

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

**Die hydrophoben Surfactantproteine B und C: biochemische
Analyse in bronchoalveolärer Lavage und genetische Analyse
bei Neugeborenen und Kindern mit chronischer pulmonaler
Symptomatik**



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

Vorgelegt von

Elke Lorenz
aus Freiburg im Breisgau

2018

Mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Griese

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Josef Rosenecker
Prof. Dr. med. Jürgen Behr

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Ralf Zarbock

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 08.02.2018

Für all die Menschen,
die mein Leben bereichern!

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	8
1.1. Zielsetzung der Arbeit	8
1.2. Surfactant.....	8
1.2.1. Historisches	9
1.2.2. Zusammensetzung und Funktion des Surfactant.....	10
1.2.3. Surfactantproteine	11
1.2.3.1. Surfactantprotein B (SP-B).....	14
1.2.3.2. Surfactantprotein C (SP-C)	16
1.3. Diffuse parenchymatöse Lungenerkrankungen im Neugeborenen- und Kindesalter (DPLD, chILD).....	18
1.3.1. Genetische Ursachen für DPLD.....	21
1.3.2. Chronische Tachypnoe im Kleinkindalter (CTI)	21
1.3.2.1. Neuroendokrine Zellhyperplasie (NEHI).....	21
1.3.2.2. Pulmonale interstitielle Glykoneose (PIG).....	23
1.3.3. Nicht-spezifische interstitielle Pneumonitis (NSIP)	23
1.3.4. Pulmonale alveoläre Proteinose (PAP).....	24
1.3.5. Genetische Störungen im Surfactantmetabolismus.....	27
1.3.5.1. Überblick der genetischen Störungen im Surfactantmetabolismus.....	27
1.3.5.2. Mutationen in SFTPB	28
1.3.5.3. Mutationen in SFTPC.....	33
1.3.5.4. Mutationen in ABCA3.....	41
1.3.5.5. Mutationen in Genen der GM-CSF-Rezeptor α - und β -Kette .	47
1.3.5.6. Mutationen im Gen des thyroidalen Transkriptionsfaktor TTF-1.	49
1.4. Bronchoalveoläre Lavage (BAL)	50
2. Material und Methoden.....	53
2.1. Patientenauswahl und Kontrollgruppen.....	53
2.1.1. Ethikerklärung.....	59
2.2. Gewinnung und Aufarbeitung von bronchoalveolärer Lavage.....	59
2.3. Quantitative Proteinbestimmung	60
2.4. Gelelektrophorese und Westernblotting	61

2.5.	Surfactantquantifizierung und Molekulargewichtsbestimmung.....	65
2.6.	Genetische Untersuchungen.....	66
2.6.1.	DNA-Isolation aus Blut.....	66
2.6.2.	Primeretablierung und PCR.....	67
2.6.3.	Agarosegelelektrophorese.....	73
2.6.4.	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	75
2.6.5.	Sequenzierung.....	76
2.6.6.	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP).....	77
2.7.	Statistik.....	78
3.	Ergebnisse.....	79
3.1.	Charakterisierung der Kontrollgruppen.....	79
3.2.	Patientencharakteristika.....	82
3.2.1.	Chronische Tachypnoe im Kleinkindalter.....	98
3.3.	Biochemische Analysen aus BAL.....	109
3.3.1.	Differentialzytologie.....	109
3.3.2.	Proteinkonzentration.....	110
3.3.3.	Surfactantprotein B (SP-B).....	112
3.3.4.	Surfactantprotein C (SP-C).....	122
3.3.5.	Verhältnis SP-C/SP-B.....	130
3.4.	Genetische Analysen im Promotor von SFTPC.....	131
4.	Diskussion.....	136
4.1.	Kollektiv: Charakteristika und Diagnostik.....	138
4.2.	Differentialzytologie aus BAL.....	141
4.3.	Biochemische Analysen aus BAL.....	143
4.3.1.	Gesamtproteinkonzentration.....	144
4.3.2.	SP-B-Konzentrationen in BAL.....	146
4.3.3.	SP-C-Konzentrationen in BAL.....	147
4.4.	Genetische Analysen im Promotor von SFTPC.....	149
5.	Zusammenfassung.....	152
6.	Anhang.....	154
6.1.	Tabellenverzeichnis.....	154
6.2.	Literaturverzeichnis.....	171
6.3.	Danksagung.....	183

Abkürzungsverzeichnis

ABCA3	ATP-binding-cassette subfamily A member 3
BAL(F)	bronchoalveoläre Lavage (Flüssigkeit)
BDP-cLDI	bronchopulmonary dysplasia – chronic lung disease of prematurity bronchopulmonale Dysplasie des Frühgeborenen
BSA	bovines Serumalbumin
chILD	childrens' interstitial lung disease, interstitielle Lungenerkrankung im Kindesalter
CPI	chronic pneumonitis of infancy, chronische Pneumonitis im Kleinkindalter
CSFRA2	Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating factor receptor Alpha
CT	Computertomographie
CTI	chronic tachypnea of infancy, chronische Tachypnoe im Kleinkindalter
DIP	desquamative interstitielle Pneumonie
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DPLD	diffuse parenchymal lung disease, diffuse parenchymatöse Lungenerkrankung
EAA	exogen allergische Alveolitis
ECMO	extrakorporale Membranoxygenierung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. ethylene diamine tetraacetic acid)
FG	Frühgeborenes
GM-CSF	granulocyte-monocyte colony-stimulating factor
HCl	Salzsäure
HFOV	Hochfrequenzoszillation Ventilation (Beatmungsform)
HRCT	High resolution Computertomographie
ILD	interstitiell lung disease, interstitielle Lungenerkrankung
kb	Kilobasen (molekulare Maßeinheit)
kDa	Kilodalton (molekulare Maßeinheit)
LB	Lungenbiopsie
Lb	lamellar body, Lamellar-Körperchen
LDS	Lithiumdodecylsulfat

LG	Lungengesunde
LIP	lymphozytäre interstitielle Pneumonie
m/w	männlich/weiblich
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Lauge Natriumhydroxid
NG	Neugeborenes
Nkx2.1	Gen, das für den thyroidalen Transkriptionsfaktor 1 (TTF-1) kodiert
Nr.	Nummer
NSIP	nicht-spezifische interstitielle Pneumonie
PAP	pulmonale alveoläre Proteinose
PAS	periodic acid-Schiff; histochemische Färbemethode
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
pro-SP-C	Vorläuferprotein des Surfactantproteins C
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RDS	respiratory distress syndrome, akutes Atemnotsyndrom
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
SFTPB	Gen für Surfactantprotein B
SFTPC	Gen für Surfactantprotein C
SP	Surfactantprotein
SP-B	Surfactantprotein B
SP-C	Surfactantprotein C
TBE	TRIS-Borat-EDTA-gepufferte Lösung
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (engl. Tris buffered saline)
TS	Trachesalsekret
TTF-1	Thyroidaler Transkriptionsfaktor 1
V.a.	Verdacht auf

1. Einleitung

1.1. Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung der Arbeit ist es, die Aussagekraft einer Quantifizierung der Surfactantproteine B und C in bronchoalveolärer Lavage für die Diagnose einer früh-kindlichen interstitiellen Lungenerkrankung (chILD, DPLD) zu evaluieren. Des Weiteren soll diese Methode in die aktuell empfohlene diagnostische Vorgehensweise bei Verdacht auf DPLD eingeordnet werden.

In Anlehnung an Studien, die eine Assoziation zwischen Single Nucleotid Polymorphismen (SNP's) in der Promotorregion von SFTPC und verminderter Expression von SP-C gefunden haben, wurde bei Patienten mit Verdacht auf DPLD die Promotorregion von SFTPC untersucht. Das ausgewählte Kollektiv bestand aus Patienten, bei denen zuvor bereits bekannte genetische Defekte, die zu einer Störung im Surfactantmetabolismus führen (SFTPB, SFTPC, ABCA3, Nkx2.1, CSF2RA), ausgeschlossen wurden. Ziel war es, SNP's zu detektieren, welche möglicherweise SP-C-Level vorhersagen könnten bzw. die mit SP-C-Leveln in bronchoalveolärer Lavage (BAL) assoziiert sind.

1.2. Surfactant

Surfactant (surface active agent) ist ein Komplex aus Phospholipiden und Proteinen, dessen Bestandteile von Typ II Pneumozyten der Alveolen (im Folgenden Typ II Alveolarzellen genannt), bronchialen Clarazellen und zu einem geringen Teil von submukösen Drüsenzellen der Lunge gebildet wird (103). Die Hauptfunktion des Surfactant besteht in der Reduktion der Oberflächenspannung der Alveolen um etwa den Faktor 70 an der Grenze zwischen der Luft im Alveolarraum und dem Flüssigkeitsfilm, der das Alveolarepithel benetzt (106). In diesen Flüssigkeitsfilm wird der lipidreiche Surfactant sezerniert, organisiert sich dort als Phospholipidmono- oder -doppelschicht und verhindert so einen Kollaps der Alveolen am Ende der Expiration.

1.2.1. Historisches

Erstmals wurde das Vorhandensein einer derartigen oberflächenaktiven Substanz 1929 von Neergaard postuliert (134). Untersuchungen aus dem Jahr 1955 erbrachten den Beweis, dass oberflächenaktiver Surfactant in „den Tiefen der Lunge“ gebildet wird und die Oberflächenspannung an der Luft-Epithel-Grenze herabsetzt (102). Diese und weitere Erkenntnisse in den 1950er Jahren über Funktion und Produktion des Surfactant mündeten 1959 in der Veröffentlichung von Avery und Mead, die endgültig den Zusammenhang zwischen Störungen im pulmonalen Surfactant und dem damals noch unter dem Namen „hyaline Membranerkrankung“ (hyaline membrane disease) bekannten Krankheitsbild bei Frühgeborenen herstellten (50). Grundlage für den Begriff waren die dichten membranösen Strukturen in den kollabierten Alveolen der Frühgeborenen. Im Laufe der Jahrzehnte etablierte sich der Begriff des respiratorischen Atemnotsyndroms (ANS oder RDS, respiratory distress syndrome). Versuche mit synthetischem proteinfreiem Surfactant und natürlichem Surfactant aus Rinder- und Schweinelungen in den 1970er und 80er Jahren demonstrierten die Notwendigkeit beider Komponenten, der Phospholipide und der Surfactantproteine, für die in vivo-Funktion des Surfactants. Den klinischen Beweis für die Funktion des Surfactants erbrachte eine Studie von Fujiwara et al. 1980 an 10 Frühgeborenen, deren RDS-Symptomatik sich durch die endotracheale Applikation von modifiziertem bovinen Surfactant verbessern ließ (Reduktion der Sauerstoffkonzentration FiO_2 , der Beatmungsdrücke, Verbesserung des alveolokapillären Sauerstoffgradienten (46)). Neben der klinischen Anwendung wurde gleichzeitig die Zusammensetzung des Surfactant erforscht. Dabei fanden Klaus et al. (82) 1961 die Wichtigkeit von Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin für die Reduktion der Oberflächenspannung heraus und die Arbeitsgruppe um King identifizierte 1973 das Vorhandensein von Proteinen im Surfactantmaterial (80). Die erste Beschreibung hydrophober Surfactantproteine geht auf Phizackerly et al. zurück (104), die 1979 zwei Proteine in humanem Surfactant mit hydrophoben Eigenschaften identifizierten. Nach der 1988 von Possmeyer vorgeschlagenen Nomenklatur wurden sie SP-B und SP-C genannt.

Viele klinische Studien (RCT) mit unterschiedlichen künstlichen und natürlichen Surfactantpräparationen wurden im vergangenen Jahrhundert durchgeführt und

1997 und 1998 von Soll et al. in drei großen systematischen Cochrane Reviews zusammengefasst (117; 118; 119). Von diesen sind aktuell v.a. „künstliche Surfactantmischungen“ zur Therapie des Früh- und Neugeborenen-RDS zugelassen.

1.2.2. Zusammensetzung und Funktion des Surfactant

Die einzelnen Bestandteile des Surfactant werden von den Typ II Alveolarzellen und den bronchialen Clarazellen in der Lunge gebildet und als ein strukturell organisiertes Phospholipid-Protein-Gemisch in den Alveolarraum sezerniert. Surfactant liegt in der Lunge in folgenden morphologischen Formen vor: intrazellulär in den sogenannten Lamellarkörperchen von Typ II Alveolarzellen. Hierbei handelt es sich um Organellen, die aus Phospholipiden, SP-B und SP-C bestehen. Extrazellulär findet sich Surfactant zum einen als tubuläres Myelin organisiert. Zum anderen kommt er als Phospholipideinzelschicht- und -doppelschichtmembranen vor und kleidet in dieser Ausprägung das Alveolarepithel aus. Am Recycling der Surfactantbestandteile sind neben den Typ II Alveolarzellen und den Surfactantproteinen selbst (v.a. SP-A) auch Alveolarmakrophagen beteiligt. Sie nehmen kleine Vesikel abhängig von ihrem Oberflächenrezeptor für GM-CSF (Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor) auf. Mutationen in diesem Rezeptor führen zu einer extrazellulären Akkumulation von Surfactant im Alveolarraum und damit zu einer pulmonalen alveolären Proteinose (siehe Kapitel 1.3.4). In Abbildung 1.2.2-1 sind die hier genannten Formen von Surfactant im Verlauf des Metabolismus dargestellt.

Der Phospholipidgehalt bildet mit etwa 90% den größten Anteil am Surfactant, davon sind etwa 65% ungesättigtes Dipalmitoylphosphatidylcholin, welches den größten Effekt auf die Herabsetzung der Oberflächenspannung hat. Die restlichen 10% des Surfactants bestehen aus Proteinen, die sich nochmals in unspezifische Serumproteine und die vier spezifischen Surfactantproteine A, B, C und D unterteilen lassen. Dabei sind SP-B und SP-C als sehr hydrophobe Proteine integraler Bestandteil der Phospholipidschichten, SP-A und SP-D als Proteine der Collectin-Lectin-Familie mit hydrophilen Eigenschaften liegen in gelöster Form vor. SP-A ist überwiegend mit der Phospholipidschicht assoziiert,

wohingegen über 70% des vorhandenen SP-D im hydrophilen Anteil des Surfactant gelöst vorkommt.

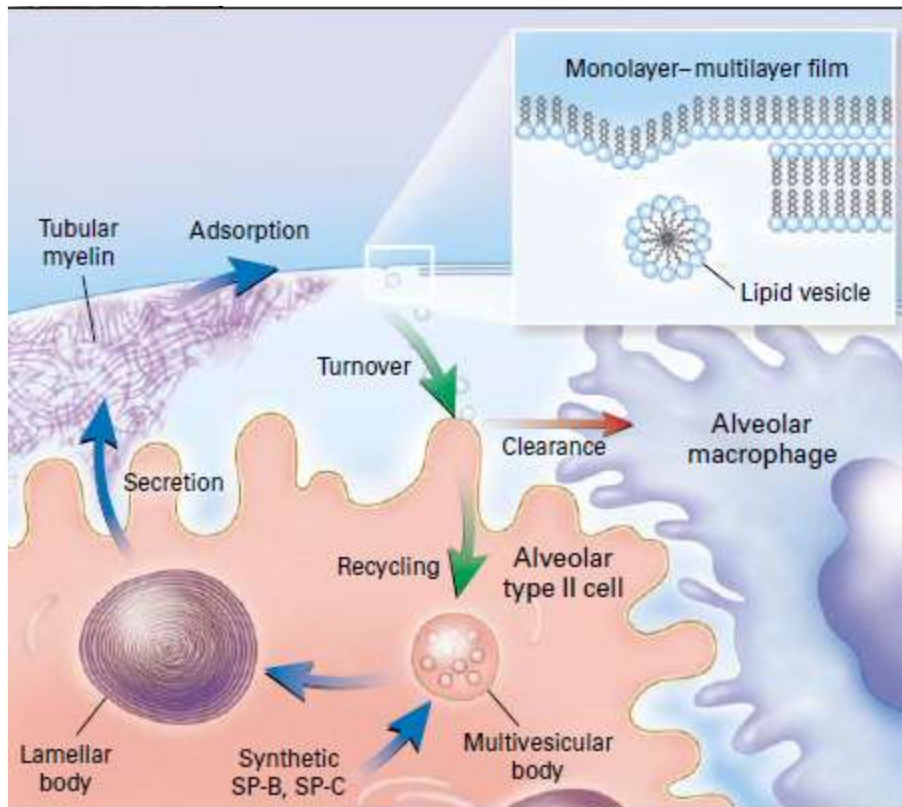


Abbildung 1.2.2-1: Metabolismus des Surfactant mit Fokus auf die hydrophoben Surfactantproteine, die zusammen mit Phospholipiden in den Lamellarkörperchen organisiert und in den Interalveolarraum sezerniert werden. Zusammen mit SP-A bilden sie dort das tubuläre Myelin, welches als Mono- oder Multilayer an die Zellmembranen adsorbiert. Der größte Teil des Surfactant wird recycelt, d.h. von den Typ II Alveolarzellen wieder aufgenommen und verwertet, ein geringer Teil wird durch Alveolarmakrophagen abgebaut (144).

1.2.3. Surfactantproteine

Unter den Surfactantproteinen hat das Surfactantprotein A (SP-A) mit etwa 5-6% des Trockengewichtes mengenmäßig den größten Anteil. SP-A und SP-D sind hydrophile Proteine, die in vivo als Polymere vorliegen. Sie gehören zur Gruppe der Kollektine, welche an ihrem N-terminalen Ende eine kollagen-ähnliche

Domäne besitzen (60). Beide Proteine sind Teil der unspezifischen, angeborenen Immunabwehr der Lunge. Sie besitzen die Fähigkeit sowohl an verschiedenste Pathogene (Bakterien, Viren, Pilze) und Allergene als auch an Makrophagen zu binden und letztere zu stimulieren. SP-A ist außerdem von Bedeutung für die strukturelle Organisation und Stabilität des tubulären Myelins (60, 83). SP-D wird ebenso wie SP-A bei der Wiederaufnahme und dem Abbau von Surfactant durch Typ II Alveolarzellen benötigt. Zusätzlich ist es an der Ausbildung der Ultrastruktur des Surfactant (75) sowie bei der Suppression inflammatorischer Prozesse innerhalb der Lunge beteiligt (81).

Die Surfactantproteine SP-B und SP-C bilden mit je 0,5-1% des Trockengewichtes einen geringen aber essentiellen Bestandteil des Surfactants (30). Sie sind stark hydrophob und dadurch integraler Bestandteil der Phospholipidschicht. SP-B liegt in seiner aktiven Form als Homodimer vor, SP-C als palmitoylgebundenes Monomer. Von essentieller Bedeutung sind beide für die Homöostase des Surfactants durch die Beschleunigung der strukturellen Organisation der Phospholipide, die Stabilisierung der Phospholipidmembranen während der Atemexkursionen und durch ihre Funktionen im Surfactantmetabolismus (143; 68). SP-B spielt eine große Rolle bei der Synthese und Speicherung von Surfactant, indem es an der korrekten Ausbildung der phospholipidreichen Lammellarkörperchen beteiligt ist.

In Tabelle 1.2.3-1 sind die wichtigsten Charakteristika der vier Surfactantproteine zusammengestellt. Abbildung 1.2.3-1 zeigt die verschiedenen Surfactantproteine in ihrer Assoziation zu den Phospholipidmembranen und die relativen Größenverhältnissen zueinander.

Tabelle 1.2.3-1: Charakteristika der Surfactantproteine mit Funktion und Sekretionsweg

SP	Polarität	Molekulargewicht Monomer	Funktion	Sekretion
SP-A	hydrophil	32 kDa	Adsorption von Phospholipiden an das Alveolarepithel Struktur des tubulären Myelins Makrophagenstimulation und Immunabwehr	direkt
SP-B	hydrophob	8,7 kDa	Struktur der Lamellarkörperchen und des tubulären Myelins Reduktion der Oberflächenspannung Prozessierung von SP-C Surfactantstabilisierung	über Lamellarkörperchen
SP-C	hydrophob	3,7 kDa	Reduktion der Oberflächenspannung Surfactantstabilisierung	über Lamellarkörperchen
SP-D	hydrophil	43 kDa	Interaktion zwischen respiratorischen Pathogenen und Immunzellen Recycling von Surfactantlipiden	direkt

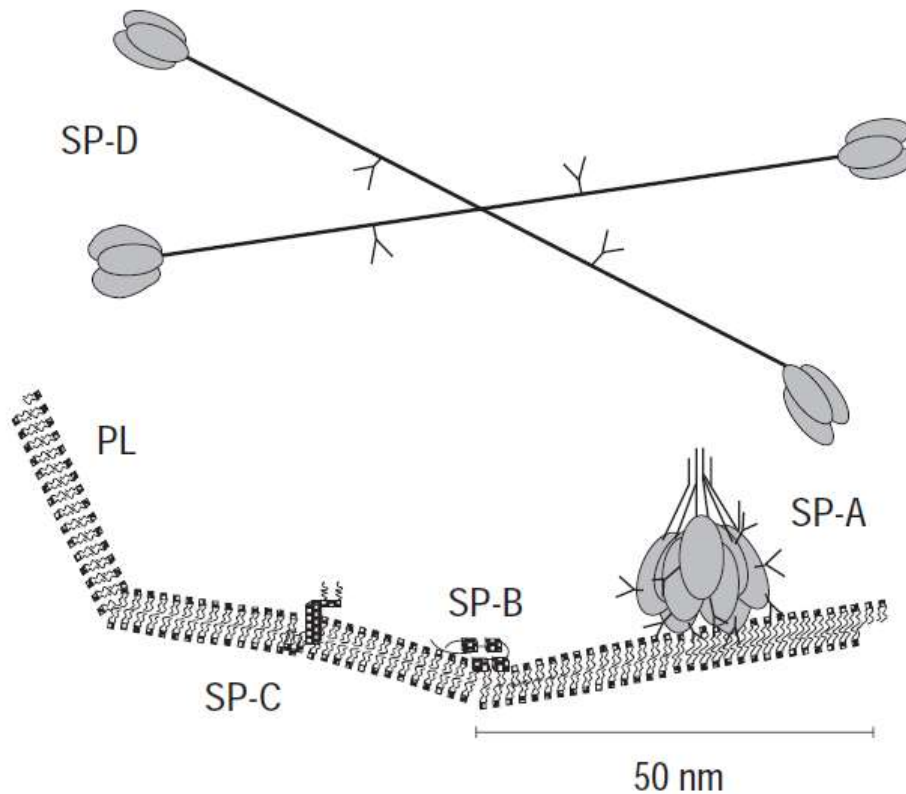


Abbildung 1.2.3-1: Bestandteile des Surfactants

Dargestellt sind die Surfactantproteine in ihrer relativen Größe zueinander und zu den Phospholipidmembranen sowie die Verbindung zwischen Phospholipiden (PL) und Surfactantproteinen. Während SP-D als hydrophiles Molekül gelöst und unabhängig von den PL vorliegt, sind SP-A und SP-B an die PL adsorbiert, wohingegen SP-C integraler Bestandteil der PL-Membranen ist (52).

1.2.3.1. Surfactantprotein B (SP-B)

Surfactantprotein B (SP-B) ist ein 79 Aminosäuren langes amphipathisches Protein, das in Typ II Alveolarzellen und bronchialen Clara-Zellen gebildet wird (103). Es entsteht durch Prozessierung eines 381 Aminosäuren großen Vorläuferproteins, welches durch ein einzelnes Gen (SFTPB) auf dem kurzen Arm des Chromosoms 2 (Position 2p12-p11.2) codiert ist (133). Das aus 11 Exons gebildete Vorläuferprotein (Prä-Pro-SP-B) wird einer Abspaltung eines 23 Aminosäuren langen Signalpeptids unterzogen, wodurch Pro-SP-B entsteht. Dieses wird sowohl am C- als auch N-terminalen Ende durch proteolytische Prozessierung zum eigentlichen 79 Aminosäuren langen und 8,7 kDa schweren SP-B, dem Translationsprodukt aus Exon 6 und 7 (105). Das SP-B Protein liegt

in aktiver Form überwiegend als Dimer vor. Die Verbindung entsteht durch sechs Disulfidbrücken an den α -Helices der Monomere (143).

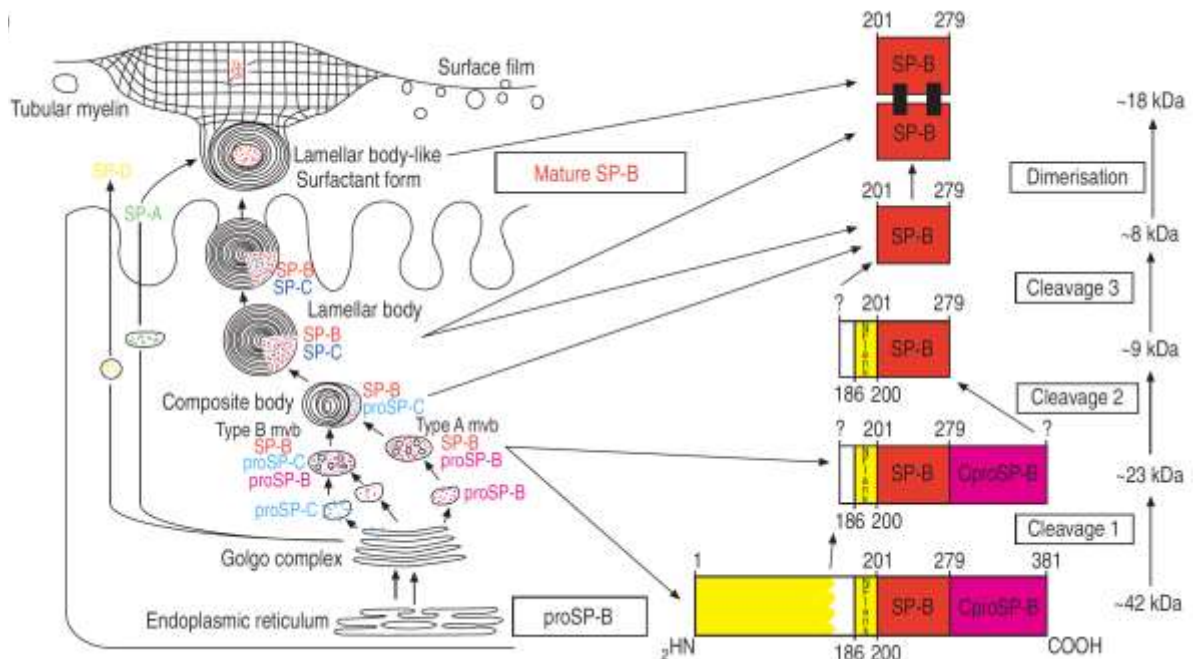


Abbildung 1.2.3.1-1: Synthese und Prozessierung von Surfactantprotein B; aus Brasch et al. Eur Respir J 2004 (15)

Sämtliche pulmonalen Symptome, die typischerweise bei Frühgeborenen mit Lungenunreife auftreten, konnten im Mausmodell an SP-B-Knockout-Mäusen gefunden werden. Diese Mäuse wiesen reduzierte Lungenvolumina, ein nahezu nicht vorhandenes Residualvolumen am Ende der Expiration und eine fehlende Lungenhysterese auf. Ultrastrukturell konnte das Fehlen von Lamellarkörperchen in Typ II Alveolarzellen gezeigt werden, weshalb SP-B eine bedeutende Funktion in der intrazellulären strukturellen Organisation der Phospholipide als Lamellarkörperchen zugeschrieben wurde (144).

Durch den Nachweis eines aberranten SP-C-Vorläuferproteins sowohl in SP-B-Knockout-Mäusen als auch in BAL von Neugeborenen mit SP-B-Defizienz wurde die Funktion von SP-B an der Prozessierung von SP-C deutlich. Ein Fehlen von reifem SP-C und ein Vorhandensein von SP-C-Vorstufen in BAL können diagnostisch demnach als Hinweis auf einen Gendefekt in SFTPB dienen.

Die Funktionen von Surfactantprotein B sind:

- Organisation und Formierung von Phospholipiden in Lamellarkörperchen (120)
- Strukturbildung des tubulären Myelins
- Prozessierung von SP-C (135)
- Beschleunigung der Ausbildung des Surfactantfilms entlang der Alveolarmembran zur Reduktion der Oberflächenspannung (95)
- normale Funktion und Entfaltung der Lunge in der postnatalen Phase (144)

1.2.3.2. Surfactantprotein C (SP-C)

Surfactantprotein C ist ein 3,7 kDa schweres, 35 Aminosäuren langes Protein, mit hohem Anteil an verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin. Dies führt dazu, dass es eines der hydrophobsten Proteine des Menschen ist. Seine Tertiärstruktur ist überwiegend alpha-helikal und durchspannt die Phospholipid-Doppelschicht. Daneben gibt es zwei kovalente Bindungen mit Palmitoylgruppen. Das Gen für SP-C ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 8 (8p21.3) kodiert und besteht aus ca. 3500 Basenpaaren mit 6 Exons, aus denen eine mRNA von etwa 900 Basenpaaren transkribiert wird. Hieraus entsteht durch alternatives Splicing ein 191 – 197 Aminosäuren langes Proprotein, Pro-SP-C, mit einem Molekulargewicht von 21 kDa. Der Abschnitt des reifen SP-C ist auf Exon 2 kodiert. Die Expression findet ausschließlich in Typ II Alveolarzellen statt. Bereits das Pro-SP-C lagert sich in Phospholipid-Doppelmembranen ein und zwar mit der im reifen SP-C weiterhin bestehenden alpha-helikalen Domäne. Zusammen mit SP-B wird es aus dem endoplasmatischen Retikulum in multivesikulären Körperchen transportiert und prozessiert und letztlich mit den Phospholipiden als Lamellarkörperchen in den Extrazellulärraum via Exozytose abgegeben (24).

In Abbildung 1.2.3.2-1 ist der Prozessierungsweg von SP-C dargestellt, beginnend mit Pro-SPC, mit einer Größe von 21 kDa. Der post-translationale Prozess geschieht im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat, bevor die Sekretion in multivesikulären Körperchen beginnt und über die

Lamellarkörperchen schließlich das reife SP-C in den Alveolarraum dringt. In einem ersten Schritt wird das C-terminale Ende abgespalten und es entsteht ein ca. 6 kDa großes Zwischenprodukt, welches nach Abspaltung des N-Terminus schließlich das reife SP-C mit einem Molekulargewicht von 3,7-4,2 kDa bildet (129). Dieser letzte Prozessierungsschritt findet nur in Anwesenheit von SP-B vollständig statt. Diesem Mechanismus geht wie oben beschrieben der biochemische Befund voraus, dass bei Mutationen im Gen für SP-B nicht nur Störungen in der SP-B-Synthese, sondern auch in der SP-C-Synthese vorliegen (135).

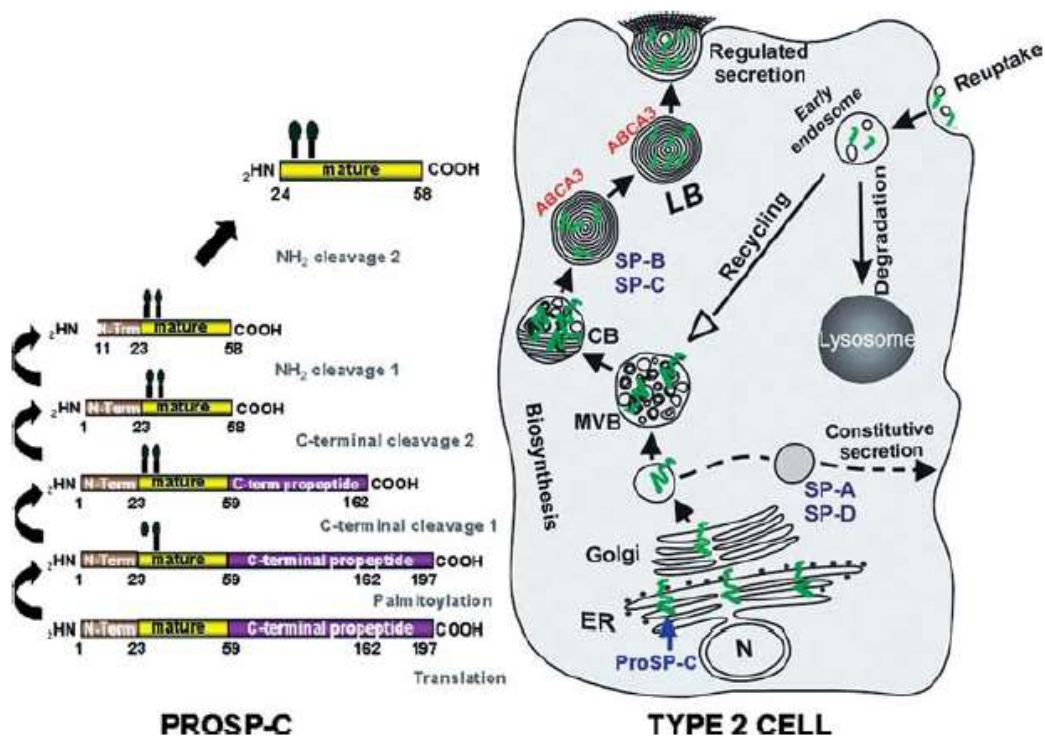


Abbildung 1.2.3.2-1: Synthese und Prozessierung von SP-C; nach Beers MF et al. Annu Rev Physiol 2005 (11)

Die Funktionen von SP-C sind im Folgenden aufgelistet:

- immunologische Funktion durch Bindung an bakterielle Lipopolysaccharide und CD 14⁺ Zellen (5)

- Beschleunigung der Formation und Stabilisierung von Phospholipiden als Membran- und Vesikelstrukturen (71)
- Stabilisierung des Surfactant und Verhinderung eines alveolären Kollapses am Ende der Expiration (70)
- Funktion im Surfactantkatabolismus: Katalyse der Wiederaufnahme von Surfactantbestandteilen (72)

1.3. Diffuse parenchymatöse Lungenerkrankungen im Neugeborenen- und Kindesalter (DPLD, chILD)

Interstitielle Lungenerkrankungen, deren Pathologie sich auf das Interstitium, d.h. den Zwischenraum zwischen den Alveolen erstreckt, können grundsätzlich in jedem Alter auftreten und stellen eine Gruppe sehr heterogener, zumeist chronischer pulmonaler Erkrankungen dar, deren Prävalenz im Einzelnen selten ist (s.u.). Dies führt dazu, dass die Erforschung genauer Ursachen, zielgerichtete Diagnostik und geeignete Therapie häufig schwierig sind und der Weg bis zur Diagnosestellung häufig langwierig ist. Besonders bei interstitiellen Lungenerkrankungen im Neugeborenen- und Kindesalter ist die Diversität noch größer und die Prävalenz noch geringer als im Erwachsenenalter. Erschwerend kommt hinzu, dass sich die Lunge auch postnatal noch entwickelt und das Immunsystem noch nicht vollständig ausgereift ist, sodass eine Reihe zusätzlicher Pathomechanismen für pulmonale Erkrankungen in Frage kommen.

Die Anstrengungen in Forschung und Medizin der letzten Jahrzehnte haben die Notwendigkeit eines besseren Verständnisses der einzelnen Entitäten interstitieller Lungenerkrankungen im Neugeborenen- und Kindesalter aufgezeigt und zu einem immer differenzierteren Klassifikationssystem und besseren Methoden der Einordnung geführt.

In der englischsprachigen Literatur existieren zwei Begrifflichkeiten, unter denen alle Entitäten chronischer interstitieller Lungenerkrankungen mit (möglichem) Beginn im Neugeborenen- und Kindesalter zusammengefasst sind: "children's

interstitial lung diseases" (chILD) oder "pediatric diffuse parenchymal lung diseases" (DPLD). Im Verlauf der Arbeit wird der Begriff DPLD verwendet.

Diffuse parenchymatöse Lungenerkrankungen, so heterogen sie bezüglich ihrer Genese sind, äußern sich klinisch häufig durch das Symptom der Tachypnoe, begleitet von weiteren pulmonalen Auffälligkeiten wie trockenem Husten, Dyspnoe und/oder Knisterrasseln bzw. Giemen in basalen Lungenabschnitten. In schweren Fällen können auch Zyanose, chronische Hypoxämie oder Trommelschlegelfinger sowie Uhrglasnägel auftreten. In der apparativen Diagnostik finden sich häufig eine restriktive Ventilationsstörung in der Lungenfunktion sowie diffuse parenchymatöse Pathologien in der Bildgebung. Als wichtiges bildgebendes Verfahren hat sich vor allem die high resolution Computertomographie (HR-CT) etabliert, obwohl der diagnostische Goldstandard bei chronischen DPLD die invasive Methode der Lungenbiopsie bleibt (66).

Mehrere epidemiologische Studien haben sich mit der Frage nach der Prävalenz von DPLD beschäftigt. Von 1988 bis 1990 wurden in Mexico über ein Populationsregister Daten gesammelt, die eine Prävalenz für DPLD von 80,9/100.000 bei erwachsenen Männern und 67,2/100.000 bei erwachsenen Frauen ergab (29). Im Gegensatz dazu scheint die Prävalenz bei Kindern deutlich niedriger zu sein. In einer dreijährigen nationalen Umfrage in Großbritannien und Irland unter pulmologisch spezialisierten Kinderärzten wurde die Prävalenz von DPLD auf 0,36/100.000 geschätzt (40). In diesem Umfrageregister waren 76% der Kinder bei Erkrankungsbeginn unter einem Jahr alt. Die Untersuchung einer dänischen Kohorte in den Jahren von 1990 bis 2008 ergab eine Prävalenz von 2,22/100.000 (19), die Daten der Erhebungseinheit für seltene pädiatrische Erkrankungen in Deutschland fand eine Inzidenz von chILD von 1,32/1 Million pro Jahr (55). Auch in der letzteren epidemiologischen Erhebung war die Mehrheit der Kinder bei Diagnosestellung unter einem Jahr alt. Zudem erfolgte die Einteilung der einzelnen DPLD-Entitäten nach der von Deutsch und Mitarbeitern 2007 vorgeschlagenen und bis heute aktuellen Klassifikation für DPLD (38), an der sich auch die vorliegende Arbeit orientiert.

Erste Schritte in der Klassifikation von DPLD machten Expertengruppen der American Thoracic Society und der European Respiratory Society 2001 mit einer

multidisziplinären Konsensus-Klassifikation der idiopathischen interstitiellen Pneumonien (4). Die zugrundeliegende Literaturrecherche in Medline bezog sich auf interstitielle Lungenerkrankungen bei Erwachsenen. Die histologische Einteilung und Korrelation mit einer klinisch-radiologisch-pathologischen Diagnose war ein wichtiger Schritt, die zum Teil unklaren Krankheitsentitäten zu definieren. Auf dieser Grundlage erfolgten 2004 (45) und 2007 (38) jeweils Klassifikationssysteme von DPLD, wobei eine Unterscheidung der histologischen Entitäten in überwiegend bei älteren Kindern und Erwachsenen oder überwiegend im Neugeborenen- und Kleinkindalter vorkommend vorgenommen wurde. Die usual interstitial pneumonia (UIP) und die respiratory bronchiolitis interstitial lung disease (RB-ILD) fanden sich lange Zeit ausschließlich im Erwachsenenalter (45). Erst kürzlich konnte ein Fall von RB-ILD im Kindesalter publiziert werden (116). Typische Entitäten des Säuglings- und frühen Kindesalters stellen die neuroendokrine Zellhyperplasie (NEHI) mit dem klinischen Korrelat der chronischen Tachypnoe des Säuglings (36), die "chronic pneumonitis of infancy" und die pulmonale interstielle Glykogenose (22) dar. Des Weiteren seien insbesondere die genetischen Störungen im Surfactantmetabolismus hervorgehoben, die ebenfalls zu interstitiellen Lungenerkrankungen im Säuglings- und Kleinkindalter führen können ((100) und Kapitel 1.4).

Sämtliche aktuellen Klassifikationen von DPLD entlehnen sich der Einteilung von Deutsch et al., die auf einer nordamerikanischen Multicenterstudie basiert. Von 11 Zentren wurde lungenbiopsisches Material von Kindern unter 2 Jahren mit diffuser Lungenerkrankung zwischen 1999 und 2004 zur Verfügung gestellt. Davon konnten 165 Lungenbiopsien mit den zugehörigen klinischen und radiologischen Befunden durch ein Expertengremium korreliert und eine Einteilung nach distinkten klinischen Merkmalen vorgenommen werden (38). Die Tabelle 2.1-1 zeigt die in der vorliegenden Arbeit herangezogene Klassifikation, modifiziert nach Deutsch et al.

Eine aktuellere Veröffentlichung stammt aus dem Jahr 2013 in Form einer klinisch-praktischen Leitlinie der American Thoracic Society mit Empfehlungen zu Klassifikation, Diagnostik und Management interstitieller Lungenerkrankungen im Kindesalter (86). Die Autoren fassen den Stand der Forschung zusammen mit daraus resultierenden Handlungsempfehlungen. Das empfohlene

Klassifikationssystem gleicht im Wesentlichen dem von Deutsch et al. vorgeschlagenen und in der vorliegenden Arbeit verwendeten. Es ist davon auszugehen, dass sich dieses System etabliert hat und auch in den kommenden Jahren, gegebenenfalls mit Ergänzungen aus neuen Forschungsergebnissen, allgemein anerkannt bleiben wird.

1.3.1. Genetische Ursachen für DPLD

Zu den häufigsten bekannten genetischen Ursachen für pädiatrische DPLD gehören Mutationen in den Genen für Surfactantprotein B und C, dem ATP-binding-cassette-subfamily-A-member-3-Transporter (ABCA3), dem Gen für den Thyroidalen Transkriptionsfaktor 1 – auch bekannt als NKX2.1 – und CSF2RA und CSF2RB, der Alpha- und Beta-Kette des GM-CSF Rezeptors. Auf diese genetischen Störungen im Surfactantmetabolismus wird in Kapitel 1.4 detailliert eingegangen.

1.3.2. Chronische Tachypnoe im Kleinkindalter (CTI)

Die Bezeichnung chronische Tachypnoe im Kleinkindalter (CTI) oder auch persistierende Tachypnoe im Kleinkindalter (PTI) wurde in der aktuellen klinisch-praktischen Leitlinie der American Thoracic Society (86) zur Bezeichnung „specific conditions of undefined etiology“ umbenannt. Wie der Name bereits nahelegt, handelt es sich um eine spezifische klinische Symptomatik, deren Ursache bislang noch nicht geklärt ist. Unter diese Kategorie werden zwei histopathologische Muster zusammengefasst, nämlich die neuroendokrine Zellhyperplasie im Kleinkindalter (NEHI) und die pulmonale interstitielle Glykogenose (PIG).

1.3.2.1. Neuroendokrine Zellhyperplasie (NEHI)

Die neuroendokrine Zellhyperplasie im Kleinkindalter wurde erstmals 2001 von Deterding et al. unter dem Krankheitsbild „persistent tachypnea of infancy“

beschrieben (36). Unter Säuglingen, also Kindern im ersten Lebensjahr, mit anhaltenden Symptomen einer interstitiellen Lungenerkrankung – Tachypnoe, Einziehungen, auskultatorisches Lungenknistern und Hypoxämie – und ohne bekannte pathologische Befunde in einer Lungenbiopsie waren histologisch vermehrte und vergrößerte neuroendokrine Zellen (NEC) aufgefallen.

Die Diagnose wird in Zusammenschau von Klinik, CT-graphischer Bildgebung und Immunhistologie gestellt. Eine Diagnose ohne Lungenbiopsie scheint bei eindeutigem Befund im HR-CT möglich. Als charakteristische Auffälligkeiten zeigen sich hier milchglasartige Trübungen in zentralen Bereichen der Lunge (Mittellappen, Lingula, parahilär und paramediastinal) auf Segment- oder Subsegmentebene und ein mosaikartiges Überblähungsmuster, sogenanntes „air-trapping“. Bei manchen Patienten mit CTI/NEHI finden sich jedoch atypische Verteilungsmuster der Milchglastrübung oder zusätzliche Pathologien in Form von Verdickungen der Bronchialwände oder der interlobulären Septen oder Konsolidierungen (18; 37; 17).

Bei der Immunhistologie wird ein Peptidhormon in den neuroendokrinen Zellen der Bronchiolen, Bombesin, mittels Antikörperbindung angefärbt und sein vermehrtes Vorkommen und die damit einhergehende Hyperplasie darstellt. Daneben finden sich allenfalls milde und unspezifische histologische Veränderungen wie vermehrte alveoläre Makrophagen sowie eine leichte Hyperplasie der glatten Muskelzellen (37). Das Fehlen eindeutiger histopathologischer Befunde ist obligat, da eine Vermehrung von NEC auch bei bronchopulmonaler Dysplasie, akuter Lungenschädigung, in extremen Höhenlagen, unter Zigarettenrauch-Exposition und bei zystischer Fibrose zu verzeichnen ist. Wird eine Lungenfunktionsdiagnostik durchgeführt, so zeigt diese eine Obstruktion der distalen Atemwege.

Bereits in der Erstbeschreibung wurde der Verlauf der NEHI/CTI als wenig therapeutisch beeinflussbar durch Glucocorticoide, Bronchodilantien oder Immunsuppressiva), jedoch als grundsätzlich gutartig beschrieben. Bisher sind in der Literatur keine Todesfälle dokumentiert. Der klinische Verlauf zieht sich über Jahre, viele Kinder haben einen zusätzlichen Sauerstoffbedarf über mehrere Jahre (37). Eine Restitutio ad integrum mit vollständiger Rückbildung der Auffälligkeiten in Bildgebung und Funktionsdiagnostik ist häufig möglich. Eine

Besserung sowohl der klinischen als auch apparativen Befunde wurde in allen Fällen beschrieben (49; 108).

1.3.2.2. Pulmonale interstitielle Glykoneose (PIG)

Die pulmonale interstitielle Glykogenose präsentiert sich klassisch mit Tachypnoe, Dyspnoe und Hypoxämie (22).

