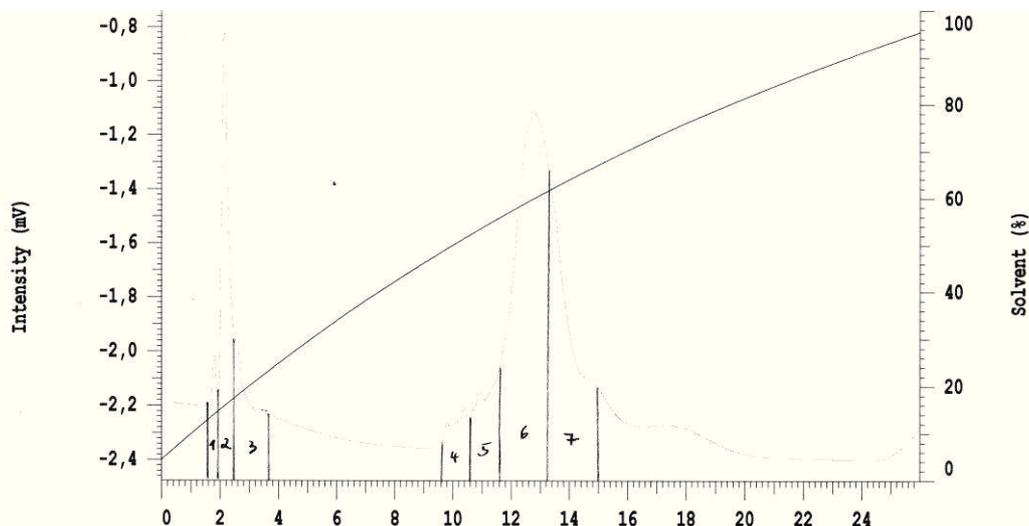


Abb. 4.40: Chromatogramm der HPLC eines 1ml BALF-Lyophilisats. 1-7: Fraktionen.

Nach dem ersten Lauf wurden anhand des Chromatogramms die zu analysierenden Fraktionen festgelegt.

Fraktion 1	1,6 – 1,9 min
Fraktion 2	1,9 – 2,5 min
Fraktion 3	2,5 – 3,7 min
Fraktion 4	9,6 – 10,6 min
Fraktion 5	10,6 – 11,6 min
Fraktion 6	11,6 – 13,2 min
Fraktion 7	13,2 – 15,0 min

Tab. 4.5: Fraktionsübersicht

Die gesammelten Fraktionen wurden per Immunoblot analysiert.

Die Positivkontrolle (BALF) sowie die Kontrolle der injizierten Probe (PK) zeigten Banden bei 17kD (Abb. 41).

In Fraktion 5 zeigte sich eine leichte Bande im interessanten Bereich bei 17kD.

In den anderen Fraktionen waren keine Banden nachweisbar (nicht gezeigt).

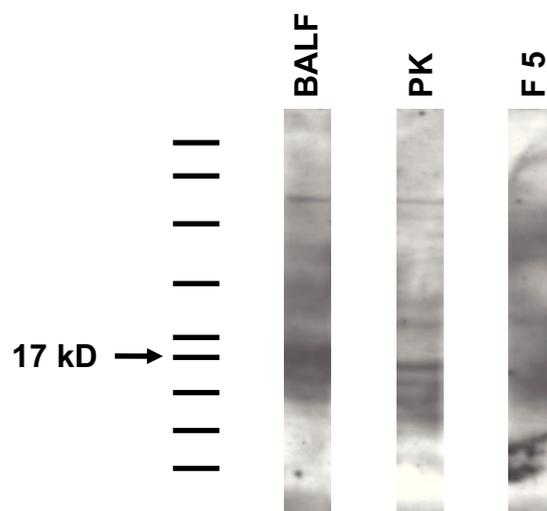


Abb. 4.41: 1-D-Gelelektrophorese gesammelter Fraktionen der HPLC. Antikörper: NProSP-C. Es zeigte sich eine diskrete 17kD Bande in Fraktion 5 (F5). BALF: Positivkontrolle. PK: Probenkontrolle (20µl).

Fraktion 5 zeigte eine im Vergleich zur Probenkontrolle und zur Positivkontrolle dezente Bande bei 17kD.

4.2.6.2 Säule: μ RPC C2/C18

Die Laufbedingungen sind unter 3.10 aufgeführt.

Es wurde ein 1ml BALF-Lyophilisat in 100 μ l H₂O + 0,1% TFA gelöst und davon 20 μ l injiziert.

Chromatogramm:

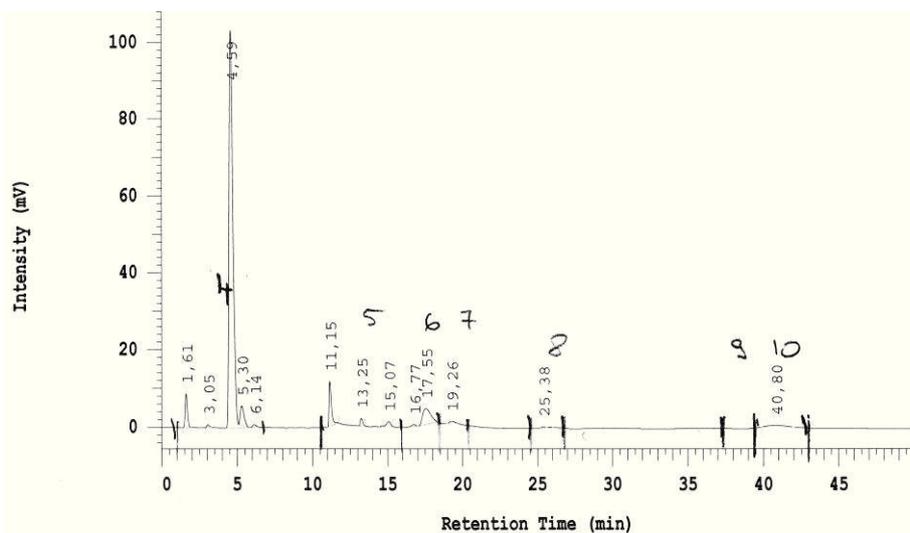


Abb. 4.42: Chromatogramm der HPLC eines 1ml BALF-Lyophilisats. 4-10: Fraktionen.

Anhand eines ersten Laufes wurden die Fraktionen festgelegt, die in einem zweiten Lauf gesammelt wurden.

Fraktion 4	1,0 – 7,0min
Fraktion 5	10,5 – 16,0min
Fraktion 6	16,0 – 18,5min
Fraktion 7	18,5 – 20,5min
Fraktion 8	24,5 – 27,0min
Fraktion 9	37,0 – 39,5min
Fraktion 10	39,5 – 43,0min

Tab. 4.6: Fraktionsübersicht

Mit diesen wurde ein Slot Blot mit anschließender Westernblotanalyse durchgeführt. Um zu sehen ob es sich um ein für Pro-SP-C spezifisches Signal handelt, wurde ein Teil des Blots mit Antikörper (AK) + Peptid versetzt, der andere Teil nur mit dem Antikörper. Da sich die Signalstärke auch an der Positivkontrolle des mit dem Peptid versetzten Blots nicht änderte, musste davon ausgegangen werden, dass die Peptidblockade nicht funktioniert hatte. Unter Umständen lag dies an einer zu kurzen Inkubation des AK mit dem Peptid.

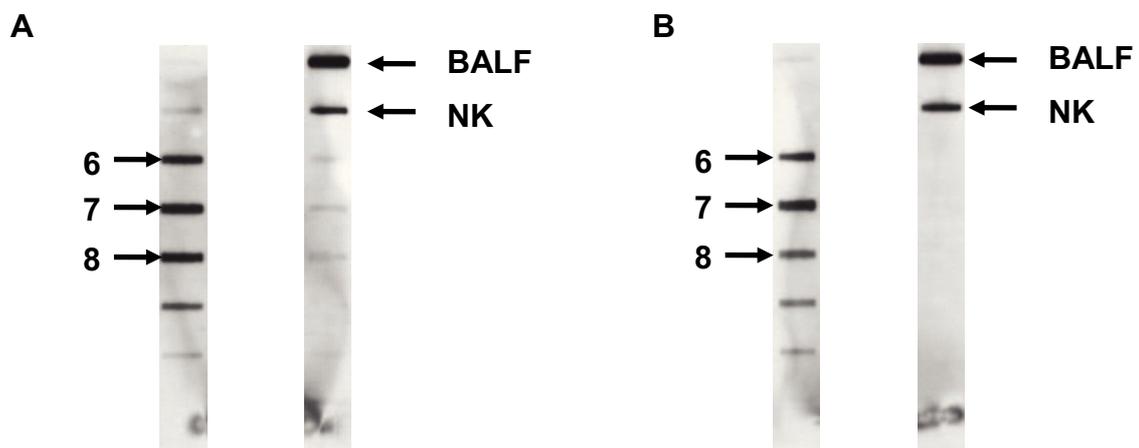


Abb. 4.43: Slot Blot gesammelter Fraktionen der HPLC. Antikörper: NProSP-C. Die Fraktionen 6 - 8 zeigen eine Signalverstärkung. **A:** Antikörper ohne Peptid, **B:** Antikörper mit Peptid. Die Peptidblockade funktionierte nicht. BALF: Positivkontrolle. NK: Negativkontrolle ($H_2O + 0,1\%$ TFA).

Es wurde ein erneuter HPLC – Versuchsblock durchgeführt:

Zunächst wurden 20 μ l eines in 100 μ l $H_2O + 0,1\%$ TFA gelösten 1ml-BALF-Lyophilisats auf die Säule gegeben und damit die Fraktionen festgelegt.

