

Aus dem Otto-Heubner-Centrum für Kinder- und Jugendmedizin der  
Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Analyse der Surfactantprotein A-Gene bei  
Patienten mit Verdacht auf einen  
Surfactantproteindefekt**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Dietmar Scholz  
aus: Münster in Westfalen

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter:       1. PD Dr. med. Paul A. Stevens (Berlin)  
                      2. Prof. Dr. Peter von Wichert (Marburg)  
                      3. Prof. Dr. med. Ludwig Gortner (Giessen)

Einreichung:       August 2000

Datum der Promotion: 18. Juni 2001

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
<b>1.1</b>	<b>AUFBAU UND FUNKTION DES SURFAKTANTPROTEIN A (SP-A)</b>	<b>6</b>
1.1.1	SP-A-Genort ( <i>sftp1</i> )	7
1.1.2	Die molekulare Struktur des SP-A	8
1.1.3	Funktion der einzelnen SP-A-Domänen	11
1.1.4	SP-A als unspezifisches Opsonin	12
1.1.5	SP-A in der bronchoalveolären Lavage (BAL)	14
<b>1.2</b>	<b>STUDIEN ZUR GENOTYPISCHEN VARIABILITÄT DES SP-A</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>AUFGABENSTELLUNG</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>PATIENTEN-DNA</b>	<b>19</b>
3.1.1	Indikation zur Untersuchung der Surfactantproteine	19
3.1.2	Differentialdiagnostische Erwägungen	21
<b>3.2</b>	<b>GERÄTE UND CHEMIKALIEN</b>	<b>22</b>
<b>3.3</b>	<b>GELELEKTROPHORESE</b>	<b>23</b>
3.3.1	Agarosegelelektrophorese	24
3.3.2	Polyacrylamidgelelektrophorese	24
3.3.3	SSCP-Gelelektrophorese	25
3.3.4	Farbnachweis der DNA im Gel	25
<b>3.4</b>	<b>DNA-ISOLATION</b>	<b>26</b>
3.4.1	Genomische DNA aus Leukozyten	26
3.4.2	Plasmid-DNA	27
3.4.3	Amplifizierte DNA-Sequenzen	27
<b>3.5</b>	<b>POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)</b>	<b>28</b>
3.5.1	nested PCR	29
3.5.2	Berechnung geeigneter Primersequenzen	31
3.5.3	Optimierung der Reaktionsbedingungen	32
<b>3.6</b>	<b>DNA-SEQUENZIERUNG</b>	<b>33</b>
3.6.1	cycle sequencing reactions	33
3.6.2	direct blotting	34
3.6.3	Farbreaktion	35
<b>3.7</b>	<b>DNA-RESTRIKTION</b>	<b>36</b>
<b>3.8</b>	<b>DNA-KLONIERUNG</b>	<b>37</b>

---

3.8.1	Insertion amplifizierter DNA in einen Vektor	37
3.8.2	Transformation mit Plasmid-DNA	38
3.8.3	Anzucht und Selektion	38
<b>3.9</b>	<b>STATISTISCHE AUSWERTUNG DER DNA-SEQUENZEN</b>	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>41</b>
<hr/>		
<b>4.1</b>	<b>ISOLATION UND AMPLIFIKATION DER SP-A-GENSEQUENZEN</b>	<b>41</b>
4.1.1	Interne Primer und Reaktionsbedingungen	41
4.1.2	Externe Primer und Reaktionsbedingungen	42
<b>4.2</b>	<b>ANALYSE DER SP-A-GENSEQUENZEN</b>	<b>46</b>
4.2.1	Die neuen Polymorphismen 1162C>T und 3138T>C	46
4.2.2	SP-A1- und SP-A2-Genotypen von 14 Patienten	49
4.2.3	Häufigkeiten einzelner Polymorphismen	53
<b>4.3</b>	<b>PCR-SSCP-ANALYSE</b>	<b>54</b>
4.3.1	Elektrophoresebedingungen zum SSCP-Nachweis	55
4.3.2	Klonierung von Mustersequenzen	57
4.3.3	SSCP-Gelelektrophoresen mit Patienten-DNA	61
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>62</b>
<hr/>		
<b>5.1</b>	<b>VERFAHREN ZUR ANALYSE DER SP-A-GENE</b>	<b>62</b>
5.1.1	Techniken	62
5.1.2	Sensitivität und Spezifität	64
5.1.3	Zufällige und systematische Fehler	65
5.1.4	Aussagekraft einzelner Beobachtungen	67
<b>5.2</b>	<b>ALLELISCHE VARIANTEN DES SP-A</b>	<b>68</b>
5.2.1	Die Existenz weiterer Polymorphismen in den SP-A-Genen	69
5.2.2	Charakterisierung bisher unbekannter Allele	70
5.2.3	Vergleich der beobachteten Allelfrequenzen mit Literaturdaten	70
<b>5.3</b>	<b>NUTZEN DER ANALYSE DER SP-A-GENE</b>	<b>73</b>
5.3.1	Der Effekt allelischer Varianten auf die Funktion des SP-A	74
5.3.2	SP-A-Genotypen als Risikofaktor für frühkindliche Pneumonien	77
5.3.3	Der Heterozygotenvorteil	80
5.3.4	Informationsgehalt der SP-A1-SP-A2-Haplotypen	81
<b>5.4</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>83</b>
5.4.1	Anwendung der beschriebenen Methodik	83
5.4.2	Design einer Assoziationsstudie	84
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>86</b>
<hr/>		

## Vorbemerkung

Die vorliegende Dissertation entstand innerhalb des Projektbereichs V: “Molekulare und zelluläre Biologie des Surfactants”, der im thematischen Schwerpunkt “Perinatale Lunge” des Forschungsverbunds FOSPED an der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin angesiedelt ist und wurde durch ein Stipendium zur studentischen Forschungsförderung unterstützt. Erste Ergebnisse waren bereits Gegenstand folgender Posterpräsentationen:

1. Dietmar Scholz, A. Cornelis Looman, Paul A. Stevens: **(1997)**  
Analyse der Gene für das Surfactant-Protein A bei angeborener Insuffizienz der pulmonalen Abwehr. (38. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie vom 5. - 8. März in Freiburg)  
Pneumologie 51 (Sonderheft 1): Seite 186 (Poster 117)
2. Dietmar Scholz, Sabine Hofsommer, A. Cornelis Looman, Paul A. Stevens: **(1997)**  
A new assay for detecting variations in the Surfactant Protein A genes and its application in infants with pulmonary infections. (8<sup>th</sup> European Students' Conference of the Charité vom 16. - 18. Oktober in Berlin)

## 1 Einleitung

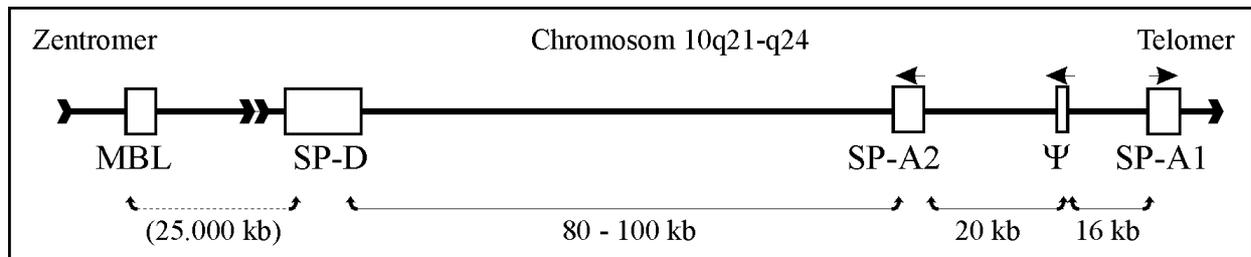
Pneumozyten vom Typ II sezernieren einen oberflächenwirksamen Stoff (*surface active agent*), der Surfactant genannt wird. Surfactant bildet einen Lipidfilm, der die alveoläre Oberflächenspannung während der Expiration verringert und so die gleichmäßige Entfaltung aller Alveolen bei der Inspiration ermöglicht. Spezifische **surfactantassoziierte Proteine** machen etwa 10 % des bei bronchoalveolärer Lavage (BAL) gewonnenen Surfactant aus. Die vier Surfactantproteine wurden in chronologischer Reihenfolge als SP-A, SP-B, SP-C und SP-D bezeichnet. Die lipophilen Proteine SP-B und SP-C steuern den Einbau von Phospholipiden in die Grenzschicht zwischen Luft- und Subphase und deren Anordnung im oberflächenaktiven Monolayer. Die hydrophilen Proteine SP-A und SP-D sollen bei der Abwehr von Pathogenen mitwirken. SP-A werden wichtige Funktionen bei der Regulation des Surfactanthaushalts zugesprochen, da es die Sekretion von Surfactantbestandteilen hemmt und deren Wiederaufnahme vermittelt. Gemeinsam mit SP-B ermöglicht es die Ausbildung des tubulären Myelins, das die intraalveoläre Speicherform von Surfactant in der Subphase darstellt. Mit etwa 50% ist SP-A das mengenmäßig wichtigste Surfactantprotein (McCormack 1998). Die meisten Erkenntnisse über **Aufbau und Funktion des Surfactantprotein A (SP-A)** wurden aus *in vitro*-Experimenten und histologischen Untersuchungen abgeleitet. Die veröffentlichten **Studien zur genotypischen Variabilität des SP-A** versuchten diese Ergebnisse durch eine Assoziation zwischen bestimmten allelischen Varianten der SP-A-Gene und Krankheitsbildern, denen eine Störung der Surfactantproteine zugrunde liegen soll, klinisch zu untermauern und weisen auf Synergien bei der Interaktion der Surfactantproteine hin.

### 1.1 Aufbau und Funktion des Surfactantprotein A (SP-A)

Das Vorliegen von zwei Kopien der SP-A-Gene beim Menschen und die Variabilität der DNA-Sequenzen am **SP-A-Genort** erschwert die exakte Analyse des SP-A-Genotyps. **Die molekulare Struktur des SP-A** ähnelt der des mannosebindenden Lektins (MBL) im Serum, wie aus der Primärsequenz abgeleitet und in elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigt werden konnte. Erkenntnisse über die **Funktion der einzelnen SP-A-Domänen** bei der Synthese und Sekretion des Proteins oder beim Zusammenwirken mit Rezeptoren, Surfactantbestandteilen und Krankheitserregern wurden an *in vitro* exprimierten, mutierten SP-A-Sequenzen gewonnen. Die Rolle, die **SP-A als unspezifisches Opsonin** bei der Abwehr von Pathogenen in der Lunge ausübt, kann ebenso wie die Beteiligung an der Surfactantregulation von der Konzentration an

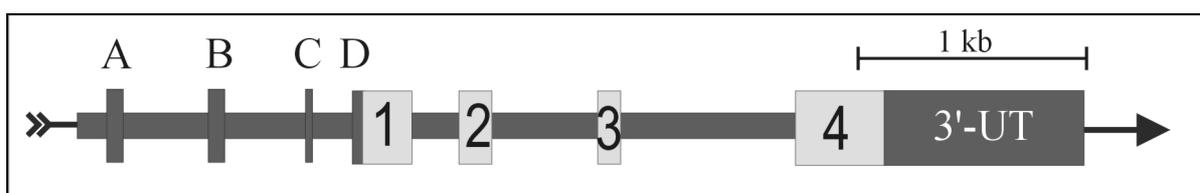
intaktem **SP-A in der bronchoalveolären Lavage (BAL)** abhängen.

### 1.1.1 SP-A-Genort (*sftp1*)



**Abbildung 1-1:** Orientierung der SP-A-Gene am Kollektingenort (nach Floros und Hoover 1998)  
Der Pfeil (←) kennzeichnet die Richtung der Transkription

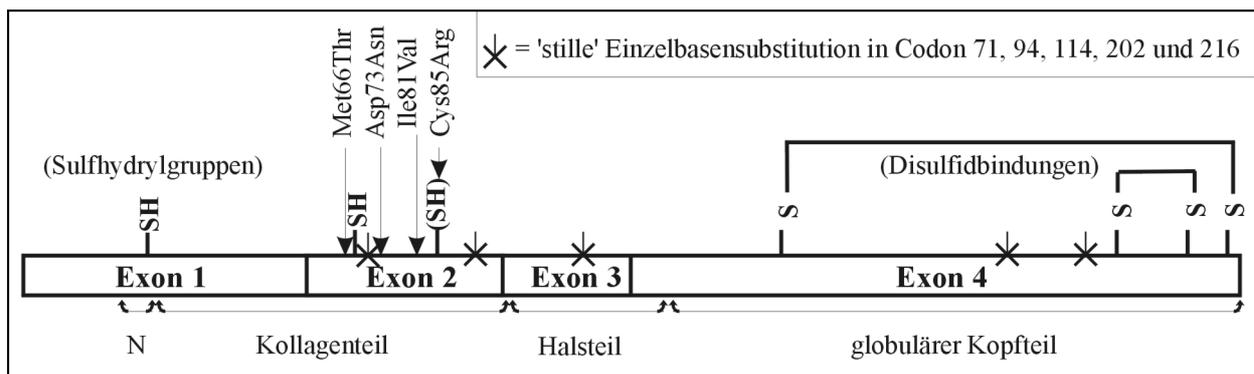
Beim Menschen sind **zwei aktive Kopien des SP-A-Gens** und ein Pseudogen (SP-AΨ) im Abstand von 35 - 40 kb identifiziert worden. Gemeinsam mit dem Gen für das zweite hydrophile Surfactantprotein SP-D (*sftp4*) bilden sie den Kollektingenort 10q22-q23 auf dem langen Arm von Chromosom 10, unweit des Genorts 10q21 für das verwandte mannosebindende Lektin MBL (Kölble et al. 1993). Die beiden Kopien des SP-A-Gens sind gegensinnig orientiert und werden unabhängig voneinander exprimiert, das Pseudogen enthält neben Exon 4 des SP-A-Gens eine Reihe hochrepetitiver Sequenzen und wird nicht translatiert.



**Abbildung 1-2:** Struktur einer Kopie des SP-A-Gens (nach McCormack 1998)  
Dargestellt ist die Intron-Exon-Struktur eines SP-A-Gens, die kodierenden Exone sind hell hinterlegt.

Jedes aktive SP-A-Gen erstreckt sich über etwa 4,6 kb. Es enthält vier kodierende Exone 1 - 4 und drei nichttranslatierte Exone A - C, die variabel an das 5'-UT-Ende von Exon 1 gespleißt werden. Exon D (23 bp) ist der nichttranslatierte Bereich von Exon 1 mit einer drei Nukleotide längeren Spleißvariante D', die durch die Einzelbasensubstitution 1018T>A im SP-A2-Gen entsteht, welche einen *PstI*-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) bildet. Die nichttranslatierten Exone A - D sind inkonstante Bestandteile der mRNA (Karinch et al. 1997).

Seit der Entschlüsselung der DNA-Sequenzen von SP-A1 (White et al. 1985) und SP-A2 (Katyal und Singh 1992) wurden zahlreiche Einzelbasensubstitutionen entdeckt, die an zehn Positionen im SP-A-Molekül einen **Aminosäureaustausch** bewirken. Vier davon befinden sich in Exon 2 und zeigen eine invariante, das heißt jeweils für SP-A1 und SP-A2 typische Ausprägung, so dass die Aminosäuresequenzen beider Kopien des SP-A-Gens zu 98 % homolog sind. **Abbildung 1-3** zeigt, dass sich diese invarianten Aminosäuren in einem kleinen Bereich von Exon 2 befinden. Die kodierenden Sequenzen beider SP-A-Gene unterscheiden sich ferner durch fünf "stille" Einzelbasensubstitutionen, die die Aminosäuresequenz nicht verändern. Jedem Exon lässt sich wie beim MBL eine bestimmte Domäne des Proteins zuordnen (Drickamer et al. 1986). Exon 1 (Codon 1 bis 58) und Exon 2 (Codon 58 bis 98) kodieren gemeinsam das aminoternale Ende und die kollagenartige Domäne, Exon 3 (Codon 98 bis 124) die Halsregion und Exon 4 (Codon 124 bis 248) die globuläre Domäne.



**Abbildung 1-3:** Invariant von SP-A1 nach SP-A2 ausgetauschte Aminosäuren (nach Floros et al. 1996)  
N bezeichnet die aminoternale Region des Proteins, beschrieben werden die Domänen in **Abschnitt 1.1.2**.

Die übrigen Einzelbasensubstitutionen, die in sechs Fällen zum Aminosäureaustausch führen, machen die allelische Variabilität der SP-A-Gene aus. Sie betreffen außer der Halsregion alle Domänen einschließlich der Signalsequenz und werden in **Abschnitt 1.2** dargestellt.

### 1.1.2 Die molekulare Struktur des SP-A

Die Genprodukte beider Kopien des SP-A-Gens sind Peptide von 248 Aminosäuren. Durch Abspaltung der Signalsequenz vom Propeptid werden **Monomere** von 228 Aminosäuren gebildet. Bereits an der Primärstruktur lassen sich vier Domänen unterscheiden, die sich etwa wie in **Abbildung 1-4** organisieren und freie Sulfhydryl- und Hydroxylgruppen zur Ausbildung intermolekularer Bindungen aufweisen:

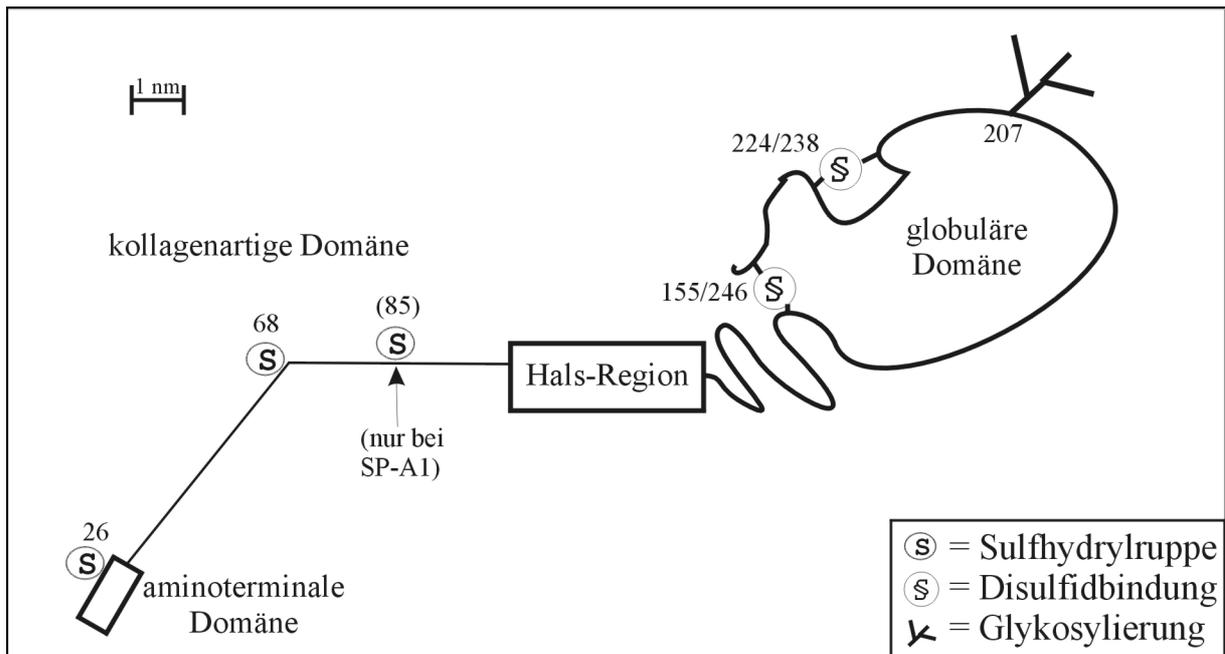
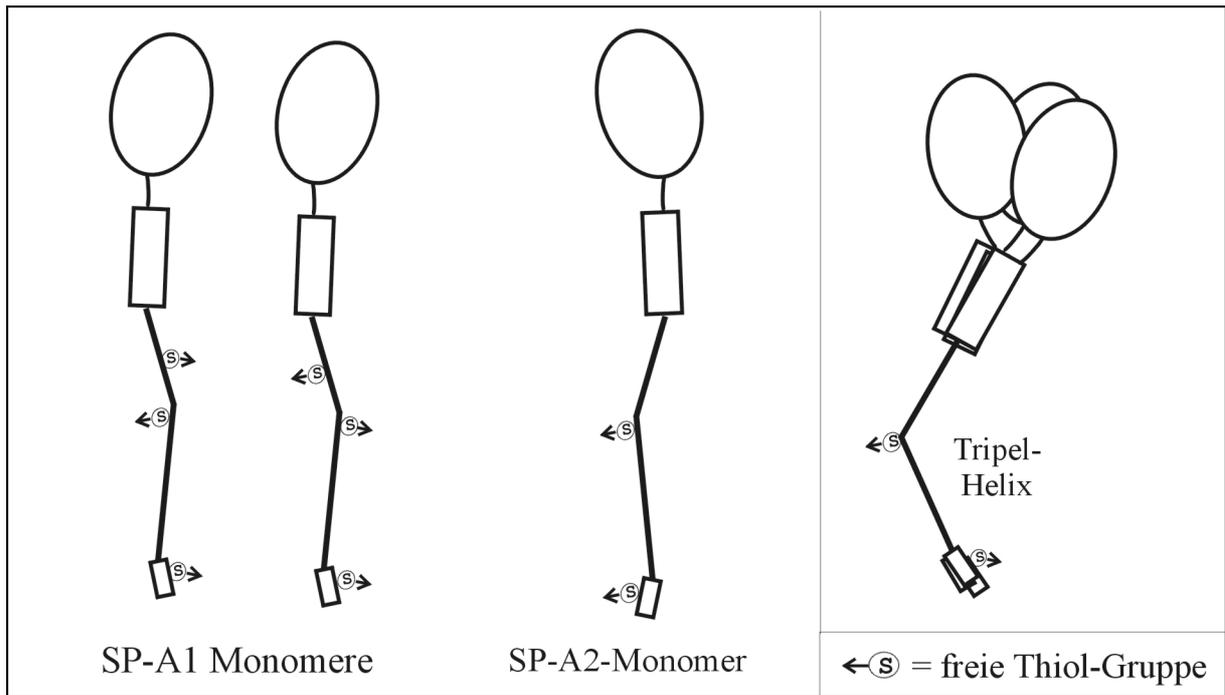


Abbildung 1-4: Die Domänen des SP-A-Monomers (nach McCormack 1998)

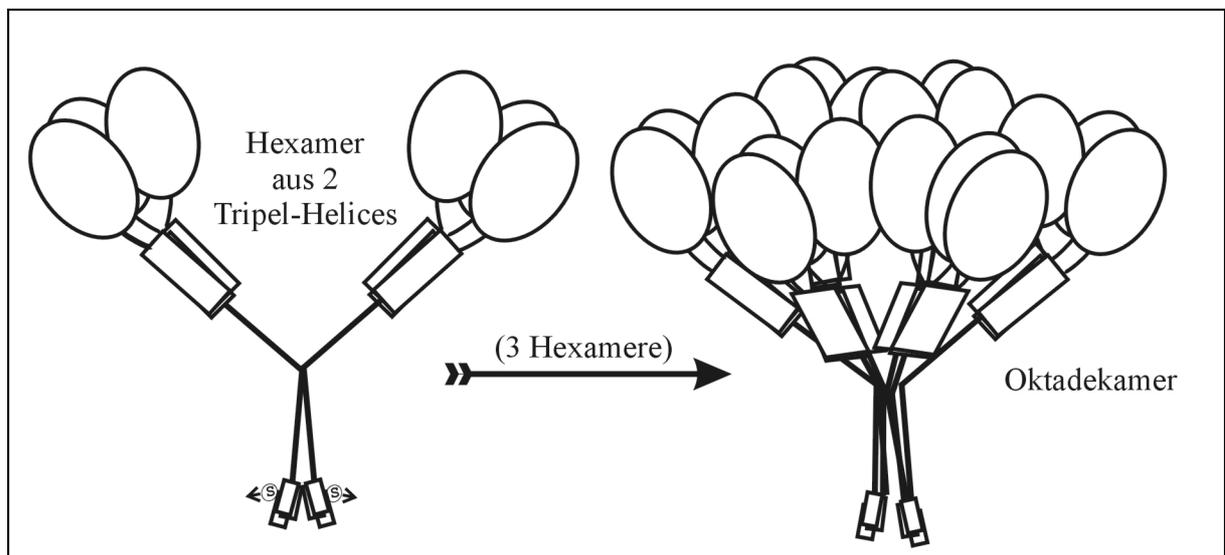
- ◆ Das kurze aminoterminalen Ende (21Glu\_27Val) besitzt ein Cystein an Position 26.
- ◆ Die kollagenartige Domäne (28Gly\_100Pro) ist durch zahlreiche hydroxylierte Proline gekennzeichnet. Beim humanen SP-A gibt es ein zusätzliches Cystein an Position 68 und im SP-A1-Gen ein weiteres an Position 85.
- ◆ Die Halsregion (101Ala\_133Thr) ist je zur Hälfte amphipatisch beziehungsweise hydrophob und bildet wahrscheinlich  $\alpha$ -helikale Strukturen aus.
- ◆ Die globuläre Domäne (134Val\_248Phe) wird durch intramolekulare Disulfidbrücken zwischen den Sulfhydrylgruppen des Cystein an Position 155 und 246 sowie 224 und 238 stabilisiert. Das Asparagin an Position 207 wird glykosyliert.

Im **Trimer** aus zwei SP-A1- und einer SP-A2-Untereinheit bilden die kollagenartigen Domänen eine Tripelhelix, die durch Wasserstoffbrücken- und Disulfidbindungen stabilisiert wird. Der Ersatz des vierzehnten von insgesamt 24 kollagenspezifischen Triplets (Abfolge der drei Aminosäuren Gly-X-Y, wobei Y häufig Prolin ist) durch die Sequenz 67Pro-Cys-Pro-Pro70 unterbricht die Tripelhelix. Dieser Knick befindet sich etwa in der Mitte des rund 20 nm langen und 1,5 nm dicken Stiels, auf dem die globuläre Domäne von ungefähr 5 nm Durchmesser ruht.



**Abbildung 1-5:** Aggregation der SP-A-Monomere zu Tripelhelices (nach Voss et al. 1991)

Nach Ausbildung der Disulfidbrücken zwischen den Monomeren der in **Abbildung 1-5** gezeigten Tripelhelix bleibt im aminoterminalen Ende und an der Knickstelle der kollagenartigen Domäne je ein Cystein frei (26Cys und 68Cys).



**Abbildung 1-6:** Aggregation der SP-A-Tripelhelices zum Oktadekamer (nach Voss et al. 1991)

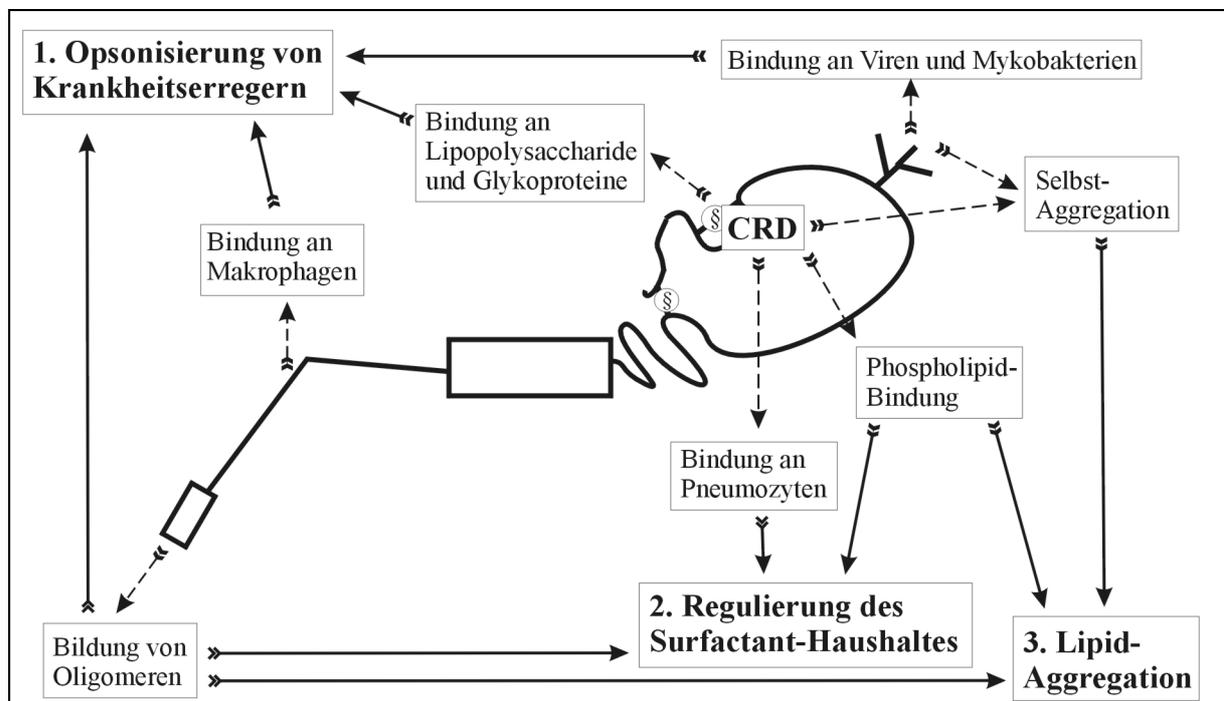
Sie stabilisieren die in **Abbildung 1-6** gezeigten **Oktadekamere** aus sechs Tripelhelices, welche sich wie beim MBL und der ähnlich aufgebauten Untereinheit C1q des ersten Komplementfaktors zu einem Komplex von der Form eines Blumenstraußes aneinanderlagern.

### 1.1.3 Funktion der einzelnen SP-A-Domänen

Intermolekulare Disulfidbindungen im **aminoterminalen Ende** ermöglichen die Aggregation der Trimere zu höheren Oligomeren. In dieser Form ist SP-A an der Surfactantregulation und Phospholipidaggregation beteiligt (McCormack et al. 1999).

Die **kollagenartige Domäne** wird wie der Komplementfaktor C1q vom Kollektinrezeptor (cC1qR) erkannt (Malhotra et al. 1992). SP-A konkurriert mit C1q und dem mannosebindenden Lektin MBL um die Bindung an cC1qR und einem weiteren, kürzlich entdeckten Rezeptor (C1qR<sub>P</sub>) auf Monozyten und Makrophagen (Nepomuceno et al. 1997).

Die **Halsregion** vermittelt die trimere Assoziation der globulären Domänen und nimmt Einfluss auf die Bindung an Phospholipide und das bakterielle Lipid A. SP-A tritt vor allem mit den im Surfactant dominierenden gesättigten Fettsäuren in Wechselwirkung. Mit Kalziumionen bilden sich Lipidaggregate wie das tubuläre Myelin, das die Ausbildung des oberflächenaktiven Films beschleunigt (McCormack 1998).



**Abbildung 1-7: Funktionen des SP-A-Moleküls**

CRD = Kohlehydraterkennungsregion (*carbohydrate recognition domain*); zu den Domänen vgl. **Abbildung 1-4**.

In der **globulären Domäne** ist die Kohlehydraterkennungsregion (*carbohydrate recognition domain*, CRD) lokalisiert, die dem Molekül Lektinaktivität verleiht. Die CRD ist ebenfalls

Ligand für Phospholipide (Palaniyar et al. 1998) und die kalziumabhängige Bindung und Endozytose von SP-A durch Typ-II-Pneumozyten (McCormack 1998). Auf Typ-II-Pneumozyten wurden die Proteine bp55 (Stevens et al. 1995) und SPAR (Korutla und Strayer 1999) identifiziert, die SP-A binden und für die Endozytose von Surfactantbestandteilen sowie die Regulation der Surfactantsekretion verantwortlich sind. Möglicherweise sind sie Teile eines Rezeptorkomplexes (Kresch et al. 1998). Der außer auf Pneumozyten auch auf Makrophagen lokalisierte Rezeptor SPR 210 (Chronos und Shepherd 1996) stimuliert die Phagozytose. Die Affinität für Lipopolysaccharide und Glykoproteine macht SP-A auch zum Liganden am Lipopolysaccharidrezeptor CD14 auf Alveolarmakrophagen (Sano et al. 1999) und am Glykoprotein gp-340, einem Mitglied der *scavenger*-Rezeptorfamilie (Tino und Wright 1999).

Die **Glykosylierung** ermöglicht die Selbstaggregation mehrerer SP-A-Moleküle und ist so Voraussetzung zur Ausbildung tubulären Myelins. Sie vermittelt die Bindung an Mykobakterien (Pasula et al. 1999) und mit Neuraminsäure an virale Proteine (Benne et al. 1995). **Abbildung 1-7** gibt einen Überblick über das Ineinandergreifen der wichtigsten Funktionen.

#### 1.1.4 SP-A als unspezifisches Opsonin

Die **Lektinaktivität** des SP-A richtet sich nicht nur auf D-Mannose und Fukose (exponierte Zuckermoleküle der Oberflächenglykoproteine von Bakterien), Lipid A (einen hoch konservierten Bestandteil der Lipopolysaccharidhülle gramnegativer Bakterien) und Glykolipide wie Galaktosylceramid, sondern auch auf Neuraminsäure und das Glykosphingolipid Asialo-G<sub>M2</sub>, die die Adhäsion von Bakterien und Viren an Körperzellen vermitteln. In Inkubationsversuchen mit markiertem SP-A und Abwehrzellen konnte *in vitro* die Opsonisierung und gesteigerte Phagozytose der am häufigsten in der Lunge vorkommenden Pathogene gezeigt werden (Haagsman 1998). Im Tierversuch mit SP-A(-/-)*knock-out*-Mäusen, deren SP-A-Gene in der Keimbahn inaktiviert worden waren, konnte die verbesserte Elimination bestimmter Krankheitserreger nach Zufuhr von exogenem SP-A schließlich *in vivo* nachgewiesen werden (Korfhagen et al. 1998).

SP-A steigert die phagozytische Aktivität auf ähnliche Weise wie IgG (Schagat et al. 1999). Es stimuliert bei Makrophagen die Sekretion wichtiger Zytokine wie der Interleukine IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8, des Tumornekrosefaktors TNF- $\alpha$  (Kremlev et al. 1997) und eines nicht näher charakterisierten Wachstumsfaktors (*colony stimulating factor*) CSF (Kalina et al. 1995). Die Abwehrzellen exprimieren daraufhin vermehrt Rezeptoren (Kabha et al. 1997) und bauen

bakterielle Lipopolysaccharide durch erhöhte Freisetzung reaktiver Sauerstoffverbindungen (Blau et al. 1997) schneller ab (Stamme und Wright 1999). Bei der Bindung an Allergene von Pollen und Hausstaubmilben wirkt SP-A durch sterische oder kompetitive Hemmung der IgE-vermittelten Histaminfreisetzung immunmodulatorisch (Wang et al. 1996). Einige Erreger scheinen die Bindung an SP-A jedoch als Vehikel zur Infektion pulmonaler Zellen zu benutzen.

**Tabelle 1-1:** Effekte von SP-A auf die Abwehr diverser Krankheitserreger in der Lunge (nach Haagsman 1998)

Unterstrichen sind die Erreger, deren Abwehr durch SP-A verbessert wird.

**Hervorgehoben** sind die Erreger, deren Abwehr möglicherweise durch SP-A gestört wird

	Krankheitserreger	Bindung	Phagozytoserate	Effekt
<b>grampositive Bakterien:</b>	<u><i>Staphylococcus aureus</i></u>	ja	<u>erhöht</u>	<u>Elimination</u>
	<u><i>Streptococcus pneumoniae</i></u>	ja	<u>erhöht</u>	<u>Elimination</u>
	<u>A-Streptokokken</u>	ja	<u>erhöht</u>	<u>Elimination</u>
	<u>B-Streptokokken</u>	ja	<u>erhöht</u>	<u>Elimination</u>
<b>gramnegative Bakterien:</b>	<u><i>Mycoplasma pulmonis</i></u>	ja	<u>erhöht</u>	<u>Elimination</u>
	<u><i>Escherichia coli</i> (J5)</u>	ja	<u>erhöht</u>	<u>Elimination</u>
	<u><i>Klebsiella pneumoniae</i> (K21a)</u>	ja	<u>erhöht</u>	<u>Elimination</u>
	<u><i>Pseudomonas aeruginosa</i></u>	ja	<u>erhöht</u>	<u>Elimination</u>
	<u><i>Haemophilus influenzae</i> a</u>	ja	<u>erhöht</u>	<u>Elimination</u>
	<u><i>Haemophilus influenzae</i> b</u>	nein	unverändert	keiner
<b>Viren:</b>	<u>Adenovirus</u>	ja	<u>erhöht</u>	<u>Neutralisation</u>
	<u>Respiratory-Synzytial-Virus</u>	ja	<u>erhöht</u>	<u>Neutralisation</u>
	<u>Herpes-simplex-Virus 1</u>	ja	<u>erhöht</u>	<u>Neutralisation</u>
	<u>Influenzavirus A (H3N2)</u>	ja	<u>erhöht</u>	<u>Neutralisation</u>
	Influenzavirus B	nein	unverändert	keiner
	Mumpsvirus	nein	unverändert	keiner
	<b>Zytomegalievirus</b>	<b>ja</b>	<b>erhöht</b>	<b>Infektion (?)</b>
<b>Allergene:</b>	<u>Pollen</u>	ja	<u>erhöht</u>	<u>Immunmodulation</u>
<b>Fungi:</b>	<u><i>Aspergillus fumigatus</i></u>	ja	<u>erhöht</u>	<u>Immunmodulation</u>
	<b><i>Cryptococcus neoformans</i></b>	<b>ja</b>	<b>vermindert</b>	<b>gestörte Abwehr</b>
	<b><i>Candida albicans</i></b>	<b>ja</b>	<b>vermindert</b>	<b>gestörte Abwehr</b>
<b>Atypische Erreger:</b>	<b><i>Pneumocystis carinii</i></b>	<b>ja</b>	<b>erhöht</b>	<b>Infektion (?)</b>
	<b><i>Mycobacterium tuberculosis</i></b>	<b>ja</b>	<b>vermindert</b>	<b>Infektion (?)</b>

SP-A bindet *in vitro* an die grampositiven **Bakterien** *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae* (McNeely und Coonrod 1993) sowie an Streptokokken der Serogruppe A (Tino und Wright 1996). B-Streptokokken (Korfhagen et al. 1998) wurden *in vivo* vermehrt phagozytiert. Aus der Gruppe der gramnegativen Erreger wurden *Escherichia coli* mit Antigen J5, also rauen Lipopolysacchariden (van Iwaarden et al. 1994), Klebsiellen des Serotyps K21a (Kabha et

al. 1997), *Mycoplasma pulmonis* (Hickman-Davis et al. 1998), und *Haemophilus influenzae* des Typs a, nicht aber Typ b (McNeely und Coonrod 1994) opsonisiert, wie **Tabelle 1-1** zeigt. Die Wirkung gegen mukoide Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* konnte *in vivo* demonstriert werden (Mariencheck et al. 1999).

Influenza-A-**Viren** mit dem Antigen H3N2 werden von SP-A neutralisiert (Benne et al. 1995). Vom *Herpes-simplex-Virus 1* infizierte Zellen (van Iwaarden et al. 1991), nicht aber *Influenza-B-* oder *Mumpsviren*, werden opsonisiert (McCormack 1998). Die Phagozytose von Adeno- (Harrod et al. 1999) und *Respiratory-Synzytial-Viren* (Le Vine et al. 1999) wurde *in vivo* durch SP-A begünstigt. **Fungi** wie *Candida albicans* (Rosseau et al. 1999) und *Cryptococcus neoformans* werden opsoniert, ihre Phagozytose ist jedoch gestört (Walenkamp et al. 1999). Die Bindung von SP-A an Konidien von *Aspergillus fumigatus* hingegen steigert die Phagozytose (Madan et al. 1997a) und hemmt allergische Reaktionen (Madan et al. 1997b).

**Intrazelluläre Erreger** wie *Mycobacterium tuberculosis* nutzen die Bindung an SP-A als Vehikel zur Infektion der Makrophagen, da tuberkulozide Stickstoffverbindungen in Anwesenheit von SP-A vermindert freigesetzt werden (Pasula et al. 1999). Die durch SP-A verbesserte Phagozytose von *Pneumocystis carinii* (Koziel et al. 1998) und Zytomegalievirus (Weyer et al. 2000) scheint die Infektion ebenfalls zu beschleunigen.

### 1.1.5 SP-A in der bronchoalveolären Lavage (BAL)

Die SP-A-Konzentration in der bronchoalveolären Lavage (BAL) ist interindividuell sehr variabel (Ratjen et al. 1996) und schwankt während der **Auseinandersetzung mit Pathogenen**. Bei HIV-Infizierten wurden sowohl erhöhte (Martin et al. 1995) als auch erniedrigte SP-A-Konzentrationen beobachtet (Sternberg et al. 1995). Im Verlauf einer *Pneumocystis carinii*-Pneumonie (Phelps et al. 1996) oder allergischen Erkrankungen wie der Farmerlunge (Cormier et al. 1996) steigt die SP-A-Konzentration in der BAL an, ebenso bei Rauchern (Nomori et al. 1998). Bei Bronchiolitis (Dargaville et al. 1996) kommt es ebenso wie bei Sarkoidosis (Gunther et al. 1999) zum Absinken des SP-A-Spiegels, bei Infektion mit dem *Respiratory-Synzytial-Virus* sind alle Surfactantproteine vermindert (Kerr und Paton 1999).