Da die PIG nach bisherigen Literaturangaben noch seltener als die NEHI ist, stützen sich die radiologischen Befunde auf einige wenige Studien, die für die PIG ebenfalls hauptsächlich eine milchglasartige Trübung der Lunge auf Segment- und/oder Subsegmentebene oder aber auch ein diffuses Verteilungsmuster beschreiben (87). Daneben wurden auch wie bei der NEHI Überblähung und „Air-trapping“, Verdickung interlobärer Septen, aber auch Vernarbungen, multifokale Atelektasen (18) und zystische, luftgefüllte Veränderungen gefunden (87).

Histologisch sind folgende Auffälligkeiten charakteristisch: ovale, glykogenreiche Mesenchymzellen, die zur Verbreiterung des Interstitiums führen (39). In sämtlichen Fallbeschreibungen finden sich keinerlei Fibrosierungen oder Inflammationsreaktionen, allerdings zeigten sich auch bei der PIG hyperplastische neuroendokrine Zellen (146).

Im Gegensatz zur NEHI gibt es in der Literatur für die PIG beschriebene Todesfälle (79; 3), sodass eine histologische differentialdiagnostische Unterscheidung der beiden Entitäten sinnvoll erscheint.

1.3.3. Nicht-spezifische interstitielle Pneumonitis (NSIP)

Die Abkürzung NSIP steht für „nonspecific interstitial pneumonia“, also nicht-spezifische interstitielle Pneumonitis und stellt ein histopathologisches Muster dar. Zugrunde liegen können diverse Ursachen, von toxischen über infektiöse Noxen, Hypersensitivitätsreaktionen und Vaskulitis bis hin zu genetischen Störungen, wie z.B. einer SP-C-Mutation. Es werden zwei Subtypen

unterschieden, ein zelluläres Muster und ein fibrosierendes Muster. Gemeinsam ist beiden eine chronische interstitielle, meist lymphozytär geprägte Inflammation. Beim fibrosierenden Muster kommt eine interstitielle Fibrose in unterschiedlicher Ausprägung hinzu, die zelluläre Infiltration des Interstitiums ist meist weniger ausgeprägt als beim zellulären Muster. Letzteres ist zusätzlich charakterisiert durch eine Hyperplasie der Typ II Alveolarzellen (77). Daraus wird ersichtlich, dass die NSIP keine ursächliche Diagnose, sondern vielmehr eine strukturelle Beschreibung ist und die Diagnosestellung einer Lungenbiopsie bedarf. Doch auch bereits ohne diese ließen sich in Studien mithilfe anderer diagnostischer Mittel mehr oder weniger spezifische Hinweise evaluieren. So z.B. in der CT-Bildgebung, in der eine milchglasartige Trübung der Lunge in einem Drittel der Fälle zu sehen und auch die einzige Pathologie ist. Das häufigste Verteilungsmuster hierbei ist bilateral, symmetrisch und überwiegend subpleural gelegen (28; 78; 67). Beim fibrosierenden Muster kann zusätzlich ein Honigwabemuster auftreten, ist für die NSIP jedoch nicht spezifisch und erschwert eher die Abgrenzung zur UIP (usual interstitial pneumonia), bei der regelhaft ein Honigwabemuster gesehen werden kann (2).

Die Prognose scheint vom Grad der Fibrosierung abhängig zu sein und mit diesem negativ zu korrelieren (127).

1.3.4. Pulmonale alveoläre Proteinose (PAP)

Bei der pulmonalen alveolären Proteinose (PAP) handelt es sich um ein Krankheitsbild mit unterschiedlichen Ursachen. Von erworbenen autoimmunologischen Prozessen, über sekundäre Ursachen im Sinne von inhalativen Noxen, hämatologischen Erkrankungen oder Immunsuppression, bis zu genetischen Defekten im Surfactantmetabolismus (41; 124; 138). Je nach Ursache kann der Krankheitsbeginn von der Neonatalperiode bis ins Erwachsenenalter reichen.

Erstmals publiziert wurden 27 PAP-Fälle 1958 durch drei pathologische Institute, die ein PAS-positives, protein- und lipidreiches Material in den Alveolen von Verstorbenen beschrieben (110). Tatsächlich ist die damals angewandte histochemische Färbemethode der „Periodic acid-Schiff reaction“ auch heute

noch eines der diagnostischen Hauptmerkmale bei der Untersuchung von bronchoalveolärer Lavage (BAL) und Lungengewebe auf PAP. Unabhängig von der Ursache der PAP und dem Erkrankungsbeginn findet sich stets derselbe histopathologische Befund einer Akkumulation von Surfactant-Lipoproteinen im Alveolarraum mit konsekutiver Gasaustauschstörung (126).

Tabelle 1.3.4-1 zeigt die drei Formen der PAP und Beispiele für den zugrundeliegenden Auslöser sowie die relative Häufigkeitsverteilung. Die erworbene Form mit Nachweis von GM-CSF-Autoantikörpern ist mit Abstand die häufigste Form. Das mediane Alter bei Diagnose liegt je nach Population in unterschiedlichen Studien zwischen 35-51 Jahren (138). Sowohl die klinische Symptomatik als auch der Krankheitsverlauf unterliegen einer großen Variabilität. Die typischen, jedoch unspezifischen Symptome sind schleichende und progrediente Belastungsdyspnoe sowie nicht-produktiver Husten (112; 76; 89; 13). In der Lungenfunktion sind Hypoxämie und Störungen der Diffusionskapazität charakteristisch. Radiologische Auffälligkeiten zeigen sich typischerweise mit bilateralen symmetrischen alveolären Infiltraten, können aber auch vom typischen Befund abweichen und z.B. unilateral oder fleckförmig auftreten. In der CT ist eine Milchglastrübung sowie alveoläre Verdichtungen mit Verdickung interlobulärer Septen (sogenanntes „crazy-paving pattern“) charakteristisch (73; 112).

Tabelle 1.3.4-1 Formen der pulmonalen alveolären Proteinose, deren Pathomechanismus und Auswirkungen auf Alveolarebene, sowie deren Häufigkeitsverteilung

Typ	Pathomechanismus	Auswirkung auf Alveolarebene	relative Häufigkeit*
genetisch	Mutationen in SFTPb, SFTPc, ABCA3, CSF2RA, CSF2RB, Nkx2-1, MARS	Akkumulation unreifer Surfactantformen, Defekt von Sekretion, Transport- und Clearancefunktionen	< 2%
erworben	autoimmunologisch: Auto-Antikörper gegen GM-CSF	Dysfunktion,/Defekt alveolärer Makrophagen und nachfolgend Störungen im Surfactantabbau und -clearance	90%
sekundär	Noxen: toxische Dämpfe, anorganische Stäube (z.B. Silicium, Aluminium), Medikamente, infektiöse Erreger Immunsuppression, hämatoonkologische Erkrankungen (z.B. MDS, Leukämie, Lymphom)	reduzierte Anzahl oder Funktion alveolärer Makrophagen durch Destruktion oder verminderte Synthese	7 – 10%

*Literatur: Trapnell BC et al., N Engl J Med 2003; Mazzone PJ et al., Semin Respir Crit Care Med 2002; Ioachimescu OC et al., Chron Respir Dis 2006; Inoue Y et al., Am J Respir Crit Care Med 2008; Luisetti M et al., Ther Adv Respir Dis 2010

Da in der vorliegenden Arbeit nur die genetischen Ursachen für PAP von Interesse sind, wird im Folgenden nur auf die in Tabelle 1.3.4-1 aufgezählten Mutationen eingegangen und nicht auf weitere Charakteristika oder therapeutische Möglichkeiten der erworbenen oder sekundären PAP. Bezüglich der kongenitalen PAP konnte der erste Zusammenhang mit einer genetischen Störung im Surfactantmetabolismus 1993 bei zwei Geschwisterkindern mit

diesem Krankheitsbild nachgewiesen werden (96). Bei ihnen wurde in BAL-Proben und postmortem Untersuchungen von Lungengewebe ein absoluter Mangel an SP-B und dessen mRNA sowie eine Akkumulation von SP-C gefunden (weiterführend siehe Kapitel 1.4.2).

1.3.5. Genetische Störungen im Surfactantmetabolismus

1.3.5.1. Überblick der genetischen Störungen im Surfactantmetabolismus

Einen Überblick über die fünf genetischen Störungen im Surfactantmetabolismus, die in der vorliegenden Arbeit vorkommen, gibt Tabelle 1.3.5.1.

Tabelle 1.3.5.1: genetische Störungen im Surfactantmetabolismus mit deren Häufigkeit und klinischen Verlauf

Mutation	Klinik	Häufigkeit/natürlicher Verlauf	Erbgang	Diagnose
SP-B-Mutation (loss of function)	akut, Beginn in neonataler Phase	1/1 Mio. lethal	rezessiv	genetische Analyse
ABCA3-Mutation (loss of function)	akut, Beginn in neonataler Phase	lethal	rezessiv	genetische Analyse
	chronisch, ILD im Kindesalter	variabel		
SP-C-Mutationen	ILD im (Klein-) Kindesalter	variabel	dominant, hereditär und sporadisch	genetische Analyse
NKX2.1-Mutationen	akut, neonatales RDS oder chronisch ILD	variabel, assoziiert mit Hypothyreose und Choreaathetose	dominant, hereditär und sporadisch	genetische Analyse
CSF2RA	Pulmonale alveoläre Proteinose	nicht bekannt, variabel	X-Y, PAR1-Region pseudoautosomal	genetische Analyse

Modifiziert nach Hamvas A. Chinese Medical Journal 2010 (65)

1.3.5.2. Mutationen in SFTPB

Wie in Kapitel 1.2.3.1 beschrieben, liegt das SFTPB-Gen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 2 (Position 2p12-p11.2) und kodiert ein 381 Aminosäuren langes Vorläuferprotein (Prä-Pro-SP-B), welches über die zuvor beschriebenen Schritte zum reifen, 79 Aminosäuren langen und 8,7 kDa schweren SP-B-Monomer prozessiert wird.

1992 veröffentlichten Moulton et al. eine Fallstudie über 2 Geschwisterpaare aus zwei unterschiedlichen Familien (keine Verwandtenehen) mit kongenitaler Alveolarproteinose (94). Klinisch zeigte sich das in allen vorher und nachher in der Literatur beschriebenen Fällen reproduzierbare Bild eines schweren Atemnotsyndroms mit respiratorischem Versagen bereits wenige Stunden postpartal nach unauffälligem Schwangerschaftsverlauf. In den histopathologischen Untersuchungen von Lungengewebe postmortem fanden sich bei diesen Geschwisterpaaren folgende Befunde: zum einen eine positive PAS-Färbung intraalveolär, welche eine Ansammlung von Proteinmaterial anzeigt. Zum anderen fand sich eine bronchopulmonale Dysplasie mit interstitieller Fibrose und alveolärer Überblähung. Moulton et al. postulierten als Ursache eine hereditäre, wahrscheinlich autosomal dominant vererbte, Störung des Surfactantstoffwechsels.

In den folgenden Jahren häuften sich derartige Fallberichte von reifen Neugeborenen mit schwerem postpartalen Atemnotsyndrom (RDS), welches auch unter maximaler supportiver Therapie (bis hin zu HFO-Ventilation und ECMO) sowie exogener Surfactantgabe innerhalb von 5 – 190 Tagen zum Tode führte (96; 33; 7; 97). In einigen Fällen konnte eine familiäre Häufung gezeigt werden.

Clark et al. konnten durch Knockout-Versuche im Mausmodell die Korrelation zwischen einer vollständigen SP-B-Defizienz in BALF und der phänotypischen Ausprägung eines schweren RDS aufgrund mangelnder postpartaler Lungenentfaltung nachweisen (26)

1994 gelang Noggee et al. der Durchbruch im Verständnis der kongenitalen Alveolarproteinose. Nachdem sie 1993 als deren Ursache eine Defizienz von SP-B und dessen mRNA in postmortem-Untersuchungen von Lungengewebe bei

zwei Geschwisterkindern mit postpartalem RDS nachgewiesen hatten, konnten sie ein Jahr später die erste und mit Abstand häufigste Mutation im Gen für SP-B (SFTPB) publizieren (132). Mit ca. 60 – 70% ist dies die 121ins2-Mutation. Hierbei handelt es sich um eine Insertion von 3 Basen (GAA) unter Verlust einer Cytosin-Base im Codon 121 in Exon 4 von SFTPB. Der daraus resultierende effektive Zusatz zweier Basen führt zu einem Frameshift, welcher einen vorzeitigen Translationsstopp nach Codon 214 in Exon 6 bedingt. Da das endgültige SP-B-Protein nach mehrfachem Splicing des Proproteins letztlich ein Translationsprodukt der Codons 201 – 279 ist, erzeugt die 121ins2-Mutation einen absoluten Mangel an reifem SP-B und seinen Pro-Formen und verursacht die Akkumulation einer unvollständig prozessierten Pro-SP-C-Form (10).

Eine 1997 veröffentlichte Untersuchung von Hamvas (63) ergab eine Prävalenz der 121ins2-Mutation auf zwei Allelen in 60% und in weiteren 25% auf einem Allel bei Kindern mit SP-B-Defizienz. In letzterem Fall ergibt sich eine phänotypische Ausprägung nur dann, wenn auf dem anderen Allel eine weitere Mutation im SFTPB-Gen vorliegt, eine sogenannte Compound-Heterozygotie. In verschiedenen Populationen wurde die Allel-Frequenz der 121ins2-Mutation evaluiert und es wurden Prävalenzen von 1/1000-3000 in zwei US-amerikanischen Populationen, 0,8/1000 in einer weiteren US-amerikanischen Population bzw. 1/560 in einer dänischen Population gefunden. Durch Extrapolation dieser Ergebnisse ergibt sich eine ungefähre Prävalenz für eine SP-B-Defizienz von 1/1,7 – 2 Millionen Geburten in o.g. Populationen (27; 64; 6).

Mit Stand Juni 2016 sind 30 verschiedene Mutationen in SFTPB bekannt (human gene mutation database). Ein symptomatischer und ohne Lungentransplantation letaler Verlauf tritt bei homozygoter oder compound heterozygoter Ausprägung auf. Demzufolge liegt ein rezessiver Erbgang vor. Untersuchungen am Mausmodell haben ergeben, dass ab einer Expression von SP-B < 25% der normalen Menge Symptome mit respiratorischem Versagen auftreten (92).

Wie bei den ersten publizierten Fällen beschrieben, fallen die Neugeborenen nach unauffälliger Schwangerschaft und termingerechter Entbindung direkt bei Geburt oder wenige Stunden danach mit schwerer respiratorischer Insuffizienz (Atemnotsyndrom) auf, welche keine oder nur kurzfristige Besserung auf Kortikosteroide und exogene Surfactantgabe zeigt. Radiologisch zeigen sich

alveoläre Infiltrate im Sinne einer diffusen Milchglatrübung. Das histologische Bild wurde bereits weiter oben im Kapitel beschrieben.

Tabelle 1.3.5.2 zeigt die Mutationen im SFTP-B-Gen, die im Kinderlungenregister bzw. über das chILD-EU Projekt bis 2012 registriert wurden.

Tabelle 1.3.5.2: Mutationen in SFTPb mit Lokalisation und klinischer Symptomatik

Mutation	Mechanismus	Lokalisation	Klinik
121ins2 (4*)	Insertion von 2 bp (375C-GAA change) mit Frameshift und vorzeitigem Abbruch des Proteins	g.1549C>GAA, Exon 4	Schwere neonatale respiratorische Insuffizienz mit letalem Ausgang
c.672+1_+5del GTGAG	Deletion homozygot von Nucleotiden GTGAG wahrscheinlich Splice site Defekt	Exon 6	reifgeboren, Eltern konsanguin, postpartale therapieresistente respiratorische Insuffizienz
C335S	Punktmutation mit Austausch von 1 bp Cystein335 (TGC) >Serin(TCC)	Position 335 in Exon 9	Fast reifgeboren (37SSW), Eltern konsanguin, postpartales Atemnotsyndrom, letal mit 17 Tagen
G135S (2)	Punktmutation mit Austausch von 1 bp Glycin135(GGC) nach Serin (AGC) mit Missense	Position 2417 in Exon 5	Frühgeboren (35SSW), postpartales Atemnotsyndrom, letal mit 1 Monat
496delG	Deletion von 1 bp	Exon 2	Fragliche Assoziation mit Atemnotsyndrom, interstitielle Pneumonitis und Emphysem
487delC	Deletion von 1 bp	n.a.	Keine Aussage möglich, da Kombination mit 121ins2

Mutation	Mechanismus	Lokalisation	Klinik
122delT	Deletion von 1 bp mit Frameshift und vorzeitigem Stoppcodon bei AS 214 in Exon 6 (p.Leu 122ArgfsX93)	Position 122 in Exon 4	Postpartales Atemnotsyndrom, verstorben mit 8 Wochen
122delT + 1553delT	Compound-heterozygote Deletionen	beide in Exon 4	SP-B-Defizienz; neonatale respiratorische Insuffizienz, letal mit 4 Monaten
c.-384G>A (9)	Promotor-Polymorphismus, dadurch TTF-1-Bindungsstelle verändert, verminderte transkriptionelle Aktivität	Promotor	Heterogen, z.T. Kombination mit ABCA3-, Nkx2-1-Mutation; Persistierende Tachypnoe; emphysematöse Lungenveränderungen, mind. 1 Kind verstorben
I131T	Polymorphismus, Austausch von 1 bp 1580T>C	Exon 4	Suszeptibilität für RDS in Verbindung mit SFTPA1 Allel-Varianten (6A2, 1A0) (61) Reifgeboren, postpartales RDS, verstorben mit 2 Monaten

Mutationen im Surfactantprotein B von Patienten aus dem Kinderlungenregister bzw. chILD-EU Projekt

*die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der jeweiligen Mutation im Register an, keine Angabe bedeutet einmal aufgetreten

1.3.5.3. Mutationen in SFTPC

Bereits 1987 isolierten Warr et al. eine cDNA aus Surfactant, welche für ein niedermolekulares Surfactantprotein kodiert. Sie benannten es nach seinem isolierten Molekulargewicht SP5 (142). 1988 wurde von Glasser et al. (48) eine detailliertere Identifikation dieses Proteins mit 2 unterschiedlichen cDNA's und einer Molekulargröße von ca. 3,7 kDa, bestehend aus 6 Exons, beschrieben. Auch die extreme Hydrophobizität und Filmbildung in Anwesenheit von Phospholipiden sowie die hieraus resultierende Wichtigkeit für die Lungenfunktion im Neugeborenenalter war zu dieser Zeit bereits bekannt.

2001 gelang Nogee et al. die Assoziation einer Mutation im Gen für SP-C mit der klinischen Symptomatik eines RDS bei einem Säugling. Dieser war im Alter von 6 Wochen mit Tachypnoe, Zyanose unter Raumluft und radiologisch interstitieller Zeichnungsvermehrung aufgefallen. Sowohl bei der Mutter als auch beim Großvater der Reihe waren pulmonale Erkrankungen seit der Kindheit bekannt. Diese damit erste genetische Mutation mit familiärer phänotypischer Ausprägung einer pädiatrischen DPLD zeigte eine heterozygote 460+1G-A Mutation im Basenpaar 1728 in der Splicingregion von Intron 4. Sie führt zu einer 37 Aminosäuren langen Deletion im Vorläuferprotein ProSP-C, wodurch der intrazelluläre Transport unterbrochen wird (98). In der weiteren Untersuchung von Kleinkindern mit chronischer pulmonaler Symptomatik konnte die gleiche Arbeitsgruppe 2002 die Hypothese bestätigen, dass sowohl hereditäre als auch sporadische Mutationen im SFTPC-Gen mit phänotypischer Ausprägung auftreten können (99).

Anders als bei Mutationen im Surfactantprotein B, zeigen sich bei Mutationen im Gen für Surfactantprotein C klinische Symptome nicht zwingend unmittelbar postpartal, sondern mit einer großen Variabilität bezüglich des Alters der klinischen Erstmanifestation. Dieses reicht von wenigen Monaten bis ins Erwachsenenalter. Auffallend ist bei sämtlichen Mutationen, dass bereits eine heterozygote Form für eine phänotypische Ausprägung ausreichend ist. Es handelt sich bei familiären Erkrankungen demnach um einen autosomal dominanten Erbgang. Bei den sporadischen Mutationen genügt ebenfalls der Defekt in einem Allel zur phänotypischen Ausprägung.

In einer sehr umfassenden Arbeit von Beers und Mulugeta aus 2005 (11) wurden die bis damals detektierten Mechanismen von SFTPC-Mutationen dargestellt. Es wurde geschlussfolgert, dass es sich in den meisten Fällen um Fehlfaltungen oder Fehl-Targeting der Proteinvorstufen handelt und nicht etwa um ein vollständiges Fehlen des reifen SP-C Proteins.

Der größte Teil der Mutationen in SFTPC tritt im C-terminalen Bereich von Pro-SP-C auf, welcher zur sogenannten BRICHOS-Domäne zählt. Diese Domäne ist eine hochkonservierte Genregion, die für etwa 100 Aminosäuren kodiert und in verschiedenen Strukturproteinen zu finden ist. Diese Strukturproteine sind alle assoziiert mit degenerativen oder proliferativen Erkrankungen (11). Das erste gefundene Protein, das BRI-Protein, wurde bei der sogenannten „familial British dementia“ und „Danish dementia“ detektiert. Gemeinsam ist den Mutationen in der BRICHOS-Domäne von pro-SP-C, dass sie alle heterozygot zur phänotypischen Ausprägung führen und kein reifes SP-C detektiert werden kann, was für einen dominant-negativen Effekt spricht (140). Die Deletion von Exon 4 führt zum Beispiel zu einer Akkumulation und Aggregatbildung von pro-SP-C intraalveolär, was bedeutet, dass die Zellen das fehlgefaltete Protein nicht abtransportieren können und dieses einen toxischen „gain-of-function“ Effekt hat.

Eine zweite Gruppe von Mutationen wird zu den „Non-BRICHOS-Mutationen“ zusammengefasst. Sie liegen in einem Genbereich auf Exon 3, der für 30 Aminosäuren kodiert. Im Gegensatz zu den BRICHOS-Mutationen, lässt sich bei den Non-BRICHOS-Mutationen reifes SP-C in BAL und Lungengewebe detektieren, dennoch genügt auch hier eine heterozygote Mutation für die klinische Symptomatik einer diffusen parenchymatösen Lungenerkrankung.

Die N-terminale, cytosolische (nicht-transmembrane) Domäne von ProSP-C ist die Lokalisation für eine dritte Gruppe von SFTPC-Mutationen. Hier wurde bislang nur eine Mutation bei einem Kind mit DIP/NSIP gefunden, die P30L-Mutation (siehe Abbildung 1.3.5.3-1 und Tabelle 1.3.5.3-2).

Die häufigste Mutation in SFTPC ist nach heutigem Stand mit etwa 25 – 30% (21) die I73T-Mutation, eine Non-BRICHOS-Mutation, die durch den Austausch eines Basenpaares in Exon 3 zu einem Aminosäureaustausch im Translationsprodukt an Stelle 73 des Vorläuferproteins ProSP-C von Isoleucin nach Threonin führt.

Pathophysiologisch kommt es zu einer Akkumulation von Surfactantprotein A, B und C und dysfunktionalem pro-SP-C zusammen mit Phospholipiden im Alveolarraum. Dies führt zu einer pulmonalen alveolären Proteinose mit Nachweis von PAS-positiver Färbung in der histochemischen Untersuchung.

Bezüglich der Prävalenz gibt es keine validen Angaben. In einer Studie von Garmany et al. 2008 gelang keine Aussage zur Prävalenz, da in einer unselektionierten Population mit fast 9000 Chromosomensätzen keine einzige I73T-Mutation detektiert werden konnte (47).

Tabelle 1.3.5.3-1 zeigt die Mutationen und deren phänotypische Ausprägung, die bis 2012 im für vorliegende Arbeit zugrundeliegenden Kinderlungenregister gesammelt wurden. Die Abbildung 1.3.5.3-1 veranschaulicht die Lokalisationen der einzelnen Mutation aus der Arbeit von Beers und Mulugeta und gibt eine Übersicht über den Aufbau von ProSP-C. In Tabelle 1.3.5.3-2 sind die dazugehörigen Mutationen mit den histopathologischen Befunden nach den oben genannten drei Gruppen nochmals aufgelistet.

Tabelle 1.3.5.3-1: SFTPC-Mutationen aus dem Kinderlungenregister bis 2012

Mutation (n)	Mechanismus	Lokalisation	Phänotypische Ausprägung
BRICHOS-Domäne			
C121F (2)	Austausch von 1 bp G>T (Cys121(TGC) > Phe(TTC))	Exon 4	NSIP
A112T (1)	Austausch von 1 bp (c.334 G>A)	Exon 4	PAP oder CPI
R167Q (1)	Austausch von 1bp (c.2125 G > A)	Exon 5	Milde bis letale Form von ILD
E191X (1)	Austausch von 1bp G>T mit Entstehung eines Stoppcodons (TAG)	Exon 5	RDS, kombinierte chILD mit NSIP/DIP/PAP-Muster
S186N (1)	Austausch von 1 bp (c557G>A)	Exon 5	benigne; wahrscheinlich Polymorphismus ohne Auswirkung auf Proteinfunktion
Non-BRICHOS-Domäne			
G74V (1)	Austausch von 1bp (c.221G-T)	Exon 3	PAP
H59R (1)	Austausch von 1bp (Histidin59 (CAC)>Arginin (CGC))	Exon 2	von asymptomatisch bis NSIP mit Lungenfibrose mit Emphysem
I73T (6)	Austausch von 1 bp (c.1286T>C)	Exon 3	Progrediente respiratorische Insuffizienz im Säuglingsalter histologisches Muster: NSIP und PAP Im Erwachsenenalter CPFE
N-terminale, nicht-transmembrane Domäne			
M/P -92/-91(-60/-61) (5)		Exon 1 je nach Beginn der Zählung; -92/-91 ab ATG-Startcodon	wahrscheinlich (ch)ILD, Beginn von postpartal bis Adoleszenz, NSIP/Emphysem/Atelektasen, etc?

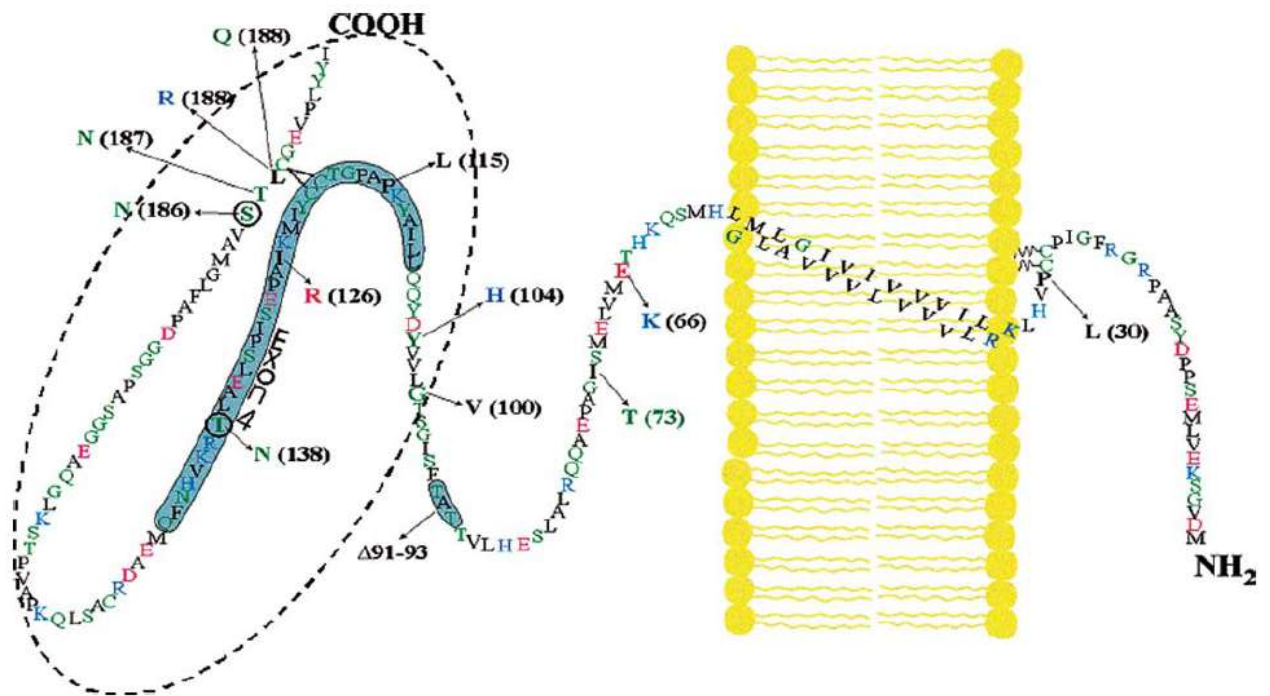


Abbildung 1.3.5.3-1: Aminosäuresequenz und mit DPLD assoziierte Mutationen von humanem SP-C; aus Beers und Mulugeta Annu. Rev. Physiol 2005

Dargestellt ist das humane SP-C-Protein mit den darauf lokalisierten und mit DPLD assoziierten Mutationen. Eingekreist ist die BRICHOS-Domäne, die die Aminosäuren 94-197 einschließt. Zwischen dieser und der transmembranen Domäne des reifen SP-C-Proteins befindet sich die Non-BRICHOS-Domäne von Aminosäure 59-93. Der cytosolische nicht-transmembrane N-terminale Teil von pro-SP-C erstreckt sich über die Aminosäuren 1 – 33 und fungiert als wichtiges Signalpeptid im intrazellulären Transport und der Prozessierung von pro-SP-C (139). Das reife SP-C-Protein besteht aus den Aminosäuren 24 – 58.

Tabelle 1.3.5.3-2: Mutationen im Gen für SFTPC aus verfügbarer Literatur bis 2005*

Mutation	Mechanismus	Lokalisation	Phänotypische Ausprägung
BRICHOS-Domäne			
I73T	Austausch von 1 bp (c.1286T>C)	Exon 3	NSIP und PAP
L188Q	Austausch von 1 bp (c.563T>A)	Exon 5	NSIP im Kindesalter DIP/UIP im Erwachsenenalter
L188R	Austausch von 1 bp (c.563T>G)	Exon 5	Unspezifische Pneumonitis
140delA	Frameshift-Mutation mit Entstehung eines stabilen Transkriptes	Exon 4	Unspezifische Pneumonitis
I126R	Austausch von 1 bp	Exon 4	Unspezifische Pneumonitis
P115L	Austausch von 1 bp	Exon 4	Unspezifische Pneumonitis
G100V	Austausch von 1 bp	Exon 3	Unspezifische Pneumonitis
Y104H	Austausch von 1 bp	Exon 3	Unspezifische Pneumonitis
Non-BRICHOS-Domäne			
E66K	Austausch von 1 bp (c.1509 G>A)	Exon 2	NSIP und PAP
del91-93	Deletion von 3 bp (TAT) an der Position 91-93	Exon 3	NSIP
delExon 4	Deletion des gesamten Exon 4	Exon 4	NSIP im Kindesalter DIP/UIP im Erwachsenenalter; kein SP-C vorhanden
IVS4DS	c.460 + 1G > A	Intron 4	NSIP im Kindesalter Chronische interstitielle Pneumonitis im Erwachsenenalter

R167Q	Austausch von 1bp an Position 2125 G > A	Exon 5	Milde bis letale Form von ILD
N-terminale, nicht-transmembrane Domäne			
P30L	Austausch von 1 bp	Exon 2	NSIP und DIP

Modifiziert nach Beers und Mulugeta Annu. Rev. Physiol. 2005*

Nicht nur das Alter der Erstmanifestation von Symptomen ist bei den SP-C-Mutationen sehr variabel, sondern auch die phänotypische Ausprägung an sich. So finden sich in der Literatur diverse Kasuistiken von Patienten mit derselben Mutation in SFTPC, jedoch unterschiedlichen Schweregraden eines Krankheitsverlaufes. Tredano et al. fanden eine Häufung von Atemnotsyndrom in einer Population weißer Siedler auf La Réunion und veröffentlichten 2003 einen Fall, bei dem zwei Säuglinge im Alter von ungefähr 9 Monaten mit Atemnotsyndrom auftraten. Das eine Kind starb im Alter von 18 Monaten, während das andere bei leichter ausgeprägten Symptomen mit wiederholten bronchoalveolären Lavagen behandelt wurde (131). Die genetische Analyse ergab dieselbe Mutation in SFTPC, die R167Q-Mutation mit einem Basenpaar-Austausch an Stelle 2125 in Exon 5 von Pro-SPC. Diese Mutation führt zu Fehlfaltung und Fehl-Trafficking (140).

Das klinische Spektrum reicht bei SP-C-Mutationen demnach von milder interstitieller Lungenerkrankung mit möglicher Dyspnoe, Tachypnoe, Zyanose und Gedeihstörung bis hin zu schweren letalen Verläufen nach Monaten bis Jahren. Histologisch kommen Muster von nicht-spezifischer interstitieller Pneumonitis, unspezifischer Pneumonitis, pulmonaler alveolärer Proteinose und eben auch interstitielle Lungenerkrankungen im Erwachsenenalter (DIP, UIP) vor (siehe Tabelle 1.3.5.3-1 und 1.3.5.3-2).

Dass hier sehr wahrscheinlich noch nicht alle klinisch relevanten Mutationen entdeckt sind bzw. sporadische de novo Mutationen keine Seltenheit sind, untermauert die Veröffentlichung von Liu et al. aus 2015 (88). Sie entdeckten die L55F-Mutation bei einem japanischen Mädchen, das mit 5 Monaten mit Symptomen und radiologischen Befunden einer interstitiellen Lungenerkrankung auffällig wurde. Nach initialer Verbesserung unter Therapie wurde im Alter von 9 Jahren aufgrund einer dramatischen pulmonalen Verschlechterung eine Lebendspende-Lungentransplantation notwendig.

Bislang sind in der Literatur über 35 verschiedene Mutationen im Gen für SP-C beschrieben, die mit Dysfunktionen im Surfactantmetabolismus assoziiert werden konnten.

1.3.5.4. Mutationen in ABCA3

Die Abkürzung ABCA3 steht für ein Transportprotein der ATP-Binding Cassette Familie, genauer der Subfamilie A Member 3. Die ABC-Proteine haben die Funktion, mittels Energie aus ATP-Spaltung verschiedenste Substrate über Zellmembranen unterschiedlichster Organe und Organstrukturen zu transportieren (34). Bei ABCA3 handelt es sich um ein 1704 Aminosäuren langes Protein, dessen Gen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 16 (16p13.3) gelegen ist und 30 kodierende Exons enthält. Die Expression von ABCA3 erfolgt beim Menschen hauptsächlich in der Lunge und dort in den Typ II Alveolarzellen. Yamano et al. fanden 2001 mittels immunhistochemischer Analysen die genaue Lokalisation innerhalb der äußeren Membran von Lamellarkörperchen (145).

Aufgrund der Kenntnis der Surfactantproduktion in Typ II Alveolarzellen, dessen Speicherung in den Lamellarkörperchen und der bekannten Funktionen anderer ABCA-Transporter in Zusammenhang mit Phospholipidtransport postulierten Shulein und Mitarbeiter für den ABCA3-Transporter eine wichtige Rolle im Surfactantmetabolismus und untersuchten an 21 Neugeborenen mit schwerem Neugeborenen-Atemnotsyndrom und Surfactantmangel unklarer Genese alle Exons des ABCA3-Gens. Sie fanden bei 16 der 21 Neugeborenen eine oder mehrere Mutationen und konnten so als erste genetische Mutationen in ABCA3 mit RDS assoziieren (114). Tatsächlich ist ABCA3 für den Transport von Phospholipiden, vornehmlich Phosphatidylcholin, in die Lamellarkörperchen zuständig. Des Weiteren ist es an der grundsätzlichen Ausbildung von Lamellarkörperchen beteiligt, was mehrere tierexperimentelle Studien belegen konnten (9; 23). Zusammen mit den Surfactantproteinen erfolgen letzte Prozessierungsschritte und der fertige Surfactant wird durch Exozytose schließlich in den Interzellularraum der Alveolen freigesetzt.

Weitere Forschungen zeigten, dass je nach verbleibender Expression des ABCA3-Transporters im Falle von Mutationen im ABCA3-Gen das Vorliegen von Surfactantproteinen bzw. deren Vorläuferproteinen variabel ist. Im Falle homozygoter Mutationen und sehr geringer bis fehlender ABCA3-Expression finden sich in Typ II Alveolarzellen zwar Vorstufen von SP-B und SP-C (pro-SP-B und pro-SP-C) in größerer Menge, jedoch kaum reifes SP-B. Ebenso im bereits sezernierten Surfactant lassen sich reichlich Vorstufen, jedoch kaum bis kein reifes SP-B und SP-C

nachweisen, was zusätzlich für eine Funktion von ABCA3 bei der Prozessierung der Surfactantproteine spricht (16).

Aufgrund der Gengröße von 80 kb besteht eine große Vielfalt an Mutationen im ABCA3-Gen. Bis dato sind über 200 Mutationen in der Literatur beschrieben, die die häufigste genetische Ursache für eine Störung im Surfactantmetabolismus zu sein scheinen (58). Aufgrund dessen ist auch die phänotypische Ausprägung sehr variabel. Wambach et al. fanden heraus, dass nonsense und Frameshift Mutationen ein frühes (postpartales) Auftreten der Symptomatik und schlechtes Outcome vorhersagen, wohingegen Splicingdefekte, Missense-Mutationen oder Deletionen/Insertionen nicht damit assoziiert sind (137). Des Weiteren ist der Phänotyp ebenfalls davon abhängig, ob Homo- oder Heterozygotie und ob eine oder mehrere Mutationen (Compound-Heterozygotie) vorliegen. Eine homozygote Mutation führt in der Regel zu einem neonatalen RDS mit postpartalem Beginn und letalem Ausgang innerhalb der ersten 6 Lebensmonate trotz maximaler Therapie (84). Heterozygote Mutationen können ein RDS auslösen, welches häufig reversibel ist. Der Beginn der Symptomatik ist sehr variabel von postapartal bis ins Kindesalter. Auch asymptomatische Verläufe kommen vor. Eine weitere Symptomatik kann eine chronische interstitielle Lungenerkrankung mit Auftreten im Kindesalter sein. Diese tritt auch bei compound-heterozygoten Mutationen auf (58). Dass auch eine Haploinsuffizienz einen schweren Krankheitsverlauf auslösen kann, konnte bei einem Frühgeborenen mit prolongiertem RDS nachgewiesen werden (101). Bei diesem Frühgeborenen führte die heterozygote Mutation p.R295C zu einer verminderten ATP-Hydrolyseaktivität des ABCA3-Transporters und in Kombination mit der Lungenunreife zu entsprechender Klinik. In Tabelle 1.3.5.4 sind die in die vorliegende Arbeit eingeschlossenen Patienten mit ABCA3-Mutation aufgelistet. Die Tabelle zeigt den Beginn der pulmonalen Symptomatik und den Langzeitverlauf mit der Dauer des Follow-up. Von den 14 Kindern sind 5 innerhalb des ersten Lebensjahres verstorben, ein Kind im Alter von 4,5 Jahren. Ein anderes wurde mit 1,8 Jahren erfolgreich lungentransplantiert, sein klinischer Zustand stabilisierte sich bis zum 4. Lebensjahr.

Ein Verdacht auf eine ABCA3-Mutation sollte demzufolge nicht nur bei perakutem neonatalen RDS in Betracht gezogen werden, sondern auch bei chronischen Verläufen von Tachypnoe, Hypoxämie und/oder Gedeihstörungen bis ins Kindesalter (20), bei histologischem Nachweis einer NSIP, DIP oder PAP (42) und sogar auch

noch im Jungendalter bei Vorliegen einer histologisch gesicherten idiopathischen pulmonalen Fibrose (IPF) oder einer sogenannten usual interstitial pneumonia (UIP) (148).

Der Nachweis von elektronendichten Strukturen in der zytomorphologischen ultrastrukturellen Analyse der Typ II Alveolarzellen ist typisch für eine Störung im ABCA3-Gen (16). Je nach Mutation können auch normalstrukturierte Lamellarkörperchen vorhanden sein, wohingegen bei primärem SP-B-Mangel aufgrund einer genetischen Störung die Lamellarkörperchen vollständig fehlen (35).

Tabelle 1.3.5.4: ABCA3-Mutationen aus Patientenkollektiv dieser Arbeit mit Phänotyp und Bedeutung der Mutation für den Phänotyp

ID	Mutation	betroffene Allele	Polyphen Prediction	klinische Einschätzung	Langzeitverlauf *	Beginn der Symptomatik	Symptomatik
1901	p.R1561X	homozygot	nicht anwendbar für Nonsense- oder Frameshift-Mutation	neonatale Erkrankung, wahrscheinlich Zusammenhang mit ABCA3	dead (0,4)	postpartal	RDS
715	p.P193S p.G1421R	compound heterozygot	beide wahrscheinlich schädigend	neonatale Erkrankung, wahrscheinlich Zusammenhang mit ABCA3	dead (0,7) LTx mit 0,6	postpartal	RDS
1354	p.R1561X	homozygot	nicht anwendbar für Nonsense- oder Frameshift-Mutation	neonatale Erkrankung, wahrscheinlich Zusammenhang mit ABCA3	dead (0,2)	postpartal	RDS
1963	p.A1700T	homozygot	benigne	keine neonatale Erkrankung, unklar ob Zusammenhang mit ABCA3	n.v.	n.v.	PAP und Cholesterin-pneumonitis
1655	p.W308R	homozygot	wahrscheinlich schädigend	neonatale Erkrankung, wahrscheinlich Zusammenhang mit ABCA3, transplanted	sick-better (LTx mit 1,8; 3,5)	postpartal	RDS
636	p.F810Cfs*2	homozygot	nicht anwendbar für Nonsense- oder Frameshift-Mutation	neonatale Erkrankung, wahrscheinlich Zusammenhang mit ABCA3	dead (0,07)	postpartal	RDS

ID	Mutation	betroffene Allele	Polyphen Prediction	klinische Einschätzung	Langzeitverlauf *	Beginn der Symptomatik	Symptomatik
1872	p.R43C p.R208W	compound heterozygot	beide wahrscheinlich schädigend	neonatale Erkrankung, wahrscheinlich Zusammenhang mit ABCA3	sick-same (1,75) dead (4,5) #	9,6 Monate	Tachypnoe, Einziehungen, Husten, Penumonien
1632	p.K1388N	homozygot	wahrscheinlich schädigend	neonatale Erkrankung, wahrscheinlich Zusammenhang mit ABCA3	dead (0,2)	postpartal	RDS, pPHT
1822	p.G964D	homozygot	wahrscheinlich schädigend	keine neonatale Erkrankung, wahrscheinlich Zusammenhang mit ABCA3	sick-same	junges Erwachs.alter	NSIP/UIP
1167	p.T1173M	heterozygot	möglicherweise schädigend	neonatale Erkrankung, unklar ob Zusammenhang mit ABCA3	sick-same (0,9)	postpartal	Tachypnoe, Einziehungen, persistierender O ₂ -Bedarf
652	p.R288K	heterozygot	benigne	neonatale Erkrankung, unklar ob Zusammenhang mit ABCA3	sick-better (7)	postpartal	Frühgeburt (36 SSW), Tachypnoe, RDS bei Pneumonie
724	p.A894T	heterozygot	benigne	neonatale Erkrankung, unklar ob Zusammenhang mit ABCA3	sick-better (13,5)	7 Jahre	Tachypnoe, Kurzatmigkeit, produktiver Husten, Gewichtsverlust

ID	Mutation	betroffene Allele	Polyphen Prediction	klinische Einschätzung	Langzeitverlauf *	Beginn der Symptomatik	Symptomatik
1479	p.R288K	heterozygot	benigne	neonatale Erkrankung, unklar ob Zusammenhang mit ABCA3	sick-better (8)	4,25 Jahre	Z.n. Frühgeburt (30 SSW), nächtliche Tachypnoe, Husten, Gedeihstörung, NSIP/DIP
719	p.E292V	heterozygot	wahrscheinlich schädigend	neonatale Erkrankung, unklar ob Zusammenhang mit ABCA3	healthy (2)	6 Monate	Tachydyspnoe, Keuchhusten, mit 9 Monaten LB (DD DIP, EAA, residuelle Viruspneumonie)
1300	p.R288K	heterozygot	benigne	neonatale Erkrankung, unklar ob Zusammenhang mit ABCA3	sick-better (0,5)	postpartal	Frühgeburt (32 SSW), RDS

Polyphen Prediction: Score, der die funktionelle Bedeutung eines SNP's mit konsekutivem Aminosäureaustausch vorhersagt (1)

pPHT = primäre pulmonale Hypertonie, SSW = Schwangerschaftswochen, EAA = exogen allergische Alveolitis, n.v. = nicht verfügbar

* Alter in Jahren bei Ende Follow-up

Information über Tod war erst nachträglich verfügbar und ist nicht in der Auswertung der Todesfälle berücksichtigt

1.3.5.5. Mutationen in den Genen der GM-CSF-Rezeptor α - und β -Kette

Ein geringer Prozentsatz der durch GM-CSF-Störungen verursachten pulmonalen alveolären Proteinosen ist auf Mutationen in den Genen für die GM-CSF-Rezeptor α - und β -Kette (CSF2RA und CSF2RB) zurückzuführen. Neben diesen genetischen Störungen können auch Mutationen in SFTPB, SFTPC, ABCA 3 und Nkx2-1 zum histologischen und klinischen Bild einer PAP führen. Im Unterschied zu diesen Mutationen, bei denen gleichzeitig interstitielle Lungenveränderungen vorhanden sind, liegt bei CSF2RA- und CSF2RB-Mutationen eine reine PAP vor (69).

