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

Bronchoalveoläre Lavage bei Kindern mit malignen Erkrankungen, Immunsuppression, Fieber und Lungeninfiltraten

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

vorgelegt von

Manfred Neumann

aus

Landshut

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. M. Griese
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. J. Behr
	Priv. Doz. Dr. M. Dreyling
Dekan:	Prof. Dr. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	13.06.2002

Häufig verwendete Abkürzungen:

ABTS	2,2‘ Azino-di-3-ethyl-benzthiazolinsulfat
AK	Antikörper
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BALF	bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
B-NHL	B-Zell non Hodgkin Lymphom
denat.	denaturierend
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme linked immunosorbant assay
HPTLC	High performance thin layer chromatographie
HRP	horse-radish-peroxidase (Meerrettichperoxidase)
Ig	Immunglobulin
LA	large aggregates (große Surfactant-Aggregate)
Lsg.	Lösung
mkl.	monoklonal
MHD	Morbus Hodgkin
NC	Nitrozellulose
OD	Optische Dichte

PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
pkl.	polyklonal
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RMS	Rhabdomyosarkom
RT	Raumtemperatur
SA	small aggregates (kleine Surfactant-Aggregate)
SAA	schwere aplastische Anämie
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SP-A	Surfactantprotein A
SP-B	Surfactantprotein B
SP-C	Surfactantprotein C
SP-D	Surfactantprotein D
TBS	tris buffered saline (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylenethylendiamine
TFE	1,1,1-Trifluorethanol
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

1 Einleitung 1

2 Material und Methoden 5

2.1 Material 5

2.1.1 Patientengruppe 5

2.1.2 Kontrollgruppe 5

2.1.3 Vorversuchsgruppe 6

2.1.4 Probengewinnung 6

2.1.5 Geräte und Software 7

2.1.6 Verbrauchsmaterial 8

2.1.7 Chemikalien und Lösungen 9

2.1.8 Beschichtungsmaterialien 10

2.1.9 Standards 10

2.1.10 Primär-Antikörper 10

2.1.11 Sekundär-Antikörper 10

2.2 Methoden 11

2.2.1 Allgemeines 11

2.2.2 Bestimmung von Zellzahl und Keimbefall 11

2.2.3 Bestimmung der Oberflächenaktivität 11

2.2.4 Trennung von kleinen und großen Aggregaten 12

2.2.5 Bestimmung des Phospholipidgehaltes 12

2.2.5.1 Lipidextraktion 12

2.2.5.2 Lipidwaschung 13

2.2.5.3 Phospholipidbestimmung 13

2.2.6 Bestimmung der Gesamtproteinmenge 14
2.2.7 Proteinbestimmung mittels ELISA 14
2.2.7.1 ELISA für SP-A: 15
2.2.7.2 ELISA für SP-B: 16
2.2.7.3 ELISA für SP-C: 17
2.2.7.4 ELISA für SP-D: 18
2.2.8 Bestimmung der Bindungsfähigkeit an Kohlenhydrate 19
2.2.8.1 Mannose Bindungs-ELISA für SP-A 19
2.2.8.2 Maltose Bindung-ELISA für SP-D 20
2.2.9 Bestimmung der Bindungsfähigkeit an Pseudomonas aeruginosa 21
2.2.9.1 Pseudomonas aeruginosa Bindungs-ELISA für SP-A 21
2.2.9.2 Pseudomonas aeruginosa Bindungs-ELISA für SP-D 22
2.2.10 Darstellung durch Dünnschichtchromatographie und Immundetektion 23
2.2.11 Proteintrennung durch eindimensionale SDS-Gelelektrophorese 25
2.2.11.1 Gele und Lösungen 25
2.2.11.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gel mit Zwischengel 25
2.2.11.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gel ohne Zwischengel 26
2.2.11.1.3 SDS-Polyacrylamid-Harnstoff-Gel 27
2.2.11.2 Durchführung der eindimensionalen SDS-Gelelektrophorese 28
2.2.12 Proteindarstellung mittels Silberfärbung 28
2.2.13 Proteindarstellung mittels Proteintransfer und Immundetektion 29
2.2.14 Proteintrennung durch zweidimensionale SDS-Gelelektrophorese 30
2.2.14.1 Materialvorbereitung: 31
2.2.14.2 Probenvorbereitung: 32
2.2.14.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF) auf IPG-Fokussierungsstreifen 32

2.2.14.4 Herstellung der SDS-Gele 33
2.2.14.5 Elektrophorese der zweiten Dimension: 34
2.2.15 Rechnergestützte Auswertung der 2D-Gele 35
2.2.16 Datenanalyse mittels Statistiksoftware 37
3 Ergebnisse 38
3.1 Vergleich der Zusammensetzung der Lungenspülflüssigkeit 38
3.1.1 Mikrobiologische Untersuchung 38
3.1.2 Rückgewinnung 38
3.1.3 Oberflächenaktivität 39
3.1.4 Zelluläre Bestandteile der Lavageflüssigkeit 39
3.1.4.1 Gesamtzellzahl 39
3.1.4.2 Makrophagen 40
3.1.4.3 Lymphozyten 40
3.1.4.4 Granulozyten 40
3.1.4.5 Neutrophile Granulozyten 41
3.1.4.6 Eosinophile Granulozyten 41
3.1.5 Azelluläre Bestandteile der Lavageflüssigkeit 41
3.1.5.1 Proteine 42
3.1.5.2 Phospholipide 42
3.1.5.3 Kleine Aggregate (SA) 43
3.1.5.4 Große Aggregate (LA) 43
3.1.5.5 Verhältnis von SA zu LA 43
3.1.5.6 Gehalt an SP-A 44
3.1.5.7 Gehalt an SP-A im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt 44
3.1.5.8 Gehalt an SP-A im Verhältnis zum Phospholipidgehalt 45

3.1.5.9 Bindungsfähigkeit des SP-A an Mannose 45
3.1.5.10 Bindungsfähigkeit des SP-A an Pseudomonas aeruginosa 46
3.1.5.11 Gehalt an SP-D 46
3.1.5.12 Gehalt an SP-D im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt 46
3.1.5.13 Gehalt an SP-D im Verhältnis zum Phospholipidgehalt 47
3.1.5.14 Bindungsfähigkeit des SP-D an Maltose 47
3.1.5.15 Bindungsfähigkeit des SP-D an Pseudomonas aeruginosa 48
3.1.5.16 Gehalt an SP-B 48
3.1.5.17 Gehalt an SP-B im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt 48
3.1.5.18 Gehalt an SP-B im Verhältnis zum Phospholipidgehalt 49
3.1.5.19 Gehalt an SP-C 49
3.1.5.20 Gehalt an SP-C im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt 50
3.1.5.21 Gehalt an SP-C im Verhältnis zum Phospholipidgehalt 50
3.2 Dünnschichtchromatographie und SDS-Gelelektrophorese des SP-C 51
3.2.1 Darstellung des SP-C mittels Dünnschichtchromatographie 51
3.2.1.1 Grundsätzliche Darstellbarkeit von Standard und Proben 51
3.2.1.2 Reproduzierbarkeit des Standards, Darstellbarkeit weiterer Proben 51
3.2.1.3 Sensitivität bei der Darstellung des Standards und der Proben 51
3.2.1.4 Abhängigkeit von der Belichtungszeit des Röntgenfilmes 52
3.2.1.5 Reproduzierbarkeit des Standards in verschiedenen Konzentrationen 52
3.2.1.6 Vergleichbarkeit der Proben bei Abgleich der Phosphatmengen 53
3.2.1.7 Wiederauffindbarkeit zugesetzter Proteinmengen 53
3.2.1.8 Vergleich verschiedener Plattenchargen 54
3.2.1.9 Haltbarkeit des Standards bei wiederholtem Tiefgefrieren 55
3.2.2 Darstellung des SP-C mittels eindimensionaler Gelelektrophorese 56

3.2.2.1 Untersuchung der grundsätzlichen Darstellbarkeit von SP-C 56
3.2.2.2 Untersuchung zu Probenpuffer, Transferzeit und Proteintransit 56
3.2.2.3 Untersuchung der Verwendbarkeit verschiedener Membranen 57
3.2.2.4 Untersuchung der Bedeutung von Zwischengel und Transferzeit 58
3.2.2.5 Untersuchung der Block- und Detektionspuffer der Immundetektion 58
3.2.2.6 Untersuchung des Einflusses der Transferzeit 60
3.2.2.7 Untersuchung der Verluste beim Proteintransfer 61
3.2.2.8 Untersuchung mit Antikörpern gegen pro-SP-C und Tanktransfer 62
3.2.2.9 Untersuchung der Affinität von r-SP-C-Antikörpern gegenüber SP-C 63
3.3 Proteinvergleich mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese 64
3.3.1 Gesamtprotein 65
3.3.2 Albumin 65
3.3.3 Immunglobuline 65
3.3.4 α-1-Antitrypsin 66
3.3.5 Transferrin 67
3.3.6 SP-A 67
3.3.7 Transthyretin 67
3.3.8 Immunglobulin bindender Faktor 68
3.3.9 Cystatin S 68
3.3.10 Lipocalin-1 69
3.3.11 Calgranulin 69
3.3.12 Kleine saure Proteine 69
3.3.13 Hämoglobin 70

4 Diskussion 71
4.1 Vergleich der Zusammensetzung der Lungenspülflüssigkeit 71
4.2 Dünnschichtchromatographie und Gelelektrophorese des SP-C 75
4.3 Proteinvergleich mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese 77
5 Zusammenfassung 81
6 Literaturverzeichnis 83
7 Danksagung 91
8 Anhang 92
8.1 Tabelle 1: Liste der Kinder mit malignen Erkrankungen 92
8.2 Tabelle 2: Rückgewinnung und zelluläre Zusammensetzung der BALF 92
8.3 Tabelle 3: Phospholipide, Proteine und Surfactantproteine A und D 92
8.4 Tabelle 4: Große und kleine Aggregate, SP-B und C, Oberflächenaktivität 92
8.5 Tabelle 5: Proteine in bronchoalveolärer Lavage nach 2D SDS-PAGE 92
9 Lebenslauf 92

1 Einleitung

Die Behandlung maligner Erkrankungen wird oft durch Infektionen der unteren Atemwege kompliziert, insbesondere bei geschwächtem Immunsystem z. B. nach Knochenmarktransplantation (26). Die Schwere einer solchen Infektion wird von der Virulenz der Krankheitserreger und dem Grad der Immunsuppression mitbestimmt. Wenn das entstandene Fieber auch unter kalkulierter Antibiotikatherapie persistiert und sich die Infiltrate in der Lunge ausdehnen, dann wird häufig eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt, um die pathogenen Erreger finden und gezielt behandeln zu können (39). Die im Verlauf einer bronchoalveolären Lavage wiedergewonnene Lavageflüssigkeit enthält aber nicht nur eventuell vorhandene Krankheitserreger und Zellen, sondern stellt eine Probe des Flüssigkeitsfilmes dar, der Bronchien, Bronchiolen und Alveolen überzieht. Dieser enthält ein komplexes Gemisch aus verschiedenen Lipiden und Proteinen, das Surfactant (aus engl.: Surface active agent) genannt wird und zu etwa drei Viertel aus Phospholipiden besteht (22). Der Rest setzt sich aus Cholesterin, Glycolipiden und anderen Neutral-Lipiden einerseits, sowie den Surfactantproteinen (SP-) A, B, C und D andererseits zusammen, wobei SP-A das mengenmäßig bedeutendste Surfactantprotein darstellt (22). Es besteht aus einem kollagenartigen und einem lektinartigen Anteil, der in der Lage ist, kalziumhaltige Kohlenhydratsequenzen auf anderen Strukturen, wie z. B. Bakterien oder Zelloberflächen zu binden (22). Aufgrund der Kombination dieser beiden Anteile werden solche Moleküle, zu denen die Surfactantproteine A und D, nicht jedoch die hydrophoben Surfactantproteine B und C gehören, als Kollektine bezeichnet (22). Surfactant wird von Pneumozyten vom Typ II synthetisiert, in Lamellenkörperchen gespeichert und in den Alveolarraum ausgeschüttet, von wo es wieder aufgenommen und zum größten Teil in Pneumozyten vom Typ II wiederverwertet werden kann (22). Die biophysikalische Funktion des Surfactant besteht im Offenhalten der alveolären Gasaustauschfläche durch Reduktion der Oberflächenspannung an der Grenzfläche

zwischen Luft und Gewebe (22). Seine hohe Oberflächenaktivitat wird im Wesentlichen durch Dipalmitoylphosphatidylcholin und die Surfactantproteine B und C und z.T. auch durch das Surfactantprotein A bewirkt (22, 34). Hierdurch bleibt der Alveolarraum am Ende der Ausatmung offen, wodurch intrapulmonale Shunts und eine ungenügende Oxygenierung des Blutes ebenso verhindert werden, wie das Einströmen von Flüssigkeit aus dem Interstitium in den Alveolarraum (22). Die fehlende Ausreifung des Surfactantsystems bei Frühgeborenen führt so zum Atemnotsyndrom, das durch exogene Surfactantgabe gut behandelbar ist (22). Doch auch die lokalen Abwehrmechanismen in der Lunge, insbesondere die Surfactantproteine A (SP-A) und D (SP-D), sind von großer Bedeutung (10). Dabei binden die Surfactantproteine A und D spezifisch an Oberflächenrezeptoren von Alveolarmakrophagen und modulieren deren Aktivität (22). Auch wurde eine bevorzugte Bindung bestimmter Kollektine an bestimmte Kohlenhydrate beschrieben (10). Mäuse, mit einem Defizit an SP-A zeigen nicht nur eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Viren, wie z.B den RS-Viren (42), sondern auch gegenüber Bakterien, wie z. B. Streptococcus pyogenes oder Pseudomonas aeruginosa (43). Einen erhöhten Anteil an neutrophilen Granulozyten und eine gesteigerte Anzahl an Entzündungszellen zeigten dagegen Mäuse mit einem Defizit an SP-D nach einer Exposition zu RS-Viren (41) oder Lipopolysacchariden (19). Verschiedene Lungenerkrankungen, wie Alveolarproteinosen, Pneumonien, Mukoviszidose, Asthma bronchiale u. a. weisen biochemische und biophysikalische Veränderungen des Surfactantsystems auf (22). Bisher ist wenig darüber bekannt, ob und wie die Zusammensetzung des Surfactants bei Kindern verändert ist, die schwere respiratorische Komplikationen unter immunsuppressiver Therapie im Rahmen der Behandlung maligner Erkrankungen entwickeln. Es wurde bereits gezeigt, dass der SP-A-Spiegel bei bakteriellen Pneumonien vermindert (2, 28) und die Oberflächenspannung reduziert war (28). Darüber hinaus war der Gehalt an kleinen (SA) und großen (LA) Surfactant-Aggregaten im Rahmen von Pneumonien und nosokomialen Infektionen bei Neugeborenen (25) und Erwachsenen (28) verän-

dert, wobei sich die großen Surfactant-Aggregate (LA) in erster Linie für die oberflächenaktiven Eigenschaften des Surfactants verantwortlich zeigten (61). Im ersten Teil dieser Arbeit wurde versucht, Veränderungen in der physikalischen, chemischen und zellulären Zusammensetzung des Lungensurfactant bei therapierefraktärem Fieber und pulmonalen Infiltraten unter immunsuppressiver Therapie aufzuzeigen. Im zweiten Teil wurde versucht, mehr Informationen über das Surfactantprotein C bei immunsupprimierten Kindern mit malignen Erkrankungen, Fieber und pulmonalen Infiltraten zu erarbeiten. SP-C, dessen Gen auf Chromosom 8 lokalisiert ist, wird als großes Vorläufermolekül (pro-SP-C) transskribiert und intrazellulär prozessiert (22). Das aktive Molekül ist ein extrem hydrophobes Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 4 kDa, an das an zwei Stellen zusätzlich noch Palmitoylgruppen kovalent gebunden sind (57). Seine Hauptfunktion besteht darin, die biophysikalische Oberflächenaktivität der Lipide durch eine Beschleunigung der Absorptionsrate an der Luft-Wasser-Grenzschicht und durch eine Steigerung der Resistenz von Surfactant gegenüber der Hemmung durch Serumproteine oder Ödemflüssigkeit zu verstärken (22). Darüber hinaus steigert SP-C (wie auch SP-B) die Aufnahme von Phospholipiden in Typ-II-Pneumozyten und stabilisiert den oberflächenaktiven Surfactantfilm während der Kompression und Expansion der Lunge bei der Atmung (22). Durch seine für Proteine teilweise recht ungewöhnlichen Eigenschaften ist die Darstellung dieses Proteins jedoch mit Schwierigkeiten verbunden (51). Einige dieser Probleme sind die schlechte Löslichkeit, die Wechselwirkungen mit Lipiden und Lösungsmitteln, das niedrige Molekulargewicht und die schlechten Färbeeigenschaften auf Polyacrylamidgelen (51). Dennoch wurde versucht, mittels Dünnschichtchromatographie und Gelelektrophorese eine Darstellung des SP-C zu erreichen. In der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit sind SP-A, -B, -C und -D allerdings nicht die einzigen Proteine. Die lokale Produktion von Entzündungsmediatoren und Abwehrmolekülen durch Epithelzellen und eingewanderte Entzündungszellen ist nicht unwesentlich und wahrscheinlich für jede Erkrankung der Lunge spezifisch. Eine differenzierte Darstel-

lung der Proteine in der Lavageflüssigkeit mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese könnte zu einer Klassifikation der Krankheitsbilder beitragen und eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Lungenerkrankungen erleichtern. Die durch eine bronchoalveoläre Lavage gewonnenen Proteine sind bereits bei einigen gesunden Personen (62), bei Rauchern und Nichtrauchern (45, 46) und bei Personen nach Asbestexposition (44) mittels zweidimensioaler Gelelektrophorese dargestellt worden. Auch bei Patienten mit Lungenerkrankungen wie hypersensitiver Pneumonitis (63), idiopathischer Lungenfibrose (63), Sarkoidose (63), bronchialer Hyperreaktivität (47) und Mukoviszidose (8, 24) ist eine solche Darstellung bereits erfolgt. Ziel des dritten Teils dieser Arbeit war es deshalb, Informationen über bereits identifizierte Proteine der Lavageflüssigkeit zu nutzen, um diesbezügliche Veränderungen bei Kindern aufzuzeigen, die im Rahmen einer malignen Erkrankung und deren Therapie in ihrer Immunität geschwächt sind und sich mit Fieber und pulmonalen Infiltraten präsentieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientengruppe

Die Patientengruppe bestand aus 13 Jungen und 11 Mädchen im Alter von 8,1 (5,1;13,9) [2,0-16,5] (Medianwert (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimalwert - Maximalwert]) Jahren, die an diversen malignen Erkrankungen litten (siehe Tabelle 1). Dabei handelte es sich um akute lymphatische Leukämien (n=10), akute myeloische Leukämien (n=9), schwere aplastische Anämien (n=2), einen Morbus Hodgkin, ein B-Zell-non-Hodgkin-Lymphom und ein Rhabdomyosarkom. Eine bronchoalveoläre Lavage wurde bei Patienten durchgeführt, bei denen diffuse Verschattungen im Röntgenbild länger als 48 Stunden persistierten, oder die auf eine kalkulierte Antibiotikatherapie nicht angesprochen hatten. Die Studie war von der Ethikkommission genehmigt und das Einverständnis der Eltern vor jeder BAL eingeholt worden. Die BAL wurde in Lokalanästhesie durchgeführt. Dazu wurde vor der Bronchoskopie eine vernebelte 4%ige Lidocainlösung inhaliert und eine 2%ige Lidocainlösung bei Bedarf nachgegeben, wenn sich das Bronchoskop bereits in den Atemwegen befand.

2.1.2 Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe wurde ebenfalls in zwei Untergruppen aufgeteilt. Die Lavageflüssigkeit von sieben Kindern im Alter von 10,4 (4,4;11,5) [2,1-15,3] Jahren wurde zur Herstellung von zweidimensionalen Gelen verwendet, die von weiteren 24 Kindern im Alter von 10,2 (7,1;11,3) [4,5-15,3] Jahren, darunter 14 Jungen, für alle weiteren labortechnischen Untersuchungen. Bei keinem der Kinder bestand eine Erkrankung der Lunge oder des Herz-Kreislauf-Systems, chronische Atemwegserkrankungen waren in der Vorgeschichte nicht

eruierbar. Auch ein Infekt der oberen oder unteren Atemwege war in letzter Zeit bei keinem der Kinder beobachtet worden. An allen Kindern wurden elektive chirurgische Eingriffe vorgenommen, die nicht mit einer Erkrankung der Lunge in Verbindung gebracht werden konnten. Es handelte sich dabei um Korrekturen einer Hypospadie oder eines Vesiko-Ureteralen Refluxes (n=11), Adenotomien (n=6), Tonsillektomien (n=5) und Entfernungen lateraler Halszysten (n=2). Auch diese Untersuchung war von der Ethikkommission genehmigt worden. Die Eltern waren mit der Durchführung einer BAL zu Studienzwecken einverstanden. Diese wurde in Intubationsnarkose mit N_2O, O_2 und 1-5% Halothan durchgeführt.

2.1.3 Vorversuchsgruppe

Da die Menge der zur Verfügung stehenden Lavageflüssigkeit bei den Kindern sowohl in der Patientengruppe als auch in der Kontrollgruppe relativ knapp bemessen war, wurde noch eine zusätzliche Vorversuchsgruppe aus erwachsenen Patienten eingeführt, von denen bereits größere Mengen an Lavageflüssigkeit vorhanden waren. Diese Flüssigkeiten wurden zur Austestung der Versuche verwendet, um Verluste an Kontroll- und Patientenmaterial auf ein Mindestmaß zu beschränken. Im einzelnen litten diese Patienten, bei denen diagnostische Lavagen durchgeführt worden waren, an exogen allergischen Alveolitiden (n=2), Bronchitiden, idiopathischer Lungenfibrose, Sarkoidose, rezidivierender Mittellappenpneumonie, Pleuraerguss und Alveolarproteinose.

2.1.4 Probengewinnung

Die BAL wurde mit einem flexiblen Bronchoskop durchgeführt, dessen Außendurchmesser bei Kindern unter zehn Jahren 3,5 mm und bei älteren Kindern 4,9 mm betrug. Bei den Kindern der Kontrollgruppe und bei den Patienten mit diffusen Lungeninfiltraten wurde das Bronchoskop in den Mittellappen eingeführt, bei den Patienten mit umschriebenen Infiltraten wurde jeweils der Lungenlappen mit den deutlichsten radiologischen Veränderungen

lavagiert. Für die BAL wurde eine auf Körpertemperatur erwärmte isotone Kochsalzlösung in einer Dosierung von 3 ml/kg Körpergewicht verwendet. Das erste Aliquot von 2-4 ml der wiedergewonnenen BALF wurde für mikrobiologische Untersuchungen und die Bestimmung der Zellen in der BALF verwendet. Der Rest wurde gesammelt und durch Gaze gefiltert. Zellen und Zelldetritus wurden 10 Minuten lang bei 200 g abzentrifugiert und der Überstand bei -80 °C tiefgefroren.

2.1.5 Geräte und Software

Photometer:	Anthos HT III	Anthos Labtech Instr.	Salzburg	A
Schüttler:	5P Multi-Tube	Baxter Scientific Prod.	Deerfield	USA
Ultrazentrifuge:	Avanti J-30 I	Beckman Istruments	Palo Alto	USA
Gel-Scanner:	Fluor-S Multimager	BIORAD Laboratories	Hercules	USA
2D-Gel-Software:	Melanie II 2.2	BIORAD Laboratories	Hercules	USA
Auftrageautomat:	Linomat IV	Camag	Muttenz	CH
Thermoinkubator:	IPS Type B	Carteau & Ots	Bagnolet	F
Surfactometer:	Pulsating-Bubble	Electronetics	Amerherst	USA
Multipipetten:	Research	Eppendorf	Köln	D
Tischzentrifuge:	S 417 C	Eppendorf	Köln	D
Statistik-Software:	Prism 3.00	Graph Pad Software	San Diego	USA
Kühlzentrifuge:	Megafuge	Hareus Instruments	München	D
Mischer:	IKAMAG REO	IKA Labortechnik	Staufen	D
Graphik-Software:	Paint Shop Pro	Jasc Software Inc.	Eden Prairie	USA
Tabellenkalkulation:	MS Excel 97	Microsoft	Redmond	USA
Textverarbeitung:	MS Word 2000	Microsoft	Redmond	USA
Wasserdeionisator:	Milli-Q	Millipore	Eschborn	D
Magnetrührer:	magnetic stirrer	Pharmacia LKB	Freiburg	D

1-D-Kammer:	2001-Kammer	Pharmacia LKB	Freiburg	D
1-D-Gießstand:	FourCast	Pharmacia LKB	Freiburg	D
Fokussierung:	Dry Strip Kit	Pharmacia LKB	Freiburg	D
Rehydrieungskassette:	reswelling cassette	Pharmacia LKB	Freiburg	D
2-D-Kammer:	Multiphor II	Pharmacia LKB	Freiburg	D
2-D-Gieß-Kit:	Gradient Gel Kit	Pharmacia LKB	Freiburg	D
Transfereinrichtung:	Novablot Kit	Pharmacia LKB	Freiburg	D
Stromversorgung:	MultiDrive XL	Pharmacia LKB	Freiburg	D
Laborkryostat:	MultiTemp II	Pharmacia LKB	Freiburg	D
Laborwaage:	BP 3100 P	Sartorius AG	Göttingen	D
pH-Messgerät:	CG 840	Schott Geräte	Hofheim	D
Vortexer:	Genie 2	Scientific Industries	Bohemia	USA

2.1.6 Verbrauchsmaterial

NC-Membranen:	Hybond ECL	Amersham	Little Chalfont	GB
Microplatten (Protein):	PS Microplatte	Greiner	München	D
Röntgenfilme:	RX safety	Fuji Europa	Düsseldorf	D
HPTLC-Fertigplatten:	DIOL F_{254}s:	Merck	Darmstadt	D
PVDF-Membranen:	Immobilon P	Millipore	Eschborn	D
Microplatten (SP-A/D):	Maxisorp F96	NUNC	Rosklide	DK
Microplatten (SP-B/C):	Polysorp F96:	NUNC	Wiesbaden	D
Filterpapier:	1850-915	Pharmacia LKB	Freiburg	D
Fokussierungsstreifen:	Immobiline D. S.	Pharmacia LKB	Freiburg	D
2D-Gel-Bond-Filme:	PAG-Film	Pharmacia LKB	Freiburg	D
Faltenfilter:	5951/2	Schleicher&Schüll	Keene	NL
Dialyseschläuche:	1 kiloDalton	Spectrum Medical Ind.	Dominguez	USA

2.1.7 Chemikalien und Lösungen

Soweit nicht anders erwähnt:	Merck	Darmstadt	D
Luminol + Entwickler (RPN2106 ECL)	Amersham	Little Chalfont	GB
Chloroform, Methanol, 2-Propanol:	Baker	Deventer	NL
Gurr-Certistain (Malachite Green)	BDH Lab. Supplies	Poole	GB
Low Molecular Weight Standard (LMW):	BIORAD Laboratories	München	D
Protein-Assay Farbstoff-Konzentrat	BIORAD Laboratories	München	D
2,2‘ Azino-di-3-ethyl-benzthiazolinsulfat:	Boehringer	Mannheim	D
Avidin-Biotin-HRP-Komplex (AB-complex):	Dakopatts	Hamburg	D
Bovines Serum-Albumin (BSA):	Paesel & Lorei	Frankfurt/M.	D
Acrylamid, Bisacrylamid:	Pharmacia LKB	Freiburg	D
Ammoniumpersulfat:	Pharmacia LKB	Freiburg	D
Bromphenolblau, Kerosin:	Pharmacia LKB	Freiburg	D
Glycerin, Glycin, SDS, TEMED:	Pharmacia LKB	Freiburg	D
Pharmalyte (3-10), Sephadex LH 60:	Pharmacia LKB	Freiburg	D
Farbstoff Serva Blue G:	Serva	Heidelberg	D
Ionenaustauscher Amberlite MB-3:	Serva	Heidelberg	D
Triton X-100:	Serva	Heidelberg	D
Tween 20, Fischgelatine, Ammoniak:	Sigma	Deisenhofen	D
Ultra Low Range Weight Standard (ULR):	Sigma	Deisenhofen	D
Jodacetamid:	Sigma	Deisenhofen	D
Alveofact:	Thomae	Biberach/Riß	D

2.1.8 Beschichtungsmaterialien

SP-A-AK: Maus anti Mensch (mkl.) (PC-6)	Int. Reagents Corp.	Kobe	J
SP-D-AK: Maus anti Ratte (mkl.) (VI F 11)	BMA	Augst	CH
Avidin (SP-A/SP-D-Bindung):	ICN	Costa Mesa	USA
α-D-Mannose-PAA-Biotin (SP-A-Bindung):	Synthesome	Moskau	RUS
α-D-Maltose-PAA-Biotin (SP-D-Bindung):	Synthesome	Moskau	RUS

2.1.9 Standards

SP-A: SP-A (RP99-008)	W. Steinhilber	Byk Gulden	Konstanz	D
SP-D: Humanes SP-D	Erika C. Crouch	Barnes Jewish Hospital	St.Louis	USA
SP-B: Humanes SP-B	W. Seeger	Zentrum innere Medizin	Gießen	D
SP-C: Humanes SP-C	W. Seeger	Zentrum innere Medizin	Gießen	D
SP-C: Humanes r-SP-C	W. Steinhilber	BYK Gulden	Konstanz	D

2.1.10 Primär-Antikörper

SP-A: Kaninchen anti Mensch (pkl.):	Chemicon	Temecula	USA
SP-D: Maus anti Ratte (mkl.) (VI F 11)	BMA	Augst	CH
SP-B: Maus anti Schwein (mkl.)	Y. Suzuki	Kyoto	J
SP-C: Kaninchen anti Mensch (pkl.)	Zentrum innere Medizin	Gießen	D
r-SP-C: Kaninchen anti Mensch (pkl.)	BYK Gulden	Konstanz	D
pro-SP-C: Kaninchen anti Mensch (pkl.)	Childrens Hospital	Cincinnati	USA

2.1.11 Sekundär-Antikörper

SP-A ELISA: Ziege anti Kaninchen (HRP):	Dianova	Hamburg	D
SP-A-Bindung: Ziege anti Kaninchen (HRP):	Dianova	Hamburg	D
SP-D ELISA: Kaninchen anti Maus (HRP):	DAKO	Hamburg	D

SP-D-Bindung: Kaninchen anti Maus (HRP):	DAKO	Hamburg	D
SP-B ELISA: Schaf anti Maus (biotin):	Amersham Buchler	Braunschweig	D
SP-C ELISA: Schaf anti Kaninchen (biotin):	Amersham Buchler	Braunschweig	D
SP-C (HPTLC): Ziege anti Kaninchen (HRP):	Dianova	Hamburg	D

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeines

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Proben bei den Messungen seriell verdünnt und zwei- bzw. dreifach eingesetzt. Zur Messung wurden jeweils die Verdünnungen ausgewählt, deren Konzentrationen sich im linearen Bereich der jeweiligen Messmethode befanden.