Beim klassischen Surfactantmangelsyndrom, dem **Atemnotsyndrom des Neugeborenen (RDS)**, an dem insbesondere Frühgeborene mit unreifem Surfactantsystem erkranken, ist neben

den Phospholipiden in der BAL auch der Gehalt an SP-A herabgesetzt und korreliert invers mit dem Schweregrad der Erkrankung (Moya et al. 1994). In die schlecht belüfteten Alveolen eindringende Serumproteine komplizieren das Krankheitsbild, das ohne die vorübergehende Substitution mit exogenem Surfactant oftmals nach Ausbildung hyaliner Membranen in der bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) endet.

Eine verringerte SP-A-Konzentration in der BAL erhöht das Risiko, am akuten Atemnotsyndrom (ARDS) zu erkranken (Kuroki et al. 1998). Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose und wenig SP-A haben eine schlechtere Prognose (McCormack et al. 1995). Es gibt inzwischen Hinweise, dass erniedrigte SP-A-Spiegel bei der Pathogenese von Pneumonien, Zystischer Fibrose (Postle et al. 1999) und Birkenpollenallergie (Hickling et al. 1998) eine Rolle spielen.

Die **pulmonale Alveolarproteinose (PAP)** ist durch die Akkumulation der hydrophilen Surfactantproteine SP-A und SP-D in den Lungenbläschen charakterisiert (Kuroki et al. 1998). Anstelle des in der normalen Lunge vorhandenen tubulären Myelins bilden sich abnorme Strukturen. Das akkumulierende Protein reagiert positiv mit dem Periodsäure-Schiff-Reagenz (PAS). Die Alveolarproteinose tritt sekundär bei vielen chronischen Erkrankungen der Lunge auf, oftmals bleibt die Ätiologie jedoch ungeklärt. Bei Neugeborenen mit Alveolarproteinose dominiert das klinische Bild eines Atemnotsyndroms mit Fehlen von Phosphatidylglycerol und verminderter L/S-Ratio (Lecitin/ Sphingomyelin) in der BAL trotz normalem Reifezustand. Ein hereditärer Mangel des lipophilen Surfactantproteins B aufgrund verschiedener Mutationen im SP-B-Gen ist eine häufige Ursache der kongenitalen Alveolarproteinose (CAP) mit letalem Verlauf (*congenital alveolar proteinosis*, Nogee et al. 1994), sie wird aber auch bei hereditärem GM-CSF-Rezeptormangel beobachtet (Dirksen et al. 1997). Beide Erkrankungen werden autosomal rezessiv vererbt. Einige Patienten mit IgA-Mangel (Webster et al. 1980) und lysinurischer Proteinintoleranz (Parto et al. 1993) entwickeln ebenfalls noch während der Kindheit eine Alveolarproteinose.

## 1.2 Studien zur genotypischen Variabilität des SP-A

Die Arbeitsgruppe um Joanna Floros hat in zahlreichen Veröffentlichungen vier allelische Varianten des SP-A1-Gens und fünf allelische Varianten des SP-A2-Gens beschrieben. Nach der Benennung der zuerst aus mRNA des „pulmonalen Surfactant-Apoproteins“ isolierten und in Form von DNA-Kopien (*copyDNA*) klonierten Sequenzen als PSAP-1A und PSAP-6A werden die Allele des SP-A1 als 6a und die des SP-A2 als 1a bezeichnet, wobei angefügte Ziffern die

allelischen Varianten unterscheiden. Bis auf Allel 1a3 wurden sie alle mit einer Allelfrequenz von  $q > 1\%$  in der untersuchten Population von mehr als 250 Individuen beobachtet (Floros et al. 1996). In ethnisch abgegrenzten Subpopulationen waren zum Teil erhebliche Abweichungen in den Frequenzen einzelner Allele beobachtet worden, die zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit in **Abschnitt 5.2.3** diskutiert werden.

Die in **Tabelle 1-2** und **Tabelle 1-3** ebenfalls gezeigten Allele 6a5 und 1a4 wurden von Karinch et al. 1998 homozygot in der Zelllinie H441 eines Adenokarzinoms charakterisiert, wobei offen bleibt, ob sie in der Normalpopulation vorkommen. Allel 6a5 stellt im Grunde ein Hybrid aus der 3'-terminalen Hälfte von Allel 6a und dem 5'-terminalen Ende des Allels 6a4 dar. Allel 1a4 unterscheidet sich vom Allel 1a1 nur durch das Fehlen der sonst invariant vorhandenen Substitution des Cytosin an dritter Position in Codon 202 durch Thyminidin (Karinch et al. 1998). Die Genese dieser Veränderungen ist unklar. Die übrigen Allele werden wegen der in **Abbildung 1-1** dargestellten, engen Kopplung am Genort *sftp1* (10q22-q23) kosegregiert, dass heißt als SP-A1/SP-A2-Haplotypen vererbt (Floros et al. 1996).

**Tabelle 1-2: Polymorphe Codons in den Allelen des SP-A1-Gens** (nach Floros und Hoover 1998)

Angegeben sind die drei DNA-Basen des polymorphen Codons und gegebenenfalls die ausgetauschte Aminosäure. Das *kursiv gesetzte Allel* wurde in der Zelllinie eines Adenokarzinoms beobachtet.

Exon:	1	1	2	4	4
<b>Einzelbasensubstitution:</b>	1101T>C	1193G>C	1544A>G	2985A>G	3241C>T
<b>Aminosäureaustausch:</b>	Val19Ala	Val50Leu	(62Pro)	(133Thr)	Arg219Trp
<b>Allel 6a:</b>	GCG (Ala)	CTC (Leu)	CCG	ACG	CGG (Arg)
<b>Wildtypallel 6a2:</b>	GTG (Val)	GTC (Val)	CCA	ACA	CGG (Arg)
<b>Allel 6a3:</b>	GTG (Val)	CTC (Leu)	CCA	ACA	CGG (Arg)
<b>Allel 6a4:</b>	GTG (Val)	CTC (Leu)	CCG	ACA	TGG (Trp)
<b>neues Allel 6a5:</b>	<i>GCG (Ala)</i>	<i>CTC (Leu)</i>	<i>CCG</i>	<i>ACA</i>	<i>TGG (Trp)</i>

**Tabelle 1-3: Polymorphe Codons in den Allelen des SP-A2-Gens** (nach Floros und Hoover 1998)

\*: Die Substitution des Cytosin für Thyminidin an dritter Position in Codon 202 kennzeichnet sonst das SP-A1-Gen.

Exon:	1	2	4	4	4
<b>Einzelbasensubstitution:</b>	1098A>C	1649G>C	3018C>T	3204T>C*	3265C>A
<b>Aminosäureaustausch:</b>	Asn9Thr	Ala91Pro	(140Ser)	(202Asp)	Gln223Lys
<b>Wildtypallel 1a0:</b>	AAC (Asn)	GCT (Ala)	TCC	GAT	CAG (Gln)
<b>Allel 1a:</b>	ACC (Thr)	CCT (Pro)	TCC	GAT	CAG (Gln)
<b>Allel 1a1:</b>	ACC (Thr)	GCT (Ala)	TCT	GAT	AAG (Lys)
<b>Allel 1a2:</b>	ACC (Thr)	GCT (Ala)	TCC	GAT	CAG (Gln)
<b>Seltenes Allel 1a3:</b>	AAC (Asn)	GCT (Ala)	TCT	GAT	AAG (Lys)
<b>Neues Allel 1a4:</b>	<i>ACC (Thr)</i>	<i>GCT (Ala)</i>	<i>TCT</i>	<i>GAC*</i>	<i>AAG (Lys)</i>

Unbekannt ist, ob sich hinter den zahlreichen Polymorphismen in den SP-A-Genen eine Mutation verbirgt, die ein defektes Genprodukt kodiert. Es gibt Hinweise auf eine Beteiligung des SP-A bei der Pathogenese der in **Abschnitt 1.1.5** erwähnten multifaktoriellen Erkrankungen. Individuen mit einem SP-A-Gendefekt sollten eine erhöhte Disposition für die Entwicklung derartiger Erkrankungen erkennen lassen, falls das mutierte SP-A-Gen ein Empfänglichkeitsgen (*susceptibility gene*) für die Manifestation eines Surfactantproteindefekts darstellt.

Assoziationsstudien sind ein geeignetes Verfahren zum Nachweis des schwachen Effekts eines Empfänglichkeitsgens auf das Auftreten multifaktorieller Erkrankungen, da sie sensitiver sind als Kopplungsanalysen und nicht die Untersuchung betroffener Familienmitglieder erfordern (Floros und Hoover 1998). Der Arbeitsgruppe um J. Floros gelang der Nachweis einer Assoziation des Wildtypallels 1a0 mit dem Auftreten des Atemnotsyndroms (RDS) bei weißen Neugeborenen mit einem Gestationsalter von mehr als 28 SSW (Kala et al. 1998). Dieses Allel scheint als Bestandteil des Haplotyps 6a2/1a0 weniger mRNA als andere zu exprimieren (Karinch et al. 1997). Der Nachteil, den dieser in der Normalpopulation am häufigsten beobachtete Haplotyp für Neugeborene mit unreifem Surfactantsystem mit sich bringt, wird möglicherweise durch einen noch unbekanntem Heterozygotenvorteil (Floros und Hoover 1998) bei der Abwehrfunktion kompensiert, der in **Abschnitt 5.3.3** eingehend diskutiert werden soll.

Für Träger des Allels 1a0 des SP-A-Gens und einer Deletion oder Insertion im Intron 4 des SP-B-Gens war das Risiko deutlich höher. Da eine genetische Kopplung mit SP-B auf Chromosom 2 ausgeschlossen ist, wird der überadditive Effekt als Beweis für die synergistische Wirkung von SP-A und SP-B in der Pathogenese des RDS gewertet. Beide Proteine sind zur Ausbildung tubulären Myelins nötig. Varianten im Intron 4 des SP-B scheinen auch mit einem erhöhten Risiko korreliert, am akuten Atemnotsyndrom (ARDS) zu erkranken (Max et al. 1996). Derartige Synergien sind bei der Analyse von Surfactantproteindefekten zu beachten. Bei der konnatalen Alveolarproteinose mit SP-B-Mangel akkumulieren abnorme Komplexe von SP-A und SP-D sowie aberrante Vorläufer des SP-C (pro-SP-C, Vorbroker et al. 1995). Bei der Abwehr von Infektionen der Lunge könnten sowohl SP-A als auch SP-D eine Rolle spielen.

## 2 Aufgabenstellung

1. Zur isolierten Amplifikation der kodierenden Sequenzen der beiden Untereinheiten des Surfactantproteins A (SP-A) aus genomischer DNA sollten Polymerasekettenreaktionen mit Spezifität für das SP-A1- beziehungsweise das SP-A2-Gen etabliert werden.
2. Bei Patienten, die im Rahmen der erweiterten klinischen Diagnostik auf einen hereditären Surfactantproteinddefekt getestet wurden, sollten die SP-A-Gene auf neue Mutationen untersucht werden.
3. Die SP-A-Gene der Patienten, deren Krankheitsbild nicht aufgrund einer anderen Ätiologie erklärt werden konnte, sollten zum Ausschluss einer Mutation vollständig sequenziert werden.
4. DNA-Sequenzen mit neuen Mutationen sollten aus den diploiden Proben zur exakten Bestimmung des Haplotyps kloniert werden.
5. Als Suchtest (*screening*) nach Mutationen sollte ein Verfahren zum Nachweis von Einzelstrangkonnformationspolymorphismen (abgekürzt SSCP für *single strand conformation polymorphism*) erprobt werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Patienten-DNA

DNA von 31 nicht konsanguinen Patienten indogermanischer (*caucasian*) Abstammung wurde zwischen Juni 1996 und Februar 1998 auf einen Surfactantproteindefekt untersucht. Alle Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme zur stationären Behandlung in einer Kinder- oder Lungenklinik. Die **Indikation zur Untersuchung der Surfactantproteine** wurde von den behandelnden Ärzten in Absprache mit dem Leiter des Projektbereichs "Molekulare und zelluläre Biologie des Surfactants" gestellt. EDTA-Blut wurde mit Einwilligung der Eltern beziehungsweise der volljährigen Patienten entnommen und zur DNA-Isolation verwendet. **Differentialdiagnostische Erwägungen** entschieden, bei welchen Patienten die SP-A-Gene vollständig sequenziert wurden.

#### 3.1.1 Indikation zur Untersuchung der Surfactantproteine

Zwölf Patienten waren Frühgeborene, die seit der Geburt beatmungspflichtig waren. Zwei litten an einer therapierefraktären Pneumonie und zehn am Atemnotsyndrom des Neugeborenen (RDS). Von diesen zehn konnten sieben nicht vom Respirator entwöhnt werden, bei einem war ein fatales Atemnotsyndrom aus der Familienanamnese bekannt, bei den beiden anderen war PAS-positives Material in der bronchoalveolären Lavage (BAL) nachgewiesen worden.

Vierzehn Patienten waren reifgeborene Säuglinge, von denen sich sieben zum Zeitpunkt der Untersuchung noch im Neugeborenenalter befanden. Drei der Säuglinge wurden wegen einer therapierefraktären Pneumonie behandelt und einer hatte ein akutes Atemnotsyndrom (ARDS) im Anschluss an eine virale Pneumonie entwickelt. Von den zehn übrigen Säuglingen mit dem klinischen Bild eines RDS waren sieben nicht vom Respirator zu entwöhnen, zwei benötigten vorübergehend eine extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO), beim anderen war ein fatales Atemnotsyndrom aus der Familienanamnese bekannt.

Fünf ältere Kinder und Erwachsene mit allmählicher Verschlechterung der Lungenfunktion und interstitieller radiologischer Zeichnungsvermehrung wurden wegen PAS-positivem Material in der BAL oder einer Lungenbiopsie unter dem Verdacht auf eine Alveolarproteinose untersucht. Fünf Mitarbeiter ohne pulmonale Erkrankung hatten ihre SP-A-Gene ebenso analysieren lassen.

**Tabelle 3-1: Patientendaten mit Angaben zur Indikation und Alter zum Zeitpunkt der Blutabnahme**

ARDS = akutes Atemnotsyndrom, BPD = bronchopulmonale Dysplasie, CMV = Zytomegalievirus, ECMO = extrakorporale Membranoxygenierung, PAS+ = PAS-positives Material in BAL oder Biopsat (pathognomonisch für Alveolarproteinose), RDS = Atemnotsyndrom, SSW = vollendete Schwangerschaftswochen bei Frühgeburt, Surf = Zahl der Surfactantgaben (falls bekannt), verst = verstarb im Alter von: Ta(gen), Wo(chen), Mo(naten) oder J.(ahren). \* = aufgrund dieser Diagnose wurde eine vollständige Sequenzierung der SP-A-Gene durchgeführt.

Nr	Alter	SSW	Indikation	Differentialdiagnose	Surf	verst
1	2 Wo		RDS mit Langzeitbeatmung	pulmonale Maladaptation bei maternalem Diabetes		
2	4 Mo		therapierefraktäre Pneumonie	Aspiration, Chromosom 20p-Syndrom, Glykogenose		4 Mo
3	2 Wo		RDS mit 10 Tagen ECMO	idiopathische Alveolarproteinose*	3 ×	4 Wo
4	15 J.		chronische Dyspnoe (PAS+)	idiopathische Alveolarproteinose*		
5	9 Wo	25	RDS mit Langzeitbeatmung	BPD, therapierefraktärer Surfactantmangel*		
6	4 Wo		RDS mit Langzeitbeatmung	idiopathische Alveolarproteinose*		7 Wo
7	1 Mo	35	therapierefraktäre Pneumonie	rezidivierende konnatale Pneumonie*		
8	7 Wo	25	RDS mit Langzeitbeatmung	BPD, therapierefraktärer Surfactantmangel*	4 ×	
9	14 J.		chronische Dyspnoe (PAS+)	idiopathische Alveolarproteinose*		
10	4 Wo		RDS mit Langzeitbeatmung	zeitweise verminderter SP-A-Gehalt in der BAL*	8 ×	
11	2 Wo		RDS, Familienanamnese	Besserung nach Ausschluss der Alveolarproteinose		
12	11 J.		chronische Dyspnoe (PAS+)	Leukämie, idiopathische Alveolarproteinose*		
13	7 Mo	25	rezidivierende Pneumonie	Wilson-Mikity-Syndrom (Blasenlungensyndrom)		
14	2 Wo	25	RDS mit Langzeitbeatmung	Vierling mit BPD	9 ×	
15	4 Mo	27	RDS mit Langzeitbeatmung	BPD, therapierefraktärer Surfactantmangel*	5 ×	
16	5 Mo		therapierefraktäre Pneumonie	rezidivierende interstitielle Pneumonie*		
17	9 Mo		therapierefraktäre Pneumonie	rezidivierende Bronchopneumonie*		
18	5 Wo		RDS mit Langzeitbeatmung	konnatale Alveolarproteinose bei SP-B-Mangel		4 Mo
21	7 Mo		ARDS mit Langzeitbeatmung	ARDS, interstitielle Pneumonie, SP-B-Mangel	3 ×	
22	4 Wo		RDS mit Langzeitbeatmung	Besserung nach Ausschluss der Alveolarproteinose		
23	40 J.		chronische Dyspnoe (PAS+)	sekundäre Alveolarproteinose bei Pneumokoniose		
24	1 Wo	35	RDS, Familienanamnese	schweres RDS	3 ×	
25	7 Wo		RDS, ECMO, CMV-Infekt	konnatale Alveolarproteinose bei SP-B-Mangel	2 ×	3 Mo
26	9 Wo	30	RDS mit Langzeitbeatmung	BPD, Sepsis, nosokomiale Pneumonien	13 ×	5 Mo
27	7 Wo	34	RDS mit Langzeitbeatmung	RDS, BPD, nosokomiale Pneumonie	6 ×	
28	3 Wo		RDS mit Langzeitbeatmung	Besserung nach Ausschluss der Alveolarproteinose		
31	4 Mo	34	schweres RDS (PAS+)	konnatale Alveolarproteinose bei GM-CSF-Mangel	1 ×	4 Mo
32	3 Wo	29	RDS mit Langzeitbeatmung	Atelektase mit Verteilungsstörung in der Lunge		
33	6 Wo		RDS mit Langzeitbeatmung	nosokomiale Pneumonie, Chromosom 22q-Syndrom		3 Mo
34	1 Wo	36	schweres RDS (PAS+)	idiopathische Alveolarproteinose*	3 ×	6 Wo
37	35 J.		chronische Dyspnoe (PAS+)	Idiopathische Alveolarproteinose*		

### 3.1.2 Differentialdiagnostische Erwägungen

Bei elf Patienten wurde die Diagnose einer Alveolarproteinose durch den Nachweis des charakteristischen, protein- und phospholipidhaltigen, PAS-positiven Materials in der Lunge gesichert. Bei zwei dieser Patienten war kein Surfactantprotein B (SP-B) in der Lavage nachweisbar. Es wurden Untersuchungen des SP-B-Gens (*sftp3* nach Pilot-Matias et al. 1989) auf die Mutationen 121ins2 (Nogee et al. 1994), Arg236Cys (Ballard et al. 1995) und Gly135Cys (Klein et al. 1998) durchgeführt, die jedoch nicht Bestandteil dieser Arbeit sein sollen. Patient 18 hatte die Leserastermutation 121ins2 (nach den aktuellen Vorschlägen zur Nomenklatur Phe120fs mit einem *frameshift* in Codon 120) in einem Allel des SP-B-Gens und im anderen Allel eine Einzelbasensubstitution, die den Aminosäureaustausch Cys49Arg bewirkt, es bestand also *compound heterozygosity* (kombinierte Heterozygotie) für [g.2587delCinsGAA] + [g.1508T>C], was den letalen Ausgang erklärt (L. Nogee et al., unveröffentlicht). Patient 25 hatte ebenfalls eine konnatale Alveolarproteinose, der für den SP-B-Mangel verantwortliche Defekt war jedoch nicht zu ermitteln. Die bei diesem Patienten ebenfalls nachgewiesene Infektion mit dem Zytomegalievirus (CMV) soll bei einigen Formen der Alveolarproteinose pathogenetisch beteiligt sein (Ranchod und Bissell 1979). Bei Patient 31 konnte ein Defekt im GM-CSF-Rezeptorgen als Ursache der konnatalen Alveolarproteinose nachgewiesen werden, Patient 23 entwickelte die Alveolarproteinose sekundär im Rahmen einer Pneumokoniose. Bei Autopsien ist dies kein seltener Befund (Honma und Chiyotani 1991). Nach Ausschluss bekannter Ursachen wurden die übrigen sieben Fälle zunächst als idiopathische Alveolarproteinose eingeordnet. Es handelte sich hierbei um drei Neugeborene, die innerhalb weniger Wochen verstarben und vier ältere Kinder oder Erwachsene. Bei Patient 12 wäre auch die Einordnung als sekundäre Alveolarproteinose bei Leukämie gerechtfertigt (Cordonnier et al. 1994), doch soll der auffällige SP-A-Genotyp in **Abschnitt 5.2.2** diskutiert werden.

Außer bei den **sieben Patienten mit idiopathischer Alveolarproteinose** wurden die SP-A-Gensequenzen bei **drei Säuglingen mit rezidivierender Pneumonie** im Alter von einem, fünf, beziehungsweise neun Monaten und **vier seit mehreren Wochen beatmungspflichtigen RDS-Patienten** vollständig ermittelt. Eins dieser Kinder war durch den vorübergehenden Nachweis einer niedrigen Konzentration des SP-A in der BAL aufgefallen, drei waren Frühgeborene, bei denen wegen der schlechten Antwort auf wiederholte Surfactantgaben ein für den Surfactantmangel verantwortlicher Defekt in den Surfactantproteinen als Differentialdiagnose zur sich abzeichnenden bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) diskutiert wurde. Bei den übrigen Patienten erklärten die in **Tabelle 3-1** aufgeführten Differentialdiagnosen die Schwere der Erkrankung. Nach Entlassung wurde der Krankheitsverlauf nicht weiter verfolgt. Drei der

Säuglinge waren an nosokomialer Pneumonie verstorben, von diesen hatten zwei Fehlbildungen aufgrund chromosomaler Deletionen (del20p11.23 beziehungsweise del22q11).

### 3.2 Geräte und Chemikalien

Die benutzten Geräte sind in **Tabelle 3-2** aufgeführt, die Verbrauchsmaterialien in **Tabelle 3-3**.

**Tabelle 3-2:** Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
<i>Autoklav</i>	2540 EL	tuttnauer®
<i>Schüttelbrutschrank</i>	3032	G.F.L.®
<i>Direkt-Blotter</i>	1500 System	GATC GmbH in Konstanz (BRD)
<i>Elektrophorese (horizontal)</i>	GFA 100	Pharmacia Biotech in Uppsala (Schweden)
<i>Elektrophorese (vertikal)</i>	SE 600	Hoefler Scientific Instruments in S. F. (USA)
<i>Feinwaage</i>	MC BA 100	Sartorius GmbH in Göttingen (BRD)
<i>Foto Scanner</i>	ScanJet 4C	Hewlett Packard
<i>Gefrierkühlschrank</i>	KK EE 26 A	Robert Bosch GmbH in München (BRD)
<i>Hybridisiertrommel</i>		GATC GmbH in Konstanz (BRD)
<i>Imaging-Densitometer</i>	GS-670	Bio-Rad Laboratories GmbH in München (BRD)
<i>Kältezentrifuge</i>	MR 18 22	Jouan®
<i>Kühlpumpe</i>	Colora	Spandau Pumpen in Berlin (BRD)
<i>Netzgerät</i>	PowerPac3000	Bio-Rad Laboratories GmbH in München (BRD)
<i>PH-Meter</i>	761 calimatic	Knick Elektr. Messgeräte GmbH in Berlin (BRD)
<i>Pipetten</i>	Vario	eppendorf® in Hamburg (BRD)
<i>Sofortbildkamera</i>	DS 34	Polaroid® in Cambridge (Großbritannien)
<i>Sterilwerkbank</i>	BSK 6 MP	antair®
<i>Thermocycler</i>	TRIO-Thermobloc	Biometra® in Göttingen (BRD)
<i>Thermomixer</i>	5436	eppendorf® in Hamburg (BRD)
<i>Tischzentrifuge</i>	5410	eppendorf® in Hamburg (BRD)
<i>UV-Crosslinker</i>	GATC LINK	GATC GmbH in Konstanz (BRD)
<i>UV-Transilluminator</i>	UVVIS-20	Hoefler Scientific Instruments in S.F. (USA)
<i>Vortex</i>	Reax 2000	Heidolph®
<i>Waage</i>	34.002	VEB Wägetechnik Rapido (DDR)

Die Chemikalien stammten, wo nicht anders angegeben, von der Carl Roth GmbH in Karlsruhe, der Serva Feinbiochemica GmbH in Heidelberg oder der Sigma-Aldrich GmbH in Deisenhofen, die Restriktionsendonukleasen und Reaktionspuffer von New England Biolabs in Beverly

(USA). Die DNA-Oligomere (Primer) wurden bei MWG-BIOTECH® in Ebersberg (BRD) synthetisiert.

**Tabelle 3-3:** Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Typ	Hersteller
<i>Filter</i>	1573 ½	Schleicher & Schüll GmbH in Dassel (BRD)
<i>Direct Blotting Membrane</i>	Breite 15 cm	GATC GmbH in Konstanz (BRD)
<i>Gel drying film</i>	25,5 × 28 cm	Promega® Boehringer Ingelheim in Heidelberg (BRD)
<i>Parafilm®</i>	4 × 24 cm	American National Can in Greenwich (USA)
<i>Petrischalen</i>	Falcon® 1029	Becton Dickinson Labware in New Jersey (USA)
<i>Pipettenspitzen</i>	Pipet Tips	eppendorf® in Hamburg (BRD)
<i>(dito gestopft)</i>	Safe Seal-Tips	BIOzym® in Hessisch Oldendorf (BRD)
<i>Reaktionsgefäße</i>	Safe-lock	eppendorf® in Hamburg (BRD)
<i>Schwarzweißfilme</i>	Type 667	Polaroid® in Cambrigde (Großbritannien)

### 3.3 Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese wurde DNA zur Analyse und Isolierung aufgetrennt. Die Größe der DNA-Moleküle in Basenpaaren (bp) wurde im Vergleich mit einem DNA-Standard abgeschätzt. **Tabelle 3-4** zeigt die Reagenzien für die Gelelektrophoresen.

**1. Tabelle 3-4:** Reagenzien für die Gelelektrophorese

Reagenz	Bezeichnung	Hersteller
<i>DNA-Standards</i>	100 bp DNA ladder <i>HindIII-digest</i> des λ-Phagen	GibcoBRL® in Eggenheim (BRD) Eigenproduktion
<i>Agarose</i>	Agarose (für > 500 bp)	Biozym Diagnostik GmbH in Hessisch Old. (BRD)
<i>Acrylamidlösung</i>	40%-Acryl.(37,5:1)Bis-Acr.	amresco® in Solon, Ohio (USA)
<i>SSCP-Gellösung</i>	MDE® Gel Solution	FMC BioProducts in Rockland, Maine (USA)
<i>abweisendes Silan</i>	Dimethyldichlorsilan	Serva Feinbiochemica GmbH in Heidelberg (BRD)

Hochmolekulare genomische DNA und Plasmid-DNA wurden in der **Agarosegelelektrophorese** aufgetrennt. Die DNA kann nach Einschmelzen des Gels in Anwesenheit chaotropischer Salze leicht isoliert werden. PCR-Produkte und DNA-Restriktionen wurden aufgrund der besseren Trennschärfe in der **Polyacrylamidgelelektrophorese** analysiert. Dem Auftragepuffer wurden Farbstoffe zur Markierung der Laufmittelfront zugesetzt. **Tabelle 3-5** zeigt die Stammlösungen.

**Tabelle 3-5:** Lösungen für die Gelelektrophorese

Lösung	Konzentration der Bestandteile
<i>Auftragepuffer</i>	10 mmol/l Tris-Base (pH 8,0) 25 % Ficoll 400 0,1 % Xylencyanol FF 0,1 % Bromphenolblau
<i>Polymerisationsstarter</i>	0,1 % Ammoniumpersulfat (APS) 0,15 % N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
<i>TAE-Puffer</i> (pH 8,0 bei 25 °C)	40 mmol/l Tris-Base 5 mmol/l Natriumacetat 1 mmol/l Na <sub>2</sub> EDTA
<i>(10×)TBE-Puffer</i> (pH 8,0 bei 25 °C)	900 mmol/l Tris-Base 900 mmol/l Borsäure 20 mmol/l Na <sub>2</sub> EDTA

Die **SSCP-Gelelektrophorese** wurde in Polyacrylamidgelen geringer Querverzweigung zum Nachweis des Einzelstrangkonnformationspolymorphismus (*single strand conformation polymorphism*) mit amplifizierter DNA durchgeführt. Die Proben wurden vor der Elektrophorese im Einzelstrangpuffer denaturiert, also in *sense*- und *antisense*-Einzelstränge aufgetrennt, die im nicht denaturierenden Gel eine individuelle Konformation (räumliche Anordnung) annehmen und sich dadurch von der ebenfalls gebildeten Doppelstrang-DNA isolieren lassen. Zum **Farbnachweis der DNA im Gel** wurden interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt. Beim Nachweis von Einzelstrang-DNA war die Silberfärbung sensitiver.

### 3.3.1 Agarosegelelektrophorese

1 µl genomische DNA oder 2 µl amplifizierte DNA wurde mit 1 µl Auftragepuffer in einem 8 × 4 × ½ cm-Gel aus 1 % Agarose in TAE-Puffer bei einem konstanten Strom von 40 mA etwa 20 Minuten aufgetrennt. Zur Gelexzision wurde 50 µl PCR-Produkt mit 10 µl Auftragepuffer in einem 12 × 8 × 0,8 cm-Gel bei 85 mA etwa 60 Minuten aufgetrennt.

### 3.3.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

5 - 10 µl amplifizierte DNA wurde in 16 × 14 × 0,15 cm-Gelen aus 5 - 8 % Polyacrylamid in TBE-Puffer mit 5 µl Auftragepuffer bei 55 mA etwa 1 h aufgetrennt.

### 3.3.3 SSCP-Gelelektrophorese

Die in **Tabelle 3-6** gezeigten Stammlösungen mit verschiedenen Bisacrylamidanteilen wurden bei 4 °C aufbewahrt. Die Glasplatten wurden vor dem Gießen mit abweisendem Silan beschichtet. 5 - 10 µl PCR-Amplifikat wurden mit 5 - 10 µl Einzelstrangpuffer für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert und in 16 × 16 × 0,15 cm-Gelen aus 3,5 - 12 % Polyacrylamid in TBE-Puffer 90 - 150 Minuten mit einer konstanten Leistung von 7 Watt aufgetrennt. Eine zusätzliche Probe wurde mit Doppelstrangpuffer gemischt und nicht denaturiert.

**Tabelle 3-6:** Lösungen für die SSCP-Gelelektrophorese

Lösung	Konzentration der Bestandteile
40%-Acrylamidlösung Acryl.(39:1)Bis-Acryl.	35,1 g Acrylamid 0,9 g N, N'-Methylenbisacrylamid 90 ml H <sub>2</sub> O
40%-Acrylamidlösung Acryl. (99:1)Bis-Acryl.	39,6 g Acrylamid 0,4 g N, N'-Methylenbisacrylamid 100 ml H <sub>2</sub> O
40%-Acrylamidlösung Acryl. (199:1)Bis-Acryl.	19,9 g Acrylamid 0,1 g N, N'-Methylenbisacrylamid 50 ml H <sub>2</sub> O
Einzelstrangpuffer	80 % Formamid 1 mmol/l Na <sub>2</sub> EDTA 10 mmol/l NaOH 0,1 % Xylencyanol FF/ Bromphenolblau
Doppelstrangpuffer	80 % Formamid 1 mmol/l Na <sub>2</sub> EDTA 0,1 % Xylencyanol FF/ Bromphenolblau

### 3.3.4 Farbnachweis der DNA im Gel

Polyacrylamidgele wurden 10 Minuten in Ethidiumbromidlösung gefärbt. Agarosegelen wurde Ethidiumbromid in entsprechender Konzentration zugegeben. Zum Nachweis schwacher Banden wurde das Gel mit 1,5 ml SYBR<sup>®</sup>-Green I für 30 Minuten überschichtet.

SSCP-Gele wurden mit dem *silver stain kit* aus **Tabelle 3-7** auf dem Horizontalwipptisch gefärbt. Zunächst wurde 60 Minuten in Fixativ 1 und zweimal 30 Minuten in Fixativ 2 gespült. Der Oxidizer wirkte 10 Minuten auf das Gel ein, bevor er in drei Waschsritten von 10 Minuten Dauer gründlich ausgespült wurde. Das Silberreagenz wirkte 30 Sekunden ein, bevor 2 Minuten mit H<sub>2</sub>O gespült wurde. Entwicklerlösung wurde dreimal bis zur Ausflockung eingesetzt. Stopplösung beendete die Reaktion, bevor sich eine Hintergrundfärbung einstellte.

**Tabelle 3-7:** Lösungen zum Farbnachweis der DNA im Gel

1): Biozym Diagnostik GmbH in Hessisch Oldendorf

2): *silver stain kit* der Bio-Rad Laboratories in Richmond, California

Lösung	Konzentration der Bestandteile
<i>Ethidiumbromidlösung</i>	0,5 µg/ml in H <sub>2</sub> O
<i>SYBR<sup>®</sup>-Green I stain solution<sup>1)</sup></i>	1:10.000 in TBE-Puffer (pH 8,0)
<i>Fixativ 1</i>	40 % Methanol
<i>Fixativ 2</i>	10 % Ethanol
<i>Oxidizer<sup>2)</sup></i>	(keine Angaben) KCr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> und HNO <sub>3</sub>
<i>Silberreagenz<sup>2)</sup></i>	0,05 % AgNO <sub>3</sub>
<i>Entwickler<sup>2)</sup></i>	3 % NaCO <sub>3</sub> 0,2 % Paraformaldehyd
<i>Stopplösung</i>	5 % Essigsäure

### 3.4 DNA-Isolation

**Genomische DNA aus Leukozyten** wurde nach Auflösen der Zellen mittels geeigneter Detergentien und Präzipitation der Proteine in einer Salzlösung durch alkoholische Fällung pelletiert. Die freigesetzte RNA wurde enzymatisch abgebaut. **Plasmid-DNA** wurde nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) isoliert. **Amplifizierte DNA-Sequenzen** wurden durch Bindung an silikatisches Trägermaterial isoliert. In der PCR nicht verbrauchte Nukleotide und Primer wurden enzymatisch abgebaut. Nebenprodukte wurden elektrophoretisch abgetrennt und die gewünschte DNA mittels **Gelexzision** isoliert.

#### 3.4.1 Genomische DNA aus Leukozyten

**Tabelle 3-8:** Lösungen zur Isolation chromosomaler DNA

*Puregene<sup>®</sup> DNA-Isolation Kit*: Volumina zur DNA-Isolation aus 300µl Vollblut und Zusammensetzung nach Angaben des Herstellers: Gentra Systems, Inc. in Minneapolis (USA)

Lösung	Volumen	Zusammensetzung
<i>Red Blood Cell (RBC) Lysis Solution</i>	900 µl	NH <sub>4</sub> Cl, Na <sub>2</sub> EDTA, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
<i>Cell Lysis Solution</i>	300 µl	Tris-Base, Na <sub>2</sub> EDTA, SDS
<i>RNase A Solution</i>	1,5 µl	>120 Units/µl RNase A
<i>Protein Precipitation Solution</i>	150 µl	Ammoniumacetat
<i>DNA Hydration Solution</i>	100 µl	10 mmol/l Tris-Base, 1 mmol/l Na <sub>2</sub> EDTA

Die Isolation der Leukozyten-DNA wurde mit den in **Tabelle 3-8** aufgeführten Lösungen des *Puregene<sup>®</sup> DNA-Isolation Kit* nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Aus 300 µl Vollblut wurden etwa 30 µg DNA isoliert. Die DNA-Proben mit einer Konzentration von etwa 0,3 µg/µl wurden bei -20 °C aufbewahrt. Verdünnungen von 1:10 in wurden bei 4 °C bereitgehalten, um wiederholtes Auftauen und Gefrieren zu vermeiden (vgl. **Abbildung 4-1** in **Abschnitt 4.1.2**).

### 3.4.2 Plasmid-DNA

1,5 ml Bakterienkultur wurden 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl des Suspensionspuffers in **Tabelle 3-9** suspendiert, unter Vortexen mit 200 µl Detergenz gemischt und für 5 Minuten auf Eis gestellt. 30 Minuten nach Zugabe von 150 µl Salzlösung 1 wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (13.000 Upm). Der Überstand wurde mit 1 ml 96 %igem Ethanol gemischt und die DNA bei -20 °C für 30 Minuten ausgefällt. Nach 10 Minuten Zentrifugieren bei 4 °C (13.000 Upm) wurde der Überstand abgesaugt.

**Tabelle 3-9:** Lösungen zur Isolation von Plasmid-DNA

Lösung	Konzentration der Bestandteile
<i>Suspensionspuffer</i>	25 mmol/l Tris-HCl (pH 8,0) 50 mmol/l Glucose 10 mmol/l Na <sub>2</sub> EDTA
<i>Detergenz</i>	1% SDS 0,2 mol/l NaOH
<i>Salzlösung 1</i>	3,0 mol/l Natriumacetat (pH 4,8)
<i>Salzlösung 2</i>	0,3 mol/l Natriumacetat (pH 4,8)

Das Pellet wurde in 150 µl Salzlösung 2 gelöst, mit 300 µl tiefgekühltem Ethanol gefällt, in der Vakuumzentrifuge 5 Minuten getrocknet und in 30 µl H<sub>2</sub>O zur weiteren Analyse gelöst.

### 3.4.3 Amplifizierte DNA-Sequenzen

Ein PCR-Ansatz (50 µl) wurde mit je 0,5 µl Exonuklease und Phosphatase 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. 15 Minuten Erhitzen auf 80 °C inaktivierte die Enzyme. Die Probe wurde mit 250 µl Puffer PB in ein QIAquick<sup>®</sup> *spin column* überführt und 30 Sekunden zentrifugiert (13.000Upm). Nach Waschung mit 500 µl Puffer PE wurde mit 30 µl H<sub>2</sub>O eluiert. Zur **Gelexzision** wurde die entsprechende Farbbande aus dem Agarosegel geschnitten und mit QIAEXII-Suspension aus

**Tabelle 3-10** nach Herstellerprotokoll extrahiert.

**Tabelle 3-10:** Materialien zur Aufbereitung amplifizierter DNA

1): Reagent pack for use with Sequencing Kit Nr. US 70995 von Amersham in Cleveland, Ohio (USA)

2): Reagenzien zur DNA-Extraktion von der QIAGEN GmbH in Hilden (BRD)

Produkt	Bestandteile
<i>Enzyme</i> <sup>1)</sup>	2 Units/µl shrimps alkaline phosphatase + 10 Units/µl Exonuclease I
<i>QIAquick® spin column</i> <sup>2)</sup>	silikatisches Trägermaterial
<i>Puffer PB/ Puffer QX 1</i>	Chaotropische Salze
<i>Puffer PE</i>	Tris-Base / NaCl / 70% Ethanol
<i>QIAEX II-Suspension</i>	silikatisches Trägermaterial

### 3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

**Tabelle 3-11:** Reagenzien für die PCR

1): Promega® oder TaKaRa®, Boehringer Ingelheim Bioproducts in Heidelberg (BRD)

2): Expand®-Long Template PCR-System von Boehringer in Mannheim (BRD)

3): PerkinElmer Weiterstadt, 4): PAN-Systems GmbH Aidenbach, 5): Braun® Melsungen (BRD)

Reagenz	Konzentration der Bestandteile
<i>(10×)PCR-Puffer</i> <sup>1)</sup> (pH 9,0 bei 25 °C)	500 mmol/l KCl 100 mmol/l TrisHCl 1 % Triton® X 100
<i>(10×)PCR-Puffer II</i> <sup>3)</sup> (pH 8,3 bei 25 °C)	500 mmol/l KCl 100 mmol/l TrisHCl
<i>Additiva</i>	5 - 10 mmol/l Ammoniumsulfat 10 % Glycerol 5 - 10 % Formamid
<i>Magnesiumlösung</i> <sup>1)</sup>	25 mmol/l MgCl <sub>2</sub>
<i>dNTP-Mix</i> <sup>1)</sup> (pH 7,8 bei 25 °C)	10 mmol/l dATP 10 mmol/l dCTP 10 mmol/l dGTP 10 mmol/l dTTP
<i>thermostabile DNA-Polymerasen</i>	5 Units/µl Taq-DNA-Polymerase <sup>1)</sup> 5 Units/µl Tfl-DNA-Polymerase <sup>1)</sup>
<i>hot start-DNA-Polymerase</i> <sup>3)</sup>	5 Units/µl AmpliTaq Gold®
<i>DNA-Polymerasen mit proof reading-Aktivität</i>	5 Units/µl ExTaq-DNA-Polymerase <sup>1)</sup> 5 Units/µl Pwo-DNA-Polymerase + Taq-DNA-Polymerase <sup>2)</sup> 5 Units/µl PowerScript DNA-Polymerase + Pyrophosphatphosphohydrolase <sup>4)</sup>
<i>aqua ad iniectibilia</i> <sup>5)</sup>	100 % H <sub>2</sub> O

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) wird ein bestimmter DNA-Abschnitt durch eine thermostabile DNA-Polymerase mit Temperaturoptimum zwischen 70 - 80 °C synthetisiert. Die Startpunkte für die Extension werden durch Hybridisierung der bei hoher Temperatur denaturierten DNA mit spezifischen DNA-Oligomeren gebildet. Diese Primer haben meist nur etwa 20 Nukleotide und lagern sich erst bei Unterschreitung ihrer Schmelztemperatur an die DNA an. Die Wiederholung der drei Reaktionsschritte Denaturierung, Hybridisierung und Extension in einer zyklischen Reaktion im *Thermocycler* bewirkt die exponentielle Amplifikation der entsprechenden Sequenz. Wird aus einer DNA-Probe mit "externen" Primern ein größerer Abschnitt amplifiziert und aus dem PCR-Produkt mit "internen" Primern eine kürzere Sequenz erneut synthetisiert, nennt man dies ***nested PCR*** (Newton und Graham 1997).