Das Auftreten einer PAP konnte in Forschungen der 90er Jahre sowohl bei GM-CSF knock-out Mäusen als auch bei knock-out Mäusen für die β -Kette des GM-CSF-Rezeptors nachgewiesen werden. Hier zeigten sich lipoproteinbeladene alveoläre Makrophagen neben den bekannten interalveolären Lipoproteinansammlungen, die für jegliche Form der PAP charakteristisch sind (121). Zurückzuführen ist diese Akkumulation nicht etwa auf eine gesteigerte Produktion von Surfactantmaterial, sondern auf eine verminderte Clearance, v.a. von Phospholipiden und SP-A. Dies konnten zwei Studien aus 1996 und 2001 zeigen (74; 147). Shibata et al. konnten den Zusammenhang zwischen GM-CSF und den alveolären Makrophagen aufzeigen, indem sie eine durch GMCSF regulierte Expression des Transkriptionsfaktors PU1 nachwiesen (113). Dieser ist zuständig für das Wachstum und die Ausdifferenzierung der Makrophagenvorläuferzellen.

Bisher finden sich in der Literatur mehr Mutationen im Gen für die α -Kette des GM-CSF-Rezeptors als für die β -Kette. Im Folgenden werden nur einige Charakteristika der CSF2RA-Mutationen beleuchtet.

Bei dem Kollektiv der vorliegenden Arbeit konnte unter den Patienten mit PAP eine Mutation in CSF2RA gefunden werden. Das Gen findet sich auf der sogenannten pseudoautosomalen Region (PAR) des X- und Y-Chromosoms, was bedeutet, dass nur eine Mutation in beiden Allelen zur phänotypischen Ausprägung führt. Einzige Ausnahme besteht beim Genotyp des Turner-Syndroms (X0). Die fertige α -Untereinheit des Rezeptors beruht auf 11 kodierenden Exons. Die erste Mutation, eine Deletion der Exons 5-13, wurde

2008 bei einem 4 jährigen Mädchen mit hinsichtlich GM-CSF-Stimulation therapieresistenter PAP beschrieben (91). Mittlerweile sind mehr als 17 verschiedene homozygote Mutationen in der Literatur beschrieben (69).

Neben der genetischen Analyse besteht zur Klärung einer CSFR-Mutation bei PAP diagnostisch noch die Möglichkeit einer Aktivitätsmessung der STAT 5-Phosphorylierung, welche intrazellulär in Monozyten in der Signalkaskade durch Stimulation des GM-CSF-Rezeptors erfolgt (122). Dass trotz derselben Mutation in CSF2RA eine Variabilität in der Schwere des Krankheitsbildes der PAP vorliegen kann, konnten Suzuki et al. bei zwei Geschwisterkindern (6 und 8 Jahre) nachweisen (123). Tabelle 1.3.5.5 zeigt die Charakteristika des in der vorliegenden Arbeit eingeschlossenen Patienten mit einer CSF2RA-Mutation.

Tabelle 1.3.5.5: Charakteristika des Patienten 1787 mit CSF2RA-Mutation

ID	1787
Mutation	homozygote Deletion Exon 2 – 13
Beginn	Kleinkindalter (Neonatalperiode unauffällig)
pulmonale Symptomatik	rezidivierende Pneumonien (6-8/Jahr) Asthma
Verlauf	u.a. schwere Mykoplasmeninfektion mit 7,75 Jahren, Ascariasis, rezidivierende Krankenhausaufenthalte
Diagnostik	CT mit 8,5 Jahren: NSIP, floride Inflammation, Bronchiektasen CT mit 10,3 Jahren: zunehmende alveoläre und interstitielle Verdichtungen LB mit 10,5 Jahren: pulmonale alveoläre Proteinose
Follow-up Dauer	3,5 Jahre
Langzeitverlauf	sick – better

LB = Lungenbiopsie, CT = Computertomographie, NSIP = nicht-spezifische interstitielle Pneumonie

1.3.5.6. Mutationen im Gen des thyroidalen Transkriptionsfaktor TTF-1

Der Transkriptionsfaktor TTF-1 ist Teil eines Enhancer-Komplexes, der unter anderem an die Promotorregion von SFTPb und SFTPc bindet und deren Expression stimuliert.

Bereits 1996 wurde im Mausmodell der Zusammenhang zwischen TTF-1 und seiner Rolle in der embryonalen Entwicklung der Lunge und der Expression von SP-B und SP-C herausgefunden (149). Heute ist bekannt, dass TTF-1 in Typ II Alveolarzellen und in Clarazellen alle jeweils dort exprimierten Surfactantproteine induziert (12). Die Expression von TTF-1 an sich findet sich in den drei Organen Schilddrüse, Gehirn und Lunge. Das dazugehörige Gen ist Nkx2.1 auf Chromosom 14q13 und besteht aus 3 Exons und 2 Introns (62). Primär wurde TTF-1 als ein Protein in thyreoidalen Zellen identifiziert, welches an den Promotor von Thyreoglobulin bindet, worauf die Namensgebung zurückzuführen ist (25). Eine vollständige Deletion dieses Gens führt zum sogenannten „Brain-Thyroid-Lung-Syndrom“, bei dem Neugeborene mit kongenitaler Hypothyreose, RDS und Choreoathetosen auffallen (85). Andere Mutationen im Nkx2.1-Gen können pulmonale Symptome auch erst im Kindesalter als interstitielle Lungenerkrankung oder rezidivierende pulmonale Infekte auslösen (56).

In einem Übersichtsartikel von Hamvas et al. werden über 20 Mutationen in Nkx2.1 beschrieben (65). Keine davon hat ein überdurchschnittlich gehäuftes Vorkommen wie etwa bei der I121ins-Mutation in SFTPb. Dem Artikel ist ebenfalls zu entnehmen, dass der Anteil an sporadischen Neumutationen etwa 50% beträgt. Dabei gibt es sowohl loss-of-function- als auch gain-of-function-Mutationen. Guillot et al. konnten zeigen, dass diese Mutationen trotz gleicher klinischer Symptomatik mit neonatalem RDS und Übergang in eine schwere DPLD entweder mit einer verminderten oder einer Überexpression von SFTPc einhergehen (59). In der biochemischen Analyse der Surfactantproteine zweier Neugeborener mit Nkx2.1-Mutationen konnten sie verminderte Konzentrationen an reifen Surfactantproteinen und erhöhte Konzentrationen an unreifen Vorstufen in BAL sowie in vitro im Vergleich zum Wildtyp nachweisen (59).

Die beiden Nkx2.1-Mutationen im Kollektiv der vorliegenden Arbeit sind in der folgenden Tabelle 1.3.5.6 charakterisiert.

Tabelle 1.3.5.6: Charakteristika der Patienten 659 und 1399 mit Nkx2.1-Mutation

ID	659	1399
Mutation in Nkx2.1	Deletion Chromosom 14	c.278_306del29 (zusätzlich Polymorphismus in SFTPb: c.-384G>A ht)
Beginn	keine Information	postpartal
pulmonale Symptomatik	rezidivierende Pneumonien	Tachypnoe, Einziehungen, sekundäre pulmonale Hypertonie mit Rechtsherzinsuffizienz,
andere Symptomatik	Hypothyreose, Choreoatetose	kongenitale Hypothyreose psychomotorische Retardierung
Diagnostik	BAL: massive neutrophile Inflammationsreaktion	CT: ILD mit verdickten Interlobärsepten, Emphysembullae, milchglasartigen Trübungen BAL: massive neutrophile Inflammationsreaktion
Verlauf	mit 19 Jahren BAL	mechanische Beatmung, Tracheostoma mit 2 Monaten
Follow-up Dauer	--	9 Monate
Langzeitverlauf	sick – same	verstorben

ht = heterozygot, ILD = interstitielle Lungenerkrankung, BAL = bronchoalveoläre Lavage

1.4. Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Die Indikationen für eine BAL sind sowohl von diagnostischem als auch therapeutischem Wert. Therapeutisch wird sie zum Beispiel als „whole lung lavage“ (WLL) bei pulmonaler alveolärer Proteinose durchgeführt. Tabelle 1.4-1 gibt eine Übersicht über Indikationen der BAL. Im Abschnitt Material und

Methoden wird in Kapitel 2.2 die standardisierte Untersuchung und Gewinnung von bronchalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) beschrieben.

Tabelle 1.4-1: Indikationen für eine Bronchoskopie/bronchoalveoläre Lavage

diagnostische Indikation und mögliche Diagnose	therapeutische Indikation
<p>pulmonale Infektionen bei Immunsuppression</p> <ul style="list-style-type: none"> • spezifische Erreger 	<p>Beseitigung von Sekretverhalt bei:</p> <ul style="list-style-type: none"> • infektiösen Erkrankungen • Cholesterinpneumonmie • pulmonale alveoläre Proteinose
<p>chronischer Husten, chronische Bronchitis</p> <ul style="list-style-type: none"> • chronische Infektion • chronische Aspiration • Fisteln • ziliäre Dyskinesie 	<p>Fremdkörperentfernung bei Bolusaspiration</p>
<p>unklare Atemwegsobstruktion/kongenitaler Stridor</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tracheomalazie • tracheobronchiale Stenosen • Fremdkörper 	<p>interventionelle Bougierung von Stenosen, Verschluss von Fisteln</p>
<p>persistierende pulmonale Symptome (pathologische Atemgeräusche, Einziehungen, Tachypnoe)</p> <ul style="list-style-type: none"> • interstitielle Lungenerkrankungen • alveoläre Hämorrhagie • pulmonale Histozytose 	
<p>V.a. Malignität</p> <ul style="list-style-type: none"> • maligne Zellen 	
<p>Bestimmung von Krankheitsaktivität</p>	

Die Analyse von BAL-Flüssigkeit gibt Aufschluss über die zellulären und nicht-zellulären Bestandteile des Alveolarraumes. Die zellulären Bestandteile beinhalten sowohl Zellen des Alveolarraums (Makrophagen, ganz selten Alveolarepithelzellen), Zelldetritus und immunologische Zellen (Lymphozyten, Granulozyten), die in der zytologischen Begutachtung differenziert werden. Ein Beispiel für normale relative Häufigkeiten einzelner Zelltypen in der Differentialzytologie zeigt Tabelle 1.4-2.

Tabelle 1.4-2: Normwerte der Differentialzytologie bei Kindern und Jugendlichen

Zellen	prozentualer Anteil
Recovery	> 40%
Gesamtzellzahl	70 – 300/ μ l
Makrophagen	84 – 92,5 %
Lymphozyten	7 – 12,5%
neutrophile Granulozyten	0,9 – 3,5% (< 5 Jahre bis 10%)
Eosinophile	0 – 0,4%
CD4/CD8	0,1 – 1,9

modifiziert nach ERS Task Force on bronchoalveolar lavage in children (31)
angegeben ist die Bandbreite der Medianwerte aus fünf verschiedenen Studien

Des Weiteren lassen sich in BALF körperfremde (pathogene) Zellen/Erreger finden. Zu den nicht-zellulären Bestandteilen in BALF gehören die Komponenten des Surfactants, also Phospholipide und Surfactantproteine, aber auch mögliche Antikörper/Immunglobuline, Cytokine und Interleukine. In Tabelle 1.4-3 sind die in BALF enthaltenen Proteinkomponenten aufgelistet. Bei diesen handelt es sich entweder um Proteine des Blutplasmas oder um eigens vom Alveolarepithel gebildete Proteine. Den Hauptbestandteil der Proteine bildet Albumin, welches aus dem Serum stammt (107).

Tabelle 1.4-3: Proteinbestandteile in bronchoalveolärer Lavage

Plasmaproteine	Alveolarepithel
Albumin	Surfactantproteine
β2-Mikroglobulin	Cytokine
Fibrinogen	Chemokine
Immunglobuline (v.a. M, G)	Immunglobuline (v.a. A, E)
Cytokine	Proteasen
Proteasen	<ul style="list-style-type: none"> • Angiotensin-converting enzyme • Metalloproteinasen • Myeloperoxidase • Elastase • Fibronectin
<ul style="list-style-type: none"> • Alpha-1 Antitrypsin 	

modifiziert nach Rose et al. 2007 (109) und Radhakrishnan et al. 2014 (107)

2. Material und Methoden

2.1. Patientenauswahl und Kontrollgruppen

In die Arbeit wurden Proben von Patienten eingeschlossen, die aufgrund des Verdachtes auf DPLD eine bronchoalveoläre Lavage erhalten hatten, welche im Zeitraum zwischen November 2005 und Februar 2011 am Dr. von Haunerschen Kinderspital nach unten beschriebener quantitativer Methode biochemisch analysiert wurde. Die bronchoalveoläre Lavage war entweder direkt am Dr. von Haunerschen Kinderspital oder in auswärtigen Kliniken in Deutschland und Europa durchgeführt und dann zur Diagnostik an das Dr. von Haunersche Kinderspital gesendet worden. Als Kontrollgruppe dienten Patienten, die im gleichen Zeitraum entweder im Rahmen elektiver operativer Eingriffe in Intubationsnarkose oder aufgrund einer pulmonalen Pathologie diagnostisch lavagiert wurden und einen Normalbefund oder die Diagnose einer bronchialen Pathologie (Asthma, chronische Bronchitis) aufwiesen. Die Kontrollgruppe wurde nochmals unterteilt in Kinder mit normalem Differentialzellbild in der BAL und solchen mit neutrophiler Inflammationsreaktion. Insgesamt waren die Kinder überwiegend kaukasischer (europäischer) Herkunft, aber auch afrikanischer,

türkischer oder arabischer Abstammung. Abbildung 2.1-1 zeigt das Flussdiagramm der Patientenauswahl mit den Ein- und Ausschlusskriterien. Hatten die Kinder vor BAL eine Therapie mit Surfactant innerhalb von 14 Tagen erhalten oder war die Probe makroskopisch blutig, wurden sie ausgeschlossen.

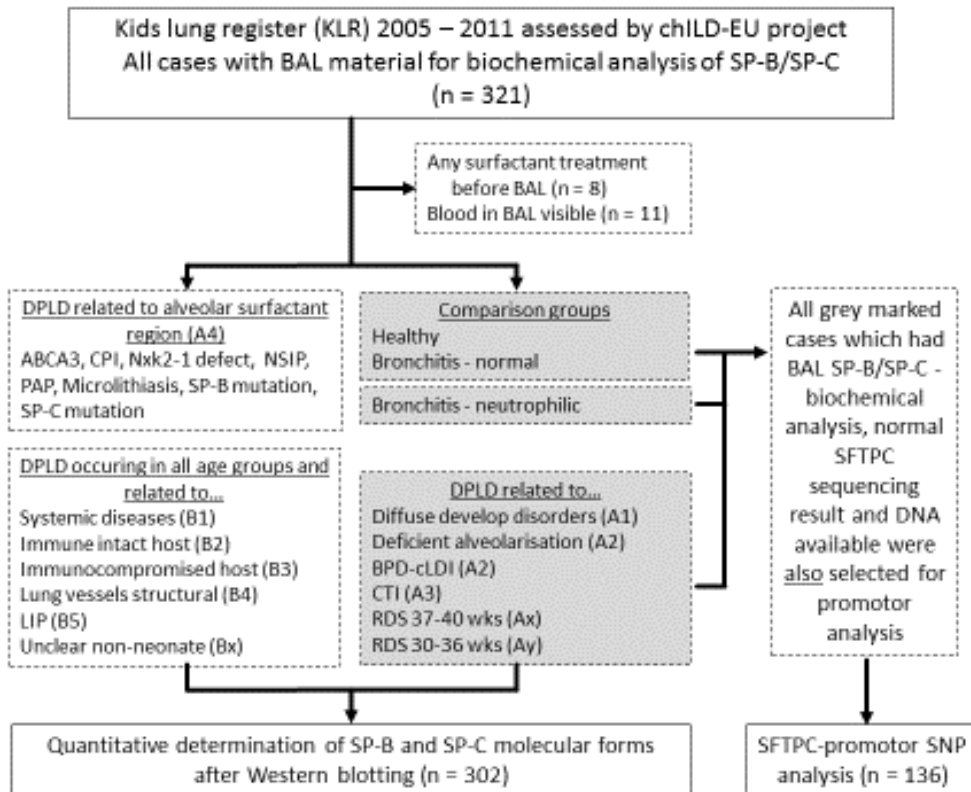


Abbildung 2.1-1: Flussdiagramm der Ein- und Ausschlusskriterien und Übersicht über das Patientenkollektiv (57)

Die Diagnosestellung innerhalb des Patientenkollektivs erfolgte anhand anamnestischer und diagnostischer Informationen aus Arztbriefen und Befunden. In 26% (80 von 302 Patienten) bzw. in 34% der Patienten mit DPLD oder auffälliger Differentialzytologie in der BAL (ohne Lungengesunde und Bronchitis-Patienten mit Normalbefund in BAL; n=231) war eine histologische Aufarbeitung von Lungengewebe erfolgt. Die Kategorisierung der pulmonalen Entitäten wurde auf Grundlage der von Deutsch et al. 2007 vorgeschlagenen Systematik vorgenommen (38). Tabelle 2.1-1 zeigt die in der vorliegenden Arbeit verwendete

Systematik mit der jeweiligen Anzahl vorkommender Patienten in den Krankheitsentitäten. In der Tabelle 2.1-2 sind die Kontrollgruppen aufgeführt.

Unter Berücksichtigung aller vorhandenen Patienteninformationen wurde eine Arbeitsdiagnose mit möglichst klarer Zuweisung erstellt. Bei offenen Fragen bezüglich der Diagnose erfolgte dennoch eine Kategorisierung in die hierfür erstellten Subkategorien Ax, Ay, Bx, die jeweils die Bezeichnung „unklares Atemnotsyndrom“ tragen (Ax bei Reifgeborenen, Ay bei nahezu Reifgeborenen (37-40 SSW), Bx bei Säuglingen und Kleinkindern) (56).

Tabelle 2.1-1: Systematik der Entitäten diffuser parenchymatöser Lungenerkrankungen und Anzahl in vorliegender Arbeit

Abkürzung	Kategorie/Subkategorie	Anzahl (n)
A = DLD more prevalent in infancy		
A1	Diffuse developmental disorders	2
	Alveolar capillary dysplasia with misalignment pulmonary vein	2
A2	Growth abnormalities deficient alveolarisation	34
	Pulmonary hypoplasia	4
	Related to preterm birth (BDP-cLDI ^a)	25
	Related to preterm birth (Wilson Mikity, new BPD)	1
	Related to chromosomal disorders	4
	related to congenital heart disease	1
A3	Infant conditions of defined etiology	32
	Neuroendocrine cell hyperplasia of infancy (NEHI)	3
	Chronic tachypnoe of infancy (CTI)	28
	Pulmonary interstitial glycogenosis (PIG)	1
A4	Related to alveolar surfactant region	40
	ABCA3 – two*	9
	ABCA3 – one [#]	6
	Alveolar microlithiasis	1
	Chronic pneumonitis of infancy (CPI)	4
	Nkx2-1 defect [§]	2

Abkürzung	Kategorie/Subkategorie	Anzahl (n)
A4	Nonspecific interstitial pneumonia (NSIP)	9
	Pulmonary alveolar proteinosis (PAP)	5
	Surfactant protein C mutation	3
	Surfactant protein B mutation	1
Ax	Unclear RDS in the mature neonate (37-40 wks)	19
	Familial	2
	No or very low SP-C biochemically	7
	Pulmonary hypertension	7
	Pulmonary hypoplasia	1
Ay	Unclear RDS in the almost mature neonate (30-36 wks)	9
	No or very low SP-C biochemically	3
	Pulmonary hypertension	3
B = DLD not specific to infancy, mostly in older children		
B1	Related to systemic disease processes	4
	Immune-mediated/collagen vascular disorders	2
	Langerhans cell histiocytosis	1
	Alagille Syndrome (arteriohepatic dysplasia)	1
B2	presumed immune intact host, related to exposures (infectious/non-infectious)	10
	Infectious/post-infectious processes	2
	Mac-Leod-Swyer-James-Syndrom	2
	Exogen allergic alveolitis/hypersensitivity pneumonitis	3
	Aspiration syndromes/GERD	3
B3	DPLD-in the immunocompromised host or transplanted	9
	Infections–Antibody deficiencies	1
	Infections–T cell deficiencies	3
	Infections–Miscellaneous	4
	Related to therapeutic intervention	1

Abkürzung	Kategorie/Subkategorie	Anzahl (n)
B4	DPLD-related to lung vessels structural processes	12
	Pulmonary capillary hemangiomatosis	5
	Pulmonary hypertension	4
	lymphatic disorders	1
	Congestive changes related to cardiac dysfunction	1
	Pulmonary hemorrhage	1
B5	DPLD-related to reactive lymphoid lesions	2
	Lymphocytic interstitial pneumonia (LIP)	2
Bx	DPLD-unclear RDS in the NON-neonate	3

^a bronchpulmonary dysplasia in chronic lung disease of prematurity

* zwei krankheitsauslösende Mutationen im Gen für den ABCA3-Transporter

eine krankheitsauslösende Mutation im Gen für den ABCA3-Transporter

§ krankheitsauslösende Mutation im Gen für TTF1 (thyroid transcription factor 1)

¹ der Begriff „unclear“ bezieht sich auf das Fehlen einer eindeutigen Ätiologie

Tabelle 2.1-2: Kontrollgruppen

Abkürzung	Kategorie/Subkategorie	Anzahl (n)
D = other airway disorders		
	bronchitis – neutrophilic	37
	bronchitis – normal cell differential	70
Lungengesunde (LG)		
	Healthy	19

In einer Subgruppe von Patienten mit BAL-Diagnostik auf SP-B- und SP-C-Level, bei denen bekannte (mono-) genetische Ursachen für die klinischen Symptome bereits ausgeschlossen worden waren (bekannte Mutationen in SFTPC, SFTPB, ABCA3, Nkx2-1, CSFRA2) und bei denen DNA-Material zur Verfügung stand, wurde die Promotorregion von SFTPC auf sog. SNP's (Single Nucleotide

Polymorphisms; siehe unten) hin untersucht. Aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit einer Beeinflussung der SP-C-Expression bei alveolären Pathologien, wurden Patienten aus den Subkategorien A4 (DPLD related to alveolar surfactant region) ausgeschlossen. Aufgrund der geringen Fallzahl und der nicht zu erwartenden statistischen Aussagekraft der Ergebnisse wurden ebenfalls die Subkategorien B1-5, Bx (not specific to infancy) ausgeschlossen.

Die Tabelle 2.1-3. stellt die Häufigkeit und den prozentualen Anteil der Subkategorien im Gesamtkollektiv („Biochemie“) und im selektierten Kollektiv für die genetischen Analysen („Promotorgenetik“) dar.

Tabelle 2.1-3:Häufigkeit der verschiedenen Gruppen in dieser Arbeit

Kategorie	Anzahl (Biochemie)	Prozent % (Biochemie)	Anzahl (Promotorgenetik)	Prozent % (Promotorgenetik)
LG	19	6,29	7	5,15
D (normal)	70	23,18	49	36,03
D (neutrophil)	37	12,25	24	17,65
A1	2	0,66	0	
A2	34	11,26	18	13,26
A3	32	10,60	16	11,76
A4	40	13,25	-	
Ax	19	6,29	16	11,76
Ay	9	2,98	6	4,41
B1	4	1,32	-	
B2	10	3,31	-	
B3	9	2,98	-	
B4	12	3,97	-	
B5	2	0,66	-	
Bx	3	0,99	-	

2.1.1. Ethikerklärung

Die Genehmigung zur Nutzung der patientenbezogenen Daten und Materialien erfolgte auf der Grundlage der schriftlichen Einverständniserklärungen aller Patienten bzw. deren Eltern bei minderjährigen Kindern. Die Durchführung der Arbeit wurde von der Ethik-Kommission der Ludwig-Maximilians-Universität München (EK026-06) genehmigt. Die prospektive Datensammlung und -analyse erfolgte im Rahmen des GOLD.net project (EK 257-10), weitere Analysen wurden im Rahmen des Projektes FP7-305653-chILD-EU (EK 111-13) durchgeführt.

2.2. Gewinnung und Aufarbeitung von bronchoalveolärer Lavage

Die Bronchoskopie zur Gewinnung bronchoalveolärer Lavage erfolgt im Allgemeinen in Sedierung (Midazolam 0,2 – 0,3 mg/kg Körpergewicht) Bei manchen Kindern der Kontrollgruppe war sie, wie bereits erwähnt, im Rahmen eines operativen Eingriffes unmittelbar nach Intubation durch den Tubus durchgeführt worden. Nach vollständiger Inspektion des Respirationstraktes wird die Lavage in der Regel in einem Subsegment von Mittellappen oder Lingula durchgeführt. Im Falle der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Proben wurden sie auch im rechten Unterlappen oder aus dem pathologisch veränderten Lungenlappen entnommen. Das Bronchoskop wird in die sogenannte Wedge-Position (lumenverschießend) gebracht, um nacheinander viermal jeweils 1 ml/kg Körpergewicht vorgewärmte 0,9%ige NaCl-Lösung zu instillieren und sofort wieder abzusaugen. Der durch Absaugen zurückgewonnene Anteil an instillierter NaCl-Lösung wird als recovery bezeichnet und als Maß für die technische Qualität der BAL angesehen. Bei Kindern wird eine Recovery > 40% für eine qualitativ gute Durchführung vorausgesetzt (31), wobei in Mittellappen und Lingula in der Regel die höchste Recovery erzielt wird, wohingegen im rechten Unterlappen die BAL bei Kindern technisch häufig einfacher ist (31).

Da die erste Fraktion hauptsächlich bronchialen Ursprungs ist, wurde die durch die erste Instillation gewonnene erste Fraktion getrennt von der 2. – 4. Fraktion (Pool) aufgefangen und weiterverarbeitet. Für die nachfolgend beschriebene

biochemische Analyse der Surfactantproteinkonzentrationen wurde die 2. – 4. gepoolte Fraktion verwendet. Sowohl die 1. Fraktion als auch Pool wurden über einen Gaze-Filter zunächst von gröberer Verunreinigungen befreit und anschließend je ein Aliquot mit mehreren Millilitern der mikrobiologischen und virologischen Untersuchung zugeführt. Für die zytologische Begutachtung der 1. Fraktion und Pool, die in den meisten Fällen durchgeführt wurde, wurde die native Lavageflüssigkeit zunächst zentrifugiert und aus dem Sediment die Gesamtzellzahl/ μ l bestimmt. Die Zelldifferenzierung erfolgte über das am häufigsten genutzte Verfahren mittels Zytospin und Färbung nach Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa-Färbung). Durch Anfärbung mit Sudanrot wurde auf fett-speichernde Makrophagen untersucht, die bei Aspirationssyndromen vorkommen. Eine pulmonale Hämorrhagie mit hämosiderinspeichernden Makrophagen wurde durch Eisenfärbung mittels Berliner Blau untersucht und eine PAS-Färbung wurde zur Diagnostik auf Alveolarproteinose durchgeführt.

Die Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei -70°C eingelagert.

2.3. Quantitative Proteinbestimmung

Material:

Bio-Rad Farbstoffreagenz für Proteinassay (Bio-Rad Laboratories GmbH No. 500-0006)

Mikrotiterplatten (Greiner, niedrigaffin, 96 Vertiefungen, transparent)

Bovines Serum Albumin V, BSA (Paesel und Lorei, No. 100568)

Filterpapier

Eppendorf-Reaktionsgefäße 1ml

Anthos HT 3 Photometer (Anthos Labtec Instruments, Typ 12600)

Aqua ad injectabilia (Braun Melsungen AG, No. 3703452)

Puffer: PBS-Puffer:

Tabelle 2.3-1: Zusammensetzung des PBS-Puffers

Na ₂ HPO ₄	1704 mg
NaH ₂ PO ₄	414 mg
NaCl	8766 mg
H ₂ O (Aqua ad.inj.)	in 1000 ml lösen und mit NaOH/ HCl auf pH 7,4 titrieren

Method:

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in den Proben erfolgte nach der Methode von Bradford (14). Das Farbstoff-Konzentrat von Bio-Rad wurde zunächst mit Aqua ad injectabilia 1:5 verdünnt und anschließend zur Entfernung von Präzipitaten durch einen Papierfilter filtriert. Als Standard wurde aus einer Ausgangslösung (100 mg BSA in 10 ml PBS-Puffer) eine Verdünnungsreihe mit folgenden abnehmenden Konzentrationen von BSA in PBS Puffer hergestellt: 5000 µg/ml, 2500 µg/ml, 1250 µg/ml, 625 µg/ml, 312,5 µg/ml, 156,3 µg/ml, 78,13 µg/ml. Zusätzlich wurde bei jeder Messung reiner PBS-Puffer als Leerwert mitgeführt. Es erfolgte eine Doppelbestimmung der einzelnen Standardkonzentrationen und eine Dreifachbestimmung der Proben mit der jeweiligen Menge von 5 µl. Jeder Probe sowie den Standardlösungen wurde zum Anfärben jeweils 100 µl eines Farbstoffreagenzes zugesetzt. Im Photometer wurde die Absorption bei 600 nm gemessen und nach Abzug des Leerwertes (Leerwert = Bio-Rad Reagenz + BSA) mit Hilfe der Standardverdünnungsreihe in Proteinkonzentrationen umgerechnet.

2.4. Gelelektrophorese und Westernblotting

Material:

Eppendorf Reaktionsgefäße 0,5 ml

Pipetten 100 µl, 20 µl (Gilson Pipetman; Eppendorf Research)

Bachhofer Vakuumzentrifuge (Bachhofer GmbH, Typ BA-VC 300H)

Vakuumpumpe (WKF, Typ L 05-60)

Thermoblock (TDB-120)

Zentrifuge (Eppendorf, 5417C)

Vortexgerät Vortex Genie 2 (Scientific Industries, G-560 E)
 Gelkammer Novex XCell II Mini Cell (Invitrogen, EI 9001)
 Blotkammer Novex XCell II Blot Module (Invitrogen, EI 9051)
 Netzgerät Novex Powerease 500 (Invitrogen, EI 8700)
 PVDF-Transfermembranen (0,45µm Porengröße, Immobilon IPVH 00010)
 Filterpapier (Whatman, Nr. 1003-917)
 Sponge Pad Schwämme (Invitrogen, EI 9052)
 NuPage 10 % Bis-Tris Gel 1,0 mm (Invitrogen, NP 0302)
 Teleostean Fischgelatine (SIGMA, G7765-1L)
 3M Kopierfolie (Tartan 901)
 Entwicklungskassette (Dupont)
 Röntgenfilme (Amersham, RPN 3103K)
 Entwicklungsmaschine (AGFA, CP 1000)
 Aqua ad injectabilia (Braun Melsungen AG, Nr. 3703452)
 Puffer: Probenpuffer, MES-Puffer, Transfer-Puffer, TBS-Puffer, PBS-Puffer
 (Zusammensetzung siehe Tabellen 2.4.1 – 2.4.5)
 BSA Serumalbumin vom Rind, Fraktion V (Paesel+Lorei)
 Molekulargewichtsmarker Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard
 (Invitrogen, LC5800)
 Standard für SP-B und SP-C (siehe Tabelle 2.4.7)
 Antikörper (siehe Tabelle 2.4.6)
 ECL Chemilumineszenzlösung (Amersham RPN 2209)
 SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate (ThermoScientific, Nr.
 MI161897)
 DIANA III Chemiluminescence Detection System und Advanced Image Data
 Analyzer Software, Version 4.04.032 (Raytest, Straubenhardt, Germany)
 Puffer

Tabelle 2.4-1: Probenpuffer

25%	NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen NP 0007)
75%	Aqua ad injectabilia (Braun, Melsungen)

Tabelle 2.4-2: NuPAGE MES Running Buffer

5%	NuPAGE 20x MES Running Buffer (Invitrogen NP 0002)
95%	Aqua ad injectabilia (Braun, Melsungen)

Tabelle 2.4-3: Transfer-Puffer

5%	NuPAGE 20x Transfer Buffer (Invitrogen NP 0006)
20%	Methanol (MERCK)
75%	Aqua ad injectabilia (Braun, Melsungen)

Tabelle 2.4-4: PBS-Puffer

1704 mg/l	Na ₂ HPO ₄ (MERCK)
414 mg/l	NaH ₂ PO ₄ x 1 H ₂ O (MERCK)
8766 mg/l	NaCl (MERCK)
In 1000 ml Aqua ad injectabilia gelöst; titriert auf pH 7,4	

Tabelle 2.4-5: TBS-Puffer

484,6 mg/l	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ Tris
5844 mg/l	NaCl
In 1000 ml Aqua ad injectabilia gelöst; titriert auf pH 7,4	
500 mg/l	Tween 20 (SIGMA, Nr.9005-64-5)

Tabelle 2.4-6: Übersicht der verwendeten Antikörper

Antikörper	Typ	Charge	Hersteller
1. AK anti-SP-B 1:10.000	rekombinant, anti-human, vom Kaninchen	C 329	Altana Pharma AG, Konstanz
1. AK anti-SP-C 1:10.000	rekombinant, anti-human, vom Kaninchen	22/96	Altana Pharma AG, Konstanz
2. AK 1:100.000	anti-IgG-Kaninchen, peroxidase-konjugiert, von der Ziege	111-036-045	Dianova, Hamburg

Tabelle 2.4-7: Übersicht der verwendeten Standards

Standard	Typ	Hersteller
SP-B	humanes dimeres SP-B gelöst in Chloroform-Methanol-Lösung	Dr. Schmidt, Surfactant-Labor Uni Gießen
SP-C	humanes rekombinantes SP-C gelöst in Chloroform-Methanol-Lösung	Prof. Schäfer, Altana Pharma AG, Konstanz

Methode:

Für die Gelelektrophorese wurden standardmäßig 10 µg Protein pro Probe eingesetzt, sodass sich nach der Bestimmung der Proteinkonzentration im Bradford-Assay jeweils eine individuelle Menge an Probenvolumen ergab. Die Proben wurden über mehrere Stunden, je nach zu verdampfendem Volumen, in der Vakuumzentrifuge lyophilisiert, um sie anschließend für die Gelelektrophorese einheitlich mit 20 µl Probenpuffer zu resuspendieren. Zusammen mit einem SP-B-Standard (28 ng) und einer SP-B-Kontrolle (BAL eines Patienten mit bekanntem SP-B-Bandenmuster) bzw. mit einem SP-C-Standard (25 ng) wurden die resuspendierten Proben für 10 Minuten bei 70°C im Thermoblock erhitzt und die Proteine durch das LDS im Probenpuffer denaturiert. Jeweils die gesamte Probenmenge (20 µl) sowie 7 µl des Molekulargewichtsmarker Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard wurden in die Gelkammern eines NuPage 10% Bis-Tris Gels überführt und in der Novex XCell II Mini Cell von Invitrogen in MES-Laufpuffer für 40 min bei 200 V und ca. 120 mA nach Proteingröße aufgetrennt. Vereinzelt blieb in Eppendorfgefäßen ein kleiner Probenrest in Form von auskristallisierten Puffersalzen zurück.

Der Proteintransfer auf eine PVDF-Transfermembran erfolgte in der Blotkammer Novex XCell II Blot Module mit Transferpuffer über eine Stunde (für SP-B) bzw. zwei Stunden (für SP-C) bei 25 V und 160 mA. Im Anschluss an das Westernblotting wurden die Membranen in einer 3%-igen Fischgelatine-PBS-Puffer-Lösung für drei Stunden inkubiert, um eine Absättigung der freien Proteinbindungsstellen zu erreichen. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper in PBS-Puffer (Verdünnung 1:10.000). Zur Entfernung von überschüssigen nicht gebundenen Antikörpern wurde vier Mal für je 10 min in TBS-Puffer gewaschen. Danach wurde eine zweistündige Inkubation mit dem 2.

Antikörper, ebenfalls in TBS-Puffer gelöst, durchgeführt und wiederum vier Mal für 10 Minuten in TBS-Puffer gewaschen.

2.5. Surfactantquantifizierung und Molekulargewichtsbestimmung

Methode:

Die zur Detektion der Surfactantprotein-Banden erforderliche Aktivierung der Membranen erfolgte durch ECL Chemilumineszenzlösung und das chemilumineszierende Peroxidasesubstrat SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate bei zehnfacher Menge ECL im Verhältnis zum Substrat. Direkt im Anschluss an diese Aktivierung wurde die Chemilumineszenz am DIANA III Detection System gemessen.

Die Auswertung erfolgte über die dazugehörige Software Advanced Image Data Analyzer durch Markierung der Fläche der detektierten Banden von Proben und Standards. Dabei war der Assay für SP-B linear im Bereich von 1 bis 40 ng, jener für SP-C zwischen 3 bis 80 ng. Der Inter-Assay Variationskoeffizient für SP-B lag bei 10%, für SP-C bei 19%.

Durch die bekannte Menge des eingesetzten Standards und dessen Chemilumineszenzintensität konnte die Menge an Surfactant in ng in den Patientenproben berechnet und letztlich als Konzentration (ng/ml) im Verhältnis zum eingesetzten Probenvolumen angegeben werden.

Zur Bestimmung der Molekulargewichte der detektierten Banden wurde nachfolgend ein Röntgenfilm mit Belichtungszeiten zwischen 30 Sekunden und zwei Minuten erstellt und entwickelt. Anhand des Röntgenfilms und auf Grundlage des mitgeführten Molekulargewichtsmarkers wurden mit Hilfe der Software Biorad Quantity One die Molekulargewichte ausgewertet. Abbildung 2.5-1 zeigt ein willkürliches Beispiel einer Westernblot-Membran aus den Analysen für diese Arbeit.

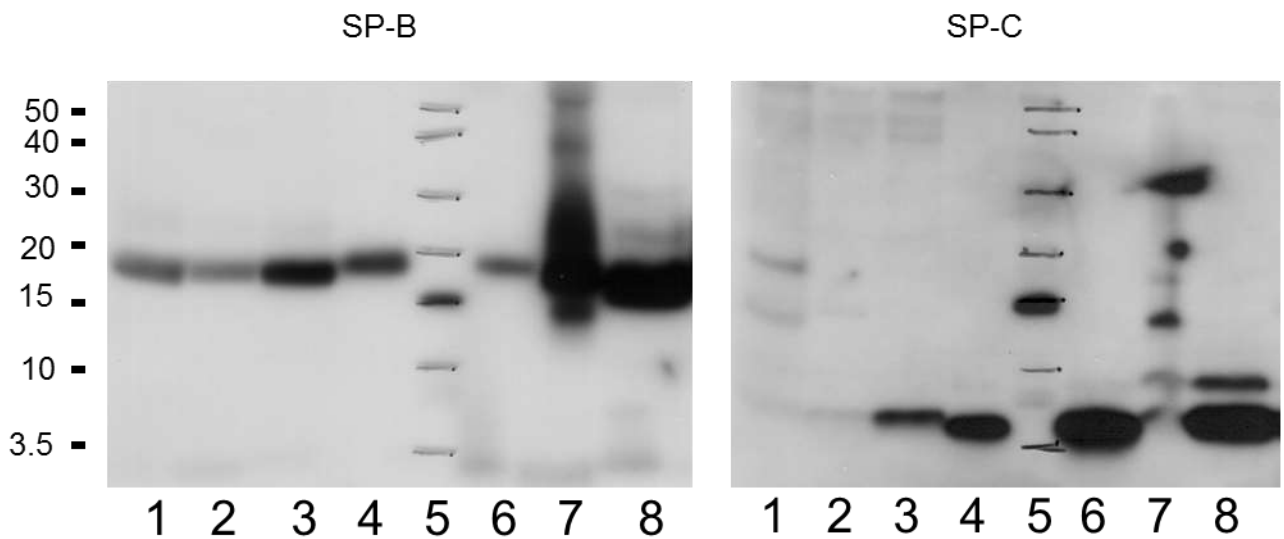


Abbildung 2.5-1: Beispiel einer Westernblot-Membran zur Quantifizierung von SP-B und SP-C nach Molekulargewicht

Western blots aus bronchoalveolärer Lavage oder Tracheobronchialsekret (10 µg Gesamtprotein pro Reihe). Die Molekulargewichte (kDa) sind am linken Rand angegeben und wurden durch den Molekulargewichtsstandard (Reihe 5) bestimmt. Alle Positionen, die in diesen Reihen identifiziert wurden, wurden mit Stift nachgezogen. Alle Banden wurden unter nicht-reduzierten Bedingungen analysiert. Reihe 1, ID 1785 (NSIP (A4)); Reihe 2, ID 1772 (Immunocompromised host (B3)); Reihe 3, ID 1786 (RDS 30-36 wks (Ay)); Reihe 4, Standard (SP-B 19 ng bzw. SP-C 10 ng); Reihe 5 Molekulargewichtsstandard mit Stift markiert; Reihe 6 Standard (SP-B 9 ng, SP-C 25 ng); Reihe 7, ID 518 (Bronchitis – neutrophilic); Reihe 8, ID 1771 (Bronchitis – neutrophilic)

2.6. Genetische Untersuchungen

2.6.1. DNA-Isolation aus Blut

Material:

QIAamp Mini Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany)

Ethanol 96-100%

1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen

2 ml Mikrozentrifugenröhrchen
Pipettenspitzen mit aerosol barrier
Thermoblock (TDB-120)
Zentrifuge (Eppendorf, 5417C)
Vortexgerät Vortex Genie 2 (Scientific Industries, G-560 E)
PBS-Puffer

Methode:

Für die genetische Analyse im Promotor des SFTPC-Gens wurde DNA aus EDTA-Blut sowie vereinzelt aus Blutkuchen isoliert. Hierfür wurde das QiaAmp Mini Blood Kit verwendet, die zugehörigen Puffer und die QIAGEN-Protease nach Anleitung vorbereitet. Nach langsamem Auftauen der bei -70°C gelagerten Blutproben, wurden jeweils 200 µl einer Probe entnommen und mit gleicher Menge Puffer und Ethanol sowie mit jeweils 20 µl Protease versetzt. Die Lösung wurde nach gründlichem Mischen durch die QIAamp spin columns filtriert. Diese Prozedur wurde jeweils zweimal mit dem über Zentrifugation filtrierten Überstand und einem zweiten Puffer (AW1) wiederholt. In einem letzten Schritt wurde die DNA in 200 µl Puffer AE gelöst. Aus 200 µl Blut lässt sich typischerweise eine Lösung mit einer DNA-Konzentrationen von etwa 30 ng/ml gewinnen, von der jeweils 5 µl für die anschließende Amplifizierung mittels PCR verwendet wurden. Die restliche DNA-Lösung wurde bei -20°C eingelagert.

Der Reinheitsgrad der DNA-Lösungen wurde stichprobenartig mittels NanoDrop über den Extinktionsquotienten OD_{260}/OD_{280} bestimmt und lag stets in im adäquaten Schwankungsbereich zwischen 1,8 und 2,0.

Ältere und zum Teil unsachgemäß gelagerte DNA-Proben waren vereinzelt zu stark verunreinigt oder wiesen eine zu geringe DNA-Konzentration auf, sodass sie nicht zur genetischen Analyse verwendet werden konnten.

2.6.2. Primeretablierung und PCR

Material:

PCR-Platte, 96 Vertiefungen (Eppendorf, No. 0030 128.613)
Gradientencycler PEQSTAR 96 Universal Gradient (PEQLAB, No. 95-96002)

T1-Thermocycler (Biometra)

Zentrifuge (Eppendorf, 5417C)

Vortexgerät Vortex Genie 2 (Scientific Industries, G-560 E)

Template (gepoolte DNA von 3 gesunden Probanden für die Primeretablierung;
Patienten-DNA für die PCR)

Primer 4x (Metabion; siehe Tabelle 2.6.2-1)

Reaktionsmix AmpliTaQ GOLD (Applied Biosystems)

- AmpliTaQ Gold® DNA-Polymerase (Life technologies, Darmstadt, Germany)
- Magnesiumchlorid-Lösung, MgCl₂, 25 mM
- GeneAmp PCR Gold Buffer 10x
- dNTP's
- GC Enhancer

Aqua ad injectabilia (Braun Melsungen)

Ethidiumbromid-Agarosegel 1,5 %

DNA loading dye 6x (Fermentas, HR0611)

Längenstandard Quick-load 100bp (Biolabs, N04675)

Elektrophorese Power Supply (Consort EV243)

INTAS® Geldokumentation

Tabelle 2.6.2-1: Primer, die für PCR verwendet wurden:

Primerpaare	Primersequenzen (forward und reverse)	Länge PCR-Produkt (bp)
SFTPC2641U24 (P1) SFTPC3502L20 (P2)	5'-AAATAAAACCGGAGAAGTGGAGAG-3' 5'-CAGCATGGCATCTGAACTGA-3'	881
SFTPC3459U23 (P3) SFTPC4545L22 (P4)	5'-ACACTTCCCTCCCTTTCTTCCTC-3' 5'-TTACCTTGCCTCCTCCCACATA-3'	1108

Tabelle 2.6.2-2: 25 µl Ansatz für Primeretablierung und PCR:

Reagenzien (µl)	SFTPC-P1 + P2	SFTPC-P3 + P4
DNA-Lösung	1	1
Reaktionsmix Amplitaq GOLD	12,5	12,5
GC Enhancer	2,5 (0)	2,5 (0)
lower Primer	0,5	0,5
upper Primer	0,5	0,5
Aqua ad injectabilia	8 (10,5)	8 (10,5)

Methode:

Die Primer wurden 1:4 mit Aqua ad injectabilia verdünnt und gründlich gemischt. Aus dem Template, den Primerpaaren (upper und lower Primer), dem PCR-Puffer, den dNTP's, MgCl₂ und Aqua ad injectabilia wurden 2 Ansätze (einer pro Primerpaar) hergestellt. Diese wurden auf Eis gestellt und im nächsten Schritt mit der AmpliTaQ Gold® DNA-Polymerase versetzt. Die fertige Lösung wurde für 15 Sekunden gevortext und zur weiteren Bearbeitung auf Eis gehalten, um die Polymerase nicht vorzeitig zu aktivieren. In eine 96-well PCR-Platte wurden pro well jeweils 25 µl der hergestellten Ansätze pipettiert, wobei pro Reihe der Ansatz eines Primerpaares aufgetragen wurde. Nach kurzem Zentrifugieren der PCR-Platte wurde diese in einem Gradientencycler inkubiert. Über die Dauer von 35 PCR-Zyklen unterlag die PCR-Platte einem horizontalen Temperaturgradienten zwischen 50-70°C der sich von der linken zur rechten Seite erstreckte. In Tabelle 2.6.2-3 ist der Temperaturgradient schematisch dargestellt.

