



# **Pulmonale Alveolarproteinose**

Granulozyten-Makrophagen  
Kolonie-stimulierender Faktor  
in neutrophilen Granulozyten und Monozyten

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik  
im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Direktor: Prof. Dr. med. C. Klein**

# **Pulmonale Alveolarproteinose GM-CSF in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen**



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

vorgelegt von  
Anke Sibbersen  
aus Husum  
2018

Mit Genehmigung der Medizinische Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Griese  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Andrea Koch  
PD Dr. med. Gerhard Wolf

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

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2018

## Widmung

Meinen Eltern.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1. Pulmonale Alveolarproteinose	
1.1.1 Definition pulmonale Alveolarproteinose	
1.1.2 Epidemiologie pulmonale Alveolarproteinose	
1.1.3 Ätiologie der pulmonalen Alveolarproteinose	
1.1.3.1 Pathophysiologie	
1.1.3.2 Surfactant	
1.1.4 Klinik der pulmonalen Alveolarproteinose	
1.1.5. Diagnose der pulmonalen Alveolarproteinose	
1.1.6 Therapie der pulmonalen Alveolarproteinose	
1.2 Signaltransduktion	
1.2.1 Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor	
1.2.2 Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor Rezeptor	
1.2.3 Signal transducer and activator of transcription 5	
<b>2. Zielsetzung</b> .....	9
<b>3. Material und Methoden</b> .....	10
3.1 Patienten- und Kontrollgruppen	
3.2 Gewinnung und Lagerung der diagnostischen Lavage und Blutproben	
3.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay	
3.3.1 GM-CSF-Bestimmung	
3.3.2 Surfactantproteine A und D	
3.3.3 Gesamtprotein	
3.4 GM-CSF-Antikörper-Bestimmung	
3.5 Zellisolation	
3.6 Clearance Assay	
3.7 Fluorescence Activated Cell Sorting	
3.8 Statistische Auswertung	
<b>4. Ergebnisse</b> .....	20
4.1. Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor	
4.2. Antikörper gegen Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor	
4.3. Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor Rezeptorketten	
4.4. Clearance Assay der neutrophilen Granulozyten	
4.5. Stimulierbarkeit der Zellen durch GM-CSF	

<b>5. Diskussion</b> .....	34
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	39
<b>7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b> .....	41
<b>8. Literaturverzeichnis</b> .....	42
<b>9. Anhang</b> .....	47
9.1. Tabellen	
9.2. Vorversuche	
9.3. Danksagung	

## Abkürzungsverzeichnis

CD116	alpha-Kette des Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor-Rezeptors
CD131w	beta-Kette des Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor-Rezeptors
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell-Sorting
FCS	Fetal Calf Serum = fötales bovines Serum
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
GMCSFR	Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor-Rezeptor
GMCSFRa	alpha-Kette des Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor-Rezeptors
GMCSFRb	beta-Kette des Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor-Rezeptors
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MFIR	Mean Fluorescence Intensity Ratio
PAP	pulmonale Alveolarproteinose
PAP-Abs	adulte Patienten mit PAP ohne Nachweis von GM-CSF-Antikörpern
PAP+Abs	adulte Patienten mit PAP mit Nachweis von GM-CSF-Antikörpern
PAP juvenil	juvenile Patienten mit PAP
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells (Monozyten)
PMN	Polymorph-Nuclear Cells (Neutrophile Granulozyten)
pSTAT5	Phosphorylierter Signal transducer and activator of transcription 5
SPA	Surfactant Protein A
SPD	Surfactant Protein D
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
TP	Total Protein in der bronchoalveolären Lavage
WLL	Whole Lung Lavage

# 1. Einleitung

## 1.1 Pulmonale Alveolarproteinose

### 1.1.1 Definition pulmonale Alveolarproteinose

Die pulmonale Alveolarproteinose (PAP) ist eine Gruppe seltener heterogener Erkrankungen der Lunge, bei der sich Surfactant durch eine Fehlfunktion des Surfactantsekretionssystems oder der Surfactant phagozytierenden Alveolarmakrophagen in der Lunge ansammelt. Das Surfactant ist eine grenzflächenaktive Substanz (englisch: surface active agent), besteht aus Surfactantproteinen und Phospholipiden und reduziert die Oberflächenspannung in den Alveolen. Durch das Surfactant wird ein Kollaps der Alveolen verhindert. Sammelt sich nun übermäßig viel Surfactant in den Alveolen, wird der Gasaustausch behindert. Es resultiert zunächst eine partielle, ganz spät eine globale respiratorische Insuffizienz.

### 1.1.2 Epidemiologie pulmonale Alveolarproteinose

Die pulmonale Alveolarproteinose ist eine sehr seltene Erkrankung, von der weniger als 1 von 100000 Menschen betroffen sind. Die Prävalenz der erworbenen pulmonalen Alveolarproteinose beträgt 3,7/1mio, die Inzidenz der Erkrankung 0,36/1mio [1]. Das mittlere Lebensalter bei Diagnosestellung beträgt 39 Jahre, es sind vor allem Männer betroffen, von denen 72% rauchen oder geraucht haben [2]. Im Jahr 1953 wurde die Erkrankung pulmonale Alveolarproteinose erstmals bei einem Patienten von Dr. Benjamin Castleman im Massachusetts General Hospital diagnostiziert. Rosen et al. beschrieb 1958 anhand von 26 Patienten dasselbe Krankheitsbild. Bei allen Patienten fiel als Besonderheit dieser Erkrankung proteinreiches Periodic Acid Schiff (PAS)-positives Material in den Alveolen bei gleichzeitigem Fehlen von Zellinfiltration und normalen interalveolären Septen auf [3].

1965 stellten Larson und Gordinier die Hypothese auf, dass es sich bei dem lipidreichen Material in den Alveolen um Surfactant handelt, das sich aufgrund einer Überproduktion, eines Defektes im Abbau oder aufgrund eines anormalen Surfactants ansammelt [4].

### **1.1.3 Ätiologie pulmonale Alveolarproteinose**

Bei der pulmonalen Alveolarproteinose sammeln sich Surfactantlipide und -proteine, die physiologischerweise in der Lunge gebildet und abgebaut werden, in den Alveolen der Lunge an und behindern den Gasaustausch. Ursache dessen ist ein verminderter Abbau des Surfactants durch eine Fehlregulation durch GM-CSF aus unten aufgeführten Gründen. Zusätzlich kann es durch eine Fehlfunktion der Makrophagen zu einer vermehrten Infektanfälligkeit kommen.

#### **1.1.3.1 Pathophysiologie pulmonale Alveolarproteinose**

Es gibt unterschiedliche Ursachen für eine Akkumulation von Surfactant in den Alveolen, die zum Bild der pulmonale Alveolarproteinose führen. Hier werden vier Gruppen der PAP unterschieden: adulte Patienten mit neutralisierenden Antikörpern gegen GM-CSF, adulte Patienten ohne Nachweis dieser Antikörper, juvenile und sekundäre PAP-Patienten. Zusätzlich gibt es auf der Insel La Réunion eine Gruppe von Patienten, die an einer Pulmonalproteinose-ähnlichen Erkrankung leiden. Diese Gruppe wurde in dieser Arbeit aufgrund der guten Abgrenzbarkeit hier nachgewiesener Gendefekte vernachlässigt [5].

Bei einem überwiegenden Teil der adulten PAP-Patienten (ca. 90 %) können hohe Level der Antikörper gegen das Zytokin GM-CSF nachgewiesen werden, pathophysiologisch handelt es sich bei diesen Patienten um eine erworbene Autoimmunerkrankung.

GM-CSF stimuliert die Alveolarmakrophagen zum Surfactant-Abbau, bei Anwesenheit von Antikörpern wird das GM-CSF durch die Antikörper abgefangen und neutralisiert. Das Surfactant sammelt sich dann im Alveolarraum der Lunge, der Gasaustausch wird behindert. Manchmal kann ein GM-CSF-Rezeptorgendefekt ursächlich bei Patienten, die keine Antikörper gegen das Zytokin haben, nachgewiesen werden. Diese Rezeptorgendefekte der  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Kette des GM-CSF-Rezeptors werden unter anderem auch der hereditären PAP zugrunde gelegt und wurden bereits bei einigen juvenilen PAP-Patienten nachgewiesen. Bislang wurden 6 Mutationen der  $\beta$ -Kette beschrieben [6-8] sowie 21 Patienten mit  $\alpha$ - Ketten-Mutationen [9-15]. Zudem gibt es Mutationen der Surfactant-Proteine B oder C oder ABCA3-Mutationen, die ebenfalls zum klinischen Bild der pulmonalen Alveolarproteinose führen.

Der Erkrankung der sekundären pulmonalen Alveolarproteinose liegt meist eine Fehlfunktion der Alveolarmakrophagen- durch hämatoonkologische Grunderkrankungen

wie Fanconi Anämie [16, 17], myelodysplastischem Syndrom [18, 19], einer akuten oder chronischen myeloischen Leukämie [20, 21], durch Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis [22] oder Amyloidose [23] oder durch Inhalation von anorganischem Staub [24-28]- zugrunde.

### **1.1.3.2 Surfactant**

Surfactant ist die Abkürzung für Surface Active Agent, es besteht aus Lipiden und Proteinen und kleidet die Innenseite der Alveolen aus. Surfactant verhindert das Zusammenfallen der Lunge durch eine Reduzierung der Oberflächenspannung in den Alveolen. Zusätzlich schützt es die Lunge vor Verletzungen und Infektionen durch Mikroorganismen oder eingeatmete Partikel. Surfactant wird etwa ab der 24. SSW in Typ II-Pneumozyten gebildet. Bei der PAP führt eine zu hohe Menge an Surfactant in den Alveolen zu einer restriktive Lungenerkrankung.

Es gibt vier unterschiedlichen Surfactantproteine, die in zwei Gruppen unterteilt werden: die hydrophilen Surfactantproteine SP-A und SP-D und die hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C. Jedes Surfactantprotein hat eine spezielle Funktion. SP-B und SP-C verbinden sich mit den Surfactantlipiden und reduzieren die Oberflächenspannung, SP-A und SP-D spielen aufgrund ihrer Bindungswalenz von Liganden wie Calcium, Zucker oder Lipiden eine wichtige Rolle in der Abwehr der Lunge, indem sie pathogene Keime opsonieren [29].

SP-A knockout Mäuse haben eine normale Lungenmorphologie mit unauffälliger Zusammensetzung des Surfactant und entsprechender Compliance, jedoch sind sie anfälliger für Infektionen mit Bakterien und Viren wie B-Streptokokken oder Influenza [30, 31]. Ein SP-A-Monomer ist ein 32 kDa großes Protein, ein voll prozessiertes SP-A besteht aus achtzehn Monomeren.

SP-D knockout Mäuse sind ebenfalls durch eine vermehrte Infektanfälligkeit gekennzeichnet, zusätzlich haben sie jedoch vor allem eine Prädisposition für chronische Entzündung sowie eine allergische Dysregulation [32]. SP-D besteht aus zwölf jeweils 43 kDa großen Monomeren.

Die Instandhaltung des Surfactants ist wichtig für die Aufrechterhaltung der Lungenfunktion und wird durch aufeinander abgestimmte Produktion, Sekretion, Wiederaufnahme, Wiederverwertung und Verwertung strikt geregelt [33].

GM-CSF ist der wichtigste Regulator des Surfactantkatabolismus in den Alveolarmakrophagen.

### **1.1.4 Klinik der pulmonalen Alveolarproteinose**

Erste Symptome der adulten PAP sind Dyspnoe und Husten, selten sind thorakale Schmerzen, Hämoptysen, Fieber oder Gewichtsverlust führende Symptome.

Auskultatorisch zeigen sich bei 50 % der Patienten inspiratorische Knistergeräusche.

Von 410 veröffentlichten Fällen von PAP-Patienten betrug die mittlere Dauer zwischen Symptombeginn und Diagnosestellung 7 Monate.

Die Erkrankung tritt häufiger bei Männern als bei Frauen auf ( $\text{♂}:\text{♀}=2,65:1,0$ ).

Männer erkranken durchschnittlich im 39. Lebensjahr, Frauen im 35. Lebensjahr.

75% der Männer und 39% der Frauen waren zu Beginn der Erkrankung Raucher [2].

Die hereditäre PAP präsentiert sich als eine progrediente Tachydyspnoe und eine Gedeihstörung [9]. Rezidivierende Infektionen oder Husten sind bei Kindern kein Leitsymptom.

### **1.1.5 Diagnose der pulmonalen Alveolarproteinose**

Laborchemisch zeigen sich bis auf eine leicht erhöhte Laktatdehydrogenase und möglicherweise eine Hypoxämie bei Stress in der BGA keine Auffälligkeiten.

Die Lungenfunktionstestung kann einen Normalbefund zeigen, häufig jedoch sind die Vitalkapazität und vor allem die totale Lungenkapazität im Rahmen der restriktiven Ventilationsstörung erniedrigt.

Im Röntgen Thorax findet sich eine perihiläre Zeichnungsvermehrung, die häufig nicht mit der Schwere der Erkrankung korreliert. In der CT des Thorax ist ein sogenanntes „crazy paving“ zu sehen, das durch milchglasartige Verschattungen und intralobuläre Verdickungen zustande kommt. Diese Veränderungen sind nicht spezifisch für eine PAP, jedoch korreliert die Schwere der Erkrankung mit ihnen [34].

In der bronchoalveolären Lavage findet sich eine charakteristische Zusammensetzung: Die Lavageflüssigkeit ist milchig trüb und es finden sich charakteristischerweise Schaumzellen oder Monozyten-ähnliche Makrophagen und eine erhöhte Anzahl an Makrophagen in der Flüssigkeit. Ebenso finden sich große azelluläre eosinophile Anteile sowie granuläres, PAS-positives Material und eine erhöhte Konzentration an Surfactantproteinen in der Lavage [35].

Der Goldstandard zur Diagnose der PAP ist die Lungenbiopsie. Intraalveolär findet sich histologisch ein amorphes eosinophiles, feingranuläres, lipidreiches Material.

Zudem gibt es die Möglichkeit des Mutationsnachweises bei den hereditären PAP sowie die Antikörperbestimmung bei Patienten mit erworbener Erkrankung.

### **1.1.6 Therapie der pulmonalen Alveolarproteinose**

Die Therapie der Wahl bei der pulmonalen Alveolarproteinose ist die Ganzlungenlavage. Die juvenilen Patienten werden durch einen liegenden Tubus mittels Absaugkatheter lavagiert. Es wird vierfach eine 0,9% Kochsalzlösung instilliert und wieder abgesaugt. Das hierbei instillierte Volumen beträgt bis zu 15 ml/kg Körpergewicht. Um die rechte Lungenseite zu lavagieren, wird das Kind auf der linken Körperhälfte gelagert, für die linke Lungenseite erfolgt die Lagerung auf der rechten Körperhälfte. Die adulten Patienten werden durch ein Bronchoskop lavagiert. Hier betrug das instillierte Volumen ebenfalls minimal 1ml/kg Körpergewicht, maximal jedoch 50 ml NaCl 0,9 %. Nach der WLL kommt es zu einer sofortigen Symptomverbesserung, das Intervall zwischen den WLL wird individuell bestimmt. Das mittlere beschwerdefreie Intervall adulter Patienten beträgt 15 Monate.

Es gibt verschiedene Ansätze anderer Therapien wie die Zufuhr von GM-CSF durch Inhalation [36] und die Elimination der Antikörper durch z.B. B-Zell-Suppression oder Plasmapherese.

### **1.2 Signaltransduktion**

Der erste Schritt zum Verständnis der Pathophysiologie der pulmonalen Alveolarproteinose war die Entdeckung, dass GM-CSF-knockout-Mäuse eine Erkrankung entwickeln, die biochemisch, pathologisch, physiologisch, histologisch und ultrastrukturell der menschlichen PAP sehr ähnlich ist. Auch bei den Mäusen wurde festgestellt, dass eine Ansammlung von PAS-positiven Material in der Lunge auf einen verminderten Abbau und nicht eine Überproduktion zurückzuführen ist [37].

Ebenfalls haben Versuche mit GM-CSF-knockout-Mäusen ergeben, dass GM-CSF für den Surfactantabbau, verschiedene Immunabwehrfunktionen und die Alveolarmakrophagendifferenzierung essentiell ist [38].

Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) ist ein Zytokin, das an einen spezifischen Rezeptor auf Alveolarmakrophagen bindet. Dieser Rezeptor besteht aus einer GM-CSF bindenden  $\alpha$ -Kette und einer nicht-bindenden Janus Kinase 2 (JAK2) –assoziierten, Affinitäts-erhöhenden  $\beta$ -Kette [39].

Bindet nun GM-CSF an die  $\alpha$ -Kette des GM-CSF-Rezeptors, fusioniert dieser mit der  $\beta$ -Kette, JAK2 wird phosphoryliert. Das aktivierte JAK2 phosphoryliert signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) und das phosphorylierte STAT5

(pSTAT5) fördert viele verschiedene Zellfunktionen, unter anderem den Surfactantabbau durch Alveolarmakrophagen [40]. Diese Funktionen werden über den Transkriptionsfaktor PU.1 reguliert, der die Maturation der Vorläuferzellen zu Alveolarmakrophagen stimuliert.

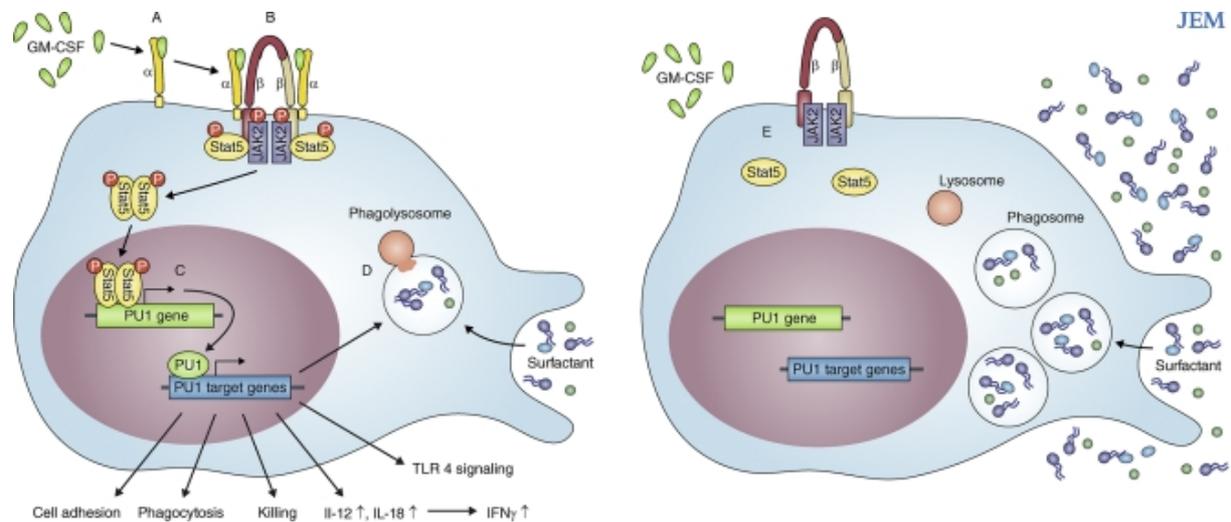


Abb. 1: Signaltransduktion GM-CSF zum Zielgen [41]. GM-CSF bindet an die alpha-Kette des Rezeptors, es erfolgt eine Fusion mit der beta-Kette, die gebundene Januskinase wird phosphoryliert, die STAT5 aktiviert. pSTAT5 wandert in den Zellkern und aktiviert die Zielgene, unter anderem PU.1, ein Transkriptionsfaktor, der unter anderem die Reifung der Alveolarmakrophagen reguliert. Links dargestellt ist die physiologische Signaltransduktion. Auf der rechten Abbildung wird das Ausbleiben der Signaltransduktion durch eine  $\alpha$ -Ketten-Mutation aufgezeigt.

Dagegen bleiben die Surfactantaufnahme durch die Makrophagen und die Typ II-Pneumozyten vom GM-CSF unbeeinflusst [42].