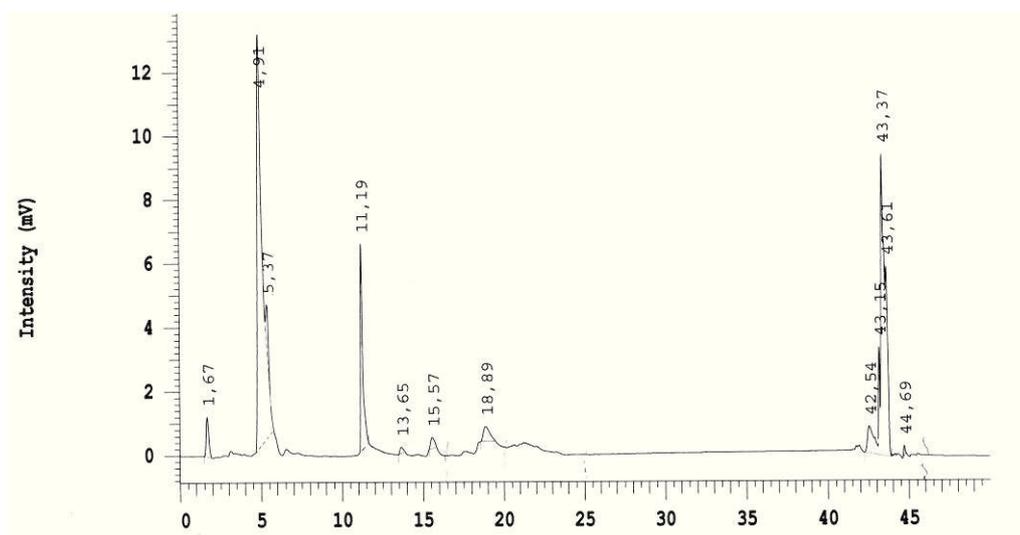


Abb. 4.44: Chromatogramm der HPLC eines 1ml BALF-Lyophilisats.

Fraktion 4	1,0 – 7,0min
Fraktion 5	10,5 – 16,5min
Fraktion 6	16,5 – 20,0min
Fraktion 7	20,0 – 25,0min
Fraktion 8	40,0 – 45,0min

Tab. 4.7: Fraktionsübersicht

Im Anschluss wurden zwei Läufe mit einem 1ml-BALF-Lyophilisat durchgeführt, die erhaltenen Fraktionen gepoolt, lyophilisiert und eine 1-D-Gelelektrophorese mit Westernblotanalyse durchgeführt. Es ergaben sich keine verwertbaren Banden in den Fraktionen.

Es wurden weitere zwei Läufe durchgeführt. Als Material diente eine large aggregate MP-Präparation aus 25ml BALF. Diese wurde in 100µl H₂O + 0,1% TFA gelöst, der unlösliche Teil abzentrifugiert und je 20µl des Überstandes auf die Säule aufgebracht. Fraktionen wurden gesammelt. Zusätzlich wurde bei diesen Läufen der Bereich zwischen Fraktion 7 und 8 aufgefangen. Anschließend wurden sie gepoolt, lyophilisiert und eine 1-D-Gelelektrophorese mit Westernblotanalyse durchgeführt.

Der Blot zeigte eine leichte Bande im Bereich des Pro-SP-C in der Zwischenfraktion (F 7-8). In den anderen Fraktionen waren keine Banden im 17kD Bereich sichtbar.

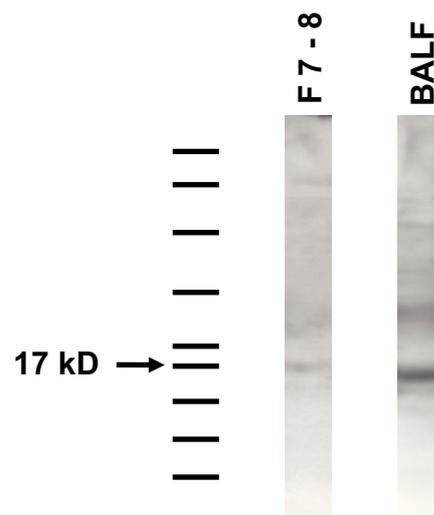


Abb. 4.45: Westernblot der Zwischenfraktion F 7-8 zweier HPLC-Läufe. Material: MP-Präparation aus 25ml BALF. AK: NProSP-C. Es zeigt sich eine Bande im Bereich der SP-C Proform. BALF: Positivkontrolle.

Dieses Ergebnis war reproduzierbar, allerdings ließ sich nicht genügend Material anreichern.

In den Peakfraktionen der Chromographie ließ sich immunhistochemisch kein Pro-SP-C nachweisen.

Allerdings ließ sich reproduzierbar in der „Zwischenfraktion 7-8“ Pro-SP-C nachweisen. Eine effiziente Anreicherung gelang dadurch jedoch nicht.

4.2.7 2-D-Gelelektrophorese zur Proteintrennung bei unterschiedlichem pH

Ziel der 2-D-Gelelektrophorese war es, Spots der Proformen von SP-B und SP-C zu isolieren. Ausgangsmaterial war BALF.

4.2.7.1 pH – Bereich 3,0 – 10,0

Es wurde zunächst eine MP aus 9ml Ausgangsmaterial pro Streifen benutzt. Es ergab sich folgender Blot:

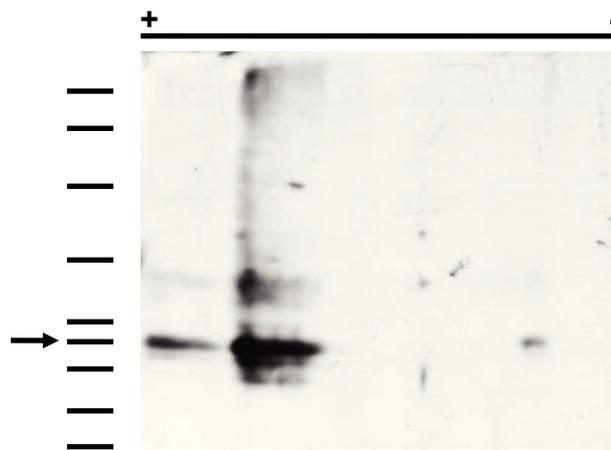


Abb. 4.46: Westernblot einer 2-D-Gelelektrophorese. Material: MP-Präparation aus 9ml BALF pro Streifen. AK: NProSP-C. Es zeigte sich anodennah bei 17kD eine Bande. → 17kD

Im Bereich der Anode ließ sich eine 17kD Bande nachweisen.

In demselben pH-Bereich wurde eine weitere Elektrophorese durchgeführt, diesmal mit einer MP aus 10ml BALF pro Streifen. Durch mehrfaches Spülen der MP mit kaltem Wasser wurde die Probe entsalzt und danach lyophilisiert. Nach Zugabe des Probenpuffers musste die Probe 30min bei 37°C erwärmt werden, um sich vollständig zu lösen. Es wurden zwei Gele gemacht, eines für eine Westernblotanalyse, eines zur Coomassie- bzw. Silberfärbung.

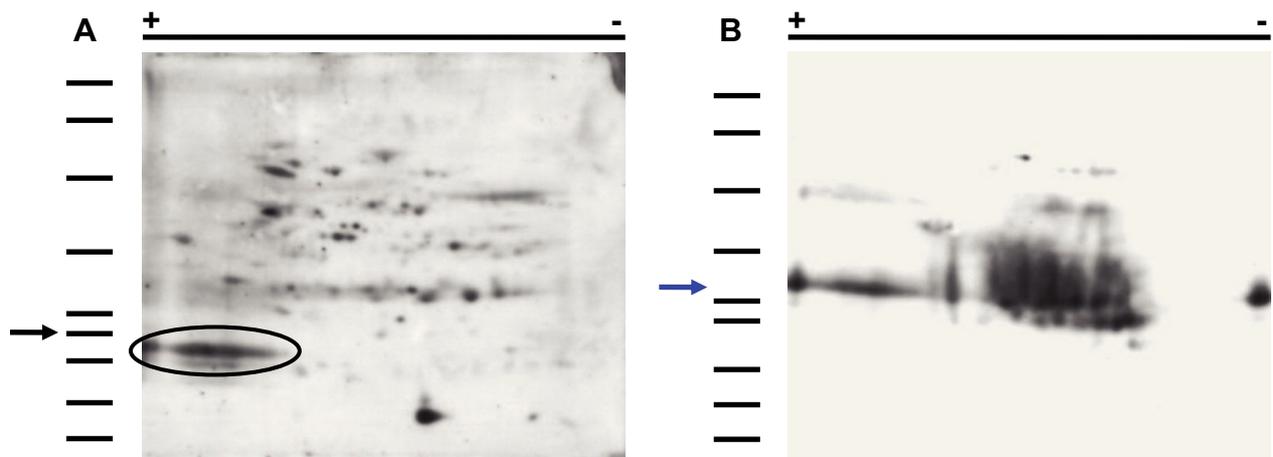


Abb. 4.47: Westernblot einer 2-D-Gelelektrophorese. AK: NProSP-C (A) und CTermB (B). Material: MP-Präparation aus 10ml BALF pro Streifen. Es zeigte sich links anodennah etwas unterhalb des 17kD Bereichs eine Bande. Im 23kD Bereich der SP-B Proform zeigte sich rechts eine Bande über einen weiten pH-Bereich. → 17kD, → 23kD.

Im Westernblot (Abb. 4.47) zeigte sich für Pro-SP-C eine anodennahe Bande, die allerdings etwas unterhalb des 17kD Bereiches auftrat. Pro-SP-B ist über einen weiten pH-Bereich verteilt.

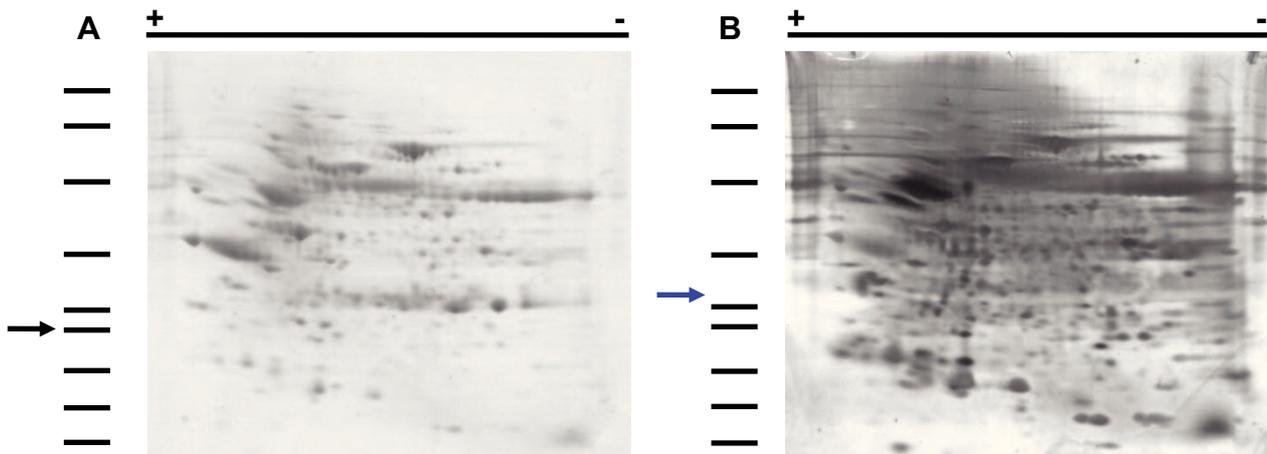


Abb. 4.48: Coomassie- (A) bzw. Silberfärbung eines 2-D-Gels (B). Es zeigten sich im Bereich der Signale aus Abbildung 47 mehrere kleine Spots. → 17kD, → 23kD.