Die **Berechnung geeigneter Primersequenzen** mit speziellen Algorithmen bildet die Grundlage für die experimentelle Auswahl der Primer. Die verschiedenen Reagenzien aus **Tabelle 3-11** wurden zur **Optimierung der Reaktionsbedingungen** in wechselnden Konzentrationen eingesetzt. Alle Schritte der DNA-Isolation und die Vorbereitung der PCR wurden unter der Sterilwerkbank mit gestopften Pipettenspitzen und Einmalhandschuhen durchgeführt. Reaktionsgefäße und Reagenzien wurden autoklaviert. Bei jeder PCR wurde ein Reaktionsansatz ohne DNA mitgeführt, um Kontaminationen auszuschließen.

### 3.5.1 nested PCR

Um wie bei einer allelspezifischen PCR (ASPCR) nur eine aus mehreren annähernd identischen DNA-Sequenzen zu amplifizieren, sind "diskriminierende" Primer nötig, deren 3'-terminale Nukleotide in unserem Fall für eine der beiden SP-A-Gensequenzen spezifisch sind. Mit jeder genomischen DNA-Probe wurden wie in **Abbildung 3-1** dargestellt zwei separate Polymerasekettenreaktionen zur Isolation der beiden Genkopien durchgeführt. In diesen externen PCRs wurde mit diskriminierenden Primern eine alle kodierenden Exone umfassenden Sequenz des SP-A1-Gens (3.104 bp) beziehungsweise des SP-A2-Gens (3.090 bp) amplifiziert. Die voramplifizierten Sequenzen dienten jeweils als *template* (DNA-Matrize) zur Amplifikation der Exonsequenzen in den internen PCRs. Die für ein Exon spezifischen Primer diskriminieren nicht SP-A1 von SP-A2. Als optimale Verdünnung des externen PCR-Produkts in der internen PCR wurde 1:50.000 bei Anwendung von 25 Reaktionszyklen ermittelt. Von der externen PCR wurde unter sterilen Bedingungen 1 µl entnommen, mit 999 µl H<sub>2</sub>O verdünnt und bei minus 20 °C aufbewahrt. 1 µl je Reaktionsansatz wurde als DNA in der internen PCR eingesetzt.

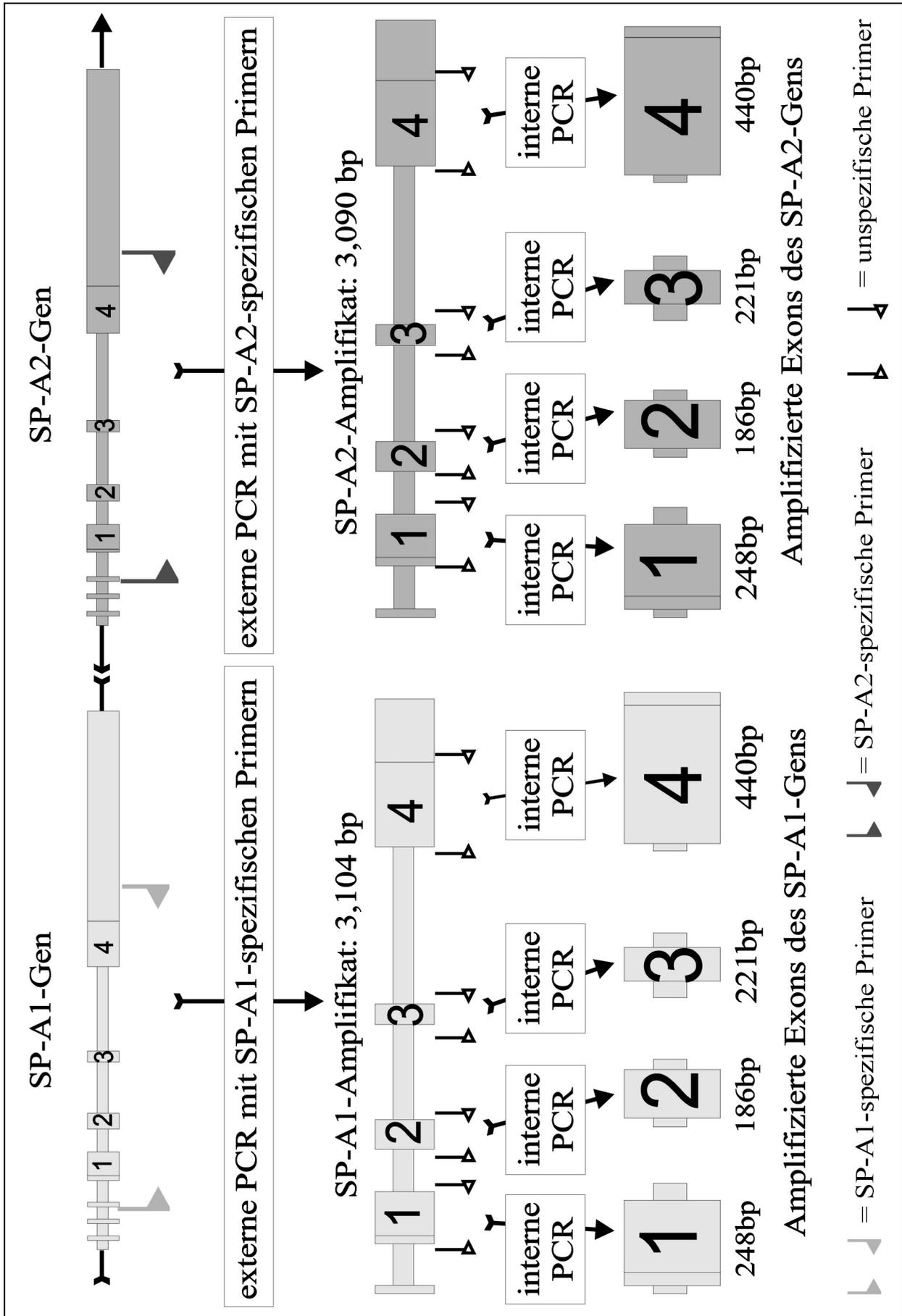


Abbildung 3-1: Getrennte Amplifikation der SP-A-Gene mittels *nested* PCR

### 3.5.2 Berechnung geeigneter Primersequenzen

Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ), bei der Oligonukleotide von komplementärer DNA dissoziieren, wurde nach **Gleichung 3-1** berechnet. Multiple *annealing tests* nach Hillier und Green (1991) dienten der Selektion spezifischer Primersequenzen. Diese wurden mit dem *FastA-Algorithmus* nach Pearson und Libman (1988) auf Homologie zu den in der GenBank gespeicherten Sequenzen von Primaten geprüft. Primer mit über 94 % Analogie zu einem anderen Gen wurden ausgeschlossen. Bei Identität am 3'-Ende wurden nur 85 % Analogie akzeptiert.

$$T_m(\text{Primer}) = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \times \ln\left(\frac{c}{4}\right)} - 273,15 + 16,6 \times \log[K^+]$$

**Gleichung 3-1:** Schmelztemperatur von DNA-Oligomeren (nach Rychlik et al. 1990)

*Legende:*  $\Delta H$  ist die Enthalpie und  $\Delta S$  die Entropie der Helixbildung.  $R$  ist die Gaskonstante (1.987 cal/°C/mol).  $c$  ist die Primer- und  $[K^+]$  die Kaliumionenkonzentration

Einige Sequenzen wurden manuell modifiziert. Um alle Primer vergleichen zu können, wurde der Schätzung der Hybridisierungstemperatur ( $T_a$ ) eines Primerpaars die vom Hersteller nach **Gleichung 3-2** berechnete Schmelztemperatur ( $T_m$ ) zugrundegelegt.

$$T_m(\text{Primer}) = 69,3^\circ\text{C} + 0,41 \times (\%G + C) - \frac{675}{n}$$

**Gleichung 3-2:** Schmelztemperatur von DNA-Oligomeren (vereinfacht nach Newton und Graham 1997)

*Legende:*  $n$  ist die Zahl der Nukleotide und  $(\%G+C)$  der Anteil der DNA-Basen Guanin und Cytosin

Angrenzend an jedes Exon wurden innerhalb der Introne Paare interner Primer konzipiert, die **Tabelle 4-1** im Ergebnisteil zeigt. Auf ihre Eignung geprüft wurden Sequenzen von 18 - 22 bp mit einem G+C-Gehalt von 40 - 55 % und G oder C als 3'-terminalem Nukleotid.  $T_m$  wurde zwischen 50 - 65 °C gewählt mit weniger als 2 °C Differenz zwischen  $T_m(\text{forward-Primer})$  und  $T_m(\text{reverse-Primer})$ . In den nichttranslatierten Bereichen ober- und unterhalb der kodierenden Gensequenz wurden beide SP-A-Gene diskriminierende Primer identifiziert, die sich am 3'-Ende wie in **Tabelle 3-12** zu sehen in mindestens zwei Nukleotiden unterscheiden und so zwischen SP-A1- und SP-A2-Sequenzen diskriminieren.

**Tabelle 3-12:** Getestete diskriminierende PrimerMiteinander amplifizierende Primer sind unterstrichen, Einzelheiten siehe in **Abschnitt 4.1.2**.

Bezeichnung	Nukleotide	Position	DNA-Basensequenz (vom 5'- zum 3'-Ende)	T <sub>m</sub> [°C]
<u>SPA-1-FW-01</u>	<u>911-932</u>	<u>vor Exon D</u>	<u>GTCGCCCGCCCTGCCTCGTCGG</u>	<u>73,5</u>
SPA-1-FW-02	916-932	vor Exon D	CCGCCCTGCCTCGTCGG	62,0
<u>SPA-1-FW-04</u>	<u>913-929</u>	<u>vor Exon D</u>	<u>GTCGCCCGCCCTGCCTCGT</u>	<u>66,0</u>
<u>SPA-1-FW-05</u>	<u>131-151</u>	<u>vor Exon A</u>	<u>AAATGCTGCGTCTACCTTACC</u>	<u>50,6</u>
SPA-1-FW-07	917-933	vor Exon D	CGCCCTGCCTCGTCGGG	62,0
SPA-1-FW-08	555-579	Exon B	CTGAAAAGAAAGTAACACAGCAGGG	60,3
SPA-1-FW-09	603-628	nach Exon B	GTGAGTGAGTGACCTGACTAATAGCC	63,8
SPA-1-FW-10	442-466	vor Exon B	AGAGAACAGACCCCAAAAAGAAAGG	60,3
<u>SPA-1-FW-11</u>	<u>553-577</u>	<u>Exon B</u>	<u>GCCTGAAAAGAAAGTAACACAGCAG</u>	<u>55,6</u>
<u>SPA-1-FW-12</u>	<u>550-574</u>	<u>Exon B</u>	<u>GGAGCCTGAAAAGAAAGTAACACAG</u>	<u>54,7</u>
<u>SPA-1-FW-13</u>	<u>548-572</u>	<u>Exon B</u>	<u>TTGGAGCCTGAAAAGAAAGTAACAC</u>	<u>55,1</u>
<u>SPA-1-RE-01</u>	<u>3381-3361</u>	<u>UT von Exon 4</u>	<u>GAGGCCGACAAGGAGAGCGTC</u>	<u>59,8</u>
<u>SPA-1-RE-05</u>	<u>3406-3387</u>	<u>UT von Exon 4</u>	<u>ACAGACCAAGTGGAGCCTCA</u>	<u>51,8</u>
SPA-1-RE-06	3394-3376	UT von Exon 4	GAGCCTCAGGATGGAGGCC	55,8
SPA-1-RE-07	3470-3452	UT von Exon 4	TAAGGGTGCCTCCAGTCCC	53,7
<u>SPA-1-RE-08</u>	<u>3416-3392</u>	<u>UT von Exon 4</u>	<u>CTAGCATCTCACAGACCAAGTGGAG</u>	<u>56,1</u>
<u>SPA-2-FW-01</u>	<u>940-960</u>	<u>vor Exon D</u>	<u>CTCGCCCGCCCTGCCTCTCGC</u>	<u>70,4</u>
<u>SPA-2-FW-02</u>	<u>944-960</u>	<u>vor Exon D</u>	<u>CCCGCCCTGCCTCTCGC</u>	<u>61,2</u>
SPA-2-FW-03	578-599	Exon B	CCTGAAAAGAAGGTAAGTGGGC	53,8
SPA-2-FW-04	577-597	Exon B	GCCTGAAAAGAAGGTAAGTGG	50,1
<u>SPA-2-RE-01</u>	<u>3395-3373</u>	<u>UT von Exon 4</u>	<u>GAAACTGAAGGCCAGACAGGATC</u>	<u>55,8</u>
<u>SPA-2-RE-02</u>	<u>3403-3385</u>	<u>UT von Exon 4</u>	<u>TGGGGATGGAAACTGAAGG</u>	<u>52,0</u>
SPA-2-RE-03	3403-3386	UT von Exon 4	TGGGGATGGAAACTGAAG	47,6

### 3.5.3 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Primer wurden in Konzentrationen von 0,1 µmol/l, Nukleotide in einer Konzentration von 200 µmol/l eingesetzt. Magnesiumionenkonzentration [Mg<sup>++</sup>] und Hybridisierungstemperatur (T<sub>a</sub>) wurden in parallelen Reaktionen aufeinander abgestimmt. Bei der **touchdown-Technik** wurde T<sub>a</sub> zur Erhöhung der Spezifität im ersten Zyklus etwa 5 - 15 °C über der Idealtemperatur gewählt und in den folgenden 10 - 20 Zyklen um jeweils ½ - 1 °C herabgesetzt (Don et al. 1991). Zur Durchführung eines **hot starts** (d'Áquila et al. 1991) wurde eine DNA-Polymerase eingesetzt, die erst nach dem Denaturierungsschritt aktiv wird und so die DNA-Synthese an den vor dem Reaktionsstart entstandenen, unspezifischen Primerbindungen verhindert. **Additiva** wurden dem Reaktionspuffer in Einzelversuchen zugesetzt. Fehlerkorrigierende (*proof reading*)

DNA-Polymerasen mit 3'→5'-Exonuklease-Aktivität wurden für die Amplifikation längerer DNA-Sequenzen (*long template PCR*) eingesetzt.

**Tabelle 3-13:** Universalprimer zur Amplifikation klonierter DNA

1): Position in pCR2.1 (Mead et al. 1991); 2): Position in pUC19 (Yanisch-Perron et al. 1985)

Bezeichnung	pCR2.1 <sup>1)</sup>	pUC19 <sup>2)</sup>	Nukleotidsequenz	T <sub>m</sub> [°C]
M13(-29)	205-221	481-464	CAGGAAACAGCTATGACC	41,9
M13(-43)	453-431	356-378	AGGGTTTTCCAGTCACGACGTT	59,7

Zur **Amplifikation oder Sequenzierung klonierter DNA** aus den isolierten Plasmiden können die in beiden Vektoren integrierten Universalprimersequenzen M13 dienen. **Tabelle 3-13** zeigt die nach der Entfernung von der multiplen Klonierungsstelle (*multiple cloning site*) als M13(-29) und M13(-43) bezeichneten Sequenzen. Die entsprechende PCR erforderte 25 Zyklen mit einer Magnesiumionenkonzentration [Mg<sup>++</sup>] = 1,5 mmol/l und Hybridisierung bei T<sub>a</sub> = 48 °C.

## 3.6 DNA-Sequenzierung

Die DNA wurde nach der Kettenterminationsmethode (*chain termination method*, Sanger et al. 1977) sequenziert. Jede Probe wurde in vier separaten zyklischen Sequenzierreaktionen (*cycle sequencing reactions*, Murray 1989), bei denen im Gegensatz zur PCR nur ein Primer eingesetzt wird, amplifiziert. Da jeweils eine der vier Desoxynukleotidfraktionen teilweise durch Didesoxynukleotide ersetzt wird, bricht die Synthese der DNA-Sequenzen früher oder später bei der entsprechenden Base ab. Die DNA-Einzelstränge wurden während der elektrophoretischen Auftrennung in einem denaturierenden Gel direkt auf eine Membran übertragen (*direct blotting*, Beck et al. 1984) und anschließend durch eine enzymatische **Farbreaktion** sichtbar gemacht.

### 3.6.1 cycle sequencing reactions

Für dGTP wurde das analoge dITP eingesetzt, wie **Tabelle 3-14** zeigt. Aus je 1,3 µl (10×)-Reaktionspuffer und dITP-Mix wurden mit jeder DNA-Probe 13 µl Reaktionsgemisch mit einer Primerkonzentration von 1,5 pmol/µl und 6 Units Enzym vorbereitet. 3,1 µl Reaktionsgemisch wurden zu 1 µl eines ddNTP-Mix gegeben und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, bevor die in **Protokoll 3-1** gezeigte *cycle sequencing reaction* gestartet wurde. Die amplifizierten Sequenzen wurden mit 2,7 µl Stoppmix 5 Minuten auf 95 °C erhitzt, auf Eis

gekühlt und nebeneinander auf das denaturierende Harnstoffgel aufgetragen.

**Tabelle 3-14:** Lösungen für die cycle sequencing reaction

*BioCycle Sequencing Kit* von GATC in Konstanz (BRD) außer 1): Amersham in Cleveland, Ohio (USA). ddNTP steht für jeweils eins der vier Didesoxynukleotide, die durch eine Biotinylierung markiert sind.

Lösung	Konzentration	der Bestandteile
<i>(10×)-Reaktionspuffer</i>	274 mmol/l 68,6 mmol/l 200 mmol/l 27,4 mmol/l	TrisHCl (pH 7,5) Trinatriumcitrat NaCl MnCl <sub>2</sub>
<i>dITP-Mix</i>	(unbekannt)	dATP, dCTP, dITP, dTTP
<i>Enzym</i> <sup>1)</sup>	32 Units/μl	Thermo Sequenase <sup>®</sup> -DNA-Polymerase
<i>ddNTP-Mix</i>	1,25 μmol/l 50 mmol/l je 125 μmol/l	ddNTP NaCl dATP, dCTP, dGTP, dTTP
<i>Stopp-Mix</i>	99% 0,1% 5 mmol/l	Formamid Bromphenolblau Na <sub>2</sub> EDTA

**Protokoll 3-1:** cycle sequencing reaction

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	
initiale Denaturierung	95 °C	180 Sekunden	
Denaturierung	95 °C	30 Sekunden	60 Zyklen
Hybridisierung	48 °C	25 Sekunden	
Extension	60 °C	30 Sekunden	
finale Extension	72 °C	180 Sekunden	

### 3.6.2 direct blotting

Zwischen speziell geschliffenen Glasplatten, die zuvor mit 150 μl bindendem Silan beschichtet worden waren, wurde ein denaturierendes 4 %iges Polyacrylamidgel von 22 × 32 × 0,019 cm mit 50 % Harnstoffanteil gegossen. 21,65 ml Harnstoffreagenz aus **Tabelle 3-15** und 3,35 ml Acrylamidlösung wurden gemischt und mit 110 μl APS und 25 μl TEMED polymerisiert. Parafilm<sup>®</sup> verhinderte das Austrocknen der Gelkante. Nach drei Gelen wurden die Platten 1 h in 0,5-molarer NaOH-Lösung gereinigt. Von jeder Sequenzreaktion wurden 3 - 4 μl aufgetragen und nach einer langsamen Einlaufphase von 5 Minuten bei 500 V mit einer konstanten Leistung von 30 W bei einer angelegten Spannung von 1.400 - 1.800 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Membran wurde tangential an der Gelkante durch einen Schrittmotor vorangetrieben und nach der Elektrophorese mit Heißluft getrocknet. Vor der weiteren Entwicklung wurde die DNA

durch dreiminütiges *cross-linking* unter UV-Licht auf der Membran fixiert.

**Tabelle 3-15:** Lösungen für das denaturierende Harnstoffgel

1): *BioCycle Sequencing Kit* von GATC in Konstanz (BRD)

Lösung	Konzentration der Bestandteile
<i>(10×)-TBE-Puffer</i> (pH 8,0 bei 25 °C)	154,5 g Tris-Base 26,2 g Borsäure 9,0 g Na <sub>2</sub> EDTA 810,0 g H <sub>2</sub> O
<i>Harnstoffreagenz</i>	56,9 g Harnstoff 11,4 ml (10×)-TBE-Puffer ad 100 ml H <sub>2</sub> O
<i>Acrylamidlösung</i>	30 % Acrylamid-(30:0,8)-Bisacrylamidlösung <sup>1)</sup>
<i>bindendes Silan</i>	50 µl 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan 30 µl Essigsäure (99,9 %) 9,92 ml Ethanol (95 %)

### 3.6.3 Farbreaktion

**Tabelle 3-16:** Lösungen zum Nachweis der biotinylierten DNA auf der Membran

1): GATC GmbH in Konstanz; 2): Boehringer in Mannheim; 3): Bio-Rad Laboratories GmbH in München

Lösung	Konzentration der Bestandteile
<i>Maleinsäurepuffer</i> (pH 7,5 bei 20 °C)	12,61 g/l Maleinsäure 8,77 g/l NaCl 8 g/l NaOH
<i>Reaktionspuffer</i> (pH 9,5 bei 20 °C)	5,84 g/l NaCl 0,83 g/l TrisHCl 11,58 g/l Tris-Base
<i>(10×)-blocking reagent</i>	10 g blocking powder <sup>2)</sup> 90 ml Maleinsäurepuffer
<i>SA-AP-Lösung</i>	1:7.500 Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat <sup>1)</sup>
<i>NBT-Lösung</i>	300 mg Nitrotetrazoliumblausäure <sup>3)</sup> 7 ml N, N-Dimethylformamid 3 ml H <sub>2</sub> O
<i>BCIP-Lösung</i>	150 mg 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-toluidinsalz <sup>3)</sup> 10 ml N, N-Dimethylformamid

Der pH-Wert des in **Tabelle 3-16** gezeigten Maleinsäurepuffers wurde mit NaOH-Lösung exakt titriert. Das mit Maleinsäurepuffer verdünnte *(10×)-blocking reagent* blockiert unspezifische Bindungsstellen. In der Hybridisiertrömmel wurde die Membran mit 150 ml Maleinsäurepuffer 5 Minuten equilibriert. Nach 45 Minuten Inkubation mit 80 ml *blocking reagent* wurde mit 4 µl SA-AP-Lösung in 20 ml *blocking reagent* 45 Minuten inkubiert. Nach 3 Waschungen für

10 Minuten mit 150 ml Maleinsäurepuffer wurde der pH-Wert 5 Minuten mit 150 ml Reaktionspuffer umgestellt, bevor 227 µl NBT und 300 µl BCIP in 20 ml Reaktionspuffer aufgetragen wurden. Spätestens nach 24 h wurde die Farbreaktion durch Waschen mit H<sub>2</sub>O und Trocknen gestoppt.

### 3.7 DNA-Restriktion

Mit der GCG-Software wurde in den SP-A-Genen nach den Erkennungssequenzen von 217 verschiedenen Restriktionsendonukleasen gesucht. Zum Nachweis eines beschriebenen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) wurde die DNA mit 5 Units Enzym für 2 Stunden inkubiert. Im Falle einer kombinierten Restriktion mit zwei Enzymen, die sich im in **Tabelle 3-17** angegebenen Temperaturoptimum unterscheiden, wurde zunächst mit dem Enzym bei der niedrigen Temperatur inkubiert. Nach Deaktivierung des ersten Enzyms bei 80 °C für 15 Minuten wurde mit dem anderen Enzym bei höherer Temperatur inkubiert. PCR-Amplifikate ohne Nebenprodukte wurden zum Teil unter Verzicht auf die Aufreinigung durch Hinzufügen entsprechender Volumina an Magnesiumlösung, Puffer und H<sub>2</sub>O auf die nötigen Pufferbedingungen gebracht und mit 5 Units Enzym inkubiert. Plasmid-DNA wurde vor der gelelektrophoretischen Auftrennung mit RNase inkubiert.

**Tabelle 3-17:** Restriktionsendonukleasen

Gezeigt werden die Schnittstelle ↓ innerhalb der palindromischen Erkennungssequenz, die gelieferte Konzentration, die optimale Temperatur und der verwendete, vom Hersteller mitgelieferte Restriktionspuffer.

Enzym	Palindrom	Konzentration	Optimum	Puffer
<i>ApaI</i>	GGGCC↓C	10 Units/µl	25°C	NEB 4
<i>BamHI</i>	G↓GATCC	20 Units/µl	37°C	NEB <i>for Bam</i>
<i>EcoRI</i>	G↓AATTC	20 Units/µl	37°C	NEB <i>for Eco</i>
<i>HindIII</i>	A↓AGCTT	20 Units/µl	37°C	NEB 2
<i>NcoI</i>	C↓CATGG	10 Units/µl	37°C	NEB 4
<i>NdeI</i>	CA↓TATG	20 Units/µl	37°C	NEB 4
<i>PstI</i>	CTGCA↓G	20 Units/µl	37°C	NEB 3
<i>RsaI</i>	GT↓AC	10 Units/µl	37°C	NEB 1
<i>SmaI</i>	CCC↓GGG	10 Units/µl	25°C	NEB 4
<i>StuI</i>	AGG↓CCT	10 Units/µl	37°C	NEB 2

### 3.8 DNA-Klonierung

Zur **Insertion amplifizierter DNA in einen Vektor** wurde dieser mit dem entsprechenden PCR-Produkt ligiert. In der internen PCR amplifizierte Sequenzen einzelner Exone, die Muster bestimmter allelischer Varianten repräsentieren, wurden im *pCR2.1*-Vektor (Mead et al. 1991) kloniert. Der Vektor liegt als lineare DNA mit beiderseits überhängendem 5'-Thymidin vor. Das PCR-Produkt, an das die Taq-DNA-Polymerase beiderseits ein überhängendes 3'-Adenosin synthetisiert, schließt die DNA zu einem ringförmigen Plasmid. Amplifizierte Sequenzen aus der externen PCR, die auffällige Haplotypen der gesamten kodierenden Sequenz eines SP-A-Gens enthalten, wurden im Vektor *pUC19* (Yanisch-Perron et al. 1985), der bereits als ringförmiges Plasmid vorliegt, kloniert. Mit Hilfe von Endonukleasen wurde der Vektor geöffnet und an den Enden der amplifizierten Gensequenz komplementäre Schnittstellen geschaffen, die die Ligation von Vektor und Plasmid ermöglichen.

Zur **Transformation mit Plasmid-DNA** wurden *Escherichia coli* des Stammes NM 522 (Serogruppe K12) verwendet. Sie waren durch Vorbehandlung auf Eis mit  $MgCl_2$  und  $CaCl_2$  in "kompetente Zellen" (Himeno et al. 1984) verwandelt worden, die in der Lage sind, Plasmid-DNA aus ihrer Umgebung aufzunehmen. Das Einbringen fremder DNA in einen Mikroorganismus und die **Anzucht und Selektion** dieser gentechnisch veränderten Organismen (GVOs) stellen einen genehmigungspflichtigen Eingriff im Sinne des Gentechnikgesetzes (GenG) dar. Die Arbeiten wurden in einem Genlabor der Sicherheitsstufe 1 durchgeführt und bei der zuständigen Behörde angemeldet. Die transformierten Klone wurden gegen Ampicillin, im Falle der Transformation mit *pCR2.1* zusätzlich gegen Kanamycin, selektiert. Klone mit eingefügtem PCR-Produkt wurden anhand fehlender Laktaseaktivität identifiziert.

#### 3.8.1 Insertion amplifizierter DNA in einen Vektor

5  $\mu$ l PCR-Produkt wurden mit je 1  $\mu$ l T4-DNA-Ligase, (10 $\times$ )-Ligationspuffer und gelöstem Vektor *pCR2.1* aus **Tabelle 3-18** und 2  $\mu$ l  $H_2O$  bei 14 °C etwa 18 Stunden inkubiert. Zur Ligation mit *pUC19* wurden PCR-Produkt und Vektor mittels DNA-Restriktion präpariert und das PCR-Produkt mittels Gelexzision isoliert. Das Plasmid wurde in 1/10 Volumen 3-molarer Natriumacetatlösung (pH 4,8) und 2 Volumina 96 %igem Ethanol gefällt (30 Minuten bei -20 °C), zentrifugiert (5 Minuten mit 13.000 Upm) und als getrocknetes Pellet in  $H_2O$  gelöst. Etwa 20 ng Vektor und PCR-Produkt wurden gemischt und mit 1  $\mu$ l T4-DNA-Ligase und 2  $\mu$ l (10 $\times$ )-Ligationspuffer in 20  $\mu$ l Volumen 18 Stunden bei 14 °C inkubiert. Die DNA-

Konzentration war anhand der Ethidiumbromidfluoreszenz im Gel im Vergleich mit Proben bekannter Konzentration geschätzt worden (*ethidium bromide dot quantitation*).

**Tabelle 3-18:** Reagenzien zur Insertion von DNA in einen Vektor

Hersteller: New England Biolabs in Beverly (USA) außer 1): Invitrogen Corporation in Carlsbad, California

Reagenz	Konzentration der Bestandteile
<i>Ligase</i> (10×)-Ligationspuffer	4 Units/μl T4-DNA-Ligase 500 mmol/l TrisHCl (pH 7,8 bei 25°C) 100 mmol/l MgCl <sub>2</sub> 100 mmol/l DTT 10 mmol/l ATP 500 μg/ml BSA
<i>pCR2.1</i> <sup>1)</sup> (Mead et al. 1991)	25 ng/μl lineare Doppelstrang-DNA
<i>pUC19</i> (Yanisch-Perron et al. 1985)	40 ng/μl Plasmid-DNA

### 3.8.2 Transformation mit Plasmid-DNA

Die kompetenten Zellen wurden in einer Suspension mit Glycerin (**Tabelle 3-19**) bei - 70 °C in Portionen von 100 μl gelagert. Sie wurden ½ Stunde auf Eis mit den ligierten Plasmiden sanft suspendiert. Zur Aufnahme der angelagerten Plasmide wurden die Zellen 2 Minuten bei 42 °C inkubiert und einige Minuten auf Eis gestellt. Zur Expression der Antibiotikaresistenzgene wurden sie in 1,5 ml LB-Medium 1 ½ Stunden bei 37 °C inkubiert.

**Tabelle 3-19:** Reagenzien zur Transformation kompetenter Zellen (GibcoBRL Life Technologies, Paisley, UK)

Reagenz	Konzentration der Bestandteile
Kompetente Zellen ( <i>E. coli</i> K12 strain NM 522)	88 μl Zellen in 100 mmol/l CaCl <sub>2</sub> ; 10 mmol/l Tris-Base 12 μl Glycerin
LB-Medium (Lennox L Broth Base; pH 7,0)	10,0 g/l SELECT Pepton 140 5,0 g/l Hefe Extrakt 5,5 g/l NaCl

### 3.8.3 Anzucht und Selektion

Bei Zugabe des als Induktor wirksamen IPTG wird ein unvollständiges β-Galactosidase-Protein exprimiert, das mit dem vom Vektor kodierten Teil der β-Galactosidase ein aktives Enzym bildet (α-Komplementation auf Proteinebene). Die Hydrolyse von X-Gal setzt ein blaugrünes Indoxylderivat frei. Die mit der in der PCR amplifizierten DNA transformierten Klone bleiben

weiß, da die Insertion des DNA-Doppelstrangs in die Klonierungsstelle (*cloning site*) die Expression des komplementierenden  $\beta$ -Galactosidase-Fragments unterbricht.

**Tabelle 3-20:** Reagenzien zur Anzucht und Selektion der Klone (GibcoBRL Life Technologies, Paisley, Scotland)

Reagenz	Konzentration der Bestandteile
LB-Agar	10 g/l SELECT Pepton 140 5 g/l Hefe Extrakt 5 g/l NaCl 12 g/l Agar
Ampicillin	100 mg/ml Binotal®
Kanamycin	125 mg/ml Kanamycinsulfat
IPTG-Lösung	500 mmol/l Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
X-Gal-Lösung	40 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid in N, N-Dimethylformamid

250 ml LB-Agar wurden autoklaviert und nach Zugabe von je 100  $\mu$ l der in **Tabelle 3-20** gezeigten Antibiotika und je 250  $\mu$ l IPTG und X-Gal auf zehn Petrischalen verteilt. Auf den abgekühlten Agarplatten wurden jeweils 100  $\mu$ l der transformierten Zellkulturen mit einem Drigalskispatel verstrichen. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden weiße Kolonien auf eine Agarplatte überimpft und in je 1,5 ml LB-Medium mit Antibiotikazusatz kultiviert. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden die Agarplatten mit den selektierten Kolonien bei 4°C zur erneuten Anzucht aufbewahrt und die Kulturen zur Isolation der Plasmid-DNA verwendet.

### 3.9 Statistische Auswertung der DNA-Sequenzen

Die DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe der WISCONSIN PACKAGE®-Software (GCG Version 9.0) der Genetics Computer Group in Madison, Wisconsin (USA) bearbeitet. Die Numerierung der Nukleotide richtete sich nach den in der "GenBank" des National Center for Biotechnology Information, Rockville Pike, Bethesda (USA) veröffentlichten, genomischen Sequenzen der SP-A-Gene. M30838 (White et al. 1985) ist die später (wie in **Abschnitt 5.1.4** erläutert) korrigierte Sequenz des Wildtypallels 6a2 (SP-A1) und M68519 (Katyal und Singh 1992) die Sequenz des Wildtypallels 1a0 (SP-A2). Alle Polymorphismen wurde entsprechend den jüngsten Empfehlungen der *Nomenclature Working Group* (den Dunnen und Antonarakis 2000) beschrieben. Dabei werden die Aminosäuren beginnend vom Methionin, das vom Startcodon kodiert wird, numeriert. Dies entspricht den Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe um J. Floros, bei denen die Signalsequenz die Aminosäuren 1 - 20 umfasst und die Glutaminsäure am aminoterminalen Ende des prozessierten Peptids als Aminosäure 21 (21Glu) bezeichnet wird.

Die Arbeitsgruppe um F. X. McCormack bezeichnet in ihren Veröffentlichungen die Aminosäure am aminoterminalen Ende des prozessierten Peptids als erste (1Glu). Die “mannosebindende“ Aminosäure 215Glu ist daher bei McCormack Aminosäure 195.

Die bei den statistischen Berechnungen verwendeten *utility programs for analysis of genetic linkage*<sup>®</sup> (Ott 1992) sind jeweils in Klammern angegeben. Zu den Häufigkeiten  $p$  und  $q$  einer Wildtypsequenz und ihrer allelischen Variante und der Proportion Heterozygoter  $h$  wurden die 95 %-Clopper-Pearson-Konfidenzgrenzen aus den Quantilen der F-Verteilung bestimmt (BINOM Version 1.76). Der Heterozygotiegrad, also die nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwartete Proportion Heterozygoter, wurde als *unbiased estimation (Het)* zusammen mit dem Gehalt an Polymorphismusinformation (*PIC*) nach **Gleichung 3-3** aus den Zahlen der beobachteten Allele bestimmt (HET Version 1.80).

$$\left[ \text{Het} = 1 - \sum_{i=1}^a q_i^2 \times \frac{n}{n-1} \right] \wedge \left[ \text{PIC} = 1 - \sum_{i=1}^a q_i^2 - \sum_{i=1}^{a-1} \sum_{j=i+1}^a 2q_i^2 q_j^2 \right]$$

**Gleichung 3-3:** Formeln zur Berechnung von Heterozygotiegrad und PIC (Ott 1992)

a: Zahl der verschiedenen Allele, n: Gesamtzahl beobachteter Allele,  $q_i$ : Häufigkeit des i-ten Allels

Die Konkordanz der Verteilung der beobachteten Genotypen mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests als Wahrscheinlichkeit  $P(\chi_1^2 > \chi^2)$  errechnet, mit der die Prüfgröße überschritten wird. Fällt die Irrtumswahrscheinlichkeit unter ein Signifikanzniveau (gewöhnlich  $\alpha < 0,05$ ), befinden sich die Genotypen nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE Version 1.05). Die Häufigkeit der Haplotypen wurde nach der *maximum likelihood*-Methode mit 50 Iterationen aus der Zahl der beobachteten Genotypen unter Annahme der Kopplung beider SP-A-Gene geschätzt (ASSOCIATE Version 2.35).

In Subpopulationen voneinander abweichende Frequenzen wurden in einer 2x2-Kontingenztafel mit einem Freiheitsgrad im Chi-Quadrat-Test auf Signifikanz getestet (CONTING Version 2.71). Die Wahrscheinlichkeit  $P(\chi_1^2 > \chi^2)$  entspricht der Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$ . Der einseitige, exakte Test nach Fisher (2BY2 Version 1.50) wurde angewandt, wenn eine der Feldhäufigkeiten Null, zwei kleiner als fünf oder  $n < 25$  war. Der erforderliche Stichprobenumfang  $n'$  zum Test einer beobachteten gegen eine vorgegebene Proportion und die Umfänge  $n_1$  &  $n_2$  zum Vergleich zweier gleich großer Populationen wurden im Vorzeichentest von Lorenz (Bock 1998) für eine *power* von  $1 - \beta \geq 80\%$  mit Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha < 5\%$  errechnet (SAMPSI Version 6.0 der Stata Corporation, Texas, USA).

## 4 Ergebnisse

Es wurde eine *nested* PCR zur **Isolation und Amplifikation der SP-A-Gensequenzen** etabliert. Bei der **Analyse der SP-A-Gensequenzen** von vierzehn Patienten mit Verdacht auf Defekt eines Surfactantproteins wurden zwei "stille" Einzelbasensubstitutionen im SP-A1-Gen entdeckt, die neue Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) definieren. Ein bisher nur aus dem SP-A1-Gen bekannter Polymorphismus mit Aminosäureaustausch wurde erstmals im SP-A2-Gen belegt. Bei Berücksichtigung der Kopplung aller Polymorphismen war die Definition fünf neuer Allele möglich. Zur Suche (*screening*) nach weiteren Allelen wurden die beobachteten Varianten als Muster-DNA kloniert und zusammen mit DNA-Proben einer **PCR-SSCP-Analyse** zur Detektion des Einzelstrangkonnformationspolymorphismus (*single strand conformation polymorphism*) unterworfen. Eine Häufung bestimmter Varianten konnte bei der im Verhältnis zur genetischen Variabilität geringen Zahl von DNA-Proben nicht belegt werden.

### 4.1 Isolation und Amplifikation der SP-A-Gensequenzen

**Interne Primer und Reaktionsbedingungen** zur Amplifikation der einzelnen Exone, welche DNA-Abschnitte geeigneter Länge zur Sequenzierung oder SSCP-Analyse liefern, wurden experimentell ermittelt. **Externe Primer und Reaktionsbedingungen** zur Isolierung beider SP-A-Gene wurden ebenfalls experimentell optimiert und auf ihre Spezifität geprüft.

