

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

**Surfactantproteine B und C sowie deren Vorstufen bei Patienten mit
Cystischer Fibrose und anderen Lungenerkrankungen**

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

vorgelegt von

Tim Oliver Tafel

aus

München

2008

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. M. Griese

Mitberichterstatter: Prof. Dr. D. Nowak

Priv. Doz. Dr. R. Fischer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dr. P. Latzin

Dekan:

Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung:

14.02.2008

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serumalbumin
CF	Cystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
FEV1	Forcierte expiratorische Einsekundenkapazität
kDa	Kilodalton
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MES	2-Morpholino-Ethansulfonsäure
P.a.	Pseudomonas aeruginosa
PAP	Pulmonale Alveolarproteinose
PBS	Phosphate Buffered Saline
SP	Serumprobe
SP-A	Surfactantprotein A
SP-B	Surfactantprotein B
SP-C	Surfactantprotein C
SP-D	Surfactantprotein D
St.au.	Staphylokokkus aureus
STD	Standardprobe
TBS	Tris Buffered Saline

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Cystische Fibrose.....	1
1.2 Surfactant.....	2
1.2.1 Biochemische Zusammensetzung, Synthese und Funktion.....	2
1.2.2 Surfactantproteine.....	3
1.2.2.1 Surfactantprotein B (SP-B).....	4
1.2.2.2 Surfactantprotein C (SP-C).....	6
1.2.3 Surfactant bei CF und anderen Lungenerkrankungen.....	8
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	9
2. Material und Methoden	10
2.1 Patientenkollektive und Kontrollgruppe.....	10
2.1.1 Cystische Fibrose.....	10
2.1.2 Chronische Bronchitis.....	11
2.1.3 Pneumonie ohne Immundefekt.....	12
2.1.4 Lungengesunde Kontrollgruppe.....	13
2.2 Durchführung der Bronchoalveolären Lavage.....	14
2.3 Quantitative Gesamtproteinbestimmung.....	15
2.4 1-D Gelelektrophorese und Westernblotanalyse.....	16
2.5 Qualitative und Quantitative Auswertung.....	19
2.6 Statistische Auswertung.....	20
3. Ergebnisse	21
3.1 Qualitative Auswertung.....	21
3.1.1 Surfactantprotein C.....	21
3.1.1.1 Cystische Fibrose.....	21
3.1.1.2 Chronische Bronchitis.....	24
3.1.1.3 Pneumonie ohne Immundefekt.....	26
3.1.1.4 Lungengesunde Kontrollgruppe.....	27
3.1.1.5 Höhermolekulare Vorstufen (Pro-SP-C).....	29
3.1.1.6 Unspezifische Bindungen.....	32

3.1.2 Surfactantprotein B.....	35
3.1.2.1 Cystische Fibrose.....	35
3.1.2.2 Chronische Bronchitis.....	37
3.1.2.3 Pneumonie ohne Immundefekt.....	38
3.1.2.4 Lungengesunde Kontrollgruppe.....	40
3.1.2.5 Höhermolekulare Vorstufen (Pro-SP-B).....	41
3.1.2.6 Unspezifische Bindungen.....	44
3.1.3 Zusammenfassende Darstellung.....	45
3.2 Quantitative Auswertung.....	46
3.2.1 Gesamtproteinkonzentration.....	46
3.2.2 Surfactantprotein C.....	47
3.2.2.1 Standardkurven.....	47
3.2.2.2 Vergleiche von SP-C zwischen den Krankheitsgruppen.....	49
3.2.2.3 Neutrophile Granulozyten im BAL-Zytospin.....	51
3.2.2.4 Bakteriologische Untersuchungen.....	56
3.2.2.5 Weitere durchgeführte Untersuchungen.....	60
3.2.3 Surfactantprotein B.....	61
3.2.3.1 Standardkurven.....	61
3.2.3.2 Vergleiche von SP-B zwischen den Krankheitsgruppen.....	62
3.2.3.3 Neutrophile Granulozyten im BAL-Zytospin.....	64
3.2.3.4 Bakteriologische Untersuchungen.....	68
3.2.3.5 Weitere durchgeführte Untersuchungen.....	72
4. Diskussion.....	74
4.1 Qualitative Auswertung.....	74
4.1.1 Surfactantprotein C.....	74
4.1.2 Surfactantprotein B.....	76
4.2 Quantitative Auswertung.....	76
4.2.1 Gesamtproteinkonzentration.....	76
4.2.2 Surfactantprotein C	77
4.2.3 Surfactantprotein B.....	78
5. Zusammenfassung.....	80

6. Anhang	81
6.1 Abbildungen.....	81
6.1.1 Surfactantprotein C.....	81
6.1.1.1 Neutrophile Granulozyten im BAL-Zytospin.....	81
6.1.1.2 Forcierte expiratorische Einsekundenkapazität.....	84
6.1.1.3 Patientenalter.....	85
6.1.1.4 Vergleiche zwischen männlichen und weiblichen Patienten.....	86
6.1.2 Surfactantprotein B.....	87
6.1.2.1 Neutrophile Granulozyten im BAL-Zytospin.....	87
6.1.2.2 Forcierte expiratorische Einsekundenkapazität.....	90
6.1.2.3 Patientenalter.....	91
6.1.2.4 Vergleiche zwischen männlichen und weiblichen Patienten.....	92
6.2 Tabellen.....	93
6.2.1 Cystische Fibrose.....	93
6.2.2 Chronische Bronchitis.....	95
6.2.3 Pneumonie ohne Immundefekt.....	97
6.2.4 Lungengesunde Kontrollgruppe.....	99
6.2.5 Gruppenübergreifende Daten.....	101
6.2.6 Bakteriologische Daten.....	102
6.3 Literaturverzeichnis.....	104
6.4 Danksagung.....	112
6.5 Lebenslauf.....	113

1. Einleitung

1.1 Cystische Fibrose

Cystische Fibrose (Mukoviszidose, CF) wird autosomal-rezessiv vererbt und ist mit einer Inzidenz von ca. 1 auf 2000 Geburten weltweit eine der häufigsten angeborenen Stoffwechselerkrankungen. Sie wird verursacht durch einen Gendefekt auf dem langen Arm des Chromosoms 7. Dieser führt zu einer veränderten oder, je nach Mutationstyp, sogar fehlenden Expression des so genannten CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) – Proteins, welches als Chloridkanal in epithelialen Zellmembranen fungiert (Vankeerberghen et al. 2002). Bei weltweit bereits über 1000 beschriebenen Mutationen bewirkt die am häufigsten vorkommende eine Deletion von Phenylalanin an Position 508 ($\Delta F 508$) des Proteins (Ratjen und Döring 2003). Sie tritt in ca. 70% der Fälle auf. Als Folge entsteht eine pathologisch veränderte Zusammensetzung der Sekrete exokriner Drüsen mit erhöhter Schleimviskosität und konsekutiver Sekretretention sowie obligat eine pathologische Steigerung des Natrium- und Chloridgehalts im Schweiß, was zu diagnostischen Zwecken genutzt werden kann.

Am schwersten von den Veränderungen betroffen sind in der Regel die Atmungsorgane, wo es im Verlauf der Erkrankung häufig zu obstruktiven Emphysemen, Atelektasen und Bronchiektasen sowie wiederholt zu eitrigen Bronchitiden und Pneumonien kommt. Letztere entstehen durch sekundäre bakterielle Infektionen, woran vor allem die Keime *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylokokkus aureus* und *Haemophilus influenzae* beteiligt sind. Weiterhin werden auch der Verdauungstrakt, das Pankreas und das hepatobiliäre System in Mitleidenschaft gezogen, woraus Komplikationen wie chronische Verdauungsinsuffizienz mit Gedeihstörungen, Leberzirrhose, Rektumprolaps und Diabetes mellitus resultieren können (Reinhardt 2003). Bei männlichen Betroffenen führt außerdem eine Schädigung der Samenleiter in ca. 98% der Fälle zur Infertilität.

Die Prognose der Cystischen Fibrose hat sich in den vergangenen Jahren durch frühere Diagnosestellung und neue Therapieoptionen kontinuierlich verbessert. Die durchschnittliche Lebenserwartung der Erkrankten liegt derzeit in Ländern, die über optimale therapeutische Möglichkeiten verfügen, bereits bei über 30 Jahren. Häufigste Todesursache ist nach wie vor die Entwicklung einer respiratorische Insuffizienz (Gibson et al. 2003).

1.2 Surfactant

1.2.1 Biochemische Zusammensetzung, Synthese und Funktion

Pulmonales Surfactant ist ein komplexes Gemisch, welches zu etwa 90% aus Lipiden (überwiegend Phospholipide) und zu etwa 10% aus Proteinen besteht. Den Hauptanteil der Phospholipide stellt Phosphatidylcholin, von dem mehr als 65% in gesättigter Form als Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) vorliegen. Bei den Proteinen spielen mengenmäßig neben den weiter unten besprochenen Surfactantproteinen vor allem Serumproteine eine wichtige Rolle (Griese 1999).

Surfactant (Abkürzung des englischen Begriffs „**surface active agent**“) verdankt seinen Namen den stark oberflächenaktiven Eigenschaften des Gemisches. Es ist in der Lage, die alveoläre Oberflächenspannung während der Expiration von etwa 70 mN/m an einer reinen Luft-Wasser-Grenzschicht auf ein Minimum von nahezu 0 mN/m herabzusetzen (Griese 1999; Perez-Gil 2002), wodurch ein endexpiratorischer Kollaps der Alveolen verhindert wird. Außerdem spielt es eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Krankheitserregern in der Lunge (Haagsman und Diemel 2001).

Pulmonales Surfactant wird im endoplasmatischen Retikulum von Typ-II-Pneumozyten synthetisiert, die ungefähr 10% der Alveolaroberfläche ausmachen. Es wird zunächst in Form von Lamellarkörperchen intrazellulär gespeichert und anschließend in den Alveolarraum sezerniert (van Golde et al. 1988; Haagsman et al. 1991), wobei die Exozytose durch Hyperventilation sowie durch Agonisten für β -adrenerge Rezeptoren stimuliert wird (Griese et al. 1993). Hier kommt es schließlich in Anwesenheit von Kalziumionen und der Surfactantproteine A und B zur Bildung von tubulärem Myelin, welches nach vorherrschender Meinung als Reservoir für den die Oberflächenspannung reduzierenden Phospholipidfilm an der Luft-Flüssigkeitsgrenze der Alveolen dient (ten Brinke et al. 2002). Durch Kompressionvorgänge während der Atmung wird Surfactantmaterial aus dem Film gepresst und bildet in der wässrigen Hypophase Vesikel, welche zum Großteil durch Typ-II-Pneumozyten wieder aufgenommen werden. Auf diese Weise können etwa 85% der Phospholipide recycelt werden (Robertson et al. 1992), während weitere 10% durch Alveolarmakrophagen abgebaut und ein kleiner Anteil über die Atemwege entfernt wird. Abbildung 1.1 zeigt vereinfacht den pulmonalen Surfactantmetabolismus und die Bildung des Phospholipidfilms an der Luft-Flüssigkeitsgrenze in den Alveolen.

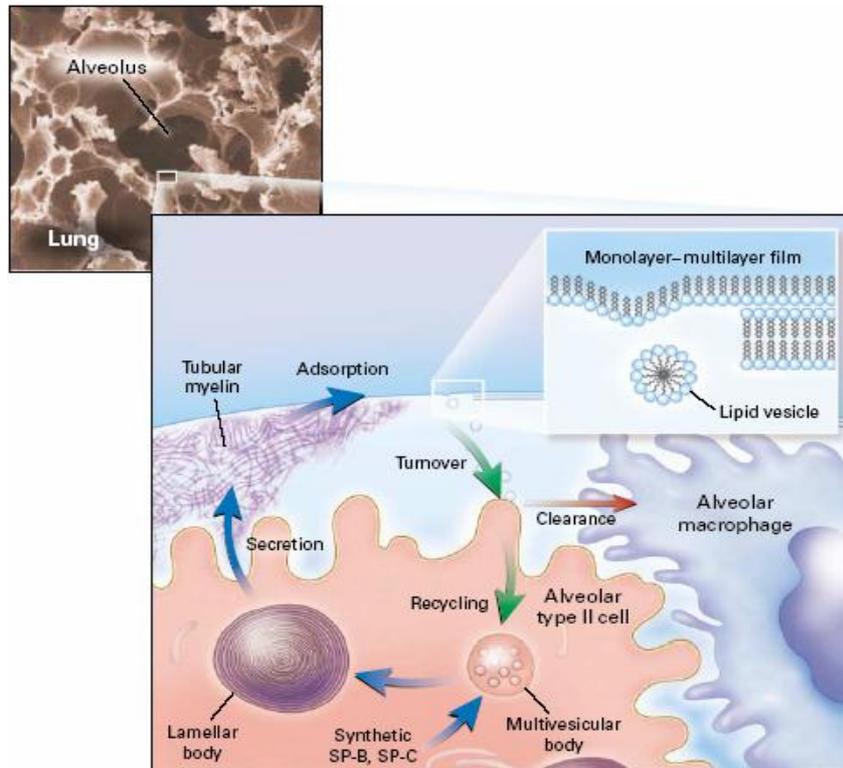


Abbildung 1.1: Vereinfachte Darstellung des pulmonalen Surfactantmetabolismus mit Bildung der alveolären Phospholipid-Doppelmembran (aus Whitsett und Weaver 2002).

1.2.2 Surfactantproteine

Bisher wurden vier surfactantspezifische Proteine identifiziert, die nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit den Buchstaben A bis D bezeichnet wurden (Possmayer 1988). Es können die hydrophilen und mit Molekulargewichten von ca. 32 bzw. 43 kDa schwereren Surfactantproteine A (SP-A) und D (SP-D) aus der Gruppe der Kollektine von den hydrophoben und leichteren Surfactantproteinen B (SP-B) und C (SP-C) unterschieden werden, auf die unter 1.2.2.1 und 1.2.2.2 noch näher eingegangen wird. Abbildung 1.2 gibt einen Überblick über die relativen Größen und die Struktur der einzelnen Proteine.

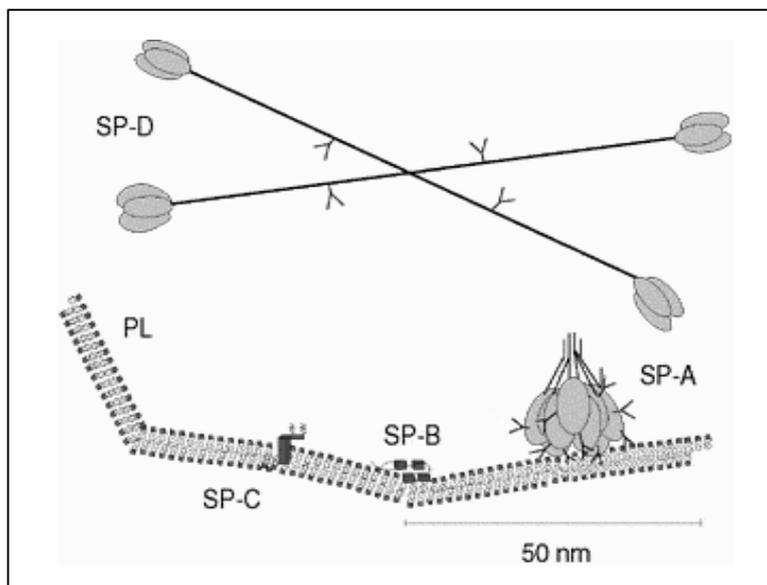


Abbildung 1.2: Struktur und relative Größe der Phospholipide und der Surfactantproteine A bis D (aus Griese 1999). Während SP-D extrazellulär überwiegend in freier Form vorliegt, sind die übrigen Surfactantproteine zumeist an Phospholipide (PL) gebunden.

Das mengenmäßig wichtigste Surfactantprotein ist SP-A. Es ist für etwa 5-6% des Trockengewichts von pulmonalem Surfactant verantwortlich (Perez-Gil 2002). Neben seiner Beteiligung bei der strukturellen Organisation des alveolären Surfactantfilms spielt SP-A, zusammen mit SP-D, durch seine Fähigkeit, sich an die verschiedensten Krankheitserreger und Allergene sowie an alveoläre Makrophagen zu binden, vor allem bei der unspezifischen Immunabwehr der Lunge eine entscheidende Rolle (Haagsman und Diemel 2001).

1.2.2.1 Surfactantprotein B (SP-B)

Surfactantprotein B ist ein positiv geladenes Peptid aus der Gruppe der Saposine, bestehend aus 79 Aminosäuren (davon 52% hydrophob) mit einem Molekulargewicht von etwa 8 kDa. Es wird von den Exons 6 und 7 auf dem kurzen Arm des Chromosoms 2 kodiert (Vamvakopoulos et al. 1995) und von Typ-II-Pneumozyten und Clara-Zellen aus einem höhermolekularen Präprotein (Pro-SP-B) synthetisiert, wobei die vollständige Prozessierung von Pro-SP-B zu SP-B lediglich in Typ-II-Pneumozyten erfolgt (Nogee 2002). Die SP-B-

Moleküle besitzen eine α -helikale Struktur, welche über drei intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert wird. Die Ausbildung einer weiteren Disulfidbrücke zwischen zwei SP-B-Molekülen durch die Aminosäure Cystein in Position 48 führt dazu, dass das Peptid im Alveolarraum hauptsächlich als Dimer vorliegt (Weaver und Conkright 2001). In Abbildung 1.3 sind die einzelnen Schritte der Prozessierung von SP-B aus seinen höhermolekularen Vorstufen dargestellt.

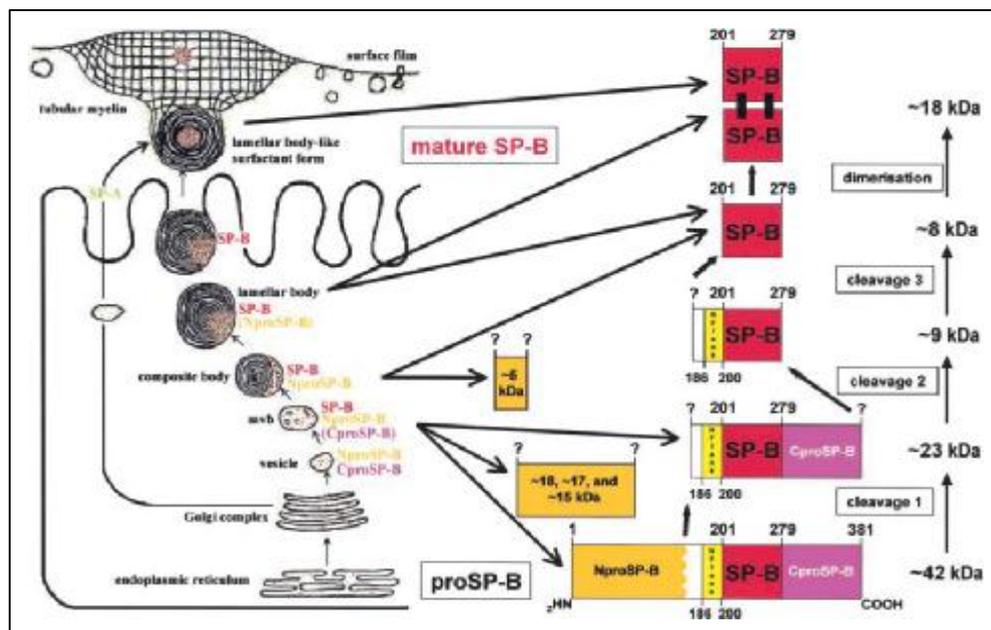


Abbildung 1.3: Proteolytische Prozessierung von Pro-SP-B zu SP-B in Typ-II-Pneumozyten (aus Brasch et al. 2003). Nach der intrazellulären schrittweisen Abspaltung der N- und C-terminalen Bereiche erfolgt extrazellulär die Ausbildung von SP-B-Dimeren.

Die Hauptfunktion von Surfactantprotein B liegt in der Beschleunigung der Ausbildung des oberflächenaktiven Surfactantfilms an der Luft-Flüssigkeitsgrenze der Alveolen, wobei die Adsorptionsrate der Phospholipide durch die Anwesenheit des Proteins etwa um den Faktor 150 gesteigert wird. Weiterhin ist SP-B, zusammen mit SP-A und Kalzium, an der Bildung von tubulärem Myelin beteiligt (Griese 1999; Hawgood 2004). Außerdem wurden anti-inflammatorische sowie schützende Eigenschaften gegenüber sauerstoffinduzierten Lungenschäden beschrieben (Tokieda et al. 1999; Miles et al. 1999).

Eine angeborene homozygote SP-B-Defizienz führt zu neonatalem Atemnotsyndrom mit pulmonaler Alveolarproteinose und zum Tod durch respiratorische Insuffizienz im ersten Lebensjahr (Nogee et al. 1993).

1.2.2.2 Surfactantprotein C (SP-C)

Surfactantprotein C wird von einem Gen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 8 kodiert und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 4 kDa. Das aus 35 Aminosäuren (davon 69% hydrophob) bestehende Peptid wird wie SP-B aus einer höhermolekularen Vorstufe (Pro-SP-C) gebildet, woran, im Gegensatz zur Synthese der übrigen Surfactantproteine, ausschließlich Typ-II-Pneumozyten beteiligt sind. Es ist darüber hinaus das einzige Surfactantprotein, welches bisher ausschließlich in Lungengewebe nachgewiesen werden konnte (ten Brinke et al. 2002). SP-C liegt zumeist als Monomer in dipalmyliertem Zustand vor, wodurch seine hydrophoben Eigenschaften noch verstärkt werden. Zusätzlich existieren in geringerem Ausmaß zahlreiche Isoformen mit zum Teil unterschiedlichen Strukturen (Johansson 1998). So kann es z.B., speziell bei Vorliegen von depalmyliertem SP-C, zu Aggregationen und zur Bildung von β -Amyloid-Fibrillen anstelle der ansonsten vorherrschenden transmembranösen α -Helix kommen (Gustafsson et al. 1999). Abbildung 1.4 zeigt die einzelnen Schritte der Prozessierung von SP-C aus Pro-SP-C, Abbildung 1.5 die tertiäre Struktur von SP-B und SP-C und ihre relative Lage zur Phospholipid-Doppelmembran.

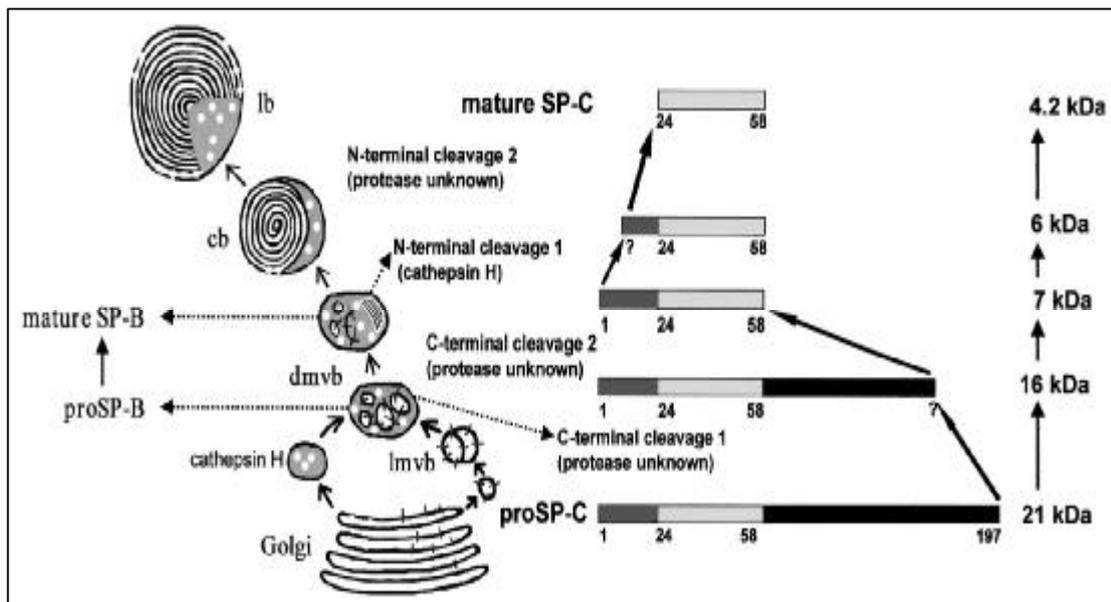


Abbildung 1.4: Proteolytische Prozessierung von SP-C aus seinen höhermolekularen Vorstufen (aus Brasch et al. 2002). Von dem aus 197 Aminosäuren bestehenden Präprotein werden in vier Schritten die N- und C-terminalen Bereiche abgespalten; die Aminosäuren 24 bis 58 bilden schließlich das reife Surfactantprotein C.

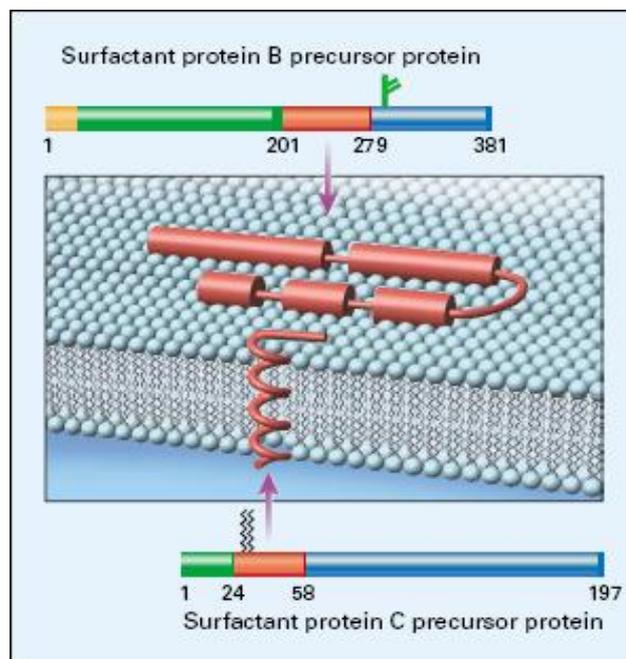


Abbildung 1.5: Surfactantproteine B und C: Tertiäre Strukturen und relative Lage zur Phospholipid-Doppelmembran (aus Whitsett und Weaver 2002).

SP-C beschleunigt wie SP-B die Adsorptionsrate der Phospholipide an der Luft-Flüssigkeitsgrenze der Alveolen, wodurch der alveoläre Surfactantfilm stabilisiert und seine biophysikalische Oberflächenaktivität verstärkt wird (Oosterlaken-Dijksterhuis et al. 1991; Qanbar et al. 1996). Zusätzlich kommt es zu einer Verbesserung der Resistenz von Surfactant gegenüber den hemmenden Einflüssen von Serumproteinen und Ödemflüssigkeit sowie zu einer gesteigerten Aufnahme von Phospholipiden in Typ-II-Pneumozyten, woran auch SP-B beteiligt ist (Griese 1999).

Während die hereditäre SP-B-Defizienz bei Neugeborenen u. a. auch zu einer inkompletten Synthese von SP-C und Anhäufung von SP-C-Vorstufen im Alveolarraum führt (Vorbroke et al. 1995), ergaben Untersuchungen an SP-C-defizienten Mäusen eine normale Prozessierung von SP-B (Glasser et al. 2001). Eine angeborene fehlende oder veränderte Expression von SP-C führt im Allgemeinen nicht zur Entwicklung einer gestörten Lungenfunktion des Neugeborenen, wird aber mit dem Auftreten von interstitiellen Lungenerkrankungen im Jugend- und Erwachsenenalter in Zusammenhang gebracht (Amin et al. 2001, Noguee et al. 2001, Thomas et al. 2002).

1.2.3 Surfactant bei CF und anderen Lungenerkrankungen

Bei verschiedenen Lungenerkrankungen wurden unterschiedliche und zum Teil charakteristische Veränderungen in der Zusammensetzung der in pulmonalem Surfactant enthaltenen Phospholipide und Proteine beschrieben. Das Ausgangsmaterial der Untersuchungen wird im Allgemeinen durch bronchoalveoläre Lavage (BAL) gewonnen.

Bei Patienten mit Cystischer Fibrose ergaben sich bei verschiedenen Untersuchungen keine signifikanten Veränderungen der Gesamtprotein- oder Phospholipidkonzentrationen in der BAL (Griese et al. 1997; Postle et al. 1999). Es zeigten sich allerdings erhöhte SP-A-Konzentrationen bei jüngeren Kindern mit Cystischer Fibrose (Hull et al. 1997), während ältere CF-Patienten durchgehend verminderte Konzentrationen des Proteins aufwiesen (Griese et al. 1997; Postle et al. 1999; Meyer et al. 2000). Bestimmungen von SP-D bei jüngeren CF-Patienten sowie solchen mit fortgeschrittenerer Lungenerkrankung ergaben reduzierte Konzentrationen (Postle et al. 1999; Noah et al. 2003), wobei in beiden Studien auch die zum Zeitpunkt der Untersuchungen bei den Patienten bestehenden hohen Entzündungsaktivitäten eine Rolle gespielt haben können. Sowohl bei Messungen von SP-A als auch von SP-D wurden negative Korrelationen mit dem Ausmaß der Entzündungsaktivität zum Zeitpunkt der Lavage beobachtet (Noah et al. 2003). Über die Surfactanproteine B und C bei Cystischer Fibrose liegen, wie auch bei anderen Lungenerkrankungen, nur wenige Daten vor. Untersuchungen von Griese et al. 1997 und 2004 ergaben unveränderte Werte für SP-B bei Patienten mit CF im Vergleich zu lungengesunden Kontrollgruppen, bei leicht erhöhten SP-C-Konzentrationen (Griese et al. 2004). Letztere wurden auch bei anderen Erkrankungen mit erhöhter pulmonaler Entzündungsaktivität beobachtet (Griese et al. 2002).

Bei Kindern mit bakteriellen Pneumonien zeigten sich neben einer Verminderung der Konzentration von Phosphatidylcholin in der Lavage auch erniedrigte Werte für SP-A, nicht jedoch für SP-B (Günther et al. 1996; LeVine et al. 1996). Für Patienten mit chronischer nicht-obstruktiver Bronchitis wurden teilweise ähnliche Veränderungen in der Zusammensetzung des Lavagematerials wie bei CF-Patienten beschrieben (Gutkowski et al. 1979; Rudnik et al. 1983); aussagekräftige kontrollierte Studien liegen hierzu allerdings nicht vor.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Insgesamt liegen nur sehr wenige Daten über SP-B und SP-C bei Lungenerkrankungen oder Erkrankungen mit pulmonaler Beteiligung vor. Insbesondere existieren hierfür keine vergleichenden Studien zwischen Patienten mit Cystischer Fibrose und anderen Lungenerkrankungen. Außerdem wurden bisher lediglich für die hydrophilen Surfactantproteine A und D Veränderungen in Abhängigkeit von der pulmonalen Entzündungsaktivität beschrieben (Noah et al. 2003).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die hydrophoben Surfactantproteine B und C bei Patienten mit Cystischer Fibrose, Pneumonie, chronischer Bronchitis sowie einer lungengesunden Kontrollgruppe sowohl qualitativ als auch quantitativ darzustellen. Wir stellten außerdem die Hypothese auf, dass es unabhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung zu quantitativen Veränderungen von SP-B und SP-C bei gesteigerter pulmonaler Entzündungsaktivität kommt.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektive und Kontrollgruppe

2.1.1 Cystische Fibrose

Es wurde BAL-Material von 21 CF-Patienten im Alter von 9,0 bis 19,9 Jahren (Median 14,0) untersucht, die im Rahmen einer deutschlandweiten Mukoviszidose-Studie eine bronchoalveoläre Lavage erhalten hatten (Paul et al. 2004). Die Diagnose „Cystische Fibrose“ war durch wiederholte Schweißtests mit Chloridkonzentrationen über 60 mmol/l und/oder durch Nachweis spezifischer Mutationen im CFTR-Gen bei jedem einzelnen Patienten gesichert worden.

Der Anteil der neutrophilen Granulozyten im Zytospin der Lavage (2. - 4. Fraktion gepoolt), welcher als Indikator für den Schweregrad der pulmonalen Krankheitsaktivität herangezogen wurde, betrug zwischen 0,7 und 93,1% (Median 40,6). Ein Auszug klinischer Parameter kann Tabelle 2.1 entnommen werden.

Tabelle 2.1: Klinische Daten der CF-Patienten

Patient	Alter [Jahre]	Geschlecht	FEV1 [%-soll]	Zellen Pool [mal 10 ⁶ /ml]	Neutrophile Granulozyten Pool Zytospin [%]
CF 1	19,9	männlich	98,9	6,40	0,7
CF 2	12,4	männlich	87,5		1,0
CF 3	9,6	weiblich	93,1	2,97	1,3
CF 4	9,0	weiblich	77,6	0,34	1,5
CF 5	12,1	weiblich	95,7	8,84	2,0
CF 6	18,1	männlich	125,3	8,15	2,4
CF 7	13,8	weiblich	102,0	0,36	4,1
CF 8	11,3	männlich	61,3	0,44	24,3
CF 9	17,1	weiblich	93,9	0,91	25,6
CF 10	11,3	männlich	95,8	0,61	34,0
CF 11	10,3	weiblich	83,0	1,16	40,6
CF 12	16,8	weiblich	112,7	8,45	44,6
CF 13	12,8	weiblich	105,5	44,85	49,7
CF 14	14,6	männlich	67,2	1,11	57,5
CF 15	19,3	männlich	96,5	0,58	76,0
CF 16	14,0	weiblich	80,7	9,14	78,6
CF 17	17,4	weiblich	89,0	309,20	81,0
CF 18	17,0	männlich	41,8	55,00	84,2
CF 19	18,7	männlich	84,9	19,00	91,0
CF 20	14,0	männlich	68,7	121,60	92,0
CF 21	14,3	weiblich	81,0	57,00	93,1

2.1.2 Chronische Bronchitis

Nach sorgfältiger Sichtung von Patientenakten des Dr.-von-Hauerschen Kinderspitals wurden anhand klinischer, radiologischer und bronchoskopischer Befunde 29 Patienten ausgewählt und den Gruppen „chronische Bronchitis“ (15 Patienten) und „Pneumonie ohne Immundefekt“ (14 Patienten – siehe 2.1.3) zugeordnet.

Voraussetzung für die Einteilung in die Gruppe „chronische Bronchitis“ waren folgende Einschlusskriterien:

- anhaltender Husten von mindestens dreimonatiger Dauer
- bronchoskopisch diagnostizierte Krankheitsaktivität.

Ausgeschlossen bzw. einer anderen Kategorie zugeteilt wurden Patienten mit

- der ärztlichen Diagnose „Asthma bronchiale“
- einem radiologisch nachgewiesenen pneumonischen Infiltrat

als Ursache für den chronischen Husten.

Das Alter in der Gruppe „chronische Bronchitis“ zum Zeitpunkt der BAL betrug 0,3 bis 16,7 Jahre (Median 4,2). Klinische Daten sind in Tabelle 2.2 vermerkt.

Tabelle 2.2: Klinische Daten der Patienten mit chronischer Bronchitis

Patient	Alter [Jahre]	Geschlecht	Zellen Pool [mal 10 ⁴ /ml]	Neutrophile Granulozyten Pool Zytospin [%]
B 1	0,8	männlich	13,0	0,0
B 2	11,2	weiblich	7,0	0,4
B 3	16,7	weiblich	5,4	1,0
B 4	0,3	weiblich	26,0	1,0
B 5	4,2	männlich	28,0	2,0
B 6	9,6	weiblich	5,5	2,0
B 7	2,8	weiblich	30,0	2,0
B 8	4,1	männlich	15,0	2,0
B 9	5,3	weiblich	14,0	2,0
B 10	0,7	weiblich	16,7	3,0
B 11	0,7	weiblich	10,5	4,0
B 12	7,1	weiblich	18,0	7,0
B 13	1,8	männlich	27,5	8,0
B 14	4,6	männlich	14,5	8,0
B 15	7,2	weiblich	12,5	8,0

2.1.3 Pneumonie ohne Immundefekt

Einschlusskriterien für die Zuteilung zu dieser Patientengruppe waren:

- zum Zeitpunkt der BAL bestehende klinische Symptome einer Pneumonie (Husten und/oder Fieber)
- ein im Röntgen-Thorax oder Computertomogramm nachgewiesenes pneumonisches Infiltrat

Als Ausschlusskriterien wurden

- atypische (interstitielle) Pneumonien
- bestehende Immundefekte
- onkologische Erkrankungen als Grundlage der Pneumonie

festgelegt.

Das Alter in dieser Gruppe betrug 0,3 bis 6,0 Jahre (Median 2,1). Eine kurze klinische Charakterisierung zeigt Tabelle 2.3.

Tabelle 2.3: Klinische Daten der Patienten mit Pneumonie

Patient	Alter [Jahre]	Geschlecht	Zellen Pool [mal 10 ⁴ /ml]	Neutrophile Granulozyten Pool Zytospin [%]
P 1	0,3	männlich	5,5	0
P 2	6,0	weiblich	5,5	1
P 3	0,3	männlich	33,0	2
P 4	5,3	weiblich	11,5	3
P 5	1,2	männlich	108,5	4
P 6	4,5	weiblich	19,6	7
P 7	1,8	männlich	10,4	9
P 8	1,5	männlich	43,5	17
P 9	1,0	männlich	20,0	19
P 10	0,8	männlich	21,0	21
P 11	3,9	weiblich	56,5	46
P 12	3,8	männlich	61,0	66
P 13	2,4	männlich	8,6	71
P 14	5,2	weiblich	45,0	80

2.1.4 Lungengesunde Kontrollgruppe

Diese Gruppe stellte 10 Kinder im Alter von 0,5 bis 10,8 Jahren sowie 4 junge Erwachsene im Alter von 22,6 bis 26,8 Jahren dar (Median insgesamt 7,6), bei denen keine Erkrankung mit pulmonaler Beteiligung vorlag. Die BAL-Proben waren hier im Einverständnis mit den Patienten bzw. ihren Erziehungsberechtigten im Rahmen von Operationen im chirurgischen, dermatologischen oder Hals-Nasen-Ohren-Bereich gewonnen worden. Tabelle 2.4 zeigt einige klinische Parameter.

Tabelle 2.4: Klinische Daten der lungengesunden Kontrollgruppe

Patient	Alter [Jahre]	Geschlecht	Zellen Pool [mal 10 ⁴ /ml]	Neutrophile Granulozyten Pool Zytospin [%]
K 1	1,6	weiblich	4,9	0,0
K 2	6,5	weiblich	7,2	0,0
K 3	26,8	männlich	3,2	0,5
K 4	9,2	männlich	10,0	1,0
K 5	4,8	männlich	15,5	1,0
K 6	10,8	männlich	10,0	1,0
K 7	0,5	weiblich	20,0	1,0
K 8	22,6	männlich	0,2	1,2
K 9	23,9	männlich	0,6	1,5
K 10	24,8	männlich	0,7	1,7
K 11	1,4	weiblich	10,9	2,0
K 12	4,7	weiblich	8,0	2,0
K 13	2,8	männlich	8,3	2,0
K 14	8,7	männlich	18,0	3,0

2.2 Durchführung der Bronchoalveolären Lavage

Die Bronchoskopie wurde in Anästhesie (Midazolam 0,2 bis 0,3 mg/kg Körpergewicht) mittels eines flexiblen Bronchoskops mit einem Durchmesser von 3,5 mm bei Patienten < 10 Jahre bzw. 4,9 mm bei Patienten > 10 Jahre durchgeführt. Das Bronchoskop wurde entweder in ein Subsegment des Mittellappens, der Lingula oder in die betroffene Region der entsprechenden Lungenhälfte lumenverschießend („Wedge Position“) eingeführt. Anschließend wurde die bronchoalveoläre Lavage mit auf 37° C vorgewärmter steriler 0,9%-iger NaCl-Lösung durchgeführt, welche instilliert und sofort wieder abgesaugt wurde. Das Volumen hierfür betrug 4 mal 1 ml/kg Körpergewicht (maximal 50 ml), wobei das Volumen der ersten Spülung (1. Fraktion) getrennt von den weiteren drei Spülungen (gepoolte 2. - 4. Fraktion) aufbereitet und untersucht wurde.

Bei Patienten der lungengesunden Kontrollgruppe erfolgte die Lavage unmittelbar nach Intubation über einen durch den liegenden Tubus eingeführten Absaugkatheter mit Endloch.

Die 1. Fraktion und die Pool-Fraktion wurden separat über sterilisierte Gaze-Filter gereinigt, um gröbere Verunreinigungen zu beseitigen, bevor jeweils ein Aliquot zur mikrobiologischen und virologischen Untersuchung entnommen wurde.

Gesamtzellzahlen und Differentialzellbild wurden anschließend im Zytospin nach May-Grünwald-Giemsa-Färbung untersucht, wobei die 1. Fraktion im Allgemeinen den überwiegenden Teil der abgeschilferten Epithelzellen (Riedler 1995) und die Pool-Fraktion einen relativ höheren Anteil an Lymphozyten (Pohunek 1996) enthält.

Für die folgenden Untersuchungen der Surfactantparameter wurde ausschließlich der nach Zentrifugation zur Zellgewinnung verbleibende Überstand der jeweiligen Pool-Fraktion verwendet.

Die Verwendung der Restmaterialien der BAL-Proben wurde von der Ethikkommission der LMU genehmigt. Das schriftliche Einverständnis der jeweiligen Patienten bzw. ihrer Erziehungsberechtigten lag ebenfalls vor.

2.3 Quantitative Gesamtproteinbestimmung

- Material:
- BioRad Farbstoffreagenz für Proteineassay (BioRad Laboratories GmbH, Nr. 500-0006)
 - Greiner Mikrotiterplatten, transparent, niedrigaffin (Greiner Labortechnik)
 - Anthos HT 3 Photometer (Anthos Labtec Instruments, Typ 12600)
 - Bovines Serumalbumin V, BSA (Paesel und Lorei, Nr. 100568)
 - Aqua ad injectabilia (Braun Melsungen AG, Nr. 3703452)
 - Filterpapier

- Puffer:
- PBS-Puffer

Tabelle 2.5: Zusammensetzung des PBS-Puffers

Na ₂ HPO ₄	0,178 g
NaH ₂ PO ₄	1,560 g
NaCl	8,760 g
H ₂ O (Aqua ad inj.)	in 1000 ml lösen und mit NaOH/HCl auf pH 7,4 titrieren

Methode:

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in den BAL-Proben der Patienten wurde die Methode nach Bradford (Bradford 1976) herangezogen. Das BioRad Farbstoffreagenz wurde hierfür im Verhältnis 1:5 mit Aqua ad injectabilia verdünnt und anschließend filtriert. Als Standardreihe wurde durch serielle Verdünnung einer Ausgangslösung (100 mg BSA in 10 ml PBS-Puffer) eine Verdünnungsreihe mit sieben verschiedenen Proteinkonzentrationen zwischen 5000 und 78 µg/ml erstellt. Zusätzlich wurde bei jeder Messung reiner PBS-Puffer als Leerwert mitgeführt. Es erfolgte eine Doppelbestimmung der Standardproben sowie eine Dreifachbestimmung der Patientenproben, wobei jeweils 5 µl Probenvolumen mit 100 µl BioRad Farbreagenz versetzt wurde. Im Photometer konnte dann die Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt und unter Berücksichtigung der Leer- und Standardwerte in Proteinkonzentrationen umgerechnet werden. Bei Konzentrationen über- oder unterhalb des

linearen Bereichs der Standardkurve wurden weitere Messungen mit geringeren bzw. höheren Probenvolumina vorgenommen und erhaltene Werte entsprechend umgerechnet.

2.4 1-D Gelelektrophorese und Westernblotanalyse

- Material:
- Eppendorf Reaktionsgefäße 0,5 ml
 - Bachhofer Vakuumzentrifuge (Bachhofer GmbH, Typ BA-VC 300H)
 - Vakuumpumpe (WKF, Typ L 05-60)
 - Wasserbad Julabo Paratherm S100
 - Gelkammer Novex XCell II Mini Cell (Invitrogen, EI 9001)
 - Blotkammer Novex XCell II Blot Module (Invitrogen, EI 9051)
 - Netzgerät Novex Powerease 500 (Invitrogen, EI 8700)
 - Nitrocellulosemembranen (Millipore, Immobilon IPVH 00010)
 - Filterpapier (Whatman, Nr. 1003-917)
 - Sponge Pad Schwämme (Invitrogen, EI 9052)
 - MGW Laser- und Kopierfolie
 - Entwicklungskassette (Amersham, RPN 11642)
 - Röntgenfilme (Amersham, RPN 3103K)
 - Entwicklungsmaschine (AGFA, CP 1000)
 - NuPage 10 % Bis-Tris Gel 1,0 mm (Invitrogen, NP 0301)
 - NuPage Antioxidant (Invitrogen NP 0005)
 - Teleostean Fischgelatine (SIGMA, Nr. 232-554-6)
 - Aqua ad injectabilia (Braun Melsungen AG, Nr. 3703452)
 - ECL Chemilumineszenzlösung (Amersham RPN 2209)

Puffer:

- MES, Probenpuffer, Transferpuffer, PBS, TBS

Zusammensetzung siehe Tabelle 2.6

Tabelle 2.6: Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Puffer	Chemikalien	Anteil / Menge
MES	NuPage MES SDS Laufpuffer (Invitrogen, NP 0002)	5%
	H ₂ O (Aqua ad inj.)	95%
Probenpuffer	NuPage LDS Probenpuffer (Invitrogen, NP 0007)	25%
	NuPage Reducing Agent (Invitrogen, NP 0004)	10%
	H ₂ O (Aqua ad inj.)	65%
Transfer	NuPage Transferpuffer (Invitrogen, NP 0006)	5%
	Methanol p.a.	20%
	H ₂ O (Aqua ad inj.)	75%
PBS	Na ₂ HPO ₄	1,704 g
	NaH ₂ PO ₄ x 1 H ₂ O	0,414 g
	NaCl	8,766 g
	in H ₂ O (Aqua ad inj.) lösen und auf pH 7,4 titrieren	1000 ml
TBS	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ (Tris)	0,485 g
	NaCl	5,844 g
	Tween 20 (SIGMA, Nr. 9005-64-5)	0,500 g
	in H ₂ O (Aqua ad inj.) lösen und auf pH 7,4 titrieren	1000 ml

Antikörper:**Tabelle 2.7:** Liste der verwendeten Antikörper

Antikörper	Typ	Charge	Hersteller
Anti - SP-B	rekombinant anti-human vom Kaninchen	C 329	Byk-Gulden (Konstanz)
Anti - Pro-SP-B	rekombinant anti-human vom Kaninchen, C-terminal	1/24/00	Guttentag (USA)
Anti - SP-C	rekombinant anti-human vom Kaninchen	22/96	Byk-Gulden (Konstanz)
Anti - Pro-SP-C	rekombinant anti-human vom Kaninchen, N-terminal	D 3219	Beers (USA)
2. Antikörper	anti-Ig-Kaninchen von der Ziege, Peroxidase-konjugiert		DIANOVA (Hamburg)

Methode:

Probenvorbereitung: Nach Bestimmung des Proteingehalts der nativen BAL-Proben (siehe 2.3) wurde jeweils viermal (zur Bestimmung von SP-B und SP-C sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen) das errechnete Probenvolumen für 5 µg Gesamtprotein in Eppendorfgefäße pipettiert. Die Proben wurden in der Vakuumzentrifuge lyophilisiert und dann in jeweils 22 µl Probenpuffer aufgenommen. Zur Bestimmung von SP-B bzw. SP-C unter nicht reduzierenden Bedingungen wurde der Anteil des Reducing Agent im Probenpuffer durch Aqua ad injectabilia ersetzt. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren bei 1000 g für wenige Sekunden erfolgte die 10-minütige Inkubation im Wasserbad bei 70° C und das erneute Vortexen und Zentrifugieren.

Gelelektrophorese: Pro Gel wurden neben sieben Patientenproben MultiMark Standard (Invitrogen, LC 5725) als Molekulargewichtsmarker sowie die jeweiligen Standardproben für SP-B und Pro-SP-B bzw. SP-C und Pro-SP-C aufgetragen (vergleiche Tabelle 2.8).