Die Färbungen (Abb. 4.48) ergaben in beiden Größenbereichen mehrere kleinere Spots.

Um zu überprüfen ob die erhaltenen Banden im 17kD Bereich von Pro-SP-C stammen, wurde der Versuch wiederholt und ein Westernblot mit der AK-Lösung ohne Peptid und ein Blot mit AK-Lösung mit Peptid versetzt (Abb. 4.49). Die Probenvorbereitung entsprach dem vorherigen Versuch.

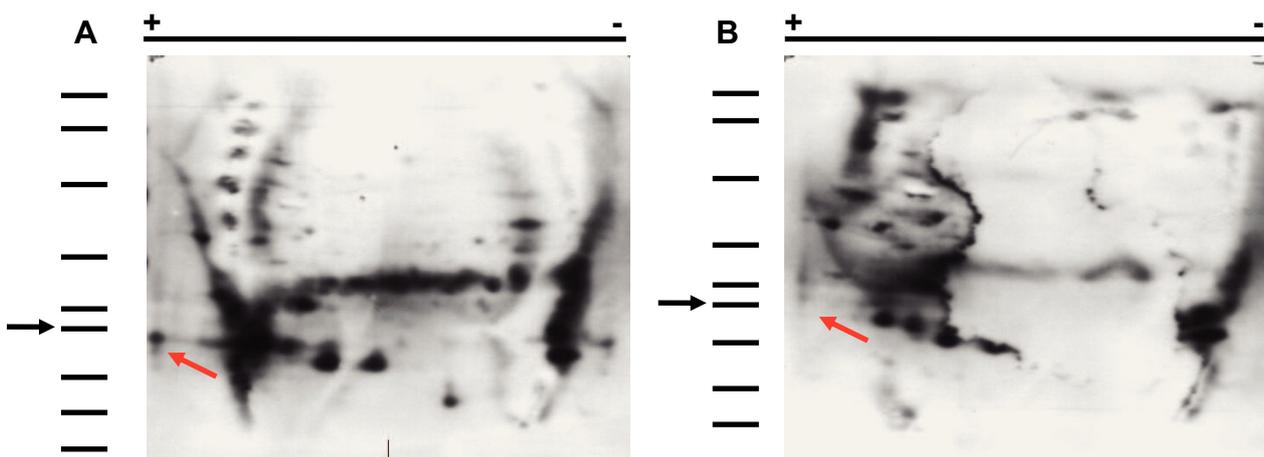


Abb. 4.49: Westernblot einer 2-D-Gelelektrophorese. AK: NProSP-C, (A) ohne-, (B) mit Peptid. Bei sehr schlechter Blotqualität zeigten sich die meisten Spots auf beiden Blots. In unmittelbarer Anoden-nähe sind allerdings einige Spots im 17kD Bereich (→) bei Inkubation mit AK + Peptid verschwunden (roter Pfeil).

Es zeigte sich, dass die meisten Signale unspezifisch waren, da sie auf beiden Blots auftauchten. Anodennah im 17kD Bereich zeigte sich allerdings ein Spot (roter Pfeil), der durch Inkubation mit AK + Peptid nicht mehr zu detektieren war.

Um eine schärfere Auftrennung zu erhalten, wurden im Folgenden pH-Streifen mit einem engeren pH-Bereich verwendet.

Mittels 2-D-Gelelektrophorese im pH-Bereich 3,0 – 10,0 ergab sich anodennah bei 17kD ein Spot, der bei Inkubation mit Antikörper + Peptid verschwand, was für das Vorhandensein des Zielproteins spricht.

4.2.7.2 pH – Bereich 3,5 – 6,0

In einem ersten Versuch wurde als Probenmaterial eine MP-Präparation aus 10ml BAL pro Streifen verwendet. Es ergab sich folgender Westernblot nach 45min Detektionszeit:

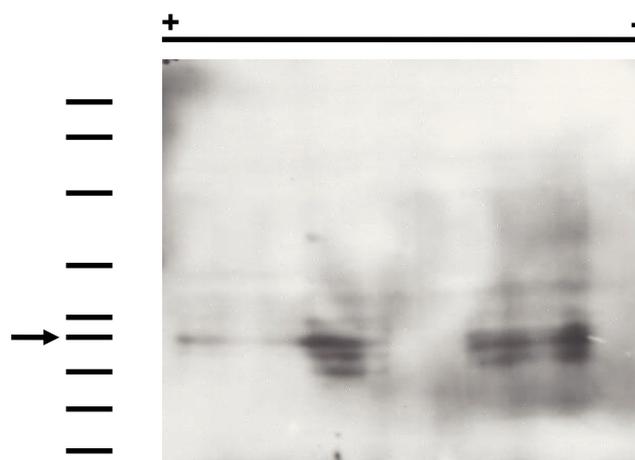


Abb. 4.50: Westernblot einer 2-D-Gelelektrophorese. AK: NProSP-C. Material: MP aus 10ml BALF. Es zeigte sich eine Bande etwas unterhalb des 17kD Bereichs. ➔ 17kD.

Es zeigte sich etwas unterhalb des 17kD Bereiches eine Bande, die sich über einen weiten pH-Bereich erstreckte. Die Unterbrechungen lagen unter Umständen an einer Beschädigung des pH-Streifens durch den hohen Salzgehalt der Probe.

Der Versuch wurde deshalb wiederholt und die Probenaufbereitung geändert. Die MP wurden zum Entsalzen mehrfach mit kaltem H₂O gespült, bevor sie lyophilisiert wurde.

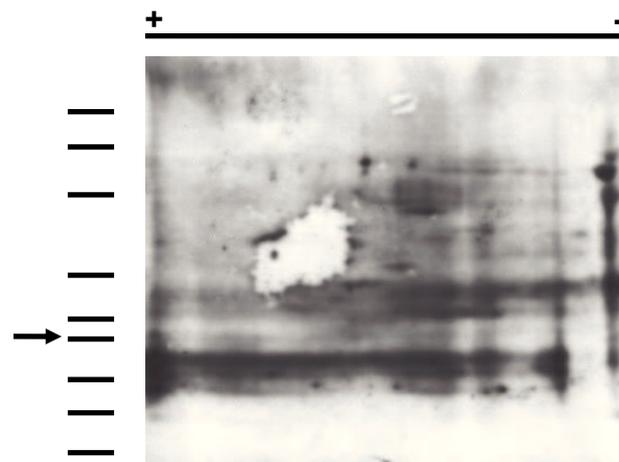


Abb. 4.51: Westernblot einer 2-D-Gelelektrophorese. AK: NProSP-C. Material: MP aus 10ml BALF. Es zeigte sich eine dünne Bande im 17kD Bereich. Stärkere Banden oberhalb bzw. unterhalb dieses Bereiches. → 17kD.

Der Blot zeigte eine dünne Bande im 17kD Bereich nahezu über den gesamten pH-Bereich. Stärkere Banden, die sich ebenfalls über den gesamten pH-Bereich erstreckten, fanden sich etwas ober- und unterhalb des Zielbereiches.

Im verwendeten pH-Bereich fanden sich keine engbegrenzten Spots bei 17kD, vielmehr zeigten sich Banden über den gesamten pH-Bereich. Eine Isolierung gelang in diesem pH-Bereich nicht.

4.2.7.3 pH – Bereich 4,0 – 7,0

Die Versuche wurden analog zu denen im pH-Bereich 3,5 – 6,0 durchgeführt. Im ersten Versuch wurden die Proformen von SP-B und SP-C detektiert. Auch in diesem pH-Bereich ergaben sich keine Spots sondern eine praktisch durchgängige Linie etwas unterhalb des 17kD Bereichs. Auch hier zeigten sich im pH-Streifen einige Unterbrechungen, die auf eine Beschädigung des Streifens bei hohem Salzgehalt der Probe zurückzuführen sind.

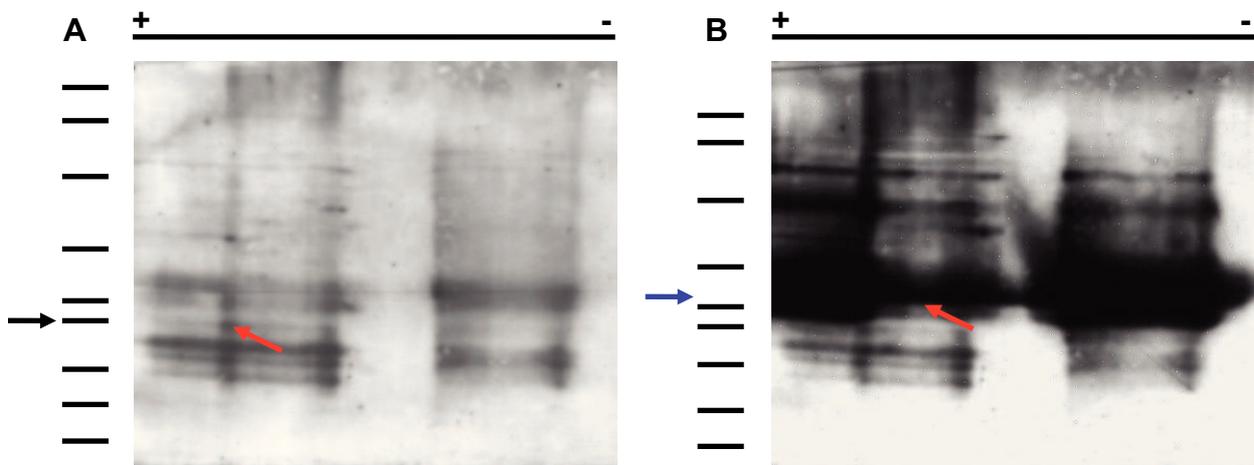


Abb. 4.52: Westernblot einer 2-D-Gelelektrophorese. AK: NProSP-C (A), CTermB (B). Material: MP aus 10ml BALF. Es zeigten sich für beide Proformen keine einzelnen Spots, sondern praktisch durchgängige Banden (rote Pfeile). → 17kD, → 23kD.