#### 4.1.1 Interne Primer und Reaktionsbedingungen

**Protokoll 4-1: *Thermocycling* der internen PCR**

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	
initiale Denaturierung	95 °C	180 Sekunden	
Denaturierung	94 °C	30 Sekunden	25 Zyklen
Hybridisierung	T <sub>a</sub>	25 Sekunden	
Extension	72 °C	30 Sekunden	
finale Extension	72 °C	180 Sekunden	

Die **Primer zur PCR-SSCP-Analyse** wurden möglichst nah an die Spleißregion (*splicing consensus site*) positioniert, um variable Intronsequenzen nicht mit zu amplifizieren. Die **Primer zur DNA-Sequenzierung** mussten 60 bp vor dem Exon beginnen, da der erste DNA-Abschnitt,

der vor dem Farbstoff das Gel verlässt, im hier angewandten

*direct blotting*-Verfahren nicht detektiert werden kann. Variable Regionen innerhalb der Introne wurden ausgeschlossen. Für das mit 75 bp als SSCP-Fragment ohne angrenzende Intronsequenzen zu kurze Exon 3 wurde nur ein Primerpaar für beide Anwendungen definiert. In der internen PCR wurden jeweils 1 µl DNA oder verdünntes PCR-Produkt in 50 µl Reaktionsgemisch mit drei Tropfen Mineralöl (etwa 55 µl) überschichtet und im Thermocycler nach **Protokoll 4-1** zur Reaktion gebracht. **Tabelle 4-1** zeigt die optimalen Reaktionsbedingungen für die ausgewählten Primerpaare.

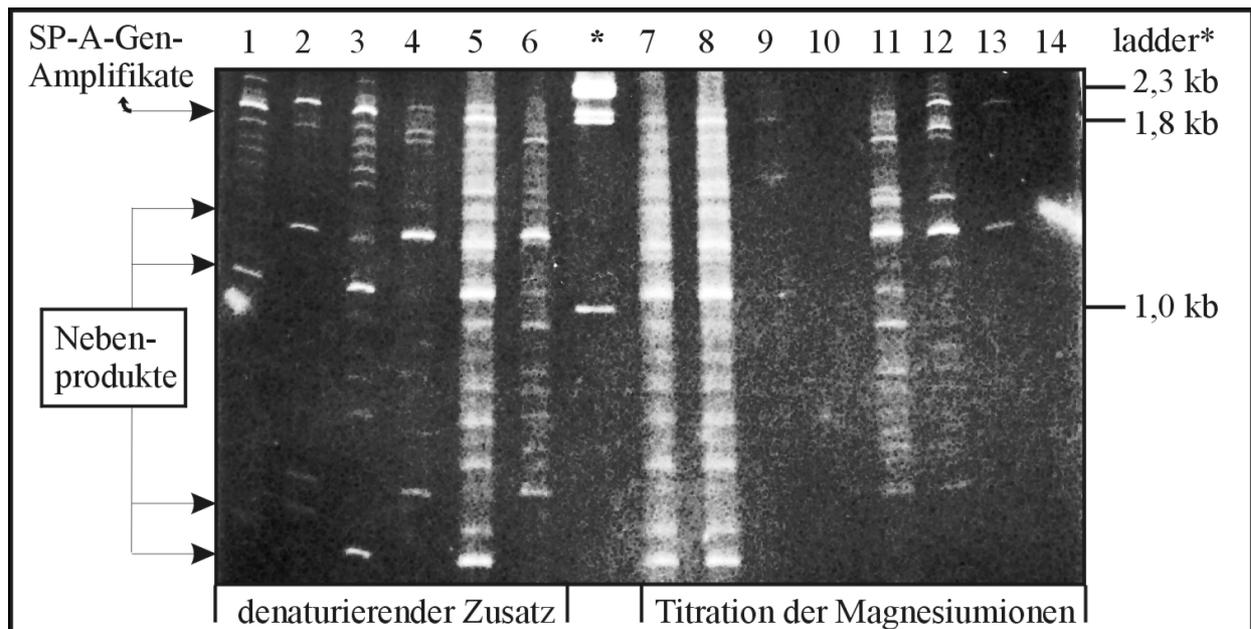
**Tabelle 4-1: Primer und Amplifikationsbedingungen für die internen Polymerasekettenreaktionen**

*Legende:* **EX-** bezeichnet das amplifizierte Exon, **-SSCP** die Primerpaare für die PCR-SSCP-Analyse, **-Sequenz** die Primerpaare für die Gewinnung von Amplifikaten zur DNA-Sequenzierung.

Bezeichnung	Position SP-A1	im Gen SP-A2	DNA-Basensequenz (vom 5'-Ende zum 3' Ende)	T <sub>m</sub> [°C]	T <sub>a</sub> [°C]	(Mg <sup>++</sup> ) [mmol/l]
SPA-EX1-FW2	994-1016	1021-1043	AGATGGGCTCACGGCCATCCCTC	65,9	<b>EX1</b>	<b>-SSCP</b>
SPA-EX1-RE2	1241-1218	1268-1245	AGGGTGGGGTCTGCAGCACAGTAC	62,2		
SPA-EX1-FW3	945-964	971-990	TTCCTGAGTCTGACAGAGC	48,9	<b>EX1</b>	<b>-Sequenz</b>
SPA-EX1-RE3	1279-1261	1307-1289	AGATGGGCCTCCTGAAAAG	50,7		
SPA-EX2-FW2	1508-1528	1528-1548	ATCCATGTCTCTTTTCTCTGC	55,9	<b>EX2</b>	<b>-SSCP</b>
SPA-EX2-RE	1693-1674	1712-1693	CTGTGCCCATGTTTCCACTG	53,6		
SPA-EX2-FW	1451-1470	1471-1490	GATAATGGGCATCGAGTCTC	48,5	<b>EX2</b>	<b>-Sequenz</b>
SPA-EX2-RE2	1775-1757	1793-1775	CTTAGGTTGAGCCAAATGC	47,5		
SPA-EX3-FW	2313-2331	2333-2351	TTCCAGGATTGCAGATGGC	53,2	<b>EX3</b>	
SPA-EX3-RE	2533-2514	2555-2536	GAGGGGAATTTGTGGGAAAC	52,3		
SPA-EX4-FW	2915-2934	2927-2946	ACAAAGTGGTCAAGTGGCCTG	52,3	<b>EX4</b>	<b>-SSCP</b>
SPA-EX4-RE2	3354-3334	3366-3346	GTCCCATGGCCTAAATGCCTC	61,8		
SPA-EX4-FW3	2874-2891	2886-2903	ATCTGGTAGCAGAGACCC	42,9	<b>EX4</b>	<b>-Sequenz</b>
SPA-EX4 RE	3413-3395	3427-3409	GCATCTCACAGACCAAGTG	45,2		

#### 4.1.2 Externe Primer und Reaktionsbedingungen

Die **diskriminierenden Primer** wurden in die genetisch stabilere 3'-UT-Region von Exon 4 und die unmittelbare Umgebung der Exone A - D plziert. Mögliche *forward*-Primer wurden unmittelbar vor Exon A, in und um Exon B sowie 100 bp vor Exon D identifiziert, *reverse*-Primer 150 bp nach dem Stoppcodon (**Tabelle 3-12**). Kombinationen der Primer SPA-1-FW-01 mit SPA-1-RE-01, SPA-2-FW-01 mit SPA-2-RE-01, SPA-2-FW-02 mit SPA-2-RE-02, SPA-1-FW-05 mit SPA-1-RE-05, SPA-1-FW-04 mit SPA-1-RE-01, -05, -06 oder -07 und SPA-1-FW-11, -12 oder -13 mit SPA-1-RE-8 amplifizierten DNA bei (Mg<sup>++</sup>) = 2 – 2,5 mmol/l.



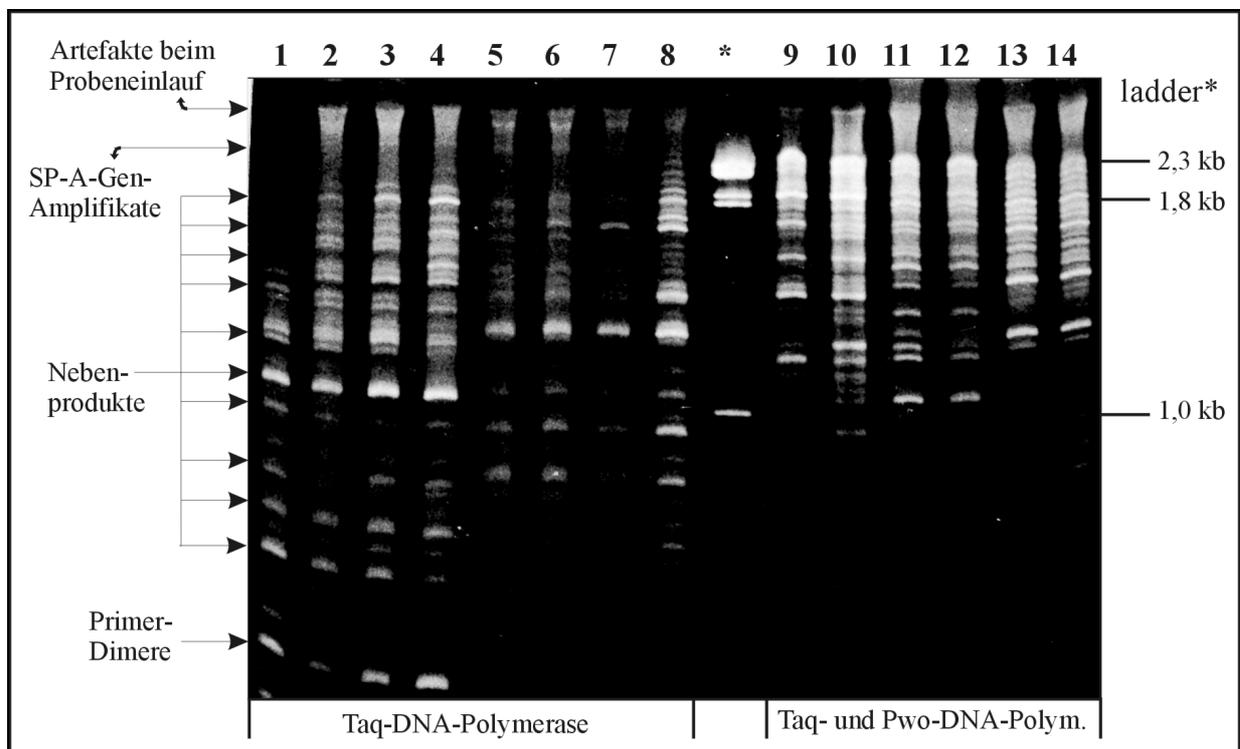
**Abbildung 4-1:** Optimierung der externen PCR durch Modifikation des Reaktionspuffers

*DNA-Qualität:* frisch isoliert in Spur 1 und 2; gefrorene Proben in Spur 3 - 14.

*Primer:* SPA-1-FW-01/RE-01 in Spur 1, 3, 5 und 7-10; SPA-2-FW-01/RE-01 in Spur 2, 4, 6 und 11 - 14.

*Magnesium* [ $Mg^{++}$ ]: 1 mmol/l in Spur 10 + 14; 1,5 mmol/l in 9 + 13; 2 mmol/l in 8 + 12; 2,5 mmol/l in 7 + 11.

*Ammoniumsulfat:*  $[(NH_4)_2SO_4]$  = 5 mmol/l in Spur 5 und 6,  $[(NH_4)_2SO_4]$  = 10 mmol/l in Spur 3 und 4.



**Abbildung 4-2:** Amplifikation der SP-A-Gene durch Polymerasen mit und ohne fehlerkorrigierende Aktivität

*Primer:* SPA-1-FW-01/RE-01 in Spur 1-4 und 9-12; SPA-2-FW-01/RE-01 in Spur 5-8 und 13-14.

*Magnesium* [ $Mg^{++}$ ]: 2 mmol/l in 1+5+9+13; 3 mmol/l in 2+6+10+14; 4 mmol/l in 3+7+11; 5 mmol/l in 4+8+12.

Denaturierende **Additiva** sollten durch unspezifische Anlagerung (*misannealing*) der Primer

entstandene Nebenprodukte verringern (Newton und Graham 1997). Frisch isolierte DNA erzielte den gleichen Effekt in **Abbildung 4-1**. Enzyme mit 3'→5'-Exonuklease-Aktivität wie Pwo-DNA-Polymerase erhöhten gegenüber Polymerasen ohne fehlerkorrigierende (*proof reading*) Aktivität die Ausbeute der PCR, ohne die Spezifität zu verbessern, wie **Abbildung 4-2** zeigt. Auch die **touchdown-Technik** erhöhte die Spezifität der Primerbindung nur wenig.

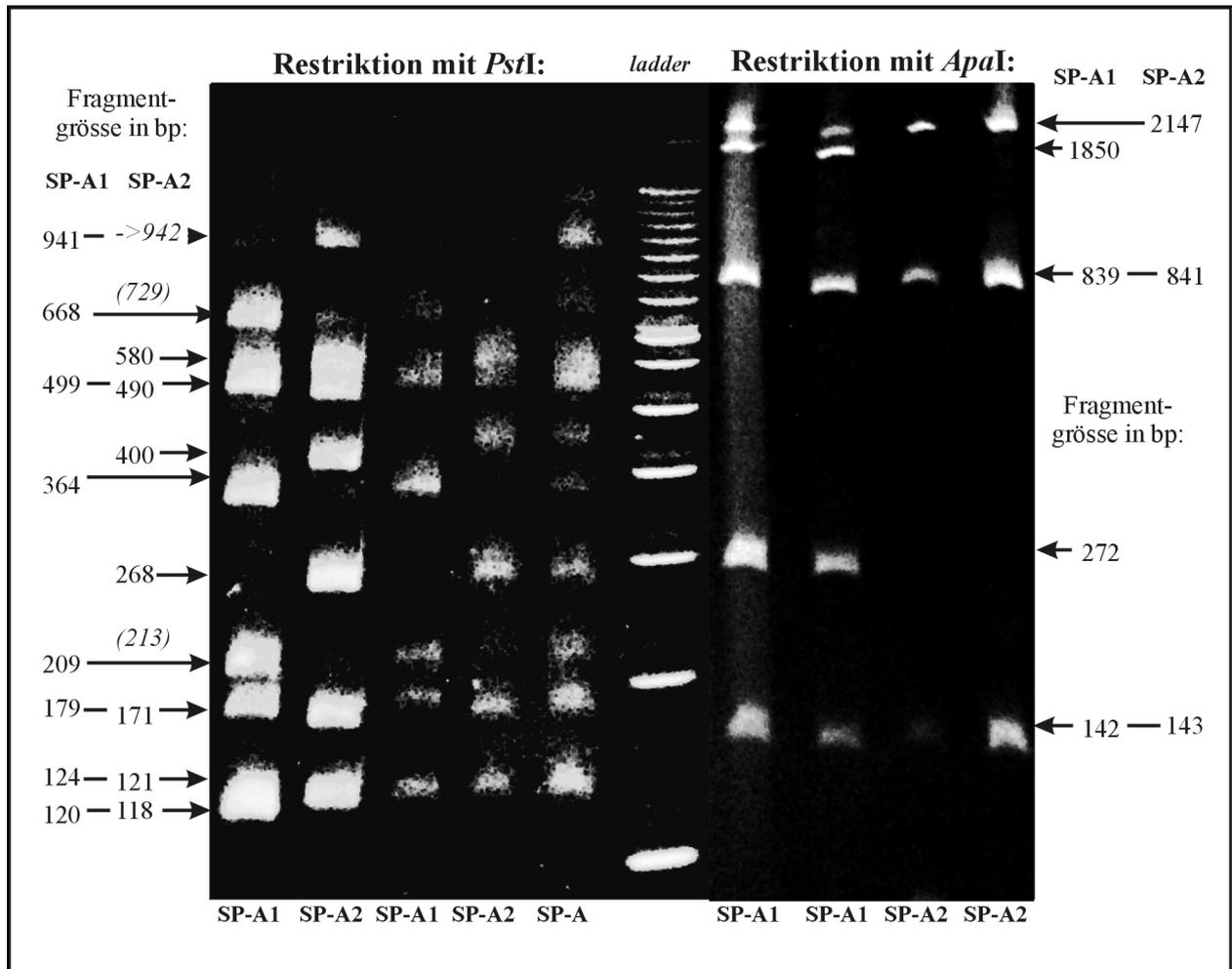
**Tabelle 4-2:** Externe Primer zur Amplifikation der SP-A-Gene (diskriminierende Nukleotide sind unterstrichen)  
\*: Beim nichtdiskriminierenden Primerpaar ist nur die Position im SP-A1-Gen angegeben, **R** steht für A und G.

Bezeichnung	Nukleotide	Nukleotidsequenz (vom 5'-Ende zum 3' Ende)	T <sub>m</sub> [°C]
SPA-1-FW-EXT	534-572	AGGTCGCTGATTTCTTGGAGCCTGAAAAGAA <u>AGTAACAC</u>	71,1
SPA-1-RE-EXT	3637-3606	AAGGAACTGGACCAGATGGGGAATAAGGAG <u>GG</u>	69,7
SPA-2-FW-EXT	560-597	GTCGCTGATTTCTTGGAGCCTGAAAAGAAGGTA <u>ACTGG</u>	72,1
SPA-2-RE-EXT	3649-3618	5'-AAGGAACTGGACCAGATGGGGAATAAGGA <u>AGC</u>	68,5
SPA-FW-EXT	532-570*	TCAGGTCGCTGATTTCTTGGAGCCTGAAAAGA <u>ARGTAAC</u>	76,5
SPA-RE-EXT	3658-3625*	CACTGCTGCCATCTGTAAGTGAACGA <u>ACTGGACC</u>	71,1

Durch die 5'-terminale Verlängerung von SPA-1-FW-13 und SPA-2-FW-4 wurden die in **Tabelle 4-2** charakterisierten externen, diskriminierenden Primer für SP-A1 und SP-A2 sowie korrespondierende *reverse*-Primer ermittelt. Bei [Mg<sup>++</sup>] = 2,2 mmol/l und T<sub>a</sub> = 70 °C herrschten optimale Reaktionsbedingungen. Das unspezifische Primerpaar diente Testzwecken. Nach Einbau eines *hot starts* durch die in **Protokoll 4-2** gezeigte initiale Aktivierung der DNA-Polymerase bei 95 °C wurde in 50 Zyklen genug PCR-Produkt zur DNA-Sequenzierung gebildet. Durch RFLP-Analysen mit *ApaI* und *PstI* wurde die Identität der amplifizierten Gene anhand der in **Abbildung 4-3** gezeigten invarianten Polymorphismen überprüft. Die DNA-Sequenzen in **Abbildung 4-4** demonstrieren die klare Isolierung beider Gene in der *nested* PCR.

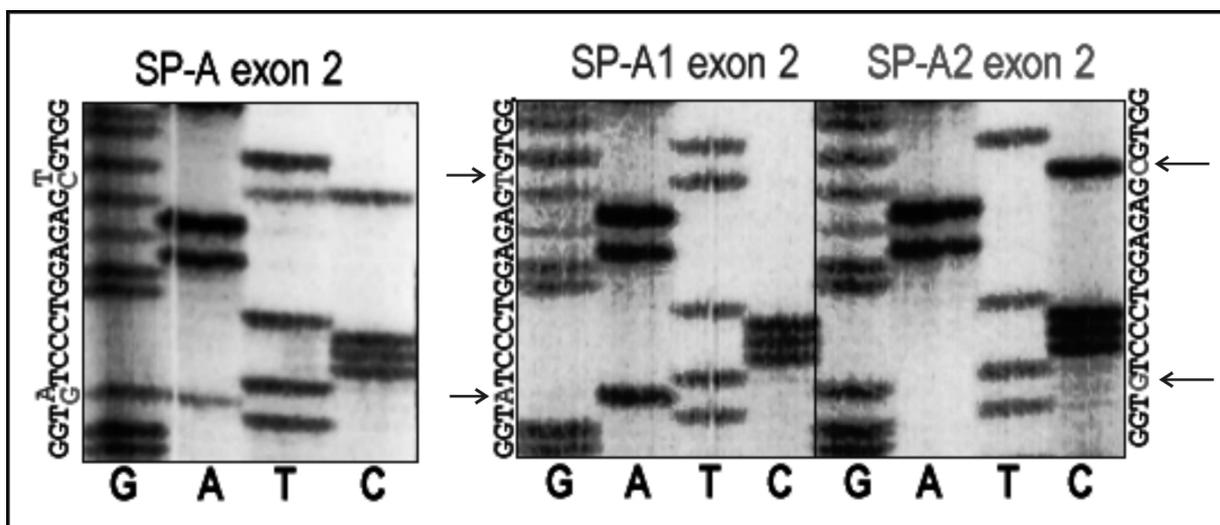
**Protokoll 4-2:** *Thermocycling* der externen PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	
initial	95 °C	540 Sekunden	(Enzymaktivierung)
Denaturierung	94 °C	30 Sekunden	50 Zyklen
Hybridisierung	70 °C	25 Sekunden	
Extension	74 °C	150 Sekunden	
final	74 °C	450 Sekunden	(Elongation)



**Abbildung 4-3:** Identifizierung der amplifizierten SP-A-Gene durch RFLP-Analyse

Die Größe der Restriktionsfragmente ist in der jeweiligen Spalte unterhalb des Gens angegeben. Das *Pst*I-Fragment von 942 bp wird in einigen Allelen in Fragmente von 729 und 213 bp geschnitten. In Spur SP-A wurde das Produkt aus der PCR mit den nichtdiskriminierenden Primern SPA-FW-EXT und SPA-RE-EXT aufgetragen.



**Abbildung 4-4:** DNA-Sequenzierung von Exon 2 (Nukleotide 1596\_1615 von SP-A1 bzw. 1616\_1635 von SP-A2) Links: SP-A-Exon 2 aus genomischer DNA mit Polymorphismus 1599A>G (Codon 61) und 1611T>C (Codon 65). Rechts: beide Gensequenzen isoliert aus Produkten der externen PCR amplifiziert und getrennt sequenziert.

## 4.2 Analyse der SP-A-Gensequenzen

Die zum (bisher nur im SP-A1-Gen beobachteten) Aminosäureaustausch Val50Leu führende Einzelbasensubstitution 1220G>C wurde erstmals im SP-A2-Gen detektiert. **Die neuen Polymorphismen 1162C>T und 3138T>C** wurden bei mehreren Patienten im SP-A1-Gen nachgewiesen. Aus den DNA-Sequenzen aller Exone wurden die **SP-A1- und SP-A2-Genotypen von 14 Patienten**, bei denen nach differentialdiagnostischen Erwägungen der Verdacht auf einen Surfactantproteindefekt bestand, abgeleitet. Die **Häufigkeiten einzelner Polymorphismen** wurden aus der Zahl der jeweils beobachteten DNA-Sequenzen berechnet.

### 4.2.1 Die neuen Polymorphismen 1162C>T und 3138T>C

Bei Patient 7 und Patient 10 wurde der Polymorphismus 1220G>C im SP-A2-Gen detektiert. Die Einzelbasensubstitution führt zum Aminosäureaustausch **Val50Leu**, der im SP-A1-Gen die häufigste Variante darstellt. **Tabelle 4-3** zeigt die Häufigkeit der Variante 50Leu bei den 14 Patienten, deren SP-A2-Gen sequenziert wurde. Bei der in **Tabelle 4-4** gezeigten Verteilung der Genotypen ist mit  $\alpha = 0,77$  kein Verstoß gegen das Hardy-Weinberg-Gesetz nachweisbar.

**Tabelle 4-3:** Allelfrequenzen am Genort SP-A2-Codon 50  
(In Klammern sind jeweils die 95 %-Clopper-Pearson-Konfidenzgrenzen angegeben)

Allel	Allelfrequenz	n = 28 Allele
1220G (50Val):	$p = 92,9 (76,5-99,1) \%$	26 Allele
1220C (50Leu):	$q = 7,1 (0,9-23,5) \%$	2 Allele

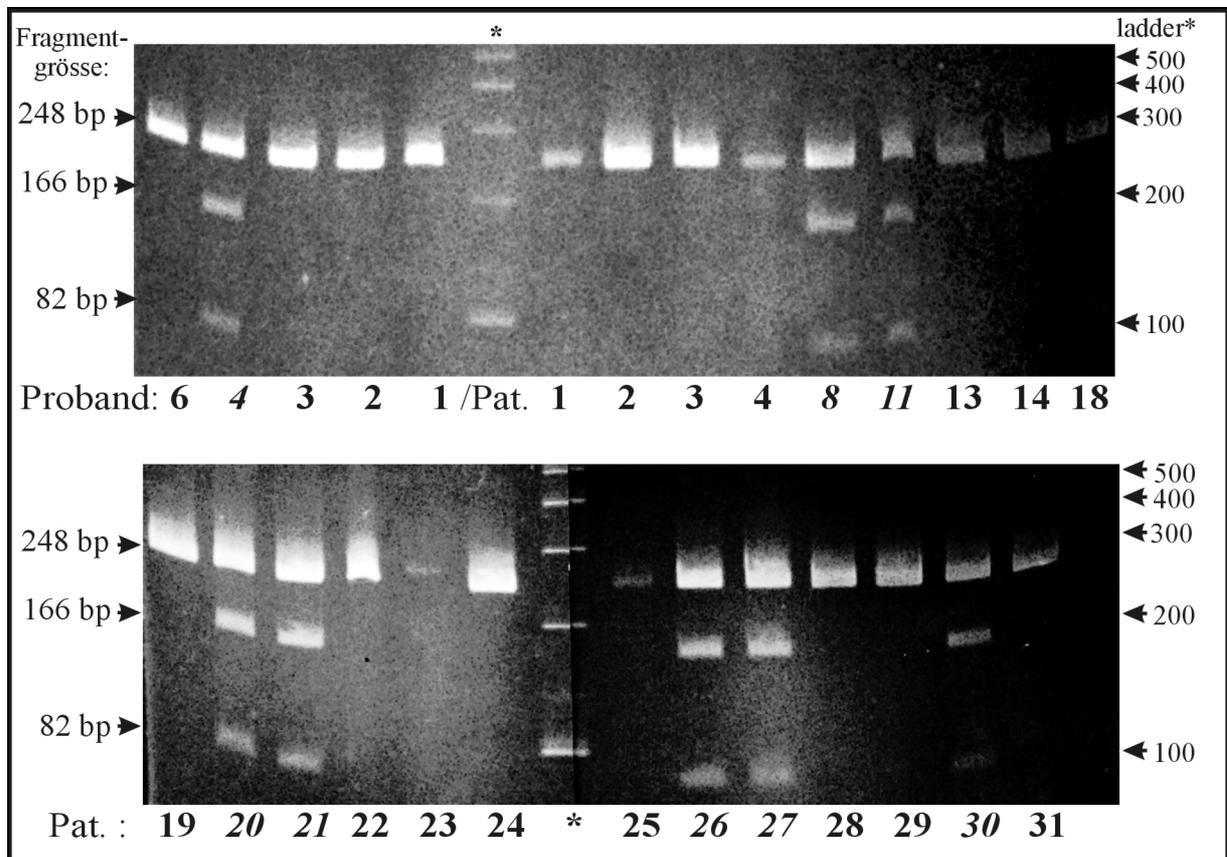
**Tabelle 4-4:** Genotypfrequenzen am Genort SP-A2-Codon 50

Die Konkordanz  $P(\chi_1^2 > \chi^2)$  mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz beträgt im Chi-Quadrat-Test:  $P(\chi_1^2 > \chi^2) = 77\%$ .

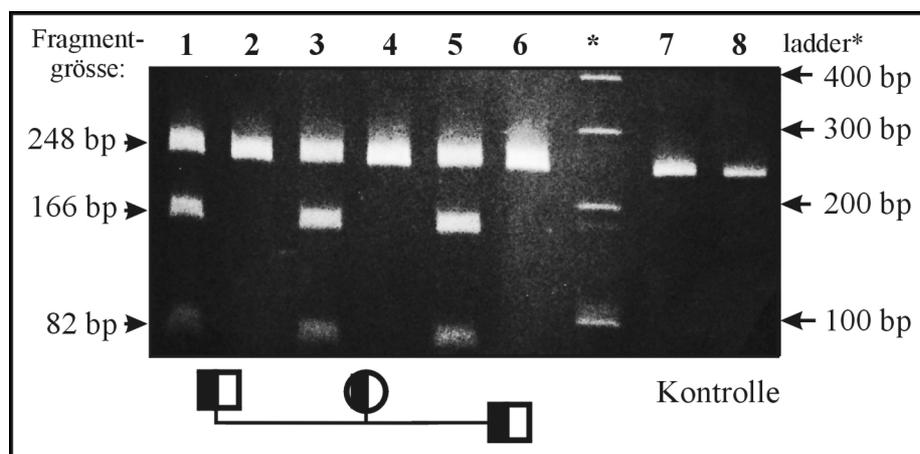
Genotyp	Frequenz (N = 13 Patienten)
[1220G]+[1220G] (50Val/50Val):	84,6 % (P = 11 Patienten)
[1220C]+[1220G] (50Leu/50Val):	15,4 % (H = 2 Patienten)
[1220C]+[1220C] (50Leu/50Leu):	0,0 % (Q = 0 Patienten)

Bei Patient 8, Patient 12 und einem Mitarbeiter wurde in einem Allel des SP-A1-Gens der Polymorphismus **1162C>T** in Codon 39, welches weiterhin Histidin kodiert, entdeckt. Die Substitution schafft eine Restriktionsschnittstelle für *NcoI*. Die RFLP-Analyse aller 31 Patienten

detektierte 7 Heterozygote, die in **Abbildung 4-5** zu sehen sind. Wie die Familienanalyse in **Abbildung 4-6** zeigt, waren beide Elternteile des Mitarbeiters heterozygot für 1162C>T.



**Abbildung 4-5:** RFLP-Analyse mit *NcoI* am Genort SP-A1-Codon 39  
Heterozygote Träger der Variante 1162C>T sind *kursiv* gesetzt.



**Abbildung 4-6:** Familienanalyse am Genort SP-A1-Codon 39 (Amplifikate von SP-A-Exon 1 geschnitten mit *NcoI*)  
ungerade Nummern: aus dem SP-A1-Gen; gerade Nummern aus dem SP-A2-Gen amplifiziert  
Spuren 1 & 2: Vater, 3 & 4: Mutter, 5 & 6: Mitarbeiter mit Variante, 7 & 8: Mitarbeiter ohne Variante

Der Vergleich der Frequenz der Variante bei Patienten und Mitarbeitern in der Kontingenztafel in **Tabelle 4-5** wird im Chi-Quadrat-Test nicht signifikant ( $\alpha = 0,90$ ). Aus der Verteilung der Genotypen in **Tabelle 4-6** ergibt sich kein Verstoß gegen das Hardy-Weinberg-Gesetz.

**Tabelle 4-5:** 2×2-Kontingenztafel mit Häufigkeit der Einzelbasensubstitution am Genort SP-A1-Codon 39

Die Signifikanz beträgt im Chi-Quadrat-Test:  $P(\chi_1^2 > \chi^2) = 0,90$ .

Allele (n):	Gesamt (72 Allele)	Patientenallele (62)	Mitarbeiterallele (10)
1162C :	<b>64</b>	55	9
Frequenz p:	<b>88,9 (79,3-95,1) %</b>	88,7 (78,1-95,1) %	90,0 (55,5-99,7) %
1162T:	<b>8</b>	7	1
Frequenz q:	<b>11,1 (4,9-20,7) %</b>	11,3 (4,7-21,9) %	10,0 (0,3-44,5) %

**Tabelle 4-6:** Häufigkeit der beobachteten Genotypen am Genort SP-A1-Codon 39

Die Konkordanz  $P(\chi_1^2 > \chi^2)$  mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz wurde im Chi-Quadrat-Test berechnet.

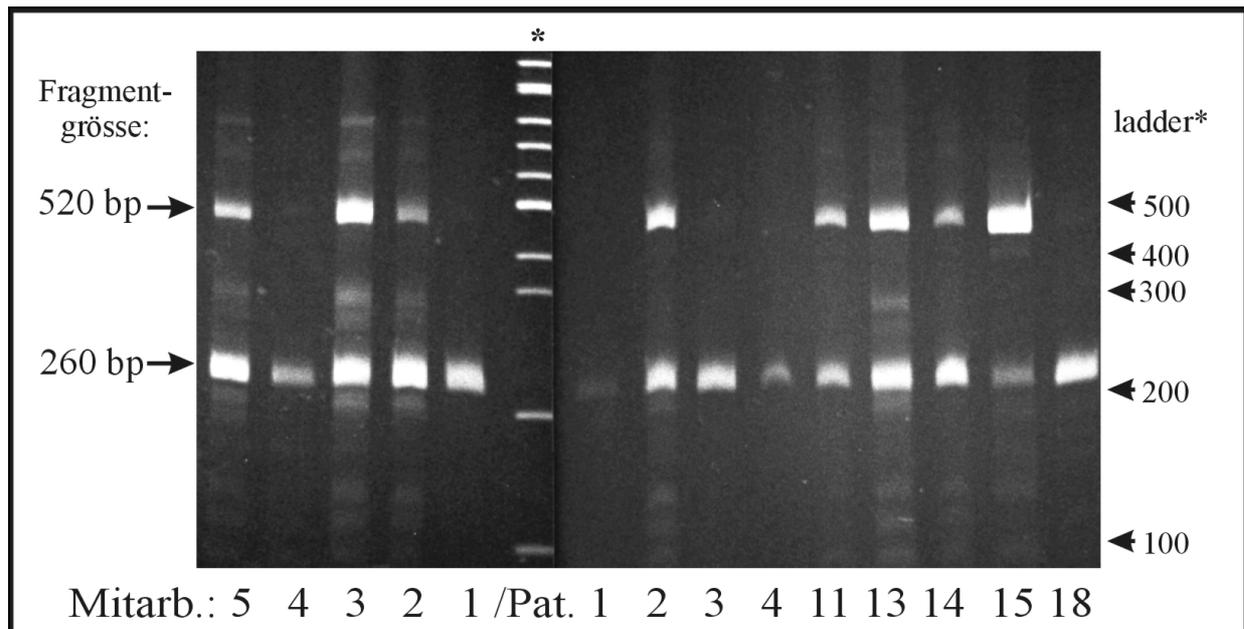
Genotypen (N):	Gesamt (36)	Patienten (31)	Mitarbeiter (5)
[1162C]+[1162C] (P):	75,0% (28)	74,2% (24)	80,0% (4)
[1162C]+[1162T] (H):	25,0% (8)	25,8% (7)	20,0% (1)
[1162T]+[1162T] (Q):	0,0% (0)	0,0% (0)	0,0% (0)
<b>Konkordanz:</b>	$P(\chi_1^2 > \chi^2) = 45 \%$	$P(\chi_1^2 > \chi^2) = 48 \%$	$P(\chi_1^2 > \chi^2) = 80 \%$

Die in einem Allel des SP-A1-Gens von Patient 15 entdeckte Variante **3138T>C** deletiert eine *NdeI*-Restriktionsstelle. Das betroffene Codon 184 kodiert weiterhin Tyrosin. In der Kontingenztafel in **Tabelle 4-7** wird der Vergleich der durch DNA-Sequenzierung ( $q \approx 3,6 \%$ ) oder RFLP-Analyse bestimmten Frequenz ( $q \approx 15,9 \%$ ) mit  $\alpha = 0,10$  annähernd signifikant.

**Tabelle 4-7:** 2×2-Kontingenztafeln mit Häufigkeit der Einzelbasensubstitution am Genort SP-A1-Codon 184

Allele (n):	Gesamt (72)	Sequenz (28)	RFLP (44)	Patienten (62)	Mitarbeiter (10)
3138T:	<b>64</b>	27	37	54	10
p [%]:	<b>88,9 (79,3-95,1)</b>	96,4 (81,7-99,9)	84,1 (69,9-93,4)	87,1 (76,1-94,3)	100 (74,1-100)
3138C:	<b>8</b>	1	7	8	0
q [%]:	<b>11,1 (4,9-20,7)</b>	3,6 (0,1-18,3)	15,9 (6,6-30,1)	12,9 (5,7-23,9)	0 (0,0-25,9)
<b>Signifikanz:</b>		Chi-Quadrat-Test: $P(\chi_1^2 > \chi^2) = 0,10$	ex. Fisher-Test: $P_{(a)} = 0,28$		

Ursache war der unvollständige DNA-Verdau durch *NdeI* trotz verlängerter Inkubationszeit, wie bei den Proben von Mitarbeiter 3 und 5 sowie Patient 11 und 14 in **Abbildung 4-7** zu sehen.



**Abbildung 4-7:** Beispiel für unvollständigen DNA-Verdau durch NdeI (4 Stunden Inkubation mit 10 Units Enzym) Alle Mitarbeiter waren homozygot für den Wildtyp. Die Patienten 2, 13, und 15 tragen die Variante.

Der Unterschied zwischen der bei den Patienten ( $q \approx 12,9\%$ ) und den Mitarbeitern ( $q \approx 0\%$ ) beobachteten Frequenz wurde im exakten Fisher-Test mit  $\alpha = 0,28$  nicht signifikant. Aus der in **Tabelle 4-8** wiedergegebenen Verteilung der Genotypen in den gebildeten Subpopulationen konnte kein Verstoß gegen das Hardy-Weinberg-Gesetz abgeleitet werden.

**Tabelle 4-8:** Häufigkeit der beobachteten Genotypen am Genort (SP-A1)-Codon 184

Die Konkordanz  $P(\chi_1^2 > \chi^2)$  mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz wurde im Chi-Quadrat-Test berechnet.

Population (N):	Gesamt (36)	Patienten (31)	Probanden (5)	Sequenz (14)	RFLP (22)
[3138T]+[3138T]:	2,8% (P=1)	3,2% (P=1)	0,0% (P=0)	0,0% (P=0)	4,5% (P=1)
[3138C]+[3138T]:	16,7% (H=6)	19,4% (H=6)	0,0% (H=0)	7,1% (H=1)	22,7% (H=5)
[3138C]+[3138C]:	80,6% (Q=29)	77,4% (Q=24)	100,0% (Q=5)	92,9% (Q=13)	72,7% (Q=16)
<b>Konkordanz:</b>	$P(\chi_1^2 > \chi^2)=35\%$	$P(\chi_1^2 > \chi^2)=44\%$	$P(\chi_1^2 > \chi^2)=100\%$	$P(\chi_1^2 > \chi^2)=89\%$	$P(\chi_1^2 > \chi^2)=48\%$

#### 4.2.2 SP-A1- und SP-A2-Genotypen von 14 Patienten

Von 14 Patienten, die nach den in **Abschnitt 3.1.2** dargelegten Kriterien ausgewählt worden waren, wurden die DNA-Sequenzen aller Exone beider SP-A-Gene bestimmt. Da diploide Proben amplifiziert und sequenziert wurden, liegen an heterozygoten Genorten zwei verschiedene DNA-Basen vor, die ähnlich wie in der Sequenz auf der linken Seite in **Abbildung 4-4** nebeneinander als Farbbanden auf der Membran auftauchen. In **Tabelle 4-9** werden die

daraus abgeleiteten Sequenzen beider Allele von SP-A1 gezeigt; aus Gründen der Übersichtlichkeit werden nur die Sequenzen der polymorphen Codons wiedergegeben. Nach dem in **Tabelle 1-2** wiedergegebenen Schema lassen sich die Allele des SP-A1-Gens an bestimmten Einzelbasensubstitutionen in Exon 1, 2 und 4 erkennen. Außer dem Wildtyp 6a2 haben alle Allele die Substitution 1193G>C. Allel 6a4 trägt darüber hinaus die Substitutionen [1544A>G + 3241C>T], während [1101T>C + 1544A>G + 2985A>G] das Allel 6a definiert. Die bei den Patienten 8, 12 und 15 entdeckten neuen Einzelbasensubstitutionen sind nur durch das Auftreten unbekannter Allele zu erklären, die eine Erweiterung des Schemas erfordern.

**Tabelle 4-9: Polymorphe Codons in den Exonsequenzen von SP-A1 und dementsprechende Allele der Patienten**  
Zur Orientierung ist die seltene Variante **hervorgehoben**. Neu beschriebene Polymorphismen sind *kursiv* gesetzt. Unterstrichene Haplotypen wurden durch Klonierung gesichert.