Der GM-CSF/STAT5 Signalweg reguliert zudem die Expression von spezifischen Zielgenen wie das Protoonkogen pim-1[43, 44] und Zytokin-induzierte SH2- enthaltende Proteine(CIS) [45].

### 1.2.1 Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)

Burgess und Metcalf entdeckten 1980 ein Zytokin, das Granulozyten und Makrophagen im Knochenmark von Mäusen zum Wachstum anregte [46]. GM-CSF ist ein Glykoprotein, das von verschiedenen Geweben, Zellen des Immunsystems und vom Endothel gebildet wird. GM-CSF wird von T- und B-Zellen, Endothelzellen, Makrophagen und Fibroblasten gebildet. Es stimuliert die Differenzierung von Granulozyten und Makrophagen von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark wie auch die Aktivität dieser Zellen.

Mäuse mit einem Fehlen an GM-CSF oder dessen Rezeptorketten [37, 47, 48] zeigen eine Fehlfunktion der Alveolarmakrophagen, die unter anderem den Abbau des Surfactants vermindert [49, 50].

Die fehlende Signaltransduktion des GM-CSF führt bei Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose zur Ansammlung von Surfactant über die fehlende Reifung der Alveolarmakrophagen und Ansammlung der Phagosomen in den Zellen.

GM-CSF ist ein 23 kDa großes Protein. Das Gen für GM-CSF liegt auf dem langen Arm des Chromosom 5 (5q31.1).

### **1.2.2 GM-CSF-Rezeptor**

Die  $\alpha$ -Kette des GM-CSF-Rezeptors ist 75-85 kDa groß. GM-CSF bindet an die  $\alpha$ -Kette und setzt somit die Signaltransduktion in Gang. Das Gen für GMCSFRa liegt in der pseudoautosomalen Region des X-Chromosoms (Xp22.32) und besteht aus 13 Exons. Eine homologe Sequenz findet sich auch auf dem Y-Chromosom (Yp11.3). Diese Gene unterliegen nicht der X-chromosomalen Inaktivierung. Die betroffenen Patienten sind homozygote Träger einer Mutation oder heterozygote Träger zweier Mutationen. Nur bei Haploinsuffizienz oder bei Inaktivierung des zweiten Allels führen alleinige Mutationen eines Allels zur pulmonalen Alveolarproteinose.

Die  $\beta$ -Kette des Rezeptors teilt sich GM-CSF mit Interleukin 3 und Interleukin 5. Sie ist 120 kDa groß. Das Gen für GMCSFRb liegt auf dem langen Arm von Chromosom 22 (22q12.3).

Trotzdem sich GM-CSF die  $\beta$ -Kette des Rezeptors mit IL-3 und IL-5 teilt, scheint eine Mutation in der  $\beta$ -Kette für die Myelopoese keine große Rolle zu spielen: Mäuse mit  $\beta$ -Ketten-Defizienz entwickeln ein Krankheitsbild, das der pulmonalen Alveolarproteinose ähnelt, es zeigt sich keine verminderte Zellzahl bis auf eine geringe Reduktion dendritischer Zellen [51].

### **1.2.3 signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5)**

STATs sind Proteine, die Signale von Zytokinrezeptoren weiterleiten. Durch Zytokine und Wachstumsfaktoren werden die STATs von einer Rezeptor-assoziierten Kinase phosphoryliert. Durch diese Aktivierung bilden sie Homo- und Heterodimere, translozieren in den Zellkern, binden an spezielle DNS-Sequenzen, die GAS ( $\gamma$ -Interferon-aktivierte Sequenzen) und aktivieren die Transkription spezifischer Zielgene. Sie sind bei verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt, wie z.B. im Immunsystem bei

der T-Zell-Rezeptor(TCR)- Signalwirkung, der Apoptose und der adulten Brustdrüsenentwicklung.

Eine Überfunktion von STAT5 kann zu soliden Tumoren, Leukämien und myelodysplastischen Syndromen führen.

Es gibt sieben unterschiedliche signal transducer and activator of transkription [52, 53].

STAT5 wurde erstmals 1991 in der Brustdrüse der Maus entdeckt und zunächst als mammary gland factor (MGF) bezeichnet [54], wegen seiner Ähnlichkeit zur STAT Familie jedoch in STAT5 umbenannt. STAT5 wurde zunächst nur im Mausmodell beschrieben [55-57]. Später wurde von drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander ein weiteres STAT5 entdeckt und wegen seiner Ähnlichkeit zum STAT5 STAT5B genannt [58-60]. Es gibt also zwei Isotypen des Transmitters: STAT5A und STAT5B [58-60]. Beide STATs werden durch Phosphorylierung an einem Tyrosinrest aktiviert [58, 59]. Die Gene für das humane STAT5A und STAT5B liegen auf dem Chromosom 17 (17q11.1 bis q22) nebeneinander und sind 10 kB voneinander entfernt.

Durch Splicing und proteolytische Prozessierung wird die Funktion der Proteine entscheidend verbessert [61]. Das humane STAT5A ist 94 kDa groß und besteht aus 794 Aminosäuren, das STAT5B ist 92 kDa groß und besteht aus 787 Aminosäuren [59, 62]. Durch posttranslationales proteolytisches Prozessieren werden die STATs auf 77 kDa, bzw. 80 kDa verkleinert [63, 64].

Die beiden STAT5 sind einander sehr ähnlich: Beide haben fünf Domänen, die strukturell und funktionell allen STATs gemeinsam sind, und die Signaltransduktion ermöglichen [65]. Der C-Terminus von STAT5A, bzw. STAT5B ist mit 8, bzw. 20 Aminosäuren unterschiedlich. Gemeinsam ist ihnen mit allen STATs die SH2-Domäne, die zwischen der 593. und 670. Aminosäure liegt und für die Rezeptor-spezifische Rekrutierung und Dimerisation der STAT-Proteine [66] über ein phosphorylierten Tyrosin-Rest der SH2-Domäne zuständig ist [57, 67].

STAT5A/B werden von Interleukin-2 (IL-2) [68], IL-3 [60], IL-5 [60], und IL-7 [69], Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor [60, 70], Insulin [71], Erythropoietin [57], Thrombopoietin und dem Wachstumshormon GH aktiviert.

Bei Patienten mit einer Mutation des STAT5B-Gens findet man eine Wachstumsretardierung sowie eine vermehrte Infektanfälligkeit durch T-Zell-Lymphopenie [72, 73]. Bisher sind keine Mutationen der STAT5 beschrieben worden, die zur pulmonalen Alveolarproteinose führen.

## 2. Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den angeborenen und erworbenen pulmonalen Alveolarproteinosen. In diesem Zusammenhang wurde vor allem das Zytokin Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor und dessen Einfluss auf die neutrophilen Granulozyten und Monozyten untersucht und somit die Signaltransduktion, die zum Abbau der Surfactantproteine führt.

Die Ziele dieser Arbeit lassen sich in folgenden konkreten Fragestellungen zusammenfassen:

### *Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor*

1. Wie verhalten sich die GM-CSF-Level der unterschiedlichen PAP-Gruppen zu Kontrollgruppen und zueinander?
2. Besteht ein Zusammenhang zwischen GM-CSF-Level und GM-CSF-Antikörperlevel in den Erkrankungsgruppen?
3. Wie viel Surfactant befindet sich in der bronchoalveolären Lavage der PAP-Patienten und wie hoch ist es im Vergleich zu dem GM-CSF-Level?

### *Einfluss von GM-CSF auf neutrophile Granulozyten und Monozyten*

1. Sind die Zellen Erkrankter in der Lage GM-CSF aufzunehmen?
2. Exprimieren die Zellen von PAP-Patienten mit GM-CSF-Rezeptormutation nach GM-CSF-Stimulation die entsprechenden Rezeptoren?
3. Verändert sich der Phosphorylierungsstatus von STAT5 bei Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose nach GM-CSF-Stimulation?

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Patienten- und Kontrollgruppen

In dieser Arbeit wurden Patienten des Kinderlungenregisters auf Störungen in der GM-CSF Signaltransduktion, und adulte PAP-Patienten mit bisher unbekannter Ätiologie auf Antikörper gegen GM-CSF untersucht. Patienten mit sekundärer Proteinose bei malignen oder chronischen Erkrankungen wurden in diese Arbeit nicht einbezogen. Ebenso wurde die Gruppe der Patienten der Insel La Réunion im Indischen Ozean ausgeschlossen. Ein zusätzliches Einschlusskriterium war das Vorhandensein von Materialien wie Serum, bronchoalveolärer Lavage, möglichst DNA und klinischer Daten (Abb.2).

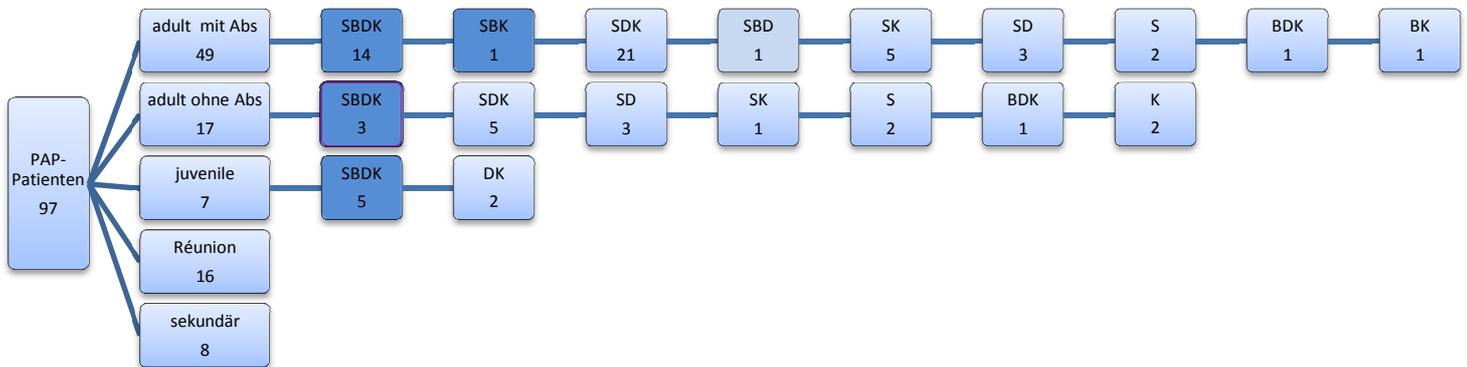


Abb. 2 Subkategorie PAP-Patienten

Dargestellt sind die Subkategorien der PAP-Patienten (adult mit Abs: adulte PAP-Patienten mit Nachweis von GM-CSF-Antikörpern, adult ohne Abs: adulte Patienten ohne Antikörpernachweis) mit vorhandenen Materialien (S=Serum, B=BAL, D=DNA, K=Klinik). Verwendet wurden die violett markierten Patienten.

Das Patientenkollektiv bestand aus fünf Patienten mit juveniler pulmonaler Alveolarproteinose (J), fünfzehn Patienten mit adulter pulmonaler Alveolarproteinose, bei denen Antikörper gegen das GM-CSF nachgewiesen werden konnten (A) und drei Patienten mit adulter pulmonaler Alveolarproteinose ohne GM-CSF-Antikörper (O) (Abb.2 und Tab.1)

Tab.1 Patientenkollektiv (s. Anhang Tab.1)

PAP-Patienten	n	weiblich	männlich	Alter bei Probenentnahme
J	5	4	1	9,2 [1-11] Jahre
A	15	7	8	41,6 [25-53] Jahre
O	3	1	3	44,3 [35-43] Jahre

Als Kontrollen wurden Patienten mit der Diagnose Asthma bronchiale (n=24) und akute oder chronische Bronchitis (n=34/24) eingeschlossen, die eine diagnostische bronchoalveoläre Lavage erhielten. Bei der Auswahl waren ein zusätzliches Einschlusskriterium das Vorhandensein von Serum, bronchoalveolärer Lavage und DNA sowie die Daten des klinischen Phänotyps.

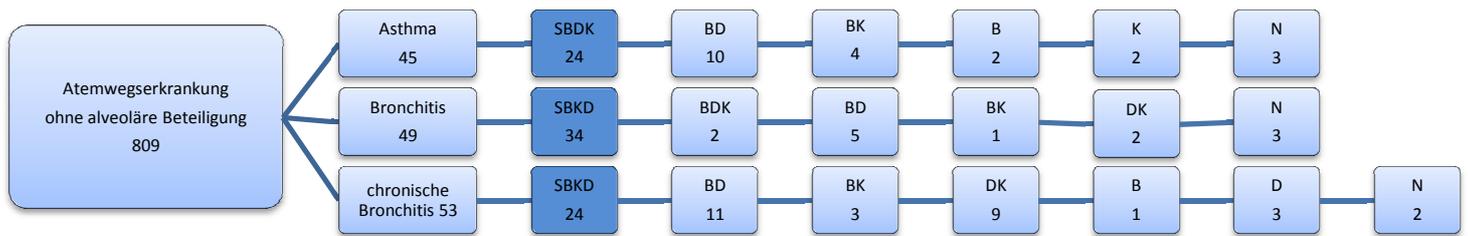


Abb. 3 Kontrollen

Darstellung der Kontrollgruppe mit vorhandenen Materialien (S=Serum, B=BAL, D=DNA, K=Klinik). Verwendet wurden die dunkel markierten Patienten.

Um eine akute Entzündungsreaktion auszuschließen, wurde zusätzlich ein Anteil neutrophiler Granulozyten an der Gesamtzellzahl in der bronchoalveolären Lavage im Referenzbereich gefordert. Der Referenzwert beträgt bis zu fünf Prozent, bzw. bei Kindern unter dem fünften vollendeten Lebensjahr ein Anteil an neutrophilen Granulozyten von maximal zehn Prozent.

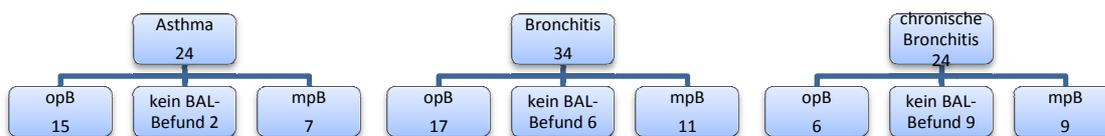


Abb. 4 Neutrophile Granulozyten in der BAL der Kontrollgruppe

Darstellung der Einschlusskriteriums neutrophiler Granulozytenanteil < 5 %, bzw. bei Kindern unter dem 5. Lebensjahr Anteil < 10 % bei den Bronchitissubkategorien Asthma bronchiale, akute Bronchitiden und chronische Bronchitiden.

Somit setzte sich die Kontrollgruppe für die biochemischen Analysen (C) aus achtunddreißig Patienten zusammen. Davon haben fünfzehn Patienten ein Asthma bronchiale, siebzehn Patienten eine akute Bronchitis und sechs Patienten eine chronischer Bronchitis.

Die Indexpatientin für die Funktionsassays war eine juvenile PAP-Patientin, die zum Zeitpunkt der Untersuchung 12 Jahre alt war. Die Patientin ist homozygote Trägerin einer C>A Nucleotidsubstitution des CSF2RA-Gen im Exon 3 (c.74C>A), die zu einem Austausch von Serin (TCG) an Position 25 der Aminosäuren zu einem Stopcodon (TAG) der Translation führt.

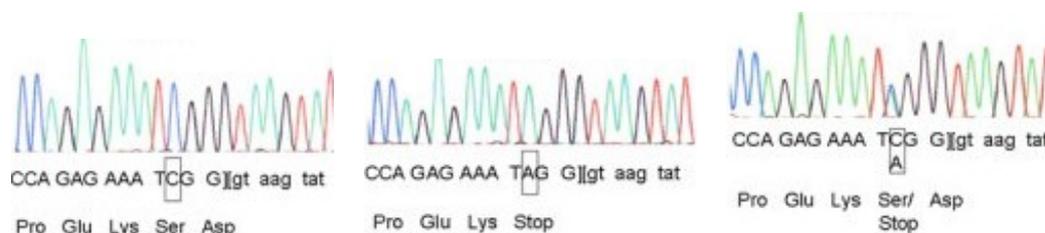


Abb. 5 Basensequenz der Indexpatientin

Sequenzierung des Exon 3 des CSF2Ra einer Kontrolle (linke Seite), der Patientin (Mitte) und der Eltern (rechte Seite). An Position 25 zeigt sich die Mutation des Cytosin zu einem Adenosin, bei der Translation wird das Serin somit zu einem Stopcodon.

Die Eltern der Patientin sind konsanguin (Cousine und Cousin 1. Grades) und türkischer Herkunft. Beide Elternteile sind heterozygote Träger der CSF2Ra-Mutation. Klinisch war die Patientin im Alter von zweieinhalb Jahren an einer pulmonalen Alveolarproteinose mit Gedeihstörung und chronischer Tachypnoe erkrankt. Beide Elternteile waren symptomfrei.

Therapieversuche mit Azathioprin, Steroiden, inhaliertem und subkutan gegebenem GM-CSF waren ohne Benefit. Zum Zeitpunkt der Untersuchung erhielt die Patientin eine intensivierete Therapie mit monatlichen therapeutischen Ganzlungenlavage. Unter dieser Therapie kam es zu einer vollständigen Remission der respiratorischen Insuffizienz.

Die Kontrollgruppe für die Funktionsassays (K) ist ebenfalls in Tabelle 2 gelistet. Für die Zellversuche an den neutrophilen Granulozyten und Monozyten wurden zur Kontrolle die Zellen 4 gesunder Erwachsener und 2 gesunder Kinder verwendet.

Tab. 2 Kontrollgruppen (siehe Anhang Tabelle 2 und 3)

Kontrollen	n	weiblich	männlich	Alter bei Probenentnahme
C	38	13	25	7,3 [1-17] Jahre
K	6	4	2	20,3 [6-27] Jahre

Die Untersuchung wurde mit Einverständnis der Patienten und deren Eltern vorgenommen. Die Ethikkommission der LMU hat der Analyse und Auswertung der Daten zugestimmt (Schreiben vom 25.03.2011).

### **3.2 Gewinnung und Lagerung der diagnostischen Lavage und Blutproben**

Die juvenilen Patienten wurden durch einen liegenden Tubus mittels gewedgtem Absaugkatheter lavagiert. Es wurde vierfach eine 0,9% Kochsalzlösung instilliert und wieder abgesaugt. Das hierbei instillierte Volumen betrug 1 ml/kg Körpergewicht. Um die rechte Lunge zu lavagieren, wurde das Kind auf der linken Körperseite gelagert, für die linke Lunge lag die Patientin in Rechtsseitenlage.

Bei den adulten Patienten wurde durch ein Bronchoskop lavagiert. Hier betrug das instillierte Volumen ebenfalls minimal 1ml/kg Körpergewicht, maximal jedoch 50 ml NaCl 0,9 %.

Die hierbei gewonnenen Proben sowie die Blutproben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Für die Funktionsassays wurde frisch entnommenes heparinisiertes Blut unmittelbar nach der Blutentnahme bearbeitet.

### **3.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay**

#### **3.3.1 Quantitative GM-CSF-Bestimmung**

Die Quantitative GM-CSF-Bestimmung wurde mit dem „Human GM-CSF Platinum ELISA“ von eBioscience durchgeführt. Hierbei wurden zunächst die Proben in einem Probenpuffer auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Das in der Probe enthaltene GM-CSF wurde auf der Mikrotiterplatte von GM-CSF-Antikörpern gebunden. Diese Proben wurden nun für 3 Stunden mit einem Zweitantikörper gegen GM-CSF inkubiert und der Überstand nach dieser Inkubationszeit ausgewaschen. Durch das an den Zweitantikörper gebundene Katalysatorenzym Meerrettichperoxidase kam es während einer Inkubation mit Tetramethylbenzidin zu einer blauen Farbreaktion. Nach 10 Minuten wurde diese Farbreaktion mit Phosphorsäure gestoppt, hierbei erfolgte ein Farbumschlag ins Gelbe. Diese enzymatisch hervorgerufene Farbreaktion wurde bei 450 nm quantifiziert und mit einer ebenfalls aufgetragenen Standardreihe verglichen. Konzentrationen unter 1,3 pg/ml konnten hierbei nicht mehr quantifiziert werden. Die Berechnung der Standardkurve erfolgt mit der Biolise Software.