Für den nächsten Blot wurde die MP zum Entsalzen mehrmals mit kaltem H₂O gespült, bevor sie lyophilisiert wurde.

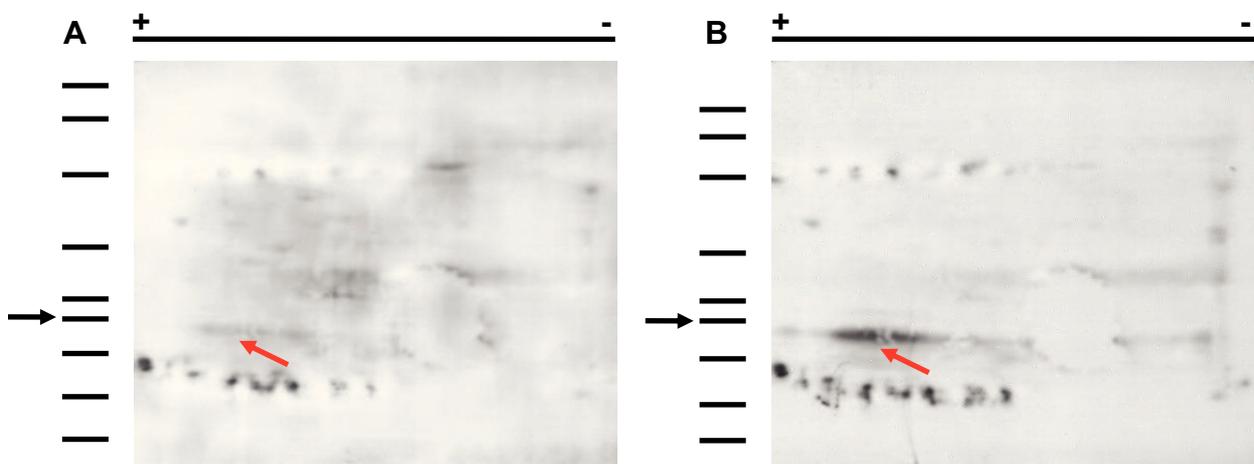


Abb. 4.53: Westernblot einer 2-D-Gelelektrophorese. AK: NProSP-C von Davids (A), NProSP-C von Beers (B). Material: MP aus 10ml BALF. Etwas unterhalb des 17kD Bereichs der Anodenhälfte ist eine längere Bande in beiden Abbildungen zu sehen (roter Pfeil). → 17kD.

Abgegrenzte Spots ließen sich im Zielgrößenbereich nicht detektieren. Es zeigte sich allerdings in beiden Abbildungen eine Bande etwas unterhalb des 17kD Bereiches.

Auch in diesem pH-Bereich ließen sich keine abgegrenzten Spots im Zielgrößenbereich detektieren.

4.2.8 Immunopräzipitation

Ziel war es, mit Hilfe der Immunopräzipitation eine Anreicherung der Proform des SP-C zu erreichen. Es wurde die unter 3.8.2 beschriebene Methode verwendet.

Die Präzipitation erbrachte folgende Ergebnisse:

Protein G ergab ein Signal unterhalb der 31kD Bande.

Die reine AK-Lösung zeigte Banden bei 17kD, zwischen 6 und 11kD sowie über einen weiten Größenbereich, beginnend in etwa auf Höhe der Protein G Bande (Abb. 4.54).

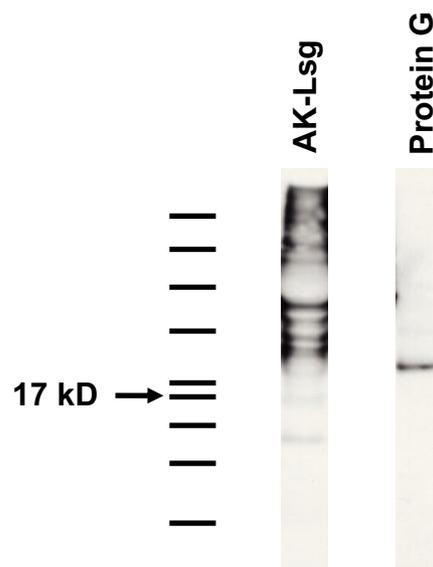


Abb. 4.54: Westernblot von Fraktionen der Immunopräzipitation. AK: ProSP-C (Chemicon AB3786). Material: Protein G (rechts), AK-Lösung (links).

Ein Signal etwas unterhalb des Bereiches des Zielproteins ergab sich sowohl auf der Bahn des komplett prozessierten Pellets [F], als auch in den Fraktionen aller Zwischenschritte und Kontrollen [A – E] (Abb. 4.55).

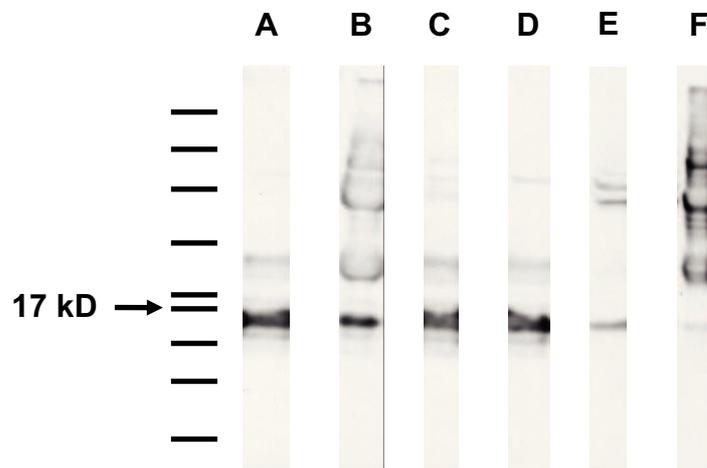


Abb. 4.55: Westernblot von Fraktionen der Immunopräzipitation. AK: ProSP-C (Chemicon AB3786). Material: 25ml BALF-Lyophilisat. Es zeigte sich auf allen Bahnen eine Bande etwas unterhalb der 17kD Markierung.

Ob es zu einer Anreicherung kam, ließ sich mit diesem Versuch nicht beurteilen.

In einem nächsten Schritt wurde das im obigen Versuch nicht gebundene, aber eine Bande knapp unterhalb des 17kD Bereichs zeigende Material (Fraktion D) weiterverarbeitet (siehe 3.7.2.1).

Das Coomassie – Gel ergab keine Banden bei 17kD. Allerdings zeigte sich in der E2 Bahn weiterhin die AK-Bande. Somit schien das Ausfällen des Antikörpers nicht funktioniert zu haben (nicht abgebildet).

Der zugehörige Westernblot ergab nur eine sehr schwache Bande in der Fraktion W1. In den Fraktionen E1 und E2 waren keine Banden detektierbar (Abb. 4.56).



Abb. 4.56: Westernblot einer Fraktion der weiterverarbeiteten Fraktion D der vorausgegangenen Immunopräzipitation. AK: ProSP-C (Chemicon AB3786). Es zeigte sich nur eine schwache Bande in der Fraktion W1.

Es wurde eine erneute Präzipitation (siehe 3.7.2.1) durchgeführt. Von der präzipitierten Probe wurden 20% für eine Westernblotanalyse verwendet. Die anderen 80% zur Herstellung eines Coomassie – gefärbten Gels benutzt.

Auf dem Westernblot zeigte sich eine im Vergleich zu den Banden des Ausgangsmaterials sowie der Fraktion des Überstandes schwache Bande (Abb. 4.57).

Es gelang somit nicht, die Proform des SP-C mit Hilfe dieser Methode anzureichern.

Auf dem Coomassie – Gel ließ sich in der Präzipitationsfraktion im Bereich der Bande des Westernblots unterhalb des 17kD Marke keine Bande nachweisen (nicht gezeigt).

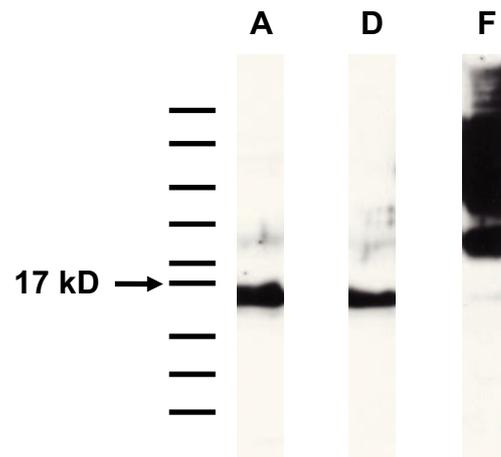


Abb. 4.57: Westernblot der Fraktionen einer Immunopräzipitation. AK: ProSP-C (Chemicon AB3786). Es zeigte sich eine im Vergleich zu den Fraktionen A und D schwache Bande in der Fraktion F. A: Ausgangsmaterial, D: Überstand, F: Pellet.

Es gelang nicht, die Proform des SP-C mit Hilfe der Immunopräzipitation anzureichern.

4.2.9 Massenspektrometrie eines Elektrophoresegelbereichs von Fraktionen der Immunopräzipitation

Obwohl es mit der Immunopräzipitation (siehe 3.7.2) nicht gelang, genügend Material für eine sichtbare Bande in der Coomassiefärbung zu erhalten, wurde ein Elektrophoresegelabschnitt zur Massenspektrometrie geschickt (siehe 3.7.2.2).