SP-A1	Exon:	1	1	1	2	4	4	4
	Einzelbase:	1101T>C	<i>1162C&gt;T</i>	1193G>C	1544A>G	2985A>G	<i>3138T&gt;C</i>	3241C>T
Patient	Aminosäure:	Val19Ala	<i>(39His)</i>	Val50Leu	(62Pro)	(133Thr)	<i>(184Tyr)</i>	Arg219Trp
3	6a2	GTG	<i>CAC</i>	GTC	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
	6a2	GTG	<i>CAC</i>	GTC	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
4	6a2	GTG	<i>CAC</i>	GTC	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
	6a2	GTG	<i>CAC</i>	GTC	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
5	6a3	GTG	<i>CAC</i>	<b>CTC</b>	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
	6a3	GTG	<i>CAC</i>	<b>CTC</b>	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
6	6a	<b>GCG</b>	<i>CAC</i>	<b>CTC</b>	<b>CCG</b>	<b>ACG</b>	<i>TAT</i>	CGG
	6a3	GTG	<i>CAC</i>	<b>CTC</b>	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
7	6a2	GTG	<i>CAC</i>	GTC	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
	6a3	GTG	<i>CAC</i>	<b>CTC</b>	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
8	6a2	GTG	<i>CAC</i>	GTC	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
	<i>6a*</i>	<u>GTG</u>	<u>CAT</u>	<u>CTC</u>	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
9	6a2	GTG	<i>CAC</i>	GTC	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
	6a3	GTG	<i>CAC</i>	<b>CTC</b>	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
10	6a2	GTG	<i>CAC</i>	GTC	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
	6a3	GTG	<i>CAC</i>	<b>CTC</b>	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
12	6a2	GTG	<i>CAC</i>	GTC	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
	<i>6a*</i>	<u>GTG</u>	<u>CAT</u>	<u>CTC</u>	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
15	<i>6a#</i>	GTG	<i>CAC</i>	<b>CTC</b> o. GTC	CCA	ACA	<b>TAC</b>	CGG
	6a2 oder 6a3	GTG	<i>CAC</i>	GTC o. <b>CTC</b>	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
16	6a2	GTG	<i>CAC</i>	GTC	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
	6a2	GTG	<i>CAC</i>	GTC	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
17	6a2	GTG	<i>CAC</i>	GTC	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
	6a2	GTG	<i>CAC</i>	GTC	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
34	6a2	GTG	<i>CAC</i>	GTC	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
	6a2	GTG	<i>CAC</i>	GTC	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
37	6a3	GTG	<i>CAC</i>	<b>CTC</b>	CCA	ACA	<i>TAT</i>	CGG
	6a4	GTG	<i>CAC</i>	<b>CTC</b>	<b>CCG</b>	ACA	<i>TAT</i>	<b>TGG</b>

Die DNA-Klonierung isoliert die amplifizierten Sequenzen beider Allele eines heterozygoten Patienten voneinander. Elf Klone waren erfolgreich mit der amplifizierten DNA-Sequenz von SP-A1-Exon 1 von Patient 8 transformiert worden. In einer kombinierten DNA-Restriktion mit *NcoI* und *EcoRI* wurde die klonierte Sequenz aus der Plasmid-DNA herausgeschnitten und auf das Vorliegen der Substitution **1162C>T** getestet. Bei der Sequenzierung von acht *NcoI*-positiven Klonen wurde siebenmal die Substitution 1193G>C ermittelt, der achte Klon hatte in Codon 50 die Valin kodierende Wildtypsequenz "GTC". Mögliche Ursachen für die Entstehung dieser mutierten Sequenz (Klon 8.2 in **Tabelle 4-13**) werden in **Abschnitt 5.1.3** diskutiert. Da die übrigen polymorphen Genorte der Wildtypsequenz entsprechen, tragen Patient 8 und 12 neben dem Wildtypallel 6a2 ein neues **Allel 6a\*** des Haplotyps [1162C>T + 1193G>C], das dieselbe Aminosäuresequenz wie Allel 6a3 kodiert.

Patient 15 besitzt ein unbekanntes Allel mit der Substitution **3138T>C** und ist gleichzeitig heterozygot in Codon 50. Um zu bestimmen, ob dieses Allel in Exon 1 die Wildtypsequenz oder die Substitution 1193G>C trägt, musste fast die gesamte SP-A1-Sequenz kloniert werden. In den klonierten Sequenzen waren beide Kombinationen vorhanden, so dass die Frage nicht eindeutig beantwortet werden konnte (vergleiche dazu weiter unten den Hinweis auf das Phänomen der *jumping PCR* bei der Klonierung des SP-A2-Gens). Patient 15 trägt daher entweder ein Wildtypallel 6a2 und ein **Allel 6a#** des Haplotyps [1193G>C + 3138T>C] oder ein Allel 6a3 des Haplotyps [1193G>C] und ein **Allel 6a#** des Haplotyps [3138T>C].

**Tabelle 4-10** gibt die Ergebnisse der DNA-Sequenzierung der SP-A2-Amplifikate wieder. Da die Zahl der verschiedenen SP-A2-Allele größer ist, kann das in **Tabelle 1-3** wiedergegebene Schema nicht jeden Genotyp aus einer diploiden Probe identifizieren. Nur Allel 1a ist durch die Substitution 1649G>C charakterisiert. Bei Nachweis der Sequenz [3018C>T + 3265C>A] in Exon 4 entscheidet die Anwesenheit der Substitution 1098A>C in Exon 1, ob Allel 1a1 oder Allel 1a3 vorliegt. Allel 1a2 liegt vor, wenn es sich abgesehen von der Substitution 1098A>C um die Wildtypsequenz handelt. Liegt wie bei Patient 4 sowohl in Exon 1 wie auch in Exon 4 Heterozygotie vor, kann der Genotyp nicht aus der diploiden Probe bestimmt werden.

Die bei Patient 7 und 10 entdeckte Substitution **1220G>C**, die zum Aminosäureaustausch **Val50Leu** führt, lässt sich durch das Auftreten eines bisher nicht beschriebenen Allels erklären. Sieben erfolgreich mit der aus DNA von Patient 10 amplifizierten Sequenz von SP-A2-Exon 1 transformierte Klone wurden sequenziert. Während zwei die Wildtypsequenz und vier den Haplotyp [1098A>C + 1220G>C] aufwiesen, war der siebte (Klon 10.11 in **Tabelle 4-14**) mit dem Haplotyp [1118T>C + 1220G>C] offenbar als Polymerasefehler in der PCR entstanden.

**Tabelle 4-10:** Polymorphe Codons in den Exonsequenzen von SP-A2 und dementsprechende Allele der Patienten (Fragliche Allele bei Patient 4 und 12 gingen nicht in die Allel- und Haplotypfrequenzen in **Abschnitt 5.2.3** ein)

SP-A2	Exon:	1	1	2	4	4
Patient	Einzelbasensubstitution: Aminosäureaustausch:	1098A>C Asn9Thr	1220G>C Val50Leu	1649G>C Ala91Pro	3018C>T (140Ser)	3265C>A Gln223Lys
3	1a0 1a0	AAC AAC	GTC GTC	GCT GCT	TCC TCC	CAG CAG
(4)	(1a0 oder 1a2) (1a1 oder 1a3)	AAC oder ACC ACC oder AAC	GTC GTC	GCT GCT	TCC TCT	CAG AAG
5	1a0 1a2	AAC ACC	GTC GTC	GCT GCT	TCC TCC	CAG CAG
6	1a 1a2	ACC ACC	GTC GTC	CCT GCT	TCC TCC	CAG CAG
7	1a3 1a*	AAC ACC	GTC CTC	GCT GCT	TCT TCC	AAG CAG
8	1a2 1a#	ACC AAC	GTC GTC	GCT GCT	TCC TCT	CAG CAG
9	1a0 1a0	AAC AAC	GTC GTC	GCT GCT	TCC TCC	CAG CAG
10	1a* 1a#	ACC AAC	CTC GTC	GCT GCT	TCC TCT	CAG CAG
(12)	(1a§) (1a§)	ACC ACC	GTC GTC	CCT CCT	TCT TCT	AAG AAG
15	1a0 1a2	AAC ACC	GTC GTC	GCT GCT	TCC TCC	CAG CAG
16	1a0 1a0	AAC AAC	GTC GTC	GCT GCT	TCC TCC	CAG CAG
17	1a0 1a0	AAC AAC	GTC GTC	GCT GCT	TCC TCC	CAG CAG
34	1a3 1a3	AAC AAC	GTC GTC	GCT GCT	TCT TCT	AAG AAG
37	1a1 1a1	ACC ACC	GTC GTC	GCT GCT	TCT TCT	AAG AAG

Durch Restriktion eines SP-A2-Amplifikats aus der DNA von Patient 10 mit *StuI* in Exon C und Codon 168 wurde eine Sequenz von 2.302 bp (DNA-Basen 860C\_3161G) gebildet und mit *pUC19* ligiert. Nur 2 von 24 transformierten Klonen waren laktaseinaktiv. Da bei Restriktion mit *BamHI* keine Sequenz herausgeschnitten werden konnte, muss die Vielfach-Klonierungsstelle (*multiple cloning site*) dieser Plasmide samt komplementierendem  $\beta$ -Galactosidasegen deletiert gewesen sein. Durch Kombination der *StuI*-Restriktion mit *HindIII*, welches nach Codon 155 schneidet, wurde ein überhängendes 3'-Ende am SP-A2-Amplifikat (DNA-Basen 860C\_3123A) gebildet. Von neun transformierten Klonen enthielten drei die SP-A2-Sequenz. Die DNA-Sequenzierung zeigte den **Haplotyp [1098A>C + 1220G>C] mit der Wildtypsequenz "TCC" in Codon 140** in zwei der Klone, der dritte Klon wies sowohl in Exon 1 als auch in Exon 4 die

Wildtypsequenz auf. Sein Auftreten könnte durch ein als *jumping PCR* bezeichnetes Phänomen der Regeneration von DNA-Sequenzen während der Amplifikation erklärt werden (Porter-Jord und Garrett 1990) und soll ebenfalls in **Abschnitt 5.1.3** diskutiert werden. Eine mit *SmaI* und *EcoRI* unter Einschluss des variablen Codons 203 gebildete Sequenz von 2.537 bp (DNA-Basen 910\_3446) konnte nicht mit pUC19 ligiert werden. Eine Erklärung wäre das Fehlen der Schnittstelle für *SmaI* im amplifizierten Allel aufgrund einer Intronvariante, so dass das 5'-Ende des nur mit *EcoRI* geschnittenen PCR-Amplifikats (DNA-Basen 560\_3446) nicht zum Vektor komplementär war.

Patient 7 und 10 tragen das neue **Allel 1a\*** des Haplotyps [1098A>C + 1220G>C], das aufgrund des Aminosäureaustausches **Val50Leu** ein SP-A1-Monomer mit neuer Primärstruktur kodiert. Bei Patient 7 ist das zweite Allel 1a3 mit dem Haplotyp [3018C>T + 3265C>A].

Bei Patient 10 hat das zweite Allel abweichend von der Wildtypsequenz lediglich die bekannte, "stille" Einzelbasensubstitution in Codon 140. Dieses neue **Allel 1a#** des Haplotyps [3018C>T] kodiert dasselbe Protein wie Wildtypallel 1a0 und wurde ebenfalls bei Patient 8 nachgewiesen.

Patient 12 ist homozygot für alle vier bisher bekannten Einzelbasensubstitutionen im SP-A2-Gen. Der beobachtete Haplotyp [1098A>C + 1220G>C + 3018C>T + 3265C>A] charakterisiert das neue **Allel 1a§**, das als Einzelbeobachtung in **Abschnitt 5.2.2** näher diskutiert wird.

### 4.2.3 Häufigkeiten einzelner Polymorphismen

Aus den Zahlen der für eine bestimmte Substitution heterozygoten beziehungsweise homozygoten Proben wurde die beobachtete Häufigkeit  $q$  des entsprechenden Polymorphismus im untersuchten Patientenkollektiv sowie die beobachtete Proportion Heterozygoter  $h$  berechnet. Ein Vergleich mit dem erwarteten Heterozygotiegrad  $Het$  kann ebenso wie die Prüfung auf Konkordanz mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz im Chi-Quadrat-Test einen in der studierten Population vorherrschenden Heterozygotenvorteil aufdecken. Die in **Tabelle 4-11** gezeigte Analyse der einzelnen Polymorphismen im SP-A1-Gen zeigte jeweils eine hohe Konkordanz mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz, die Zahl Heterozygoter entsprach dem Erwartungswert.

Im SP-A2-Gen lag die erwartete Häufigkeit Heterozygoter  $Het$  für die Substitution 3265C>A in Codon 223 mit 42,3 % am oberen Ende des 95 %-Konfidenzintervalls (1,8 - 42,8 %) der beobachteten Heterozygotie  $h$ . Sowohl bei diesem zum Aminosäureaustausch Gln223Lys

führenden Polymorphismus wie auch bei der zum Aminosäureaustausch Ala91Pro führenden Substitution 1649G>C wurde die erhöhte Zahl Heterozygoter als Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht mit  $\alpha = 0,019$  beziehungsweise  $\alpha = 0,015$  in **Tabelle 4-12** signifikant.

**Tabelle 4-11:** Häufigkeiten der einzelnen Polymorphismen im SP-A1-Gen (n = 28 Allele)

Die Proportion Heterozygoter  $h$  wurde mit dem erwarteten Heterozygotiegrad  $Het$  verglichen.

Die Konkordanz  $P(\chi_1^2 > \chi^2)$  mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz wurde im Chi-Quadrat-Test berechnet.

Variante	$q$ [%]	$h$ [%]	Het [%]	$P(\chi_1^2 > \chi^2)$
<b>1101T&gt;C (Val19Ala)</b>	<b>3,6</b> (0,1 - 18,3)	7,1 (0,2 - 33,9)	7,1	89 %
1162C>T (39His)	<b>7,1</b> (0,9 - 23,5)	14,3 (1,8 - 42,8)	13,8	77 %
<b>1193G&gt;C (Val50Leu)</b>	<b>42,9</b> (24,5 - 62,8)	42,9 (17,7 - 71,1)	50,8	64 %
1544A>G (62Pro)	<b>7,1</b> (0,9 - 23,5)	14,3 (1,8 - 42,8)	13,8	77 %
2985A>G (133Thr)	<b>3,6</b> (0,1 - 18,3)	7,1 (0,2 - 33,9)	7,1	89 %
3138T>C (184Tyr)	<b>3,6</b> (0,1 - 18,3)	7,1 (0,2 - 33,9)	7,1	89 %
<b>3241C&gt;T (Arg219Trp)</b>	<b>3,6</b> (0,1 - 18,3)	7,1 (0,2 - 33,9)	7,1	89 %

**Tabelle 4-12:** Häufigkeiten der einzelnen Polymorphismen im SP-A2-Gen (n = 28 Allele)

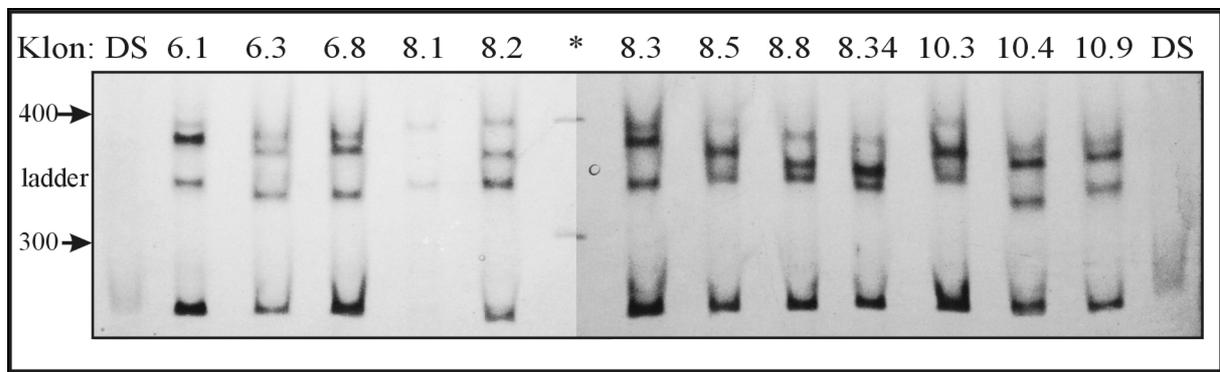
Variante	$q$ [%]	$h$ [%]	Het [%]	$P(\chi_1^2 > \chi^2)$
<b>1098A&gt;C (Asn9Thr)</b>	<b>42,9</b> (24,5-62,8)	42,9 (17,7 -71,1)	50,8	64 %
<b>1220G&gt;C (Val50Leu)</b>	<b>7,1</b> (0,9-23,5)	14,3 (1,8 - 42,8)	13,8	77 %
<b>1649G&gt;C (Ala91Pro)</b>	<b>10,7</b> (2,3-28,2)	7,1 (0,2 - 33,9)	19,8	<u>1,9 %</u>
3018C>T (140Ser)	<b>35,7</b> (18,7-55,9)	28,6 (8,4 - 58,1)	47,6	15,7 %
<b>3265C&gt;A (Gln223Lys)</b>	<b>28,6</b> (13,2 - 48,7)	14,3 (1,8 - 42,8)	42,3	<u>1,5 %</u>

### 4.3 PCR-SSCP-Analyse

Die **Elektrophoresebedingungen zum SSCP-Nachweis** in den PCR-Amplifikaten wurden experimentell bestimmt. Die **Klonierung von Mustersequenzen** ermöglichte die wiederholte Amplifikation von DNA, deren Sequenz an den polymorphen Genorten den entsprechenden Abschnitten der einzelnen Allele entsprach. Zur Überprüfung der Sensitivität wurden Exonsequenzen mit weiteren artifiziellen Mutationen kloniert. **SSCP-Gelelektrophoresen mit Patienten-DNA** waren wegen der Heterozygotie nicht eindeutig zu interpretieren.

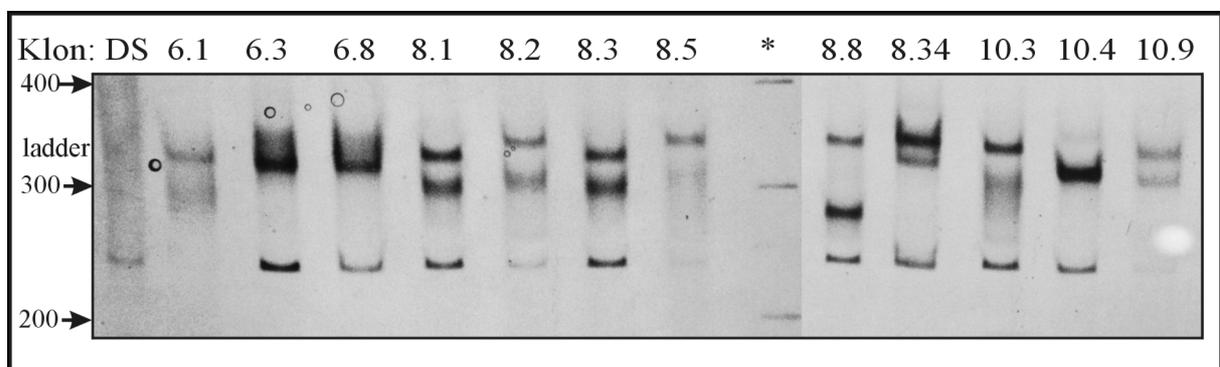
### 4.3.1 Elektrophoresebedingungen zum SSCP-Nachweis

Die Reproduzierbarkeit der SSCP-Elektrophorese wird durch Temperatur, Geldichte sowie denaturierende Zusätze beeinflusst (Orita et al. 1989). Einzelstrang-DNA wurde mit steigender **Geldichte** stärker im Gel zurückgehalten, die Mobilitätsunterschiede zur Doppelstrang-DNA verringerten sich, so dass in 3,5 % Polyacrylamid Doppelstrang- und Einzelstrang-DNA nicht mehr zu trennen sind. **Abbildung 4-8** zeigt ein 5 %iges Polyacrylamidgel im Monoacrylamid-Bisacrylamid-Verhältnis von 99:1. Eine geringere Querverzweigung würde die Unterschiede wieder erhöhen, aber durch die Konsistenz des Gels die Handhabung zu sehr erschweren.



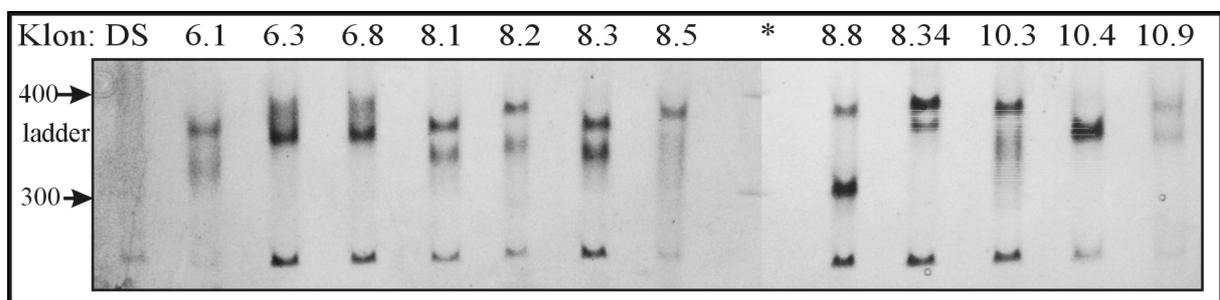
**Abbildung 4-8:** SSCP-Analyse mit klonierter DNA von SP-A-Exon 1  
5% Polyacrylamid(99:1), Temperatur = 20°C, Laufzeit = 90Minuten, DS = nicht denaturierte DNA.  
Die den Klonen entsprechenden Haplotypen sind in **Tabelle 4-13** und **Tabelle 4-14** aufgeführt.

Die **Temperatur** beeinflusst die DNA-Konformation (Newton und Graham 1997). Bei 4°C sind einige Polymorphismen besser zu sehen, wie bei Klon 8.8 in **Abbildung 4-9**. Klon 8.2 lässt sich jedoch besser in der bei 20° C durchgeführten Elektrophorese in **Abbildung 4-8** differenzieren.

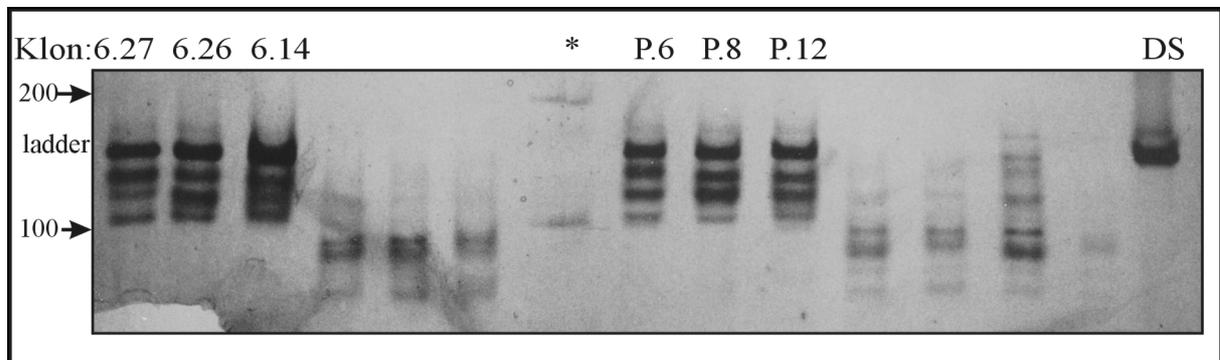


**Abbildung 4-9:** SSCP-Analyse mit klonierter DNA von SP-A-Exon 1  
6% Polyacrylamid(99:1), Temperatur = 4°C, Laufzeit = 135 Minuten, DS = nicht denaturierte DNA.

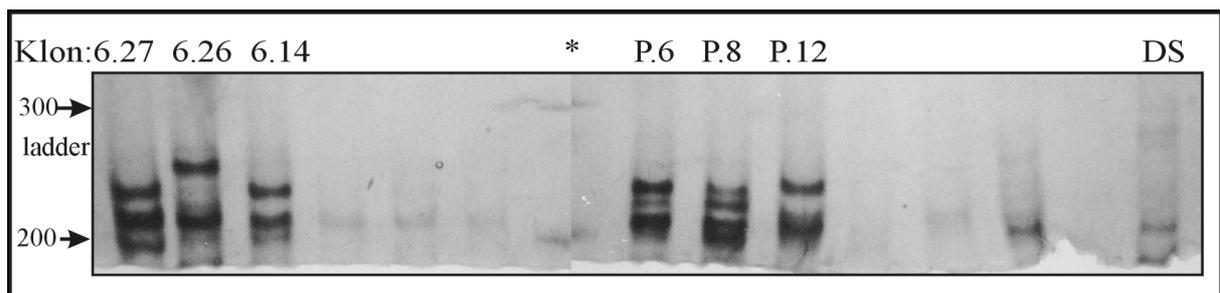
Diese Ergebnisse sind in Gelen vergleichbarer Dichte reproduzierbar, wie die Elektrophorese mit MDE<sup>®</sup> Gel Solution (FMC BioProducts) in **Abbildung 4-10** im Vergleich zu der unter den gleichen Bedingungen durchgeführten Elektrophorese mit herkömmlichen Polyacrylamid in **Abbildung 4-9** zeigt. Durch **denaturierende Zusätze** von 5 % Glycerol wurde die Mobilität der Einzelstrang-DNA so weit erhöht, dass sie bei einer Konzentration von 5 % Polyacrylamid (99:1) nun wie in **Abbildung 4-11** vor der Doppelstrang-DNA liegt. Diesen Effekt zeigten bereits Orita et al. 1989. Die Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität der mutierten Sequenzen verringern sich dabei oftmals, wie der Vergleich mit **Abbildung 4-12** zeigt.



**Abbildung 4-10:** SSCP-Analyse mit klonierter DNA von SP-A-Exon 1 (0,25x)MDE<sup>®</sup> Gel Solution, Temperatur = 4°C, Laufzeit = 135 Minuten, DS = nicht denaturierte DNA.



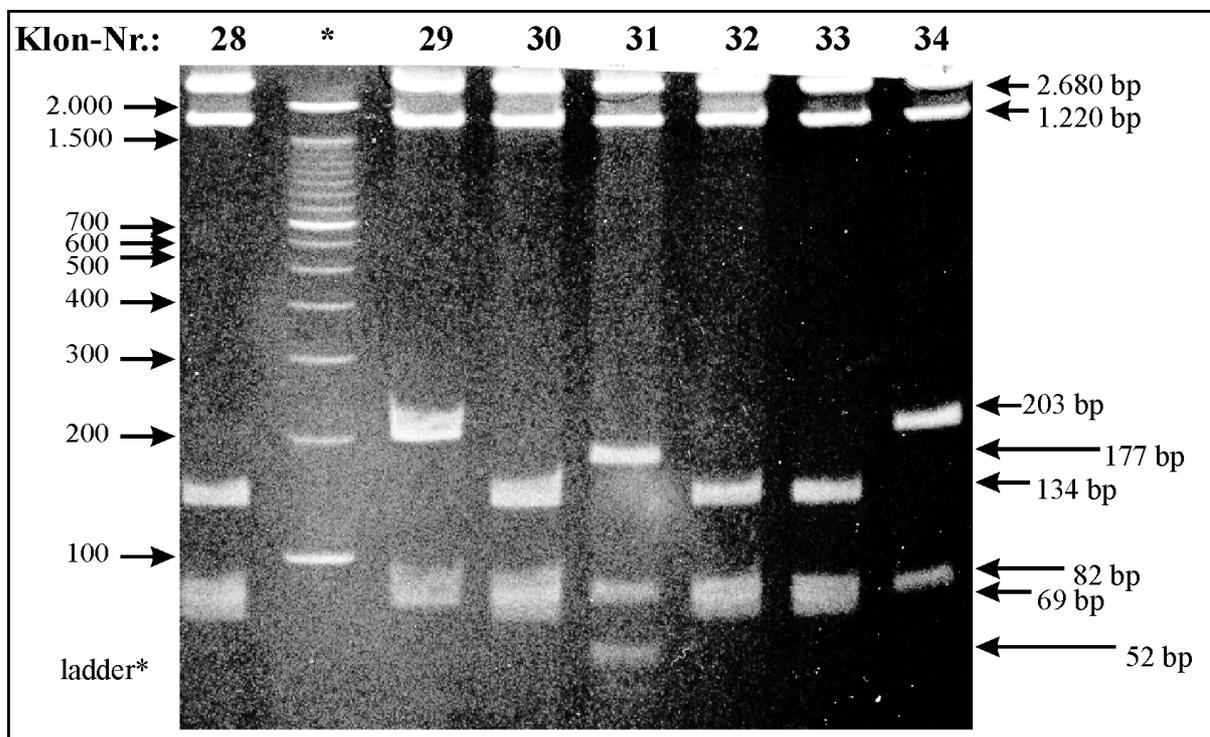
**Abbildung 4-11:** SSCP-Analyse von SP-A1-Exon 2 mit DNA-Proben der Patienten 6, 8 und 12 5% Polyacrylamid(99:1) mit 5% Glycerol, Temperatur = 4°C, Laufzeit = 135 min, DS = Doppelstrang-DNA.



**Abbildung 4-12:** SSCP-Analyse von SP-A1-Exon 2 mit DNA-Proben der Patienten 6, 8 und 12 5% Polyacrylamid(99:1), Temperatur = 4°C, Laufzeit = 135 Minuten, DS = am unteren Gelrand (185 bp).

### 4.3.2 Klonierung von Mustersequenzen

Aus amplifizierter DNA der heterozygoten Patienten 6, 8 und 10 konnten die den einzelnen Exonsequenzen entsprechenden Abschnitte aller Allele als Mustersequenzen im Vektor *pCR2.1* kloniert werden. In einer PCR mit den internen Primern SPA-EX1-FW3 und SPA-EX1-RE3 wurden die Sequenzen von Exon 1 beider SP-A-Gene zusammen aus genomischer DNA eines dieser Patienten amplifiziert. Die Plasmid-DNA der erfolgreich transformierten Klone wurde in einer DNA-Restriktion mit *PstI* wie in **Abbildung 4-13** auf das Vorliegen der bereits in **Abschnitt 1.1.1** beschriebenen und invariant nur im SP-A2-Gen vorkommenden Einzelbasensubstitution 1018T>A oberhalb von Exon D getestet.



**Abbildung 4-13:** Restriktionsanalyse der Klone von Patient 10-SP-A-Exon 1

Amplifikate von SP-A1 (Klon 28, 30, 32 und 33) bilden Fragmente von 134, 82, 69 und 26 bp. SP-A2-Amplifikate (Klon 29 und 31) bilden je nach Orientierung im Vektor Fragmente von 203, 82 und 26 oder 177, 82 und 52 bp.

Mit den Universalprimern M13(-29) und M13(-43) wurden gezielt Amplifikate beider Gene sequenziert, bis von jedem Allel wenigstens zwei klonierte Mustersequenzen identifiziert worden waren, die als Gefrierkultur konserviert wurden. Durch die in **Abschnitt 5.1.3** zu diskutierenden Fehlermöglichkeiten waren in einige der Sequenzen bei der PCR falsche DNA-Basen eingefügt worden, die nun als artifizielle Mutationen mit kloniert wurden. Sie traten zum Teil in ohnehin polymorphen Codons auf (wie 1194T>C bei Klon 6.1) und sind in **Tabelle 4-13** und **Tabelle 4-14 hervorgehoben**. Die entsprechenden Klone wurden auch konserviert, da sie gut geeignet

sind, die Sensitivität der SSCP-Analyse bei der Detektion beliebiger Einzelbasensubstitutionen zu testen. Die Tabellen zeigen die Sequenzen der Klone in den polymorphen Codons und welchem Allel die klonierte Sequenz entspricht, wobei mehrere Allele in Exon 1 dieselbe Sequenz haben. Artifizuell mutierte Sequenzen sind durch Anführungszeichen gekennzeichnet.

**Tabelle 4-13:** Mustersequenzen für SP-A1-Exon 1 (kloniert aus einer PCR mit *Taq*-DNA-Polymerase)  
Unterstrichene Klone wurden in einer Gefrierkultur als Muster für die angegebenen Allele konserviert.  
 Bei der PCR mutierte Genorte sind **hervorgehoben**. Anführungszeichen markieren die mutierten Allelsequenzen.

Aminosäure:		Val19Ala	(27Val)	(39His)	Val50Leu	Leu50Pro	(51Lys)	
Patient	Klon	1101T>C	1126T>C	1162C>T	1193G>C	1194T>C	1198A>G	Allel
6	<u>1</u>	GTG		CAC	→	<b>CCC (Pro)</b>		<u>(6a3, 6a4)</u> '
	2	GTG		CAC	CTC			6a3, 6a4
	<u>3</u>	GCG		CAC	CTC			<u>6a</u>
	4	GTG		CAC	CTC			6a3, 6a4
	6	GCG		CAC	CTC			6a
	7	GTG		CAC	CTC			6a3, 6a4
	<u>8</u>	GCG		CAC	CTC			<u>6a</u>
	<u>9</u>	GTG		CAC	CTC			<u>6a3, 6a4</u>
	<u>10</u>	GCG	<b>GTC</b>	CAC	CTC			<u>(6a)</u> '
	<u>12</u>	GTG		CAC	CTC			<u>6a3, 6a4</u>
8	<u>1</u>	GTG		CAT	CTC			<u>6a*</u>
	<u>2</u>	GTG		<b>CAT</b>	GTC			<u>(6a2)</u> '
	<u>3</u>	GTG		CAT	CTC			<u>6a*</u>
	<u>5</u>	GTG		CAC	GTC			<u>6a2</u>
	6	GTG		CAC	GTC			6a2
	<u>8</u>	GTG		CAC	GTC		<b>AAG</b>	<u>(6a2)''</u>
10	2	GTG		CAC	CTC			6a3, 6a4
	<u>3</u>	GTG		CAC	GTC			<u>6a2</u>
	<u>8</u>	<b>GCG</b>		CAC	GTC			<u>(6a2)'''</u>
	<u>10</u>	GTG		CAC	CTC			<u>6a3, 6a4</u>

Mit den internen Primern SPA-EX2-FW und SPA-EX2-RE2 wurden die Sequenzen von Exon 2 beider SP-A-Gene aus genomischer DNA von Patient 6 amplifiziert. Die Plasmid-DNA der erfolgreich transformierten Klone wurde in einer DNA-Restriktion mit *ApaI* auf das Vorliegen der invariant nur im SP-A2-Gen vorkommenden Einzelbasensubstitution 1640G>A getestet. Wieder wurden gezielt so viele Amplifikate beider Gene sequenziert, bis von jedem Allel zwei klonierte Mustersequenzen identifiziert worden waren. **Tabelle 4-16** und **Tabelle 4-15** zeigen die Sequenzen der Klone an den polymorphen Genorten von SP-A1 und SP-A2.

**Tabelle 4-14:** Mustersequenzen für SP-A2-Exon 1 (kloniert aus einer PCR mit *PwoI*-DNA-Polymerase)

Aminosäure:		Asn9Thr	Ser16Pro	Val50Leu	
Patient	Klon	1098A>C	1118T>C	1220G>C	Allel
8	29	ACC		GTC	1a, 1a1, 1a2, 1a§
	31	ACC		GTC	<u>1a, 1a1, 1a2, 1a§</u>
	34	ACC		GTC	<u>1a, 1a1, 1a2, 1a§</u>
10	4	ACC		CTC	1a*
	5	ACC		CTC	<u>1a*</u>
	7	ACC		CTC	1a*
	9	AAC		GTC	<u>1a0, 1a3, 1a#</u>
	11	ACC	CCT	GTC	<u>(1a, 1a1, 1a2, 1a§)'</u>
	14	AAC		GTC	<u>1a0, 1a3, 1a#</u>
	15	ACC		CTC	<u>1a*</u>

**Tabelle 4-15:** Mustersequenzen für SP-A2-Exon 2 (kloniert aus einer PCR mit *Taq*-DNA-Polymerase)

Aminosäure:		(Intron)	Ala91Pro	(Intron)	(Intron)	(Intron)	Allel
Patient	Klon	1526A>G	1649G>C	1690G>A	1696T>C	1745_1747delGGT	
6	5	ACGCA	GCT	GTGGG			<u>1a0, 1a1-1a*, 1a#</u>
	14		CCT	GTAGG			<u>1a, 1a§</u>
	17		CCT	GTAGG			<u>1a, 1a§</u>
	20		CCT	GTAGG			1a, 1a§
	22		CCT	GTAGG			<u>1a, 1a§</u>
	24		CCT	GTAGG			1a, 1a§
	26		CCT	GTAGG	AGCGG		(1a, 1a§)'
	27		GCT	GTGGG		(TGGGΔΔΔCAGA)	<u>1a0, 1a1-1a*, 1a#</u>
	28		CCT	GTAGG			1a, 1a§

**Tabelle 4-16:** Mustersequenzen für SP-A1-Exon 2 (kloniert aus einer PCR mit *Taq*-DNA-Polymerase)

Aminosäure:		(Intron)	(Intron)	(Intron)	(62Pro)	Gly72Pro	Allel
Patient	Klon	1507C>T	1515T>C	1526T>C	1544A>G	1632_1633GG>CC	
6	2				CCA		<u>6a2, 6a3, 6a*, 6a#</u>
	3	CATAT			CCG		<u>(6a, 6a4)'</u>
	4			TCCGC	CCA		6a2, 6a3, 6a*, 6a#
	7				CCA	CCC	<u>(6a2, 6a3, 6a*, 6a#)'</u>
	8				CCA		<u>6a2, 6a3, 6a*, 6a#</u>
	9				CCG		<u>6a, 6a4</u>
	13		TGCCT		CCA		<u>(6a2, 6a3, 6a*, 6a#)''</u>
	15				CCA		<u>6a2, 6a3, 6a*, 6a#</u>
	25				CCA		6a2, 6a3, 6a*, 6a#

Die in den Klonen 6.3, 6.4, 6.5, 6.13 und 6.26 detektierten Abweichungen in den Intronen liegen innerhalb der Sequenz der SSCP-Primer, so dass diese Fehler bei der Reamplifikation zur SSCP-Analyse wieder korrigiert werden. Die Deletion von drei DNA-Basen bei Klon 6.27 liegt außerhalb der für die SSCP-Analyse amplifizierten Sequenz. Die Sequenz von Klon 6.26 entsprach ab Nukleotid 1716 der des SP-A1-Gens.

Mit den internen Primern SPA-EX3-FW und SPA-EX3-RE wurden die Sequenzen von Exon 3 beider SP-A-Gene aus genomischer DNA von Patient 7 amplifiziert. Da in diesem Exon keine in einem Gen varianten polymorphen Genorte bekannt sind, wurde bei der Sequenzierung an der invarianten Einzelbasensubstitution 2453T>C erkannt, ob eine amplifizierte Sequenz des SP-A1- oder des SP-A2-Gens vorliegt. Bei einer klonierten SP-A2-Sequenz (Klon 7.9) war zusätzlich Nukleotid 2517 im Intron deletiert, wie **Tabelle 4-17** zeigt.

**Tabelle 4-17:** Mustersequenzen für SP-A-Exon 3 ( $\Delta$  markiert die deletierte DNA-Base)

Aminosäure:		(94Phe)	(Intron)	
Patient	Klon	2453T>C	2517delT	Gen
	<u>3</u>	TTT		<u>SP-A1</u>
	4	TTT		SP-A1
	5	TTT		SP-A1
7	6	TTT		SP-A1
	<u>7</u>	TTC		<u>SP-A2</u>
	<u>9</u>	TTC	CCCC $\Delta$ GGGC	( <u>SP-A2</u> )'
	<u>10</u>	TTT		<u>SP-A1</u>
	<u>12</u>	TTC		<u>SP-A2</u>

Mit den internen Primern SPA-EX4-FW3 und SPA-EX4-RE wurden die Sequenzen von Exon 4 beider SP-A-Gene aus genomischer DNA der Patienten 6 und 10 amplifiziert. Lediglich ein Klon war erfolgreich transformiert worden, was an der Größe des DNA-Fragments liegen kann. Dieser Klon hatte abweichend von der Sequenz von Allel 1a eine G-A-Transition in Codon 240. Aufgrund der im folgenden Abschnitt beschriebenen, unzureichenden Spezifität der SSCP-Analyse diploider Patientenproben wurde auf die weitere Klonierung verzichtet.

**Tabelle 4-18:** Mustersequenz für SP-A2-Exon 4 (kloniert aus einer PCR mit *PwoI*-DNA-Polymerase)

Aminosäure:		(140Ser)	Gln223Lys	Tyr240Cys	
Patient	Klon	3018C>T	3265C>A	3305A>G	Allel
	<u>6</u>	TCC	AAG	TGC	<u>1a</u>

### 4.3.3 SSCP-Gelelektrophoresen mit Patienten-DNA

**Abbildung 4-12** zeigte eine SSCP-Gelelektrophorese, bei der Amplifikate von SP-A2-Exon 2 aus Patienten-DNA gemeinsam mit klonierter Standard-DNA aufgetrennt wurden. Bei den DNA-Standards lässt sich das Wildtypallel 1a0 (Klon 6.27) von der Sequenz mit der Einzelbasensubstitution 1649G>C (Klon 6.14) und der in der PCR mutierten Sequenz mit der Transition 1696T>C (Klon 6.26) unterscheiden. Beim Vergleich der Muster von Klon 6.14 und Patient 12 wird die bei der Sequenzierung in **Tabelle 4-10** nachgewiesene Homozygotie in Codon 91 für [1649G>C] + [1649G>C] deutlich. Patient 8 ist in Codon 91 homozygot für die Wildtypsequenz "GCT". Das von Abweichen des Farbbandenmusters von dem bei Klon 6.27 zu sehenden ist durch die inconstante Einzelbasensubstitution 1690G>A im Intron bedingt. Bei Patient 6 bilden sich durch die Heterozygotie andere Banden als in den homozygoten Proben, wobei es sich wahrscheinlich um Heteroduplexe handelt (Humphries et al. 1997).

Bei der SSCP-Gelelektrophorese mit Amplifikaten von Exon 3 ließ sich die SP-A1-Gensequenz von der SP-A2-Gensequenz unterscheiden. Die in der PCR mutierte Sequenz von Klon 7.9 war ebenfalls zu differenzieren. Aufgrund der häufigen Polymorphismen war die Identifikation diploider Proben sehr schwierig. Selbst unter Berücksichtigung der hier nicht gezeigten Analysen aller Exone war die exakte Bestimmung des SP-A-Genotyps anhand der Beobachtung von Einzelstrangkonnformationspolymorphismen nicht möglich.