Die Elektrophorese erfolgte in den Mini Cell Gelkammern bei 200 V und 100 mA für 40 Minuten. Für stabile Bedingungen sorgte die vorherige Zugabe von Antioxidant zum MES-Laufpuffer.

Tabelle 2.8: Verwendete Standardproben

Standard	Typ	Herkunft
SP-B	SP-B human-dimer	Dr.Schmidt, Innere Medizin (Gießen)
SP-C	rekombinantes humanes SP-C	Byk-Gulden (Konstanz)
Pro-SP-B / Pro-SP-C	BAL-Material eines Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose	Dr.-von-Haunersches Kinderspital (München)

Westernblot: Der Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran wurde im „SemiDry“-Verfahren mit Transferpuffer durchgeführt. Die Transferzeit in den Blotkammern betrug 60 Minuten für SP-B / Pro-SP-B bzw. 120 Minuten für SP-C / Pro-SP-C bei 30 V und 170 mA.

Immunodetektion: Nach dem Westernblot wurden die Membranen für 3 Stunden in PBS-Puffer mit 3% Fischgelatine inkubiert, um eine Absättigung der freien Proteinbindungsstellen

zu erreichen. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper in PBS-Puffer (Verdünnung 1:10000 bzw. 1:5000 bei Antikörpern gegen Pro-Formen). Dabei wurden Membranen mit reduzierten Patientenproben je nach aufgetragener Standardprobe zunächst mit Anti-Pro-SP-B oder Anti-SP-C, Membranen mit nicht reduzierten Proben mit Anti-SP-B bzw. Anti-SP-C inkubiert. Nach Entfernen von überschüssigen, nicht gebundenen Antikörpern durch Waschen mit TBS für 4 mal 15 Minuten wurde mit dem 2. Antikörper in TBS (Verdünnung 1:100000) für 2 Stunden inkubiert. Die Membranen wurden erneut 4 mal 15 Minuten mit TBS gewaschen und danach für jeweils eine Minute mit Chemilumineszenzlösung aktiviert. Anschließend erfolgte die Entwicklung der Röntgenfilme nach Belichtungszeiten von zwei und fünf Minuten.

Membranen mit Patientenproben in reduzierter Form wurden nach kurzer Reinigung in PBS-Puffer erneut mit dem 1. Antikörper (diesmal Anti-SP-B oder Anti-Pro-SP-C) inkubiert und wie oben beschrieben weiter bearbeitet. Membranen mit nicht reduzierten Proben erfuhren keine weitere Inkubation und wurden in PBS-Puffer bei 4° C gelagert.

2.5 Qualitative und Quantitative Auswertung

Nach Entwicklung wurden die fertigen Filme mit dem FluorS Multi-Imager eingescannt und mit Hilfe des Softwareprogramms „Quantity One“ ausgewertet. Neben der qualitativen erfolgte dabei auch eine quantitative Auswertung der Banden von SP-B und SP-C in reduzierter sowie in nicht reduzierter Form. Dazu wurden zunächst die optische Dichte (nach Abzug der Hintergrunddichte des Films) sowie der durchschnittliche Höhendurchmesser jeder Bande bestimmt. Diese Werte wurden miteinander multipliziert und in Relation zur jeweiligen Bandenstärke der Standardprobe gesetzt. Mit Hilfe von Standardkurven für SP-C und SP-B in reduzierter und nicht reduzierter Form konnten Absolutwerte für die vorhandenen Mengen an SP-B bzw. SP-C ermittelt werden. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte sowohl in Bezug auf die Gesamtproteinmenge als auch in Bezug auf das Lavagevolumen.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit Graph Pad Prism Version 4.01 (San Diego, CA, USA) sowie Microsoft Excel 2000 (San Francisco, CA, USA). Für den Vergleich von lediglich zwei Patientengruppen wurde der Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben, bei mehreren Gruppen der Kruskal-Wallis-Test eingesetzt. Falls sich damit ein signifikanter Unterschied ergab, erfolgte anschließend ein Vergleich aller Paare mit dem Post-Test nach Dunn. Das Konfidenzintervall betrug jeweils 95%. Aus Ergebnissen von Mehrfachmessungen wurde jeweils der Mittelwert gebildet. Für die Korrelationsanalysen zwischen unterschiedlichen Parametern wurde der zweiseitige Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Ein P-Wert von $< 0,05$ wurde jeweils als signifikant angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Qualitative Auswertung

3.1.1 Surfactantprotein C

3.1.1.1 Cystische Fibrose

Bei 19 von 21 Patienten mit Mukoviszidose konnte Surfactantprotein C in der bronchoalveolären Lavage sowohl in den unter reduzierenden als auch in den unter nicht reduzierenden Bedingungen untersuchten Proben nachgewiesen werden. Die Westernblots der Patientenproben CF 20 und CF 21 zeigten zunächst auch nach wiederholtem Auftragen des Lavagematerials weder in reduziertem noch in nicht reduziertem Zustand eine Reaktion mit dem SP-C-Antikörper. Die Abbildungen 3.1 und 3.2 zeigen die Ergebnisse der Westernblotanalysen.

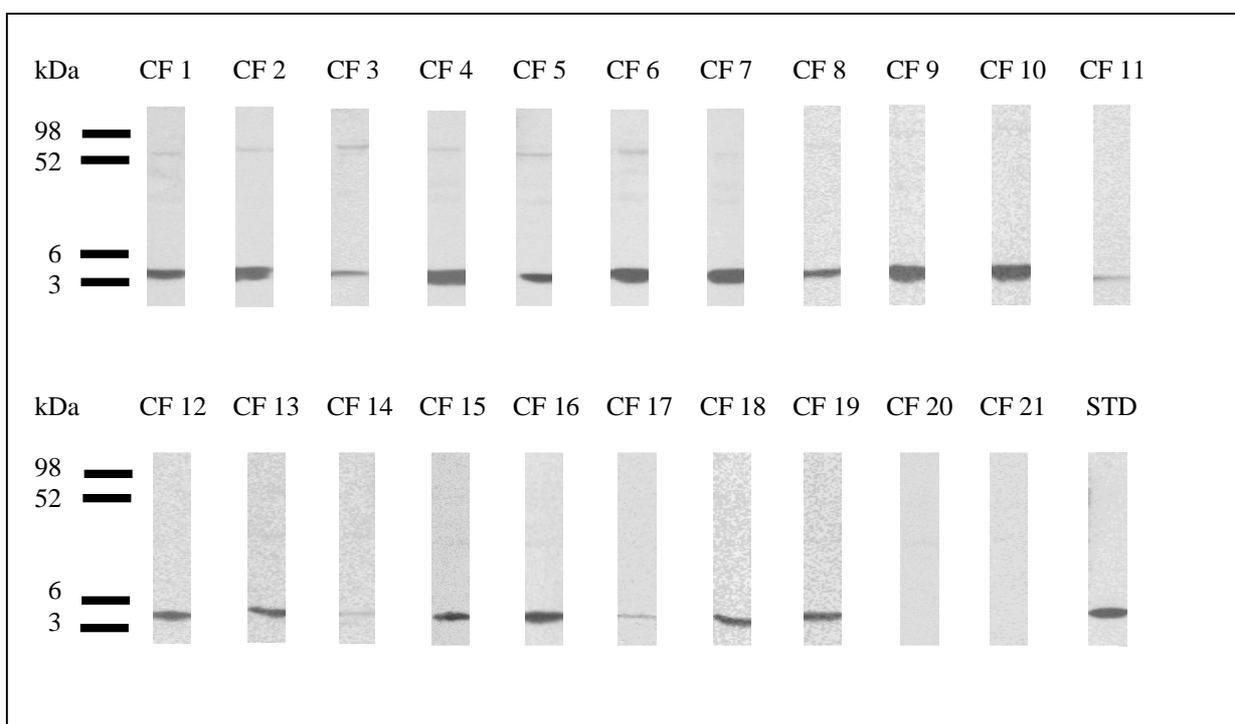


Abbildung 3.1: Darstellung der Westernblotanalysen der CF-Patientenproben und einer Standardprobe (STD) in reduziertem Zustand. Bei 19 von 21 Patienten wurde SP-C mit einem Molekulargewicht von 3,67 bis 5,16 kDa (Median 4,24) detektiert. Es wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein aufgetragen.

Antikörper: Anti-SP-C

Die bei manchen Westernblotanalysen der in reduziertem Zustand aufgetragenen CF-Patientenproben zusätzlich aufgetretenen Banden im höheren Molekulargewichtsbereich (Abbildung 3.1) waren auch bei einigen der in reduziertem Zustand untersuchten Proben der anderen Patientengruppen nachweisbar (siehe 3.1.1.2 bis 3.1.1.5). Ihre Entstehung im Rahmen unspezifischer Antikörperreaktionen wird vermutet und unter 3.1.1.6 näher erläutert.

Weiterhin zeigten sich zusätzliche, zum Teil nur leicht angedeutete, Antikörperreaktionen auch bei einigen in nicht reduziertem Zustand untersuchten Patientenproben der verschiedenen Krankheitsgruppen (Abbildungen 3.2, 3.5, 3.7 und 3.9). Diese stellten sich jeweils knapp oberhalb der SP-C-Bande dar. Hier könnten eventuell vereinzelte kovalente Bindungen zwischen zwei SP-C-Molekülen oder zwischen SP-C und anderen Thiolen entstanden sein, da sich entsprechende Banden nach Reduktion der Proben nicht darstellen ließen (Abbildungen 3.1, 3.3, 3.6 und 3.8).

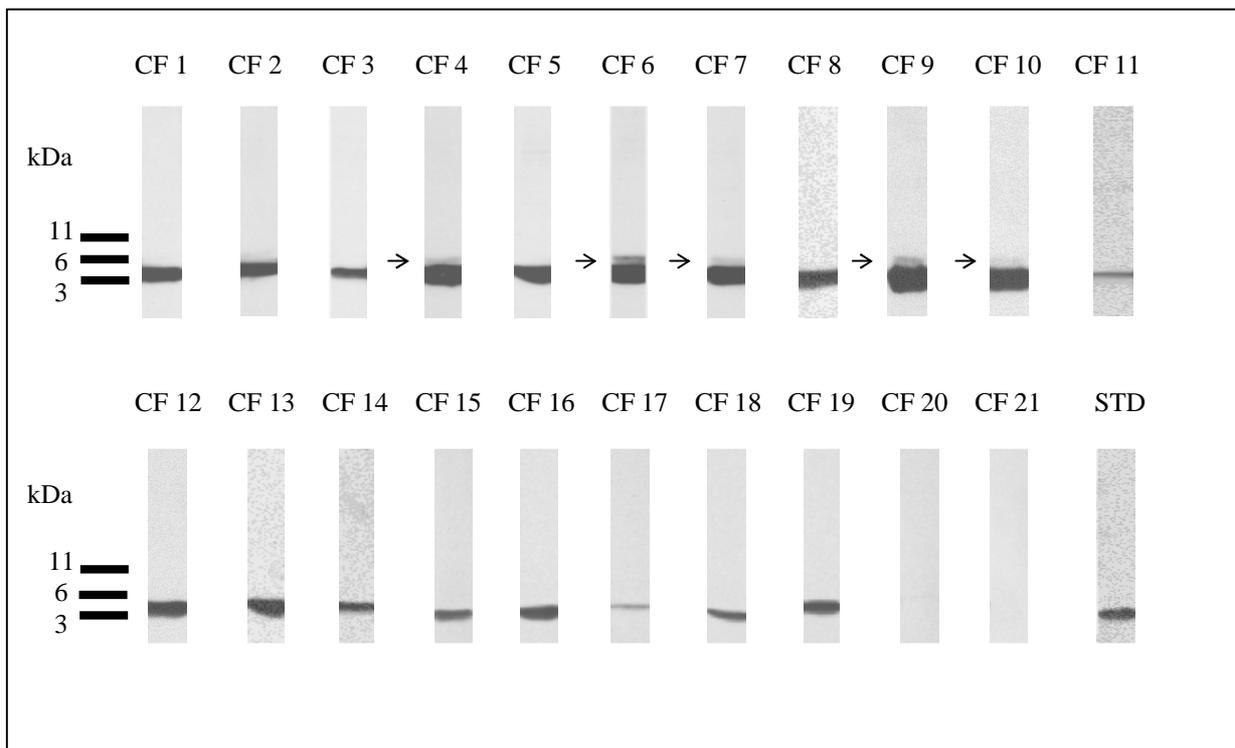


Abbildung 3.2: Darstellung der Westernblotanalysen der CF-Patientenproben und einer Standardprobe (STD) in nicht reduziertem Zustand. Der Nachweis von SP-C gelang hier bei 19 von 21 Patienten mit Molekulargewichten von 4,21 bis 5,05 kDa (Median 4,48), bei fünf Patienten mit einer zusätzlichen Bande (Pfeile) zwischen 6,77 und 7,15 kDa. Es wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein aufgetragen.

Antikörper: Anti-SP-C

In den Patientenproben CF 20 und 21 konnte SP-C, wie oben beschrieben, als einzige dieser Gruppe nicht nachgewiesen werden. Eine Wiederholung der Analyse mit den fünffachen Probenvolumina führte zum gleichen Ergebnis. Auffällig bei diesen Patienten war, dass sie mit 92 bzw. 93,1% einen höheren Gehalt an neutrophilen Granulozyten im Zytospin der Lavage aufwiesen als alle anderen untersuchten Patienten (Tabellen 1.1 bis 1.4).

Ziel war es daher, das Vorhandensein von SP-C unabhängig vom Anteil neutrophiler Granulozyten bei den Patienten CF 20 und 21 zu untersuchen. Hierzu wurde Probenmaterial einer bronchoalveolären Lavage verwendet, welche bei ihnen zu einem 16 Monate späteren (CF 20-2) bzw. 17 Monate früheren (CF 21-2) Zeitpunkt 2 im Vergleich zum Datum der ursprünglich untersuchten Lavage (Zeitpunkt 1) durchgeführt worden war. Abbildung 3.3 zeigt die Darstellung dieser Proben in nicht reduziertem Zustand nach Durchführung der Gelelektrophorese mit Westernblotanalyse, Tabelle 3.1 einen Vergleich der wichtigsten klinischen Daten der beiden Patienten zu den verschiedenen Lavage-Zeitpunkten.

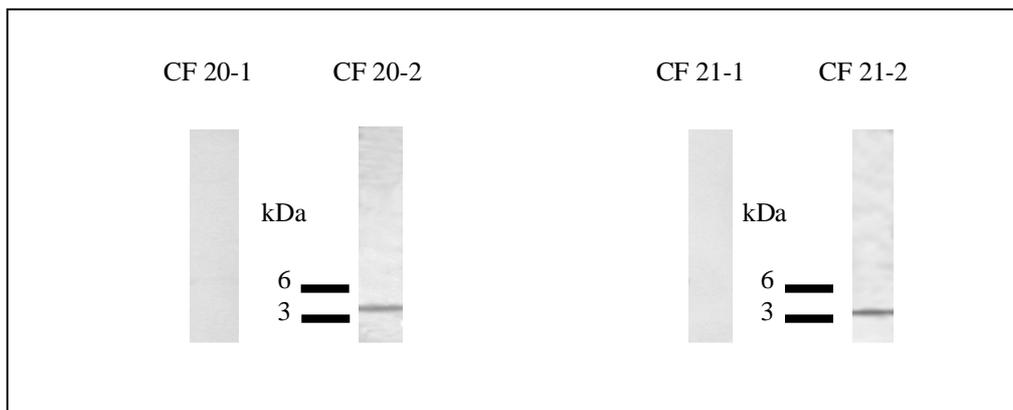


Abbildung 3.3: Westernblotanalysen der CF-Proben 20 und 21 der Lavage 2 nach Inkubation mit dem SP-C-Antikörper. Zum Vergleich sind jeweils links die Ergebnisse der Lavage 1 abgebildet, bei denen SP-C nicht detektiert werden konnte.

Antikörper: Anti-SP-C

Tabelle 3.1: Klinische Daten der Patienten CF 20 und 21 zu den Lavage-Zeitpunkten 1 und 2

Patient	Alter [Jahre]	FEV 1 [%-soll]	Zellen Pool [mal 10 ⁶ /ml]	Neutrophile Granulozyten Pool Zytospin [%]	Nachweis von P. aeruginosa
CF 20-1	14,0	68,74	121,6	92,0	positiv
CF 20-2	15,3	65,71	52,6	57,0	negativ
CF 21-1	14,3	80,95	57,0	93,1	positiv
CF 21-2	12,9	84,74	12,0	43,0	negativ

Im Probenmaterial der zum Zeitpunkt 2 durchgeführten Lavage konnte SP-C bei den Patienten CF 20 und CF 21 detektiert werden. Tabelle 3.1 lässt neben einem deutlich geringeren Anteil neutrophiler Granulozyten im untersuchten Material der zweiten Lavage auch einen positiven Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* im Probenmaterial der ersten Lavage dieser Patienten erkennen. Allerdings wurde der Keim auch in der Lavage-Flüssigkeit von sechs weiteren Patienten der CF-Gruppe nachgewiesen, bei denen SP-C detektiert werden konnte, so dass ein Zusammenhang mit der Abwesenheit von SP-C in den zunächst untersuchten Proben der Patienten CF 20 und 21 lediglich in Kombination mit den hohen Entzündungswerten vermutet werden könnte.

3.1.1.2 Chronische Bronchitis

In dieser Gruppe wurde SP-C zunächst sowohl in reduziertem als auch in nicht reduziertem Zustand in 14 der 15 untersuchten Lavageproben detektiert. Nach erneutem Auftragen des fünffachen Volumens der Probe B 12 (B 12-2) konnte es aber letztendlich bei allen Bronchitis-Patienten nachgewiesen werden. Durch die nun erhöhte in der Probe B 12-2 enthaltene Gesamtproteinmenge von 25 µg zeigten sich hier allerdings auch deutlich stärkere weitere Antikörperreaktionen (Abbildungen 3.4 und 3.5), auf die unter 3.1.1.6 noch im Allgemeinen eingegangen wird. Die Ergebnisse der Westernblotanalysen sind in den Abbildungen 3.4 und 3.5 dargestellt.

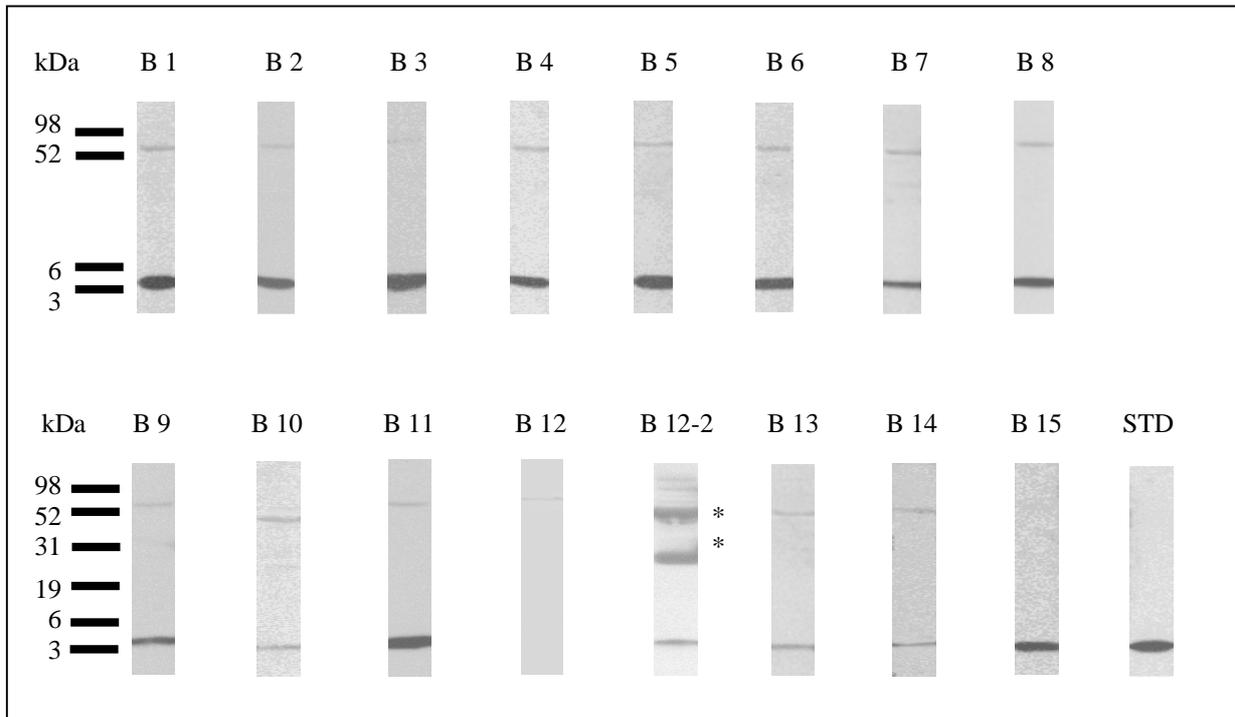


Abbildung 3.4: Westernblotanalysen der Bronchitis-Patientenproben und einer Standardprobe (STD) in **reduzierter** Form. Die SP-C-Banden stellten sich zwischen 3,9 und 5,05 kDa (Median 4,21) dar. Es wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein aufgetragen (Probe B 12-2: 25 µg, daher hier vermehrt unspezifische Antikörperreaktionen: *).

Antikörper: Anti-SP-C

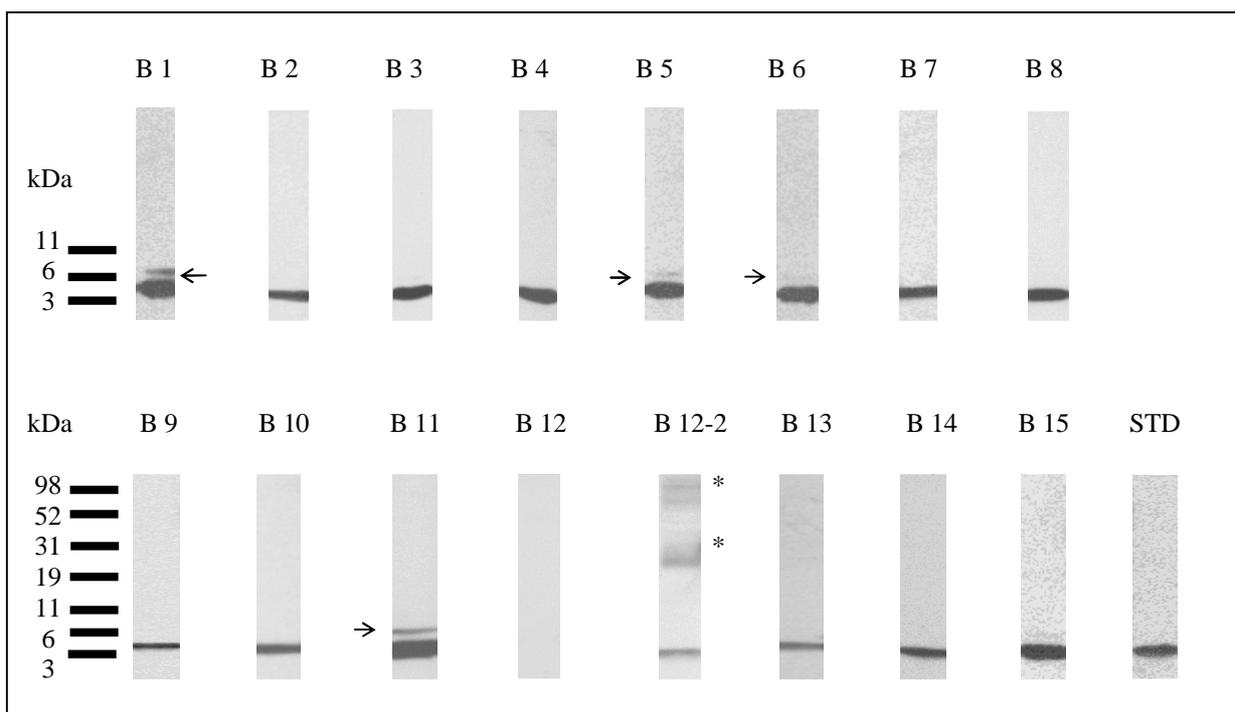


Abbildung 3.5: Westernblotanalysen der Bronchitis-Patientenproben und einer Standardprobe (STD) in **nicht reduzierter** Form mit Nachweis von SP-C zwischen 3,74 und 5,04 kDa (Median 4,28). Zusätzliche Banden (Pfeile) waren bei vier Patientenproben erkennbar (Molekulargewichte 6,32 bis 7,51 kDa). Es wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein aufgetragen (Probe B12-2: 25 µg, daher hier vermehrt unspezifische Antikörperreaktionen: *).

Antikörper: Anti-SP-C

Zusätzliche Banden als Hinweis auf Aneinanderlagerungen von SP-C-Molekülen waren bei vier Patientenproben in nicht reduzierter Form erkennbar. In reduziertem Zustand wurden diese nicht detektiert.

3.1.1.3 Pneumonie ohne Immundefekt

SP-C konnte bei 13 von 14 Pneumonie-Patienten in der Lavage nachgewiesen werden. Bei einer der Proben (P 12) gelang dies in nicht reduziertem Zustand erst nach Auftragen des fünffachen Probenvolumens, wobei hier durch die erhöhte Gesamtproteinmenge weitere Antikörperreaktionen deutlicher hervortraten. In der Lavageprobe P 14 wurde SP-C hingegen auch nach Untersuchen des fünffachen Probenvolumens nicht detektiert. Eine Übersicht zeigen die Abbildungen 3.6 und 3.7. Zusätzliche SP-C-Banden waren hier bei zwei Patientenproben in nicht reduzierter Form erkennbar (Abbildung 3.7).

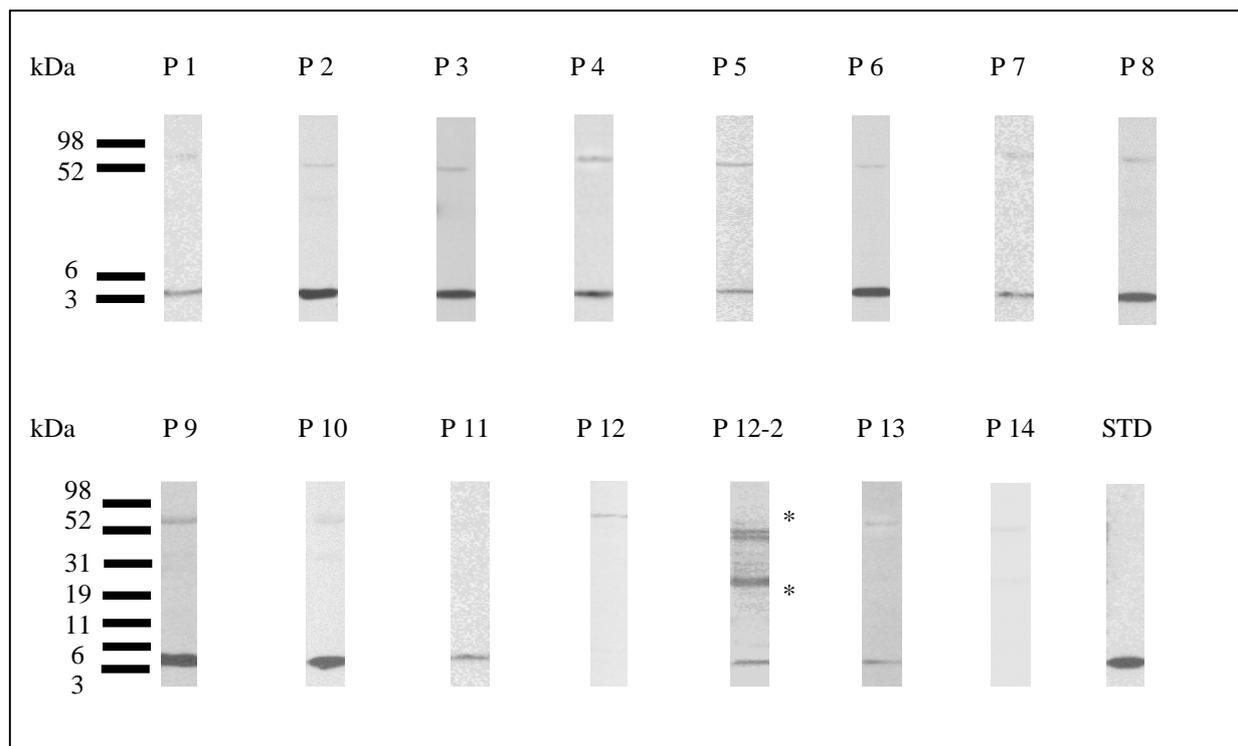


Abbildung 3.6: Westernblotanalysen der Lavage-Proben der Pneumonie-Patienten und einer Standardprobe (STD) in **reduziertem** Zustand. SP-C wurde mit Molekulargewichten zwischen 3,78 und 4,59 kDa (Median 4,13) detektiert. Es wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein aufgetragen (Probe P 12-2: 25 µg, daher hier vermehrt sichtbare unspezifische Antikörperreaktionen: *).

Antikörper: Anti-SP-C

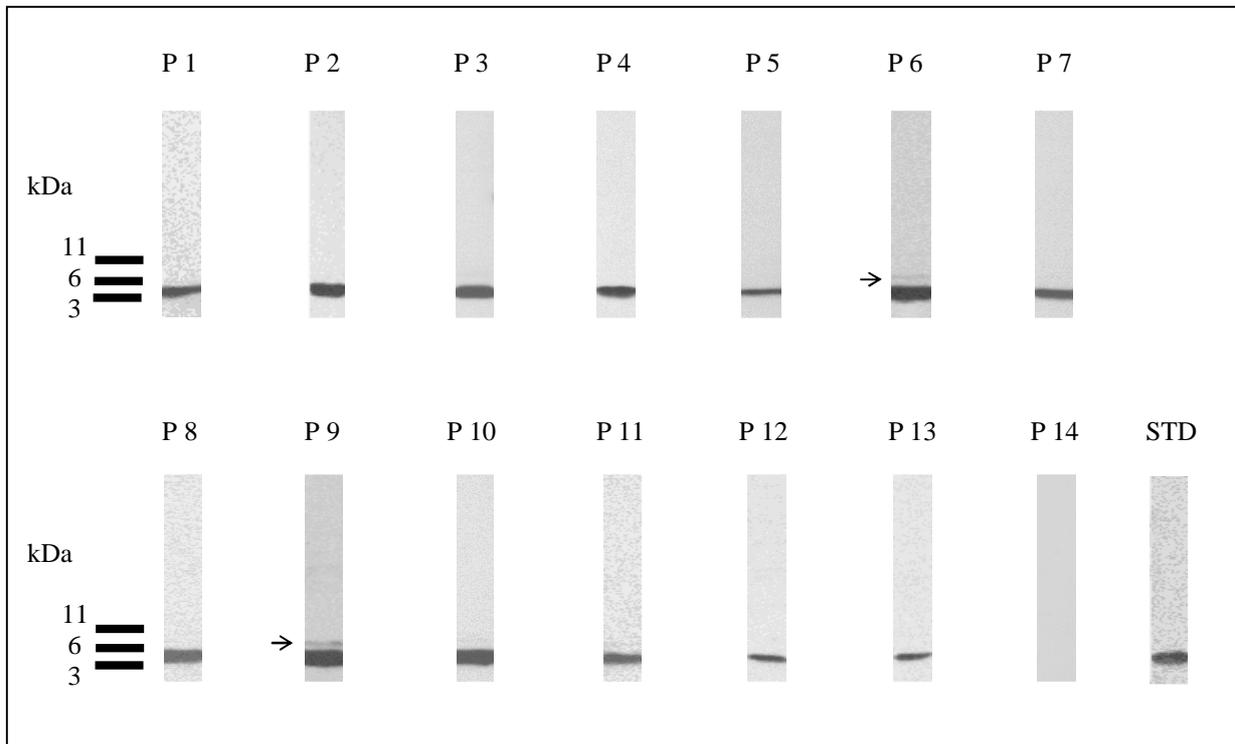


Abbildung 3.7: Westernblotanalysen der Lavageproben der Pneumonie-Patienten und einer Standardprobe (STD) in nicht reduziertem Zustand. SP-C stellte sich mit Molekulargewichten von 3,73 bis 4,81 kDa (Median 4,42) dar, sowie mit zwei zusätzlichen Banden (Pfeile) bei 6,64 und 6,96 kDa. Es wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein aufgetragen. Antikörper: Anti-SP-C

3.1.1.4 Lungengesunde Kontrollgruppe

Aus der Gruppe der lungengesunden Kontrollpatienten wurden insgesamt 14 Lavageproben untersucht. Leider stand hier in den meisten Fällen nur sehr wenig Probenmaterial zur Verfügung, so dass die Westernblotanalyse nur bei vier Patienten dieser Gruppe sowohl mit reduzierten als auch mit nicht reduzierten Proben durchgeführt werden konnte. Bei allen anderen Patienten erfolgte die Messung lediglich in nicht reduziertem Zustand. Dabei wurde SP-C bei allen untersuchten Proben nachgewiesen. Die jeweiligen Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.8 und 3.9 dargestellt.

In nicht reduzierter Form zeigten drei Proben zusätzliche Reaktionen mit dem SP-C-Antikörper (Abbildung 3.9).

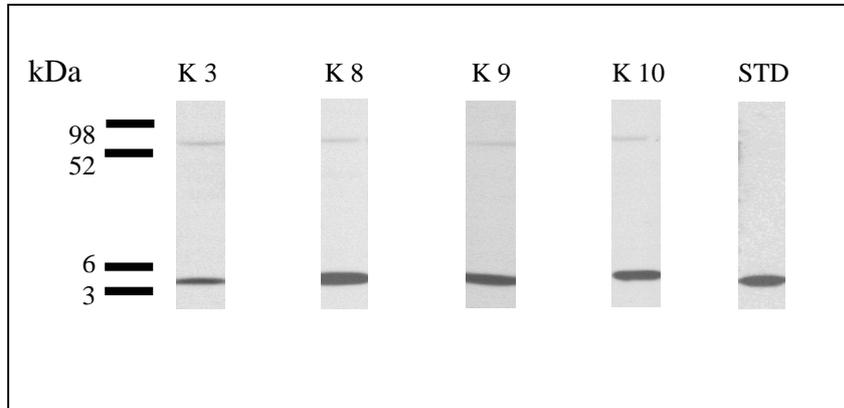


Abbildung 3.8: Westernblotanalysen der in reduziertem Zustand untersuchten Proben der Kontrollgruppe und einer Standardprobe (STD). Die Molekulargewichte der Banden lagen zwischen 3,96 und 4,30 kDa (Median 4,095). Es wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein aufgetragen. Antikörper: Anti-SP-C

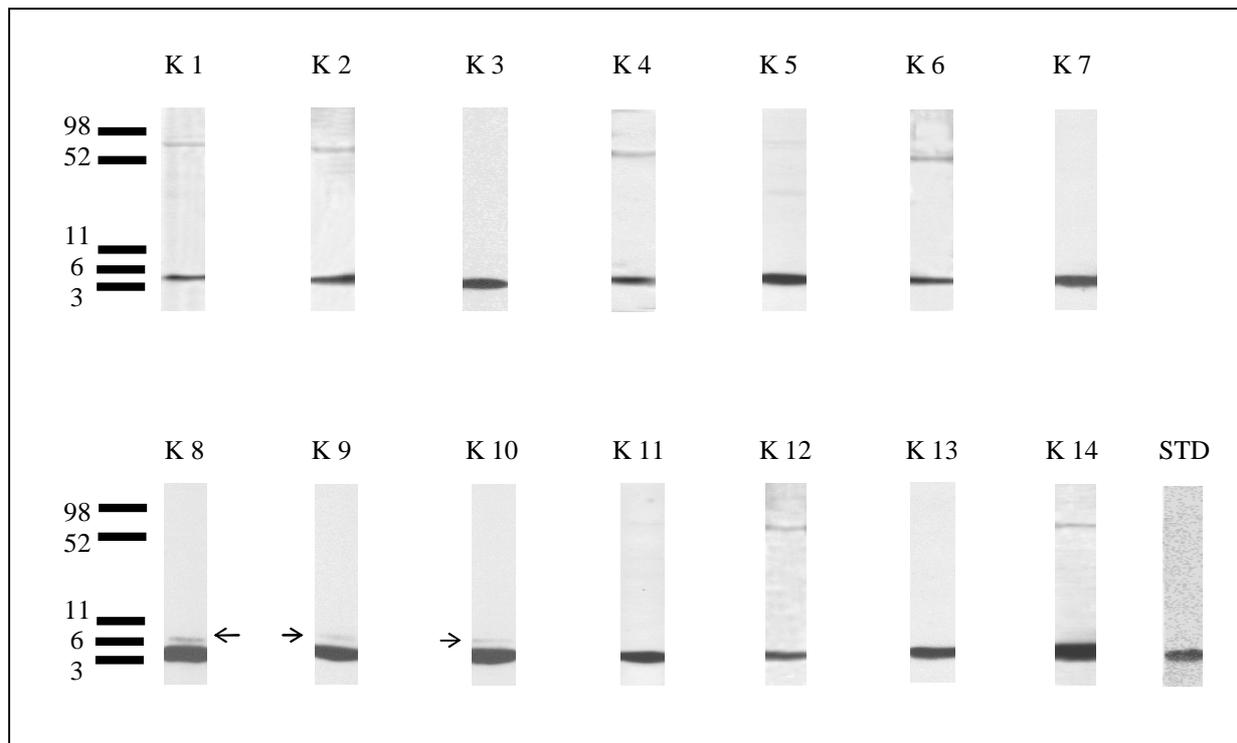


Abbildung 3.9: Westernblotanalysen der in nicht reduziertem Zustand untersuchten Kontrollproben und einer Standardprobe (STD) mit Nachweis von SP-C zwischen 3,76 bis 4,85 kDa (Median 4,115). Zusätzliche Reaktionen zeigten sich bei drei Proben (Pfeile; Molekulargewichte 6,78 bis 7,20 kDa). Es wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein aufgetragen. Antikörper: Anti-SP-C

3.1.1.5 Höhermolekulare Vorstufen (Pro-SP-C)

Bei den unter nicht reduzierenden Bedingungen untersuchten Patientenproben erfolgte nach Detektion von SP-C die Inkubation der Membranen mit dem Pro-Sp-C-Antikörper zum Nachweis höhermolekularer Vorstufen des Proteins (Pro-SP-C). Als Positivkontrolle diente Lavagematerial eines Patienten PAP 1 mit pulmonaler Alveolarproteinose, in dem aberrantes Pro-SP-C mit einem Molekulargewicht von ca. 15-16 kDa nachgewiesen wurde.

Die Untersuchung der einzelnen Proben aus den drei Patientengruppen sowie der Kontrollgruppe ergaben bei keinem Patienten den Nachweis von Pro-Sp-C, weder in Höhe der Bande der Positivkontrolle noch in einem anderen bekannten Molekulargewichtsbereich von SP-C-Vorstufen. Auffälligkeiten zeigten sich lediglich bei den Proben CF 20 und 21, die anschließend gesondert dargestellt und beschrieben werden. Auf die vermutlich durch unspezifische Antikörperreaktionen entstandenen Banden im Bereich von 25 bis 30 kDa bzw. 60 bis 70 kDa wird unter 3.1.1.6 näher eingegangen. Die Abbildungen 3.10 bis 3.13 zeigen die Westernblotanalysen der Patientenproben aus den verschiedenen Gruppen sowie der Probe PAP 1 als Positivkontrolle nach Inkubation mit dem Pro-SP-C-Antikörper.

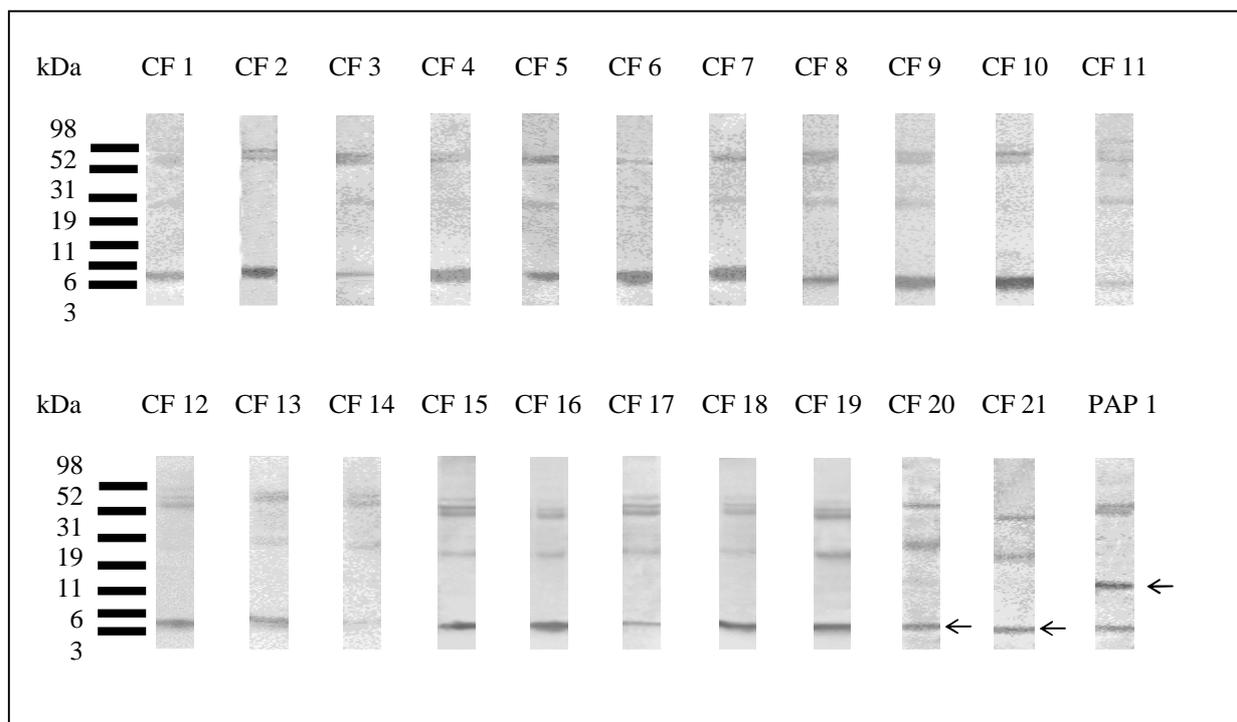


Abbildung 3.10: Westernblotanalysen der CF-Patientenproben sowie der Positivkontrolle PAP 1 in nicht reduziertem Zustand. Es wurden keine höhermolekularen Vorstufen von SP-C (Pfeil bei PAP 1) detektiert. Unspezifische Antikörperreaktionen sind bei 25 bis 30 kDa bzw. 60 bis 70 kDa erkennbar (vergleiche 3.1.1.6). Bei den Proben CF 20 und 21 zeigte sich im Bereich von ca. 3 bis 4 kDa jeweils eine im Vergleich zu Abbildung 3.1 neue Reaktion mit dem Pro-SP-C-Antikörper (Pfeile). Es wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein aufgetragen. Antikörper: 1. Inkubation: Anti-SP-C; 2. Inkubation: Anti-Pro-SP-C

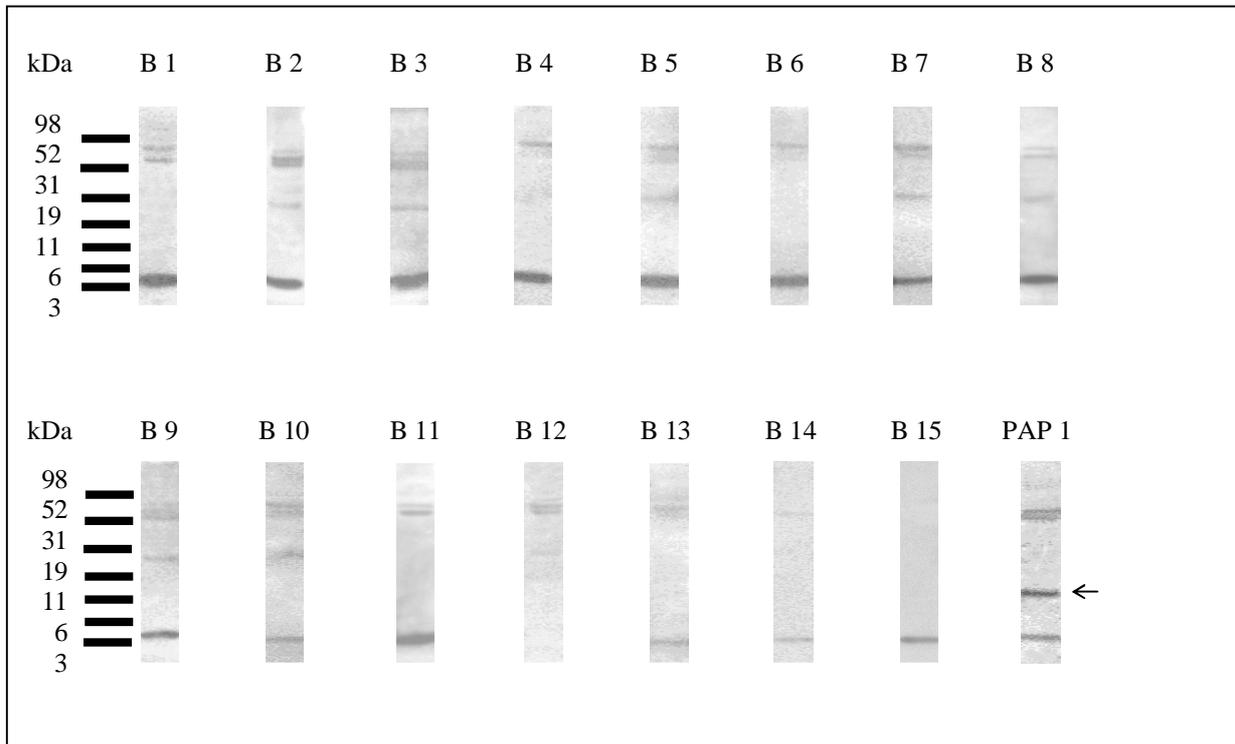


Abbildung 3.11: Westernblotanalysen der Bronchitis-Patientenproben sowie der Positivkontrolle PAP 1 in **nicht reduziertem** Zustand. Pro-SP-C (Pfeil bei PAP 1) wurde in keiner Probe detektiert. Unspezifische Reaktionen sind bei 25 bis 30 kDa bzw. 60 bis 70 kDa erkennbar (vergleiche 3.1.1.6). Es wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein aufgetragen. Antikörper: 1. Inkubation: Anti-SP-C; 2. Inkubation: Anti-Pro-SP-C

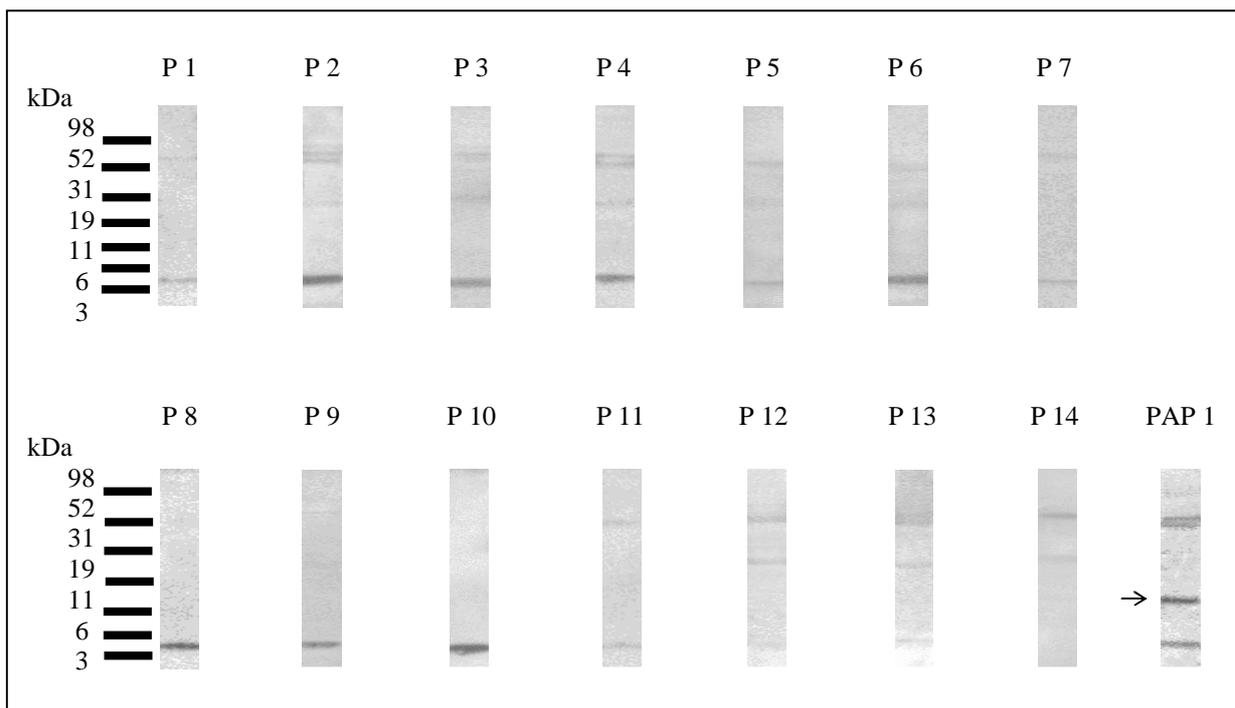


Abbildung 3.12: Westernblotanalysen der Pneumonie-Patientenproben sowie der Positivkontrolle PAP 1 in **nicht reduziertem** Zustand. Pro-SP-C (Pfeil bei PAP 1) wurde in keiner Probe detektiert. Unspezifische Reaktionen sind bei 25 bis 30 kDa bzw. 60 bis 70 kDa erkennbar (vergleiche 3.1.1.6). Es wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein aufgetragen. Antikörper: 1. Inkubation: Anti-SP-C; 2. Inkubation: Anti-Pro-SP-C

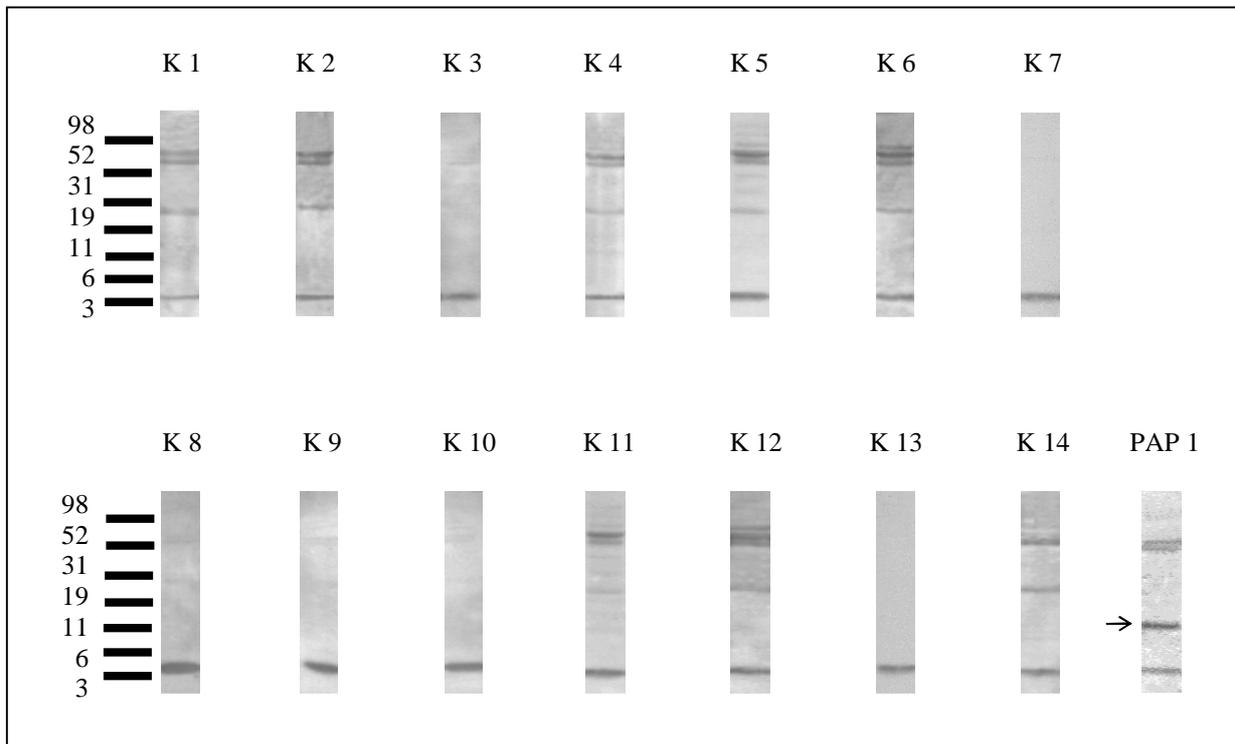


Abbildung 3.13: Westernblotanalysen der Patientenproben der Kontrollgruppe sowie der Positivkontrolle PAP 1 in **nicht reduziertem** Zustand. Es wurden keine höhermolekularen Vorstufen von SP-C (Pfeil bei PAP 1) detektiert. Unspezifische Reaktionen sind bei 25 bis 30 kDa bzw. 60 bis 70 kDa erkennbar (vergleiche 3.1.1.6). Es wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein aufgetragen.