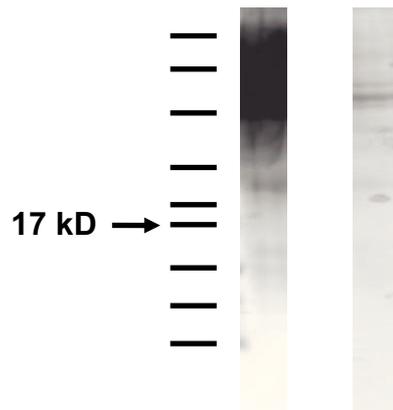


Abb. 4.58: Coomassie – Gel von gepoolten Fraktionen der Immunopräzipitation. Der Bereich um 17kD der dargestellten Bahnen wurde zur massenspektrometrischen Untersuchung gegeben.

Mittels massenspektrometrischer Verfahren unserer Kooperationspartner (D. Galletskiy, Michael Przybylski, Universität Konstanz) gelang es, mehrere Aminosäuresequenzen in den Vorläuferformen von SP-C und SP-B zu identifizieren¹⁹. Es wurden folgende Sequenzen in den einzelnen Vorläuferformen veröffentlicht:

Proform	Molekulargewicht (kD)	identifizierte Sequenzen
Pro-SP-C	15	126-139
Pro-SP-C	15	64-81, 126-139
Pro-SP-C	11	126-139
Pro-SP-C	9	126-139
Pro-SP-B	26	85-94, 166-175, 253-264, 287-295
Pro-SP-B	24	166-175, 253-264, 287-295
Pro-SP-B	22	166-175, 253-264, 287-29

Tab. 4.8: Übersicht über die durch massenspektrometrische Verfahren identifizierten Aminosäuresequenzen in den einzelnen Vorläuferproteinen.

5 Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit wurden in einem ersten Schritt die Verläufe von vier Fällen einer juvenilen Alveolarproteinose bzw. einer Kombination aus PAP und unspezifischer interstitieller Pneumonie aufgearbeitet sowie unterschiedliche Therapieansätze auf deren Effektivität hin untersucht.

Bei Patient 1 konnte eine heterozygote missense Mutation (g.1286T>C) im SP-C-Gen nachgewiesen werden. Histologisch zeigt sich ein Mischbild aus NSIP und PAP¹³. Nach anfänglichen Ganzlungenlavagen ist es gelungen, den Patienten durch eine kombinierte antiinflammatorische und immunsuppressive Therapie mittels Glukokortikoiden und Azathioprin pulmonal stabil zu halten. Eine supportive Sauerstoffgabe ist allerdings weiterhin notwendig.

Das Therapieschema der Patientin 2 umfasst momentan die regelmäßige (alle 3,5 bis 5,5 Wochen) Durchführung von Ganzlungenlavagen. Darunter gelang es die Erkrankung soweit zu stabilisieren, dass intermittierende Pausen der supportiven Sauerstoffversorgung möglich sind. Die zu Beginn der Krankheit eingesetzten Therapien mit GM-CSF, Glukokortikoiden und Azathioprin zeigten keine nachhaltigen Erfolge. Bei der Patientin konnte eine GM-CSF R α Mutation im Verlauf nachgewiesen werden (Veröffentlichung in Vorbereitung).

Bei Patientin 3 konnten wiederholt keine bzw. extrem niedrigtitrige GM-CSF-Autoantikörper im Serum nachgewiesen werden. Die PAP der Patientin wird als sporadische PAP, jedoch ohne sichere autoimmunologische Ursache, eingeordnet; inwieweit eine genetische oder eine exogene, bisher nicht bekannte Auslösung vorliegt, müssen weitere Verlaufs- und zellbiologische Untersuchungen zeigen. Mit der Durchführung regelmäßiger Ganzlungenlavagen (alle drei bis sechs Monate) zeigt die Patientin einen erfreulichen Verlauf mit zuletzt normaler Lungenfunktion (Werte nicht dargestellt).

Bei der Patientin 4 trat im Rahmen einer Niemann-Pick Typ C2 Erkrankung eine sekundäre Form der PAP auf. Bei der Grunderkrankung handelt es sich um eine autosomal rezessiv vererbte Lipidspeichererkrankung, welche die viszerale Organe und das zentrale Nervensystem betrifft. Die Patientin verstarb im Alter von neun Monaten²¹.

In einem zweiten Schritt ist mittels Proteinchemie die Isolation eines aberranten SP-C-Vorläuferproteins des zuvor dargestellten Patienten 1 mit deNovo Mutation im SP-

C-Gen¹³ versucht worden. Es gelang mittels eines mehrstufigen Extraktionsverfahrens in Kombination mit einer 1D-Gelelektrophorese das gesuchte Protein soweit anzureichern, dass es massenspektrometrisch untersucht werden konnte. Das Vorläuferprotein ließ sich in einer weiterführenden Arbeit in den 9, 11 bzw. 15kD Banden einer 1D-Gelelektrophorese einer aufgearbeiteten BALF des Patienten nachweisen. Durch die Kombination aus Massenspektrometrie und proteinchemischer Verfahren konnte indirekt der Beweis erbracht werden, dass die bei dem Patienten gefundene Mutation in die Prozessierung des reifen SP-C eingreift und zur intraalveolären Anhäufung bestimmter Zwischenprodukte führt¹⁹.

Die klinischen Verläufe und die Darstellung der verschiedenen bei den Patienten angewandten therapeutischen Strategien wurden durch Aktenstudium retrospektiv ermittelt. Daher ist die Genauigkeit der Darstellung von der bei der Aktenführung vorhandenen Präzision abhängig. Andere Arbeiten zu Verlaufsuntersuchungen bei PAP^{20, 4} waren prospektiv angelegt, so dass hierfür eine vorherige Festlegung der zu verfolgenden Parameter möglich war. Dies ist jedoch bei der extremen Rarität dieser Erkrankungen im Kindesalter praktisch nicht möglich; es handelt sich immer um komplexe Einzelfälle. Die Aufarbeitung von Verläufen seltener Erkrankungen ist dennoch entscheidend, um aus möglichst vielen veröffentlichten Verläufen Behandlungsstrategien für den Einzelfall entwickeln zu können und später dann in multizentrischen, interkontinentalen Ansätzen zu prüfen.

Es ist unerlässlich, die Relevanz der gefundenen Mutationen für die der Erkrankungen zu Grunde liegenden Veränderungen zu überprüfen. Dazu können die möglichen mutationsbedingten Veränderungen auf Proteinebene beitragen. Diese aufzuklären gestaltet sich nicht selten sehr schwierig. Oft ist der Einsatz eines breiten Spektrums an Methoden notwendig, um Erfolge zu erzielen. Dies spiegelt sich auch an der Vielzahl der in dieser Arbeit zum Einsatz gekommenen Verfahren (Immunopräzipitation, Methanol-Chloroform-Präzipitation, 1-D/2-D-Gelelektrophorese, Westernblotanalyse, chromatographische Verfahren, Massenspektrometrie) wider. Kooperationen zwischen einzelnen Arbeitsgruppen, wie hier mit der Universität Konstanz, sowie der Einsatz moderner und zum Teil sehr aufweniger Methoden (u.a. Massenspektrometrie) können bei der Aufklärung helfen.

Die bei **Patient 1** zu Grunde liegende Mutation und deren Folgen sind ausführlich von Brasch et al¹³ beschrieben worden. In den ersten Jahren der Erkrankung konnte mit der Durchführung von Ganzlungenlavagen eine Stabilisierung erreicht werden. Das zur Anwendung gekommene Protokoll ist von Paschen et al³⁴ veröffentlicht worden. Das morphologische Bild der Lunge hat sich im Verlauf der Erkrankung verändert. Nach und nach ist eine ausgeprägte Wabenlunge entstanden. Ähnliche Veränderungen der Organstruktur bei Mutationen im SP-C-Gen sind von Guillot et al 2009 beschrieben worden²².

Die mit dieser Mutation verbundene aberrante SP-C-Proform wurde immunhistochemisch weiter untersucht. Zunächst gelang es zu zeigen, dass sich das Protein in der Mittelphase einer Extraktion wie von Beers et al⁵ beschrieben anreichern lässt. Es gelang jedoch nicht, wie für SP-B gezeigt, das Protein durch Ansäuerung in die hydrophobe Unterphase zu überführen. Im Anschluss wurde mit diversen Methoden daran gearbeitet, das Protein von den anderen Bestandteilen der Mittelphase zu separieren. Es wurden dazu Verfahren wie die 2-D-Gelelektrophorese, die Kationen- bzw. Anionenaustauschchromatographie, die Gelfiltration, die Immunopräzipitation aber auch die HPLC eingesetzt. Es konnte in keinem der Versuche zur Aufreinigung mittels Immunoblot eine reproduzierbare Bande im gesuchten Zielbereich des aberranten Pro-SP-C detektiert werden. Deshalb wurde auf die Massenspektrometrie aus einem angereicherten Proteingemisch zurückgegriffen. Dazu wurden 175ml BALF verarbeitet (7 Bahnen à 25ml). Die Proteinmenge pro Bahn betrug 7,5mg (300,4 µg/ml). Das Coomassie gefärbte Gel wurde massenspektrometrisch untersucht. Es wurden SP-C-Vorstufen aus den 9, 11 und 15kD Banden identifiziert¹⁹.

SP-C ist ein bedeutender Bestandteil der alveolären Oberfläche. Normalerweise finden sich keine Proformbestandteile in der Lavageflüssigkeit. Bei Patienten mit der Mutation I73T im SP-C-Gen finden sich in der BALF neben reifem SP-C auch Vorläuferformen des Proteins. Es gelang, zwei 15kD große Vorläuferproteine näher zu charakterisieren:

Eine Proform ließ sich mittels des N-terminalen Antikörpers Anti-NproSP-C (1-20) detektieren und enthält neben dem N-Terminus das reife SP-C. Weitere Prozessierungen führen zu reifem SP-C, welches in der BALF des Patienten nachgewiesen werden konnte¹⁹.

Das zweite Vorläuferprotein entsteht möglicherweise durch eine C-terminale Spaltung. Die Detektion erfolgte hier mittels des C-terminalen Antikörpers Anti-CproSP-C

(162-175). Es zeigte sich, dass dieses Protein Teile des C-terminalen Propeptides enthält. Somit könnte es sich hier um ein aberrant prozessiertes Pro-SP-C handeln.