Nach der Inkubation wurden die 25 µl-Ansätze der PCR-Produkte jeweils mit 2 µl DNA-Färbemittel (loading dye) versetzt und wie im Abschnitt Agarosegel-Elektrophorese beschrieben im elektrischen Feld aufgetrennt. Anhand der Farbstoffmarkierung des loading dye wurde das Fortschreiten der Auftrennung überprüft. Bei noch unvollständiger Auftrennung wurde das elektrische Feld für weitere 10 – 15 min angelegt.

Durch die Interkalation des im Gel vorhandenen Ethidiumbromids mit der DNA konnten die durch die PCR entstandenen DNA-Fragmente als fluoreszierende

Banden bei Durchleuchtung mit UV-Licht (305 nm) mit der Geldokumentation von INTAS® visualisiert und die Aufnahmen gespeichert und ausgedruckt werden. Abbildung 2.6.2-1 zeigt das Beispiel einer Gelelektrophorese bei der Primeretablierung. In Tabelle 2.6.2-3 sind die zu jeder Position zugehörigen Temperaturen aufgeführt. Die optimale Annealingtempertur besteht an jenen Positionen, an denen das gewünschte amplifizierte DNA-Produkt isoliert auftritt. Die optimale Annealingtemperatur für die Primer aus Tabelle 2.6.2-1 lag bei 58 °C.

Tabelle 2.6.2-3:

well-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatur (°C)	55	55,5	56,4	58,0	59,8	61,6	63,4	65,2	66,9	68,6	69,6	70,0

zugehöriger Temperaturgradient zur Abbildung 2.6.2.1 für die Bestimmung der Annealingtemperatur

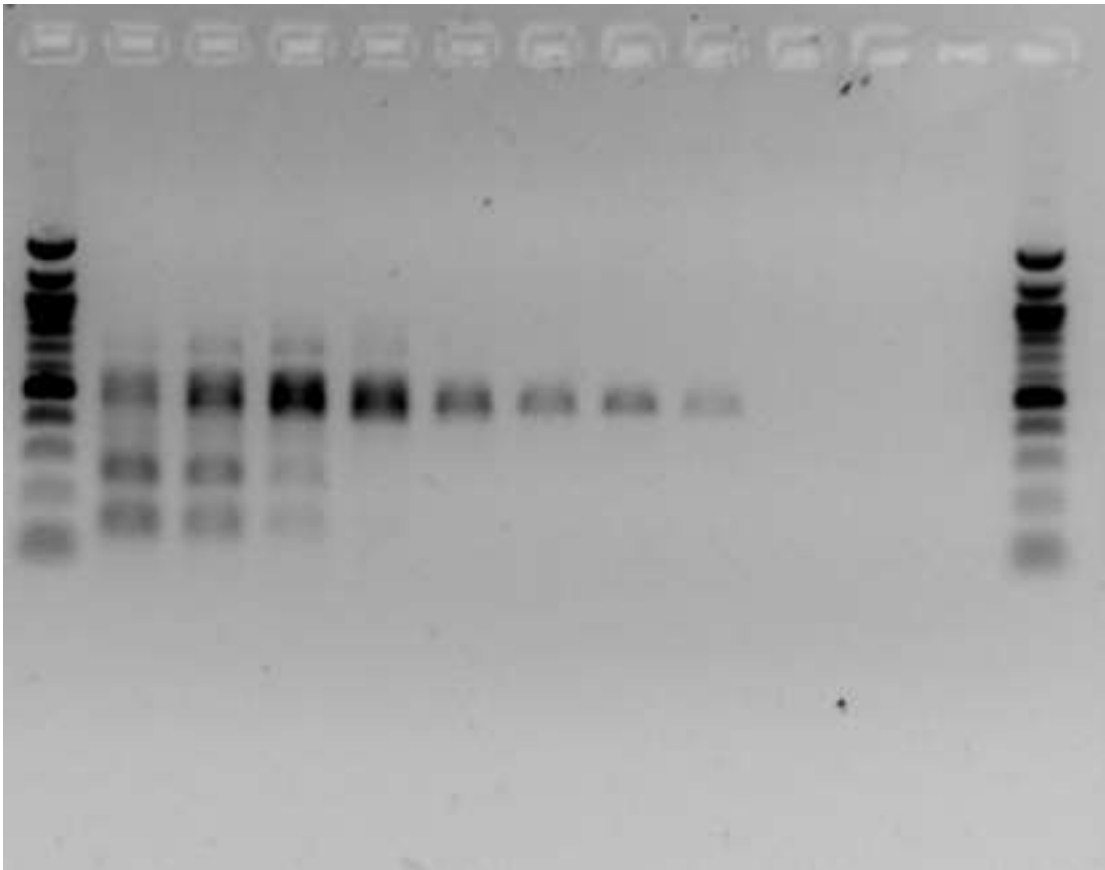


Abb. 2.6.2-1: Beispiel einer Gelelektrophorese bei der Primeretablierung für die Amplifizierung mittels Restriktionsverdau (siehe Abschnitt 2.6.6): die optimale Annealing-Temperatur liegt bei Position 4-7

PCR:

Mit der von Mullis 1983 entdeckten Methode der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) werden selektiv gewünschte Abschnitte der DNA exponentiell amplifiziert. Die oben beschriebenen Primer werden hierfür als Startermoleküle für die Amplifizierung benötigt. Der DNA-Abschnitt, der von den Primern beidseitig flankiert wird, wird in jedem Zyklus der Reaktion verdoppelt. Ein Zyklus besteht dabei aus folgenden drei Schritten:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94 °C, dabei wird die DNA in zwei Einzelstränge gespalten.
2. Anlagerung der Primer ("Annealing") an die DNA-Einzelstränge bei einer primerspezifischen Temperatur zwischen 55 – 70 °C.

3. Synthese des komplementären DNA-Doppelstranges (Extension) bei der optimalen Arbeitstemperatur der DNA-Polymerase von 72 – 75 °C.

Für die Amplifizierung der gewünschten Promotorregionen im SFTPC-Gen mittels PCR wurden jeweils 5 µl DNA-Lösung der Patientenproben eingesetzt. Da die zu analysierenden Promotorregionen für ein einzelnes PCR-Produkt auf dem Gen zu weit auseinander liegen, wurden mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren zwei PCR-Produkte pro Patientenprobe hergestellt. Die Größe der PCR-Produkte lag bei 881 bp und 1108 bp. 5µl Patienten-DNA wurde also zweimal in je eine 96-well-Platte pipettiert und anschließend jeweils ein Ansatz, bestehend aus dem Reaktionsmix von Applied Biosystems mit der AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase, dem upper und lower Primer einem Enhancer sowie Aqua ad injectabilia, zugegeben (siehe Tabelle).

Tabelle 2.6.2-4: 25 µl-Ansatz für PCR

Reagenzien (µl)	SFTPC-P1 + P2	SFTPC-P3 + P4
DNA-Lösung	5	5
Reaktionsmix Amplitaq GOLD	12,5	12,5
GC Enhancer	2,5	2,5
lower Primer	0,5 SFTPC3502L20	0,5 SFTPC4545L22
upper Primer	0,5 SFTPC2641U24	0,5 SFTPC3459U23
Aqua ad injectabilia	4	4

Die Reaktionsbedingungen für die PCR im Thermocycler sind in Tab 2.6.2.5 aufgelistet.

Tabelle 2.6.2-5: Reaktionsbedingungen für die PCR im Thermocycler

Zyklen	Zeit	Temperatur
1x	15 min	95 °C
40x	30 sec	95 °C
	30 sec	58 °C
	1 min	72 °C
1x	10 min	72 °C
1x	10 min	4 °C

2.6.3. Agarosegelelektrophorese

Material:

250 ml Erlenmeyerkolben

Mikrowellenherd

Agarosegelkammer mit Kämmen (24 Taschen)

Agarose (SERVA Electrophoresis GmbH; 100389)

Ethidiumbromid 10mg/ml Stammlösung (FLUKA)

TBE-Puffer 10x

DNA loading dye 6x (Fermentas, HR0611)

Längenstandard Quick-load 100bp (Biolabs, N04675)

Tabelle 2.6.3-1: TBE-Puffer

121,2 g	Tris (AppliChem; 9S004465)
55,56 g	Borsäure (MERCK; A8571650721)
3,72 g	EDTA (Amersham; K374993640747)
In 1 l Aqua ad Injectabilia gelöst; titriert auf pH 8,0	

Methode:

Aufgrund ihrer negativen Ladung wandert DNA in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die Auftrennung verschieden großer DNA-Fragmente in einem Agarosegel beruht auf der Siebfunktion des Gels durch die Vernetzung langer Agarosepolymere im Gel und der Ausbildung von Poren unterschiedlicher Größe. Die Porengröße ist abhängig von der Konzentration der Agarose im Gel. Je höher die Konzentration, desto kleiner die Poren. Für die in der Arbeit beschriebenen Elektrophoresen wurden 1,5%- und 3%-Agarosegele verwendet.

Für die 1,5%igen Gele wurde in einem Erlenmeyerkolben 1,8 g Agarose in 120 ml TBE-Puffer durch Erhitzen im Mikrowellenherd gelöst. Entsprechend wurde für die 3%igen Gele 3,6 g Agarose auf 120 ml TBE-Puffer verwendet. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurde 6 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) hinzugefügt und die Mischung in eine Formschale gegossen, die mit zwei Kämmen versehen war.

Nach dem Erstarren des Gels wurden die Kämme entfernt, das Gel in eine Horizontal-Elektrophoresekammer eingesetzt und mit TBE-Puffer als Laufpuffer bedeckt. Die DNA-Proben wurden mit 2 µl Ladepuffer (DNA loading dye 6x) versetzt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Ebenso wurden je die äußersten Taschen einer Kammreihe mit Längenstandard (100 bp DNA ladder) beladen. Nach Aufsetzen des Deckels der Elektrophoresekammer wurde eine Maximalstromstärke von 110 mA angelegt und die Proben im Agarosegel für 50 Minuten (ggf. länger) aufgetrennt. Wie im Abschnitt Primeretablierung dargestellt, wurden die aufgetrennten DNA-Banden aufgrund des interkalierenden Ethidiumbromids mittels UV-Licht an der INTAS® - Geldokumentation visualisiert.

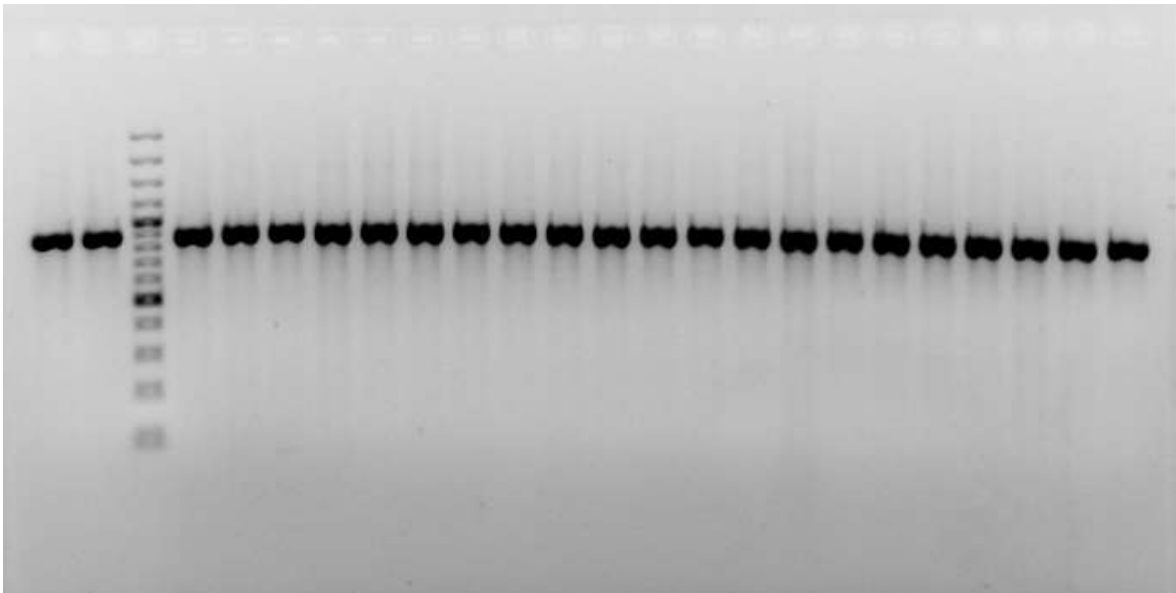


Abbildung 2.6.3-1: Beispiel PCR-Produkte von 23 DNA-Proben vor Aufreinigung; an dritter Stelle von links der Längenstandard
Die DNA-Fragmente wurden mit den Primern P1 und P2 amplifiziert und haben eine Größe von 881bp.

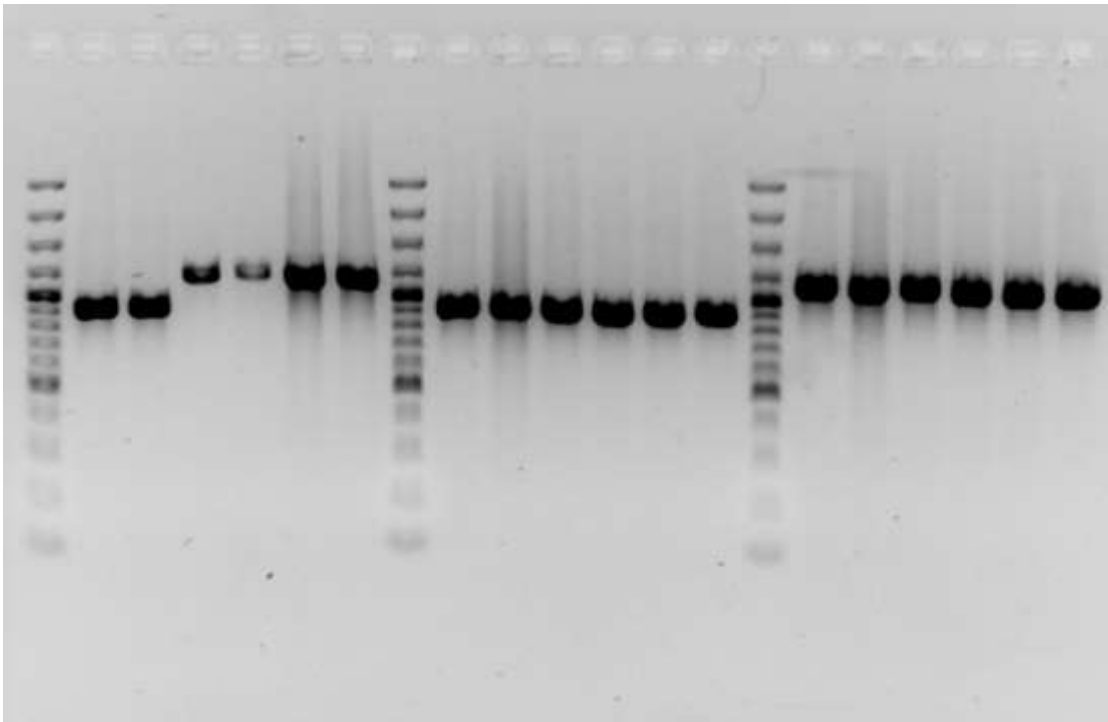


Abbildung 2.6.3-2: Position 2-3 und 9-14 zeigen das PCR-Produkt, welches mit den Primern P1 und P2 amplifiziert wurde (881 bp), Position 4-7 und 16-21 entspricht dem PCR-Produkt zwischen den Primern P3 und P4 (1108 bp); Position 1, 8 und 15 = Längenstandard

2.6.4. Aufreinigung der PCR-Produkte

Material:

MinElute 96 UF PCR Purification Kit (Qiagen)

Eppendorf Reaktionsgefäße 0,5 ml und 1,5 ml

PCR-Produkte

Ethanol 100%

3 M Natriumacetat pH 5,0

Aqua ad injectabilia

Zentrifuge (Eppendorf, 5417C)

Vortexgerät Vortex Genie 2 (Scientific Industries, G-560 E)

Methode:

Mit dem MinElute PCR Purification Kit können insbesondere kleine DNA-Fragmente zwischen 70 bp – 4 kb mit einer Ausbeute von in der Regel 80% und einer hohen Endkonzentration aufgereinigt werden. Sämtliche, die nachfolgende Sequenzierung störende Enzyme, Polymerasen und (Oligo-)Nukleotide wie z.B. Primer bis zu einer Größe von 40 bp werden eliminiert. Dies wird mit Hilfe eines Bindepuffers (PB Buffer) erreicht, der Doppelstrang-DNA ab einer Größe von etwa 70 bp bindet.

In Vorbereitung auf das Verfahren wurde das gelieferte Waschpuffer-Konzentrat Buffer PE mit 100%igem Ethanol verdünnt. Das Prinzip der Aufreinigung von DNA-Lösungen mit dem MinElute System beruht auf der selektiven und reversiblen Bindung von DNA oben genannter Größe an eine Silikamembran in den mitgelieferten spin columns (Säulen) in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen. Durch Waschen mit dem verdünnten Waschpuffer wurden sämtliche Verunreinigungen entfernt. In einem anschließenden zusätzlichen Zentrifugationsschritt wurde der Waschpuffer vollständig eliminiert, um keinen störenden Einfluss auf nachfolgende enzymatische Reaktionen zu nehmen. Anschließend wurde die gereinigte DNA mit 15 µl des basischen Tris-Puffers Buffer EB mit pH 8,5 wieder eluiert. Das Volumen des so gewonnenen Eluates betrug 14 µl. Das Vorgehen war gemäß Herstellerangaben.

2.6.5. Sequenzierung

Material:

Thermos Scientific NanoDrop™

Eppendorfgefäße 1,5 ml

aufgereinigte PCR-Produkte

upper und lower Primer, 5 µM

Methode:

Mittels NanoDrop wurde die Konzentration der aufgereinigten PCR-Produkte gemessen und auf einen Bereich zwischen 20-80 ng/µl eingestellt.

Jeweils 5 µl des PCR-Produktes wurden in zwei 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert. In eines der Eppendorfgefäße wurde der zugehörige lower Primer, in das andere der zugehörige upper Primer, jeweils in einer Konzentration von 5 µM, hinzugefügt. Die Proben wurden mittels Barcodes kodiert und an die Firma GATC-Biotech AG in Konstanz zur Sequenzierung versandt.

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Software Mutation Surveyor 4.0 (SoftGenetics) und einer Referenzsequenz (RefSeq accession NG_029334).

2.6.6. Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

Eine weitere Methode für den Nachweis von DNA-Polymorphismen ist der enzymatische Restriktionsverdau. Hierbei wird einer DNA-Probe neben einer spezifischen Pufferlösung und Nukleotiden ein Restriktionsenzym hinzugefügt, welches an spezifischen Nukleotidsequenzen (Schnittstellen) eine Spaltung der Doppelstrang-DNA vornimmt. Liegen im Bereich einer solchen Schnittstelle Polymorphismen vor, so kann das Restriktionsenzym aufgrund veränderter Nukleotide im Gegensatz zum Wildtypallel im Allel mit Polymorphismus keine Aufspaltung vornehmen und es entstehen Spaltprodukte unterschiedlicher Längen, welche nach Amplifizierung und Aufgereinigung des PCR-Produktes wiederum in einer anschließenden Gelelektrophorese dargestellt werden können.

Mit dieser Methode war in vorliegender Arbeit zunächst versucht worden, den Promotorbereich von SFTPC auf unter anderem drei bereits in der Literatur beschriebene Polymorphismen (136) zu untersuchen. Auch nach vielfachen Experimenten gelang es nicht, geeignete Restriktionsenzyme und passende Primer zu etablieren, um den gewünschten Promotorbereich in SFTPC abzudecken, weshalb letztlich die Methode der Sequenzierung angewendet wurde.

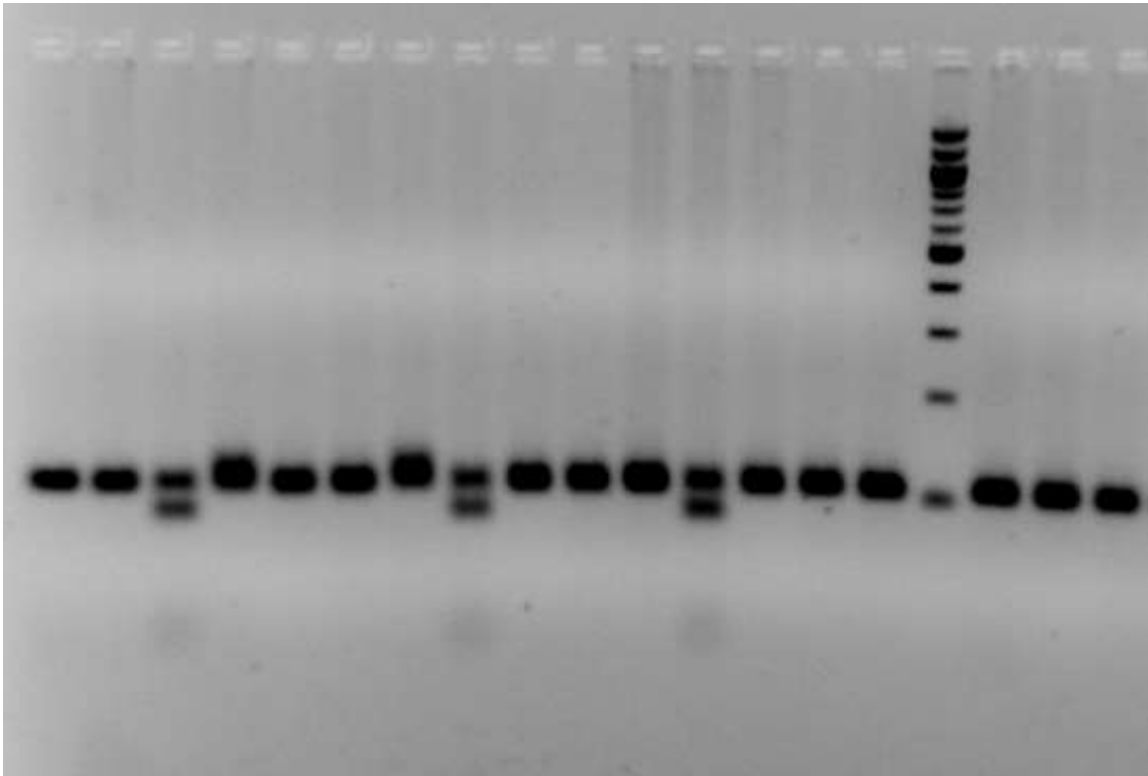


Abbildung 2.6.6-1: Beispiel eines Restriktionsverdaus mit dem Restriktionsenzym MboI; Schnittstelle = GAAGANNNNNNN; Position 3, 8 und 12 zeigen einen Polymorphismus im Promotorbereich, die übrigen PCR-Produkte enthalten das Wildtyp-Allel.

Da sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht auf die Methode des RFLP stützen, werden Material und Methoden hier auch nicht detaillierter beschrieben.

2.7. Statistik

Der Vergleich der Häufigkeitsverteilung der analysierten SNP's erfolgte mittels des Chi Square Tests. Die Analyse der Unterschiede in den Surfactantkonzentrationen zwischen den einzelnen Subkategorien und zur gesunden Kontrollgruppe wurde mit Kruskal Wallis ANOVA's und nachfolgend Dunn's post hoc-Test (Unterschied zu Kontrollen) bzw. Tukey post hoc-Test (Subkategorien untereinander) durchgeführt. Für alle Berechnungen wurde das Signifikanzniveau bei einem p-Wert < 0,05 festgesetzt. Die Auswertungen der

biochemischen und der genetischen Analysen sowie die Erstellung der Grafiken erfolgten mit Hilfe von GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, California) und SPSS Version 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, US) Des Weiteren wurde für die Auswertung der Patientencharakteristika Microsoft Excel 2010 - 2013 (San Francisco, California) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Kontrollgruppen

In die Kontrollgruppe wurden, wie bereits im Abschnitt Material und Methoden erwähnt, Lungengesunde und Kinder mit rein bronchialer pulmonaler Pathologie eingeschlossen. Somit unterteilt sich die Kontrollgruppe in drei Subkategorien, die in Tabelle 3.1-1 aufgeführt sind. Von insgesamt 126 Individuen, stammten 19 von Lungengesunden. In dieser Subkategorie lag das mediane Alter mit 11,6 Jahren deutlich höher, da 9 Probanden Freiwillige in der dritten Lebensdekade waren. In der Subkategorie der Lungengesunden ist auch der Anteil an erhältlichen Werten für das Differentialzellbild der BAL mit 52,6% am geringsten. Das Differenzierungskriterium für die beiden Subkategorien der Patienten mit bronchialer Pathologie war das Differenzialzellbild (PMN-Grenzwert 10%). Eine quantitative Bestimmung lag nicht in allen Fällen vor. Die Kategorisierung konnte dennoch anhand qualitativer Beurteilung und Auswertung und mithilfe detaillierter klinischer Informationen getroffen werden. In allen Subkategorien und somit auch in der gesamten Kontrollgruppe überwog der Anteil an männlichen Individuen mit insgesamt knapp 2/3 (67,5%).

Von den 126 Kontrollen verstarb ein Reifgeborenes, welches seit Geburt mit Tachypnoe und Einziehungen aufgefallen war. Im Alter von 5 Monaten zeigte die Bronchoskopie das Bild einer am ehesten viralen Bronchiolitis mit schwerer peripherer Obstruktion in der Lungenfunktion. Des Weiteren wurde eine ziliäre Dyskinesie diagnostiziert sowie ein angeborener Immundefekt. Radiologisch konnte eine interstitielle Pneumonie ausgeschlossen werden. Im Alter von ca. 11 Monaten verstarb das Kind am respiratorischen Versagen. Eine Lungenbiopsie zur genauen Klärung der Ursache wurde von den Eltern abgelehnt, sodass die

Ursache bzw. pulmonale Grunderkrankung letztlich nicht vollständig geklärt werden konnte.

Ebenfalls aus Tabelle 3.1-1 ersichtlich ist die Tatsache, dass das mediane Alter bei BAL-Diagnostik bei den Kindern mit neutrophiler Inflammationsreaktion deutlich niedriger liegt im Vergleich zu den anderen beiden Subkategorien der Kontrollgruppe. Hieraus lassen sich ein früherer Krankheitsbeginn und ein schwerer Krankheitsverlauf in dieser Subkategorie folgern.

Eine ausführliche Auflistung aller Individuen aus der Kontrollgruppe zeigt Tabelle 6.1-1 im Tabellenverzeichnis (Zuordnung aus Übersichtsgründen). Hier sind unter anderem im Einzelnen die Gründe für die BAL-Diagnostik angegeben.

Tabelle 3.1-1: Charakteristika der Kontrollgruppe

Kategorie	Anzahl	Alter bei BAL (Jahre)	Geschlecht (m/w)	Anteil Neutrophile in Differentialzellbild (%)	Vollständigkeit PMN-Werte	verstorben/ lebend
Healthy (Lungengesunde)	19	11,6 [7,60-24,2]	14/5	1,00 [1,00-2,75]	52,6%	0/19
Bronchitis-normal (normales Differentialzellbild)	70	4,9 [2,18-9,37]	44/26	1,80 [0,75-3,05]	90%	1*/69
Bronchitis-neutrophilic (Neutrophilie)	37	1,66 [0,40-5,44]	27/10	53,00 [24,75-80,00]	58%	0/37
Gesamt	126	3,67 [0,75-9,6]	85/41			1/125

Angaben als Median [1.Quartile – 3. Quartile]

*Patient ID 1519, normales Differentialzellbild

3.2. Patientencharakteristika

In Kapitel 2.1 wurde bereits das untersuchte Kollektiv mit Anzahl und Häufigkeitsverteilung beschrieben. Im Folgenden wird im Detail auf die Charakteristika dieses sehr heterogenen Kollektivs eingegangen.

Für die Auswertung der klinischen Charakteristika wurden die Daten der Kinder, bei denen keine Analyse der BAL-Probe möglich war (Surfactantgabe, blutiges Material), mit eingeschlossen. In Tabelle 3.2-1 Spalte zwei sind deshalb jeweils zwei verschiedene Angaben aufgeführt. Die Anzahl des gesamten Kollektivs der ursprünglich nach Screening eingeschlossenen Kinder betrug 322. Nach Sichtung und Analyse der BALF konnten 302 Proben verwendet werden. Weder die patientenbezogenen Charakteristika noch die Häufigkeit und Art der durchgeführten Diagnostik unterschied sich signifikant im Vergleich der 322 versus 302 Individuen.

Die Bandbreite der in der vorliegenden Arbeit dargestellten DPLD-Entitäten entspricht in der relativen Häufigkeit und der absoluten Anzahl der in größeren Studien evaluierten (siehe Tabelle 3.2-2 Patientencharakteristika nach Subkategorien und Tabelle 2.1-1, Material und Methoden). Es fand sich ein Übergewicht an männlichen gegenüber weiblichen Kindern mit einem Verhältnis von 1,5:1 in der Biochemiegruppe und mit 1,4:1 in der Genetikgruppe. Der Anteil derer, die mit Symptomen im Säuglingsalter (1. Lebensjahr) auffielen, lag bei ca. 60% über alle Gruppen (61% Biochemiegruppe, 57% Genetikgruppe). Bei Auftreten der pulmonalen Symptomatik bis zum Ende des 2. Lebensjahres lag der Anteil bei ca. 64,5% (66% Biochemiegruppe, 63% Genetikgruppe). Die Mortalität wurde mit im Mittel 20% über alle Patientengruppen berechnet. Alle Todesfälle bis auf einen (siehe Kapitel 3.1) ergaben sich in den Patientengruppen.

Das Alter bei Beginn der pulmonalen Symptomatik lag im Median bei 0,16 Jahren (2 Monate, siehe Tabelle 3.2-1). Für das Gesamtkollektiv der biochemischen Analyse, also inklusive der Kontrollgruppen, lag diese Information bei 83,5% vor. Ohne die Kontrollgruppen lag die Vollständigkeit der Daten bei rund 96,5%. Bei ihnen bestand aufgrund des Anteils an Lungengesunden zum Teil keine pulmonale Symptomatik. Zusätzlich war bei den Kindern mit überwiegend bronchialer Symptomatik der Zeitpunkt des Beginns für vorliegende Arbeit weniger von Interesse. Sowohl das Alter bei Beginn der pulmonalen Symptomatik als auch das Alter bei BAL-Diagnostik lag

beim gesamten Kollektiv erwartungsgemäß höher als bei Betrachtung der Patientengruppen ohne die Kontrollen. Grund hierfür ist zum einen das höhere mediane Alter der Lungengesunden mit den Proben der freiwilligen erwachsenen Probanden, zum anderen lag auch das mediane Alter bei Kindern mit rein bronchialen Lungenerkrankungen (4,9 bzw. 1,66 Jahre) deutlich über dem der anderen Patientengruppen. Dies deckt sich mit dem allgemeinen Krankheitsverständnis für das Auftreten von bronchialen Pathologien im Kindesalter (Beginn der Symptome bei frühkindlichem Asthma beispielsweise in der Hälfte der Fälle vor dem Alter von 3 Jahren; Melbourne Asthma Cohort). In den Patientengruppen (ohne Kontrollen) lag das Alter bei Beginn der pulmonalen Symptomatik ganz überwiegend postpartal, in der 3. Quartile bis 0,4 Jahre (ca. 5 Monate) reichend.

Die mediane Follow-up Dauer lag bei den 302 Individuen bei 2,4 Jahren (0,9 – 6,0 Jahre). Die Follow-up Dauer bei den einzelnen Patienten war sehr inhomogen. Der Beginn der Follow-up-Zeit wurde mit der Durchführung der Bronchoskopie und Gewinnung der BAL festgelegt. Die Gesamtrate an verfügbarem Follow-up lag in der Biochemiegruppe bei 94,8-97,2% (je nachdem, ob die Drop-out Patienten hinzugezählt wurden oder nicht) und in der Genetikgruppe bei 77,9 %. Bei letzterer war von 136 Kindern bei 30 kein Follow-Up verfügbar, wobei von diesen 30 Patienten 25 aus einer der Kontrollgruppen entstammen. Die Follow-Up-Quote bei den Patienten mit ILD liegt demzufolge mit nur 5 lost-to Follow-Ups bei 91,1%.

Tabelle 3.2-1: Charakteristika des gesamten Kollektivs mit und ohne Kontrollgruppen sowie des Kollektivs mit genetischer Analyse des SFTPC-Promotors

Parameter	Biochemie SP-B/SP-C	Ohne Kontrollgruppen	SFTPC-Promotor	Ohne Kontrollgruppen
Anzahl	322 [#] (302 [*])	192 (176)	136	56
Alter** bei BAL (y)	1 [0,3-5,5] (1,13[0,32-5,7])	0,45 [0,12-1,6] (0,51 [0,15-1,65])	1,32 [0,34-5,5]	0,32 [0,1-0,7]
Geschlecht (m/w)	192/130 [1,5:1] (184/118 [1,56:1])	105/87 [1,2:1] (100/76 [1,3:1])	79/57 [1,4:1]	34/22 [1:55:1]
verstorben	39 [12,1%] (33 [10,9%])	38 [19,8%] (32 [18,2%])	12 [8,8%]	12 [21,4%]
Frühgeburt (< 37SSW)	69 [21,4%] (63 [20,86%])	58 [30,2%] (53 [30,1%])	32 [23,5%]	24 [42,9%]
O ₂ -Bedarf Neonatal-Periode	114 [35,4%] (102 [33,8%])	101 [52,6%] (90 [51,1%])	44 [32,4%]	36 [64,3%]
maschinelle Beatmung Neonatal-Periode	98 [30,4%] (87 [28,8%])	88 [45,8%] (78 [44,3%])	39 [28,7%]	31 [55,4%]
Alter** bei Beginn pulmonaler Symptomatik (y)	0,13 [0-1,0] (0,13 [0-1,0])	0,00 [0-0,33] (0,00 [0-0,38])		
Follow-up Dauer ⁺ (y)	2,40 [0,9-6,0] (2,50 [0,9-6,4])	1,85 [0,7-4,1] (2,00 [0,75-4,3])	3,7 [1,1-6,5]	2,0 [0,71-4,1]

Parameter	Biochemie SP-B/SP-C	Ohne Kontrollgruppen	SFTPC-Promotor	Ohne Kontrollgruppen
Diagnostik			n = 136	n = 56
BAL-Zytologie		78 [40,6%] (72 [40,9%])		
Röntgen-Thorax	204 [63,4%] 191 [63,2%]	149 {176 [§] } = 77,6-91,7% (137 {164 [§] }) = 77,8-93,2%	78 = 57,4%	45 = 80,4% {52 [§] } = 92,9%
CT	185 [57,5%] 178 [59%]	135 [70,3%] 128 [72,7%]	76 = 55,9%	42 = 75%
Lungenbiopsie	86 [26,7%] (80 [26,5%])	79 [41,1%] 73 [41,5%]	17 [22,4%]	14 [25%]

Werte in Klammern [] sind Ergebnisse aus dem ursprünglichen Kollektiv inkl. der Patienten, bei denen die BALF aufgrund blutiger Proben oder Surfactantgabe nicht für eine Analyse von SP-B und SP-C verwendet werden konnte.

* Anzahl der Patienten, bei denen die BAL-Probe zur Analyse auf SP-B und SP-C verwendet werden konnte

**Alter als Median [1. und 3. Quartile]

+ Angabe als Median [1. und 3. Quartile]

§ Hinzunahme der Patienten, bei denen ein CT durchgeführt wurde, aber kein Befund eines Röntgen-Thorax vorlag.

Tabelle 3.2-2: Patientencharakteristika nach Subkategorien

Subkategorie	Code	Anzahl	Alter bei BAL (Jahre) ¹	Geschlecht m/w	verstorben/lebend
DPLD related to...					
Diffuse developmental disorders ²	A1	2	0.06 [0.05-0.06]	0/2	1/1
Deficient alveolarisation	A2	9	0.32 [0.13-0.74]	5/4	1/8
BPD-cLDI (Bronchopulmonary dysplasia-chronic lung disease of prematurity)	A2	25	0.32 [0.12-0.61]	17/8	4/21
CTI (Chronic tachypnea of infancy)	A3	32	0.78 [0.37-1.12]	20/12	0/32
RDS 37-40 wks (Unclear respiratory distress syndrome of the mature) ³	Ax	19	0.08 [0.03-0.16]	13/6	6/13
RDS 30-36 wks (Unclear respiratory distress syndrome of the almost mature)	Ay	9	0.16 [0.06-0.68]	6/3	0/9
DPLD related to alveolar surfactant region					
ABCA3 - two (Two disease causing mutations in the ABCA3-transporter gene)	A4	9	0.10 [0.04-0.34]	3/6	5/4
ABCA3 - one (One variant of unclear significance in the ABCA3-transporter gene in a patient with respiratory symptoms and suspected interstitial lung disease)	A4	6	2.62 [0.31-7.98]	3/3	1/5
CPI (Chronic pneumonitis of infancy)	A4	4	2.66 [0.11-6.71]	3/1	1/3

Subkategorie	Code	Anzahl	Alter bei BAL (Jahre) ¹	Geschlecht m/w	verstorben/lebend
Nxk2.1 defect (Disease causing mutation in the gene coding thyroid transcription factor 1)	A4	2	9.98 [0.27-19.7]	2/0	1/1
NSIP (Non-specific interstitial pneumonitis)	A4	9	0.72 [0.44-2.98]	1/8	3/6
PAP (Pulmonary alveolar proteinosis) ⁴	A4	5	2.76 [0.97-9.99]	1/4	1/4
Microlithiasis	A4	1	4.88	0/1	0/1
SP-B mutation (Mutation in the gene encoding for surfactant protein B)	A4	1	0.00	0/1	1/0
SP-C mutation (Mutation in the gene encoding for surfactant protein C)	A4	3	0.55 [0.02-19.2]	3/0	0/3
DPLD occurring in all age groups and related to...					
Systemic diseases	B1	4	4.89 [1.91-8.39]	2/2	1/3
Immune intact host	B2	10	8.38 [3.80-10.8]	7/3	0/10
Immunocompromised host	B3	9	0.57 [0.33-1.10]	8/1	1/8
Lung vessels structural	B4	12	1.64 [0.48-8.46]	4/8	2/10
LIP	B5	2	8.42 [0.05-16.8]	0/2	0/2
Unclear non-neonate	Bx	3	0.66 [0.64-9.81]	1/2	3/0

¹ Angabe als Median [1. und 3. Quartile]

² histologisch gesichert; ein Kind überlebte; es wurde keine FOXF1 Analyse durchgeführt

³ Die Bezeichnung "unclear" bezieht sich auf die unklare Ätiologie

Fortsetzung Legende zu Tabelle 3.2-2: Patientencharakteristika nach Subkategorien:
4 bei allen Patienten mit Nachweis von PAP wurden GMCSF Autoantikörper gemessen, die in allen Fällen negativ waren; bei Patient 710 konnte eine lysinurische Proteinintoleranz mittels Plasma- und Urinanalyse festgestellt werden, die anderen Patienten waren diesbezüglich unauffällig; GM-CSF Rezeptor alpha wurde in zwei Fällen sequenziert und war bei Patient 1787 positiv (homozygote Deletion Exon 2 – 13)

Die Rate an Frühgeburten (< 37 Schwangerschaftswochen) wurde mit knapp 30% über die Patientengruppen berechnet. Von diesen Kindern hatten wiederum knapp 40% (39,7%) eine oder mehrere Surfactantgaben erhalten. Diese lagen gemäß der Einschlusskriterien 14 oder mehr Tage vor der Gewinnung von BAL-Material. Von 53 der 58 Frühgeborenen konnte das BAL-Material auf SP-B und SP-C analysiert werden. Tabelle 3.2-3 auf den nachfolgenden Seiten zeigt die Einteilung und jeweilige Anzahl dieser Kinder in die Subkategorien, das Outcome beim individuellen Follow-up sowie die SP-C- und SP-B-Werte. Im Median lagen die Werte für SP-C in der BAL bei 51,7 ng/ml (15,83 – 181,47 ng/ml; 1.-3. Quartile), für SP-B bei 752,8 ng/ml (386,45 – 1169,4 ng/ml; 1.-3. Quartile).

Über 50% der Kinder in den Patientengruppen benötigten Sauerstoff in der Neonatalperiode, ca. 45% sogar eine maschinelle Beatmung.

Tabelle 3.2-3: Charakteristika der Frühgeborenen

ID	Diagnose	Geschlecht	Gestationsalter (SSW)	Langzeit Outcome	Gesamt protein (ug/ml)	SP-C 4kDa (ng/ml)	SP-C 8kDa (ng/ml)	SP-B 16kDa (ng/ml)	SP-B 8kDa (ng/ml)
1479	ABCA3 - one (A4)	w	30	sick-better	416,1	0,0		339,8	
1300	ABCA3 - one (A4)	m	32	sick-better	151,6	14,7		348,6	72,2
652	ABCA3 - one (A4)	w	36	sick-better	567,0	50,0		810,2	
1674	NSIP (A4)	m	32	sick-better	112,3	467,7		4017,0	29,9
1326	CPI (A4)	m	34	healthy	72,0	29,0		423,4	96,1
1967	BPD-cLDI (A2)	m	24	sick-same	161,2		83,0	3482,4	
1906	BPD-cLDI (A2)	m	24	sick-same	64,5	11,4		196,1	
1477	BPD-cLDI (A2)	m	24	sick-better	319,1	1364,0	192,9	1585,0	541,0
1366	BPD-cLDI (A2)	m	25	dead	346,7	203,5		665,4	650,8
1805	BPD-cLDI (A2)	w	25	sick-same	102,4	141,8		512,5	
1448	BPD-cLDI (A2)	m	25	sick-same	253,7	7,5	43,4	771,7	
1340	BPD-cLDI (A2)	m	26	sick-same	56,5	28,2		159,9	26,4
1493	BPD-cLDI (A2)	m	26	sick-same	422,1	0,0		145,2	
1949	BPD-cLDI (A2)	w	27	dead	376,6		139,1	4598,0	
1891	BPD-cLDI (A2)	m	27	sick-better	189,1		233,4	1518,0	
1938	BPD-cLDI (A2)	w	27	sick-better	116,3		4,0	923,0	
1299	BPD-cLDI (A2)	m	28	sick-better	205,8	65,2		625,2	361,2

ID	Diagnose	Geschlecht	Gestationsalter (SSW)	Langzeit Outcome	Gesamt protein (ug/ml)	SP-C 4kDa (ng/ml)	SP-C 8kDa (ng/ml)	SP-B 16kDa (ng/ml)	SP-B 8kDa (ng/ml)
1503	BPD-cLDI (A2)	m	29	sick-better	142,8	12,0	2,1	602,6	
1407	BPD-cLDI (A2)	w	29	sick-better	537,6		51,7	457,1	322,6
1989	BPD-cLDI (A2)	m	29	dead	118,2	0,0		22,4	
1404	BPD-cLDI (A2)	w	29	dead	650,7	1,8		1221,8	343,1
1824	BPD-cLDI (A2)	m	30	sick-same	447,1	19,7		1087,5	47,6
256	BPD-cLDI (A2)	m	30	dead	147,8		255,0	1420,0	
653	BPD-cLDI (A2)	m	31	sick-same	300,3	197,8	79,4	768,8	244,8
1578	BPD-cLDI (A2)	w	31	dead	214,2	291,6		1374,0	
1406	BPD-cLDI (A2)	w	33	sick-better	223,3	38,1		389,2	150,2
688	BPD-cLDI (A2)	m	33	sick-same	683,7	46,7		561,2	205,8
732	BPD-cLDI (A2)	m	34	sick-same	83,6	7,9		155,1	22,7
907	BPD-cLDI (A2)	m	34	sick-better	211,4	38,0		625,0	
1405	BPD-cLDI (A2)	m	35	healthy	247,4		5,6	222,2	119,0
639	Deficient alveolarisation (A2)	m	34	sick-better	892,4	102,6		243,3	65,9
1649	Deficient alveolarisation (A2)	w	36	sick-better	156,3	15,8		923,6	
1717	CTI (A3)	m	35	sick-better	51,2		181,0	543,0	26,0

ID	Diagnose	Geschlecht	Gestationsalter (SSW)	Langzeit Outcome	Gesamt protein (ug/ml)	SP-C 4kDa (ng/ml)	SP-C 8kDa (ng/ml)	SP-B 16kDa (ng/ml)	SP-B 8kDa (ng/ml)
592	CTI (A3)	m	35	healthy	84,1	111,4	7,0	386,5	
1463	CTI (A3)	m	35	sick-better	89,5	22,9		236,4	
687	CTI (A3)	m	36	sick-better	25,8	9,8		78,3	
1871	RDS 30-36 wks (Ay)	m	31	sick-same	101,4	55,2		865,0	29,1
1559	RDS 30-36 wks (Ay)	m	33	sick-better	140,9	36,7		752,8	
1786	RDS 30-36 wks (Ay)	m	34	sick-better	160,6	62,6		452,3	
1675	RDS 30-36 wks (Ay)	w	34	healthy	1236,0	1710,9		17259,4	
1789	RDS 30-36 wks (Ay)	m	35	sick-better	113,1	90,4	12,3	519,9	
1641	RDS 30-36 wks (Ay)	m	35	healthy	138,1	437,1	32,4	899,9	
1778	RDS 30-36 wks (Ay)	w	35	sick-better	246,4	357,4	52,8	1169,4	
1884	RDS 30-36 wks (Ay)	w	36	sick-better	368,7	15,6		653,9	
1547	RDS 30-36 wks (Ay)	m	36	sick-same	96,9	181,5		1077,5	47,8
475	RDS 37-40 wks (Ax)	m	36	healthy	66,5	0,0		57,0	
1633	Immune intact host (B2)	m	35	sick-better	255,5		39,4	1444,4	40,8
1648	Immunocompromised host (B3)	w	29	sick-better	721,8	47,4		303,1	

ID	Diagnose	Geschlecht	Gestationsalter (SSW)	Langzeit Outcome	Gesamt protein (ug/ml)	SP-C 4kDa (ng/ml)	SP-C 8kDa (ng/ml)	SP-B 16kDa (ng/ml)	SP-B 8kDa (ng/ml)
2002	Immunocompromised host (B3)	m	34	sick-better	298,9	508,2		1638,0	
1419	Lung vessels structural (B4)	w	28	dead	141,9		160,5	304,1	90,5
1396	Lung vessels structural (B4)	m	35	sick-better	60,3	228,6		8,3	
1606	Lung vessels structural (B4)	w	36	sick-same	71,6	170,6	4,7	628,5	
707	Lung vessels structural (B4)	w	36	dead	412,8	502,1	69,4	3324,4	1341,7

Ebenfalls in Tabelle 3.2-1 ist die Häufigkeit der durchgeführten Diagnostik aufgeführt. Betrachtet man die Patientengruppen ohne Kontrollgruppen steigt erwartungsgemäß der Prozentsatz an durchgeführter Diagnostik. Über das gesamte Kollektiv wurden bei 63%, ohne die Kontrollen in knapp 78% Röntgen-Thoraces angefertigt. Dieser Prozentsatz ist eher als gering zu bewerten, bedenkt man die schnelle und sichere Durchführbarkeit der Methode und den eindeutigen Fokus der pulmonalen Symptomatik des Kollektivs. Es ist davon auszugehen, dass hier eine erhebliche Dunkelziffer aufgrund unvollständiger Informationen vorliegt. Gestützt wird diese Annahme dadurch, dass bei zusätzlichen 27 Patienten aus dem Kollektiv der 302 die Information über eine CT-Diagnostik, jedoch kein Röntgen-Thorax-Befund vorlag. Es ist anzunehmen, dass diese Kinder nach allgemeinem klinischem Standard vor einer aufwändigeren CT-Untersuchung mit deutlich höherer Strahlenbelastung zunächst eine Röntgen-Thorax Aufnahme erhalten haben. Wird diese Annahme zugrunde gelegt, steigt der Prozentsatz der Röntgen-Thorax-Diagnostik in den Patientengruppen auf rund 92-93%. Die Häufigkeit einer computertomographischen Untersuchung lag bei den Patientengruppen nach Ausschluss der Kontrollen bei rund 70-73%. Eine weitere Differenzierung in Standard- und HR-CT war aufgrund der unvollständigen verfügbaren Daten nicht sinnvoll möglich. Im Kollektiv der Patienten, bei denen eine genetische Analyse im SFTPC-Promotor durchgeführt wurde, lag bei vier Patienten keine Informationen zu Bildgebung mittels Röntgen-Thorax oder Computertomographie vor, sodass auch in diesem Kollektiv Röntgen-Thoraces scheinbar nicht in 100% der Fälle durchgeführt wurden. In Tabelle 3.2-4 sind diese 4 Patienten mit den verfügbaren klinischen Informationen dargestellt. Aufgrund der Krankheitsschwere und des Verlaufes ist es sehr wahrscheinlich, dass bei diesen Patienten zumindest ein Röntgen-Thorax durchgeführt wurde und somit dieses diagnostische Mittel zu 100% Anwendung im Kollektiv fand.