2.2.2 Bestimmung von Zellzahl und Keimbefall

Mikrobiologische und zytologische Untersuchungen der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit wurden als Routineverfahren von den Laboratorien der Universitätsklinik Essen durchgeführt.

2.2.3 Bestimmung der Oberflächenaktivität

Die Oberflächenspannung einer Flüssigkeit kann laut dem Laplace' schen Gesetz nach der Formel $\Delta P = 2\ \gamma/r$ aus dem Unterschied in Druck und Radius zweier Luftblasen berechnet werden.

Resuspensionslösung: 140 mM NaCl, 10 mM HEPES, 0,5 mM EDTA, 3 mM $CaCl_2$, pH 6,9

Die Oberflächenaktivität der Lungenspülflüssigkeit wurde mittels eines pulsierenden Blasen-Surfactometers gemessen. Zuvor waren die Proben in einer Konzentration von 1 mg Phos-

pholipid pro ml in Resuspensionslösung resuspendiert worden. Zunächst wurde die Probenkammer mit etwa 20 µl Probenflüssigkeit randvoll gefüllt. Durch Abzug von Probenflüssigkeit aus der Probenkammer entstand über eine Kapillare am oberen Ende der Kammer eine kleine Luftblase, deren minimaler und maximaler Radius mittels eines Mikroskops anhand zweier Justierstriche eingestellt wurde. Die beim Abzug der Flüssigkeit entstehende Druckdifferenz wurde gemessen und daraus die Oberflächenspannung nach der Formel $\Delta P = 2\ \gamma/r$, dem Laplace' schen Gesetz, berechnet (23). Die Oberflächenspannung bei Adsorption (γ_{ads}) wurde 10 s nach Ausbildung der Luftblase bei 37 °C gemessen. Diese pulsierte daraufhin mit einer Frequenz von 20 min^{-1} zwischen 0,40 und 0,55 mm Durchmesser. Nach 3 min wurde im Equilibrium bei 0,40 mm Durchmesser die minimale Oberflächenspannung (γ_{min}) besimmt.

2.2.4 Trennung von kleinen und großen Aggregaten

Die eingefrorenen BAL-Proben wurden wieder aufgetaut und 30 min bei 40000 g und 4 °C zentrifugiert. Dabei blieben die kleinen, weniger oberflächenaktiven Aggregate (SA) im Überstand zurück, während die großen Aggregate (LA), die wesentlich zur Oberflächenaktivität beitragen (22, 25, 33, 60), sedimentierten.

2.2.5 Bestimmung des Phospholipidgehaltes

Die Aliquots der Proben wurden lipidextrahiert und der Phospholipidgehalt aus dem Gehalt an anorganischem Phosphat bestimmt, wie bei Griese et al. (25) beschrieben.

2.2.5.1 Lipidextraktion

Reagenz A:	Chloroform : Methanol	= 1:2 (v/v)
Reagenz B:	Chloroform : H_2O	= 1:1 (v/v)

Die Lipidextraktion wurde nach Bligh und Dyer (5) durchgeführt. Es wurden zwei Serien von Reagenzgläsern vorbereitet und mit Chloroform gespült. In die Reagenzgläser der ersten Serie wurden jeweils 0,5 ml Probe und 1,5 ml H_2O eingesetzt, anschließend 7,5 ml Reagenz A hinzugegeben. Nach zehnminütigem Vortexen wurden dann 5 ml Reagenz B zugegeben, erneut 10 min gevortext und 10 min bei 1000 g zentrifugiert. Die Flüssigkeitsstände wurden markiert und die Unterstände in die vorbereiteten Reagenzgläser der zweiten Serie abpipettiert.

2.2.5.2 Lipidwaschung

Folch-Lösung: Chloroform : Methanol : H_2O = 86:14:1 (v/v/v)

Zur Lipidwaschung nach Folch (15) wurden die Reagenzgläser der ersten Serie bis zur Markierung mit der Folch-Lösung aufgefüllt, 10 min gevortext und 10 min zentrifugiert. Die Unterstände wurden nochmals in die Reagenzgläser der zweiten Serie abpipettiert. Die Flüssigkeit in den Reagenzgläsern der ersten Serie wurde bei 40 °C unter N_2-Atmosphäre vollständig abgedampft, die Flüssigkeit in den Reagenzgläsern der zweiten Serie kam in dieser Versuchsreihe nicht zur Verwendung.

2.2.5.3 Phospholipidbestimmung

Reagenz A: 4,20 g Ammoniummolybdat in 100 ml 4,5 mM HCl

Reagenz B: 0,45 g Malachitgrün in 150 ml H_2O

Reagenz C: Reagenz A : Reagenz B = 1:3 (v/v) (2-3 h absetzen lassen, dann filtern)

Reagenz D: 1 % (w/v) Triton X-100 in H_2O

Die Bestimmung der Phospholipidkonzentration erfogte nach Duck-Chong (13). Die Probengläsern wurden mit H_2SO_4 über Nacht gebeizt, mit H_2O gespült und getrocknet. Zunächst

wurden die Proben mit 1 ml Chloroform : Methanol im Verhältnis 2:1 resuspendiert und für den Standard 100 µl KH_2PO_4-Konzentrat 1:1000 zu 100 ml mit 1 M HCl auf 1 µg Phosphat pro ml verdünnt. In jedes Reagenzglas wurden 30 µl Magnesium-Nitrat und gegebenenfalls 100 µl Probe gegeben und bei 85 °C abgedampft. Anschließend wurde über einer Bunsenflamme verascht. Die Proben wurden daraufhin mit 1 ml 1 mM HCl gelöst. Alle Reagenzgläser wurden bei 90 °C über 15 min im Thermoblock belassen, danach im Wasserbad gekühlt und 0,5 ml : 0,5 ml aufgeteilt. Daraufhin wurde15 µl Reagenz D zugeben und kurz gevortext. Jeweils 1 ml gefilterte Reagenz C wurde zugeben und erneut kurz gevortext. 280 µl pro Well wurden einpipettiert und die Färbung nach 5 min bei λ = 650 nm abgelesen. Der Gehalt an Phospholipiden wurde dann aus dem gemessenen Phosphatgehalt berechnet.

2.2.6 Bestimmung der Gesamtproteinmenge

Phosphatpuffer (PBS): 18 mM KH_2PO_4, 57 mM Na_2HPO_4, 75 mM NaCl, pH 7,0-7,5

Die Gesamtproteinmenge einer Probe wurde nach der Methode von Bradford (7) bestimmt. Als Standard wurde 100 mg BSA in 10 ml PBS gelöst und sequentiell verdünnt. Pro Well wurden 5 µl Standard bzw. Probe und 100 µl Farbreagenz eingesetzt. Es wurde darauf geachtet, dass sich keine Blasen bildeten oder der Farbstoff ausfiel und die Farbreaktion sofort bei λ = 600 nm gemessen.

2.2.7 Proteinbestimmung mittels ELISA

Unter ELISA (enzyme linked immunosorbant assay) versteht man die Detektion einer Substanz mittels enzymgekoppelter Antikörper. Zunächst wird ein Stoffgemisch (z. B. Lavageflüssigkeit) mit einem Antikörper inkubiert, der spezifisch die gesuchte Substanz (z. B. SP-A) erkennt und an diese bindet. Dieser primäre Antikörper wird anschließend von einem sekundären erkannt und gebunden, der mit einem Enzym (z. B. Meerrettichperoxidase)

gekoppelt ist. Nach Zugabe einer Farbreagenz (z. B. ABTS) wird diese durch das indirekt an die gesuchte Substanz gekoppelte Enzym verändert. Die Intensität der Farbreaktion ist somit von der Konzentration der gesuchten Substanz im Stoffgemisch abhängig. Soweit nicht anders erwähnt, wurde nach Labormethoden der Kinderpoliklinik in München verfahren.

2.2.7.1 ELISA für SP-A:

Carbonatpuffer: 15 mM Na_2CO_3, 35 mM $NaHCO_3$, pH 9,6

Waschpuffer: 10 mM Tris/HCl, 140 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100, pH 7,4

Blockpuffer: 1 % BSA in Waschpuffer

ABTS-Lösung: 500 mg ABTS und 50 µl H_2O_2 in 50 ml H_2O

Die NUNC Maxisorp Mikrotiterplatte wurde über Nacht mit 100 µl der monoklonalen Anti-human-SP-A-Antikörpern in einer Konzentration von 1 µg/ml in Carbonatpuffer beschichtet und anschließend mit 200 µl Blockpuffer über eine Stunde bei 37 °C geblockt, dann dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Alle Proben wurden mit 10 mM EDTA in Waschpuffer vier zu eins verdünnt und eine Minute lang im Ultraschallbad homogenisiert. Anschließend wurde Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 4 % zugegeben (12) und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Die Microtiterplatte wurde zunächst eine Stunde bei 37 °C mit jeweils 100 µl SP-A Primär-Antikörper in einer Konzentration von 1:100 in Blockpuffer inkubiert, dreimal mit Waschpuffer gewaschen und daraufhin nochmals eine Stunde lang bei gleicher Temperatur mit den 100 µl SP-A Sekundär-Antikörpern in einer Konzentration von 1:5000 in Blockpuffer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde die Farbreaktion mit 100 µl ABTS-Lösung erzeugt und bei λ = 405 nm nach einer Stunde abgelesen.

2.2.7.2 ELISA für SP-B:

Phosphatpuffer (PBS):	12 mM Na_2HPO_4, 3 mM NaH_2PO_4, 150 mM NaCl, pH 7,4
Verdünnungspuffer:	PBS : Propanol =1:1 (v/v)
Vorwaschpuffer:	Diisopropylether : Butanol = 3:2 (v/v)
Waschpuffer:	PBS, 0,5 % Tween 20, pH 7,4
Blockpuffer:	PBS, 1 % BSA (w/v), pH 7,4
Substratpuffer:	60 mM Natriumacetat, 50 mM NaH_2PO_4, pH 4,2
ABTS-Lösung:	20 mg ABTS und 10 µl H_2O_2 (30 %) in 30 ml Substratpuffer

Proben und Standards wurden zunächst 1:1 mit Propanol gemischt und anschließend mit Verdünnungslösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Jeweils 100 µl pro Well wurden anschließend auf die Mikrotiterplatten übertragen und bei 37 °C eingetrocknet. Um die Adsorption an die Platten zu optimieren, wurden danach jeweils 100 µl Trifluorethanol zugegeben und wiederum bei 37 °C eingetrocknet. Zur Entfernung der Phospholipide wurde dann 20 min bei Raumtemperatur mit Vorwaschpuffer inkubiert, dekantiert und zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde zwei Stunden lang bei Raumtemperatur mit 200 µl Blockpuffer geblockt und dann dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Mit dem SP-B Primär-Antikörper (200 µl/Well in einer Konzentration von 1,5 µg/ml Blockpuffer) wurden die Platten dann für zwölf Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und wiederum dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Die SP-B Sekundär-Antikörper wurden 1:1000 in Blockpuffer gelöst und jeweils 200 µl/Well über drei Stunden vorsichtig bei Raumtemperatur geschüttelt. Erneut folgte dreimaliges Waschen mit dem Waschpuffer. Der AB-Komplex wurde nach Herstellervorschrift verdünnt, in einer Menge von 200 µl/Well aufgetragen und nach zweistündigem schütteln bei Raumtemperatur durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Danach wurden 200 µl ABTS-Lösung pro Well einpipettiert, bei 4 °C über Nacht

inkubiert und am nächsten Tag bei λ = 450 nm abgelesen. Eine ausführliche Beschreibung findet sich bei Krämer et al. (36)

2.2.7.3 ELISA für SP-C:

Lösungsmischung:	2-Propanol : H_2O = 80:20 (v/v), pH 3,5
Waschpuffer:	50 mM Tris/HCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,4
Blockpuffer:	50 mM Tris/HCl, 1 % BSA (w/v), pH 7,6
Substratpuffer:	60 mM Natriumacetat, 50 mM NaH_2PO_4, pH 4,2
ABTS-Lösung:	20 mg ABTS und 10 µl H_2O_2 (30 %) in 30 ml Substratpuffer

Die Proben wurden 1:5 (v/v), der SP-C-Standard seriell bis 3,125 ng/ml in Lösungsmischung verdünnt. Davon wurden jeweils 100 µl in die Microtiterplatten einpipettiert und über Nacht bei 37 °C getrocknet. Pro Well wurde dann 100 µl Trifluorethanol hinzugegeben und über drei Stunden bei 37 °C getrocknet, um das SP-C optimal an die Oberfläche der Platte zu binden. Daraufhin wurden die Phospholipide mit Methanol ausgewaschen. 200 µl Methanol wurde pro Well hinzugegeben und die Platte 20 min lang vorsichtig bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und die Platte nochmals kurz mit Methanol, dann dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde mit jeweils 200 µl Blockpuffer pro Well für zwei Stunden bei Raumtemperatur geblockt und wiederum dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Der SP-C Primär-Antikörper, der 1:200 in Blockpuffer verdünnt worden war, wurde dann in einer Menge von jeweils 200 µl eingesetzt und konnte über 12 bis 15 Stunden mit dem SP-C auf der Platte reagieren. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde zwei Stunden lang mit 200 µl der 1:1000-Lösung der SP-C Sekundär-Antikörper in Blockpuffer inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden 200 µl des AB-Komplexes, der 1:50 in Blockpuffer verdünnt worden war, für zwei Stunden hinzugegeben. Auf dreimaliges Waschen folgte dann die Farbreaktion mit 200 µl ABTS-

Lösung, die nach einer Nacht bei 4 °C am nächsten Tag bei λ = 450 nm abgelesen wurde. Eine ausführliche Beschreibung findet sich bei Schmidt et al. (55).

2.2.7.4 ELISA für SP-D:

Carbonatpuffer:	15 mM Na_2CO_3, 35 mM $NaHCO_3$, pH 9,6
Tris-NaCl-Lösung:	10 mM Tris/HCl, 140 mM NaCl
Waschpuffer:	Tris-NaCl-Lösung, 5 mM $CaCl_2$, 0,1 % Triton X-100, pH 7,4
Blockpuffer:	1 % BSA in Waschpuffer
ABTS-Lösung:	500 mg ABTS und 50 µl H_2O_2 in 50 ml H_2O

Die verwendeten NUNC Maxisorp Platten wurden über Nacht bei 4 °C mit monoklonalen SP-D-Antikörpern beschichtet, die eine Kreuzreaktion mit humanem SP-D zeigten und von denen 1 µg/ml in Carbonatpuffer gelöst war. Die Platten wurden mit Waschpuffer gewaschen und mit 200 µl Blockpuffer pro Well für eine Stunde bei 37 °C geblockt. Es folgten drei Waschvorgänge mit Waschpuffer. Die Proben wurden eins zu fünf in Blockpuffer verdünnt und 100 µl davon eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert, dann nochmals dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Die Detektion des gebundenen SP-D erfolgte über 30 Minuten bei 37°C mit SP-D Primär-Antkörpern (100 µl Lösung pro Well, wobei 1 µg SP-D Primär-Antikörper in 1 ml Blockpuffer gelöst war). Erneut folgten drei Waschvorgänge mit Waschpuffer. Daraufhin wurde mit SP-D Sekundär-Antikörpern, die 1:100 in Blockpuffer verdünnt waren, eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert (jeweils 100 µl) und dann dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Die Farbreaktion wurde mit 200 µl ABTS-Lösung erzeugt und bei λ = 405 nm nach einer Stunde abgelesen.

2.2.8 Bestimmung der Bindungsfähigkeit an Kohlenhydrate

Die Bindungsfähigkeit von Mannose durch SP-A wurde bereits beschrieben (29) und auch eine Präferenz von Maltose durch SP-D festgestellt (10). Um die Bindungsfähigkeit der wasserlöslichen Surfactantproteine an mit Kohlenhydraten beschichtete Oberflächen zu überprüfen, wurde ebenfalls die ELISA-Technik verwendet. Die Polystyrolplatten wurden nun zuerst mit einer Schicht aus Kohlenhydraten überzogen, bevor die Proben eingesetzt, gemessen und gegeneinander verglichen wurden.

2.2.8.1 Mannose Bindungs-ELISA für SP-A

Carbonatpuffer:	15 mM Na_2CO_3, 35 mM $NaHCO_3$, pH 9,6
Tris-NaCl-Lösung:	10 mM Tris/HCl, 140 mM NaCl
Tris-$CaCl_2$-Lösung:	10 mM Tris/HCl, 5 mM $CaCl_2$
Trispuffer (TBS):	Tris-NaCl-Lösung, 0,1 % Triton X-100, pH 7,4
Blockpuffer:	Tris-NaCl-Lösung, 1 % BSA, 0,01 % Triton X-100
Waschpuffer:	Tris-NaCl-Lösung, 5 mM $CaCl_2$, 0,1 % Triton X-100, pH 7,4
Probenpuffer:	Tris-$CaCl_2$-Lösung, 0,1 % BSA, 0,05 % Triton X-100, pH 7,4
Detektionspuffer 1:	Tris-NaCl-Lösung, 0,1 % BSA, 0,01 % Triton X-100, pH 7,4
Detektionspuffer 2:	Tris-NaCl-Lösung, 0,1 % BSA, 0,05 % Triton X-100, pH 7,4
ABTS-Lösung	500 mg ABTS und 50 µl H_2O_2 in 50 ml H_2O

Die Beschichtung der Microtiterplatten erfolgte durch 100 µl Avidin (20 µg/ml Carbonatpuffer) über 16 Stunden bei 4°C, gefolgt von 100 µl α-D-Mannose-PAA-Biotin (100 ng/ml TBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde mit 200 µl Blockpuffer für eine Stunde bei 37 °C geblockt und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Zu 200 µl Probe wurden jeweils 800 µl 1 mM EDTA in 10 mM Tris mit pH 7,4 zugegeben. Nach einer Minute im Ultraschallbad wurden 100 µl Triton X-100 (22 %) hinzugegeben, geschüttelt und bei

10000 g abzentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden 1:1 in Probenpuffer verdünnt. Der SP-A Standard wurde in einer Konzentration von 200 ng/ml eingesetzt und achtmal sequentiell verdünnt, die Proben wurden in einer Konzentration von 20 ng/ml eingesetzt und viermal sequentiell verdünnt. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Die SP-A Primär-Antikörper wurden zur Bindung mit dem SP-A auf der Platte eine Stunde bei 37 °C in einer Konzentration von 1:100 in Detektionspuffer 1 inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen mit Waschpuffer, daraufhin wurde mit den SP-A Sekundär-Antikörpern eine Stunde bei 37 °C in einer Konzentration von 1:5000 in Detektionspuffer 2 inkubiert und noch dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Die Farbreaktion wurde mit 100 µl ABTS-Lösung erzeugt und bei λ = 405 nm nach einer Stunde abgelesen.

2.2.8.2 Maltose Bindung-ELISA für SP-D

Carbonatpuffer:	15 mM Na_2CO_3, 35 mM $NaHCO_3$, pH 9,6
Tris-NaCl-Lösung:	10 mM Tris/HCl, 140 mM NaCl
Trispuffer (TBS):	Tris-NaCl-Lösung, 0,1 % Triton X-100, pH 7,4
Blockpuffer:	Tris-NaCl-Lösung, 5 mM $CaCl_2$, 1 % BSA, 0,01% Triton X-100
Waschpuffer:	Tris-NaCl-Lösung, 5 mM $CaCl_2$, 0,1 % Triton X-100, pH 7,4
ABTS-Lösung	500 mg ABTS und 50 µl H_2O_2 in 50 ml H_2O

Die Beschichtung der Microtiterplatte erfolgte durch 100 µl Avidin (20 µg/ml Carbonatpuffer) über 16 Stunden bei 4 °C, gefolgt von 100 µl α-D-Maltose-PAA-Biotin (2 µg/ml TBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen, mit 200 µl Blockpuffer für eine Stunde bei 37 °C geblockt und wieder dreimal mit Waschpuffer gewaschen. 100 µl der Probe wurden eins zu eins in Blockpuffer verdünnt. Der SP-D Standard wurde in einer Konzentration von 200 ng/ml eingesetzt und achtmal sequentiell verdünnt, die Proben wurden in einer Konzentration von 20 ng/ml eingesetzt und

viermal sequentiell verdünnt. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37 °C wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Die SP-D Primär-Antikörper wurden zur Bindung mit dem SP-D auf den Platten eine Stunde lang bei 37 °C in einer Konzentration von 2 µg/ml in Blockpuffer inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen mit Waschpuffer, daraufhin wurde mit den SP-D Sekundär-Antikörpern eine Stunde lang bei 37 °C in einer Konzentration von 1:1000 in Blockpuffer inkubiert und noch dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Die Farbreaktion wurde mit 100 µl ABTS-Lösung erzeugt und bei λ = 405 nm nach einer Stunde abgelesen.

2.2.9 Bestimmung der Bindungsfähigkeit an Pseudomonas aeruginosa

Auch die spezifische Bindungsfähigkeit der wasserlöslichen Surfactantproteine an einen bei Immunsuppression häufig auftretenden Keim (Pseudomonas aeruginosa) wurde mittels ELISA-Technik überprüft. Vor dem Einsatz der Proben wurden die Polystyrolplatten dazu mit einer Schicht aus Pseudomonaden überzogen und Kontrollgruppe und Patientengruppe nach Durchführung der Versuche gegeneinander verglichen.

2.2.9.1 Pseudomonas aeruginosa Bindungs-ELISA für SP-A

Trispuffer (TBS):	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100, pH 7,4
Phosphatpuffer (PBS):	18 mM KH_2PO_4, 57 mM Na_2HPO_4, 75 mM NaCl, pH 7,0-7,5
Carbonatpuffer:	15 mM Na_2CO_3, 35 mM $NaHCO_3$, pH 9,6
Suspensionspuffer:	Carbonatpuffer + 0,3 % Paraformaldehyd
Blockpuffer:	PBS + 1 % Gelatine + 0,1 % NaN_3
Waschpuffer:	TBS + 2 mM $CaCl_2$
Probenpuffer:	TBS + 2 mM $CaCl_2$ + 1 % BSA
Linkpuffer:	TBS + 2 mM $CaCl_2$ + 0,125 % Glutaraldehyd
ABTS-Lösung	500 mg ABTS und 50 µl H_2O_2 in 50 ml H_2O

Die von einem Patienten mit Mukoviszidose isolierten Pseudomonaden vom Stamm P11 wurden zur Beschichtung über Nacht bei 37 °C angezüchtet, in Suspensionspuffer bis zu einer optischen Dichte von 0,2 suspendiert, 1:1 verdünnt und mit 100 µl pro Well über Nacht bei Raumtemperatur eingetrocknet. Geblockt wurde mit 200 µl Blockpuffer für vier Stunden bei Raumtemperatur, anschließend wurde einmal mit Waschpuffer gewaschen. Der Standard von 200 ng SP-A pro ml Probenpuffer wurde daraufhin eingesetzt und seriell verdünnt. Die Proben wurden, wenn möglich, in einer Konzentration von 20 ng SP-A pro ml Probenpuffer eingesetzt. War die Ausgangskonzentration zu gering, wurden die Proben unverdünnt eingesetzt und das Ergebnis anschließend auf eine Konzentration von 20 ng SP-A pro ml Probenpuffer umgerechnet. Anschließend wurde drei Stunden lang bei Raumtemperatur geschüttelt und daraufhin zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Nach einer Vernetzung mit Linkpuffer für 15 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte erneutes Blocken mit Probenpuffer für 15 Minuten bei Raumtemperatur und zweimaliges Waschen mit Waschpuffer. Anschließend wurde mit dem SP-A Primär-Antikörper 1:100 in Probenpuffer über Nacht bei 4 °C inkubiert und zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Dann erfolgte die Irkubation mit dem SP-A Sekundär-Antikörper 1:5000 in Probenpuffer über Nacht bei 4 °C und dreimaliges Waschen. Die Detektion erfolgte mit ABTS-Lösung, die Ablesung der Farbreaktion bei λ = 405 nm nach einer Stunde.

2.2.9.2 Pseudomonas aeruginosa Bindungs-ELISA für SP-D

Trispuffer (TBS):	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100, pH 7,4
Phosphatpuffer (PBS):	18 mM KH_2PO_4, 57 mM Na_2HPO_4, 75 mM NaCl, pH 7,0-7,5
Carbonatpuffer:	15 mM Na_2CO_3, 35 mM $NaHCO_3$, pH 9,6
Suspensionspuffer:	Carbonatpuffer + 0,3 % Paraformaldehyd
Blockpuffer:	PBS + 1 % Gelatine + 0,1 % NaN_3
Waschpuffer:	TBS + 2 mM $CaCl_2$

Probenpuffer:	TBS + 2 mM $CaCl_2$ + 1 % BSA
Linkpuffer:	TBS + 2 mM $CaCl_2$ + 0,125 % Glutaraldehyd
ABTS-Lösung	500 mg ABTS und 50 µl H_2O_2 in 50 ml H_2O

Die NUNC Maxisorp Microtiterplatte wurde mit von einem Patienten mit Mukoviszidose isolierten nicht mucoiden Pseudomonas aeruginosa Stamm (P11) beschichtet, der zuvor, wie oben beschrieben, in Suspensionspuffer bis zu einer optischen Dichte von 0,2 suspendiert, eins zu eins verdünnt und mit 100 µl pro Well über Nacht bei Raumtemperatur eingetrocknet worden war. Nach dem Blocken mit 200 µl Blockpuffer für vier Stunden bei Raumtemperatur und dem einmaligen Waschen mit Waschpuffer wurden 100 µl der Standards bzw. der auf 20 ng SP-D pro ml verdünnten Proben aufgetragen, seriell verdünnt und in Gegenwart von 2 mM $CaCl_2$ drei Stunden lang bei 25 °C inkubiert. Darauf folgten zwei Waschvorgänge mit Waschpuffer, die Vernetzung mit Linkpuffer für 15 min bei Raumtemperatur, erneutes Blocken mit Probenpuffer für 15 min bei Raumtemperatur und zweimaliges Waschen mit Waschpuffer. Die Inkubation mit dem SP-D Primär-Antikörper 1:100 in Probenpuffer erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer folgte dann die Inkubation mit dem SP-D Sekundär-Antikörper 1:5000 in Probenpuffer über Nacht bei 4 °C und dreimaliges Waschen. Die Detektion erfolgte mit ABTS-Lösung, bei λ = 405 nm wurde nach einer Stunde mit dem Photometer abgelesen.

2.2.10 Darstellung durch Dünnschichtchromatographie und Immundetektion

Bei der High-Performance-Dünnschichtchromatographie (HPTLC) werden die zu analysierenden Proben zunächst auf die Trennschicht der HPTLC-Fertigplatten aufgetragen und diese dann mit der Unterkante in Fließmittel gestellt. Durch die Kapillarwirkung wandert das Fließmittel (die mobile Phase) in der Trennschicht (der stationären Phase) über eine gewisse Strecke. Dabei werden die Proben gemäß ihrer Größe und ihren Adhäsions-

eigenschaften in ihre Fraktionen getrennt. Nach dem Abdampfen der mobilen Phase verbleiben die Fraktionen auf der Schicht gespeichert und können dort mittels Immundetektion visualisiert werden.