Die Identifikation einer weiteren 11kD C-terminalen und 9kD Vorläuferform würde zu einem anomalen Prozessierungsweg des SP-C passen, der dennoch reifes SP-C entstehen lässt.

Durch Vergleich der Molekulargewichte der in den Gelbanden gefundenen Vorläuferproteine mit den berechneten Massen der Sequenzen [59-197], [59-175] und [59-139] mit 15kD, 13kD und 9kD zeigt sich, dass sowohl die gefundene 11kD-Form mit Bestandteilen der Sequenz [126-175] als auch die gefundene 9kD Form mit der Sequenz [126-139] kein reifes SP-C [24-58] enthält.

Das komplette C-terminale Ende des Pro-SP-C ist innerhalb des endoplasmatischen Retikulums sowie der Golgi-Vesikel lokalisiert. Es enthält die sogenannte Brichos Domäne, welcher Chaperon-ähnliche Eigenschaften zugesprochen werden und die dadurch Schutz vor Fehlfaltungen und Aggregationen des Proteins bietet.²⁸ Das Vorliegen eines irregulären SP-C-Vorläufers führt möglicherweise zu intrazellulären toxischen Effekten, zu denen auch die fehlerhafte Prozessierung von SP-B gehört. Veränderungen des endoplasmatischen Retikulums und Apoptose sind mögliche weitere Folgen. Diese Vorgänge wurden von Beers et al beschrieben⁵.

Patientin 2 wurde im Krankheitsverlauf mit mehreren als experimentell einzustufenden Therapieoptionen behandelt. Dazu gehörte unter Anderem ein Therapieversuch mit GM-CSF. In den letzten Jahren wurde die Rolle von GM-CSF in der Pathogenese der PAP untersucht. Ausgangspunkt war die unerwartete Beobachtung, dass Mäuse mit ausgeschaltetem GM-CSF-Gen eine der PAP ähnliche Lungenpathologie entwickeln¹⁷. Diese kann sowohl durch Aktivierung des GM-CSF-Gens²⁶ als auch durch die Gabe von GM-CSF³⁸ korrigiert bzw. gebessert werden. Veränderungen am GM-CSF-Rezeptor sind bei Patienten mit PAP beobachtet worden. Diese können entweder die Liganden bindende alpha-Kette^{45, 32} oder die für die Signaltransduktion verantwortliche gemeinsame beta-Kette des GM-CSF/II-3/II-5 Rezeptors^{7, 16} betreffen. Nach Beginn der Therapie hat sich bei unserer Patientin zunächst ein Anstieg der Eosinophilen auf 16,9% im peripheren Blut gezeigt. Lieschke et al haben eine Eosinophilie als Reaktion auf die Gabe von rekombinantem GM-CSF beschrieben³⁰. Die Anfangsdosis der Patientin 2 betrug 3µg/kg/KG/d. Diese wurde bis auf 40µg/kg/KG/d gesteigert. In einer von Venkateshiah et al veröffentlichten prospektiven Studie zum

Einsatz von rekombinantem subkutan verabreichten GM-CSF bei 25 erwachsenen Patienten mit idiopathischer PAP wurden maximal 18µg/kgKG/d verabreicht. In der Studie wird von sichtbaren Verbesserungen in 48% der Fälle berichtet⁴⁸. Unter Therapie mit hochdosiertem GM-CSF subkutan wurde bei der Patientin v.a. bei Aufregung ein sich Zwicken beobachtet. Auch fanden sich immer wieder Kratzspuren auf der Haut der Patientin. Es erfolgte probeweise die Umstellung auf eine inhalative Applikation. In der oben erwähnten Untersuchung von Venkateshiah et al wurde auto-aggressives Verhalten als Nebenwirkung der GM-CSF-Therapie nicht aufgeführt⁴⁸. Zur Inhalation ist das rekombinante GM-CSF in 3ml NaCl 0,9% gelöst und über einen Vernebler der Firma Pari[®] inhaliert worden. Wylam et al veröffentlichten Daten zur inhalativen Gabe von GM-CSF. Die adulten Patienten mit idiopathischer PAP haben 250 bis maximal 500µg GM-CSF zweimal täglich jede zweite Woche erhalten. Elf von zwölf Patienten sprachen auf die Therapie an. Über Juckreiz als Nebenwirkung wurde nicht berichtet⁵⁰. Auch Robinson et al berichteten über den erfolgreichen Einsatz von inhalativem GM-CSF bei zwei jugendlichen Patienten mit autoimmuner PAP⁴⁰.

Im Verlauf ließ sich bei Patientin 2 kein messbarer Effekt des GM-CSF auf die Krankheitsschwere nachweisen und auch der anfänglich gestiegene Eosinophilenprozentsatz im peripheren Blut, der als Ansprechen auf die Therapie interpretiert wurde, sank im Verlauf wieder ab. Es kam nicht zu einer Normalisierung der LDH-Werte, eines dauerhaften CEA-Abfalls oder einer anhaltenden Reduktion des Sauerstoffbedarfs. Die Aufarbeitung der durchgeführten Ganzlungenlavagen zeigte keine signifikanten Veränderungen während des Therapiezeitraums im Vergleich zu den Lavagen außerhalb des GM-CSF Einsatzes.

Inoue et al konnten zeigen, dass die Schwere der Krankheit mit bestimmten Serummarkern korreliert, u.a. mit LDH und CEA²⁷. In einer Untersuchung von Seymour et al zeigten lediglich zwei von elf PAP-Patienten mit erhöhten LDH-Werten zu Beginn der Therapie ein Ansprechen auf die Gabe von GM-CSF, wohingegen alle drei Patienten mit initial normalen LDH-Werten im Serum auf die Gabe reagierten⁴².

Die bei der Patientin 2 im Verlauf gefundene Mutation in GM-CSF-Rezeptor bietet einen möglichen Erklärungsansatz für den ausgebliebenen Therapieerfolg durch GM-CSF. Sollte die Mutation einen kompletten bzw. nahezu kompletten Funktionsausfall des Rezeptors bewirken, kann die Zufuhr von zusätzlichem GM-CSF keinen Erfolg bringen. Ein relativer Zytokinmangel durch Autoantikörper gegen GM-CSF konnte nicht nachgewiesen werden.

Der zunächst beobachtete Anstieg der Eosinophilen nach Therapiebeginn ist möglicherweise als eine Reaktion auf die Gabe des Zytokins zu interpretieren.

Andererseits berichten Tazawa et al in einer Serie von drei Patienten mit idiopathischer PAP über eine deutliche Verbesserung von Serummarkern (u.a. CEA, KL-6) im Rahmen der inhalativen GM-CSF-Therapie⁴⁶. Auch wird von einer Abnahme der Autoantikörpertiter im Serum berichtet^{10, 42}. Bei unserer Patientin ließ sich keine signifikante Veränderung der LDH- bzw. CEA-Werte im Behandlungszeitraum registrieren. Die weitere Untersuchung der Auswirkungen der gefundenen Mutation könnte unter Umständen eine Erklärung für den nicht erfolgreichen Therapieversuch mittels GM-CSF erbringen.

Yamamoto et al haben von einem 9-jährigen Mädchen mit autoimmuner PAP berichtet, bei der es erst nach dreimaliger Halblungenlavage zu einem Ansprechen auf die inhalative GM-CSF-Applikation kam. Im Verlauf ist die Dosierung des GM-CSF von initial 250µg/d auf 125µg alle drei Tage gesenkt worden. Laut den Autoren spricht der auch nach über einem Jahr nach Symptombeginn noch hohe KL-6 Wert im Serum sowie Reste einer Milchglastrübung im CT für ein weiter aktives Krankheitsgeschehen, das die Fortsetzung der GM-CSF-Inhalation notwendig macht⁵¹.

Barraclough veröffentlichten bereits 2001 den Fall eines 34-jährigen Mannes mit durch Biopsie gesicherter PAP, bei dem sich nach dreimonatiger Behandlung mit 5µg/kgKG/d GM-CSF bei subkutaner Applikation eine komplette Remission einstellte³.

Price et al berichteten über ein bei Erkrankungsbeginn 13-jähriges eineiiges Zwillingmädchen, das nach fehlgeschlagener Lavage-Therapie mit inhalativem GM-CSF behandelt wurde. GM-CSF-Autoantikörper ließen sich bei ihr sowohl im Serum als auch in der BALF nachweisen. Zum Zeitpunkt der Erstvorstellung zeigte das Mädchen eine Gedeihstörung sowie dezente Trommelschlegelfinger. Die Therapie wurde mit 500µg/d begonnen, nach neun Monaten auf 250µg/d reduziert und nach zwölf Monaten abgesetzt. Bereits nach einem Monat Therapie wurde eine Zunahme der Belastbarkeit beobachtet. Drei Monate nach Therapieende hatten sich die Trommelschlegelfinger zurückgebildet und die Körpergröße hatte die der gesunden Zwillingsschwester erreicht³⁷.

Das aktuelle Therapiekonzept der Patientin 2 umfasst die regelmäßige Durchführung von Ganzlungenlavagen. Der Ablauf der Ganzlungenlavage in unserem Zentrum ist von Paschen et al³⁴ beschrieben worden. Beccaria et al haben 21 erwachsene Pati-

enten mit idiopathischer PAP über einen Zeitraum von zwölf Jahren nach Ganzlungenlavage beobachtet⁴. Sie konnten bestätigen, dass es sich um eine sichere, effektive und mit langfristigem Erfolg versehene Behandlungsmethode bei Patienten mit idiopathischer PAP handelt. Anders als bei unserer Patientin, waren 70% der Studienteilnehmer auch sieben Jahre nach erfolgter Ganzlungenlavage rezidivfrei. Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Brustwandperkussion während der Ganzlungenlavage die Menge an ausgewaschenem Material erhöhen kann. Die Untersuchung von Hammon et al²³ sieht eine Überlegenheit der manuellen Perkussion gegenüber der mechanischen Variante. Perez et al beschreiben einen Ablauf in 3 Schritten zur Erhöhung der Effektivität der Ganzlungenlavage. Zunächst wird in Rückenlage begonnen bis der Rückfluss klar erscheint, es schließt sich eine manuelle Thoraxperkussion während der Weiterführung der Ganzlungenlavage an. Diese wird bis zum Erhalt eines klar erscheinenden Rückflusses fortgesetzt. Der letzte Schritt besteht aus der Umlagerung des Patienten in Bauchlage sowie Fortsetzung der Ganzlungenlavage unter Perkussion bis zu Erhalt eines klaren Rückflusses³⁵. Bei unserer Patientin wurde ebenfalls versucht, die Effektivität der Lavage durch parallelen Einsatz einer Schüttelweste (The Vest[®]; Hill-Rom; Batesville, Indiana; USA) zu erhöhen. Wegen der Gefahr der Tubusdislokation musste dieser Versuch allerdings abgebrochen werden.