Tabelle 3.2-4: Patienten aus Promotorgenetik-Kollektiv ohne Informationen zu radiologischer Bildgebung

ID	Sub-kategorie	Gestationsalter (SSW)	Beginn pulmonaler Symptomatik	Follow-up Dauer	Langzeit-Outcome	Symptome, Diagnose
1659	Ay	34	0	n.a.	n.a.	respiratorische Anpassungsstörung, Alloimmunneutropenie, transitorische Hypogammaglobulinämie, offenes Foramen ovale
1596	Ay	36	0	n.a.	n.a.	Unklares protrahiertes RDS mit Intubation (3 Tage), persistierende Tachypnoe, einmalige Surfactantgabe, fetofetales Transfusionssyndrom
1732	Ax	39	0	0,08	dead	Fulminante Sepsis mit RDS, Mekoniumaspiration, primäre pulmonale Hypertonie, Pleuraerguss rechts
1681	Ax	39	0	0,50	sick-better	primäre pulmonale Hypertonie, respiratorische Insuffizienz mit prolongiertem Sauerstoffbedarf, Neugeborenenensepsis, Hyperplasie der Conchae und Adenoide, Antiphospholipidsyndrom

n.a. = not available, Ax = unklares RDS bei Reifgeborenen, Ay = unklares RDS beim fast Reifgeborenen (30-36 SSW)

Von den 322 ursprünglich eingeschlossenen Kindern war bei 86 (rund 27%) eine Lungenbiopsie durchgeführt worden. 6 dieser Kinder wiesen keine alveoläre/interstitielle Lungenerkrankung auf, wurden für die vorliegende Arbeit demzufolge in eine der Kontrollgruppen mit bronchialer Pathologie eingeordnet (aus Übersichtsgründen wurde diese Tabelle dem Tabellenverzeichnis zugeordnet; Tabelle 6.1-1). Aus den Patientengruppen der 302 Kinder, bei denen BAL-Diagnostik durchgeführt wurde, wurden 73 Patienten, also ebenfalls rund 27%, lungenbiopsiert. Tabelle 3.2-5 zeigt deren Charakteristika und die Verteilung in den einzelnen Subkategorien. Erwartungsgemäß liegt die Rate an Lungenbiopsien bei Patienten mit histologischer Diagnose (NSIP, strukturelle Veränderungen der Lungengefäße) am höchsten. Aber auch in der Subkategorie der ABCA3-Mutationen (11 von 15) und bei den Kindern mit klinischer Diagnose einer chronischen Tachypnoe (CTI) (12 von 32) waren vermehrt Lungenbiopsien durchgeführt worden.

Leitsymptom über alle Patientengruppen war in 2/3 der Fälle Tachypnoe oder Dyspnoe. Bei dieser Häufigkeit ist allerdings von einer deutlichen Dunkelziffer aufgrund mangelnder klinischer Informationen auszugehen.

Tabelle 3.2-5: Patientengruppen mit Lungenbiopsie

Subkategorie	Code	Anzahl Lungenbiopsie (n gesamt)	Alter bei Lungenbiopsie (Jahre) ¹	Geschlecht m/w	verstorben/ lebend
DPLD related to...					
Diffuse developmental disorders	A1	2 (2)	0.05	0/2	1/1
Deficient alveolarisation	A2	2 (9)	0.00	2/0	1/1
BPD-cLDI (Bronchopulmonary dysplasia-chronic lung disease of prematurity)	A2	3 (25)	0.00	3/0	2/1
CTI (Chronic tachypnea of infancy)	A3	12 (32)	0.33	8/4	0/12
RDS 37-40 wks (Unclear respiratory distress syndrome of the mature) ²	Ax	3 (19)	0.05	2/1	1/2
RDS 30-36 wks (Unclear respiratory distress syndrome of the almost mature)	Ay	1 (9)	0.00 [0.06-0.68]	0/1	0/1
DPLD related to alveolar surfactant region	A4	28 (40)	0,28	11/17	9/19
ABCA3 – (one or two disease causing mutations in the ABCA3-transporter gene)	A4	11 (15)	0.10	6/5	5/6
NSIP (Non-specific interstitial pneumonitis)	A4	9 (9)	0.72	1/8	3/6
DPLD occurring in all age groups and related to...					
Systemic diseases	B1	1 (4)	8	1/0	0/1

Subkategorie	Code	Anzahl Lungenbiopsie (n gesamt)	Alter bei Lungenbiopsie (Jahre) ¹	Geschlecht m/w	verstorben/ lebend
Immune intact host	B2	7 (10)	9	4/3	0/7
Lung vessels structural	B4	9 (12)	0,1	3/6	2/7
LIP	B5	2 (2)	7,25	0/2	0/2
Unclear non-neonate	Bx	1 (3)	0,3	1/0	1/0

¹ Angabe als Median

² Die Bezeichnung "unclear" bezieht sich auf die unklare Ätiologie

3.2.1. Chronische Tachypnoe im Kleinkindalter

Aufgrund der großen Anzahl an Patienten (n = 32) in der Subkategorie CTI soll diese hier bezüglich des klinischen Verlaufs, der diagnostischen Mittel und Befunde detaillierter betrachtet werden. Wie in Kapitel 1.1.1 beschrieben ist die CTI eine Erkrankung ungeklärter Ätiologie, die in nahezu 100% einen benignen Verlauf aufweist. Auch im Kollektiv der vorliegenden Arbeit fand sich im Follow up-Zeitraum kein Todesfall. Was das Langzeit Outcome betrifft, waren von den 32 Kindern am Ende des jeweiligen Follow up-Zeitraumes 7 gesund, bei 16 Kindern hatte sich die Symptomatik deutlich verbessert, bei 9 Kindern hatte sich keine Verbesserung gezeigt. Tabelle 3.2.1-2 zeigt den Vergleich der Follow-up Dauer zum Langzeit Outcome. Auffallend ist hier, dass die mediane und mittlere Follow up-Dauer bei den Kindern, bei denen sich keine Verbesserung gezeigt hatte, signifikant kürzer war. Es ist demzufolge davon auszugehen, dass die Nachbeobachtungszeit hier zu kurz war, um den spontanen Heilungsprozess der Erkrankung vollständig abzubilden, dass bei diesen Kindern also vielmehr noch keine Verbesserung der klinischen Symptomatik im Follow up-Zeitraum aufgetreten ist.

Wie in der aktuellen Literatur (49) beschrieben, ist die Diagnosestellung der CTI in vielen Fällen bereits durch die klinische Symptomatik und radiologische Bildgebung möglich. Von den 32 Kindern der vorliegenden Arbeit hatten 28 (87,5%) eine Computertomographie (CT) und 12 (37,5%) eine Lungenbiopsie (LB) erhalten. In Tabelle 3.2.1-1 sind die Befunde sowie im Einzelnen das Langzeit-Outcome und die Follow up-Dauer dargestellt. Das mediane Alter bei Beginn der pulmonalen Symptomatik lag bei 0,19 Jahren (0 – 0,33 Jahre IQR), also von postpartal bis zu 4 Monaten. Bei 4 der Kinder lag das Gestationsalter unter 37 Schwangerschaftswochen, wobei eine Angabe zum Gestationsalter nur in knapp 63% der Fälle vorlag. Die häufigste radiologische Pathologie waren milchglasartige Trübungen und Verdichtungen – ein in der Literatur als typisch beschriebenes Merkmal (siehe Kapitel 1.1.1). Bei Patient 1831 konnte die Lungenbiopsie eine interstitielle Glykogenose nachweisen, ein Krankheitsbild, bei dem in der Literatur auch Todesfälle beschrieben wurden und die deshalb eine wichtige Differentialdiagnose bei gleicher klinischer Symptomatik darstellt. Bei diesem Patienten kam es 3 Stunden postpartal zu einer respiratorischen Insuffizienz mit Notwendigkeit der

Intubation und mechanischen Beatmung sowie zweimaliger Surfactantgabe noch am ersten Lebenstag. Bis zum Alter von 2,5 Jahren hatte sich der pulmonale Zustand fast vollständig normalisiert, sodass nur noch eine milde Belastungseinschränkung und Entwicklungsverzögerung ohne Notwendigkeit einer Dauermedikation bestand.

Die Ergebnisse der BAL-Diagnostik für SP-B und SP-C werden gesondert in den Kapiteln 3.3.3 und 3.3.4 beschrieben.

Tabelle 3.2.1-1: Charakteristika und Diagnostik der Subkategorie CTI

ID	m/w	Gestations- alter	Alter bei Symptom- beginn (Jahre)	Follow- Up Dauer (Jahre)	Langzeit- Outcome	Computertomographie Befund	Lungenbiopsie Befund
304	m	40	0,25	0,25	sick-same	mit 3 Monaten CT: ausgedehnte Belüftungsstörungen in allen Lungenlappen, keine typischen Veränderungen für interstitielle Lungenerkrankung	keine Lungenbiopsie durchgeführt im Follow up Zeitraum
1909	m		0,30	3,00	sick-better	mit 1 Jahr CT: Milchglasartige Trübung einzelner Lungenabschnitte (Lingula, Mittellappen, Anteile zentraler Unter- und Oberlappen)	keine Lungenbiopsie durchgeführt im Follow up Zeitraum
1475	m		0,00	2,08	sick-same	mit 8 Monaten CT: dorsal betonte interstitielle Verdichtungen, dorsobasale dystelektatische Veränderungen (mechanische Beatmung)	mit 10 Monaten LB: interstitielle Veränderungen mit Hinweis auf chronische zelluläre Pneumonitis, NSIP
1717	m	35	0,00	1,75	sick-better	kein CT durchgeführt im Follow up Zeitraum	keine Lungenbiopsie durchgeführt im Follow up Zeitraum

ID	m/w	Gestations- alter	Alter bei Symptom- beginn (Jahre)	Follow- Up Dauer (Jahre)	Langzeit- Outcome	Computertomographie Befund	Lungenbiopsie Befund
697	m		0,25	2,90	healthy	mit 1,75 Jahren CT: Alveolitis	mit 1,75 Jahren LB: Chronische Bronchiolitis, Emphysem
1500	w	39	0,33	4,30	sick-better	mit 4,5 Monaten HR-CT: hauptsächlich interstitiell entzündlicher Prozess (Bronchiolitis)und milchglasartige Verdichtungen beidseits, zusätzlich flau infiltrative Verdichtung Oberlappen rechts	keine Lungenbiopsie durchgeführt im Follow up Zeitraum
1116	m		0,80	1,00	sick-same	mit 11 Monaten: sehr diskretes Mosaikmuster mit bilateralen Dystelektasen und angrenzenden leicht überblähten Abschnitten	keine Lungenbiopsie durchgeführt im Follow up Zeitraum
1682	m	39	0,30	0,30	sick-same	kein CT durchgeführt im Follow up Zeitraum	keine Lungenbiopsie durchgeführt im Follow up Zeitraum

ID	m/w	Gestations- alter	Alter bei Symptom- beginn (Jahre)	Follow- Up Dauer (Jahre)	Langzeit- Outcome	Computertomographie Befund	Lungenbiopsie Befund
1425	w	38	0,00	2,00	healthy	mit 9 Monaten: generalisierte herterogene Veränderungen mit Milchglasstrübung, verdickten interstitiellen Septen und überblähten Lungenanteilen, z.T. pleurale Verdickung dorsolateral mit 1,8 Jahren: nur noch residuelle Veränderungen mit vereinzelter Milchglasstrübung	keine Lungenbiopsie durchgeführt im Follow up Zeitraum
1534	m	39	0,00	0,83	sick-same	mit 8,5 Monaten: Bilaterale und symmetrische Milchglasstrübung in zentralen Lungenabschnitten	keine Lungenbiopsie durchgeführt im Follow up Zeitraum
1887	w		0,08	2,50	healthy	mit 7 Monaten CT: residuelles Infiltrat rechter Oberlappen; keine interstitiellen Veränderungen; (mit 6 Monaten Röntgen-Thorax: Überblähung, peribronchiale Verdichtungen)	keine Lungenbiopsie durchgeführt im Follow up Zeitraum

ID	m/w	Gestations- alter	Alter bei Symptom- beginn (Jahre)	Follow- Up Dauer (Jahre)	Langzeit- Outcome	Computertomographie Befund	Lungenbiopsie Befund
1860	w	40	0,00	1,17	sick-better	mit 9 Monaten: Mosaikmuster bei obstruktiver Komponente, gering betontes Interstitium, z. T. beginnend narbige Veränderungen beidseits basal, keine Milchglastrübung	keine Lungenbiopsie durchgeführt im Follow up Zeitraum
1689	w		0,00	1,80	sick-better	kein CT durchgeführt im Follow up Zeitraum	keine Lungenbiopsie durchgeführt im Follow up Zeitraum
1779	m	38	0,04	1,00	sick-same	mit 7 Monaten CT: Mischbild überblähter und interstitieller Lungenveränderungen mit Betonung der retrokardialen Unterlappenabschnitte beidseits	mit 1 Jahr LB: normale Lungenbiopsie bis auf megakaryozytische Embolisation
1678	w	40	0,25	3,70	sick-better	CT durchgeführt, aber Befund nicht verfügbar	keine Lungenbiopsie durchgeführt im Follow up Zeitraum

ID	m/w	Gestations- alter	Alter bei Symptom- beginn (Jahre)	Follow- Up Dauer (Jahre)	Langzeit- Outcome	Computertomographie Befund	Lungenbiopsie Befund
1738	m		1,30	2,20	sick-same	mit 1,7 Jahren: ausgedehnte Milchglasinfiltrate (v.a. Mittellappen, Lingula) hier mit Dystelektasen, zentraler Oberlappen und periphere Unterlappen leichte zentrilobuläre noduläre Verdichtungen	mit 2 Jahren LB: leichte residuelle Bronchiolitis; kleinherdige Dystelektase abschnittsweise Emphysem, diskrete Vermehrung der intraalveolären Makrophagen
592	m	35	0,00	3,90	healthy	mit 1,25 Jahren CT: peribronchiale streifige Verdichtungen, lokale Überblähung und Milchglastrübung	keine Lungenbiopsie durchgeführt im Follow up Zeitraum
1463	m	35	0,00	0,60	sick-better	mit 3 Monaten CT: chronische Minderbelüftungen dorsale Oberlappen beidseits, keine interstitiellen Veränderungen, Zeichen einer Bronchiolitis obliterans	keine Lungenbiopsie durchgeführt im Follow up Zeitraum

ID	m/w	Gestations- alter	Alter bei Symptom- beginn (Jahre)	Follow- Up Dauer (Jahre)	Langzeit- Outcome	Computertomographie Befund	Lungenbiopsie Befund
1636	w		0,50	4,30	sick-same	mit 6 Monaten: Infiltrate perihilär rechts, Oberlappenatelektase; mit 2,5 Jahren: Mosaikmuster, zentrale fleckige Hypertransparenz	mit 4,4 Jahren: Neuroendokrine Zellhyperplasie
687	m	36	0,25	4,50	sick-better	mit 6 Monaten CT: peribronchiale Infiltrate, unspezifische Alveolitis, Minderbelüftungen dorsobasal, mit 7 Monaten: kein H.a. interstitielle Lungenveränderungen	mit 8 Monaten: Neuroendokrine Zellhyperplasie, begleitende leichte chronische Bronchiolitis und CIP
544	w	39	0,40	2,40	sick-better	mit 6 Monaten CT: Milchglastrübungen, interstitielle Verdickungen, kleine Infiltrate; mit 11 Monaten CT: diffuse Milchglastrübung	mit 1,08 Jahren LB: ILD ausgeschlossen; lokale Überblähung, Dystelektase, fokale bronchioläre Ektasie mit intraluminalem Mucus; obstruktive bronchoalveoläre Perfusions-Ventilationsstörung
674	w	40	0,13	7,00	healthy	mit 6 Monaten CT: peribronchiale bilaterale fleckige Infiltrate	keine Lungenbiopsie durchgeführt im Follow up Zeitraum

ID	m/w	Gestations- alter	Alter bei Symptom- beginn (Jahre)	Follow- Up Dauer (Jahre)	Langzeit- Outcome	Computertomographie Befund	Lungenbiopsie Befund
1941	m		0,00	1,00	sick-better	kein CT durchgeführt im Follow up Zeitraum	keine Lungenbiopsie durchgeführt im Follow up Zeitraum
667	m	38	0,33	9,40	sick-better	mit 1,9 Jahren CT: links streifige Verdichtungen bzw. indurative Veränderungen, DD Atelektasen	keine Lungenbiopsie durchgeführt im Follow up Zeitraum
1610	m	38	0,00	2,50	healthy	mit 1,08 Jahren: diffuse, fleckige Verdichtungen bilateral (perikardial, Mittellappen, Lingula), passend zu CTI	keine Lungenbiopsie durchgeführt im Follow up Zeitraum
1365	m		0,40	4,50	sick-better	mit 6 Monaten CT: Beidseits rechtsbetont teils milchglasartige Transparenzminderung, Dystelektase rechter Oberlappen	mit 8 Monaten LB: diskrete Lymphozytische Alveolitis
1712	m	40	0,00	1,00	sick-better	CT durchgeführt, aber Befund nicht verfügbar	keine Lungenbiopsie durchgeführt im Follow up Zeitraum

ID	m/w	Gestations- alter	Alter bei Symptom- beginn (Jahre)	Follow- Up Dauer (Jahre)	Langzeit- Outcome	Computertomographie Befund	Lungenbiopsie Befund
1948	w	41	0,25	1,16	sick-better	mit 4 Monaten CT: fleckige Milchglastrübungen beidseits (Lingula, Oberlappen rechts kranial und basal)	keine Lungenbiopsie durchgeführt im Follow up Zeitraum
706	w		1,80	7,70	sick-better	mit ca. 3 Jahren CT: Befund nicht verfügbar; mit 6,5 Jahren CT: Bronchiolitis, deutliches air-trapping und Verdickung der Bronchialwände	mit 2,08 Jahren LB: Neuroendokrine Zellhyperplasie (Synaptophysin positiv)
1531	m	38	0,42	3,75	sick-better	mit 2,1 Jahren: Überblähung, bronchiale Verdickung wie bei Bronchiolitis obliterans	Bronchiolitis und leichte Neuroendokrine Zellhyperplasie
1759	w		0,10	0,90	sick-same	mit 4 Monaten CT: bilaterale bronchopneumonische Infiltrate, alveolitische-brochiolitische Veränderungen	mit 4 Monaten LB: Chronic pneumonitis of infancy und Neuroendokrine Zellhyperplasie
1831	m	37	0,00	2,50	healthy	mit 5,5 Wochen CT: Schmetterlingsförmige Verdichtungen der Lunge beidseits, Milchglastrübungen	Interstitielle Glycogenose

Legende zu Tabelle 3.2.1-1: Charakteristika und Diagnostik der Subkategorie CTI:

healthy = gesund, sick – better = Verbesserung der klinischen Symptomatik, sick – same = keine Verbesserung der klinischen Symptomatik

sämtliche Abkürzungen sind dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen

Tabelle 3.2.1-2: Langzeit Outcome der Patienten mit chronischer Tachypnoe in Abhängigkeit von der Follow up-Dauer

Langzeit Outcome	Anzahl Patienten	mittlere/mediane Follow up-Dauer (Jahre)
healthy	7	3,33/2,5
sick – better	16	3,23/2,7
sick – same	9	1,43/1,0
sick – worse	0	--

3.3. Biochemische Analysen aus BAL

3.3.1. Differentialzytologie

In einem ersten Schritt der Analyse von BAL-Probenmaterial erfolgt nach Zentrifugation, wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, in der Regel eine Zelldifferenzierung aus dem erhaltenen Sediment. Nicht bei allen BAL-Proben, welche von außerhalb zur Verfügung standen, war eine Zelldifferenzierung durchgeführt worden bzw. waren die Befunde verfügbar. Des Weiteren muss eine gewisse Heterogenität in der Methodik und Angabe der qualitativen Werte der Differentialzytologie angenommen werden. Zum einen wurden quantitative Werte für einzelne Zellreihen als Prozentsatz der Gesamtzellzahl erhoben, zum anderen lagen qualitative Aussagen über das Zellbild vor. Für die vorliegende Arbeit interessant waren das Vorhandensein und der Schweregrad einer neutrophilen Inflammationsreaktion. Tabelle 3.3.1-1 zeigt das Vorgehen, welches bei den qualitativen deskriptiven Informationen zur Semiquantifizierung angewendet wurde.

Tabelle 3.3.1-1: Semiquantifizierung der qualitativen Angaben zu neutrophiler Inflammationsreaktion

Prozent PMN in BAL (%)	Qualitative Aussage zur neutrophilen Inflammationsreaktion
0 - 10	keine (relevante)
> 10 – < 15	mild
15 – < 25	mäßig
25 – < 75	schwer
75 – 100	sehr schwer/massiv

PMN = polymorphkernige neutrophile Granulozyten

Quantitative oder qualitative Werte bzw. Aussagen zu polymorphkernigen neutrophilen Zellen (PMN) bzw. einer neutrophilen Inflammationsreaktion in der BAL konnten bei 214

der 302 Proben erhoben werden (knapp 71%). Mögliche Gründe für das Nichtvorhandensein einer Differentialzytologie waren:

- 1) Es wurde keine Differentialzytologie durchgeführt. Dies war entweder der Fall bei Lungengesunden oder bei Material von Patienten, welches in externen Kliniken gewonnen und aufbereitet worden war.
- 2) Die Information über die Differentialzytologie war nicht verfügbar und konnte auch nicht nachträglich eingeholt werden.
- 3) Bei dem verfügbaren Material handelte es sich nur um tiefes Trachealsekret oder Bronchiallavage, woraus keine Zelldifferenzierung möglich (Detritus) und sinnvoll ist.

Auf Grundlage der quantitativen und qualitativen Angaben der Differentialzytologie erfolgte wie bereits beschrieben die Einteilung der Kontrollgruppen in „Bronchitis – normal“ und „Bronchitis – neutrophil“. Hier wurde ein Cut-off von 10% für ein Alter bei BAL < 5 Jahre festgesetzt.

Die PMN-Werte wurden als Marker für eine neutrophile Inflamationsreaktion in Korrelation zu den jeweiligen analysierten Konzentrationen an SP-C gesetzt. Die Ergebnisse sind Kapitel 3.3.4 (SP-C) dargestellt.

3.3.2. Proteinkonzentration

Bei Betrachtung der Gesamtproteinkonzentrationen von BALF ergab sich ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) für Unterschiede zwischen den Gruppen (overall ANOVA). In der post hoc-Analyse zeigten viele Subkategorien signifikante Ergebnisse gegenüber der Subkategorie der Lungengesunden (siehe Abbildung 3.3.2-1). Besonders hervorzuheben sind die Subkategorien mit inflammatorischer Reaktion. Wie erwartet war die Gesamtproteinkonzentration hier erhöht. Hierzu gehören die Subkategorien „Bronchitis – neutrophilic“, BPD-cLDI (Frühgeborene) und Immunsupprimierte ($p < 0,0001$). Als Ursache ist zum einen eine inflammationsbedingte

Permeabilitätsstörung, zum anderen aber auch ein erhöhter Influx von Abwehrproteinen zu diskutieren. Des Weiteren ist die Subkategorie der PAP-Patienten zu erwähnen, bei denen die signifikant höhere Gesamtproteinkonzentration hinreichend durch die massive Erhöhung der Surfactantproteine zu erklären ist (siehe Tabelle 6.1-1, Anhang).

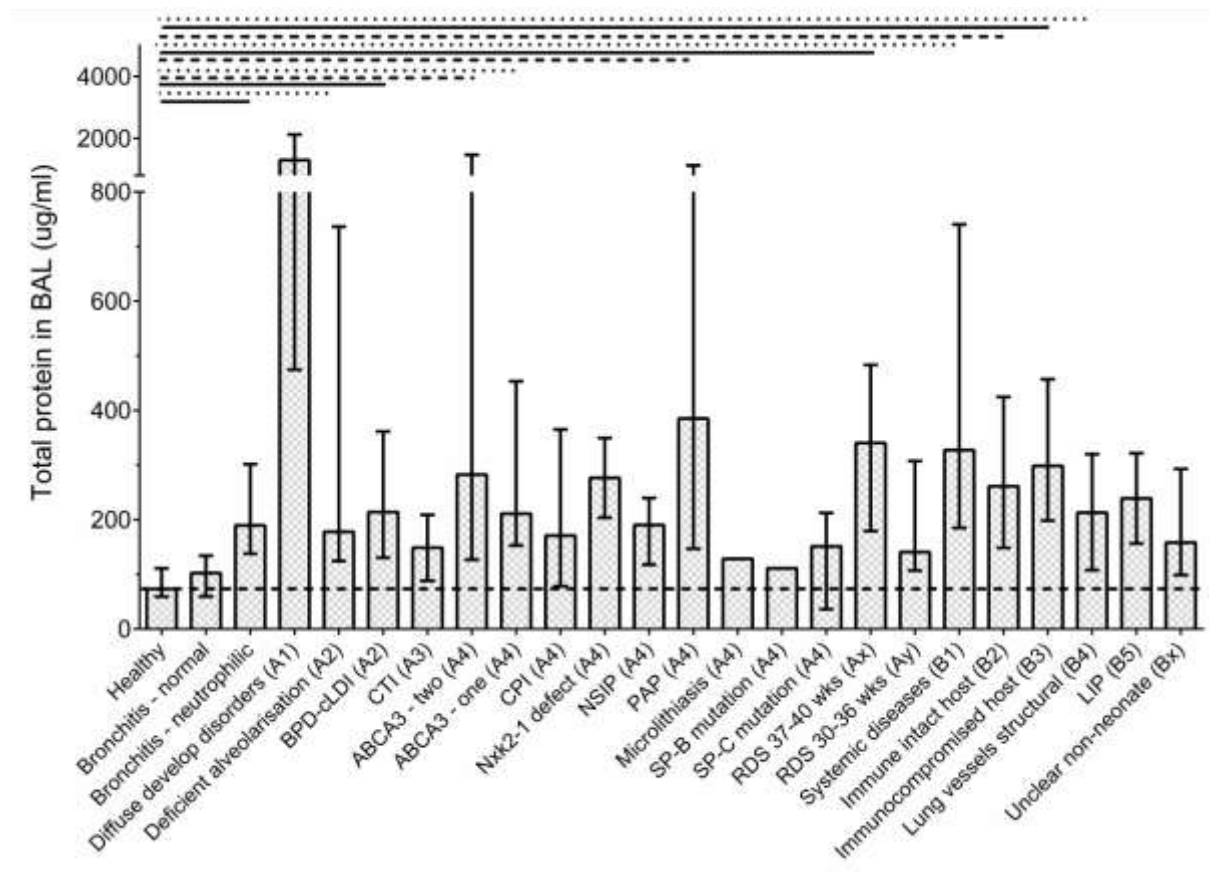


Abbildung 3.3.2-1: Gesamtproteinkonzentrationen in BALF in den einzelnen Subkategorien

Die overall ANOVA ergab einen p-Wert $< 0,0001$. Die Unterschiede zur gesunden Kontrollgruppe sind für verschiedene p-Werte durch folgende Linien oberhalb der Abbildung angegeben: gestrichelt für $p < 0,05$, gepunktet für $p < 0,01$, durchgehend für $p < 0,0001$. Die gestrichelte Linie innerhalb der Abbildung zeigt die mediane Konzentration an Gesamtprotein der gesunden Kontrollgruppe an.

3.3.3. Surfactantprotein B (SP-B)

Surfactantprotein B lag in BAL überwiegend als 16kDa-Dimer vor. Die monomere Form mit einem Gewicht von 8 kDa wurde bei den 302 analysierten Proben nur in rund 36% (35,8%) der Fälle überhaupt detektiert (siehe Abbildung 3.3.3-1). Der Anteil an der dimeren Form lag im Median 4,4 fach höher. Nur in 5 Fällen zeigten sich höhere Konzentrationen an monomerem SP-B als an dimeren. Diese Patienten entstammten den Subkategorien D (bronchitis neutrophil), A1, A4 und B2. Eine Ursächlichkeit ließ sich aufgrund der geringen Fallzahl nicht ableiten. (Tabelle 6.6-1, Anhang)

In 61,6% der Analysen zeigten sich auch höhermolekulare Formen von SP-B in Größenbereichen um 24 kDa und 32 kDa, was auf eine Aggregation als Tri- oder sogar Tetramer zurückzuführen ist.

Sowohl zwischen den einzelnen Subkategorien als auch innerhalb derer zeigten sich zum Teil erhebliche Schwankungen in den SP-B-Konzentrationen. Auch der Vergleich der Medianwerte über die verschiedenen Subkategorien wies große Schwankungsbereiche auf. Die Abbildungen 3.3.3-1 und 3.3.3-2 zeigen jeweils die Medianwerte der einzelnen Subkategorien mit dem jeweiligen Interquartilen Range. Die Varianzanalyse erfolgte mittels nichtparametrischem ANOVA und zeigt Unterschiede zwischen den Gruppen ($p < 0.05$). Die Betrachtung der einzelnen Untergruppen im Post-hoc Test zeigte für die SP-B-Konzentrationen bei 8 kDa keine signifikanten Unterschiede. Die ANOVA für 16 kDa war signifikant ($p = 0,0019$), Dunn's post hoc Test zeigte nur einen Unterschied zwischen Kontrollen und PAP auf. Bei Betrachtung der Summe von SP-B bei 8kDa und 16kDa zeigten sich wie in Tabelle 3.3.3-2 dargestellt, signifikante Unterschiede bei den Subkategorien PAP und 2-ABCA3-Mutationen jeweils zu den drei Kontrollgruppen und wie zu erwarten zu den Frühgeborenen (häufig noch Surfactantmangel aufgrund Lungenunreife). Für die Subkategorie der 2-ABCA3-Mutationen gibt es zusätzlich einen signifikanten Unterschied zur Gruppe der CTI (A3) und der unklaren RDS des fast Reifgeborenen (Ax).

Wurde das Verhältnis aus der SP-B-Konzentration und der Gesamtproteinkonzentration der einzelnen BAL-Proben bestimmt und für einen Vergleich der Subkategorien

herangezogen, ergaben sich zum einen innerhalb der Subkategorien stabilere Werte mit weniger Ausreißern, zum anderen deutlichere Trends im Subkategorienvergleich. Dieses Ergebnis war unabhängig davon, ob die Summe aus den Konzentrationen für SP-B bei 8 kDa und 16 kDa oder zusätzlich bei 24 kDa berücksichtigt wurde. Mittels des Kruskal Wallis Tests ließen sich signifikante Unterschiede zwischen den Subkategorien nachweisen, mit den höchsten Werten für die Patienten mit pulmonaler alveolärer Proteinose. (siehe Abbildung 3.3.3-3 und 3.3.3-4). Im Einzelnen zeigte sich eine Signifikanz für die Subkategorie mit pulmonaler alveolärer Proteinose gegenüber allen anderen Subkategorien sowohl für der Verhältnis von SP-B bei 8 + 16 kDa und auch bei 8 + 16 + 24 kDa zur Gesamtproteinkonzentration (siehe Tabelle 3.3.3-3). Alle anderen Subkategorien sind weder untereinander noch zu den Kontrollgruppen signifikant unterschiedlich bezüglich dieser Verhältnisse.

Die einzige Entität, bei der in keinem der Molekulargrößenbereiche SP-B zu finden war, ist die homozygote 121ins2 Mutation in SFTPB. Insbesondere für SP-B bei 16 kDa war dies die einzige Entität, bei der kein SP-B nachgewiesen werden konnte, in allen anderen Subkategorien fand sich dimeres SP-B. Dies deckt sich mit Surfactantproteinanalysen bei SP-B-Mutationen aus der Literatur (96; 129).

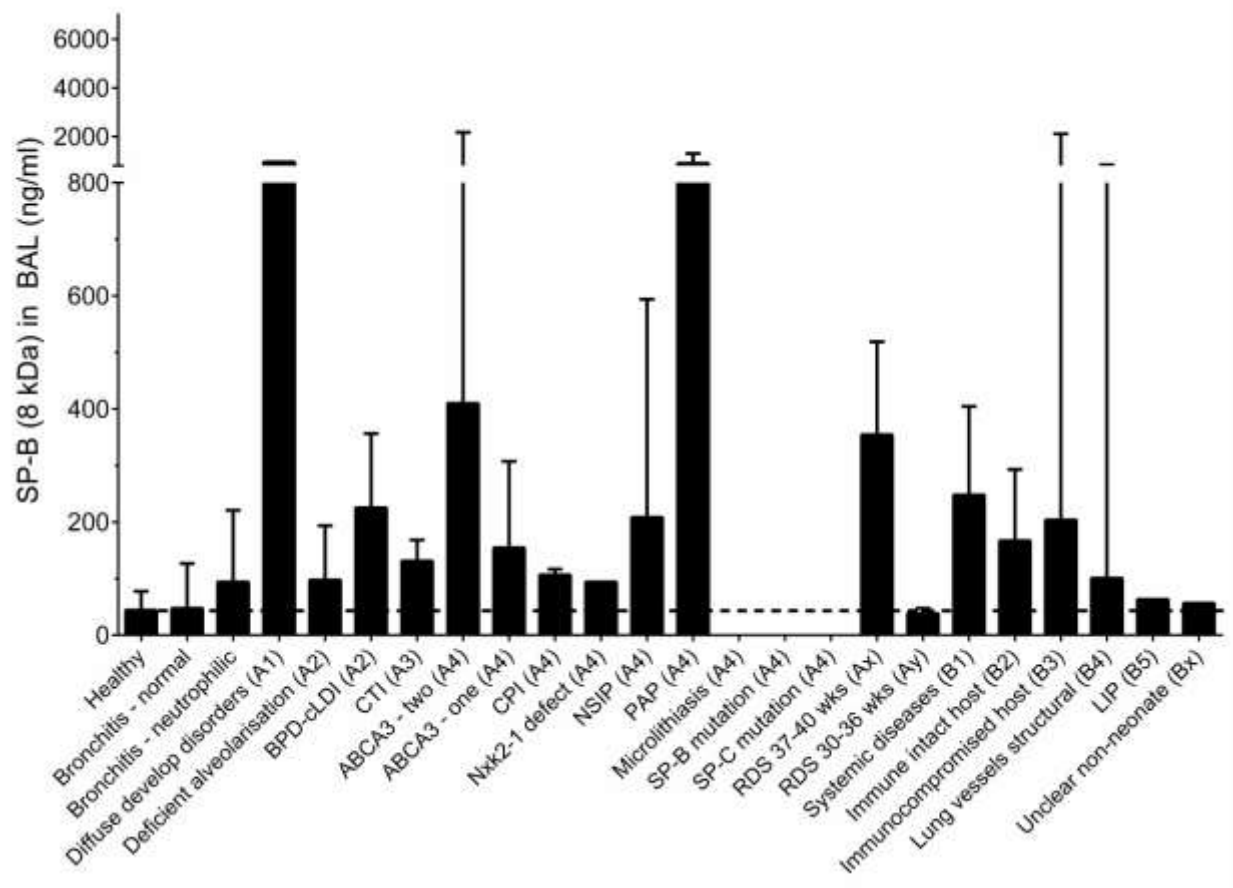


Abbildung 3.3.3-1: Konzentration von Surfactantprotein B (SP-B) mit einem Molekulargewicht von ca. 8 kDa (SP-B Monomer) in BALF von Kindern in den verschiedenen Subkategorien

Die Ergebnisse sind als Median-Werte und Interquartilen Range angegeben. Die gestrichelte Linie zeigt die mediane Konzentration an SP-B in der Subkategorie der Lungengesunden.

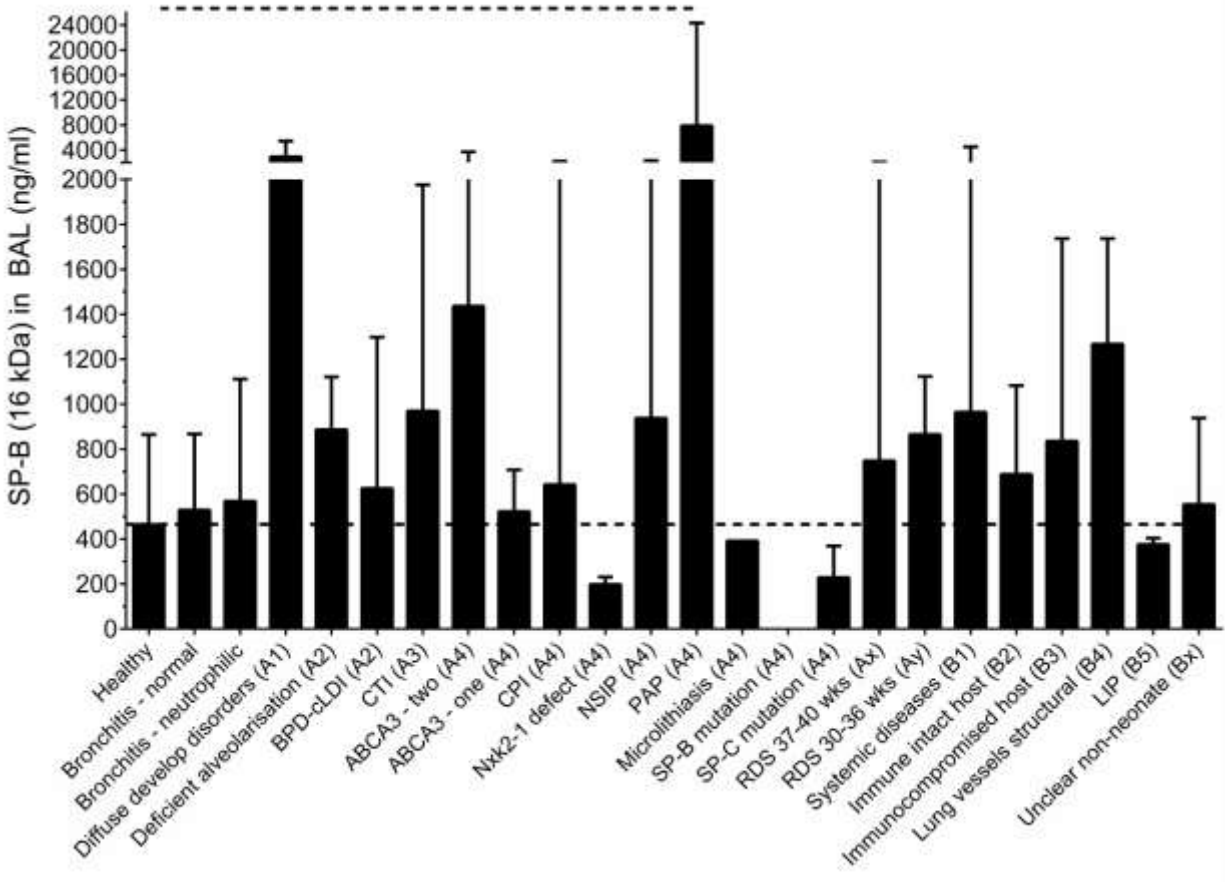


Abbildung 3.3.3-2: Konzentration von Surfactantprotein B (SP-B) mit einem Molekulargewicht von ca. 16 kDa (reifes SP-B Dimer) in BALF von Kindern aus den verschiedenen Subkategorien

Die Ergebnisse sind als Median und Interquartilen Range angegeben. Die gestrichelte Linie innerhalb der Abbildung zeigt die mediane Konzentration an SP-B in der Subkategorie der Lungengesunden, die oberhalb der Abbildung stellt den signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen Lungengesunden und PAP-Patienten dar.

Tabelle 3.3.3-1: Medianwerte der SP-B-Konzentrationen bei 8 und 16 kDa sowie bei 8, 16 und 24 kDa und der Verhältnisse der SP-B-Konzentrationen zur Gesamtproteinkonzentration der einzelnen Subkategorien

Subkategorie (Code)	n	*Summe SP-B 8+16 kDa (ng/ml)	*Summe SP-B 8+16+24 kDa (ng/ml)	*Verhältnis SP-B 8+16 kDa/ total protein	*Verhältnis SP-B 8+16+24 kDa/ total protein
Healthy	19	386,06	454,74	4,17	5,14
Bronchitis - normal	69	544,56	619,96	5,31	5,47
Bronchitis - neutrophilic	38	603,46	617,95	2,87	3,25
Diffuse developmental disorders (A1)	2	3406,50	6625,05	2,73	5,24
Deficient alveolarisation (A2)	9	886,70	1120,90	4,15	4,82
BPD-cLDI (A2)	25	779,70	1205,00	3,30	5,09
CTI (A3)	32	969,33	1015,98	6,82	7,04
RDS 37-40 wks (Ax)	19	901,77	1044,70	2,01	4,21
RDS 30-36 wks (Ay)	9	894,06	1122,42	5,34	6,83
ABCA3 - two (A4)	9	1577,23	2243,68	7,31	9,78
ABCA3 - one (A4)	6	599,10	931,94	2,53	3,99
CPI (A4)	3	559,80	660,90	6,92	6,92
DIP (A4)	1	724,27	724,27	2,96	2,96
Nxk2-1 defect (A4)	2	244,76	308,65	1,03	1,27

Subkategorie (Code)	n	*Summe SP-B 8+16 kDa (ng/ml)	*Summe SP-B 8+16+24 kDa (ng/ml)	*Verhältnis SP-B 8+16 kDa/ total protein	*Verhältnis SP-B 8+16+24 kDa/ total protein
NSIP (A4)	9	945,50	1031,30	5,70	6,29
PAP (A4)	5	7892,00	7892,00	22,39	22,39
Microlithiasis (A4)	1	391,60	460,80	3,04	3,58
SP-B mutation (A4)	1	0,00	0,00	0,00	0,00
SP-C mutation (A4)	3	228,80	444,40	1,51	2,94
Systemic diseases (B1)	4	965,09	965,09	4,27	4,27
Immune intact host (B2)	10	825,87	960,51	3,24	3,82
Immunocompromised host (B3)	9	857,40	857,40	4,27	4,27
Lung vessels structural (B4)	12	1349,90	1536,49	5,61	6,19
LIP (B5)	2	407,19	731,92	1,83	3,66
Unclear non-neonate (Bx)	3	553,90	553,90	3,47	3,47

*Angabe als Median der Werte innerhalb der einzelnen Subkategorien; n = Anzahl der analysierten Proben in den einzelnen Subkategorien

Sämtliche Abkürzungen sind dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen.