## 5 Diskussion

Eine **Verfahren zur Analyse der SP-A-Gene** wurde erarbeitet und bei Patienten mit Verdacht auf einen Surfactantproteindefekt angewendet. **Allelische Varianten des SP-A** könnten für ihre Träger ein erhöhtes Risiko für Erkrankungen, bei denen Surfactantproteine pathogenetisch beteiligt sind, bedeuten. Der **Nutzen der Analyse der SP-A-Gene** bei verschiedenen Krankheitsbildern wird diskutiert und ein **Ausblick** auf weitergehende Untersuchungen gewagt.

### 5.1 Verfahren zur Analyse der SP-A-Gene

Es gibt einfache **Techniken** zum schnellen Nachweis von bekannten Polymorphismen. Die in der Literatur veröffentlichten Analysen zur Allelverteilung beim SP-A untersuchten die bekannten polymorphen Genorte. Die Entdeckung und Beschreibung unbekannter genetischer Varianten erfordert ein schrittweises Vorgehen. **Sensitivität und Spezifität** waren neben der Durchführbarkeit wichtige Kriterien bei der Auswahl der Techniken. **Zufällige und systematische Fehler** der angewandten Methoden minderten die **Aussagekraft einzelner Beobachtungen** angesichts der hohen genetischen Variabilität der SP-A-Sequenzen.

#### 5.1.1 Techniken

Zur Isolation und Amplifikation der zu untersuchenden DNA wurde wegen ihrer Einfachheit und Effektivität die **Polymerasekettenreaktion (PCR)** gewählt. Bei entsprechender Wahl der Primer ermöglicht sie die Amplifikation nahezu beliebiger Abschnitte der DNA. Die externe PCR diskriminiert zwischen den beiden Kopien des SP-A-Gens. Die interne PCR amplifiziert die kodierenden Sequenzen. Als *nested* PCR erhöhen sie gemeinsam die Effektivität.

Unbekannte Mutationen lassen sich in der **denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE)** und der **Einzelstrangkonnformationspolymorphismus-Analyse (SSCP)** detektieren. Beide Verfahren reagieren auf Veränderungen an einer beliebigen Stelle der DNA-Sequenz. Bei der DGGE beeinflusst die veränderte Schmelztemperatur der mutierten DNA das Elektrophoreseverhalten (Myers et al. 1985). Mit der Berechnung des Schmelzverhaltens der DNA können optimale Elektrophoresebedingungen geschaffen werden (Abrams et al. 1990). Das Verfahren wird unter anderem zum Nachweis der Hämophilie A angewandt (Higuchi et al. 1991). Bei der SSCP-Gelelektrophorese beeinflusst die individuelle Konformation (räumliche

Anordnung) der als Einzelstrang vorliegenden DNA (*single strand conformation*) die Retention im Gel (Orita et al. 1989). Für diese Technik existieren keine Algorithmen, um von der elektrophoretischen Mobilität der Einzelstrang-DNA auf die Konformation oder die Lokalisation der Mutation zu schließen; die Analyse beruht auf dem Vergleich der als Farbbanden sichtbaren *sense*- und *antisense*-Stränge mit den Mustern bekannter Kontrollen. Aufgrund der einfachen Durchführbarkeit hat die SSCP-Analyse ein breites Einsatzgebiet (Humphries et al. 1997). Die Arbeitsgruppe um J. Floros erprobte die Technik zum Nachweis des Allels 6a (Krizkova et al. 1994). in der SSCP-Gelelektrophorese kann in der Regel DNA von 150 - 400 bp Länge analysiert werden (Newton und Graham 1997). Da die Exone der SP-A-Gene diese Länge haben, schien die Technik gut geeignet, wenn bei der Amplifikation von Exon 3 Teile des Introns eingeschlossen wurden, um ein größeres DNA-Fragment zu schaffen (siehe **Abschnitt 4.1.1**).

Die **direkte DNA-Sequenzierung** auffälliger Proben ist zur Charakterisierung neuer Mutationen erforderlich. Durch Sequenzierung der Exone wurden alle Polymorphismen in den SP-A-Genen der vierzehn nach den in **Abschnitt 3.1.2** erwähnten Kriterien ausgewählten Patienten ermittelt. Zur Alleltypisierung Heterozygoter ist die DNA-Klonierung wie in **Abschnitt 4.2.2** nötig.

Eine Einzelbasensubstitution kann eine Restriktionsschnittstelle schaffen oder deletieren. In diesem Fall kann der Nachweis des **Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)** zur schnellen Analyse einer großen Zahl von Proben eingesetzt werden. Je nach Vorhandensein oder Fehlen der Restriktionsschnittstelle entstehen DNA-Fragmente definierter Länge, die sich eindeutig in der Gelelektrophorese voneinander trennen lassen. Die Aminosäuresubstitutionen in den SP-A-Genen lassen sich nur mit den in **Tabelle 5-1** aufgeführten, wenig gebräuchlichen Restriktionsendonukleasen detektieren. Daher wurde die RFLP-Analyse in **Abschnitt 4.2.1** nur zum Nachweis der neu beschriebenen, "stillen" Einzelbasensubstitutionen angewandt.

**Tabelle 5-1:** Restriktionsendonukleasen für die RFLP-Analyse der Aminosäuresubstitutionen im SP-A

Legende: n steht für eine beliebige DNA-Base, s für G oder C. Die substituierte DNA-Base ist **hervorgehoben**.

Variante:	Asn9Thr	Val19Ala	Val50Leu	Ala91Pro	Arg219Trp	Gln223Lys
Enzym:	<u>HphI</u>	<u>Cac8I</u>	<u>BpI</u>	<u>Cac8I</u>	(kein	<u>TspRI</u>
Sequenz:	GGTGA	GCnnGC	GAGnnnnnCTC	GCnnGC	Enzym)	CAsTG

Wird kein RFLP erzeugt, kann die **sequenzspezifische Oligohybridisierung (SSO)** dem Nachweis der charakterisierten Mutation dienen. Dazu werden Oligonukleotide konzipiert, die PCR-Primern ähneln, aber am polymorphen Genort hybridisieren. Sie sind radioaktiv markiert und entweder für das mutierte oder das Wildallel spezifisch. An der Intensität der Markierungen,

die im *Slot blot* durch schlitzförmige Öffnungen auf eine Membran übertragen werden, erkennt man, welche Oligonukleotide zur untersuchten DNA-Sequenz komplementär sind. Die Arbeitsgruppe um J. Floros entwickelte ein PCR-SSO-Verfahren zur Bestimmung der in einer Probe vorliegenden SP-A-Allele anhand der identifizierten Polymorphismen (Rishi et al. 1992). Alternativ könnte die **allelspezifische PCR (ASPCR)**, bei der allelspezifische Oligonukleotide als Primer eingesetzt werden, welche nur das gewünschte Allel amplifizieren, zur Untersuchung polymorpher Genorte eingesetzt werden. Dieses Verfahren wurde zur Diagnose der Sichelzellanämie entwickelt (Wu et al. 1989). Bei der allelspezifischen **Ligasekettenreaktion (LCR)** werden zwei am polymorphen Genort aneinander angrenzende Oligonukleotide nur ligiert, wenn sie exakt komplementär zur untersuchten DNA sind (Barany 1991).

### 5.1.2 Sensitivität und Spezifität

Die **direkte DNA-Sequenzierung** der PCR-Produkte ist der Goldstandard zur Erfassung aller Polymorphismen. Die Empfindlichkeit anderer Techniken wird daran gemessen.

Bei der **DGGE** wird eine Tandemrepeatsequenz von 30 - 50 Wiederholungen des Dinukleotids "GC" an die DNA-Probe gehängt. Dies erhöht die Schmelztemperatur der zu untersuchenden Sequenz und die Sensitivität bei der Detektion von Veränderungen. Mit Hilfe dieser "GC-Klammer" werden etwa 50 % aller Mutationen in DNA von 30 - 1000 bp detektiert (Sheffield et al. 1989). Die **SSCP**-Analyse soll über 90% der Mutationen in DNA von 250 - 400 bp detektieren (Grace et al. 1995) und wurde daher zur Analyse ausgewählt. Schwierigkeiten entstehen bei polymorphen Sequenzen durch Bildung von Heteroduplexen, die neben informativen Einzelstrang-DNA-Banden weitere Farbbanden im Gel erzeugen (Humphries et al. 1997).

Der Nachweis eines bekannten **RFLP** in der Gelelektrophorese ist eine sehr sensitive Methode, deren Treffsicherheit bei geeigneten Reaktionsbedingungen nahe 100 % liegt. Voraussetzung ist eine gute Aufreinigung der amplifizierten DNA und der Einsatz von Restriktionsendonukleasen mit hoher Aktivität. Bei der **PCR-SSO** kommt es in geringem Maße zu unspezifischen Bindungen nichtkomplementärer Oligonukleotide an die zu untersuchende DNA. Daher wird ein Signal erst dann als heterozygot positiv gewertet, wenn es 25 - 75 % der Intensität eines bekannten Allels hat, welches vollständig hybridisiert. Sensitivität und Spezifität dieser Technik sind dementsprechend geringer (Thein et al. 1993). Bei der **ASPCR** werden sogar drei diskriminierende Nukleotide am 3'-Ende des Primers gefordert, um eine hochspezifische

Primerbindung zu sichern. Für den Nachweis von Einzelbasensubstitutionen, wie sie in den SP-A-Genen vorliegen, ist diese Technik weniger geeignet (Newton und Graham 1997). Die **LCR** hingegen startet nur, wenn die Primer absolut komplementär zur DNA sind. Sie wäre eine hoch sensitive und spezifische Technik zum Nachweis bekannter Einzelbasensubstitutionen.

### 5.1.3 Zufällige und systematische Fehler

Bei der **Polymerasekettenreaktion (PCR)** baut die DNA-Polymerase mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit nicht komplementäre DNA-Basen ein. Die Polymerasefehler werden mit jedem Reaktionszyklus weiter amplifiziert. Die Fehlerrate der Taq-DNA-Polymerase beträgt  $f \approx 1 \times 10^{-4}$ , so dass bei Elongation um 10.000 Nukleotide im Mittel ein nicht komplementäres in den DNA-Strang eingebaut wird. Bei der Amplifikation der Sequenz von Exon 1 des SP-A-Gens (DNA-Basen 994\_1241) mit den internen Primern SPA-EX1-FW2 und SPA-EX1-RE2 mit einer Länge  $b$  von etwa 250 bp in einer PCR mit  $d = 35$  Reaktionszyklen müssten nach der Formel  $F = 1 - e^{-(b \times f \times d)}$  (Cha und Thilly 1995) 58 % der Sequenzen eine solche Transition aufweisen. Die Analyse der klonierten SP-A1-Exon 1-Amplifikate in **Tabelle 4-13** zeigt, dass es in fünf von zwanzig Sequenzen zu einer Transition kam. DNA-Polymerasen mit fehlerkorrigierender (*proof reading*) Aktivität verringerten den Anteil fehlerhafter Sequenzen auf 10% (**Tabelle 4-14**). Bei der direkten Sequenzierung von PCR-Produkten ohne Zwischenklonierung bleiben diese zufällig über die gesamte Sequenz verteilten Polymerasefehler unsichtbar. Nur die Signale der korrekt amplifizierten Sequenzen summieren sich zur sichtbaren Konsensussequenz (Newton und Graham 1997).

Die in **Abbildung 4-1** und **Abbildung 4-2** gezeigte Bildung von Nebenprodukten durch Abbruch der DNA-Synthese nach unspezifischer Bindung (*misannealing*) der Primer an homologen Sequenzen wie der falschen Kopie des SP-A-Gens oder am Pseudogen (SP-A $\Psi$ ) ist ein typisches Problem der Amplifikation langer DNA-Sequenzen (*long template PCR*). Die Verwendung eines *hot starts* und besonders langer Oligonukleotide als **diskriminierende** Primer in oder nahe der genetisch stabileren, translatierten Genregionen löste dieses Problem, wie RFLP-Analysen (**Abbildung 4-3**) und DNA-Sequenzen (**Abbildung 4-4**) zeigen.

Bei der **DNA-Klonierung** werden einzelne in der PCR generierte Sequenzen aus der Konsensussequenz herausgegriffen. Um zu vermeiden, dass Polymerasefehler als allelische Varianten interpretiert werden, einigt man sich im allgemeinen darauf, erst dann von einem neuen Haplotyp zu sprechen, wenn er unabhängig voneinander in drei Klonen vorliegt (White et

al. 1985). Neben Polymerasefehlern, die sich als Transitionen (Austausch einzelner Nukleotide) oder, insbesondere innerhalb C + G-reicher Sequenzen wie bei Klon 7.9 in **Tabelle 4-17** oder Klon 6.27 in **Tabelle 4-15**, als Deletionen bemerkbar machen, treten bei der Amplifikation heterozygoter DNA dem von der Meiose her bekannten Kreuzungsphänomen (*crossing over*) ähnliche Rekombinationen beider allelischer Sequenzen auf. Durch Anlagerung einer im Extensionsschritt nur teilweise synthetisierten DNA-Sequenz eines Allels während des nächsten Hybridisierungsschritts am anderen Allel wird eine Chimäre gebildet, die in den ersten Exonen die Sequenz eines Allels und in den 3'-terminalen Exonen die Sequenz des anderen Allels besitzt und so einen neuen Haplotyp vortäuscht. (So würde die Rekombination einer Exon 1 und 2 von Allel 6a und Exon 3 und 4 von Allel 6a4 umfassenden DNA die Sequenz von Allel 6a5 bilden, wie sich in **Tabelle 1-2** nachvollziehen lässt.) Dieses als Springen der PCR (*jumping PCR*) bezeichnete Phänomen wird besonders bei der Amplifikation langer DNA-Sequenzen beobachtet (Colgan 1993) und gezielt zur Mutagenese von DNA-Sequenzen ausgenutzt (Ørum et al. 1993). Klon 6.26 in **Tabelle 4-15** ist eine Chimäre der mit den Primern SPA-EX2-FW und -RE2 aus genomischer DNA amplifizierten Sequenz (1451\_1716) des SP-A1-Gens und (1735\_1793) des SP-A2-Gens (Nukleotid 1716 des SP-A1-Gens entspricht Nukleotid 1734 des SP-A2-Gens). Aus den in einer PCR mit DNA von Patient 8 amplifizierten Sequenzen von Exon 1 des SP-A1-Gens wurde zweimal die Wildtypsequenz, achtmal die Sequenz des Haplotyps [1162C>T + 1193G>C] und einmal der Haplotyp [1162C>T] kloniert. Neben der Rekombination durch das *jumping PCR*-Phänomen ist auch eine C-T-Transition aufgrund eines Polymerasefehlers denkbar. Die Wahrscheinlichkeit für eine Transition an einer bestimmten Stelle beträgt nach der Formel von Cha und Thilly etwa 0,3 %. Klon 6.1 in **Tabelle 4-13** besitzt die Transition 1194T>C in Codon 50. Das Auftreten dieser Transitionen in als polymorph bekannten Codons könnte darauf hinweisen, dass dort *mutation hotspots* vorliegen, und wird in **Abschnitt 5.3.4** diskutiert.

Bei der **DNA-Sequenzierung** kann es durch Unregelmäßigkeiten im Gel oder auf der Membran zum zufälligen Fehlen oder zur Verschiebung von Farbbanden kommen. Die nachlassende Intensität der zuletzt aus dem Gel austretenden Markierungen durch Diffusion verursacht weitere Unsicherheiten beim Lesen der Sequenz. Diese Fehler wurden durch routinemäßiges Sequenzieren in beiden Richtungen unter Verwendung einmal des *forward*- und im anderen Fall des *reverse*-Primers korrigiert. Die Substitution von Guanodin durch Inosin im Reaktionsmix in **Tabelle 3-14** verhinderte das sogenannte Auflaufen der Nukleotide in der G-Spur.

Bei der **SSCP-Gelelektrophorese** können die von einer Probe gebildeten Farbbanden mit dem Muster einer nicht identischen Sequenz verwechselt werden. Die Gelelektrophorese derselben Proben bei verschiedenen Temperaturen verringert diese Fehlermöglichkeit, da jeweils andere

Konformationen und neue Muster auftreten. Der von der Sequenz des Wildtypallels 6a2 durch die Einzelbasensubstitution 1162C>T in Codon 39 abweichende Klon 8.2 zeigt bei Raumtemperatur in **Abbildung 4-8** ein auffälliges Muster, während der von der Sequenz des Wildtypallels 6a2 durch die Einzelbasensubstitution 1198A>G in Codon 51 abweichende Klon 8.8 sich besser bei 4 °C in **Abbildung 4-9** von den anderen allelischen Varianten differenzieren lässt. Der informative Wert der Einzelstrang-DNA-Farbbanden wurde durch Hinzufügen denaturierender Additiva nicht verbessert. Mit Zunahme genetischer Variabilität und Heterozygotie werden Fehler wahrscheinlicher, da mehr Muster zu unterscheiden sind und Heteroduplexbanden die Interpretation der informativen Banden stören (Humphries et al. 1997).

Bei der RFLP-Analyse kann eine unvollständige **DNA-Restriktion** das Vorliegen von Heterozygotie vortäuschen. In der PCR amplifizierte Nebenprodukte können ebenfalls schwache Signale hinterlassen. Probleme mit Restriktionsendonukleasen wie in **Abbildung 4-7** gezeigt lassen sich nicht immer eliminieren. Auch die **PCR-SSO** ist anfällig für Fehlinterpretationen, da bereits Signale mit 25 % der Referenzintensität als Heterozygotie gewertet werden.

#### 5.1.4 Aussagekraft einzelner Beobachtungen

Bei der erstmaligen **Sequenzierung** eines Gens nachgewiesene Polymorphismen müssen durch Resequenzierung bestätigt werden. So wurde in der von White et al. 1985 veröffentlichten und mit 6a0 bezeichneten Sequenz des SP-A-Gens in Codon 45 "CAC" anstelle von "GAC", in Codon 54 "CTG" anstelle von "CCT" und in Codon 203 "GGC" anstelle von "GGG" gelesen. Die Resequenzierung der damals verwendeten Klone zeigte das Fehlen der damals postulierten Polymorphismen 1178G>C, 1206\_1207CT>TG und 3195G>C in der nun als Allel 6a3 bezeichneten Sequenz (Floros et al. 1996). Einzelbeobachtungen wie das hier bei Patient 12 beschriebene neue Allel 1a§ sind daher mit einem Fragezeichen zu versehen, bis sie bei weiteren Patienten beobachtet werden. Wegen der hohen Frequenz, mit der die meisten Polymorphismen in den SP-A-Genen vorkommen, treten in fast allen Allelen mehrere kombiniert auf. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die hier anhand der beobachteten Polymorphismen beschriebenen Allele nicht den bei den Patienten vorliegenden Haplotypen entsprechen. Der Versuch, die Haplotypen zu klonieren, wurde durch die Rekombination von Teilabschnitten beider Allele aufgrund des *jumping PCR*-Phänomens erschwert. Die Vermischung beider Kopien des Gens in der externen PCR konnte jedoch mit ziemlicher Sicherheit ausgeschlossen werden, da an beiden Enden des Genes **diskriminierende** Primer eingesetzt wurden. (SPA-1-FW-EXT bildete kein PCR-Produkt mit SPA-2-RE-EXT und SPA-2-FW-EXT nicht mit SPA-1-RE-EXT.)

Zwar verwenden Floros et al. nur einen diskriminierenden Primer am 5'-Ende des Gens ("Oligo 326" und "Oligo 327") und das sowohl zu den DNA-Basen 3864\_3845 des SP-A1- und 3887\_3868 des SP-A2-Gens komplementäre "Oligo 68" am 3'-Ende. Wir fanden jedoch bei Verwendung des SP-A1-spezifischen Primers SPA-1-FW-EXT mit dem gemeinsamen Primer SPA-RE-EXT Kopien des SP-A2-Gens im PCR-Produkt, so dass die Kombination mit SP-A1- respektive SP-A2-spezifischen *reverse*-Primern vorgenommen wurde.

Die mit der **PCR-SSCP-Analyse** erzielten Ergebnisse waren gut reproduzierbar, solange homozygote Proben verglichen wurden. Alle bekannten Polymorphismen und die in der PCR generierten "Mutationen" waren deutlich nachweisbar, wenn wie in **Abbildung 4-8** und **Abbildung 4-9** zwei Gelelektrophoresen bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt wurden. Da in diploiden Proben aufgrund des hohen Heterozygotiegrads der SP-A-Gene oftmals sowohl in Exon 1 als auch in Exon 4 zwei verschiedene Sequenzen vorliegen, ist es bei der hohen Zahl zu unterscheidender Muster sehr schwer, die in der Regel in Form von vier Banden im Gel sichtbaren Einzelstränge (beide werden in einen *sense* und einen *antisense*-Strang aufgetrennt) einer bekannten allelischen Variante zuzuordnen, selbst wenn diese wie in **Abbildung 4-11** und **Abbildung 4-12** in demselben Gel aufgetrennt wird. Die Spezifität bei der Entdeckung unbekannter Polymorphismen wird durch das Auftreten zusätzlicher nicht informativer Banden aufgrund von irrelevanten Polymorphismen im Intron oder der Bildung von Heteroduplexen aus den nicht vollständig komplementären Sequenzen beider Allele stark eingeschränkt.

Die Untersuchung des gesamten Patientenkollektivs auf die beiden hier erstmals beschriebenen **Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen** im SP-A1-Gen wurde im Falle der Substitution 3138T>C infolge des unvollständigen DNA-Verdaus durch die Endonuklease *NdeI* erschwert, so dass die Sequenzierung der entsprechenden Sequenzen wahrscheinlich zuverlässigere Ergebnisse liefert ( $\alpha = 0,10$  beim Vergleich der Häufigkeiten nach beiden Methoden in **Tabelle 4-7**).

## 5.2 Allelische Varianten des SP-A

**Die Existenz weiterer Polymorphismen in den SP-A-Genen** wurde durch die DNA-Sequenzierung belegt. Das Vorliegen der Polymorphismen in neuen Kombinationen erlaubte die **Charakterisierung bisher unbekannter Allele** bei mehreren Patienten, so dass die genetische Variabilität des SP-A höher scheint als bisher angenommen. Der **Vergleich der beobachteten Allelfrequenzen mit Literaturdaten** zeigt, wie wichtig die exakte Auswahl einer großen Zahl von Patienten ist, um eine Assoziation zwischen SP-A-Genotyp und Phänotyp nachzuweisen.

### 5.2.1 Die Existenz weiterer Polymorphismen in den SP-A-Genen

Im SP-A1-Gen wurden zwei neue polymorphe Genorte entdeckt. In Codon 39 und 184 gibt es jeweils eine Transition der Base des dritten Nukleotids von Cytosin nach Thymin und umgekehrt ohne Einfluss auf die Aminosäuresequenz. Der **Polymorphismus 1162C>T** in Exon 1 wurde als konstantes **Allel 6a\*** des Haplotyps [1162C>T + 1193G>C] in der untersuchten Familie vererbt und ist mit einer bei Mitarbeitern wie Patienten beobachteten Allelfrequenz von etwa 11 % eine recht häufige Variante ( $\alpha = 0,90$  in **Tabelle 4-5**). Obwohl keine homozygoten Träger gefunden wurden, folgt die Verteilung der Genotypen dem Hardy-Weinberg-Gesetz ( $\alpha = 0,45$  in **Tabelle 4-6**), die Aminosäuresequenz entspricht Allel 6a2. Der **Polymorphismus 3138T>C** in Exon 4 wurde ebenfalls bei 11 % der Untersuchten detektiert. Obwohl keiner der untersuchten Mitarbeiter Träger von 3138T>C war, wurde der Unterschied zur Patientengruppe nicht signifikant ( $\alpha = 0,28$ ). Vergleicht man die Zahl der durch DNA-Sequenzierung nachgewiesenen Träger mit den Ergebnissen der RFLP-Analyse, zeigt sich eine methodisch bedingte Diskrepanz (3,6 % versus 15,9 %;  $\alpha = 0,10$  in **Tabelle 4-7**). Trotz falsch positiv Heterozygoter in der RFLP-Analyse ist in der kleinen Population keine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gesetz nachweisbar ( $\alpha = 0,35$  in **Tabelle 4-8**). Wahrscheinlich ist **Allel 6a#**, dessen Haplotyp nicht exakt bestimmt werden konnte (entweder [1193G>C + 3138T>C] oder [1193G>C]) und dessen Aminosäuresequenz der von Allel 6a2 oder 6a3 entspricht, ebenfalls konstant mit niedriger Allelfrequenz in der Bevölkerung vorhanden.

Der Nachweis des **Polymorphismus Val50Leu** in den SP-A2-Genen zweier Patienten (bisher nur in SP-A1 beobachtet) ist ein Beleg für die Existenz von einem **Allel 1a\*** des Haplotyps [1098A>C + 1220G>C], das ein SP-A2-Molekül mit veränderter Primärstruktur kodiert. Mit einer beobachteten Allelfrequenz von nahezu 8 % ist es keine seltene Variante (**Tabelle 4-3**). Da es in zwei Proben nicht verwandter Patienten auftaucht, scheint es keine Spontanmutation zu sein. Eine Ursache, warum es bisher nicht in der Literatur beschrieben wurde, könnte die Verwendung des mit der Wildtypsequenz "GTC" in Codon 50 hybridisierenden Oligonukleotids ("Oligo 96" in den Arbeiten von Floros et al.) als Markermolekül für SP-A2-Sequenzen sein. Da dieses zu den DNA-Basen 1185\_1201 des SP-A1-Gens beziehungsweise 1212\_1228 des SP-A2-Gens komplementäre Oligonukleotid nicht an Sequenzen mit der G>C-Substitution hybridisiert, würden diese nicht als SP-A2-Allele erkannt und im ungünstigsten Fall von der Analyse ausgeschlossen. In der Studie von Floros et al. von 1996, deren Ergebnisse **Tabelle 5-2** zeigt, kamen nur 490 SP-A2-Allele zur Auswertung, das sind 6,8 % weniger als die 526 SP-A1-Allele. Ob diese allelische Variante klinische Bedeutung hat, wird in **Abschnitt 5.3.1** diskutiert.

### 5.2.2 Charakterisierung bisher unbekannter Allele

Zusätzlich zu dem durch neue Polymorphismen definierten Allel 1a\*, Allel 6a\* und Allel 6a# konnten zwei weitere Allele des SP-A2-Gens beschrieben werden. Die genetische Variabilität kommt durch die wechselnde Verbindung einzelner polymorpher Genorte zustande (Floros et al. 1996). Das bei zwei Patienten gefundene **Allel 1a#** des Haplotyps [3018C>T] unterscheidet sich nur durch die aus den Allelen 1a1 und 1a3 bekannte "stille" Einzelbasensubstitution in Codon 140 vom Wildtypallel 1a0. Das bei Patient 12 beobachtete **Allel 1a§** zeichnet sich durch die sonst in keinem Allel beobachtete Verbindung aller Einzelbasensubstitutionen aus. Bei der DNA-Gewinnung war der sehr geringe Gehalt an Leukozytensediment aufgefallen. Angesichts der Leukämie des Patienten kann es sich um eine somatische Mutation der Leukozyten-DNA handeln, die die hereditäre DNA der Leukozyten mengenmäßig verdrängte. Diese Erklärung für das homozygote Auftreten der weniger häufigen Substitutionen 1649G>C und 3265C>A bei diesem Patienten macht die in **Tabelle 4-12** berechneten Abweichungen der kleinen Patientengruppe vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht plausibel. Auch die in der Literatur einmal beschriebenen Allele 1a4 und 6a5 waren homozygot in der Zelllinie eines Adenokarzinoms beobachtet worden (Karinch et al. 1998).

### 5.2.3 Vergleich der beobachteten Allelfrequenzen mit Literaturdaten

Da bei den 14 Patienten, deren SP-A Genotypen bestimmt wurden, verschiedene Diagnosen den Verdacht auf einen Surfactantproteindefekt begründeten, sind die hier erhobenen Daten nicht geeignet, eine Korrelation mit einem bestimmten Phänotyp herzustellen. Bei der weiteren Untergliederung in drei Gruppen von sieben Patienten mit Alveolarproteinose, vier Neugeborenen mit Atemnotsyndrom (RDS) und drei Säuglingen mit rezidivierender Pneumonie wären die einzelnen Zahlen zu klein für eine statistische Auswertung. Aus dem Vergleich der in unserem heterogenen Patientenkollektiv bestimmten Allelfrequenzen mit den von Floros et al. 1996 in einem ebenso heterogenen, aber weitaus größeren Kollektiv ermittelten Daten kann jedoch die Größe der Population geschätzt werden, in der die hier beobachteten Abweichungen signifikant würden. Die Zahlen der neuen Allele 6a\* und 6a# wurden zu der Anzahl des am nächsten verwandten Allels 6a3 addiert (das zweite SP-A1-Allel von Patient 15 wurde als 6a2 gezählt). Ebenso wurden die Zahlen von Allel 1a0 und 1a# addiert. Bei der von Floros et al. angewandten Oligohybridisierung konnten die hier beschriebenen Einzelbasensubstitutionen, die diese Allele von den bekannten unterscheiden, nicht auffallen (Floros und Hoover 1998). Die nur in Einzelfällen beobachteten Allele 6a5, 1a4 und 1a<sup>§</sup> werden nicht bei der Berechnung der

Allelfrequenzen berücksichtigt, da es noch keine Anhaltspunkte dafür gibt, dass es sich um konstant weitervererbte Allele handelt.

**Tabelle 5-2: Vergleich der Allelfrequenzen und erforderliche Stichprobengröße im Vorzeichentest**

Die Allelfrequenz  $q$  ist hervorgehoben;  $\alpha$  ist die im Chi-Quadrat-Test errechnete Signifikanz.

$n'$  ist der nötige Stichprobenumfang, um Signifikanz ( $\alpha \leq 0,05$ ) mit einer *power* von 80 % zu erreichen.

$n_1$  &  $n_2$  ist der nötige Stichprobenumfang von zwei gleich großen Populationen im direkten Vergleich.

SP-A1-Allele	Scholz (n=28)	Floros 1996 (n=526)	$\alpha$	$n'$	$n_1$ & $n_2$
6a	<b>3,6</b> (0,1-18,3) %	<b>9,3</b> (7,0-12,1) %	0,30	<b>122</b>	259
6a2	<b>57,1</b> (37,2-75,5) %	<b>54,4</b> (50,0-58,7) %	0,77	<b>1990</b>	4046
6a3 (+ 6a* + 6a#)	<b>35,7</b> (18,6-55,9) %	<b>27,8</b> (24,0-31,8) %	0,36	<b>206</b>	447
6a4	<b>3,6</b> (0,1-18,3) %	<b>8,6</b> (6,3-11,3) %	0,35	<b>153</b>	322
SP-A2-Allele	Scholz (n=24)	Floros 1996 (n=490)	$\alpha$	$n'$	$n_1$ & $n_2$
1a0 (+ 1a#)	<b>50,0</b> (29,1-70,9) %	<b>56,5</b> (52,0-61,0) %	0,53	<b>359</b>	751
1a	<b>4,2</b> (0,1-21,1) %	<b>12,0</b> (9,3-15,3) %	0,24	<b>80</b>	172
1a1	<b>8,3</b> (1,0-27,0) %	<b>21,6</b> (18,1-25,5) %	0,12	<b>47</b>	103
1a2	<b>16,7</b> (4,7-37,4) %	<b>9,0</b> (6,6-11,9) %	0,21	<b>104</b>	259
<u>1a3</u>	<u><b>12,5</b></u> (2,7-32,4) %	<u><b>0,8</b></u> (0,2-2,1) %	<u><math>\leq 0,001</math></u>	<b>(14)</b>	72
<u>1a*</u>	<u><b>8,3</b></u> (1,0-27,0) %	<u><b>0,0</b></u> (0,0-0,6) %	<u><math>\leq 0,001</math></u>	<b>(8)</b>	93

Bei den SP-A1-Allelen war keine signifikante Abweichung von in der Literatur angegebenen Häufigkeiten zu beobachten, die alle innerhalb der hier bestimmten 95 %-Konfidenzintervalle liegen. Auch bei den häufigeren SP-A2-Allelen wurde selbst eine scheinbare Verringerung der Allelfrequenz auf weniger als die Hälfte wie bei Allel 1a1 mit  $\alpha = 0,12$  in **Tabelle 5-2** nicht signifikant. Um die Differenz der für 1a1 berechneten Allelfrequenz von  $q \approx 8,3$  (1,0 - 27,0) % zum Literaturwert von  $q = 21,6$  % mit einer *power* von  $1 - \beta \geq 80$  % signifikant nachzuweisen, müssten mindestens  $n' = 47$  Allele untersucht werden. Wenn zwei gleich große Gruppen von Patienten und Kontrollpersonen verglichen werden sollten, wären in jeder Gruppe  $n_1$  &  $n_2 = 103$  Allele, zusammen also mehr als 100 Probanden nötig. Nur das seltene Allel 1a3, mit  $q < 1$  % definitionsgemäß eine Mutation (Floros und Hoover 1998), wurde trotz der niedrigen Zahl der Patienten mit  $q \approx 2,7 - 32,4$  % signifikant häufiger beobachtet ( $\alpha < 0,001$ ). Das in den Arbeiten von Floros et al. nicht detektierte Allel 1a\* wurde mit  $q \approx 1,0 - 27,0$  % natürlich ebenfalls signifikant häufig beobachtet ( $\alpha < 0,001$ ). Die mögliche Bedeutung einzelner allelischer Varianten für ihre Träger wird in **Abschnitt 5.3.1** diskutiert.

Aus den in der Literatur veröffentlichten Allelfrequenzen lässt sich auf die Häufigkeit der in den entsprechenden Studien beobachteten Polymorphismen innerhalb der SP-A-Gene zurückrechnen.

Wie aus **Tabelle 1-2** und **Tabelle 1-3** ersichtlich, entspricht die Allelfrequenz 6a der Häufigkeit des Polymorphismus 1101T>C, Allelfrequenz 6a4 entspricht der Frequenz von 3241C>T, die Häufigkeit von 1544A>G ist die Summe der Allelfrequenzen 6a + 6a4 und die Häufigkeit von 1193G>C im SP-A1-Gen ist die Summe aller Allelfrequenzen minus dem Wildtypallel 6a2. Im SP-A2-Gen entspricht die Allelfrequenz 1a der Häufigkeit der Substitution 1649G>C, die Häufigkeit von 3265C>A ergibt sich als Summe der Allelfrequenzen 1a1 + 1a3, die Frequenz von 3018C>T als Summe der Allelfrequenzen 1a1 + 1a3 + 1a# und die von 1098A>C als Summe der Allelfrequenzen 1a + 1a1 + 1a2 + 1a4. Die Substitutionen 1162C>T und 3138T>C im SP-A1- und 1220G>C im SP-A2-Gen wurden von Floros et al. nicht beschrieben. Die bei Patient 4 und 12 beobachteten Polymorphismen, bei denen lediglich die korrekte Bestimmung des Haplotyps unmöglich war, wurden in **Tabelle 5-3** mitgezählt. Trotz auffälliger Abweichungen in der Häufigkeit einzelner Polymorphismen war die Zahl der untersuchten Allele zu gering. Erst bei Analyse von mindestens 63 Allelen, also etwa allen 31 Patienten, würde bei gleichbleibender Häufigkeit die Abweichung am polymorphen Genort Codon 62 mit einer der *power* von  $1 - \beta \geq 80\%$  entsprechenden Wahrscheinlichkeit signifikant.

**Tabelle 5-3:** Vergleich der Häufigkeit einzelner Polymorphismen und erforderliche Stichprobengröße

Die Frequenz  $q$  des Polymorphismus ist hervorgehoben; die Signifikanz  $\alpha$  wurde im Chi-Quadrat-Test errechnet.  $n'$  ist der nötige Stichprobenumfang, um Signifikanz ( $\alpha \leq 0,05$ ) mit einer *power* von 80 % zu erreichen.  $n_1$  &  $n_2$  ist der nötige Stichprobenumfang von zwei gleich großen Populationen im direkten Vergleich.

SP-A1-Varianten	Scholz (n=28)	Floros 1996 (n=526)	$\alpha$	$n'$	$n_1$ & $n_2$
<b>1101T&gt;C (Val19Ala)</b>	<b>3,6</b> (0,1-18,3) %	<b>9,3</b> (6,9-12,1) %	0,30	<b>122</b>	259
<b>1193G&gt;C (Val50Leu)</b>	<b>42,9</b> (24,5-62,8) %	<b>45,6</b> (41,3-50,0) %	0,77	<b>1990</b>	4046
1544A>G (62Pro)	<b>7,1</b> (0,9-23,5) %	<b>17,9</b> (14,7-21,4) %	0,14	<b>63</b>	135
2985A>G (133Thr)	<b>3,6</b> (0,1-18,3) %	<b>9,3</b> (7,0-12,1) %	0,30	<b>122</b>	259
<b>3241C&gt;T (Arg219Trp)</b>	<b>3,6</b> (0,1-18,3) %	<b>8,6</b> (6,3-11,3) %	0,35	<b>153</b>	322
SP-A2-Varianten	Scholz (n=28)	Floros 1996 (n=490)	$\alpha$	$n'$	$n_1$ & $n_2$
<b>1098A&gt;C (Asn9Thr)</b>	<b>42,9</b> (24,5-62,8) %	<b>42,7</b> (38,2-47,2) %	0,98	<b>363250</b>	727624
<b>1649G&gt;C (Ala91Pro)</b>	<b>10,7</b> (2,3-28,2) %	<b>12,0</b> (9,3-15,3) %	0,83	<b>3598</b>	7235
3018C>T (140Ser)	<b>35,7</b> (18,7-55,9) %	<b>22,4</b> (18,8-26,4) %	0,11	<b>68</b>	159
<b>3265C&gt;A (Gln223Lys)</b>	<b>28,6</b> (13,2 - 48,7) %	<b>22,4</b> (18,8-26,4) %	0,45	<b>304</b>	659

Beim Vergleich von Allelfrequenzen ist die Abstammung der Patienten zu beachten (Floros und Hoover 1998). Rishi et al. beobachteten 1992 mit  $H = 18,6$  versus  $49,3\%$  eine signifikante Verminderung Heterozygoter bei Individuen indogermanischer (*caucasian*) Abstammung am einzigen damals als polymorph bekannten Genort Codon 50 im SP-A1-Gen ( $P(\chi_1^2 > \chi^2) < 0,001$  in **Tabelle 5-4**), die von Krizkova et al. 1994 in einer größeren Population nicht reproduziert wurde. Die bei Angehörigen der Ibo und Yoruba in Nigeria mit  $H = 21,0$  versus  $30,5\%$

beobachtete Verminderung Heterozygoter ( $P(\chi_1^2 > \chi^2) = 0,016$ ) wurde angesichts der verringerten Allelfrequenz ( $q = 18,5$  versus  $32,9\%$  mit  $\alpha = 0,006$ ) durch einen Gründereffekt (*founder effect*) erklärt, da sie bei in den USA lebenden Afrikanern nicht auftrat. Bei letzteren war die Allelfrequenz sogar erhöht ( $q = 51,3$  versus  $32,9\%$  mit  $\alpha = 0,006$ ), nicht jedoch bei den Afrikanern in einer späteren Studie (Kala et al. 1998). Kleine Populationen sind nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, da die spontane Gendrift verhindert, dass der als *founder effect* bezeichnete Beitrag eines Allels durch Vermischung kompensiert wird (Sperlich 1988). Die Häufigkeit des Polymorphismus 1193G>C im SP-A1 bei unseren Patienten indogermanischer Abstammung entspricht mit  $q = 42,9\%$  versus  $47,7\%$  der von Kala et al. an Individuen gleicher Abstammung ermittelten ( $\alpha = 0,64$ ). Über die anderen polymorphen Genorte lagen keine entsprechenden Daten vor.

**Tabelle 5-4:** Häufigkeit des Polymorphismus 1193G>C (Val50Leu) im SP-A1-Gen mit 95 %-Konfidenzintervall Die Signifikanz  $\alpha$  wurde jeweils gegen die indogerm. Population, bei \* gegen die gesunden Individuen indogerm. Abstammung von Kala et al. getestet. Die Proportion Heterozygoter  $h$  wurde mit dem erwarteten Heterozygotiegrad  $H_{et}$  verglichen. Die Konkordanz  $P(\chi_1^2 > \chi^2)$  mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz wurde im Chi-Quadrat-Test berechnet.