Bei der **dritten Patientin** konnten sechs Wochen nach Diagnosestellung mittels Ganzlungenlavage und thorakoskopischer Lungenbiopsie keine oder allenfalls niedrige im Normalbereich liegende Autoantikörper gegen GM-CSF im Serum nachgewiesen werden²⁹. Es ist noch nicht definitiv klar, um welche Form der PAP es sich handelt.

Patientin 4 zeigt den Fall einer sekundären PAP bei einer Patientin mit Niemann-Pick Typ C2²¹. Die subkutane Gabe von GM-CSF hatte bei der Patientin keinen definitiven Effekt auf die Schwere der PAP. Eine Besserung der pulmonalen Situation ergab sich in diesem Fall durch regelmäßige, bronchoalveoläre Lavagen. Die Patientin verstarb einen Tag nach der fünften Ganzlungenlavage bei der es zu einem Pneumothorax gekommen war.

In der jüngeren Vergangenheit wurden einige Fallberichte über Therapieerfolge bei PAP mittels experimenteller Ansätze publiziert.

So berichtete Hashizume über den Fall einer 70-jährigen Patientin mit idiopathischer PAP, die auf eine zweimalige Ganzlungenlavage nicht ansprach. Daraufhin wurde mit der Gabe von 45mg Ambroxol, einem Surfactantaktivator pro Tag begonnen. Innerhalb von vier Monaten kam es zu einer deutlichen Verbesserung des Zustandes der Patientin. Die Dyspnoe ging zurück, die Sauerstoffsättigung stieg auf 97% und die radiologischen Veränderungen normalisierten sich. Auch fielen zuvor erhöhte Serummarker wie CEA und LDH. Zwei Jahre danach ist die Patientin unter oraler Ambroxolgabe weiterhin in Remission²⁴.

Desweiteren publizierten Cho et al den Fall einer weiblichen Patientin mit kongenitaler PAP, bei der es nach erfolgloser Durchführung von insgesamt drei Ganzlungenlavagen mittels intravenöser Immunglobulin Gabe gelang, erfolgreich zu behandeln. Untersuchungen zur Bestimmung des zu Grunde liegenden Defekts ergaben eine eingeschränkte Sekretion von Immunglobulinen aus B-Zellen und eine herabgesetzte Phagozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen. Ein ursächlicher Gendefekt konnte nicht ermittelt werden. Die Patientin hat drei Brüder. Zwei von ihnen verstarben an einer PAP nach 91 beziehungsweise 162 Lebenstagen. Der dritte Bruder ist gesund. Die beschriebene Patientin zeigte über einen Beobachtungszeitraum von über drei Jahren unter monatlicher Immunglobulingabe keine weiteren respiratorischen Symptome und entwickelte sich neurologisch unauffällig¹⁵.

Als weitere Therapieoption wird der Einsatz einer Plasmapherese zur Reduktion Autoantikörper gegen GM-CSF bei autoimmuner PAP diskutiert. Über den Nutzen dieser Therapie gibt es unterschiedliche Angaben in der Literatur. So beschrieben Bonfield et al den erfolgreichen Einsatz dieser Technik¹⁰. Bei einer 43jährigen Patientin kam es parallel zu einer deutlichen Reduktion der Autoantikörperspiegel im Serum sowie einer deutlichen Verbesserung der Oxygenierung des Blutes. Dagegen berichteten Luisetti et al³¹ von einem 40 Jahre alten Mann mit autoimmuner PAP, bei dem die Plasmapherese nicht von einer klinischen Verbesserung der Situation begleitet wurde und im Verlauf weitere Ganzlungenlavagen notwendig waren. Allerdings lag der Autoantikörperspiegel nach Plasmapherese mit 1156µg/ml noch über dem durchschnittlichen Wert von 113 +/- 7µg/ml, den Trapnell et al bei 158 Patienten mit aktiver Lungenerkrankung bei autoimmuner PAP ermittelten⁴⁷. Interessanterweise ist der Antikörperspiegel in diesem Fall in einem Zeitraum von 24 Monaten nach Been-

digung der Plasmapherese auf einen Wert von 56µg/ml abgefallen. In diesem Zeitraum wurden drei weitere Ganzlungenlavagen durchgeführt.

Borie et al berichteten vom erfolgreichen Einsatz von Rituximab, einem CD20 Antikörper, bei einem 41-jährigen Patienten mit autoimmuner PAP¹¹. Drei Monate nach Gabe ließ sich ein Rückgang der GM-CSF-Antikörper im Serum und des zirkulierenden anti-GM-CSF neutralisierenden Aktivitätstiters nachweisen. Neun Monate nach Infusion kam es zu einem Rückgang der Dyspnoe. Im CT und in Lungenfunktions-tests zeigte sich ebenfalls eine deutliche Verbesserung.

Bei seltenen Erkrankungen wie sie die PAP darstellt, ist es sehr wichtig, die Einzelfälle aufzuarbeiten und die Resultate beziehungsweise erfolgsversprechende Therapieansätze zu veröffentlichen. Nur so ist es möglich, aus einer relativ großen Grundgesamtheit allgemein gültige Therapiestrategien zu entwickeln beziehungsweise zu bestätigen. Nur publizierte Einzelfallberichte können bei seltenen Erkrankungen wertvolle Hilfestellungen für die konkrete Therapie und Weiterentwicklung des Feldes leisten. In Zukunft wird eine internationale Kooperation entscheidend sein, um ausreichende Fallzahlen dieser seltenen, schweren und vielfach tödlich verlaufenden Erkrankungen zusammenstellen zu können.

6 Zusammenfassung

Die pulmonale Alveolarproteinose des Kindes ist ein sehr seltenes Krankheitsbild. Verschiedene Formen der Erkrankung sind in den letzten Jahren beschrieben worden. Viele Therapieansätze sind experimentell und beruhen auf einzelnen, veröffentlichten Fallbeschreibungen. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, die Erkrankung an Hand von Einzelfällen klinisch und biochemisch näher zu charakterisieren.

Hierfür wurden biochemische Verfahren mit massenspektrometrischen Untersuchungen kombiniert, um aberrante Zwischenprodukte der Surfactantproteine B und C in der bronchoalveolären Lavage bei einem Patienten mit Mutation im Surfactantprotein C Gen näher charakterisieren zu können.

Die klinischen Verläufe von vier Patienten mit PAP unterschiedlicher Genese (Mutation im SFTPC-Gen, Mutation im GM-CSF R α -Gen, unklare Genese (Autoantikörper negativ), sekundär im Rahmen einer Niemann-Pick TypC2-Erkrankung) wurden in dieser Arbeit aufgearbeitet und der Effekt verschiedener zum Einsatz gekommener Therapieansätze bewertet. Bei dem Patienten mit der Mutation im SFTPC-Gen führte die Kombination der biochemischen Verfahren mit der Massenspektrometrie letztendlich zur Identifikation mehrerer Aminosäuresequenzen in den aberranten Vorläuferproteinen von SP-C und SP-B.

Klinisch zeigte sich bei den untersuchten Patienten ein positiver Effekt der bronchoalveolären Ganzlungenlavage auf die pulmonale Situation. Der Sauerstoffbedarf ging regelmäßig zurück. Auch zeigten sich Besserungen in den Röntgenthoraces. Der regelmäßige Einsatz bei einer Patientin führte zu einer deutlichen Stabilisierung des Krankheitsverlaufs. Der Einsatz von GM-CSF zeigte dagegen keine dauerhaft messbaren Effekte. Ähnliches gilt für die Glucocorticoidstoßtherapie eines weiteren Patienten.

Die Aufarbeitung und Veröffentlichung von Einzelfällen ist bei sehr seltenen Erkrankungen, wie sie die PAP darstellt, essentiell, um allgemein gültige Therapiestrategien entwickeln bzw. bestätigen zu können. Eine internationale Kooperation wird bei diesen Erkrankungen in Zukunft entscheidend sein, um die Behandlung dieser seltenen Erkrankungen weiterentwickeln zu können.

7 Literaturverzeichnis

1. Andujo O, Rosenfeld CR, Nielsen HC, Parker CR, and Snyder JM. Failure to detect a stimulatory effect of estradiol-17B on ovine fetal lung maturation. *Pediatr.Res.* 1987; 22: 145-9.
2. Bai Y, Galetskiy D, Damoc E et al. Lung alveolar proteomics of bronchoalveolar lavage from a pulmonary alveolar proteinosis patient using high-resolution FTICR mass spectrometry. *Anal.Bioanal.Chem.* 2007; 389: 1075-85.
3. Barraclough RM and Gillies AJ. Pulmonary alveolar proteinosis: a complete response to GM-CSF therapy. *Thorax* 2001; 56: 664-5.
4. Beccaria M, Luisetti M, Rodi G et al. Long-term durable benefit after whole lung lavage in pulmonary alveolar proteinosis. *Eur.Respir.J.* 2004; 23: 526-31.
5. Beers MF, Bates SR, and Fisher AB. Differential extraction for the rapid purification of bovine surfactant protein B. *Am.J.Physiol* 1992; 262: L773-L778.
6. Beers MF and Mulugeta S. Surfactant protein C biosynthesis and its emerging role in conformational lung disease. *Annu Rev Physiol* 2005; 67: 663-96.
7. Bewig B, Wang XD, Kirsten D, Dalhoff K, and Schafer H. GM-CSF and GM-CSF beta c receptor in adult patients with pulmonary alveolar proteinosis. *Eur.Respir.J.* 2000; 15: 350-7.
8. Blic J. Pulmonary alveolar proteinosis in children. *Paediatr Respir Rev* 2004; 5: 316-22.
9. Bligh EG and Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol.* 1959; 7: 911-7.
10. Bonfield TL, Kavuru MS, and Thomassen MJ. Anti-GM-CSF titer predicts response to GM-CSF therapy in pulmonary alveolar proteinosis. *Clin.Immunol.* 2002; 105: 342-50.