Tabelle 3.3.3-2: signifikante Unterschiede der SP-B-Konzentrationen für die Summe aus 8 und 16 kDa

Subkategorie	Vergleich mit Subkategorie	p-Wert*
ABCA3 – two (A4)	Lungengesunde	< 0,001
	Bronchitis – normal	< 0,001
	Bronchitis – neutrophilic	< 0,001
	BPD-cLDI (A2)	< 0,001
	CTI (A3)	< 0,001
	RDS 37-40 wks (Ax)	= 0,001
PAP (A4)	Lungengesunde	= 0,027
	Bronchitis – normal	= 0,01
	Bronchitis – neutrophilic	= 0,012
	BPD-cLDI (A2)	= 0,04

* der Median-Werte der SP-B-Konzentrationen bei 8+16kDa

Der Vergleich der Subkategorien untereinander erfolgte mittels des Tukey post hoc Tests, das Signifikanzniveau wurde bei einem p-Wert < 0,05 festgelegt.

Sämtliche Abkürzungen sind dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen.

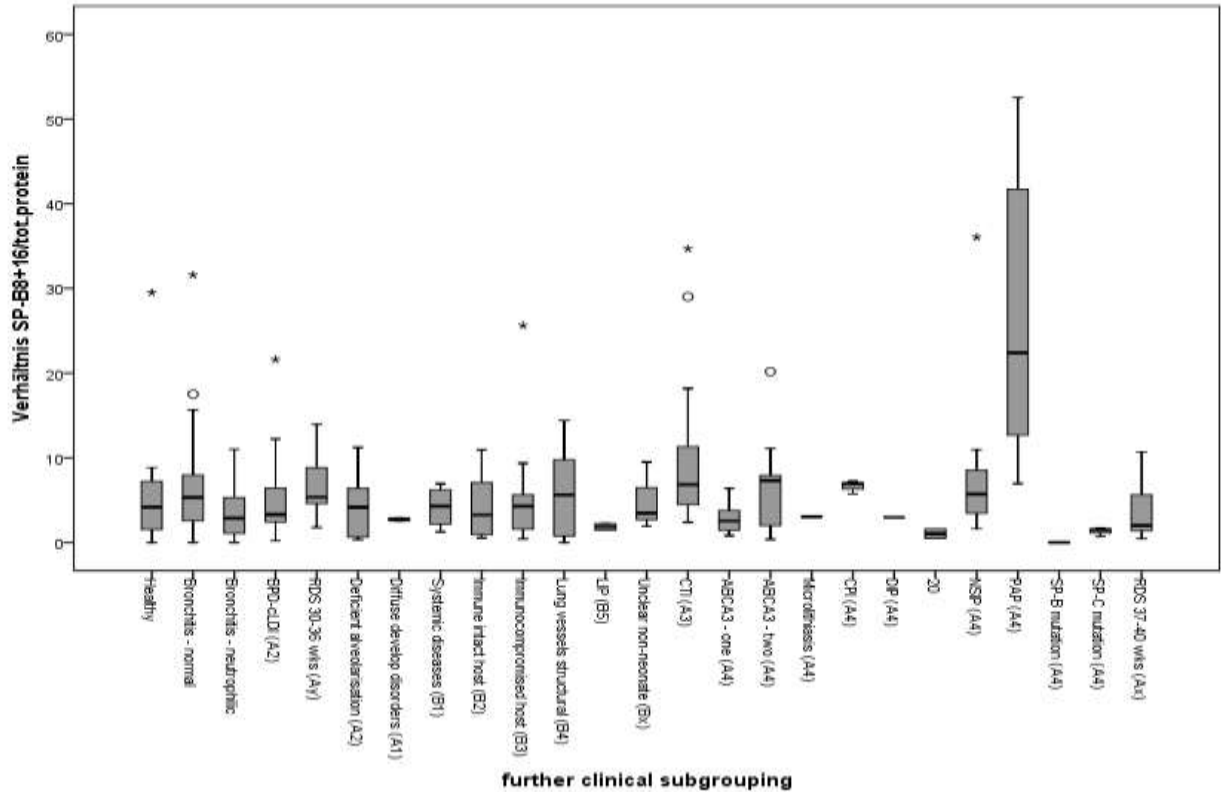


Abbildung 3.3.3-3: Verhältnis der Konzentration von Surfactantprotein B bei 8 kDa und 16 kDa zur Gesamtproteinkonzentration in BAL von Kindern aus den verschiedenen Subkategorien

Die Ergebnisse sind als Median und Interquartilen Range angegeben.

○ bedeuten milde Ausreißer, * sind extreme Ausreißer.

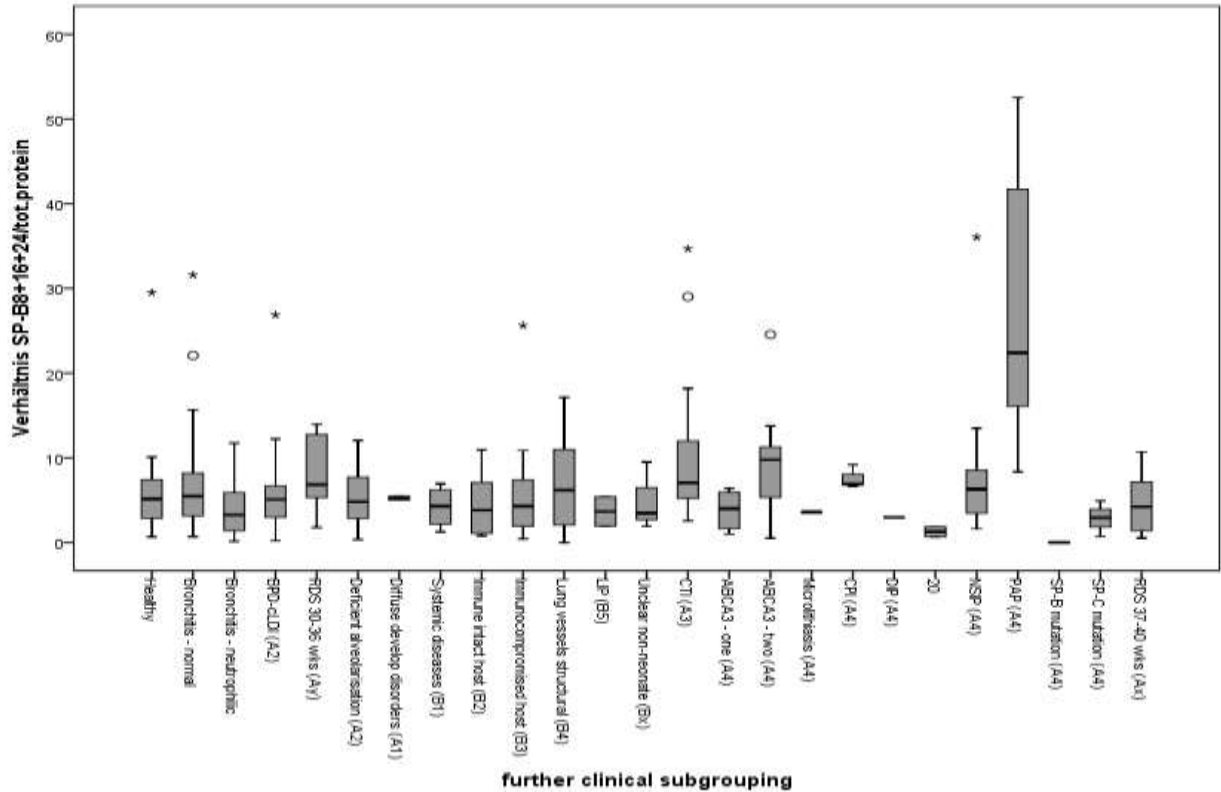


Abbildung 3.3.3-4: Verhältnis der Konzentration von Surfactantprotein B bei 8, 16 und 24 kDa zur Gesamteinkonzentration in BAL von Kindern aus den verschiedenen Subkategorien

Die Ergebnisse sind als Median und Interquartilen Range angegeben.

o bedeuten milde Ausreißer, * sind extreme Ausreißer.

Da für die Subkategorie mit SP-B-Mutation kein SP-B detektiert wurde, konnte mathematisch kein Verhältnis gebildet werden. Als Wert wurde 0 festgesetzt.

Tabelle 3.3.3-3: signifikante Unterschiede in der post hoc Analyse der Median-Werte der Verhältnisse von SP-B bei 8 und 16 kDa zur Gesamtproteinkonzentration

Subkategorie	Vergleich mit Subkategorie	p-Wert* SP-B 8+16 kDa/total protein	p-Wert* SP-B 8+16+24 kDa/total protein
PAP (A4)	healthy	< 0,001	< 0,001
	Bronchitis – normal	< 0,001	< 0,001
	Bronchitis – neutrophilic	< 0,001	< 0,001
	Diffuse developmental disorders (A1)	< 0,001	< 0,001
	Deficient alveolarisation (A2)	< 0,001	< 0,001
	BPD-cLDI (A2)	< 0,001	< 0,001
	CTI (A3)	< 0,001	< 0,001
	RDS 37-40 wks (Ax)	= 0,001	< 0,001
	RDS 30-36 wks (Ay)	< 0,001	< 0,001
	ABCA3 - one (A4)	< 0,001	< 0,001
	ABCA3 - two (A4)	< 0,001	= 0,002
	Nxk2-1 defect (A4)	= 0,001	= 0,001
	NSIP (A4)	= 0,001	= 0,001
	SP-C mutation (A4)	< 0,001	< 0,001
	Systemic diseases (B1)	< 0,001	< 0,001
	Immune intact host (B2)	< 0,001	< 0,001
	Immunocompromised host (B3)	< 0,001	< 0,001
	Lung vessels structural (B4)	< 0,001	< 0,001
	Unclear non-neonate (Bx)	= 0,004	= 0,002
	LIP (B5)	= 0,003	= 0,008

*Vergleich der Median-Werte der o.g. Verhältnisse

Der Vergleich der Subkategorien untereinander erfolgte mittels des Tukey post hoc Tests, das Signifikanzniveau wurde bei einem p-Wert < 0,05 festgelegt.

Sämtliche Abkürzungen sind dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen.

3.3.4. Surfactantprotein C (SP-C)

SP-C wurde in BAL überwiegend in seiner monomeren Form mit einer Molekulargröße von ca. 4 kDa detektiert. Über alle Subkategorien hinweg lag die 4 kDa-Form in 85,6% der Fälle vor. Dimere oder auch Aggregate von Tri- und Tetrameren wurden in rund 37%, 18% und 4% gefunden. Im Gegensatz zu SP-B, welches nur bei einer Mutation in SFTP B vollständig fehlt, zeigten sich bei der Analyse von SP-C in BAL wesentlich häufiger Proben ohne oder mit sehr niedrigen Konzentrationen von SP-C. Dies kam bei 29 Patienten vor. Eine Häufung zeigte sich in den Subkategorien „bronchitis – neutrophilic“ und den Surfactant-assoziierten Störungen (SP-B-, SP-C-, ABCA3-, Nrx2.1-Mutationen). In Tabelle 3.3.4-2 sind zum einen diejenigen Individuen aufgelistet, bei denen in allen kDa-Bereichen keinerlei SP-C detektiert werden konnte. Zum anderen sind diejenigen aufgeführt, bei denen entweder im 4 kDa-Bereich SP-C in einer Konzentration ≤ 5 ng/ml nachweisbar war oder bei denen im 4 kDa-Bereich kein SP-C, jedoch in Summe der anderen kDa-Bereiche die Konzentration ebenfalls ≤ 5 ng/ml lag.

Tabelle 3.3.4-1: Patienten ohne oder mit sehr geringem* Vorkommen von SP-C bei 4 kDa in der BAL

Nummer	Patienten ID	m/w	Kategorie	Diagnose	Patient verstorben	SP-C 4 kDa (ng/ml)	PMN (%)
1	1178	w	A1	Diffuse develop disorders (Alveolar capillary dysplasia with misalignment of the pulmonary veins)	ja	0	n.a.
2	1400	m	A2	Deficient alveolarisation (Trisomy 21)	nein	0	2
3	701	m	A2	Deficient alveolarisation (Trisomy 21)	nein	0	n.a.
4	1989	m	A2	Related to preterm birth (BPD-cLDI)	ja	0	n.a.
5	1493	m	A2	Related to preterm birth (BPD-cLDI)	nein	0	n.a.
6	1405 [#]	m	A2	Related to preterm birth (BPD-cLDI)	nein	0	n.a.
7	2064	m	A4	SP-C mutation	nein	0	6
8	1446 [#]	m	A4	SP-C mutation	nein	0	79
9	1822	w	A4	ABCA3 – two mutations	nein	0	n.a.
10	1354	m	A4	ABCA3 – two mutations	ja	0	n.a.
11	1479	w	A4	ABCA3 – one mutation	nein	0	36
12	636	m	A4	ABCA3 – two mutations	ja	0	n.a.
13	1901 [§]	w	A4	ABCA3 – two mutations	ja	0	n.a.
14	475	m	Ax	RDS 37-40 wks	nein	0	91
15	1683	m	Ax	RDS 37-40 wks	nein	0	n.a.
16	1739 [#]	m	Ax	RDS 37-40 wks	nein	0	n.a.
17	162	w	D	Bronchitis – neutrophilic	nein	0	80
18	1171	m	D	Bronchitis – neutrophilic	nein	0	50

Nummer	Patienten ID	m/w	Kategorie	Diagnose	Patient verstorben	SP-C 4 kDa (ng/ml)	PMN (%)
19	705	m	D	Bronchitis – neutrophilic	nein	0	93
20	1958	m	D	Bronchitis – neutrophilic	nein	0	47
21	1319	m	D	Bronchitis – neutrophilic	nein	0	38
22	1548	m	D	Bronchitis – neutrophilic	nein	0	15
23	416	m	D	Bronchitis – neutrophilic	nein	0	80
24	264 [#]	w	B2	Immune intact host	nein	0	2
25*	1402*	w	A4	SP-B mutation	ja	2,9	n.a.
26*	659*	m	A4	Nxk2-1 defect	nein	3,8	98
27*	1404	w	A2	Related to preterm birth (BPD-cLDI)	ja	1,8	n.a.
28*	717	m	Ax	RDS 37-40 wks	nein	4,97	n.a.
28*	136	m	D	Bronchitis – neutrophilic	nein	4	27
29*	1207	m	D	Bronchitis – normal	nein	3,2	1,8

*Konzentration von SP-C bei 4 kDa \leq 5ng/ml

[#] Konzentration von SP-C über 8 kDa-, 12 kDa- und 16 kDa-Bereiche \leq 5 ng/ml

[§]Vorkommen von SP-C ausschließlich im Bereich von 16 kDa

PMN = polymorphkernige neutrophile Granulozyten

Hohe bis sehr hohe Konzentrationen an SP-C bei 4 kDa, die im Dunn's post hoc-Test signifikant unterschiedlich zur Subkategorie der Lungengesunden waren, wurden bei Kindern mit CTI (chronic tachypnea of infancy), mit PAP, mit histologisch gesicherter NSIP und in der Subkategorie mit strukturellen Veränderungen im Bereich der Lungengefäße (B4) gefunden. Einzig bei den PAP-Patienten war die Konzentration an SP-C gleichzeitig bei 4 kDa und bei 8 kDa massiv erhöht. Dargestellt sind diese Ergebnisse in den Abbildungen 3.3.4-1 und 3.3.4-2. In Abbildung 3.3.4-1 ist ebenfalls ersichtlich, dass Kindern mit CTI im Vergleich zu den Erkrankungen der alveolären Surfactantregion (A4) deutlich erhöhte SP-C Konzentrationen aufweisen.

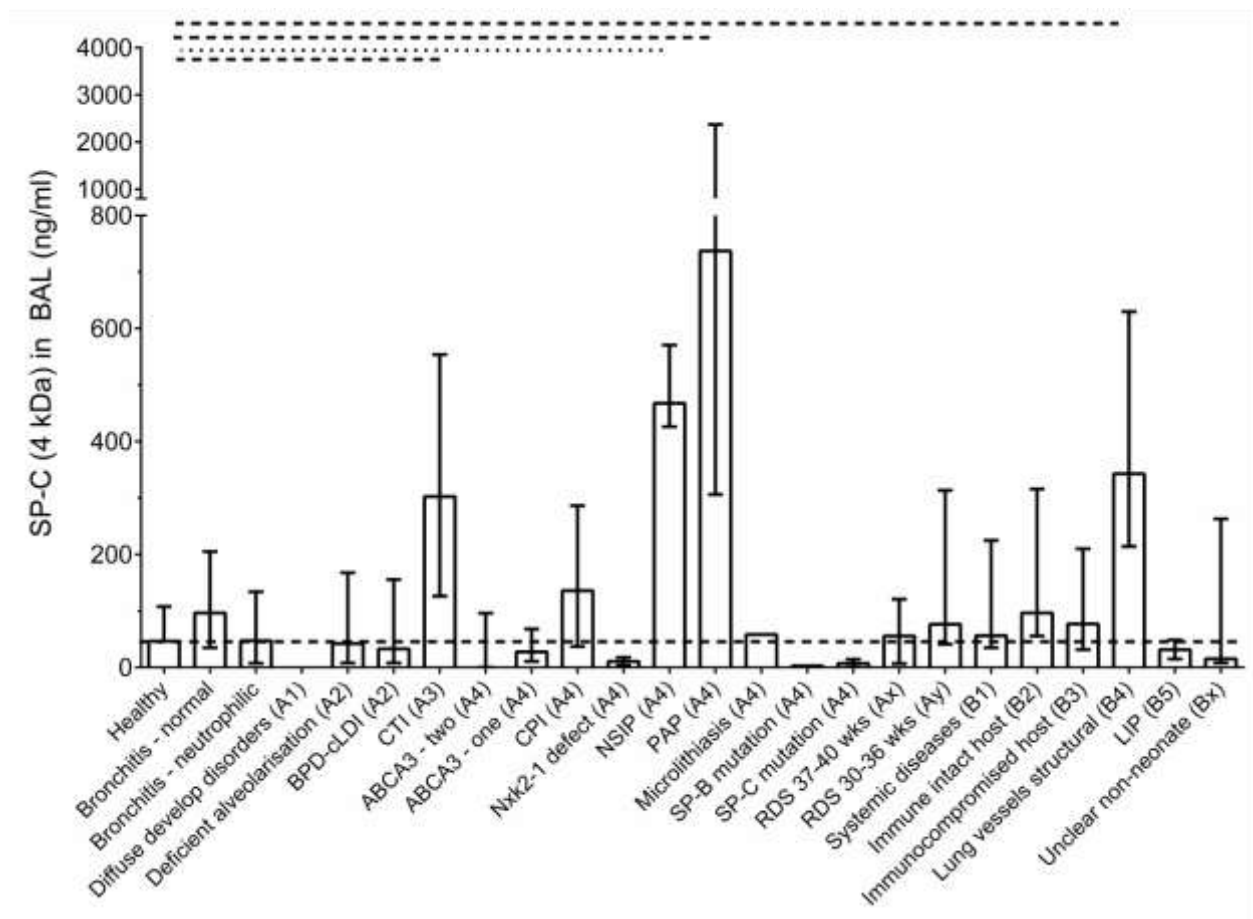


Abbildung 3.3.4-1: Konzentration von Surfactantprotein C (SP-C) mit einem Molekulargewicht von ca 4 kDa (reifes SP-C Monomer) in BALF von Kindern aus den verschiedenen Subkategorien

Die Ergebnisse sind als Median und Interquartilen Range angegeben.

$p < 0,0001$ über alle Subkategorien (overall ANOVA)

Die Unterschiede zu Lungengesunden sind für verschiedene p-Werte durch folgende Linien oberhalb der Abbildung angegeben: gestrichelt für $p < 0,05$, gepunktet für $p < 0,01$. Die gestrichelte Linie innerhalb der Abbildung zeigt die mediane Konzentration an SP-C der Lungengesunden an.

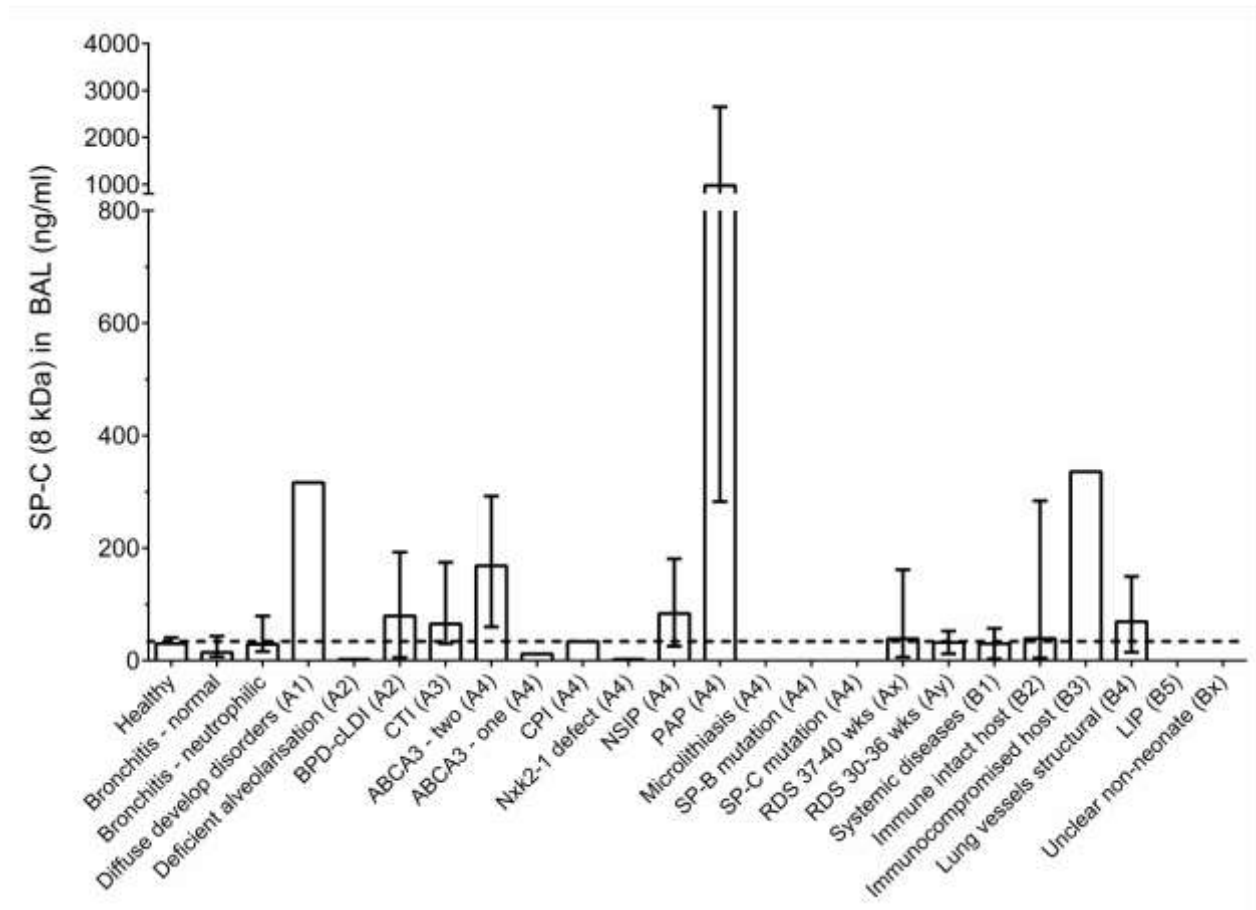


Abbildung 3.3.4-2: Konzentration von Surfactantprotein C (SP-C) mit einem Molekulargewicht von ca 8 kDa (Dimer) in BALF von Kindern aus den verschiedenen Subkategorien

Die Ergebnisse sind als Median und Interquartilen Range angegeben.

$p = 0,0277$ für Unterschiede über alle Subkategorien (overall ANOVA).

Es zeigten sich keine Unterschiede im Dunn's post hoc-Test zur Subkategorie der Lungengesunden.

Bezüglich des Fehlens von SP-C in BAL ließ sich im Gegensatz zu einem vollständigen Fehlen von SP-B trotz einer Häufung in den oben genannten Subkategorien kein diagnostischer Aussagewert für spezifische DPLD festlegen.

Um den Zusammenhang zwischen Inflammation und erniedrigten SP-C-Konzentrationen in BAL genauer zu untersuchen, wurden die beiden nicht-alveolären Subkategorien „bronchitis – normal“ und „bronchitis – neutrophilic“ bezüglich ihrer SP-C-Konzentrationen verglichen. Hier ergab sich für die Subkategorie ohne neutrophile Inflamationsreaktion eine SP-C-Konzentration (Summe bei 4+8 kDa) von 96,5 ng/ml im Median, für die Subkategorie mit neutrophiler Inflamationsreaktion von 55,8 ng/ml. Dieser Unterschied zeigte sich im Tukey post hoc-Test nicht signifikant. Das Verhältnis aus der Summe von SP-C bei 4 kDa und 8 kDa zur Gesamtproteinkonzentration hingegen ergab einen p-Wert von 0,050 (gerade nicht signifikant). Die Werte wurden als Median und Interquartilenrange angegeben (1,31 vs. 0,27), multiple Vergleiche wurden per ANOVA und Tukey post hoc-Test vorgenommen.

Des Weiteren wurden alle verfügbaren PMN-Werte aus der Differentialzytologie der BAL-Proben sowie qualitative Aussagen über die Schwere der neutrophilen Inflamationsreaktion mit den analysierten SP-C-Konzentrationen korreliert. Dabei wurden Proben aus den Subkategorien „healthy“ und „bronchitis–normal“ ausgenommen. Aus allen anderen Subkategorien konnten insgesamt 113 Werte in die fünf semiquantitativen Schweregraden eingeteilt werden, je nach relativem Anteil der neutrophilen Zellen: PMN 0 - <10% (keine), 10 – < 15% (mild), 15 – < 25% (mäßig), 25 – < 75% (schwer), 75 – 100% (sehr schwer/massiv).

Tabelle 3.3.4-2: Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten in BAL und der SP-C-Konzentration

Schweregrad	Prozent PMN in BAL (%)	Summe SP-C 4 und 8 kDa (ng/ml)
0	0 - <10	123 (228,6*)
1	10 – < 15	153,6
2	15 – < 25	115,5
3	25 – < 75	29
4	75 – 100	19,8

Median-Werte der Summe aus den SP-C-Konzentrationen bei 4 kDa und 8 kDa in Abhängigkeit unterschiedlicher Schweregrade neutrophiler Inflammation

*Median ohne die Kontrollgruppen „healthy“ und „bronchitis-normal“

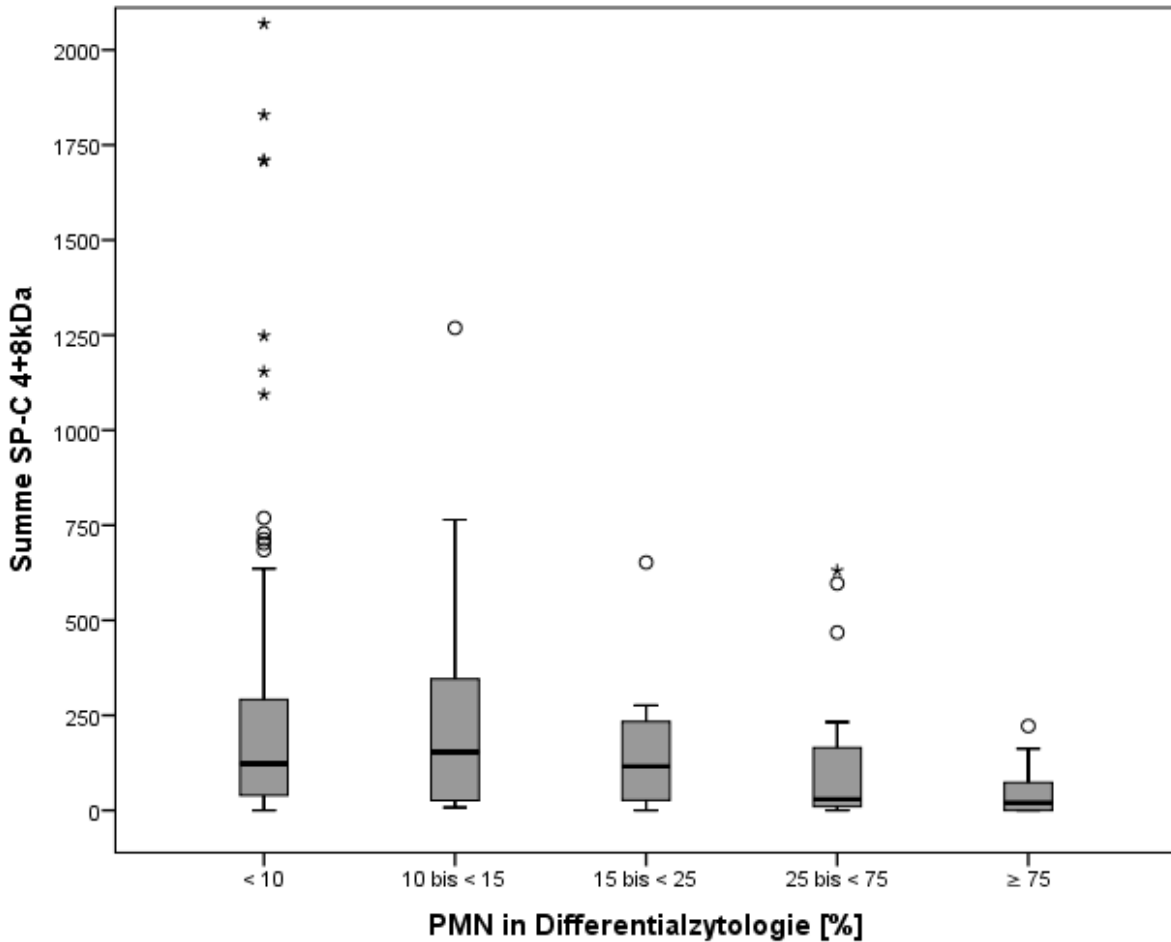


Abbildung 3.3.4-3: SP-C-Konzentrationen für verschiedene Schweregrade neutrophiler Inflammation in BALF

Trotz der absolut gesehenen Abnahme der Medianwerte der SP-C-Konzentrationen bei zunehmendem Prozentsatz polymorphkerniger neutrophiler Zellen in BALF ergab sich keine signifikante negative Korrelation. Signifikant jedoch zeigten sich die Unterschiede zwischen den Schweregraden 0 vs. 3 ($p = 0,02$), 0 vs. 4 ($p < 0,0001$) und 1 vs. 4 ($p = 0,012$).

Bei isolierter Betrachtung der Subkategorie „bronchitis – neutrophilic“ zeigte sich eine schwache negative Korrelation zwischen der Schwere der neutrophilen Inflammationsreaktion, d.h. der Höhe der PMN-Werte und der SP-C-Konzentrationen mit einem r-Wert von 0,30, jedoch ebenfalls ohne Signifikanz ($n = 36$, $p = 0,07$).

3.3.5. Verhältnis SP-C/SP-B

Aufgrund der relativ stabilen SP-B-Konzentrationen unabhängig von der Krankheitsentität (mit Ausnahme von SP-B-Mutationen) wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Verhältnis von SP-B zu SP-C in BAL einen konkreteren diagnostischen Aussagewert für DPLD liefern könnte.

Für die verschiedenen Subkategorien wurde das Verhältnis aus der Summe von SP-C bei 4 kDa und 8 kDa zur Summe aus SP-B bei 8 kDa und 16 kDa (häufigste Bereiche über alle Kategorien) berechnet. Der jeweilige Medianwert dieser Verhältnisse in den Subkategorien ist in der Abbildung 3.3.5-1 dargestellt. Unter der Annahme, dass die erste Quartile bei den lungengesunden Kontrollen mit einem Verhältnis von 0,09 einen unteren Grenzwert für eine SP-C-Defizienz darstellen könnte, ist dieser als horizontale Linie eingezeichnet. In der statistischen Auswertung ergab sich über alle Subkategorien eine overall ANOVA von $p < 0,0001$, im Vergleich zu den lungengesunden Kontrollen jedoch kein signifikanter Unterschied. Zu erkennen ist auch, dass das Verhältnis von SP-C/SP-B in BAL nicht diagnostisch wegweisend für DPLD ist, da auch bei anderen Krankheitsentitäten, die keine alveoläre Pathologie aufweisen und insbesondere auch bei inflammatorischen Prozessen ebenfalls Werte unterhalb des Verhältnisses von 0,09 lagen.

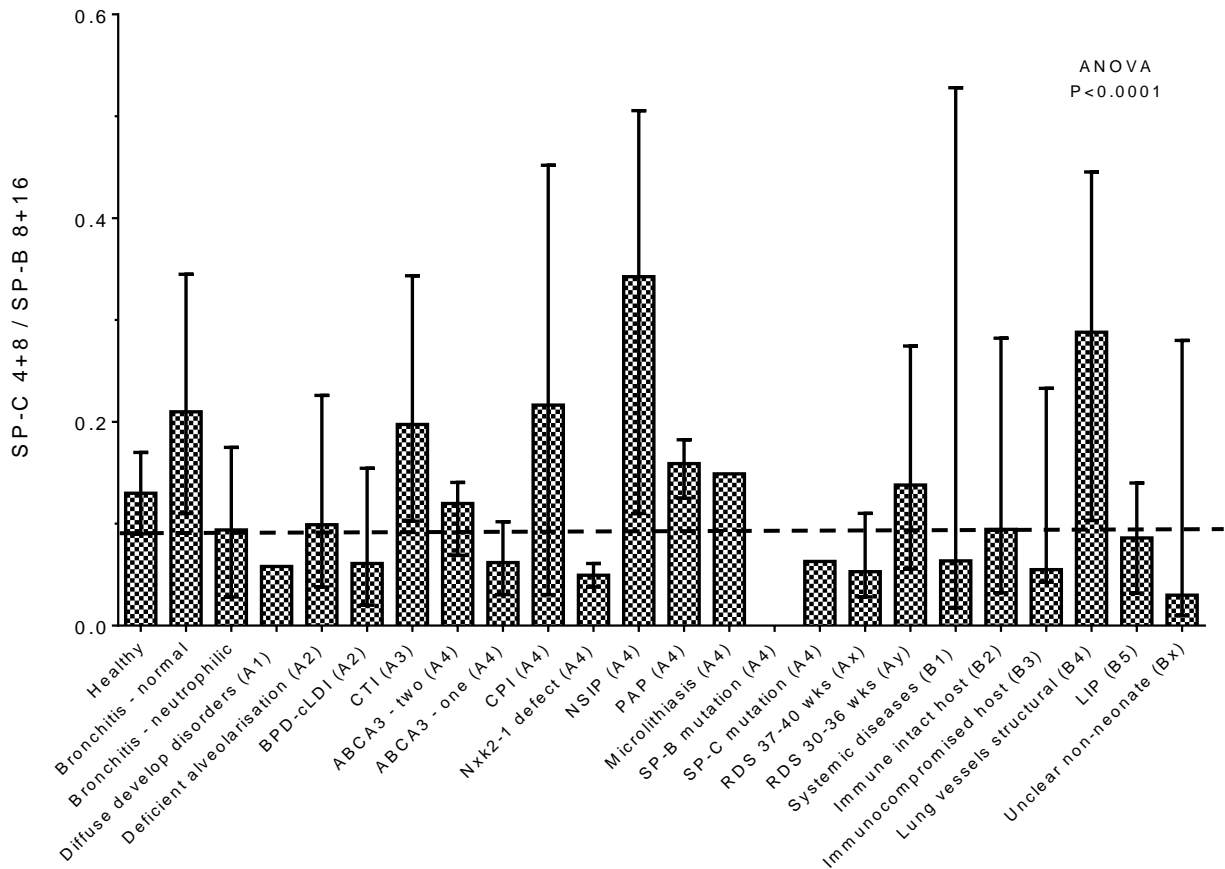


Abbildung 3.3.5-1: Verhältnis der SP-C-Konzentrationen bei 4 und 8 kDa zu den SP-B-Konzentrationen bei 8 und 16 kDa in BALF von Kindern aus den verschiedenen Subkategorien

Die Ergebnisse sind als Median und Interquartilen Range angegeben.

$p < 0,0001$ für Unterschiede über alle Subkategorien (overall ANOVA).

Es zeigten sich keine Unterschiede im Dunn's post hoc-Test im Vergleich zu den Lungengesunden. Die gestrichelte Linie innerhalb der Abbildung zeigt die erste Quartile des Verhältnisses bei der Subkategorie der Lungengesunden (0,09).

3.4. Genetische Analysen im Promotor von SFTPC

Das Kollektiv für die genetische Analyse der Promotorregion in SFTPC auf Single Nucleotid Polymorphismen, die mit niedrigen oder auch erhöhten SP-C-Konzentrationen

in BAL assoziiert sind, wurde wie in Abbildung 2.1 dargestellt, ausgewählt. Aus den Kontrollgruppen wurden alle Kinder eingeschlossen, bei denen verwertbare DNA-Proben zur Verfügung standen. Aus den Patientengruppen wurden diejenigen ausgeschlossen, bei denen:

- 1) eine genetische Mutation im Surfactantmetabolismus vorlag (SFTPb, SFTPc, ABCA3, Nkx2.1, CSFRA)
- 2) mit hoher Wahrscheinlichkeit, die Krankheitsentität die SP-C-Expression beeinflusst, d.h. alle Subkategorien „DPLD related to alveolar surfactant region“, (A4)
- 3) kein verwertbares DNA-Material zur Verfügung stand
- 4) die Fälle aus den B-Subkategorien (DPLD occurring in all age groups), aufgrund der sehr geringen Fallzahl und nicht zu erwartenden statistischen Aussagekraft.

Wie in der Abbildung 2.1 und der Tabelle 2.1-3 gezeigt, wurden so insgesamt 136 Fälle selektiert, davon 80 aus einer der Kontrollgruppen und 56 aus den Subkategorien A2, A3, Ax, Ay.

Aufgrund der geringen Anzahl an Fällen in den einzelnen Subkategorien erfolgte für die genetische Analyse die Zusammenfassung aller Kontroll-Subkategorien (healthy, bronchitis-normal, bronchitis-neutrophilic) in einer großen Kontrollgruppe (controls) und aller Patientensubkategorien in einer Patientengruppe (cases).

In Anlehnung an die Arbeit von Wambach et al. (136) wurden zielgerichtet die dort gefundenen SNP's, mit einer signifikanten Assoziation zu RDS, untersucht (rs8192335, rs8192337, rs8192321). Des Weiteren wurden jene SNP's, die mehr als einmal innerhalb der Kohorte bei der Promotorsequenzierung gefunden wurden, in die Analyse eingeschlossen. Tabelle 3.4-1 zeigt eine Auflistung dieser SNP's und deren Häufigkeitsverteilung im Vergleich zwischen Kontrollen und Fällen. In Tabelle 3.4-2 sind die rs-Nummern (siehe Legende) sowie die genauen Lokalisationen der SNP's im Promotor von SFTPc und auf Chromosom 8 aufgelistet. Für keinen der SNP's ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Kontrollen und Fälle), d.h. keiner der SNP's stellt eine Selektionshilfe bezüglich DPLD dar.

Table 3.4-1 Häufigkeitsverteilung der analysierten Single Nucleotid Polymorphismen

SNP / Genotyp	Kontrollen (%)	Patienten (%)	Total (%)	p-Wert
rs8192335				
GG	56 (100)	78 (97.5)	134 (98.5)	
GT	0 (0)	2 (2.5)	2 (1.5)	0.512
TT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
rs4995702				
AA	13 (23.2)	17 (24.6)	30 (24.0)	
AG	32 (57.1)	41 (59.4)	73 (58.4)	0.863
GG	11 (19.6)	11 (15.9)	22 (17.6)	
rs8192313				
TT	27 (48.2)	27 (39.1)	54 (43.2)	
TG	23 (41.1)	39 (56.5)	62 (49.6)	0.148
GG	6 (10.7)	3 (4.3)	9 (7.2)	
rs8192337				
GG	56 (100)	78 (97.5)	134 (98.5)	
GA	0 (0)	2 (2.5)	2 (1.5)	0.512
AA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
rs6557857				
GG	10 (17.9)	9 (12.9)	19 (15.1)	
GA	26 (46.4)	39 (55.7)	65 (51.6)	0.547
AA	20 (35.7)	22 (31.4)	42 (33.3)	
rs8192321				
AA	55 (98.2)	75 (93.8)	130 (95.6)	
AG	1 (1.8)	5 (6.2)	6 (4.4)	0.400
GG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
rs199880842				
-/-	50 (89.3)	60 (85.7)	110 (87.3)	
-/CAAAA	6 (10.7)	10 (14.3)	16 (12.7)	0.601
CAAAA/CAAAA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde für einen signifikanten Unterschied in der Häufigkeitsverteilung der Genotypen der unterschiedlichen SNP's angenommen (Fisher exact Test).

Tabelle 3.4-2 Lokalisation und rs-Code der untersuchten SNP's

Position in SFTPC Gensequenz	Position auf Chromosom 8	rs-Code*	Polymorphismus
3487	22017670	rs8192337	3487 G>A
2749	22016932	rs8192335	2749 G>T
3967	22018150	rs8192321	3697 A>G
2759	22016942	rs4995702	2759 A>G
2760	22016943	rs8192313	2760 T>G
3969	22018152	rs199880842	3969 Ins CAAAA
3739	22017922	rs6557857	3739 G>A

*rs-Code (reference SNP) ist eine Nummer, die für einen neu entdeckten SNP in der Single Nucleotid Polymorphism Database des National Center for Biotechnology Information (NCBI) vergeben wird und somit der wissenschaftlichen Welt zusammen mit weiteren Informationen zu Population, Häufigkeit, geno- und phänotypischen Details und Arbeitsmethoden zur Verfügung gestellt wird

In einem nächsten Schritt wurden die SNP's mit der Konzentration von SP-C bei 4 kDa korreliert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4-3 dargestellt. Nur für den SNP rs6557857 ergab sich ein signifikanter Unterschied in den SP-C Konzentrationen zwischen den Genotypen, sowohl bei der Patientengruppe alleine als auch bei Betrachtung des gesamten Kollektivs. In der Kontrollgruppe alleine ergab sich keine Signifikanz. Der Genotyp AA war mit den höchsten SP-C-Konzentrationen assoziiert, gefolgt von GA (67,8 ng/ml vs. 120 ng/ml vs. 218 ng/ml für den Genotyp GG, GA bzw. AA; $p = 0,03$). Bei den anderen SNP's konnte keine Assoziation zur Höhe der SP-C Konzentration in BAL nachgewiesen werden.

Table 3.4-3 Konzentration von SP-C 4 kDa in BAL von Patienten und Kontrollen für verschiedene Genotypen

SNP / Genotyp	Kontrollen	Patienten	Total
rs4995702			
AA	170.5 ± 146.3	135.7 ± 115.7	153.9 ± 130.7
AG	123.6 ± 112.3	219.9 ± 352.1	172.7 ± 265.3
GG	56.92 ± 47.21	62.23 ± 62.27	58.82 ± 50.71
P (ANOVA)	0.1268	0.3657	0.0523
rs8192313			
TT	143.2 ± 124.4	245.8 ± 390.9	188.2 ± 275.8
TG	111.9 ± 117.7	143.5 ± 174.4	128.5 ± 149.1
GG	57.57 ± 36.05	27.96 ± 8.168	44.88 ± 30.00
P (ANOVA)	0.3371	0.1337	0.0637
rs6557857			
GG	82.40 ± 75.83	38.52 ± 29.79	67.77 ± 66.09
GA	114.2 ± 107.5	125.3 ± 161.9	119.9 ± 136.5
AA	152.5 ± 141.7	288.1 ± 407.8	218.0 ± 304.5
P (ANOVA)	0.5321	0.0320	0.0309
rs199880842			
-/-	131.3 ± 119.4	181.2 ± 301.6	154.7 ± 223.8
-/CAAAA	33.81 ± 32.49	163.1 ± 162.3	88.67 ± 126.5
CAAAA/CAAAA	n.a.	n.a.	n.a.
P (Mann-Whitney)	0.0641	0.6977	0.1313

Die Werte sind in ng/ml und als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Es wurde ein p-Wert < 0,05 für signifikante Unterschiede in den SP-C Konzentrationen zwischen den Genotypen eines spezifischen SNP's angenommen.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die diagnostische Wertigkeit der Quantifizierung der hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C in BALF untersucht. Bei dem Kollektiv handelte es sich um eine relativ große und inhomogene Kohorte von DPLD-Patienten mit seltenen bis sehr seltenen Diagnosen. Innerhalb dieser Krankheitsbilder zeigte sich eine typische Altersverteilung und Mortalitätsrate sowie Häufigkeitsverteilung der einzelnen Krankheitsspektren. Die Heterogenität des Kollektivs war wichtig, um auch mögliche Unterschiede zwischen den einzelnen DPLD-Entitäten detektieren bzw. beurteilen zu können.

Von diagnostischer Bedeutung ist die biochemische Analyse der Surfactantproteine in BALF vor allem bei Verdacht auf SP-B-Defizienz, d.h. bei Neugeborenen mit unmittelbar bis wenige Stunden postpartalem Auftreten einer respiratorischen Insuffizienz. Obwohl in diesem Kollektiv nur ein Patient mit einer nachgewiesenen Mutation in SFTPB eingeschlossen werden konnte, untermauert dieser Fall den in der Literatur vielfach beschriebenen Befund einer vollständigen SP-B-Defizienz in BALF bei Mutationen in SFTPB. Dass dieser Befund zur Erhärtung der Diagnose „hereditäre Störung im Gen für SFTPB“ herangezogen werden kann, bestätigt die vorliegende Arbeit, da dies die einzige Diagnose einer DPLD mit vollständigem Fehlen von SP-B in den Molekulargewichtsbereichen von 8 kDa und 16 kDa darstellte.