Antikörper: 1. Inkubation: Anti-SP-C; 2. Inkubation: Anti-Pro-SP-C

Die Patientenproben CF 20-1 und CF 21-1 hatten bei der Detektion von SP-C keinen positiven Nachweis des Proteins ergeben (Abbildungen 3.1 und 3.2). Nach Inkubation mit dem Pro-SP-C-Antikörper zeigte sich dann bei beiden Proben eine positive Reaktion im Bereich von 3,54 kDa (CF 20) bzw. 3,41 kDa (CF 21). Bei den zum Vergleich ebenfalls untersuchten Proben CF 20-2 und CF 21-2 (Herkunft siehe 3.1.1.1) konnten keine Reaktionen mit dem Pro-SP-C-Antikörper festgestellt werden. Die Ergebnisse der Detektionen von Pro-SP-C bei diesen vier Patientenproben sind in Abbildung 3.14 dargestellt.

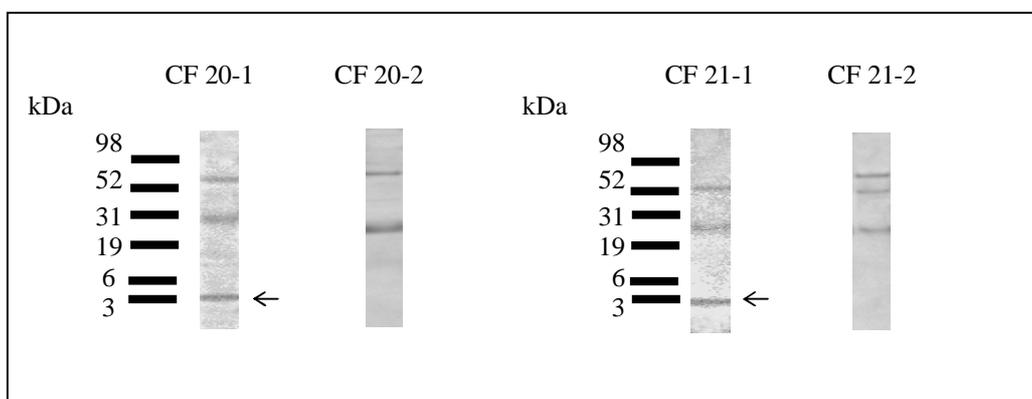


Abbildung 3.14: Detektion von Pro-SP-C in den verschiedenen Lavageproben der Patienten CF 20 und 21. In der Lavageprobe 1 zeigt sich jeweils eine Bande (Pfeile) bei 3,54 kDa (CF 20) bzw. 3,41 kDa (CF 21), die in der jeweiligen Lavageprobe 2 nicht nachweisbar war. Die Proben CF 20-2 und 21-2 waren zur Verhinderung von Bandenüberlagerungen zuvor nicht mit dem SP-C-Antikörper inkubiert worden. Es wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein aufgetragen. Antikörper: 1. Inkubation: Anti-SP-C (nicht bei CF 20-2 und 21-2); 2. Inkubation: Anti-Pro-SP-C

3.1.1.6 Unspezifische Bindungen

Bei einigen untersuchten Patientenproben kam es, speziell nach Inkubation mit dem Pro-Sp-C-Antikörper aber auch beim Nachweis von SP-C, zu Reaktionen, die weder SP-C noch einer bekannten Vorstufe des Proteins zugeordnet werden konnten. Sie traten vor allem in Molekulargewichtsbereichen von 60 bis 70 kDa sowie 25 bis 30 kDa auf.

Um das Entstehen dieser zusätzlichen Banden im Rahmen unspezifischer Reaktionen zu überprüfen, wurde zunächst eine Serumprobe (SP) eines gesunden Probanden untersucht. Nach der Gelelektrophorese wurde diese Probe in reduziertem Zustand analog zu den Lavageproben nacheinander mit den Antikörpern gegen SP-C und Pro-SP-C inkubiert. Es zeigten sich dabei vor allem Reaktionen in den oben erwähnten Molekulargewichtsbereichen. Abbildung 3.15 zeigt den Vergleich der Westernblotanalysen der Serumprobe mit einigen Lavageproben, bei denen zusätzliche Reaktionen erkennbar waren.

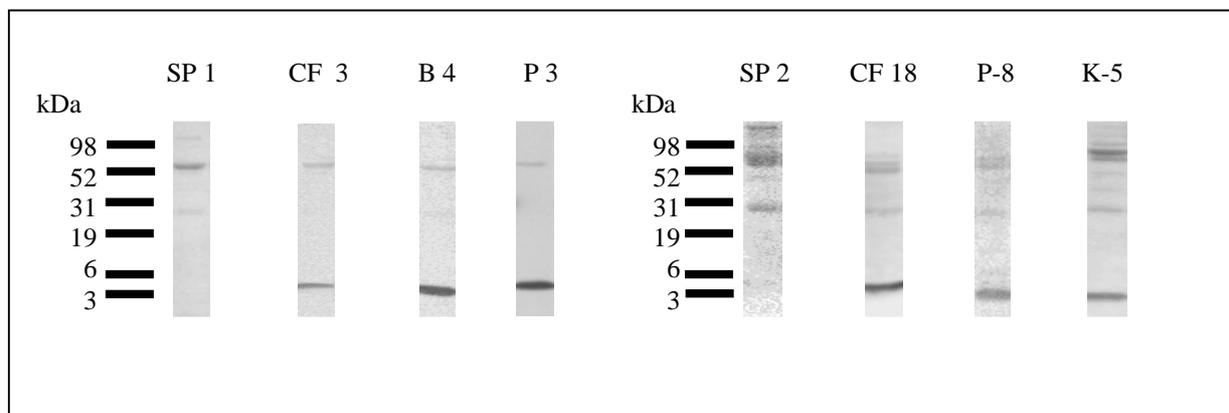


Abbildung 3.15: Westernblotanalyse einer Serumprobe nach Inkubation mit SP-C-Antikörper (SP 1) sowie Pro-SP-C-Antikörper (SP 2). Zum Vergleich sind jeweils rechts einige Lavageproben abgebildet. Unspezifische Bindungen sind vor allem im Bereich von 25 bis 30 kDa sowie 60 bis 70 kDa auch bei den Westernblotanalysen der Serumprobe erkennbar. Es wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein aufgetragen.

Antikörper: 1. Inkubation: Anti-SP-C; 2. Inkubation: Anti-Pro-SP-C (nur rechte Seite)

Weiterhin wurden zwei Proben der Positivkontrolle PAP 1 in nicht reduziertem Zustand untersucht, wobei die erste nach Gelelektrophorese auf herkömmliche Weise mit dem Pro-SP-C-Antikörper inkubiert wurde. Bei der zweiten Probe wurde das Pro-SP-C-Antikörperserum zunächst für zwei Stunden auf dem Vortexer mit dem zur Herstellung des Serums verwendeten Pro-SP-C-Peptid inkubiert. Durch die Bindung des Peptids an den Pro-SP-C-Antikörper stand dieser für weitere Reaktionen bei der Inkubation der Probe nun nicht mehr zur Verfügung. Bei beiden untersuchten Proben der Positivkontrolle sichtbare Banden konnten daher nur durch Reaktionen anderer im Antikörperserum vorhandenen Antikörper entstehen, während Banden, die sich lediglich in der Westernblotanalyse der ersten Probe zeigten, auf die Detektion von Pro-SP-C hindeuten. Abbildung 3.16 zeigt die Westernblotanalyse der beiden Proben PAP 1 ohne und mit vorheriger Zugabe von Pro-SP-C-Peptid zum Antiserum. Die Untersuchung wurde zum Vergleich in identischer Weise bei den Patientenproben CF 20-2 und CF 21-2 durchgeführt und die Ergebnisse ebenfalls in Abbildung 3.16 dargestellt.

Aus Abbildung 3.16 wird ersichtlich, dass die nach Inkubation mit dem Pro-SP-C-Antikörperserum bei den Patientenproben sichtbaren Banden im Bereich von 60 bis 70 kDa bzw. 25 bis 30 kDa nicht durch Reaktionen mit dem spezifischen Pro-SP-C-Antikörper entstanden sind. Abbildung 3.15 hingegen zeigt, dass sich diese bei den Lavageproben sichtbaren Banden auch bei der Westernblotanalyse einer Serumprobe darstellen ließen.

Es handelt sich hierbei also nicht um den Nachweis von SP-C oder einer Vorstufe des Proteins, sondern vermutlich um unspezifische Reaktionen der Antikörperseren mit Serumproteinen der Patienten (z.B. Albumin mit einem Molekulargewicht von 66 kDa). Diese könnten z.B. durch Exsudationen im Rahmen entzündlicher Prozesse oder durch bei der Lavage entstandene Mikroverletzungen in den Alveolarraum gelangt sein.

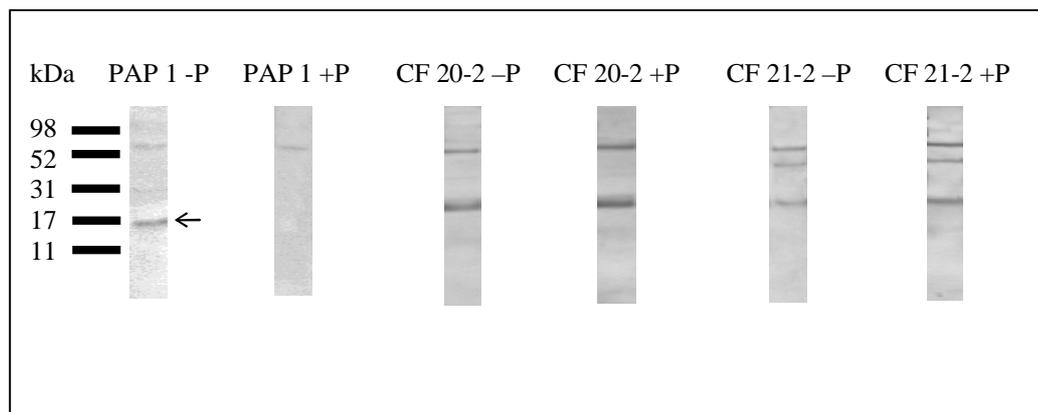


Abbildung 3.16: Westernblotanalyse der Positivkontrolle PAP 1 sowie der Patienteproben CF 20 und 21 nach Inkubation mit dem Pro-SP-C-Antikörperserum, jeweils ohne (-P) und mit (+P) Zugabe des Peptids. Die Pro-SP-C-Bande (Pfeil) ist bei Zugabe des Peptids nicht erkennbar, unspezifische Banden bleiben erhalten. Es wurden jeweils 5 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Antikörper: Anti-Pro-SP-C

3.1.2 Surfactantprotein B

3.1.2.1 Cystische Fibrose

In der Gruppe der Patienten mit Cystischer Fibrose konnte Surfactantprotein B bei allen untersuchten Proben detektiert werden. In reduziertem Zustand gelang dies im Molekulargewichtsbereich von ca. 8 kDa (Abbildung 3.17), in nicht reduziertem Zustand bei ca. 17 kDa (Abbildung 3.18). Dies deutet auf das überwiegende Vorliegen von aneinandergelagerten SP-B-Molekülen (Dimere) in der bronchoalveolären Lavage der Patienten hin, die in reduzierter Form nach Spaltung der Disulfidbrücken nicht mehr als solche nachgewiesen werden konnten.

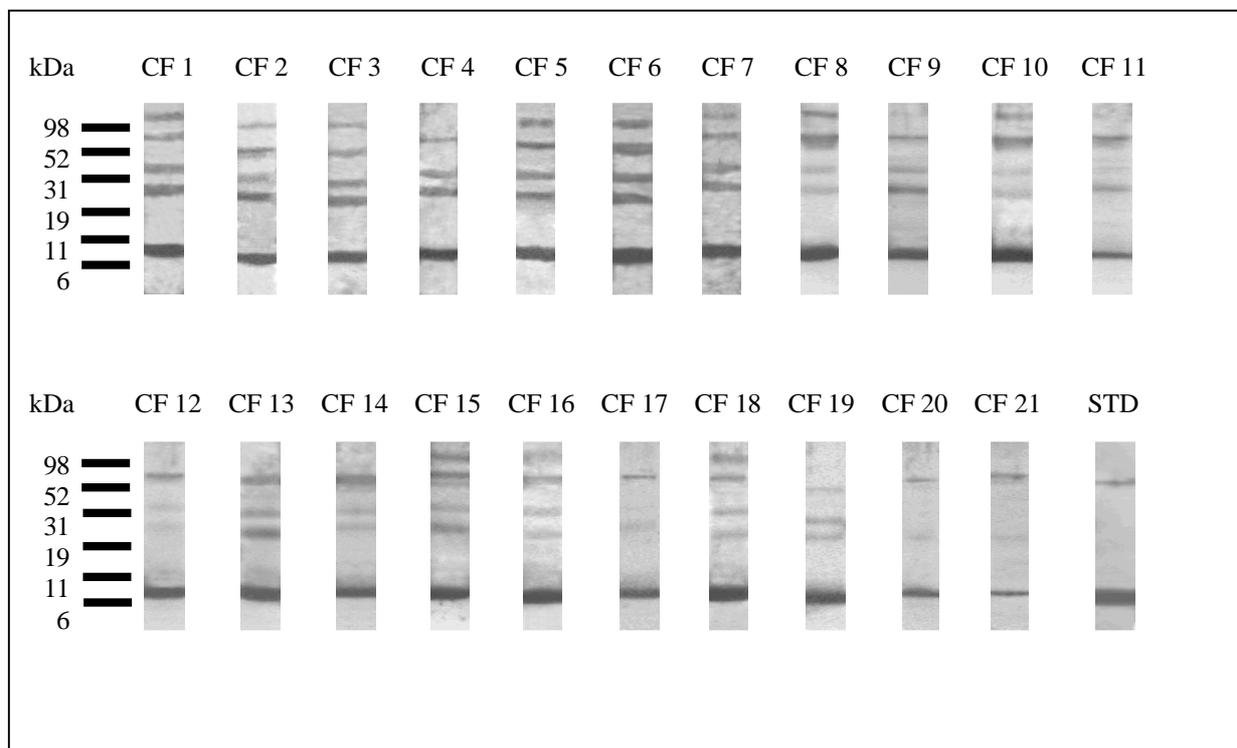


Abbildung 3.17: Westernblotanalysen der Patientenproben der CF-Gruppe und einer Standardprobe (STD) in **reduzierter** Form. SP-B wurde mit Molekulargewichten von 7,41 bis 8,67 kDa (Median 7,91) detektiert. Unspezifische Antikörperreaktionen zeigten sich oberhalb von ca. 30 kDa (vergleiche 3.1.2.6), Pro-SP-B durch die vorangegangene Inkubation mit Anti-Pro-SP-B bei 24 bis 25 kDa. Es wurden jeweils 5 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Antikörper: 1. Inkubation: Anti-Pro-SP-B; 2. Inkubation: Anti-SP-B

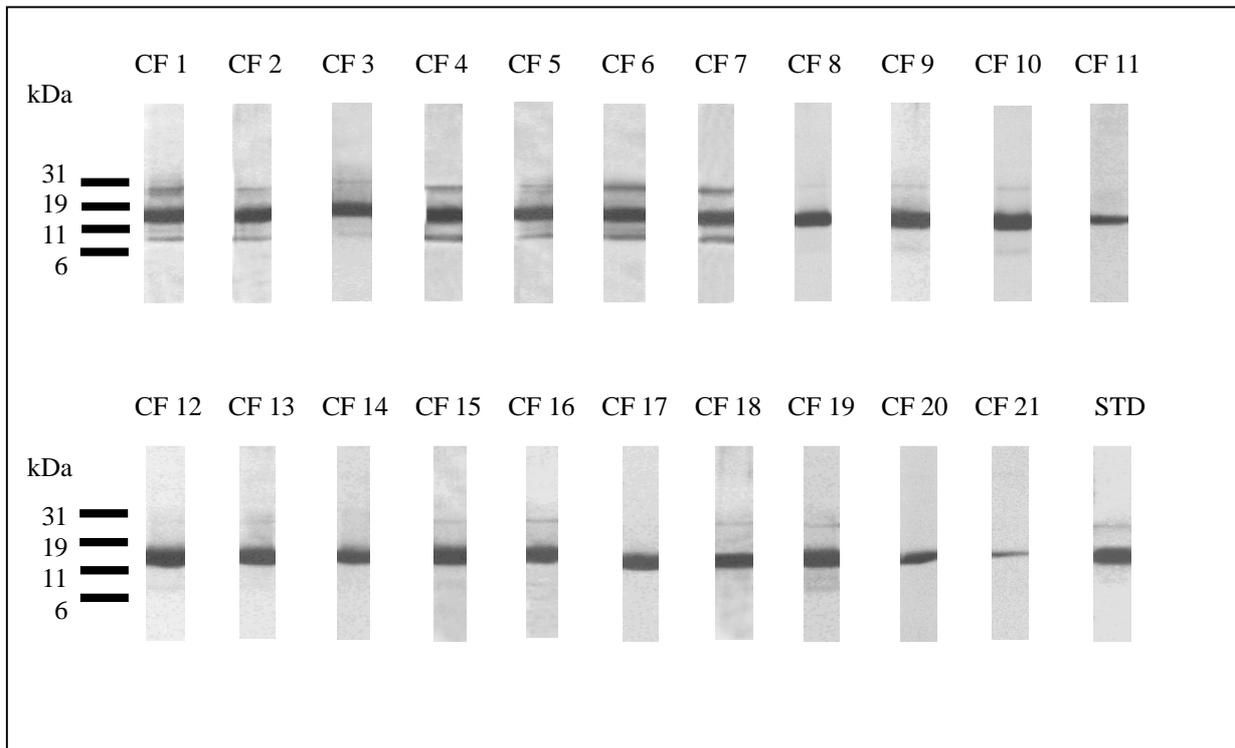


Abbildung 3.18: Westernblotanalysen der Patientenproben der CF-Gruppe und einer Standardprobe (STD) in **nicht reduzierter** Form. SP-B wurde hauptsächlich zwischen 16,20 und 17,99 kDa (Median 17,00) detektiert. Bei einigen Proben zeigten sich zusätzlich Banden im Bereich von ca. 8 bzw. 30 kDa. Es wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein aufgetragen. Antikörper: Anti-SP-B

Weitere nachweisbare Banden bei den Westernblotanalysen der reduzierten Lavageproben (Abbildung 3.17) waren in erster Linie auf die vorherige Detektion von Pro-SP-B sowie in diesem Zusammenhang aufgetretene unspezifische Bindungen zurückzuführen (siehe 3.1.2.5 und 3.1.2.6) und traten auch bei den untersuchten Proben der anderen Patientengruppen auf (siehe 3.1.2.2 bis 3.1.2.4).

Zusätzliche Banden im Bereich von 8 bzw. 30 kDa bei einigen nicht reduzierten Proben lassen das Vorhandensein von Monomeren auch in nicht reduziertem Zustand sowie noch höhermolekularen Zusammenlagerungen von SP-B vermuten.

3.1.2.2 Chronische Bronchitis

SP-B wurde bei allen untersuchten Lavageproben dieser Gruppe nachgewiesen, im Fall der Probe B 12 allerdings auch nach erneutem Auftragen des fünffachen Probenvolumens lediglich in nicht reduzierter Form. Die Detektion erfolgte auch bei den Patientenproben der Bronchitis-Gruppe im Bereich von ca. 8 kDa in reduziertem und ca. 17 kDa (mit zusätzlichen Banden bei einigen Patientenproben im Bereich von 8 sowie 30 kDa) in nicht reduziertem Zustand. Die Ergebnisse der Westernblotanalysen sind in den Abbildungen 3.19 und 3.20 dargestellt.

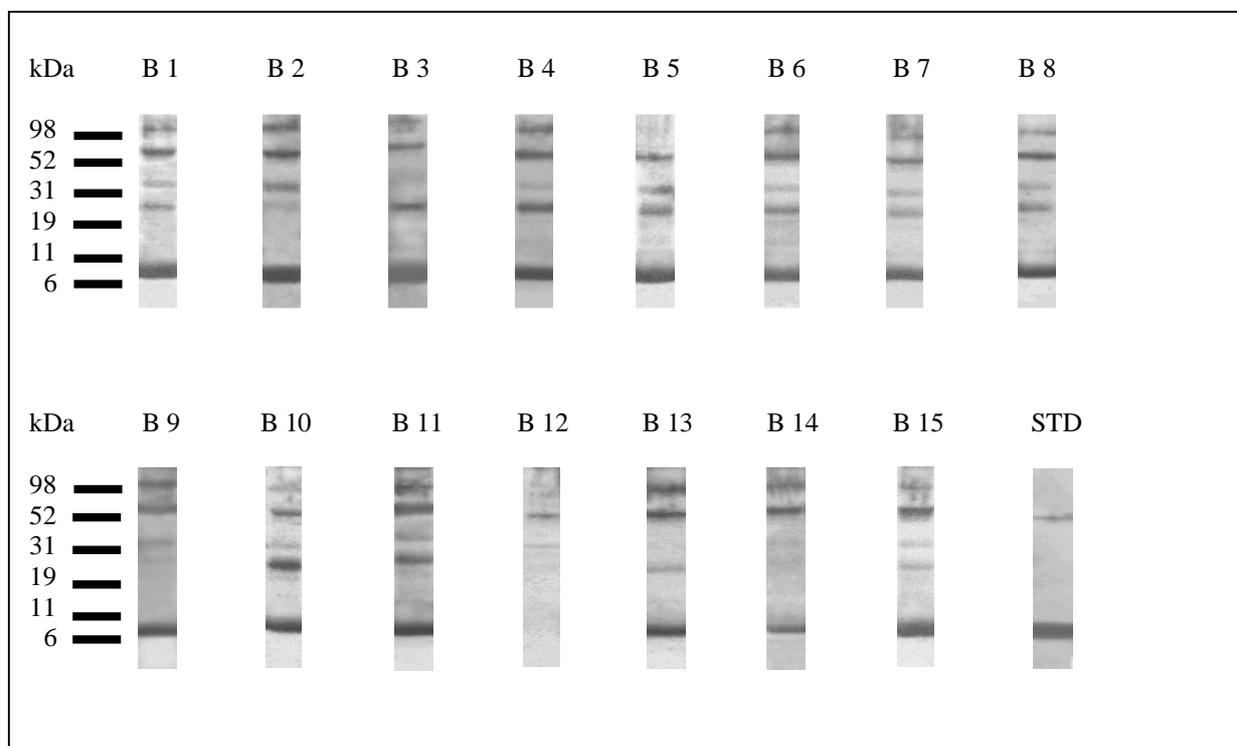


Abbildung 3.19: Westernblotanalysen der Lavageproben der Patienten mit chronischer Bronchitis und einer Standardprobe (STD) in **reduzierter** Form. SP-B ließ sich in 14 von 15 Patientenproben mit Molekulargewichten zwischen 7,39 und 8,59 kDa (Median 7,98) darstellen. Unspezifische Antikörperreaktionen zeigten sich oberhalb von ca. 30 kDa (vergleiche 3.1.2.6), Pro-SP-B durch die vorangegangene Inkubation mit Anti-Pro-SP-B bei 24 bis 25 kDa. Es wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein aufgetragen. Antikörper: 1. Inkubation: Anti-Pro-SP-B; 2. Inkubation: Anti-SP-B

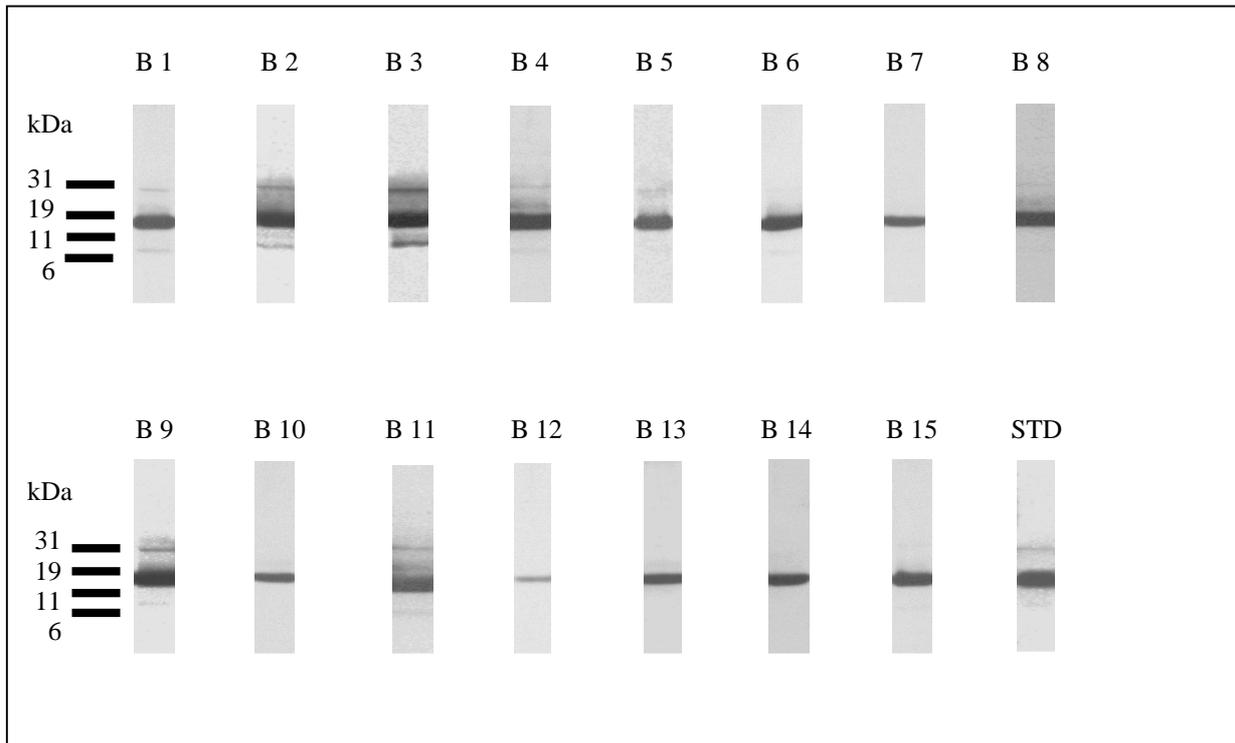


Abbildung 3.20: Westernblotanalysen der Lavageproben der Patienten mit chronischer Bronchitis und einer Standardprobe (STD) in nicht reduzierter Form. SP-B wurde hauptsächlich mit Molekulargewichten zwischen 16,08 und 18,04 kDa (Median 16,86) detektiert. Zusätzliche Banden zeigten sich bei einigen Patienten im Bereich von ca. 8 bzw. 30 kDa. Es wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein aufgetragen. Antikörper: Anti-SP-B

3.1.2.3 Pneumonie ohne Immundefekt

Bei den Lavageproben der Pneumonie-Patienten konnte SP-B in 13 von 14 Fällen sowohl in reduzierter als auch in nicht reduzierter Form detektiert werden. Im Fall der Probe P 14 gelang dies auch nach Untersuchung des fünffachen Volumens der reduzierten Probe nur in nicht reduziertem Zustand. Bezüglich der Molekulargewichte der Banden zeigte sich die bereits in den anderen Krankheitsgruppen festgestellte unterschiedliche Höhe zwischen reduziertem und nicht reduziertem Probenmaterial. Die Abbildungen 3.21 und 3.22 zeigen die Ergebnisse der Westernblotanalysen aus der Patientengruppe „Pneumonie ohne Immundefekt“.

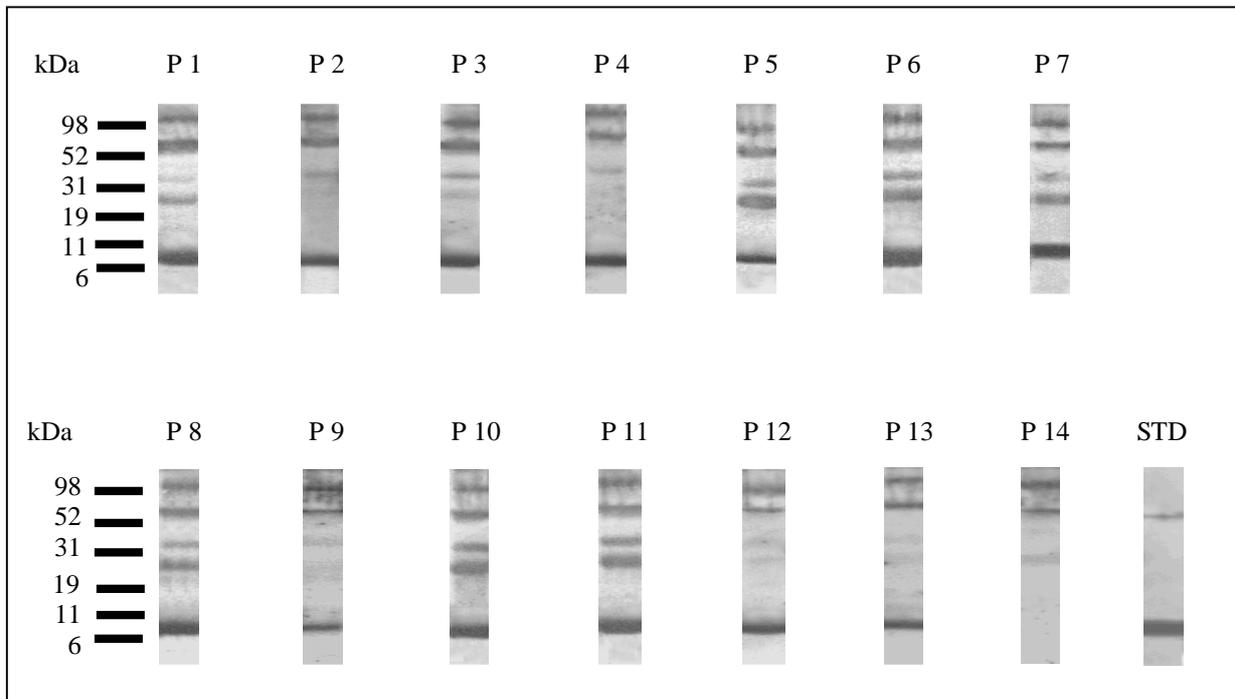


Abbildung 3.21: Westernblotanalysen der Lavageproben der Pneumonie-Patienten und einer Standardprobe (STD) in **reduzierter** Form mit Nachweis von SP-B in 13 von 14 Proben zwischen 7,18 und 8,44 kDa (Median 7,91). Unspezifische Antikörperreaktionen zeigten sich oberhalb von ca. 30 kDa (vergleiche 3.1.2.6), Pro-SP-B durch die vorangegangene Inkubation mit Anti-Pro-SP-B bei 24 bis 25 kDa. Es wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein aufgetragen. Antikörper: 1. Inkubation: Anti-Pro-SP-B; 2. Inkubation: Anti-SP-B

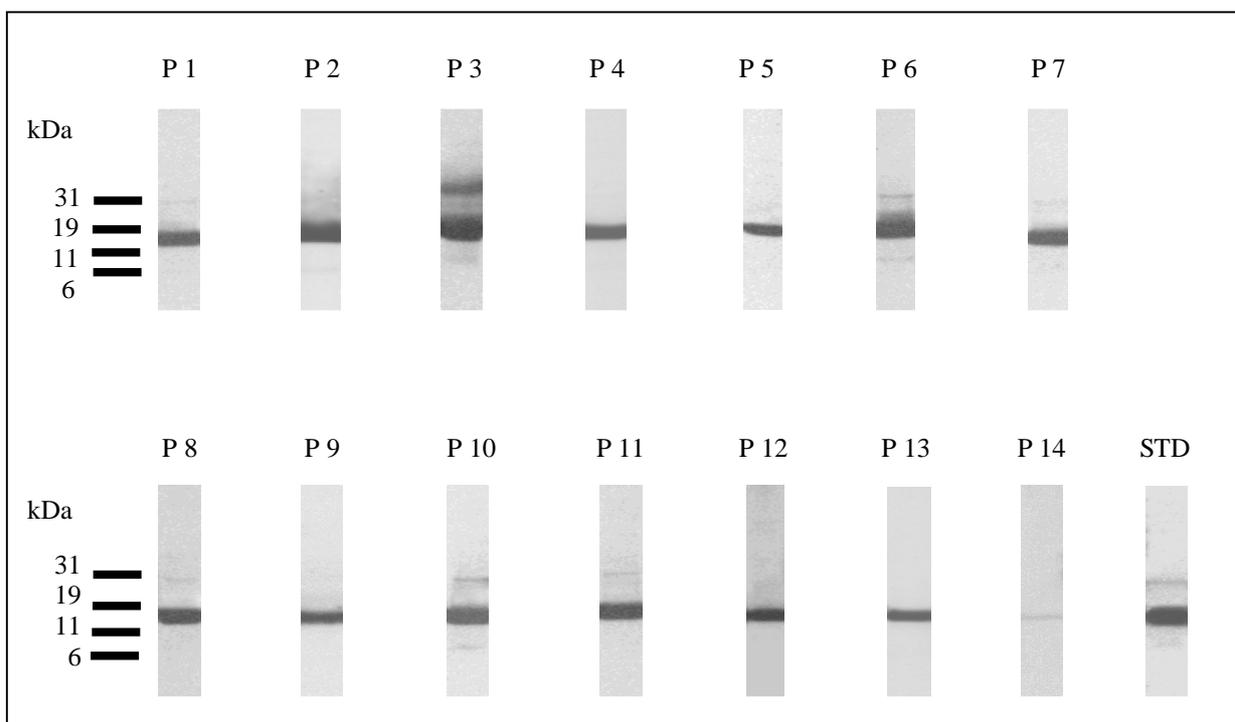


Abbildung 3.22: Westernblotanalysen der Lavageproben der Pneumonie-Patienten und einer Standardprobe (STD) in **nicht reduzierter** Form mit Nachweis von SP-B zwischen 16,23 und 17,93 kDa (Median 16,92) sowie einigen zusätzlichen Banden bei ca. 8 bzw. 30 kDa. Es wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein aufgetragen. Antikörper: Anti-SP-B

3.1.2.4 Lungengesunde Kontrollgruppe

Wegen der unter 3.1.1.4 bereits erwähnten geringen Menge an verfügbarem Probenmaterial konnte auch SP-B in dieser Gruppe nur bei vier Patientenproben sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen untersucht werden. Die übrigen Proben wurden lediglich in reduzierter Form aufgetragen. Dabei konnte SP-B bei allen untersuchten Lavageproben reduziert im Bereich ca. 8 kDa und nicht reduziert bei ca. 17 kDa detektiert werden, entsprechend der in den anderen Gruppen schon beschriebenen Verteilung der Molekulargewichte. Die jeweiligen Ergebnisse der Westernblotanalysen der lungengesunden Kontrollgruppe sind in den Abbildungen 3.23 und 3.24 dargestellt.

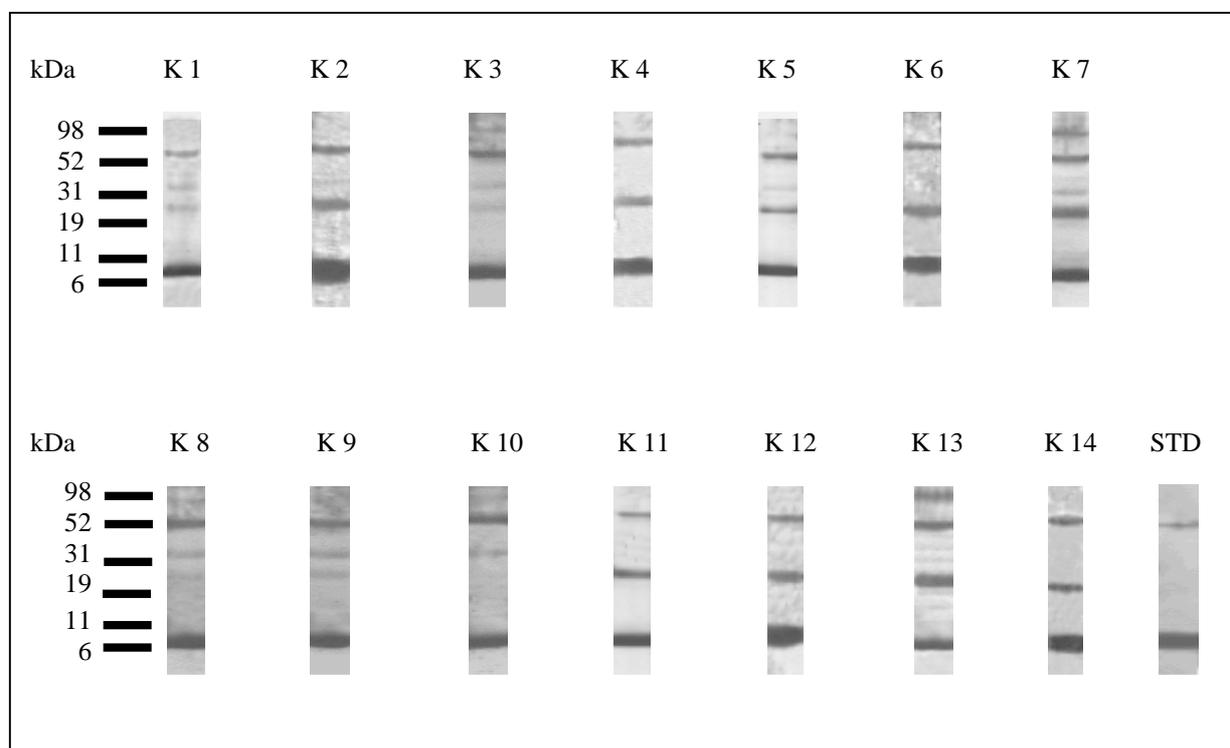


Abbildung 3.23: Westernblotanalysen der Lavageproben der lungengesunden Kontrollgruppe und einer Standardprobe (STD) in reduzierter Form. Der Nachweis von SP-B erfolgte mit Molekulargewichten von 7,24 bis 8,48 kDa (Median 7,975). Unspezifische Antikörperreaktionen zeigten sich oberhalb von ca. 30 kDa (vergleiche 3.1.2.6), Pro-SP-B durch die vorangegangene Inkubation mit Anti-Pro-SP-B bei 24 bis 25 kDa. Es wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein aufgetragen.

Antikörper: 1. Inkubation: Anti-Pro-SP-B; 2. Inkubation: Anti-SP-B

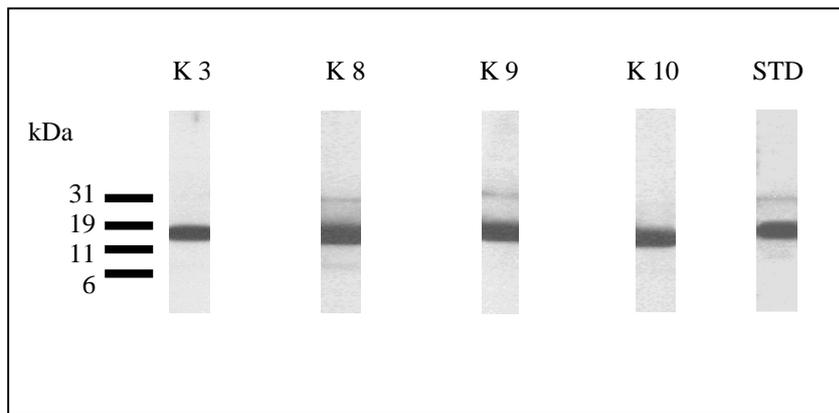


Abbildung 3.24: Westernblotanalysen der Lavageproben der lungengesunden Kontrollgruppe und einer Standardprobe (STD) in **nicht reduzierter** Form. SP-B wurde zwischen 16,45 und 17,71 kDa (Median 17,09) detektiert. Es wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein aufgetragen.

Antikörper: Anti-SP-B

3.1.2.5 Höhermolekulare Vorstufen (Pro-SP-B)

Wie bereits unter 3.1.2.1 beschrieben, erfolgte bei allen unter reduzierenden Bedingungen untersuchten Lavageproben vor der Detektion von SP-B die Inkubation der Membranen mit Pro-SP-B-Antikörper zum Nachweis höhermolekularer Vorstufen des Proteins (Pro-SP-B). Als Positivkontrolle diente, wie bei der Detektion von Pro-SP-C (siehe 3.1.1.5), Lavagematerial des Patienten PAP 1, in dem Pro-SP-B mit einem Molekulargewicht von ca. 24 bis 25 kDa sowie ca. 19 bis 21 kDa nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.25).

Ein positiver Nachweis von Pro-SP-B gelang bei allen 21 Patientenproben der Gruppe „Cystische Fibrose“, 14 von 15 Proben der Gruppe „Chronische Bronchitis“, 12 von 14 Proben der Gruppe „Pneumonie ohne Immundefekt“ und 13 von 14 Lavageproben der lungengesunden Kontrollgruppe. Pro-SP-B stellte sich dabei in erster Linie in Form einer Bande bei 24 bis 25 kDa dar. Vereinzelt zeigte sich auch bei einigen Patientenproben auf den Filmen - zumeist nur leicht angedeutet - eine weitere Bande im Molekulargewichtsbereich von 19 bis 21 kDa, die sich jedoch im Gegensatz zur Positivkontrolle PAP 1 wegen ihrer geringen Intensität auf den folgenden Abbildungen nicht darstellen ließ. Die Abbildungen 3.25 bis 3.28 zeigen die Westernblotanalysen der Patientenproben aus den verschiedenen Gruppen nach Inkubation mit dem Pro-SP-B-Antikörper.