### 3.3.2 Surfactanproteine

#### Quantitative SP-A Bestimmung

Der Festphasenantikörper PC-6 (monoklonaler Maus Antikörper gegen humanes SP-A, Kaoru Taniguchi Japan) wurde in einer Konzentration von 2 µg/ml in Carbonatpuffer (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 mM, NaHCO<sub>3</sub> 35 mM, in H<sub>2</sub>O lösen, auf pH 9,6 einstellen) gelöst, davon wurden jeweils 100 µl pro Well der Mikrotiterplatte (Nunc, Maxisorp C96) aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Überstand wurde verworfen. Es folgte die Inkubation über eine Stunde bei 37 °C mit Bovinem Serum Albumin V (Paesel+Lorei No. 42160223), gelöst in 200 µl/Well TBS Puffer (Tris-HCl 10 mM, NaCl 140 mM, Triton-X 100 0,1 %, in H<sub>2</sub>O lösen, auf pH 7,4 einstellen). Für die Standardreihe wurde das Antigen A (humanes rekombinantes SP-A, Byk Gulden) in den Verdünnungen von 100 ng/ml bis 1,5 ng/ml in Blockpuffer gelöst aufgetragen. Es wurden 2 Standardreihen erstellt. Die Patientenproben wurden mit dem TBS Puffer, der 10mM EDTA enthielt, fünffach verdünnt und im Ultraschallbad 1 Minute homogenisiert und mit Triton X 22 %, gelöst in H<sub>2</sub>O, auf eine 5,5 fache Verdünnung eingestellt. Es folgte die Zentrifugation bei 10.000 \*g. 100 µl des Überstandes wurden auf der Mikrotiterplatte 1:1 mit Blockpuffer verdünnt. Es erfolgte die erneute Inkubation bei 37 °C über eine Stunde. Danach wurde die Platte dreimalig mit Pufferlösung gewaschen. Anschließend wurden 100 µl des SP-A-Antikörpers (polyklonaler Kaninchen Antikörper gegen humanes rekombinantes SP-A, ByK Gulden) in einer zehntausendfachen Verdünnung in Blockpuffer (1% BSA in TBS Puffer) aufgetragen und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Es erfolgte die erneute dreimalige Waschung mit Pufferlösung. Dann erfolgte die Auftragung des 1:5000 in TBS Puffer verdünnten Anti Kaninchen IgG von der Ziege gekoppelt mit einer Meerrettichperoxidase (Dianova), danach erneute Inkubation bei 37 °C mit dreimaligem Waschen. Als Substratreaktion wurde ABTS (Boehringer Nr. 1112427) durch die Peroxidase des 2. Antikörpers in ein chromophores Produkt umgesetzt. Dazu wurde ABTS in einer Konzentration von 1 mg/ml im ABTS Puffer (Boehringer No. 1112597) angesetzt, mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer Endkonzentration von 0,001% versetzt und davon 100 µl aufgetragen. Danach erfolgte die Inkubation auf dem Schüttler für 30-60 Minuten. Die Absorptionsmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm. Die Berechnung der Standardkurve erfolgte mit der Biolise Software.

### **Quantitative SP-D Bestimmung**

Der Festphasenantikörper P 13 (polyklonaler Kaninchenantikörper gegen humanes SP-D, Dr. E. Crouch) wurde ebenfalls in Carbonatpuffer gelöst und in einer Konzentration von 1 µg/ml und einem Volumen von 100 µl in die Wells der Platte pipettiert. Auch hier erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen. Danach erfolgte eine erneute Inkubation über eine Stunde bei 37 °C mit 10 mg/ml BSA in 200 µl /Well TBS Puffer (Tris-HCl 10 mM, NaCl 140 mM, Triton-X 100 0,1 %, CaCl 5 mM, in H<sub>2</sub>O lösen, auf pH 7,4 einstellen). SP-D (humanes rekombinantes SP-D, Dr. E. Crouch) wurde für die Standardreihe in Verdünnungen von 100 ng/ml bis 1,5 ng/ml in Blockpuffer gelöst aufgetragen. Die Patientenproben wurden 1:4 in Blockpuffer verdünnt und 100 µl in jedes Well pipettiert und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Es folgte die dreimalige Waschung mit Pufferlösung und anschließend die Auftragung des SP-D „Sandwich“ Antikörper (VI F 11, monoklonaler Maus-Antikörper gegen Ratten SP-D, BMA) in einer Verdünnung von 1 µg/ml in Blockpuffer (1% BSA in TBS Puffer), erneut wurde über eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Es erfolgte die erneute dreimalige Waschung, dann folgte die Auftragung des Meerrettichperoxidase-gekoppelten anti-Maus IgG, 1:100 verdünnt in TBS Puffer und die Inkubation bei 37 °C mit anschließendem dreimaligen Waschen. ABTS wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml im ABTS Puffer angesetzt, der 0,001% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enthielt. Davon wurde pro Well 100 µl aufgetragen. Es folgte die Inkubation auf dem Schüttler für 30-60 Minuten. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die Messwerte wurden mit der Biolise Software berechnet.

### **3.3.3 Gesamtprotein**

Die Gesamtproteinkonzentration in den Proben wurde nach der Methode von Bradford bestimmt. Das Bio-Rad Farbstoff-Konzentrat (Bio-Rad Laboratories GmbH No. 500-0006) wurde mit Aqua ad injectabilia 1:5 verdünnt und anschließend zur Befreiung von Präzipitaten filtriert. Für die Standardreihe wurde BSA in PBS Puffer 5000 µg/ml, 2500µg/ml, 1250µg/ml, 625 µg/ml, 312,5 µg/ml, 156,3 µg/ml und 78,15 µg/ml hergestellt. Die Standardreihe wurde doppelt bestimmt, die Proben dreifach. In die Proben wurde 100 µl Farbstoffreagenz pipettiert. Die Absorption wurde bei 600 nm gemessen.

### **3.4 GM-CSF-Antikörper-Bestimmung**

Zunächst wurden in Nunc MaxiSorp C96-Platten 100 µl GM-CSF-Antigen in jedes Well in einer Konzentration von 1 µg/ml pipettiert und in 100 µl Carbonatpuffer (1,59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2,93 g NaHCO<sub>3</sub>, Aqua dest. ad 1000 ml, pH 9,6) pro Well für eine Stunde bei 37 °C gecoatet. Im nächsten Schritt wurde mit 200 µl Blocking Puffer (TBS-T + 1% BSA) pro Well für eine Stunde bei 37 °C geblockt und im Anschluss dreimalig mit TBS-T gewaschen. Die bronchoalveoläre Lavage wurde nun unverdünnt und in den Probenverdünnungen in TBS-T 1:4 und 1:10, die Serumproben wurden in den Verdünnungen 1:750, 1:1500, 1:7500 in einer Menge von 50 µl pro Well aufgetragen und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Messung der Proben erfolgte in Doppelbestimmung. Im Anschluss wurden die Wells dreimalig mit TBS-T gewaschen. Der erste Antikörper (Polyclonal Rabbit Anti-Human IgG/HRP) wurde 1:6000 in Blockingpuffer verdünnt, pro Well wurden 100 µl zupipettiert. Es wurde über eine Stunde bei 37 °C inkubiert und folgend dreimalig mit TBS-T gewaschen. Die Färbung erfolgte mit ABTS-Substrat, es wurde über 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 10 mg ABTS-Substrat in 10 ml ABTS-Puffer 100 µl/well und 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm. Die Auswertung der Messwerte erfolgte mit der Biolise Software, angegeben ist die Abweichung der gemessenen Konzentration von der Negativkontrolle.

### **3.5 Zellisolation**

Das heparinisierte Blut wurde 1:2 mit D-PBS verdünnt und im Mengenverhältnis 1:3 auf erwärmtes Ficoll in ein Falcon-Röhrchen geschichtet. Nach Zentrifugation bei 400 \*g für 30 min haben sich durch die unterschiedliche Dichte mehrere Schichten im Falcon-Röhrchen gebildet. Die oberste Schicht enthielt das Plasma und die Thrombozyten, darunter befand sich eine dünne Schicht mit den Monozyten auf dem Rest vom Ficoll. Die unterste Schicht wurde von den Erythrozyten und Granulozyten gebildet (s.Abb.6).

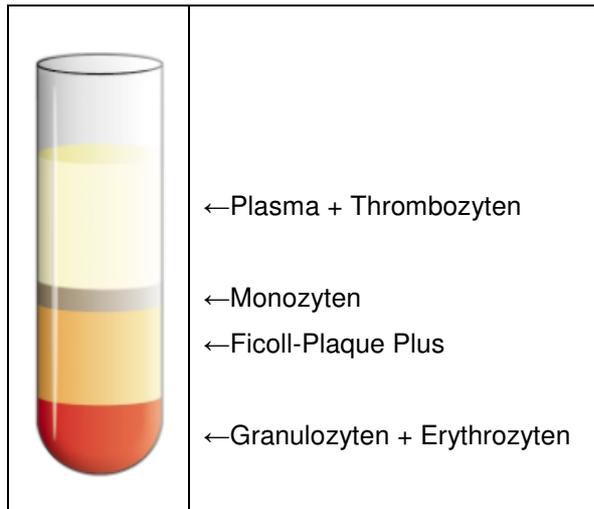


Abb.6 Phasenbildung nach Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll.

Um die Monozyten zu isolieren, wurde die Schicht, in der sich die Monozyten befinden, in ein Falcon-Röhrchen pipettiert und die Zellen wurden zweifach mit 8 ml D-PBS gewaschen. Ein Milliliter Blut ergab ungefähr eine Millionen isolierte Monozyten. Um die neutrophilen Granulozyten zu isolieren, wurden nach der Dichtegradientenzentrifugation die Schichten oberhalb der roten Phase verworfen und die Erythrozyten zweifach mit Ammoniumchloridpuffer lysiert. Aus einem Milliliter Blut wurden mindestens drei Millionen neutrophile Granulozyten isoliert. Die Zellen wurden nach der Isolation in ein geeignetes Medium aufgenommen.

### **3.6 Clearance Assay**

Aus heparinisiertem Blut wurden mit Ficoll durch Dichtegradientenzentrifugation Monozyten und Granulozyten isoliert. Granulozyten und Monozyten wurden getrennt voneinander in RPMI aufgenommen und gezählt. Humanes GM-CSF wurde in einer Konzentration von 1 ng/ml hinzugefügt. Die Lösungen wurden auf 10 Eppendorf-Gefäße aufgeteilt, sodass jedes Gefäß 1 Mio Neutrophile Granulozyten bzw. Monozyten in 1 ml RPMI und 200 pg/ml bzw. 10 pg/ml GM-CSF enthielt. Zu den Zeitpunkten 0 min, 1 min, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 6 h, 12 h, 20 h wurden die Zellen abzentrifugiert und im Überstand der Verbrauch des GM-CSF durch jeweils 1 Mio. Granulozyten oder Monozyten mittels ELISA (BenderMedSystems) gemessen.

Die mit monoklonalen GMCSF-Antikörpern bedeckte Mikrotiterplatte des ELISA Kits Human GM-CSF Platinum ELISA wurde zweimalig mit 400 µl des Waschpuffers (PBS mit 1 % Tween 20) gewaschen. Für die Standardreihe wurde GM-CSF in einer Verdünnung von 7,8 pg/ml bis 500 pg/ml aufgetragen, in die anderen Wells wurde 50

$\mu\text{l}$  der Probe 1:1 mit Assaypuffer (PBS mit 1 % Tween 20 und 10 % BSA) verdünnt aufgetragen. Zu jeder Probe wurde 50  $\mu\text{l}$  HRP-Konjugat (mit monoklonalem, anti-humanem GM-CSF-Antikörper) hinzugefügt und auf einem Schüttler bei Raumtemperatur über 3 Stunden inkubiert. Folgend wurde die Platte dreimalig gewaschen, 100  $\mu\text{l}$  TMB-Substratlösung in jedes Well gegeben und bei Raumtemperatur über 10 Minuten bei Dunkelheit inkubiert. Zum Beenden der Farbreaktion wurde 1 M Phosphorsäure als Stop Solution hinzupipettiert. Die Quantifizierung im Fotometer erfolgte bei 450 nm Wellenlänge. (s.o.)

### **3.7 Fluorescence Activated Cell Sorting**

Antikörper:

CD11b: BD555388

GMCSFR $\alpha$ : BD551373

GMCSFR $\beta$ : BD554534

Zusammen mit BD553999 (Biotin Goat Anti-Mouse Ig)  
BD554061 (PE Streptavidin)

STAT5: sc-166465

Zusammen mit BD553999 (Biotin Goat Anti-Mouse Ig)  
BD554061 (PE Streptavidin)

pSTAT5: BD612567

4 ml heparinisieretes Blut wurde zentrifugiert und das Plasma verworfen. Die Erythrozyten wurden zweimalig mit Ammoniumchlorid lysiert und das Leukozytenisolat rein gewaschen. Die Hälfte der Leukozyten wurde mit 50 ng/ml GM-CSF bei 37 °C für 30 min stimuliert, die andere Hälfte ohne Zusatz bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Stimulation wurde durch Zentrifugieren gestoppt und die Zellpellets in 700  $\mu\text{l}$  D-PBS resuspendiert. Jeweils 100  $\mu\text{l}$  der Zellösung wurden in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. In drei der Eppendorf-Gefäße wurden die Oberflächenrezeptoren durch Antikörper markiert, das vierte Röhrchen enthielt die Negativkontrolle bzw. der Leerwert ohne Zusatz von Antikörpern. Die Zellen wurden mit 10  $\mu\text{l}$  Antikörpern (Antikörper gegen CD11b/ GMCSFR $\alpha$ / GMCSFR $\beta$ : 5  $\mu\text{l}$  Antikörper mit 2,5  $\mu\text{l}$  Biotin Goat Anti-Mouse und 2,5  $\mu\text{l}$  PE Streptavidin, 1:4 mit PBS verdünnt) inkubiert und mit 7,5 % Formaldehyd fixiert.

In den jeweils restlichen Eppendorf-Gefäßen wurden die Zellen zuerst mit 7,5 % Formaldehyd fixiert und durch den Perm Buffer III (BP558050) permeabilisiert. In die Eppendorfgefäß wurden die intrazellulären pSTAT5 und STAT5 durch Hinzugabe von 5 µl pSTAT5-Antikörper bzw. STAT5-Antikörper mit 2,5 µl Biotin Goat Anti-Mouse und 2,5 µl PE Streptavidin markiert, die Zellen des übrigen Gefäßes dienten als Negativkontrolle. Die so markierten Zellen konnten nun geFACSt werden. Ausgewertet wurde mit dem Programm WinMDI 2.9, hierbei wurde die Fluoreszenz des Leerwertes des etwaigen Versuches von der Fluoreszenz der Probe abgezogen.

### **3.8 Statistische Auswertung**

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism 4.0 (San Diego, CA, USA). Die verwendeten Tests sind im Ergebnisteil angegeben. Bei Mehrfachmessungen einer Probe wurde jeweils der Mittelwert berechnet und die Standardabweichung angegeben.

Ebenso wurden die Mittelwerte einer Gruppe mit der gleichen Grunderkrankung sowie deren Standardabweichung angegeben.

Für die biochemische Auswertung sowie die Funktionsassays wurde der t-Test für unabhängige Stichproben angewandt. Da die Analysen explorativ und deskriptiv waren, wurde auf eine Korrektur für multiple Vergleiche verzichtet.

Korrelationen wurden nach Pearson bzw. Spearman berechnet.

Die Signifikanz wurde für jede Probe mit  $p^* = <0,05$ ,  $p^{**} = < 0,01$ ,  $p^{***} = < 0,001$  für ein 95 % Konfidenzintervall angegeben.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Quantifizierung in Lavage und Serum

Es wurden Lavage und Serum in den Gruppen der 38 Kontrollen, 5 juvenilen Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose, 3 adulten Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose ohne Autoantikörperbildung gegen GM-CSF und 15 adulten Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose mit Autoantikörperbildung gegen GM-CSF gemessen. Die GM-CSF-Level in Serum und Lavage, Surfactantprotein A und D und das Gesamtprotein in der bronchoalveolären Lavage sowie die GM-CSF-Autoantikörper wurden quantifiziert.

Tab. 3 Messergebnisse der biochemischen Untersuchungen der Patienten, Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (Einzelwerte s. Anhang Tab. 4)

Patient	GM-CSF Serum [pg/ml]	GM-CSF BAL [pg/ml]	SPA BAL [ng/ml]	SPD BAL [ng/ml]	TP BAL [ $\mu$ g/ml]	GM-CSF-Ak BAL undilutet	GM-CSF-Ak BAL 1:4	GM-CSF-Ak BAL 1:10	GM-CSF-Ak Serum 1:750	GM-CSF-Ak Serum 1:1500	GM-CSF-Ak Serum 1:7500
J n=5	4,6 $\pm$ 3,0	105,7 $\pm$ 50,88	70340 $\pm$ 18340	2747 $\pm$ 958,5	895,4 $\pm$ 269,8	1,25 $\pm$ 0,21	1,25 $\pm$ 0,16	1,08 $\pm$ 0,11	1,60 $\pm$ 0,37	1,20 $\pm$ 0,24	1,05 $\pm$ 0,04
O n=3	6,2 $\pm$ 3,97	28,2 $\pm$ 11,49	14920,0	119,8	193,3 $\pm$ 78,95				1,76 $\pm$ 0,71	1,20 $\pm$ 0,36	1,10
A n=15	0,0 $\pm$ 0,0	6,6 $\pm$ 4,52	1654000 $\pm$ 923500	1229 $\pm$ 722	1544 $\pm$ 577,3	6,92 $\pm$ 4,22	9,05 $\pm$ 1,55	7,50 $\pm$ 1,10	7,81 $\pm$ 4,95	5,70 $\pm$ 1,01	2,23 $\pm$ 0,34

Tab. 4 Messergebnisse der biochemischen Untersuchungen der Kontrollen, Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( Einzelwerte s. Anhang Tab. 5)

Kontrolle	GM-CSF Serum [pg/ml]	GM-CSF BAL [pg/ml]	SPA BAL [ng/ml]	SPD BAL [ng/ml]	TP BAL [ $\mu$ g/ml]
n=38	0,0 $\pm$ 0,01	1,4 $\pm$ 0,24	4974 $\pm$ 1159	88,9 $\pm$ 23,48	111,3 $\pm$ 30,01

GM-CSF wurde in Serum und bronchoalveolärer Lavage von Patienten und Kontrollen gemessen und die Ergebnisse der einzelnen Gruppen miteinander verglichen.