Trispuffer (TBS):	4 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,5
Phosphatpuffer (PBS):	12 mM Na_2HPO_4, 3 mM NaH_2PO_4, 150 mM NaCl, pH 7,4
Blockpuffer:	3 % Fischgelatine in PBS
Waschpuffer:	0,05 % Tween 20 in TBS
Detektionspuffer:	0,5 % BSA in PBS
Fließmittel:	65 ml Chloroform, 30 ml Methanol, 2 ml NH_3 (25 %), 4 ml H_2O

Die HPTLC-Platten wurden zunächst mit Fließmittel gewaschen. 3 µg SP-C Standard wurde in 250 µl 2-Propanol, die lipidlösliche Fraktion aus 4 ml Probenflüssigkeit in 100 µl Chloroform : Methanol in einem Verhältnis von 2:1 (v/v) gelöst. Der Probenauftrag erfolgte mit dem Auftrageautomaten mit 50-300 ng SP-C-Standard und 10 bzw. 20 µl Probenlösung. Die Platten wurden eine Stunde lang in eine flache Schicht von Fließmittel gestellt, dann abgetropft und dreieinhalb Stunden bei Raumtemperatur in Blockpuffer geblockt, wobei sie schwach geschüttelt wurden. Die Primär-Antikörper wurden in einer Konzentration von 1:10000 in Detektionspuffer eingesetzt und 16 Stunden lang bei 4 °C schwach geschüttelt. Dann wurde viermal mit Waschpuffer gewaschen, die Platte mit Sekundär-Antikörper in einer Konzentration von 1:100000 in Waschpuffer über zwei Stunden bei Raumtemperatur schwach geschüttelt und erneut viermal mit Waschpuffer gewaschen. Luminol und Entwickler wurden 1:1 gemischt und die HPTLC-Platte eine Minute lang inkubiert. Die Exposition auf den Röntgenfilm dauerte je nach Signalstärke ein bis zehn, bei schwachen Signalen bis zu 30 Minuten.

2.2.11 Proteintrennung durch eindimensionale SDS-Gelelektrophorese

2.2.11.1 Gele und Lösungen

Ein Mischung verschiedener Proteine kann mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) in seine einzelnen Bestandteile aufgetrennt werden (54). Durch die Verwendung von Tricin kann dabei eine gute Auflösung kleiner Proteine auch bei relativ niedrigen Acrylamid-Konzentrationen erreicht und durch Harnstoff dazu beigetragen werden, die Auflösung im Bereich unter 5 kDa noch weiter zu verbessern (54). Die SDS-PAGE erfolgte nach Lämmli (38) und nach Schägger und von Jagow (54). Die Herstellung der Gele und Lösungen erfolgte nach den Laborvorschriften des Instituts für Physikalische Biochemie der Universität München.

2.2.11.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gel mit Zwischengel

48 % AA / 1,5 % BIS:	48 % Acrylamid (w/v) + 1,5 % Bisacrylamid (w/v) in H_2O
Gelpuffer:	182,5 g Tris + 1,5 g SDS + H_2O ad 500 ml (pH 8,45)
APS (10%)	10 % Ammoniumperoxodisulfat (w/v) in H_2O
Überschichtungslösung:	Isopropanol
Probenpuffer:	2 g SDS + 10 ml Glycerol + 727 mg Tris
	+ 20 mg Bromphenolblau-Na-Salz + H_2O ad 100 ml (pH 6,8)
Probenpuffer (denat.):	Probenpuffer mit 5 % 2-Mercaptoethanol (v/v)
Anodenpuffer:	24 g Tris + H_2O ad 1000 ml (pH 8,9)
Kathodenpuffer:	12 g Tris + 17,9 g Tricin + 1 g SDS + H_2O ad 1000 ml (pH 8,2)
Fixierlösung:	40 % Methanol + 10 % Eisessig (v/v) in H_2O

Lösungen:	Sammelgel:	Zwischengel:	Trenngel:
48 % AA / 1,5 % BIS [ml]	1	2,3	7,5
Gelpuffer [ml]	3	3,75	7,5
50 % Glycerin [ml]	---	---	4,8
H_2O [ml]	8,4	5,2	2,7
TEMED [µl]	12	4,5	9
APS (10%) [µl]	50	37,5	75

2.2.11.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gel ohne Zwischengel

30 % AA / 0,2 % BIS:	150 g Acrylamid + 1 g Bisacrylamid + H_2O ad 500 ml
APS (10%)	10 % Ammoniumperoxodisulfat (w/v) in H_2O
Überschichtungslösung:	Isopropanol
Probenpuffer:	2 g SDS + 10 ml Glycerol + 727 mg Tris
	+ 20 mg Bromphenolblau-Na-Salz + H_2O ad 100 ml (pH 6,8)
Probenpuffer (denat.):	Probenpuffer mit 5 % 2-Mercaptoethanol (v/v)
Anodenpuffer:	24 g Tris + H_2O ad 1000 ml (pH 8,9)
Kathodenpuffer:	12 g Tris + 17,9 g Tricin + 1 g SDS + H_2O ad 1000 ml (pH 8,2)
Fixierlösung:	40 % Methanol + 10 % Eisessig (v/v) in H_2O

Lösungen:	Sammelgel:	Trenngel:
30 % AA / 0,2 % BIS [ml]	0,83	9,5
Tris (1,875 M; pH 8,8) [ml]	---	3,5
Tris (0,6 M; pH 6,8) [ml]	0,5	---
H_2O [ml]	3,6	3,5

SDS [µl]	50	167
TEMED [µl]	5	10
APS (10 %) [µl]	25	100

2.2.11.1.3 SDS-Polyacrylamid-Harnstoff-Gel

60 % AA / 0,8 % BIS:	300 g Acrylamid + 4 g Bisacrylamid + H_2O ad 500 ml
APS (10 %)	10 % Ammoniumperoxodisulfat (w/v) in H_2O
Überschichtungslösung:	Isopropanol
Probenpuffer (Tris-Urea):	5 g SDS + 72 g Glycerin + 303 g Tris + H_2O ad 1000 ml
Blottpuffer (Tris-Urea):	56,3 g Glycerin + 12,12 g Tris + H_2O ad 500 ml
Anodenpuffer:	24 g Tris + H_2O ad 1000 ml (pH 8,9)
Kathodenpuffer:	12 g Tris + 17,9 g Tricin + 1 g SDS + H_2O ad 1000 ml (pH 8,2)
Fixierlösung:	40 % Methanol + 10 % Eisessig (v/v) in H_2O

Lösungen:	Sammelgel:	Trenngel:
60 % AA / 0,8 % BIS [ml]	1	9,8
Tris (1,875 M; pH 8,8) [ml]	---	12
Tris (0,6 M; pH 6,8) [ml]	2,5	---
Harnstoff [g]	4,32	10,9
H_2O [ml]	5,24	---
SDS (10 %) [µl]	120	318
TEMED [µl]	20	20
APS (10 %) [µl]	140	140

2.2.11.2 Durchführung der eindimensionalen SDS-Gelelektrophorese

Die Elektrophoresekammer wurde zunächst nach Herstellerangaben aufgebaut, die Trenn- und Zwischengellösungen eingefüllt und der obere Gelrand mit Überschichtungslösung benetzt. Die Polymerisation erfolgte 45 min lang bei Raumtemperatur. Danach wurde die Überschichtungslösung abgesaugt, das Sammelgel aufgetragen und dieses mit dem Probenkamm versehen. Nach dem Auftauen der Proben wurden diese in jeweils 40 µl Probenpuffer 15 min lang bei 95 °C inkubiert. Dabei kam sowohl normaler als auch denaturierender Probenpuffer zum Einsatz. Nach 60 min wurde der im Sammelgel platzierte Kamm entfernt und der Marker sowie die Proben in die Kammtaschen pipettiert. Anschließend wurden die Taschen mit weiterem Sammelgel vorsichtig verschlossen und das Gel nach der Polymerisation über den Anodenpuffer und den Kathodenpuffer an die Spannungsquelle angeschlossen. Die angelegte Spannung betrug anfangs 30 V, sie wurde jedoch nach 60 bis 90 min, als die Proben vollständig in das Sammelgel eingedrungen waren, auf 130 V erhöht. Nach weiteren 180 min, spätestens jedoch nach dem Erreichen des unteren Gelrandes durch die Front des Farbstoffes, war die Auftrennung der Proteine beendet.

2.2.12 Proteindarstellung mittels Silberfärbung

Um die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen, wurde das Verfahren der Silberfärbung nach Blum (6) angewandt. Basis der verwendeten Reagenzien ist jeweils deionisiertes Wasser mit einer Leitfähigkeit von kleiner 2 µS.

Thiosulfatreagenz:	0,02 % Natriumthiosulfat in H_2O
Silbernitratreagenz:	0,2 % Silbernitrat, 0,0074 % Formaldehyd in H_2O
Entwickler:	3 % Na_2CO_3, 0,0185 % Formaldehyd, 0,0005% Natriumthiosulfat
Stopreagenz:	0,5 % Glycin in H_2O
Konservierer:	40 % Glycerin in H_2O

Zunächst wurden die Gele für mindestens eine Stunde in der Fixierlösung fixiert und danach dreimal 20 min in 30 % Ethanol gewaschen. Daraufhin erfolgte die einminütige Reduktionsreaktion mit Thiosulfatreagenz, der sich drei Waschvorgänge für 20 sec mit deionisiertem Wasser anschlossen. Dann wurden die Gele 20 min in Silbernitratreagenz inkubiert und wiederum dreimal 20 sec lang mit deionisiertem Wasser gewaschen. Entwickelt wurde daraufhin mit 3 bis 5 min mit dem Entwickler. Die Gele wurden dann 10 sec in deionisiertem Wasser geschwenkt und die Reaktion 5 min lang mit Stopreagenz zum Stillstand gebracht. Danach wurde noch zweimal für 30 min mit deionisiertem Wasser gewaschen. Um die Gele haltbarer zu machen, wurden sie noch 30 min lang in Konservierer eingelegt und dann in Klarsichtfolie luftdicht verschweißt.

2.2.13 Proteindarstellung mittels Proteintransfer und Immundetektion

Gelelektrophoretisch separierte Proteine können mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert werden. Die im Gel aufgetrennten Proteine werden im Semidry-Verfahren (37) auf eine Nitrozellulose (NC)- oder Polyvinylidenfluorid (PVDF)- Membran transferiert und über Bindung an spezifische Antikörper und eine anschließende Enzymreaktion visualisiert (64).

Trispuffer (TBS):	4 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,5
Phosphatpuffer (PBS):	12 mM Na_2HPO_4, 3 mM NaH_2PO_4, 150 mM NaCl, pH 7,4
Blottpuffer:	192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20 % Methanol, 0,01 % SDS in H_2O
Blockpuffer:	5 % Milchpulver (w/v) in TBS
oder:	3 % Fischgelatine (w/v) in PBS
oder:	2 % BSA (w/v) in PBS
Waschpuffer:	0,05 % Tween 20 (w/v) in TBS
Detektionspuffer:	0,5 % BSA (w/v) in PBS
Ponceausreagenz:	0,2 % Poncaeuslösung, 3 % Trichloressigsäure in H_2O

Zunächst wurden die Gele über 5 min in Blottpuffer äquilibriert. Bei Verwendung einer PVDF-Membran musste auch diese durch sukzessives Tauchen in 100% Methanol für 1 min, H_2O für 2 min und Blottpuffer für 2 min äquilibriert werden. Zum Proteintransfer auf die Membran wurde eine Graphitplatte mit sechs Lagen in Blottpuffer getränktem Filterpapier, einer ebenfalls in Blottpuffer getränkten Membran, dem Gel, einer weiteren getränkten Membran, wiederum sechs Lagen getränktem Filterpapier und einer zweiten Graphitplatte belegt (64). Dabei wurde besonders auf fettfreies Arbeiten geachtet und eventuell vorhandene Luftblasen mit einer Glaspipette entfernt. Der Transfer erfolgte bei Raumtemperatur und einer Stromstärke von 0,8 mA/cm^2 in der Regel über 60 min (37). Die Anfärbung der Proteine auf der Membran erfolgte zunächst mit Ponceausreagenz über 30 min. Daraufhin wurden die entstandenen Banden mit Kugelschreiber markiert und mit Blockpuffer 30 min lang bei 20 °C geblockt. Die Inkubation mit Primär-Antkörpern in einer Konzentration von 1:10000 in Detektionspuffer erfolgte bei 4 °C über Nacht. Anschließend wurde in TBS, TBS + 0,01 % Triton und nochmal TBS jeweils 10 min gewaschen. Mit den Sekundär-Antikörpern in einer Konzentration von 1:100000 in Waschpuffer wurden die Membranen bei 20 °C für 60 min inkubiert, gefolgt von zweimaligem Waschen in TBS für 10 min. Daraufhin wurde eine Entwicklung mit ECL-System nach Vorschrift des Herstellers für 1, 5 oder 10 min angeschlossen. Die Belichtung des Filmmaterials dauerte 10 bis 100 sec.

2.2.14 Proteintrennung durch zweidimensionale SDS-Gelelektrophorese

Bei der zweidimensionale SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese werden die Proteine zuerst in der ersten Dimension entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Erst bei der Elektrophorese der zweiten Dimension wird dann die Auftrennung der Proteine nach dem spezifischen Gewicht vorgenommen. Die 2D-SDS-PAGE wurde mit einem immobilisierten linearen Gradienten von pH 3 bis pH 9 nach Görg et al. (17, 18, 16) durchgeführt. Dabei wurde DDT zur Trennung der Disulfidbrücken und Auffaltung der Quartärstruktur,

Chaps und Triton X-100 zur Lösung der hydrophoben Bindungen und Harnstoff zur Dissoziation von Wasserstoffbrücken und elektrostatischen Wechselwirkungen eingesetzt.

2.2.14.1 Materialvorbereitung:

Quelllösung: 19,2 g Harnstoff und 25,6 ml Wasser 15 min mit einer Spatelspitze Ionenaustauscher rühren, filtrieren und 29,8 ml davon abnehmen.
100 mg DTT, 150 mg Chaps und 150 µl Pharmalyte (3-10) zugeben.

Solulösung: 54 g Harnstoff + 53 ml H_2O 15 min mit einer Spatelspitze Ionenaustauscher rühren, filtrieren, dann Zugabe von 2 g Chaps + 1 g DTT
+ 2 ml 2-D Pharmalyte (3-10)+ 43 mg Pefablock SC + H_2O ad 100 ml

Elektrodenpuffer: 14,4 g Glycin + 3,03 g Tris + 1,0 g SDS + H_2O ad 1000 ml, filtrieren

Blaulösung: 30 mg Bromphenolblau + 10 ml Sammelgelpuffer

Äquipuffer: 36 g Harnstoff + 30 g Glycerin + 2 g SDS
+ 3,3 ml Trenngelpuffer + 45,7 ml H_2O

Äquilibrierer (A): 20 ml Äquipuffer + 60 µl Blaulösung + 0,2 g DTT

Äquilibrierer (B): 20 ml Äquipuffer + 60 µl Blaulösung. + 0,8 g Jodacetamid

Acrylamidlösung: 28,8 g Acrylamid + 1,2 g Bisacrylamid ad 100 ml H_2O
15 min mit einer Spitze Ionenaustauscher rühren und filtrieren.

APS (40 %) 40 % Ammoniumperoxodisulfat (w/v) in H_2O

Sammelgelpuffer: 6,05 g Tris + 0,4 g SDS + 70 ml H_2O
mit 4 N HCl auf pH 6,8 einstellen + H_2O ad 100ml, filtrieren

Trenngelpuffer 18,2 g Tris + 0,4 g SDS + 70 ml H_2O
mit 4 N HCl auf pH 8,8 einstellen + H_2O ad 100ml, filtrieren

Markerlösung: 2,3 ml SDS-Probenpuffer + 200 µl Bromphenolblau + LMW-Marker
5 min bei 95 °C kochen, dann abkühlen lassen

SDS-Probenpuffer: 100 mg SDS + 1 ml Trenngelpuffer + 8,9 ml H_2O

Fixierlösung: 40 % Ethanol + 10 % Ameisensäure in H_2O

2.2.14.2 Probenvorbereitung:

Für die zweidimensionale SDS-Gelelektrophorese war eine spezielle Vorbereitung der Proben erforderlich. Sie wurden zunächst mittels eines Dialyseschlauchs mit 1 kDa Porengröße 1:100 gegen destilliertes Wasser mit 43 mg Pefablock pro 2 l H_2O über 24 h bei 4 °C dialysiert, wobei die Dialyseflüssigkeit dreimal gewechselt wurde. Anschließend wurde die Proteinkonzentration des Dialysates bestimmt, dieses dann gemäß der Vorschrift des Geräteherstellers gefriergetrocknet und bei -80 °C gelagert. Vor der Verwendung wurden die Proben in jeweils 50 µl Solulösung gelöst, sodass sie etwa 3 bis 5 µg Protein/µl enthielten.

2.2.14.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF) auf IPG-Fokussierungsstreifen

Die Gelstreifen für die isoelektrische Fokussierung wurden über Nacht bei Raumtemperatur zum Quellen in Quelllösung eingelegt, nach dem Quellen auf feuchtes Filterpapier gelegt und mit deionisiertem Wasser abgetupft. Die Fokussierungsstreifen wurden auf eine mit Kerosin beschichtete Kühlplatte aufgelegt, wobei das basische Ende der Streifen zur Kathode zeigte. Elektrodenstreifen wurden aus Filterpapier ausgeschnitten, in deionisiertem Wasser getränkt und als Anode und Kathode aufgelegt. Um den CO_2-Gehalt zu verringern, wurde ein Stück Filterpapier mit in die Kammer gegeben, das vorher in 5 N NaOH getränkt worden war. Die Probenkammern aus Silikon wurden etwa 5 mm von der Anode entfernt auf das Gel aufgelegt und Probenlösung entsprechend einer Proteinmenge von 80 µg aufgetragen, nicht jedoch auf den Randstreifen. Die Elektroden wurden auf den Elektrodenstreifen positioniert, der Rahmen mit Silikonöl bedeckt und die Spannungsquelle nach folgendem Schema eingestellt, wobei die Filterpapierblätter nach 2,5 und 4 Stunden gewechselt wurden:

Stufe	Zeit [h]	Spannung [V]	Strom [mA]	Leistung [W]
1	0,5	150	1	5
2	1	300	1	5
3	1	600	1	5
4	4	3500	1	5

Nach Ende der IEF wurden die Streifen in beschrifteter Klarsichtfolie bei -80 °C eingefroren. Vor der Weiterverwendung wurden die Fokussierstreifen aufgetaut, zum Äquilibrieren jeweils 10 min in Äquilibrierer (A) und (B) vorsichtig geschwenkt und anschließend mit deionisiertem Wasser gewaschen und abgetupft.

2.2.14.4 Herstellung der SDS-Gele

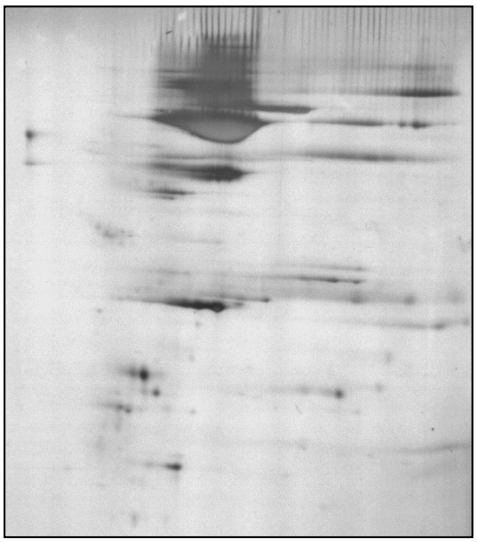
Lösungen:	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid-Lösung [ml]	2,0	6,0
Sammmelgelpuffer [ml]	2,5	----
Trenngelpuffer [ml]	---	3,75
Glycerol (100 %) [g]	3,75	3,75
H_2O [ml]	2,5	2,25
TEMED [µl]	3,0	7,5
APS (40 %) [µl]	10,0	15
Endvolumen [ml]	10,0	15,0

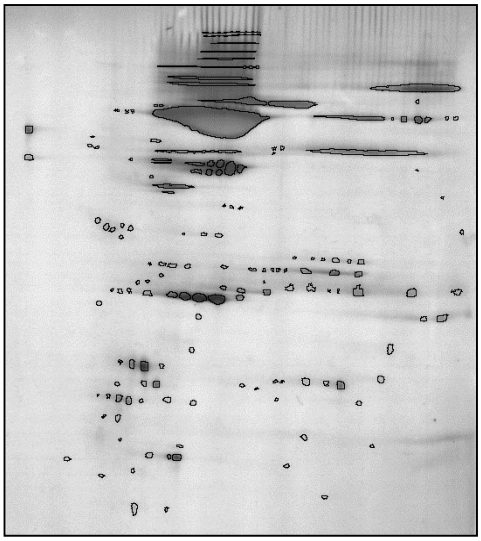
Die Lösungen wurden im Ultraschallbad durchmischt und TEMED und APS erst unmittelbar vor dem Gießen zugegeben. Die Gele wurden in einer Kassette zwischen zwei Glasplatten gegossen, wobei das Gelbond zuerst mit der hydrophoben Seite blasenfrei auf eine Glasplatte aufgelegt wurde. Danach wurden die Gele zuerst 15 min bei Raumtemperatur, dann 30 min bei 50° C im Wärmeschrank und schließlich bis zur weiteren Verwendung bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.14.5 Elektrophorese der zweiten Dimension:

Das SDS-Gel wurde blasenfrei auf die Kühlplatte der Elektrophoresekammer und die Elektrodenstreifen an beiden Enden des Gels aufgelegt. Die äquilibrierten Fokussierungsstreifen wurden blasenfrei mit der Gelseite nach unten auf das kathodische Ende des SDS-Gels aufgelegt, wobei der Abstand zum Kathodenstreifen etwa 2-3 mm betrug. Der pH-Bereich des Streifens wurde markiert und 5 µl LMW-Marker-Lösung mittels der Silikon-Probenkammer aufgetragen. Die Elektroden wurden plaziert und die Elektrophorese zum Probeneintritt über 1 h bei bis zu 200 V, 30 mA und 30 W durchgeführt. Die Fokussierungsstreifen wurden dann entfernt und der Kathodenstreifen über die Auftragsstelle des Fokussierungsstreifens gelegt. Anschließend wurde die Auftrennung mit bis zu 600 V, 30 mA und 30 W über etwa 4 Stunden bis zum Erreichen des Gelendes durch die Bromphenolfront weitergeführt. Unmittelbar nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele über Nacht in der Fixierlösung fixiert und einer Silberfärbung unterzogen (2 min +/-10 sec), sodass sich der Standard gut darstellte.

2.2.15 Rechnergestützte Auswertung der 2D-Gele

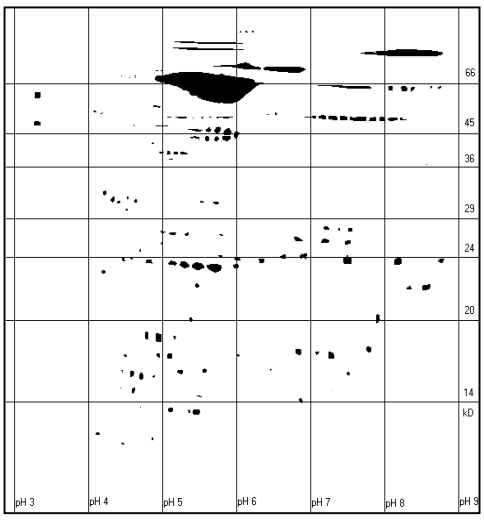




Die zweidimensionalen Gele wurden nach der Silberfärbung über einen Scanner bei λ = 300 nm in die Melanie II Software auf dem PC kopiert. Dort wurde zunächst Helligkeit und Kontrast angepasst und anschließend die Spots auf den Gelen automatisch detektiert. Offensichtliche Artefakte, die als Spots erkannt worden waren, wurden manuell entfernt und schlecht erkannte Spots nachbearbeitet. Die Gele wurden dann aufeinander gelegt und die korrespondierenden Spots zuerst automatisch und dann manuell zugeordnet. Die Berechnung der Proteinmengen aus der optischen Dichte der Spots scheiterte zunächst an der Tatsache, dass mittels Silberfärbung zwar sehr kleine Proteindichten visualisiert werden können, hohe Konzentrationen aber wieder an Färbung verlieren, der lineare Messbereich hier also zu klein für einen quantitativen Vergleich ist.

Deshalb verfügt Melanie II über die Möglichkeit, Spots nachträglich zu bearbeiten, deren Färbung aufgrund zu hoher Proteinkonzentration nicht quantitativ ist. Dabei wird aus dem linearen Bereich der Färbung am Rande der Spots die theoretisch vorhandene optische Dichte außerhalb des linearen Bereichs geschätzt. Dabei wird angenommen, dass die Proteinverteilung eines Spots der Gauss´schen Normalverteilung folgt. In diesem Fall kann die theoretische Färbung natürlich aus einem korrekt gefärbten Randbereich berechnet werden, was jedoch nur bei einzeln platzierten Spots mit angemessener Zuverlässigkeit funktioniert. Befinden sich in einem Bezirk nämlich mehrere kräftige Spots, deren

überentwickelte Bereiche ineinander übergehen, wie es z. B. bei Albumin häufig der Fall ist, dann wird daraus ein riesiger Spot, dem eine inadäquat große Proteinmenge zugeschrieben werden könnte. Eine Abgrenzung der einzelnen ineinander übergegangenen Bereiche ist aber auch mit dem Auge oft unmöglich. Dazu wären Aufnahmen in verschiedenen Entwicklungsstadien desselben Gels nötig, was technisch allerdings sehr schwierig ist. Eine Alternative wäre die Anfertigung von mehreren Gelen aus derselben Probe mit unterschiedlich langen Entwicklungszeiten. Die dafür benötigten Mengen an Lavageflüssigkeit standen jedoch nicht zur Verfügung.



Deshalb wurde auf einem anderen Weg versucht, zumindest eine semiquantitative Auswertung der Gele zu ermöglichen. Die Bilder der Gele wurden mit den eingegrenzten und bearbeiteten Spots in das Programm Paint Shop Pro übernommen. Dort wurden alle Graustufen eliminiert. Die Hintergründe wurden transparent und die Spots gleichmäßig mit einer von Gel zu Gel unterschiedlichen Farbe eingefärbt. Daraufhin wurden die Bilder übereinandergelegt und so angepasst, dass sowohl die korrespondierenden Gewichtsmarker, als auch die pH-Markierungen übereinander zu liegen kamen. Nach optischen Gesichtspunkten und unter Bezug auf die entsprechenden Artikel von Wattiez (62, 63) und Lindahl (46) wurden dann einige wichtige Proteine und Proteinbereiche definiert. Da mit den Gelen nach der Silberfärbung kein Immunoblotting mehr durchgeführt werden konnte, wurden nur optisch einwandfrei zu identifizierende Spots berücksichtigt. Einzelne Spots oder abgegrenzte Bereiche konnten nun mittels Paint Shop Pro ausgewählt und deren Flächen gemessen werden.

2.2.16 Datenanalyse mittels Statistiksoftware

Die Analyse der Daten wurde mit den Rechnerprogrammen Microsoft Excel und Graph Pad Prism 3.00 durchgeführt (49). Alle Daten werden, soweit nicht näher bezeichnet, nach folgendem Muster angegeben:

Medianwert (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimalwert - Maximalwert]

Die azellulären Komponenten der BAL werden, wie von der European Task Force on BAL empfohlen (31), als Konzentrationen in der wiedergewonnenen Lavageflüssigkeit ausgedrückt. Zur besseren Vergleichbarkeit mit anderen Arbeiten wurden die Surfactantproteine auch auf den Gesamtproteingehalt und den Phospholipidgehalt bezogen. Die Korrelation zwischen einzelnen Variablen wurden durch Berechnung der Spearman rank Korrelationskoeffizienten überprüft. Zur Berechnung von signifikanten Unterschieden wurde beim Vergleich von zwei Gruppen der Mann-Whitney-Test, bei drei oder mehr Gruppen der Test nach Kruskal-Wallis verwendet. Multiple Vergleiche wurden mit dem Dunn's Test durchgeführt. Als Signifikanzschwelle wurde ein $p < 0,05$ gewählt. Es handelt sich jeweils um einen nichtparametrischen Test, der keine Normalverteilung der Daten voraussetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich der Zusammensetzung der Lungenspülflüssigkeit

Die Patientengruppe wurde in zwei Untergruppen aufgeteilt, je nachdem, ob pathogene Keime in der Lavageflüssigkeit nachgewiesen werden konnten. So konnten die Lavageproben der Kontroll- und der Patientengruppe verglichen und dabei ein etwaiger Keimbefall berücksichtigt werden.