Studie	Abstammung	n	q [%]	$\alpha$	H [%]	h [%]	$P(\chi_1^2 > \chi^2)$
<b>Rishi 1992</b>	<u>Indogermanisch</u>	86	<b>41,9</b> (31,3-53,0)	0,64	<b>18,6</b> (8,4 - 33,4)	<u>49,3</u>	$\leq 0,001$
	Nigerianisch	40	<b>37,5</b> (22,7-54,2)		<b>35,0</b> (15,4 - 59,2)	48,1	0,26
<b>Krizkova 1994</b>	Indogermanisch	164	<b>32,9</b> (25,8-40,7)	<u>0,006</u>	<b>43,9</b> (33,0 - 55,3)	44,4	0,96
	<u>Nigerianisch</u>	124	<b>18,5</b> (12,1-26,5)		<b>21,0</b> (11,7 - 33,2)	<u>30,5</u>	<u>0,016</u>
	<u>Afrikanisch</u>	78	<b>51,3</b> (39,7-62,8)		<b>35,9</b> (21,2 - 52,8)	50,6	0,08
<b>Kala 1998</b>	Indogermanisch	172	<b>47,7</b> (40,4-55,4)	0,55	keine Genotypen		
	Afrikanisch	24	<b>54,2</b> (32,8-74,4)		veröffentlicht		
<b>Scholz</b>	Indogermanisch	28	<b>42,9</b> (24,5-62,8)	*0,64	<b>42,9</b> (17,7 - 71,1)	50,8	0,64

### 5.3 Nutzen der Analyse der SP-A-Gene

Assoziationsstudien können ein wichtiges Werkzeug sein, um postulierte genetische Einflüsse auf die Ätiologie multifaktorieller Erkrankungen aufzudecken. **Der Effekt allelischer Varianten auf die Funktion des SP-A** ist bisher wenig untersucht, jedoch könnten Parallelen zum homologen mannosebindenden Lektin (MBL) im Serum bestehen. Bei entsprechenden Patienten könnte das Überwiegen bestimmter **SP-A-Genotypen als Risikofaktor für frühkindliche Pneumonien** demonstriert werden. **Der Heterozygotenvorteil** ist an den Besitz von zwei ungleichen Allelen gebunden und könnte das häufige Auftreten der weniger aktiven genetischen Variante in der Normalpopulation erklären. Der ungewöhnlich hohe

**Informationsgehalt der SP-A1-SP-A2-Haplotypen** macht den Genort *sftp1* zu einem nützlichen genetischen Marker.

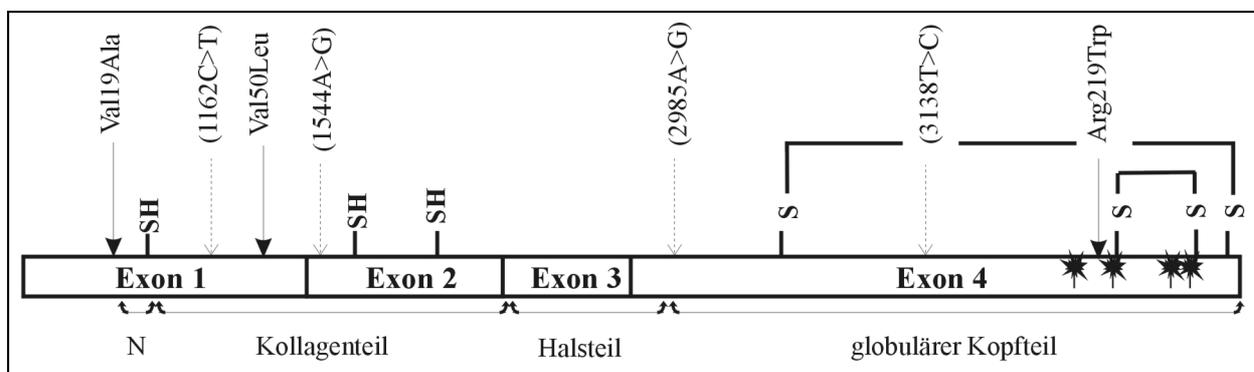
### 5.3.1 Der Effekt allelischer Varianten auf die Funktion des SP-A

Die genetische und strukturelle Homologie des SP-A in der Lunge zum **MBL** im Serum scheint sich auch auf die funktionelle Ebene zu erstrecken. Die mögliche Wirkung der in bestimmten Patientenproben beobachteten **Aminosäuresubstitutionen in SP-A1 und SP-A2** auf die Struktur und Funktion des SP-A soll unter diesem Blickwinkel diskutiert werden.

Auf die ähnliche Funktion und den gemeinsamen phylogenetischen Ursprung von SP-A und **MBL** deutet neben der strukturellen Übereinstimmung (Drickamer et al. 1986) auch die in **Abbildung 1-1** bereits skizzierte Anordnung ihrer Gene nahe dem des zweiten hydrophilen Surfactantproteins SP-D (*sftp3*) auf dem langen Arm von Chromosom 10 hin (Kölble et al. 1993). Sie alle werden als Kollektine bezeichnet, da sie einen Stiel aus aneinander gebundenen Tripelhelices (kollagenartige Domäne) besitzen, auf denen globuläre Domänen sitzen, die die hochkonservierte Kohlehydraterkennungsregion (*carbohydrate recognition domain*, CRD) enthalten, welche die spezifische Bindung an Oligosaccharide (Lektinaktivität) vermittelt. Hier befinden sich, durch die bereits in **Abbildung 1-3** skizzierten Disulfidbrücken zwischen 224Cys und 238Cys sowie 155Cys und 246Cys räumlich stabilisiert, zehn invariante Aminosäuren von denen wenigstens vier an der Komplexbildung mit Mannose und einem Kalziumion beteiligt sind, wie mit Hilfe von röntgenspektografischen Messungen beim MBL gezeigt werden konnte. Beim SP-A sollen die entsprechenden Aminosäuren 215Glu, 222Glu, 234Asn und 235Asp diese Funktion übernehmen. Auch die Bindung an Typ-II-Pneumozyten, die Regulation des Surfactanthaushalts sowie die Fähigkeit zur Lipidaggregation können durch Austausch einer dieser Aminosäuren gegen Alanin unterbunden werden (McCormack 1998). Beim Austausch der Aminosäuren 214Gly\_234Asn gegen die entsprechende Domäne des MBL wurden anstelle der SP-A-spezifischen Bindung an Typ-II-Pneumozyten und Phospholipide Bindungsmuster des MBL ins chimäre Molekül eingeführt (Chiba et al. 1999).

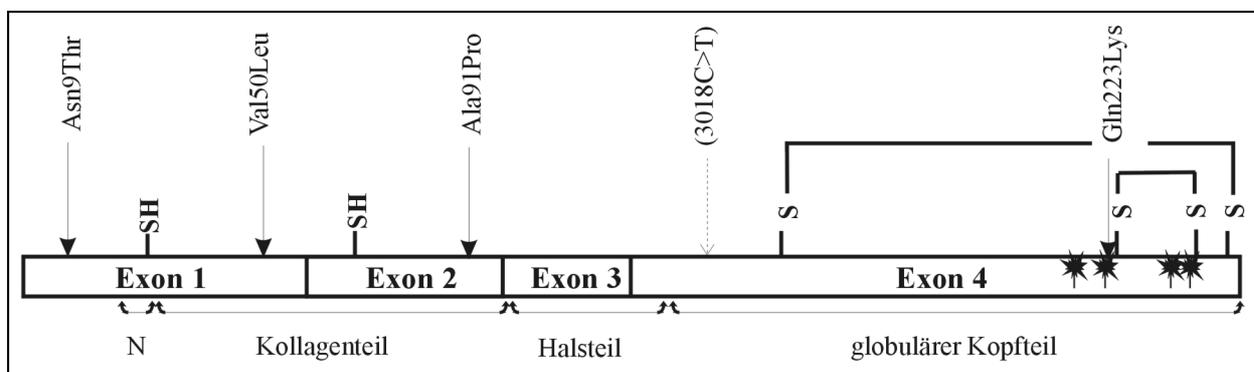
Eine Reihe der varianten **Aminosäuresubstitutionen in SP-A1 und SP-A2** befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu den in **Abbildung 5-1** und **Abbildung 5-2** durch Sterne (\*) gekennzeichneten Mannosebindungsstellen. Im SP-A1-Allel 6a4 (Arg219Trp) ist das zwischen den an der Mannosebindung beteiligten Aminosäuren 215Glu und 222Glu lokalisierte, basische Arginin durch das hydrophobe Tryptophan ersetzt. Dieser in der von Floros et al. untersuchten

Population mit einer Häufigkeit von 8,5 % seltenste Polymorphismus in den SP-A-Genen war in dem hier untersuchten Patientenkollektiv nur in einem Allel von Patient 37 zu detektieren. Bei diesem Erwachsenen mit idiopathischer Alveolarproteinose bestand darüber hinaus im SP-A2-Gen Homozygotie für die Substitution des zwischen der mannosebindenden Aminosäure 222Glu und der an der kleinen Disulfidschleife beteiligten Aminosäure 224Cys lokalisierten, hydrophoben Glutamins durch das basische Lysin (Gln223Lys). Dieser in den Allelen 1a1, 1a3 und 1a4 beobachtete Polymorphismus ist mit einer in der Literatur angegebenen Allelfrequenz von 22,4 % recht häufig. Homozygotie für Gln223Lys bestand ebenfalls bei Patient 34, einem Neugeborenen mit fataler "idiopathischer" Alveolarproteinose, bei dem die "klassische" kongenitale Alveolarproteinose (CAP) durch den Nachweis von SP-B in der BAL und die Analyse auf die bekannten Defekte sowohl des SP-B- als auch des GM-CSF-Rezeptorgens ausgeschlossen worden war, sowie bei Patient 12, bei dem genotypisch eine somatische Mutation der Leukozyten-DNA und phänotypisch das bei malignen hämatologischen Erkrankungen nicht ganz seltene sekundäre Auftreten der Alveolarproteinose als alternative Erklärung diskutiert werden kann. Bei Patient 34 hingegen lag der Polymorphismus als Bestandteil des mit einer in der Literatur veröffentlichten Frequenz von 0,9 % sehr seltenen Allels 1a3 vor. Falls dieses Allel außer Exon 1 (wie aus **Tabelle 1-3** ersichtlich) auch die regulativen 5'-UT-Sequenzen mit dem Wildtypallel 1a0 teilt, ließe sich spekulieren, dass es sich ebenso um ein schwach exprimiertes Allel handelt (Karinch et al. 1997). Das seltene homozygote Auftreten eines Allels mit geringer mRNA-Expression und Kodierung eines möglicherweise strukturell veränderten Genprodukts könnte im Falle dieses Patienten die pathogenetisch noch wenig verstandene Alveolarproteinose zumindest mitverursacht haben. Der Polymorphismus Gln223Lys war ebenso auf einem Allel von Patient 4, einem älteren Kind mit idiopathischer Alveolarproteinose und einem Allel von Patient 7, einem Frühgeborenen mit konnataler Pneumonie beobachtet worden.



**Abbildung 5-1:** Lokalisation der allelischen Varianten im SP-A1 (erweitert nach Floros et al. 1996)  
Die vier mannosebindenden Aminosäuren 215Glu, 222Glu, 234Asn und 235Asp sind mit einem \* gekennzeichnet.

Patient 7 war abgesehen von der mit einer ausgeprägten Monozytose (22 % von insgesamt 17,5 Leukozyten/nl) einhergehenden konnatalen Pneumonie, die schlecht auf antibiotische Therapie ansprach, phänotypisch wenig auffällig. Der Genotyp jedoch war durch das Vorliegen der Substitution des hydrophoben Valin im achten Kollagentriplett durch die ein Kohlenstoffatom längere, verwandte Aminosäure Leucin (Val50Leu) in beiden SP-A-Genen in heterozygoter Ausprägung gekennzeichnet. (Die Vermischung der Sequenzen beider Gene wurde wie in **Abschnitt 5.1.4** erläutert ausgeschlossen.) Auch Patient 10, ein Neugeborenes mit schwerem RDS, bei dem in einer BAL eine niedrige Konzentration von SP-A ermittelt worden war, war in beiden Genen heterozygot für Val50Leu. Die in **Abschnitt 5.3.2** näher beschriebenen Mutationen des MBL befinden sich an vergleichbarer Lokalisation und stören durch den Austausch der für die Tripelhelixbildung obligaten Aminosäuren (Glycin) ohne gegen solche mit Seitenketten oder den Einbau einer Thiolgruppe (Substitution von Cystein) die Kollagenstruktur. Analoge Mutationen in den Kollagengenen sind Ursache der gestörten Kollagenbildung beim Ehlers-Danlos-Syndrom oder der *Osteogenesis imperfecta* (Prockop 1985). Bei homozygoten Trägern einer Mutation im MBL werden ebenso wie bei kombiniert Heterozygoten (*compound heterozygous*) niedrige Serumkonzentrationen gemessen, da die Bildung intakter Oktadekamere gestört ist (Lipscombe et al. 1995). Homozygot für Val50Leu im SP-A1-Gen waren außer Patient 37 (dem bereits erwähnten Erwachsenen mit idiopathischer Alveolarproteinose und Homozygotie für das seltene Allel 6a4) Patient 5 (ein Frühgeborenes mit kompliziertem, protrahiertem RDS) und Patient 6 (ein Neugeborenes mit fataler Alveolarproteinose, bei dem ebenfalls keiner der klassischen Gendefekte vorlag). Mit einer Häufigkeit von etwa 45 % im SP-A1- und immerhin 7 % im SP-A2-Gen ist Val50Leu die häufigste genetische Variante des SP-A überhaupt. Zwar ist eine massive Störung der Tripelhelixbildung durch diese Mutation unwahrscheinlich, doch könnte beispielsweise die Affinität der Bindung am Kollektinrezeptor der Phagozyten durch den Polymorphismus beeinflusst werden.



**Abbildung 5-2:** Lokalisation der allelischen Varianten im SP-A2 (erweitert nach Floros et al. 1996)

Für die übrigen Substitutionen, die den Austausch verwandter Aminosäuren betreffen, existieren keine Hinweise auf eine Beeinflussung der Struktur des Proteins. Im einundzwanzigsten Kollagentriplett des Allels 1a ist anstelle des in den anderen SP-A2-Allelen vorliegenden Alanins wie im SP-A1 die Aminosäure Prolin kodiert (Ala91Pro). Innerhalb der kollagenartigen Domäne gibt es zahlreiche Prolinmoleküle, die bei der Prozessierung hydroxyliert werden und in dieser Form für Wasserstoffbrückenbindungen zur Stabilisation der Tripelhelix zur Verfügung stehen (McCormack 1998). In der Signalsequenz der SP-A2-Allele 1a, 1a1, und 1a2 ist Asparagin durch das ebenfalls hydrophile Threonin substituiert (Asn9Thr) und im SP-A1-Allel 6a Valin durch das ebenfalls hydrophobe Alanin (Val19Ala). Die "stillen" Einzelbasen-Substitutionen ohne Einfluss auf die Primärstruktur sind aus den Abbildungen ersichtlich.

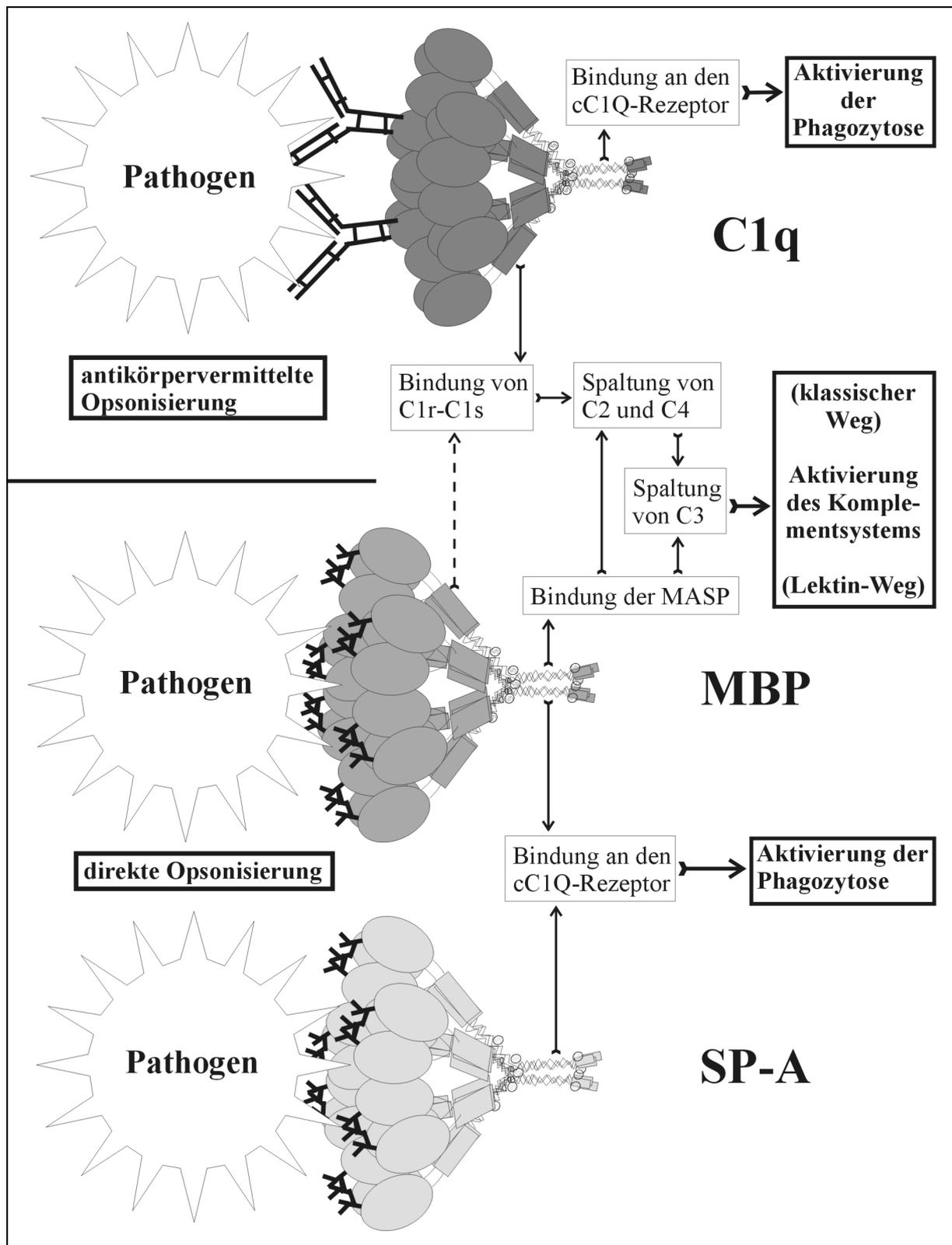
### 5.3.2 SP-A-Genotypen als Risikofaktor für frühkindliche Pneumonien

SP-A scheint Pathogene in der Lunge zu opsonisieren und so an der **Aktivierung des Immunsystems** beteiligt zu sein. Bei den Defektmutanten des MBL führen erst weitere Faktoren zur Manifestation des **Opsonierungsdefekts** im Serum. **Physiologischer IgG-Mangel** bei Frühgeborenen und Säuglingen könnte einen mit bestimmten allelischen Varianten des SP-A assoziierten Opsonierungsdefekt in der Lunge als **Pneumonie** offenbar werden lassen.

Die strukturell mit den Kollektinen verwandte Untereinheit C1q der ersten Komponente des Komplementsystems stellt ein Modell für die **Aktivierung des Immunsystems** durch Opsonine dar. Die globulären Domänen des C1q binden vernetzte Immunglobuline, während MBL und SP-A an entsprechend angeordnete Oligosaccharide oder andere in **Abschnitt 1.1.4** genannte Oberflächenmarker binden. Wie **Abbildung 5-3** zeigt, ist die kollagenartige Domäne aller drei Moleküle der Ligand für Kollektinrezeptoren (cC1qR und cC1qR<sub>p</sub>) auf Monozyten und Makrophagen (Malhotra et al. 1992 und Nepomuceno et al. 1997), die die Phagozytose anregen. Die mit dem MBL assoziierte Serinprotease (MASP) aktiviert ebenfalls das Komplementsystem.

Super et al. erkannten 1989 den MBL-Mangel als Ursache eines 1968 erstmals beschriebenen **Opsonierungsdefekts** im Serum, der vor allem bei Kindern durch Mittelohrentzündungen, rezidivierende Infektionen der Atemwege, Diarrhöe und atopische Erkrankungen auffällt (Garred et al. 1996) und selbst Erwachsene zu Infektionen mit sonst von MBL opsonisierten Erregern disponiert (Summerfield et al. 1995). Mutationen in der kollagenartigen Domäne des MBL wie die Substitution von Glycin durch Asparaginsäure in Codon 54 (Gly54Asp, Sumiya et al. 1991), durch Glutaminsäure in Codon 57 (Gly57Glu, Lipscombe et al. 1992) oder von Arginin in

Codon 52 durch Cystein (Arg52Cys, Madsen et al. 1994) stören die Tripelhelixbildung.



**Abbildung 5-3: Vergleich der Opsonisierung von Krankheitserregern durch C1q, MBL und SP-A**  
Der *cC1q-Rezeptor* (auf Monozyten und Makrophagen) bindet die kollagenartige Domäne des C1q und der Kolektine. Die mit dem MBL assoziierte Serinprotease (MASP) aktiviert Komplement auf dem Lektinweg.

Bei den defekten MBL-Mutanten erfolgt trotz Bindung an Krankheitserreger keine Aktivierung des Komplementsystems über die MASP (Matsushita et al. 1995). Der Opsonierungsdefekt wird bei Hinzutreten anderer Immundefekte klinisch manifest. Die MBL-Mutationen wurden häufiger bei Mangel an Immunglobulin G der Subklasse 3 (IgG3) beobachtet (Garred et al. 1996), welches insbesondere der Neutralisation von Viren dient. Da C1q nicht an IgG4 und nur schwach an IgG2 bindet (Reid 1996), sind beim kombinierten Defekt MBL- und C1q-vermittelte Aktivierung von Komplement beeinträchtigt. Auch ein isolierter, selektiver IgA-Mangel verursacht selten typische Infektionen (Tosi und Cates 1998). Erst das Fehlen eines Komplementfaktors (isolierter Mangel an C1q, C2 und C3, Densen 1995) oder der selektive Mangel an IgG2 (Fassano et al. 1990), das eine besondere Affinität für Polysaccharidantigene zeigt, vermag die Elimination kapseltragender Bakterien wie Meningokokken, Pneumokokken und *Haemophilus influenzae* ernsthaft zu beeinträchtigen.

**Physiologischer IgG-Mangel** besteht nach Verlust der transplazentar übertragenen Antikörper im Alter von 6 - 24 Monaten. In den ersten drei Monaten fällt der Serumspiegel auf unter 40 % ab. Die frühe Synthese von IgG3 kann den Verlust nicht ausgleichen. Erst die Bildung von IgG1, das stärker an Proteinantigene bindet, führt zum Anstieg der Serumspiegel. Mit acht Monaten findet ein Subklassenwechsel zugunsten von IgG2 statt. Mit zwei Jahren erreicht die Aktivität dieses wichtigen Opsonins das Niveau Erwachsener. Auch die Komplementaktivität beträgt bei Geburt nur 50 - 70 % der Werte Erwachsener. Und obwohl die klassische Komplementkaskade (mit Aktivierung über C1q) bereits im Alter von drei bis sechs Monaten volle Aktivität erreicht, ist der alternative Weg (bei dem Endotoxine der Bakterien direkt C3 aktivieren) erst zu Beginn des zweiten Lebensjahres ausgereift (Ferriani et al. 1990). Streptokokken der Serogruppe A und B, *Haemophilus influenzae* Typ b, *Escherichia coli*, Pneumokokken, Meningokokken und Salmonellen, die alle die Komplementkaskade nicht auf dem alternativen Weg aktivieren, verursachen in diesem Alter die meisten Infektionen (Joiner 1988). Da auch die Abwehrzellen in den ersten Lebensjahren eine verminderte Chemotaxis und eingeschränkte Bakterizidie aufweisen und die Kapazität zur Bildung von Neutrophilen im Knochenmark noch gering ist, stellen Bakteriämien, Pyodermie und Pneumonie häufige Probleme dar (Tosi und Cates 1998).

In den ersten beiden Lebensjahren erkranken jährlich etwa 40 von 1.000 Kindern an einer **Pneumonie**. Die häufigsten Erreger sind Viren, die entweder eine akute Bronchiolitis oder eine Bronchopneumonie auslösen. Die meisten bakteriellen Pneumonien im ersten Lebensjahr werden durch *Haemophilus influenzae* Typ b verursacht, einen nicht von SP-A opsonierten Erreger (McNeely und Coonrod 1994). Infektionen mit Typ a, c oder d, gegen die sich die opsonisierende Aktivität von SP-A richtet (van Iwaarden et al. 1994), sind selten.

Pneumokokken sind bei älteren Kindern häufiger, Streptokokken der Serogruppe A und *Staphylococcus aureus* treten eher als bakterielle Superinfektion auf und können Pneumatozelen bilden (Klein 1998). Ein relativer SP-A-Mangel wurde bei Infektionen mit grampositiven Erregern gezeigt (Baughman et al. 1993). Wie in **Tabelle 1-1** aufgeführt, opsonisiert SP-A neben *Haemophilus influenzae* Typ a auch Pneumokokken und *Staphylococcus aureus* (McNeely und Coonrod 1993), Streptokokken der Serogruppen A (Tino und Wright 1996) und B (Korfhagen et al. 1998), sowie einige *Escherichia coli*- (van Iwaarden et al. 1994) und *Klebsiella*-Stämme (Kabha et al. 1997). Letztere verursachen bei Kindern, deren Immunabwehr beeinträchtigt ist, ernste Pneumonien (Klein 1998). Auch Erreger atypischer Pneumonien wie *Herpes simplex*-Viren (van Iwaarden et al. 1991) und *Aspergillus fumigatus* (Madan et al. 1997a) werden von SP-A opsonisiert.

### 5.3.3 Der Heterozygotenvorteil

Der Nachweis einer Assoziation des häufigsten SP-A2-Allels 1a0 mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung des RDS bei Neugeborenen ab der 29. SSW (Kala et al. 1998) und die Hinweise auf eine schwache Expression von mRNA durch dieses Allel (Karinch et al. 1997) führten zur Annahme eines Heterozygotenvorteils, der die Nachteile für Träger dieses Allels im Neugeborenenalter auf einer anderen Ebene kompensiert (Floros und Hoover 1998).

Das klassische Beispiel für einen solchen ausbalancierten Polymorphismus ist das Vorkommen des Sichelzellhämoglobins in Malariagebieten. Auch die zum MBL-Mangel führenden, mutierten Allele B, C und D des MBL-Gens unterliegen innerhalb von in den Tropen angesiedelten Populationen einem Selektionsvorteil. Bei Afrikanern beträgt die Häufigkeit aller drei mutierten Allele zusammen etwa 30 % versus 20 % bei Individuen indogermanischer Abstammung (*Caucasian*, Lipscombe et al. 1996). Möglicherweise mildert die relative Verminderung der MBL-vermittelten Opsonisierung bei heterozygoten Trägern in den Tropen häufiger auftretende parainfektiose Komplikationen wie zum Beispiel das durch Komplementaktivierung ausgelöste Waterhouse-Friedrichson-Syndrom bei Meningokokkensepsis, wie es von Defekten des Komplementsystems bekannt ist (Ross und Denson 1984). Gestützt wird diese Hypothese durch die Verteilung der Promotervarianten, deren mit einer hohen Expression von mRNA assoziierte (*high expression*) Variante in Afrika eine Häufigkeit von 8 %, bei Individuen indogermanischer Abstammung aber 33 % erreicht (Madsen et al. 1995). Auch die Konzentrationen von IgG der Subklassen 2, 3 und 4 sind bei Afrikanern niedriger (Wasserman und Sorensen 1999).

Beim SP-A mit seinen vielfältigen Aufgaben im Surfactanthaushalt und bei der Abwehr von Krankheitserregern müssen diverse Einflüsse selektiv auf die verschiedenartigen allelischen Varianten einwirken. Das Vorliegen zweier unabhängig regulierter Kopien des SP-A-Gens mit mehreren allelischen Varianten erleichtert die Reaktion des SP-A-Genotyps auf Veränderungen der Umwelt im Sinne genetischer Ökonomie (*parsimony*, Floros und Hoover 1998).

### 5.3.4 Informationsgehalt der SP-A1-SP-A2-Haplotypen

Der SP-A-Genort *sftp1* scheint einen der unregelmäßig im Genom verteilten *mutation hotspots* darzustellen (Kölble et al. 1993). Aus den beobachteten Verbindungen einzelner Varianten lassen sich **SP-A1-SP-A2-Haplotypen** berechnen, die Information über regulative Elemente beinhalten. Ihr hoher **Gehalt an Polymorphismusinformation (PIC)** macht die SP-A-Gene zu wertvollen genetischen Markern bei der Analyse von Störungen des Surfactantsystems selbst und der Lokalisation anderer defekter Gene auf demselben Chromosom in einer Kopplungsanalyse.

Genorte, an denen so häufig wie in den SP-A-Genen Polymorphismen beobachtet werden, nennt man *mutation hotspots*. In der Mehrzahl handelt es sich um C-T- oder T-C-Transitionen, die in vielen Genen regelmäßig als Neumutationen vorkommen. Wenn sie Einfluss auf die Proteinsequenz haben, können sie wie die zahlreichen Mutationen im Keratin 9-Gen hereditäre Erkrankungen wie die epidermiolytische Palmoplantarkeratose verursachen (Reis et al. 1994). Der Polymorphismus 3018C>T in Codon 140 des SP-A2-Gens war bei der Sequenzierung der Allele 1a1 und 1a3 aufgefallen (Floros et al. 1996). Wir fanden den Polymorphismus in einigen Allelen mit der Wildtypsequenz und definierten das neue Allel 1a# des SP-A2-Haplotyps [3018T>C]. Die neuen Polymorphismen 1162C>T und 3138T>C in Codon 39 und 184 des SP-A1-Gens sind ebenfalls C-T-Transitionen. Die bei der Amplifikation der DNA *in vitro* entstandenen Polymerasefehler waren oftmals in oder nahe der polymorphen Codons in den SP-A-Genen lokalisiert. So hat Klon 6.1 eine T-C-Transition in Codon 50 und Klon 8.2 die C-T-Transition in Codon 39 (beide hervorgehoben in **Tabelle 4-13**). Außerdem wurden bei Klon 8.8 eine A-G-Transition in Codon 51 und bei Klon 6.7 in **Tabelle 4-16** zwei G-C-Transitionen in Codon 72 beobachtet. Lin et al. zeigten 1998, dass die häufigste mit hereditärem SP-B-Mangel verbundene Mutation 121ins2 und eine weitere Leserastermutation 122delT (g.2592delT) in einer als *mutation hotspot* bekannten Sequenz des SP-B-Gens liegen (g.2587\_2593CCCCCTG), die durch das Motiv "CCTG" in einer Kette von Cytosinbasen (*poly(C) tract*) charakterisiert ist. Der hier beschriebene Polymorphismus 1162C>T liegt in einer cytosinreichen Sequenz des

SP-A1-Gens (1151\_1168CCTGGATCCCACGGCCTG), in der zweimal das Motiv "CCTG" vorkommt. Weitere Untersuchungen werden zu klären haben, ob es sich bei den beobachteten Polymorphismen in den SP-A-Genen um wiederkehrende Spontanmutationen oder konstant in der Population vorhandene allelische Varianten handelt (Floros und Hoover 1998).

**Tabelle 5-5:** Geschätzte Häufigkeit der beobachteten Haplotypen (N = 12 diploide Proben)

Unterstrichene Haplotypen erreichten in der Studie von Floros et al. 1996 (N = 239) statistische Signifikanz. Durch neu beschriebene Allele definierte Haplotypen sind *kursiv gesetzt*.

Haplotyp	1a	1a0	1a1	1a2	1a3	1a*	1a#
<b>6a</b>	<u>0,04</u>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>6a2</b>	<u>0,00</u>	<u>0,33</u>	<u>0,00</u>	0,00	0,13	0,00	0,08
<b>6a3</b>	0,00	<u>0,08</u>	<u>0,04</u>	0,08	0,00	0,08	0,00
<b>6a4</b>	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	0,04	<u>0,00</u>	0,00	0,00	0,00
<i>6a*</i>	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00
<i>6a#</i>	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00

Da die beiden Kopien des SP-A-Gens am Genort *sftp1* gekoppelt weitergegeben werden (Floros et al. 1996), konnte aus den beobachteten Genotypen die Häufigkeit einzelner **SP-A1-SP-A2-Haplotypen** errechnet werden. Patient 4 wurde wegen des ungeklärten SP-A2-Genotyps und Patient 12 wegen des fraglichen Allels 1a $\S$  ausgeschlossen. Von elf beobachteten Haplotypen gehören vier zu den bei Floros et al. signifikant häufigen, 6a2/1a0 ist mit 33 % in **Tabelle 5-5** wie in der Literatur häufigsten. Am zweithäufigsten war bei unseren Patienten 6a2/1a3 anstelle 6a3/1a1 (Karinch et al. 1997). Die indirekt aus den diploiden Proben ermittelten Haplotypen umfassen zusätzlich zur in **Abschnitt 5.3.1** diskutierten Aminosäuresequenz die innerhalb der nichttranslatierten DNA lokalisierten, regulativen und strukturbildenden Elemente.

**Tabelle 5-6:** Grad der Heterozygotie und Gehalt an Polymorphismusinformation in den SP-A-Genen

\*: wegen des fraglichen Genotyps 6a2/6a# oder 6a3/6a# bei Patient 15 wurden zwei Werte berechnet

Studie	Genort	n	h [%]	Het [%]	PIC
<b>Scholz</b>	SP-A1	28	57 (29 - 82) %	62 bzw. 65 %*	0,55 bzw. 0,57*
	SP-A2	24	50 (21 - 79) %	<u>79 %</u>	<u>0,73</u>
<b>Floros 1996</b>	SP-A1	526	63 (57 - 69) %	61 %	0,55
	SP-A2	490	50 (44 - 57) %	61 %	0,56

Aus den Zahlen der beobachteten Allele lassen sich der in der untersuchten Population vorherrschende **Gehalt an Polymorphismusinformation (PIC)** und Heterozygotiegrad (*Het*) berechnen. Die fraglich inkonstanten Allele 6a5, 1a4 und 1a $\S$  gingen nicht in die Berechnungen

in **Tabelle 5-6** ein, da die Allele eines Markers nur dann informativ sind, wenn sie mit ausreichender Frequenz und Konstanz in der zu untersuchenden Population vorkommen. Für das SP-A1-Gen wurden zwei Berechnungen durchgeführt, bei denen für Patient 15 einmal der Genotyp 6a2/6a# und einmal der Genotyp 6a3/6a# angenommen wurde. Aufgrund der neu beschriebenen Allele des SP-A2-Gens ist der Heterozygotiegrad mit  $Het = 79\%$  versus  $61\%$  und der PIC mit  $0,73$  versus  $0,56$  deutlich höher als die von Floros et al. 1996 ermittelten Werte. Im menschlichen Genom beträgt der PIC im Mittel  $0,21$  (Sperlich 1988). Ab einem PIC von  $0,50$  oder einem Heterozygotiegrad von  $70\%$  gelten genetische Marker als ausreichend informativ, um in betroffenen Familien eine Kopplung mit Krankheitsgenen an benachbarten Genorten nachzuweisen (Ott 1992).

## 5.4 Ausblick

Die **Anwendung der beschriebenen Methodik** produzierte interessante Einzelergebnisse bei einigen Patienten mit idiopathischer Alveolarproteinose. Um das Vorliegen eines bestimmten SP-A-Genotyps als Risikofaktor für einen Surfactantproteindefekt in einem größeren Patientenkollektiv signifikant zu belegen, sind genaue Kriterien für den Ein- und Ausschluss der Patienten nötig (Floros und Hoover 1998). Das mögliche **Design einer Assoziationsstudie** soll am Beispiel des Phänotyps der frühkindlichen Pneumonie diskutiert werden.

### 5.4.1 Anwendung der beschriebenen Methodik

Die durch die Existenz von zwei Kopien des SP-A-Gens im menschlichen Genom bedingten Schwierigkeiten bei der Analyse der kodierenden DNA-Sequenzen wurden durch die Etablierung der *nested* PCR mit externen, zwischen SP-A1 und SP-A2 diskriminierenden Primern an beiden Enden des SP-A-Gens überwunden. Die hohe Zahl allelischer Varianten erschwert jedoch die Anwendung eines Suchtests (*screening*) wie der SSCP-Analyse, die unspezifisch auf jede Veränderung der DNA-Sequenz reagiert. Bisher verborgene Varianten wie die in **Abschnitt 4.2.1** beschriebenen Polymorphismen fallen am ehesten bei der DNA-Sequenzierung auf (Floros und Hoover 1998). Zwar ist die Analyse von isolierten Polymorphismen mit spezifischen Oligonukleotiden (ASPCR, LCR, SSO) oder Restriktionsenzymen (RFLP-Analyse) möglich. Aufgrund des geringeren Informationsgehalts isolierter Genorte sind dann allerdings größere Populationen erforderlich, um eine Assoziation

zwischen Genotyp und Phänotyp signifikant zu belegen, wie ein Vergleich der erforderlichen Stichprobenumfänge in **Tabelle 5-2** mit 72 bis 4.046 Allelen und **Tabelle 5-3** mit 135 bis 727.624 Allelen andeutet. Da die zahlreichen Polymorphismen in den SP-A-Genen in wechselnden Kombinationen auftauchen, sind die vollständigen Haplotypen weitaus informativer, zu ihrer exakten Bestimmung wird jedoch oftmals die aufwendige DNA-Sequenzierung klonierter Sequenzen nötig sein.

#### 5.4.2 Design einer Assoziationsstudie

Eine Assoziation zwischen Phänotyp und Genotyp erfordert den direkten Vergleich der in einer Patientengruppe ermittelten Allelfrequenzen mit denen einer Kontrollgruppe. Beide müssen derselben Population entstammen, da die Abstammung wie in **Tabelle 5-4** die Allelfrequenzen beeinflusst. Aufgrund der genetischen Variabilität sind sehr große Populationen erforderlich, um Differenzen bei einzelnen Varianten statistisch signifikant nachzuweisen. **Tabelle 5-2** und **Tabelle 5-3** zeigen einige Rechenbeispiele. Je exakter der erwartete Phänotyp eingegrenzt werden kann, desto häufiger wird der gesuchte Genotyp beobachtet werden.

Als ein möglicher Ausdruck eines SP-A-Defekts wird wie in **Abschnitt 5.3.2** bereits erläutert ein bei Säuglingen mit physiologischem IgG-Mangel klinisch manifester Opsonierungsdefekt in der Lunge angesehen (Haagsman 1998). Kinder bis zum Alter von 18 oder 24 Monaten sollten in die Analyse eingeschlossen, reife Neugeborene bis zum Alter von sechs Monaten jedoch ausgeschlossen werden. Frühgeborene könnten eine besondere Untergruppe bilden. Im allgemeinen lässt erst das Auftreten von zwei bakteriellen Pneumonien innerhalb von 3 Jahren eine Evaluation der humoralen Immunität erwägen (Wasserman und Sorensen 1999). Da das Zeitfenster, in dem die spezifische Immunität reift, sich jedoch nach achtzehn Monaten schließt, wäre die Erstdiagnose einer ambulanten Pneumonie ein gutes Einschlusskriterium. Bei hospitalisierten Patienten bestehen oftmals Risikofaktoren, so dass Patienten mit nosokomialer Pneumonie eine besondere Untergruppe bilden könnten. Die diagnostischen Merkmale müssen dem Alter angepasst werden. Neugeborene entwickeln nicht immer typische Symptome, zu denen neben Atemnot (mit erhöhter Atemfrequenz, inspiratorischem Flattern der Nasenflügel, interkostalen Einziehungen und gegebenenfalls Zyanose) auch Fieber und Husten gehören. Die Zeichen in der Röntgenaufnahme des Thorax (alveoläre oder interstitielle Infiltration, hiläre Verdichtung, Atelektasen, Bronchopneumogramme und Hyperinflation) sind uneinheitlich und gestatten die Diagnose einer Infektion der unteren Atemwege ohne sichere Differenzierung zwischen Pneumonie und Bronchiolitis (Davies et al. 1996). Der Nachweis von Erregern im

Rachenabstrich oder Sputum ist nicht signifikant, die Blutkultur zu wenig sensitiv und eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) zu invasiv. Rezidivierende virale Erkrankungen sollen nicht mit einem Immundefekt assoziiert sein (Wasserman und Sorensen 1999), doch da sich die opsonisierende Aktivität des SP-A wie in **Tabelle 1-1** gegen alle wichtigen Erreger kindlicher Pneumonien und auch gegen Viren richtet, mag man auf den Erregernachweis verzichten. Zur Unterscheidung zwischen viraler und bakterieller Genese könnte ansonsten neben der Bestimmung von Akut-Phase-Parametern wie C-reaktivem Protein, einer Leukozytose mit Linksverschiebung im Differentialblutbild und der Erythrozytensedimentationsrate das Interferon- $\alpha$  im Serum dienen (Moulin et al. 1996). Nicht auf die Lunge beschränkte Infektionen mit pyogenen Bakterien und Pilzen weisen auf einen Defekt des phagozytären Systems hin (Yang und Hill 1996) und wären ein sinnvolles Ausschlusskriterium.