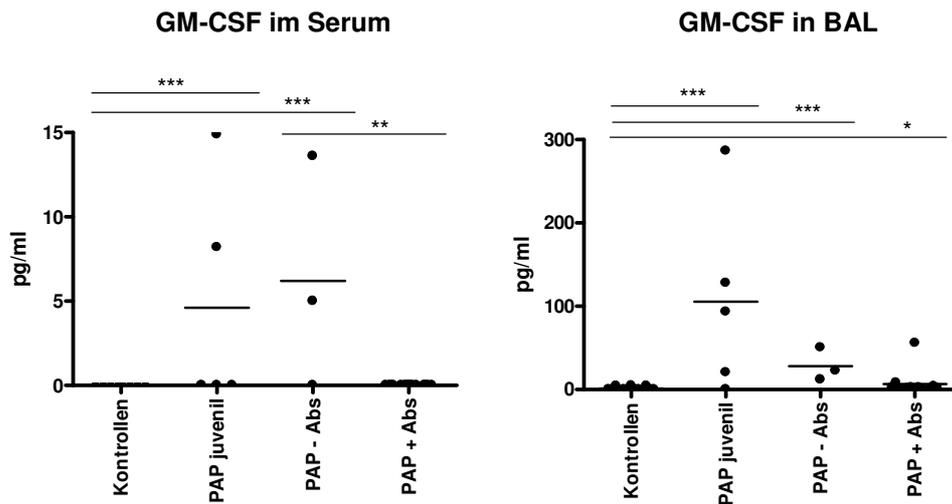


Abb. 7 GM-CSF in Serum und in BAL

Die GM-CSF-Konzentration von Kontrollen (n=32 im Serum, n=36 in der Lavage) und Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose (juvenile Patienten (n=5), adulte Patienten ohne GM-CSF-Autoantikörpern (PAP-Abs; n=3) und adulte Patienten mit GM-CSF-Autoantikörpern (PAP+Abs; n=15 im Serum, n=12 in der Lavage)) ist dargestellt in Serum und in bronchoalveolärer Lavage jeweils in Vergleich zu den Kontrollen. \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*  $p \leq 0,05$

Die GM-CSF-Konzentrationen der juvenilen Patienten im Serum waren signifikant höher als die der Kontrollgruppe ( $4,5 \pm 3,0$  pg/ml;  $0,0 \pm 0,01$  pg/ml;  $p \leq 0,001$ ). Die GM-CSF-Konzentration im Serum der adulten Patienten ohne Antikörper war im Vergleich zu der Konzentration der Kontrollgruppe ebenfalls höher ( $6,2 \pm 3,97$  pg/ml;  $0,0 \pm 0,01$  pg/ml;  $p \leq 0,01$ ). Die PAP-Patienten mit GM-CSF-Autoantikörper unterschieden sich nicht signifikant zur Kontrollgruppe ( $0,0 \pm 0,0$  pg/ml;  $0,0 \pm 0,01$  pg/ml). Die Konzentration der adulten PAP-Patienten ohne GM-CSF-Autoantikörper waren ebenfalls signifikant höher als die Konzentrationen der adulten Patienten mit Antikörpern ( $6,2 \pm 3,97$  pg/ml;  $0,0 \pm 0,0$ ;  $p \leq 0,01$ ) [Abb. 7A].

Die GM-CSF-Konzentrationen in der bronchoalveoläre Lavage der Kontrollgruppe waren signifikant niedriger als die in der Lavage der juvenilen Patienten ( $1,4 \pm 0,24$  pg/ml;  $106,7 \pm 50,88$  pg/ml;  $p \leq 0,01$ ). Die GM-CSF-Konzentrationen der bronchoalveolären Lavage der adulten PAP-Patienten ohne Autoantikörper und mit GM-CSF-Autoantikörpern waren signifikant niedriger als die der Kontrollen ( $28,2 \pm 11,49$  pg/ml;  $6,6 \pm 4,52$  pg/ml;  $1,4 \pm 0,24$  pg/ml;  $p \leq 0,001$  bzw.  $p \leq 0,05$ ). Die GM-CSF-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage der erwachsenen Patienten mit und ohne Antikörper unterschieden sich nicht signifikant [Abb. 7B].

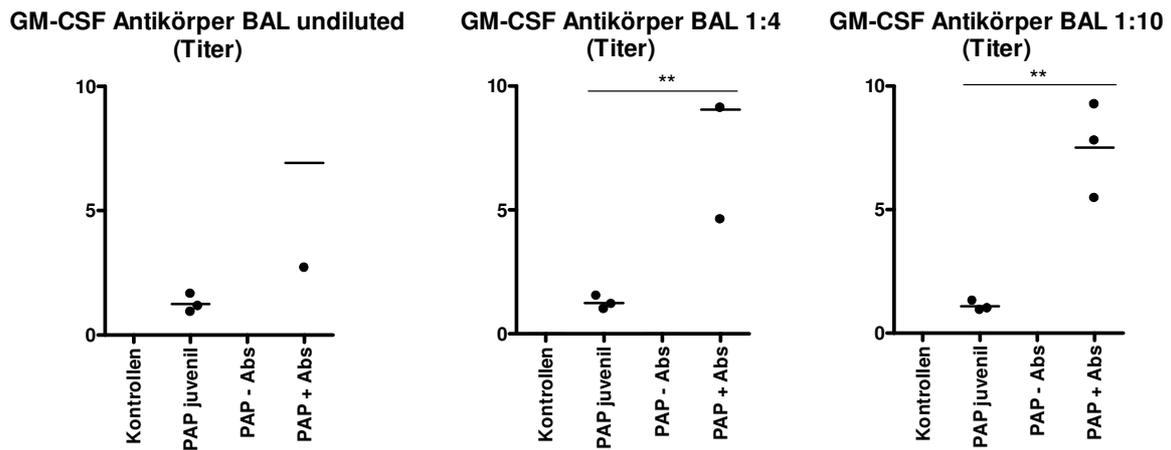


Abb. 8 GM-CSF Antikörper BAL

Titer der GM-CSF-Antikörper in der BAL juveniler Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose (n=3) und adulter Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose mit GM-CSF-Autoantikörpern (PAP+Abs; n=4), dargestellt ist die Konzentration der Antikörper in der unverdünnten BAL, 1:4 und 1:10. \*\*  $p \leq 0,01$

Der Titer der GM-CSF-Autoantikörper in der unverdünnten BAL der juvenilen Patienten und der Titer der Patienten mit Autoantikörpern unterschieden sich nicht signifikant ( $1,25 \pm 0,21$ ;  $6,92 \pm 4,22$ ), während der Titer der Patienten mit Nachweis von Autoantikörpern in der BAL in der Verdünnung 1:4 als auch in der Verdünnung 1:10 bei den signifikant höher war als in der BAL der juvenilen Patienten (Verdünnung 1:4:  $1,25 \pm 0,16$ ;  $9,05 \pm 1,55$ ;  $p \leq 0,01$ ; Verdünnung 1:10:  $1,08 \pm 0,11$ ;  $7,50 \pm 1,10$ ;  $p \leq 0,01$ ) [Abb. 8].

Für die Unterscheidung zwischen pulmonaler Alveolarproteinose mit oder ohne Autoantikörperbildung wurde der Titer der GM-CSF-Antikörper im Serum bestimmt.

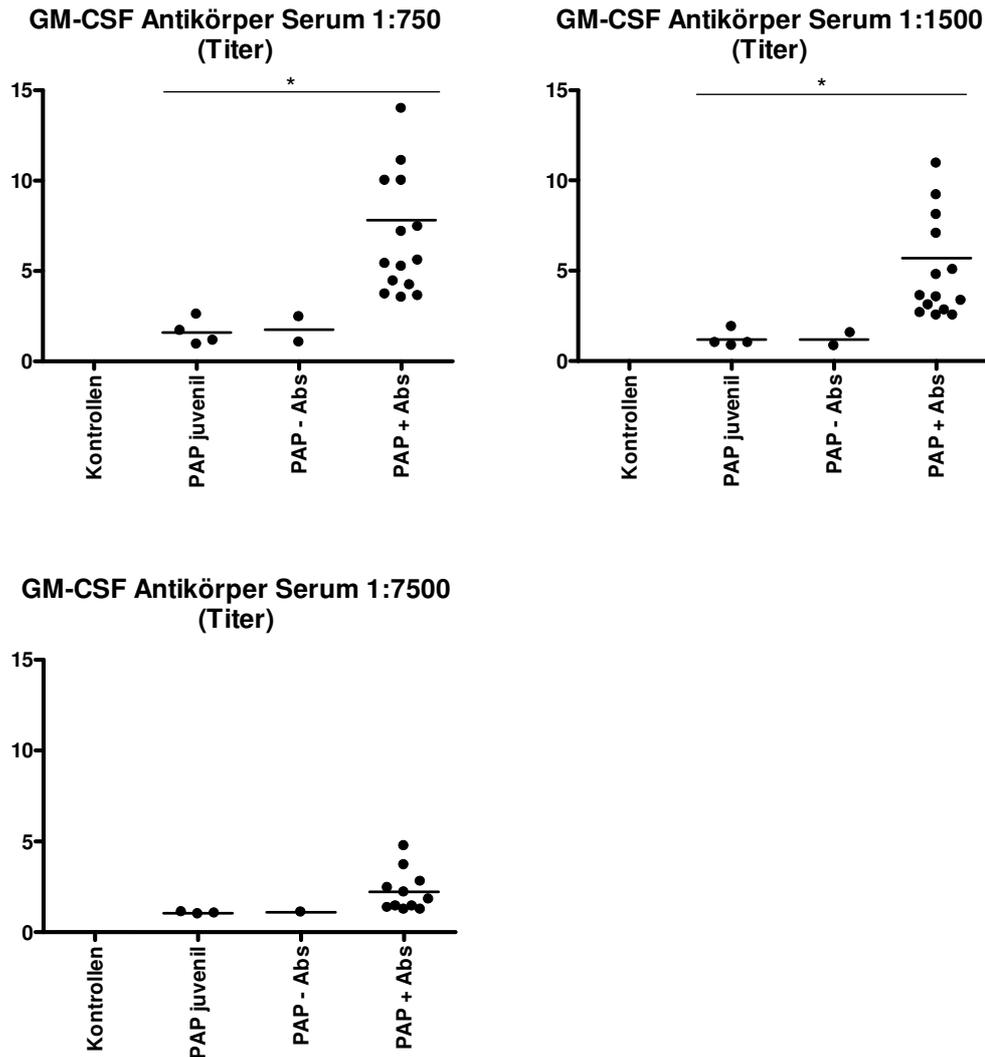


Abb. 9 GM-CSF-Antikörper Serum

Titer der GM-CSF-Antikörper im Serum juveniler Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose (n=4) und adulter Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose ohne GM-CSF-Autoantikörpern (PAP-Abs; n=2, in der Verdünnung 1:7500 n=1) und mit GM-CSF-Autoantikörpern (PAP+Abs; n=15, in der Verdünnung 1:7500 n=11) in den Verdünnungen 1:750, 1:1500 und 1:7500. \*  $p \leq 0,05$

Die Antikörper im Serum der juvenilen und der adulten Patienten ohne Antikörperbildung unterschieden sich in keiner Verdünnung voneinander (Verdünnung 1:750:  $1,60 \pm 0,37$ ;  $1,76 \pm 0,71$ ; Verdünnung 1:1500:  $1,20 \pm 0,24$ ;  $1,20 \pm 0,36$ ; Verdünnung 1:7500:  $1,05 \pm 0,04$ ;  $1,10$ ). Eine Auswertung der Verdünnung 1:7500 war aufgrund der geringen Fallzahl nicht möglich. Der Titer der Patienten mit Autoantikörpern war signifikant höher als der der Juvenilen in der Verdünnung 1:750 und der Verdünnung 1:1500 (Verdünnung 1:750:  $7,81 \pm 4,95$ ;  $1,60 \pm 0,37$ ;  $p \leq 0,05$ ; Verdünnung 1:1500:  $5,70 \pm 1,01$ ;  $1,20 \pm 0,24$ ;  $p \leq 0,05$ ). In der Verdünnung 1:7500 bestand kein Unter-

schied. Die Gruppen der adulten Patienten unterschieden sich nicht signifikant in der Verdünnung 1:750 und 1:1500 [Abb. 9].

Setzte man nun die Höhe der GM-CSF-Antikörper in Relation mit dem in Serum und bronchoalveolärer Lavage enthaltenen GM-CSF, zeigte sich (nach Spearman) sowohl eine negative Abhängigkeit der GM-CSF-Level im Serum von den Antikörpern im Serum mit  $\rho_{s_{\text{Serum}}} = -0,5818$  ( $p^{**}$ ) als auch der GM-CSF-Level in der Lavage von den Antikörpern in der bronchoalveolären Lavage mit  $\rho_{s_{\text{BAL}}} = -0,8857$  ( $p^*$ ).

Auch die Höhe der Antikörpertiter im Serum und in Lavage korrelierte miteinander:

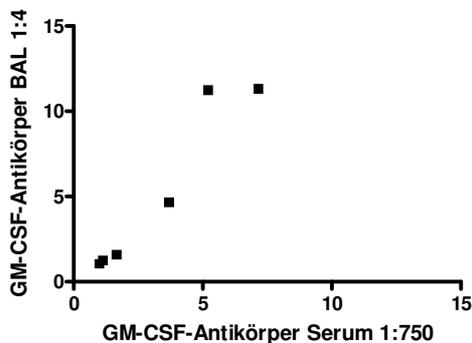


Abb. 10 GM-CSF-Antikörper Serum – GM-CSF- Antikörper BAL

GM-CSF-Antikörpertiter in der bronchoalveolären Lavage 1:4 ist in Abhängigkeit der GM-CSF-Antikörpertiter in Serum 1:750 dargestellt.

Nach Pearson zeigt sich ein linearer Zusammenhang der Antikörperlevel im Serum und in bronchoalveolärer Lavage mit einem Korrelationskoeffizienten  $\rho = 0,9609$  ( $p^{**}$ ) [Abb. 10].

Ebenfalls quantifiziert wurde Surfactant Protein A und Surfactant Protein D in der bronchoalveolären Lavage der Patienten und Kontrollen.

## Ergebnisse

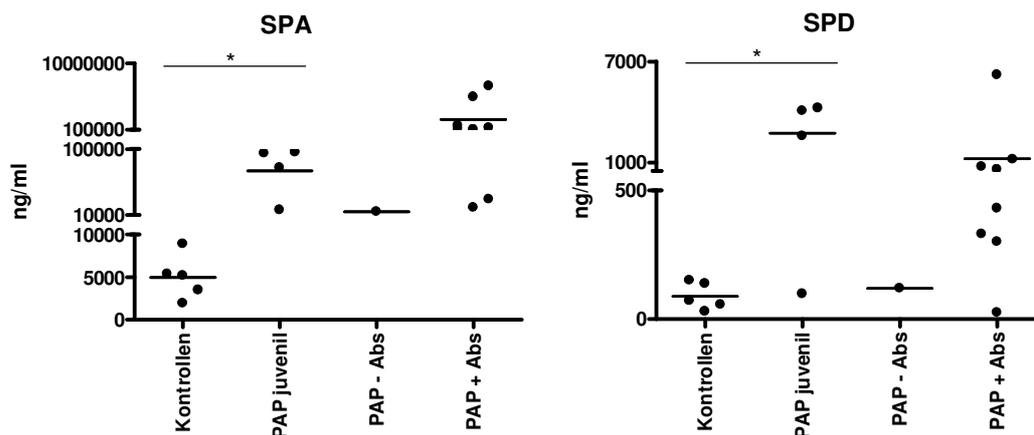


Abb. 11 Surfactantprotein A und D

Die Surfactant Protein A- und Surfactant Protein D- Konzentration von Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose (juvenile Patienten (n=4), adulten Patienten ohne GM-CSF-Autoantikörpern (n=1) und adulten Patienten mit GM-CSF-Autoantikörpern (n=8)) ist dargestellt in bronchoalveolärer Lavage jeweils in Vergleich zu den Kontrollen. \*  $p \leq 0,05$

Die Surfactant Protein A-Konzentrationen der juvenilen PAP-Patienten waren signifikant höher als die der Kontrollgruppe ( $70340 \pm 18340$  ng/ml;  $4974 \pm 1159$  ng/ml;  $p \leq 0,05$ ).

In der Gruppe der adulten PAP-Patienten mit Nachweis von Autoantikörpern unterschieden sich die Konzentrationen nicht signifikant zu denen der Kontrollgruppe ( $1654000 \pm 923500$  ng/ml;  $4974 \pm 1159$  ng/ml).

Ebenfalls signifikant höher war die Surfactant Protein D-Konzentration in der BAL der juvenilen Patienten als in der BAL der Kontrollgruppe ( $2747 \pm 958,5$  ng/ml;  $88,9 \pm 23,48$ ;  $p \leq 0,05$ ). Zur adulten Gruppe mit Antikörpern war der Unterschied nicht signifikant.

Die gemessenen SPA- und SPD- Konzentrationen der Patienten ohne Antikörper reichte zur statistischen Auswertung nicht aus.

Die GM-CSF-Konzentration in Serum oder Lavage korrelierte nicht mit den SPA- oder SPD-Konzentrationen in der Lavage.

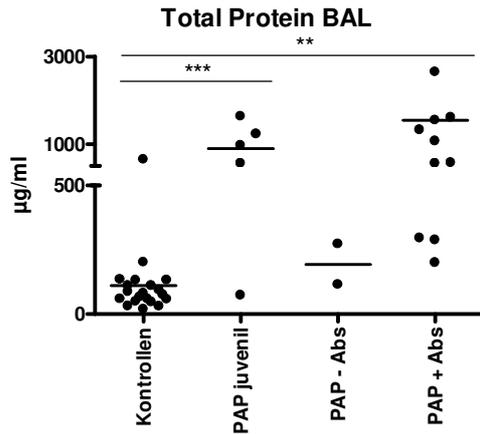


Abb. 12 Total Protein Level

Abgebildet ist die gemessene Gesamtproteinkonzentration in der BAL der verschiedenen Patientengruppen (juvenile PAP n=5, adulte PAP ohne Antikörper n=2, adulte PAP mit Antikörpern n=11) sowie der Kontrollen (n=20). \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*  $p \leq 0,01$

Die Gesamtproteinkonzentration in der BAL der juvenilen Patienten als auch die Konzentration in der Lavage von adulten Patienten mit GM-CSF-Antikörpern war signifikant höher als die Proteinkonzentration in der BAL der Kontrollgruppe ( $896 \pm 270$  µg/ml bzw.  $1544 \pm 577$  µg/ml;  $111,3 \pm 30$  µg/ml;  $p \leq 0,001$  bzw.  $p \leq 0,01$ ).

Die Konzentration der adulten Patienten ohne Autoantikörper unterschied sich von den Kontrollen nicht signifikant. Die Proteinlevel der adulten Patienten unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant.

Demnach bestand das in den Alveolen und Bronchien enthaltene Protein zu 11,27 % aus SP-A und zu 0,25 % aus SP-D bei den juvenilen Patienten. Das Protein der adulten Patienten mit Antikörpern bestand durchschnittlich zu 24,58 % aus SP-A und zu 0,50 % aus SP-D. In der Lunge der Patienten ohne GM-CSF-Antikörper bestand das Protein zu 5,48 % aus SP-A und zu 0,04 % aus SP-D.

## **4.2 Clearance Assay**

### **4.2.1 GM-CSF-Clearance Assay mit PMN**

In den folgenden Clearance Assays wurden jeweils eine Million isolierte neutrophile Granulozyten oder Monozyten von der Patientin J1 mit der Nonsense-Mutation in der GM-CSF-Rezeptor alpha-Kette, der Mutter und des Vaters der Patientin J1 und der Kontrolle K1 mit GM-CSF in RPMI ohne Zusätze (Vorversuch 1 „Effekt von FCS (fetal

## Ergebnisse

calf serum) auf die GM-CSF-Konzentration“ (siehe Anhang) inkubiert und die GM-CSF-Konzentration im Überstand nach 30, 60, 120 und 1200 Minuten gemessen.

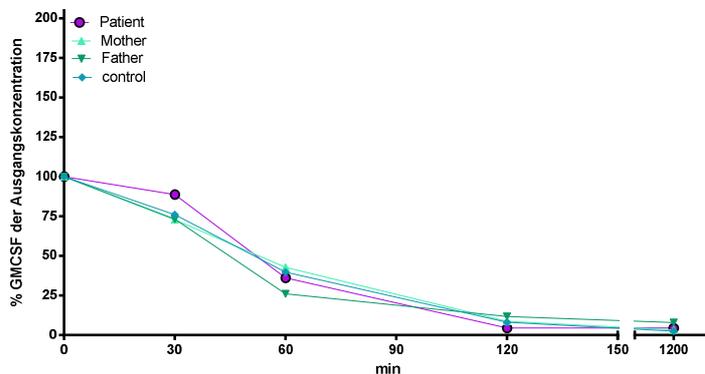


Abb. 13 Neutrophile Granulozyten Clearance Assay

Aus heparinisiertem Blut isolierte neutrophile Granulozyten wurden in RPMI mit 200 pg/ml GM-CSF inkubiert. Nach 0, 5, 30, 60, 120, 1200 min wurde 1 ml der Lösung abpipettiert und die Zellen abzentrifugiert. Im Überstand wurde die GM-CSF-Konzentration gemessen.