3.1.1 Mikrobiologische Untersuchung

Nach dem Ergebnis der mikrobiologischen Untersuchung konnte die Patientengruppe aufgeteilt werden. In der ersten Untergruppe befanden sich demnach 14 Patienten, bei denen keine pathogenen Keime in der BALF nachgewiesen werden konnten. Die zweite Untergruppe bildeten zehn Patienten, in deren BALF pathogene Keime entdeckt wurden. Im Einzelnen waren dies fünfmal Aspergillen, Paecilomyceten, Cytomegaloviren, Pseudomonaden (Pseudomonas putida), Staphylokokken (Staphylococcus epidermidis) und Lactobacillen (siehe Tabelle 1). Diese Einteilung diente als Basis für die weiteren Berechnungen und Auswertungen.

3.1.2 Rückgewinnung

Die Rückgewinnung, sprich der Anteil der eingesetzten Spülflüssigkeit, der bei der bronchoalveolären Lavage zurückgewonnen werden konnte, war nicht einheitlich. Während es bei den 24 Kontrollen 64,5 (59,0;72,5) [45,0-94,0] % waren, konnten bei den 24 Patienten 60,0 (55,5;72,5) [31,0-85,0] % zurückgewonnen werden. Bei den 14 Patienten ohne Keimnachweis in der BALF waren es 70,5 (59,0;75,0) [54,0-85,0] %, bei den zehn Patienten mit Keimen 55,5 (40,0;62,5) [31,0-72,0] %. Insgesamt ergab dies ein p_{ges} von 0,0290 bei signifi-

kantem Test nach Dunn im Vergleich von Kontrollen mit Patienten mit Keimen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (siehe Tabelle 2 im Anhang).

3.1.3 Oberflächenaktivität

Bezüglich der Oberflächenaktivität konnten keine signifikanten Veränderungen bei den Patienten beobachtet werden. Gemessen wurden neun Kontrollen und zehn Patienten, davon sechs ohne und vier mit Keimen in der BALF. Die Oberflächenspannung lag bei initialer Adsorption (γ_{ads}) im Bereich von 45,5 (29,8;49,7) [19,5-52,0] mN/m bei den Kontrollen und bei 43,2 (28,9;54,3) [22,6-69,2] mN/m bei den Patienten. Bei Kindern mit Keimen in der BALF wurden 46,1 (36,3;55,7) [22,6-69,2] mN/m gemessen, bei den Patienten ohne Keim 43,0 (28,9;53,0) [27,5-57,4] mN/m. Nach 100 Pulsationen war die minimale Oberflächenspannung (γ_{min}) erreicht. Diese betrug bei den Kontrollkindern 19,1 (16,6;19,9) [13,8-21,8] mN/m und bei den Patienten 18,7 (14,4;20,7) [10,7-32,9] mN/m. Aufgeteilt nach Untergruppen wurden bei Patienten mit Keimen 18,0 (15,8;22,3) [11,5-32,9] mN/m und bei Patienten ohne Keimnachweis 18,9 (14,0;20,7) [10,7-20,7] mN/m gemessen. Der p-Wert lag im Falle von γ_{ads} bei 0.9668, im Falle von γ_{min} bei 0,9937 (siehe Tabelle 4 im Anhang).

3.1.4 Zelluläre Bestandteile der Lavageflüssigkeit

Zur Bestimmung der zellulären Bestandteile der BALF stand Material von allen 24 Kontrollen und allen 24 Patienten, d. h. zehn Patienten mit und 14 Patienten ohne Keimnachweis zur Verfügung. Die Anzahl der Proben wird deshalb nicht jeweils angegeben. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 2 im Anhang.

3.1.4.1 Gesamtzellzahl

Die Gesamtzahl der Zellen, die in der BALF gefunden wurden, war bei den Kindern mit malignen Erkrankungen, Fieber, Immunsuppression und pulmonalen Infiltraten mit 22,1

(11,6;76,2) [1,9-629,2] Zellen/µl signifikant höher (p_{ges}=0,0001) als bei den Kontrollen mit 6,0 (2,7;11,7) [0,5-45,9] Zellen/µl. Patienten mit Keimen in der BALF, bei denen eine Zellzahl von 25,1 (10,0;87,3) [4,7-493,7] Zellen/µl gemessen wurde, unterschieden sich nicht wesentlich von Patienten ohne Keimnachweis mit 18,9 (9,1;88,8) [1,9-629,2] Zellen/µl Lavageflüssigkeit.

3.1.4.2 Makrophagen

Unter den Zellen in der BALF hatten die Makrophagen den größten Anteil. Bei den Kontrollen waren es 84,5 (72,7;90,0) [47,0-95,7] %, bei den Patienten nur 45,5 (22,0;68,5) [2,0-99,0] %. Patienten mit Keimen in der BALF hatten 36,0 (19,0;61,5) [12,0-80,0] % Makrophagen, Patienten ohne Keimnachweis 61,5 (22,0;75,5) [2,0-99,0] %. Insgesamt ergab dies einen signifikant geringeren Anteil an Makrophagen in den Patientengruppen mit p_{ges}<0,0001.

3.1.4.3 Lymphozyten

Ein relativer Anstieg an Lymphozyten (p_{ges}=0,0249) wurde bei den Patienten im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt. Lag der Anteil bei den Kontrollen bei 15,0 (9,5;25,9) [4,0-50,0] %, so waren es bei den Patienten 34,0 (15,5;65,0) [1,2-98,0] %. Die Untergruppen zeigten mit 34,0 (11,0;65,5) [1,2-98,0] % für Patienten ohne Keimnachweis und 35,0 (15,5;74,0) [6,0-87,0] % für Patienten mit Keimen in der BALF keine großen Unterschiede.

3.1.4.4 Granulozyten

Auch bei den Granulozyten zeigten sich signifikante Unterschiede mit p_{ges}=0,0061. In der Kontrollgruppe waren unter den entdeckten Zellen 1,2 (0,5;1,8) [0,3-3,0] % Granulozyten, in der Patientengruppe 4,0 (0,9;14,5) [0,1-74,0] %. Die Werte für Patienten mit Keimen lagen mit 8,5 (1,2;32,5) [0,4-74,0] % jedoch höher als für Patienten ohne Nachweis pathogener

Keime in der BALF, bei denen 3,4 (0,5;10,5) [0,1-33,0] % Granulozyten gefunden wurden. So war der Unterschied zwischen Kontrollen und Patienten mit Keim im Test nach Dunn signifikant ($p<0,05$), nicht aber der Unterschied zwischen Kontrollen und Patienten ohne Keimnachweis.

3.1.4.5 Neutrophile Granulozyten

Ein ähnliches Bild ergab sich, mit $p_{ges}=0,0031$, wenn nur die neutrophilen Granulozyten betrachtet wurden. Sie lagen im Falle der Kontrollen bei 0,6 (0,3;1,1) [0,1-2,5] % der Zellen und im Falle der Patienten bei 3,0 (0,7;13,5) [0,0-74,0] % der Zellen. Patienten ohne Keime hatten 2,6 (0,1;6,5) [0,0-32,0] % neutrophile Granulozyten in der BALF, Patienten mit Keimen 8,0 (1,1;25,5) [0,4-74,0] %. Wiederum war der Unterschied zwischen Kontrollen und Patienten mit Keimen im Test nach Dunn signifikant ($p<0,05$), der Unterschied zwischen Kontrollen und Patienten ohne Keimnachweis jedoch nicht.

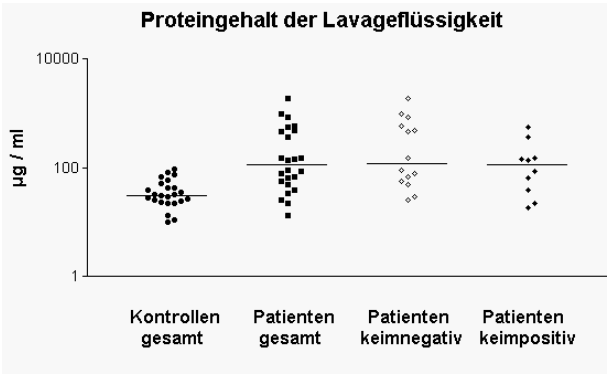
3.1.4.6 Eosinophile Granulozyten

Auch die eosinophilen Granulozyten wurden verglichen, hier ergaben sich jedoch mit $p_{ges}=0,8553$ keine signifikanten Differenzen. 0,2 (0,0;0,4) [0,0-1,6] % waren es bei den Kontrollen, 0,2 (0,0;0,6) [0,0-15,0] % bei den Patienten. In der Gruppe der Patienten ohne Keimnachweis wurden 0,4 (0,0;1,3) [0,0-8,0] % gemessen, in der Gruppe mit Keimen in der BALF 0,1 (0,0;0,7) [0,0-15,0] %.

3.1.5 Azelluläre Bestandteile der Lavageflüssigkeit

Da zur Bestimmung der azellulären Bestandteile der BALF nicht von allen Kindern ausreichend Material zur Verfügung stand, wird die Anzahl der gemessenen Proben im Folgenden jeweils angegeben. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 3 und 4 im Anhang aufgelistet.

3.1.5.1 Proteine



Die Gesamtproteinkonzentration konnte bei allen 24 Kontrollen und allen 24 Patienten, von denen 14 ohne und 10 mit Keimnachweis waren, gemessen werden. Bei den Kontrollen lag diese bei 31,2 (24,0;47,0) [9,8-94,2] µg/ml, bei den Patienten bei 113,7 (53,3;482,8) [13,2-1859,9] µg/ml. Wurden die Patienten in Kinder mit und Kinder ohne Keimnachweis aufgeteilt, ergaben die Messungen 121,2 (53,3;722,6) [25,8-1859,9] µg/ml für erstere und 111,8 (30,1;261,2) [18,2-557,6] µg/ml für letztere. Insgesamt ergab dies ein p_{ges} von kleiner als 0,0001. Im Test nach Dunn ergaben sich folgende Auffälligkeiten: Die einzigen signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ergaben sich zwischen der Gruppe der Kontrollen einerseits und der Gruppe der Patienten, sowie der Untergruppe der Patienten ohne Keimnachweis andererseits, mit jeweils $p<0,001$. Die anderen Vergleiche ergaben keine Signifikanzen. Unabhängig davon konnte festgestellt werden, dass Patienten mit interstitiellen Lungeninfiltraten mit 496,2 (305,7;917,0) [84,4-963,3] µg/ml signifikant höhere Proteinkonzentrationen in der BALF zeigten als Patienten mit umschriebenen Infiltraten 67,6 (34,0;151,2) [18,2-1859,9] µg/ml, wobei ein p von 0,0111 errechnet wurde.

3.1.5.2 Phospholipide

Bei den Phospholipiden konnten mit $p_{ges}=0,1509$ keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Im einzelnen wurden folgende Werte gemessen: 21 Kontrollen mit 8,3 (4,5;12,3) [2,2-19,3] µg/ml und 24 Patienten mit 14,4 (5,7;27,0) [0,4-125,1] µg/ml, davon 14 Patienten ohne Keimnachweis mit 15,7 (4,8;32,2) [2,0-67,3] µg/ml und 10 Patienten mit Keimnachweis mit 12,6 (4,7;33,7) [0,4-125,1] µg/ml. Auch im Test nach Dunn traten bezüglich der Phospholipide keine signifikanten Unterschiede auf.

3.1.5.3 Kleine Aggregate (SA)

Die kleinen, weniger oberflächenaktiven Aggregate der BALF blieben auch nach 30 min Zentrifugation bei 40000 g im Überstand zurück. Sie wurden hier nicht eingehend untersucht und nur ihre Gesamtmenge im Überstand bestimmt. Diese ergab bei 19 Kontrollen 1,8 (1,4;11,8) [0,8-31,3] µg/ml, bei 10 Patienten 10,0 (4,7;16,4) [2,1-27,0] µg/ml. Von den Patienten ohne Keimnachweis konnten 6 mit 13,4 (5,0;22,1) [4,2-27,0] µg/ml gemessen werden, von den Patienten mit Keimen in der BALF nur 4 mit 6,9 (4,4;10,3) [2,1-15,2] µg/ml. Die Gruppen unterschieden sich signifikant mit p_{ges}=0,0177, wobei der Test nach Dunn zeigte, dass sich sowohl die Patientengruppe insgesamt als auch die Untergruppe ohne Keimnachweis von den Kontrollen mit $p<0,01$ unterschied, nicht aber die Untergruppe der Patienten mit Keimnachweis.

3.1.5.4 Große Aggregate (LA)

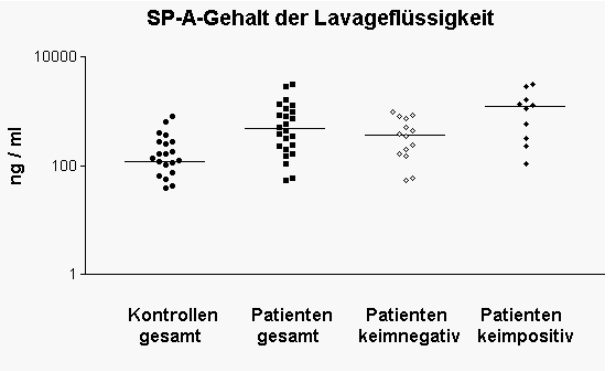
Die großen Aggregate zeigten in ihrer Gesamtheit keine signifikanten (p_{ges}=0,0937) Unterschiede zwischen den 18 mit 10,9 (5,2;25,5) [2,6-48,3] µg/ml gemessenen Kontrollen, den 10 mit 18,8 (11,3;38,2) [10,5-109,9] µg/ml gemessenen Patienten und den Untergruppen. Bei den Patienten ohne Keim konnten 18,8 (10,7;38,2) [10,5-40,3] µg/ml nachgewiesen werden, bei den anderen 23,3 (12,3;53,0) [11,5-109,9] µg/ml, wobei der Test nach Dunn nur zwischen der Kontrollgruppe und der Gesamtgruppe der Patienten einen signifikanten Unterschied mit $p<0,05$ ergab.

3.1.5.5 Verhältnis von SA zu LA

Da die SA und die LA natürlich immer voneinander abhängig sind, wurde noch der Quotient aus SA und LA gebildet. Dieses Verhältnis lag bei den 18 Kontrollen bei 0,29 (0,12;0,55) [0,07-0,90], bei den 10 Patienten bei 0,44 (0,22;0,61) [0,14-1,12]. In der Untergruppe ohne Keimnachweis ergaben sich Quotienten von 0,51 (0,43;0,89) [0,38-1,12], in der Unter-

gruppe mit Keimnachweis von 0,22 (0,17;0,29) [0,14-0,41]. Obwohl die Unterschiede mit p_{ges}=0,0613 insgesamt nicht signifikant waren, zeigte sich, dass sich die Patienten ohne Keim nach Dunn's Test sowohl von den Kontrollen als auch von den Patienten mit Keimnachweis signifikant (p<0,01) unterschieden.

3.1.5.6 Gehalt an SP-A



Der Proteingehalt der Lavageflüssigkeit an Surfactantprotein A wurde bei den 24 Kontrollen mit 120,0 (48,9;262,8) [0,0-800,0] ng/ml, bei den 24 Kindern mit malignen Erkrankungen mit 479,1 (215,7;1052,1) [54,2-3155,2] ng/ml gemessen. Die Untergruppe der 14 Patienten ohne Nachweis pathogener Keime enthielt 368,8 (157,7;770,4) [54,2-976,0] ng/ml, in der Untergruppe der 10 Patienten mit Keimen in der BALF konnten 1218,5 (274,3;2274,0) [107,4-3155,2] ng/ml gemessen werden. Über alle vier Gruppen wurde ein p_{ges} von kleiner als 0,0001 errechnet, wobei sich im Test nach Dunn nur die Gesamtgruppe der Patienten mit p<0.01 und die Untergruppe der Patienten mit Keimnachweis mit p<0,001 signifikant von den Kontrollen unterschieden, nicht jedoch die Untergruppe der Patienten ohne Keimnachweis in der BALF.

3.1.5.7 Gehalt an SP-A im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt

Betrachtet man den Gehalt der Lavageflüssigkeit an Surfactantprotein A jedoch im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt der jeweiligen Proben, so ergeben sich bei einem p_{ges} von 0,1341 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untergruppen. Die 19 berechneten Werte der Kontrollgruppe lagen bei 3,9 (1,6;12,1) [0,8-26,4] ng SP-A pro µg Gesamtprotein, die 24 Ergebnisse der Patientengruppe bei 6,3 (0,7;12,2) [0,0-37,8] ng SP-A pro µg

Gesamtprotein. Bei den Patienten ohne Keimnachweis in der BALF wurden 3,1 (0,3;8,8) [0,0-37,8] ng SP-A pro µg Gesamtprotein, bei den zehn Patienten mit Keimen in der Lavageflüssigkeit 8,8 (4,6;23,1) [0,8-32,6] ng SP-A pro µg Gesamtprotein berechnet.

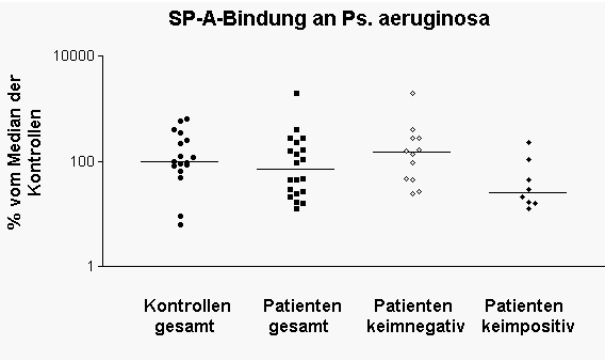
3.1.5.8 Gehalt an SP-A im Verhältnis zum Phospholipidgehalt

Auch zum Phospholipidgehalt wurde die SP-A-Konzentration ins Verhältnis gesetzt. Dabei zeigte sich auch, dass die 18 Werte der Kontrollgruppe mit 17,6 (9,4;34,1) [4,6-81,5] ng SP-A pro µg Phospholipid nach Dunn's Test zwar nicht signifikant von den 24 Patienten insgesamt (40,6 (17,2;106,7) [0,8-291,8] ng SP-A pro µg Phospholipid) oder den 14 Patienten ohne Keimnachweis (37,6 (14,3;55,1) [0,8-97,7] ng SP-A pro µg Phospholipid) unterschieden, wohl aber mit $p<0,05$ von den zehn Patienten mit Keimnachweis in der Lavageflüssigkeit. Insgesamt lag p_{ges} nach Kruskal-Wallis bei 0,0198.

3.1.5.9 Bindungsfähigkeit des SP-A an Mannose

Zur Messung der Mannose-Bindungsfähigkeit von Surfactantprotein A konnten versuchsbedingt nur Proben mit einem relativ hohen Gehalt an SP-A gemessen werden. Dies waren sieben Kontrollen und 15 Patienten, bei denen in sechs Fällen Keime in der Lavageflüssigkeit nachgewiesen werden konnten. Die Werte sind jeweils Prozentangaben und wurden auf den Median der Kontrollgruppe bezogen. Diese wurde mit 100,0 (53,8;195,1) [36,9-203,1] % gemessen, die Patientengruppe mit 134,2 (108,6;257,0) [60,6-328,7] %. In der Patientengruppe ohne Keimbefall waren es 157,9 (95,0;277,3) [60,6-328,7] %, in der Patientengruppe mit Keimbefall 130,8 (101,4;213,1) [83,8-263,9] %. Signifikante Unterschiede konnten bei $p_{ges}=0,4620$ nicht nachgewiesen werden. Auch im Test nach Dunn wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

3.1.5.10 Bindungsfähigkeit des SP-A an Pseudomonas aeruginosa



Die Bindungsfähigkeit des Surfactantproteins A an Pseudomonas aeruginosa konnte bei 17 Kontrollproben und 20 Patientenproben gemessen werden. Alle Messwerte wurden als Prozentwerte angegeben und auf den Median der Kontrollgruppe bezogen. Die Bindungsfähigkeit war in der Patientengruppe mit 70,1 (25,5;199,2) [12,7-1970,1] % gegenüber der Kontrollgruppe mit 100,0 (72,8;298,8) [6,2-629,3] % nicht signifikant reduziert. Die zwölf Patienten ohne Keimnachweis zeigten eine Bindungsfähigkeit von 150,7 (45,6;276,3) [24,1-1970,1] %, die acht Patienten mit Keimnachweis 25,0 (16,5;75,6) [12,7-232,5] %. Nach Kruskal-Wallis lag p_{ges} bei 0,0854 und nach Dunn's Test gab es keine Signifikanzen zwischen den Gruppen.

3.1.5.11 Gehalt an SP-D

Der Gehalt an Surfactantprotein D in der Lavageflüssigkeit war in den gemessenen Gruppen fast identisch, was auch in einem p_{ges} von 0,9961 zum Ausdruck kommt. Bei den 24 Kontrollkindern wurden 37,7 (14,0;66,3) [0,0-119,3] ng/ml ermittelt, bei den 22 gemessenen Patienten 50,8 (16,9;73,2) [0,0-208,8] ng/ml. Zwölf Patienten ohne Keimnachweis wurden mit 40,3 (21,0;60,4) [0,0-208,8] ng/ml gemessen, die zehn Patienten mit Keimnachweis mit 50,8 (6,6;92,0) [0,0-105,0] ng/ml.

3.1.5.12 Gehalt an SP-D im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt

Wurden bei den 23 berechenbaren Kontrollen 1,1 (0,4;2,3) [0,1-8,5] ng SP-D pro µg Gesamtprotein errechnet, so lag dieser Quotient bei den 18 berechneten Patienten nur bei 0,4 (0,2;0,8) [0,0-2,7] ng SP-D pro µg Gesamtprotein. Die Untergruppen unterschieden sich

nur unwesentlich, bei zehn Patienten ohne Keim wurden 0,6 (0,1;0,9) [0,0-1,1] ng SP-D pro µg Gesamtprotein ermittelt, bei acht Patienten mit Keimen in der Lavageflüssigkeit 0,4 (0,2;0,6) [0,2-2,71] ng SP-D pro µg Gesamtprotein. Insgesamt lag p_{ges} bei 0,0304, wobei sich nach Dunn nur die Kontrollgruppe und die Patientengruppe signifikant voneinander unterschieden.

3.1.5.13 Gehalt an SP-D im Verhältnis zum Phospholipidgehalt

Es konnten Werte für 20 Kontrollen mit 3,4 (1,8;12,0) [0,2-25,4] ng SP-D pro µg Phospholipid und Werte für 18 Patienten mit 4,9 (1,0;14,6) [0,1-124,3] ng SP-D pro µg Phospholipid berechnet werden. Patienten ohne Keimnachweis zeigten 1,5 (0,9;33,1) [0,8-106,0] ng SP-D pro µg Phospholipid, Patienten mit Keimnachweis 9,0 (2,2;13,3) [0,1-124,3] ng SP-D pro µg Phospholipid. Berechnet über alle vier Gruppen nach Kruskal-Wallis war p_{ges} gleich 0,8478.

3.1.5.14 Bindungsfähigkeit des SP-D an Maltose

Zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit von SP-D an Maltose war der Einsatz einer definierten, nicht zu kleinen Proteinmenge notwendig. Daher konnten nur Proben mit entsprechend hohem SP-D Gehalt berücksichtigt werden, von denen ausreichende Mengen an Lavageflüssigkeit zur Verfügung standen. Messungen konnten deshalb nur bei fünf Kindern der Kontrollgruppe und neun Kindern der Patientengruppe (sechs davon mit Keimbefall) durchgeführt werden. Alle Werte wurden als Prozentwerte angegeben und auf den Median der Kontrollgruppe bezogen. Gemessen wurden 100,0 (68,5;121,6) [21,1-324,8] % in der Kontrollgruppe, 65,8 (51,6;307,2) [17,1-357,7] % in der Patientengruppe, 141,9 (93,1;235,3) [44,3-328,7] % in der Untergruppe ohne Keimbefall und 64,1 (38,0;321,7) [17,1-357,7] % in der Untergruppe mit Keimbefall. Der Kruskal-Wallis-Test über alle vier Gruppen ergab mit p=0,9703 keine Signifikanzen, ebensowenig der Test nach Dunn.

3.1.5.15 Bindungsfähigkeit des SP-D an Pseudomonas aeruginosa

Bei 14 Kontrollproben und bei 14 Patientenproben konnte die Bindungsfähigkeit des SP-D an Pseudomonas aeruginosa gemessen werden. Auch in diesem Fall wurden alle Messwerte als Prozentwerte angegeben und auf den Median der Kontrollgruppe bezogen. Die Bindungsfähigkeit lag in der Patientengruppe mit 344,7 (39,6;444,9) [0,0-990,1] % im Median zwar höher als in der Kontrollgruppe mit 100,0(69,9;162,0) [52,3-265,2] %, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Die sieben Patienten mit Keimnachweis in der BALF wurden mit 343,7 (140,5;729,9) [18,8-990,1] % gemessen, die sieben Patienten ohne Keimnachweis mit 345,8 (68,6;564,9) [0,0-741,7] %. Auch zwischen den Untergruppen gab es keine signifikanten Unterschiede, p_{ges} lag bei 0,2374.

3.1.5.16 Gehalt an SP-B

Was den Gehalt an Surfactantprotein B betrifft, so konnten zwar alle 48 Proben gemessen werden, signifikante Unterschiede waren jedoch nicht nachweisbar (p_{ges}=0,4686). Mit 189,9 (147,9;209,3) [40,8-418,4] ng/ml wurden die Kontrollen gemessen, mit 194,0 (163,0;265,9) [125,7-646,8] ng/ml die Patienten. Im Falle der zehn Patienten ohne Keimnachweis ergaben sich 185,9 (163,0;239,5) [125,7-620,1] ng/ml, bei den zehn Patienten mit Keimnachweis in der Lavageflüssigkeit 214,3 (153,2;313,7) [128,6-646,8] ng/ml.

3.1.5.17 Gehalt an SP-B im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt

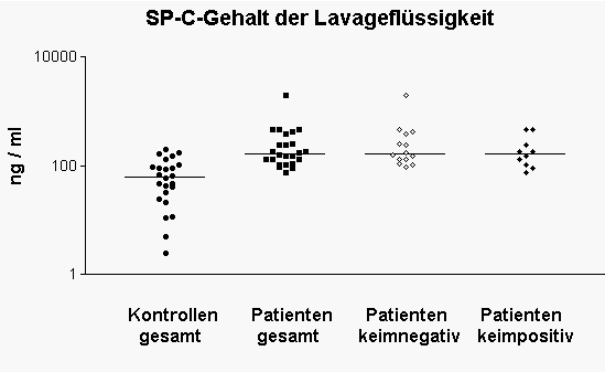
Nach Bildung der Quotienten aus SP-B-Gehalt und Gesamtprotein zeigten sich signifikante Unterschiede im Test nach Kruskal-Wallis, mit dem ein p_{ges} von 0,0021 errechnet wurde. Die Kontrollgruppe ergab 5,8 (3,4;6,9) [1,6-22,6] ng SP-B pro µg Gesamtprotein, die Patientengruppe 2,6 (0,5;4,0) [0,1-8,8] ng SP-B pro µg Gesamtprotein. In der Untergruppe der Patienten ohne Keimnachweis wurden 1,8 (0,3;5,6) [0,1-8,8] ng SP-B pro µg Gesamtprotein errechnet, in der Untergruppe der Patienten mit Keimen in der Lavageflüssigkeit 2,9

(0,9;4,8) [0,6-8,1] ng SP-B pro µg Gesamtprotein. Im Test nach Dunn unterschieden sich die Patienten mit $p<0,01$ von den Kontrollen, das gleiche galt aber auch für die Untergruppe der Patienten ohne Keimnachweis.

3.1.5.18 Gehalt an SP-B im Verhältnis zum Phospholipidgehalt

Auch der Quotient aus dem SP-B-Gehalt und dem Phospholipidgehalt wurde gebildet. Hier konnten Werte für alle 24 Patienten und 21 Kontrollen berechnet werden. Signifikante Differenzen zeigten sich bei einem p_{ges} von 0,3357 nicht. Die berechneten Werte waren 24,8 (14,6;43,8) [9,6-64,1] ng SP-B pro µg Phospholipid bei den Kontrollen und 17,1 (8,3;34,7) [1,6-380,1] ng SP-B pro µg Phospholipid bei den Patienten. In der Patientengruppe der 14 Kinder ohne Keimnachweis lagen die Ergebnisse mit 10,5 (8,2;32,6) [2,7-91,3] ng SP-B pro µg Phospholipid nicht signifikant unter den Ergebnissen der Patientengruppe der zehn Kinder mit Keimnachweis in der Lavageflüssigkeit, bei denen 26,7 (7,3;42,8) [1,6-380,1] ng SP-B pro µg Phospholipid errechnet wurden.