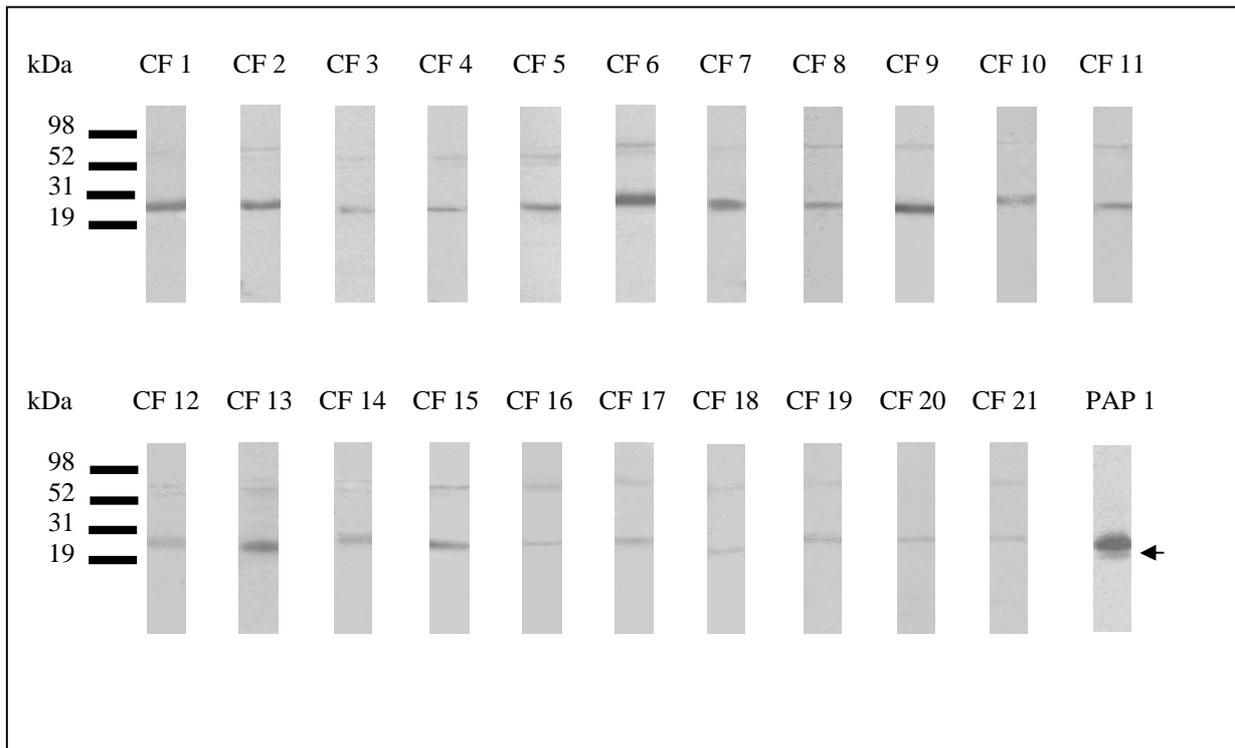


Abbildung 3.25: Westernblotanalysen der CF-Patientenproben sowie der Positivkontrolle PAP 1 in **reduzierter** Form. Pro-SP-B konnte bei allen 21 CF-Proben nachgewiesen werden. Bei der Probe PAP 1 ließ sich regelmäßig eine weitere Bande zwischen 19 und 21 kDa darstellen (Pfeil). Es wurden jeweils 5 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Antikörper: Anti-Pro-SP-B

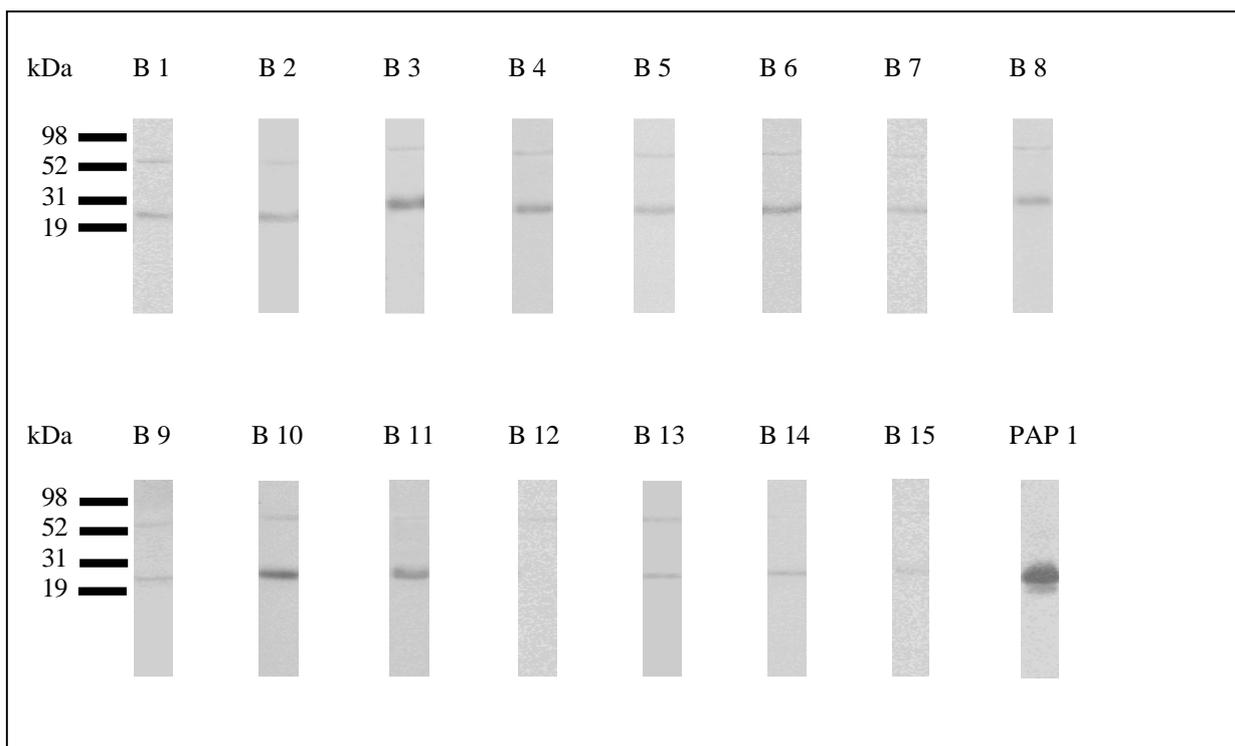


Abbildung 3.26: Westernblotanalysen der Bronchitis-Patientenproben und der Positivkontrolle PAP 1 in **reduzierter** Form. Pro-SP-B konnte bei 14 von 15 Proben nachgewiesen werden. Es wurden jeweils 5 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Antikörper: Anti-Pro-SP-B

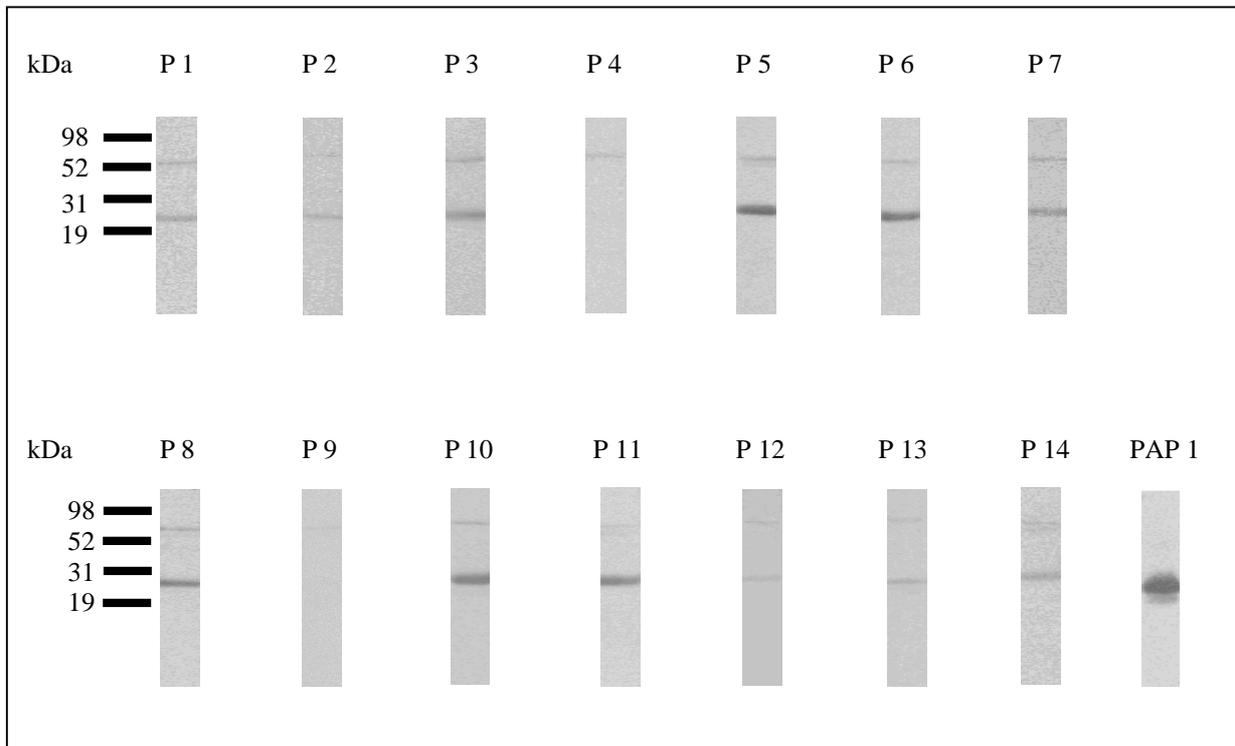


Abbildung 3.27: Westernblotanalysen der Pneumonie-Patientenproben und der Positivkontrolle PAP 1 in **reduzierter** Form. Pro-SP-B konnte bei 12 von 14 Proben nachgewiesen werden. Es wurden jeweils 5 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Antikörper: Anti-Pro-SP-B

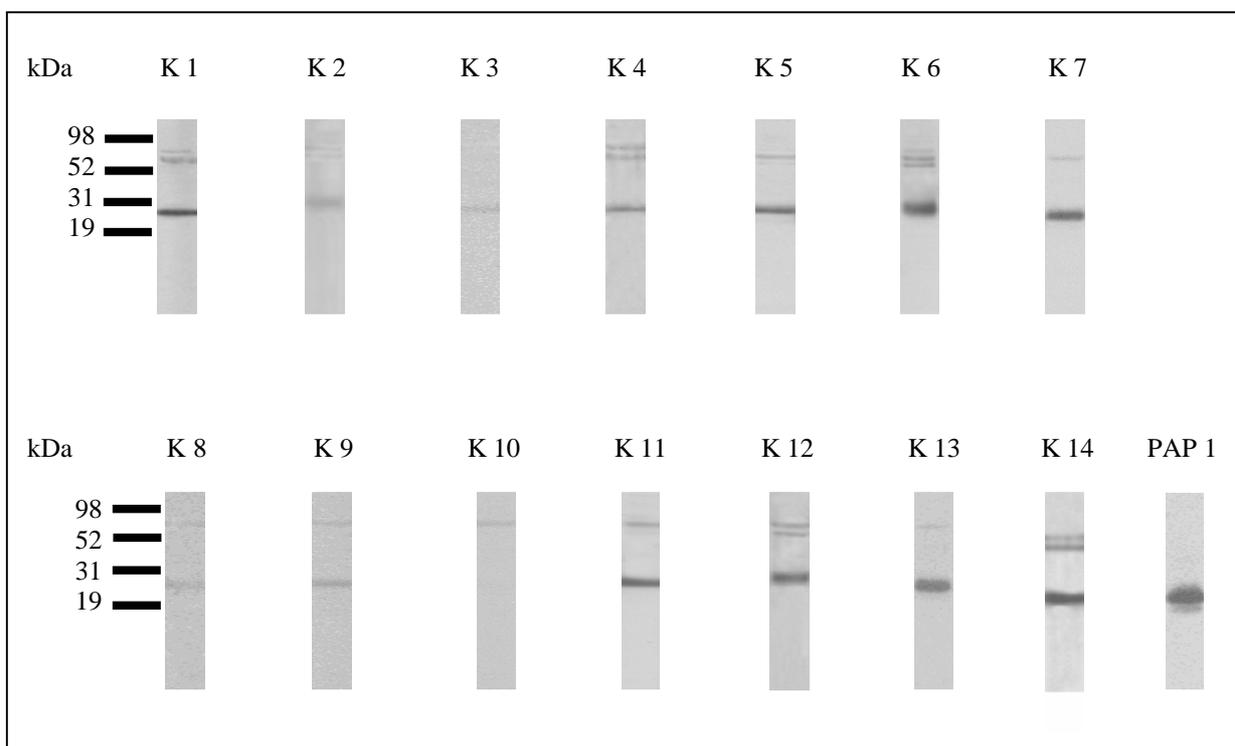


Abbildung 3.28: Westernblotanalysen der Patientenproben der Kontrollgruppe und der Positivkontrolle PAP 1 in **reduzierter** Form. Pro-SP-B konnte bei 13 von 14 Proben nachgewiesen werden. Es wurden jeweils 5 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Antikörper: Anti-Pro-SP-B

3.1.2.6 Unspezifische Bindungen

Auch bei der Detektion von (Pro-)SP-B zeigten sich, wie beim Nachweis von (Pro-)SP-C (siehe 3.1.1.6), bei einigen Patientenproben zusätzliche Banden, die weder SP-B noch einer bekannten Vorstufe des Proteins zugeordnet werden konnten. Diese Banden traten vor allem bei den in reduziertem Zustand untersuchten Lavageproben nach Inkubation mit dem SP-B-Antikörper im Bereich oberhalb von 30 kDa auf.

Analog zu den unter 3.1.1.6 durchgeführten Untersuchungen konnten die oben erwähnten zusätzlichen Banden ebenfalls bei der Westernblotanalyse einer Serumprobe (SP) eines gesunden Probanden nach Inkubation mit den verschiedenen Antikörpern gegen Pro-SP-B und SP-B dargestellt werden (Abbildung 3.29). Diese Tatsache legt auch hier die Vermutung nahe, dass es sich dabei um unspezifische Reaktionen der Antikörperseren mit Serumproteinen der Patienten (z.B. Albumin) handelt (siehe auch 3.1.1.6).

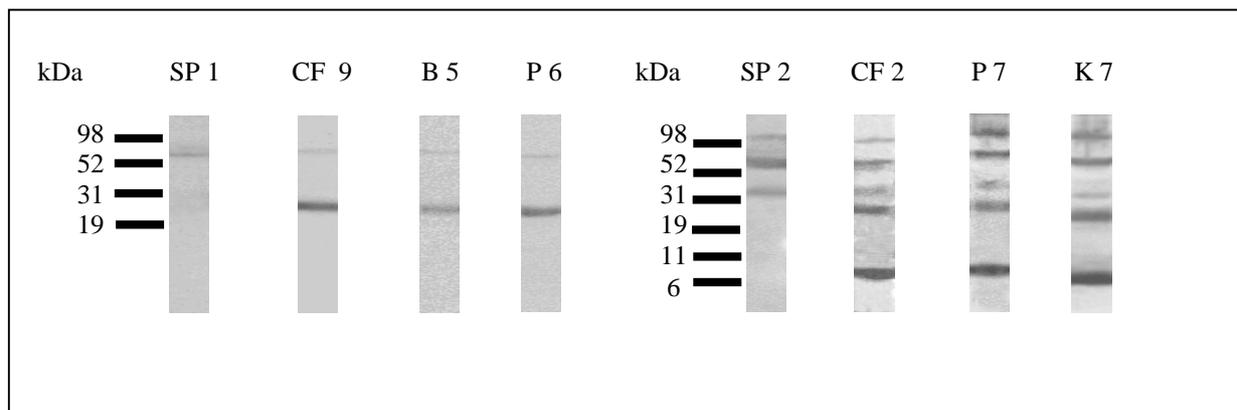


Abbildung 3.29: Westernblotanalyse einer Serumprobe nach Inkubation mit Pro-SP-B-Antikörper (SP 1) sowie SP-B-Antikörper (SP 2), jeweils in **reduzierter** Form. Unspezifische Bindungen sind oberhalb von ca. 30 kDa auch bei den Westernblotanalysen der Serumprobe erkennbar. Es wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein aufgetragen.
Antikörper: 1. Inkubation: Anti-SP-B; 2. Inkubation: Anti-Pro-SP-B (nur rechte Seite)

3.1.3 Zusammenfassende Darstellung

In Abbildung 3.30 sind noch einmal die typischen Bandenmuster von SP-C und SP-B in reduziertem und nicht reduziertem Zustand sowie ihrer Pro-Formen dargestellt. Für Pro-SP-C ist hier beispielhaft die Westernblotanalyse der Standardprobe PAP 1 dargestellt, da es in keiner der untersuchten Patientenproben detektiert wurde. Tabelle 3.2 zeigt, wie oft die Proteine in den einzelnen Gruppen nachgewiesen werden konnten bzw. fehlten.

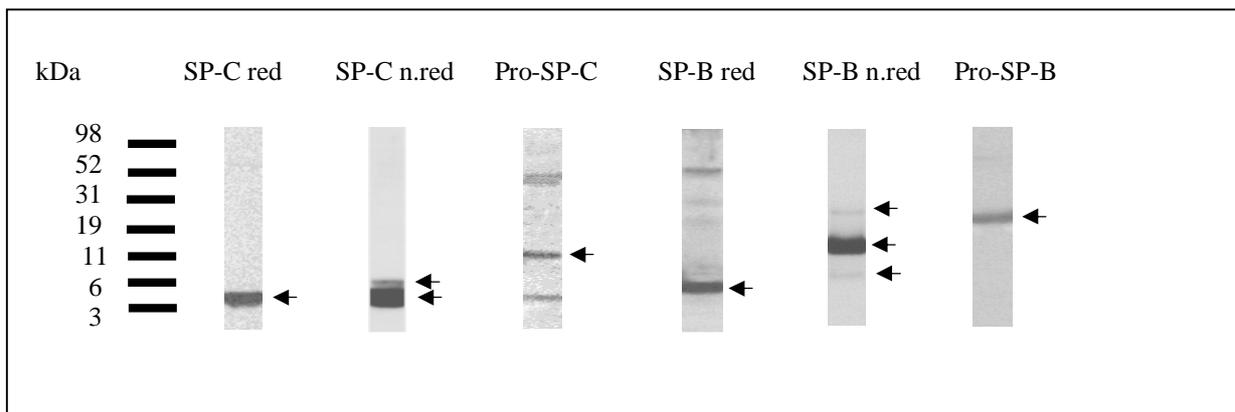


Abbildung 3.30: Musterbeispiel der Banden von SP-C, SP-B und ihren Vorstufen (Pfeile). Die unter reduzierenden Bedingungen auf Pro-SP-C bzw. SP-B untersuchten Westernblots waren zuvor auch mit dem SP-C- bzw. Pro-SP-B-Antikörper inkubiert worden, wodurch hier zusätzliche Banden auftraten (vergleiche 3.1.1 und 3.1.2). Es wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein aufgetragen.

Tabelle 3.2: Häufigkeit der einzelnen Proteinnachweise

Gruppe	SP-C red	SP-C n.red	Pro-SP-C	SP-B red	SP-B n.red	Pro-SP-B
CF	19/21 (4,2 kDa)	19/21 (4,2 kDa) 5/21 (7 kDa)	0/21 (15-16 kDa) 2/21 (3-4 kDa)	21/21 (8 kDa)	21/21 (16-18 kDa) 16/21 (30 kDa) 14/21 (8kDa)	21/21 (24-25 kDa) 4/21 (19-21 kDa)
Bronchitis	15/15 (4,2 kDa)	15/15 (4,2 kDa) 4/15 (7 kDa)	0/15 (15-16 kDa) 0/15 (3-4kDa)	14/15 (8 kDa)	15/15 (16-18kDa) 9/15 (30 kDa) 9/15 (8 kDa)	14/15 (24-25 kDa) 2/15 (19-12 kDa)
Pneumonie	13/14 (4,2 kDa)	13/14 (4,2 kDa) 2/14 (7 kDa)	0/14 (15-16 kDa) 0/14 (3-4 kDa)	13/14 (8 kDa)	14/14 (16-18 kDa) 6/14 (30 kDa) 4/14 8 kDa)	12/14 (24-25 kDa) 1/14 (19-21 kDa)
Kontrolle	4/4 (4,2 kDa)	14/14 (4,2 kDa) 3/14 (7 kDa)	0/14 (15-16 kDa) 0/14 (3-4 kDa)	14/14 (8 kDa)	4/4 (16-18 kDa) 2/4 (30 kDa) 1/4 (8 kDa)	13/14 (24-25 kDa) 2/14 (19-21 kDa)
Gesamt	51/54 (4,2 kDa)	61/64 (4,2 kDa) 14/64 (7 kDa)	0/64 (15-16 kDa) 2/64 (3-4 kDa)	62/64 (8 kDa)	54/54 (16-18 kDa) 33/54 (30 kDa) 28/54 (8 kDa)	60/64 (24-25 kDa) 9/64 (19-21 kDa)

3.2 Quantitative Auswertung

3.2.1 Gesamtproteinkonzentration

Vor Durchführung der Westernblotanalysen wurden mit der Methode nach Bradford (siehe 2.3) die Gesamtproteinkonzentrationen der einzelnen Lavageproben ermittelt. Dies diente einerseits der Bestimmung des für die Gelelektrophorese aufzutragenen Probenvolumens für jeweils 5 µg Gesamtprotein bzw. der Angabe der anschließend ermittelten Menge von SP-C und SP-B pro Gesamtprotein. Auf der anderen Seite konnte aber auch ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Anteil neutrophiler Granulozyten als Indikator des Schweregrades der pulmonalen Krankheitsaktivität und der Gesamtproteinkonzentrationen in den bronchoalveolären Lavagen untersucht werden, was in Abbildung 3.32 dargestellt wurde. Abbildung 3.31 zeigt zunächst einen Überblick der Gesamtproteinkonzentrationen der einzelnen Patientengruppen, welche keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

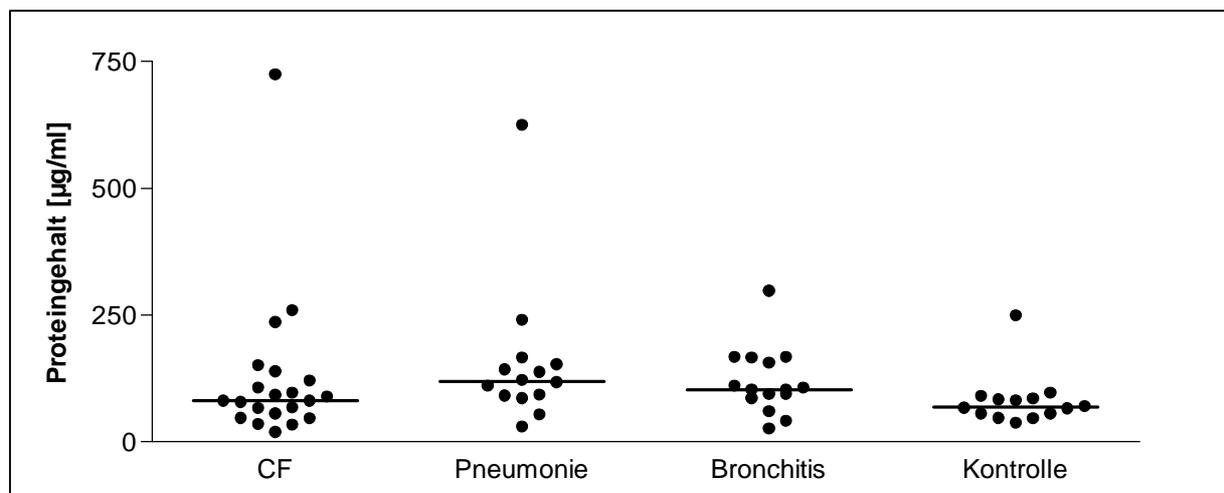
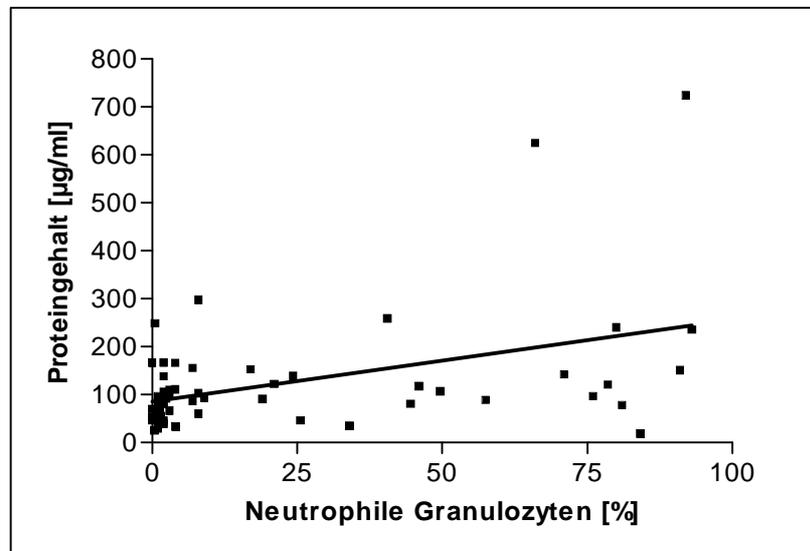


Abbildung 3.31: Vergleich der Gesamtproteinkonzentrationen der Lavageproben aus den verschiedenen Patientengruppen. Der Kruskal-Wallis-Test erbrachte mit $P = 0,036$ einen signifikanten Unterschied zwischen den vier Gruppen, welcher jedoch durch den Post-Test nach Dunn zwischen keiner der Gruppen bestätigt wurde (P jeweils $> 0,05$). Die Mediane sind als waagerechte Linien dargestellt.



$$r = 0,3916; P = 0,0014$$

Abbildung 3.32: Gruppenübergreifende Korrelation der Gesamtproteinkonzentrationen mit dem Anteil neutrophiler Granulozyten in den Lavageproben. Lineare Regressionsanalyse (schwarze Linie).

Mit zunehmendem Anteil neutrophiler Granulozyten (und somit höherer Krankheitsaktivität) zeigte sich gruppenübergreifend ein Anstieg des Gesamtproteingehaltes in den Lavageproben (Abbildung 3.32). Da zwei der gemessenen Proben extrem hohe Proteingehaltswerte von über 600 µg/ml aufwiesen, wurde eine weitere Korrelationsanalyse unter Ausschluß dieser beiden Proben durchgeführt. Sie führte ebenfalls zu einem deutlich signifikanten Ergebnis ($r = 0,34$; $P = 0,0069$).

3.2.2 Surfactantprotein C

3.2.2.1 Standardkurven

Um Absolutwerte für die gemessenen Mengen von SP-C in den Lavageproben angeben zu können, wurden sowohl in reduzierter als auch in nicht reduzierter Form jeweils in Dreifachbestimmung bekannte Mengen des Proteins zwischen 1 und 80 ng aufgetragen. Abbildung 3.33 zeigt je ein Beispiel der entsprechenden Westernblotanalysen.

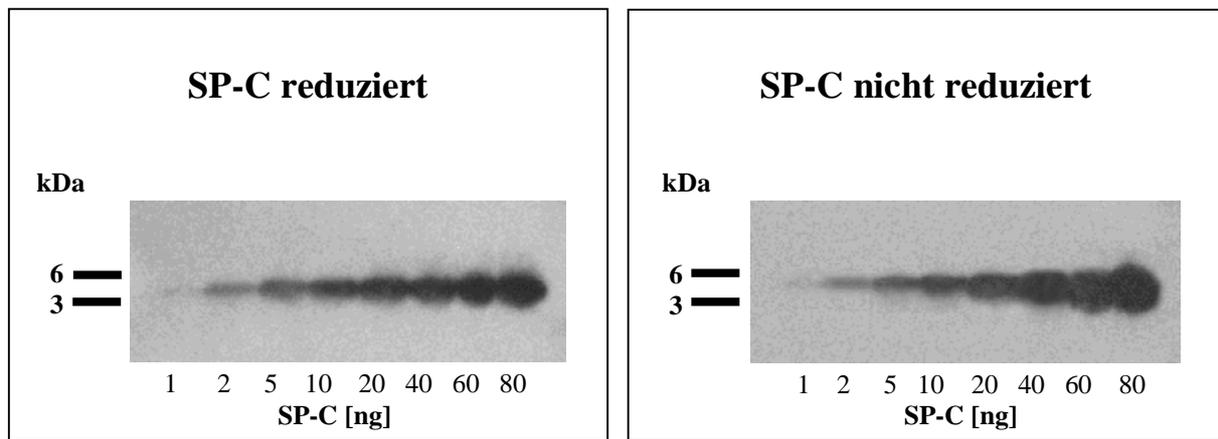


Abbildung 3.33: Westernblotanalysen der Standardreihen von SP-C in reduziertem (links) sowie nicht reduziertem (rechts) Zustand (jeweils ein Beispiel).

Wie bei der anschließenden Untersuchung der Patientenproben wurde der ermittelte Wert der entsprechenden Bandenstärken dann durch den bei Messung der Standardprobe (20 ng SP-C) erhaltenen Wert dividiert (siehe auch 2.5). Die Mittelwerte der Mehrfachbestimmungen wurden als Standardkurven gegen die aufgetragenen Proteinmengen dargestellt (Abbildung 3.34).

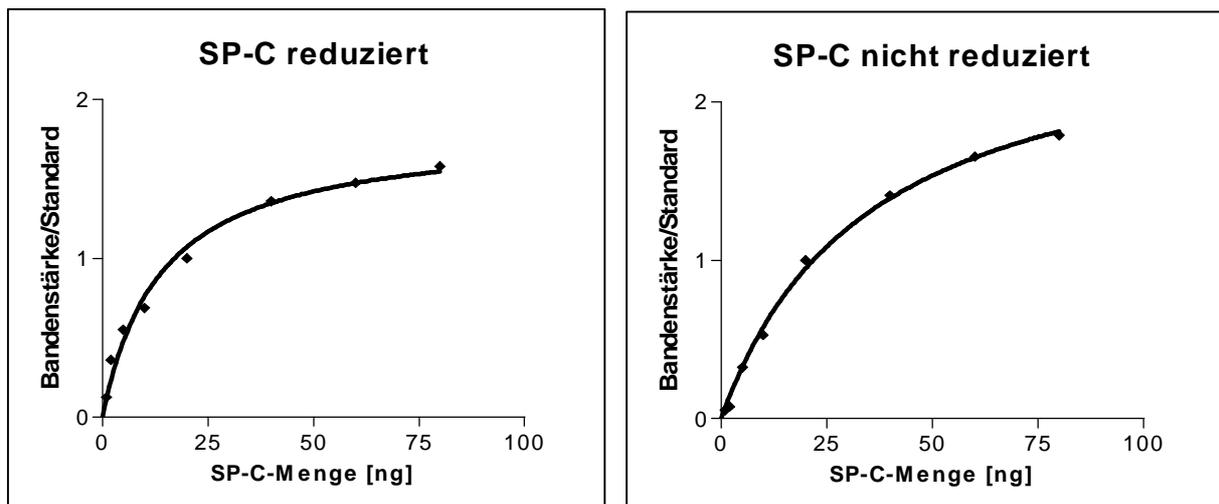


Abbildung 3.34: Standardkurven für SP-C in reduziertem (links) sowie nicht reduziertem (rechts) Zustand (dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Mehrfachbestimmungen). Es zeigt sich jeweils eine nichtlineare Funktion (Hyperbel).

Bei den folgenden Messungen der SP-C-Mengen in den Patientenproben in reduziertem und nicht reduziertem Zustand zeigte sich, dass einige Werte zum Teil deutlich oberhalb der Standardkurvenbereiche lagen. Da eine Extrapolation durch die fehlende Linearität der Kurven zu sehr ungenauen Ergebnissen geführt hätte, wurden alle Proben, die bei der Umrechnung der Werte SP-C-Mengen von mehr als 60 ng ergaben, erneut in höheren Verdünnungen aufgetragen und die erhaltenen Ergebnisse entsprechend umgerechnet.

3.2.2.2 Vergleiche von SP-C zwischen den Krankheitsgruppen

Nach Erstellung der Standardkurven folgte die quantitative Bestimmung von SP-C in reduzierter und nicht reduzierter Form nach der unter 2.5 beschriebenen Methode. Bei der Betrachtung von unter reduzierenden Bedingungen gemessenem SP-C zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Krankheitsgruppen „Cystische Fibrose“, „Pneumonie ohne Immundefekt“, und „Chronische Bronchitis“ sowie der lungengesunden Kontrollgruppe (Abbildung 3.35), wobei mit letzterer aussagefähige Untersuchungen wegen der geringen Fallzahl (n = 4) sicherlich nur sehr eingeschränkt möglich waren.

Die in Abbildung 3.35 erkennbaren hohen SP-C-Werte einiger Proben aus der CF-Patientengruppe wurden, wie schon unter 3.2.2.1 beschrieben, durch erneute Messungen verdünnter Lavageproben dieser Patienten bestätigt. Es handelt sich dabei ausschließlich um Proben von Patienten mit einem neutrophilen Granulozytenanteil der Gesamtzellzahl im BAL-Zytospin von weniger als 5% (vergleiche 3.2.2.3).

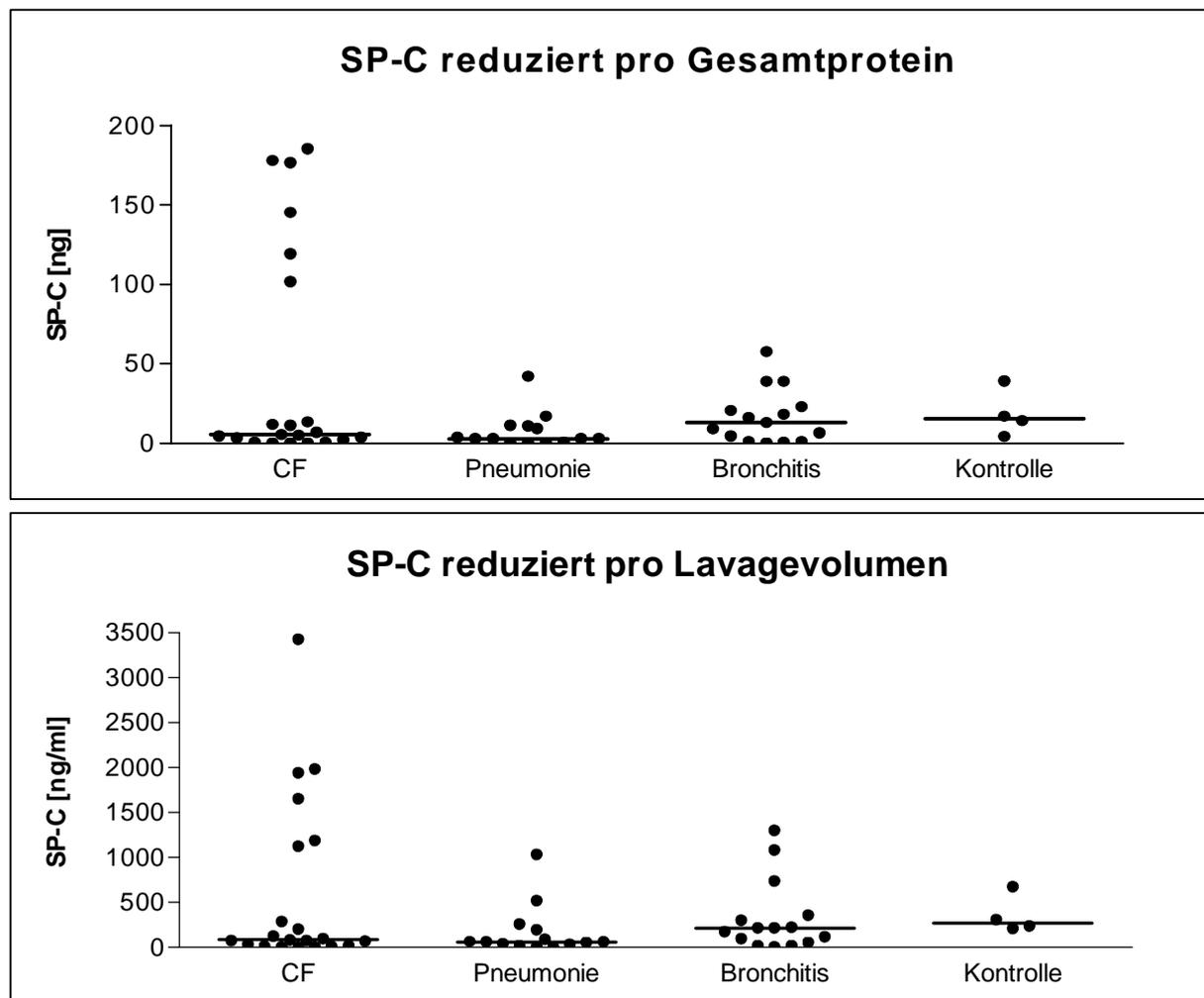


Abbildung 3.35: Vergleiche der SP-C-Mengen in den Lavageproben der verschiedenen Patientengruppen, bezogen auf 5 µg Gesamtprotein (oben) bzw. 1 ml Lavagevolumen (unten), jeweils in reduzierter Form. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den als waagerechte Linien dargestellten Medianen (Kruskal-Wallis-Test: P jeweils > 0,05).

Bei der Untersuchung von unter nicht reduzierenden Bedingungen gemessenem SP-C ergab der Kruskal-Wallis-Test bei den pro Volumen Lavageflüssigkeit angegebenen SP-C-Mengen zunächst einen signifikanten Unterschied der Mediane der einzelnen Gruppen, welcher sich nach Durchführung des Post-Tests nach Dunn jedoch zwischen keiner der Gruppen bestätigte (Abbildung 3.36).

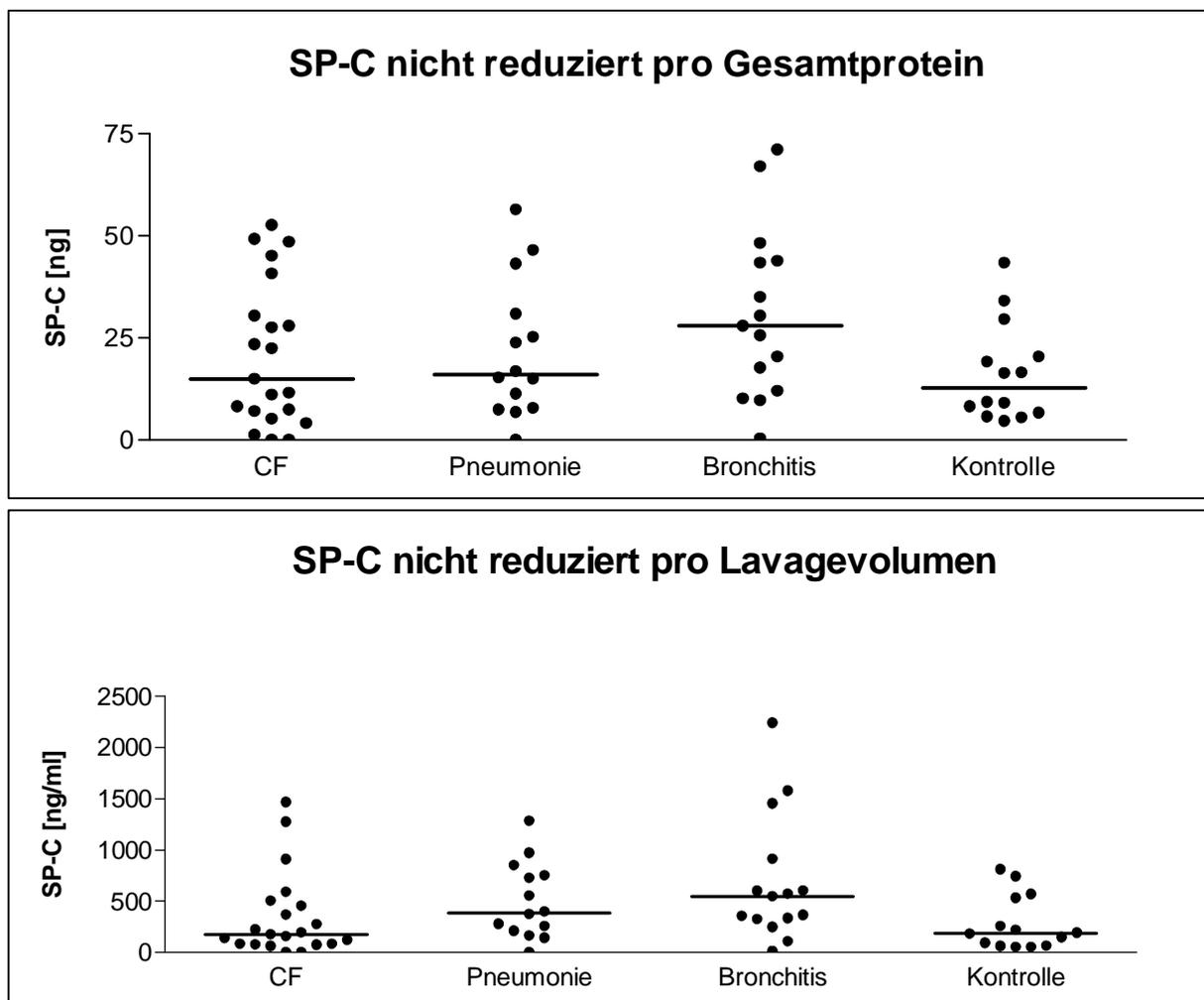


Abbildung 3.36: Vergleiche der SP-C-Mengen in den Lavageproben der verschiedenen Patientengruppen, bezogen auf 5 µg Gesamtprotein (oben) bzw. 1 ml Lavagevolumen (unten), jeweils in nicht reduzierter Form. Lediglich bei der Untersuchung der pro Lavagevolumen angegebenen Daten zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Mediane (waagerechte Linien) im Kruskal-Wallis-Test ($P = 0,035$), welcher im Post-Test nach Dunn nicht bestätigt wurde (P zwischen allen Gruppen jeweils $> 0,05$).

3.2.2.3 Neutrophile Granulozyten im BAL-Zytospin

SP-C wurde quantitativ mit dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten an der Gesamtzellzahl im Zytospin der Lavage und somit indirekt mit dem Ausmaß der pulmonalen Entzündungsaktivität zum Zeitpunkt der Lavage korreliert. Bei den gruppenübergreifenden Untersuchungen zeigten sich dabei signifikante Abnahmen von in reduziertem Zustand gemessenen SP-C, sowohl pro Gesamtprotein als auch pro Volumen Lavageflüssigkeit (Abbildung 3.37). Bei SP-C in nicht reduzierter Form brachte lediglich die Untersuchung der

pro Gesamtprotein angegebenen Mengen ein knapp signifikantes Testergebnis (Abbildung 3.38).

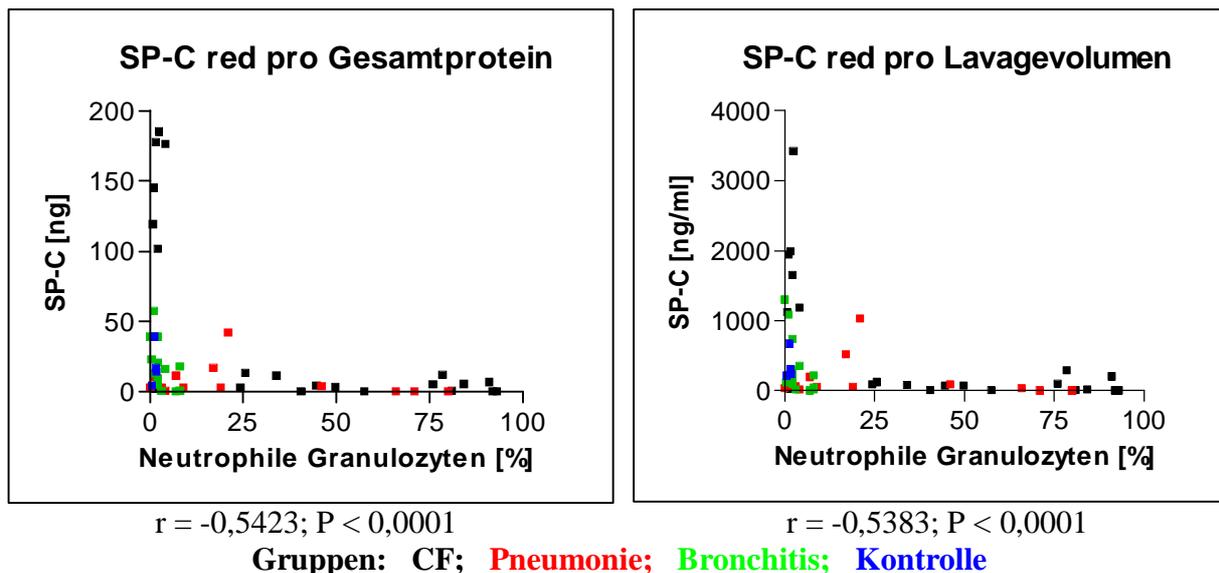


Abbildung 3.37: Gruppenübergreifende Korrelationen der SP-C-Mengen in reduzierter Form, angegeben pro 5 µg Gesamtprotein (links) bzw. 1 ml Lavagevolumen (rechts) mit dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im BAL-Zytospin.

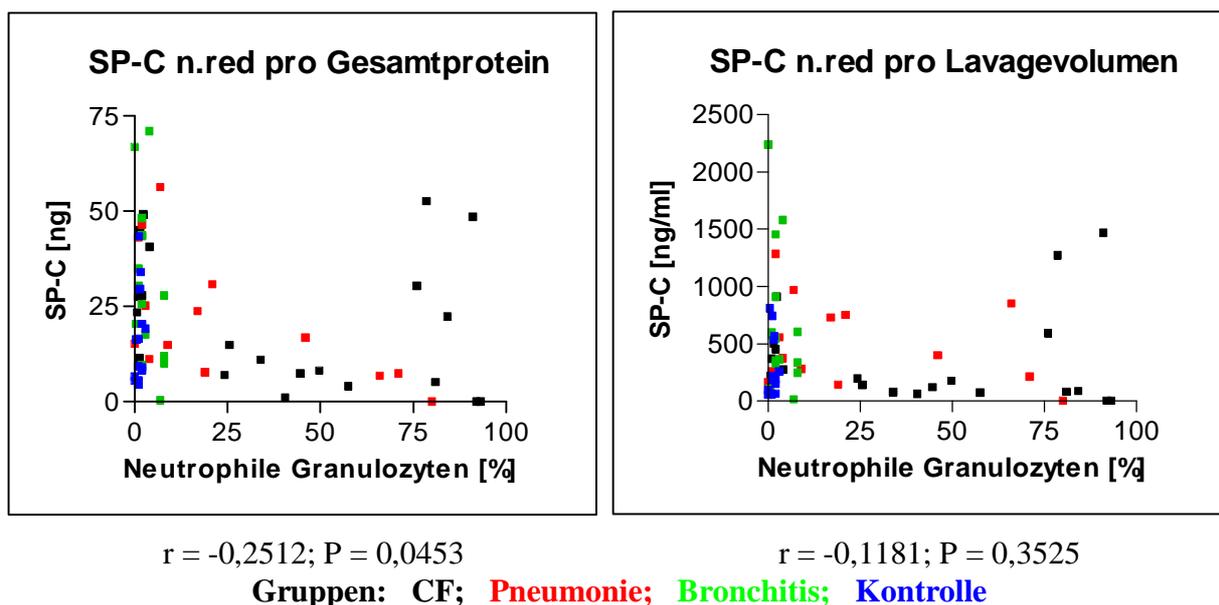


Abbildung 3.38: Gruppenübergreifende Korrelationen der SP-C-Mengen in nicht reduzierter Form, angegeben pro 5 µg Gesamtprotein (links) bzw. 1 ml Lavagevolumen (rechts) mit dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im BAL-Zytospin.

Trotz der hochsignifikanten Ergebnisse bei den in Abbildung 3.37 dargestellten Korrelationen fallen beim Betrachten der Diagramme der unter reduzierenden Bedingungen untersuchten Lavageproben die sehr hohen SP-C-Werte einiger Proben mit niedrigem neutrophilen Granulozytenanteil auf. Diese hohen SP-C Werte ergaben sich, wie unter 3.2.2.2 bereits beschrieben, bei sechs Lavageproben aus der Gruppe „Cystische Fibrose“. Sie führten jedoch nicht zu einer wesentlichen Beeinträchtigung der Korrelationsergebnisse; diese waren nach Ausschluß der genannten Proben von den Korrelationsanalysen immer noch hochsignifikant mit P-Werten von 0,0003 (SP-C red pro Gesamtprotein) bzw. 0,0004 (SP-C red pro Lavagevolumen).

Innerhalb der Patientengruppe „Cystische Fibrose“, welche mit 21 Proben die größte der untersuchten Gruppen darstellte, wurden ebenfalls Korrelationen zwischen SP-C und dem Anteil neutrophiler Granulozyten durchgeführt. Hierbei ergaben sich signifikante P-Werte jeweils bei den unter reduzierenden Bedingungen gemessenen Patientenproben pro Gesamtprotein bzw. Lavagevolumen, nicht jedoch bei den unter nicht reduzierenden Bedingungen untersuchten Proben (Abbildungen 3.39 und 3.40).