Im Überstand der neutrophilen Granulozyten zeigte sich zunächst eine geringere Aufnahme von GM-CSF durch die Zellen der Patientin J1, während die Zellen der Eltern sowie der Kontrolle K1 GM-CSF aufnahmen. Nach einer Stunde Inkubation hatten die Zellen der Patientin J1 jedoch die Differenz ausgeglichen und die GM-CSF-Konzentration im Überstand der neutrophilen Granulozyten sinkt in allen Proben kontinuierlich ab [Abb. 13]. Trotz der Mutation in der alpha-Kette des GM-CSF-Rezeptors der Patientin J1 waren die neutrophilen Granulozyten durch Endozytose in der Lage GM-CSF aufzunehmen.

### 4.2.2 GM-CSF-Clearance Assay mit PBMC

Der gleiche Versuch wurde mit Monozyten durchgeführt, auch hier wurden eine Million Monozyten aus heparinisiertem Blut von der Kontrolle K1, der Patientin J1 und deren Eltern isoliert und mit 10 pg/ml GM-CSF in RPMI inkubiert. Nach 3, 5, 60, 120 und 1200 Minuten wurden die Zellen abzentrifugiert und im Überstand die GM-CSF-Konzentration gemessen.

## Ergebnisse

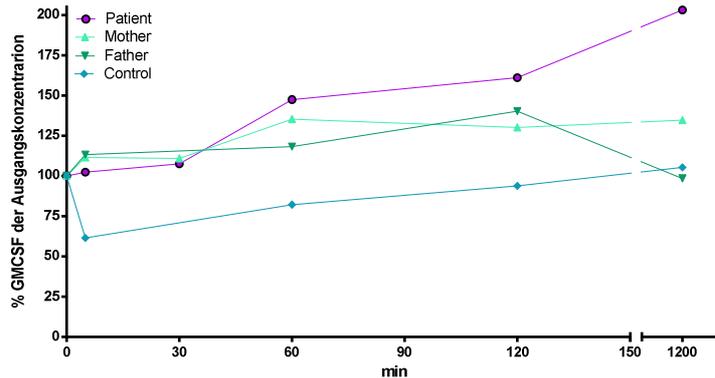


Abb. 14 Monozyten Clearance Assay

Aus heparinisiertem Blut isolierte Monozyten wurden in RPMI ohne FCS mit 10 pg/ml GM-CSF inkubiert. Nach 0, 5, 30, 60, 120, 1200 min wurde 1ml der Lösung abpipettiert und die Zellen abzentrifugiert. Im Überstand wurde die GM-CSF-Konzentration gemessen.

Die Konzentration des GM-CSF im Überstand der Monozyten während einer Inkubation über sechs Stunden variierte bei den Eltern der Patientin J1 und der Kontrolle K1 wenig. Nach sechs Stunden betrug die GM-CSF-Konzentration 135 % der Ausgangskonzentration bei den Monozyten der Mutter, 98 % beim Vater, 105 % bei der Kontrolle K1. Im Gegensatz dazu stieg die Konzentration der Patientin kontinuierlich an, letztlich auf 203 % des Ausgangswertes nach sechs Stunden Inkubation [Abb. 14]. Bei Monozyten entsprachen sich GM-CSF-Aufnahme und -Abgabe demnach in gesunden Zellen, bei der Patientin J1 wurde jedoch weniger GM-CSF aufgenommen als abgegeben.

### **4.3 Stimulierbarkeit durch GM-CSF**

#### **4.3.1 Rezeptorstimulation durch GM-CSF in PMN**

Es wurden Versuche zur Stimulierbarkeit der Rezeptorexpression bei der Indexpatientin J1, deren Eltern und Kontrollen in neutrophilen Granulozyten durchgeführt. Die Antigene (CD11b, GMCSFRa, GMCSFRb) wurden mittels Antikörper auf isolierten Zellen und auf Zellen nach Stimulation mit GM-CSF markiert und im Anschluss geFACSt.

Für die Versuche wurden Zellen aus heparinisiertem Blut verwendet (siehe Anhang: Vorversuch 2 „Zellen aus heparinisierten vs. Zellen aus EDTA-Blut“)

## Ergebnisse

Tab. 5 FACS der Oberflächenantigene auf neutrophilen Granulozyten

Messung des MFI vor und nach Stimulation mit GM-CSF 50 ng/ml für 30 min bei 37 °C, Markierung der Oberflächenmarker, Gattung der neutrophilen Granulozyten. Aufgeführt ist die mittlere Änderung des MFI der PAP-Patientin, der Eltern und der Kontrollgruppe (Einzelwerte s. Anhang Tab. 8).

PMN	MFIR CD11b	n	MFIR CD116	n	MFIR CD131w	n
P	108,9 ± 4,5	4	77,1 ± 22,3	4	179,3 ± 39,5	2
M	177,7 ± 19,7	3	87,2 ± 6,3	3	113,3	1
F	172,0 ± 28,5	3	126,9 ± 20,4	3	102,0	1
K	144,0 ± 110,3	15	158,6 ± 17,9	15	162,1 ± 21,5	7

Die prozentuale Änderung des MFI (MFIR) nach Stimulation mit GM-CSF wurde bei der Patientin mit der Kettenmutation angeschaut und mit den Eltern und der Kontrollgruppe verglichen.

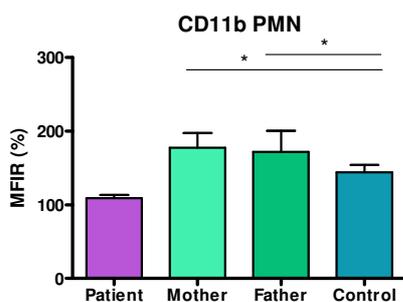


Abb. 15 Aktivitätsveränderung in PMN

Dargestellt ist die mit FACS gemessene MFIR (prozentuale Änderung der MFI) des Aktivitätsparameters CD11b auf PMN ohne und nach 30 min Stimulation mit GM-CSF 50 ng/ml bei 37,0 °C. n(Patient)=4, n(Mutter, Vater)=3, n(Kontrollen)=15. \*  $p \leq 0,05$

Die neutrophilen Granulozyten der Kontrollen wurden durch Stimulation mit GM-CSF 50 ng/ml aktiviert, die CD11b-Expression stieg durchschnittlich auf 144 % des Ausgangswertes. Die Änderung der CD11b-Expression der neutrophilen Granulozyten der Indexpatientin nach Stimulation mit GM-CSF betrug 109 %. Obwohl die neutrophilen Granulozyten der Patientin sich kaum stimulieren ließen und der Unterschied in Abb. 15 graphisch gezeigt wird, unterschieden die MFIR sich nicht signifikant von den Neutrophilen der Kontrollgruppe. Die Stimulation der neutrophilen Granulozyten der Mutter und des Vaters war signifikant höher als die Stimulierbarkeit der Zellen der Kontrollgruppe, zur Patientin bestand kein signifikanter Unterschied.

Ebenfalls untersucht wurde die Expression des GM-CSF-Rezeptors der Indexpatientin auf neutrophilen Granulozyten vor und nach Stimulation durch GM-CSF. Dieser Rezeptor besteht wie oben beschrieben aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette.

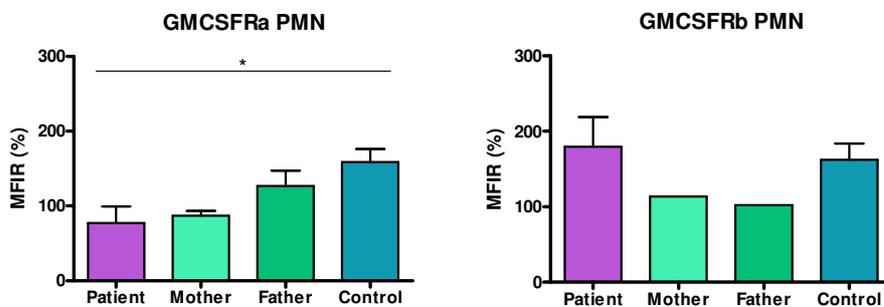


Abb. 16 Rezeptorstimulation in PMN

Dargestellt ist die mit FACS gemessene MFIR (prozentuale Änderung der MFI) der Oberflächenantigene GMCSFRa und GMCSFRb auf PMN ohne und nach 30 min Stimulation mit GM-CSF 50 ng/ml bei 37,0 °C. GMCSFRa: n(Patient)=4, n(Mutter, Vater)=3, n(Kontrollen)=15; GMCSFRb: n(Patient)=2, n(Mutter, Vater)=1, n(Kontrollen)=7. \*  $p \leq 0,05$

Hierbei wurde gezeigt, dass die Stimulierbarkeit der  $\alpha$ -Ketten-Expression der Patientin mit  $\alpha$ -Ketten-Mutation signifikant geringer war als die der Kontrollgruppe. Von der Expression der Eltern unterschied sich die der Patientin nicht. Die Expressionen der Eltern unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant von der  $\alpha$ -Ketten-Expression der Kontrollgruppe.

Die  $\beta$ -Ketten-Expression der Kontrollgruppe unterschied sich nicht signifikant von der  $\beta$ -Ketten-Expression der Indexpatientin. Die gesammelten Daten der Eltern über die Expression der  $\beta$ -Kette reichten für eine statistische Auswertung nicht aus [Abb. 16].

#### 4.3.3 Rezeptorstimulation durch GM-CSF in PBMC

Durch FACS Analyse wurde die Aktivität der PBMC mittels CD11b und die GM-CSF-Rezeptor  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kettenexpression auf PBMC mit und ohne GM-CSF-Stimulation gemessen. Es wurden die Daten der Patientin mit GM-CSF-Rezeptor  $\alpha$ -Kettenmutation, deren Eltern und der Kontrollen miteinander verglichen.

## Ergebnisse

Tab. 6 FACS der Oberflächenantigene auf Monozyten

MFI vor und nach Stimulation mit GM-CSF 50 ng/ml für 30 min bei 37 °C, Markierung der Oberflächenmarker, bzw. der intrazellulären Transkriptionsfaktoren, Gattung der Monozyten. Aufgeführt ist die mittlere Änderung des MFI des PAP-Patienten, der Eltern und der Kontrollgruppe (Einzelwerte s. Anhang Tab.9).

PBMC	MFIR CD11b	n	MFIR CD116	n	MFIR CD131w	n
P	89,0 ± 2,8	2	48,2 ± 13,4	2	152,7 ± 87,8	2
M	169,4 ± 47,1	2	113,7 ± 3,8	2	110,4	1
F	161,9 ± 42,9	2	2222,0 ± 2001,0	2	117,0	1
K	121,9 ± 4,3	12	130,5 ± 13,0	13	152,0 ± 29,1	7

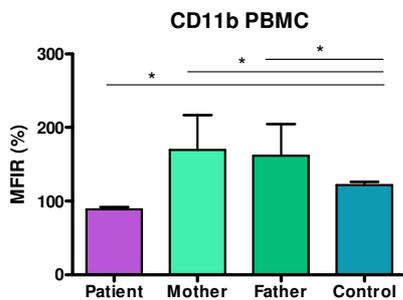


Abb. 17 Aktivitätsveränderung in PBMC

Dargestellt ist die mit FACS gemessene MFIR (prozentuale Änderung der MFI) des Aktivitätsparameters CD11b auf PBMC ohne und nach 30 min Stimulation mit GM-CSF 50 ng/ml bei 37,0 °C. n(Patient) = 2, n(Mutter, Vater) = 2, n(Kontrollen) = 12. \*  $p \leq 0,05$

Die Aktivitätsänderung des CD11b-Rezeptors der Monozyten der Patientin mit  $\alpha$ -Kettenmutation war signifikant geringer als die der Kontrollgruppe. Die CD11b Expression der Mutter war signifikant höher als die Änderung der Expression der Kontrollgruppe und unterschied sich nicht von der Expression der Patientin. Die Expression von CD11b auf Monozyten des Vaters war ebenfalls signifikant höher als die der Kontrollgruppe, zu seiner Tochter bestand kein Unterschied [Abb. 17].

Ebenfalls auf den Monozyten wurde die Expression der beiden Ketten des GM-CSF-Rezeptors miteinander verglichen.

## Ergebnisse

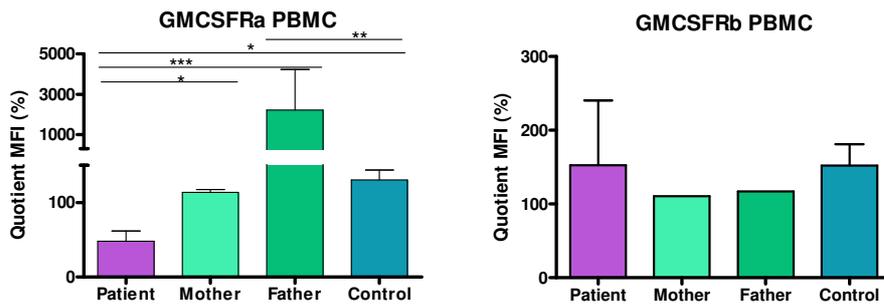


Abb. 18 Rezeptorstimulation in PBMC

Dargestellt ist die mit FACS gemessene MFIR (prozentuale Änderung der MFI) der Oberflächenantigene GMCSFRa und GMCSFRb auf PBMC ohne und nach 30min Stimulation mit GM-CSF 50 ng/ml bei 37,0 °C. GMCSFRa: n(Patient)=2, n(Mutter, Vater)=2, n(Kontrollen)=13; GMCSFRb: n(Patient)=2, n(Mutter, Vater)=1, n(Kontrollen)=7. \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*  $p \leq 0,05$

Es bestand eine signifikant geringere  $\alpha$ -Ketten-Expression auf den Monozyten der Patientin im Vergleich zur Kontrollgruppe und im Vergleich zu beiden Elternteilen. Der Vater zeigte eine höhere  $\alpha$ -Ketten-Expression als die Kontrollen, die Mutter zeigte zur Kontrollgruppe keinen Unterschied.

Die  $\beta$ -Ketten-Expression auf Monozyten der Indexpatientin unterschied sich nicht von der auf Monozyten der Kontrollgruppe.

Zur Auswertung der  $\beta$ -Kette des GM-CSF-Rezeptors auf Monozyten wurden nicht genügend Daten der Eltern zur statistischen Auswertung erhoben [Abb. 18].

### 4.3.3 Stimulation der STAT5-Phosphorylierung in PMN durch GM-CSF

Die Phosphorylierung von STAT5 durch GM-CSF über die aktivierte JAK2 wurde bei der Patientin J1, deren Eltern und einer Kontrollgruppe mittels FACS analysiert (Einzelwerte s. Anhang Tab.10).

Tab. 7 FACS der Transkriptionsfaktoren in neutrophilen Granulozyten

MFI vor und nach Stimulation mit GM-CSF 50 ng/ml für 30 min bei 37 °C, Markierung der intrazellulären Transkriptionsfaktoren nach Permeabilisierung der Zellmembran, Gattung der neutrophilen Granulozyten. Aufgeführt ist der jeweilige MFI abzüglich der Negativkontrolle.

PMN	STAT5	n	pSTAT5	n
P	114,1 ± 59,9	2	93,9 ± 2,9	3
M	45,9	1	512,7 ± 316,6	2
F	238,4	1	482,3 ± 293,4	2
K	113,9 ± 14,3	4	333,1 ± 54,7	11

Nach der FACS-Analyse wurde die durchschnittliche Änderung der MFI des STAT5 und dessen phosphorylierter Form miteinander verglichen.

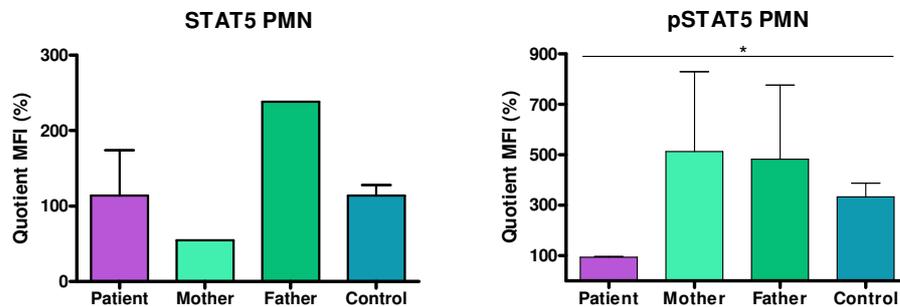


Abb.19 Stimulation der STAT5-Phosphorylierung

Dargestellt ist die mit FACS gemessene MFIR (prozentuale Änderung der MFI) der intrazellulären STAT5 sowie pSTAT5 in PMN ohne und mit 30min Stimulation mit GM-CSF 50 ng/ml bei 37,0 °C.

STAT5: n(Patient)=2, n(Mutter, Vater)=1, n(Kontrollen)=4.

pSTAT5: n(Patient)=3, n(Mutter, Vater)=2, n(Kontrollen)=11. \*  $p \leq 0,05$

STAT5 ließ sich in den neutrophilen Granulozyten der Patientin durch Stimulation mit GM-CSF erhöhen, der Unterschied zu der Kontrollgruppe ist nicht signifikant. Die Datenmenge der Eltern lässt keine Auswertung zu, ist der Vollständigkeit halber dennoch mit aufgeführt.

STAT5 in phosphorylierter Form sank in den neutrophilen Granulozyten der Indexpatientin nach Stimulation, eine Phosphorylierung fand nicht statt. In der Kontrollgruppe erhöhte sich der Anteil des pSTAT5, der Unterschied zur Indexpatientin war signifikant. Die Phosphorylierung des STAT5 der Mutter durch GM-CSF unterschied sich weder von der Patientin noch zur Kontrollgruppe signifikant. Ebenso bestand kein signifikanter Unterschied der Erhöhung des pSTAT5 bei dem Vater im Vergleich zu der Indexpatientin oder zur Kontrollgruppe [Abb.19].

## 5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde in Blut- und Lavageproben von Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose GM-CSF sowie die inhibitorischen Antikörper gegen GM-CSF bestimmt und miteinander sowie mit einer Kontrollgruppe, bestehend aus 38 Patienten mit Bronchitis oder Asthma bronchiale, verglichen.

Aus einem Patientenkollektiv von 73 Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose wurden 15 Patienten mit Nachweis von GM-CSF-Antikörpern, 3 erwachsene Patienten ohne Nachweis der Antikörper sowie 5 juvenile Patienten mit Nachweis einer GM-CSF-Rezeptormutation ausgewählt. Mit einer Verzerrung der Daten muss gerechnet werden, da durch den Patientenausschluss von Patienten aufgrund fehlender Blutproben oder nicht vorhandener bronchoalveolärer Lavage, keine zufällige Auswahl getroffen wurde. Von den 7 in die Datenbank aufgenommenen juvenilen Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose konnten 5 Proben untersucht werden; leider lagen von zwei Patienten tunesischer Herkunft entweder nur Proben der bronchoalveolären Lavage oder DNA zum Mutationsnachweis vor. Die Ergebnisse für diese, allerdings aufgrund der Seltenheit der Erkrankung, recht kleine Untergruppe sind also einigermaßen repräsentativ für die Stichprobe.

Die Diagnosestellung der pulmonalen Alveolarproteinose erfolgt bei klinischem Verdacht durch eine bronchoalveolärer Lavage in Verbindung mit der Messung der GM-CSF-Autoantikörper im Serum oder einer histopathologischer Untersuchung von Lungengewebe.

GM-CSF kann im Blut und in der bronchoalveolären Lavage bestimmt werden, um die Verdachtsdiagnose zu erhärten. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass GM-CSF bei den juvenilen PAP-Patienten sowohl in Serum als auch in der BAL im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ist. Folglich sollte im Serum bei juvenilen Patienten mit Verdacht auf eine pulmonale Alveolarproteinose sowohl GM-CSF als auch die GM-CSF-Antikörper bestimmt werden, um so im Rahmen einer Routineblutentnahme weniger invasiv die Verdachtsdiagnose zu erhärten oder auszuschließen.