3.1.5.19 Gehalt an SP-C



Der Gehalt an Surfactantprotein C wurde bei allen 48 Proben gemessen und war bei den Patienten signifikant erhöht, p_{ges} war kleiner als 0,0001. Bei den Kontrollen ergaben die Messungen 62,1 (28,3;98,8) [2,5-200,2] ng/ml, bei den Patienten dagegen 164,0 (119,1;319,8) [75,6-1954,6] ng/ml. Zwischen den Untergruppen der Patienten konnten keine wesentlichen Unterschiede nachgewiesen werden. Bei den 14 Patienten ohne Keimnachweis wurden 164,0 (119,1;402,3) [94,5-1954,6] ng/ml gemessen, bei den zehn Patienten mit Keimnach-

weis 164,7 (97,1;346,7) [75,6-472,9] ng/ml. Im Test nach Dunn unterschieden sich auch beide Untergruppen der Patienten unabhängig voneinander signifikant von den Kontrollen.

3.1.5.20 Gehalt an SP-C im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt

Auch beim SP-C wurde der Quotient aus Einzelprotein und Gesamtprotein gebildet. Dabei zeigten sich in diesem Fall keine deutlichen Unterschiede, p_{ges} lag mit 0,9316 entsprechend hoch. Bei den 24 Kontrollen ergaben die Berechnungen 1,8 (1,1;2,6) [0,2-4,4] ng SP-C pro µg Gesamtprotein, bei den 24 Patienten 1,2 (0,8;3,1) [0,1-5,7] ng SP-C pro µg Gesamtprotein. 1,5 (0,5;3,9) [0,1-5,7] ng SP-C pro µg Gesamtprotein wurden bei den 14 Patienten ohne Keimnachweis errechnet, 1,8 (1,3;3,1) [0,3-4,9] ng SP-C pro µg Gesamtprotein bei den zehn Patienten mit Keimnachweis in der Lavageflüssigkeit.

3.1.5.21 Gehalt an SP-C im Verhältnis zum Phospholipidgehalt

SP-C wurde auch zum Phospholipidgehalt ins Verhältnis gesetzt und bei 21 Kontrollen 7,2 (3,5;15,3) [0,7-52,3] ng SP-C pro µg Phospholipid und bei 24 Patienten 15,2 (5,8;27,0) [1,2-434,0] ng SP-C pro µg Phospholipid berechnet. Die Berechnungen ergaben 13,0 (5,8;66,2) [2,4-390,9] ng SP-C pro µg Phospholipid im Falle der 14 Patienten ohne Keimnachweis und 17,2 (4,9;38,7) [1,2-434,0] ng SP-C pro µg Phospholipid bei den zehn Patienten mit Keimnachweis in der Lavageflüssigkeit. Signifikante Unterschiede konnten mit p_{ges} von 0,1530 nicht festgestellt werden.

3.2 Dünnschichtchromatographie und SDS-Gelelektrophorese des SP-C

Zur Austestung der Darstellung des SP-C mittels Dünnschichtchromatographie und SDS-Gelelektrophorese wurden Proben von Patienten aus der Vorversuchsgruppe verwendet, da es sich bei diesen Versuchen um in unserem Labor noch nicht etablierte Verfahren handelte.

3.2.1 Darstellung des SP-C mittels Dünnschichtchromatographie

3.2.1.1 Grundsätzliche Darstellbarkeit von Standard und Proben

Im ersten Versuch (DC 1) wurden 50, 100, 200 und 300 ng r-SP-C als Standard in einer Konzentration von 12,29 ng/µl und jeweils 10 und 20 µl der Proben 2 und 5, entsprechend den LA-Fraktionen aus 400 und 800 µl bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit, eingesetzt.

Beide Standards und eine der Proben zeigten deutliche, nicht proportionale Signale.

3.2.1.2 Reproduzierbarkeit des Standards, Darstellbarkeit weiterer Proben

Zweimal 50 und 200 ng r-SPC-Standard wurden in einer Konzentration von 12,29 ng/µl eingesetzt, wobei der r-SP-C-Standard dazu zweimal getrennt hergestellt wurde. Dazu wurden 10 und 20 µl der Proben 1, 6 und 7 auf die zweite HPTLC-Platte (DC 2) aufgetragen, was jeweils den LA-Fraktionen aus 400 und 800 µl der drei Proben entsprach.

Die Entwicklung ergab wiederum schwache Probensignale und deutliche Standardsignale, deren Intensitäten jedoch nicht proportional zur Proteinmenge waren.

3.2.1.3 Sensitivität bei der Darstellung des Standards und der Proben

Zur Austestung der Sensitivität wurden auf der dritten HPTLC-Platte (DC 3) nun 1, 3, 7,5, 10 und 30 ng r-SP-C-Standard in einer Konzentration von 0,5 ng/µl eingesetzt. Die LA-Frak-

tionen aus 40 und 120 µl Lavageflüssigkeit der Probe 3 wurden in 10 bzw. 30 µl gelöst aufgetragen, die LA-Fraktion aus 400 µl Lavageflüssigkeit der Probe 4 in 100 µl gelöst.

Zur Darstellung kamen keine Standards mit weniger als 30 ng rekombinantem-SP-C.

Die vierte HPTLC-Platte (DC 4) wurde unbrauchbar und deshalb nicht ausgewertet.

3.2.1.4 Abhängigkeit von der Belichtungszeit des Röntgenfilmes

Von der fünften HPTLC-Platte (DC 5) wurden vier Röntgenfilme mit 1, 2, 8 und 30 Minuten Belichtungszeit angefertigt. Als Standard wurden diesmal 10, 30, 100 und 300 ng r-SP-C in einer Konzentration von 5 ng/µl aufgetragen. Von der Proben 3 und 4 wurden jeweils LA-Fraktionen aus 120 und 600 µl Lavageflüssigkeit in 6 bzw.30 µl gelöst. Zusätzlich wurden 120 µl der Probe 3 unter Zusatz von 100 ng r-SP-C und 600 µl der Probe 4 unter Zusatz von 300 ng r-SP-C aufgetragen. Deutliche Signale zeigten sich nur bei Zusatz von r-SP-C.

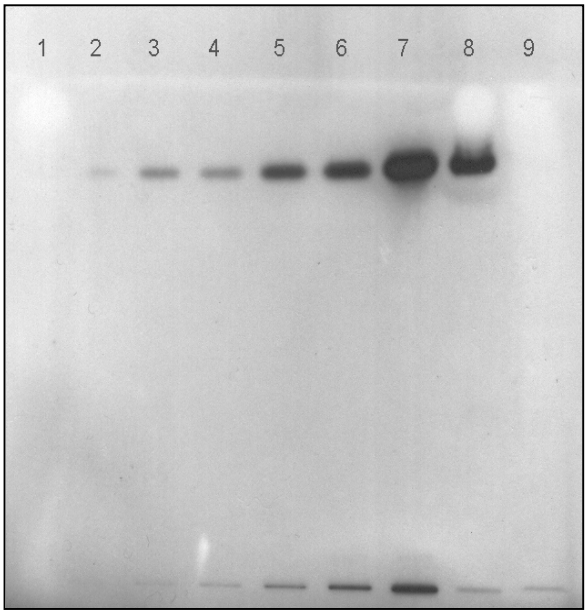
Nach 1, 8 und 30 Minuten wurden jeweils 100, 30 und 10 ng r-SP-C sichtbar.

3.2.1.5 Reproduzierbarkeit des Standards in verschiedenen Konzentrationen

Der r-SP-C-Standard wurde auf der sechsten HPTLC-Platte (DC 6) in zwei Konzentrationen verwendet, um sich der optimalen Konzentration annähern zu können. 5, 15 und 50 ng Standard wurden in einer Konzentration von 2 ng/µl aufgetragen, 15, 50 und 150 ng Standard in einer Konzentration von 5 ng/µl. Von den Proben 2, 5 und 8 wurden jeweils LA-Fraktionen aus 1200 µl Lavageflüssigkeit gelöst in 30µl aufgetragen, um so ein deutlicheres Ergebnis zu erzielen. Die Probe 3 kam deutlich zur Darstellung und lag in der Intensität zwischen 50 und 150 ng r-SP-C, die Proben 5 und 8 zeigten hingegen keine eindeutigen Signale.

Die Standards zeigten kräftige Signale, die bei gleicher Proteinmenge in verschiedenen Konzentrationen in der Signalintensität durchaus vergleichbar waren.

DC 6 nach 8 min Belichtungszeit unter Angabe von Bahn und aufgetragenem Material:



1 Probe 8 (entsprechend 1,2 ml BALF)

2 Standard (5 ng; Konzentration 2 ng/µl)

3 Standard (15 ng; Konzentration 5 ng/µl)

4 Standard (15 ng; Konzentration 2 ng/µl)

5 Standard (50 ng; Konzentration 5 ng/µl)

6 Standard (50 ng; Konzentration 2 ng/µl)

7 Standard (150 ng; Konzentration 5 ng/µl)

8 Probe 2 (entsprechend 1,2 ml BALF)

9 Probe 5 (entsprechend 1,2 ml BALF)

3.2.1.6 Vergleichbarkeit der Proben bei Abgleich der Phosphatmengen

Um die aufgetragenen Probenmengen besser vergleichbar zu machen, wurden die LA-Fraktionen der Proben 2, 3, 4, 5 und 7 auf der siebten HPTLC-Platte (DC 7) auf einen Phosphatgehalt von 500 ng abgeglichen, die Probe 6 auf 250 ng Phosphat. Als Standard wurden 5, 15 und 50 ng r-SP-C in einer Konzentration von 2 ng/µl aufgetragen.

Der Abgleich der Phosphatmengen erbrachte keine Verbesserung der Ergebnisse.

3.2.1.7 Wiederauffindbarkeit zugesetzter Proteinmengen

Auf der achten HPTLC-Platte (DC 8) wurden 1,5 und 5 ng r-SP-C in einer Konzentration von 0,5 ng/µl aufgetragen und 5, 15 und 50 ng r-SP-C in einer Konzentration von 2 ng/µl. Die zu messenden Proben 8, 101, 102 und 105 wurden auf eine Phosphatkonzentration von 1 µg pro 30 µl abgestimmt und jeweils 30µl aufgetragen. Um eine eventuelle Beeinflussung der Reaktion mit dem SP-C der Proben durch andere Inhaltsstoffe auszuschließen, wurden der Probe 8 20 ng r-SP-C zugesetzt und später versucht, diese bei der Auswertung wiederzufinden. Nach der Belichtung (3, 10 und 30 Minuten) zeigten alle Proben und die

Standards von 15 und 50 ng deutliche Signale, nicht jedoch der 1,5 und der 5 ng Standard. Nach 30 Minuten Belichtungszeit erschien der 5 ng-Standard, der in einer Konzentration von 2 ng/µl aufgetragen worden war etwas intensiver als der mit 0,5 ng/µl. Die Probe 8 (mit 20 ng r-SP-C) zeigte zwischen 15 und 50 ng r-SP-C.

Zugesetztes r-SP-C wurde in einer vorher signalfreien Probe gut wiedergefunden.

3.2.1.8 Vergleich verschiedener Plattenchargen

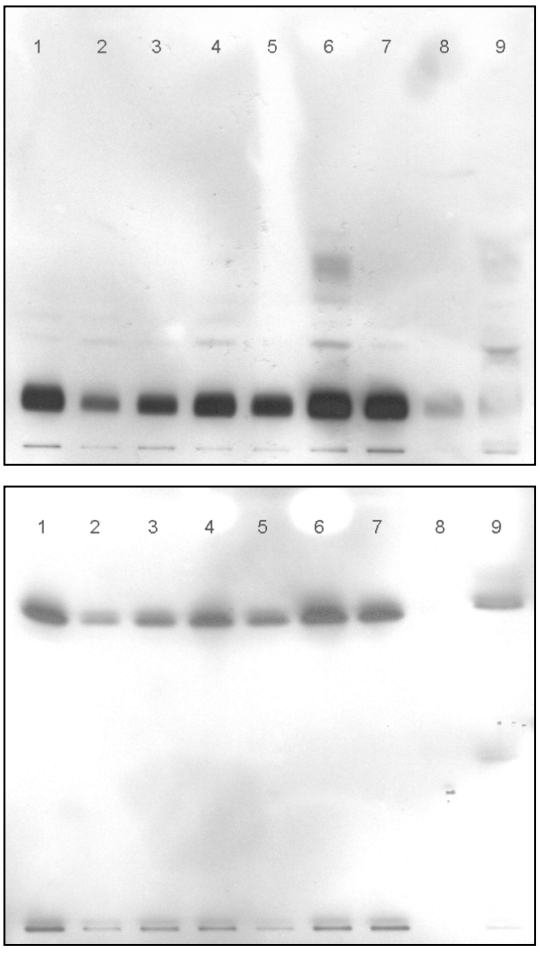
Die ersten acht HPTLC-Platten stammten der Charge 64 des Herstellers Merck, die neunte Platte (DC 9) der Charge 74, die zehnte Platte (DC 10) der Charge 54. Beide Platten wurden gleichermaßen bearbeitet und entwickelt. Unter der Annahme, dass die SP-C-Konzentration in den Proben möglicherweise zu gering für eindeutige Signale und diese bei Alveolarproteinose unter Umständen erhöht sei, wurden auf DC9 und DC10 auch Proben der LA-Fraktion eines Patienten mit Alveolarproteinose (AP) in Mengen, die 13,6 bzw. 136 µl Lavageflüssigkeit entsprachen aufgetragen. Zusätzlich wurde noch Material der Probe 8 in einer Menge entsprechend 345 µl Lavageflüssigkeit aufgetragen. Diese Probe war zuvor mit 40 ng r-SP-C versetzt worden. Da nach DC 8 eine gewisse Konzentrationsabhängigkeit des Signals vermutet werden konnte, wurden bei DC 9 und DC 10 als Standard nun 5 und 10 ng r-SP-C in einer Konzentration von 1 ng/µl eingesetzt, 10 und 20 ng in einer Konzentration von 2 ng/µl und 20 und 50 ng in einer Konzentration von 5 ng/µl. Die Platte aus der Charge 74 zeigte nach gleicher Belichtungszeit eine intensivere Darstellung der Banden, allerdings auch ein deutlich stärkeres Hintergrundsignal. Auffällig waren auch die Unterschiede in der Laufstrecke der Proteine auf den Platten, da die Front des Laufmittels in beiden Fällen die Plattenoberkante erreicht hatte. Das Signal des auf 1 ng/µl konzentrierten Standards war bei 10 ng deutlich schwächer als das des 10 ng Standards mit 2 ng/µl, welches sich bei 20 ng jedoch kaum vom 20 ng Standard mit 5 ng/µl unterschied. Interessant waren auch die Zwischenbanden, die sich auf der Platte DC 9 intensiv zwischen

dem Auftragsort und den SP-C-Banden darstellten. Die Proben stellten sich auf beiden Platten mit unterschiedlichem Bandenmuster dar. Auf der Platte DC 10 war der Auftrag der Probe AP in unterschiedlicher Konzentration aus dem Ergebnis nicht nachvollziehbar.

Die Ergebnisse der Platten aus verschiedenen Chargen waren sehr unterschiedlich.

3.2.1.9 Haltbarkeit des Standards bei wiederholtem Tiefgefrieren

Die Platte DC 11 kam aus der Charge 54, die Platte DC 12 aus der Charge 64. In einer Konzentration von 1 ng/µl wurden 30 ng, in einer Konzentration von 2 ng/µl 30 und 60 ng r-SP-C aufgetragen. Ebenso wurde mit einem r-SP-C-Standard verfahren, der zuvor mehrfach tiefgefroren und aufgetaut worden war. Aus einem bisher ungeöffneten Röhrchen wurden 60 ng r-SP-C in einer Konzentration von 2 ng/µl aufgetragen. Als Proben wurden AP 1 entsprechend 13,6 µl und AP 10 entsprechend 136 µl Lavageflüssigkeit eingesetzt. Die Proteinbanden auf DC 12 waren insgesamt wesentlich weiter gelaufen.



Bei den gezeigten Abbildungen handelt es sich:

- oben um eine Platte der Charge 54 (DC 11) und
- unten um eine Platte der Charge 64 (DC 12).

Bahn: aufgetragenes Material:

1 Standard (60ng; 2 ng/µl; bisher ungeöffnet)

2 Standard (30ng; 1 ng/µl mehrfach aufgetaut)

3 Standard (30ng; 1 ng/µl einfach aufgetaut)

4 Standard (30ng; 2 ng/µl mehrfach aufgetaut)

5 Standard (30ng; 2 ng/µl einfach aufgetaut)

6 Standard (60ng; 2 ng/µl mehrfach aufgetaut)

7 Standard (60ng; 2 ng/µl einfach aufgetaut)

8 Probe AP1 entsprechend 13,6 µl BALF

9 Probe AP10 entsprechend 136 µl BALF

Wieder zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Resultate von der Plattencharge. Wiederholtes Tiefgefrieren hatte keinen wesentlichen Einfluss auf das Ergebnis.

3.2.2 Darstellung des SP-C mittels eindimensionaler Gelelektrophorese

3.2.2.1 Untersuchung der grundsätzlichen Darstellbarkeit von SP-C

Bei der ersten SDS-PAGE wurde ein Marker für niedrige Molekulargewichte (LMW) und ein Marker für sehr niedrige Molekulargewichte (MMW) mit eingesetzt. Als ersten Standard (3W) wurden 4,9 µl r-SP-C-Lösung (entsprechend 3µg r-SP-C) in 150 µl denaturierendem Probenpuffer gelöst. Der zweite Standard (3T) wurde entsprechend vorbereitet, jedoch wurde die Flüssigkeit aus der r-SP-C-Lösung vor der Lösung in denaturierendem Probenpuffer abgedampft. Darüber hinaus wurden 10 µl des Standards 3T mit 90 µl denaturierendem Probenpuffer verdünnt und so zum dritten Standard ($3T_{1/10}$). Die LA-Fraktion aus 1 ml Lavageflüssigkeit eines Patienten mit Alveolarproteinose wurde ebenfalls in denaturierendem Probenpuffer (150 µl) gelöst und als zweite Probe nochmals mit denaturierendem Probenpuffer auf die halbe Konzentration verdünnt. Das SDS-Gel wurden nun spiegelbildlich mit jeweils 20 µl der Standards und Proben bestückt und die Elektrophorese durchgeführt. Anschließend wurde das geteilt. Von einer Hälfte wurde eine Silberfärbung angefertigt, bei der anderen ein Proteintransfer auf eine mit Milchpulver (5% in TBS) geblockte NC-Membran durchgeführt. Standards, Proben und Gewichtsmarker ließen sich in der Silberfärbung gut darstellten.

Nach der Immundetektion konnte zunächst kein Signal nachgewiesen werden.

3.2.2.2 Untersuchung zu Probenpuffer, Transferzeit und Proteintransit

Das Gel wurde achtmal mit jeweils 20 µl des nach Herstellervorschrift aufbereiteten Molekulargewichtsmarkers (MMW) und 133 ng r-SP-C in 20 µl denaturierendem Probenpuffer

bestückt. Der Probenpuffer wurde jeweils viermal mit und viermal ohne SDS verwendet. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in vier Streifen geschnitten. Der Proteintransfer wurde 60 bzw. 90 Minuten lang jeweils mit und ohne SDS im Probenpuffer auf zwei aufeinanderliegende NC-Membranen durchgeführt. Die Immundetektion erfolgte bei jeweils vier Streifen beider Membranen nach Blockung mit Milchpulver (5% in TBS), bei den anderen mit Fischgelatine (3 % in PBS). Nach einer Transferzeit von 60 Minuten waren auf den Gelstreifen nach der Silberfärbung noch deutliche Schwärzungen der Proteinbanden zu erkennen, nach 90 Minuten jedoch kaum noch Proteine auf den Gelstreifen nachweisbar. Die Signale waren unter Verwendung von SDS deutlich stärker, von der Tranferzeit kaum beeinflusst und auf den gelnahen Membranen deutlich stärker als auf den Membranen der zweiten Schicht.

Auf den mit Milchpulver entwickelten Membranen zeigte sich kein Signal, sonst waren die r-SP-C-Banden bei starkem Hintergrundsignal jeweils deutlich sichtbar.

3.2.2.3 Untersuchung der Verwendbarkeit verschiedener Membranen

Es wurden zwei Gele angefertigt und mit 20µl des Molekulargewichtsmarkers (MMW), Lösungen aus 167 bzw. 20 ng r-SP-C in 20 µl denaturierendem Probenpuffer, einer Lösung aus 10 ng r-SP-C in 10 µl denaturierendem Probenpuffer, einer Lösung aus 20 ng r-SP-C in 10 µl denaturierendem Probenpuffer, einer Lösung aus 400 ng Alveofact in 20 µl Probenpuffer mit und ohne Mercaptoethanol und einer Probe aus 68 µl Lavageflüssigkeit eines Patieten mit Alveolarproteinose in 15µl Puffer beladen. Nach der Elektrophorese der beiden Gele wurde der Proteintransfer jeweils 60 und 90 Minuten lang auf eine vorher in Methanol gespülte und in Blottpuffer äquilibrierte PVDF-Membran und eine NC-Membran durchgeführt.

Die Beschichtung der PVDF-Membran wurde an der Stelle des Alveofact-Transfers in weiten Bereichen abgelöst und die PVDF-Membran damit unbrauchbar.

3.2.2.4 Untersuchung der Bedeutung von Zwischengel und Transferzeit

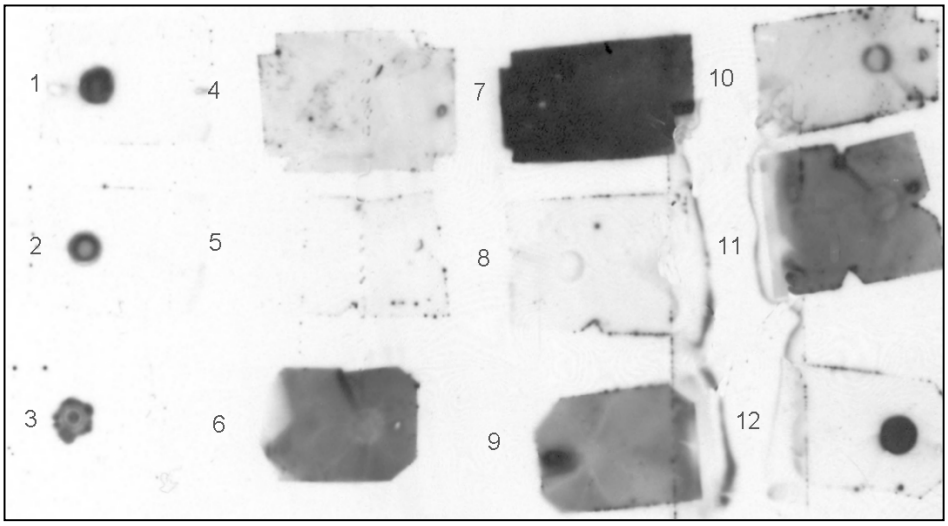
Neben einem SDS-Polyacrylamid-Gel mit Zwischengel wurde nun auch ein Polyacrylamid-Gel ohne Zwischengel angefertigt. Aufgetragen wurden jeweils sechsmal 100 ng r-SP-C-Standard in 20 µl Puffer und sechsmal 40 µg Alveofact in 20 µl Puffer. Nach der Elektrophorese wurde der Proteintransfer auf mit Fischgelatine (3 % in PBS) geblockte NC-Membranen durchgeführt. Bei den sechs Streifen des Gels mit Zwischengel wurde 45, 90, 135, 210, 300 und 420 Minuten lang transferiert, bei den sechs Streifen des Gels ohne Zwischengel 17, 30, 52, 90, 150 und 275 Minuten lang. Wieder erfolgte danach eine Silberfärbung der Gelstreifen und eine Immundetektion der NC-Membranen. Obwohl mittels der Silberfärbung bei zunehmender Transferzeit eine (wenn auch nicht linear) abnehmende Proteinmenge in den Gelen festgestellt werden konnte, war nach der Immundetektion nichts als ein starkes Hintergrundsignal zu erkennen. Anhand der Silberfärbung konnte festgestellt werden:

Die einzelnen Banden waren im SDS-Polyacrylamid-Gel mit Zwischengel deutlich besser abgegrenzt als dies beim einfachen SDS-Polyacrylamid-Gel der Fall war.

3.2.2.5 Untersuchung der Block- und Detektionspuffer der Immundetektion

Nun wurden auf zwölf kleinen NC-Membranstreifen jeweils 50 ng r-SP-C aufgetragen. Vier wurden in Fischgelatine (3 % in PBS), vier in Milchpulver (5 % in TBS) und vier in BSA (2 % in PBS) jeweils 150 Minuten lang geblockt. Sechs Membranen wurden danach mit dem r-SP-C-Primär-Antikörper 1:10000 in TBS mit 1 % BSA oder in PBS mit 0,5 % BSA über Nacht bei 4 °C inkubiert, die anderen Membranen in einer Probe aus r-SP-C-Blut in einer Konzentration von 1:1000 in Milchpulver (5 % in TBS) oder TBS. An Sekundär-Antikörpern, Entwicklung und Belichtung der Röntgenfilme wurde nichts geändert. Die mit r-SP-C-Blut inkubierten Membranen erbrachten keine brauchbaren Ergebnisse.

Bei Verwendung des Primär-Antikörpers mit 1 % BSA in TBS war das Signal vom Blockprotein nahezu unabhängig (Nr. 1, 2 und 3). Mit 0,5 % BSA in PBS war bei der in BSA in PBS geblockten Membran ein sehr deutliches Signal zu erkennen (Nr. 12).

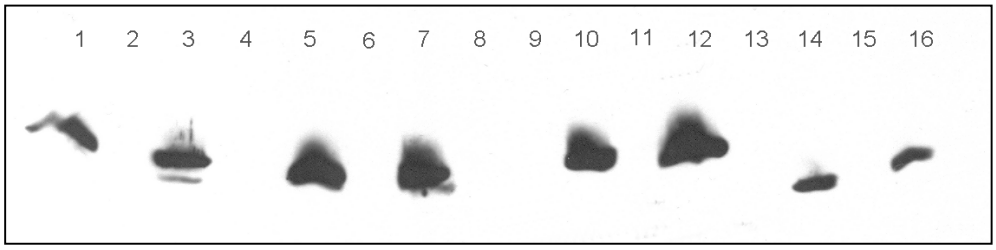


Nr.:	Blockpuffer:	Primär-Antikörper und Probenpuffer:
1	Fischgelatine (3 % in PBS)	r-SP-C-Primär-Antikörper 1:10000 in TBS mit 1 % BSA
2	Milchpulver (5 % in TBS)	r-SP-C-Primär-Antikörper 1:10000 in TBS mit 1 % BSA
3	BSA (2 % in PBS)	r-SP-C-Primär-Antikörper 1:10000 in TBS mit 1 % BSA
4	Fischgelatine (3 % in PBS)	r-SP-C-Blut (1:1000) in Milchpulver (5 % in TBS)
5	Milchpulver (5 % in TBS)	r-SP-C-Blut (1:1000) in Milchpulver (5 % in TBS)
6	BSA (2 % in PBS)	r-SP-C-Blut (1:1000) in Milchpulver (5 % in TBS)
7	Fischgelatine (3 % in PBS)	r-SP-C-Blut (1:1000 in TBS)
8	Milchpulver (5 % in TBS)	r-SP-C-Primär-Antikörper 1:10000 in PBS mit 0,5 % BSA
9	BSA (2 % in PBS)	r-SP-C-Blut (1:1000 in TBS)
10	Fischgelatine (3 % in PBS)	r-SP-C-Primär-Antikörper 1:10000 in PBS mit 0,5 % BSA
11	Milchpulver (5 % in TBS)	r-SP-C-Blut (1:1000 in TBS)
12	BSA (2 % in PBS)	r-SP-C-Primär-Antikörper 1:10000 in PBS mit 0,5 % BSA

3.2.2.6 Untersuchung des Einflusses der Transferzeit

In vier Bereichen des Harnstoff-Gels wurden je vier Geltaschen mit 10 µl eines in Probenpuffer aufbereiteten Molekulargewichtsmarkers (ULR), 200 ng r-SP-C in 10 µl Probenpuffer, 200 µg Alveofact in 10 µl Probenpuffer und r-SP-C-Surfactant (entsprechend einer Menge von 10 µg Phospholipiden) in 10 µl Probenpuffer eingesetzt. Nach der Elektrophorese wurde der Proteintransfer auf eine in PBS (2% BSA) geblockte NC-Membran durchgeführt. Die vier Bereiche des Gels wurden geteilt und der Proteintransfer 5, 60, 180 oder 960 Minuten lang durchgeführt. Die Immundetektion erfolgte mit einem in PBS mit 0,5 % BSA gelösten Primär-Antikörper. Deutliche Signale waren bei r-SP-C-Standard und r-SP-C-Surfactant erkennbar.

Transferzeiten zwischen 60 und 180 Minuten ergaben die besten Ergebnisse.