Bei Unterteilung der CF-Patienten in eine Gruppe mit einem geringen (unter 5%; $n = 7$) und eine mit einem hohen (über 24%; $n = 14$) Anteil neutrophiler Granulozyten in der Lavage konnten hingegen in allen vier Darstellungen signifikante Unterschiede festgestellt werden (Abbildungen 3.41 und 3.42). Es zeigten sich jeweils deutlich höhere SP-C-Mengen in der Gruppe mit weniger als 5% Neutrophilen. Die hier durchgeführte Unterteilung bot sich trotz der unterschiedlichen Fallzahlen an, da so einerseits der größtmögliche Abstand der Grenzen der Granulozytenanteile zwischen den Gruppen erreicht wurde, und andererseits bei einem Neutrophilenanteil von weniger als 5% von einer sehr geringen bis nicht vorhandenen pulmonalen Entzündungsaktivität zum Zeitpunkt der BAL ausgegangen werden konnte (Entspricht dem Normalwert für den neutrophilen Granulozytenanteil in der BAL).

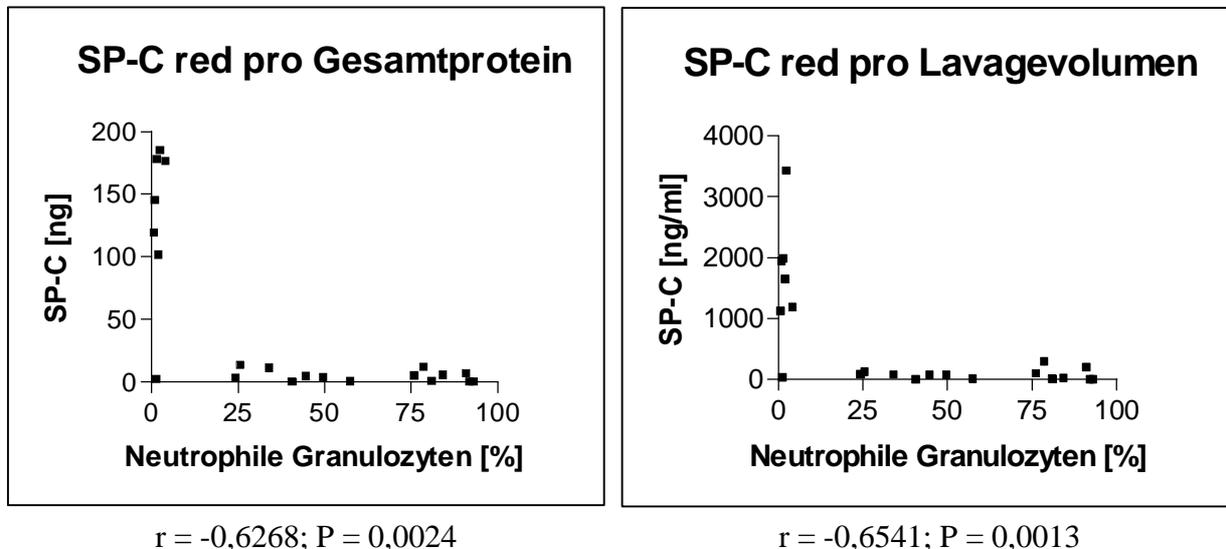


Abbildung 3.39: Korrelationen der SP-C-Mengen aus der Gruppe „Cystische Fibrose“ in reduzierter Form, angegeben pro 5 µg Gesamtprotein (links) bzw. 1 ml Lavagevolumen (rechts) mit dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im BAL-Zytospin.

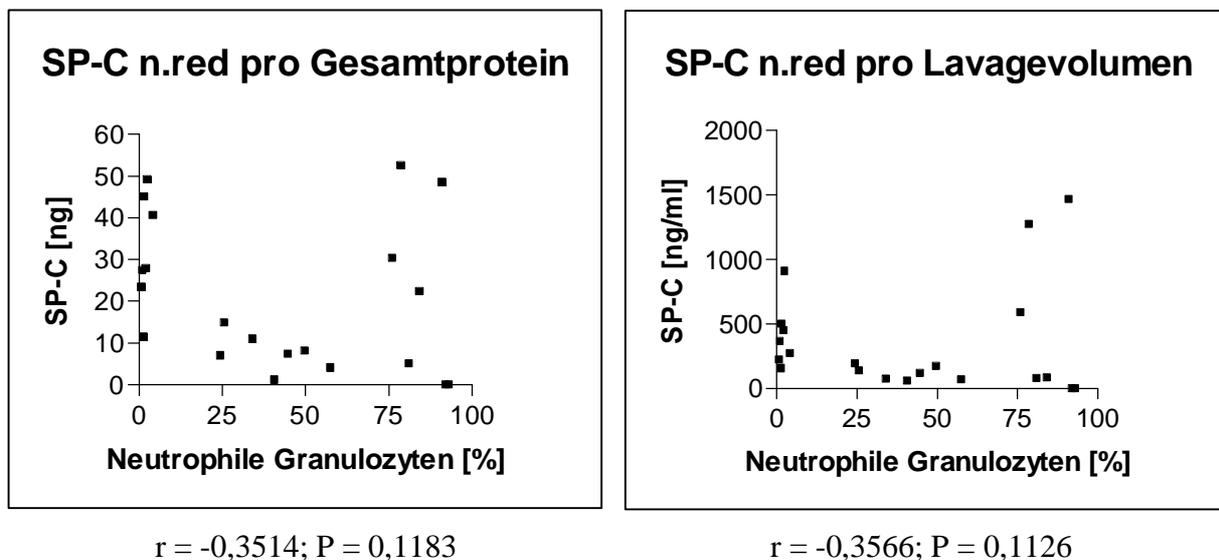
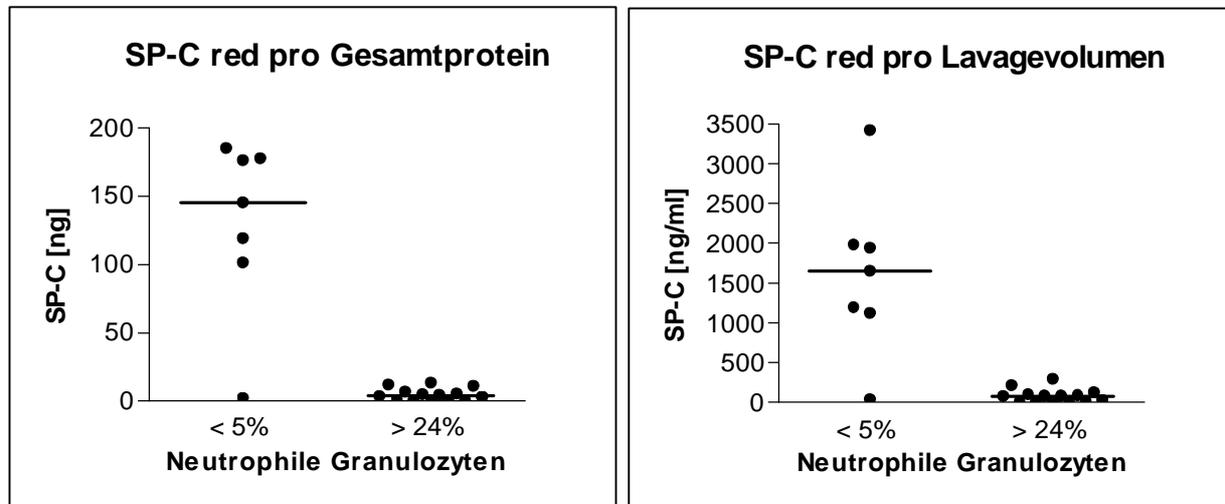


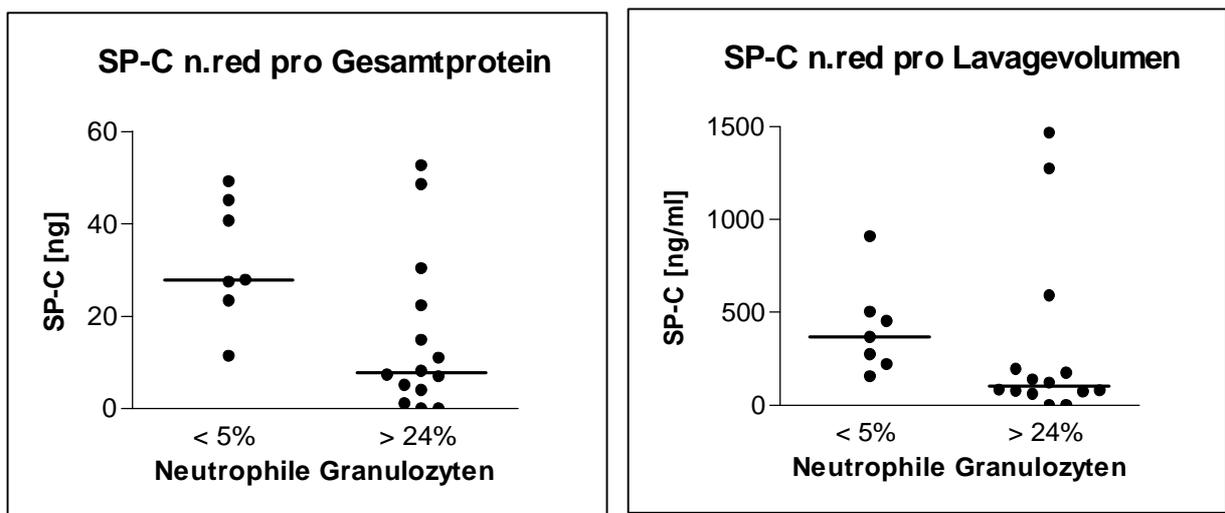
Abbildung 3.40: Korrelationen der SP-C-Mengen aus der Gruppe „Cystische Fibrose“ in nicht reduzierter Form, angegeben pro 5 µg Gesamtprotein (links) bzw. 1 ml Lavagevolumen (rechts) mit dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im BAL-Zytospin.



$P = 0,0032$

$P = 0,0025$

Abbildung 3.41: Vergleiche der SP-C-Mengen in reduziertem Zustand pro 5 µg Gesamtprotein (links) sowie pro 1 ml Lavagevolumen (rechts) in den bronchoalveolären Lavagen von CF-Patienten mit niedrigem (< 5%) und hohem (> 24%) pulmonalen neutrophilen Granulozytenanteil. Mann-Whitney-Test: P jeweils < 0,01.



$P = 0,0278$

$P = 0,0481$

Abbildung 3.42: Vergleiche der SP-C-Mengen in nicht reduziertem Zustand pro 5 µg Gesamtprotein (links) sowie pro 1 ml Lavagevolumen (rechts) in den bronchoalveolären Lavagen von CF-Patienten mit niedrigem (< 5%) und hohem (> 24%) pulmonalen neutrophilen Granulozytenanteil. Mann-Whitney-Test: P jeweils < 0,05.

Korrelationen innerhalb der weiteren Patientengruppen sowie der lungengesunden Kontrollgruppe zwischen SP-C reduziert/nicht reduziert pro Gesamtprotein/Lavagevolumen und den neutrophilen Granulozytenanteilen in der BAL ergaben bei den folgenden Untersuchungen signifikante Ergebnisse:

„Pneumonie ohne Immundefekt“: SP-C nicht reduziert pro Gesamtprotein: P = 0,0156

„Chronische Bronchitis“: SP-C reduziert pro Gesamtprotein: P = 0,0098

SP-C reduziert pro Lavagevolumen: P = 0,0303

Alle weiteren Korrelationen innerhalb dieser Gruppen ergaben P-Werte über 0,05. Im Falle der lungengesunden Kontrollgruppe konnten für die Bestimmungen von SP-C in reduziertem Zustand aufgrund der geringen Fallzahlen (n = 4) keine P-Werte ermittelt werden. Die entsprechenden Korrelationsdiagramme sind im Anhang abgebildet.

3.2.2.4 Bakteriologische Untersuchungen

Als zusätzlicher Indikator für das Ausmaß der pulmonalen Entzündungsaktivität zum Zeitpunkt der BAL dienten neben dem neutrophilen Granulozytenanteil auch die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen der Lavageflüssigkeiten. Innerhalb der Gruppe „Cystische Fibrose“ wurde dabei noch zwischen dem Nachweis der Keime *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylokokkus aureus* differenziert. Diese Unterscheidung wurde bei den gruppenübergreifenden Untersuchungen wegen zu geringer Datenmengen aus den anderen Gruppen nicht durchgeführt. Hier wurde lediglich zwischen positivem und negativem Keimnachweis unterschieden. Die Patienten der lungengesunden Kontrollgruppe sowie der Patient P 1 aus der Gruppe „Pneumonie ohne Immundefekt“ wurden von diesen Untersuchungen ausgeschlossen, da bei ihnen keine bakteriologischen Ergebnisse vorlagen.

Bei den gruppenübergreifenden Vergleichen zeigten sich sowohl pro Gesamtprotein als auch pro Lavagevolumen signifikant niedrigere SP-C-Mengen bei Patienten mit positivem gegenüber Patienten mit negativem Keimnachweis, allerdings lediglich bei den in reduziertem Zustand untersuchten Proben (Abbildungen 3.43). Diese Ergebnisse hatten, wie bei den gruppenübergreifenden Korrelationen mit dem neutrophilen Granulozytenanteil, auch nach Ausschluß der sechs Proben mit sehr hohen SP-C-Mengen Bestand (vergleiche 3.2.2.3).

Die unter nicht reduzierenden Bedingungen untersuchten Proben zeigten beim Vergleich der SP-C-Mengen zwar ebenfalls niedrigere Mediane in der Patientengruppe mit positivem Keimnachweis in der Lavage; es ergaben sich jedoch im Mann-Whitney-Test keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$; Abbildung 3.44).

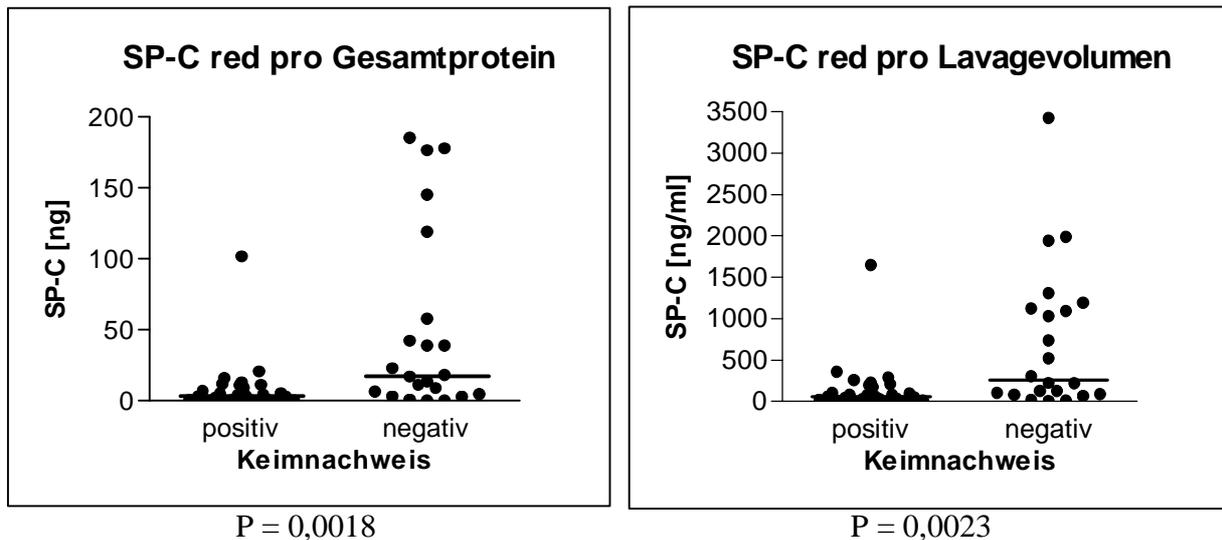


Abbildung 3.43: Vergleiche der SP-C-Mengen in reduziertem Zustand bezogen auf 5 µg Gesamtprotein (links) sowie 1 ml Lavagevolumen (rechts) bei Patienten mit positivem bzw. negativem Keimnachweis in der BAL. Mann-Whitney-Test: P jeweils $< 0,01$.

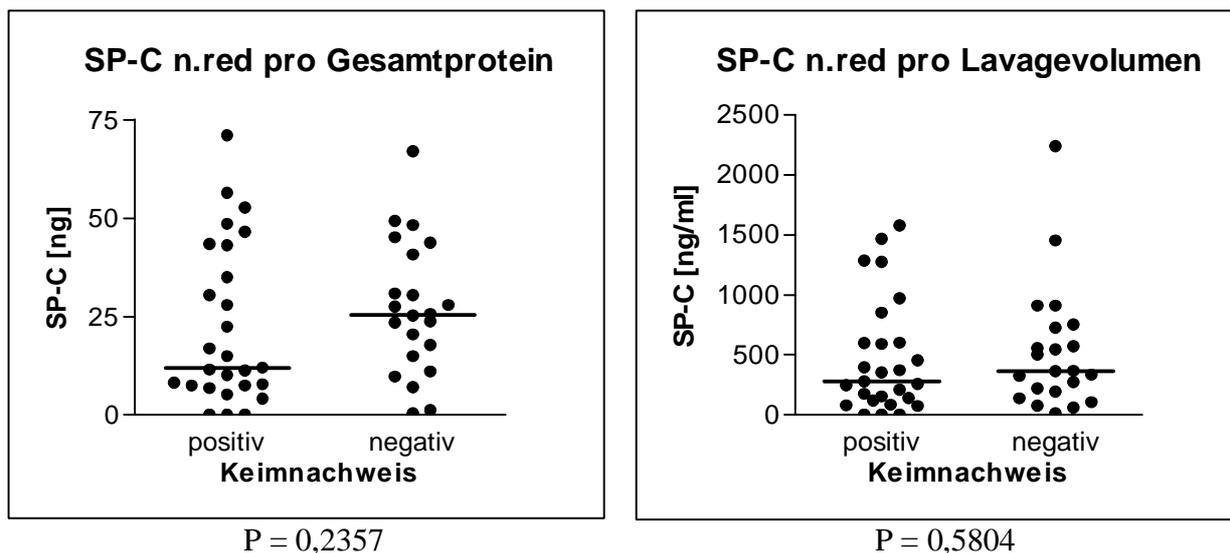


Abbildung 3.44: Vergleiche der SP-C-Mengen in nicht reduziertem Zustand bezogen auf 5 µg Gesamtprotein (links) sowie 1 ml Lavagevolumen (rechts) bei Patienten mit positivem bzw. negativem Keimnachweis in der BAL. Mann-Whitney-Test: P jeweils $> 0,05$.

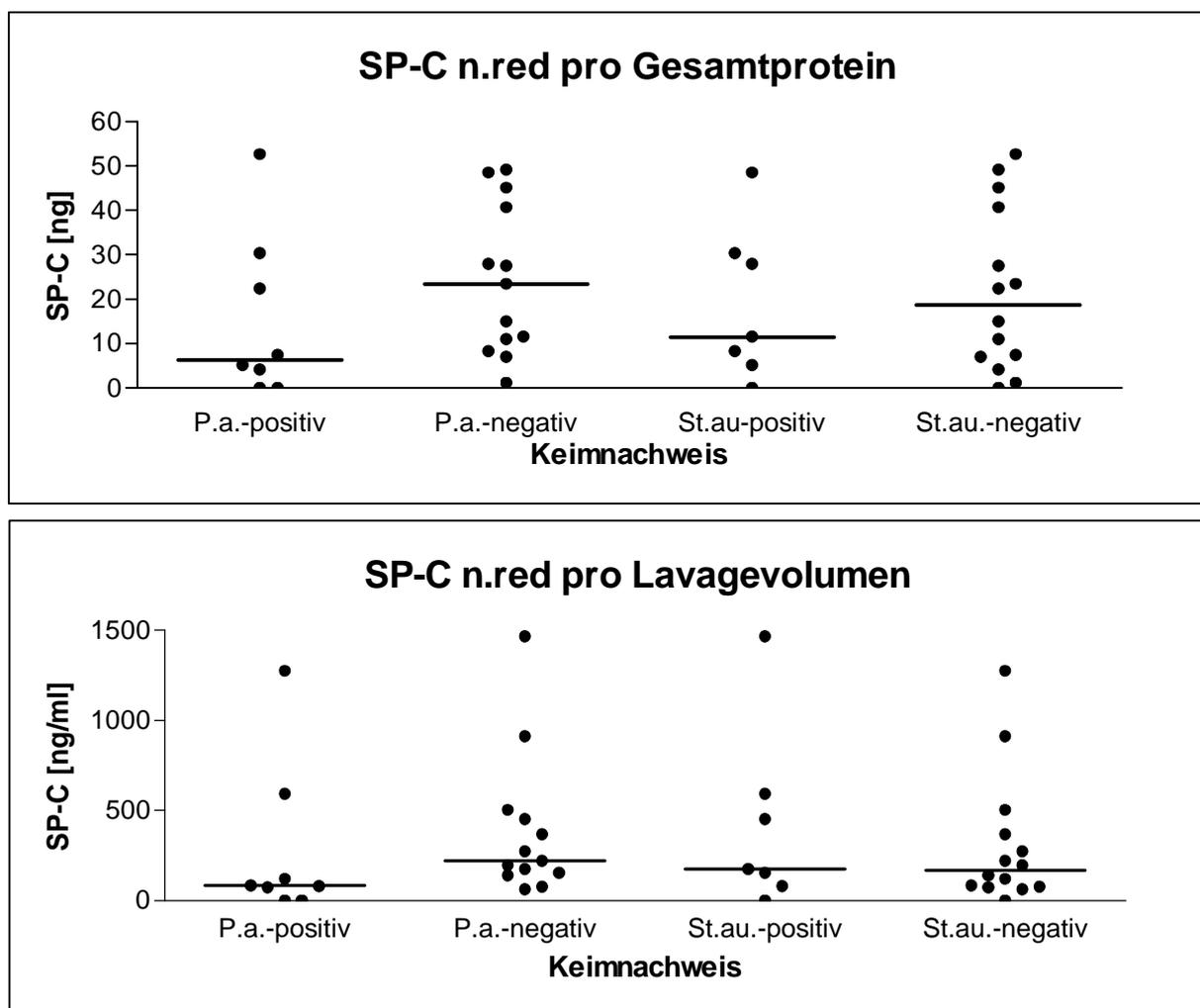


Abbildung 3.46: Vergleich der SP-C-Mengen in nicht reduzierter Form bei CF-Patienten mit positivem bzw. negativem bakteriologischen Befund für *Pseudomonas aeruginosa* (P.a.) bzw. *Staphylokokkus aureus* (St.au) in der BAL, bezogen auf 5 µg Gesamtprotein (oben) sowie 1 ml Lavagevolumen (unten).

Mann-Whitney-Test: P für alle Vergleiche jeweils > 0,05.

Eine signifikante Verringerung der SP-C-Mengen in der BAL bei positivem gegenüber negativem Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* im Mann-Whitney-Test zeigte sich auch hier bei den unter reduzierenden Bedingungen untersuchten Proben, während sich für die unter nicht reduzierenden Bedingungen gemessenen Proben sowie für den Nachweis von *Staphylokokkus aureus* keine signifikanten Unterschiede ergaben (P jeweils > 0,05).

Auf Vergleiche von Patientenproben mit positivem Nachweis für beide Keime in der BAL wurde hier verzichtet, da die geringe Fallzahl (n = 3) keine aussagefähigen Ergebnisse zugelassen hätte.

3.2.2.5 Weitere durchgeführte Untersuchungen

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Untersuchungen wurden gruppenübergreifende Korrelationen zwischen SP-C und dem Alter der Patienten sowie zwischen SP-C und der forcierten expiratorischen Einsekundenkapazität (FEV1) zum Lavagezeitpunkt durchgeführt. Bei letzterer konnten neben den 21 Patienten der Gruppe „Cystische Fibrose“ lediglich 10 weitere Patienten aus den Gruppen „Pneumonie ohne Immundefekt“ und „Chronische Bronchitis“ berücksichtigt werden, da bei allen anderen keine Daten zur Lungenfunktion vorlagen. Sämtliche Korrelationsanalysen zwischen den SP-C-Mengen und dem Patientenalter bzw. der Lungenfunktion ergaben keine signifikanten Ergebnisse (P jeweils $> 0,05$).

Ebenfalls gruppenübergreifend untersucht wurden die SP-C-Mengen als Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Patienten. Im Mann-Whitney-Test konnten auch hier keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Alle Diagramme zu den hier aufgeführten Untersuchungen sind im Anhang dargestellt.

3.2.3 Surfactantprotein B

3.2.3.1 Standardkurven

Es wurden für SP-B jeweils in Dreifachbestimmung Standardkurven unter reduzierenden sowie unter nicht reduzierenden Bedingungen mit Proteinkonzentrationen zwischen 1 und 80 ng erstellt. Wie bei der quantitativen Auswertung von SP-C (vergleiche 3.2.2) diente auch bei SP-B die 20 ng Surfactantprotein enthaltende Probe als Standard, um einen Vergleich der ermittelten Bandenstärken zwischen den einzelnen Westernblotanalysen zu ermöglichen (vergleiche 3.2.2.1). Abbildung 3.47 zeigt jeweils ein Beispiel der Westernblotanalysen der SP-B-Standardkurven in reduziertem sowie in nicht reduziertem Zustand. In Abbildung 3.48 sind die entsprechenden Mittelwerte der Bandenstärken in Bezug auf die Bandenstärke der Standardprobe gegen die aufgetragenen Proteinmengen dargestellt.

Da bei den folgenden quantitativen SP-B-Bestimmungen in den Patientenproben wie bei den SP-C-Messungen einige Werte oberhalb der Standardkurvenbereiche lagen, wurden auch hier Proben mit Ergebnissen über 60 ng erneut in höheren Verdünnungen untersucht und anschließend umgerechnet, um genauere und zuverlässigere Ergebnisse zu erhalten (vergleiche 3.2.2).

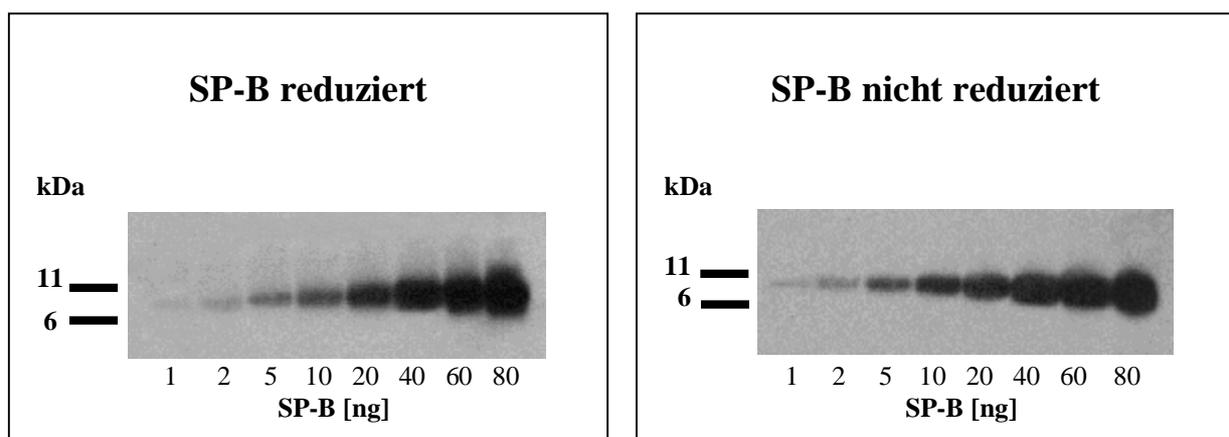


Abbildung 3.47: Westernblotanalysen der SP-B-Standardreihen in reduzierter (links) sowie nicht reduzierter (rechts) Form (jeweils ein Beispiel).

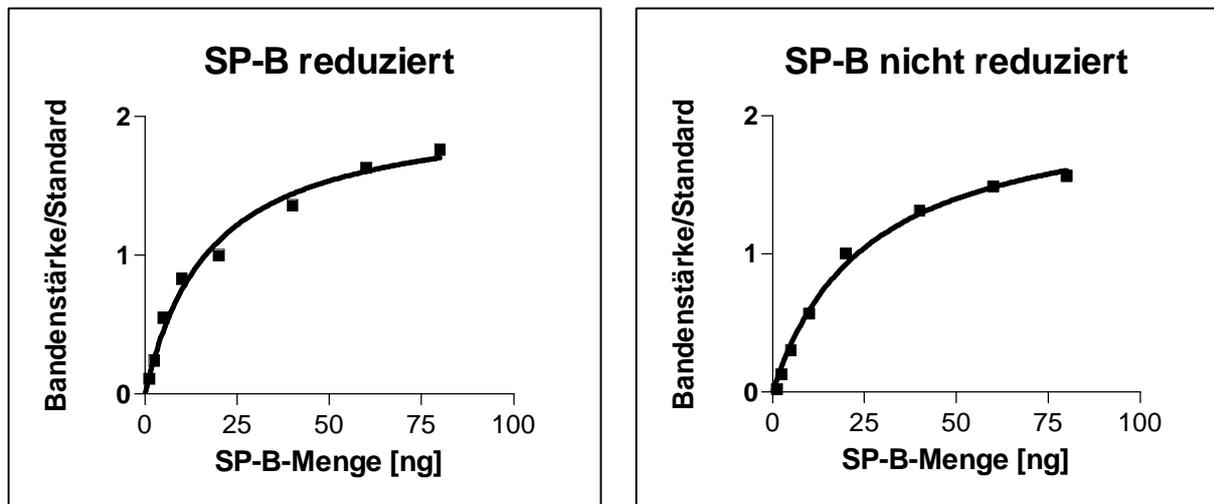


Abbildung 3.48: SP-B-Standardkurven in reduziertem (links) sowie nicht reduziertem (rechts) Zustand (dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Mehrfachbestimmungen). Es zeigt sich jeweils eine nichtlineare Funktion (Hyperbel).

3.2.3.2 Vergleiche von SP-B zwischen den Krankheitsgruppen

SP-B wurde nach Erstellung der Standardkurven wie SP-C quantitativ nach der unter 2.5 beschriebenen Methode unter reduzierenden sowie unter nicht reduzierenden Bedingungen bestimmt und jeweils bezogen auf die Gesamtproteinmenge sowie das Lavagevolumen angegeben. Vergleiche zwischen den einzelnen Patientengruppen „Cystische Fibrose“, „Pneumonie ohne Immundefekt“ und „Chronische Bronchitis“ sowie der lungengesunden Kontrollgruppe ergaben dabei die in den Abbildungen 3.49 und 3.50 dargestellten Ergebnisse. Im Kruskal-Wallis-Test wurden keine signifikanten Unterschiede der Mediane festgestellt. Ein verwertbares Ergebnis bezüglich der unter nicht reduzierenden Bedingungen untersuchten Proben der Kontrollgruppe konnte hier wegen der geringen Fallzahl ($n = 4$) nicht erwartet werden.

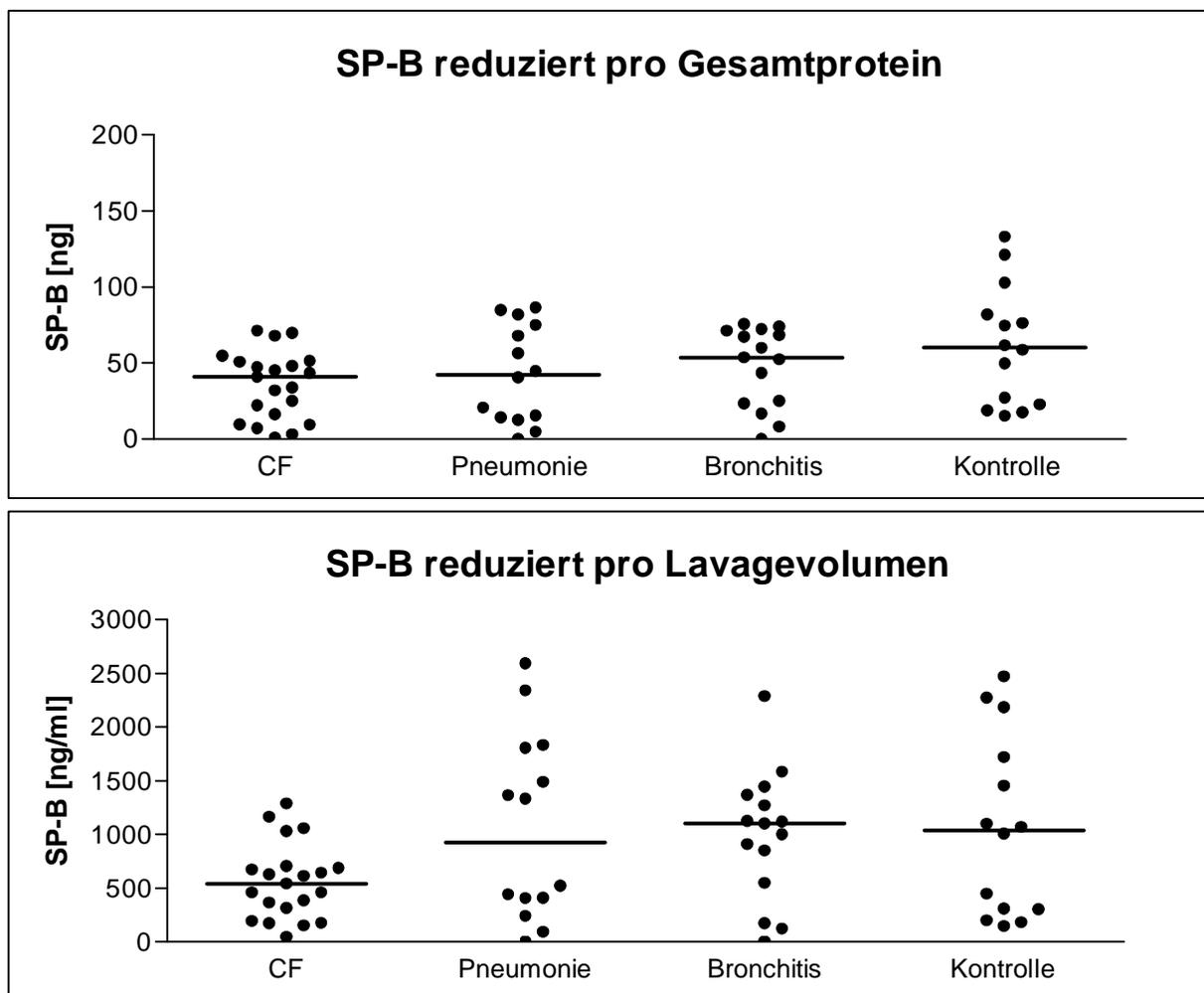


Abbildung 3.49: Vergleiche der SP-B-Mengen in den Lavageproben der verschiedenen Patientengruppen in reduziertem Zustand, angegeben pro 5 µg Gesamtprotein (oben) bzw. 1 ml Lavagevolumen (unten). Im Kruskal-Wallis-Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der als waagerechte Linien dargestellten Mediane (P jeweils > 0,05).

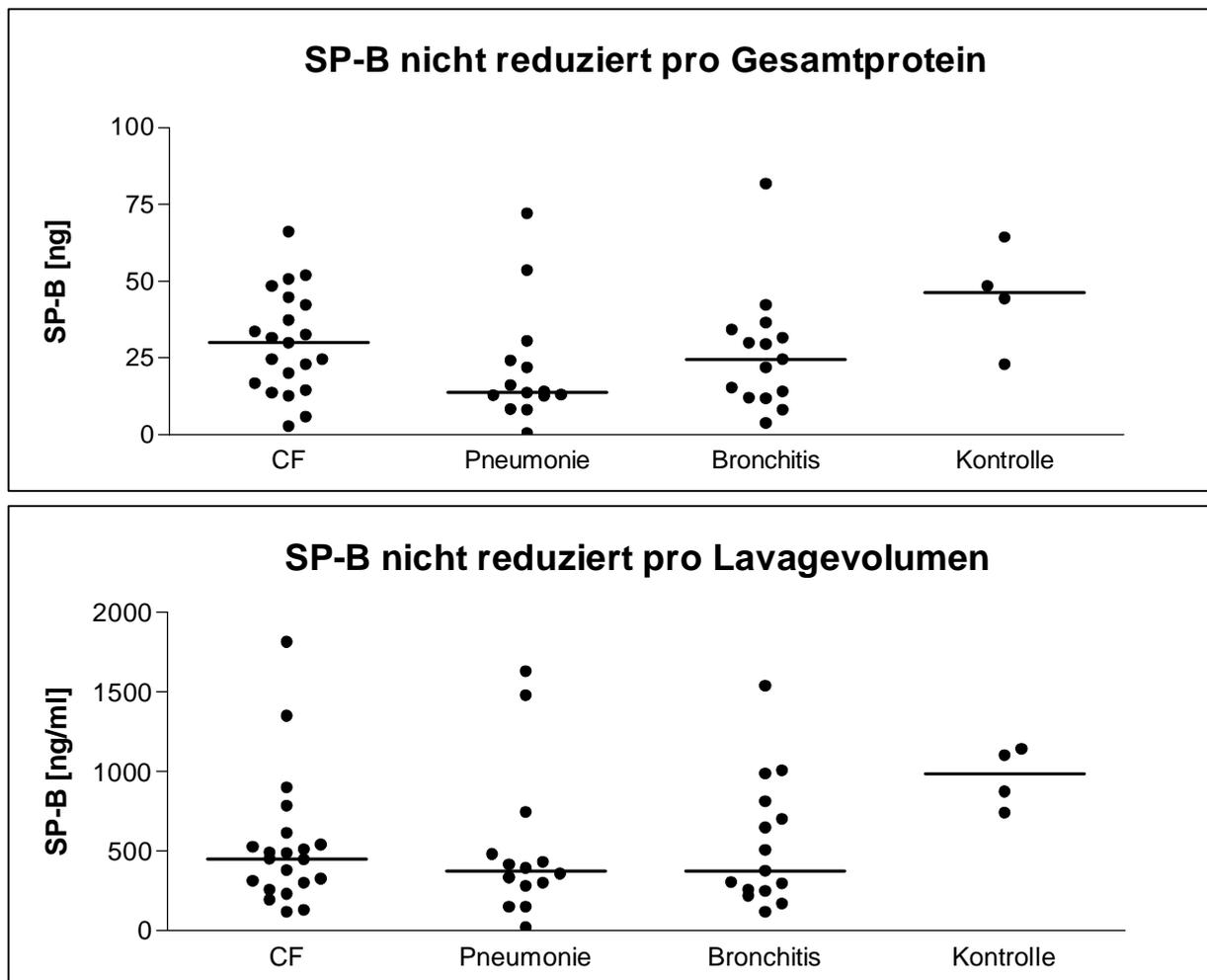
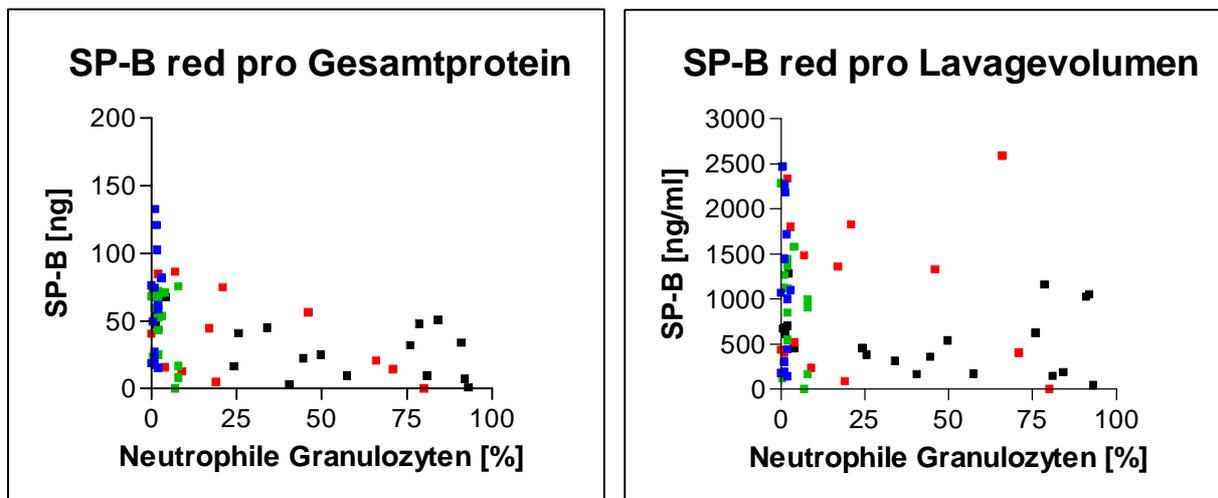


Abbildung 3.50: Vergleiche der SP-B-Mengen in den Lavageproben der verschiedenen Patientengruppen in nicht reduziertem Zustand, angegeben pro **5 µg Gesamtprotein** (oben) bzw. **1 ml Lavagevolumen** (unten). Im Kruskal-Wallis-Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der als waagerechte Linien dargestellte Mediane (P jeweils > 0,05).

3.2.3.3 Neutrophile Granulozyten im BAL-Zytospin

Auch bei SP-B wurden Vergleiche zwischen den quantitativ gemessenen Proteinmengen und dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im Zytospin der Lavagen erstellt (vergleiche 3.2.2.3). Die gruppenübergreifenden Untersuchungen ergaben dabei eine signifikante Abnahme der SP-B-Mengen bei steigendem Anteil neutrophiler Granulozyten bei den für SP-B pro Gesamtprotein durchgeführten Korrelationen sowohl in reduziertem als auch in nicht reduziertem Zustand, nicht jedoch für die pro Lavagevolumen angegebenen Ergebnisse (Abbildungen 3.51 und 3.52).

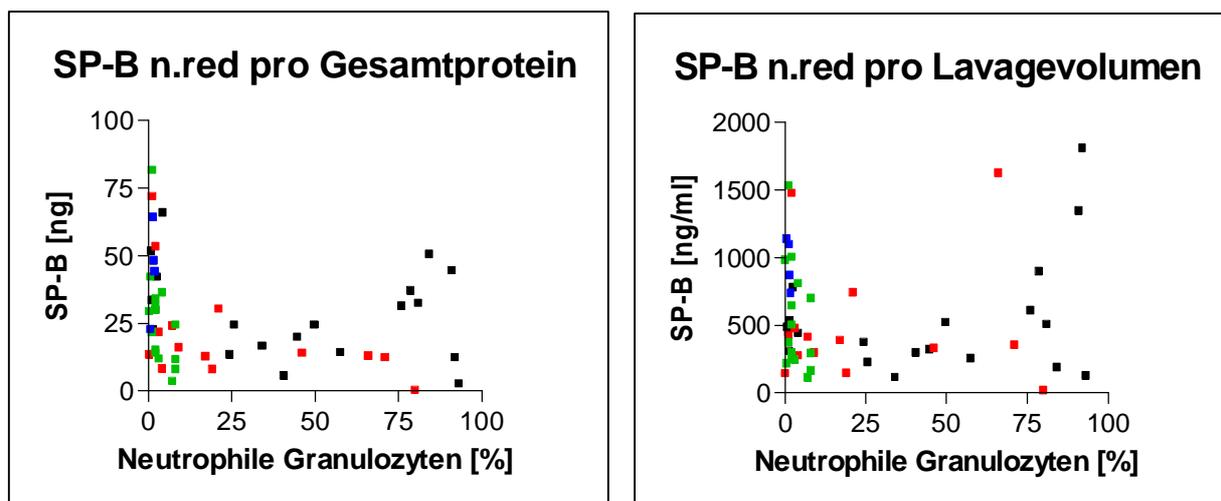


$$r = -0,4414; P = 0,0003$$

Gruppen: CF; **Pneumonie**; **Bronchitis**; **Kontrolle**

$$r = -0,2209; P = 0,0794$$

Abbildung 3.51: Gruppenübergreifende Korrelationen der SP-B-Mengen in reduzierter Form, bezogen auf 5 µg Gesamtprotein (links) bzw. 1 ml Lavagevolumen (rechts) mit dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im BAL-Zytospin.



$$r = -0,3930; P = 0,0033$$

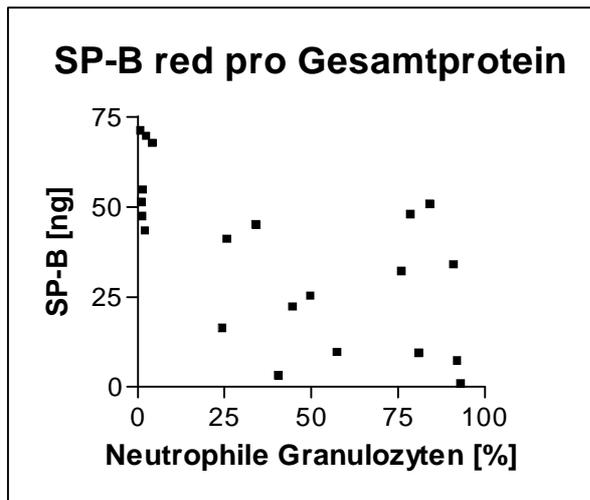
Gruppen: CF; **Pneumonie**; **Bronchitis**; **Kontrolle**

$$r = -0,1665; P = 0,2287$$

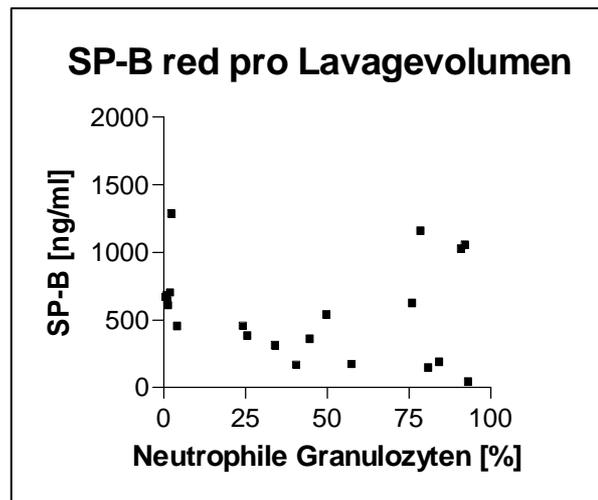
Abbildung 3.52: Gruppenübergreifende Korrelationen der SP-B-Mengen in nicht reduzierter Form, bezogen auf 5 µg Gesamtprotein (links) bzw. 1 ml Lavagevolumen (rechts) mit dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im BAL-Zytospin.

Untersuchungen innerhalb der Patientengruppe „Cystische Fibrose“ wurden zunächst ebenfalls als Korrelationsanalysen durchgeführt, wobei sich eine signifikante Verringerung

der SP-B-Mengen mit steigendem neutrophilen Granulozytenanteil lediglich bei den unter reduzierenden Bedingungen gemessenen Proben pro Gesamtprotein ergab (Abbildungen 3.53 und 3.54).