Bei Betrachtung der relativen SP-B-Konzentrationen im Vergleich zur Gesamtproteinkonzentration zeigte sich für die Subkategorie der PAP-Patienten ein gegenüber allen anderen Subkategorien signifikant höheres Verhältnis, im Median von ca. 22,4 (siehe Tabelle 3.3.3-1). Ein annähernd so hohes Verhältnis fand sich nur noch bei zwei einzelnen Individuen aus der Subkategorie NSIP (36) und 2-ABCA3-Mutationen, wobei bei letzterem histologisch das Mischbild einer PAP/NSIP vorlag. Somit können Verhältnisse von SP-B/Gesamtprotein über 20 als Hinweis auf das Vorliegen einer PAP angesehen werden.

Für die SP-C-Konzentrationen in BALF zeigte sich hingegen kein so eindeutiges Bild, da bei vielen Krankheitsentitäten Individuen mit niedrigen bis fehlenden Konzentrationen an SP-C gefunden wurden. Eine mögliche Erklärung fand sich in einer erhöhten Zellzahl an neutrophilen Granulozyten in der Differentialzytologie der BAL-Proben als Surrogat für eine Inflammationsreaktion. Im Gegensatz dazu zeigten sich erhöhte Konzentrationen an SP-C in BALF als differentialdiagnostisch wertvoll, da sie nicht nur erwartungsgemäß bei PAP-Patienten und NSIP auftraten, sondern auch in der Subkategorie der chronischen Tachypnoe im Kleinkindalter (CTI) zu finden waren. Signifikant unterschiedlich war hier das Verhältnis aus SP-C bei 4 kDa und 8 kDa zur Gesamtproteinkonzentration gegenüber den Subkategorien mit neutrophiler Bronchitis, den Kindern mit Lungenschädigung durch Frühgeburt (BDP-cLDI), aber auch den Reifgeborenen mit unklarem Atemnotsyndrom (Ax). Da das Krankheitsbild der CTI im initialen Stadium klinisch nicht so einfach von Surfactantstörungen abzugrenzen ist, ergibt sich hier ein weiteres diagnostisches Werkzeug in Ergänzung zur Messung von KL-6 (43) vor der Durchführung einer invasiven Lungenbiopsie. Erwartungsgemäß ergab sich auch für die Subkategorie der PAP-Patienten ein signifikant höheres Verhältnis gegenüber den oben genannten Subkategorien.

Unter der Annahme, dass bei relativ stabilen Konzentrationen von SP-B innerhalb der Subkategorien das Verhältnis der beiden hydrophoben Surfactantproteine eine DPLD charakterisieren könnte, wurde das Verhältnis von SP-C/SP-B analysiert. Keiner der Medianwerte der einzelnen Subkategorien ergab einen signifikanten Unterschied zu der Gruppe der Lungengesunden, sodass sich hier kein zusätzlicher Nutzen für die Diagnostik bei DPLD findet.

In Anlehnung an die Ergebnisse von Wambach und Kollegen (136), die 2010 ihre ausführlichen Untersuchungen zu Single Nucleotid Polymorphismen im Gen für SFTPC veröffentlichten, wurde in vorliegender Arbeit an einem ausgewählten kleineren Kollektiv (wie in Kapitel 3.4 beschrieben) die Promotorregion von SFTPC auf SNP's hin untersucht, mit der Fragestellung nach Assoziation mit SP-C-Konzentrationen. Hierbei wurden die drei von Wambach und Mitarbeitern detektierten und in in-vitro-Untersuchungen mit

verminderter SFTPC-Transkription einhergehenden SNP's in die Analysen miteinbezogen mit dem Ziel der Überprüfung an einem unabhängigen Kollektiv.

Von den letztlich insgesamt sieben weiter untersuchten SNP's, die mehr als einmal im Kollektiv gefunden wurden, konnte einer signifikant mit SP-C-Leveln korreliert werden, sodass trotz der Notwendigkeit weiterer (in-vitro-)Untersuchungen die Hypothese der Beeinflussung von SP-C-Konzentrationen in vivo durch Promotorpolymorphismen in SFTPC untermauert werden konnte.

Die einzelnen Ergebnisse der biochemischen und genetischen Analysen werden in den nachfolgenden Kapiteln ausführlich diskutiert.

4.1. Kollektiv: Charakteristika und Diagnostik

Bei dem Kollektiv der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe von Neugeborenen und Kindern mit initialer Verdachtsdiagnose einer DPLD auf dem Boden einer chronischen pulmonalen Symptomatik. Diese Heterogenität ist bisher einzigartig und als Stärke der vorliegenden Arbeit zu werten, da bisherige Studien nur einzelne DPLD-Entitäten in Form von Einzelfällen oder Gruppen weniger Patienten gegenüber Kontrollgruppen untersuchten. Um ein solches Kollektiv untersuchen zu können, war eine langjährige zentrenübergreifende Zusammenarbeit und die Etablierung eines Netzwerkes wie das des Kinderlungenregisters notwendig, da chronische pädiatrische Erkrankungen im Allgemeinen und das Vorkommen der meisten DPLD-Entitäten im Speziellen zu den seltenen bis sehr seltenen Diagnosen gehört. So war es möglich, etwaige Variationen von Sufactantprotein B und C über das gesamte Krankheitsspektrum der DPLD zu untersuchen. Eine Limitation bleibt jedoch die weiterhin geringe Fallzahl in vielen Subkategorien, die eine statistische Unterpowering mit sich bringt. Auch bezüglich der genetischen Testungen wäre mehr Vollständigkeit wünschenswert gewesen, gerade in der Subkategorie der Patienten mit unklarem RDS. Um diese Limitationen in der Zukunft zu beseitigen ist es notwendig, noch mehr Fälle und Bio-Materialien nach standardisierten Methoden zu sammeln und zu bearbeiten.

Aufgrund der einheitlichen Durchführung aller für die vorliegende Arbeit notwendigen biochemischen Analysen der Surfactantproteine in einem Labor unter standardisierten Bedingungen, konnte die Variabilität des Testverfahrens niedrig gehalten werden. Andererseits erfolgte die Aufbereitung der BAL-Proben häufig noch in den zuweisenden Kliniken, sodass auf die Qualität der Aufbereitung kein Einfluss genommen werden konnte. Um diese Limitation im Voraus möglichst klein zu halten, wurden im Rahmen der Einschlusskriterien solche Proben ausgeschlossen, die bereits makroskopisch hämolytisches oder stark verunreinigtes Material enthielten (n = 11 von 321). Wie eingangs beschrieben wurden auch Patienten mit Surfactantgabe innerhalb von 14 Tagen vor BAL von den Analysen ausgeschlossen. Dies war bei 8 Patienten der Fall gewesen.

Auch die Verfügbarkeit der klinischen und diagnostischen Informationen war heterogen, was zum Teil die Eingruppierung der Patienten deutlich erschwerte. Bei einigen Kindern war es nicht möglich, Informationen zum Langzeitverlauf zu erhalten, sodass hier ein Restrisiko der Fehldiagnose und damit einer falschen Eingruppierung bestehen bleibt. Als Beispiel sei hier das im Alter von 5 Monaten verstorbene Reifgeborene aus der Kontrollgruppe mit bronchialer Pathologie angeführt. Die Diagnosen Bronchiolitis, ciliäre Dyskinesie und Immundefekt wurden gestellt, eine postmortem Untersuchung des Lungengewebes zum sicheren Ausschluss einer DPLD war jedoch von den Eltern abgelehnt worden, was aus rein wissenschaftlicher Sicht unbefriedigend ist. Um dem Sachverhalt der falschen Eingruppierung entgegenzuwirken wurden die Subkategorien Ay, Ax und Bx etabliert, die einer (noch) unklaren Ursache der pulmonalen Symptomatik in verschiedenen Altersgruppen Rechnung tragen. Umgekehrt lassen sich gerade für die Subkategorien Ax, Ay, und A3 differentialdiagnostisch folgende mögliche Confounder diskutieren, die durch unzureichende Information oder Diagnostik nicht aufgedeckt wurden: pulmonale Infektionen, Langzeitbeatmung, aber auch ABCA3-Mutationen. Gerade in den Subkategorien mit noch unklarer Ursache ist also die klare Empfehlung, so lange weitere Diagnostik und klinische Beobachtung durchzuführen, bis eine definitive Diagnose gestellt werden kann. Denkbar sind hier auch Screeningprojekte wie Exom-Sequenzierung oder Biomarker-Identifikation (56)

Eine weitere formale Limitation stellt die Eingruppierung von 4 Kindern in eine der DPLD-Subkategorien dar, deren Alter bei Erkrankungsbeginn > 2 Jahren lag. Sowohl Deutsch et al. (38) als auch die American Thoracic Society (86) haben in ihrer Klassifikation für die A-Kategorien ein Alter für den Erkrankungsbeginn innerhalb der ersten beiden Lebensjahre definiert. Alle vier Kinder waren in die Subkategorie A4 (related to alveolar surfactant region) eingruppiert worden. Hier bleibt das Risiko einer Fehlkategorisierung entweder aufgrund mangelnder klinischer Informationen zum Verlauf in den ersten beiden Lebensjahren oder aufgrund unvollständiger Diagnostik bzw. zu kurzer Follow up-Dauer.

Viele der weiteren Charakteristika stimmen gut mit der vorhandenen Literatur überein (55), so zum Beispiel die hohe Mortalitätsrate von ca. 20% und auch die Tatsache, dass in der Subkategorie der CTI kein Patient verstorben ist (90).

Der hohe Prozentsatz an neonatalem Sauerstoffbedarf (50%) und der Notwendigkeit einer maschinellen Beatmung (45%) kann als Surrogat für die Erkrankungsschwere in diesem Kollektiv angesehen werden. Etwa die Hälfte der Patienten (47%), die Sauerstoff benötigten, waren Frühgeborene aus unterschiedlichen Subkategorien (siehe Tabelle 3.2-2, Kapitel Patientencharakteristika).

Was die diagnostischen Maßnahmen betrifft, so ist im Falle der bildgebenden Methoden die Röntgen-Thorax-Untersuchung die primäre Standarduntersuchung. Obwohl nicht bei allen Kindern Informationen zu deren Durchführung oder Befund vorlagen, ist sehr wahrscheinlich bei 100% der Kinder aus den Patientengruppen ein Röntgen-Thorax durchgeführt worden (siehe Kapitel 3.2, Tabelle 3.2-2). Die Rate an CT-Bildgebung lag mit 70-73% im erwarteten Bereich, da sich trotz der Strahlenbelastung und des Aufwandes der Untersuchung bei entsprechender Erkrankungsschwere ein deutlicher Nutzen-Risiko-Vorteil ergibt. Auch die „clinical practice guideline“ der American Thoracic Society aus 2013 befürwortet klar den Einsatz einer CT-Diagnostik, im Speziellen des HR-CT-Verfahrens.

Die Rate an Lungenbiopsien ist mit ca. 27% als eher gering einzustufen. Dies ist vor allem dem jungen Alter und einer möglichen assoziierten klinischen Verschlechterung bei limitierten neuen Therapieoptionen geschuldet.

4.2. Differentialzytologie aus BAL

Die differentialzytologische Begutachtung von BAL war in zweierlei Hinsicht für die vorliegende Arbeit von Bedeutung: zum einen war sie Grundlage für die Einteilung der Kontrollgruppen mit bronchialer Pathologie in solche mit akuter inflammatorischer Reaktion und solche ohne. Zum anderen wurde der Fragestellung nachgegangen, ob eine (akute) inflammatorische Reaktion einen Einfluss auf die Konzentration der hydrophoben Surfactantproteine und der Zusammensetzung von BALF im Allgemeinen haben könnte. Hierfür wiederum wurden nicht nur die SP-C-Level über alle Subkategorien hinweg mit dem relativen Anteil an neutrophilen Granulozyten in der Differentialzytologie korreliert, sondern auch die Kontrollgruppen „Bronchitis-normal“ und „Bronchitis-neutrophilic“ miteinander verglichen mit der Frage, ob eine inflammatorische Reaktion auch ohne Beteiligung des Alveolarraumes sich auf die Surfactantzusammensetzung auswirkt.

Zwar zeigte sich beim Vergleich der beiden Bronchitissubkategorien bezüglich der SP-C-Werte kein eindeutiger signifikanter Unterschied, jedoch ergab sich ein grenzwertiger Befund für das Verhältnis von SP-C bei 4 + 8 kDa zur Gesamtproteinkonzentration mit einem p-Wert von genau 0,05 (Verhältnis Bronchitis-neutrophilic 0,27, Bronchitis-normal 1,31) sowie eine schwache negative Korrelation innerhalb der Subkategorie „Bronchitis-neutrophilic“ zwischen SP-C-Konzentrationen und dem Prozentsatz an neutrophilen Granulozyten in BALF ($p = 0.07$, $r = 0.30$, $n = 36$). Beide Ergebnisse untermauern die Hypothese einer inflammatorischen Downregulation der SP-C-Synthese in einem akuten Stadium. Diese Ergebnisse sind insoweit erstaunlich als dass ein solcher Effekt sich nicht bei Patienten mit zystischer Fibrose (CF) und pulmonaler Inflammation zeigen ließ (53). Mögliche Erklärungen hierfür könnten eine kompensatorische erneute Upregulation bei CF-Patienten mit lebenslanger neutrophiler Entzündungsreaktion sein (125) oder aber die von der Lokalisation her mehr in Bronchiektasen vorkommende kompartimentierte Inflammation mit Schutz des Alveolarraumes vor proteolytischer Schädigung (54)

und/oder unterschiedliche Sekretionsmuster an Cyto- und Chemokinen oder anderen Faktoren.

Eine Schwäche bezüglich der differentialzytologischen Befunde dieses Patientenkollektivs ist die dezentrale Befunderhebung sowie die uneinheitliche Aufbereitung der BAL-Proben in verschiedenen Zentren, von denen das Material an unser Labor gesendet wurde. Ob die BALF filtriert oder unfiltriert analysiert wird, hat einen Einfluss auf die Anzahl an Lymphozyten und Makrophagen, wohl jedoch nicht auf den Neutrophilenanteil, wie Milman et al. 1993 zeigten (93). Weitere Untersuchungen konnten einen Effekt durch die Zentrifugationsstärke und -dauer von BALF auf die Zellzusammensetzung nachweisen (32) und da es sich um relative Werte (Prozentangaben) handelt, ist auch die Menge an ausgezählten Zellen entscheidend für das Ergebnis. Empfohlene Mengen variieren in der Literatur zwischen 200 bis 600 Zellen, was ebenfalls zu variierenden Ergebnissen führen kann. Letztlich bleibt auch durch unvollständige Durchführung bzw. Angabe einer Differentialzytoloige im Gesamtkollektiv eine Ungenauigkeit bestehen. Zum Teil wurde die Untersuchung in externen Labors nicht durchgeführt, zum Teil waren zu wenige Zellen für eine Auszählung vorhanden oder das Präparat nicht analysierbar (z.B. stark verschleimt). Bei vereinzelt Proben handelte es sich nur um Trachealsekret, aus welchem die Diagnostik nicht möglich war. Da gerade bei der Einteilung der Kontrollgruppen mit bronchialer Pathologie auch die klinischen Informationen herangezogen wurden, konnte dadurch diese Schwäche teilweise kompensiert werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit untermauern die Wichtigkeit der differentialzytologischen Aufbereitung von BALF im Hinblick auf die Interpretation von Proteinen, hier SP-C-Konzentrationen, um mögliche Einflussnahmen durch proteolytische Vorgänge abzuschätzen.

4.3. Biochemische Analysen aus BAL

Die Methodik der Surfactantproteinanalyse aus bronchoalveolärer Lavage ist eine seit 2005 in unserem Labor gut etablierte und auch in der klinischen Routine angewandte Methodik. Eine Stärke der vorliegenden Arbeit ist die einheitliche, nach Protokoll durchgeführte Analyse der Surfactantproteine B und C sowie der Gesamteinkonzentration, die eine stabile Vergleichbarkeit der Ergebnisse über alle Subkategorien liefert.

Limitierend ist die Abhängigkeit von auswärtigen Laboren was die Qualität und Aufarbeitung der Bio-Materialien angeht. Dies reicht von der Anzahl der gewonnenen Fraktionen bei der Lavage über den Zeitpunkt der BAL-Weiterverarbeitung (Zentrifugation, Aliquotierung) bis hin zu sachgemäßem Transport und Lagerung. Bei der Auswahl der Patientenproben wurde somit ein besonderes Augenmerk auf die Qualität der Proben gelegt, bei trotzdem restriktivem Ausschluss auf dem Boden der ohnehin geringen Fallzahlen der „orphan diseases“.

Bei der Aufbereitung der BAL-Proben für die Westernblotanalysen, fanden sich nach Zugabe der Pufferlösungen vereinzelt Rückstände in den Eppendorfgefäßen (siehe Kapitel 2.4), welche auf auskristallisierte Puffersalze zurückzuführen sind. Dass hier jedoch auch Proteinreste gebunden bleiben, ist nicht auszuschließen und könnte zur Verfälschung von Ergebnissen geführt haben.

Bei den verwendeten Antikörpern für die Detektion von SP-B und SP-C in den Westernblotanalysen ist bekannt, dass diese auch Pro-Formen erkennen, was zu aberranten Banden in der Regel in höheren Molekulargewichtsbereichen führen kann. Hier muss ebenfalls beachtet werden, dass es zu Überlappungen und somit falsch hohen Messungen gekommen sein könnte. Auch ist an Verfälschungen durch proteolytische Proteinfragmente oder Verschiebungen von Banden mit der Konsequenz falsch erhobener Molekulargewichtsbereiche zu denken.

Trotz dieser Limitationen ergab sich in Stichproben insgesamt eine gute Reproduzierbarkeit der biochemischen Messungen, wie folgende Tabelle zeigt.

Tabelle 4.3-1: Reproduzierbarkeit der quantitativen SP-C-Bestimmungen aus BAL

Patient ID	SP-C 1 (ng/ml)	SP-C 2 (ng/ml)	SP-C 3 (ng/ml)	Gesamtprotein (mg/dl)
434	14,49	14,01		93,67
1277	75,57	132,68		226,25
1498	5,76	4,4		65,68
359	88,23	62,26	126,51	102,62
704	5,4	13,96		199,64
672	184,56	189,49		107,8
671	21,5	29,21		31,65
1207	0	3,22		231,09
1175	248,22	73,03		46,68
1396	311,62	228,6		60,31
1860	210,51	261,98		29,19
362	580,41	214,85	298,52	87,37

4.3.1. Gesamtproteinkonzentration

Die Gesamtproteinkonzentration in BALF besteht nicht nur aus den Surfactantproteinen, sondern, wie im Kapitel 1.3 Einleitung bereits beschrieben, aus einerseits Plasmaproteinen, hier vornehmlich Albumin, aber auch Proteasen, Chemo- und Zytokinen und Immunglobulinen sowohl aus Plasma als auch aus dem Alveolarepithel.

In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine inflammatorische Situation pulmonal zu einer Erhöhung der Gesamtproteinkonzentration in BALF führt. Ursache hierfür ist der vermehrte Einstrom von Immunzellen und deren sezernierten Proteinen. Durch die Inflammation kommt es gleichzeitig zu einer Permeabilitätsstörung, die auch vermehrt Plasmaproteine in den Alveolarraum durchlässt (141).

Dieser Effekt konnte in den Subkategorien „Bronchitis – neutrophilic“, BPD-cLDI (Frühgeborene) und Immunsupprimierte gesehen werden. Des Weiteren auch in der Gruppe der PAP-Patienten, bei denen die Erhöhung der Gesamtproteinkonzentration auf die massive Erhöhung der Surfactantproteine zurückzuführen ist. Dies spiegelt sich wiederum im Ergebnis wider, dass die Subkategorie PAP die einzige ist, bei der das Verhältnis von SP-B zur Gesamtproteinkonzentration zu allen anderen Subkategorien signifikant erhöht ist.

Eine ebenfalls sehr hohe Gesamtproteinkonzentration fand sich in der Subkategorie der „diffuse developmental disorders“ (A1). In dieser Gruppe war letztlich nur das Material von 2 Patienten verwertbar. Anzumerken ist, dass es sich bei dem Material für die biochemischen Analysen nur um tiefes Trachealsekret handelte und eine Differentialzytologie daraus nicht sinnvoll und möglich war. Allein die Tatsache, dass sich im Trachealsekret immer vermehrter Zelldetritus und Proteine befinden, ist eine mögliche Erklärung für die hohen Proteinkonzentrationen. Bei beiden Patienten lag jedoch klinisch auch eine schwere pulmonale Infektion vor (siehe Tabelle 4.2-1). SP-C war bei beiden relativ zur Gesamtproteinkonzentration gesehen deutlich erniedrigt, die Konzentration an SP-B erhöht, sodass auch diese beiden Patienten die Hypothese der inflammationsbedingten SP-C-Erniedrigung und Erhöhung der Gesamtproteinkonzentration bestätigen.

Tabelle 4.3.1-1: Patienten der Subkategorie „diffuse developmental disorders“

Parameter	ID 742	ID 1178
Symptome	12. Lebenstag Tachypnoe, Zyanose, respiratorische Insuffizienz, mechanische Beatmung FiO ₂ 1,0	2. Lebenstag Dyspnoe, respiratorische Insuffizienz, mechanische Beatmung
Alter bei BAL (Jahre)	0,05	0,06
pulmonale Befunde	interstitielle Zeichnungsvermehrung im CT	konnatale Pneumonie, Pneumothorax, PHT
Diagnose	Alveolokapilläre Dysplasie, Arterio-venöse Malformationen	Alveolokapilläre Dysplasie
Langzeit-Verlauf	seit 29. Lebenstag Symptomfreiheit, Normalisierung pulmonalarterieller Druck	verstorben mit 35 Lebentagen
Gesamtprotein (mg/ml)	2123,00	474,70
SP-B 8+16kDa (ng/ml)	5438,10	1374,90
SP-C 4+8kDa (ng/ml)	316,7	0,00
SP-C/Gesamtprotein	0,15	0,00
SP-B/Gesamtprotein	2,56	2,90

PHT = pulmonale Hypertonie

4.3.2. SP-B-Konzentrationen in BAL

Surfactantprotein B konnte als Dimer bei einem Molekulargewicht von 16kDa bei allen Patienten in allen Subkategorien eindeutig identifiziert werden, außer bei dem einen Fall mit einer 121ins2-Mutation in SFTPB. Hier konnte SP-B weder als Mono- noch als Dimer nachgewiesen werden. Zusammen mit den Fallberichten aus der Literatur (96; 128; 130;

8; 44; 111) und den Erkenntnissen aus Tiermodellen mit Knock-out-Mäusen, bestätigt dieses Ergebnis, wenn auch nur anhand eines Falles, die diagnostische Wertigkeit einer biochemischen Analyse von BALF bei Verdacht auf hereditäre Störung im Surfactantprotein B-Metabolismus. Gerade deshalb ist von großer Wichtigkeit, eine bronchoalveoläre Lavage vor einer exogenen Surfactantapplikation durchzuführen, da letzterer in der Regel sowohl SP-B als auch SP-C enthält und die Halbwertszeiten sehr lang sein können (51; 115). Bei auffälligem Ergebnis muss für die genaue Diagnose eine genetische Testung angeschlossen werden.

Eine stark erhöhte SP-B-Konzentration bei 16 kDa oder in Summe von 8 + 16 kDa ist nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit hinweisend für eine PAP. Da aber auch in der Subkategorie der 2-ABCA3-Mutationen deutlich erhöhte SP-B-Konzentrationen gemessen wurden, sind in diesen Fällen eine Lungenbiopsie und vor allem auch eine genetische Diagnostik zur weiteren Evaluation sinnvoll. Letztere sollte neben der Analyse des ABCA3-Gens je nach Befund der Lungenbiopsie zur Klärung einer genetischen Ursache einer PAP auch die CSF2RA und –B-Gene untersuchen.

In diesem Kollektiv scheint es, dass bei erhöhter SP-B-Konzentration eine Differenzierung zwischen PAP und zwei gleichzeitig bestehenden ABCA-3-Mutationen durch die Verhältnisbildung von SP-B/Gesamtproteinkonzentration rein auf biochemischer Ebene wegweisend sein könnte. Da die einzelnen Subkategorien allerdings klein sind, sind hier weitere Untersuchungen an einem größeren Kollektiv wünschenswert, um gegebenenfalls einen Grenzwert für die biochemische Diagnose einer PAP festlegen zu können.

4.3.3. SP-C-Konzentrationen in BAL

Die in der vorliegenden Arbeit detektierten SP-C-Konzentrationen zeigten überraschenderweise eine große Bandbreite. Anders als bei den SP-B-Konzentrationen fanden sich niedrige Konzentrationen oder vollständiges Fehlen von SP-C in BALF in fast allen Subkategorien – erwartungsgemäß in den Subkategorien mit Störungen in der

alveolären Surfactantregion, aber eben auch in vielen anderen (siehe Tabelle 3.3.4-1). Als weitere mögliche Ursache außerhalb einer primären Surfactantstörung wurde auf das Vorliegen einer Inflammationsreaktion zum Zeitpunkt der BAL-Entnahme hin untersucht. Diese Hypothese unterstützende Ergebnisse sind einerseits eine schwache, jedoch nicht signifikante, negative Korrelation ($r = 0,3$, $p = 0,07$) zwischen der SP-C-Konzentrationen und der Anzahl der neutrophilen Granulozyten innerhalb der Subkategorie „Bronchitis – neutrophil“. Zum anderen zeigte sich ein grenzwertig signifikanter Unterschied ($p = 0,05$) in den beiden Subkategorien „Bronchitis – normal“ und „Bronchitis – neutrophil“ bezüglich des Verhältnisses SP-C-Konzentration bei 4 + 8 kDa zur Gesamtproteinkonzentration. Die alleinige Betrachtung der medianen SP-C-Konzentrationen in diesen Subkategorien war nicht signifikant unterschiedlich. Aus allen verfügbaren Patientendaten mit Differentialzytologie zeigte sich zwar keine signifikante negative Korrelation zu den SP-C-Konzentrationen, die Werte der Patienten mit schwerer und sehr schwerer neutrophiler Inflammationsreaktion (PMN 25 – 74% und $\geq 75\%$) unterschieden sich jedoch signifikant zu denen mit normwertigen Neutrophilen (PMN $<10\%$), was den Einfluss einer neutrophilen Inflammationsreaktion auf die SP-C-Konzentration untermauert.

Vorherige Studien konnten den Zusammenhang zwischen Inflammation und SP-C-Konzentration in BALF bei Patienten mit zystischer Fibrose nicht feststellen (53). Dies könnte zum einen an der lokaliserteren, kompartimentieren Verteilung der Inflammation bei zystischer Fibrose im Gegensatz zu bronchitischen Pathologien liegen, was eine inflammationsbedingte proteolytische Schädigung des Alveolarraums verhindert (54). Zum anderen ist denkbar, dass durch die lebenslange Inflammationsreaktion bei zystischer Fibrose eine kompensatorische Hochregulation von SP-C stattfindet (125) und letztlich kommen unterschiedliche Muster an Cytokinfreisetzung und anderer Faktoren in Frage. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit machen die Wichtigkeit einer Differentialzytologie, im Speziellen die Bestimmung der Anzahl an neutrophilen Granulozyten deutlich, um eine Fehlinterpretation von niedrigen oder fehlenden SP-C-Werten zu vermeiden.

Von Bedeutung sind auch die erhöhten SP-C-Konzentrationen, die nicht nur erwartungsgemäß bei PAP-Patienten detektiert wurden, sondern auch in den

Subkategorien mit strukturellen Lungengefäßveränderungen, NSIP und CTI. Gerade bei letzterer Subkategorie könnte somit eine biochemische SP-C-Diagnostik aus BALF hilfreich in der Differentialdiagnose zu Erkrankungen der alveolären Surfactantregion sein und eine serologische Messung von KL-6 vor einer Lungenbiopsie ergänzen (43). Ob dieses Ergebnis sich als robust erweist und welche Ursachen dahinterstehen muss an unabhängigen Kollektiven in weiteren Studien untersucht werden.

4.4. Genetische Analysen im Promotor von SFTPC

Nach Sequenzierung der Promotorregion in SFTPC im zuvor beschriebenen Kollektiv fanden sich insgesamt 7 SNP's, die häufiger als einmal auftraten und deshalb in die weitere Korrelationsanalyse mit den SP-C-Konzentrationen aus BALF eingingen.

Die von Wambach und Kollegen gefundenen SNP's, die in ihrer ersten Analyse statistisch mit RDS bei Neugeborenen assoziiert und in in-vitro-Untersuchungen durch verminderte Transkriptionsaktivität bestätigt werden konnten, fanden sich in diesem Kollektiv in der Patientengruppe ebenfalls numerisch überrepräsentiert, allerdings vielleicht aufgrund der relativ geringen Fallzahl war der Unterschied nicht statistisch signifikant.

Die Tabelle 4.6-1 zeigt die Häufigkeiten der drei SNP's in den Patienten- und Kontrollgruppen. Die Häufigkeitsverteilung entspricht der von Wambach und Kollegen an ihrem Kollektiv erhobenen.

Tabelle 4.6-1: Promotor-SNP's in SFTPC mit Assoziation zu RDS bei Kindern*

SNP / Genotyp	Kontrollen (%)	Patienten (%)	Total (%)	p
rs8192335				
GG	56 (100)	78 (97.5)	134 (98.5)	
GT	0 (0)	2 (2.5)	2 (1.5)	0.512
TT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
rs8192321				
AA	55 (98.2)	75 (93.8)	130 (95.6)	
AG	1[#] (1.8)	5 (6.2)	6 (4.4)	0.400
GG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
rs8192337				
GG	56 (100)	78 (97.5)	134 (98.5)	
GA	0 (0)	2 (2.5)	2 (1.5)	0.512
AA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

*untersuchte SNP's von Wambach et al. 2010; # Patienten ID 712

Bei dem Kontrollpatienten mit Promotorpolymorphismus an der Stelle SFTPC3967 (rs8192321) handelt es sich um ein Mädchen aus der Kontrollgruppe, welches aufgrund von Tachypnoe im Alter von 6 Monaten auffällig wurde und im Zeitraum des verfügbaren Follow up die Diagnose einer postinfektiösen Bronchiolitis obliterans mit chronischer Tachypnoe, Gedeihstörung und initial begleitender Tracheomalazie gestellt. Weitere Diagnostik im Sinne von CT, Lungenbiopsie oder genetischer Untersuchungen waren aufgrund der sich im Verlauf bessernden Symptomatik unter inhalativer und Sauerstofftherapie nicht notwendig. Bildgebende Verlaufskontrollen mittels Röntgen-Thorax zeigten rückläufige Befunde bis zu einem Alter von 2,5 Jahren. Ob der Promotorpolymorphismus eine Suszeptibilität für die Schwere des Krankheitsverlaufes darstellt, bleibt aktuell eine Vermutung.

Der einzige Promotorpolymorphismus, der mit SP-C-Leveln assoziiert werden konnte, ist der Basenaustausch an Stelle SFTPC3739 (rs6557857). Es zeigten sich erniedrigte SP-C-Konzentrationen für das G-Allel, sowohl in homozygoter als auch in heterozygoter Ausprägung im Vergleich zu homozygoten Trägern des A-Allels. In diesem Kollektiv lag das Vorhandensein des G-Allels bei 40,9% und deckt sich mit der Häufigkeit für die europäische Population laut des „1000 genomes project“ (39,6%). Der Mechanismus, der von diesem Promotorpolymorphismus ausgehend zu einer Beeinflussung der SP-C-Konzentration führt, ist unklar. Wahrscheinlich ist eine Beeinflussung der Transkriptionsaktivität. Hierfür werden jedoch weitere in-vitro-Untersuchungen benötigt werden, um dieser Fragestellung auf den Grund zu gehen. Dieses Ergebnis zeigt, dass Promotorpolymorphismen in SFTPC in vivo einen Einfluss auf die SP-C-Konzentration in BALF haben können und dass auch derartige genetische Veränderungen bei Fällen mit SP-C-Defizienz nach Ausschluss anderer bekannter Ursachen (SP-C-, SP-B-, ABCA3-TTF1-Mutation) in Betracht gezogen werden sollten.

5. Zusammenfassung

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, die Aussagekraft einer Quantifizierung der Surfactantproteine B und C in bronchoalveolärer Lavage für die Diagnose einer frühkindlichen interstitiellen Lungenerkrankung (DPLD) zu evaluieren.

Voraussetzung für eine aussagekräftige Quantifizierung ist eine zuverlässige und gut etablierte Untersuchungsmethode. In der vorliegenden Arbeit wurde für alle BAL-Proben die seit 2005 etablierte Methode des quantitativen Western-Blottings verwendet. Die Proteinbestimmung bei definierten Molekulargewichtsgrößen zeigte eine gute Sensitivität und Spezifität über einen großen Konzentrationsbereich. In Stichprobenanalysen konnte eine hohe Reproduzierbarkeit gezeigt werden.

Zusammenfassend kann eine quantitative Bestimmung der Surfactantproteine B und C in BALF folgende diagnostische Hinweise liefern: eine SP-B-Defizienz auf dem Boden einer genetischen Störung kann bei Vorhandensein von SP-B in BALF ausgeschlossen werden. Für die endgültige Diagnose bei vollständigem Fehlen von SP-B bedarf es jedoch einer Sequenzierung von SFTPb. Sehr hohe Konzentrationen von SP-B und Gesamtprotein in BALF mit einem Verhältnis von SP-B/Gesamtprotein > 20 weisen auf eine PAP hin. Auch hier bedarf es zur Diagnose und Klärung der genauen Ursache weiterer Untersuchungen, welche im Bezug auf primäre Störungen eine Antikörpertestung auf Autoantikörper gegen GM-CSF und Sequenzierung von Genen des Surfactantmetabolismus beinhalten (SFTPb, SFTPc, ABCA3, CSF2RA, CSF2RB, Nkx2.1). Eine SP-C-Defizienz in BAL ist nicht ausschließlich diagnostisch wegweisend für eine genetische Störung in SFTPc, sondern auch bei Mutationen in ABCA3 und Nkx2.1 möglich. Des Weiteren scheinen gerade bei der Analyse von SP-C in BALF proteolytische Prozesse im Rahmen neutrophiler Inflammationsreaktionen einen Einfluss auf die SP-C-Konzentration zu haben. Bei der Analyse von Surfactantproteinen in BALF sollte daher eine Differentialzytologie Standard sein, um mögliche Einflussnahmen durch proteolytische Vorgänge bei Inflammationsprozessen abschätzen zu können.

Die vorliegende Arbeit liefert zudem Hinweise auf den Einfluss von SP-C-Promotor-Polymorphismen auf die Konzentration von SP-C im Alveolarraum.

Trotz dass die vorliegende Arbeit die bisher größte Kohorte pädiatrischer DPLD-Patienten untersucht hat, ergibt sich durch die nach wie vor relativ geringe Fallzahl in den zum Teil extrem seltenen Subkategorien eine limitierte Power, sodass Unterschiede zwischen den einzelnen Subkategorien statistisch nicht hinreichend beurteilt werden konnten. Des Weiteren wäre eine vollständigere genetische Testung, gerade in der Subkategorie „unclear RDS“ für eine eindeutige Kategorisierung wünschenswert gewesen. Um diesen Limitationen zu begegnen, sind in Zukunft eine weitere konsequente und standardisierte Sammlung von DPLD-Verdachtsfällen und deren systematische diagnostische Aufarbeitung notwendig. Ein mögliches diagnostisches Stufenschema, welches sich im Laufe dieser Arbeit entwickelte, zeigt Abbildung 5-1.

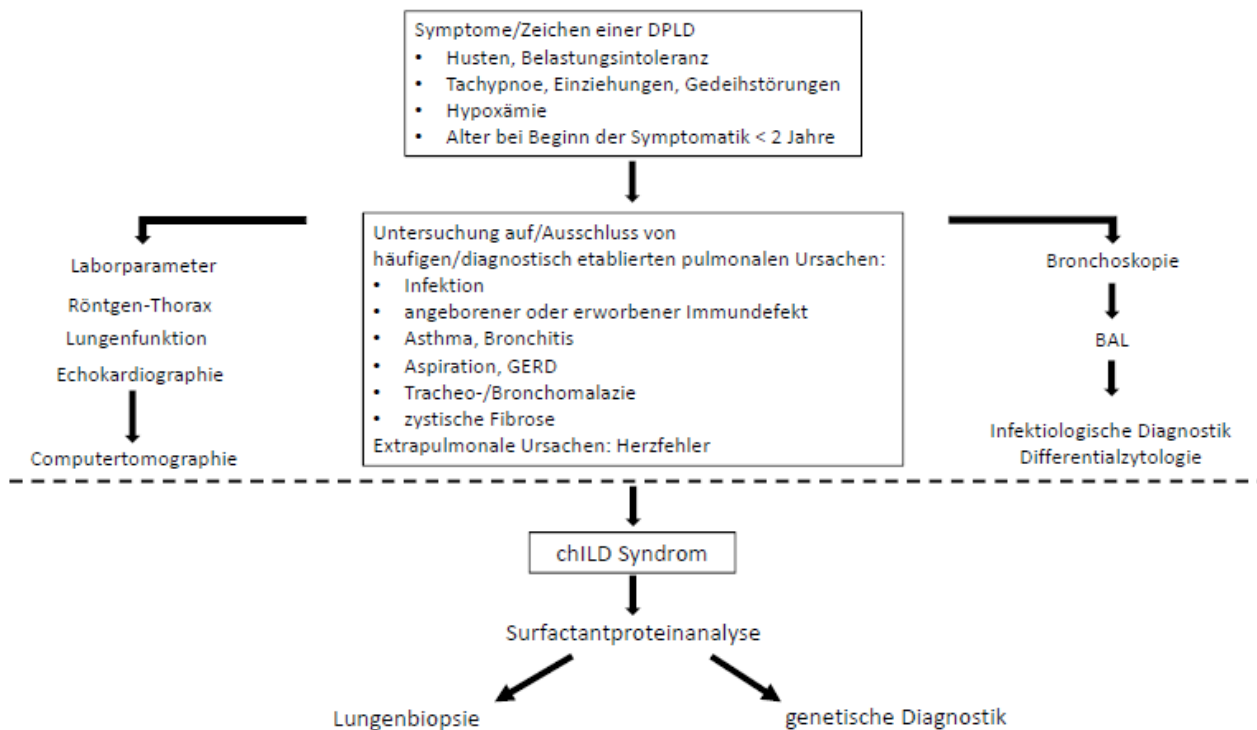


Abbildung 5-1: Diagnostisches Stufenschema bei V.a. DPLD im Kindesalter

6. Anhang

6.1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 6.1-1: Charakteristika der einzelnen Individuen aus den Kontrollgruppen

ID	sex	age at BAL [yrs]	patient category	reason for BAL/diagnosis	patient dead	PMN [%]	Lung disease outcome
196	male	10,79	Healthy	tonsillectomia	no	1,00	Healthy
169	male	8,71	Healthy	protruding ear	no	3,00	Healthy
142	male	4,84	Healthy	adeno- and tonsillectomia	no	1,00	Healthy
164	male	9,18	Healthy	adenotomy due to chronic maxillary and sphenoidal sinusitis	no	1,00	Healthy
1835	female	11,58	Healthy	bronchial hyperreactivity, most probable due to adipositas	no	1,00	Healthy
1971	male	26,55	Healthy	healthy volunteer	no		Healthy
1972	male	24,23	Healthy	healthy volunteer	no		Healthy
1973	male	22,62	Healthy	healthy volunteer	no		Healthy
1974	male	23,08	Healthy	healthy volunteer	no		Healthy
1975	male	23,99	Healthy	healthy volunteer	no		Healthy
1976	male	25,62	Healthy	healthy volunteer	no		Healthy
1977	male	24,79	Healthy	healthy volunteer	no		Healthy
1978	male	14,55	Healthy	healthy volunteer	no		Healthy
167	female	7,60	Healthy	tonsilectomy due to recurrent tonsilitis	no	3,00	Healthy

ID	sex	age at BAL [yrs]	patient category	reason for BAL/diagnosis	patient dead	PMN [%]	Lung disease outcome
178	female	6,51	Healthy	tonsilectomy due to chronic tonsillitis with hyperplasia of tonsils	no	0,00	Healthy
180	female	4,78	Healthy	tonsilectomy due to recurrent tonsillitis	no	4,00	Healthy
190	female	4,67	Healthy	Tonsillectomia	no	2,00	Healthy
182	male	9,04	Healthy	vocal cord dysfunction,mild asthma	no	0,00	Healthy
1970	male	26,89	Healthy	healthy volunteer	no		Healthy
414	male	8,97	bronchitis - normal	adenovirus infection	no		sick-same
362	male	16,21	bronchitis - normal	Asthma bronchiale	no		sick-same
1175	female	10,27	bronchitis - normal	recurrent pneumonias on lack of IgG subclass 1, laryngomalacia	no	4,20	sick-same
1702	male	17,95	bronchitis - normal	unspecified cough	no	0,20	sick-same
380	male	6,85	bronchitis - normal	cough attack resistant to therapy; oral malodor	no	4,00	sick-same
383	male	9,25	bronchitis - normal	bronchial hyperreactivity	no	10,00	sick-same
357	male	3,39	bronchitis - normal	chronic cough on exertion	no	11,00	sick-same
658	male	8,61	bronchitis - normal	Intrinsic asthma bronchiale; GER; M. Meulengracht, oro-pharyngo-laryngeale candidiasis	no	0,20	sick-better
379	male	0,95	bronchitis - normal	obstructiv, early childhood asthma, persiting atelectasis right upper lobe, pharyngeale soor	no	3,50	sick-better

ID	sex	age at BAL [yrs]	patient category	reason for BAL/diagnosis	patient dead	PMN [%]	Lung disease outcome
420	male	4,11	bronchitis - normal	recurrent bronchitis, asthma	no	1,40	sick-better
1117	female	5,10	bronchitis - normal	recurrent bronchitis, no activity on BAL	no	3,00	sick-better
1330	male	5,73	bronchitis - normal	recurrent obstructive bronchitis and bronchopneumonia, bronchial hyperreactivity on infections, allergic asthma bronchiale °I	no	1,40	sick-same
1209	male	5,51	bronchitis - normal	recurrent pneumonia, allergic asthma	no	0,10	sick-better
699	male	5,52	bronchitis - normal	state after status asthmaticus, pneumonia, obstruction	no	1,20	sick-same
704	female	4,30	bronchitis - normal	recurrent pneumonia, bronchiectasis	no	5,20	sick-better
712	female	0,79	bronchitis - normal	chronic tachypnea, post-infectious, tracheomalacia	no	0,60	sick-better
1296	male	0,22	bronchitis - normal	acute bronchitis from Respiratory-Syncytial-Virus, GER	no	2,00	sick-better
418	female	12,64	bronchitis - normal	Chronic cough - psychological component	no	0,60	sick-same
1622	female	5,88	bronchitis - normal	Chronic recurrent bronchitis, infection triggered, development of bronchiectasis	no		sick-same
1349	female	2,07	bronchitis - normal	condition after necrotizing pneumonia and sepsis with pneumococcus, pleural effusion left	no	0,00	sick-better
1338	male	4,69	bronchitis - normal	condition after recurrent pneumonia, chronic bronchitis; normal cell differentiation	no	0,80	sick-same

ID	sex	age at BAL [yrs]	patient category	reason for BAL/diagnosis	patient dead	PMN [%]	Lung disease outcome
671	female	16,41	bronchitis - normal	adolescent kyphosis and scoliosis (probable cause for pulmonary symptoms)	no	0,60	healthy
1177	female	10,43	bronchitis - normal	condition after infection with mycoplasma with acute dyspnea on exertion	no	0,80	sick-same
1651	female	7,30	bronchitis - normal	obstruction, chronic productive cough	no	1,00	sick-better
1522	male	0,12	bronchitis - normal	persisting atelectasis	no		sick-same
1207	male	3,64	bronchitis - normal	pneumonia, recurrent fever, probable systemic inflammation, atelectasis	no	1,80	sick-same
1613	male	0,81	bronchitis - normal	Prader-Willi-syndrome, condition after recurrent bronchitis and infection with rota virus	no	2,00	sick-same
726	female	1,19	bronchitis - normal	recurrent bronchitis	no	2,20	sick-same
649	female	11,68	bronchitis - normal	recurrent bronchitis and pneumonia	no	3,40	healthy
1390	male	2,28	bronchitis - normal	recurrent bronchitis	no	1,60	sick-same
1543	male	2,70	bronchitis - normal	recurrent obstructive bronchitis	no	0,20	sick-better
1397	male	6,92	bronchitis - normal	recurrent obstructive bronchitis and pneumonia	no	0,20	healthy
1298	male	0,57	bronchitis - normal	recurrent obstructive bronchitis; reflux esophagitis	no	2,00	sick-better

ID	sex	age at BAL [yrs]	patient category	reason for BAL/diagnosis	patient dead	PMN [%]	Lung disease outcome
1342	female	5,21	bronchitis - normal	recurrent pneumonia and bronchitis, partially obstructive, chronic productive cough	no	3,20	sick-same
1377	male	4,42	bronchitis - normal	recurrent pneumonia left lower lobe, tracheobronchitis	no	1,80	sick-better
1512	female	1,16	bronchitis - normal	recurrent pneumonia	no	1,20	sick-better
672	female	5,00	bronchitis - normal	recurrent pneumonia	no	2,20	sick-better
1487	male	1,97	bronchitis - normal	recurrent pneumonia, bronchitis	no	4,00	healthy
1502	female	4,13	bronchitis - normal	recurrent pneumonia, suspicion on ciliar dysfunction	no	0,20	sick-same
1592	male	4,90	bronchitis - normal	recurrent severe bronchopulmonale infection, asthma	no		sick-same
1498	male	1,23	bronchitis - normal	obstructive lung disease	no	2,80	sick-same
486	female	3,13	bronchitis - normal	bronchitis	no	3,00	sick-same
434	male	4,72	bronchitis - normal	chronic bronchitis/cough; vulnerable to infections	no	8,00	sick-same
515	female	16,74	bronchitis - normal	chronic cough	no	1,00	sick-same
359	female	6,40	bronchitis - normal	cough, bronchial hyperresponsiveness	no	2,00	sick-better