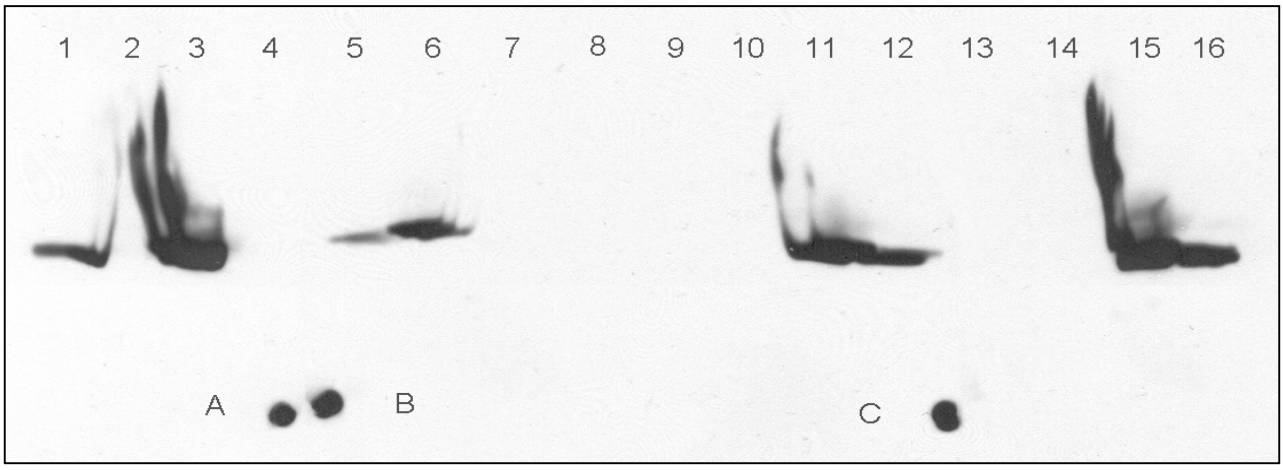


Nr.:	Transferzeit:	Material:	Nr.:	Transferzeit:	Material:
1	960 min	r-SP-C-Surfactant	9	60 min	Marker
2	960 min	Alveofact	10	60 min	200 ng r-SP-C
3	960 min	200 ng r-SP-C	11	60 min	Alveofact
4	960 min	Marker	12	60 min	r-SP-C-Surfactant
5	960 min	r-SP-C-Surfactant	13	5 min	Marker
6	180 min	Alveofact	14	5 min	200 ng r-SP-C
7	180 min	200 ng r-SP-C	15	5 min	Alveofact
8	180 min	Marker	16	5 min	r-SP-C-Surfactant

3.2.2.7 Untersuchung der Verluste beim Proteintransfer

Auch diesmal wurde ein SDS-Polyacrylamid-Harnstoff-Gel verwendet, in vier Bereiche unterteilt und die Geltaschen mit jeweils 10 µl Probenpuffer gefüllt. Darin waren ein Molekulargewichtsmarker (ULR), 30 bzw. 120 ng r-SP-C, 200 µg Alveofact, und eine Probe aus 33 µl Lavageflüssigkeit eines Patienten mit Alveolarproteinose enthalten. Der Proteintransfer auf vier NC-Membranen erfolgte je nach Bereich 0, 30, 60, und 120 Minuten lang, gefolgt von der Silberfärbung der Gele. Dabei zeigten sich beim Marker und den r-SP-C-Standards deutliche Banden. Die Probe der Alveolarproteinose erschien undeutlich, die des Alveofacts als großflächige Schwärzung. Mit zunehmender Transferzeit verringerte sich der Proteingehalt der Gele. Um die bei Elektrophorese und Proteintransfer entstehenden Proteinverluste besser abschätzen zu können, wurden vor der anschließenden Immundetektion mit in PBS mit 0,5% BSA gelösten Primär-Antikörpern dreimal 50 ng r-SP-C (A,B und C) direkt auf die in PBS (2% BSA) geblockten NC-Membranen aufgebracht. Nach Entwicklung und Belichtung waren die r-SP-C-Kontrollen gut erkennbar. Auch im Bereich des Proteintransfers erschienen deutliche Banden, doch waren diese an den an Alveofact angrenzenden Rändern stark hochgezogen.

Durch den Proteintransfer wurden keine wesentlichen Proteinverluste verursacht.



Nr.:	Transferzeit:	Material:	Nr.:	Transferzeit:	Material:
1	60 min	30 ng r-SP-C-Standard	9	30 min	Alveolarproteinose
2	60 min	200 µg Alveofact	10	30 min	200 µg Alveofact
3	60 min	120 ng r-SP-C-Standard	11	30 min	120 ng r-SP-C-Standard
4	60 min	Alveolarproteinose	12	30 min	30 ng r-SP-C-Standard
5	10 min	30 ng r-SP-C-Standard	13	120 min	Alveolarproteinose
6	10 min	120 ng r-SP-C-Standard	14	120 min	200 µg Alveofact
7	10 min	200 µg Alveofact	15	120 min	120 ng r-SP-C-Standard
8	10 min	Alveolarproteinose	16	120 min	30 ng r-SP-C-Standard

3.2.2.8 Untersuchung mit Antikörpern gegen pro-SP-C und Tanktransfer

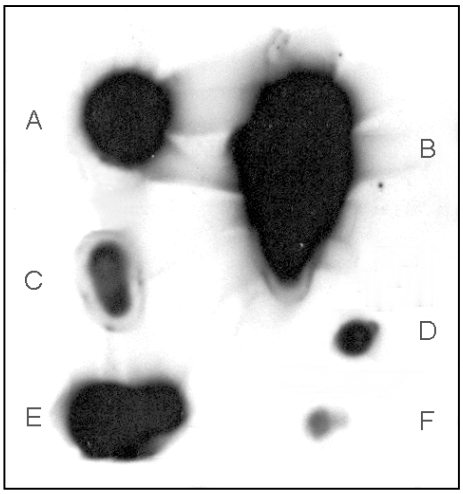
Das nun angefertigte SDS-Polyacrylamid-Gel mit Zwischengel wurde in zwei Bereiche geteilt und die Geltaschen jeweils mit 20 µl gefüllt. In jedem Bereich wurde ein Molekulargewichtsmarker, 200 µg Alveofact und 200 ng r-SP-C eingesetzt. Nach etwa einer Stunde Laufzeit wurden erneut je 200 ng r-SP-C in die entsprechenden Geltaschen eingesetzt. Nach Durchführung der Elektrophorese erfolgte der Proteintransfer diesmal im Tank, d. h. die Membranen und Filterpapiere wurden nicht nur in Blottpuffer getränkt, sondern der gesamte Proteintransfer lief 2 Stunden lang bei 60 V und 160mA in Blottpuffer ab. NC-Membranen wurden dazu auf Seite der Anode und auf Seite der Kathode eingelegt. Danach wurden die Gele einer Silberfärbung unterzogen, wonach sich deutliche Banden zeigten. Die NC-Membranen wurden daraufhin in PBS (2 % BSA) geblockt. Als Primär-Antikörper wurden einerseits r-SP-C-Antikörper, andererseits pro-SP-C-Antikörper in PBS mit 0,5 % BSA verwendet. Nach Immundetektion, ECL-Entwicklung und Filmbelichtung waren bei den mit pro-SP-C-Antikörpern inkubierten NC-Membranen nur unspezifische Bindungen und ein starkes Hintergrundsignal zu erkennen. Die r-SP-C-Banden zeigten

auch kathodenseitig ein starkes Signal, nicht jedoch die „schweren“ Banden des Molekulargewichtsmarkers, die von den pro-SP-C-Antikörpern ebenfalls unspezifisch gebunden worden waren.

Der Proteintransfer im Blottpuffer-Tank und auch die Proteindetektion mit pro-SP-C-Antikörpern erbrachten jeweils keine zufriedenstellenden Ergebnisse.

3.2.2.9 Untersuchung der Affinität von r-SP-C-Antikörpern gegenüber SP-C

Es wurden 10 bzw. 30 ng r-SP-C, zweimal 100 ng humanes SP-C und zwei Proben von Alveofact entsprechend 100 µg Phospholipid mit und ohne Zusatz von 10 ng r-SP-C nebeneinander auf eine in PBS (2 % BSA) geblockte NC-Membran aufgetragen. Die Immundetektion wurde mit r-SP-C-Primär-Antikörper in PBS mit 0,5 % BSA und dem üblichen Sekundärantikörper durchgeführt. Während schon 10 ng r-SP-C eine überdeutliche Reaktion erbrachten, wurden von 100 ng humanem SP-C lediglich schwache Signale hervorgerufen.

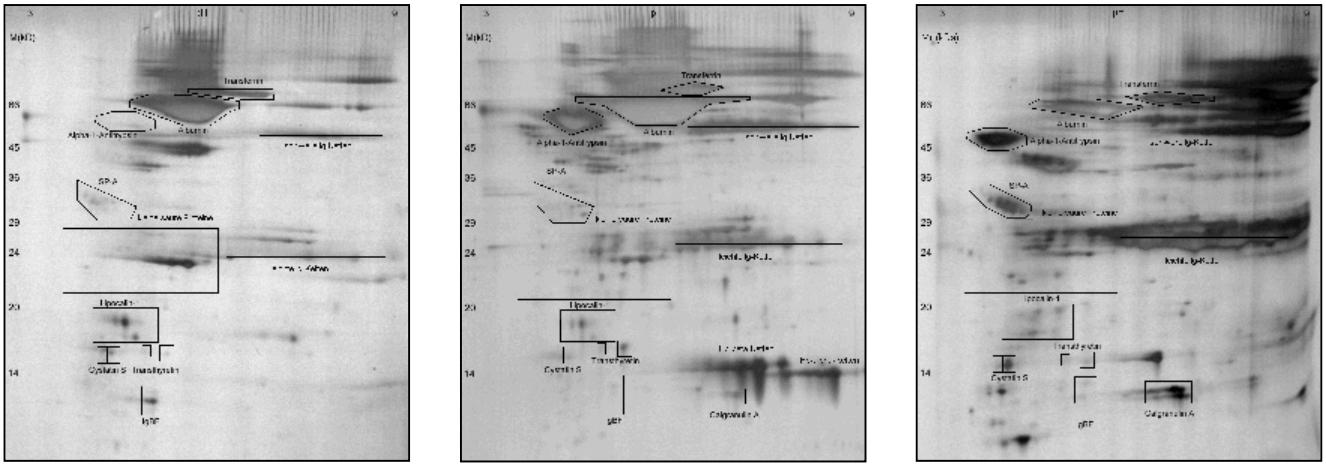


Punkt:	Material:
A	10 ng r-SP-C
B	30 ng r-SP-C
C	100 ng humanes SP-C
D	100 ng humanes SP-C
E	Alveofact (100 µg PL) + 10 ng r-SP-C
F	Alveofact (100 µg PL)

Die Affinität des r-SP-C-Antikörpers gegenüber humanem SP-C war ungenügend.

3.3 Proteinvergleich mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese

Bei der Auswertung der zweidimensionalen Elektrophorese wurde die Patientengruppe ebenfalls in zwei Untergruppen aufgeteilt, je nachdem, ob pathogene Keime in der Lavageflüssigkeit nachgewiesen werden konnten, oder nicht. So konnten auch hier die Lavageproben der Kontroll- und der Patientengruppe verglichen und dabei ein etwaiger Keimbefall berücksichtigt werden, wobei 2D-Gele von sieben Kontrollkindern und jeweils fünf Patienten mit malignen Erkrankungen, Fieber und pulmonalen Infiltraten zur Verfügung standen. Da dies für die gesamte Auswertung der zweidimensionalen Gele gilt, wurde die Anzahl der Proben in diesem Abschnitt nicht explizit erwähnt. Die Auswertung der mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese dargestellten Proteine wurde auf jene beschränkt, die zuverlässig identifiziert werden konnten. Andernfalls wurden Bereiche wie z. B. die kleinen sauren Proteine definiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 im Anhang zusammengefasst.



linke Abbildung: 2D-SDS-PAGE eines pulmonal gesunden Kindes

mittlere Abbildung: 2D-SDS-PAGE eines immunsupprimierten Kindes ohne Keimnachweis

rechte Abbildung: 2D-SDS-PAGE eines immunsupprimierten Kindes mit Keimnachweis

3.3.1 Gesamtprotein

Die Gesamtfläche der angefärbten Proteine war bei der Kontrollgruppe mit 2,0 (1,5;2,2) [1,0-2,6] % der Grundfläche zwar insgesamt etwas geringer als bei der Patientengruppe (3,4 (2,4;5,9) [0,9-9,7] %), unterschied sich mit einem p_{ges} von 0,1642 jedoch nicht signifikant von dieser, auch nicht von deren Untergruppen. Auch innerhalb der Patientengruppe war die Differenz zwischen der Gruppe mit Keim (2,9 (2,4;5,1) [0,9-6,7] %) und der ohne Keim (4,0 (2,4;6,1) [1,3-9,7] %) nicht signifikant.

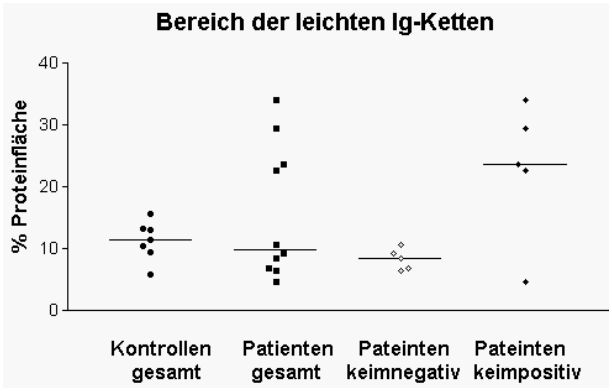
3.3.2 Albumin

Albumin (pH 5,5-6,3; 60-70 kDa) gehörte sowohl bei den Kontrollen (32,6 (28,3;40,2) [23,7-67,4] %) als auch bei den Patienten (23,1 (19,8;32,8) [7,5-58,9] %) zu den Proteinen mit dem größten Flächenanteil. Zwischen den vier Gruppen ergaben sich insgesamt keine deutlichen Unterschiede (p_{ges}= 0,0216), wohl aber innerhalb der Patientengruppe. Denn während die Patienten ohne Keim mit 35,8 (23,9;44,7) [22,3-58,9] % auf gleichem Niveau wie die Kontrollen lagen, war bei den Patienten mit Keimnachweis ein deutlicher Rückgang auf 19,4 (10,1;20,8) [7,5-23,9] % nachzuweisen. Diese beiden Untergruppen unterschieden sich im Test nach Dunn signifikant ($p<0,001$) voneinander und auch zwischen Kontrollen und Patienten mit Keim ergab Dunn's Test ein $p<0,01$.

3.3.3 Immunglobuline

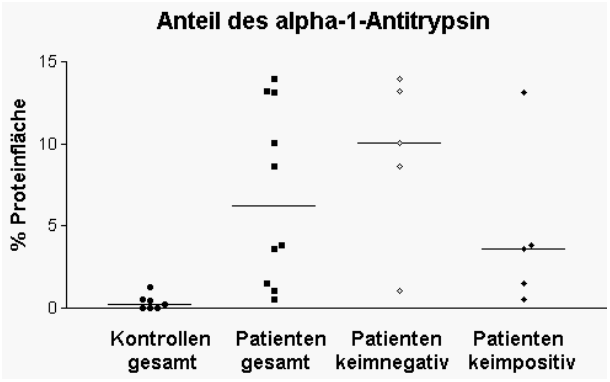
Eine weitere bedeutende Gruppe von Proteinen waren die Immunglobuline, allen voran Ig G. Die leichten Ketten (pH 6-9; 25 kDa) waren von den schweren Ketten (pH 6-9; 50 kDa) wegen des unterschiedlichen Gewichtes bei der Elektrophorese getrennt worden und konnten so auch getrennt untersucht werden. Bei den schweren Ketten konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (p_{ges}= 0,9108). Die Flächenanteile lagen um 7,7 (6,8;9,0) [3,3-12,8] % bei den Kontrollen und um 6,5 (3,8;9,8) [2,8-19,6] % bei den

Patienten. Die Patienten mit Keim unterschieden sich mit 6,8 (6,2;10,0) [2,8-19,6] % nicht wesentlich von den Patienten ohne Keim, die bei 4,1 (3,8;9,3) [3,3-14,8] % lagen.



Auch bei den leichten Ketten zeigte sich keine Signifikanz (p_{ges}= 0,2466) zwischen den Kontrollen (11,4 (9,9;13,1) [5,9-15,6] %) und den Patienten (9,9 (7,2;23,5) [4,6-34,1] %). Betrachtete man die Patientengruppe jedoch näher, so stellte sich heraus, dass das Niveau bei den Patienten mit Keimen in der BAL mit 23,7 (22,6;29.5) [4,6-34,1] % wesentlich höher lag, als dies bei den Patienten ohne Keimnachweis (8,4 (6,8;9,2) [6,4-10,6] %) der Fall war, was zwischen diesen beiden Gruppen ein p<0,001 nach Dunn ergab.

3.3.4 α-1-Antitrypsin



Ein starker Anstieg der gefärbten Fläche (p_{ges}= 0,0027). konnte im Bereich von α-1-Antitrypsin, das etwa zwischen pH 4,5 bis pH 5 mit einem Molekulargewicht von 55 kDa bis 60 kDa auftrat, nachgewiesen werden. Diese war in allen Untergruppen größer als in der Kontrollgruppe, sehr deutlich fiel der Anstieg jedoch bei den Patienten ohne Keimnachweis in der BALF aus. Während α-1-Antitrypsin bei den Kontrollen nur 0,2 (0,0;0,5) [0,0-1,3] % der Gesamtfläche einnahm, waren es bei den Patienten 6,2 (2,0;12,4) [0.6-14,0] %. Mit 10,1 (8,7;13,2) [1,1-14,0] % lag der Anteil bei Patienten ohne Keimnachweis im Vergleich zu denen mit Keimen in der BALF und 3,6 (1,5;3,8) [0,6-13,1] % α-1-Antitrypsin überdurchschnittlich hoch.

3.3.5 Transferrin

Bei Transferrin, das bei pH 6,0 bis 6,5 mit einem molekularen Gewicht von 73 bis 80 kDa auftrat, unterschieden sich die Kontrollen (5,6 (3,2;6,8) [2,3-9,5] %) weder von den Patienten insgesamt (3,5 (2,4;5,5) [1,3-9,9] %), noch von einer der Untergruppen (p_{ges}= 0,6625). Auch zwischen den Patienten mit (4,0 (2,2;4,5) [1,3-5,8] %) und denen ohne Keimnachweis (3,1 (2,9;6,1) [2,2-9,9] %) waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

3.3.6 SP-A

Beim bekanntesten und mengenmäßig bedeutendsten der Surfactantproteine, dem SP-A (pH 4,1 bis 5,0; 30 bis 37 kDa), konnten bei der planimetrischen Auswertung der 2D-Gele keine relevanten Unterschiede festgestellt werden (p_{ges}= 0,8588). Die SP-A-Fläche lag, bezogen auf die Gesamtproteinfläche, bei den Kontrollkindern bei 3,7 (1,1;6,4) [0,4-8,4] % und bei den Kindern mit malignen Erkrankungen bei 1,8 (1,2;2,2) [0,6-8,4] %. Patienten ohne Keimnachweis wurden mit 2,0 (1,0;2,1) [0,6-3,4] %, Patienten mit Keimen in der BALF mit 1,6 (1,6;2,2) [0,8-8,3] % gemessen.

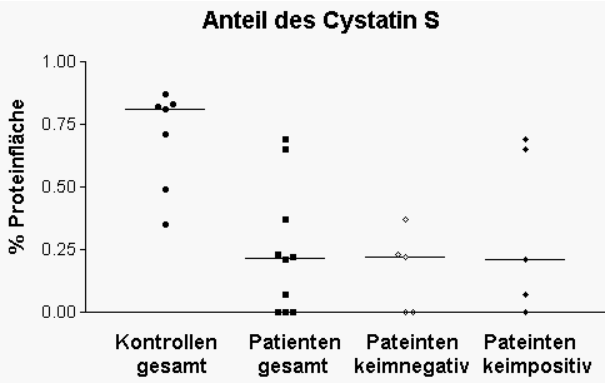
3.3.7 Transthyretin

Mit isoelektrischen Punkten bei pH 5,3 und pH 5,6 erschien Transthyretin als Doppelspot, wobei das Molekulargewicht bei etwa 14 kDa lag. Transthyretin war bei den Patienten mit 0,1 (0,0;0,3) [0,0-0,6] % deutlich gegenüber den Kontrollen (0,5 (0,4;0,6) [0,3-0,8] %) vermindert (p_{ges}= 0,0313). Zwar unterschieden sich die Patientengruppen untereinander nicht signifikant, die Gruppe mit Keimen zeigte jedoch mit 0,1 (0,0;0,1) [0,0-0,4] % deutlich verringerte Werte gegenüber der Kontrollgruppe ($p<0,01$ nach Dunn), während Transthyretin bei der Gruppe ohne Keime mit 0,2 (0,1;0,3) [0,0-0,6] % nach Dunn's Test nicht signifikant vermindert war.

3.3.8 Immunglobulin bindender Faktor

Der bei pH 5,4 und 11 kDa angetroffene Immunglobulin bindende Faktor (IgBF) zeigte bei den Patienten (0,0 (0,0;0,1) [0,0-0,3] %) eine deutliche Verminderung (p_{ges}= 0,0006). gegenüber den Kontrollen (0,8 (0,6;0,9) [0,4-1,2] %). IgBF ist sowohl bei den Patienten ohne Keimnachweis (0,0 (0,0;0,1) [0,0-0,2] %) als auch bei denen mit Keimen (0,0 (0,0;0,0) [0,0-0,3] %) signifikant verringert. Während es bei allen Kontrollen nachgewiesen werden konnte, war es nur bei drei von zehn Patienten zu erkennen.

3.3.9 Cystatin S



Auch der Cystein-Protease-Inhibitor Cystatin S erschien auf den 2D-Gelen als Doppelspot. Die isoelektrischen Punkte lagen etwa bei pH 4,9 und pH 5,1, das Molekulargewicht bei etwa 14 kDa. Bei der Isoform mit pH 4,9 (p_{ges}=0,0030) lagen die Patienten mit 0,1 (0,0;0,1) [0,0-0,3] % deutlich unter den Kontrollen mit 0,3 (0,3;0,4) [0,2-0,4] %. Die Untergruppe ohne Keimnachweis war mit 0,1 (0,0;0,1) [0,0-0,1] % stärker betroffen als die Untergruppe mit Keimen in der BALF (0,1 (0,0;0,1) [0,0-0,3] %). Im Falle der Isoform mit pH 5,1 (p_{ges}=0,0583) unterschieden sich nur die Patienten ohne Keimnachweis (0,1 (0,0;0,1) [0,0-0,3] %) im Test nach Dunn deutlich ($p<0,05$) von den Kontrollen (0,4 (0,3;0,4) [0,2-0,5] %), während die Differenzen bei den Patienten mit Keimen (0,1 (0,1;0,4) [0,0-0,6] %) und auch bei den Patienten insgesamt (0,1 (0,0;0,2) [0,0-0,6] %) nicht signifikant waren. Betrachtet man beide Isoformen des Cystatin S gemeinsam, so bleiben auch hier die Ergebnisse signifikant (p_{ges}=0,0096). Die Kontrollen lagen mit 0,8 (0,6;0,8) [0,4-0,9] % deutlich über den Patienten (0,2 (0,0;0,3) [0,0-0,7] %), auch wenn man die Gruppe mit Keimen (0,2 (0,1;0,7) [0,0-0,6] %) und die Gruppe ohne Keimnachweis (0,2 (0,0;0,2) [0,0-0,4] %) getrennt berücksichtigt.

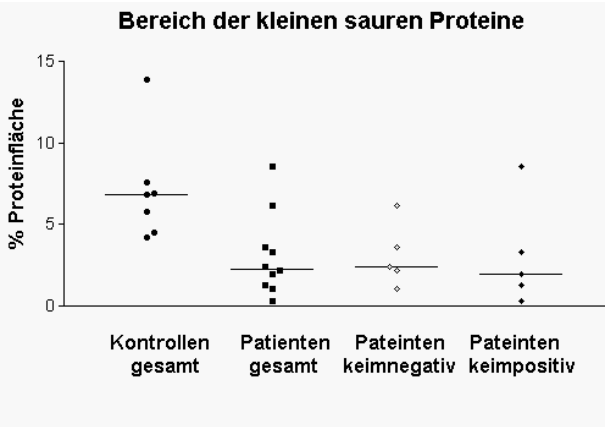
3.3.10 Lipocalin-1

Lipocalin-1 erschien auf den zweidimensionalen Gelen bei einem pH von 5,2 bis 5,5 und einem Molekulargewicht von 17,5 bis 18 kDa. Die Patientengruppe unterschied sich bei einem p_{ges} von 0,1904 mit 0,5 (0,1;1,4) [0,0-3,0] % im Falle dieses Proteins nicht wesentlich von der Kontrollgruppe mit 1,7 (1,4;2,1) [0,5-4,4] %. Auch die Untergruppe mit Keimen in der BALF zeigte mit 0,1 (0,1;1,2) [0,0-2,3] % keine Auffälligkeiten, ebensowenig die Patientengruppe ohne Keimnachweis (0,6 (0,3;1,4) [0,0-3,0] %).

3.3.11 Calgranulin

Die Betrachtung des Proteins Calgranulin erbrachte keine signifikanten Unterschiede (p_{ges}= 0,2925). Bei keinem Kind aus der Kontrollgruppe konnte Calgranulin nachgewiesen werden, entsprechende Spots waren nur bei vier Patienten zu erkennen. Die beiden Patienten mit Keimen lagen bei 0,2 % und 1,1 %, die beiden Patienten ohne Keimnachweis bei 0,1 % und 0,6 %.

3.3.12 Kleine saure Proteine



Die Gruppe der kleinen sauren Proteine, die in einen Bereich zwischen pH 3,5 und pH 6 und zwischen 22 kDa und 29 kDa eingegrenzt wurde, besteht aus vielen kleinen Proteinen, deren genaue Identität ohne weitere Untersuchungen nicht zuverlässig zu beurteilen war. Die Gesamtfläche in diesem Bereich lag bei den Patienten mit 2,3 (1,5;3,5) [0,3-8,6] % signifikant niedriger (p_{ges}= 0,0388) als bei den Kontrollen mit 6,8 (5,2;7,3) [4,2-13,9] %. Bei den Untergruppen war die Differenz zu den Kontrollen im Falle der Patienten mit Keimen

(2,0 (1,3;3,3) [0,3-8,6] %) größer als bei den Patienten ohne Keimnachweis (2,4 (2,2;3,6) [1,1-6,2] %), die sich im Test nach Dunn nicht signifikant von den Kontrollen unterschieden.

3.3.13 Hämoglobin

Im Bereich der Hämoglobin-Ketten, der etwa bei pH 6,9 bis pH 8,3 und zwischen 12 kDa und 13 kDa liegt, konnten teilweise größere Proteinmengen nachgewiesen werden. Wegen der schlechten Abgrenzbarkeit wurde hier auf eine Quantifizierung der α- und β-Ketten verzichtet.

4 Diskussion

4.1 Vergleich der Zusammensetzung der Lungenspülflüssigkeit

Die Gesamtkonzentration aller Proteine war bei den Kindern mit malignen Erkrankungen, Fieber und pulmonalen Infiltraten im Median etwa viermal so hoch wie bei den Kontrollen. Bei Patienten mit schwerer Lungenentzündung wurden von Günther et al. (28) etwa sechsfache Werte gemessen, wobei kaum Daten über den klinischen Zustand dieser Patienten vorlagen. Von allen Patienten waren die SP-A-Werte bei den Kindern mit pathogenen Keimen in der Lavageflüssigkeit am höchsten. Dieser Anstieg stellt wahrscheinlich ein regulatorisches Phänomen dar und ist Folge einer Akute-Phase-Reaktion, mit der die Aktivität der lokalen Abwehrmechanismen der Lunge gesteigert wird. In Tierexperimenten wurden erhöhte SP-A-Werte nach intratrachealer Gabe von Lipopolysacchariden oder Bakterien gefunden (48, 56, 58). Im Verlauf einer Lungenentzündung fanden Phelps et al. (50) bei Patienten mit schlechter Abwehrlage bei AIDS erhöhte SP-A-Werte, während bei immunkompetenten Patienten, wie auch in dieser Arbeit, weniger SP-A gefunden werden konnte (2, 28). In vitro wird die Expression von SP-A von mehreren Faktoren, wie z. B. Glucokortikoiden, bei unterschiedlichem Ansprechen der Gene SP-A_1 und SP-A_2 beeinflusst (53). Tierexperimentell zeigte sich ein vermehrtes Auftreten von mRNA für SP-A unter subkutanen Kortikosteroidinjektionen (14, 66). In dieser Arbeit konnten keine Unterschiede zwischen den Patienten mit und denen ohne Kortikosteroidtherapie beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass die therapeutische Verwendung von systemischen Steroiden keinen entscheidenden Einfluss auf die SP-A-Konzentration hat. Die Bindungsfähigkeit an Kohlenhydrate ist ein zentrales Charakteristikum von Kollektinen und eng mit ihren Funktionen bei der Abwehr von Bakterien verbunden (10).