## 6 Zusammenfassung

Viele Untersuchungen deuten darauf hin, dass das Surfactantprotein A (SP-A) sowohl an der Regulation des Surfactanthaushalts als auch als unspezifisches Opsonin an der Abwehr von Pathogenen in der Lunge beteiligt ist. Zahlreiche Polymorphismen kennzeichnen die Gene der Proteinuntereinheiten SP-A1 und 2. Die häufigste Aminosäuresubstitution Val50Leu befindet sich in der kollagenartigen Domäne, die an den Kollektinrezeptor der Phagozyten bindet. Weitere existieren in der an der Bindung an Lipopolysaccharide, Surfactantbestandteile und Rezeptoren auf Pneumozyten beteiligten Kohlehydraterkennungsregion (CRD) der globulären Domäne. Träger des schwach exprimierten Wildtypallels 1a0 des SP-A2-Gens haben ein erhöhtes Risiko, am Atemnotsyndrom des Neugeborenen (RDS) zu erkranken. Bei der Alveolarproteinose akkumulieren die hydrophilen Surfactantproteine A und D in den Alveolen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine *nested* PCR zur isolierten Amplifikation beider SP-A-Gene etabliert. 31 Patienten mit Verdacht auf einen Surfactantproteindefekt wurden auf neue Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) im SP-A1-Gen untersucht. Der in einer Familie konstante *Nco*I-Polymorphismus 1162C>T in Codon 39 und der *Nde*I-Polymorphismus 3138T>C in Codon 184 wurden mit einer Allelfrequenz von etwa 11 % detektiert. Die Sequenzen der entsprechenden Allele wurden kloniert. Bei 14 Patienten mit idiopathischer Alveolarproteinose, therapierefraktärem Surfactantmangel oder rezidivierender Pneumonie wurden die SP-A-Gene sequenziert. Der bisher nur SP-A1 zugeschriebene Aminosäureaustausch Val50Leu wurde als Substitution 1220G>C bei zwei Patienten im SP-A2-Gen nachgewiesen.

Drei Patienten mit Alveolarproteinose waren homozygot für die Substitution Gln223Lys in der CRD des SP-A2. Bei einem Patienten handelte es sich möglicherweise um eine somatische Mutation der Leukozyten-DNA im Rahmen einer Leukämie mit sekundärer Alveolarproteinose. Ein anderer war heterozygoter Träger des seltenen Allels 6a4 mit der Aminosäuresubstitution Arg219Trp in der CRD des SP-A1 und hatte die Alveolarproteinose erst im Erwachsenenalter entwickelt. Der dritte war homozygoter Träger des sehr seltenen Allels 1a3 des SP-A2 und verstarb im Alter von 6 Wochen an konnataler Alveolarproteinose (CAP), ohne dass ein bekannter Defekt des SP-B- oder des GM-CSF-Rezeptorgens vorlag.

Die SSCP-Analyse konnte allelische Varianten als Einzelstrangkonnformationspolymorphismen unterscheiden, war jedoch als Suchtest in heterozygoten Proben zu unspezifisch. Der hohe Gehalt an Polymorphismusinformation (PIC) macht den SP-A-Genort *sftp1* zu einem nützlichen Marker bei der Untersuchung der Surfactantproteine und anderer auf Chromosom 10 lokalisierter Gene.

## Abstract

Many studies give evidence of the role of surfactant protein A (SP-A) in the regulation of surfactant homeostasis and the defence from pathogens in the lung by opsonisation. The genes for the two protein subunits SP-A1 and SP-A2 are characterised by numerous polymorphisms. The most frequently substituted amino acid Val50Leu is located within the collagen-like region, which is recognised by the collectin-receptor on phagocytes. Further amino acids are substituted in the globular region, which is involved into the binding to lipopolysaccharides, surfactant particles, and receptors on pneumocytes by its *carbohydrate recognition domain* (CRD). Individuals carrying the weakly expressed wild-type allele 1a0 of SP-A2 have an increased risk of developing the *respiratory distress syndrome* (RDS) of the new-born. Alveolar proteinosis is a disease with accumulation of the hydrophilic surfactant proteins SP-A and SP-D in the alveoli.

In this study a *nested* PCR for separate amplification of the two SP-A genes has been established. 31 patients with suspected deficiency of a surfactant protein has been investigated for new *restriction fragment length polymorphisms* (RFLP) in the SP-A1 gene. The *NcoI*-polymorphism 1162C>T in codon 39, which was constantly inherited in one family, and the *NdeI*-polymorphism 3138T>C in codon 184 have been detected with an allele frequency of around 11 %. The DNA sequences of these alleles have been cloned. In 14 patients suffering from idiopathic alveolar proteinosis, therapy-refractory surfactant deficiency, or recurrent pneumonia the SP-A genes have been sequenced. The substituted amino acid Val50Leu, which was previously considered exclusively in SP-A1, has been detected in SP-A2 in two patients.

Three patients with alveolar proteinosis proved to be homozygous for the substitution Gln223Lys within the CRD of SP-A2. One of these patients might have a somatic mutation in the DNA of his leucocytes, with alveolar proteinosis developing secondary to his leukaemia. Another one developed alveolar proteinosis as an adult and was heterozygous for the rare allele 6a4 which includes the substituted amino acid Arg219Trp in the CRD of SP-A1. The third one proved to be homozygous for the very rare allele 1a3 of SP-A2 and died at 6 weeks of age from congenital alveolar proteinosis (CAP) without having one of the known mutations responsible for this condition within the genes for surfactant protein B (SP-B) or the GM-CSF receptor protein.

The allelic variants could be differentiated by *single strand conformation polymorphism* but the SSCP-analysis was not enough specific for the screening of heterozygous DNA. Due to its high polymorphism information content (PIC), the SP-A gene locus *sftp1* is a useful genetic marker for the analysis of the surfactant proteins and other genes located on chromosome 10.

## Abkürzungen

3'-UT, 5'-UT	nichttranslatierte Sequenz am 3'- bzw. 5'-Ende der mRNA
$\alpha$	Signifikanzniveau (Irrtumswahrscheinlichkeit)
A	Adenosin (Base des entsprechenden Nukleotids einer DNA-Sequenz)
Ala	Alanin (Aminosäure eines Proteins)
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	akutes Atemnotsyndrom
Arg	Arginin (Aminosäure eines Proteins)
Asn	Asparagin (Aminosäure eines Proteins)
Asp	Asparaginsäure (Aminosäure eines Proteins)
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	bronchoalveoläre Lavage
bp	Basenpaare (einer DNA)
BPD	bronchopulmonale Dysplasie
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
C	Cytosin (Base des entsprechenden Nukleotids einer DNA-Sequenz)
C1q	Untereinheit des ersten Komplementfaktors
CMV	Zytomegalievirus
CRD	Kohlehydraterkennungsregion ( <i>carbohydrate recognition domain</i> )
Cys	Cystein (Aminosäure eines Proteins)
ddNTP	Sammelbezeichnung für Didesoxyribonukleotide
DGGE	denaturierende Gradientengelelektrophorese
dITP	Desoxyinosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Bezeichnung für die vier Desoxyribonukleotide eukaryonter DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetylsäure
EX	Exon
FW	<i>forward</i> -Primer
G	Guanosin (Base des entsprechenden Nukleotids einer DNA-Sequenz)
Gln	Glutamin (Aminosäure eines Proteins)
Glu	Glutaminsäure (Aminosäure eines Proteins)
Gly	Glycin (Aminosäure eines Proteins)
h	beobachtete Frequenz Heterozygoter
H	Zahl Heterozygoter in einer Population
Het	Heterozygotiegrad (erwartete Proportion Heterozygoter)
His	Histidin (Aminosäure eines Proteins)
IgA, IgD, IgG, IgM	Immunglobulin der Klasse A, D, G, M
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Ile	Isoleucin (Aminosäure eines Proteins)
kb	Kilobasen (Tausend Basenpaare einer DNA)

Leu	Leucin (Aminosäure eines Proteins)
Lys	Lysin (Aminosäure eines Proteins)
MASP	mit MBL assoziierte Serinprotease
MBL	mannosebindendes Lektin
mRNA	Botenribonukleinsäure ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )
n	Zahl der Allele im Genpool
N	Zahl der Individuen einer Population
P	Frequenz des Wildtypallels
P	Zahl der homozygoten Träger des Wildtypallels
PAS	Periodsäure-Schiff-Reagenz ( <i>periodic acid-schiff reagent</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion
Phe	Phenylalanin (Aminosäure eines Proteins)
PIC	Gehalt an Polymorphismusinformation
Pro	Prolin (Aminosäure eines Proteins)
Pwo	<i>Pyrococcus woesei</i> (Prokaryont aus dem DNA-Polymerase isoliert wird)
q	Frequenz einer allelischen Variante
Q	Zahl der homozygoten Träger einer allelischen Variante
RDS	Atemnotsyndrom des Neugeborenen ( <i>respiratory distress syndrome</i> )
RE	<i>reverse</i> -Primer
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNase	Ribonuklease
SA-AP	Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin (Aminosäure eines Proteins)
SP-A, SP-B, SP-C, SP-D	surfactantassoziierte Proteine A, B, C beziehungsweise D
SSCP	Einzelstrangkonnformationspolymorphismus ( <i>single strand conformation polymorphism</i> )
SSO	sequenzspezifische Oligohybridisierung
SSW	Schwangerschaftswochen
T	Thymin (Base des entsprechenden Nukleotids einer DNA-Sequenz)
T <sub>a</sub> , T <sub>m</sub>	Hybridisierungstemperatur, Schmelztemperatur eines Oligonukleotids
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (Prokaryont aus dem DNA-Polymerase isoliert wird)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tfl	<i>Thermus flavus</i> (Prokaryont aus dem DNA-Polymerase isoliert wird)
Thr	Threonin (Aminosäure eines Proteins)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin (Aminosäure eines Proteins)
Upm	Umdrehungen pro Minute
Val	Valin (Aminosäure eines Proteins)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

## Literatur

2. Abrams ES, Murdaugh SE, Lerman SL: (1990) Comprehensive detection of single base changes in human genomic DNA using denaturing gradient gel electrophoresis and a GC clamp. Genomics 7: S. 463-75
3. Ballard PL, Nogee LM, Beers MF, Ballard RA, Planer BC, Polk L, de Mello DE, Moxley MA, Longmore WJ: (1995) Partial deficiency of SP-B in an infant with chronic lung disease. Pediatrics 96: S. 1046-52
4. Barany F: (1991) Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 88: S. 189-93
5. Baughman RP, Sternberg RI, Hull W, Buchsbaum JA, Whitsett J: (1993) Decreased surfactant protein A in patients with bacterial pneumonia. American Review of Respiratory Disease 147: S. 653-57
6. Beck S, et al.: (1984) Sequencing with direct blotting electrophoresis. EMBO Journal 3: S. 2905
7. Benne CA, Kraaijeveld CA, van Strijp JA, Brouwer E, Harmsen M, Verhoef J, van Golde LM, van Iwaarden JF: (1995) Interactions of SP-A with influenza viruses: binding and neutralization. Journal of Infectious Disease 171: S. 335-41
8. Birnboim HC, Doly J: (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Research 7: S. 1513-23
9. Blau H, Riklis S, Van Iwaarden JF, McCormack FX, Kalina M: (1997) Nitric oxide production by rat alveolar macrophages can be modulated in vitro by SP-A. American Journal of Physiology 272: S. L1198-1204
10. Bock J: (1998) Die Bestimmung des Stichprobenumfangs. R. Oldenbourg Verlag (München)
11. Cha RS, Thilly WG: (1995) Specificity, Efficiency and Fidelity of PCR. In: Dieffenbach CW, Dveksler GS: PCR Primer - A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press (USA): S. 37-51
12. Chiba H, Sano H, Saitoh M, Sohma H, Voelker DR, Akino T, Kuroki Y: (1999) Introduction of mannose-binding protein-type phosphatidylinositol recognition into pulmonary SP-A. Biochemistry 38: S. 7321-31
13. Chronos Z, Shepherd VL: (1996) Purification of a cell-surface receptor for surfactant protein A. Journal of Biological Chemistry 271: S. 16375-83
14. Colgan DJ: (1993) DNA regeneration in the PCR. Journal of Theoretical Biology 162: S. 289-307
15. Cordonnier C, Fleury-Feith J, Escudier E, Atassi K, Bernaudin JF: (1994) Secondary alveolar proteinosis is a reversible cause of respiratory failure in leukemic patients. American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine 149: S. 788-94
16. Cormier Y, Israel-Assayag E, Desmeules M, Lesur O: (1996) Effect of contact avoidance or treatment with oral prednisolone on bronchoalveolar lavage SP-A levels in subjects with farmer's lung. Thorax 51: S. 1210-15
17. d'Áquila RT, Bechtel LJ, Viteler JA, Eron JJ, Gorczyca P, Kaplin JC: (1991) Maximizing sensitivity and specificity of PCR by preamplification heating. Nucleic Acids Research 19: S. 3749
18. Dargaville PA, South M, McDougall PN: (1996) Surfactant abnormalities in infants with severe viral bronchiolitis. Archives of Disease in Childhood 75: S. 133-36
19. Davies HD, Wang EEL, Manson D, Babyn P, Shukett B: (1996) Reliability of the chest radiograph in the diagnosis of lower respiratory infections in children. Pediatric Infectious Disease Journal 15: S. 600-4
20. den Dunnen TJ, Antonarakis SE: (2000) Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. Human Mutation 16: S. 7-12
21. Densen P: (1995) Complement. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R: Principles and Practice of infectious diseases. Churchill Livingstone (New York), 4<sup>th</sup> edition: S. 58-78

22. Dirksen U, Nishinakamura R, Groneck P, Noguee L, Murray R, Burdach S: (1997) Human pulmonary alveolar proteinosis associated with a defect in GM-CSF/IL3/IL5-receptor common  $\beta$  chain expression. Journal of Clinical Investigation 100: S. 2211-17
23. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS: (1991) "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Research 19: S. 4008
24. Drickamer K, Dordal MS, Reynolds L: (1986) Mannose-binding proteins isolated from rat liver contain carbohydrate-recognition domains linked to collagenous tails. Journal of Biological Chemistry 261: S. 6878-87
25. Fassano MB, Hamosh A, Winkelstein JA: (1990) Recurrent bacterial infections in homozygous IgG2 deficiency. Pediatric Allergy and Immunology 1: S. 46-8
26. Ferriani, VPL, Barbosa JE, Carvalho IF: (1990) Serum hemolytic classical and alternative pathways of complement in infancy: Age-related changes. Acta Paediatrica Scandinavica 79: S. 322-7
27. Floros J, DiAngelo S, Koptides M, Karinch AM, Rogan PK, Nielsen H, Spragg RG, Watterberg K, Deiter G: (1996) Human SP-A locus: Allele frequencies and linkage disequilibrium between the two surfactant protein A genes. American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology 15: S. 489-98
28. Floros J, Hoover RR: (1998) Genetics of the hydrophilic surfactant proteins A and D. Biochimica et Biophysica Acta 1408: S. 312-22
29. Garred P, Madsen HO, Svejgaard A: (1996) Genetics of human mannan-binding protein. In: Ezekowitz R, Alan B, Sastry KN: Collectins and innate immunity. Springer Verlag (Heidelberg): S. 239-64
30. Grace MB, Buzard GS, Weintraub BD: (1995) Allel-specific associated polymorphism analysis - novel modification of SSCP for mutation detection in heterozygous alleles using the paradigm of resistance to thyroid hormone. Human Mutation 6: S. 232-42
31. Gunther A, Schmidt R, Nix F, Yabut-Perez M, Guth C, Rosseau S, Siebert C, Grimminger F, Morr H, Velcovshy HG, Seeger W: (1999) Surfactant abnormalities in idiopathic pulmonary fibrosis, hypersensitivity pneumonitis and sarcoidosis. European Respiratory Journal 14: S. 565-73
32. Haagsman HP: (1998) Interactions of SP-A with pathogens. Biochimica et Biophysica Acta 1408: S. 264-77
33. Harrod KS, Trapnell BC, Otake K, Korfhagen TR, Whitsett JA: (1999) SP-A enhances viral clearance and inhibits inflammation after pulmonary adenoviral infection. American Journal of Physiology 277: S. L580-8
34. Hickling TP, Malhotra R, Sim RB: (1998) Human lung SP-A exists in several different oligomeric states: oligomer size distribution varies between patient groups. Molecular Medicine 4: S. 266-75
35. Hickman-Davis JM, Lindsey JR, Zhu S, Matalon S: (1998) Surfactant protein A mediates mycoplasmacidal activity of alveolar macrophages. American Journal of Physiology 274: S. L270-77
36. Higuchi M, Antonarakis SE, Kasch L, Oldenburg J, Economou-Petersen E, Olek K, Arai M, Inaba H, Kazazian HH jr: (1991) Molecular characterization of mild-to-moderate hemophilia A: Detection of the mutation in 25 of 29 patients by DGGE. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 88: S. 8307-11
37. Hillier L, Green P: (1991) OSP: a computer program for choosing PCR and DNA sequencing primers. PCR Methods and Applications 1: S. 124-28
38. Himeno M, Shibata T, Kawahara Y, Hanaok Y, Komano T: (1984) Expression of the adenylate cyclase gene in Escherichia coli K-12. Agriculture and Biological Chemistry 48: S. 657-62
39. Honma K, Chiyotani K: (1991) Pulmonary alveolar proteinosis as a component of massive fibrosis in cases of chronic pneumoconiosis. An autopsy study of 79 cases. Zentralblatt für Pathologie 137: S. 414-7
40. Humphries SE, Gudnasson V, Whittall RE, Day INM: (1997) SSCP analysis with high throughput modifications, and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia. Clinical Chemistry 43: S. 427-35

41. Joiner KA: (1988) Complement evasion by bacteria and parasites. Annual Reviews in Microbiology 42: S.201-30
42. Kabha K, Schmegner J, Keisari Y, Parolis H, Schlepper-Schäffer J, Ofek I: (1997) SP-A enhances phagocytosis of *Klebsiella* by interaction with capsular polysaccharides and alveolar macrophages. American Journal of Physiology 272: S. L344-52
43. Kala P, Ten Have T, Nielsen H, Dunn M, Floros J: (1998) Association of pulmonary SP-A gene and respiratory distress syndrome: Interaction with SP-B. Pediatric Research 43: S. 169-77
44. Kalina M, Blau H, Riklis S, Kravtsov V: (1995) Interaction of surfactant protein A with bacterial lipopolysaccharide may affect some biological functions. American Journal of Physiology 268: S. L144-51
45. Karinch AM, de Mello DE, Floros J: (1997) Effect of genotype on the levels of surfactant protein A mRNA and on the SP-A2 splice variants in adult humans. Biochemical Journal 321: S. 39-47
46. Karinch AM, Deiter G, Ballard PL, Floros J: (1998) Regulation of expression of human SP-A1 and SP-A2 genes in fetal lung explant culture. Biochimica et Biophysica Acta 1398: S. 192-202
47. Katyal SL, Singh G: (1992) Characterization of a second human pulmonary surfactant-associated protein SP-A gene. American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology 6: S. 446-52
48. Kerr MH, Paton JY: (1999) Surfactant protein levels in severe respiratory syncytial virus infection. American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine 159: S. 1115-8
49. Klein JM, Thompson MW, Snyder JM, George TN, Whitsett JA, Bell EF, McCray PBJr, Noguee LM: (1998) Transient SP-B deficiency in a term infant with severe respiratory failure. Journal of Pediatrics 132: S. 244-8
50. Klein JO: (1998) Bacterial pneumonias. In: Feigin RD, Cherry JD: Textbook of pediatric infectious diseases. W. B. Saunders Company (Philadelphia) 4<sup>th</sup> edition: S. 273-84
51. Kölbl K, Lu J, Mole SE, Kaluz S, Reid KBM: (1993) Assignment of the human pulmonary surfactant protein D gene to 10q22-q23 close to the surfactant protein A gene cluster. Genomics 17: S. 294-8
52. Korfhagen TR, Le Vine AM, Whitsett JA: (1998) Surfactant protein A (SP-A) gene targeted mice. Biochimica et Biophysica Acta 1408: S. 296-302
53. Korutla L, Strayer DS: (1999) SP-A as a cytokine: surfactant protein-A-regulated transcription of surfactant proteins and other genes. Journal of Cellular Physiology 178: S. 379-86
54. Koziel H, Phelps DS, Fishman JA, Armstrong MY, Richards FF, Rose RM: (1998) Surfactant protein-A reduces binding and phagocytosis of pneumocystis carinii by human alveolar macrophages in vitro. American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology 18: S. 834-43
55. Kremlev SG, Umstead TM, Phelps DS: (1997) Surfactant protein A regulates cytokine production in the monocytic cell line THP-1. American Journal of Physiology 272: S. L996-1004
56. Kresch MJ, Christian C, Lu H: (1998) Isolation and partial characterization of a receptor to SP-A expressed by rat pneumocytes. American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology 19: S. 216-25
57. Krizkova L, Sakthivel R, Olowe SA, Rogan P, Floros J: (1994) Human SP-A: genotype and single strand conformation polymorphism analysis. American Journal of Physiology 266: S. L519-27
58. Kuroki Y, Takahashi H, Chiba H, Akino T: (1998) Surfactant proteins A and D: disease markers. Biochimica et Biophysica Acta 1408: S. 334-45
59. Le Vine AM, Gwozdz J, Stark J, Bruno M, Whitsett J, Korfhagen T: (1999) Surfactant protein-A enhances respiratory syncytial virus clearance in vivo. Journal of Clinical Investigation 103: S. 1015-21
60. Lin Z, de Mello DE, Wallot M, Floros J: (1998) An SP-B gene mutation responsible for SP-B deficiency in fatal CAP: evidence for a mutation hotspot in exon 4. Molecular Genetics and Metabolism 64: S. 25-35

61. Lipscombe RJ, Sumiya M, Hill AVS, Lau YL, Levinsky RJ, Summerfield JA, Turner MW: **(1992)** High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. Human Molecular Genetics 1: S. 709-15
62. Lipscombe RJ, Sumiya M, Summerfield JA, Turner MW: **(1995)** Distinct physiochemical characteristics of human mannose-binding protein expressed by individuals of differing genotype. Immunology 85: S. 660-7
63. Lipscombe RJ, Beatty DW, Ganczakowski M, Goddard EA, Jenkins T, Lau YL, Spurdle AB, Sumiya M, Summerfield JA, Turner MW: **(1996)** Mutations in the human mannose-binding protein gene - frequencies in several population groups. European Journal of Human Genetics 4: S. 13-19
64. Madan T, Eggleton P, Kishore U, Strong P, Aggrawal SS, Sarma PU, Reid KBM: **(1997a)** Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to Aspergillus fumigatus conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. Infection and Immunity 65: S. 3171-9
65. Madan T, Kishore U, Shah A, Eggleton P, Strong P, Wang JY, Aggrawal SS, Sarma PU, Reid KBM: **(1997b)** Lung SP-A and D can inhibit specific IgE binding to the allergens of aspergillus fumigatus and block allergen induced histamine release from human basophils. Clinical and Experimental Immunology 110: S. 241-9
66. Madsen HO, Garred P, Kurtzhals JAL, et al.: **(1994)** A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. Immunogenetics 40: S. 37-44
67. Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Svejgaard A: **(1995)** Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannose-binding protein. Journal of Immunology 155: S. 3013-20
68. Malhotra R, Haurum J, Thiel S, Sim RB: **(1992)** Interaction of C1q receptor with lung surfactant protein A. European Journal of Immunology 22: S. 1437-45
69. Mariencheck WI, Savov J, Dong Q, Tino MJ, Wright JR: **(1999)** SP-A enhances alveolar macrophage phagocytosis of a live, mucoid strain of P. aeruginosa. American Journal of Physiology 277: S. L777-86
70. Martin WJ 2nd, Downing JF, Williams MD, Pasula R, Twigg HL 3rd, Wright JR: **(1995)** Role of SP-A in the pathogenesis of tuberculosis in subjects with human immunodeficiency virus infection. Proceedings of the Association of American Physicians 107: S. 340-5
71. Matsushita M, Ezekowitz RAB, Fujita T: **(1995)** The Gly-54-Asp allelic form of human mannose-binding protein (MBP) fails to bind MBP-associated serine protease. Biochemical Journal 311: S. 1021-3
72. Max M, Pison U, Floros J: **(1996)** Frequency of SP-B and SP-A1 gene polymorphisms in the acute respiratory distress syndrome. Applied Cardiopulmonary Pathophysiology 6: S. 111-8
73. McCormack FX, King TE jr, Bucher BL, Nielsen L, Mason RJ, : **(1995)** SP-A predicts survival in idiopathic pulmonary fibrosis American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine 152: S. 751-9
74. McCormack FX: **(1998)** Structure, processing, and properties of surfactant protein A. Biochimica et Biophysica Acta 1408: S. 109-31
75. McCormack FX, Damodarasamy M, Elhalwagi BM: **(1999)** Deletion mapping of N-terminal domains of surfactant protein A. The N-terminal segment is required for phospholipid aggregation and specific inhibition of surfactant secretion. Journal of Biological Chemistry 274: S. 3173-81
76. McNeely TB, Coonrod JD: **(1993)** Comparison of the opsonic activity of human SP-A for Staph. aureus and Streptococcus pneumoniae with rabbit and human macrophages. Journal of Infectious Diseases 167: S. 91-97
77. McNeely TB, Coonrod JD: **(1994)** Aggregation and opsonization of type A but not type B Haemophilus influenzae by SP-A. American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology 11: S. 114-122
78. Mead DA, Pey NK, Herrnstadt C, Marcil RA, Smith LM: **(1991)** A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. Bio-Technology 9: S. 657-63
79. Moulin F, Raymond J, Iniguez JL, Ravilly S, Lebon P, Gendrel D: **(1996)** Serum alpha-interferon in lower respiratory tract infections of children. Pediatric Infectious Disease Journal 15: S. 883-6

80. Moya FR, Montes FH, Thomas VL, Mouzinho AM, Smith JF, Rosenfeld CR: (1994) SP-A and saturated phosphatidylcholine in RDS. American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine 150: S. 1672-7
81. Murray V: (1989) Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. Nucleic Acids Research 17: S. 8889
82. Myers RM, Fischer SG, Maniatis T, Lerman LS: (1985) Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by DGGE. Nucleic Acids Research 13: S. 3111-46
83. Nepomuceno RR, Henschen-Edman AH, Burgess WH, Tenner AJ: (1997) cDNA cloning and primary structure analysis of C1qR(P), the human C1q/MBL/SPA receptor that mediates enhanced phagocytosis in vitro. Immunity 6: S. 119-29
84. Newton CR, Graham A: (1997) PCR. BIOS Scientific Publishers (Heidelberg), 2nd edition
85. Noguee LM, Garnier G, Dietz HC, Singer L, Murphy AM, de Mello DE, Colten HR: (1994) A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. Journal of Clinical Investigation 93: S. 1860-63
86. Nomori H, Horio H, Fuyuno G, Kobayashi R, Morinaga S, Suemasu K: (1998) Serum surfactant protein A levels in healthy individuals are increased in smokers. Lung 176: S. 355-61
87. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K: (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics 5: S. 874-9
88. Ørum H, Andersen PS, Øster A, Johansen LK, Riise E, Bjørnvad M, Svendsen I, Engberg J: (1993) Efficient method for constructing comprehensive murine libraries displayed on phage. Nucleic Acids Research 21: S. 4491-8
89. Ott J: (1992) Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. American Journal of Human Genetics 51: S. 283-90
90. Palaniyar N, Ridsdale RA, Holterman CE, Inchley K, Possmayer F, Harauz G: (1998) Structural changes of SP-A induced by cations reorient the protein on lipid bilayers. Journal of Structural Biology 122: S. 297-310
91. Parto K, Svedstrom E, Majurin ML, Harkonen R, Dimell O: (1993) Pulmonary manifestations in lysinuric protein intolerance. Chest 104: S. 1176-82
92. Pasula R, Wright JR, Kachel DL, Martin WJ: (1999) SP-A suppresses reactive nitrogen intermediates by alveolar macrophages in response to Mycob. tuberculosis. Journal of Clinical Investigation 103: S. 483-90
93. Pearson, Lipman: (1988) Improved tools for biological sequence comparison. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 85: S. 2444-8
94. Phelps DS, Umstead TM, Rose RM, Fishman JA: (1996) Surfactant protein-A levels increase during Pneumocystis carinii pneumonia in the rat. European Respiratory Journal 9: S. 565-70
95. Pilot-Matias TJ, Kister SE, Fox JL, Kropp K, Glasser SW, Whitsett JA: (1989) Structure and organization of the gene encoding human pulmonary surfactant proteolipid SP-B. DNA 8: S. 75-86
96. Porter-Jord K, Garrett CT: (1990) Source of contamination in PCR assay. Lancet 335: S. 1220
97. Postle AD, Mander A, Reid KB, Wang JY, Wright SM, Moustaki M, Warner JO: (1999) Deficient hydrophilic lung surfactant proteins A and D with normal surfactant phospholipid molecular species in cystic fibrosis. American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology 20: S. 90-8
98. Prockop DJ: (1985) Mutations in collagen genes. Journal of Clinical Investigation 75: S. 783-7
99. Ranchod M, Bissell M: (1979) Pulmonary alveolar proteinosis and cytomegalovirus infection. Archives of Pathology and Laboratory Medicine 103: S. 139-42

100. Ratjen F, Rehn B, Costabel U, Bruch J: (1996) Age-dependency of surfactant phospholipids and SP-A in BAL fluid of children without bronchopulmonary disease. European Respiratory Journal 9: S. 328-33
101. Reid KBM: (1996) C1q: Structural and functional similarities to the collectins. In: Ezekowitz R Alan B, Sastry KN: Collectins and innate immunity. Springer Verlag (Heidelberg): S. 99-111
102. Rishi A, Hatzis D, McAlmon K, Floros J: (1992) An allelic variant of the 6A gene for human SP-A. American Journal of Physiology 262: S. L566-73
103. Ross SC, Denson P: (1984) Complement deficiency states and infection: epidemiology, pathogenesis and consequences of neisserial and other infections in an immune deficiency. Medicine 63: S. 243-73
104. Rosseau S, Hammerl P, Maus U, Gunther A, Seeger W, Grimminger F, Lohmeyer J: SP-A down-regulates proinflammatory cytokine production evoked by *Candida albicans* in human alveolar macrophages and monocytes. Journal of Immunology 163: S. 4495-502
105. Reis A, Hennies HC, Langbein L, Digweed M, Mischke D, Drechsler M, Schrock E, Royer-Pokora B, Franke WW, Sperling K et al.: (1994) Keratin 9 gene mutations in EPPK. Nature Genetics 6: S. 174-9
106. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE: (1990) Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. Nucleic Acids Research 18: S. 6409-12
107. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 74: S. 5463-7
108. Sano H, Sohma H, Muta T, Nomura S, Voelker DR, Kuroki Y: (1999) Pulmonary SP-A modulates the cellular response to smooth and rough LPS by interaction with CD14. Journal of Immunology 163: S. 387-95
109. Schagat TL, Tino MJ, Wright JR: (1999) Regulation of protein phosphorylation and pathogen phagocytosis by surfactant protein A. Infection and Immunity 67: S. 4693-9
110. Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM: (1989) Attachment of a 40-bp G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by PCR results in improved detection of single-base changes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86: S. 232-6
111. Sperlich D: (1988) Populationsgenetik. Gustav Fischer Verlag (Stuttgart), 2. Auflage
112. Stamme C, Wright JR: (1999) Surfactant protein A enhances the binding and deacylation of *E. coli* lipopolysaccharides by alveolar macrophages. American Journal of Physiology 276: S. L540-7
113. Sternberg RI, Whitsett JA, Hull WM, Baughman RP: (1995) *Pneumocystis carinii* alters SP-A concentrations in BAL fluid. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 125: S. 462-9
114. Stevens PA, Wissel H, Sieger D, Meinenreissudau V, Rüstow, B: (1995) Identification of a surfactant protein binding protein at the cell membrane of rat type II pneumocytes. Biochemical Journal 308: S. 77-81
115. Sumiya M, Super M, Tabona P, Levinsky RJ, Arai T, Turner MW, Summerfield JA: (1991) Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. Lancet 337: S. 1569-70
116. Summerfield JA, Ryder S, Sumiya M, Thursz M, Gorchein A, Monteil MA, Turner MW: (1995) Mannose-binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. Lancet 345: S. 886-9
117. Super M, Thiel S, Lu J, Levinsky RJ, Turner MW: (1989) Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonization. Lancet II: S. 1236-9
118. Thein SL, Ehsani A, Wallace RB: (1993) The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disease disorders. In: Davies K: Human Genetic Disease Analysis - A Practical Approach. Oxford University Press: S. 21-33
119. Tino MJ, Wright JR: (1996) Surfactant protein A stimulates phagocytosis of specific pulmonary pathogens by alveolar macrophages. American Journal of Physiology 270: S. L677-88

120. Tino MJ, Wright JR: (1999) Glycoprotein-340 binds SP-A and stimulates alveolar macrophage migration in an SP-A-independent manner. American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology 20: S. 759-68
121. Tosi MF, Cates KL: (1998) Immunologic and phagocytic responses to infection. In: Feigin RD, Cherry JD: Textbook of pediatric infectious diseases. WB Saunders Company (Philadelphia) 4<sup>th</sup> ed.: S. 14-53
122. van Iwaarden JF, van Strijp JA, Ebskamp MJ, Welmers AC, Verhoef J, van Golde LM: (1991) SP-A is opsonin in phagocytosis of HSV type 1 by rat alveolar macrophages. American Journal of Physiology 261: S. L204-9
123. van Iwaarden JF, Pikaar JC, Storm J, Brouwer E, Verhoef J, Oosting RS, van Golde LMG, van Strijp JAG: (1994) Binding of SP-A to the lipid A moiety of bacterial LPS. Biochemical Journal 303: S. 407-11
124. Vorbroker DK, Profitt SA, Nogee LM, Whitsett JA: (1995) Aberrant processing of surfactant protein C in hereditary SP-B deficiency. American Journal of Physiology 268: S. L647-56
125. Voss T, Melchers K, Scheirle G, Schäfer KP: (1991) Structural comparison of recombinant pulmonary surfactant protein A derived from two human coding sequences: implications for the chain composition of natural human SP-A. American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology 4: S. 88-94
126. Walenkamp AM, Verheul AF, Scharringa J, Hoepelman IM: (1999) Pulmonary SP-A binds to *Cryptococcus neoformans* without promoting phagocytosis. European Journal of Clinical Investigation 29: S. 83-92
127. Wang JY, Kishore U, Lim BL, Strong P, Reid KBM: (1996) Interaction of human SP-A and D with mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) allergens. Clinical and Experimental Immunology 106: S. 367-73
128. Wasserman RL, Sorensen RU: (1999) Evaluating children with respiratory tract infections: the role of immunization with bacterial polysaccharide vaccine. Pediatric Infectious Disease Journal 18: S. 157-63
129. Webster JRjr, Battifora H, Furey C, Harrison RA, Shapiro B: (1980) Pulmonary alveolar proteinosis in two siblings with decreased immunoglobulin A. American Journal of Medicine 69: S. 786-9
130. Weyer C, Sabat R, Wissel H, Krüger DH, Stevens PA, Prösch S: (2000) SP-A binding to CMV proteins enhances virus entry into rat lung cells. American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology 23: S. 71-8
131. White RT, Damm D, Miller J, Spratt K, Schilling J, Hawgood S, Benson B, Cordell B: (1985) Isolation and characterization of the human pulmonary surfactant apoprotein gene. Nature 317: S. 361-3
132. Wu D, Ugozzoli L, Pal B, Wallace R: (1989) Allele-specific enzymatic amplification of B-globin gDNA for diagnosis of sickle cell anemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 86: S. 2757-60
133. Yang KD, Hill HR: (1996) Immune responses to infectious diseases: an evolutionary perspective. Paediatric Infectious Disease Journal 15: S. 355-364
134. Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J: (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33: S. 103-19

## Danksagung

Allen voran danke ich meinen Eltern, die mich in allen Phasen der langen medizinischen Ausbildung unterstützten. Meiner Frau Anastassia danke ich für die, trotz der für sie damit verbundenen Entbehrungen, entgegengebrachte Geduld und Ermunterung zum Durchhalten.

Ich danke Herrn Privatdozent Dr. med. Paul A. Stevens für die Überlassung des Themas und die kritische Begleitung, die den erfolgreichen Abschluss dieser Dissertation möglich machte.

Herrn Dr. rer. nat. A. Cornelis Looman verdanke ich die Einführung in die molekulargenetischen Techniken und Denkweisen. Ganz herzlich danke ich unserer medizinisch-technischen Assistentin Frau Sabine Hofsommer für die hervorragende praktische Unterstützung im Labor.

Dem Sprecher des Forschungsverbunds FOSPED, Herrn Professor Roland Wauer danke ich für die Integration in die gemeinsamen wissenschaftlichen Veranstaltungen. Dem Leiter der Klinik für Neonatologie auf dem Charité Campus Mitte, Herrn Professor Ernst L. Grauel, danke ich besonders für die Hinweise zu den klinischen und ethischen Aspekten der Untersuchungen.

Frau Kunath und Frau Nagel im Sekretariat für Neonatologie halfen unter anderem bei der Suche nach Patientenakten und Arztbriefen. Die Herren Professoren Dr. rer. nat. Karl Sperling und Dr. André Reis vom Institut für Humangenetik gaben wertvolle Ratschläge zur Organisation und Auswertung genetischer Analysen. Frau Dr. Ute Dirksen vom KMT-Labor an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vermittelte zahlreiche Patienten. Herr Robert Preißner vom Institut für Biochemie der Charité stellte die "sara"-Domäne auf dem UNIX-Rechner für genetische Recherchen zur Verfügung. Die Kollegen im Lipidlabor von Professor Dr. Bernd Rüstow, vor allem aber Frau Dr. Heide Wissel verdienen ein großes Dankeschön für die schöne Zeit.

Frau Susanne Dobratz und Herrn Matthias Schulz vom Rechenzentrum danke ich für die Möglichkeit, das Manuskript als Digitale Dissertation auf dem Dokumentenserver der Humboldt-Universität zu Berlin zu veröffentlichen. Herrn Axel Mohnhaupt danke ich für die Unterstützung der Medienabteilung am Charité Campus Virchow bei der Erstellung der Posterpräsentationen.

Besonderer Dank gebührt meinem Freunde Dr. med. Martin Laass für die Korrekturen am Manuskript, die wesentlich zu einer verständlichen Darstellung der Sachverhalte beitrugen.

## **Erklärung an Eides Statt**

Berlin, den 17. Juni 2001

Hiermit erkläre ich, Dietmar Scholz, an Eides Statt, die unter dem Titel:

Analyse der Surfactantprotein A-Gene bei Patienten mit Verdacht auf einen Surfactantproteindefekt

verfasste Dissertation:

1. ausschließlich selbst geschrieben,
2. ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst,
3. die benutzten Hilfsmittel und die zitierte Literatur vollständig angegeben zu haben.

Des weiteren stellt die oben genannte Dissertation keine auch nur in Teilen wiedergegebene Kopie anderer Arbeiten dar.

Dietmar Scholz

## Lebenslauf

### - 1 - Persönliche Daten

Name: Scholz  
Vorname: Dietmar  
Geburtsdatum: 5. Februar 1971  
Geburtsort: Münster in Westfalen  
Familienstand: Geschieden

### - 2 - Ausbildung

Juli 1977 - Juni 1990: Besuch des Johann-Conrad-Schlaun-Gymnasiums in Münster mit Abitur  
Okt. 1991 - Sept. 1993: Vorklinisches Studium am Fachbereich Grundlagenmedizin und Medizinische Ökologie der Freien Universität Berlin mit Ärztlicher Vorprüfung abgeschlossen am 18.08.93  
Okt. 1993 - Nov. 1998: Klinisches Studium am Universitätsklinikum Rudolf-Virchow der Med. Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin mit Ärztlicher Prüfung abgeschlossen am 25.11.98

### - 3 - Tätigkeiten

Sept. 1990 - Nov. 1991: Zivildienst als Pflegehelfer in der Raphaelsklinik in Münster  
Okt. 1996 - Sept. 1997: Forschungsstudent in der AG Molekulare Surfactantbiologie von PD Dr. P. A. Stevens im Forschungsschwerpunkt Perinatale Lunge am Universitätsklinikum Charité in Berlin  
Dez. 1998 - Jan. 1999: Arzt im Praktikum in der Arbeitsgruppe Ozon und Atemwege der Universitätskinderklinik Freiburg  
Feb. 1999 - Aug. 1999: Pre-registration House Officer (Arzt im Praktikum) in der Abteilung für Allgemeine Chirurgie des Erne Hospitals in Enniskillen (Nordirland)  
Aug. 1999 - Febr. 2000: Pre-registration House Officer (Arzt im Praktikum) in der Abteilung für Lungenheilkunde des Norfolk & Norwich Hospitals in England (Großbritannien)  
Seit Juli 2000: 1<sup>st</sup> year Resident (Arzt im Praktikum) in der Abteilung für Kinderheilkunde des Cook County Hospitals in Chicago (Illinois, USA)