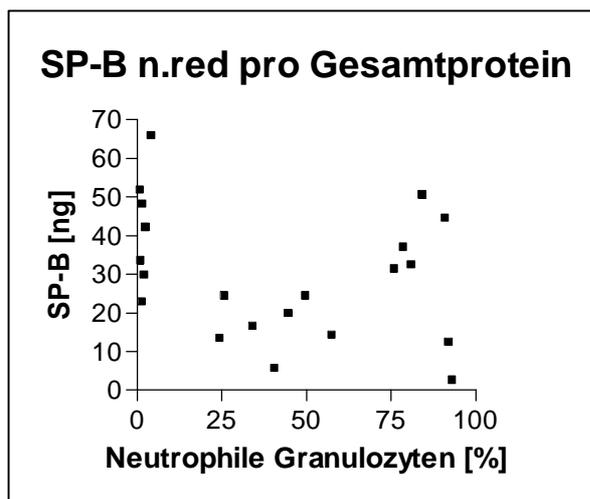


$$r = -0,6494; P = 0,0014$$

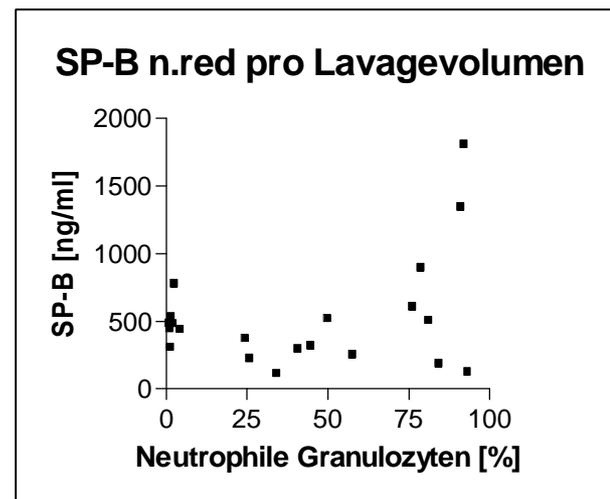


$$r = -0,2857; P = 0,2093$$

Abbildung 3.53: Korrelationen der SP-B-Mengen aus der Gruppe „Cystische Fibrose“ in reduzierter Form, bezogen auf 5 µg Gesamtprotein (links) bzw. 1 ml Lavagevolumen (rechts) mit dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im BAL-Zytospin.



$$r = -0,3053; P = 0,1784$$



$$r = 0,0714; P = 0,7583$$

Abbildung 3.54: Korrelationen der SP-B-Mengen aus der Gruppe „Cystische Fibrose“ in nicht reduzierter Form, bezogen auf 5 µg Gesamtprotein (links) bzw. 1 ml Lavagevolumen (rechts) mit dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im BAL-Zytospin.

Die anschließend (wie zuvor bei den Untersuchungen von SP-C, vergleiche 3.2.2.3) vorgenommene Unterteilung der CF-Patienten in eine Gruppe mit einem geringen (unter 5%; $n = 7$) und eine mit einem hohen (über 24%; $n = 14$) prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im Zytospin der Lavage sind in den Abbildungen 3.55 und 3.56 dargestellt.

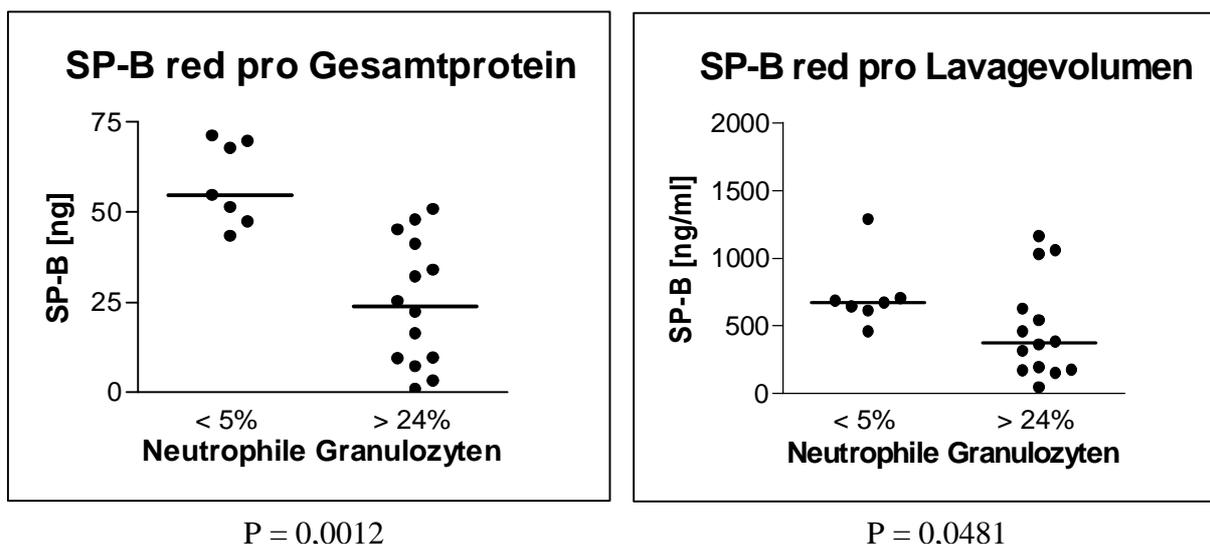


Abbildung 3.55: Vergleiche der SP-B-Mengen in reduziertem Zustand pro 5 μ g Gesamtprotein (links) sowie 1 ml Lavagevolumen (rechts) in den bronchoalveolären Lavagen von CF-Patienten mit niedrigem (< 5%) bzw. hohem (> 24%) Anteil neutrophiler Granulozyten im BAL-Zytospin. Mann-Whitney-Test: P jeweils < 0,05.

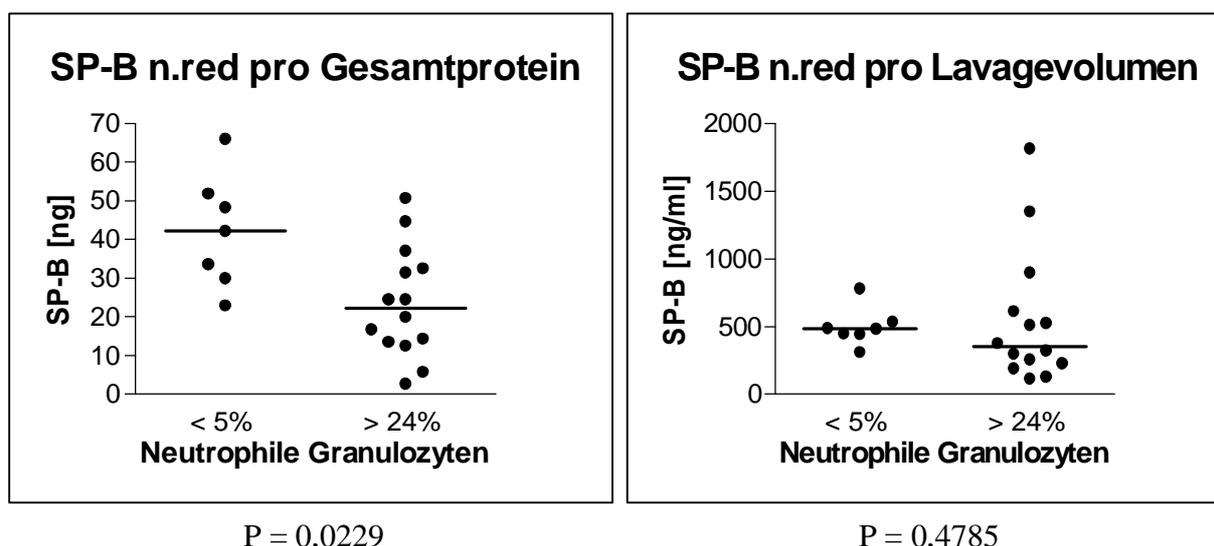


Abbildung 3.56: Vergleiche der SP-B-Mengen in nicht reduziertem Zustand pro 5 μ g Gesamtprotein (links) sowie 1 ml Lavagevolumen (rechts) in den bronchoalveolären Lavagen von CF-Patienten mit niedrigem (< 5%) bzw. hohem (> 24%) Anteil neutrophiler Granulozyten im BAL-Zytospin. Mann-Whitney-Test.

Die oben dargestellten Vergleiche ergaben bei den unter reduzierenden Bedingungen sowie bei den unter nicht reduzierenden Bedingungen pro Gesamtprotein, nicht jedoch pro Lavagevolumen, gemessenen Proben signifikant niedrigere SP-B-Mengen in der Gruppe mit mehr als 5% Neutrophilen.

Innerhalb der anderen beiden Patientengruppen sowie der lungengesunden Kontrollgruppe wurden ebenfalls Korrelationen zwischen den SP-B-Mengen und dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im Zytospin der Lavage durchgeführt. Die folgenden Untersuchungen ergaben dabei signifikante Ergebnisse:

„Pneumonie ohne Immundefekt“: SP-B nicht reduziert pro Gesamtprotein: $P = 0,0408$

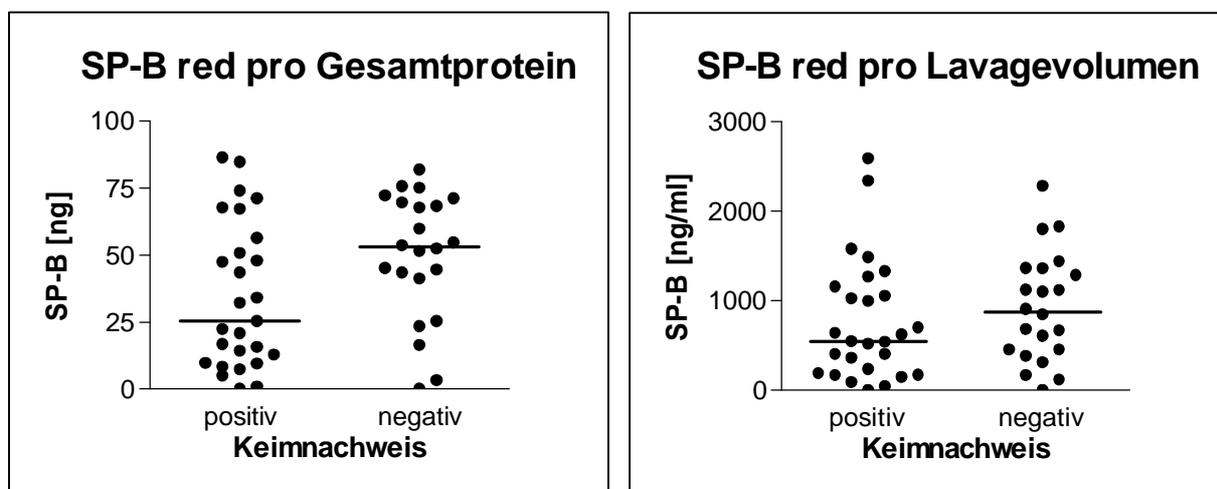
„Chronische Bronchitis“: SP-B nicht reduziert pro Gesamtprotein: $P = 0,0211$

Bei allen weiteren Korrelationen innerhalb dieser Gruppen wurden P-Werte über 0,05 ermittelt. Eine Ausnahme stellten die Untersuchungen der unter nicht reduzierenden Bedingungen gemessenen SP-B-Mengen aus der Gruppe der lungengesunden Kontrollpatienten dar, bei denen die Angabe von P-Werten aufgrund der niedrigen Fallzahlen ($n = 4$) leider nicht möglich war. Alle Diagramme der hier beschriebenen Korrelationen sind im Anhang abgebildet.

3.2.3.4 Bakteriologische Untersuchungen

Bei den bakteriologischen Untersuchungen wurde, wie schon unter 3.2.2.4 beschrieben, innerhalb der Gruppe „Cystische Fibrose“ eine Unterscheidung zwischen dem Nachweis der Keime *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylokokkus aureus* getroffen, während bei den gruppenübergreifenden Untersuchungen lediglich allgemein zwischen positivem und negativem Keimnachweis unterschieden wurde. Wie auch bei den Untersuchungen von SP-C (vergleiche 3.2.2.4) konnten der Patient P 1 aus der Gruppe „Pneumonie ohne Immundefekt“ sowie die Patienten der lungengesunden Kontrollgruppe wegen fehlender bakteriologischer Ergebnisse hier nicht berücksichtigt werden.

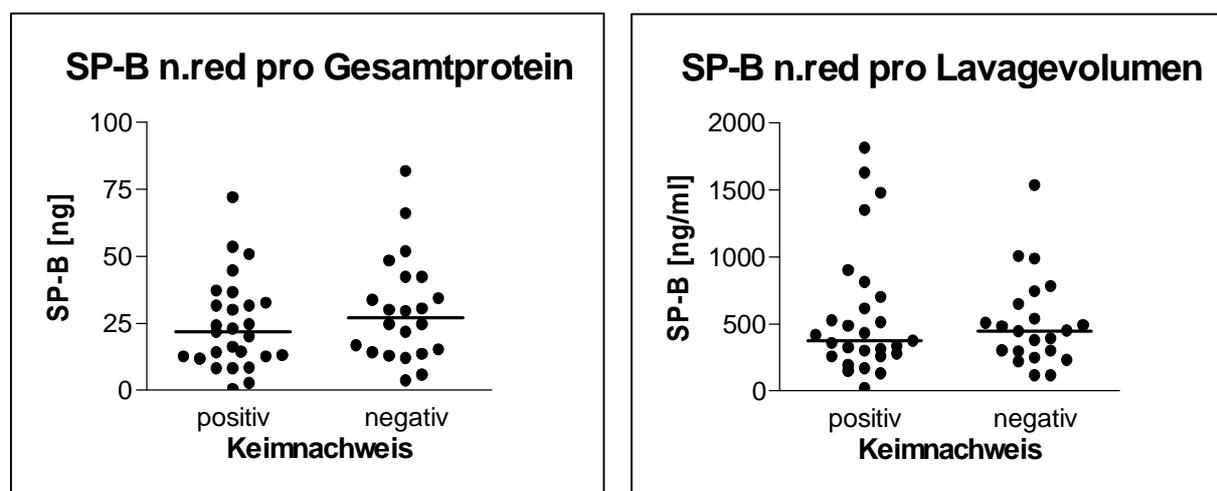
Die gruppenübergreifenden Vergleiche von Patienten mit positivem gegenüber Patienten mit negativem Keimnachweis erbrachten lediglich bei der Messung von SP-B in reduziertem Zustand pro Gesamtprotein signifikant niedrigere Mengen (Abbildungen 3.57 und 3.58).



P = 0,0445

P = 0,2604

Abbildung 3.57: Vergleiche der SP-B-Mengen in reduziertem Zustand pro 5 µg Gesamtprotein (links) sowie 1 ml Lavagevolumen (rechts) bei Patienten mit positivem bzw. negativem Keimnachweis in der BAL. Mann-Whitney-Test.



P = 0,3053

P = 0,8802

Abbildung 3.58: Vergleiche der SP-B-Mengen in nicht reduziertem Zustand pro 5 µg Gesamtprotein (links) sowie 1 ml Lavagevolumen (rechts) bei Patienten mit positivem bzw. negativem Keimnachweis. Mann-Whitney-Test.

Bei Betrachten der Diagramme der Abbildungen 3.57 und 3.58 fällt auf, dass trotz niedrigerer Mediane in der Gruppe der Patienten mit positivem Keimnachweis in allen vier Vergleichen und einem knapp signifikanten Unterschied im Mann-Whitney-Test bei der Messung von SP-B in reduziertem Zustand pro Gesamtprotein, deutliche Unterschiede der Ober- und Untergrenzen sowie der Verteilung der SP-B-Mengen zwischen den beiden Gruppen jeweils nicht zu erkennen sind. Eine Aussage bezüglich niedrigerer SP-B-Mengen bei positivem Keimnachweis in der Lavage ist deshalb hier nur sehr eingeschränkt möglich.

Bei den Vergleichen innerhalb der Patientengruppe „Cystische Fibrose“ konnte ein knapp signifikanter Unterschied der SP-B-Mengen im Mann-Whitney-Test zwischen Proben mit positivem und Proben mit negativem bakteriologischen Befund nur bei der Messung von SP-B in reduziertem Zustand pro Gesamtprotein für den Keim *Pseudomonas aeruginosa* festgestellt werden. Hier zeigte sich ebenfalls eine Verringerung der SP-B-Mengen bei Proben mit positivem Keimnachweis. Die anderen Untersuchungen innerhalb dieser Gruppe blieben ohne signifikantes Ergebnis (P jeweils $> 0,05$). Die entsprechenden Diagramme sind in den Abbildungen 3.59 und 3.60 dargestellt.

Wie auch bei den Messungen von SP-C wurden keine Vergleiche mit Patientenproben mit positivem Befund für beide hier untersuchten Keime erstellt, da die geringe Fallzahl ($n = 3$) zu keinem aussagefähigen Ergebnis geführt hätte (vergleiche 3.2.2.4).

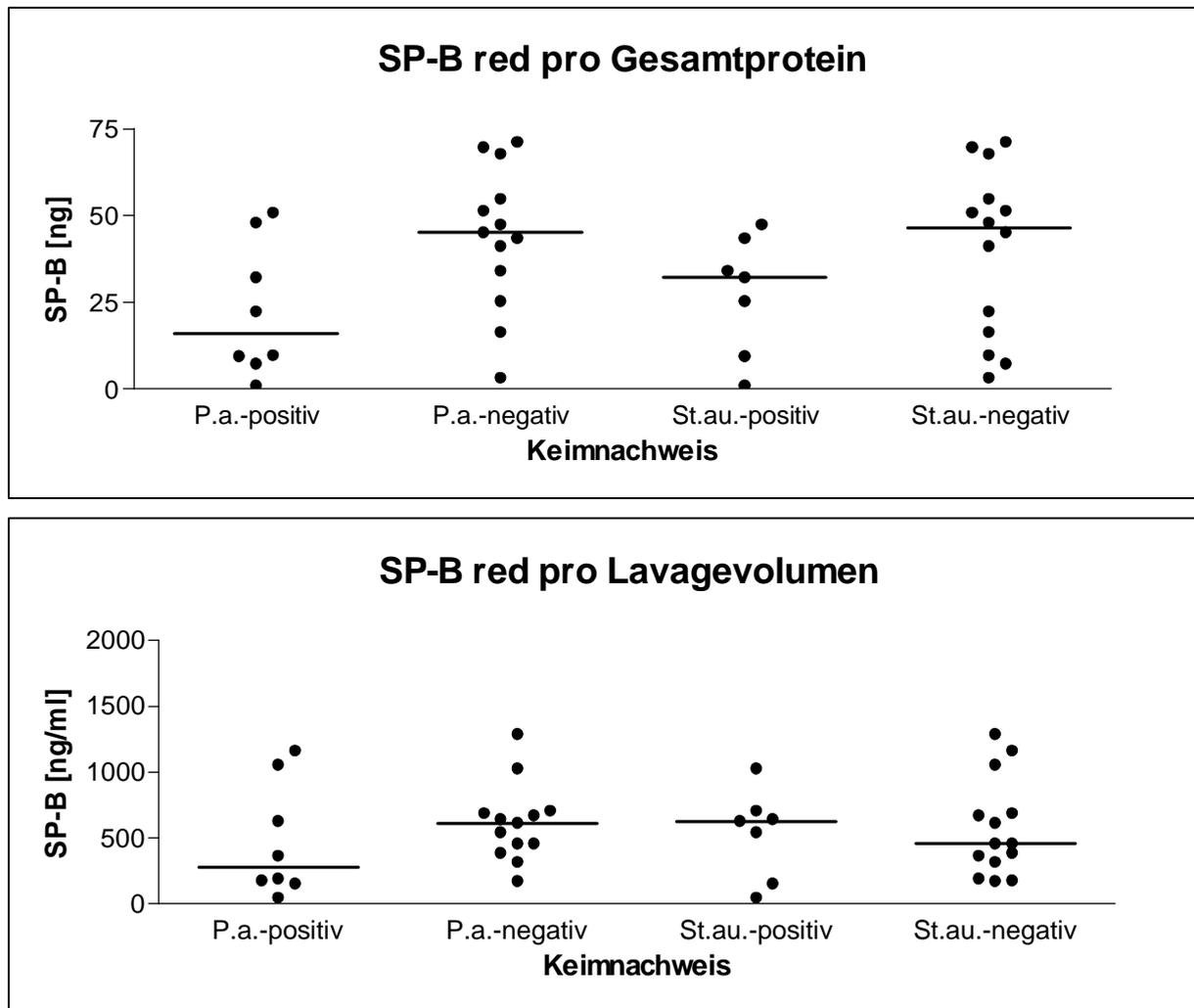


Abbildung 3.59: Vergleiche der SP-B-Mengen in reduziertem Zustand bei CF-Patienten mit positivem bzw. negativem bakteriologischen Befund für *Pseudomonas aeruginosa* (P.a.) sowie *Staphylokokkus aureus* (St.au.) in der BAL, bezogen auf 5 µg Gesamtprotein (oben) bzw. 1 ml Lavagevolumen (unten).

Mann-Whitney-Test: Signifikanter P-Wert für den Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* bei SP-B pro 5 µg Gesamtprotein ($P = 0,0465$).

Keine signifikanten P-Werte für alle anderen Vergleiche (P jeweils $> 0,05$).

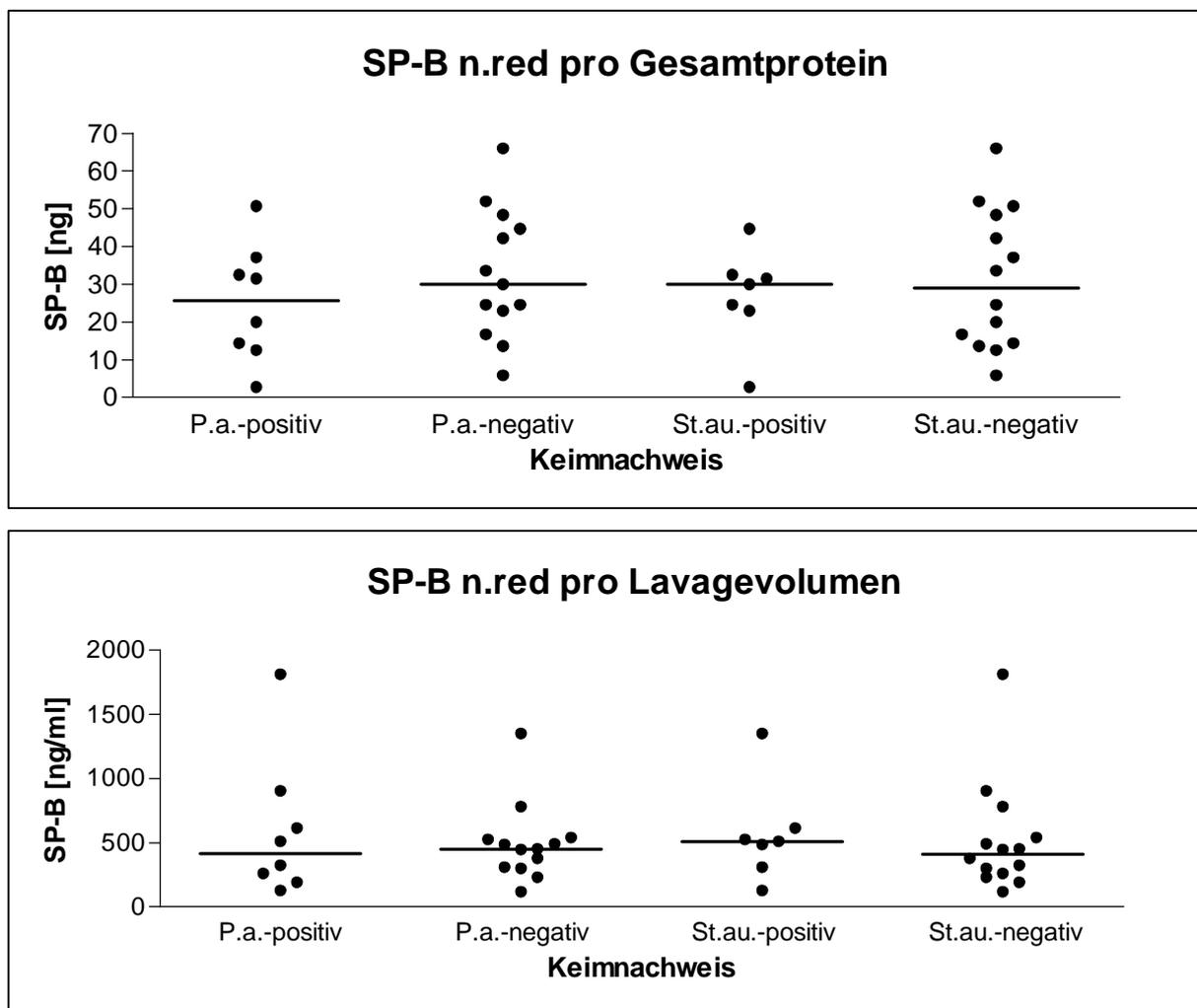


Abbildung 3.60: Vergleiche der SP-B-Mengen in nicht reduziertem Zustand bei CF-Patienten mit positivem bzw. negativem bakteriologischen Befund für *Pseudomonas aeruginosa* (P.a.) sowie *Staphylokokkus aureus* (St.au.) in der BAL, bezogen auf 5 µg Gesamtprotein (oben) bzw. 1 ml Lavagevolumen (unten). Mann-Whitney-Test: P für alle Vergleiche jeweils > 0,05.

3.2.3.5 Weitere durchgeführte Untersuchungen

Es wurden zusätzlich gruppenübergreifende Korrelationen zwischen den gemessenen SP-B-Mengen und dem Alter der Patienten sowie zwischen SP-B und der forcierten expiratorischen Einsekundenkapazität (FEV1), jeweils zum Zeitpunkt der Lavage, durchgeführt. Wie bei den Untersuchungen von SP-C konnten bei den Korrelationen mit der FEV1 wegen zum Teil fehlender Angaben zur Lungenfunktionsdiagnostik neben den 21 Patienten aus der Gruppe „Cystische Fibrose“ nur noch 10 weitere Patienten aus den Gruppen „Pneumonie ohne Immundefekt“ und „Chronische Bronchitis“ berücksichtigt werden (vergleiche 3.2.2.5). Es

zeigte sich bei den hier beschriebenen Untersuchungen eine knapp signifikante Zunahme der SP-B-Mengen in nicht reduziertem Zustand pro Gesamtprotein bei steigendem Patientenalter (Abbildung 6.14). Alle weiteren Korrelationen zwischen SP-B und dem Alter der Patienten sowie der FEV1 blieben ohne signifikante Ergebnisse (P jeweils $> 0,05$).

Weiterhin wurden Vergleiche der gemessenen SP-B-Mengen zwischen weiblichen und männlichen Patienten erstellt. Im Mann-Whitney-Test wurden hierbei keine signifikanten Unterschiede erkannt.

Sämtliche Diagramme zu den hier beschriebenen Untersuchungen sind im Anhang abgebildet.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Surfactantproteine B und C mit ihren jeweiligen Vorstufen aus der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von insgesamt 64 Probanden der Patientengruppen „Cystische Fibrose“, „Pneumonie“ und „Chronische Bronchitis“ sowie einer lungengesunden Kontrollgruppe untersucht. Nach der qualitativen Auswertung erfolgten zunächst quantitative Vergleiche der ermittelten Werte für SP-B und SP-C zwischen den einzelnen Kollektiven und die Darstellung der Proteinmengen in Abhängigkeit von der pulmonalen Entzündungsaktivität zum Zeitpunkt der BAL. Hierfür wurde als Indikator neben dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im BAL-Zytospin auch der positive Nachweis von Bakterien in der Lavageflüssigkeit herangezogen. Anschließend wurden Korrelationen mit weiteren Parametern wie der FEV1 als Ausdruck der Lungenfunktion sowie dem Patientenalter zum Lavagezeitpunkt durchgeführt und Vergleiche zwischen männlichen und weiblichen Patienten erstellt. Der quantitativ bestimmte Gesamtproteingehalt der einzelnen Proben wurde ebenfalls mit dem neutrophilen Granulozytenanteil zum Lavagezeitpunkt korreliert.

4.1 Qualitative Auswertung

4.1.1 Surfactantprotein C

SP-C wurde in insgesamt 51 der 54 unter reduzierenden bzw. 61 von 64 unter nicht reduzierenden Bedingungen untersuchten Lavageproben jeweils in Form einer Bande nachgewiesen (Abbildungen 3.1, 3.2, 3.4 bis 3.9). Die Mediane der Molekulargewichte lagen mit 4,095 bis 4,48 kDa um den in der Literatur angegebenen Durchschnittswert der SP-C-Monomere von 4,2 kDa (ten Brinke et al. 2002). Zusätzliche Banden, die sich bei einigen unter nicht reduzierenden Bedingungen untersuchten Proben mit Molekulargewichten zwischen 6,32 und 7,51 kDa darstellten (Abbildungen 3.2, 3.4, 3.7 und 3.9), sind, wie bereits unter 3.1.1.1 erläutert, entweder auf zum Teil vorliegende SP-C-Dimere oder auf kovalente Bindungen zwischen SP-C und anderen Thiolen zurückzuführen. Obwohl die Verbindung zweier SP-C-Moleküle etwas höhere Molekulargewichte um ca. 8 kDa erwarten ließe, liegen die aus den bisher bekannten SP-C-Isoformen (Gustafsson et al.1997; Johansson 1998) durch kovalente Bindungen zu anderen Thiolen zu erwartenden Molekulargewichte doch deutlich unterhalb der hier detektierten zusätzlichen Banden, so dass hier am ehesten von in geringen

Mengen vorliegenden SP-C-Dimeren als Ursache der zusätzlichen Banden ausgegangen werden kann.

In den Lavageproben der Patienten CF 20, CF 21 (Abbildungen 3.1 und 3.2) und P 14 (Abbildungen 3.6 und 3.7) wurde SP-C nicht detektiert. Eine DNA-Analyse konnte aufgrund des geringen Ausgangsmaterials nicht durchgeführt werden. Allerdings konnte SP-C im Probenmaterial einer weiteren Lavage der Patienten CF 20 und 21 nachgewiesen werden (Abbildung 3.3), was gegen eine Genmutation als Ursache spricht.

Höhermolekulare Vorstufen von SP-C zeigten sich in keiner der untersuchten Lavageproben. Lediglich bei den Westernblotanalysen der Patienten CF 20 und 21 ergab die Inkubation mit dem Pro-SP-C-Antikörper jeweils eine positive Reaktion (Abbildung 3.10 und 3.14). Die Molekulargewichte der Banden von 3,54 bzw. 3,41 kDa lassen den Schluß zu, dass es sich hierbei nicht um intakte SP-C-Vorstufen handelt (Abbildung 1.4), sondern lediglich um die von Pro-SP-C abgespaltenen n-terminalen Bereiche, gegen die sich der Pro-SP-C-Antikörper richtet (siehe Tabelle 2.7).

Die Proben der Patienten CF 20 und 21 wiesen gruppenübergreifend die höchsten Anteile neutrophiler Granulozyten aller untersuchten Lavageproben auf (siehe 3.1.1.1). Zum Vergleich erstellte Westernblotanalysen von zu einem anderen Zeitpunkt gewonnenen Lavageproben derselben Patienten (Tabelle 3.1) ergaben eine reguläre Detektion von SP-C (siehe oben) und keine Reaktion mit dem Pro-SP-C-Antikörper (Abbildungen 3.3 und 3.14). Auch die Lavageprobe des Patienten P 14, in der SP-C ebenfalls nicht nachgewiesen werden konnte, hatte mit immerhin 80% den höchsten Neutrophilenanteil der Gruppe „Pneumonie“ (Tabelle 2.3). Dies deutet auf einen Zusammenhang der oben beschriebenen Beobachtungen mit der pulmonalen Entzündungsaktivität hin. Ursächlich wäre hier neben einer verminderten oder gestörten SP-C-Synthese auch der vermehrte Abbau des Proteins durch von Entzündungszellen freigesetzte Proteasen denkbar. Ein dadurch erhöhter SP-C-Umsatz könnte zum vermehrten Anfallen und damit zum Nachweis von n-terminalen Pro-SP-C-Spaltprodukten in der Lavageflüssigkeit der Patienten CF 20 und 21 geführt haben.

Insgesamt konnten in keiner der untersuchten Proben aberrant prozessiertes SP-C oder höhermolekulare Vorstufen des Proteins nachgewiesen werden. Auffälligkeiten zeigten sich lediglich bei den Proben CF 20 und 21 (kein SP-C, evtl. Detektion von Pro-SP-C-Fragmenten) sowie P 14 (kein SP-C), eventuell als Folge der hohen pulmonalen Entzündungsaktivität zum Lavagezeitpunkt (siehe oben; vergleiche 4.2.2). Qualitativ ergaben sich ansonsten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen.

4.1.2 Surfactantprotein B

SP-B konnte in allen 64 untersuchten Lavageproben detektiert werden (Abbildungen 3.17 bis 3.24), lediglich bei den Patientenproben B 12 und P 14 gelang der Nachweis nur in nicht reduziertem Zustand. Eine durchgeführte DNA-Analyse ergab hier keinen Hinweis auf eine Mutation im SP-B-Gen. In reduzierter Form stellte sich das SP-B-Monomer als einzelne Bande mit Medianen der Molekulargewichte von 7,91 bis 7,98 kDa dar (Literaturwert ca. 8 kDa, Griese 1999). In nicht reduziertem Zustand zeigte sich vor allem die in vivo hauptsächlich vorliegende dimere Form des Proteins mit Medianen der Molekulargewichte von 16,86 bis 17,09 kDa (Literaturwerte ca. 16 bis 18 kDa, Beck et al. 2000, Diemel et al. 2001). Zusätzlich ließen sich hier bei einigen Proben weitere Banden im Bereich von 8 bzw. 30 kDa als Hinweis auf in geringerem Ausmaß ebenfalls vorliegende monomere und oligomere Formen des Proteins nachweisen. Letztere wurden bisher vor allem bei Rindern und Schafen beschrieben (Baatz et al. 1990; Bünger et al. 2001).

Höhermolekulare SP-B-Vorstufen ließen sich in insgesamt 60 von 64 untersuchten Lavageproben nachweisen, in erster Linie im Molekulargewichtsbereich von 24 bis 25 kDa, in wesentlich geringerer Ausprägung und auch nur vereinzelt auch im Bereich von 19 bis 21 kDa. Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen von Nogee et al. 2000 und Schuhmacher 2005, bei denen ebenfalls in einem hohen Prozentsatz entsprechende Proproteine in der Lavageflüssigkeit von Kindern mit unterschiedlichen Lungenerkrankungen sowie lungengesunder Probanden ohne pathologische Relevanz detektiert wurden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich keine qualitativen Unterschiede für den Nachweis von SP-B zwischen den einzelnen Gruppen ergaben. Höhermolekulare Vorstufen waren gruppenübergreifend in 94% der Fälle nachweisbar. Aberrantes SP-B konnte nicht detektiert werden.

4.2 Quantitative Auswertung

4.2.1 Gesamtproteinkonzentration

Die quantitative Bestimmung der Gesamtproteinkonzentrationen der einzelnen Lavageproben ergab in der Gruppe „Pneumonie“ durchschnittlich die höchsten Werte; die Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen waren jedoch nicht signifikant (Abbildung 3.31).

Früher durchgeführte Studien kamen hier zu vergleichbaren Ergebnissen (Griese 1997 und 1999). Weiterhin zeigte sich gruppenübergreifend eine signifikante Korrelation der Gesamtproteinkonzentration mit dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten an der Gesamtzellzahl (Abbildung 3.32). Dies lässt sich durch eine vermehrte Exsudation von Serumproteinen in den Alveolarraum bei gesteigerter pulmonaler Entzündungsaktivität erklären und wurde ebenfalls bereits im Rahmen anderer Untersuchungen beobachtet (Essl 2004).

4.2.2 Surfactantprotein C

Der Vergleich der quantitativ bestimmten SP-C-Mengen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen, weder für die pro Gesamtprotein noch für die pro Lavagevolumen angegebenen Werte (Abbildungen 3.35 und 3.36).

Es fiel jedoch vor allem beim Betrachten der einzelnen Blots auf, dass sich bei den unter reduzierenden Bedingungen untersuchten Proben praktisch durchgehend geringere Bandenstärken als bei den entsprechenden unter nicht reduzierenden Bedingungen untersuchten Proben ergaben. Dies könnte einerseits durch eine größere Affinität des Antikörpers zu SP-C in nicht reduzierter Form zu erklären sein, andererseits könnte auch ein Verlust von SP-C durch die Reduktion vorliegen. Entsprechend sind aussagekräftige Ergebnisse bezüglich der SP-C-Mengen in den einzelnen Lavageproben eher durch die Untersuchung der unter nicht reduzierenden Bedingungen analysierten Proben zu erwarten, auch weil hier durch die 10 zusätzlichen Patientenproben aus der lungengesunden Kontrollgruppe eine höhere Fallzahl vorlag. Weiterhin lässt sich für die ungewöhnlich hohen SP-C-Mengen in den unter reduzierenden Bedingungen untersuchten Lavageproben der Patienten CF 1, CF 2 und CF 4 – 7 (vergleiche 3.2.2.3 und Abbildung 3.41) keine schlüssige Erklärung finden. Diese wiesen alle einen pulmonalen neutrophilen Granulozytenanteil von unter 5% (0,7 bis 4,1%) zum Lavagezeitpunkt sowie einen negativen Keimnachweis von *Pseudomonas aeruginosa* in der Lavageflüssigkeit als Zeichen einer geringen pulmonalen Entzündungsaktivität auf. Im Vergleich zum Patienten CF 3 (mit 1,3% ebenfalls ein neutrophiler Granulozytenanteil von unter 5%, aber keine erhöhten SP-C-Werte) sowie zu allen anderen untersuchten Patienten der verschiedenen Gruppen ergaben sich jedoch keine wesentlichen Unterschiede bezüglich anderer Parameter wie Alter, Geschlecht oder FEV1, für die eine signifikante Beeinflussung der SP-C-Mengen ohnehin nicht nachgewiesen werden

konnte (vergleiche 3.2.2.5). Es könnte somit zwar erklärt werden, warum die Patienten CF 1, CF 2, und CF 4 – 7 höhere SP-C-Mengen als die CF-Patienten mit höherer pulmonaler Entzündungsaktivität aufwiesen (siehe unten), nicht jedoch, warum diese unter reduzierenden Bedingungen auch deutlich über denen der anderen Patienten mit geringer pulmonaler Krankheitsaktivität inklusive der lungengesunden Kontrollgruppe lagen und warum dieses Phänomen bei den unter nicht reduzierenden Bedingungen untersuchten Proben nicht auftrat. Obwohl diese Werte alle durch wiederholte Messungen bestätigt wurden, lässt sich für ihr Auftreten somit keine plausible Erklärung finden.

Die negativen Korrelationen zwischen dem neutrophilen Granulozytenanteil und den quantitativ bestimmten SP-C-Mengen ergaben für die unter reduzierenden Bedingungen untersuchten Proben sowohl bei den gruppenübergreifenden Untersuchungen als auch innerhalb der Patientengruppen „Cystische Fibrose“ und „Chronische Bronchitis“ signifikante Ergebnisse (Abbildungen 3.37, 3.39 und 6.3). Es zeigten sich weiterhin gruppenübergreifend signifikant niedrigere SP-C-Mengen in Proben mit positivem gegenüber Proben mit negativem Keimnachweis (Abbildung 3.43), ebenso innerhalb der Gruppe „Cystische Fibrose“ für den Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* (Abbildung 3.45). Diese Ergebnisse wurden auch mit den pro Lavagevolumen angegebenen SP-C-Werten und somit unabhängig von den Gesamtproteinmengen der Proben erzielt (vergleiche 4.2.1 und Abbildung 3.32). Sie konnten jedoch mit den unter nicht reduzierenden Bedingungen untersuchten Proben nicht bestätigt werden (vergleiche 3.2.2).

Insgesamt konnte somit ein Zusammenhang zwischen der pulmonalen Entzündungsaktivität zum Zeitpunkt der Lavage und den gemessenen SP-C-Mengen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit nicht sicher nachgewiesen werden. Aufgrund der mit den unter reduzierenden Bedingungen untersuchten Proben erzielten Ergebnisse wären hier jedoch positive Resultate bei weiteren Untersuchungen mit höheren Fallzahlen denkbar. Ein Zusammenhang der SP-C-Mengen mit der FEV1, dem Alter oder dem Geschlecht der Patienten konnte ebenfalls nicht festgestellt werden (vergleiche 3.2.2.5 und Abbildungen 6.7 bis 6.12).

4.2.3 Surfactantprotein B

Auch bei der quantitativen Auswertung von SP-B gilt, dass die Werte der unter reduzierenden Bedingungen untersuchten Proben eher zu repräsentativen Ergebnissen führten, da sich dabei

im Gegensatz zu den unter nicht reduzierenden Bedingungen untersuchten Proben alle SP-B-Moleküle jeweils in Form einer einzelnen Bande darstellen ließen (vergleiche 3.1.2 und 4.1.2). Die Unterschiede der Ergebnisse der durchgeführten Korrelationen und Vergleiche waren hier jedoch insgesamt deutlich weniger ausgeprägt als bei den Untersuchungen von SP-C (vergleiche 4.2.2).

Für die quantitativ bestimmten SP-B-Mengen in den Lavageproben konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen ermittelt werden (Abbildungen 3.49 und 3.50).

Bei den weiteren Untersuchungen ergab sich, wie bei der Auswertung von SP-C, zumeist eine Abnahme der SP-B-Mengen bei steigendem neutrophilen Granulozytenanteil in der Lavage (vergleiche 3.3.2.3). Signifikante P-Werte traten dabei jedoch nur unregelmäßig und ausschließlich bei den pro Gesamtprotein angegebenen SP-B-Mengen auf (Abbildungen 3.51 bis 3.53, 6.14 und 6.16), so dass aufgrund dieser Ergebnisse und durch die bereits bestehende Korrelation zwischen Gesamtproteinmenge und neutrophilem Granulozytenanteil (vergleiche 4.2.1 und Abbildung 3.32) nicht auf quantitative Veränderungen von SP-B, sondern allenfalls auf eine Verminderung des SP-B/Gesamtprotein-Quotienten bei steigender pulmonaler Entzündungsaktivität geschlossen werden kann. Auch bei den Vergleichen zwischen Proben mit positivem und Proben mit negativem Keimnachweis konnten keine wesentlichen Unterschiede der SP-B-Mengen festgestellt werden (vergleiche 3.2.3.4).

Insgesamt zeigten sich somit auch bei den Untersuchungen von SP-B keine eindeutigen quantitativen Veränderungen in Abhängigkeit vom Ausmaß der pulmonalen Entzündungsaktivität. Diese Ergebnisse decken sich mit denen anderer Untersuchungen, bei denen unveränderte SP-B-Mengen in der Lavage von Patienten mit entzündlichen Lungenerkrankungen festgestellt wurden (Griese 1997, 1999 und 2004).

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit erfolgte neben der qualitativen Darstellung der Surfactantproteine B und C und ihrer Vorstufen auch erstmals eine quantitative Auswertung von SP-B und SP-C in Abhängigkeit der pulmonalen Entzündungsaktivität.

Qualitativ konnten dabei keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen festgestellt werden. Pro-SP-B wurde erwartungsgemäß in über 90 % der Proben nachgewiesen. Pro-SP-C wurde nicht detektiert, lediglich zwei Patientenproben aus der CF-Gruppe wiesen bei hoher pulmonaler Entzündungsaktivität nachweisbare Pro-SP-C-Spaltprodukte auf. Weder für die Surfactantproteine B und C noch für eine ihrer Vorstufen wurden aberrant prozessierte Formen detektiert.

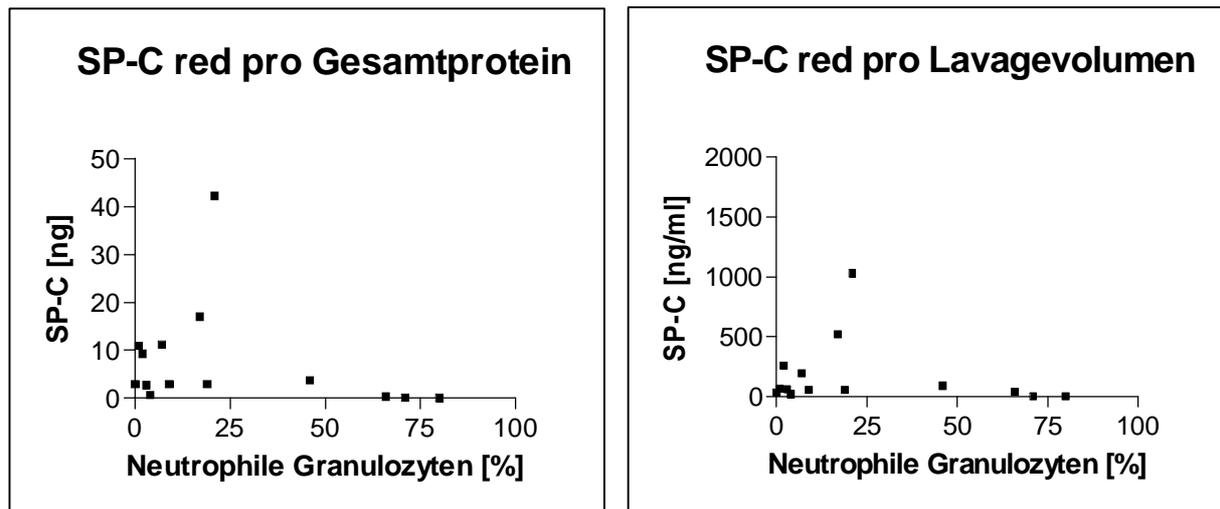
Die quantitativen Untersuchungen ließen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen erkennen. Es zeigte sich weiterhin kein sicher nachzuweisender Zusammenhang zwischen der Menge von SP-B und SP-C in der Lavage mit dem Ausmaß der pulmonalen Entzündungsaktivität zum Lavagezeitpunkt.