Mit den durchgeführten Versuchen zur Kohlenhydrat-Bindungsfähigkeit des SP-A konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Patientengruppe ermittelt werden. Da jedoch aus technischen Gründen nur Proben mit ausreichendem Proteingehalt verwendet werden konnten und die Proben deshalb vorselektiert wurden, ist bei der Betrachtung dieser Daten besondere Vorsicht geboten. Auch die Bindungskapazität des SP-A an Bakterien vom Typ Pseudomonas aeruginosa war nicht signifikant verändert. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit gibt es keine Hinweise darauf, dass verringerte SP-A-Konzentrationen die Entfernung von Mikroorganismen aus der Lunge verschlechtern, wie dies nach Versuchen mit SP-A-Knock-out-Mäusen angenommen wurde (40, 43). Falls zukünftige Studien eine schlechtere Funktion des SP-A in entsprechenden klinischen Situationen nachweisen sollten, dann könnte z. B. eine Substitution mit rekombinantem humanen SP-A die lokale Abwehrlage in der Lunge verbessern. Auch SP-D spielt mit großer Wahrscheinlichkeit eine Rolle in der lokalen Abwehr der Lunge (10). Nach den Ergebnissen dieser Arbeit scheint jedoch weder seine Konzentration noch seine Bindungsfähigkeit an Kohlenhydrate oder Pseudomonaden in der vorliegenden klinischen Situation verändert zu sein. Deshalb wurde angenommen, dass das SP-D hier nicht reduziert und damit auch nicht wesentlich an der Entstehung einer Infektion beteiligt war. Ob in der hier vorliegenden klinischen Situation eine Steigerung der SP-D-Konzentration ausbleibt, kann nur mittels weiterer Untersuchungen geklärt werden. Zwischen der SP-D-Konzentration und der Anzahl der neutrophilen Granulozyten konnte mit $r = -0.22$ und $p = 0.33$ keine Korrelation festgestellt werden, obwohl dies für SP-D-Knock-out-Mäuse beschrieben (41) und eine veränderte Konzentration des SP-D auch bei Ratten nach Inhalation von Lipopolysacchariden festgestellt worden war (59).

Überraschenderweise war die Oberflachenaktivität des Surfactants bei den Patienten nicht reduziert, obwohl eine Zunahme der kleinen Aggregate bedeutende Veränderungen des Surfactants vermuten ließ. Auffällig war dabei, dass das Verhältnis zwischen kleinen und

großen Aggregaten bei den Patienten ohne Keimnachweis stark erhöht war, sowohl im Vergleich zu den Kontrollen, als auch zu den Patienten mit Keimnachweis. Die erhaltene Oberflächenaktivität könnte durch den beobachteten Anstieg der SP-A-Konzentration erklärt werden. Diese könnte zu einer erhöhten Widerstandsfähigkeit des Surfactant gegenüber einer Inaktivierung durch andere Proteine beitragen (67). Doch gerade die Patienten ohne Keimnachweis zeigten keinen signifikanten Anstieg der SP-A-Konzentration. Wesentlich stärker als SP-A trägt SP-B zur Erhaltung der biophysikalischen Funktionen der Lunge bei (22). Die SP-B-Konzentration war bei den Patienten jedoch nicht wesentlich verändert, der SP-B-Anteil am Gesamtprotein gerade bei den Patienten ohne Keimbefall signifikant reduziert.

Wichtiger scheint die Tatsache zu sein, dass die SP-C-Konzentration bei den Patienten dieser Arbeit deutlich erhöht war und so u. U. zur Erhaltung der Oberflächenaktivität beitragen konnte, wie dies schon in Tierversuchen und bei in-vitro-Experimenten gefunden wurde (53). Zu den Faktoren, die die Expression und Konzentration von SP-C in der reifen Lunge regeln, gehören auch TNF α, Kortikosteroide und erhöhte Konzentrationen an Sauerstoff in der Atemluft (4). Während TNF α die Transkription des SP-C zu verringern scheint (1), konnten hier erhöhte SP-C-Werte festgestellt werden. Die Konzentration des TNF α war hier jedoch nicht gemessen worden. Die Patienten dieser Arbeit waren keiner erhöhten Sauerstoffkonzentration ausgesetzt worden, doch waren acht von ihnen im Zeitraum von einer Woche vor der BAL mit systemischen Kortikosteroiden behandelt worden. Allerdings unterschieden sich diese in ihrer SP-C-Konzentration nicht von den Patienten, die keine Steroide bekommen hatten. Auch konnten keine Korrelationen zwischen den vier Surfactant-Proteinen festgestellt werden, was gut zu der tierexperimentell gewonnenen Erkenntnis passt, dass die Regulation der mRNA für SP-C unabhängig von der der anderen Proteine zu sein scheint (4).

Bei der Untersuchung des zellulären Anteils der Lavageflüssigkeit wurde festgestellt, dass die Gesamtzellzahl in der Lavageflüssigkeit der Patienten erhöht und der Anteil der Makrophagen in allen Patientengruppen deutlich zurückgegangen war. Der Anteil der Granulozyten war in der Patientengruppe, insbesondere jedoch bei den Patienten mit Keimbefall, deutlich angestiegen, was als Reaktion auf eine Infektion gedeutet werden kann. Der sehr variable, insgesamt aber gestiegene Anteil an Lymphozyten in der Lavageflüssigkeit der Patienten lässt sich wohl auf das lokale immunologische Geschehen zurückführen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Kinder, die im Rahmen einer malignen Erkrankung und deren Therapie abwehrgeschwächt sind und pulmonale Komplikationen mit Fieber und pulmonalen Infiltraten entwickeln, erhöhte Konzentrationen der Surfactantproteine A und C in der Lavageflüssigkeit aufwiesen. Die biophysikalischen Eigenschaften des Surfactant schienen bei diesen Patienten nicht verändert zu sein, obwohl eine erhöhte SA-Fraktion Veränderungen im Metabolismus des Surfactant vermuten ließ. Patienten mit pathogenen Keimen in der Lavageflüssigkeit wiesen die höchsten SP-A-Werte auf, die Fähigkeit zur Bindung an Pseudomonas aeruginosa schien jedoch kaum eingeschränkt zu sein. Dies deutet auf eine adaptiv gesteigerte lokale Abwehr unter den beschriebenen klinischen Bedingungen hin.

4.2 Dünnschichtchromatographie und Gelelektrophorese des SP-C

Vor der Entwicklung spezifischer SP-C-Antikörper waren bereits andere Methoden zur quantitativen Bestimmung des SP-C entwickelt worden. Hierbei wurde SP-C zunächst chromatographisch (57, 51) oder gelelektrophoretisch (57) isoliert und dann radiochemisch (51) oder mittels Aminosäureanalyse und Fluorescaminassay (57) quantifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte SP-C mittels Dünnschichtchromatographie und SDS- Gelelektrophorese aufgetrennt und ein Versuch zur Visualisierung mit den nun zur Verfügung stehenden Antikörpern unternommen werden. Da diese Verfahren in unserem Labor noch nicht ausgetestet worden waren, wurden hier Proben von Patienten aus der Vorversuchsgruppe verwendet. Aus den Ergebnissen der ersten Versuche konnte der Eindruck gewonnen werden, dass eine Darstellung von SP-C mittels Immundetektion nach einer durchgeführten Dünnschichtchromatographie prinzipiell möglich ist. Leider war jedoch bei einigen Proben kein Signal zu erkennen, was auf eine zu niedrige Sensitivität hindeutete. Dazu zeigte sich, dass die erzielte Signalintensität bei den Proben insgesamt gering und nicht immer proportional zur eingesetzten Menge war. Rekombinantes SP-C, das Proben zugegeben worden war, wurde jedoch mit großer Zuverlässigkeit wiedergefunden. Allerdings zeigten sich deutlich unterschiedliche Ergebnisse bei Verwendung verschiedener Plattenchargen. In niedrigen Konzentrationen unter etwa 10 ng SP-C war das Signal des Standards nicht zuverlässig reproduzierbar. Dennoch konnte, zumindest in Bezug auf den Standard, von einer zufriedenstellenden Sensitivität gesprochen werden, denn bei Van Eijk (57) war eine Detektionsgrenze von 4 µg SP-C beschrieben worden, bei Quanbar (51) eine Sensitivität von etwa 100 ng SP-C. Bei der Proteindarstellung mittels eindimensionaler Gelelektrophorese konnten Gewichtsmarker, Standards und Proben durch eine Silberfärbung gut visualisiert werden, was auf eine prinzipielle Verwendbarkeit der SDS-PAGE zur Separation des SP-C hinweist. Die beste Auftrennung der kleinen Proteine wurde, wie bei Schägger und

von Jagow (54) beschrieben, bei Verwendung eines Zwischengels errreicht, wenngleich die stark lipidhaltigen Proben auch hier zu Verwischungen neigten. NC-Membranen zeigten sich für einen Proteintransfer nach SDS-PAGE von stark lipidhaltigen Proben besser geeignet als PVDF-Membranen, da es bei letzteren teilweise zu einer Ablösung der Beschichtung kam. Die Ergebnisse der Immundetektion schienen stark vom verwendeten Blockpuffer abhängig zu sein: Erst nachdem das Milchpulver durch Fischgelatine abgelöst worden war, konnte überhaupt eine Detektion erzielt und diese durch Verwendung von BSA optimiert werden. Auch bei Baldo (2) war schon beschrieben worden, dass Milchpulver und BSA die besten Ergebnisse beim Abblocken unspezifischer Bindungen zeigten. Unter den gegebenen Bedingungen scheint die optimale Transferzeit im Semidry-Verfahren bei 60 bis 120 Minuten zu liegen, was sich in etwa mit der Transferzeit von 60 Minuten bei Kyhse-Anderson (37) deckt. Lag die Transferzeit darunter, blieben größere Proteinmengen im Gel zurück, lag sie darüber, schienen die Proteine die Membran teilweise schon wieder verlassen zu haben. Insgesamt waren die beim Transfer entstehenden Proteinverluste eher gering. Bei einem Proteintransfer im Tank waren die Ergebnisse nicht optimal, möglicherweise auch deshalb, weil Teile des SP-C in die „falsche“ Richtung transferiert worden waren. Die Vorteile des Semidry-Verfahrens waren schon von Kyhse-Anderson (37) beschrieben worden. Das Hauptproblem bei der Darstellung des SP-C mittels Immundetektion schien jedoch in der begrenzten Affinität der verwendeten Antikörper zu humanem SP-C zu liegen. Deshalb erschien eine Fortführung der Untersuchungen erst nach Verfügbarkeit neuer Antikörper mit besserer Affinität zu humanem SP-C sinnvoll. Insgesamt schien eine Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie der elektrophoretischen Auftrennung wegen der exakteren Darstellung bei hohen Lipidanteilen überlegen zu sein.

4.3 Proteinvergleich mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese

Der Vergleich der Lavageflüssigkeiten der Kontrollen mit denen der Patienten mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese beschränkte sich in dieser Arbeit auf den Vergleich jener Proteine, welche mit den zur Verfügung stehenden Mitteln zuverlässig identifiziert werden konnten. Diese waren Albumin, α1-Antitrypsin, Transthyretin, Cystatin S, Surfactantprotein A, Transferrin, Lipocalin-1, Calgranulin A, der Immunglobulin bindende Faktor und die leichten und schweren Immunglobulinketten. Dazu wurde noch ein Bereich ausgewählt, der die kleinen sauren Proteine repräsentiert, die im Einzelnen jedoch nicht zuverlässig identifiziert werden konnten. Da die Gesamtmenge der Proteine auf 80 µg pro Gel abgeglichen worden war, konnten nur Aussagen über relative Unterschiede und Veränderungen gemacht werden, nicht jedoch über den absoluten Gehalt eines Proteins in der Lavageflüssigkeit. Deshalb könnte die Konzentrationszunahme eines einzelnen Proteins verringerte Proteinkonzentrationen anderer Proteine vortäuschen und umgekehrt, ohne dass eine Veränderung der absoluten Konzentration dieser Proteine in der Lavageflüssigkeit stattgefunden hätte. Dies sollte bei der Interpretation der Ergebnisse stets berücksichtigt werden. Das einzige Protein, das bei den immunsupprimierten Kindern mit malignen Erkrankungen, Fieber und pulmonalen Infiltraten eine signifikante Zunahme verzeichnete, war α_1-Antitrypsin, ein Akute-Phase-Protein. Ein Zusammenhang zwischen erhöhten Konzentrationen dieses Proteins und den pulmonalen Infiltraten konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Auch bei erwachsenen Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen waren bereits erhöhte Anteile von α_1-Antitrypsin mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese nachgewiesen worden (63). Die in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen waren interessanterweise bei den Patienten am deutlichsten, in deren Lavageflüssigkeit keine pathogene Keime gefunden worden waren. Dies könnte auf einen von pathogenen Mikroorganismen unabhängigen Prozess hindeuten. Calgranulin konnte auf keinem der Gele aus der Kontroll-

gruppe nachgewiesen werden, jedoch auf 40 % der Gele aus der Patientengruppe. Auch von Wattiez et al. (63) konnte Calgranulin A auf zweidimensionalen Gelen gesunder Kinder nicht nachgewiesen werden, bei Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen wurden jedoch erhöhte Konzentrationen dieses Proteins festgestellt. Wilkinson (64) hatte schon vorher eine Expression von Calgranulin A durch Granulozyten festgestellt, auch eine Rolle als Akute-Phase-Protein ist vorstellbar. Die Anteile einiger anderer Proteine am Gesamtproteingehalt der Lavageflüssigkeit waren bei immunsupprimierten Kindern mit malignen Erkrankungen, Fieber und pulmonalen Infiltraten dagegen verringert. Der Transthyretin-Anteil war bei den Patienten signifikant reduziert, am deutlichsten jedoch bei denen, in deren Lavageflüssigkeit pathogene Keime gefunden worden waren. Transthyretin wurde schon als Akute-Phase-Protein beschrieben (11) und Wattiez (63) zeigte, dass Transthyretin bei Patienten erhöht war, die an interstitiellen Lungenerkrankungen ohne Beteiligung pathogener Keime litten. Transthyretin in der Lavageflüssigkeit könnte so zur Unterscheidung zwischen Infektion und Kontamination bei Lungenerkrankungen beitragen. Auch der Anteil des Immunglobulin bindenden Faktors (IgBF) war bei den Kindern der Patientengruppe signifikant verringert. Die Funktion dieses Proteins ist noch nicht geklärt, doch wurde bereits gezeigt, dass es die Aktivierung von B-Lymphozyten unterdrückt und ein Modulator der lokalen Immunantwort sein könnte (35). Bei Rauchern wurden erhöhte IgBF-Werte im Vergleich zu Nichtrauchern gefunden und die Exposition zu Dimethylbenzamin, einer die Atemwege irritierenden Chemikalie, ließ die Konzentration von IgBF in der Lavageflüssigkeit im Vergleich zu einer vor der Exposition durchgeführten Bronchiallavage deutlich ansteigen (46). Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten IgBF-Werte waren bei den Patienten mit Morbus Hodgkin und dem Rhabdomyosarkom am höchsten, bei Leukämiepatienten wurde IgBF jedoch nur selten gefunden. Cystatin S, ein Cystein-Protease-Inhibitor der schon in Speichel (32, 52) und Sputum (9) gefunden worden war, wurde bei den Patienten ebenfalls in relativ geringer Konzentration dargestellt. Analog zu der von Lindahl et al. (46) veröffentlichten Ar-

beit wurde Cystatin S in zwei Isoformen eingeteilt. Dort wurde gezeigt, dass bei Rauchern besonders die Isoform mit einem isoelektrischen Punkt bei pH 5,1 reduziert war, während die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine Reduktion von Cystatin S hindeuten, die bei immunsupprimierten Kindern mit malignen Erkrankungen besonders die Isoform bei pH 4,9 betraf. Der Bereich der kleinen sauren Proteine umfasst Kathepsin D, Topomyosin, Calreticulin, Calvasculin, Calcyclin, Saposin D und andere Proteine (63), die mit den hier verwendeten Methoden nicht genauer abgegrenzt werden konnten. Die Gesamtheit dieser Proteine scheint jedoch vor allem bei den Patienten reduziert zu sein, in deren Lavageflüssigkeit pathogene Keime gefunden wurden. Bei Patienten, die an einer idiopathischen Lungenfibrose oder einer hypersensitiven Pneumonitis litten, wurden von Wattiez et al. (63) dagegen erhöhte Konzentrationen der Proteine Cathepsin-D und Haptoglobin-α_1 ermittelt. Zweidimensionale Gele mit einer besseren Auflösung würden die Bearbeitung dieses Bereiches wesentlich erleichtern. Bei den anderen im Rahmen dieser Arbeit betrachteten Proteinen konnten keine Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgruppe ermittelt werden. Dass auch im Falle des Surfactantproteins A keine signifikaten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen festgestellt werden konnten, steht auf den ersten Blick im Widerspruch zu den mittels ELISA gewonnen Daten. Einerseits muss bedacht werden, dass die Kontrollgruppe der zweidimensionalen Gele nicht identisch mit der des ELISA ist. Andererseits konnten nicht von allen Patienten zweidimensionale Gele angefertigt werden, d. h. die Patientengruppe der zweidimensionalen Gele stellt nur einen Ausschnitt aus der für den ELISA verwendeten Patientengruppe dar. Dazu können die hier gewonnenen Ergebnisse nur mit den Daten des ELISA verglichen werden, wenn diese zur Gesamtproteinmenge ins Verhältnis gesetzt werden, da die Gesamtproteinmenge auf den Gelen vorher auf 80 µg abgeglichen worden war. In diesem Fall gibt es auch bei den mittels ELISA gewonnen Daten keine signifikanten Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und der Patientengruppe. Auch bei Transferrin konnten in dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede

zwischen Kontrollen und Patienten festgestellt werden, bei interstitiellen Lungenerkrankungen waren dagegen erhöhte Transferrinspiegel von Wattiez et al. (63) nachgewiesen worden. Transferrin steigert die Aufnahme von Surfactant durch Alveolarzellen vom Typ II (20). Es tritt bei respiratorischem Versagen als Fe^{3+}-Transferrin auf, welches, im Gegensatz zum sonst vorhandenen eisenfreien Transferrin, zu einer Verschlechterung der Oberflächenaktivität des Surfactant führt (30). Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine näheren Untersuchungen zur Unterscheidung dieser beiden Formen durchgeführt. Das Auftreten von Hämoglobin-Ketten auf den Gelen könnte auf eine vermehrte Permeabilität für Plasmaproteine oder eine Erosion von Blutgefäßen durch eine Verletzung bei Durchführung der bronchoalveolären Lavage zurückzuführen sein. Die großen Mengen an α_1-Antitrypsin und Immunglobulinen, die insbesondere bei Patienten mit Keimnachweis gefunden wurden, haben vermutlich die Identifikation weiterer Proteine erschwert. Eine Entfernung dieser Komponenten könnte die Ergebnisse der zweidimensionalen Gelelektrophorese in Zukunft verbessern. Die bei dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse haben dazu beigetragen, die sehr begrenzten Mengen an Lavageflüssigkeit, die bei Kindern gewonnen werden können, gezielter einzusetzen. So wird eine Vorfraktionierung und die gezielte Auswahl von engen pH-Bereichen für die isoelektrische Fokussierung dazu beitragen, detailliertere Aussagen zum Proteinsatz der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit unter verschiedenen pathogenen Bedingungen zu machen.

5 Zusammenfassung

Bei geschwächter Abwehrlage wird die Morbidität und Mortalität wesentlich von pulmonalen Komplikationen mitbestimmt. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Zusammensetzung und Funktion des pulmonalen Surfactants unter diesen Bedingungen zu untersuchen. Dazu wurden die bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten von Kindern mit malignen Erkrankungen, Immunsuppression, pulmonalen Infiltraten und therapieresistentem Fieber mit denen von pulmonal gesunden Kindern verglichen. Die SP-A-Konzentration war in der Patientengruppe deutlich erhöht, seine Funktion schien jedoch kaum verändert. Während auch die Werte für das SP-C und die kleinen Surfactant-Aggregate bei den Patienten deutlich erhöht waren, gab es kaum Unterschiede bei SP-B, SP-D, den großen Surfactant-Aggregaten und der Oberflächenaktivität. Diese Daten lassen eine adaptiv gesteigerte lokale Abwehr und ein System zur Erhaltung der Oberflächenaktivität unter den beschriebenen klinischen Bedingungen vermuten.

Das zweite Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur Visualisierung von humanem SP-C mittels Immundetektion nach Dünnschichtchromatographie und Gelelektrophorese. Eine quantitative Darstellung des SP-C in Lavageflüssigkeiten war mit keinem der beiden Verfahren möglich, eine empfindliche semiquantitative Detektion von rekombinantem SP-C mittels Dünnschichtchromatographie konnte jedoch erreicht werden.

Ein weiteres Ziel war es, die Lavageproteine von pulmonal gesunden Kindern und Patienten gemäß ihrem Molekulargewicht und ihrem isoelektrischen Punkt zweidimensional darzustellen, zu vergleichen und die besonders bei Kindern sehr begrenzten Mengen an Lavageflüssigkeit besser nutzbar zu machen. Folgende signifikante Änderungen wurden beobachtet: Bei den Patienten war das α_1-Antitrypsin vermehrt, der Anteil an Ig-bindendem Faktor, Transthyretin und Cystatin S schien jedoch vermindert zu sein. Im Bereich der kleinen sauren Proteine behinderte der relativ hohe Anteil an Immunglobulinketten die Separation

und Identifikation einzelner Proteine. Diese Daten zeigen, dass es bei Kindern mit malignen Erkrankungen, Immunsuppression, pulmonalen Infiltraten und therapieresistentem Fieber deutliche Veränderungen in der Zusammensetzung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit gibt. Eine Vorfraktionierung der Proben könnte für die Identifikation der einzelnen Proteine ebenso hilfreich sein wie die Verwendung eines eng begrenzten pH-Bereiches bei der isoelektrischen Fokussierung.

Diese Arbeit charakterisiert funktionelle und biochemische Aspekte des pulmonalen Surfactantsystems bei Kindern mit malignen Erkrankungen, Immunsuppression, pulmonalen Infiltraten und therapieresistentem Fieber.

6 Literaturverzeichnis

1. Bachurski C., Pryhuber G., Glasser S.W., Kelly S., Whitsett J.A. Tumor necrosis factor-α inhibits surfactant protein C. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 19402-19407
2. Baldo B.A., Tovey E.R., Ford S.A. Comparison of different blocking agents and nitro-celluloses in the solid phase detection of proteins by labelled antisera and protein A. *J. Biochem. Biophys. Methods* 1986; 12(5-6): 271-279
3. Baughman R.P., Sternberg R.I., Hull W., Buchsbaum J.A., Whitsett J.A. Decreased surfactant protein A in patient with bacterial pneumonia. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1993; 147: 653-657
4. Beers M.F., Fisher A.B. Surfactant protein C: a review of its unique properties and metabolism. *Am. J. Physiol.* 1992; 263: L151-L160
5. Bligh E.C., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959; 37: 911-917
6. Blum H., Beier H., Gross H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* 1987; 8: 93-99
7. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of proteins utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254
8. Bredow C. von, Birrer P., Griese M. Surfactant protein A and other bronchoalveolar lavage proteins are altered in cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 2001; 17(4): 716-722
9. Buttle D.J., Burnett D., Abrahamson M. Levels of neutrophil elastase and cathepsin B activities, and cystatins in human sputum: relationship to inflammation. *Scand. J. Clin. Invest.* 1990; 50: 509-516
10. Crouch E. Collectins and pulmonary host defense. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 1998; 19: 177-210

11. Doherty N.S., Littman B.H., Reilly K., Swindell A.C., Buss J.M. Analysis of changes in acute-phase plasma proteins in an acute inflammatory response and in rheumatoid arthritis using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1998; 19: 355-363
12. Doyle I.R., Nicholas T.E., Bersten A.D. Serum surfactant protein-A levels in patients with acute cardiogenic pulmonary edema and adult respiratory distress syndrome. *Am. J Respir. Crit. Care Med.* 1995; 152: 307-317
13. Duck-Chong C.G. A rapid sensitive method for determining phospholipid phosphorus involving digestion with magnesium nitrate. *Lipids* 1978; 14: 492-497
14. Fisher J., McCormac F., Park S., Stelzner T., Shannon J.M. In Vivo regulation of surfactant proteins by glucocorticoids. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 1991; 5: 63-70
15. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem*. 1957; 22: 497-509
16. Görg A. Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients: Current state. *Biochem. Soc. Trans.* 1993; 21: 130-132
17. Görg A., Postel W., Friedrich C., Kuick R., Strahler J.R., Hanash S.M. Temperature-dependent spot positional variability in two-dimensional polypeptide patterns. *Electrophoresis* 1991; 12: 653-658
18. Görg A., Postel W., Günther S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1988; 9: 531-546
19. Greene K., Whitsett J.A., Korfhagen T., Fisher J. SP-D expression regulates endotoxin mediated lung inflammation in vivo. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 161: A515
20. Griese M. Influence of blood constituents on uptake of a lipid-extracted natural surfactant by alveolar type II cells. *Exp. Lung Res.* 1997; 23(5): 361-376
21. Griese M. Pulmonary surfactant in health and lung diseases: state of the art. *Eur. Respir. J.* 1999; 13: 1455-1476

22. Griese M. Stoffwechsel und endokrine Funktionen. In Rieger C et al. (Hrsg.) *Pädiatrische Pneumologie*, Springer, 1999; Kapitel 1.4.1: 67-77

23. Griese M., Birrer P., Demirsoy A. Pulmonary surfactant in cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 1997; 10: 1983-1988

24. Griese M., Bredow C. von, Birrer P. Reduced proteolysis of surfactant protein A and changes of the bronchoalveolar lavage fluid proteome by inhaled α1-protease inhibitor in cystic fibrosis. *Electrophoresis* 2001; 22: 165-171

25. Griese M., Dietrich P., Potz C., Westerburg B., Bals R., Reinhardt D. Surfactant subfractions during nosocomial infection in ventilated preterm human neonates. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 153: 398-403

26. Griese M., Rampf U., Hofmann D., Fuhrer M., Reinhardt D., Bender-Gotze C. Pulmonary complications after bone marrow transplantation in children: twenty-four years of experience in a single pediatric center. *Pediatr. Pulmonol* 2000; 30(5): 393-401

27. Gross N.J., Schultz R.M., Reverence V.V. Serine protease requirement for the extracellular metabolism of pulmonary surfactant. *Biochim. Biophys. Acta* 1990; 1044: 222-230

28. Günther A., Siebert C., Schmidt R., Ziegler S., Grimminger F., Yabut M., Temmesfeld B., Walmrath D., Morr H., Seeger W. Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 153: 176-184

29. Haagsman H.P., Hawgood S., Sargeant T., Buckley D., White R.T., Drickamer K., Benson B.J. The major lung surfactant protein, SP 28-36, is a calcium-dependent, carbohydrate-binding protein. *J. Biol. Chem.* 1987; 262(29): 13877-13880

30. Hallman M., Sarnesto A., Bry K. Interaction of transferrin saturated with iron with lung surfactant in respiratory failure. *J. Appl. Physiol.* 1994; 77(2): 757-766

31. Haslam P.L., Baughman R. Guidelines for measurement of acellular components and recommendations for standardization of bronchoalveolar lavage (BAL). *Eur. Respir. Rev.* 1999; 9: 25-157

32. Isemura S., Saitoh E., Sanada K., Minakata K. Identification of full-sized forms of salivary (S-type) cystatins (cystatin SN, cystatin SA, cystatin S, and two phosphorylated forms of cystatin S) in human whole saliva and determination of phosphorylation sites of cystatin S. *Int. Biochem. J.* 1991 Oct; 110(4): 648-654

33. Jobe A., Rider E.D. Catabolism and recycling of surfactant. Robertson B., Van Golde L.M.G., Batenburg J.J. (eds). Pulmonary surfactant: from molecular biology to clinical practice. *Elsevier*, Amsterdam 1992; 131-337

34. Johansson J., Curstedt T. Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components. *Eur. J. Biochem.* 1997; 244: 675-693

35. Kamada M., Mori H., Maeda N., Yamamoto S., Kunimi K., Takikawa M., Aono T., Futaki S., Koide S.S. Beta-Microseminoprotein / prostatic secretory protein is a member of immunoglobulin binding factor family. *Biochim. Biophys. Acta* 1998; 1388: 101-110

36. Krämer H.J., Schmidt R., Günther A., Becker G., Suzuki Y., Seeger W. ELISA technique for quantifikation of surfactant protein B (SP-B) in bronchoalveolar lavage fluid. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995; 152: 1540-1544

37. Kyhse-Anderson J. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 1984; 10(3-4): 203-209

38. Lämmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685

39. Lanino E., Sacco O., Kotitsa Z., Rabagliati A., Castagnola E., Garaventa A., Dallorso S., Gandolfo A., Manfredini L., Venzano P., Savioli C., Maccio L., Dini G., Rossi G.A.