11. Borie R, Debray MP, Laine C, Aubier M, and Crestani B. Rituximab therapy in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Eur.Respir.J.* 2009; 33: 1503-6.
12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-54.
13. Brasch F, Griese M, Tredano M et al. Interstitial lung disease in a baby with a de novo mutation in the SFTPC gene. *Eur.Respir.J.* 2004; 24: 30-9.
14. Brasch F and Muller KM. Classification of pulmonary alveolar proteinosis in newborns, infants, and children. *Pathologie* 2004; 25: 299-309.
15. Cho K, Nakata K, Ariga T et al. Successful treatment of congenital pulmonary alveolar proteinosis with intravenous immunoglobulin G administration. *Respirology.* 2006; 11 Suppl: S74-S77.
16. Dirksen U, Nishinakamura R, Groneck P et al. Human pulmonary alveolar proteinosis associated with a defect in GM-CSF/IL-3/IL-5 receptor common beta chain expression. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 100: 2211-7.
17. Dranoff G, Crawford AD, Sadelain M et al. Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science* 1994; 264: 713-6.
18. Folch J, Lees M, and Sloane S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J.Biol.Chem.* 1957; 226: 497-509.
19. Galetskiy D, Woischnik M, Ripper J, Griese M, and Przybylski M. Aberrant processing forms of lung surfactant proteins SP-B and SP-C revealed by high-resolution mass spectrometry. *Eur.J.Mass Spectrom.* (Chichester, Eng) 2008; 14: 379-90.
20. Goldstein LS, Kavuru MS, Curtis-McCarthy P, Christie HA, Farver C, and Stoller JK. Pulmonary alveolar proteinosis: clinical features and outcomes. *Chest* 1998; 114: 1357-62.

21. Griese M, Brasch F, Aldana VR et al. Respiratory disease in Niemann-Pick type C2 is caused by pulmonary alveolar proteinosis. *Clin.Genet.* 2010; 77: 119-30.
22. Guillot L, Epaud R, Thouvenin G et al. New surfactant protein C gene mutations associated with diffuse lung disease. *J.Med.Genet.* 2009; 46: 490-4.
23. Hammon WE, McCaffree DR, and Cucchiara AJ. A comparison of manual to mechanical chest percussion for clearance of alveolar material in patients with pulmonary alveolar proteinosis (phospholipidosis). *Chest* 1993; 103: 1409-12.
24. Hashizume T. Pulmonary alveolar proteinosis successfully treated with am-broxol. *Intern.Med.* 2002; 41: 1175-8.
25. Heukeshoven J and Dernick R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 1985; 6: 103-12.
26. Huffman JA, Hull WM, Dranoff G, Mulligan RC, and Whitsett JA. Pulmonary epithelial cell expression of GM-CSF corrects the alveolar proteinosis in GM-CSF-deficient mice. *J.Clin.Invest* 1996; 97: 649-55.
27. Inoue Y, Trapnell BC, Tazawa R et al. Characteristics of a large cohort of patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis in Japan. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2008; 177: 752-62.
28. Johansson H, Nordling K, Weaver TE, and Johansson J. The Brichos domain-containing C-terminal part of pro-surfactant protein C binds to an unfolded poly-val transmembrane segment. *J.Biol.Chem.* 2006; 281: 21032-9.
29. Latzin P, Tredano M, Wust Y et al. Anti-GM-CSF antibodies in paediatric pulmonary alveolar proteinosis. *Thorax* 2005; 60: 39-44.
30. Lieschke GJ and Burgess AW. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (1). *N.Engl.J.Med.* 1992; 327: 28-35.

31. Luisetti M, Rodi G, Perotti C et al. Plasmapheresis for treatment of pulmonary alveolar proteinosis. *Eur.Respir.J.* 2009; 33: 1220-2.
32. Martinez-Moczygemba M, Doan ML, Elidemir O et al. Pulmonary alveolar proteinosis caused by deletion of the GM-CSFR α gene in the X chromosome pseudoautosomal region 1. *J.Exp.Med.* 2008; 205: 2711-6.
33. Neuhoff V, Arold N, Taube D, and Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 1988; 9: 255-62.
34. Paschen C, Reiter K, Stanzel F, Teschler H, and Griese M. Therapeutic lung lavages in children and adults. *Respir.Res.* 2005 ;6: 138.
35. Perez A and Rogers RM. Enhanced alveolar clearance with chest percussion therapy and positional changes during whole-lung lavage for alveolar proteinosis. *Chest* 2004 ;125: 2351-6.
36. Pohunek P, Pokorna H, and Striz I. Comparison of cell profiles in separately evaluated fractions of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid in children. *Thorax* 1996; 51 :615-8.
37. Price A, Manson D, Cutz E, and Dell S. Pulmonary alveolar proteinosis associated with anti-GM-CSF antibodies in a child: successful treatment with inhaled GM-CSF. *Pediatr.Pulmonol.* 2006; 41: 367-70.
38. Reed JA, Ikegami M, Cianciolo ER et al. Aerosolized GM-CSF ameliorates pulmonary alveolar proteinosis in GM-CSF-deficient mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 1999; 276: L556-L563.
39. Riedler J, Grigg J, Stone C, Tauro G, and Robertson C. Bronchoalveolar lavage cellularity in healthy children. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 1995; 152: 163-8.
40. Robinson TE, Trapnell BC, Goris ML, Quittell LM, and Cornfield DN. Quantitative analysis of longitudinal response to aerosolized granulocyte-macrophage

- colony-stimulating factor in two adolescents with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Chest* 2009; 135: 842-8.
41. Rosen SH, Castleman B, and Liebow AA. Pulmonary alveolar proteinosis. *N.Engl.J.Med.* 1958; 258: 1123-42.
 42. Seymour JF, Doyle IR, Nakata K et al. Relationship of anti-GM-CSF antibody concentration, surfactant protein A and B levels, and serum LDH to pulmonary parameters and response to GM-CSF therapy in patients with idiopathic alveolar proteinosis. *Thorax* 2003; 58: 252-7.
 43. Seymour JF and Presneill JJ. Pulmonary alveolar proteinosis: progress in the first 44 years. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2002; 166: 215-35.
 44. Sharief N, Crawford OF, and Dinwiddie R. Fibrosing alveolitis and desquamative interstitial pneumonitis. *Pediatr Pulmonol* 1994; 17: 359-65.
 45. Suzuki T, Sakagami T, Rubin BK et al. Familial pulmonary alveolar proteinosis caused by mutations in CSF2RA. *J.Exp.Med.* 2008; 205: 2703-10.
 46. Tazawa R, Nakata K, Inoue Y, and Nukiwa T. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inhalation therapy for patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis: a pilot study; and long-term treatment with aerosolized granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: a case report. *Respirology.* 2006; 11 Suppl: S61-S64.
 47. Trapnell BC, Whitsett JA, and Nakata K. Pulmonary alveolar proteinosis. *New England Journal of Medicine* 2003; 349: 2527-39.
 48. Venkateshiah SB, Yan TD, Bonfield TL et al. An open-label trial of granulocyte macrophage colony stimulating factor therapy for moderate symptomatic pulmonary alveolar proteinosis. *Chest* 2006; 130: 227-37.
 49. Wessel D and Flugge UI. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 1984; 138: 141-3.

50. Wylam ME, Ten R, Prakash UB, Nadrous HF, Clawson ML, and Anderson PM. Aerosol granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for pulmonary alveolar proteinosis. *Eur.Respir.J.* 2006; 27: 585-93.
51. Yamamoto H, Yamaguchi E, Agata H et al. A combination therapy of whole lung lavage and GM-CSF inhalation in pulmonary alveolar proteinosis. *Pediatr.Pulmonol.* 2008; 43: 828-30.

Aufstellung der Veröffentlichungen mit eigener Beteiligung:

1. Griese M, Brasch F, Aldana VR, Cabrera MM, Goelnitz U, Ikonen E, Karam BJ, Liebisch G, Linder MD, Lohse P, Meyer W, Schmitz G, Pamir A, Ripper J, Rolfs A, Schams A, Lezana FJ.
Respiratory disease in Niemann-Pick type C2 is caused by pulmonary alveolar proteinosis.
Clin Genet. 2010; 77: 119-30

2. Galetskiy D, Woischnik M, Ripper J, Griese M, Przybylski M.
Aberrant processing forms of lung surfactant proteins SP-B and SP-C revealed by high-resolution mass spectrometry.
Eur J Mass Spectrom. 2008; 14: 379-90

3. Bai Y, Galetskiy D, Damoc E, Ripper J, Woischnik M, Griese M, Liu Z, Liu S, Przybylski M.
Lung alveolar proteomics of bronchoalveolar lavage from a pulmonary alveolar proteinosis patient using high-resolution FTICR mass spectrometry.
Anal Bioanal Chem. 2007; 389: 1075-85

8 Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. M. Griese danke ich für die Überlassung des Themas sowie die Betreuung mit hilfreichen Anregungen und Hilfestellungen.

Herrn Dr. Markus Woischnik danke ich für die Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der „AG Griese“, v.a. Frau Andrea Schams und Frau Stefanie Gruschka für ihre Unterstützung bei sämtlichen labor-technischen Auswertungen und Methoden.

Bei meinen Mitdoktoranden bedanke ich mich für die anregenden Diskussionen und Ihre Hilfestellungen sowie die schöne Zeit im Labor.

Den Mitarbeitern des Dr. von Haunerschen Kinderspitals, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben danke ich sehr herzlich.

Meiner Familie und meiner Freundin möchte ich für ihre Unterstützung, Ermutigung und Geduld sowohl während des Studiums als auch darüber hinaus danken.