In den Funktionsassays der Indexpatientin mit Mutation der  $\alpha$ -Kette des GM-CSF-Rezeptors ließ sich nun zeigen, dass in den neutrophilen Granulozyten der erkrankten Patienten eine im Vergleich zum Abbau erhöhte Sekretion an GM-CSF während

der ersten Minuten stattfindet. Durch Endozytose waren die neutrophilen Granulozyten dann in der Lage das GM-CSF aufzunehmen und den Serumspiegel normal hoch zu halten.

Der gleiche Versuch mit den isolierten Monozyten zeigte eine deutlich verminderte Aufnahme, möglicherweise auch eine erhöhte Sekretion von GM-CSF. Diese Fehlregulation ist konsistent mit den gefundenen erhöhten GM-CSF-Konzentrationen in Serum und bronchoalveolärer Lavage.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit die Wirkung von GM-CSF auf neutrophile Granulozyten und Monozyten einer Indexpatientin mit einer Nonsense-Mutation der alpha-Kette des GM-CSF-Rezeptors im Exon 3 untersucht. Bei unserer Patientin zeigte sich eine fehlende Stimulierbarkeit der Expression der alpha-Kette des GM-CSF-Rezeptors durch GM-CSF auf Neutrophilen Granulozyten und Monozyten.

In der Signalkaskade bindet GM-CSF extrazellulär an die  $\alpha$ -Kette des Rezeptors, dieser fusioniert mit der  $\beta$ -Kette, intrazellulär sitzen rezeptorassoziierte JAK, die gegenseitig ihre Tyrosinphosphorylierung katalysieren. Hierdurch kann STAT5 an den phosphorylierten Rezeptor binden, STAT5 wird phosphoryliert. Es erfolgt die Bildung eines aktiven Dimers, eine Translokation in den Kern erfolgt und wirkt hier als Transkriptionsfaktor für das PU1-Gen. Durch PU1 erfolgt unter anderem eine Differenzierung und Aktivierung der Makrophagen, die die Surfactanthomöostase regulieren.

In den neutrophilen Granulozyten der Patientin mit der mutierten  $\alpha$ -Kette des GM-CSF-Rezeptors kam es trotz Endozytose von GM-CSF nicht zu einer Phosphorylierung des STAT5. Die Phosphorylierung des STAT5 blieb aufgrund der fehlenden Phosphorylierung des JAK bei fehlender Rezeptorfusionierung aus.

Dementsprechend erfolgte keine Expressierung des PU1-Genes mit dem Endziel des Surfactantabbaus.

Obwohl in der Literatur durch Tazawa et al. beschrieben ist, dass es durch eine Zufuhr von GM-CSF bei adulten Patienten mit GM-CSF-Autoantikörpern in der Hälfte der Fälle zu einer Remission kommt [74], zeigt diese Arbeit pathophysiologisch das Ausbleiben eines besseren Outcomes bei unserer juvenilen PAP-Patienten mit Rezeptormutation durch Inhalation oder subkutane Gabe von GM-CSF. Durch Zufuhr

von GM-CSF war es weder möglich eine vermehrte Rezeptorexprimierung zu erwirken noch STAT5 zu phosphorylieren.

In der Literatur sind 14 unterschiedliche Mutationen des CSF2RA-Gens beschrieben [9, 10, 14, 15], bei 8 dieser Mutationen ist in vitro die STAT5-Phosphorylierung als unterbrochen beschrieben, bei 4 der Mutationen ist die Phosphorylierung reduziert [15], es findet durch Erhöhung der GM-CSF-Konzentration ein partieller Rescue statt -wie durch Suzuki et al. beschrieben [9]. Bei Diagnosestellung einer pulmonalen Alveolarproteinose durch eine Mutation der  $\alpha$ -Kette des GM-CSF-Rezeptors ist also ein Prüfen der STAT5-Phosphorylierung sinnvoll um eine Indikation zu einer Therapie mit GM-CSF zu stellen.

Bei Patienten mit Mutation der  $\beta$ -Kette des GM-CSF-Rezeptors wurden unterschiedliche Ergebnisse über ein Rescue der Phosphorylierung von STAT5 durch Erhöhung der GM-CSF-Konzentration im heparinisierten Blut beschrieben. Bei einem Patienten ließ sich eine geringe Zunahme der Phosphorylierung im Westernblot darstellen [6]. Tanaka et al. beschreiben keine Änderung des Phosphorylierungsstatus von STAT5 nach Stimulation mit GM-CSF [7].

Diese unterschiedlichen in vitro-Ergebnisse lassen sich auf der einen Seite mit der unterschiedlichen Veränderung der Rezeptorkette durch die jeweilige Mutation erklären, auf der anderen Seite mit der unbegrenzten Erhöhung der GM-CSF-Konzentration in vitro.

Der Goldstandard der Therapie ist- trotz anderer Therapieansätze wie der Inhalation von GM-CSF [36, 74], die intrakutane Gabe von GM-CSF sowie eine Plasmapherese zur Elimination der Antikörper [75, 76] oder die Gabe von Biologicals zur Modifizierung der B-Zell-Funktion [77-79]- die Lavage der gesamten Lunge (WLL) bei allen Patienten mit PAP.

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass je nach Ätiologie der PAP eine Zufuhr von GM-CSF, entweder durch Inhalation oder durch subkutane Gabe, bei PAP-Patienten einen unterschiedlichen Benefit haben kann. Bei unserer juvenilen Patientin mit hereditärer PAP führt der Defekt des GM-CSF-Rezeptors wie gezeigt durch eine fehlende Rezeptorbindung bereits zu einer erhöhten Konzentration von GM-CSF in den Alveolen.

Da die erhöhte GM-CSF-Konzentration jedoch ohne ausreichende Wirkung bleibt, muss die subkutane GM-CSF-Gabe sowie die Inhalation von GM-CSF bei der Patientin mit hereditärer PAP zur Therapie, wie oben beschrieben, in Frage gestellt werden.

Adulte Patienten mit Antikörpern könnten jedoch von einer solchen Therapie profitieren. Eine Inhalation kann bei weiterer Erhöhung der GM-CSF-Konzentration über die maximale Bindungskapazität der Autoantikörper einen Effekt auf die Surfactant-Beseitigung durch die Makrophagen haben. In der Literatur konnte eine Remission bei etwa der Hälfte der Patienten innerhalb von 30 Monaten durch eine inhalative Therapie von GM-CSF aufrecht erhalten werden [74]. In Einzelfallberichten zeigte sich auch die intrakutane Gabe von GM-CSF als gute Alternative zur Lavage [80].

Rituximab als monoklonaler CD20-Antikörper bewirkt bei autoimmuner pulmonaler Alveolarpoteinose einen vermehrten alveolären Lipidmetabolismus durch die Makrophagen [79]. Da die Wirkung durch Reduktion der GM-CSF-Autoantikörper zustande kommt, ist Rituximab bei Patienten mit Rezeptormutation nicht indiziert.

Bei Mäusen mit pulmonaler Alveolarproteinose wurden bereits 1996 erfolgreich Knochenmarktransplantationen durchgeführt [81]. Eine Knochenmarktransplantation ist für juvenile PAP-Patienten eine Therapieoption, da jedoch eine Myeloablation durchgeführt werden muss, ist das Infektionsrisiko hoch. Eine Patientin mit primärer PAP durch eine GMCSFRa-Mutation verstarb nach Knochenmarktransplantation [10].

Für Patienten mit sekundärer PAP sind erfolgreich Transplantationen mit folgender Remission bei einem Kind mit AML und einem Erwachsenen mit MDS beschrieben [82, 83].

In der Literatur sind ebenso in vitro Stammzelltherapien beschrieben, bei denen ein Gentransfer über Lentiviren zu einer vollständigen Regeneration der Signaltransduktion führte [13].

Durch Suzuki et al. wurden Mäusen mit pulmonaler Alveolarpoteinose aufgrund einer GMCSFRb-Defizienz Gen-korrigierte Makrophagen transplantiert, der Effekt hielt über ein Jahr an [84]. Phänotypisch ähneln Mäuse mit einer GMCSFRb-Defizienz juvenilen Patienten mit einer Mutation in der  $\alpha$ - und  $\beta$ - Kette des GM-CSF-Rezeptors. Dies scheint zurzeit die erfolversprechenste Therapie der Zukunft zu sein.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bei der hereditären PAP-Patientin das GM-CSF sowohl in Serum als auch in Lavage zwar erhöht ist, jedoch ohne ausreichende Wirkung bleibt.

Es war bei der Indexpatientin mit einem GMCSFRa-Defekt trotz einer Aufnahme von GM-CSF durch neutrophile Granulozyten keine vermehrte Rezeptorexpression des GMCSFRa durch Stimulation mit GM-CSF möglich. Eine Phosphorylierung von STAT5 unterblieb, es kam zu keiner Aktivierung der für den Surfactantabbau verantwortlichen Prozesse.

Somit bleibt GMCSF wirkungslos und kommt auch nicht für die Therapie unserer Patientin mit hereditärer pulmonaler Alveolarproteinose in Frage.

## 6. Zusammenfassung

Die pulmonale Alveolarproteinose ist eine seltene Lungenerkrankung, bei der sich der Alveolarraum mit Surfactantproteinen und Phospholipiden füllt. Somit stehen die Alveolen nur noch eingeschränkt zum Gasaustausch zur Verfügung. Ursächlich hierfür ist das Zytokin GM-CSF, das durch Autoantikörper gebunden wird oder durch eine Mutation des Rezeptors keine Signalaskade auslöst, eine Ausreifung und Stimulation der Alveolarmakrophagen unterbleibt, das Surfactant wird teilweise phagozytiert, jedoch nicht lysiert.

Ziel dieser Arbeit war es Konzentrationen von GM-CSF bei den einzelnen Untergruppen der pulmonalen Alveolarproteinose herauszuarbeiten sowie die Signaltransduktion einer Indexpatientin mit Mutation der  $\alpha$ -Kette des GM-CSF-Rezeptors zu untersuchen.

Juvenile Patienten zeigten in Serum und Lavage eine signifikant höhere GM-CSF-Konzentration als die Kontrollgruppe. Adulte Patienten mit Nachweis von GM-CSF-Antikörpern zeigten einen signifikant geringeren Spiegel an GM-CSF in Serum als Patienten ohne Nachweis von Autoantikörpern. Die Höhe der GM-CSF-Spiegel stand in einer negativen Abhängigkeit zu den Titern des GM-CSF-Antikörpers.

Wie erwartet zeigten sich deutlich erhöhte Surfactantproteinkonzentrationen sowohl in den Alveolen der PAP-Patienten mit Rezeptormutation als auch bei den Patienten mit Autoantikörpern im Vergleich zu den gesunden Kontrollen.

Isolierte neutrophile Granulozyten der Indexpatientin waren in der Lage GM-CSF zu binden als auch -vermutlich durch Endozytose- aufzunehmen.

Die Monozyten der Indexpatientin bildeten deutlich mehr GM-CSF als aufgenommen wurde. Nach 20 Stunden lag die GM-CSF-Konzentration im Medium bei über 200 % des Ausgangswertes. Diese Konzentrationserhöhung ist konsistent mit den gemessenen erhöhten GM-CSF-Konzentrationen in Serum und Lavage der juvenilen Patienten.

Auf neutrophilen Granulozyten der Indexpatientin zeigte sich eine signifikant geringere Expression der  $\alpha$ -Kette des GM-CSF-Rezeptors nach Stimulation im Vergleich zu Zellen gesunder Kontrollen. Die Monozyten der Patientin waren nach Stimulation mit GM-CSF signifikant weniger aktiv als die Zellen der Kontrollgruppe und auch die  $\alpha$ -Kette des Rezeptors wurde auf den Monozyten nicht vermehrt exprimiert.

Eine Phosphorylierung von STAT5 in den neutrophilen Granulozyten der Indexpatientin durch Stimulation mit GM-CSF fand somit nicht statt, eine Aktivierung der Gene mit dem Endziel des Surfactantabbaus blieb aus.

Zusammenfassend blieb die Stimulation der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen der Indexpatientin mit GMCSFRa-Defekt mit GM-CSF wirkungslos. Die Ergebnisse dieser Arbeit charakterisieren das GM-CSF-System bei einer Patientin mit hereditärer pulmonaler Alveolarproteinose im Vergleich zu Gesunden und Patienten mit autoimmuner pulmonaler Alveolarproteinose.

## 7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1	Signaltransduktion GM-CSF zum Zielgen	Seite 6
Abb. 2	Subkategorie PAP-Patienten	Seite 10
Abb. 3	Bronchitispatienten	Seite 11
Abb. 4	Neutrophile Granulozyten in der BAL der Kontrollgruppe	Seite 11
Abb. 5	Molekulargenetik der Indexpatientin	Seite 12
Abb. 6	Phasenbildung nach Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll	Seite 17
Abb. 7	A) GM-CSF im Serum; B) GM-CSF in der Lavage	Seite 21
Abb. 8	GM-CSF Antikörper BAL	Seite 22
Abb. 9	GM-CSF Antikörper Serum	Seite 23
Abb. 10	GM-CSF-Antikörper Serum – GM-CSF- Antikörper BAL	Seite 24
Abb. 11	Surfactantprotein A und D	Seite 25
Abb. 12	Total Protein Level	Seite 26
Abb. 13	Neutrophile Granulozyten Clearance Assay	Seite 27
Abb. 14	Monozyten Clearance Assay	Seite 28
Abb. 15	Aktivitätsveränderung in PMN	Seite 29
Abb. 16	Rezeptorstimulation in PMN	Seite 30
Abb. 17	Aktivitätsveränderung in PBMC	Seite 31
Abb. 18	Rezeptorstimulation in PBMC	Seite 32
Abb. 19	Stimulation der STAT5-Phosphorylierung	Seite 33
Tab. 1	Patientenkollektiv	Seite 10
Tab. 2	Kontrollgruppen	Seite 12
Tab. 3	Messergebnisse der biochemischen Untersuchungen der Patienten, Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung	Seite 20
Tab. 4	Messergebnisse der biochemischen Untersuchungen der Kontrollen, Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung	Seite 20
Tab. 5	FACS der Oberflächenantigene auf neutrophilen Granulozyten	Seite 29
Tab. 6	FACS der Oberflächenantigene auf Monozyten	Seite 31
Tab. 7	FACS der Transkriptionsfaktoren in neutrophilen Granulozyten	Seite 32

## 8. Literatur

1. Ben-Dov, I., et al., *Pulmonary alveolar proteinosis in Israel: ethnic clustering*. Isr Med Assoc J, 1999. **1**(2): p. 75-8.
2. Seymour, J.F. and J.J. Presneill, *Pulmonary alveolar proteinosis: progress in the first 44 years*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(2): p. 215-35.
3. Rosen, S.H., B. Castleman, and A.A. Liebow, *Pulmonary alveolar proteinosis*. N Engl J Med, 1958. **258**(23): p. 1123-42.
4. Larson, R.K. and R. Gordinier, *Pulmonary Alveolar Proteinosis. Report of Six Cases, Review of the Literature, and Formulation of a New Theory*. Ann Intern Med, 1965. **62**: p. 292-312.
5. Enaud, L., et al., *Pulmonary alveolar proteinosis in children on La Reunion Island: a new inherited disorder?* Orphanet J Rare Dis, 2014. **9**: p. 85.
6. Suzuki, T., et al., *Hereditary pulmonary alveolar proteinosis caused by recessive CSF2RB mutations*. Eur Respir J, 2011. **37**(1): p. 201-4.
7. Tanaka, T., et al., *Adult-onset hereditary pulmonary alveolar proteinosis caused by a single-base deletion in CSF2RB*. J Med Genet, 2011. **48**(3): p. 205-9.
8. Dirksen, U., 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): p. 2211-7.
9. Suzuki, T., et al., *Familial pulmonary alveolar proteinosis caused by mutations in CSF2RA*. J Exp Med, 2008. **205**(12): p. 2703-10.
10. Martinez-Moczygemba, M., 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): p. 2711-6.
11. Griese, M., et al., *Long-term follow-up and treatment of congenital alveolar proteinosis*. BMC Pediatr, 2011. **11**: p. 72.
12. Santiago-Burruchaga, M., et al., *Hereditary pulmonary alveolar proteinosis. Could it be triggered by Mycoplasma pneumoniae pneumonia?* Respir Med, 2013. **107**(1): p. 134-8.
13. Lachmann, N., et al., *Gene correction of human induced pluripotent stem cells repairs the cellular phenotype in pulmonary alveolar proteinosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2014. **189**(2): p. 167-82.
14. Auger, J., et al., *De novo complex X chromosome rearrangement unmasking maternally inherited CSF2RA deletion in a girl with pulmonary alveolar proteinosis*. Am J Med Genet A, 2013. **161A**(10): p. 2594-9.
15. Hildebrandt, J., et al., *Characterization of CSF2RA mutation related juvenile pulmonary alveolar proteinosis*. Orphanet J Rare Dis, 2014. **9**: p. 171.
16. Eldar, M., et al., *Pulmonary alveolar proteinosis associated with fanconi's anemia*. Respiration, 1979. **38**(3): p. 177-9.
17. Dirksen, U., et al., *Fanconi anemia and beta c deficiency-associated pulmonary alveolar proteinosis as two hereditary diseases of childhood which are potentially curable by stem cell gene therapy but require different therapeutic approaches*. Klin Padiatr, 1999. **211**(4): p. 329-35.
18. Ohnishi, T., et al., *Secondary pulmonary alveolar proteinosis associated with myelodysplastic syndrome*. Intern Med, 2003. **42**(2): p. 187-90.
19. Ishii, H., et al., *Secondary pulmonary alveolar proteinosis complicating myelodysplastic syndrome results in worsening of prognosis: a retrospective cohort study in Japan*. BMC Pulm Med, 2014. **14**: p. 37.

20. Birsak, C.A., et al., *Pulmonary alveolar proteinosis: a complication in patients with hematologic malignancy*. *Neth J Med*, 2000. **56**(5): p. 193-7.
21. Du, E.Z., et al., *Severe alveolar proteinosis following chemotherapy for acute myeloid leukemia in a lung allograft recipient*. *J Thorac Imaging*, 2001. **16**(4): p. 307-9.
22. Abdul Rahman, J.A., Y.P. Moodley, and M.J. Phillips, *Pulmonary alveolar proteinosis associated with psoriasis and complicated by mycobacterial infection: successful treatment with granulocyte-macrophage colony stimulating factor after a partial response to whole lung lavage*. *Respirology*, 2004. **9**(3): p. 419-22.
23. Merino-Angulo, A., M. Perez-Marti, and R. Diaz de Otazu, *Pulmonary alveolar phospholipoproteinosis associated with amyloidosis*. *Chest*, 1990. **98**(4): p. 1048.
24. Bomhard, E.M., *Particle-induced Pulmonary Alveolar Proteinosis and Subsequent Inflammation and Fibrosis*. *Toxicol Pathol*, 2017: p. 192623316688959.
25. Keller, C.A., et al., *Pulmonary alveolar proteinosis in a painter with elevated pulmonary concentrations of titanium*. *Chest*, 1995. **108**(1): p. 277-80.
26. Xiao, Y.L., et al., *Pulmonary alveolar proteinosis in an indium-processing worker*. *Chin Med J (Engl)*, 2010. **123**(10): p. 1347-50.
27. Ballantyne, B., *Pulmonary alveolar phospholipoproteinosis induced by Orasol Navy Blue dust*. *Hum Exp Toxicol*, 1994. **13**(10): p. 694-9.
28. Chew, R., S. Nigam, and P. Sivakumaran, *Alveolar proteinosis associated with aluminium dust inhalation*. *Occup Med (Lond)*, 2016. **66**(6): p. 492-4.
29. Wright, J.R., *Host defense functions of pulmonary surfactant*. *Biol Neonate*, 2004. **85**(4): p. 326-32.
30. LeVine, A.M., et al., *Surfactant protein A-deficient mice are susceptible to group B streptococcal infection*. *J Immunol*, 1997. **158**(9): p. 4336-40.
31. LeVine, A.M., et al., *Absence of SP-A modulates innate and adaptive defense responses to pulmonary influenza infection*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002. **282**(3): p. L563-72.
32. Schaub, B., et al., *Surfactant protein D deficiency influences allergic immune responses*. *Clin Exp Allergy*, 2004. **34**(12): p. 1819-26.
33. Ikegami, M. and A.H. Jobe, *Surfactant protein metabolism in vivo*. *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1408**(2-3): p. 218-25.
34. Lee, K.N., et al., *Pulmonary alveolar proteinosis: high-resolution CT, chest radiographic, and functional correlations*. *Chest*, 1997. **111**(4): p. 989-95.
35. Wang, B.M., et al., *Diagnosing pulmonary alveolar proteinosis. A review and an update*. *Chest*, 1997. **111**(2): p. 460-6.
36. Tazawa, R., et al., *Inhaled granulocyte/macrophage-colony stimulating factor as therapy for pulmonary alveolar proteinosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010. **181**(12): p. 1345-54.
37. Dranoff, G., et al., *Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis*. *Science*, 1994. **264**(5159): p. 713-6.
38. Yoshida, M., et al., *GM-CSF regulates protein and lipid catabolism by alveolar macrophages*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001. **280**(3): p. L379-86.
39. Hamilton, J.A. and G.P. Anderson, *GM-CSF Biology*. *Growth Factors*, 2004. **22**(4): p. 225-31.
40. Hercus, T.R., et al., *The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor: linking its structure to cell signaling and its role in disease*. *Blood*, 2009. **114**(7): p. 1289-98.
41. Notarangelo, L.D. and I. Pessach, *Out of breath: GM-CSFRalpha mutations disrupt surfactant homeostasis*. *J Exp Med*, 2008. **205**(12): p. 2693-7.