6. Anhang

6.1 Abbildungen

6.1.1 Surfactantprotein C

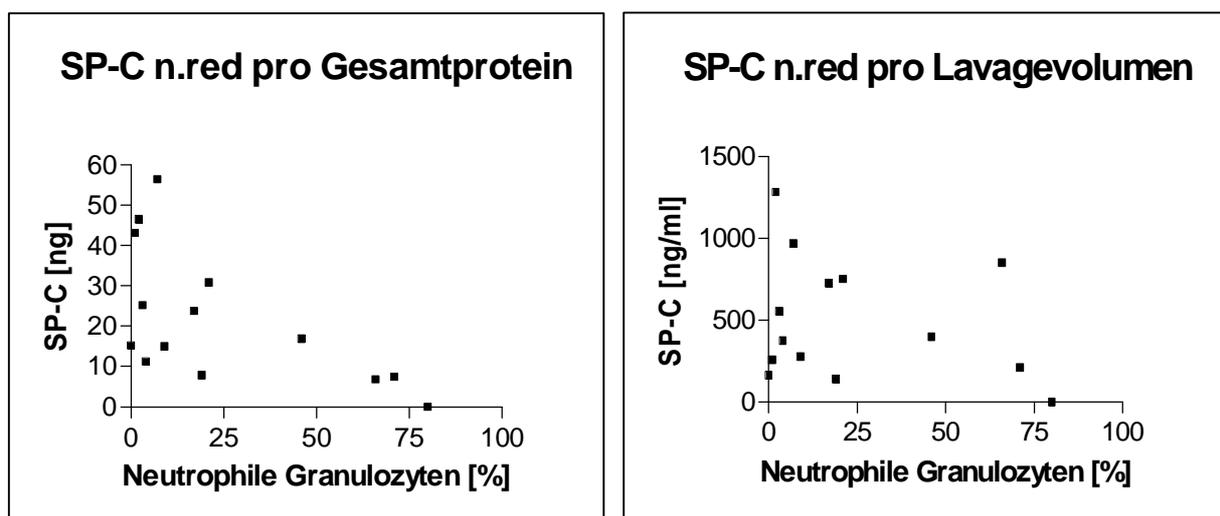
6.1.1.1 Neutrophile Granulozyten im BAL-Zytospin



$$r = -0,3775; P = 0,1833$$

$$r = -0,2615; P = 0,3664$$

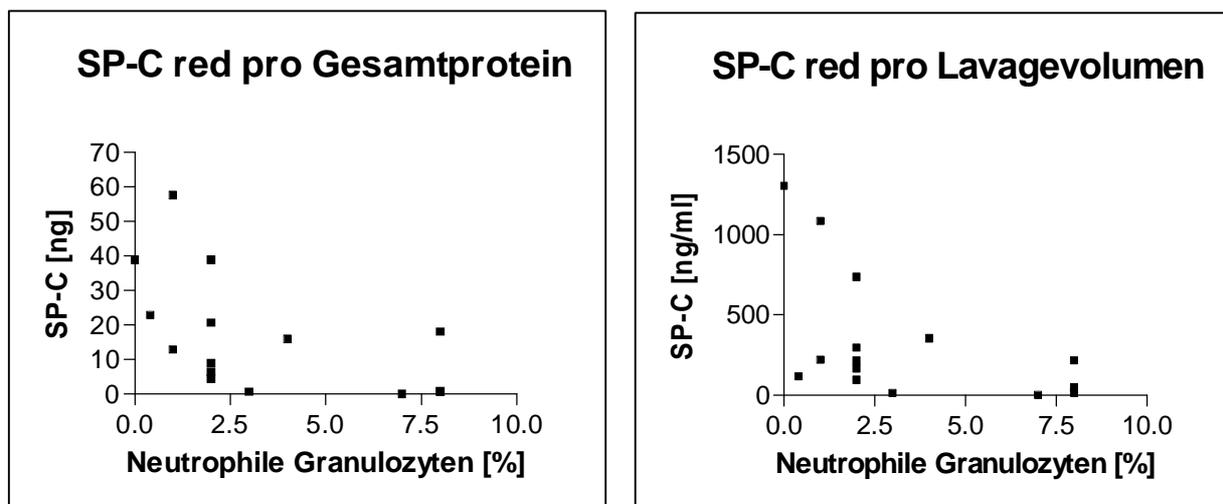
Abbildung 6.1: Korrelationen der SP-C-Mengen aus der Gruppe „Pneumonie ohne Immundefekt“ in reduzierter Form, angegeben pro 5 µg Gesamtprotein (links) bzw. 1 ml Lavagevolumen (rechts) mit dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im BAL-Zytospin.



$$r = -0,6308, P = 0,0156$$

$$r = -0,1560; P = 0,5942$$

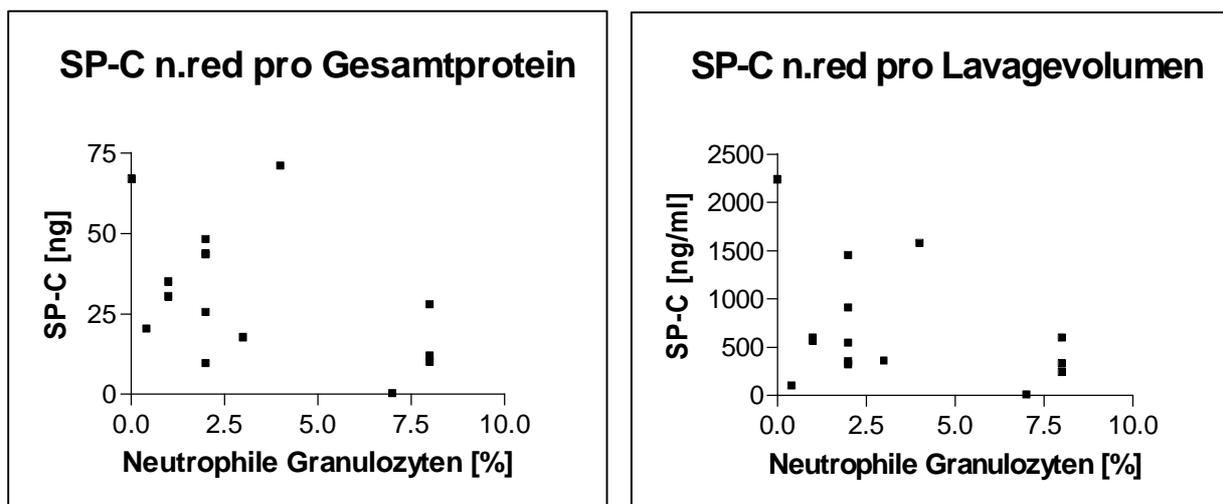
Abbildung 6.2: Korrelationen der SP-C-Mengen aus der Gruppe „Pneumonie ohne Immundefekt“ in nicht reduzierter Form, angegeben pro 5 µg Gesamtprotein (links) bzw. 1 ml Lavagevolumen (rechts) mit dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im BAL-Zytospin.



$r = -0,6424$; $P = 0,0098$

$r = -0,5590$; $P = 0,0303$

Abbildung 6.3: Korrelationen der SP-C-Mengen aus der Gruppe „Chronische Bronchitis“ in reduzierter Form, angegeben pro 5 µg Gesamtprotein (links) bzw. 1 ml Lavagevolumen (rechts) mit dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im BAL-Zytospin.



$r = -0,4220$; $P = 0,1171$

$r = -0,2613$; $P = 0,3469$

Abbildung 6.4: Korrelationen der SP-C-Mengen aus der Gruppe „Chronische Bronchitis“ in nicht reduzierter Form, angegeben pro 5 µg Gesamtprotein (links) bzw. 1 ml Lavagevolumen (rechts) mit dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im BAL-Zytospin.

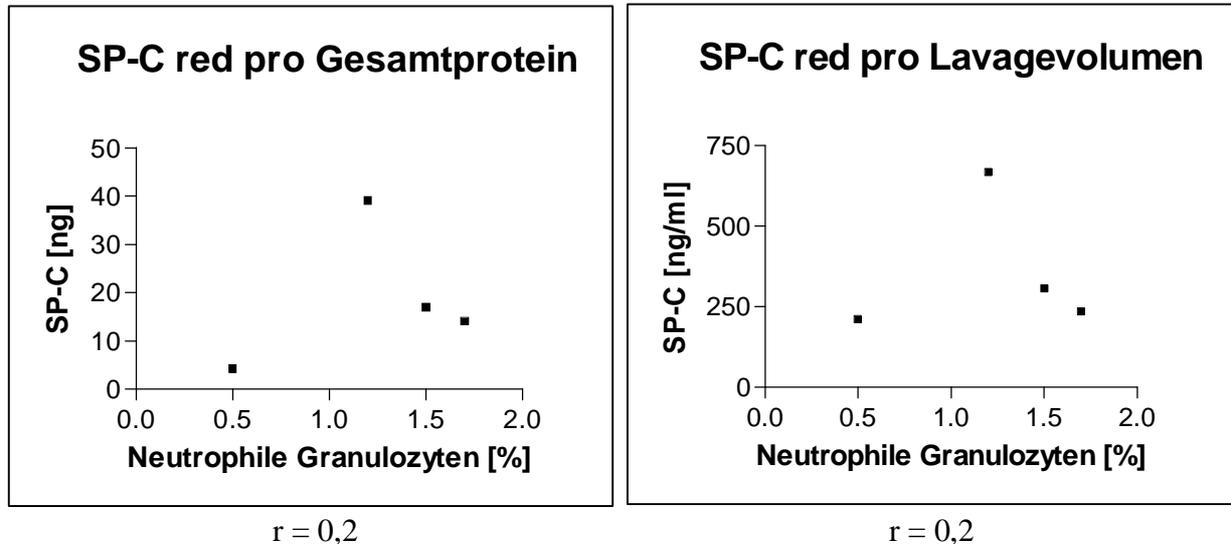


Abbildung 6.5: Korrelationen der SP-C-Mengen aus der Gruppe der lungengesunden Kontrollpatienten in **reduzierter** Form, angegeben pro **5 µg Gesamtprotein** (links) bzw. **1 ml Lavagevolumen** (rechts) mit dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im BAL-Zytospin. P-Werte konnten wegen der geringen Fallzahlen ($n = 4$) nicht ermittelt werden.

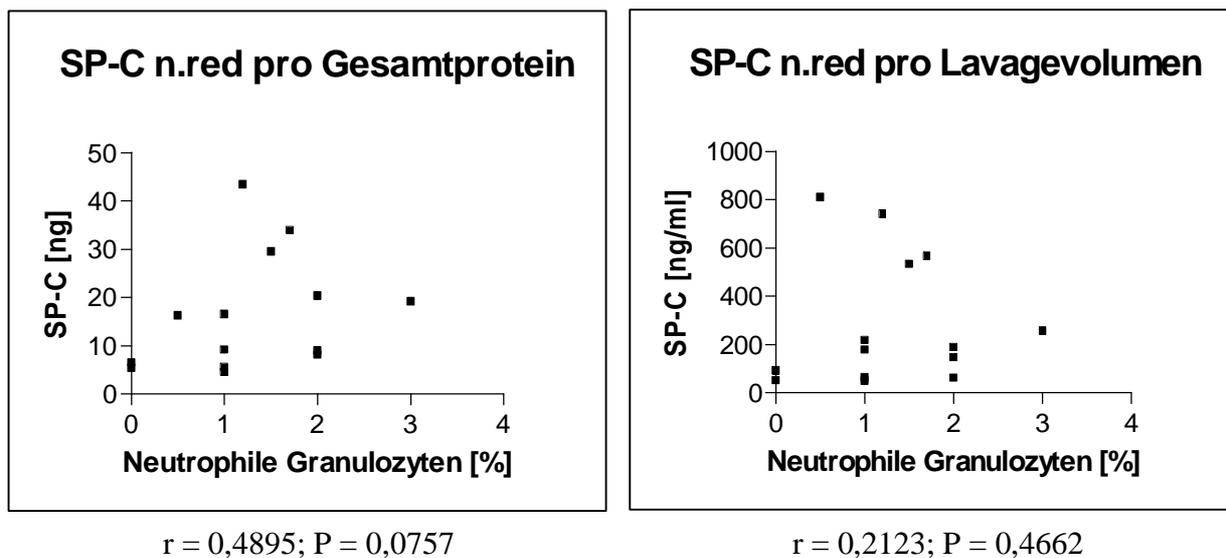
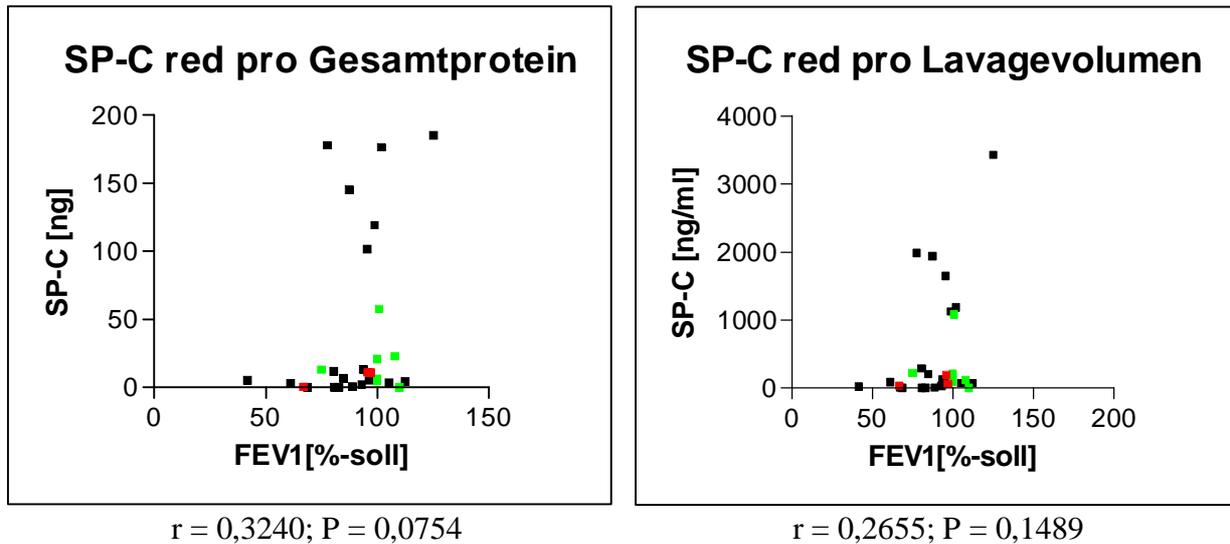


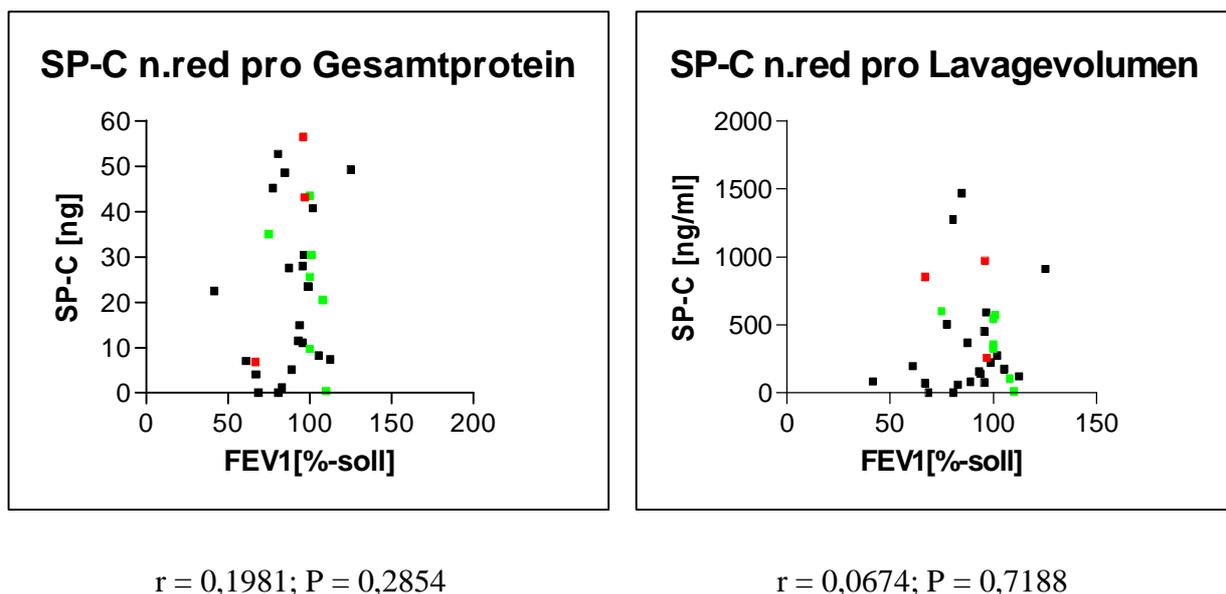
Abbildung 6.6: Korrelationen der SP-C-Mengen aus der Gruppe der lungengesunden Kontrollpatienten in **nicht reduzierter** Form, angegeben pro **5 µg Gesamtprotein** (links) bzw. **1 ml Lavagevolumen** (rechts) mit dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im BAL-Zytospin.

6.1.1.2 Forcierte expiratorische Einsekundenkapazität



Gruppen: CF; **Pneumonie**; **Bronchitis**

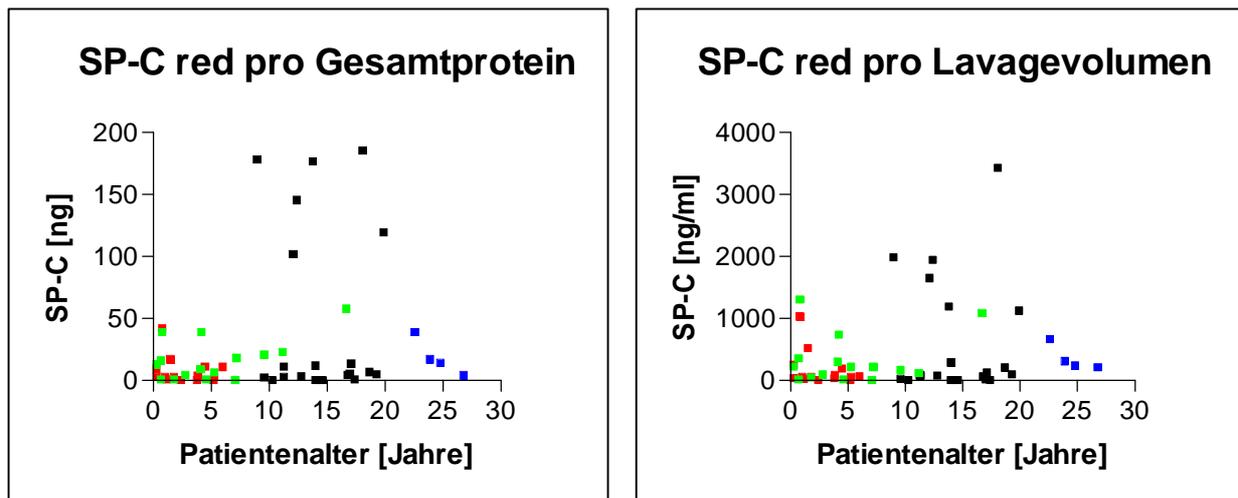
Abbildung 6.7: Gruppenübergreifende Korrelationen der SP-C-Mengen in reduzierter Form, angegeben pro 5 µg Gesamtprotein (links) bzw. 1 ml Lavagevolumen (rechts) mit der forcierten expiratorischen Einsekundenkapazität.



Gruppen: CF; **Pneumonie**; **Bronchitis**

Abbildung 6.8: Gruppenübergreifende Korrelationen der SP-C-Mengen in nicht reduzierter Form, angegeben pro 5 µg Gesamtprotein (links) bzw. 1 ml Lavagevolumen (rechts) mit der forcierten expiratorischen Einsekundenkapazität.

6.1.1.3 Patientenalter

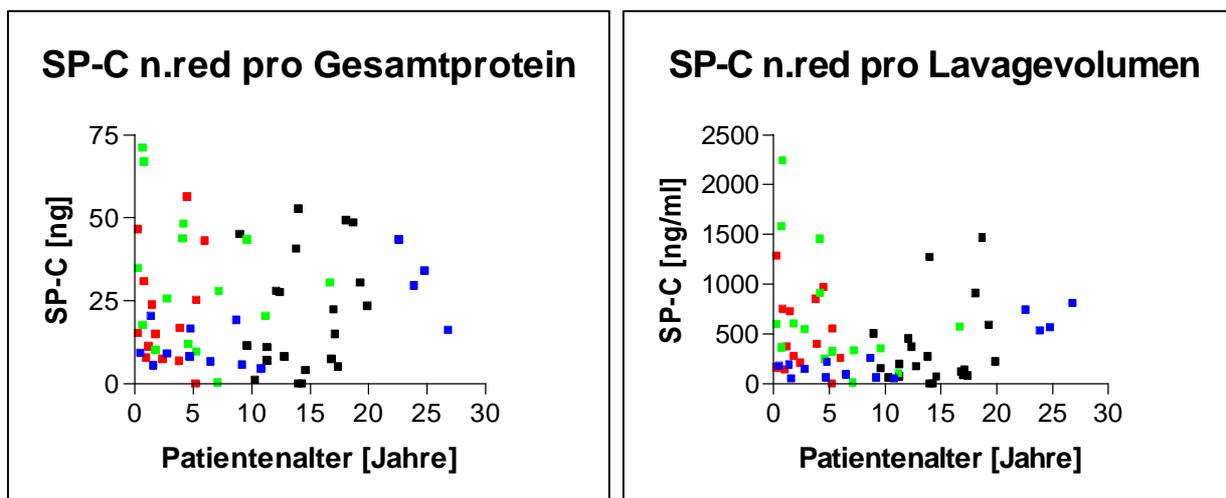


$r = 0,1869$; $P = 0,1759$

$r = 0,1221$; $P = 0,3792$

Gruppen: CF; **Pneumonie**; **Bronchitis**; **Kontrolle**

Abbildung 6.9: Gruppenübergreifende Korrelationen der SP-C-Mengen in **reduzierter** Form, angegeben pro **5 µg Gesamtprotein** (links) bzw. **1 ml Lavagevolumen** (rechts) mit dem Patientenalter zum Zeitpunkt der Lavage.



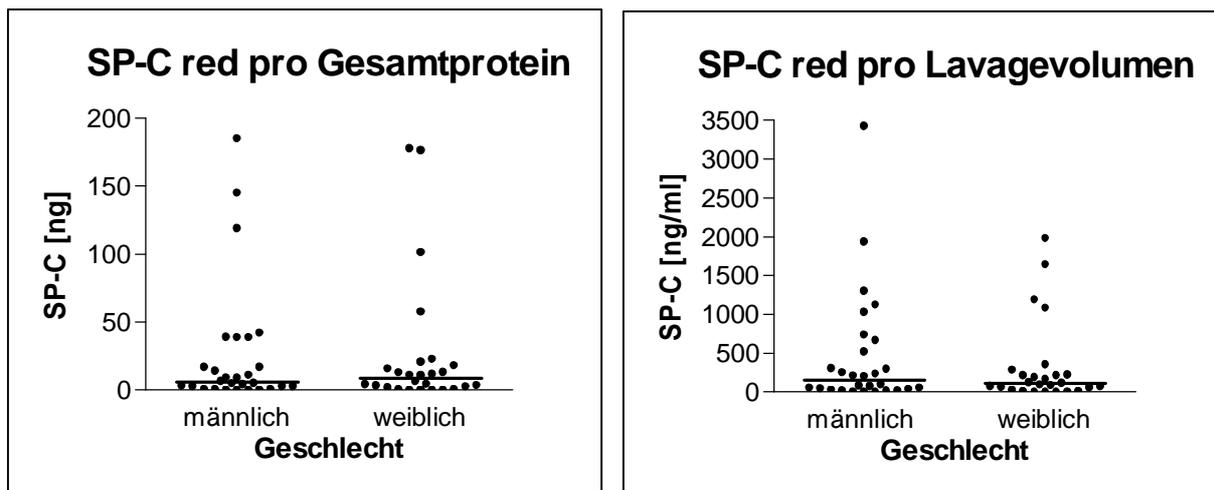
$r = -0,0130$; $P = 0,9189$

$r = -0,1420$; $P = 0,2630$

Gruppen: CF; **Pneumonie**; **Bronchitis**; **Kontrolle**

Abbildung 6.10: Gruppenübergreifende Korrelationen der SP-C-Mengen in **nicht reduzierter** Form, angegeben pro **5 µg Gesamtprotein** (links) bzw. **1 ml Lavagevolumen** (rechts) mit dem Patientenalter zum Zeitpunkt der Lavage.

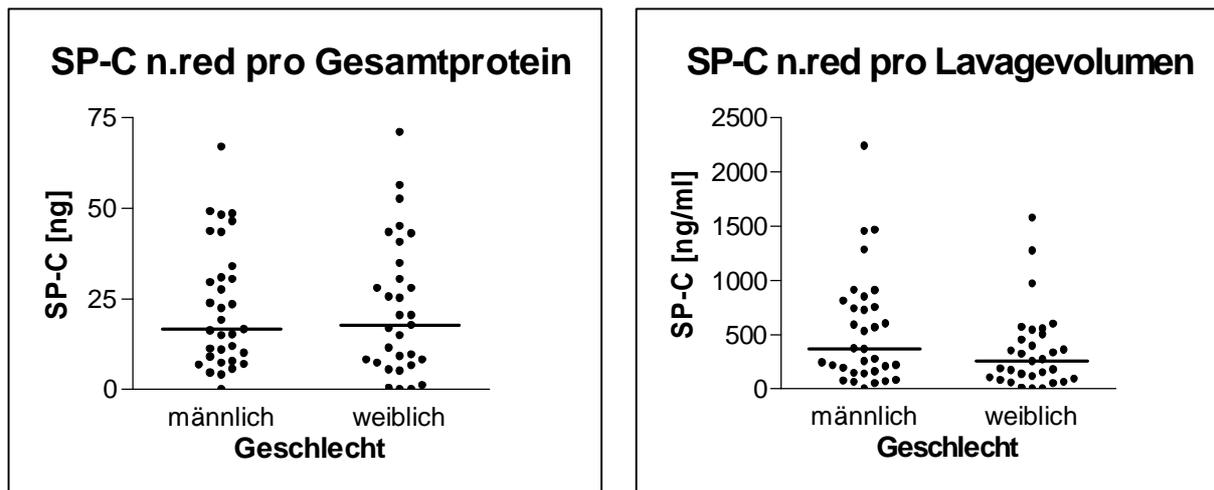
6.1.1.4 Vergleiche zwischen männlichen und weiblichen Patienten



P = 0,9655

P = 0,5620

Abbildung 6.11: Gruppenübergreifende Vergleiche der SP-C-Mengen in **reduzierter** Form bezogen auf **5 µg Gesamtprotein** (links) bzw. **1 ml Lavagevolumen** (rechts) zwischen männlichen und weiblichen Patienten. Mann-Whitney-Test: P jeweils > 0,05.



P = 0,2506

P = 0,0829

Abbildung 6.12: Gruppenübergreifende Vergleiche der SP-C-Mengen in **nicht reduzierter** Form bezogen auf **5 µg Gesamtprotein** (links) bzw. **1 ml Lavagevolumen** (rechts) zwischen männlichen und weiblichen Patienten. Mann-Whitney-Test: P jeweils > 0,05.

6.1.2 Surfactantprotein B

6.1.2.1 Neutrophile Granulozyten im BAL-Zytospin

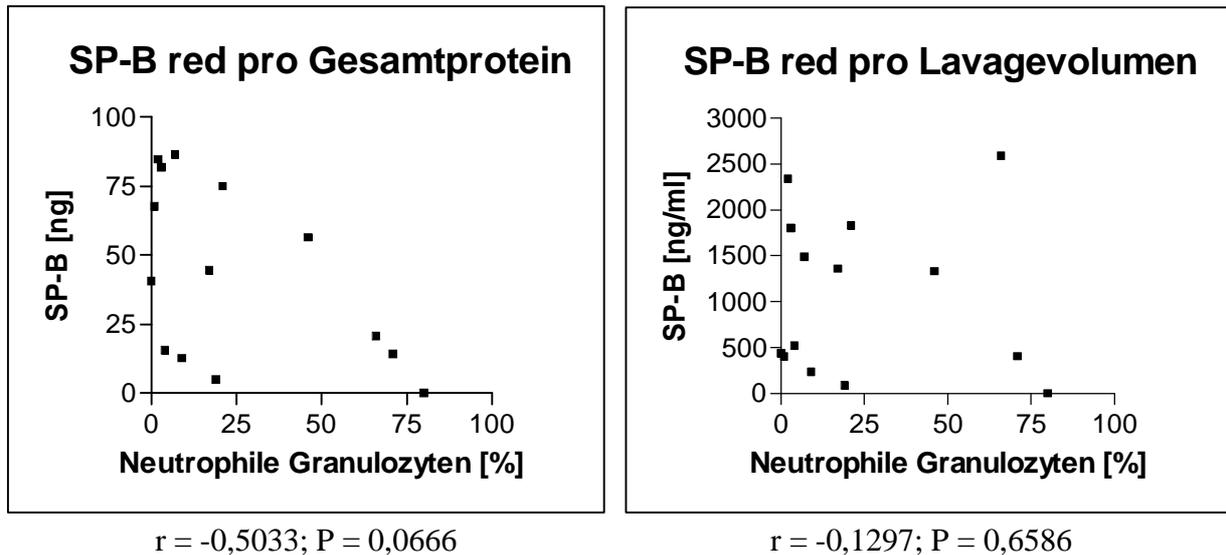


Abbildung 6.13: Korrelationen der SP-B-Mengen aus der Gruppe „Pneumonie ohne Immundefekt“ in **reduzierter** Form, angegeben pro **5 µg Gesamtprotein** (links) bzw. **1 ml Lavagevolumen** (rechts) mit dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im BAL-Zytospin.

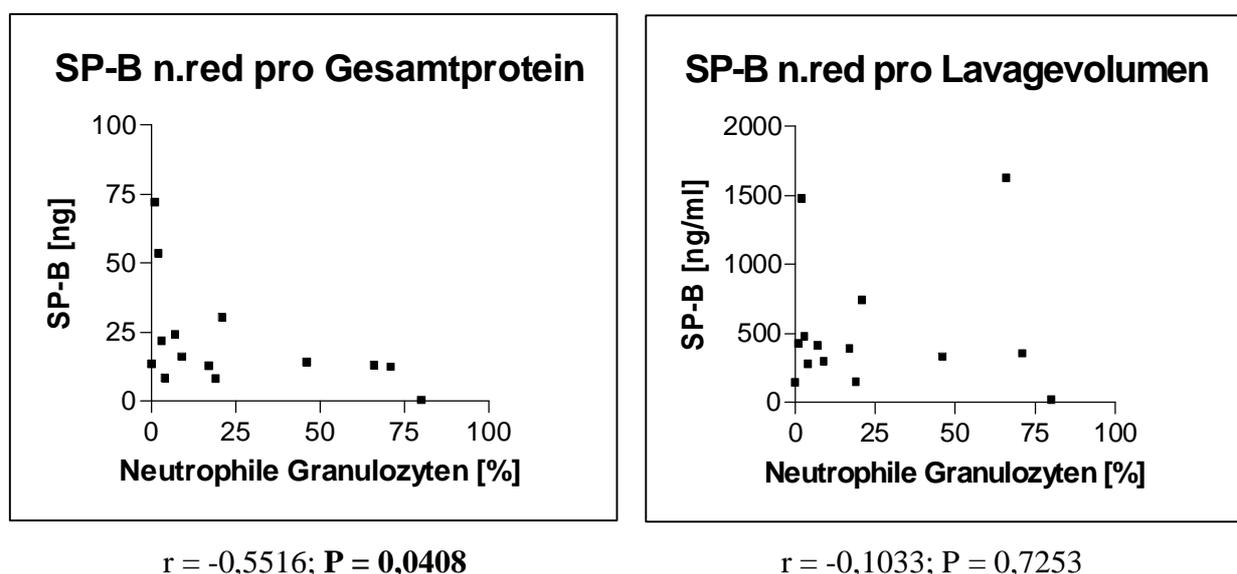
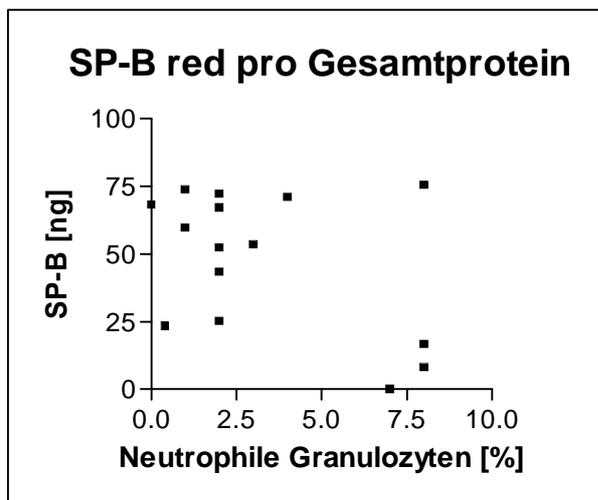
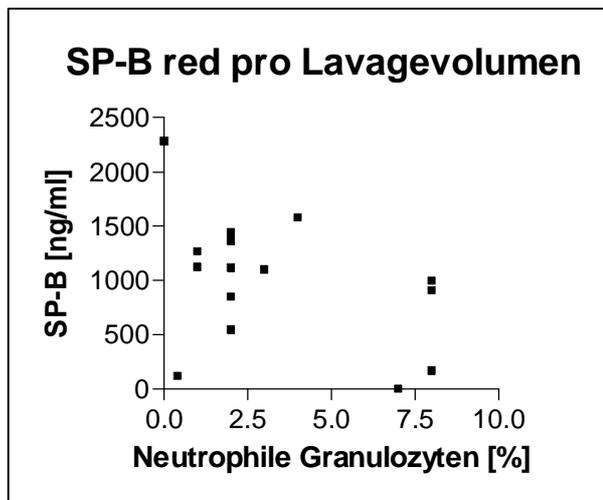


Abbildung 6.14: Korrelationen der SP-B-Mengen aus der Gruppe „Pneumonie ohne Immundefekt“ in **nicht reduzierter** Form, angegeben pro **5 µg Gesamtprotein** (links) bzw. **1 ml Lavagevolumen** (rechts) mit dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im BAL-Zytospin.

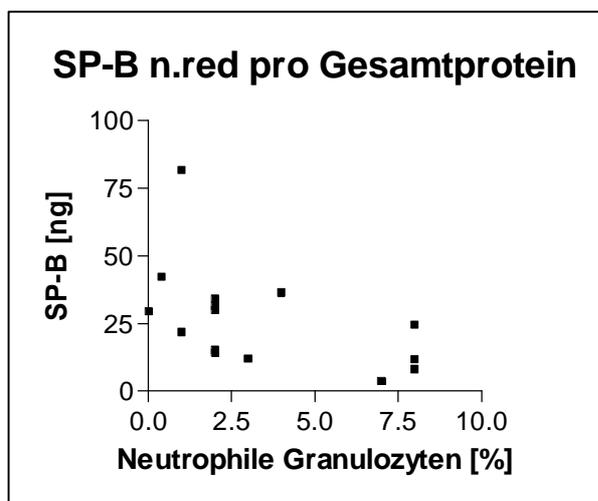


$$r = -0,2539; P = 0,3611$$

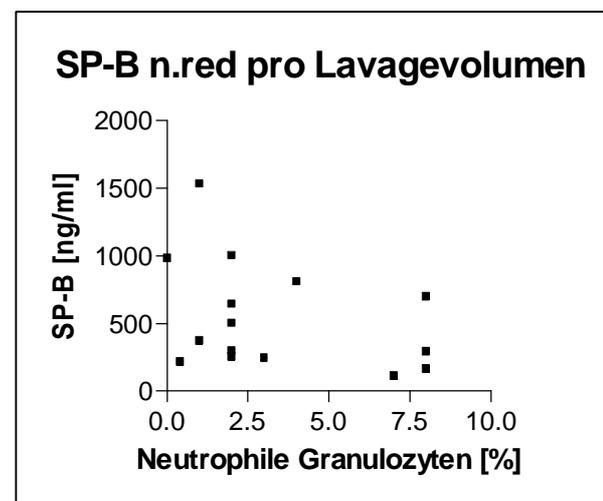


$$r = -0,3526; P = 0,1974$$

Abbildung 6.15: Korrelationen der SP-B-Mengen aus der Gruppe „Chronische Bronchitis“ in reduzierter Form, angegeben pro 5 µg Gesamtprotein (links) bzw. 1 ml Lavagevolumen (rechts) mit dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im BAL-Zytospin.

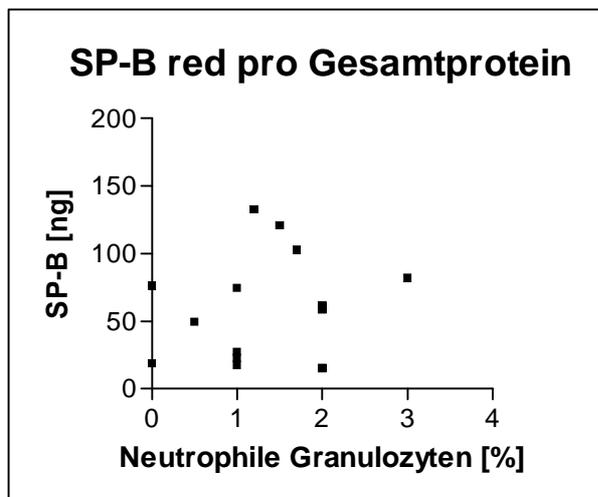


$$r = -0,5883; P = 0,0211$$

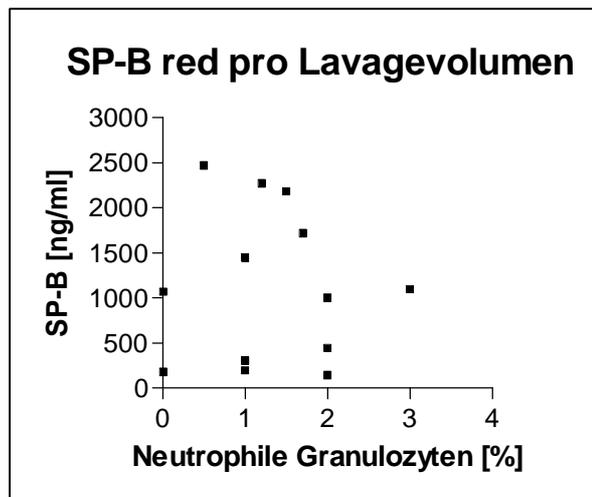


$$r = -0,3489; P = 0,2024$$

Abbildung 6.16: Korrelationen der SP-B-Mengen aus der Gruppe „Chronische Bronchitis“ in nicht reduzierter Form, angegeben pro 5 µg Gesamtprotein (links) bzw. 1 ml Lavagevolumen (rechts) mit dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im BAL-Zytospin.

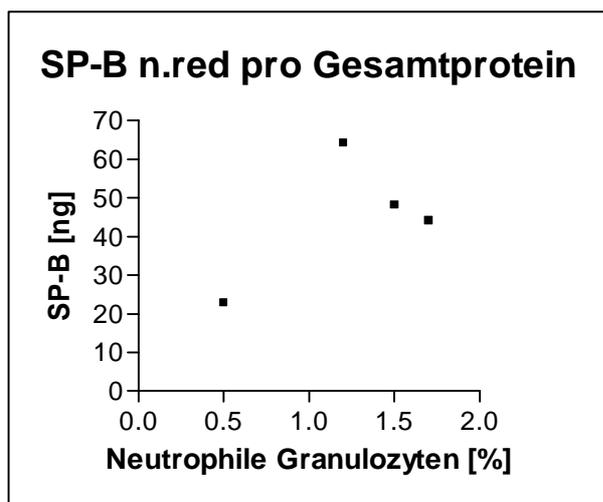


$$r = 0,2458; P = 0,3969$$

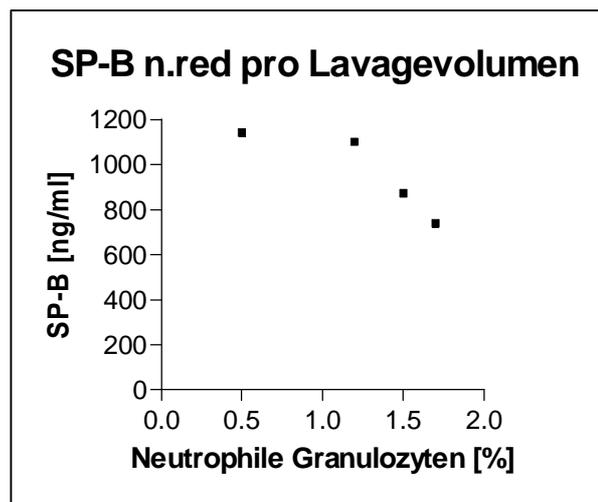


$$r = 0,0291; P = 0,9215$$

Abbildung 6.17: Korrelationen der SP-B-Mengen aus der Gruppe der lungengesunden Kontrollpatienten in reduziertem Zustand, angegeben pro 5 µg Gesamtprotein (links) bzw. 1 ml Lavagevolumen (rechts) mit dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im BAL-Zytospin.



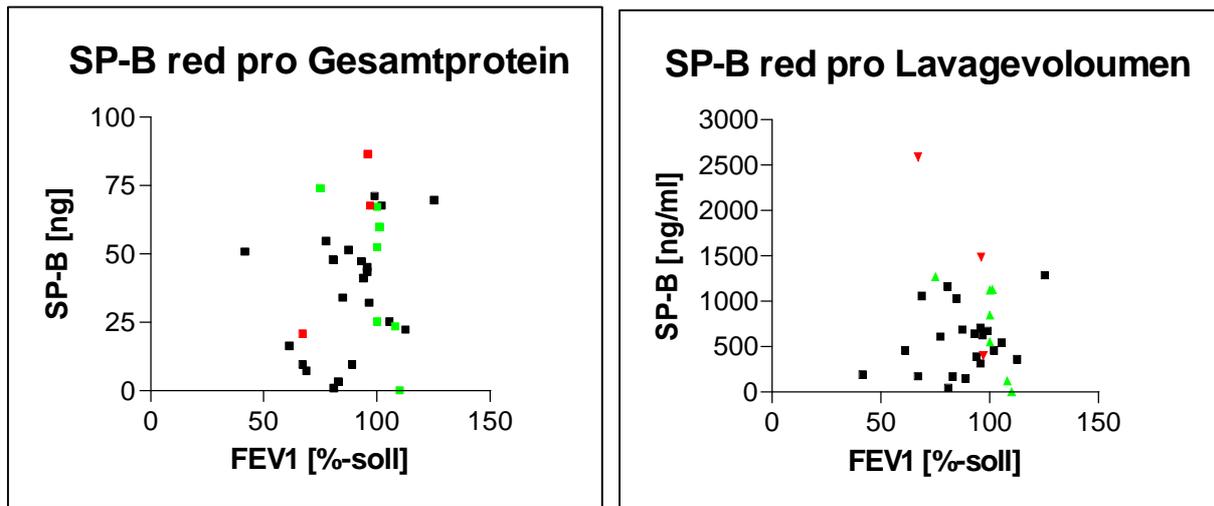
$$r = 0,2$$



$$r = 0,2$$

Abbildung 6.18: Korrelationen der SP-B-Mengen aus der Gruppe der lungengesunden Kontrollpatienten in nicht reduziertem Zustand, angegeben pro 5 µg Gesamtprotein (links) bzw. 1 ml Lavagevolumen (rechts) mit dem prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im BAL-Zytospin.

6.1.2.2 Forcierte expiratorische Einsekundenkapazität

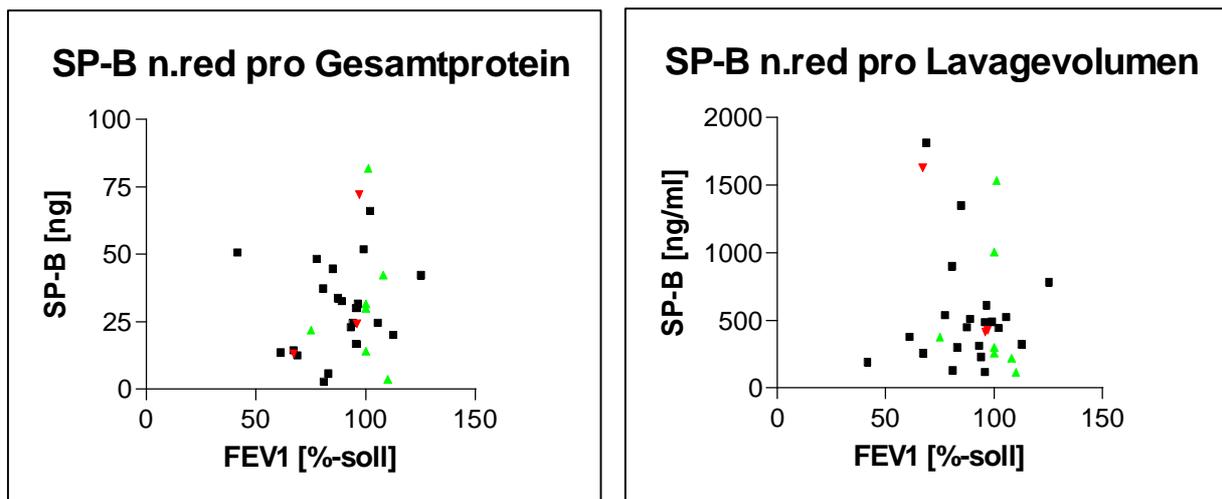


$r = 0,2163$; $P = 0,2426$

$r = -0,0617$; $P = 0,7415$

Gruppe: CF; **Pneumonie**; **Bronchitis**

Abbildung 6.19: Gruppenübergreifende Korrelationen der SP-B-Mengen in reduziertem Zustand, angegeben pro 5 µg Gesamtprotein (links) bzw. 1 ml Lavagevolumen (rechts) mit der forcierten expiratorischen Einsekundenkapazität.



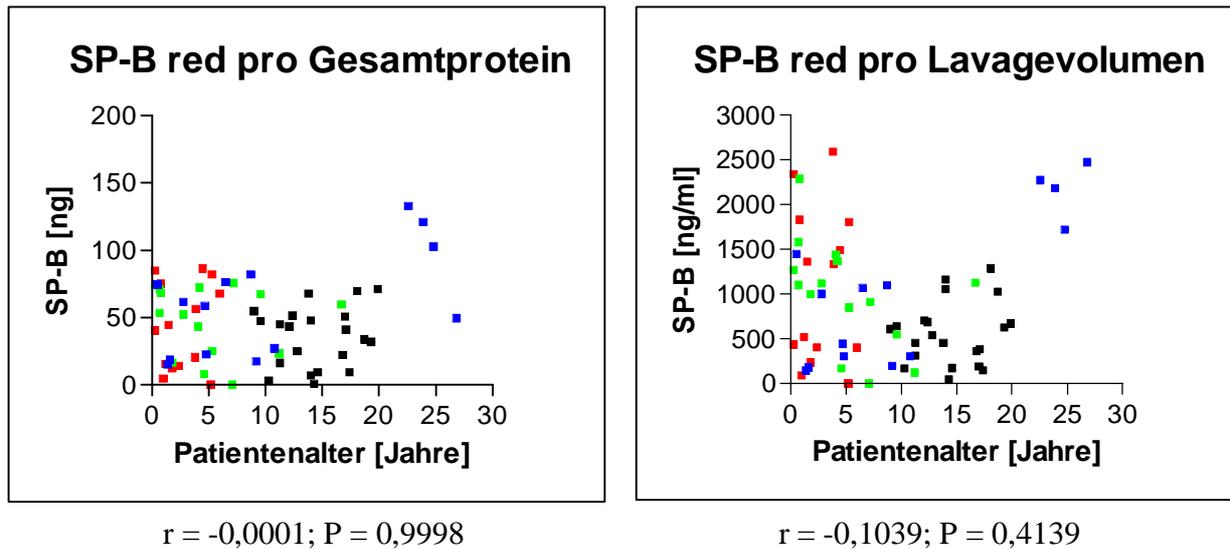
$r = 0,2552$; $P = 0,1659$

$r = -0,0569$; $P = 0,7612$

Gruppen: CF; **Pneumonie**; **Bronchitis**

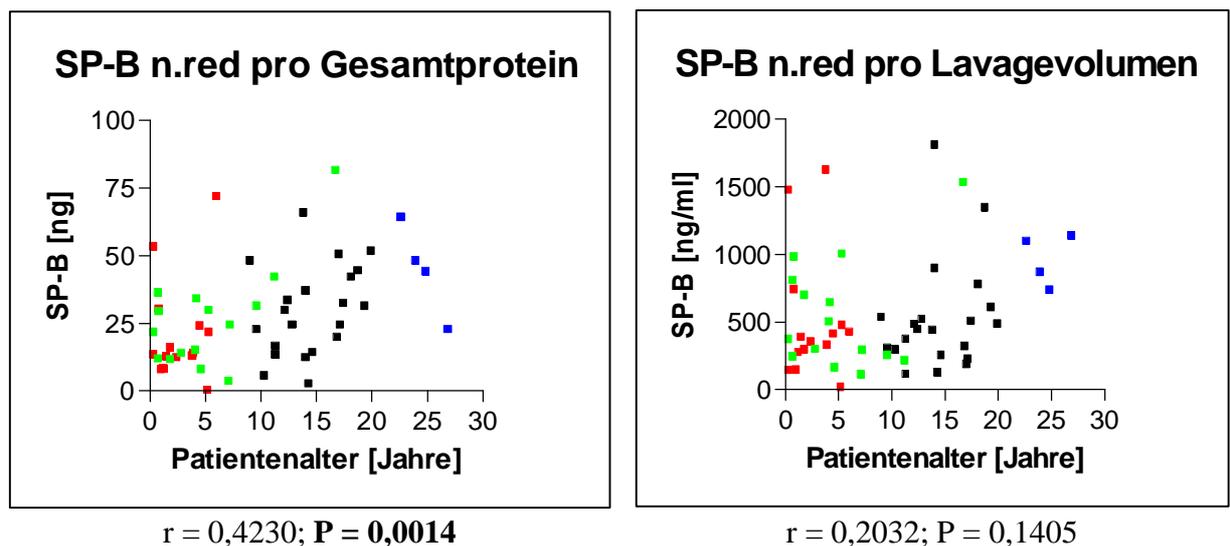
Abbildung 6.20: Gruppenübergreifende Korrelationen der SP-B-Mengen in nicht reduziertem Zustand, angegeben pro 5 µg Gesamtprotein (links) bzw. 1 ml Lavagevolumen (rechts) mit der forcierten expiratorischen Einsekundenkapazität.

6.1.2.3 Patientenalter



Gruppen: CF; **Pneumonie**; **Bronchitis**; **Kontrolle**

Abbildung 6.21: Gruppenübergreifende Korrelationen der SP-B-Mengen in **reduziertem** Zustand, angegeben pro **5 µg Gesamtprotein** (links) bzw. **1 ml Lavagevolumen** (rechts) mit dem Patientenalter zum Zeitpunkt der Lavage.



Gruppen: CF; **Pneumonie**; **Bronchitis**; **Kontrolle**

Abbildung 6.22: Gruppenübergreifende Korrelationen der SP-B-Mengen in **nicht reduziertem** Zustand, angegeben pro **5 µg Gesamtprotein** (links) bzw. **1 ml Lavagevolumen** (rechts) mit dem Patientenalter zum Zeitpunkt der Lavage.

6.1.2.4 Vergleiche zwischen männlichen und weiblichen Patienten

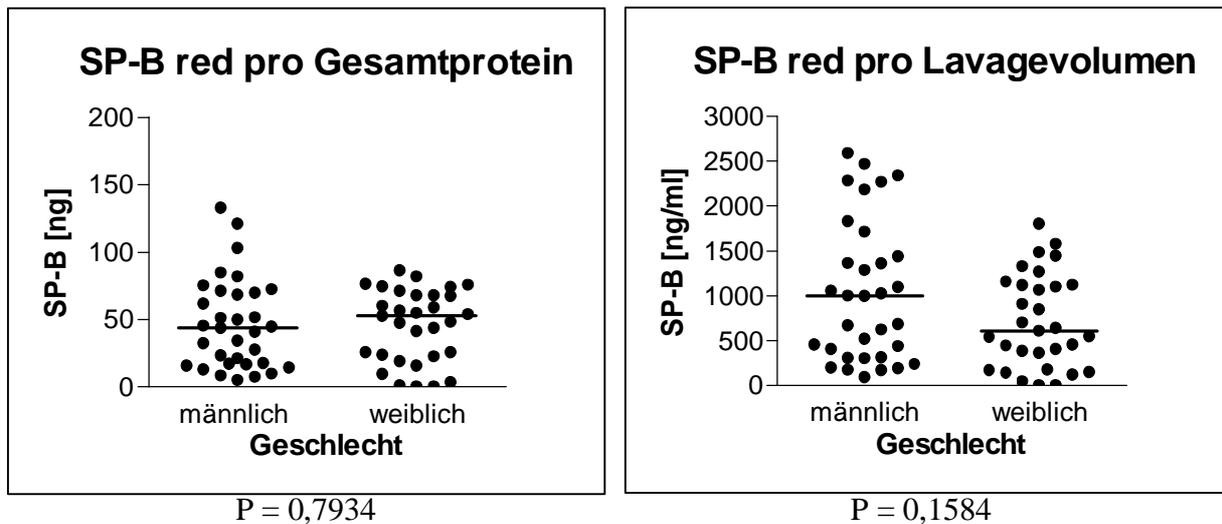


Abbildung 6.23: Gruppenübergreifende Vergleiche der SP-B-Mengen in reduziertem Zustand, angegeben pro 5 µg Gesamtprotein (links) bzw. 1 ml Lavagevolumen (rechts) zwischen männlichen und weiblichen Patienten. Mann-Whitney-Test: P jeweils > 0,05.

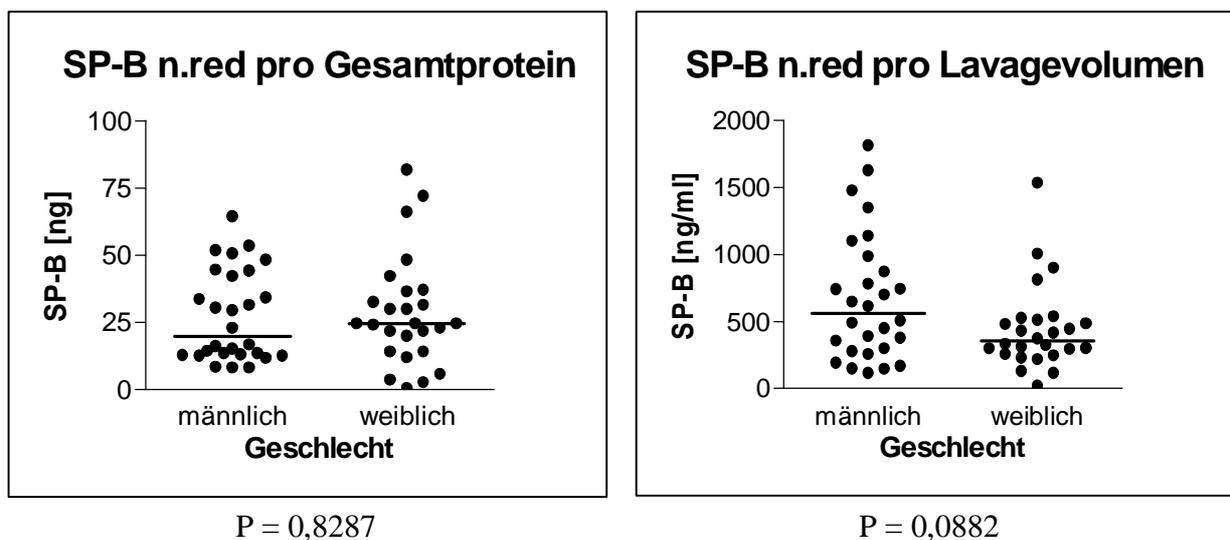


Abbildung 6.24: Gruppenübergreifende Vergleiche der SP-B-Mengen in nicht reduziertem Zustand, angegeben pro 5 µg Gesamtprotein (links) bzw. 1 ml Lavagevolumen (rechts) zwischen männlichen und weiblichen Patienten. Mann-Whitney-Test: P jeweils > 0,05.

6.2 Tabellen

6.2.1 Cystische Fibrose

Tabelle 6.1: Ergänzende Daten der CF-Patienten zur Tabelle 2.1

Patient	Pseudomonas aeruginosa in BAL	Staphylokokkus aureus in BAL	Gesamtprotein-gehalt [$\mu\text{g/ml}$]	verwendetes Lavagevolumen [μl]
CF 1	negativ	negativ	47,1	106,1
CF 2	negativ	negativ	66,8	74,9
CF 3	negativ	positiv	67,8	73,8
CF 4	negativ	negativ	55,7	89,7
CF 5	negativ	positiv	81,0	61,7
CF 6	negativ	negativ	92,4	54,1
CF 7	negativ	negativ	33,6	148,6
CF 8	negativ	negativ	139,3	35,9
CF 9	negativ	negativ	46,6	107,3
CF 10	negativ	negativ	34,7	144,0
CF 11	negativ	negativ	259,1	19,3
CF 12	positiv	negativ	81,0	61,7
CF 13	negativ	positiv	106,8	46,8
CF 14	positiv	negativ	89,3	56,0
CF 15	positiv	positiv	97,3	51,4
CF 16	positiv	negativ	121,1	41,3
CF 17	positiv	positiv	78,4	63,8
CF 18	positiv	negativ	18,8	265,7
CF 19	negativ	positiv	151,1	33,1
CF 20	positiv	negativ	724,6	6,9
CF 21	positiv	positiv	235,8	21,2

Tabelle 6.2: Statistische Auswertung der Daten aus den Tabellen 2.1 und 6.1

	Alter [Jahre]	FEV 1 [%-soll]	Zellen Pool [mal $10^6/\text{ml}$]	Neutr. Gran. Zytosp. [%]	Gesamtprotein-gehalt [$\mu\text{g/ml}$]	verwendetes Lavagevolumen [μl]
Anzahl Werte	21,00	21,00	20,00	21,00	21,00	21,00
Minimum	9,00	41,77	0,34	0,70	18,80	6,90
25% Percentile	11,70	79,13	0,76	2,20	51,40	38,60
Median	14,00	89,00	7,28	40,60	81,00	61,70
75% Percentile	17,25	97,72	31,93	79,80	130,20	97,90
Maximum	19,90	125,26	309,20	93,10	724,60	265,70
Mittelwert (MW)	14,47	87,71	32,81	42,15	125,16	74,44
Standardabweichung	3,29	18,40	71,77	35,74	150,27	57,64
Standardfehler	0,72	4,02	16,05	7,80	32,79	12,58
- 95% CI (MW)	12,97	79,33	- 0,78	25,88	56,75	48,20
+ 95% CI (MW)	15,96	96,08	66,40	58,42	193,56	100,68

Tabelle 6.3: Ergebnisse der Surfactantproteinmessungen aus der CF-Gruppe

Patient	SP-C red [ng]	SP-C red [ng/ml]	SP-C n.red [ng]	SP-C n.red [ng/ml]	SP-B red [ng]	SP-B red [ng/ml]	SP-B n.red [ng]	SP-B n.red [ng/ml]
CF 1	119,10	1122,25	23,43	220,79	71,13	670,40	51,88	488,97
CF 2	145,17	1938,18	27,51	367,28	51,32	685,18	33,62	448,83
CF 3	2,08	28,18	11,46	155,34	47,35	641,60	22,92	310,62
CF 4	177,85	1982,72	45,11	502,90	54,71	609,92	48,26	538,02
CF 5	101,60	1646,68	27,91	452,28	43,39	703,24	29,95	485,36
CF 6	185,17	3422,74	49,20	909,43	69,61	1286,69	42,22	780,41
CF 7	176,42	1187,21	40,68	273,76	67,73	455,79	65,98	444,01
CF 8	3,06	85,31	7,00	194,92	16,38	456,34	13,56	377,66
CF 9	13,32	124,16	14,93	139,14	41,13	383,32	24,53	228,57
CF 10	11,20	77,81	11,00	76,41	45,09	313,13	16,71	116,03
CF 11	0,09	4,59	1,17	60,78	3,28	169,74	5,78	299,46
CF 12	4,38	71,06	7,39	119,78	22,30	361,47	19,98	323,77
CF 13	3,51	74,98	8,20	175,11	25,27	540,06	24,53	524,06
CF 14	0,42	7,56	4,07	72,68	9,68	172,90	14,38	256,72
CF 15	5,09	99,07	30,39	591,17	32,12	624,99	31,47	612,23
CF 16	11,86	287,23	52,61	1273,85	47,92	1160,29	37,13	898,98
CF 17	0,59	9,25	5,13	80,34	9,46	148,29	32,52	509,80
CF 18	5,40	20,32	22,40	84,29	50,75	191,00	50,68	190,74
CF 19	6,78	204,81	48,52	1465,86	33,00	1027,01	44,64	1348,64
CF 20	0,00	0,00	0,00	0,00	7,28	1055,02	12,51	1813,19
CF 21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,93	44,02	2,73	128,71

Tabelle 6.4: Statistische Auswertung der Daten aus Tabelle 6.3

	SP-C red [ng]	SP-C red [ng/ml]	SP-C n.red [ng]	SP-C n.red [ng/ml]	SP-B red [ng]	SP-B red [ng/ml]	SP-B n.red [ng]	SP-B n.red [ng/ml]
Anzahl Werte	21,00	21,00	21,00	21,00	21,00	21,00	21,00	21,00
Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,93	44,02	2,73	116,03
25% Perzentile	1,34	14,78	6,06	78,38	13,03	252,07	15,54	278,09
Median	5,40	85,31	14,93	175,11	41,13	540,06	29,95	448,83
75% Perzentile	110,35	1154,73	35,53	477,59	51,04	694,21	43,43	575,12
Maximum	185,17	3422,74	52,61	1465,86	71,13	1286,69	65,98	1813,19
Mittelwert (MW)	46,34	590,20	20,86	343,62	35,75	557,17	29,81	529,75
Standardabweichung	70,04	939,24	17,74	408,61	22,18	349,35	16,59	407,47
Standardfehler	15,28	204,96	3,87	89,17	4,84	76,23	3,62	88,92
- 95% CI (MW)	14,46	162,66	12,79	157,63	25,66	398,15	22,25	344,27
+ 95% CI (MW)	78,22	1017,74	28,94	529,62	45,85	716,19	37,36	715,23

6.2.2 Chronische Bronchitis

Tabelle 6.5: Ergänzende Daten der Bronchitis-Patienten zur Tabelle 2.2

Patient	FEV 1 [%-soll]	Keimnachweis in BAL	Gesamtprotein-gehalt $\mu\text{g/ml}$	verwendetes Lavagevolumen $[\mu\text{l}]$
B 1		negativ	167,2	29,9
B 2	108	negativ	25,8	194,0
B 3	101	negativ	94,0	53,2
B 4	75	positiv	85,8	58,3
B 5		negativ	94,5	52,9
B 6	100	positiv	40,7	122,9
B 7	100	negativ	106,6	46,9
B 8		negativ	166,1	30,1
B 9	100	negativ	167,8	29,8
B 10		negativ	102,7	48,7
B 11		positiv	111,1	45,0
B 12	110	negativ	155,8	32,1
B 13		positiv	297,6	16,8
B 14		positiv	103,1	48,5
B 15		negativ	60,0	83,3

Tabelle 6.6: Statistische Auswertung der Daten aus den Tabellen 2.2 und 6.5

	Alter [Jahre]	FEV 1 [%-soll]	Zellen Pool [$\text{mal } 10^4/\text{ml}$]	Neutr. Gran. Zytosp. [%]	Gesamtprotein-gehalt $[\mu\text{g/ml}]$	verwendetes Lavagevolumen $[\mu\text{l}]$
Anzahl Werte	15,00	7,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Minimum	0,30	75,00	5,40	0,00	25,80	16,80
25% Percentile	0,80	100,00	10,50	1,00	85,80	30,10
Median	4,20	100,00	14,50	2,00	103,10	48,50
75% Percentile	7,20	108,00	26,00	7,00	166,10	58,30
Maximum	16,70	110,00	30,00	8,00	297,60	194,00
Mittelwert (MW)	5,14	99,14	16,24	3,36	118,59	59,49
Standardabweichung	4,62	11,44	8,19	2,91	66,30	45,17
Standardfehler	1,19	4,32	2,11	0,75	17,12	11,66
- 95% CI (MW)	2,58	88,57	11,71	1,75	81,87	34,48
+ 95% CI (MW)	7,70	109,72	20,77	4,97	155,30	84,51

Tabelle 6.7: Ergebnisse der Surfactantproteinmessungen aus der Bronchitis-Gruppe

Patient	SP-C red [ng]	SP-C red [ng/ml]	SP-C n.red [ng]	SP-C n.red [ng/ml]	SP-B red [ng]	SP-B red [ng/ml]	SP-B n.red [ng]	SP-B n.red [ng/ml]
B 1	38,93	1302,01	66,93	2238,46	68,30	2284,28	29,46	985,15
B 2	22,94	118,25	20,43	105,30	23,43	120,79	42,22	217,63
B 3	57,67	1084,02	30,39	571,17	59,81	1124,25	81,68	1535,34
B 4	12,94	221,92	34,94	599,29	73,96	1268,61	21,78	373,58
B 5	38,93	735,92	48,18	910,78	72,26	1365,97	34,18	646,08
B 6	20,66	168,14	43,41	353,21	67,16	546,46	31,47	256,05
B 7	4,52	96,37	25,59	545,66	52,45	1118,34	14,10	300,64
B 8	8,95	297,46	43,74	1453,16	43,39	1441,53	15,22	505,79
B 9	6,41	215,05	9,67	324,45	25,27	848,15	29,95	1004,93
B 10	0,68	14,04	17,70	363,36	53,58	1100,21	12,01	246,51
B 11	15,96	354,60	71,02	1578,22	71,13	1580,67	36,52	811,49
B 12	0,07	2,03	0,37	11,66	0,00	0,00	3,69	114,94
B 13	0,82	48,72	10,11	601,57	16,77	998,01	11,76	699,79
B 14	0,82	16,88	11,93	246,04	8,22	169,40	8,13	167,61
B 15	18,10	217,31	27,91	335,00	75,65	908,16	24,53	294,43

Tabelle 6.8: Statistische Auswertung der Daten aus Tabelle 6.7

	SP-C red [ng]	SP-C red [ng/ml]	SP-C n.red [ng]	SP-C n.red [ng/ml]	SP-B red [ng]	SP-B red [ng/ml]	SP-B n.red [ng]	SP-B n.red [ng/ml]
Anzahl Werte	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Minimum	0,07	2,03	0,37	11,66	0,00	0,00	3,69	114,94
25% Percentile	0,82	48,72	11,93	324,45	23,43	546,46	12,01	246,51
Median	12,94	215,05	27,91	545,66	53,58	1100,21	24,53	373,58
75% Percentile	22,94	354,60	43,74	910,78	71,13	1365,97	34,18	811,49
Maximum	57,67	1302,01	71,02	2238,46	75,65	2284,28	81,68	1535,34
Mittelwert (MW)	16,56	326,18	30,82	682,49	47,43	991,66	26,45	544,00
Standardabweichung	17,09	398,87	20,77	618,00	26,09	605,11	19,07	401,05
Standardfehler	4,41	102,99	5,36	159,57	6,74	156,24	4,92	103,55
- 95% CI (MW)	7,09	105,29	19,32	340,25	32,98	6,56	15,89	321,90
+ 95% CI (MW)	26,03	547,07	42,32	1024,73	61,87	1326,75	37,00	766,09

6.2.3 Pneumonie ohne Immundefekt

Tabelle 6.9: Ergänzende Daten der Pneumonie-Patienten zur Tabelle 2.3

Patient	FEV 1 [%-soll]	Keimnachweis in BAL	Gesamtprotein-gehalt [$\mu\text{g/ml}$]	verwendetes Lavagevolumen [μl]
P 1			54,0	92,6
P 2	97	positiv	29,8	167,6
P 3		positiv	138,1	36,2
P 4		negativ	110,1	45,4
P 5		positiv	166,1	30,1
P 6	96	positiv	86,1	58,1
P 7		positiv	92,9	53,8
P 8		negativ	152,9	32,7
P 9		positiv	91,1	54,9
P 10		negativ	122,0	41,0
P 11		positiv	117,9	42,4
P 12	67	positiv	625,0	8,0
P 13		positiv	142,5	35,1
P 14		positiv	240,4	20,8

Tabelle 6.10: Statistische Auswertung der Daten aus den Tabellen 2.3 und 6.9

	Alter [Jahre]	FEV 1 [%-soll]	Zellen Pool [$\text{mal } 10^4/\text{ml}$]	Neutr. Gran. Zytosp. [%]	Gesamtprotein-gehalt [$\mu\text{g/ml}$]	verwendetes Lavagevolumen [μl]
Anzahl Werte	14,00	3,00	14,00	14,00	14,00	14,00
Minimum	0,30	67,00	5,50	0,00	29,80	8,00
25% Percentile	0,90		9,50	2,50	88,60	31,40
Median	2,10	96,00	20,50	13,00	119,95	41,70
75% Percentile	4,85		50,75	56,00	159,50	56,50
Maximum	6,00	97,00	108,50	80,00	625,00	167,60
Mittelwert (MW)	2,71	86,67	32,11	24,71	154,92	51,34
Standardabweichung	2,01	17,04	28,89	28,57	144,60	38,84
Standardfehler	0,54	9,84	7,72	7,64	38,65	10,38
- 95% CI (MW)	1,56	44,34	15,43	8,22	71,43	28,91
+ 95% CI (MW)	3,87	128,99	48,80	41,21	238,41	73,76

Tabelle 6.11: Ergebnisse der Surfactantproteinmessungen aus der Pneumonie-Gruppe

Patient	SP-C red [ng]	SP-C red [ng/ml]	SP-C n.red [ng]	SP-C n.red [ng/ml]	SP-B red [ng]	SP-B red [ng/ml]	SP-B n.red [ng]	SP-B n.red [ng/ml]
P 1	2,95	31,91	15,19	164,09	40,56	438,01	13,57	146,42
P 2	10,89	64,99	43,07	256,98	67,73	404,12	72,02	429,71
P 3	9,21	254,31	46,47	1283,70	84,71	2340,06	53,50	1477,90
P 4	2,75	60,54	25,22	555,52	81,88	1803,52	21,78	479,73
P 5	0,62	20,50	11,23	373,19	15,65	519,78	8,34	277,00
P 6	11,20	192,85	56,36	970,05	86,41	1487,26	24,12	415,08
P 7	2,95	54,92	14,93	277,50	12,74	236,83	16,10	299,33
P 8	16,98	519,39	23,78	727,14	44,52	1361,47	12,77	390,47
P 9	2,95	53,82	7,79	141,88	4,92	89,53	8,13	148,07
P 10	42,14	1027,81	30,82	751,63	57,01	1829,51	30,45	742,58
P 11	3,75	88,36	16,84	397,12	56,41	1330,43	14,10	332,56
P 12	0,30	37,17	6,80	850,49	20,73	2591,57	13,03	1628,56
P 13	0,08	2,19	7,39	210,56	14,28	406,74	12,51	356,44
P 14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40	19,53

Tabelle 6.12: Statistische Auswertung der Daten aus Tabelle 6.11

	SP-C red [ng]	SP-C red [ng/ml]	SP-C n.red [ng]	SP-C n.red [ng/ml]	SP-B red [ng]	SP-B red [ng/ml]	SP-B n.red [ng]	SP-B n.red [ng/ml]
Anzahl Werte	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00
Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40	19,35
25% Percentile	0,46	26,20	7,59	187,32	13,51	320,47	10,42	212,54
Median	2,96	57,73	16,02	385,15	42,54	925,10	13,83	373,45
75% Percentile	11,05	223,58	36,94	801,06	78,45	1816,52	27,28	611,16
Maximum (MW)	42,14	1027,81	56,36	1283,70	86,41	2591,57	72,02	1628,56
Mittelwert	7,63	172,05	21,85	497,13	43,25	1059,92	21,49	510,23
Standardabweichung	11,19	282,57	16,83	370,65	31,92	866,22	19,29	474,78
Standardfehler	2,99	75,52	4,50	99,06	8,53	231,51	5,16	126,89
- 95% CI (MW)	1,17	8,90	12,14	283,13	24,82	9,78	10,35	236,10
+ 95% CI (MW)	14,09	335,21	31,57	711,14	61,68	1560,06	32,62	784,36

6.2.4 Lungengesunde Kontrollgruppe

Tabelle 6.13: Ergänzende Daten der Kontrollgruppe zur Tabelle 2.4

Patient	Gesamtproteingehalt [$\mu\text{g/ml}$]	verwendetes Lavagevolumen [μl]
K 1	47,3	105,7
K 2	70,0	71,4
K 3	248,8	20,1
K 4	56,0	89,3
K 5	66,0	75,8
K 6	56,0	89,3
K 7	97,3	51,4
K 8	85,5	58,5
K 9	90,3	55,4
K 10	83,5	59,9
K 11	46,5	107,5
K 12	38,0	131,6
K 13	81,6	61,3
K 14	67,0	74,6

Tabelle 6.14: Statistische Auswertung der Daten aus den Tabellen 2.4 und 6.13

	Alter [Jahre]	Zellen Pool [mal $10^4/\text{ml}$]	Neutr. Gran. Pool Zytosp. [%]	Gesamtprotein- gehalt [$\mu\text{g/ml}$]	verwendetes Lavagevolumen [μl]
Anzahl Werte	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00
Minimum	0,50	3,20	0,00	38,00	20,10
25% Percentile	2,20	6,55	0,75	51,65	56,95
Median	7,60	9,15	1,10	68,50	73,00
75% Percentile	23,25	16,10	2,00	87,90	97,50
Maximum	26,80	20,00	3,00	248,80	131,60
Mittelwert (MW)	10,65	10,41	1,28	80,99	75,13
Standardabweichung	9,62	5,18	0,83	51,52	28,10
Standardfehler	2,57	1,39	0,22	13,77	7,51
- 95% CI (MW)	5,09	7,42	0,80	51,24	58,90
+ 95% CI (MW)	16,21	13,41	1,76	110,37	91,36

Tabelle 6.15: Ergebnisse der Surfactantproteinmessungen aus der Kontrollgruppe

Patient	SP-C red [ng]	SP-C red [ng/ml]	SP-C n.red [ng]	SP-C n.red [ng/ml]	SP-B red [ng]	SP-B red [ng/ml]	SP-B n.red [ng]	SP-B n.red [ng/ml]
K 1			20,42	190,03	18,84	178,29		
K 2			6,61	92,60	76,22	1067,51		
K 3	4,25	211,51	16,28	809,93	49,62	2468,66	22,92	1140,47
K 4			5,67	63,51	17,56	196,69		
K 5			16,56	218,44	22,86	301,57		
K 6			4,59	51,42	27,31	305,86		
K 7			9,24	179,75	74,52	1449,81		
K 8	39,07	667,93	43,41	742,05	132,82	2270,43	64,37	1100,34
K 9	16,98	306,57	29,54	533,21	120,93	2182,85	48,26	871,12
K 10	14,13	235,97	33,98	567,32	102,82	1716,53	44,23	738,40
K 11			20,43	190,03	15,29	142,23		
K 12			8,20	62,27	58,67	445,82		
K 13			9,03	147,26	61,50	1003,26		
K 14			19,18	257,15	81,88	1097,59		

Tabelle 6.16: Statistische Auswertung der Daten aus Tabelle 6.15

	SP-C red [ng]	SP-C red [ng/ml]	SP-C n.red [ng]	SP-C n.red [ng/ml]	SP-B red [ng]	SP-B red [ng/ml]	SP-B n.red [ng]	SP-B n.red [ng/ml]
Anzahl Werte	4,00	4,00	14,00	14,00	14,00	14,00	4,00	4,00
Minimum	4,25	211,51	4,59	51,42	15,29	142,23	22,92	738,40
25% Percentile	9,19	223,74	6,14	62,89	20,85	249,13	33,58	804,76
Median	15,50	271,27	12,76	184,89	60,09	1035,39	46,25	985,73
75% Percentile	28,03	487,25	24,98	550,27	92,35	1949,69	56,32	1120,41
Maximum	39,07	667,93	43,41	809,93	132,82	2468,66	64,37	1140,47
Mittelwert (MW)	18,61	355,49	16,30	283,35	61,49	1059,08	44,95	962,58
Standardabweichung	14,69	212,15	12,02	265,24	39,05	840,52	17,07	190,83
Standardfehler	7,35	106,08	3,21	70,89	10,44	224,64	8,53	95,41
- 95% CI (MW)	- 4,77	17,91	9,36	130,21	38,94	573,78	17,79	658,93
+ 95% CI (MW)	41,99	693,08	23,24	436,49	84,04	1544,38	72,10	1266,23

6.2.5 Gruppenübergreifende Daten

Tabelle 6.17: Gruppenübergreifende statistische Auswertung (Tabellen 6.2, 6.6, 6.10, 6.14)

	Alter [Jahre]	FEV 1 [%-soll]	Zellen Pool [mal 10 ⁴ /ml]	Neutr. Gran. Pool Zytosp. [%]	Gesamtprotein- gehalt [µg/ml]	verwendetes Lavagevolumen [µl]
Anzahl Werte	64,00	31,00	63,00	64,00	64,00	64,00
Minimum	0,30	41,77	3,20	0,00	18,80	6,90
25% Percentile	2,60	80,67	10,40	1,25	63,00	36,05
Median	7,15	95,66	20,00	3,00	91,75	54,50
75% Percentile	14,00	100,00	91,00	29,80	138,70	79,55
Maximum	26,80	125,26	30920,00	93,10	724,60	265,70
Mittelwert (MW)	8,88	90,19	1054,76	20,30	120,47	66,03
Standardabweichung	7,14	17,19	4257,55	29,80	116,73	45,63
Standardfehler	0,89	3,09	536,40	3,73	14,59	5,70
- 95% CI (MW)	7,09	83,88	- 17,50	12,86	91,31	54,64
+ 95% CI (MW)	10,66	96,49	2127,02	27,75	149,62	77,43

Tabelle 6.18: Gruppenübergreifende statistische Auswertung (Tabellen 6.4, 6.8, 6.12, 6.16)

	SP-C red [ng]	SP-C red [ng/ml]	SP-C n.red [ng]	SP-C n.red [ng/ml]	SP-B red [ng]	SP-B red [ng/ml]	SP-B n.red [ng]	SP-B n.red [ng/ml]
Anzahl Werte	54,00	54,00	64,00	64,00	64,00	64,00	54,00	54,00
Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40	19,35
25% Percentile	1,45	30,05	7,99	129,46	18,21	309,49	13,29	266,86
Median	6,59	108,66	17,27	275,63	46,22	677,79	24,32	436,86
75% Percentile	19,38	330,58	32,40	595,23	68,96	1308,56	39,67	761,50
Maximum	196,42	3422,74	71,02	2238,46	132,82	2591,57	81,68	1813,19
Mittelwert (MW)	26,53	396,36	22,41	443,44	45,76	878,77	27,84	560,71
Standardabweichung	49,47	666,12	17,61	451,67	30,38	687,57	18,51	419,30
Standardfehler	6,73	90,65	2,20	56,46	3,80	85,95	2,52	57,06
- 95% CI (MW)	13,03	214,54	18,02	330,62	38,17	707,02	22,79	446,26
+ 95% CI (MW)	40,04	578,17	26,81	556,26	53,35	1050,52	32,89	675,16

6.2.6 Bakteriologische Daten

Tabelle 6.19: Statistische Daten der Patienten mit positivem Keimnachweis in der BAL

	Alter [Jahre]	FEV 1 [%-soll]	Zellen Pool [mal 10 ⁴ /ml]	Neutr. Gran. Pool Zytosp. [%]	Gesamtprotein- gehalt [µg/ml]	verwendetes Lavagevolumen [µl]
Anzahl Werte	27,00	17,00	27,00	27,00	27,00	27,00
Minimum	0,30	41,77	5,50	1,00	18,80	6,90
25% Percentile	1,80	71,87	19,60	4,00	81,00	33,10
Median	6,00	89,00	58,00	44,60	103,10	48,50
75% Percentile	14,30	96,76	914,00	78,60	151,10	61,70
Maximum	19,30	112,68	30920,00	93,10	724,60	265,70
Mittelwert (MW)	8,43	85,39	2378,74	39,96	156,34	58,59
Standardabweichung	6,59	17,51	6324,74	36,29	162,47	52,84
Standardfehler	1,27	4,25	1217,20	6,98	31,27	10,17
- 95% CI (MW)	5,83	76,39	- 123,22	25,61	92,07	37,69
+ 95% CI (MW)	11,04	94,40	4880,71	54,32	220,61	79,49

Tabelle 6.20: Statistische Daten der Patienten mit positivem Keimnachweis in der BAL

	SP-C red [ng]	SP-C red [ng/ml]	SP-C n.red [ng]	SP-C n.red [ng/ml]	SP-B red [ng]	SP-B red [ng/ml]	SP-B n.red [ng]	SP-B n.red [ng/ml]
Anzahl Werte	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00
Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40	19,35
25% Percentile	0,59	16,88	7,39	119,78	9,68	191,01	12,51	256,72
Median	3,51	54,92	11,93	277,50	25,27	546,46	21,78	373,58
75% Percentile	10,89	192,86	43,07	601,57	56,41	1160,29	32,53	699,79
Maximum	101,60	1646,68	71,02	1578,22	86,41	2591,57	72,02	1813,19
Mittelwert (MW)	8,70	149,20	22,24	467,06	34,49	764,42	24,27	559,09
Standardabweichung	19,38	315,27	20,24	469,76	27,25	674,10	16,90	478,03
Standardfehler	3,73	60,67	3,90	90,40	5,24	129,73	3,25	92,00
- 95% CI (MW)	1,03	24,49	14,23	281,23	23,71	497,76	17,58	369,99
+ 95% CI (MW)	16,37	273,92	30,24	652,89	45,27	1031,09	30,96	748,19

Tabelle 6.21: Statistische Daten der Patienten mit negativem Keimnachweis in der BAL

	Alter [Jahre]	FEV 1 [%-soll]	Zellen Pool [mal 10 ⁴ /ml]	Neutr. Gran. Pool Zytosp. [%]	Gesamtprotein- gehalt [µg/ml]	verwendetes Lavagevolumen [µl]
Anzahl Werte	22,00	14,00	21,00	22,00	22,00	22,00
Minimum	0,70	61,25	5,40	0,00	25,80	19,30
25% Percentile	3,45	85,24	13,50	1,25	51,40	32,40
Median	8,10	99,46	28,00	2,70	98,60	50,80
75% Percentile	13,10	105,00	52,50	19,00	154,35	97,90
Maximum	19,90	125,26	815,00	40,60	259,10	194,00
Mittelwert (MW)	8,68	96,01	98,70	9,21	104,58	68,18
Standardabweichung	6,00	15,42	212,68	12,13	58,16	46,23
Standardfehler	1,28	4,12	46,41	2,59	12,40	9,86
- 95% CI (MW)	6,02	87,11	1,88	3,83	78,79	47,68
+ 95% CI (MW)	11,34	104,92	195,51	14,59	130,37	88,67

Tabelle 6.22: Statistische Daten der Patienten mit negativem Keimnachweis in der BAL

	SP-C red [ng]	SP-C red [ng/ml]	SP-C n.red [ng]	SP-C n.red [ng/ml]	SP-B red [ng]	SP-B red [ng/ml]	SP-B n.red [ng]	SP-B n.red [ng/ml]
Anzahl Werte	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00
Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40	19,35
25% Percentile	0,59	16,88	7,39	119,78	9,68	191,01	12,51	256,72
Median	3,51	54,92	11,93	277,50	25,27	546,46	21,78	373,58
75% Percentile	10,89	192,86	43,07	601,57	56,41	1160,29	32,53	699,79
Maximum	101,60	1646,68	71,02	1578,22	86,41	2591,57	72,02	1813,19
Mittelwert (MW)	8,70	149,20	22,24	467,06	34,49	764,42	24,27	559,09
Standardabweichung	19,38	315,27	20,24	469,76	27,25	674,10	16,90	478,03
Standardfehler	3,73	60,67	3,90	90,40	5,24	129,73	3,25	92,00
- 95% CI (MW)	1,03	24,49	14,23	281,23	23,71	497,76	17,58	369,99
+ 95% CI (MW)	16,37	273,92	30,24	652,89	45,27	1031,09	30,96	748,19

6.3 Literaturverzeichnis

Amin R S, Wert S E, Baughman R P, Tomashefski J F Jr, Noguee L M, Brody A S, Hull W M, Whitsett J A.

Surfactant protein deficiency in familial interstitial lung disease.

J. Pediatr. 2001; 139: 85-92

Augusto L A, Li J, Synguelakis M, Johansson J, Chaby R.

Structural basis for interactions between lung surfactant protein C and bacterial lipopolysaccharide.

J. Biol. Chem. 2002; 277: 23484-23492

Augusto L A, Synguelakis M, Johansson J, Pedron T, Girard R, Chaby R.

Interaction of pulmonary surfactant protein C with CD 14 and lipopolysaccharide.

Infect.Immun. 2003; 71: 61-67

Baatz J E, Elledge B, Whitsett J A.

Surfactant protein SP-B induces ordering at the surface of model membrane bilayers.

Biochemistry 1990; 29: 6714-6720.

Beck D C, Ikegami M, Na C L, Zaltash S, Johansson J, Whitsett J A, Weaver T E.

The role of homodimers of surfactant protein B function in vivo.

J. Biol. Chem. 2000; 275: 3365-3370

Bradford M M.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal. Biochem. 1976; 72: 248-254

Brasch F, Johnen G, Winn-Brasch A, Guttentag S H, Schmiedl A, Kapp N, Suzuki Y, Müller K M, Richter J, Hawgood S, Ochs M.

Surfactant Protein B in Type II Pneumocytes and Intra-Alveolar Surfactant Forms of Human Lungs.

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2003; 30: 449-458

Brasch F, ten Brinke A, Johnen G, Ochs M, Kapp N, Müller K M, Beers M F, Fehrenbach H, Richter J, Batenburg J J, Bühling F.

Involvement of Cathepsin H in the Processing of the Hydrophobic Surfactant-Associated Protein C in Type II Pneumocytes.

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2002; 26: 659-670

Bünger H, Kaufner L, Pison U.

Quantitative analysis of hydrophobic pulmonary surfactant proteins by high-performance liquid chromatography with light-scattering detection.

J Chromatogr. A. 2000; 870: 363-369

Diemel R V, Bader D, Walch M, Hotter B, van Golde L G, Amann A, Haagsman H P, Putz G.

Functional tests for the characterization of surfactant protein B (SP-B) and a fluorescent SP-B analog.

Arch. Biochem. Biophys. 2001; 385: 338-347.

Essl R K.

Lungensurfactant bei cystischer Fibrose.

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin 2004

Gibson R, Burns J, Ramsey B W.

Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis.

N. Engl. J. Med. 2003; 168: 918-951

Glasser S W, Burhans M S, Korfhagen T R, Na C L, Sly P D, Ross G F, Ikegami M, Whitsett J A.

Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C-deficient mice.

Proc. Natl. Acad. Sci USA 2001; 98: 6366-6371

Griese M.

Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art.

Eur. Respir. J. 1999; 13: 1455-1476

Griese M, Birrer P, Demirsoy A.

Pulmonary surfactant in cystic fibrosis.

Eur. Respir. J. 1997; 10: 1983-1988

Griese M, Essl R, Schmidt R, Rietschel E, Ratjen F, Ballmann M, Paul K.

Pulmonary Surfactant, Lung Function and Endobronchial Inflammation in Cystic Fibrosis.

Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2004; 170: 1000-1005

Griese M, Gobran L I, Rooney S A.

Signal-transduction mechanisms of ATP-stimulated phosphatidylcholine secretion in rat type II pneumocytes: interactions between ATP and other surfactant secretagogues.

Biochim. Biophys. Acta 1993; 1167: 85-93

Griese M, Neumann M, von Bredow T, Schmidt R, Ratjen F.

Surfactant in children with malignancies, immunosuppression, fever and pulmonary infiltrates.

Eur. Respir. J. 2002; 20: 1284-1291

Gunther 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

Gustafsson M, Curstedt T, Jörnvall H, Johansson J.

Reverse-phase HPLC of the hydrophobic pulmonary surfactant proteins: detection of a surfactant protein C isoform containing N⁶-palmitoyl-lysine.

Biochem. J. 1997; 326: 799-806

Gustafsson M, Thyberg J, Näslund J, Eliasson E, Johansson J.

Almyloid fibril formation by pulmonary surfactant protein C.

FEBS Lett. 1999; 464: 138-142

Gutkowski P, Rudnik J, Jaskiewicz J, Pawelek J, Lejman W, Hanicka M.

Surface activity and chemical composition of bronchial washings in children.

Bronchol. Pneumol. 1979; 29: 478-482

Haagsman H P, Diemel R V.

Surfactant-associated proteins: functions and structural variation.

Comparative Biochemistry and Physiology Part A 2001; 129: 91-108

Haagsman H P, van Golde L G.

Synthesis and assembly of lung surfactant.

Annu. Rev. Physiol. 1991; 53: 441-464

Hawgood S.

Surfactant Protein B: Structure and Function.

Biol. Neonate 2004; 85: 285-289

Hull J, South M, Phelan P, Grimwood K.

Surfactant composition in infants and young children with cystic fibrosis.

Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1997; 156: 161-165

Johansson J.

Structure and properties of surfactant protein C.

Biochim. Biophys. Acta 1998; 1408: 161-172

LeVine A M, Lotze A, Stanley S, Stroud C, O'Donnell R, Whitsett J A, Pollack M M.

Surfactant content in children with inflammatory lung disease.

Crit. Care Med. 1996; 24: 1062-1067

Meyer K C, Sharma A, Brown R, Weatherly M, Moya F R, Lewandoski J R, Zimmerman J.

Function and composition of pulmonary surfactant and surfactant-derived fatty acid profiles are altered in young children with cystic fibrosis.

Chest 2000; 118: 164-174

Miles P R, Bowman L, Rao K M K, Baatz J E, Huffman L.

Pulmonary surfactant inhibits LPS-induced nitric oxide production by alveolar macrophages.

Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 1999; 20: L186-L196

Noah T L, Murphy P C, Alink J J, Leigh M W, Hull W M, Stahlman M T, Whitsett J A.
Bronchoalveolar Lavage Fluid Surfactant Protein-A and Surfactant Protein-D Are inversely
Related to Inflammation in Early Cystic Fibrosis.

Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2003; 168: 685-691

Nogee L M.

Abnormal Expression of Surfactant Protein C and Lung Disease.

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2002; 26: 641-644

Nogee L M, de Mello D E, Dehner L P, Colten H.

Deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis.

N. Engl. J. Med. 1993; 328: 406-410

Nogee L M, Dunbar A E III, Wert S E, Askin F, Hamvas A, Whitsett J A.

A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease.

N. Engl. J. Med. 2001; 344: 573-579

Negee, L M, Wert S E, Proffit S A, Hull W M, Whitsett J A.

Allelic heterogeneity in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency.

Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000; 161: 973-981

Oosterlaken-Dijksterhuis, M A, Haagsman H P, van Golde L G, Demel R A.

Characterization of lipid insertion into monomolecular layers mediated by lung surfactant
proteins SP-B and SP-C.

Biochemistry 1991; 30: 10965-10971

Paul K, Rietschel E, Ballmann M, Griese M, Worlitzsch D, Shute J, Chen C, Schink T,
Doring G, van Koningsbruggen S, Wahn U, Ratjen F.

Effect of treatment with dornase alpha on airway inflammation in patients with cystic fibrosis.

Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2004; 169: 719-725

Perez-Gil J.

Molecular Interactions in Pulmonary Surfactant Films.

Biol. Neonate 2002; 81: 6-15

Pohunek P, Pokoma H, Striz I.

Comparison of cell profiles in separately evaluated fractions of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid in children.

Thorax 1996; 51: 615-618

Possmayer F.

A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins.

Am. Rev. Respir. Dis. 1988; 138: 990-998

Postle A D, Mander A, Reid K B M, Wang J-Y, Wright S M, Moustaki M, Warner J O.

Deficient Hydrophilic Lung Surfactant Proteins A and D with Normal Surfactant Phospholipid Molecular Species in Cystic Fibrosis.

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1999; 20: 90-98

Qanbar R, Cheng S, Possmayer F, Schurch S.

Role of the palmitoylation of surfactant-associated protein C in surfactant film formation and stability.

Am. J. Physiol. 1996; 271: L572-L580

Ratjen F, Döring G.

Cystic fibrosis.

The Lancet 2003; 361: 681-689

Reinhardt D.

Mukoviszidose.

Koletzko – Kinderheilkunde 2003; 12. Auflage: 420-426

Riedler J, Grigg J, Stone C, Tauro G, Robertson C.

Bronchoalveolar lavage cellularity in healthy children.

Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1995; 152: 163-168

Robertson B, van Golde L G, Batenburg J J.

Pulmonary surfactant: from molecular biology to clinical practice.

Amsterdam, Elsevier 1992

Rudnik J, Hanicka M, Pawelek J, Zebrak J, Majewska-Zalewska H, Sowinska E.

Pulmonary surfactant contents in bronchial secretion in children with chronic respiratory diseases estimated by physico-chemical methods.

Z. Erkrank. Atemw. 1983; 160: 44-47

Schumacher S.

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

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin 2005

Ten Brinke A, Lambert M G, van Golde L G, Batenburg J J.

Palmitoylation and processing of the lipopeptide surfactant protein C.

Biochim. Biophys. Acta 2002, 1583: 253-265

Thomas A Q, Lane K, Phillips J III, Prince M, Markin C, Speer M, Schwartz D A, Gaddipati R, Marney A, Johnson J, Roberts R, Haines J, Stahlman M, Loyd J E.

Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific pneumonitis in one kindred.

Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2002; 165: 1322-1328

Tokieda K, Ikegami M, Wert S E, Baatz J E, Zou Y, Whitsett J A.

Surfactant protein B corrects oxygen-induced pulmonary dysfunction in heterozygous surfactant protein B-deficient mice.

Pediatr. Res. 1999; 46: 708-714

Vamvakopoulos N C, Modi W S, Floros J.

Mapping the human pulmonary surfactant-associated protein B gene (SFTP3) to chromosome 2p12 → p11.2.

Cytogenet. Cell Genet. 1995; 68: 8-10

Van Golde L G, Batenburg J J, Robertson B.

The pulmonary surfactant system: biochemical aspects and functional significance.

Physiol. Reviews 1988; 68: 374-455

Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman J J.

The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions.

J. Cystic Fibrosis 2002; 1: 13-29

Vorbroker D K, Profitt S A, Noguee L M, Whitsett J A.

Aberrant processing of surfactant protein C in hereditary SP-B deficiency.

Am. J. Physiol. 1995; 268: L647-656

Weaver T E, Conkright J J.

Functions of Surfactant Proteins B and C.

Annu. Rev. Physiol. 2001; 63: 555-578

Whitsett J A, Weaver T E.

Hydrophobic Surfactant Proteins in Lung Function and Disease.

N. Engl. J. Med. 2002; 347: 2141-2148

6.4 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Matthias Griese für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung und Unterstützung während der gesamten Arbeit bedanken, außerdem bei meinem Betreuer Herrn Dr. med. Philipp Latzin für sein ständiges Engagement und die vielen Ratschläge, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank unserer Laborleitung Frau Andrea Schams und ihren Mitarbeiterinnen Frau Stefanie Gruschka und Frau Yvonne Wüst für die kompetente und geduldige Hilfestellung bei allen labortechnischen Experimenten und Auswertungen und nicht zuletzt für die vielen netten Stunden im Labor.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. med. Dominik Hartl, Herrn Dr. rer. nat. Markus Woischnik sowie bei meinen Mitdoktoranden Eva Bilecki, Eva Brack, Valerie Kirchberger, Farhad Schabaz, Vitaliy Starosta, Maria Wassilewa, Katinka Weckerle und Tobias Winter, die mir bei den unterschiedlichsten Problemen immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ganz besonders bedanke ich mich noch bei meinen Eltern für ihre ständige mentale Unterstützung und ihren liebevollen Beistand.

6.5 Lebenslauf

Name: **Tafel**
Vorname: **Tim Oliver**
Nationalität: deutsch
Geburtsdatum: 06.11.1979
Geburtsort: München
Familienstand: ledig

Schulausbildung:

Sept. 1986 – Juli 1998 Europäische Schule München (ESM)
1986 – 1991 Grundschule der ESM
1991 – 1998 Gymnasium der ESM
Juli 1998 Europäische Reifeprüfung (Abitur)

Wehrersatzdienst:

Sept. 1998 – Sept. 1999 Zivildienst an der Blindeninstitutsstiftung München

Studium:

WS 1999/2000 – SS 2001 Studium der Humanmedizin (Vorklinik),
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
WS 2001 – WS 2005/06 Studium der Humanmedizin (Klinik),
Ludwig-Maximilians-Universität, München
Aug. 2001 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
Aug. 2002 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
März 2005 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
April 2006 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Mai 2006 Approbation als Arzt

Klinische Tätigkeiten:**Famulaturen:**

Febr. 2002 – März 2002	Innere Medizin, Städt. Krankenhaus München-Neuperlach
Febr. 2003 – März 2003	Anästhesie, Kreiskrankenhaus München-Pasing
Sept. 2003 – Okt. 2003	Allgemein-, Arbeits-, und Notfallmedizin, MediCare Flughafen München
März 2004	Pädiatrie, Städt. Krankenhaus München-Harlaching
Aug. 2004 – Sept. 2004	Pädiatrie, Vaiola Hospital, Nuku'alofa, Tonga

Praktisches Jahr:

April 2005 – Juni 2005	Anästhesie, General Hospital, St. John's, Neufundland, Kanada
Juni 2005 – Aug. 2005	Anästhesie, Zentralklinikum Augsburg
Aug. 2005 – Nov. 2005	Innere Medizin, Klinikum Traunstein
Nov. 2005 – März 2005	Chirurgie, Kreisklinik Wolfratshausen

Berufliche Tätigkeit:

seit Nov. 2006	Assistenzarzt, Abteilung für Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Erding
----------------	---

Engagements:

März 1997	Finalist beim European Junior Science and Humanities Symposium, Brüssel, Belgien
Mai 1997	Teilnahme am National Junior Science and Humanities Symposium, Durham, North Carolina, USA
2002 – 2006	Betreuer bei Kinderfreizeiten Amicale, Europäisches Patentamt München