ID	sex	age at BAL [yrs]	patient category	reason for BAL/diagnosis	patient dead	PMN [%]	Lung disease outcome
447	female	7,22	bronchitis - normal	recurrent bronchitis especially in winter months	no	8,00	healthy
574	male	11,04	bronchitis - normal	recurrent cough and chronic bronchitis without obstruction	no	0,00	sick-same
519	male	0,85	bronchitis - normal	recurrent desaturations without apnea; status after bronchiolitis	no		sick-better
521	female	9,64	bronchitis - normal	recurrent pneumonia, condition after patch occlusion of VSD and ASD	no	2,00	sick-same
841	female	4,96	bronchitis - normal	tracheal stenosis with chronic inflammation condition after laser therapy	no	1,80	sick-same
1376	male	2,83	bronchitis - normal	syndrome of middle lobe, recurrent pneumonia with bronchiectasis	no	1,40	sick-better
1268	female	2,68	bronchitis - normal	infection with mycobacterium avium	no	0,20	sick-better
696	male	15,35	bronchitis - normal	bronchial asthma °IV; lymphocytic and eosinophilic inflammation	no	0,20	sick-worse
1629	male	10,09	bronchitis - normal	bronchial asthma paterm-birth of 34 weeks	no	1,60	sick-same
378	male	2,40	bronchitis - normal	bronchial asthma, condition after RSV-bronchiolitis	no		sick-same
1654	male	13,42	bronchitis - normal	bronchial asthma, condition after GERD with fundoplicatio 4/2011	no	2,00	sick-better
906	male	9,50	bronchitis - normal	bronchial asthma, lymphocytic inflammation	no	2,00	sick-better

ID	sex	age at BAL [yrs]	patient category	reason for BAL/diagnosis	patient dead	PMN [%]	Lung disease outcome
1599	male	13,54	bronchitis - normal	mixed allergic and exercise-induced bronchial asthma	no	0,00	sick-better
1481	male	8,22	bronchitis - normal	intrinsic bronchial asthma	no	0,20	sick-same
1277	male	3,84	bronchitis - normal	recurrent pneumonia, bronchiectasis	no	6,00	sick-same
1495	male	11,43	bronchitis - normal	chronic bronchiolitis	no	1,00	sick-same
157	male	2,43	bronchitis - normal	chronic bronchitis, lymphocytic inflammation	no	3,00	healthy
1907	female	0,09	bronchitis - normal	condition after connatal stenosis left main and segmental bronchus with atelectasis left upper lobe, linugla, partially lower lobe, partial respiratory insufficiency	no	6,00	sick-better
510	female	2,88	bronchitis - normal	chronic dyscrine bronchitis, secondary ciliar dyskinesia	no	2,00	sick-better
442	male	0,64	bronchitis - normal	recurrent brochopulmonal infections with obstructions, lymphocytic inflammation, preterm-birth of 26 weeks	no	1,00	healthy
1511	female	0,80	bronchitis - normal	unclear ciliar dysfunction, bronchiolitis	no	5,00	sick-better
1686	male	13,53	bronchitis - normal	unclear emphysematic lung disease as part of an unclear syndrome	no	8,20	sick-same
165	male	0,71	bronchitis - normal	therapy-resistant GERD since 2004	no	1,70	healthy

ID	sex	age at BAL [yrs]	patient category	reason for BAL/diagnosis	patient dead	PMN [%]	Lung disease outcome
1424	male	0,32	bronchitis - normal	persistent bronchial obstruction, condition after meconium aspiration pneumonia, lymphocytosis	no	1,00	healthy
1990	male	0,73	bronchitis - neutrophilic	postinfectious bronchial asthma, mild dystrophie	no		sick-better
1519	male	0,34	bronchitis - neutrophilic	chronic tachypnea	yes		sick-same
2487	male	0,09	bronchitis - neutrophilic	condition after connatal pneumonia, probabla ciliac dyskinesia, apnea and desaturations	nk		nk
1516	female	5,75	bronchitis - neutrophilic	Gastro-esophageale hernia with suspected chronic aspiration	no	90,00	healthy
705	male	0,81	bronchitis - neutrophilic	recurrent obstructive bronchopneumonias due to recurrent aspirations at dysphagia, GER, tracheomalacia, preterm birth of 34 weeks	no	92,60	sick-same
1486	male	0,16	bronchitis - neutrophilic	recurrent aspirations, condition after connatal pneumonia, current pneumonia right upper lobe recurrent fever	no	84,80	sick-better
416	male	4,84	bronchitis - neutrophilic	bronchial asthma with severe recurrent obstructions, recurrent pneumonia, chronic purulent bronchitis	no	80,00	sick-same
1994	male	13,21	bronchitis - neutrophilic	bronchiectasis and bronchial asthma, Morbus Crohn	no	44,00	sick-same
427	male	1,85	bronchitis - neutrophilic	bronchiectasis, non-CF; probable immunodeficiency	no	82,00	sick-better
162	female	17,73	bronchitis - neutrophilic	bronchiectasis, non-CF, unclear chronic obstructive lung disease	no	80,00	sick-same

ID	sex	age at BAL [yrs]	patient category	reason for BAL/diagnosis	patient dead	PMN [%]	Lung disease outcome
1570	male	3,51	bronchitis - neutrophilic	recurrent pneumonia, dystelectasis lingula and left lower bronchiectasis, preterm birth of 34 weeks	no	19,00	healthy
11	male	12,60	bronchitis - neutrophilic	bronchiectasis after bronchiolitis obliterans, condition after recurrent bronchitis on GER (fundoplicatio 2001)	no	74,00	sick-same
1771	male	1,58	bronchitis - neutrophilic	bronchiolitis obliterans	no	14,00	sick-same
1348	male	11,84	bronchitis - neutrophilic	severe bronchial asthma, condition after bronchiolitis obliterans with scarring alteration of the middle lobe	no		sick-same
1447	male	0,37	bronchitis - neutrophilic	suspected bronchiolitis obliterans	no	10,60	sick-better
1905	female	1,73	bronchitis - neutrophilic	bronchiolitis obliterans	no	11,7	healthy
1817	female	0,40	bronchitis - neutrophilic	obstructive airway disease with recurrent respiratory infections, unclear syndrome	no	13,00	sick-better
1591	male	0,13	bronchitis - neutrophilic	Post-Rhinovirus chronic bronchiolitis	no		sick-better
1914	female	0,53	bronchitis - neutrophilic	primary pulmonal hypertension, adenovirus pneumonia, acute and chronic respiratory insufficiency	no		sick-same
1864	male	18,42	bronchitis - neutrophilic	chronic atrophic bronchitis, Noonan-syndrome	no	12,5	sick-better
149	male	1,29	bronchitis - neutrophilic	chronic recurrent bronchitis; neutrophil inflammation	no	24,00	sick-same

ID	sex	age at BAL [yrs]	patient category	reason for BAL/diagnosis	patient dead	PMN [%]	Lung disease outcome
1602	female	8,54	bronchitis - neutrophilic	Lobar pneumonia, bronchial asthma, GERD	no	90,00	healthy
1319	male	2,28	bronchitis - neutrophilic	recurrent obstructive bronchitis, condition after chronic colonization with streptococcus pneumoniae, infection triggered bronchial asthma	no	38,00	sick-better
1587	male	2,30	bronchitis - neutrophilic	tracheomalacia, chronic bronchitis, GER, suspected infection triggered bronchial asthma	no	59,00	sick-better
136	male	0,68	bronchitis - neutrophilic	intrinsic bronchial asthma, neutrophil inflammation	no	27,00	sick-better
1301	male	1,90	bronchitis - neutrophilic	condition after recurrent obstructive pneumonia and bronchitis	no	46,3	sick-same
1548	male	0,40	bronchitis - neutrophilic	condition after pertussis pneumonia, recurrent obstructive bronchitis, suspected syndromal disease with parents related	no	15,00	healthy
518	male	5,51	bronchitis - neutrophilic	neutrophil bronchitis	no	25,00	sick-better
1355	male	0,45	bronchitis - neutrophilic	chronic neutrophil bronchitis, suspected immunodeficiency	no		sick-better
446	male	4,21	bronchitis - neutrophilic	recurrent astmoide bronchitis; neutrophil inflammation; condition after contact to TBC	no	40,00	sick-same
1171	male	1,24	bronchitis - neutrophilic	lobar empysema right upper lobe, recurrent (tracheo)bronchitis, pneumonia, reflux esophagitis	no	50,00	sick-better
141	female	4,03	bronchitis - neutrophilic	recurrent pneumonia, suspected GER with aspiration	no	69,40	sick-same

ID	sex	age at BAL [yrs]	patient category	reason for BAL/diagnosis	patient dead	PMN [%]	Lung disease outcome
1991	female	5,42	bronchitis - neutrophilic	chronic neutrophil bronchitis, GERD with esophagitis	no	79,00	sick-same
1695	female	0,07	bronchitis - neutrophilic	infantile lobar emphysema, residual chronic bronchitis	no		sick-better
1470	male	1,12	bronchitis - neutrophilic	SFTPC polymorphism; condition after recurrent obstructive bronchitis with need of oxygen, atelectasis right upper&lower lobe and respir insufficiency	no	18,80	sick-better
638	female	0,07	bronchitis - neutrophilic	neutrophil bronchitis; respiratory adaptation disorder due to velopharyngeal insufficiency	no	73,00	healthy
1958	male	15,58	bronchitis - neutrophilic	Abscess of the lung, chronic bronchitis, interstitial attenuation	no	47,00	sick-better
1529	male	0,16	bronchitis - neutrophilic	suspected connatal bacterial infection	no		sick-better

Bei Patienten ohne quantitative Bestimmung der Neutrophilen-Anzahl in der Differentialzytologie lagen qualitative Werte (siehe Tabelle 3.3.1-1, Kapitel Differentialzytologie) vor, die die Grundlage für die Kategorisierung darstellten.

nk = not known, GER(D) = gastroösophagealer Reflux(erkrankung), yrs = years (Alter in Jahren)

Tabelle 6.1-2: Charakteristika der Kontrollen mit Lungenbiopsie

ID	m/w	Symptome	Subkategorie	endgültige Diagnose	Beginn der Symptomatik (Jahre)	Follow up-Dauer	Langzeit-Outcome	Alter bei Lungenbiopsie (Jahre)	Lungenbiopsie Befund
162	w	mit 6 Monaten 1. Lungenentzündung, danach 1-2x/Jahr; seit Alter 16 Jahre O ₂ -Bedarf; mit 17 Jahren monatlich pulmonale Exazerbationen	Bronchiektasen, Ausschluss CF	progressive Bronchiektasen, a.e. BO nach Virusinfekt, chronisch obstruktive Lungenerkrankung, mit 17Jahren chronische Pseudomonas-Infektion	9,00	17,00	sick-same	17,73	akute Inflammation, aktive Bronchitis
1495	m	mit 1,5 Jahren persistierender Husten und schwere bronchiale Obstruktion; Bronchiolitis obliterans	Bronchiolitis obliterans	chronische Bronchiolitis	1,50	12,50	sick-same	13,26	unspezifische inflammatorische Veränderungen, keine ILE
1654	m	mit 5 Jahren Asthma bronchiale; IgA-Defizienz; GERD mit Fundoplicatio 04/2011	Asthma	Asthma bronchiale, GERD/Fundoplicatio 4/2011	5,00	15,50	sick-better	13,61	keine Anzeichen für Asthma; Bronchiolektasie, teilweise komplette Obstruktion

									aufgrund Sekretretention
1771	m	Tachydyspnoe und Einziehungen seit Geburt; mit 1Jahr massive therapierefraktäre Obstruktion bezüglich inhalativer Therapie; Pneumocystis carinii in BAL	Bronchiolitis obliterans	Bronchiolitis obliterans, V.a. IgG1-Subklassendefekt	0,00	1,66	sick-same	1,55	keine Anzeichen für ILE, alveoläre Proteinose oder Infektion
1817	w	mit 2 Monaten rez. obstruktive Bronchitis, rez. Infektionen	Bronchiolitis ohne Transplantation	obstruktive unspezifische Bronchiolitis, Bronchomalazie, rez. respiratorische Infektionen, unklares Syndrom mit generalisiertem Kontaktekzem	0,16	2,30	sick-better	0,40	unspezifische Bronchiolitis aufgrund rez. respiratorischer Infektionen
1905	w	mit 1,6 Jahren prolongierte Tachydyspnoe nach viraler Infektion, O ₂ -Bedarf, chronische Bronchiolitis obliterans	Bronchiolitis ohne Transplantation	Bronchiolitis obliterans	1,60	2,60	healthy	1,76	chronische Bronchiolitis mit dysplastischem Knorpel

1914	w	Postpartale Zyanose, Intubation; mit 6 und 8 Monaten Pneumonien (H. influenzae, Pneumococcus, Adenovirus); chronische respiratorische Insuffizienz mit O ₂ -Bedarf	Bronchiolitis ohne Transplantation	pPHT; milde Bronchiolitis und Alveolitis; ASD II und VSD, kongenitale Hypothyreose (keine TTF1-Mutation)	0,50	0,66	sick-same	0,67	milde Bronchiolitis und Alveolitis, post-virale Infektion
------	---	---	------------------------------------	--	------	------	-----------	------	---

CF = cystische Fibrose; GERD = gastroösophageale Refluxerkrankung; pPHT = primäre pulmonale Hypertonie; ASD = Vorhofseptumdefekt; VSD = Ventrikelseptumdefekt

6.2. Literaturverzeichnis

1. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4):248-9.
2. Akira M, Sakatani M, Ueda E. Idiopathic pulmonary fibrosis: progression of honeycombing at thin-section CT. *Radiology*. 1993;189(3):687-91.
3. Alkhorayyef A, Ryerson L, Chan A, Phillipos E, Lacson A, Adatia I. Pulmonary interstitial glycogenosis associated with pulmonary hypertension and hypertrophic cardiomyopathy. *Pediatr Cardiol*. 2013;34(2):462-6.
4. American Thoracic S, European Respiratory S. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(2):277-304.
5. Augusto LA, Synguelakis M, Johansson J, Pedron T, Girard R, Chaby R. Interaction of pulmonary surfactant protein C with CD14 and lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 2003;71(1):61-7.
6. Baekvad-Hansen M, Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Surfactant protein-B 121ins2 heterozygosity, reduced pulmonary function, and chronic obstructive pulmonary disease in smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(1):17-20.
7. Ball R, Chetcuti PA, Beverley D. Fatal familial surfactant protein B deficiency. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1995;73(1):F53.
8. Ballard PL, Nogee LM, Beers MF, Ballard RA, Planer BC, Polk L, et al. Partial deficiency of surfactant protein B in an infant with chronic lung disease. *Pediatrics*. 1995;96(6):1046-52.
9. Ban N, Matsumura Y, Sakai H, Takanezawa Y, Sasaki M, Arai H, et al. ABCA3 as a lipid transporter in pulmonary surfactant biogenesis. *J Biol Chem*. 2007;282(13):9628-34.
10. Beers MF, Hamvas A, Moxley MA, Gonzales LW, Guttentag SH, Solarin KO, et al. Pulmonary surfactant metabolism in infants lacking surfactant protein B. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000;22(3):380-91.
11. Beers MF, Mulugeta S. Surfactant protein C biosynthesis and its emerging role in conformational lung disease. *Annu Rev Physiol*. 2005;67:663-96.
12. Boggaram V. Thyroid transcription factor-1 (TTF-1/Nkx2.1/TTF1) gene regulation in the lung. *Clin Sci (Lond)*. 2009;116(1):27-35.

13. Bonella F, Bauer PC, Griese M, Ohshimo S, Guzman J, Costabel U. Pulmonary alveolar proteinosis: new insights from a single-center cohort of 70 patients. *Respir Med*. 2011;105(12):1908-16.
14. 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.
15. Brasch F, Birzele J, Ochs M, Guttentag SH, Schoch OD, Boehler A, et al. Surfactant proteins in pulmonary alveolar proteinosis in adults. *Eur Respir J*. 2004;24(3):426-35.
16. Brasch F, Schimanski S, Muhlfeld C, Barlage S, Langmann T, Aslanidis C, et al. Alteration of the pulmonary surfactant system in full-term infants with hereditary ABCA3 deficiency. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(5):571-80.
17. Brody AS, Crotty EJ. Neuroendocrine cell hyperplasia of infancy (NEHI). *Pediatr Radiol*. 2006;36(12):1328.
18. Brody AS, Guillerman RP, Hay TC, Wagner BD, Young LR, Deutsch GH, et al. Neuroendocrine cell hyperplasia of infancy: diagnosis with high-resolution CT. *AJR Am J Roentgenol*. 2010;194(1):238-44.
19. Buchvald F KL, Nielsen KG. Interstitial Lung Disease in Danish Children from 1990 to 2008. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179:A3677.
20. Bullard JE, Wert SE, Whitsett JA, Dean M, Nogee LM. ABCA3 mutations associated with pediatric interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(8):1026-31.
21. Bullard JE, Nogee LM. Heterozygosity for ABCA3 mutations modifies the severity of lung disease associated with a surfactant protein C gene (SFTPC) mutation. *Pediatr Res*. 2007;62(2):176-9.
22. Canakis AM, Cutz E, Manson D, O'Brodivich H. Pulmonary interstitial glycogenosis: a new variant of neonatal interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(11):1557-65.
23. Cheong N, Zhang H, Madesh M, Zhao M, Yu K, Dodia C, et al. ABCA3 is critical for lamellar body biogenesis in vivo. *J Biol Chem*. 2007;282(33):23811-7.
24. Chevalier G, Collet AJ. In vivo incorporation of choline- 3 H, leucine- 3 H and galactose- 3 H in alveolar type II pneumocytes in relation to surfactant synthesis. A quantitative radioautographic study in mouse by electron microscopy. *Anat Rec*. 1972;174(3):289-310.

25. Civitareale D, Lonigro R, Sinclair AJ, Di Lauro R. A thyroid-specific nuclear protein essential for tissue-specific expression of the thyroglobulin promoter. *EMBO J.* 1989;8(9):2537-42.
26. Clark JC, Wert SE, Bachurski CJ, Stahlman MT, Stripp BR, Weaver TE, et al. Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(17):7794-8.
27. Cole FS, Hamvas A, Rubinstein P, King E, Trusgnich M, Nogee LM, et al. Population-based estimates of surfactant protein B deficiency. *Pediatrics.* 2000;105(3 Pt 1):538-41.
28. Cottin V, Donsbeck AV, Revel D, Loire R, Cordier JF. Nonspecific interstitial pneumonia. Individualization of a clinicopathologic entity in a series of 12 patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158(4):1286-93.
29. Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, Sobonya RE. The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;150(4):967-72.
30. Curstedt T, Jornvall H, Robertson B, Bergman T, Berggren P. Two hydrophobic low-molecular-mass protein fractions of pulmonary surfactant. Characterization and biophysical activity. *Eur J Biochem.* 1987;168(2):255-62.
31. de Blic J, Midulla F, Barbato A, Clement A, Dab I, Eber E, et al. Bronchoalveolar lavage in children. ERS Task Force on bronchoalveolar lavage in children. European Respiratory Society. *Eur Respir J.* 2000;15(1):217-31.
32. De Brauwier EI, Jacobs JA, Nieman F, Bruggeman CA, Wagenaar SS, Drent M. Cyto centrifugation conditions affecting the differential cell count in bronchoalveolar lavage fluid. *Anal Quant Cytol Histol.* 2000;22(5):416-22.
33. de la Fuente AA, Voorhout WF, deMello DE. Congenital alveolar proteinosis in the Netherlands: a report of five cases with immunohistochemical and genetic studies on surfactant apoproteins. *Pediatr Pathol Lab Med.* 1997;17(2):221-31.
34. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 2001;11(7):1156-66.
35. deMello DE, Heyman S, Phelps DS, Hamvas A, Nogee L, Cole S, et al. Ultrastructure of lung in surfactant protein B deficiency. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994;11(2):230-9.
36. Deterding RR, Fan LL, Morton R, Hay TC, Langston C. Persistent tachypnea of infancy (PTI)--a new entity. *Pediatr Pulmonol.* 2001;Suppl 23:72-3.
37. Deterding RR, Pye C, Fan LL, Langston C. Persistent tachypnea of infancy is associated with neuroendocrine cell hyperplasia. *Pediatr Pulmonol.* 2005;40(2):157-65.

38. Deutsch GH, Young LR, Deterding RR, Fan LL, Dell SD, Bean JA, et al. Diffuse lung disease in young children: application of a novel classification scheme. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(11):1120-8.
39. Deutsch GH, Young LR. Histologic resolution of pulmonary interstitial glycogenosis. *Pediatr Dev Pathol*. 2009;12(6):475-80.
40. Dinwiddie R, Sharief N, Crawford O. Idiopathic interstitial pneumonitis in children: a national survey in the United Kingdom and Ireland. *Pediatr Pulmonol*. 2002;34(1):23-9.
41. Dirksen U, Nishinakamura R, Groneck P, Hattenhorst U, Noguee L, Murray R, et al. Human pulmonary alveolar proteinosis associated with a defect in GM-CSF/IL-3/IL-5 receptor common beta chain expression. *J Clin Invest*. 1997;100(9):2211-7.
42. Doan ML, Guillerman RP, Dishop MK, Noguee LM, Langston C, Mallory GB, et al. Clinical, radiological and pathological features of ABCA3 mutations in children. *Thorax*. 2008;63(4):366-73.
43. Doan ML, Elidemir O, Dishop MK, Zhang H, Smith EO, Black PG, et al. Serum KL-6 differentiates neuroendocrine cell hyperplasia of infancy from the inborn errors of surfactant metabolism. *Thorax*. 2009;64(8):677-81.
44. Dunbar AE, 3rd, Wert SE, Ikegami M, Whitsett JA, Hamvas A, White FV, et al. Prolonged survival in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency associated with a novel splicing mutation. *Pediatr Res*. 2000;48(3):275-82.
45. Fan LL, Deterding RR, Langston C. Pediatric interstitial lung disease revisited. *Pediatr Pulmonol*. 2004;38(5):369-78.
46. Fujiwara T, Maeta H, Chida S, Morita T, Watabe Y, Abe T. Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease. *Lancet*. 1980;1(8159):55-9.
47. Garmany TH, Wambach JA, Heins HB, Watkins-Torry JM, Wegner DJ, Bennet K, et al. Population and disease-based prevalence of the common mutations associated with surfactant deficiency. *Pediatr Res*. 2008;63(6):645-9.
48. Glasser SW, Korfhagen TR, Perme CM, Pilot-Matias TJ, Kister SE, Whitsett JA. Two SP-C genes encoding human pulmonary surfactant proteolipid. *J Biol Chem*. 1988;263(21):10326-31.
49. Gomes VC, Silva MC, Maia Filho JH, Daltro P, Ramos SG, Brody AS, et al. Diagnostic criteria and follow-up in neuroendocrine cell hyperplasia of infancy: a case series. *J Bras Pneumol*. 2013;39(5):569-78.
50. Gribetz I, Frank NR, Avery ME. Static volume-pressure relations of excised lungs of infants with hyaline membrane disease, newborn and stillborn infants. *J Clin Invest*. 1959;38:2168-75.

51. Griese M, Dietrich P, Reinhardt D. Pharmacokinetics of bovine surfactant in neonatal respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152(3):1050-4.
52. Griese M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J*. 1999;13(6):1455-76.
53. Griese M, Essl R, Schmidt R, Rietschel E, Ratjen F, Ballmann M, et al. Pulmonary surfactant, lung function, and endobronchial inflammation in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(9):1000-5.
54. Griese M, Felber J, Reiter K, Strong P, Reid K, Belohradsky BH, et al. Airway inflammation in children with tracheostomy. *Pediatr Pulmonol*. 2004;37(4):356-61.
55. Griese M, Haug M, Brasch F, Freihorst A, Lohse P, von Kries R, et al. Incidence and classification of pediatric diffuse parenchymal lung diseases in Germany. *Orphanet J Rare Dis*. 2009;4:26.
56. Griese M, Irnstetter A, Hengst M, Burmester H, Nagel F, Ripper J, et al. Categorizing diffuse parenchymal lung disease in children. *Orphanet J Rare Dis*. 2015;10:122.
57. Griese M, Lorenz E, Hengst M, Schams A, Wesselak T, Rauch D, et al. Surfactant proteins in pediatric interstitial lung disease. *Pediatr Res*. 2016;79(1-1):34-41.
58. Griese M NT. *Praktische Pneumologie in der Pädiatrie - Therapie*: Georg Thieme Verlag KG; 2013.
59. Guillot L, Carre A, Szinnai G, Castanet M, Tron E, Jaubert F, et al. NKX2-1 mutations leading to surfactant protein promoter dysregulation cause interstitial lung disease in "Brain-Lung-Thyroid Syndrome". *Hum Mutat*. 2010;31(2):E1146-62.
60. Haagsman HP, Diemel RV. Surfactant-associated proteins: functions and structural variation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2001;129(1):91-108.
61. Haataja R, Ramet M, Marttila R, Hallman M. Surfactant proteins A and B as interactive genetic determinants of neonatal respiratory distress syndrome. *Hum Mol Genet*. 2000;9(18):2751-60.
62. Hamdan H, Liu H, Li C, Jones C, Lee M, deLemos R, et al. Structure of the human Nkx2.1 gene. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1396(3):336-48.
63. Hamvas A. Inherited surfactant protein-B deficiency. *Adv Pediatr*. 1997;44:369-88.
64. Hamvas A, Trusgnich M, Brice H, Baumgartner J, Hong Y, Noguee LM, et al. Population-based screening for rare mutations: high-throughput DNA

- extraction and molecular amplification from Guthrie cards. *Pediatr Res*. 2001;50(5):666-8.
65. Hamvas A. Evaluation and management of inherited disorders of surfactant metabolism. *Chin Med J (Engl)*. 2010;123(20):2943-7.
 66. Hartl D, Griese M. Interstitial lung disease in children -- genetic background and associated phenotypes. *Respir Res*. 2005;6:32.
 67. Hartman TE, Swensen SJ, Hansell DM, Colby TV, Myers JL, Tazelaar HD, et al. Nonspecific interstitial pneumonia: variable appearance at high-resolution chest CT. *Radiology*. 2000;217(3):701-5.
 68. Hawgood S, Derrick M, Poulain F. Structure and properties of surfactant protein B. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1408(2-3):150-60.
 69. Hildebrandt J, Yalcin E, Bresser HG, Cinel G, Gappa M, Haghighi A, et al. Characterization of CSF2RA mutation related juvenile pulmonary alveolar proteinosis. *Orphanet J Rare Dis*. 2014;9:171.
 70. Horowitz AD, Elledge B, Whitsett JA, Baatz JE. Effects of lung surfactant proteolipid SP-C on the organization of model membrane lipids: a fluorescence study. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1107(1):44-54.
 71. Horowitz AD, Baatz JE, Whitsett JA. Lipid effects on aggregation of pulmonary surfactant protein SP-C studied by fluorescence energy transfer. *Biochemistry*. 1993;32(37):9513-23.
 72. Horowitz AD, Moussavian B, Whitsett JA. Roles of SP-A, SP-B, and SP-C in modulation of lipid uptake by pulmonary epithelial cells in vitro. *Am J Physiol*. 1996;270(1 Pt 1):L69-79.
 73. Huizar I, Kavuru MS. Alveolar proteinosis syndrome: pathogenesis, diagnosis, and management. *Curr Opin Pulm Med*. 2009;15(5):491-8.
 74. Ikegami M, Ueda T, Hull W, Whitsett JA, Mulligan RC, Dranoff G, et al. Surfactant metabolism in transgenic mice after granulocyte macrophage-colony stimulating factor ablation. *Am J Physiol*. 1996;270(4 Pt 1):L650-8.
 75. Ikegami M, Na CL, Korfhagen TR, Whitsett JA. Surfactant protein D influences surfactant ultrastructure and uptake by alveolar type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288(3):L552-61.
 76. Inoue Y, Trapnell BC, Tazawa R, Arai T, Takada T, Hizawa N, et al. Characteristics of a large cohort of patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis in Japan. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(7):752-62.
 77. Katzenstein AL, Fiorelli RF. Nonspecific interstitial pneumonia/fibrosis. Histologic features and clinical significance. *Am J Surg Pathol*. 1994;18(2):136-47.

78. Kim TS, Lee KS, Chung MP, Han J, Park JS, Hwang JH, et al. Nonspecific interstitial pneumonia with fibrosis: high-resolution CT and pathologic findings. *AJR Am J Roentgenol.* 1998;171(6):1645-50.
79. King BA, Boyd JT, Kingma PS. Pulmonary maturational arrest and death in a patient with pulmonary interstitial glycogenosis. *Pediatr Pulmonol.* 2011;46(11):1142-5.
80. King RJ, Klass DJ, Gikas EG, Clements JA. Isolation of apoproteins from canine surface active material. *Am J Physiol.* 1973;224(4):788-95.
81. Kingma PS, Whitsett JA. In defense of the lung: surfactant protein A and surfactant protein D. *Curr Opin Pharmacol.* 2006;6(3):277-83.
82. Klaus MH, Clements JA, Havel RJ. Composition of surface-active material isolated from beef lung. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1961;47:1858-9.
83. Korfhagen TR, Bruno MD, Ross GF, Huelsman KM, Ikegami M, Jobe AH, et al. Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(18):9594-9.
84. Kroner C, Wittmann T, Reu S, Teusch V, Klemme M, Rauch D, et al. Lung disease caused by ABCA3 mutations. *Thorax.* 2017;72(3):213-20.
85. Krude H, Schutz B, Biebermann H, von Moers A, Schnabel D, Neitzel H, et al. Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human NKX2-1 haploinsufficiency. *J Clin Invest.* 2002;109(4):475-80.
86. Kurland G, Deterding RR, Hagood JS, Young LR, Brody AS, Castile RG, et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: classification, evaluation, and management of childhood interstitial lung disease in infancy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188(3):376-94.
87. Lanfranchi M, Allbery SM, Wheelock L, Perry D. Pulmonary interstitial glycogenosis. *Pediatr Radiol.* 2010;40(3):361-5.
88. Liu T, Sano K, Ogiwara N, Kobayashi N. A novel surfactant protein C L55F mutation associated with interstitial lung disease alters subcellular localization of proSP-C in A549 cells. *Pediatr Res.* 2016;79(1-1):27-33.
89. Luisetti M, Kadija Z, Mariani F, Rodi G, Campo I, Trapnell BC. Therapy options in pulmonary alveolar proteinosis. *Ther Adv Respir Dis.* 2010;4(4):239-48.
90. Lukkarinen H, Pelkonen A, Lohi J, Malmstrom K, Malmberg LP, Kajosaari M, et al. Neuroendocrine cell hyperplasia of infancy: a prospective follow-up of nine children. *Arch Dis Child.* 2013;98(2):141-4.
91. Martinez-Moczygemba M, Doan ML, Elidemir O, Fan LL, Cheung SW, Lei JT, et al. Pulmonary alveolar proteinosis caused by deletion of the GM-CSFRalpha gene in the X chromosome pseudoautosomal region 1. *J Exp Med.* 2008;205(12):2711-6.

92. Melton KR, Nesselin LL, Ikegami M, Tichelaar JW, Clark JC, Whitsett JA, et al. SP-B deficiency causes respiratory failure in adult mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;285(3):L543-9.
93. Milman N, Jacobsen GK, Faurschou P, Graudal N, Jorgensen A. The effect of filtration on the cellular components in bronchoalveolar lavage fluid. *Cytopathology*. 1993;4(2):85-9.
94. Moulton SL, Krous HF, Merritt TA, Odell RM, Gangitano E, Cornish JD. Congenital pulmonary alveolar proteinosis: failure of treatment with extracorporeal life support. *J Pediatr*. 1992;120(2 Pt 1):297-302.
95. Nag K, Munro JG, Inchley K, Schurch S, Petersen NO, Possmayer F. SP-B refining of pulmonary surfactant phospholipid films. *Am J Physiol*. 1999;277(6 Pt 1):L1179-89.
96. Nogee LM, de Mello DE, Dehner LP, Colten HR. Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *N Engl J Med*. 1993;328(6):406-10.
97. Nogee LM, Garnier G, Dietz HC, Singer L, Murphy AM, deMello DE, et al. A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *J Clin Invest*. 1994;93(4):1860-3.
98. Nogee LM, Dunbar AE, 3rd, Wert SE, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N Engl J Med*. 2001;344(8):573-9.
99. Nogee LM, Dunbar AE, 3rd, Wert S, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA. Mutations in the surfactant protein C gene associated with interstitial lung disease. *Chest*. 2002;121(3 Suppl):20S-1S.
100. Nogee LM. Alterations in SP-B and SP-C expression in neonatal lung disease. *Annu Rev Physiol*. 2004;66:601-23.
101. Park SK, Amos L, Rao A, Quasney MW, Matsumura Y, Inagaki N, et al. Identification and characterization of a novel ABCA3 mutation. *Physiol Genomics*. 2010;40(2):94-9.
102. Pattle RE. Properties, function and origin of the alveolar lining layer. *Nature*. 1955;175(4469):1125-6.
103. Phelps DS, Floros J. Localization of pulmonary surfactant proteins using immunohistochemistry and tissue in situ hybridization. *Exp Lung Res*. 1991;17(6):985-95.
104. Phizackerley PJ, Town MH, Newman GE. Hydrophobic proteins of lamellated osmiophilic bodies isolated from pig lung. *Biochem J*. 1979;183(3):731-6.

105. Pilot-Matias TJ, Kister SE, Fox JL, Kropp K, Glasser SW, Whitsett JA. Structure and organization of the gene encoding human pulmonary surfactant proteolipid SP-B. *DNA*. 1989;8(2):75-86.
106. Pryhuber GS. Regulation and function of pulmonary surfactant protein B. *Mol Genet Metab*. 1998;64(4):217-28.
107. Radhakrishnan D, Yamashita C, Gillio-Meina C, Fraser DD. Translational research in pediatrics III: bronchoalveolar lavage. *Pediatrics*. 2014;134(1):135-54.
108. Rauch D, Wetzke M, Reu S, Wesselak W, Schams A, Hengst M, et al. Persistent Tachypnea of Infancy. Usual and Aberrant. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193(4):438-47.
109. Rose AS, Knox KS. Bronchoalveolar lavage as a research tool. *Semin Respir Crit Care Med*. 2007;28(5):561-73.
110. Rosen SH, Castleman B, Liebow AA. Pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med*. 1958;258(23):1123-42.
111. Schuerman FA, Griese M, Gille JP, Brasch F, Noorduyne LA, van Kaam AH. Surfactant protein B deficiency caused by a novel mutation involving multiple exons of the SP-B gene. *Eur J Med Res*. 2008;13(6):281-6.
112. Shah PL, Hansell D, Lawson PR, Reid KB, Morgan C. Pulmonary alveolar proteinosis: clinical aspects and current concepts on pathogenesis. *Thorax*. 2000;55(1):67-77.
113. Shibata Y, Berclaz PY, Chroneos ZC, Yoshida M, Whitsett JA, Trapnell BC. GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity*. 2001;15(4):557-67.
114. Shulenin S, Noguee LM, Annilo T, Wert SE, Whitsett JA, Dean M. ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *N Engl J Med*. 2004;350(13):1296-303.
115. Simonato M, Baritussio A, Vedovelli L, Lamonica G, Carnielli VP, Cogo PE. Surfactant protein B amount and kinetics in newborn infants: an optimized procedure. *J Mass Spectrom*. 2012;47(11):1415-9.
116. Sismanlar T, Aslan AT, Turktas H, Memis L, Griese M. Respiratory Bronchiolitis-Associated Interstitial Lung Disease in Childhood: New Sequela of Smoking. *Pediatrics*. 2015;136(4):e1026-9.
117. Soll RF. Prophylactic natural surfactant extract for preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000(2):CD000511.

118. Soll RF. Prophylactic synthetic surfactant for preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000(2):CD001079.
119. Soll RF. Synthetic surfactant for respiratory distress syndrome in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000(2):CD001149.
120. Stahlman MT, Gray MP, Falconieri MW, Whitsett JA, Weaver TE. Lamellar body formation in normal and surfactant protein B-deficient fetal mice. *Lab Invest.* 2000;80(3):395-403.
121. Stanley E, Lieschke GJ, Grail D, Metcalf D, Hodgson G, Gall JA, et al. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(12):5592-6.
122. Suzuki T, Sakagami T, Rubin BK, Nogee LM, Wood RE, Zimmerman SL, et al. Familial pulmonary alveolar proteinosis caused by mutations in CSF2RA. *J Exp Med.* 2008;205(12):2703-10.
123. Suzuki T, Sakagami T, Young LR, Carey BC, Wood RE, Luisetti M, et al. Hereditary pulmonary alveolar proteinosis: pathogenesis, presentation, diagnosis, and therapy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182(10):1292-304.
124. Suzuki T, Maranda B, Sakagami T, Catellier P, Couture CY, Carey BC, et al. Hereditary pulmonary alveolar proteinosis caused by recessive CSF2RB mutations. *Eur Respir J.* 2011;37(1):201-4.
125. Tafel O, Latzin P, Paul K, Winter T, Woischnik M, Griese M. Surfactant proteins SP-B and SP-C and their precursors in bronchoalveolar lavages from children with acute and chronic inflammatory airway disease. *BMC Pulm Med.* 2008;8:6.
126. Trapnell BC, Whitsett JA, Nakata K. Pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med.* 2003;349(26):2527-39.
127. Travis WD, Matsui K, Moss J, Ferrans VJ. Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: prognostic significance of cellular and fibrosing patterns: survival comparison with usual interstitial pneumonia and desquamative interstitial pneumonia. *Am J Surg Pathol.* 2000;24(1):19-33.
128. Tredano M, van Elburg RM, Kaspers AG, Zimmermann LJ, Houdayer C, Aymard P, et al. Compound SFTP B 1549C-->GAA (121ins2) and 457delC heterozygosity in severe congenital lung disease and surfactant protein B (SP-B) deficiency. *Hum Mutat.* 1999;14(6):502-9.
129. Tredano M, De Blic J, Griese M, Fournet JC, Elion J, Bahuau M. Clinical biological and genetic heterogeneity of the inborn errors of pulmonary surfactant metabolism. *Clin Chem Lab Med.* 2001;39(2):90-108.

130. Tredano M, Griese M, de Blic J, Lorant T, Houdayer C, Schumacher S, et al. Analysis of 40 sporadic or familial neonatal and pediatric cases with severe unexplained respiratory distress: relationship to SFTP3. *Am J Med Genet A*. 2003;119A(3):324-39.
131. Tredano M, Griese M, Brasch F, Schumacher S, de Blic J, Marque S, et al. Mutation of SFTP3 in infantile pulmonary alveolar proteinosis with or without fibrosing lung disease. *Am J Med Genet A*. 2004;126A(1):18-26.
132. Tredano M, Cooper DN, Stuhmann M, Christodoulou J, Chuzhanova NA, Roudot-Thoraval F, et al. Origin of the prevalent SFTP3 indel g.1549C > GAA (121ins2) mutation causing surfactant protein B (SP-B) deficiency. *Am J Med Genet A*. 2006;140(1):62-9.
133. Vamvakopoulos NC, Modi WS, Floros J. Mapping the human pulmonary surfactant-associated protein B gene (SFTP3) to chromosome 2p12-->p11.2. *Cytogenet Cell Genet*. 1995;68(1-2):8-10.
134. von Neergaard K. Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik. Die Retraktionskraft der Lunge, abhändig von der Oberflächenspannung in den Alveolen. *Z Gesamte Exp Med*. 1929;66:373–94.
135. Vorbroker DK, Profitt SA, Nogee LM, Whitsett JA. Aberrant processing of surfactant protein C in hereditary SP-B deficiency. *Am J Physiol*. 1995;268(4 Pt 1):L647-56.
136. Wambach JA, Yang P, Wegner DJ, An P, Hackett BP, Cole FS, et al. Surfactant protein-C promoter variants associated with neonatal respiratory distress syndrome reduce transcription. *Pediatr Res*. 2010;68(3):216-20.
137. Wambach JA, Casey AM, Fishman MP, Wegner DJ, Wert SE, Cole FS, et al. Genotype-phenotype correlations for infants and children with ABCA3 deficiency. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(12):1538-43.
138. Wang T, Lazar CA, Fishbein MC, Lynch JP, 3rd. Pulmonary alveolar proteinosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2012;33(5):498-508.
139. Wang WJ, Russo SJ, Mulugeta S, Beers MF. Biosynthesis of surfactant protein C (SP-C). Sorting of SP-C proprotein involves homomeric association via a signal anchor domain. *J Biol Chem*. 2002;277(22):19929-37.
140. Wang WJ, Mulugeta S, Russo SJ, Beers MF. Deletion of exon 4 from human surfactant protein C results in aggresome formation and generation of a dominant negative. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 4):683-92.
141. Wang Y, Roller J, Slotta JE, Zhang S, Luo L, Rahman M, et al. Distinct patterns of leukocyte recruitment in the pulmonary microvasculature in response to local and systemic inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013;304(4):L298-305.

142. Warr RG, Hawgood S, Buckley DI, Crisp TM, Schilling J, Benson BJ, et al. Low molecular weight human pulmonary surfactant protein (SP5): isolation, characterization, and cDNA and amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(22):7915-9.
143. Weaver TE, Conkright JJ. Function of surfactant proteins B and C. *Annu Rev Physiol*. 2001;63:555-78.
144. Whitsett JA, Weaver TE. Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. *N Engl J Med*. 2002;347(26):2141-8.
145. Yamano G, Funahashi H, Kawanami O, Zhao LX, Ban N, Uchida Y, et al. ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. *FEBS Lett*. 2001;508(2):221-5.
146. Yancheva SG, Velani A, Rice A, Montero A, Hansell DM, Koo S, et al. Bombesin staining in neuroendocrine cell hyperplasia of infancy (NEHI) and other childhood interstitial lung diseases (chILD). *Histopathology*. 2015;67(4):501-8.
147. Yoshida M, Ikegami M, Reed JA, Chroneos ZC, Whitsett JA. GM-CSF regulates protein and lipid catabolism by alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280(3):L379-86.
148. Young LR, Nogee LM, Barnett B, Panos RJ, Colby TV, Deutsch GH. Usual interstitial pneumonia in an adolescent with ABCA3 mutations. *Chest*. 2008;134(1):192-5.
149. Zhou L, Lim L, Costa RH, Whitsett JA. Thyroid transcription factor-1, hepatocyte nuclear factor-3beta, surfactant protein B, C, and Clara cell secretory protein in developing mouse lung. *J Histochem Cytochem*. 1996;44(10):1183-93.

6.3. Danksagung

Zunächst danke ich meinen Eltern, dass sie mir das Leben geschenkt haben und somit den Grundstein für jeglichen Erfolg in meinem Leben gelegt haben.

Für die Möglichkeit der Durchführung meiner Dissertation am Dr. von Haunerschen Kinderspital möchte ich dem ärztlichen Direktor des Dr. von Haunerschen Kinderspitals, Herrn Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. C. Klein und seinem Vorgänger Prof. Dr. med. Dr. h. c. D. Reinhardt danken. Auch an den ehemaligen Leiter der Forschungslabors des „KUBUS“, Herrn Prof. Dr. med. A. Roscher, richtet sich mein Dank.

Vor allem meinem Doktorvater, Professor Dr. med. Matthias Griese, danke ich sehr herzlich, dass er in all den Jahren den Glauben an die Fertigstellung dieser Arbeit nicht verloren hat, stets ansprechbar war und mich mit seiner großartigen wissenschaftlichen Expertise unterstützt und angeleitet hat. Nicht weniger dankbar bin ich meinem ehemaligen Laborleiter Dr. rer. nat. Ralf Zarbock für seine Unterstützung vor allem in den Bereichen der genetischen Analysen und deren Auswertungen, aber auch für die Hilfe bei statistischen Fragen. Dem gesamten Laborteam danke ich für die gute Zusammenarbeit und die gemeinschaftliche Atmosphäre, die das Arbeiten in weniger erfolgreichen Phasen erleichtert hat. Besonders Traudl Wesselak und Andrea Schams danke ich für ihre unermüdliche Unterstützung.

Für die gute Kooperation bezüglich der Zusendung von Bio-Materialien und klinischen Informationen möchte ich den Ärzten der externen Kliniken und pulmologischen Zentren herzlich danken. Nur durch eine enge Zusammenarbeit und regen Austausch können die Erkenntnisse auf dem Gebiet der seltenen und sehr seltenen Krankheiten vorangebracht werden.

Bei allen Herausforderungen, die im Laufe meines Studiums und mit dieser Arbeit auftraten, konnte ich im privaten Bereich stets auf die Unterstützung meines wundervollen Mannes und meiner lieben Freunde vertrauen. Besonders meine Bio-Mädels Anna, Bianca, Tamara und Tina, haben mir wie ein sicherer Hafen Halt und Kraft gegeben und mich immer wieder motiviert, weiterzumachen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema
„Die hydrophoben Surfactantproteine B und C: biochemische Analyse in bronchoalveolärer Lavage und genetische Analyse bei Neugeborenen und Kindern mit chronischer pulmonaler Symptomatik“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 13.02.2018

Elke Lorenz

Ort, Datum

Unterschrift