42. Trapnell, B.C. and J.A. Whitsett, *Gm-CSF regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense*. *Annu Rev Physiol*, 2002. **64**: p. 775-802.
43. Lilly, M., et al., *Sustained expression of the pim-1 kinase is specifically induced in myeloid cells by cytokines whose receptors are structurally related*. *Oncogene*, 1992. **7**(4): p. 727-32.
44. Matikainen, S., et al., *Interferon-alpha activates multiple STAT proteins and upregulates proliferation-associated IL-2Ralpha, c-myc, and pim-1 genes in human T cells*. *Blood*, 1999. **93**(6): p. 1980-91.
45. Matsumoto, A., et al., *CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation*. *Blood*, 1997. **89**(9): p. 3148-54.
46. Burgess, A.W. and D. Metcalf, *The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors*. *Blood*, 1980. **56**(6): p. 947-58.
47. Stanley, E., 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): p. 5592-6.
48. Robb, L., et al., *Hematopoietic and lung abnormalities in mice with a null mutation of the common beta subunit of the receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukins 3 and 5*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(21): p. 9565-9.
49. Ikegami, M., et al., *Surfactant metabolism in transgenic mice after granulocyte macrophage-colony stimulating factor ablation*. *Am J Physiol*, 1996. **270**(4 Pt 1): p. L650-8.
50. Shibata, Y., et al., *GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1*. *Immunity*, 2001. **15**(4): p. 557-67.
51. Vremec, D., et al., *The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs*. *Eur J Immunol*, 1997. **27**(1): p. 40-4.
52. Darnell, J.E., Jr., I.M. Kerr, and G.R. Stark, *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins*. *Science*, 1994. **264**(5164): p. 1415-21.
53. Zhong, Z., Z. Wen, and J.E. Darnell, Jr., *Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6*. *Science*, 1994. **264**(5155): p. 95-8.
54. Schmitt-Ney, M., et al., *Beta-casein gene promoter activity is regulated by the hormone-mediated relief of transcriptional repression and a mammary-gland-specific nuclear factor*. *Mol Cell Biol*, 1991. **11**(7): p. 3745-55.
55. Schmitt-Ney, M., et al., *Developmental and environmental regulation of a mammary gland-specific nuclear factor essential for transcription of the gene encoding beta-casein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(7): p. 3130-4.
56. Schmitt-Ney, M., et al., *Mammary gland-specific nuclear factor activity is positively regulated by lactogenic hormones and negatively by milk stasis*. *Mol Endocrinol*, 1992. **6**(12): p. 1988-97.
57. Wakao, H., F. Gouilleux, and B. Groner, *Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response*. *EMBO J*, 1994. **13**(9): p. 2182-91.
58. Lin, J.X., et al., *Cloning of human Stat5B. Reconstitution of interleukin-2-induced Stat5A and Stat5B DNA binding activity in COS-7 cells*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(18): p. 10738-44.

59. Liu, X., et al., *Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(19): p. 8831-5.
60. Mui, A.L., et al., *Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs*. EMBO J, 1995. **14**(6): p. 1166-75.
61. Ihle, J.N., *The Stat family in cytokine signaling*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(2): p. 211-7.
62. Mui, A., et al., *Function of the common beta subunit of the GM-CSF/IL-3/IL-5 receptors*. Adv Exp Med Biol, 1994. **365**: p. 217-23.
63. Azam, M., et al., *Functionally distinct isoforms of STAT5 are generated by protein processing*. Immunity, 1997. **6**(6): p. 691-701.
64. Azam, M., et al., *Interleukin-3 signals through multiple isoforms of Stat5*. EMBO J, 1995. **14**(7): p. 1402-11.
65. Schindler, C. and J.E. Darnell, Jr., *Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 621-51.
66. Stocklin, E., et al., *Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor*. Nature, 1996. **383**(6602): p. 726-8.
67. Welte, T., et al., *Prolactin-dependent activation of a tyrosine phosphorylated DNA binding factor in mouse mammary epithelial cells*. Mol Endocrinol, 1994. **8**(8): p. 1091-102.
68. Hou, J., et al., *Identification and purification of human Stat proteins activated in response to interleukin-2*. Immunity, 1995. **2**(4): p. 321-9.
69. Foxwell, B.M., et al., *Interleukin-7 can induce the activation of Jak 1, Jak 3 and STAT 5 proteins in murine T cells*. Eur J Immunol, 1995. **25**(11): p. 3041-6.
70. Barahmand-pour, F., et al., *Colony-stimulating factors and interferon-gamma activate a protein related to MGF-Stat 5 to cause formation of the differentiation-induced factor in myeloid cells*. FEBS Lett, 1995. **360**(1): p. 29-33.
71. Wartmann, M., et al., *Lactogenic hormone activation of Stat5 and transcription of the beta-casein gene in mammary epithelial cells is independent of p42 ERK2 mitogen-activated protein kinase activity*. J Biol Chem, 1996. **271**(50): p. 31863-8.
72. Kofoed, E.M., et al., *Growth hormone insensitivity associated with a STAT5b mutation*. N Engl J Med, 2003. **349**(12): p. 1139-47.
73. Hwa, V., et al., *Severe growth hormone insensitivity resulting from total absence of signal transducer and activator of transcription 5b*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(7): p. 4260-6.
74. Tazawa, R., et al., *Duration of benefit in patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis after inhaled granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy*. Chest, 2014. **145**(4): p. 729-37.
75. Luisetti, M., et al., *Plasmapheresis for treatment of pulmonary alveolar proteinosis*. Eur Respir J, 2009. **33**(5): p. 1220-2.
76. Kavuru, M.S., T.L. Bonfield, and M.J. Thomassen, *Plasmapheresis, GM-CSF, and alveolar proteinosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(7): p. 1036; author reply 1036-7.
77. Borie, R., et al., *Rituximab therapy in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis*. Eur Respir J, 2009. **33**(6): p. 1503-6.
78. Kavuru, M.S., et al., *An open-label trial of rituximab therapy in pulmonary alveolar proteinosis*. Eur Respir J, 2011. **38**(6): p. 1361-7.
79. Malur, A., et al., *Rituximab therapy in pulmonary alveolar proteinosis improves alveolar macrophage lipid homeostasis*. Respir Res, 2012. **13**: p. 46.

## Literatur

80. Shende, R.P., et al., *Granulocyte macrophage colony stimulating factor therapy for pulmonary alveolar proteinosis*. J Assoc Physicians India, 2013. **61**(3): p. 209-11.
81. Nishinakamura, R., et al., *The pulmonary alveolar proteinosis in granulocyte macrophage colony-stimulating factor/interleukins 3/5 beta c receptor-deficient mice is reversed by bone marrow transplantation*. J Exp Med, 1996. **183**(6): p. 2657-62.
82. Dirksen, U., et al., *Defective expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/interleukin-3/interleukin-5 receptor common beta chain in children with acute myeloid leukemia associated with respiratory failure*. Blood, 1998. **92**(4): p. 1097-103.
83. Fukuno, K., et al., *Successful cord blood transplantation for myelodysplastic syndrome resulting in resolution of pulmonary alveolar proteinosis*. Bone Marrow Transplant, 2006. **38**(8): p. 581-2.
84. Suzuki, T., et al., *Pulmonary macrophage transplantation therapy*. Nature, 2014. **514**(7523): p. 450-4.

## 9. Anhang

### 9.1. Tabellen

Anhang Tab.1 Patientenkollektiv

Patient	Geschlecht	Jahrgang	Alter bei BAL	Ätiologie
J1	weiblich	1998	10	CSF2Ra-Mutation (Serin 25 (TCG) → Stop (TAG) -Mutation in Exon 3)
J2	männlich	1997	11	CSF2Ra-Mutation (Komplette Deletion des CSF2RA)
J3	weiblich	2000	1	CSF2Rb-Mutation
J4	weiblich	1991	14	kein Nachweis einer Mutation
J5	weiblich	1995	10	kein Nachweis einer Mutation
A1	weiblich	1971	37	Nachweis von GMCSF-Autoantikörpern
A2	weiblich	1961	39	Nachweis von GMCSF-Autoantikörpern
A3	männlich	1973	32	Nachweis von GMCSF-Autoantikörpern
A4	weiblich	1964	39	Nachweis von GMCSF-Autoantikörpern
A5	weiblich	1958	49	Nachweis von GMCSF-Autoantikörpern
A6	männlich	1966	42	Nachweis von GMCSF-Autoantikörpern
A7	männlich	1961	45	Nachweis von GMCSF-Autoantikörpern
A8	männlich	1952	51	Nachweis von GMCSF-Autoantikörpern
A9	männlich	1973	35	Nachweis von GMCSF-Autoantikörpern
A10	weiblich	1975	32	Nachweis von GMCSF-Autoantikörpern
A11	männlich	1953	52	Nachweis von GMCSF-Autoantikörpern
A12	weiblich	1953	49	Nachweis von GMCSF-Autoantikörpern
A13	männlich	1958	53	Nachweis von GMCSF-Autoantikörpern
A14	weiblich	1981	25	Nachweis von GMCSF-Autoantikörpern
A15	männlich	1960	44	Nachweis von GMCSF-Autoantikörpern
O1	weiblich	1952	42	kein Nachweis von GMCSF-Autoantikörpern
O2	männlich	1962	56	kein Nachweis von GMCSF-Autoantikörpern
O3	männlich	1966	35	kein Nachweis von GMCSF-Autoantikörpern

Patient	Andere Organsysteme	Röntgen Thorax	CT Thorax	LuFu	Therapie
J1	Zerebrale Krampfanfälle, PEG-Sonde	interstitial thickening, reticular pattern	reticular pattern and groundglass attenuation of the hole lung	FEV1 74,1% FVC 64,7%	Lavage, Corticosteroide, Antibiotika, O2, Diuretika
J2					Lavage
J3	Gedeihstörung, unklare Systemerkrankung, Z.n. Leber-Tx, Mikrozephalus, dysmorphe Stigmata	bilateral attenuation	pleural effusion, infiltrates	SpO2 > 97% mit O2 1-2l	Lavage, Tacrolimus, Corticosteroide
J4	Strabismus, Katarakt	symmetric aggregation bs		SpO2 > 90% mit O2 0,75l	Lavage
J5	Minderwuchs, muskulärer Hypotonus, Nachtschweiß	diffuse interstitial shadow		SpO2 < 80%	Lavage, Corticosteroide, Azithromycin
A1		discrete increased interstitial drawing basal	13.07.04: homogeneous reticulonodular attenuation pattern	FEV1 86,3% FVC 83,2%	Lavage
A2	Adipositas, Nikotinabusus	progressive infiltrations bs		TLC 55% FEV1 39%	Lavage, Fenoterol, Formoterol, Ipratropiumbromid
A3		consolidation with air bronchogram	ground glass attenuation, interstitial markings	FEV1 61% FVC 52%	Lavage, Corticosteroide,
A4	Trommelschlegelfinger, Uhrglasnägel	reticular shadowing		FEV1 45% TLC 100%	Lavage
A5	Hyperlipidämie, Gastritis, Nikotinabusus	multiple small infiltrates in the lower fields		FEV1 86% VCmax 103%	Lavage, Corticosteroide,
A6	Nikotinabusus	infiltrates	ground glass attenuation, increased reticular shadowing	FEV1 84% VC 77% TLC 64%	Lavage
A7		coalescenting infiltrates on both sides, in the lower fields air bronchogram	crazy paving pattern	TLC 78% VC 81%	Lavage
A8	Arterielle Hypertension, Adipositas, Z.n. Nikotinabusus, Steatosis hepatis	bilateral diffuse nodular alveolar shadowing		Leichte Restriktion	Lavage, Corticosteroide,

## Anhang

A9		distinctive reticular thickening	interstitial infiltrates	FEV1 90% TLC 84%	Lavage
A10	Hyperlipidämie, Depression, Tinnitus	alveolar shadowing	alveolar proteinosis	FEV1 71% VC 69%	Lavage
A11	Nikotin-, Cocain-, Benzodiazepine-Abusus	diffuse nodular shadowing	crazy paving mainly on the left side	FEV1 81% TLC: 66% VC: 70%	Lavage, O2, ACC
A12	Nikotinabusus	infiltrates in the middle and lower lung lobes		FEV1: 93% VC: 93%	Lavage
A13	Vorhofflimmern, Bandscheibenvorfall, Z.n. ulcus duodeni, TVT, Nikotinabusus	reticular thickening mainly in the right lower field	alveolar markings, septal thickening	FEV1 88% VC 84% TLC 78%	Lavage, Corticosteroide,
A14	Nikotinabusus, Adipositas	alveolar shadowing mainly central	alveolar proteinosis	FEV1 89%	Lavage, Corticosteroide,
A15	Arterielle Hypertension, Adipositas, Nikotinabusus	subtotal shadowing of both lungs		FEV1 61% TLC 70%	Lavage
O1	Mentale Retardierung	Infiltrates	interlobular septal thickening, fibrosis	TLC 40% VC 57%	Lavage, Atrovent, Sotalol
O2	Arterielle Hypertension, Aortenklappeninsuffizienz I°, OSAS, Z.n. Nikotinabusus	increased streaking in the lower fields	diffuse alveolar shadowing, interlobular thickening, characteristic of alveolar proteinosis	FEV1 133% VC127%	Lavage, O2
O3	Aortenklappeninsuffizienz, Morbus Bowen, Hepatopathie, unklarer zellulärer Immundefekt	bilateral infiltrates	interstitial thickening and destructions on both sides, crazy-paving		Lavage, Corticosteroide, Azathioprine

## Anhang Tab.2 Kontrollgruppe C Biochemie

Kontrollen	Geschlecht	Jahrgang	Alter bei Probenentnahme
C1	weiblich	1999	4
C2	männlich	1991	15
C3	weiblich	1989	16
C4	männlich	1995	2
C5	männlich	2000	8
C6	weiblich	2007	1
C7	männlich	1996	6
C8	weiblich	2005	1
C9	weiblich	2000	3
C10	männlich	2004	1
C11	männlich	2003	1
C12	männlich	1990	14
C13	männlich	2008	1
C14	weiblich	2002	5
C15	männlich	1985	16
C16	männlich	2000	5
C17	weiblich	1989	14
C18	weiblich	2007	1
C19	weiblich	2004	4
C20	männlich	1996	8
C21	männlich	1996	8
C22	männlich	2000	2
C23	weiblich	1982	15
C24	männlich	2000	4
C25	männlich	1996	5
C26	männlich	1992	10
C27	männlich	2004	3
C28	weiblich	1994	11
C29	männlich	2001	5
C30	männlich	2001	4
C31	männlich	1994	6
C32	weiblich	2006	3
C33	männlich	1994	11
C34	weiblich	1996	10
C35	männlich	1991	15
C36	männlich	2006	12
C37	männlich	2001	17
C38	männlich	1997	9

Anhang

Anhang Tab.3 Kontrollgruppe K Funktionsassays

Kontrollen	Geschlecht	Jahrgang	Alter bei Probenentnahme
K1	weiblich	1986	24
K2	männlich	1983	27
K3	weiblich	1986	24
K4	weiblich	1985	25
K5	weiblich	1994	16
K6	männlich	2004	6

Anhang Tab. 4 Messergebnisse der biochemischen Untersuchungen der Patienten (\* = keine Daten aufgrund fehlenden Materials, R=Ergebnis GM-CSF-Antikörper, n=negativ, p=positiv)

Patient	GM-CSF Serum [pg/ml]	GM-CSF BAL [pg/ml]	SPA BAL [ng/ml]	SPD BAL [ng/ml]	TP BAL [µg/ml]	GM-CSF-Ak BAL undilut et	R	GM-CSF-Ak BAL 1:4	R	GM-CSF-Ak BAL 1:10	R	GM-CSF-Ak Serum 1:750	R	GM-CSF-Ak Serum 1:1500	R	GM-CSF-Ak Serum 1:7500	R
J1	0,0	286,6	74690,0	4240,0	1233,5	0,93	n	1,20	n	0,94	n	1,16	n	1,02	n	1,00	n
J2	14,9	127,9	95380,0	4070,0	1635,0	1,65	n	1,00	n	1,00	n	*		*		*	
J3	8,2	20,6	17170,0	97,9	73,0	1,16	n	1,54	n	1,31	n	1,69	n	0,86	n	*	
J4	0,0	0,0	*	*	561,4	*		*		*		0,95	n	1,00	n	1,04	n
J5	0,0	93,4	94120,0	2580,0	974,0	*		*		*		2,59	p	1,91	n	1,12	n
O1	13,6	22,4	14920,0	119,8	272,2	*		*		*		1,05	n	0,84	n	*	
O2	0,0	11,9	*	*	*	*		*		*		2,46	p	1,56	n	1,10	n
O3	5,0	50,4	*	*	114,3	*		*		*		*		*		*	
A1	0,0	*	31760,0	590,0	295,2	*		*		*		11,10	p	9,20	p	2,79	p
A2	0,0	0,0	268517,2	25,8	1612,0	*		*		*		21,60	p	16,20	p	*	
A3	0,0	55,8	150500,0	755,4	1069,6	*		*		*		4,43	p	3,11	p	1,26	n
A4	0,0	2,7	6629100	1190,0	*	*		*		*		5,59	p	3,62	p	1,26	n
A5	0,0	2,5	*	*	*	*		*		*		10,00	p	8,10	p	3,70	p
A6	0,0	2,4	*	*	288,3	*		*		*		3,63	p	2,55	p	*	
A7	0,0	1,4	*	*	561,9	*		*		*		7,44	p	5,05	p	1,82	n
A8	0,0	4,1	4990000	330,0	573,6	2,70	p	4,62	p	*		3,72	p	2,82	p	1,36	n
A9	0,0	8,1	*	*	1326,1	*		11,20	p	7,79	p	5,24	p	3,36	p	1,44	n
A10	0,0	0,0	*	*	*	*		*		*		4,22	p	2,54	p	*	
A11	0,0	0,0	723600,0	430,0	2650,1	11,14	p	11,27	p	9,25	p	7,18	p	4,78	p	2,20	p
A12	0,0	1,3	20371,8	6210,0	199,3	*		*		*		10,00	p	7,07	p	*	
A13	0,0	1,0	*	*	1547,5	*		*		*		13,98	p	10,94	p	4,75	p
A14	0,0	*	*	*	*	*		9,12	p	5,46	p	5,41	p	3,55	p	2,46	p
A15	0,0	*	415900,0	300,0	6865,0	*		*		*		3,53	p	2,67	p	1,44	n

Anhang Tab. 5 Messergebnisse der biochemischen Untersuchungen der Kontrollen (\* = keine Daten aufgrund fehlenden Materials).