Fiberoptic bronchoscopy and bronchoalveolar lavage for the evaluation of pulmonary infiltrates after BMT in children. *Bone Marrow Transplant.* 1996; 18 Suppl 2: 117-120

40. LeVine A.M., Bruno M.D., Huelsman K.M., Ross G.F., Whitsett J.A., Korfhagen T.R. Surfactant potein A-deficient mice are susceptible to group B streptococcal infection. *J. Immunol.* 1997; 158: 4336-4340
41. LeVine A.M., Gwozdz J., Fisher J., Whitsett J.A., Korfhagen T. Surfactant protein D modulates lung inflammation with respiratory syncytial virus infection in vivo. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 161: A515
42. LeVine A.M., Gwozdz J., Stark J., Bruno M., Whitsett J.A., Korfhagen T. Surfactant protein-A enhances respiratory syncytial virus clearance in vivo. *J. Clin. Invest.* 1999; 103: 1015-1021
43. LeVine A.M., Kurak K., Bruno M.D., Stark J., Whitsett J.A., Korfhagen T.R. Surfactant protein-A-deficient mice are susceptible to pseudomonas aeruginosa infection. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 1998; 19: 700-708
44. Lindahl M., Ekstrom T., Sorensen J., Tagesson C. Two dimensional protein patterns of bronchoalveolar lavage fluid from non-smokers, smokers, and subjects exposed to asbestos. *Thorax* 1996; 51(10): 1028-1035
45. Lindahl M., Stahlbom B., Svartz J., Tagesson C. Protein patterns of human nasal and bronchoalveolar lavage fluids analyzed with two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1998; 19(18): 3222-3229
46. Lindahl M., Stahlbom B., Tagesson C. Newly identified proteins in human nasal and bronchoalveolar lavage fluids: Potential biomedical and clinical applications. *Electrophoresis* 1999; 20: 3670-3676.
47. Lindahl M., Stahlbom B., Tagesson C. Two-dimensional gel electrophoresis of nasal and bronchoalveolar lavage fluids after occupational exposure. *Electrophoresis* 1995; 16(7): 1199-1204

48. McIntosh J., Swyers A.H., Fisher J.H., Wright J.R. Surfactant proteins A and D increase in response to intratracheal lipopolysaccharide. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1996; 15: 509-519

49. Motulsky H. *Intuitive biostatistics*. New York, Oxford University Press 1995

50. Phelps D.S., Rose R.M. Increased recovery of surfactant protein A in AIDS related pneumonia. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1991; 143: 1072-1075

51. Quanbar R., Possmayer F. A quantitative method for detecting surfactant-associated protein C in pulmonary surfactant. *Anal. Biochem.* 1994; 216: 262-270

52. Ramasubbu N., Reddy M.S., Bergey E.J., Haraszthy G.G., Soni S.-D., Levine M.J. Large-scale purification and characterization of the major phosphoproteins and mucins of human submandibular-sublingual saliva. *Biochem. J.* 1991; 280: 341-352

53. Rooney S.A., Young S.L., Mendelson C.R. Molecular and cellular processing of lung surfactant. *FASEB J.* 1994; 8: 957-967

54. Schägger H., von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the seperation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 1987; 166: 368-379

55. Schmidt R., Ruppert C., Daum C., Grimminger F., Seeger W., Steinhilber W., Günther A. An ELISA technique for quantification of surfactant apoprotein (SP)-C in bronchoalveolar lavage fluids. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002; 163: in press

56. Sugahara K., Iyama K., Sano K., Kuroki Y., Akino T., Matsumoto M. Overexpression of surfactant protein SP-A, SP-B, and SP-C mRNA in rat lungs with lipopolysaccharide-induced injury. *Lab. Invest.* 1996; 74: 209-220

57. Van Eijk M., De Haas C.G.M., Haagsman H.P. Quantitative analysis of pulmonary surfactant proteins B and C. *Anal. Biochem.* 1995; 232: 231-237

58. Van Helden H., Kuijpers W.C., Steenvoorden D., Go C., Bruijnzeel P.L.B., Van Eijk M., Haagsman H.P. Intratracheal aerosolization of endotoxin (LPS) in the rat:

a comprehensive animal model to study adult (acute) respiratory distress syndrome. *Exp. Lung Res.* 1997; 23: 297-316

59. Van Rozendaal B., Van de Lest C., Van Eijk M., Van Golde L.M.G., Voorhout W.F., Van Helden H., Haagsman H.P. Aerosolized endotoxin is immediately bound by pulmonary surfactant protein D in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 1454: 261-269
60. Veldhuizen R.W., Inchley K., Hearn S.A., Lewis J.F., Possmayer J.F. Degradation of surfactant-associated protein B (SP-B) during in vitro conversion of large to small surfactant aggregates. *Biochem. J.* 1993; 295: 141-147
61. Veldhuizen R.W., Ito Y., Marcou J., Yao L.J., McGaig L., Lewis J.F. Effects of lung injury on pulmonary surfactant aggregate conversion in vivo and in vitro. *Am. J. Physiol.* 1997; L872-L878
62. Wattiez R., Hermans C., Bernard A., Lesur O., Falmagne P. Human Bronchoalveolar lavage fluid: Two-dimensional gel electrophoresis, amino acid microsequencing and identification of major proteins. *Electrophoresis* 1999; 20: 1634-1645
63. Wattiez R., Hermans C., Cruyt C., Bernard A., Falmagne P. Human Bronchoalveolar lavage fluid protein two-dimensional database: Study of interstitial lung diseases. *Electrophoresis* 2000; 21: 2703-2712
64. Westermeier R., Gronau S., Schickle H. Semidry-Blotting von Proteinen aus SDS- und IEF-Polyacrylamidgelen. *Pharmacia Sonderdruck* SD RE-072
65. Wilkinson M.M., Busuttil A., Hayward C., Brock D.J., Dorin J.R., Van Heyningen V. Expression pattern of two related cystic fibrosis-associated calcium-binding proteins in normal and abnormal tissues. *J. Cell Sci.* 1988; 91: 221-230
66. Young S.L., Ho Y.-S., Silbajoris R.A. Surfactant apoprotein in adult rat lung compartments is increased by dexamethasone. *Am. J. Physiol.* 1991; 260: L161-L167

67. Yukitake K., Brown C., Schlueter M., Clements J., Hawgood S. Surfactant apoprotein A modifies the inhibitory effect of plasma proteins on surfactant activity in vitro. *Pediatr. Res.* 1995; 37: 21-25

7 Danksagung

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden in den Jahren 1998 und 1999 in den Laboratorien der Kinderpoliklinik und am Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität in München durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Griese für die Überlassung des Themas und für sein beständiges Engagement und Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Dr. F. Ratjen danke ich ebenfalls für seinen Beitrag zu dieser Arbeit.

Danken möchte ich auch Frau Andrea Schams und Herrn Günther Obermeier für deren kompetente und freundliche Hilfe bei der Durchführung von Laborarbeiten.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Kinderpoliklinik und des Instituts für Physiologische Chemie für die freundliche Unterstützung und das rege Interesse an meiner Arbeit bedanken.

8 Anhang

8.1 Tabelle 1: Liste der Kinder mit malignen Erkrankungen

Patient	2-D	Alter in Jahren	Geschlecht	Diagnose	d post KMT	Pathogene Keime in Lavageflüssigkeit	Gesamtprotein /µl BAL	Blutleukozyten / µl	Temperatur	Lungeninfiltrate auf dem Röntgenbild	Steroide in 14 Tagen	klinischer Verlauf
1	+	5,3	w	ALL		keine	469,4	2600	Fieber	diffus, interstitiell	ja	verstorben
2	-	3,5	w	ALL		keine	574,6	800	Fieber	diffus, interstitiell	ja	verstorben
3	-	7,8	w	AML		keine	76,5	300	Fieber	fokal, konsolidiert rS4	nein	unverändert
4	+	7,9	w	AML		Paecilomyces	148,4	2000	Fieber	fokal, konsolidiert rS4	nein	gebessert
5	-	3,2	m	AML		keine	49,5	48100	Fieber	diffus, nodulär	nein	verstorben
6	+	2,0	w	AML		Aspergillus	66,2	800	Fieber	fokal, konsolidiert rS4+S6	nein	gebessert
7	-	2,2	w	AML		keine	88,4	2300	Fieber	fokal, konsolidiert rS4+S6	nein	gebessert
8	-	13,8	m	ALL	74	Aspergillus	38,6	10000	Fieber	fokal, konsolidiert rS4+S8	nein	gebessert
9	-	13,9	m	ALL	133	keine	57,1	3600	Fieber	fokal, konsolidiert rS4+S8	ja	verstorben
10	-	6,3	w	ALL	17	keine	496,2	62000	Fieber	diffus, interstitiell	nein	verstorben
11	+	14,2	w	SAA	84	keine	154,0	k. A.	Fieber	diffus, nodulär	nein	gebessert
12	-	15,6	w	ALL		Pseudomonas putida	18,2	2200	Fieber	fokal, konsolidiert lS8	ja	gebessert
13	+	16,5	m	MHD		Cytomegalovirus	84,4	14000	Fieber	diffus, interstitiell	nein	gebessert
14	+	16,0	m	ALL		Aspergillus	373,9	9000	Fieber	fokal, konsolidiert rS4	nein	gebessert
15	+	4,2	m	ALL		keine	67,6	4900	Fieber	fokal, konsolidiert Lingula	nein	gebessert
16	+	7,6	m	AML		Staphylococcus epidermidis	557,6	600	Fieber	fokal, konsolidiert rS8	nein	gebessert
17	-	11,1	m	SAA		keine	25,8	k. A.	Fieber	fokal, konsolidiert Lingula	ja	gebessert
18	+	13,0	w	ALL		keine	870,6	1100	Fieber	diffus, interstitiell	ja	gebessert
19	-	7,0	m	AML		Aspergillus	141,9	3800	Fieber	diffus, interstitiell	ja	verstorben
20	-	9,0	m	ALL		keine	21,6	k. A.	Fieber	fokal, konsolidiert lS1	nein	gebessert
21	-	14,0	m	AML		Aspergillus	33,4	4000	Fieber	fokal, konsolidiert rS4	nein	gebessert
22	-	8,2	m	AML		keine	963,3	300	Fieber	diffus, interstitiell	nein	verstorben
23	-	14,5	w	B-NHL		Lactobacillus	139,0	100	Fieber	fokal, konsolidiert rS9	ja	gebessert
24	+	4,5	m	RSA		keine	1859,9	3600	Fieber	fokal, konsolidiert rechts	nein	verstorben

Normale Blutleukozytenwerte: 6000 bis 17500 zwischen 1 und 3 Jahren, 6500 bis 15500 zwischen 4 und 7 Jahren, 4500 bis 13500 zwischen 8 und 13 Jahren, 4500 bis 11000 bei Erwachsenen.

Abkürzungen: ALL: Akute lymphatische Leukämie, AML: Akute myeloische Leukämie, B-NHL: B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom, 2-D: 2-D-Gelelektrophorese,

KMT: Knochenmarkstransplantation, MHD: Morbus Hodgkin, k. A.: keine Angabe, RSA: Rhabdomyosarkom, SAA: Schwere aplastische Anämie

8.2 Tabelle 2: Rückgewinnung und zelluläre Zusammensetzung der BALF

	Kontrollkinder	Kinder mit malignen Erkrankungen, Fieber und pulmonalen Infiltraten			
	Alle (n=24)	Alle (n=24)			
			Unterteilt nach dem Ergebnis der Kultur der Lavageflüssigkeit		
			ohne pathogene Keime (n=14)	mit pathogenen Keimen (n=10)	P
Rückgewinnung (%)	64,5 (59,0;72,5) [45,0-94,0]	60,0 (55,5;72,5) [31,0-85,0]	70,5 (59,0;75,0) [54,0-85,0]	55,5 (40,0;62,5) [31,0-72,0](*)	0,0290
Zellzahl (1/µl)	6,0 (2,7;11,7) [0,5-45,9]	22,1 (11,6;76,2) [1,9-629,2]***	18,9 (9,1; 88,8) [1,9-629,2]**	25,1 (10,0;87,3) [4,7-493,7]*	0,0001
Makrophagen (%)	84,5 (72,7;90,0) [47,0-95,7]	45,5 (22,0;68,5) [2,0-99,0]***	61,5 (22,0;75,5) [2,0-99,0]**	36,0 (19,0;61,5) [12,0-80,0]***	<0,0001
Lymphozyten (%)	15,0 (9,5;25,9) [4,0-50,0]	34,0 (15,5;65,0) [1,2-98,0]	34,0 (11,0;65,5) [1,2-98,0]	35,0 (15,5;74,0) [6,0-87,0]	0,0249
Neutrophile Granulozyten (%)	0,6 (0,3;1,1) [0,1-2,5]	3,0 (0,7;13,5) [0,0-74,0]*	2,6 (0,1;6,5) [0,0-32,0]	8,0 (1,1;25,5) [0,4-74,0]**	0,0031
Eosinophile Granulozyten (%)	0,2 (0,0;0,4) [0,0-1,6]	0,2 (0,0;0,6) [0,0-15,0]	0,4 (0,0;1,3) [0,0-8,0]	0,1 (0,0;0,7) [0,0-15,0]	0,8553

Die Daten sind als Median (1. Quartil; 3.Quartil) [Minimum-Maximum] angegeben. Die angegebenen p-Werte wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test über alle vier Gruppen berechnet.

Unterschiede zu den Kontrollkindern wurden mit dem Post-hoc-Test nach Dunn berechnet und mit *, **, oder *** gekennzeichnet (* wenn $p < 0,05$, ** wenn $p < 0,01$ und *** wenn $p < 0,001$).

Mit (*) wird auf ein $p < 0,05$ im Post-hoc-Test nach Dunn zwischen den Patienten ohne und den Patienten mit pathogenen Keimen in der Lavageflüssigkeit hingewiesen.

8.3 Tabelle 3: Phospholipide, Proteine und Surfactantproteine A und D

	Kontrollkinder	Kinder mit malignen Erkrankungen, Fieber und pulmonalen Infiltraten			
	Alle (n=24)	Alle (n=24)			
			Unterteilt nach dem Ergebnis der Kultur der Lavageflüssigkeit		
			ohne pathogene Keime (n=14)	mit pathogenen Keimen (n=10)	P
Phospholipide (µg/ml)	8,3 (4,5;12,3)[2,2-19,3]21	14,4 (5,7;27,0)[0,4-125,1]24	15,7 (4,8;32,2)[2,0-67,3]14	12,6 (4,7;33,7)[0,4-125,1]10	0,1509
Proteine (µg/ml)	31,2 (24,0;47,0)[9,8-94,2]24	113,7 (53,3;482,8)[13,2-1859,9]24***	121,2 (53,3;722,6)[25,8-1859,9]14***	111,8 (30,1;261,2)[18,2-557,6]10	0,0001
SP-A (ng/ml)	120,0 (48,9;262,8)[0,0-800,0]24	479,1 (215,7;1052,1)[54,2-3155,2]24**	368,8 (157,7;770,4)[54,2-976,0]14	1218,5(274,3;2274,0)[107,4-3155,2]10***	<0,0001
SP-A/Protein (ng/µg)	3,9 (1,6;12,1)[0,8-26,4]19	6,3 (0,7;12,2)[0,0-37,8]24	3,1 (0,3;8,8)[0,0-37,8]14	8,8 (4,6;23,1)[0,8-32,6]10	0,1341
SP-A/PL (ng/µg)	17,6 (9,4;34,1)[4,6-81,5]18	40,6 (17,2;106,7)[0,8-291,8]24	37,6 (14,3;55,1)[0,8-97,7]14	122,0 (17,5;227,1)[13,2-292,8]10*	0,0198
SP-A Bindung an KH (%)	100,0 (53,8;195,1) [36,9-203,1]	134,2 (108,6;257,0) [60,6-328,7]	157,9 (95,0;277,3) [60,6-328,7]	130,8 (101,4;213,1) [83,8-263,9]	0,4620
SP-A Bindung an Ps, (%)	100,0 (72,8;298,8)[6,2-629,3]17	70,1 (25,5;199,2)[12,7-1970,1]20	150,7 (45,6;276,3)[24,1-1970,1]12	25,0 (16,5;75,6)[12,7-232,5]8	0,0854
SP-D (ng/ml)	37,7 (14,0;66,3)[0,0-119,3]24	50,8 (16,9;73,2)[0,0-208,8]22	40,3 (21,0;60,4)[0,0-208,8]12	50,8 (6,6;92,0)[0,0-105,0]10	0,9961
SP-D/Protein (ng/µg)	1,1 (0,4;2,3)[0,1-8,5]23	0,4 (0,2;0,8)[0,0-2,7]18*	0,6 (0,1;0,9)[0,0-1,1]10	0,4 (0,2;0,6)[0,2-2,71]8	0,0304
SP-D/PL (ng/µg)	3,4 (1,8;12,0)[0,2-25,4]20	4,9 (1,0;14,6)[0,1-124,3]18	1,5 (0,9;33,1)[0,8-106,0]10	9,0 (2,2;13,3)[0,1-124,3]8	0,8478
SP-D Bindung an KH (%)	100,0 (68,5;121,6) [21,1-324,8]	65,8 (51,6;307,2) [17,1-357,7]	141,9 (93,1;235,3) [44,3-328,7]	64,1 (38,0;321,7) [17,1-357,7]	0,9703
SP-D Bindung an Ps, (%)	100,0(69,9;162,0)[52,3-265,2]14	344,7 (39,6;444,9)[0,0-990,1]14	345,8 (68,6;564,9)[0,0-741,7]7	343,7 (140,5;729,9)[18,8-990,1]7	0,2374

Abkürzungen: KH: Kohlenhydrate, PL: Phospholipide, P: Phosphat, Ps.: Pseudomonas aeruginosa.

Die Daten sind als Median (1. Quartil; 3.Quartil) [Minimum-Maximum] angegeben. Die angegebenen p-Werte wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test über alle vier Gruppen berechnet.

Unterschiede zu den Kontrollkindern wurden mit dem Post-hoc-Test nach Dunn berechnet und mit *, **, oder *** gekennzeichnet (* wenn $p < 0,05$, ** wenn $p < 0,01$ und *** wenn $p < 0,001$).

8.4 Tabelle 4: Große und kleine Aggregate, SP-B und C, Oberflächenaktivität

	Kontrollkinder	Kinder mit malignen Erkrankungen, Fieber und pulmonalen Infiltraten			
	Alle (n=24)	Alle (n=24)			
			Unterteilt nach dem Ergebnis der Kultur der Lavageflüssigkeit		
			ohne pathogene Keime (n=14)	mit pathogenen Keimen (n=10)	P
SA (µgP/ml)	1,8 (1,4;11,8)[0,8-31,3]19	10,0 (4,7;16,4)[2,1-27,0]10**	13,4 (5,0;22,1)[4,2-27,0]6**	6,9 [2,1-15,2]4	0,0177
LA (µgP/ml)	10,9 (5,2;25,5)[2,6-48,3]18	18,8 (11,3;38,2)[10,5-109,9]10*	18,8 (10,7;38,2)[10,5-40,3]6	23,3 [11,5-109,9]4	0,0937
SA/LA	0,3 (0,1;0,6)[0,1-0,9]18	0,4 (0,2;0,6)[0,1-1,1]10	0,5 (0,4;0,9)[0,4-1,1]6**	0,2 [0,1-0,4]4(**)	0,0613
SP-B (ng/ml)	189,9 (147,9;209,3)[40,8-418,4]24	194,0 (163,0;265,9)[125,7-646,8]24	185,9 (163,0;239,5)[125,7-620,1]14	214,3 (153,2;313,7)[128,6-646,8]10	0,4686
SP-B/Protein (ng/µg)	5,8 (3,4;6,9)[1,6-22,6]24	2,6 (0,5;4,0)[0,1-8,8]24**	1,8 (0,3;5,6)[0,1-8,8]14**	2,9 (0,9;4,8)[0,6-8,1]10	0,0021
SP-B/PL (ng/µg)	24,8 (14,6;43,8)[9,6-64,1]21	17,1 (8,3;34,7)[1,6-380,1]24	10,5 (8,2;32,6)[2,7-91,3]14	26,7 (7,3;42,8)[1,6-380,1]10	0,3357
SP-C (ng/ml)	62,1 (28,3;98,8)[2,5-200,2]24	164,0 (119,1;319,8)[75,6-1954,6]24***	164,0 (119,1;402,3)[94,5-1954,6]14***	164,7 (97,1;346,7)[75,6-472,9]10**	<0,0001
SP-C/Protein (ng/µg)	1,8 (1,1;2,6)[0,2-4,4]24	1,2 (0,8;3,1)[0,1-5,7]24	1,5 (0,5;3,9)[0,1-5,7]14	1,8 (1,3;3,1)[0,3-4,9]10	0,9316
SP-C/PL (ng/µg)	7,2 (3,5;15,3)[0,7-52,3]21	15,2 (5,8;27,0)[1,2-434,0]24	13,0 (5,8;66,2)[2,4-390,9]14	17,2 (4,9;38,7)[1,2-434,0]10	0,1530
γads (mN/m)	45,5 (29,8;49,7)[19,5-52,0]9	43,2 (28,9;54,3)[22,6-69,2]10	43,0 (28,9;53,0)[27,5-57,4]6	46,1 [22,6-69,2]4	0,9668
γmin (mN/m)	19,1 (16,6;19,9)[13,8-21,8]9	18,7 (14,4;20,7)[10,7-32,9]10	18,9 (14,0;20,7)[10,7-20,7]6	18,0 [11,5-32,9]4	0,9937

Abkürzungen: SA: Kleine Aggregate, LA: große Aggregate, P: Phosphat, PL: Phospholipide, γads und γmin: minimale Oberflächenspannung nach Adsorption und nach 100 Pulsationen

Die Daten sind als Median (1. Quartil; 3.Quartil) [Minimum-Maximum] angegeben. Die angegebenen p-Werte wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test über alle vier Gruppen berechnet.

Unterschiede zu den Kontrollkindern wurden mit dem Post-hoc-Test nach Dunn berechnet und mit *, **, oder *** gekennzeichnet (* wenn $p < 0,05$, ** wenn $p < 0,01$ und *** wenn $p < 0,001$).

Mit (**) wird auf ein $p < 0,01$ im Post-hoc-Test nach Dunn zwischen den Patienten ohne und den Patienten mit pathogenen Keimen in der Lavageflüssigkeit hingewiesen.

8.5 Tabelle 5: Proteine in bronchoalveolärer Lavage nach 2-D SDS-PAGE

		Kontrollkinder	Kinder mit malignen Erkrankungen, Fieber und pulmonalen Infiltraten			
		Alle (n=7)	Alle (n=10)			
				Unterteilt nach dem Ergebnis der Kultur der Lavageflüssigkeit		
				ohne pathogene Keime (n=5)	mit pathogenen Keimen (n=5)	P
Gesamtprotein	[µg/ml BAL]	73.6 (47.0;89.2) [13.3-329.0]	264.0 (100.4;535.6) [66.2-1859.9]	148.4 (84.4;373.9) [66.2-557.6]**	469.4(154.0;870.6) [67.6-1859.9]	0.0598
Spotfläche	[% des Gels]	1.96 (1.45;2.22) [1.03-2.57]	3.44 (2.36;5.87) [0.88-9.67]	2.89 (2.35;5.06) [0.88-6.67]	4.00 (2.38;6.13) [1.28-9.67]	0.1642
Albumin	[% der Spots]	32,6 (28,3;40,2) [23,7-67,4]	23,1 (19,8;32,8) [7,5-58,9]	35,8 (23,9;44,7)[22,3-58,9](***)	19,4 (10,1;20,8) [7,5-23,9]**	0,0216
SP-A	[% der Spots]	3,7 (1,1;6,4) [0,4-8,4]	1,8 (1,2;2,2) [0,6-8,3]	2,0 (1,0;2,1) [0,6-3,4]	1,6 (1,6;2,2) [0,8-8,3]	0,8588
α1 Antitrypsin	[% der Spots]	0,2 (0,0;0,5) [0,0-1,3]	6,2 (2,0;12,4) [0,6-14,0]**	10,1(8,7;13,2)[1,1-14,0]***	3,6 (1,5;3,8) [0,6-13,1]*	0,0027
Transferrin	[% der Spots]	5,6 (3,2;6,8) [2,3-9,5]	3,5 (2,4;5,5) [1,34-9,91]	3,1 (2,9;6,1) [2,2-9,9]	4,0 (2,2;4,5) [1,3-5,8]	0,6625
Ig bindender Faktor	[% der Spots]	0,8 (0,6;0,9) [0,4-1,2]	0,0 (0,0;0,1) [0,0-0,3]***	0,0 (0,0;0,1) [0,0-0,2]**	0,0 (0,0;0,0) [0,0-0,3]***	0,0006
Transthyretin	[% der Spots]	0,5 (0,4;0,6) [0,3-0,8]	0,1 (0,0;0,3) [0,0-0,6]*	0,2 (0,1;0,3) [0,0-0,6]	0,1 (0,0;0,1) [0,0-0,4]**	0,0313
Cystatin S (gesamt)	[% der Spots]	0,8 (0,6;0,8) [0,4-0,9]	0,2 (0,0;0,3) [0,0-0,7]**	0,2 (0,0;0,2) [0,0-0,4]**	0,2 (0,1;0,7) [0,0-0,7]*	0,0096
Cystatin S (pH 4,9)	[% der Spots]	0,3 (0,3;0,4) [0,2-0,4]	0,1 (0,0;0,1) [0,0-0,3]**	0,1 (0,0;0,1) [0,0-0,1]***	0,1 (0,0;0,1) [0,0-0,3]**	0,0030
Cystatin S (pH 5,1)	[% der Spots]	0,4 (0,3;0,4) [0,2-0,5]	0,1 (0,0;0,2) [0,0-0,6]	0,1 (0,0;0,1) [0,0-0,3]*	0,1 (0,1;0,4) [0,0-0,6]	0,0583
Lipocalin-1	[% der Spots]	1,7 (1,4;2,1) [0,5-4,4]	0,5 (0,1;1,4) [0,0-3,0]	0,6 (0,3;1,4) [0,0-3,0]	0,1 (0,1;1,2) [0,0-2,3]	0,1904
Calgranulin A	[% der Spots]	0,0 (0,0;0,0) [0,0-0,0]	0,0 (0,0;0,2) [0,0-1,1]	0,0 (0,0;0,1) [0,0-0,6]	0,0 (0,0;0,2) [0,0-1,1]	0,2925
kleine saure Proteine	[% der Spots]	6,8 (5,2;7,3) [4,2-13,9]	2,3 (1,5;3,5) [0,3-8,6]*	2,4 (2,2;3,6) [1,1-6,2]	2,0 (1,3;3,3) [0,3-8,6]*	0,0388
Ig (leichte Ketten)	[% der Spots]	11,4 (9,9;13,1) [5,9-15,6]	9,9 (7,2;23,5) [4,6-34,1]	8,4 (6,8;9,2) [6,4-10,6](***)	23,7 (22,6;29,5) [4,6-34,1]	0,2466
Ig (schwere Ketten)	[% der Spots]	7,7 (6,8;9,0) [3,3-12,8]	6,5 (3,8;9,8) [2,8-19,6]	4,1 (3,8;9,3) [3,3-14,8]	6,8 (6,2;10,0) [2,8-19,6]	0,9108

Die Gesamtproteinmenge wird in µg/ml BAL angegeben, die Spotfläche in % der Gesamtgelfläche und alle anderen Werte in % der Gesamtspotfläche.

Die Daten sind als Median (1. Quartil; 3.Quartil) [Minimum-Maximum] angegeben. Die angegebenen p-Werte wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test über alle vier Gruppen berechnet.

Unterschiede zu den Kontrollkindern wurden mit dem Post-hoc-Test nach Dunn berechnet und mit *, **, oder *** gekennzeichnet (* wenn $p < 0,05$, ** wenn $p < 0,01$ und *** wenn $p < 0,001$).

Mit (***) wird auf ein $p < 0,001$ im Post-hoc-Test nach Dunn zwischen den Patienten ohne und den Patienten mit pathogenen Keimen in der Lavageflüssigkeit hingewiesen.

9 Lebenslauf

Vor- und Zuname: Manfred Neumann

Geburtstag und -ort: 9. Dezember 1970 in Landshut

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1977-1987 Besuch der Grund-, Haupt- und Realschule in München

1991-1993 Besuch der städtischen Berufsoberschule in Landshut

1993-1994 Sprachkurs am Institut français de Munich in Landshut

08.07.1994 Schulabschluss mit Erwerb der allgemeinen Hochschulreife in Landshut

Berufsausbildung:

1987-1991 Ausbildung zum Kommunikationselektroniker bei Fa. Rohde & Schwarz

08.02.1991 Abschlußprüfung durch die IHK für München und Oberbayern

02.91-06.91 Tätigkeit als Kommunikationselektroniker bei der Fa. Rohde & Schwarz

Zivildienst und Pflegepraktikum:

08.94-12.94 Abteilung für Innere Medizin im Kreiskrankenhaus Achdorf

Hochschulstudium:

1995-2001 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

17.04.2001 Studienabschluss in München mit Bestehen der Ärztlichen Prüfung

23.04.2001 Erteilung der Erlaubnis für die Tätigkeit als Arzt im Praktikum

04.01-12.01 Ausarbeitung der vorliegenden Dissertation

Berufsausübung:

Seit dem 15.01.02 Tätigkeit als Arzt im Praktikum am Klinikum Landshut