Kontrolle	GMCSF Serum [pg/ml]	GMCSF BAL [pg/ml]	SPA BAL [ng/ml]	SPD BAL [ng/ml]	TP BAL [µg/ml]
C1	0,0	1,0	*	*	*
C2	0,0	1,0	*	*	*
C3	0,0	0,0	*	*	31,6
C4	0,0	0,0	5198,0	56,4	58,7
C5	*	*	*	*	*
C6	*	*	*	*	*
C7	0,0	0,0	*	*	*
C8	*	1,8	*	*	110,2
C9	0,0	0,0	5360,0	150,0	201,5
C10	0,0	0,0	*	*	81,3
C11	0,0	3,7	*	*	*
C12	0,0	4,4	8877,6	137,5	48,6
C13	0,0	1,6	*	*	30,2
C14	*	0,0	*	*	75,7
C15	0,0	1,0	*	*	87,4
C16	0,0	4,6	*	*	*
C17	0,0	1,0	3486,6	71,4	93,5
C18	0,0	2,0	*	*	*
C19	0,0	1,2	*	*	131,1
C20	0,0	0,0	*	*	*
C21	0,0	3,3	*	*	*
C22	*	1,0	*	*	*
C23	0,0	2,2	1947,6	29,2	58,1
C24	0,0	2,2	*	*	649,7
C25	0,0	1,0	*	*	*
C26	0,0	3,1	*	*	*
C27	0,0	1,0	*	*	*
C28	*	1,2	*	*	47,1
C29	0,0	0,0	*	*	132,1

## Anhang

C30	0,0	0,0	*	*	110,6
C31	0,0	1,8	*	*	*
C32	0,0	0,0	*	*	18,8
C33	0,0	1,8	*	*	*
C34	0,0	0,0	*	*	134,4
C35	0,0	3,5	*	*	59,6
C36	0,0	0,0	*	*	*
C37	0,0	0,0	*	*	*
C38	0,0	4,4	*	*	65,5
M±σ	0,0 ±0,01	1,4 ±0,24	4974 ±1159	88,9 ±23,48	111,3 ±30,01

Anhang Tab. 6 FACS der neutrophilen Granulozyten aus Heparin und EDTA-Blut im Vergleich Zellen aus heparinisiertem und EDTA-Blut, MFI vor und nach Stimulation mit GM-CSF 50 ng/ml für 30 min bei 37 °C, Markierung der Oberflächenmarker, Gattung der neutrophilen Granulozyten. Aufgeführt ist der jeweilige MFI abzüglich der Negativkontrolle.

PMN	CD11b		GMCSFRa		GMCSFRb		pSTAT5	
	PBS	GM-CSF	PBS	GM-CSF	PBS	GM-CSF	PBS	GM-CSF
1 Heparin	331,2	710,4	21,0	51,4	77,7	170,9	0,5	3,1
1 EDTA	322,5	613,2	18,3	21,3	77,2	129,6	2,0	2,4
2 Heparin	384,3	426,1	30,3	59,3	94,0	234,0	18,2	27,7
2 EDTA	372,4	409,9	40,8	41,7	89,4	203,2	17,3	28,7
3 Heparin		382,0	30,0	57,1	149,5	171,3	11,7	20,8
3 EDTA	426,1	384,3	59,3	30,3	94,0	234,0	17,8	24,4
4 Heparin	623,6	633,8	39,1	57,1	109,9	124,8	13,5	24,4
4 EDTA	603,6	521,0	43,8	36,3	77,7	94,0	17,4	21,9
5 Heparin	468,2	747,5	42,8	46,3	64,3	118,8	11,7	15,8
5 EDTA	539,3	529,9		39,0		55,2	14,1	13,8

Anhang Tab. 7 FACS der Monozyten aus Heparin und EDTA-Blut im Vergleich Zellen aus heparinisiertem und EDTA-Blut, MFI vor und nach Stimulation mit GM-CSF 50 ng/ml für 30 min bei 37 °C, Markierung der Oberflächenmarker, Gattung der Monozyten. Aufgeführt ist der jeweilige MFI abzüglich der Negativkontrolle.

PBMC	CD11b		GMCSFRa		GMCSFRb	
	PBS	GM-CSF	PBS	GM-CSF	PBS	GM-CSF
1 Heparin	631,8	885,7	238,4	361,6	299,3	463,7
1 EDTA	556,1	599,5	84,7	228,8	116,0	452,1
2 Heparin		855,9	346,7	366,8	414,1	494,7
2 EDTA	881,1	1008,1	370,5	371,3	192,5	376,5
3 Heparin	824,6	1019,2	343,5	348,5	465,1	475,4
3 EDTA	1050,8	922,4	406,2	347,7	222,9	
4 Heparin	974,8	985,1	348,9	326,6	372,7	409,7
4 EDTA	1066,4	894,9	337,5	309,1	212,4	229,7
5 Heparin	941,2	1241,8	335,5	338,1	168,8	538,9
5 EDTA	948,6	984,0		308,9		90,1

Anhang

Anhang Tab. 8 FACS der neutrophilen Granulozyten, extrazellulär

MFI vor und nach Stimulation mit GM-CSF 50 ng/ml für 30 min bei 37 °C, Markierung der Oberflächenmarker, Gattung der neutrophilen Granulozyten. Aufgeführt ist der jeweilige MFI abzüglich der Negativkontrolle.

PMN	CD11b PBS	CD11b GM-CSF	GMCSFRa PBS	GMCSFRa GM-CSF	GMCSFRb PBS	GMCSFRb GM-CSF
J1	368,9	437,9	15,6	15,1		
J1	833,3	876,3	6,1	7,9		
J1	471,6	534,5	18,4	8,3	400,0	875,3
J1	369,3	362,3	580,1	207,4	734,8	1027,7
M1	335,1	484,4	775,8	649,2	1107,4	1254,5
M1	311,3	662,7	30,8	30,6		
M1	572,3	1005,2	23,5	18,5		
F1	345,1	399,8	576,7	966,5	1406,2	1435,0
F1	362,5	697,1	42,6	44,4		
F1	451,6	939,3	23,6	25,7		
K1	696,0	872,6	28,5	33,3		
K1	453,2	677,4	21,4	33,3		
K1	644,7	687,2	49,2	49,8		
K1	383,3	365,7	36,1	37,9		
K1	331,2	710,4	21,0	51,4	77,7	170,9
K1	384,3	426,1	30,3	59,3	94,0	234,0
K1	623,6	633,8	39,1	57,1	109,9	124,8
K1	293,0	594,2	122,2	238,8		
K1	464,2	722,2	18,4	37,2	399,3	419,6
K1	326,2	386,6	540,2	844,1	836,3	1239,3
K2	532,0	1038,5	42,9	24,4		
K3	5,6	382,0	30,0	57,1	149,5	171,3
K4	468,2	747,5	42,8	46,3	64,3	118,8
K5	425,5	625,7	4,8	15,6		
K6	847,1	1143,8	11,8	9,6		

Anhang Tab. 9 FACS der Monozyten

MFI vor und nach Stimulation mit GM-CSF 50 ng/ml für 30 min bei 37 °C, Markierung der Oberflächenmarker, bzw. der intrazellulären Transkriptionsfaktoren, Gattung der Monozyten. Aufgeführt ist der jeweilige MFI abzüglich der Negativkontrolle.

PBMC	CD11b PBS	CD11b GM-CSF	GMCSFRa PBS	GMCSFRa GM-CSF	GMCSFRb PBS	GMCSFRb GM-CSF
J1	584,6	536,5	12,7	7,8	510,1	1226,1
J1	561,6	484,1	842,1	293,2	1329,5	862,6
M1	245,1	531,2	139,3	153,2		
M1	290,3	355,6	690,0	810,4	1293,6	1428,5
F1	205,2	420,0	4,4	186,7		
F1	381,5	454,2	519,2	1148,5	1380,1	1615,2
K1	586,7	663,4	140,3	193,7		
K1	636,1	624,2	281,9	262,7		
K1	599,1	746,6	257,7	285,2		

## Anhang

K1	403,4	539,8	200,6	224,0		
K1	631,8	885,7	238,4	361,6	299,3	463,7
K1			346,7	366,8	414,1	494,7
K1	974,8	985,1	348,9	326,6	372,7	409,7
K1	610,0	799,0	322,2	694,5		
K1	515,5	715,0	9,9	340,1	506,6	526,4
K1	561,6	484,1	842,1	293,2	862,6	1329,5
K3	824,6	1019,2	343,5	348,5	465,1	475,4
K4	941,2	1241,8	335,5	338,1	168,8	538,9
K6	691,9	852,9	94,3	220,4		

### Anhang Tab. 10 FACS der neutrophilen Granulozyten, intrazellulär

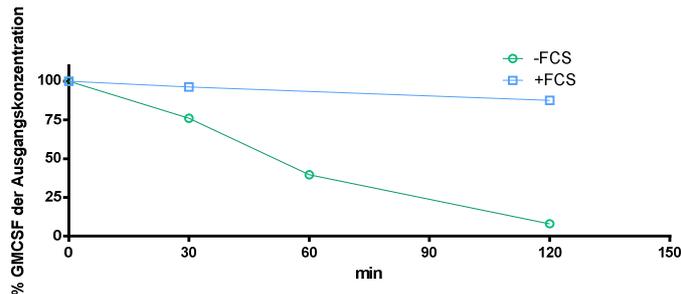
MFI vor und nach Stimulation mit GM-CSF 50 ng/ml für 30 min bei 37 °C, Markierung der intrazellulären Transkriptionsfaktoren nach Permeabilisierung der Zellmembran, Gattung der neutrophilen Granulozyten. Aufgeführt ist der jeweilige MFI abzüglich der Negativkontrolle.

PMN	STAT5 PBS	STAT5 GM-CSF	pSTAT5 PBS	pSTAT5 GM-CSF
J1			11,7	10,8
J1	1951,5	1058,4	21,6	21,5
J1	663,5	1154,2	13,7	12,3
M1	1277,0	701,7	8,5	70,2
M1			14,4	28,3
F1	1722,4	4105,8	20,6	159,8
F1			17,0	32,2
K1			12,7	31,6
K1			20,7	34,4
K1			0,6	3,1
K1			19,2	35,7
K1			15,5	27,4
K1	814,5	739,5	21,6	126,2
K1	1534,1	2384,1	37,2	78,8
K1	1668,2	1794,0	28,4	154,5
K1	1757,1	1791,1	32,5	177,1
K3			11,7	20,8
K4			11,7	30,8

## **9.2. Vorversuche**

### **Vorversuch 1: Effekt von FCS auf die GM-CSF-Konzentration**

In einem Vorversuch zur Bestimmung des optimalen Mediums für das Clearance Assay wurden eine Million isolierte neutrophile Granulozyten von gesunden Erwachsenen aus heparinisiertem Blut (vgl. 4.3.1) mit GM-CSF 10 pg/ml in RPMI mit zugesetztem fötalem bovinem Serum (FCS) und in RPMI ohne Zusätze inkubiert.



Anhang Abb. 1 FCS-Versuch

Aus heparinisiertem Blut isolierte gesunde neutrophile Granulozyten wurden in RPMI mit FCS und in RPMI ohne FCS mit 10 pg/ml GM-CSF inkubiert. Nach 0, 30, 60, 120 min wurde jeweils 1 ml abpipettiert und die Zellen abzentrifugiert. Im Überstand wurde der GM-CSF-Verbrauch gemessen.

Im fötalen bovines Serum wurde im Gegensatz zu der Vergleichsprobe ohne FCS nur wenig GM-CSF von den neutrophilen Granulozyten aufgenommen, nach 120 Minuten lag die GM-CSF-Konzentration im Medium mit FCS bei 88 % der Ausgangskonzentration, im Medium ohne FCS bei 8 % der Ausgangskonzentration. Die folgenden Versuche wurden in RPMI ohne Zusätze durchgeführt.

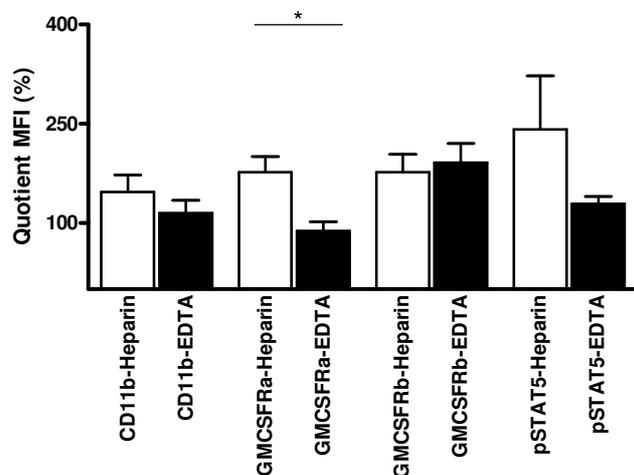
### **Vorversuch 2: Zellen aus heparinisiertem vs. Zellen aus EDTA-Blut**

In einem Vorversuch wurde die Rezeptorexprimierbarkeit von Zellen, die aus heparinisiertem Blut isoliert wurden, mit aus EDTA – Blut isolierten Zellen verglichen um in den folgenden Versuchen eine eingeschränkte Expression durch die Gerinnungshemmer Heparin oder EDTA zu unterbinden.

Leukozyten aus heparinisiertem oder mit EDTA versetztem Blut wurden isoliert und über 30 Minuten in GM-CSF 50 ng/ml oder in PBS bei 37 °C inkubiert, die Zellen wurden geFACSt und die Veränderung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von CD11b, GMCSFRa, GMCSFRb auf neutrophilen Granulozyten und nach Permeabilisierung die Veränderung der MFI von pSTAT5 in neutrophilen Granulozyten jeweils vor und nach Stimulation mit GM-CSF gemessen.

Anhang Tab. 11 FACS der neutrophilen Granulozyten aus heparinisierem und EDTA-Blut  
Zellen aus heparinisierem und EDTA-Blut, MFI vor und nach Stimulation mit GM-CSF 50 ng/ml für 30 min bei 37 °C, Markierung der Oberflächenmarker, Gattung der neutrophilen Granulozyten. Aufgeführt ist die mittlere Änderung des FMI (Einzelwerte siehe Anhang Tab.6).

PMN	CD11b	n	GMCSFRa	n	GMCSFRb	n	pSTAT5	n
$\bar{x}$ MFI <sub>Heparin</sub>	146,7 ± 25,95	4	176,9 ± 23,24	4	176,3 ± 27,37	4	241,6 ± 80,51	5
$\bar{x}$ MFI <sub>EDTA</sub>	115,0 ± 29,22	5	88,15 ± 14,11	5	191,3 ± 29,03	5	128,9 ± 11,31	5



Anhang Abb. 2 PMN: Heparin vs. EDTA

Vergleich der Stimulierbarkeit der Rezeptorexpression neutrophiler Granulozyten aus heparinisierem und EDTA-Blut. Dargestellt ist die mit FACS gemessene MFIR (prozentuale Änderung der MFI) des Aktivitätsparameters CD11b, GMCSFRa, GMCSFRb und pSTAT5 ohne und nach 30 min Stimulation mit GM-CSF 50 ng/ml bei 37,0 °C. n = 5. \* p ≤ 0,05

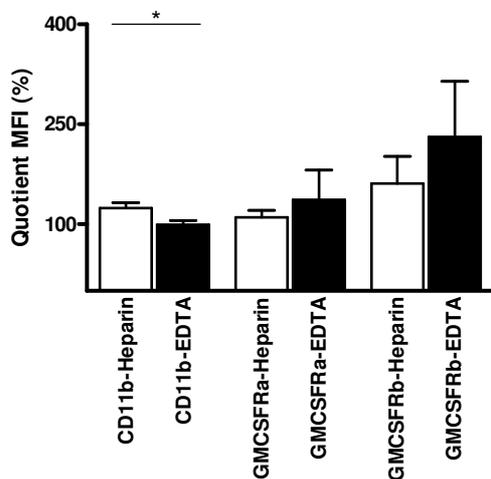
Deutlich zeigte sich eine höhere Expression der Rezeptoren nach Stimulation mit GM-CSF in PMN aus heparinisierem Blut. Statistisch unterschied sich die Aktivität, gemessen am CD11b, in den beiden Gruppen nicht. Die Alphakette des GM-CSF-Rezeptors ließ sich ebenfalls auf neutrophilen Granulozyten aus heparinisierem Blut vermehrt stimulieren, der Unterschied zu den Zellen aus EDTA-Blut war signifikant (176,9 ± 23,24; 88,15 ± 14,11; p ≤ 0,05). Die Expression der Betakette unterschied sich ebenso wie die intrazelluläre Phosphorylierung des STAT5 der neutrophilen Granulozyten aus heparinisierem Blut und aus EDTA Vollblut nicht.

Ebenfalls wurde die MFIR von Monozyten mit und ohne Stimulation mit GM-CSF 50 mg/ml für 30 min bei 37 °C aus heparinisierem und EDTA Blut miteinander verglichen.

Anhang Tab. 12 FACS der Monozyten aus heparinisierem und EDTA-Blut

Zellen aus heparinisierem und EDTA-Blut, MFI vor und nach Stimulation mit GM-CSF 50 ng/ml für 30 min bei 37 °C, Markierung der Oberflächenmarker, Gattung der Monozyten. Aufgeführt ist der jeweilige MFI abzüglich der Negativkontrolle.

PMN	CD11b	n	GMCSFRa	n	GMCSFRb	n
$\bar{x}$ MFIR <sub>Heparin</sub>	124,2 ± 8,41	5	110,7 ± 10,44	5	161,1 ± 40,53	5
$\bar{x}$ MFIR <sub>EDTA</sub>	99,53 ± 5,87	5	136,9 ± 44,55	4	231,2 ± 83,24	5



Anhang Abb. 3 PBMC: Heparin vs. EDTA

Vergleich der Stimulierbarkeit der Rezeptorexpression auf Monozyten aus heparinisierem und EDTA-Blut. Dargestellt ist die mit FACS gemessene MFIR (prozentuale Änderung der MFI) des Aktivitätsparameters CD11b, GMCSFRa und GMCSFRb ohne und nach 30 min Stimulation mit GM-CSF 50 ng/ml bei 37,0 °C. n = 5. \* p ≤ 0,05

Die Expression von CD11b durch Monozyten aus heparinisierem Blut unterschied sich von der Expression in EDTA Blut signifikant ( $124,2 \pm 8,41$ ;  $99,53 \pm 5,87$ ;  $p \leq 0,05$ ). Die Stimulierbarkeit von GMCSFRa auf Monozyten unterschied sich nicht signifikant. GMCSFRb wird ebenfalls nicht signifikant vermehrt in einer Gruppe exprimiert.

Bei zum Teil signifikant höherer Expression der Oberflächenrezeptoren auf Zellen aus heparinisierem Blut wurden folglich in den Hauptversuchen die Leukozyten aus heparinisierem Blut verwendet.

### **9.3. Danksagung**

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Matthias Griese für die Übernahme der Doktorvaterschaft, die hervorragende Betreuung, die stets zeitnahe Unterstützung und die mir gewidmete Zeit.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Andrea Schams für die gute Zusammenarbeit und die wertvollen Hilfestellungen bei zahlreichen Versuchen.

Desweiteren danke ich Herrn Dr. Andreas Hector für die Einarbeitung in die Thematik.

Meinem Mann Dr. Fabian Sibbersen danke ich für die Motivation und Unterstützung, die zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

## Eidesstattliche Versicherung

**Sibbersen, Anke**

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Pulmonale Alveolarproteinose: GM-CSF in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen**

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.

**Flensburg, 26.11.2018**

---

Ort, Datum

**Anke Sibbersen**

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand