

**Das Atemnotsyndrom Frühgeborener:  
Assoziationen zu Polymorphismen des Surfactant Protein-B  
Gens?**

**Inauguraldissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Vassiliki Makri  
aus Athen

Giessen 2003

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin  
Abteilung Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie  
Leiter: Prof. Dr. med L. Gortner  
des Universitätsklinikums Giessen

Gutachter: Prof. Dr. Gortner

Gutachter: PD Dr. Günther

Tag der Disputation: 21. Oktober 2003

# INHALTSVERZEICHNIS

<b><u>EINLEITUNG</u></b> .....	1
1. Surfactant .....	1
1.1. Funktion .....	1
1.2. Zusammensetzung .....	2
1.3. Surfactant Proteine .....	4
1.3.1. Surfactant Protein A (SP-A) .....	4
1.3.2. Surfactant Protein B (SP-B).....	6
1.3.2.1. Aufbau.....	6
1.3.2.2. Funktion .....	8
1.3.2.3. Mangel an SP-B.....	12
1.3.3. Surfactant Protein C (SP-C).....	13
1.3.4. Surfactant Protein D (SP-D) .....	14
2. RDS.....	15
2.1. Definition .....	15
2.2. Pathogenese und klinisches Bild.....	15
2.3. Folgen .....	16
3. Multifaktorielle Ätiologie des RDS:	
genetische Komponente.....	18
<b><u>FRAGESTELLUNG</u></b> .....	22
<b><u>PATIENTENKOLLEKTIV</u></b> .....	23
<b><u>MATERIALIEN</u></b> .....	24
1. Chemikalien .....	24
2. Puffer und Lösungen .....	26
3. Oligonukleotide.....	27
<b><u>GERÄTE</u></b> .....	28
<b><u>METHODEN-ÜBERBLICK</u></b> .....	29
1. DNA-Isolierung.....	30
2. PCR.....	30
3. Gel-Elektrophorese.....	31
4. Fragmentlängenanalyse .....	32

5. Klonierung .....	34
6. Sequenzierung .....	37
<b><u>DEFINITIONEN UND STATISTIK</u></b> .....	39
<b><u>ERGEBNISSE</u></b> .....	40
1. Längenvariationen im SP-B Intron-4: Aufbau und Verteilung.....	40
2. Vergleich der Polymorphismus Prävalenz zwischen Frühgeborenen und reifen Neugeborenen ohne respiratorische Adaptations- störungen.....	42
3. Klinische Daten der Gruppe der Frühgeborenen.....	42
4. Vergleich der Frühgeborenen mit und ohne SP-B Intron-4 Polymorphismus.....	44
<b><u>DISKUSSION</u></b> .....	46
<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b> .....	50
<b><u>LITERATUR</u></b> .....	52
<b><u>LEBENS LAUF</u></b> .....	61
<b><u>DANKSAGUNG</u></b> .....	62

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

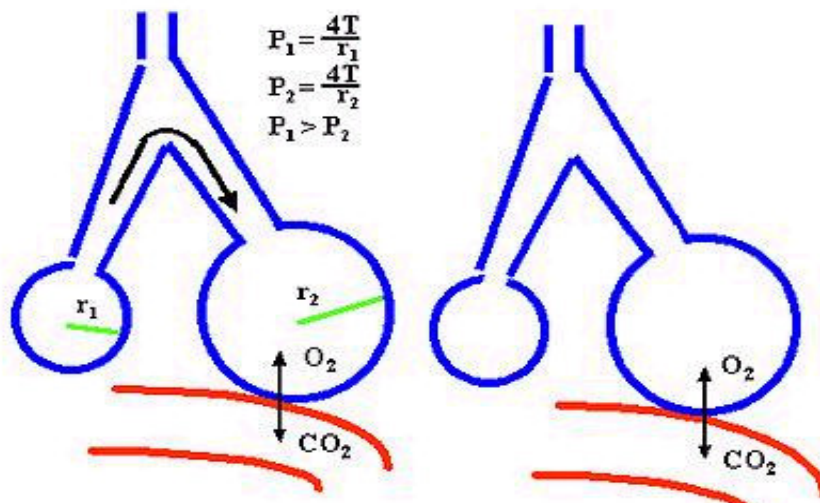
<b>bp</b>	Basenpaar
<b>BPD</b>	Bronchopulmonale Dysplasie
<b>CLD</b>	Chronic lung disease
<b>dNTP</b>	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
<b>ddNTP</b>	Didesoxy-Nukleosid-Triphosphat
<b>DPPC</b>	Dipalmitoylphosphatidylcholin
<b>FiO<sub>2</sub></b>	Inspiratorische Sauerstoff-Konzentration
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>PaCO<sub>2</sub></b>	Arterieller Kohlenstoffdioxid-Partialdruck
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion
<b>RDS</b>	Respiratory distress syndrome; Atemnotsyndrom
<b>rpm</b>	Runden pro Minute
<b>SaO<sub>2</sub></b>	Arterielle Sauerstoff-Sättigung
<b>SP-A, -B, -C, -D</b>	Surfactantassoziiertes Protein A, B, C, D

# EINLEITUNG

## 1. Surfactant

### 1.1. Funktion

Die Lunge ist ein Organ mit einer sehr großen Oberfläche (1 cm<sup>3</sup> Lungengewebe entspricht einer Gasaustauschoberfläche von 300 cm<sup>2</sup>), die im ständigen Kontakt mit der Luft ist und dem lebenswichtigen Gasaustausch dient. Die Aufnahme von Sauerstoff und die Entfernung von Kohlendioxid findet in den Alveolen statt. Die Oberflächenspannung, die an der Luft-Wasser-Interphase existiert kann in Abwesenheit einer oberflächenaktiven Substanz zum Kollaps der Alveolen und somit zur Atelektase der ganzen Lunge führen. Entsprechend der LaPlace'schen Regel hängt dieser Innendruck umgekehrt proportional vom Radius jeder Alveole ab (**Abb. 1**).



**Abb. 1** LaPlace'sche Regel: je kleiner der Radius ( $r$ ) desto größer der Innendruck ( $P$ ) in der Alveole. Rechts sind Alveolen ohne Surfactant und links mit Surfactant dargestellt. Surfactant reduziert den Innendruck auf nahezu Null. [Floros, Lin, Medscape Respiratory Care 1999]

Der pulmonale oberflächenaktive Faktor (Surfactant: Surface active reagent) kleidet den Alveolarraum aller Säugetiere aus und dient in erster Linie der mechanischen Stabilisierung der Alveolen und der Vermeidung ihres Kollaps, besonders in der Endexpiration. Dies wird erreicht durch die Herabsetzung der Oberflächenspannung an der Luft-Wasser-Grenzfläche in Abhängigkeit von der Größe der Alveolen, so daß bei den kleineren Alveolen die Oberflächenspannung auf nahezu Null reduziert wird [CREUWELS et al, 1997]. Die Existenz eines pulmonalen oberflächenaktiven Faktors, welcher die Spannung an der Innenseite der Alveolen reduziert, wurde erstmals 1929 postuliert [VON NEERGAARD, 1929]. 1961 konnten Klaus et al dem Phospholipidanteil und hier in erster Linie dem Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) die spannungsreduzierende Funktion des Surfactant nachweisen [KLAUS et al, 1961]. In den folgenden Jahren wurde die wichtige Rolle der surfactant-assoziierten Proteine sowohl bei der Verminderung der Oberflächenspannung [KING et al, 1973] als auch bei der lokalen Immunität der Atemwege [VAN IWAARDEN et al, 1990; PISON et al, 1994] erkannt.

## 1.2. Zusammensetzung

Surfactant stellt ein Gemisch aus Lipiden und Proteinen dar (Abb. 2). Der Lipidanteil beträgt

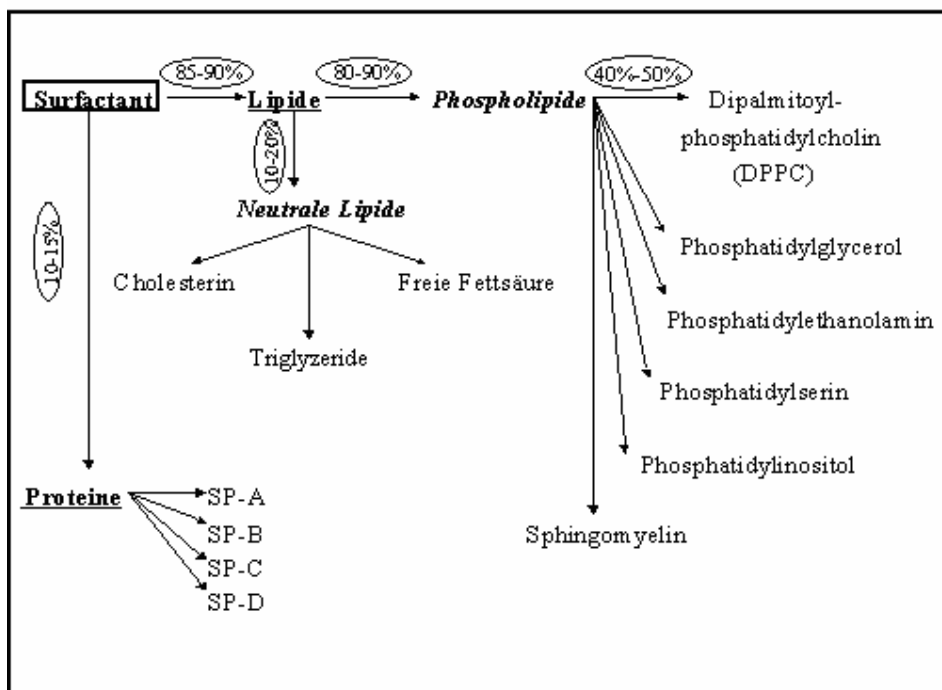
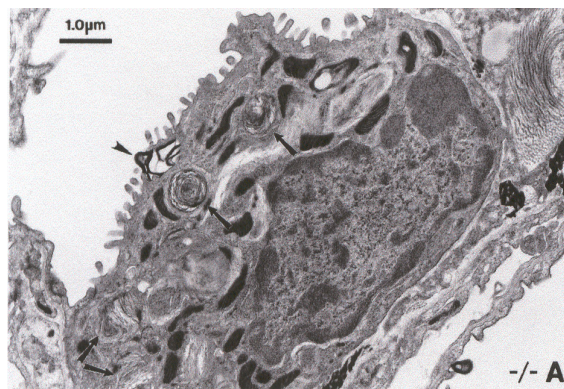


Abb. 2 Die Zusammensetzung von Surfactant.

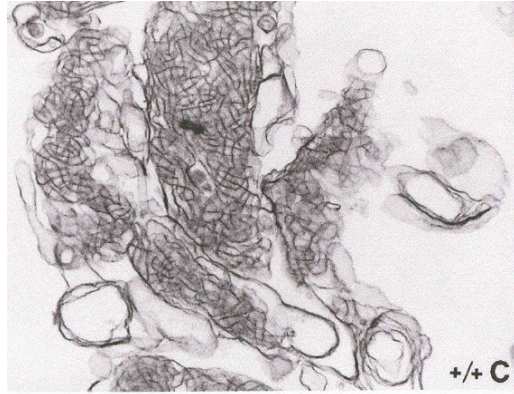
85-90% und besteht zu 80-90% aus Phospholipiden, unter denen das DPPC dominiert, und zu 10-20% aus neutralen Lipiden [CREUWELS et al, 1997]. Der Proteinanteil beträgt 10-15% und besteht aus den sogenannten 'surfactantassoziierten Proteinen', namentlich SP-A, SP-B, SP-C und SP-D nach Possmayer [POSSMAYER, 1988]. SP-A und SP-D sind hydrophile, SP-B und SP-C hydrophobe Proteine [JOHANSSON et al, 1994]. Alle Bestandteile des Surfactant werden im endoplasmatischen Retikulum der Typ-II-Alveozyten gebildet –SP-A [POLIN et al, 1997] und SP-B [NOGEE, 1998] werden zusätzlich von Clara-Zellen produziert–, dann durch den Golgi-Apparat in die multivesikulären Körperchen (multivesicular bodies) transportiert [VOORHOUT et al, 1993] und zuletzt in der Form von sogenannten Lamellar-Körperchen gespeichert (Abb. 3).



**Abb. 3** Lamellar-Körperchen: Doppelschichtstrukturen (lange Pfeile), die als intrazelluläre Speicherform des Surfactant (kurzes Pfeil) dienen. [Korfhagen et al, 1996]

Diese Lamellar-Körperchen erscheinen in Form von mehrfachen Doppelschicht-Strukturen und repräsentieren die intrazelluläre Speicherform von Surfactant. Die Lamellar-Körperchen werden zunächst in die Hypophase, das heißt in den Flüssigkeitsraum, der sich über die alveoläre Oberfläche streckt, sezerniert und dort in das sogenannte tubuläre Myelin transformiert [ROONEY et al 1994]. Das tubuläre Myelin stellt dicht zusammengepackte Ansammlungen von viereckigen ausgestreckten Röhren dar, die einem Gitter ähneln (Abb. 4) und wird in vitro aus DPPC, Phosphatidylglycerol, SP-A und SP-B in Anwesenheit von  $Ca^{2+}$  hergestellt [NAG et al, 1999].





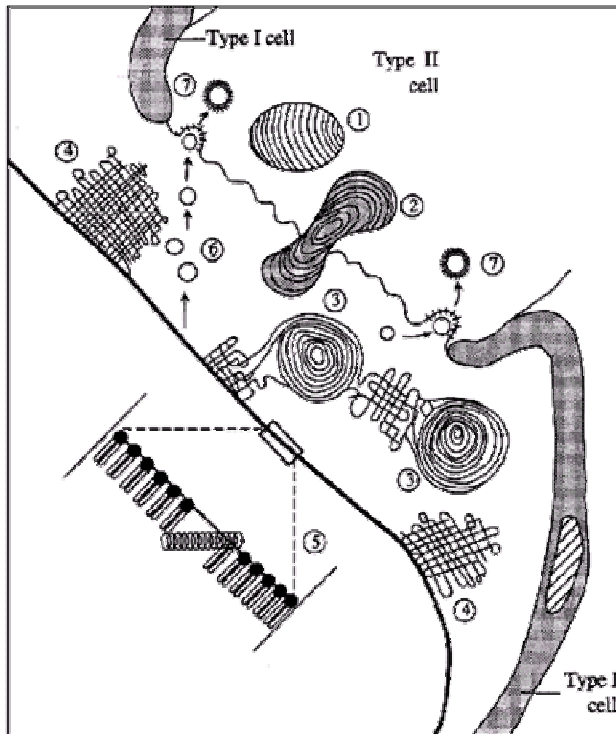
**Abb. 4** Tubuläres Myelin: gitterähnliche Struktur. [Korfhagen et al, 1996]

Das tubuläre Myelin ist die direkte Vorläuferstruktur der aktiven Form des Surfactant, die den Oberflächenfilm an der Luft-Wasser-Grenzschicht im Alveolarraum bildet. Dobbs et al konnten zeigen, daß sowohl die Struktur des tubulären Myelins als auch die der Lamellar-Körperchen nicht vorhanden sind, wenn Typ-II-Alveozyt-Kulturen sich nicht der Luft, sondern einer flüssigen Umgebung ausgesetzt sind [DOBBS et al, 1997]. Der Oberflächenfilm besteht aus einem Lipid-Monolayer (Monoschicht) angereichert mit DPPC. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie konnte eine Bilayer-Struktur (Doppelschicht) erkannt werden, die mit dem Oberflächen-Monolayer verbunden ist und als sein Reservoir dient, das heißt, diesen mit Lipiden und Proteinen versorgt [VELDHUIZEN, HAAGSMAN, 2000]. Zuletzt wird Surfactant größtenteils von den Typ-II-Zellen wieder aufgenommen und reutilisiert [IKEGAMI et al, 1998] (Abb. 5).

## 1.3. Surfactant Proteine

### 1.3.1. Surfactant Protein A (SP-A)

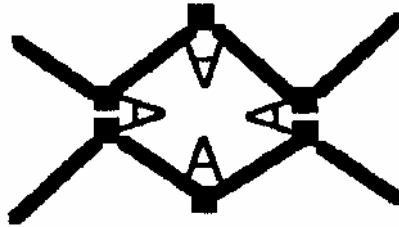
Das humane SP-A ist ein hydrophiles Protein mit einer Molekularmasse von 28-36 kDa (monomere Form) und besteht aus 248 Aminosäuren [CREUWELS et al, 1997]. Der SP-A Genlokus setzt sich zusammen aus zwei funktionellen Genen, SP-A1 und SP-A2, und einem Pseudogen und wird auf dem langen Arm von Chromosom 10 kodiert. SP-A gehört zur Kollektinen-Untergruppe der C-Typ Lektine der Säugetiere [COLE et al, 2001].



- ① Typ-II-Alveozyten bilden Surfactant und speichern es in Form von Lamellarkörperchen
- ② Die Lamellarkörperchen werden in die Hypophase abgesondert.
- ③ Die Transformation des Surfactant in das tubuläre Myelin
- ④ Das tubuläre Myelin
- ⑤ Die Bildung des Oberflächenfilms an der Luft-Wasser-Grenzschicht
- ⑥ Wiederaufnahme des Sufactant von den Typ-II-Alveozyten ⑦

**Abb. 5** Schematische Darstellung des Surfactantmetabolismus. [Creuwels et al, 1997]

Zu den Eigenschaften von SP-A gehört zunächst dessen Rolle in der lokalen Immunität der Atemwege. SP-A Moleküle sind in der Lage, sowohl Alveolarmakrophagen als auch bakterielle Komponenten zu binden (Opsonisierung), was der Phagozytose inhalierter Keime dient. Außerdem fördert SP-A die Migration der Alveolarmakrophagen (Chemotaxis) und stimuliert sie zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen [CREUWELS et al, 1997]. SP-A schreibt man auch eine regulatorische Rolle bei den oberflächenaktiven Eigenschaften des pulmonalen Surfactant zu. SP-A nimmt Teil in der Formation des tubulären Myelins und dient seiner Stabilisierung. Elektronenmikroskopische Studien deuten auf eine mögliche Lokalisation der SP-A Moleküle an den Eckpunkten dieser gitterförmigen Struktur [PALANIYAR et al, 1999] (Abb. 6). Darüber hinaus ist SP-A in der Phospholipidadsorption an der Luft-Wasser Interphase beteiligt und moduliert die Phospholipidaufnahme und Sekretion der Typ-II-Alveozyten [CREUWELS et al, 1997].

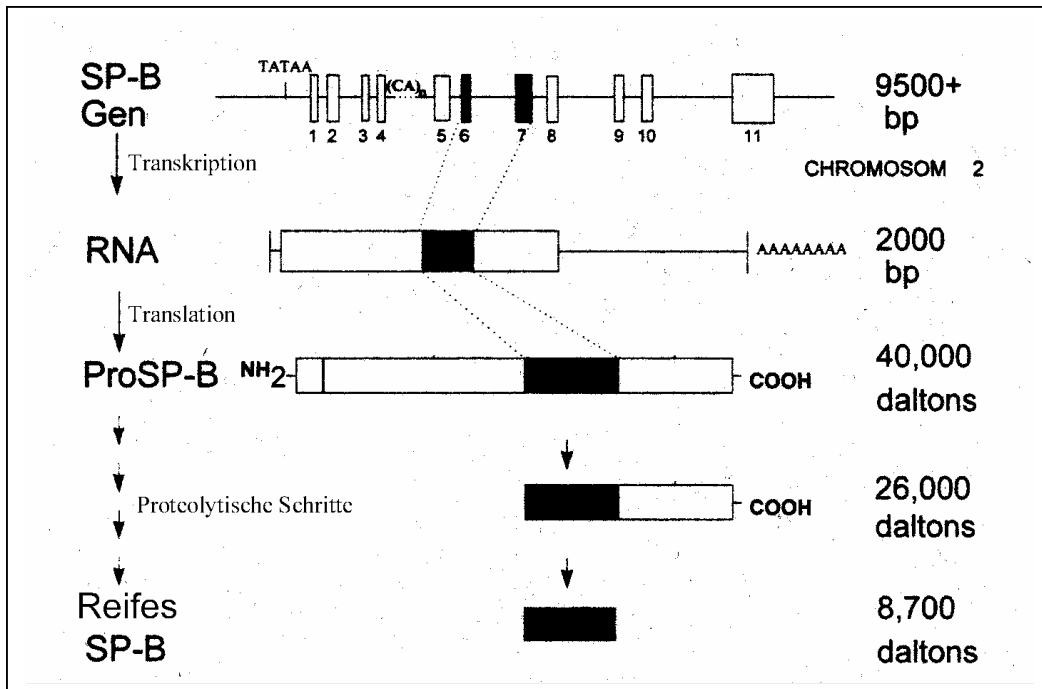


**Abb. 6** Tubuläres Myelin: Lokalisation der SP-A Moleküle an den Ecken der gitterförmigen Struktur. [Palaniyar et al, 1999]

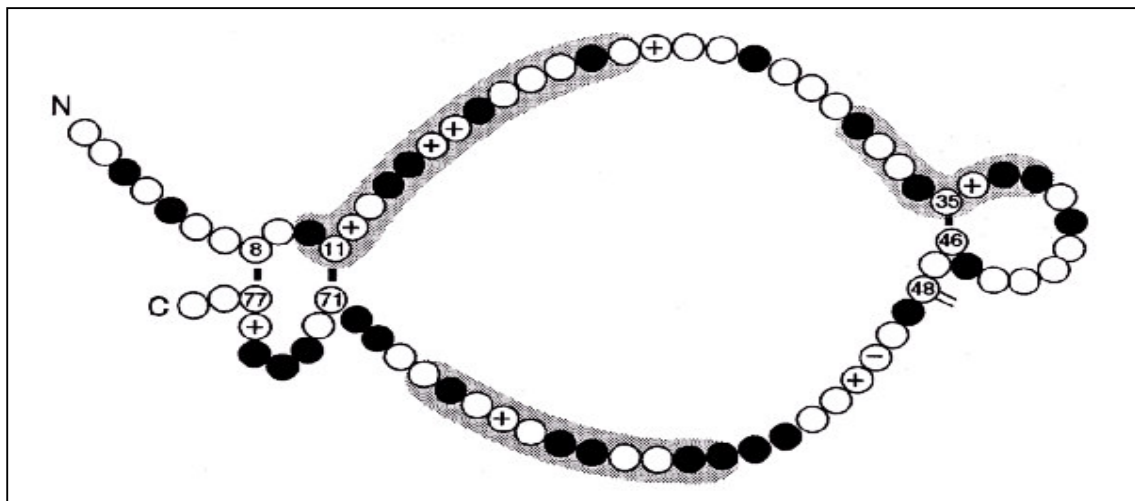
## 1.3.2. Surfactant Protein B (SP-B)

### 1.3.2.1. Aufbau

Das SP-B Gen ist beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 2 lokalisiert [VAMVAKOPOULOS et al, 1995]. Es ist ein relativ kurzes Gen (ca. 9500 Basen) und besteht aus 11 Exons, wobei das 11. Exon nicht translatiert wird. Zunächst wird das SP-B Gen in ein 2000 Basen langes m-RNA Molekül transkribiert, das dann in ein 381 Aminosäuren langes Präproprotein übersetzt wird. Das 23 Aminosäuren langes Signalpeptid, das vom ersten Exon kodiert ist, wird nach der Translation abgespalten, so daß das Proprotein entsteht. Danach folgen zwei proteolytische Schritte, bei denen erst mal das aminoternale Ende und anschließend das carboxyterminale Ende des Proproteins entfernt wird (**Abb. 7**). Studien mit polyklonalen Antikörpern haben gezeigt, daß dieser Schritt sehr wahrscheinlich nach dem Golgi-Apparat und vor der Formation von Lamellar-Körperchen abläuft, nämlich innerhalb der multivesikulären Körperchen [KORIMILLI et al, 2000; VOORHOUT et al, 1992]. Daraus entsteht das reife SP-B, kodiert von den Exons 6 und 7, ein stark hydrophobes Protein mit einer Molekularmasse von 8,7 kDa [NOGEE, 1998; WEAVER, 1998]. Seine monomere Form bildet sich aus 79 Aminosäuren mit einem hohen Anteil an Cystein. Sechs dieser Cysteine dienen der Ausbildung von drei intramolekularen Disulfidbrücken (**Abb. 8**), während die siebte Cysteinaminosäure (Position 48) der Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke dient und damit zur Entstehung des SP-B Dimers führt.



**Abb. 7** SP-B Gen, m-RNA, Proprotein und die proteolytischen Schritte zum SP-B. [modifiziert nach Nogee, 1998]



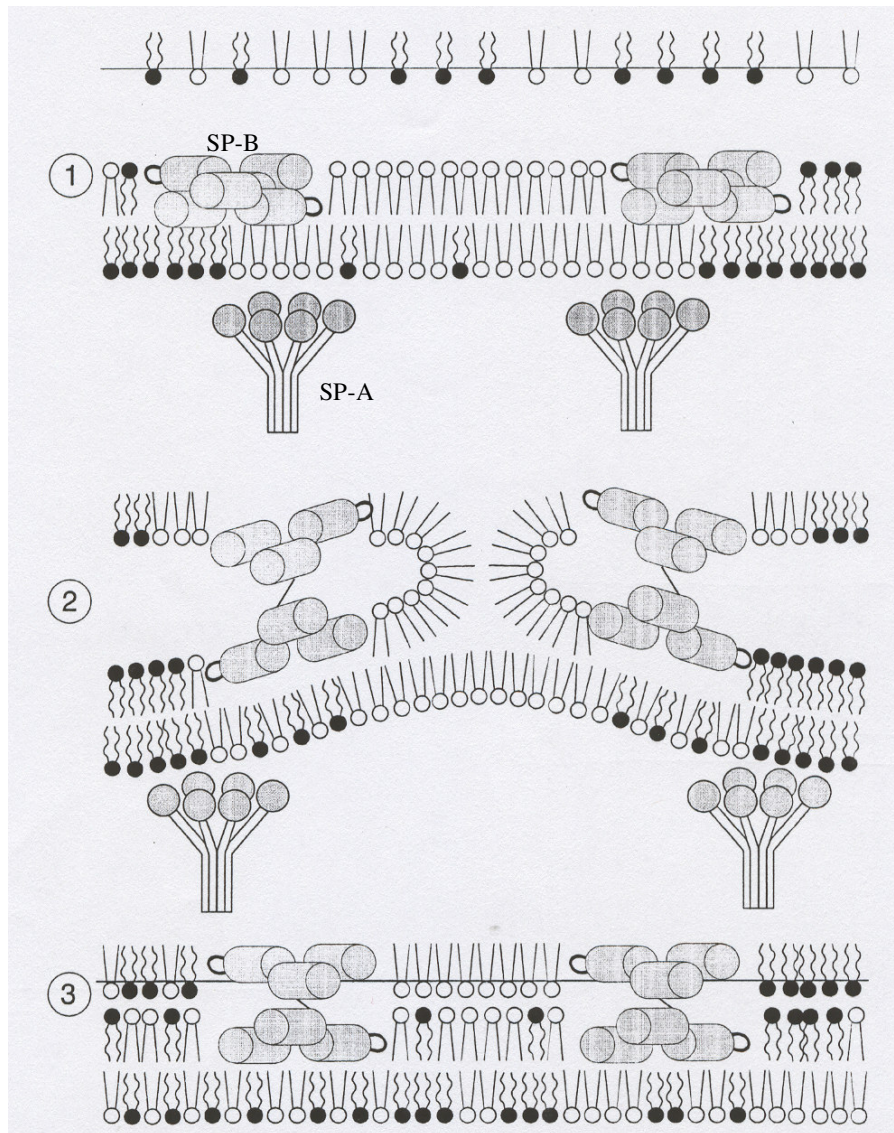
**Abb. 8** Die monomere Form von SP-B mit den drei Disulfidbrücken. [Creuwels et al, 1997]

Diese Disulfidbrücken scheinen sowohl zur Flexibilität des Proteins, als auch zur außergewöhnlich thermischen Stabilität seiner Sekundärstruktur beizutragen. Studien haben gezeigt, daß die dimere Form des SP-B zwar nicht für die Biogenese des Surfactant, jedoch für die optimale Funktion des Surfactant bei der Verminderung der Oberflächenspannung notwendig ist [WEAVER et al, 1999]. Im Alveolarraum tritt sowohl seine monomere (10%) als auch seine dimere (90%) Form auf. Die Sekundärstruktur des SP-B ist hauptsächlich  $\alpha$ -helikal [CREUWELS et al, 1997; HAWGOOD et al, 1998].

### 1.3.2.2. Funktion

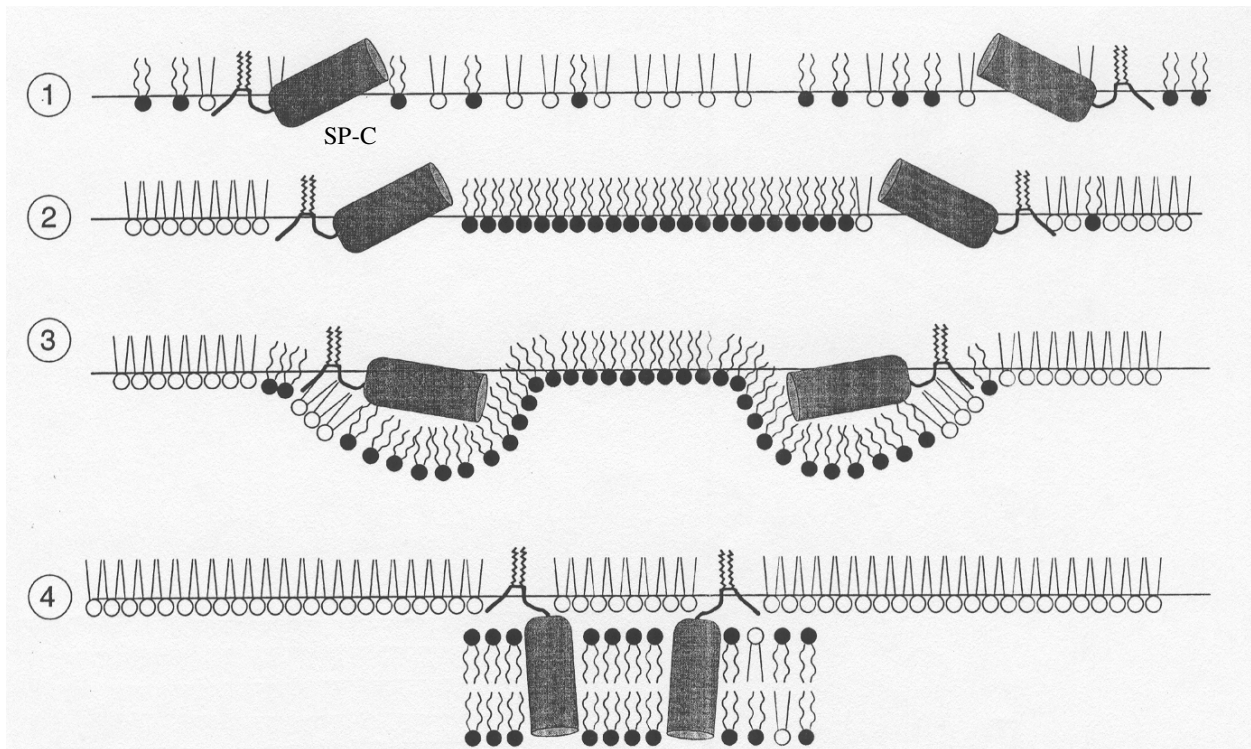
Die Hauptrolle von SP-B ist die Verminderung der Oberflächenspannungswerte, insbesondere in der Endexpiration, und somit die Verhinderung eines alveolären Kollaps [PRYHUBER, 1998]. Das gelingt durch die Ausbildung eines Oberflächenfilms, der aus einem DPPC-reichen Monolayer besteht. DPPC wird allgemein als das verantwortliche Lipidanteil für die nahe Null liegende Oberflächenspannung an der Luft-Wasser-Interphase angesehen. Diskutiert werden zwei Mechanismen, die bei der Anreicherung des Monolayers mit DPPC involviert sein können: (a) die selektive Adsorption von DPPC oder (b) das selektive Entfernen von Nicht-DPPC-Lipiden.

(a) Belege für den ersten Mechanismus stammen hauptsächlich von Experimenten mit dem 'Captive Bubble'-Surfactometer [SCHURCH et al, 1992; VELDHUIZEN, BATENBURG et al, 2000]. Veldhuizen et al haben ein theoretisches Model entwickelt, wobei die Interaktion von SP-A und SP-B zur Adsorption von neuen DPPC-reichen Domänen in die Interphase während der Inspiration führt (Abb. 9) [VELDHUIZEN, HAAGSMAN, 2000]. Weiterhin haben Tavena et al gezeigt, daß die Anwesenheit von SP-B und SP-C die Adsorption von SP-A in den Phospholipid-Monolayer erhöhen kann [TAVENA et al, 2000].



**Abb 9.** Theoretisches Model der DPPC-Adsorption in die Interphase. SP-B Moleküle befinden sich zwischen den Lipiden der Doppelschicht (Bilayer-Struktur), die als Reservoir des Oberflächen-Monolayers dient, während SP-A Moleküle in der Subphase vorhanden sind. Die Kooperation von SP-B und SP-A Molekülen führt zur Entstehung von DPPC angereicherten Domänen in der Doppelschicht (1). SP-B 'verschmelzt' die Bilayer-Struktur mit dem Oberflächen-Monolayer (2), so daß eine DPPC angereicherte Domäne in die Luft-Wasser-Interphase eingefügt wird. [modifiziert nach Veldhuizen, Haagsman, 2000]

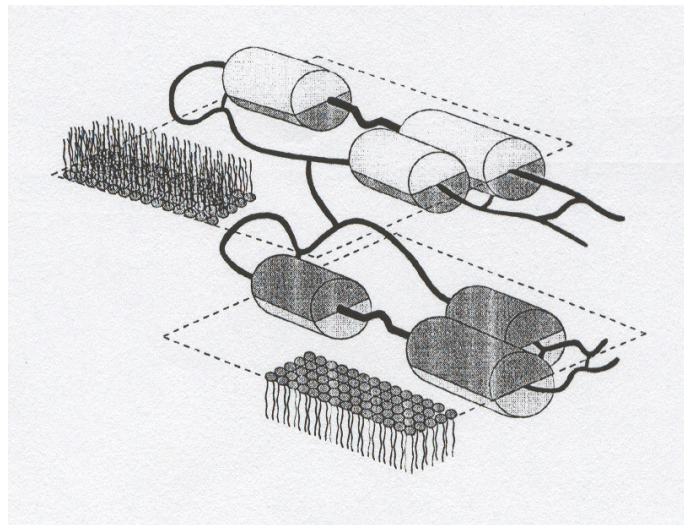
(b) Belege für den zweiten Mechanismus basieren auf Experimenten mit dem 'Pulsating bubble'-Surfactometer, sowie dem 'Captive Bubble'-Surfactometer und mit 'Langmuir-Wilhelmy Balance' [NAG et al, 1997; PASTRANA-RIOS et al, 1994; VELDHUIZEN, HAAGSMAN, 2000; VON NAHMEN, POST et al, 1997; VON NAHMEN, SCHENK et al, 1997]. Es ist anzunehmen, daß sowohl SP-B als auch SP-C (Abb. 10) die Eigenschaft besitzen Nicht-DPPC-Lipide der Interphase während der Expiration auszuschließen.



**Abb. 10** Theoretisches Model für das selektive Entfernen von Nicht-DPPC Lipiden. SP-C Moleküle befinden sich in dem Lipid-Monolayer der Luft-Wasser-Interphase (1). Während der Expiration zieht sich der Monolayer zusammen, so daß sich flüssige und gelförmige Phasen bilden, wobei sich die SP-C Moleküle in der Nähe der flüssigen Phasen befinden (2), die hauptsächlich Nicht-DPPC-Lipiden enthalten. Während sich der Druck in der Interphase steigert, verformt sich der Monolayer und führt zur Entfernung (squeeze out) der Nicht-DPPC-Lipiden und der SP-C Moleküle (3). Die SP-C Moleküle dienen jetzt als eine Art Brücke zwischen dem Monolayer und den ausgedrückten Lipiden (4). [modifiziert nach Veldhuizen, Haagsman, 2000]

Als weitere Funktion des SP-C wird die Herstellung der Verbindung zwischen der Reservoir-Bilayer-Strukturen und dem Lipid-Monolayer an der Oberfläche postuliert. Hervorzuheben ist an dieser Stelle, daß es sich bei den erwähnten Studien um Modelle handelt, deren Ziel die Erforschung des spezifischen Wirkungsmechanismus von SP-B ist. Die obligate Beteiligung an der Funktionalität von Surfactant wird, bei bereits beschrieben, als nachgewiesen angesehen.

Weitere Eigenschaften, die dem SP-B zugeschrieben werden, sind die Wiederaufnahme von Surfactant von den Typ-II-Alveozyten, die Stabilisierung des Phospholipidfilms an der Luft-Wasser-Interphase, die Fusion und die Verbindung von Membranen (**Abb. 11**) und die Ausbildung des tubulären Myelins [**CHANG et al, 1998; CREUWELS et al, 1996; HAWGOOD et al, 1998; THOMPSON, 2001; VELDHIJZEN, HAAGSMAN, 2000; WHITSETT et al, 1995**].



**Abb. 11** Die Verbindung von Membranen mit Hilfe von SP-B. [Veldhuizen, Haagsman, 2000]

Aus Tierexperimenten mit 'Knockout'-Mäusen weiß man, daß für die Ausbildung des tubulären Myelins sowohl SP-B [**DEMELLO et al, 1994; WEAVER et al, 1999**] als auch SP-A [**KORFHAGEN et al, 1996**] unentbehrlich sind. Außerdem hat man festgestellt, daß



bei SP-B (-/-) Mäusen auch die Formation von Lamellarkörperchen beeinträchtigt wird [STAHLMAN et al, 2000; WEAVER et al, 1999]. Friedrich et al haben zudem gezeigt, daß SP-B den Surfactant-Film vor der Inaktivierung von Serum-Proteinen schützen kann [FRIEDRICH et al, 2000]. Eine bisher unerwartete Funktion von SP-B konnte bei einem synthetischen SP-B Peptid gezeigt werden, welches das Wachstum von Bakterien verhinderte [KASER et al, 1997]. Schließlich ist SP-B zusammen mit SP-A und SP-D sowohl im gastrointestinalen Trakt [ELIAKIM et al, 1989] als auch beim Epithell der eustanchischen Tube [PAANANEN et al, 2001] nachgewiesen worden, was für eine zusätzliche Rolle des SP-B außerhalb der Lunge spricht. Im Gegensatz dazu ist SP-C bis jetzt nur in Lungengewebe nachgewiesen worden [JOHANSSON et al, 1997].

### 1.3.2.3. Mangel an SP-B

SP-B ist das einzige surfactant-assoziierte Protein, das bei der postnatalen Lungenadaptation und für das weitere Überleben des Neugeborenen unentbehrlich ist. Anhand experimenteller Daten von SP-A [KORFHAGEN et al, 1996], SP-C [WEAVER et al, 2001] und SP-D [BOTAS et al, 1998] 'Knockout'-Mäusen führt der Mangel an diesen Proteinen eventuell zu Veränderungen des Surfactant-Metabolismus oder dessen Homöostase, jedoch hat er keinerlei Auswirkungen auf die Surfactant-Funktion und das postnatale Überleben. Die extrem wichtige Schlüsselrolle, die das SP-B bei der Entwicklung einer normalen Lungenfunktion spielt, kann man sehr deutlich an den Konsequenzen eines absoluten SP-B Mangels feststellen.

Erstmals wurde die sogenannte „kongenitale alveoläre Proteinose“ als eine Ursache für den SP-B Mangel beschrieben. Diese zwar seltene aber letale Lungenerkrankung des Neugeborenen, wurde auf Mutationen im SP-B Gen zurückgeführt [NOGEE et al, 1993]. Die häufigste [NOGEE et al, 2000] homozygote Mutation, die dafür verantwortlich ist, ist die Insertion von 2 Basenpaaren in Kodon 121 von Exon-4, die das Leseraster verschiebt ('Frame-shift'-Mutation) und zu einem frühzeitigen Abbruch der Translation führt [NOGEE et al, 1994]. Beers et al haben gezeigt, daß das mutierte SP-B Gen, wie üblich, transkribiert wird, doch ist die daraus entstehende m-RNA sehr instabil und wird bis zu 92% abgebaut [BEERS et al, 2000]. Die Prävalenz des 121ins2 Allels (heterozygote Mutation) ist auf 1 pro 1000-3000 Personen geschätzt worden [COLE et al, 2000]. Klinisch beobachtet man eine schwergradige, nicht auf die Zufuhr vom exogenen Surfactant ansprechbare, respiratorische

Insuffizienz [NOGEE et al, 1993; BOHNHORST et al, 1996], wobei der röntgenologische Befund sich dem Atemnotsyndrom (RDS) des Frühgeborenen ähnelt [HERMAN et al, 1993]. Eine kurative Therapie steht bis heute nicht zur Verfügung mit Ausnahme der Möglichkeit einer Lungentransplantation, die allerdings als experimentelle Therapieform einzugreifen ist [HAMVAS et al, 1997].

Die Folgen eines SP-B Mangels wurden gleichzeitig auch tierexperimentell bestätigt. Es konnte gezeigt werden, daß die intratracheale Applikation von monoklonalen SP-B-Antikörpern bei neugeborenen Kaninchen, einerseits Entzündungszeichen, begleitet von der Bildung von hyalinen Membranen (ein pathologischer Befund des RDS), andererseits eine Verminderung der Lungen-Compliance bewirkt [ROBERTSON et al, 1991].

Weiterhin ergaben sich aus dem Modell der SP-B (-/-) Knockout-Maus die selben klinischen und histopathologischen Befunde, wie bei der kongenitalen Alveolarproteinose als Folge eines SP-B Mangels [WEAVER et al, 1999]. Im Gegenteil dazu, war die SP-B mRNA und das SP-B Protein bei den (+/-) heterozygoten Mäusen zu 50% reduziert, mit der Folge, daß zwar die Lungen-Compliance sinkt und die Alveolen während der Endexpiration vermehrt zum Kollaps neigen, was jedoch keinen Einfluß auf das Überleben der Tieren zeigte [CLARK et al, 1997]. Ähnliche Beobachtungen folgten dann auch bei 121ins2-heterozygoten Menschen, so daß von einer normalen Lungenfunktion zumindest während der ersten Lebensjahrzehnten auszugehen ist [YUSEN et al, 1999].

### **1.3.3. Surfactant Protein C (SP-C)**

SP-C ist ein kleines, extrem hydrophobes Protein mit einem Molekulargewicht von 4-6 kDa (monomere Form), das aus 33-35 Aminosäuren mit hohem Anteil an Valin besteht [CREUWELS et al, 1997]. Das SP-C Gen wird auf dem kurzen Arm des Chromosoms 8 kodiert und setzt sich zusammen aus 6 Exons und 5 Introns, wobei das letzte Exon untranslatiert bleibt [NOGEE, 1998]. SP-C ist bis jetzt das einzige Surfactantprotein, das ausschließlich in Lungengewebe nachgewiesen werden kann [JOHANSSON et al, 1997]. Es beeinflusst die mechanischen Eigenschaften des pulmonalen Surfactant, indem es den Einbau und Ausbau von Phospholipiden in die Luft-Wasser-Interphase zusammen mit SP-B reguliert. Anhand Tierexperimenten konnte man belegen, daß der absolute SP-C Mangel zwar keinen Einfluß auf die Surfactant-Synthese und die Lungenmorphologie hat, doch eventuell die

Lungenmechanik beeinflussen kann [GLASSER et al 2001]. Weiterhin haben Noguee et al eine 'splice-site'-Mutation der ersten Base des Intron-4 beschrieben, die zur chronischen interstitiellen Lungenkrankheit führt. Deshalb geht man von einem Zusammenhang zwischen genetischer Variationen des SP-C Gens und einer, eher chronischen als akuten, respiratorischen Insuffizienz aus [NOGEE et al, 2001]. Schließlich hat man beobachtet, daß SP-C, ähnlich wie SP-B, die Eigenschaft besitzt den Surfactant-Film von der inaktivierenden Wirkung der Serum-Proteine zu schützen [AMIRKHANIAN et al, 1993].

#### **1.3.4. Surfactant Protein D (SP-D)**

SP-D gehört ebenso wie SP-A zur Familie der Kollektine [COLE et al, 2001]. Es handelt sich um ein hydrophiles Protein mit einer Molekularmasse von 43 kDa (monomere Form), das aus 355 Aminosäuren entsteht. Es befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 10. Weniger als 10% des SP-D Pools im humanen Organismus ist mit Phospholipiden assoziiert, so daß seine Rolle bezüglich der oberflächenaktiven Eigenschaften des pulmonalen Surfactant noch umstritten bleibt [CREUWELS et al, 1997]. Tierexperimente, bei denen der Einfluß des SP-D (-/-) Genotyps auf das Neugeborene studiert werden konnte, haben gezeigt, daß der Mangel an SP-D die postnatale pulmonale Adaptation nicht beeinflußt [BOTAS et al, 1998]. Ob der SP-D Mangel chronische Atemstörungen hervorrufen kann, bleibt bislang unklar. Andererseits schreibt man SP-D eine mögliche Rolle bei der lokalen Immunität der Lunge zu. Ähnlich wie SP-A, kann SP-D gleichzeitig Bakterien und Alveolarmakrophagen binden, Alveolarmakrophagen zur Produktion von Sauerstoffradikalen fördern, sowie Mikroorganismen agglutinieren [CREUWELS et al, 1997].

## **2. RDS**

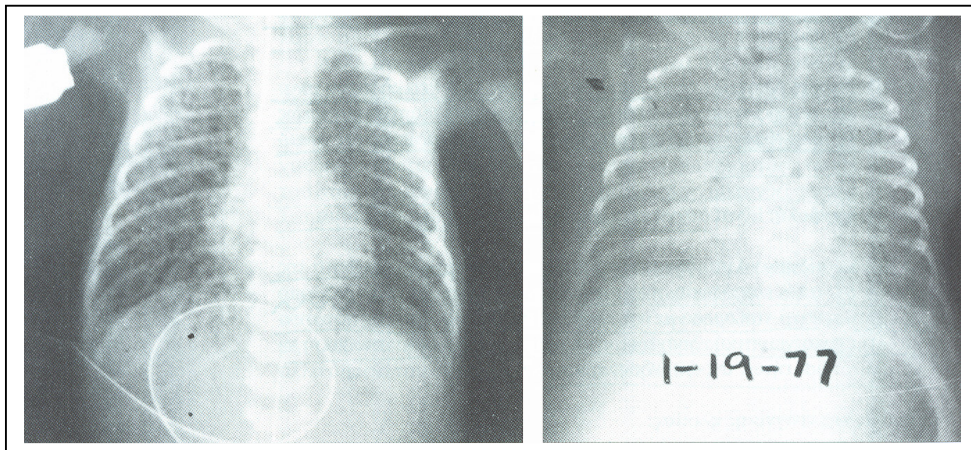
### **2.1. Definition**

RDS (respiratory distress syndrome) oder Atemnotsyndrom des Neugeborenen oder, wie in den 60er und 70er Jahren genannt, 'Hyaline Membranen-Krankheit' ist die respiratorische Insuffizienz des Neugeborenen, bzw. des Frühgeborenen, die durch die nicht ausreichende Produktion von Surfactant der fetalen unreifen Lunge bedingt ist. RDS wurde erstmals 1959 von Avery in Verbindung mit dem Surfactant-Mangel gebracht. Sie beobachtete, daß die Lunge von Neugeborenen, die an RDS gestorben waren, anders aussahen als die von Neugeborenen, die an einer anderen Ursache gestorben waren. Die RDS-Lunge war leberähnlich und produzierte keinen Schaum, wie eine normale Lunge im Zustand der Kompression. Darüber hinaus waren die Zellextrakte von den RDS-Lungen nicht in der Lage die Oberflächenspannung in vitro zu reduzieren, was für einen Mangel an oberflächenaktivem Faktor sprach [AVERY, 1959].

### **2.2. Pathogenese und klinisches Bild**

Surfactant sorgt für die mechanische Stabilisierung der Alveolen und ist deshalb die Voraussetzung für das normale Atmen mit dem geringsten Aufwand. Der Mangel an Surfactant in der fetalen unreifen Lunge führt zur Entstehung von hohen Oberflächenspannungswerten an der Innenseite der Alveolen, was zur alveolären Atelektase führt. Pathophysiologisch erkennt man eine Abnahme der Lungen-Compliance und eine verminderte funktionelle Residualkapazität. Darüber hinaus findet ein vermehrter intrapulmonaler Shuntfluß statt, der auf schwere Gasaustauschstörungen beruht. Es bestehen einerseits Ventilationsstörungen in Form von Mikroatelektasen und andererseits, als Folge der daraus entstehenden Hypoxie, Perfusionsstörungen, die durch den heraufgesetzten Widerstand (Vasokonstriktion) der A. pulmonalis bedingt sind. Die Hypoperfusion, die Hypoxie und die inadäquate Lungenmechanik führen zur Schädigung der alveolokapillären Membran. Histologisch kann ein Einstrom plasmaproteinreicher Flüssigkeit (Protein-Leakage) zunächst in das Interstitium und später, im fortgeschrittenen Stadium, in den Alveolarraum nachgewiesen werden, der wiederum zur Inaktivierung des dort schon verminderten Surfactantgehalts führt. Auf diese Weise bildet sich ein Circulus vitiosus. Diese proteinreiche Flüssigkeit bildet eosinophile Kondensationen, welche die Innenseite der Alveolen auskleiden und als 'hyaline Membranen' bezeichnet sind [KOPELMAN et al, 1995].

Die ersten Zeichen des RDS treten meistens sofort oder kurz nach der Entbindung auf. Dazu gehören die Zyanose, die Tachypnoe, das Nasenflügeln, die Einziehungen und das expiratorische Stöhnen. Die sub- und interkostalen Einziehungen entstehen, wenn die großen negativen intrathorakalen Kräfte, die das Neugeborene ausübt, um seine steife Lunge zu expandieren, das relativ instabile thorakale Skelettsystem verformen. Das typische expiratorische Stöhnen entsteht, wenn das Neugeborene seine Stimmbänder während der Expiration teilweise zusammenzieht, um ein adäquates Residualvolumen aufrecht zu erhalten. In den meisten Fällen zeigt die Blutgasanalyse eine Hypoxie kombiniert mit einer Hyperkapnie [KOPELMAN et al, 1995]. Im Röntgenbild sieht man ein feingranulär-retikuläres Muster mit oder ohne Aerobronchogramm bis hin zu einer weißen Lunge (Atelektase)(Abb. 12-13).



**Abb. 12-13** Röntgenaufnahmen von Frühgeborenen mit RDS: feingranulär-retikuläres Muster beider Lungen (12) mit Aerobronchogramm (13).

### 2.3. Folgen

Eine der häufigsten Konsequenzen des RDS ist die Entwicklung einer bronchopulmonalen Dysplasie (BPD). Die BPD ist eine chronische neonatale Lungenerkrankung, die sich als persistierende Hypoxie, Hyperkapnie und Sauerstoff-Bedarf im Alter von 28 Lebenstagen und

später manifestiert. Das röntgenologische Bild dazu zeigt eine Kombination von einerseits atelektatischen und andererseits emphysematischen Lungenarealen [BANCALARI et al, 1979]. Histopathologisch findet man die stereotypischen Zeichen einer Reaktion der Lunge auf chronischen nicht-spezifischen Reiz (Hyperplasie und Degenerierung der Typ-II-Alveozyten) [POLIN et al, 1997].

Zum ersten Mal wurde die BPD 1967 von Northway beschrieben, als eine Komplikation des RDS, die überwiegend bei Frühgeborenen auftrat, die während der ersten Tage ihres Lebens eine mechanische Beatmung benötigten. Als Ursache dafür erkannte man in erster Linie den Einfluß des Barotraumas und der Sauerstofftoxizität auf die unreife Lunge [NORTHWAY et al, 1967].

Doch nach der Anwendung der Surfactant-Therapie, die das Überleben von sehr kleinen Frühgeborenen ermöglichte, wurden zusätzliche ätiologische Faktoren erkannt, die zu einer prolongierten maschinellen Beatmung und zu einer Kolonisation der Atemwege mit pathogenen Keimen führen. Dazu gehören der persistierende Ductus arteriosus Botalli, die Flüssigkeitsüberladung in der ersten Lebenswoche die Entwicklung eines Pneumothorax oder eines interstitiellen Lungenemphysems und die Besiedlung der Lunge mit Mykoplasmen (*Ureaplasma urealyticum*) [BANCALARI et al, 2001; RUF et al, 2002]. Dennoch reagieren Patienten mit scheinbar vergleichbaren Befunden und Bedingungen in absolut differierender Art und Weise, so daß man von einer zusätzlichen genetischen Prädisposition ausgeht [KOPELMAN et al, 1995].

1988 haben Shennan et al eine alternative Definition für die BPD vorgeschlagen, die den anhaltenden Sauerstoffbedarf im postmenstruellen Alter von 36 Wochen zugrunde legt [SHENNAN et al, 1988]. Diese Definition entspricht in der Regel ein schweres Krankheitsbild mit langanhaltenden pulmonalen Konsequenzen und wurde in der vorliegenden Studie mit dem Begriff `chronic lung disease` (CLD), aus der anglo-amerikanischen Literatur übernommen, gleichgesetzt.

### **3. Multifaktorielle Ätiologie des RDS: genetische Komponente**

Aktuelle Konzepte gehen von einer multifaktoriellen Ätiologie des RDS des Frühgeborenen aus. Als hauptsächlichen Risikofaktor erkennt man das Gestationsalter im Zusammenhang mit dem Geburtsgewicht, d.h. je extremer die Frühgeburtslichkeit und je geringer das Geburtsgewicht desto größer ist die Gefahr eines RDS [ROBERTSON et al, 1992]. Darüber hinaus konnte man eine Prädisposition bei Früh- und Neugeborenen diabetischer Mütter [MATTI et al, 1996] und Mütter fortgeschrittenes Alters [DANI et al, 1999], bei männlichen im Vergleich zu weiblichen Frühgeborenen [DANI et al, 1999; PERELMAN et al, 1986], bei Frühgeborenen kaukasischer gegenüber afro-amerikanischer Herkunft [KAVVADIA et al, 1998; RICHARDSON et al, 1994] und bei Neugeborenen, die per selektiver oder Notfall- Sectio entbunden werden [DANI et al, 1999], nachweisen. Zur Prävention des RDS oder Minderung dessen Schweregrades des Frühgeborenen gehört die Kortisongabe bei der Mutter 24-48 h ante partum [CROWLEY, 1995], welche die Surfactant-Synthese induziert [BALLARD et al, 1996; BEERS et al, 1995; DULKERIAN et al, 1996; GUTTENTAG et al, 1999; HUNDERTMARK et al, 1999].

Mehrere Arbeitsgruppen postulieren einen zusätzlichen genetischen Faktor, der an der Ätiologie des RDS beteiligt zu sein scheint. Eine dieser Studien konnte bei eineiigen Zwillingen eine signifikant größere Übereinstimmung in der Erkrankung, beziehungsweise Nicht-Erkrankung, an RDS im Vergleich zu zweieiigen Zwillingen feststellen [MYRIANTHOPOULOS et al, 1971]. Gemäß einer weiteren Untersuchung, ist das Risiko für ein RDS höher bei Frühgeborenen, deren Mutter früher schon mal ein an RDS erkranktes Kind hatte [NAGOURNEY et al, 1996].

Im Hinblick auf die oben erwähnten Beobachtungen, untersuchten Floros et al die mögliche Assoziation des von ihrer eigenen Arbeitsgruppe entdeckten Intron-4 Polymorphismus im SP-B-Gen mit einer häufigeren Entwicklung des RDS bei Neugeborenen und konnten einen Zusammenhang bestätigen [FLOROS et al, 1995]. Im zitierten Artikel wird dieser neu entdeckte Polymorphismus als eine Variation bei der Kombination von mehreren ähnlich gebauten Motiven beschrieben, die sich in der ersten Hälfte des Intron-4 befinden. Jedes Motiv entsteht aus weiteren zwei Elementen: ein 20 bp langes Segment und eine darauffolgende jedes Mal unterschiedliche Anzahl von CA-Wiederholungen. Einzel-Base-Unterschiede innerhalb jedes 20 bp-Elementes ermöglichen es dies als Bestandteil des ersten

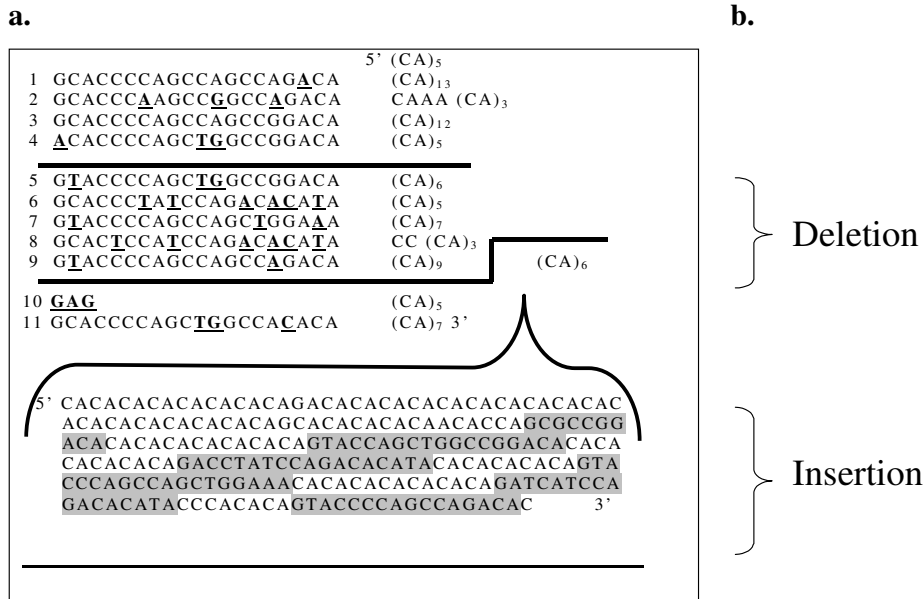
oder des zweiten u.s.w. Motivs zu identifizieren. Auf diese Weise erhält man normalerweise beim Wildtyp 11 Motive, wobei das 10. ein abgeschnittenes 20 bp-Element beinhaltet (**Abb. 14a**).

Floros et al konnten zeigen, daß verschiedene Variationen des zuvor beschriebenen Wildtyps auftreten können, bei denen entweder Motive fehlen (Deletion), was häufiger vorkommt, oder aber zusätzliche Motive eingebaut sind (Insertion). Bei einer Insertion geht es eigentlich um eine Reihe von degenerierten Motiven, wie es sich nach der Sequenzierung der längeren Varianten herausgestellt hat. Das Auftreten dieser kürzeren oder längeren Varianten des Intron-4 kommt fast ausschließlich in Form einer Heterozygotie vor, d.h. als Kombination eines normalen mit einem varianten Gen beim selben Individuum und seine Häufigkeit liegt nach Floros et al bei ca. 18%. Sie hat weiterhin beobachtet, daß die Punkte, an denen eine Deletion oder auch eine Insertion stattfinden (break-points), sich immer innerhalb des  $(CA)_n$ -Elementes und nicht im 20 bp-Segment befinden. Bei den in die Studie eingeschlossenen Neugeborenen war stets das  $(CA)_n$ -Element des 9. Motivs der Bereich für sämtliche Deletionen und Insertionen (**Abb. 14b**). Mittels der molekulargenetischen Untersuchung von 219 Neugeborenen mit (n=82) und ohne (n=137) Entwicklung eines RDS haben Floros et al nachgewiesen, daß die durch eine Insertion oder Deletion im Intron-4 genetisch varianten Früh- und Neugeborenen eine höhere Inzidenz an RDS aufweisen und daß dieser Unterschied statistisch signifikant ist.

In den folgenden Jahren erschienen mehrere Artikel, die sich mit der möglichen Assoziation zwischen sowohl SP-B als auch SP-A Polymorphismen und der Entwicklung eines RDS befaßten, jedoch mit kontroversen Ergebnissen. 1998 haben Kala et al festgestellt, daß (a) bestimmte SP-A2 Allele ( $1A^0$ ) häufiger bei Neugeborenen, die ein RDS entwickelten, auftraten und daß (b) eine positive synergistische Assoziation zwischen diesen Allelen und dem SP-B Intron-4 Polymorphismus bestand [**KALA et al, 1998**]. Im April 2000 zeigten Rämets et al, daß die  $6A^2$  und  $6A^3$  SP-A1 Allele, sowie der  $6A^2/1A^0$  SP-A1/SP-A2 Haplotyp häufiger in der RDS-Subpopulation der untersuchten Finischen Neugeborenen zu finden war. Doch fanden sie keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der SP-B Intron-4 Prävalenz in beiden Subpopulationen [**RÄMET et al, 2000**].

Im Juli 2000 erschien die erste Studie aus unserer Gruppe, die sich mit SP-A Polymorphismen und die Entwicklung einer BPD als Folge eines initialen Atemnotsyndroms befasste. Dabei





**Abb. 14 (a)** Aufbau des SP-B Intron-4 Gens: jedes Motiv (1-11) entsteht aus ein 20 bp langes Segment und eine darauffolgende Anzahl von CA-Wiederholungen. Die Einzel-Base-Unterschiede in jedem 20 bp-Element sind fettgedruckt.

**(b)** Intron-4 Polymorphismus: Beispiel einer Deletion, wobei das 5.-9. Motiv fehlt, und einer Insertion, wobei 6 degenerierte Motive (grau markiert) im Bereich des (CA)<sub>n</sub>-Elementes des 9. Motivs eingebaut sind. [modifiziert nach Floros et al, 1995]

hat sich der 6A<sup>6</sup> SP-A1 Polymorphismus als zusätzlicher unabhängiger ätiologischer Faktor für BPD erwiesen [WEBER et al, 2000]. Haataja et al haben im September des selben Jahres eine Korrelation zwischen gewissen SP-A Allelen in Kombination mit dem SP-B Ile131Thr Polymorphismus und der Entwicklung eines RDS festgestellt. Sie haben entdeckt, daß sich der Thr/Thr Genotyp in Kombination mit 6A<sup>2</sup> SP-A1 und/oder 1A<sup>0</sup> SP-A2 Allelen als RDS-Risikofaktor, während er in Kombination mit 6A<sup>3</sup> SP-A1 und/oder 1A<sup>2</sup> SP-A2 Allelen als RDS-Schutzfaktor erweist. Eine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem SP-B Intron-4 Polymorphismus, sowohl allein als auch in Kombination mit verschiedenen SP-A Allelen, und der Gruppe der Frühgeborenen, die ein RDS entwickelten, konnte nicht bestätigt werden [HAATAJA et al, 2000].

Ferner belegte eine weitere Arbeit von Floros et al, daß a) SP-B Intron-4 Deletion-Allele bei männlichen kaukasischen Neugeborenen eines Gestationsalters zwischen 28 und 33 Schwangerschaftswochen häufiger mit RDS assoziieren, b) SP-B Intron-4 Insertion-Allele bei weiblichen afro-amerikanischen Frühgeborenen ein Risikofaktor für RDS sind und c) verschiedene Kombinationen aus SP-A Polymorphismen und SP-B Einzel-Nukleotid-Polymorphismen sich entweder als Risikofaktor oder Schutzfaktor für RDS erweisen [FLOROS, FAN, DIANGELO et al, 2001].

# **FRAGESTELLUNG**

Das Ziel der vorliegenden prospektiven Studie waren folgende Punkte:

- die Überprüfung der Existenz von Längenvariationen (Polymorphismen) im SP-B Intron-4 in einem deutschen kaukasischen Patientenkollektiv,
- deren Verteilung zu bestimmen,
- ihren Aufbau zu untersuchen,
- die Prävalenz des Polymorphismus zwischen Frühgeborenen und reifen Neugeborenen ohne respiratorische Adaptationsstörungen zu vergleichen,
- die Assoziation zwischen der SP-B Intron-4 Variation und der Inzidenz, dem Schweregrad, sowie den Komplikationen des RDS bei Frühgeborenen zu untersuchen.

## **PATIENTENKOLLEKTIV**

Das von uns untersuchte Patientenkollektiv erfaßte 140 deutsche kaukasische Frühgeborene mit einem Gestationsalter von 25-32 Schwangerschaftswochen, die in der neonatologischen Intensivstation der Klinik für Pädiatrie der Medizinischen Universität zu Lübeck (1996-1998) und der Intensivstation des Zentrums für Kinderheilkunde der Justus-Liebig-Universität in Gießen (1999-2000) stationär behandelt wurden. Als Indikation für die Intubation der Frühgeborene diente die schwere Atemnot, das  $\text{PaCO}_2 > 65 \text{ mmHg}$  oder  $\text{pH} < 7,2$  und/oder  $\text{SaO}_2 < 90\%$  trotz  $\text{FiO}_2 > 0,5$ . Surfactant wurde endotracheal appliziert, wenn die frühgeborenen Kinder, mit mehr als 40% inspiratorischer Sauerstoffkonzentration ( $\text{FiO}_2$ ) beatmet waren. Als Kontrollgruppe dienten 58 deutsche kaukasische gesunde reife Neugeborene ohne respiratorische Adaptationsstörungen, die im Zeitraum 1999-2000 in der Universitäts-Frauenklinik Gießen geboren waren.

# MATERIALIEN

## 1. Chemikalien

◇ Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
◇ Ampicillin sodium salt (50mg/ml)	Sigma, Taufkirchen
◇ ATP, lithium salt (100mM)	Boehringer, Mannheim
◇ Bacto-tryptone	Becton Dickinson, Basel
◇ Bacto-yeast-extract	Becton Dickinson, Basel
◇ Bacto-agar	Becton Dickinson, Basel
◇ Bakterienstamm : E.coli JM 101	Stratagene , Amsterdam, The Netherlands
◇ CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
◇ Dephosphorylation Buffer, 10x conc.	Boehringer, Mannheim
◇ 5xDNA Blue Run	Hybaid-AGS, Heidelberg
◇ dNTP-Mix (10mM)	Finnzymes, Espoo, Finland
◇ EDTA-Na <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
◇ Essigsäure 96%	Riedel-de Haen , Seeize
◇ Ethanol	Riedel-de Haen , Seeize
◇ Ethidium Bromid (aqueous sol. 1% w/v)	Serva, Heidelberg
◇ Formamid	Sigma, Taufkirchen
◇ Hind III - Restriktionsenzym (20.000U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
◇ IPTG (200mg/ml)	Promega, Mannheim
◇ Ligation Buffer, 10x conc.	Boehringer, Mannheim
◇ MgCl <sub>2</sub> (25mM)	Hybaid-AGS, Heidelberg
◇ NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
◇ Natrium-Acetat	Merck, Darmstadt
◇ NE Buffer 2, 10x conc.	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
◇ Phosphatase alkaline, (1U/μl)	Boehringer, Mannheim
◇ Polymerase : Taq/Pwo Mix, conc. 2,5u/μl	Hybaid-AGS, Heidelberg
◇ Premix : Big Dye Terminator RRMix	Applied Biosystems, Weiterstadt

◇ QIAamp DNA Mini Kit (250)	Qiagen, Hilden
◇ QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
◇ QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
◇ QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
◇ 10xReaction Buffer incomplete	Hybaid-AGS, Heidelberg
◇ Standard : DNA Molecular Weight Marker XIV, 100 base pair ladder (0,25µg/µl)	Roche, Mannheim
◇ Standard : Genescan 2500 ROX, Size Standard (8nM)	Applied Biosystems, Weiterstadt
◇ T <sub>4</sub> DNA Ligase (5U/µl)	Boehringer, Mannheim
◇ Trisbase	Sigma, Taufkirchen
◇ TSR (Template Suppression Reagent)	Applied Biosystems, Weiterstadt
◇ UV-Safe-TAE (50x)	MWG-Biotech, Ebersberg
◇ Vektor : p-Bluescript II SK (+)	Stratagene, Amsterdam, The Netherlands
◇ Wasser	Riedel-de Haen, Seeize
◇ X-gal (50mg/ml)	Promega, Mannheim
◇ XHO I - Restriktionsenzym (20.000U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
◇ Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

## 2. Puffer und Lösungen



### 50 x TAE (Ansatz für 1000ml)

242 g      Trisbase  
57,1 ml    Essigsäure (99%)  
100 ml     EDTA-Na<sub>2</sub> 0,5 M  
aqua dest. ad 1000 ml  
(pH : 7,6-7,8)



### Agarose-Gel 2%

1 g          Agarose  
50 ml       1 x TAE



### Luria Bertani -Medium (Ansatz für 1000 ml)

10,0 g      Bacto-tryptone  
5,0 g        Bacto-yeast-extract  
10,0 g      NaCl  
aqua dest. ad 1000 ml  
(pH : 7,0 . Einstellen mit ca. 3 ml NaOH 1M)



### Agar (Ansatz für 500 ml)

500 ml      Luria Bertani-Medium  
7,5 g        Bacto-agar

### 3. Oligonukleotide

- ◇ **Intron-4-FW** (markiert mit 5'-FAM): 5'>TGG TCA TCG ACT ACT TCC AGA ACC< 3', sense, Position 2592-2615
- ◇ **Intron-4-RV** : 5'>CAT GGC TGA AGG GCA CGT AGT TTC C< 3', antisense, Position 3090-3114
- ◇ **Clon-FW** : 5'>GGC CTT GTG TCC AGG GAC< 3', sense, Position 2422-2439
- ◇ **Clon-RV** : 5'>TGT GTG TGA GAG TGA GGG TGT AAG< 3', antisense, Position 3174-3179
- ◇ **Intron-4-FW XHO I** : 5'>GCA CTC GAG TGG TCA TCG ACT ACT TCC AGA ACC< 3', sense, Position 2592-2615
- ◇ **Intron-4-RV Hind III** : 5'>GCA AAG CTT CAT GGC TGA AGG GCA CGT AGT TTC C< 3', antisense, Position 3090-3114

Die eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma Carl Roth, Karlsruhe bezogen.



## GERÄTE

◇ DNA-Sequenzer	Perkin Elmer Abi Prism 310 Genetic Analyzer, Weiterstadt
◇ Elektrophorese-Kammer	Owi Separation Systems, Heidelberg
◇ Elektrophorese-Netzgerät	Stabilisiertes Netzgerät 500V 0,5A., Heidelberg
◇ Inkubator	Trio-Thermoblock Biometra, Göttingen
◇ Inkubator-Schüttler	Certomat U, B. Brown Biotech International, Melsungen
◇ Laborwaage	Kern824 Gottl. Kern & Sohn GmbH, Albstadt
◇ Minischüttler	Janke & Kunkel IKA-Labortechnik VF2, Frankfurt
◇ pH-Meter	CG840, Schott, Mainz
◇ Photometer	UV/Visible Spectrophotometer Pharmacia, Freiburg
◇ Software	Abi Prism 310: Sequencing Analysis 3.4.1 Gene Scan Analysis 3.1.2
◇ Thermocycler	Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400, Weiterstadt
◇ UV-Lampe	Bio Photonics Gel Print 2000i, MWG-Biotech & Foto / Prep I by Fotodyne, Ebersberg
◇ Vakuum-Zentrifuge	von Keutz, Reiskirchen
◇ Zentrifuge	Hettich Universal 30RF, Tuttlingen

# METHODEN-ÜBERBLICK

1. DNA-Isolierung und Konzentrationsmessung



2. PCR



3. Gel-Elektrophorese



4. Fragmentlängenanalyse



5. Klonierung



6. Sequenzierung

## 1. DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung sowohl, aus Vollblut als auch aus Blutfilterkärtchen, erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Kit (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers. Diese Methode besteht aus 4 Schritten:

- (a) Lysis von 200  $\mu$ l EDTA-Blut oder 1  $\text{cm}^2$  Blutfilterkärtchen im Lysispuffer mit Proteinase K
- (b) Adsorption der DNA von der QIAamp Membran (QIAamp Spin-Säulen)
- (c) Entfernung eventueller Verunreinigungen mittels zweier verschiedener Waschlösungen.
- (d) Eluieren der an der Membran gebundenen und ausgewaschenen DNA.

Die Konzentration der auf diese Weise isolierten DNA wurde photometrisch bestimmt.

## 2. PCR

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction; PCR) wurde von Kary B. Mullis et al 1985 entwickelt. Sie dient der Vervielfältigung (Amplifikation) einer gewählten Sequenz von Nukleotiden, so daß von ursprünglich geringen Ausgangsmengen millionenfache Kopien entstehen. Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung einzelner Reaktionsschritte, die der natürlichen Replikation ähneln. Bei jedem Reaktionszyklus wird zunächst die doppelsträngige DNA durch Erhitzen denaturiert. An die somit entstandenen, einzelsträngigen DNA-Moleküle wird ein ausgewähltes Paar synthetischer Oligonukleotide (Primer) gebunden, das gegenläufig orientiert ist und den zu amplifizierenden Bereich einrahmt. Die Anlagerung der Primer erfolgt bei einer niedrigeren Temperatur als die Denaturierung und ist primer-spezifisch. Sie stellt die ideale Temperatur bei der sich der jeweilige Primer nur an einer vollständig komplementären Sequenz bindet dar. Danach folgt die Verlängerung (Extension) der Primer am 3'OH-Ende und somit die Synthese des Gegenstranges mit Hilfe einer DNA-Polymerase in Anwesenheit freier Desoxy-Nukleosid-Triphosphate (dNTPs). In jedem folgenden Zyklus werden diese kontinuierlich neu synthetisierten, komplementären DNA-Stränge vom Originalstrang getrennt und als neue Matritze benutzt.

Die Amplifikation des SP-B Intron 4 Gens erfolgte in Anpassung dergenannten Prinzipien. Das Reaktionsgemisch (25  $\mu$ l) bestand aus 120 ng genomischer DNA, je 10 pmol beider Intron-4 spezifischer Primer, 2,5  $\mu$ l 10xReaction Buffer incomplete, 45 nmol  $\text{MgCl}_2$ , 24 pmol

dNTP-Mix und 1 u Pwo/Taq Polymerase. Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler (Perkin Elmer, Weiterstadt) gemäß dem folgenden Protokoll:

1. Denaturierung: 94°C für 2 min
  2. Denaturierung: 94°C für 30 sec
  3. Anlagerung: 60°C für 30 sec
  4. Verlängerung: 68°C für 1 min
  5. Verlängerung: 68°C für 20 min
- } x 30 Zyklen

Als Oligonukleotide dienten die Primer:

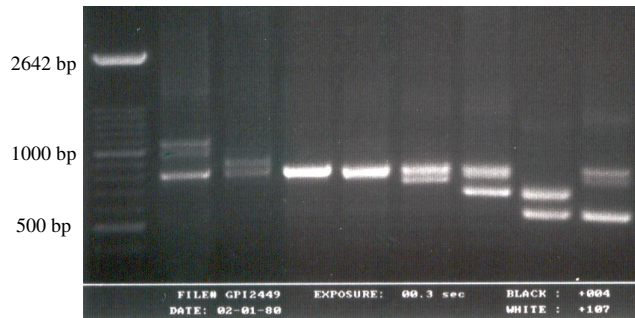
**Intron-4-FW** (5'-FAM markiert) und **Intron-4-RV** oder **Clon-FW** und **Clon-RV**

Das erste Primer-Paar amplifiziert ein 523 bp langes Fragment und wurde hauptsächlich bei der PCR vor der Fragmentlängenanalyse benutzt, das zweite amplifiziert ein 776 bp langes Fragment und kam hauptsächlich bei der PCR vor der Klonierung mit dem Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit von Invitrogen zum Einsatz.

### 3. Gel-Elektrophorese

Nach der PCR wurden die entstandenen PCR-Produkte mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht. Bei der Gel-Elektrophorese entsteht ein elektrisches Feld, auf dem unterschiedlich lange DNA-Fragmente mit Hilfe ihrer negativen Ladung unterschiedlich schnell wandern.

Für die Gel-Elektrophorese der SP-B Intron-4 Produkte wurde ein 2%iges Gel (1 g Agarose, 50 ml 1xTAE-Lösung) hergestellt. Nach dem vollständigen Auflösen der Agarose in der Mikrowelle wurden 5 µl Ethidium Bromid 2mg/ml bei etwa 60°C hinzugefügt. Das abgekühlte Gel wurde dann in eine Elektrophorese-Kammer verbracht, die mit 1xTAE-Lösung gefüllt war. 5 µl der Intron-4 Produkte, zusammen mit 1,25 µl Blue Run (Blaumarker), wurden in die Taschen des Gels pipettiert. In jeweils die erste Kammer wurden 5 ml eines DNA-Markers verbracht, was zum Abschätzen der Fragmentlänge diente. Die Gel-Kammer wurde dann an ein Netzgerät angeschlossen (90 V für etwa 45 min) bis der Blue Run 4 cm gelaufen war. Am Ende der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht, welches das sich in doppelsträngige DNA-Moleküle einlagernde Ethidium Bromid sichtbar macht, fotografiert (**Abb. 15**).



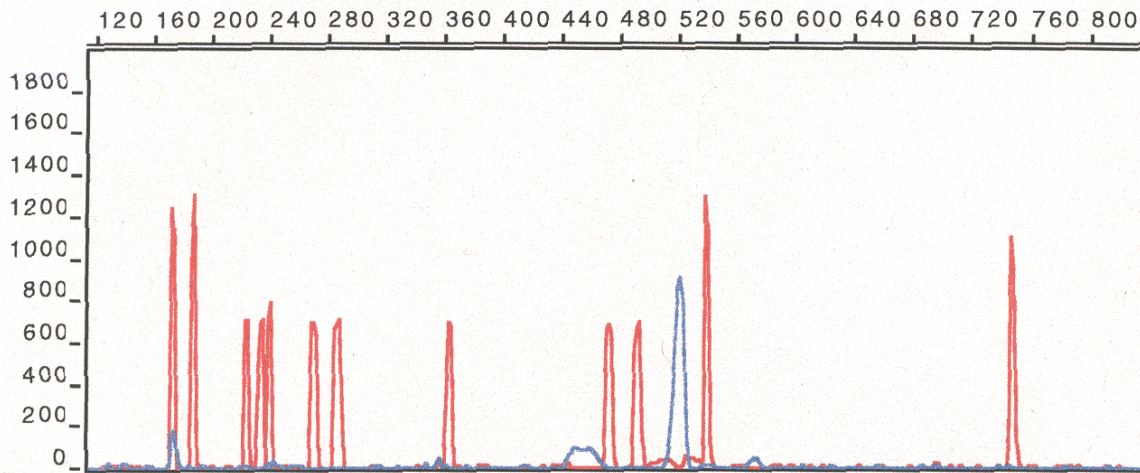
**Abb. 15** Beispiel einer Gelelektrophorese. Im ersten Fach (links) befindet sich der DNA-Marker, mit dessen Hilfe die Länge der verschiedenen Fragmente gemessen wird. Die kürzeren im Vergleich zu den längeren Fragmenten sind weiter unten auf dem Bild.

#### 4. Fragmentlängenanalyse

Die bei der Gel-Elektrophorese detektierten varianten Allele (Länge  $\neq$  523 bp oder  $\neq$  776 bp, in Abhängigkeit von verwendetem Primer-Paar) wurden mit Hilfe der Fragmentlängenanalyse hinsichtlich ihrer exakten Länge näher untersucht.

Die Fragmentlängenanalyse stellt eine Variante der Elektrophorese dar, bei der die exakte Länge verschiedener DNA-Fragmente bestimmt werden kann. Die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten DNA-Proben wandern, in Abhängigkeit von ihrer Längenausdehnung, unterschiedlich schnell durch das Gel, so daß sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Scan-Region des Lasers erreichen, der die Fluoreszenzfarbstoffe der untersuchten DNA-Segmente detektieren und differenzieren kann. Der angeschlossene Computer wandelt die entstandenen Lichtsignale in digitale Signale um und erstellt so ein Elektropherogramm.

Im Elektropherogramm wird jedes detektierte Fragment als Peak abgebildet, dessen Höhe der Intensität des Lichtsignals entspricht. Die Länge des detektierten Fragments wird über die Messung des Abstandes zwischen dem Anfangspunkt des Elektropherogramms und dessen Peak berechnet. Zum Vergleich benötigt der Computer einen DNA-Standard, der parallel zur untersuchten Probe läuft, jedoch mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, so daß die Peaks der Probe und des Standards voneinander unterschieden werden können (**Abb. 16**).



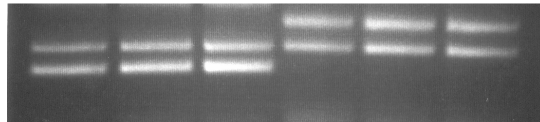
**Abb. 16** Beispiel eines Elektropherogramms. Die Höhe der Peaks entspricht der Intensität des Lichtsignals, der Abstand vom Punkt Null der x-Achse der Länge des detektierten Fragments (rot: DNA-Standard; blau: DNA-Probe).

Der verwandte DNA-Standard (Genescan-2500 ROX) besteht aus 28 unterschiedlich langen Fragmenten, welche die Pst I-Restiktionsprodukte der DNA des Bakteriophagen Lambda repräsentieren. Da mit diesem Standard Fragmente bis 536 bp-Länge verglichen werden können, konnte die Länge aller SP-B Intron-4 Allele über 536 bp nur annähernd angegeben werden. Ihre genaue Längenausdehnung wurde dann mit Hilfe der Sequenzierung festgestellt.

Bei der Vorbereitung für die Fragmentlängenanalyse wurden 1µl vom PCR-Produkt, 0,5µl Genescan-2500 ROX Standard und 12 µl Formamid zusammenpipetiert. Formamid dient zur Verhinderung der Bildung von Sekundärstrukturen des PCR-Produktes. Das entstandene Gemisch wurde zunächst für 2 min bei 90°C denaturiert und danach für weitere 2 min auf Eis gekühlt. Die Fragmentlängenanalyse wurde mit einem Perkin Elmer ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer durchgeführt und die Ergebnisse von einem Power Macintosh (7200/120) Computer mit Sequencing Analysis 3.4.1 Software analysiert.

## 5. Klonierung

Die in der Analyse auffälligen varianten SP-B Intron-4 Allele wurden aus genomischer DNA nach dem bereits beschriebenen Protokoll reamplifiziert. Hierzu wurde bei der PCR das Primer-Paar: **Intron-4-FW XHO I**, **Intron-4-RV Hind III** benutzt. Erwähnenswert sind die den Primern und damit den PCR Produkten angehängten Restriktionsstellen XHO I: C<sup>↓</sup>TCGAG bei FW; Hind III: A<sup>↓</sup>AGCTT bei RV. Das gesamte PCR-Produkt (50µl) wurde auf ein 2% Agarose-Gel appliziert, so daß nach Durchführung der Gel-Elektrophorese die gewünschte Bande (variantes Allel) sichtbar wurde (**Abb. 17**) und mittels Skalpell vom Rest des Gels abgetrennt werden konnte. Aus den ausgeschnittenen Gelpartikeln wurde die gewünschte DNA mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert und gereinigt. Die auf diese Weise entstandenen DNA-Fragmente dienen als Klonierungssubstrate.



**Abb. 17** Elektrophorese eines 2% Gels. Die gewünschte Bande wurde mittels Skalpell vom Rest des Gels abgetrennt.

Bei der verwendeten Klonierungsmethode werden die gewünschte Passagier-DNA (Insert) und der Vektor (p-Bluescript) zunächst mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten, so daß die entstehenden einzelsträngigen Enden (sticky ends) der Passagier-DNA und des jetzt linearisierten Vektors komplementär zueinander sind und einen Vorkomplex ausbilden können. Dieser Vorkomplex wird dann durch das Enzym DNA-Ligase und ATP kovalent verknüpft. Durch eine Dephosphorylierung des linearisierten Vektors mit alkalischer Phosphatase wird dessen Religation im Vorhinein verhindert.

Als Wirtsorganismen für den rekombinanten Vektor werden am häufigsten gram-negative Bakterien, insbesondere *Escherichia coli*, ausgewählt. Die Stämme, die man bei einem Klonierungsprozeß benutzt, sind apathogen und enthalten einen genetischen Selektions-

marker, der ihre Replikation abhängig von der Zufuhr der Base Thymidin macht. Somit ist eine Ausbreitung der Organismen außerhalb definierter Nährmedien unterbunden. Zunächst werden die *Escherichia coli*-Zellen kompetent gemacht, das heißt durchlässig für den rekombinanten Vektor. Das erreicht man mit der Inkubation in eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung.

Der nächste Schritt ist die Transformation der nun kompetenten *Escherichia coli*-Zellen mit dem Vektor-Insert Komplex. Nach einer erfolgreichen Transformation erfolgt die Selektion nur derjenigen *Escherichia coli*-Kolonien, die Plasmide aufgenommen haben. Dazu dient das schon im Plasmid vorhandene Antibiotikaresistenzgen (hier Ampicillinresistenzgen). Während also *Escherichia coli* auf ampicillinhaltigen Nährboden (60 µg/ml) physiologischerweise nicht kultivierbar sind, zeigen transformierte Zellen, die nach der Aufnahme dieser Plasmid-DNA gegen Ampicillin resistent sind, normales Wachstum.

Für die zusätzliche Selektion der *Escherichia coli*-Kolonien, die nicht nur das Plasmid eingebaut haben, sondern auch das gewünschte Insert, dient die  $\alpha$ -Komplementation, eine Art von optischem Screening der Transformanten mit rekombinanten Plasmiden. Dafür müssen sowohl der Vektor (p-Bluescript) als auch die Wirt-Zelle (*Escherichia coli*-Zelle) zwei verschiedene, aber zueinander komplementäre Gen-Fragmente besitzen, die zusammen das vollständige  $\beta$ -Galaktosidase-Gen bilden. Die rekombinanten Bakterien sind leicht zu erkennen, indem sie auf X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid) Indikatorplatten Kolonien bilden, die aus der Spaltung von X-Gal durch  $\beta$ -Galaktosidase resultierend, eine Blaufärbung aufweisen. Im Gegensatz dazu, führt der Einbau eines fremden DNA-Fragments (gewünschtes Insert) in die Polylinker-Region des Vektors zur Produktion eines Protein-Fragments, das nicht mehr zur  $\alpha$ -Komplementation fähig ist. Auf diese Weise erkennt man die Bakterien mit eingebautem Plasmid-Insert Komplex an der Bildung von weiß gefärbten Kolonien.

Gemäß unserem Klonierungsprotokoll wurden zunächst 50 µl der vorher gereinigten Klonierungssubstrate (gewünschtes Insert) und 10 µg p-Bluescript mit 35 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl NE Buffer 2 (Restriktionspuffer), 50 u XHO I und 50 u Hind III für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden sowohl das Insert, als auch der Vektor mittels QIAquick PCR Purification Kit gereinigt und anschließend mit 30 µl H<sub>2</sub>O eluiert. Bei der Dephosphorylierung wurden 30 µl gereinigten Vektors mit 5 µl Dephosphorylation Buffer, 1 u alkalische Phosphatase und 14 µl H<sub>2</sub>O gemischt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der nun dephosphorylierte Vektor



wurde erneut mittels QIAquick PCR Purification Kit gereinigt und anschließend mit 30 µl H<sub>2</sub>O eluiert. Darauf erfolgte die Ligation: 100 ng dephosphoryliertes p-Bluescript, 2 µl Ligation Buffer, 0,1 µmol ATP, 5 U T<sub>4</sub>-DNA Ligase und 180 ng Insert (SP-B Intron-4) wurden zusammenpipettiert und über Nacht bei 16°C inkubiert.

Bei der Vorbereitung der Wirt-Zellen (*Escherichia coli* JM 101) für die Transformation wurde am ersten Tag eine Vorkultur aus 20 ml Luria-Bertani Medium und 20 µl *Escherichia coli* angesetzt. Als Kontrolle für Kontaminationen dienten 20 ml Luria-Bertani Medium ohne *Escherichia coli*. Beide Kulturen wurden bei 37°C über Nacht im Schüttler (250 rpm) inkubiert. Am zweiten Tag wurde die Hauptkultur angesetzt, die aus 20 ml Luria-Bertani Medium und 100 µl Vorkultur bestand. Die Hauptkultur wurde dann für 2 Stunden bei 37°C und 250 rpm im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde am Photometer ihre optische Dichte bei  $\lambda=600\text{nm}$  bestimmt (erwünschte Werte zwischen 0,3 und 0,6). Zum Kompetentmachen der Bakterien wurde die Hauptkultur bei 4°C und 2500 rpm für 20 min abzentrifugiert. Das daraus entstandene Pellet wurde in 10 ml CaCl<sub>2</sub> (gekühlt auf Eis) gelöst und erneut bei 4°C und 1500 rpm für 20 min abzentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet in 2 ml CaCl<sub>2</sub> gelöst und für 24 Stunden auf Eis aufbewahrt.

Das Transformationsprotokoll sah mehrere Schritte vor:

20 µl Ligaseansatz wurden mit 100 µl kompetente Bakterien gemischt, 30 min auf Eis gestellt, 90 sec bei 42°C inkubiert und 10 min wieder auf Eis abgekühlt. Daraufhin wurden 200 µl Luria-Bertani Medium (37°C warm) zugegeben und das Gemisch wurde für 45 min bei 37°C aufbewahrt. Während der Wartezeit wurden die benötigten Agarplatten vorbereitet. In autoklavierten Agar wurden 60 µg/ml Ampicillin zugegeben, sobald die Flüssigkeit eine Temperatur von 50°C unterschritten hatte. Davon wurden Platten mit je 20 ml Agar gegossen und zum weiteren Abkühlen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Der nächste Schritt sah das Ausstreichen eines Gemisches aus 4,4 mg X-Gal und 0,4 mg IPTG vor. Nach 30 min Einziehen konnten 100 µl vom Ligaseansatz-kompetente Bakterien-Luria Bertani-Medium Gemisch auf die Agarplatten ausplattiert werden. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden von jeder Platte 2-3 weiße Klone gepickt und in 5 ml Luria Bertani-Medium mit 6 µl Ampicillin über Nacht bei 250 rpm und 37°C geschüttelt. Die Isolation des Vektors inklusive seines Inserts erfolgte mittels QIAprep Spin Miniprep Kit. Die Proben

wurden anschließend im Photometer quantitativ bestimmt. Zum Screening der gepickten Klonen hinsichtlich des eingebauten Inserts diente entweder die Restriktion mit XHO I und Hind III oder die Fragmentlängenanalyse nach PCR Amplifikation mit dem 5'-FAM-markierten **Intron-4-FW Primer** und dem unmarkierten **Intron-4-RV Primer**.

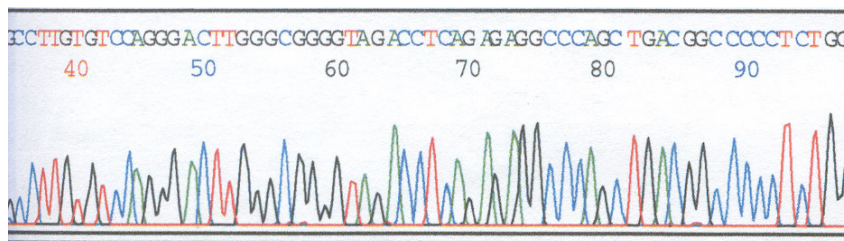
Alternativ wurde für die Klonierung insbesondere der längeren Allele, die auch am schwierigsten zu klonieren waren, das Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit von Invitrogen benutzt. Der Vorteil dieser Methode liegt in der direkten Insertion von 'blunt-end' PCR Produkten in einen Plasmid-Vektor, ohne daß vorher eine Restriktion der Inserts erfolgen muß. Dafür benötigt man 4 µl PCR-Produkt, das zu 10 ng TOPO-Vektor ligiert wird, und dann zur Transformation von TOP 10 One Shot Chemically *Escherichia coli* Zellen verwendet wird. Die folgenden Schritte sind der bereits beschriebenen klassischen Klonierungsmethode ähnlich.

## 6. Sequenzierung

Das von uns angewandte Sequenzierungsverfahren basiert auf der klassischen Methode nach Sanger (1977). Diese beruht auf dem jeweiligen Abbruch der Synthesereaktion des komplementären Stranges, wenn ein Didesoxynukleotid eingebaut ist. Den ersten Schritt stellt die Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion dar, bei der nicht nur die sonst eingesetzten Desoxynukleotiden (dNTPs) zur Verfügung stehen, sondern auch Didesoxynukleotide (ddNTPs), die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die ddNTPs können, wie andere Nukleotide auch, in den wachsenden komplementären DNA-Strang eingebaut werden, aber sie führen zum sofortigen Abbruch der Strang-Synthese. Der Grund ist das Fehlen der 3'-OH-Gruppe der Desoxyribose am 3'-OH-Ende, die normalerweise von einem freien dNTP angegriffen wird und zur Fortführung der Kettenreaktion dient. Auf diese Weise entsteht ein Gemisch von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge, deren jeweils letztes Nukleotid ein fluoreszenzmarkiertes ddNTP darstellt.

Der nächste Schritt ist die Elektrophorese dieses Gemisches über ein Polymer, so daß die unterschiedlich langen DNA-Fragmente, die sich immer um ein Basenpaar unterscheiden, effizient aufgetrennt werden können. Dabei sind die 4 verschiedenen ddNTPs (ddATP; ddCTP; ddGTP; ddTTP) mit 4 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so daß der

angeschlossene Computer jedes DNA-Fragment identifizieren und die Basenabfolge in Form eines Chromatogramms zusammenstellen kann (**Abb. 18**).



**Abb. 18** Beispiel eines Chromatogramms.

Für die Sequenzierung der varianten Intron-4 Fragmente wurde zunächst ein Reaktionsansatz (10 µl) aus 1000 ng Plasmid-Insert Komplex, 15 pmol **sense** oder **antisense Intron-4 Primer** (unmarkiert) und 2,0 µl Premix Big Dye vorbereitet. In einem Thermocycler (Perkin Elmer, Weiterstadt) wurde die folgende Sequenzierreaktion durchgeführt:

1. Denaturierung: 96°C für 15 sec
  2. Denaturierung: 96°C für 10 sec
  3. Anlagerung: 50°C für 5 sec
  4. Verlängerung: 60°C für 4 min
- } x 25 Zyklen

Danach wurden die Proben mit Hilfe einer Ethanol-fällung gereinigt. Dafür wurde der Reaktionsansatz mit 90 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl 3M Natrium-Acetat (pH=4,6) und 250 µl 100% Ethanol gemischt und für 15 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden 300 µl 70% Ethanol hinzupipettiert und erneut für 5 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand entfernt und das erhaltene Pellet in einer Vakuum-Zentrifuge für etwa 5 min abgetrocknet. Das getrocknete Pellet wurde nun in 12 µl TSR-Puffer aufgenommen, kräftig geschüttelt, für 2 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Sequenzierung erfolgte in einem ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, Weiterstadt) mit Hilfe der Sequencing Analysis 3.4.1 Software.

## DEFINITIONEN UND STATISTIK

RDS wurde klinisch diagnostiziert und anhand radiologischer Kriterien [COUCHARD et al, 1974] klassifiziert:

Grad I. feingranulär-retikuläres Muster

Grad II. positives Aerobronchogramm

Grad III. unklare Herz- und Zwerchfellkonturen

Grad IV. weiße Lunge

Als bronchopulmonale Dysplasie wurde der persistierende Sauerstoff-Bedarf am 28. Lebenstag und später definiert [BANCALARI et al, 1979] und als chronic lung disease der persistierende Sauerstoff-Bedarf in der 36. Woche post conceptionem [SHENNAN et al, 1988]. Schwergradiges RDS wurde als der Bedarf für Intubation und maschinelle Beatmung mit  $FiO_2 > 0,5$  und/oder mittlerem Atemwegdruck  $> 7$  cm  $H_2O$  und  $RDS \geq III$  definiert.

Die statistische Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte bezüglich der kontinuierlichen Variablen anhand 'Wilcoxon test for unpaired measurements'. Kategorische Variablen wurden mittels  $\chi^2$ -Test verglichen. Als statistisch signifikant wurden Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$  betrachtet.

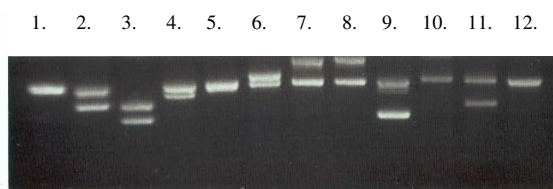
# ERGEBNISSE

## 1. Längenvariationen im SP-B Intron-4:

### Aufbau und Verteilung

Von der Gesamtgruppe der untersuchten Neugeborenen ( $n=198$ ) wurden mittels Gel-Elektrophorese 37 Neugeborene, die heterozygot für ein variantes Intron-4 Allel waren, und 2 Neugeborene, die heterozygot für zwei verschiedene Intron-4 Allele waren, entdeckt. Die übrigen 159 Neugeborene waren homozygot für den Wildtyp des SP-B Intron-4 Gens, dessen Länge 523 bp beträgt. Somit war die Häufigkeit des Intron-4 Polymorphismus in dem untersuchten Patientenkollektiv 19,7%. Davon waren 27 Neugeborene heterozygot für ein kürzeres Allel, 2 Neugeborene waren heterozygot für zwei verschiedene kürzere Allele und 10 waren heterozygot für ein längeres Allel.

Die exakte Länge der varianten Allele wurde anhand der Fragmentlängenanalyse bestimmt. Es wurden insgesamt 8 verschiedene variante Allele entdeckt (**Abb. 19**), deren Häufigkeit in **Tabelle 1** dargestellt ist.



**Abb. 19** Gel-Elektrophorese der varianten und nicht varianten Fragmente.

Fach 1: 523bp + 570bp \*

Fach 6: 523bp + 598bp

Fach 2: 523bp + 358 bp

Fach 7,8: 523bp + 811bp

Fach 3: 358bp + 245 bp

Fach 9: 523bp + 245bp

Fach 4: 523bp + 435bp

Fach 10,12: 523bp

Fach 5: 523bp + 490 bp\*

Fach 11: 523bp + 314bp

\* Diese Polymorphismen, wegen des kleinen Längenunterschieds im Vergleich zu den nicht varianten Fragmenten, wurden anhand Fragmentlängenanalyse identifiziert.

**Tabelle 1.** Verteilung der varianten Allele in der untersuchten Population.

Länge der varianten Allele anhand der Fragmentlängenanalyse	Anzahl der Neugeborenen
245 bp	9
314 bp	2
358 bp	16
435 bp	2
490 bp	2
570 bp	2
598 bp	6
811 bp	2

Mit Hilfe der Sequenzieranalyse wurde der genaue Aufbau des Intron-4 Polymorphismus bestimmt. Die Insertion oder Deletion von Motiven bei den varianten Allelen ist in der folgenden Tabelle (**Tabelle 2**) kurz dargestellt.

**Tabelle 2.** Der Aufbau des identifizierten Polymorphismus anhand der Verteilung der Motive.

Allele (Länge in bp)	Abfolge der Motive	Gesamte Anzahl der Motive
1. 523 bp (Wildtyp)	1;2;3;4;5;6;7;8;9;10;11	11
2. 245 bp	1;10;11	3
3. 314 bp	1;2;3;10;11	5
4. 358 bp	1;2;3;4;10;11	6
5. 435 bp	1;2;3;2;3;4;10;11	8
6. 490 bp	1;2;3;4;6;7;8;9;10;11	10
7. 570 bp	1;1;2;3;4;5;6;7;8;9;10;11	12
8. 598 bp	1;2;1;2;3;4;5;6;7;8;9;10;11	13
9. 811 bp	1;2;3;4;5;6;7;8;9;2;3;4;5;6;7;8;9;10;11	19

## **2. Vergleich der Polymorphismus Prävalenz zwischen Frühgeborenen und reifen Neugeborenen ohne respiratorische Adaptationsstörungen**

Zunächst wurde die Häufigkeit der Intron-4 Variation zwischen der Gruppe der Frühgeborenen ( $n=140$ ) und der Gruppe der reifen Neugeborenen ohne respiratorische Adaptationsstörungen ( $n=58$ ) verglichen. 20,7% (29/140) der Frühgeborenen und 17,2% (10/58) der reifen Neugeborenen erwiesen sich als heterozygot für den SP-B Intron-4 Polymorphismus, so daß ein signifikanter Unterschied in der Polymorphismus Prävalenz zwischen den beiden untersuchten Gruppen ausgeschlossen werden konnte ( $\chi^2$ -Test:  $p=0,58$ ). Ferner zeigten beide Gruppen keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht ( $\chi^2$ -Test:  $p=0,81$  für die Frühgeborenen,  $p=0,47$  für die reifen Neugeborenen).

## **3. Klinische Daten der Gruppe der Frühgeborenen**

Die klinischen Daten, die für das Patientenkollektiv der frühgeborenen Kinder erfasst wurden, sind in **Tabelle 3** aufgeführt. Die Gruppe der Frühgeborenen (25-32 SSW) wurde in zwei Untergruppen geteilt. Die erste Gruppe ( $n=111$ ) bestand aus Kindern mit nur dem Wildtyp des Intron-4 Gens auf beiden Chromosomen, während die zweite Gruppe ( $n=29$ ) die Kinder enthielt, die sich als heterozygot für den Intron-4 Polymorphismus im SP-B Gen herausstellten. Diese beiden Gruppen wurden bezüglich der schon dargestellten klinischen Daten verglichen (**Tabelle 3**), so daß ein signifikanter Unterschied und somit ein möglich verwirrender Faktor (confounding factor) bei dem weiteren Vergleich der beiden Gruppen ausgeschlossen werden konnte.

**Tabelle 3.** Die klinischen Daten der untersuchten Frühgeborenen (n=140)*Gruppe 1: Frühgeborene ohne Intron-4 Polymorphismus**Gruppe2: Frühgeborene mit Intron-4 Polymorphismus*

	Gruppe 1 (n=111)	Gruppe 2 (n=29)	n=140
• Gestationsalter (Median)	29 (25-32) Wo	29 (25-32) Wo	29 (25-32) Wo
• Geburtsgewicht (Median)	1100 (420-2160)g	1070 (490-2060)g	1100(420-2160)g
• Geschlecht-Verteilung :			
weiblich/männlich	61/50	13/16	74/66
• Geburtsmodus: Sectio caesare, n (%)	103 (92,8%)	26 (89,7%)	129 (92,1%)
• Apgar-Score (5 min) $\leq 6$ , n (%)	3 (2,7%)	1 (3,4%)	4 (2,9%)
• Arterieller Nabelschnur pH < 7,10, n (%)	2 (1,8%)	0	2 (1,4%)
• Verabreichung antenataler Glukokortikoiden, n (%)	90 (81,1%)	25 (86,2%)	115 (82,1%)
• Amnioninfektionssyndrom, n (%)	40 (36,0%)	12 (41,4%)	62 (44,3%)
• Schwangerschaftsinduzierte Hypertension, n (%)	17 (15,3%)	4 (13,8%)	21 (15,0%)
• Mütterlicher Diabetes, n (%)	2 (1,8%)	2 (6,9%)	4 (2,9%)
• Neonatale Mortalität, n (%)	2 (1,8%)	0	2 (1,4%)



## 4. Vergleich der Frühgeborenen mit und ohne SP-B Intron-4 Polymorphismus

Bei der Einordnung der Patienten in Frühgeborene mit Intron-4 Polymorphismus und Frühgeborene ohne Polymorphismus im SP-B Gen erhielt man folgende Ergebnisse (**Tabelle 4**):

Die Frühgeborenen mit Polymorphismus

- a) entwickelten häufiger RDS (93,1% vs. 75,7% ;  $p < 0,05$ ),
  - b) entwickelten eine schwergradigere Form von RDS (55,2% vs. 28,4% ;  $p < 0,01$ ),
  - c) entwickelten häufiger bronchopulmonale Dysplasie (48,3% vs. 21,6% ;  $p < 0,01$ ),
  - d) beanspruchten häufiger Surfactantbehandlung (72,4% vs. 43,2% ;  $p < 0,01$ ),
- und
- e) zeigten einen längeren O<sub>2</sub>-Bedarf (Median: 17d vs. 4d ;  $p < 0,05$ ).

Jedoch unterschieden sich die heterozygoten von den homozygoten Frühgeborenen nicht im Hinblick auf

- f) die Beatmungsdauer (Median: 3d vs. 2d ; n.s.)
- und
- g) die Häufigkeit der Chronic lung disease (13,8% vs. 10,0% ; n.s.)

Ferner wurde die Gruppe der Frühgeborenen mit Intron-4 Polymorphismus anhand der Länge der varianten Allele in zwei Untergruppen geteilt. Die Untergruppe mit den kürzeren, im Vergleich zum Wildtyp, Allelen verhielt sich wie die Gesamtgruppe der Frühgeborenen mit varianten Allelen, während bei der Untergruppe mit den längeren Allelen die oben beschriebenen Unterschiede nicht mehr statistisch signifikant waren (**Tabelle 4**).

**Tabelle 4.** Verlauf und Komplikationen des neonatalen RDS bei den untersuchten Frühgeborenen ohne Intron-4 Polymorphismus (Gruppe 1), mit Intron-4 Polymorphismus (Gruppe 2), mit kürzeren (Gruppe 2a) und mit längeren im Vergleich zum Wildtyp Allelen (Gruppe 2b).

	Gruppe 1 (n=111)	Gruppe 2 (n=29)	<i>p</i>	Gruppe 2a (n=21)	<i>p</i>	Gruppe 2b (n=8)	<i>p</i>
RDS, <i>n</i> (%)	84 (75,7%)	27 (93,1%)	<b>&lt;0,05</b>	19 (90,5%)	<b>&lt;0,05</b>	8 (100%)	<b>n.s.</b>
Schwergradiges RDS, <i>n</i> (%)	31 (28,4%)	16 (55,2%)	<b>&lt;0,01</b>	12 (57,1%)	<b>&lt;0,01</b>	4 (50,0%)	<b>n.s.</b>
BPD-Prävalenz, <i>n</i> (%)	24 (21,6%)	14 (48,3%)	<b>&lt;0,01</b>	13 (61,9%)	<b>&lt;0,01</b>	1 (12,5%)	<b>n.s.</b>
Surfactant-Gabe, <i>n</i> (%)	48 (43,2%)	21 (72,4%)	<b>&lt;0,01</b>	16 (76,2%)	<b>&lt;0,01</b>	5 (62,5%)	<b>n.s.</b>
O <sub>2</sub> -Bedarf-Dauer (Median; Tage)	4 (0-184)	17 (0-150)	<b>&lt;0,05</b>	29 (0-150)	<b>&lt;0,05</b>	9 (1-35)	<b>n.s.</b>
Beatmungsdauer (Median, Tage)	2 (0-160)	3 (0-65)	<b>n.s.</b>	3 (0-65)	<b>n.s.</b>	3 (0-8)	<b>n.s.</b>
CLD-Prävalenz, <i>n</i> (%)	11 (9,9%)	4 (13,8%)	<b>n.s.</b>	4 (19,0%)	<b>n.s.</b>	0	<b>n.s.</b>

[nicht signifikant: n.s.]

## DISKUSSION

Die Frühgeburtlichkeit und eine daraus resultierende unzureichende Surfactant-Produktion der unreifen fetalen Lunge werden als eine Grundlage der Pathogenese des RDS beim frühgeborenen Kind angesehen. Abgesehen von dem geringen Gestationsalter wurden in den letzten Jahren verschiedene andere Risikofaktoren entdeckt, welche die multifaktorielle Ätiologie des RDS unterstreichen. Das Geburtsgewicht [RORERTSON et al, 1992], das Geschlecht [PERELMAN et al, 1986], die Nationalität [KAVVADIA et al, 1998; RICHARDSON et al, 1994], der mütterliche Diabetes [MATTI et al, 1996], das Alter der Mutter [DANI et al, 1999], die antenatale Kortikosteroidgabe [CROWLEY et al, 1995] und der Geburtsmodus [DANI et al, 1999] scheinen die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung des RDS beim Neugeborenen zu beeinflussen. Weiterhin geht man von einer zusätzlichen genetischen Prädisposition aus. Mehrere Mutationen und Polymorphismen innerhalb des SP-A und SP-B Gens, welche die normale Surfactant-Funktion beeinträchtigen können und das Risiko sowie die Konsequenzen des RDS beeinflussen können, sowohl als einzelne Faktoren als auch in Kombination miteinander, sind bisher in der Literatur beschrieben (Tabelle 5).

- DE MELLO et al, 1994
- FLOROS et al, 1995
- BALLARD et al, 1995
- DE LA FUENTE et al, 1997
- FLOROS et al, 1998
- KALA et al, 1998
- LIN et al, 1998
- KLEIN et al, 1998
- FLOROS, LIN, 1999
- WILLIAMS et al, 1999
- RÄMET et al, 2000
- WEBER et al, 2000
- HAATAJA et al, 2000
- SOMASCHINI et al, 2000
- FLOROS, FAN, 2001
- FLOROS, FAN, DIANGELO et al, 2001

**Tabelle 5.** *Literatur über den Einfluß von SP-A und SP-B Mutationen/ Polymorphismen auf Surfactant und der Lungenmechanik.*

Außerdem haben Nogee et al von einer Mutation im SP-C Exon-4 berichtet, die zur chronischen postnatalen interstitiellen Lungenerkrankung führt [NOGEE et al, 2001],

während Glasser et al gezeigt haben, daß der SP-C Mangel die Lungenmechanik beeinflussen kann [GLASSER et al, 2001]. Daraus läßt sich schließen, daß verschiedene bekannte, aber auch noch unbekannte, ätiologische Faktoren bei der Ateminsuffizienz während der neonatalen und postnatalen Zeit beteiligt sind.

Anhand experimenteller Daten hauptsächlich vom Model der gen-manipulierten Maus (Knockout-Maus) ist anzunehmen, daß das SP-B das einzige surfactant-assoziierte Protein ist, das sich bei der postnatalen Lungenfunktion und dem weiteren Überleben des Neugeborenen als unentbehrlich erweist. Aus diesem Grund war es besonders interessant zu überprüfen, ob genetische Variationen im SP-B Gen nicht nur mit der RDS-Inzidenz [FLOROS et al, 1995], sondern auch mit dem Schweregrad und die Komplikationen des RDS korrelieren. Das untersuchte Patientenkollektiv bestand ausschließlich aus Neugeborenen deutscher kaukasischer Herkunft, um einen hohen Grad einer genetischen Homogenität der untersuchten Gruppe zu erreichen, da man vorher Unterschiede sowohl im Risiko für die Entwicklung des RDS [FLOROS, FAN,DIANGELO et al, 2001; KAVVADIA et al, 1998; RICHARDSON et al, 1994] als auch in der Verteilung der varianten SP-B Intron-4 Allelen [VELETZA et al, 1996] innerhalb verschiedener ethnischen Gruppen festgestellt hatte.

Die Ergebnisse der Sequenzierung der varianten Intron-4 Allele unterschieden sich von den in 1995 von Floros et al publizierten Daten im Hinblick auf drei Aspekte:

- (a) das zehnte Motiv sowohl bei den varianten als auch bei den invarianten Allelen beinhaltete das einzelne Nukleotid **G**, im Kontrast zum zehnten Motiv identifiziert von Floros et al als **GAG**,
- (b) die kürzeren Varianten entstanden nicht nur nach Deletion von Motiven, sondern auch aus der Kombination einer Deletion mit einer Insertion, wie z.B. im Fall des 435 bp-Allels, das aus der Deletion der Motiven 5-9 und der Duplikation der Motiven 2-3 entsteht,
- (c) Die längeren Varianten waren das Produkt der Replikation einer Anzahl von Motiven und nicht das Ergebnis der Insertion von degenerierten Versionen von Motiven, wie vorher beschrieben.

Im Gegenteil waren die Sequenzierdaten der vorliegenden Studie vergleichbar mit denen publiziert in 2000 von Haataja et al.

Aus der statistischen Analyse der erworbenen Daten ließ sich zeigen, daß die SP-B Intron-4 Variation, bzw. die kürzeren Varianten, häufiger und mit einer schwergradigeren Form des

RDS assoziieren. Außerdem beanspruchte die Gruppe der untersuchten Frühgeborenen, die einen Polymorphismus –bzw. ein kürzeres Allel– trug, häufiger eine Surfactant-Therapie und entwickelte häufiger eine BPD, die aus einem längeren Sauerstoff-Bedarf resultierte. Jedoch unterschieden sich beide Gruppen der Frühgeborenen im Hinblick auf die CLD-Prävalenz statistisch nicht signifikant. Obwohl der Intron-4 Polymorphismus mit einer häufigeren Entwicklung einer chronischen Lungenkrankheit zu korrelieren schien, wenn man den Sauerstoff-Bedarf der Frühgeborenen am 28. Lebenstag betrachtete, schien sich dieser Unterschied im Krankheitsgeschehen bis der 36. Woche nach Konzeption statistisch nicht zu halten. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, daß der Polymorphismus innerhalb des SP-B kodierenden Gens hauptsächlich mit dem initialen klinischen Verlauf des RDS assoziiert ist, während der weitere Verlauf, nach der Erholung von den initialen lebensbedrohlichen Funktionsstörungen, im Wesentlichen nicht mehr von der Anwesenheit genetischer Variationen beeinflusst wird.

Jedoch bleibt die Ursache für die Assoziation des SP-B Intron-4 Polymorphismus mit den verschiedenen Verlaufsformen des neonatalen RDS bis jetzt unbekannt. Unterschiedliche potentielle Mechanismen sind anzunehmen und müssen weiter geklärt werden. Eine Hypothese geht dahin, daß es sich hier nur um eventuelle quantitative Unterschiede in der SP-B Expression handeln könnte und nicht um qualitative Unterschiede, wie bei der 121ins2 Mutation im SP-B Exon-4, da es um eine Genvariation innerhalb der nicht kodierenden Region des SP-B Gens geht.

Zu diskutieren ist die Möglichkeit, daß diese Region des SP-B Gens eine regulatorische Funktion hat und somit die Anwesenheit des beschriebenen Polymorphismus zur verminderten Transkriptions- und Translationsrate führt in einem Moment, in dem die oberflächenaktive Funktion des SP-B am meisten gebraucht wird, nämlich bei der postnatalen Adaptation der fetalen unreifen Lunge. Dafür sprechen bisherige Beobachtungen, daß verschiedene Länge-Variationen von Dinukleotid-Wiederholungen innerhalb von Introns unterschiedlichen Einfluß auf die Transkriptionsaktivität des betreffenden Genlokus aufweisen [AKAI et al, 1999; GEBHARDT et al, 1999; PRAVICA et al, 1999].

Es wäre aber auch denkbar, daß diese Genvariation zu einem alternativen 'Splicing'-Prozess führt, der wiederum entweder eine verminderte Proteinsynthese und einen herabgesetzten SP-

B Vorrat in den Typ-II-Alveozyten verursacht, oder aber eine veränderte sekundäre bzw. tertiäre Struktur des SP-B Moleküls verursacht und somit seine Funktion beeinträchtigt. Dafür spricht die Feststellung von Karinch et al, daß bestimmte SP-A Polymorphismen mit niedrigeren SP-A mRNA Mengen korrelieren und daß verschiedene SP-A2 Allelen zu verschiedenen SP-A2 'Splice-Varianten' führen [KARINCH et al, 1997]. Darüber hinaus haben Lin et al eine neue SP-B mRNA 'Splice-Variante' entdeckt, die sich in geringen Mengen in Lungengewebe gesunder Menschen befindet, jedoch vermehrt bei Patienten mit Lungenerkrankungen, wie RDS und BPD, auftritt [LIN et al, 1999].

Die veränderte Auswirkung des Intron-4 Polymorphismus auf die Induktion der SP-B Synthese durch pränatale Kortikosteroide ist sicherlich auch nicht auszuschließen. Zusätzlich sollte man, gemäß Floros et al, die Möglichkeit betrachten, daß eine Genkopplung zwischen dem Intron-4 Locus und dem eigentlichen Gen-Locus, der mit der erhöhten RDS-Inzidenz assoziiert ist, besteht. Dagegen spricht die Tatsache, daß die erhöhte RDS-Inzidenz nicht nur mit einem spezifischen varianten Allel korreliert. Die Untersuchung eines wesentlich größeren Patientenkollektivs könnte möglicherweise Unterschiede zwischen den verschiedenen Intron-4 varianten Untergruppen bezüglich der RDS-Häufigkeit aufzeigen.

Schließlich diene der Vergleich zwischen den Frühgeborenen und den reifen Neugeborenen bezüglich der Prävalenz der SP-B Intron-4 Variation, die ähnlich bei beiden Gruppen ist, zum Ausschluß der potentiellen Rolle der Frühgeburtlichkeit als verwirrender Faktor in den vorliegenden Untersuchungen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es eine Assoziation zwischen dem SP-B Intron-4 Polymorphismus und der Inzidenz, dem Schweregrad, sowie den Komplikationen des neonatalen RDS herausstellen ließ. Weitere Studien sind notwendig, um den zugrundeliegenden Mechanismus festzustellen und eine eventuelle Interaktion zwischen dem Intron-4 Locus und anderen Genregionen, die zur Entwicklung eines RDS bei frühgeborenen Kindern beitragen, zu untersuchen.

## ZUSAMMENFASSUNG

Beim Atemnotsyndrom (RDS) handelt es sich um die respiratorische Insuffizienz des Frühgeborenen. Sie ist bedingt durch die unzureichende Produktion von Surfactant der fetalen unreifen Typ-II-Zelle, und ist zusätzlich beeinflusst von genetischen Faktoren. Surfactant stellt ein Gemisch aus Lipiden und Proteinen dar. Der Proteinanteil beträgt rund 10% und besteht zu 50% aus den sogenannten 'surfactant-assoziierten Proteinen', namentlich SP-A, SP-B, SP-C und SP-D. SP-B insbesondere sorgt für die Stabilisierung des Phospholipid-Films an der Luft-Wasser-Interphase und ist deshalb essentiell für die Bildung des Surfactant-Monolayers. Die Schlüsselrolle des SP-B ist im Fall des absoluten SP-B Mangels, sowohl experimentell durch das Modell der Knockout-Maus, als auch klinisch durch die kongenitale alveoläre Proteinose, bestätigt.

Das Ziel der vorliegenden Studie war zum Einen die Existenz von Längenvariationen im SP-B Intron-4 im deutschen kaukasischen Patientenkollektiv zu überprüfen, deren Verteilung zu bestimmen, und ihren Aufbau zu untersuchen. Weiterhin wurde die Intron-4 Polymorphismus-Prävalenz zwischen Frühgeborenen und reifen Neugeborenen ohne respiratorische Adaptationsstörungen verglichen, sowie die Assoziation zwischen der SP-B Intron-4 Variation und der Inzidenz, dem Schweregrad bzw. den Komplikationen des RDS bei Frühgeborenen untersucht.

Das in dieser Studie untersuchte Patientenkollektiv erfaßte 58 gesunde reife Neugeborene ohne respiratorische Adaptationsstörungen und 140 Frühgeborene mit einem Gestationsalter von 25-32 SSW. 159 Neugeborene der Gesamtgruppe der untersuchten Neugeborenen ( $n=198$ ) waren homozygot für den Wildtyp des SP-B Intron-4 Gens. Bei 39 Neugeborenen, und somit bei 19,7% des erfaßten Patientenkollektivs, wurde eine Intron-4 Variation in Form einer Heterozygotie nachgewiesen. Es bestand jedoch kein Unterschied in der Prävalenz der Intron-4 Variation zwischen der Gruppe der Frühgeborenen und der Gruppe der reifen Neugeborenen ohne respiratorische Adaptationsstörungen.

Bei einer Unterteilung der Patienten in Frühgeborene mit SP-B Intron-4 Polymorphismus und Frühgeborene ohne Polymorphismus erhielt man folgende Ergebnisse:

(a) Die Frühgeborenen mit Polymorphismus, bzw. mit kürzeren Allelen, entwickelten häufiger RDS, (b) entwickelten eine schwergradigere Form des RDS, (c) zeigten einen längeren O<sub>2</sub>-Bedarf, (d) entwickelten häufiger bronchopulmonale Dysplasie und (e) beanspruchten häufiger eine Surfactanttherapie. Jedoch unterschieden sich die heterozygoten von den homozygoten Frühgeborenen nicht im Hinblick auf (f) die Beatmungsdauer und (g) die Chronic lung disease-Prävalenz.

Bislang ist der Mechanismus des Einflusses der Intron-4 Variation auf die SP-B Expression nicht geklärt. Unter anderem ist anzunehmen, daß die Änderungen an der Intron-4 Länge, das Umschreiben des SP-B-Gens in m-RNA teils beeinträchtigen und somit zu einer verminderten Proteinsynthese resultieren. Andererseits ist die Frage zu diskutieren, ob dieser Polymorphismus nur indirekt mit einer verminderten SP-B-Expression korreliert, indem er mit einem anderen dafür zuständigen Gen mitvererbt wird (Gen-Kopplung).



## LITERATUR

1. Akai J, Kimura A, Hata RI 1999 Transcriptional regulation of the human type I collagen alpha2 (COL1A2) gene by the combination of two dinucleotide repeats. *Gene* 239: 65-73
2. Amirkhanian JD, Bruni R, Waring AJ, Navar C, Taeusch HW 1993 Full length synthetic surfactant proteins SP-B and SP-C reduce surfactant inactivation by serum. *Bioch et Bioph Acta* 1168: 315-320
3. Avery ME, Mead J 1959 Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *Am J Dis Child* 97:517-523
4. Ballard PL, Erstey R, Gonzales LW, Gonzales J 1996 Transcriptional regulation of human pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C by glucocorticoids. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14: 599-607
5. Ballard PL, Noguee LM, Beers MF, Ballard RA, Planer BC, Polk L, deMello DE, Moxley MA, Longmore WJ 1995 Partial deficiency of surfactant protein B in an infant with chronic lung disease. *Pediatrics* 96: 1046- 1052
6. Bancalari E, Abdenour GE, Feller R, Gannon J 1979 Bronchopulmonary dysplasia: clinical presentation. *J Pediatr* 95:819-823
7. Bancalari E, del Moral T 2001 Bronchopulmonary Dysplasia and surfactant. *Biol Neonate* 80: 7-13
8. Beers MF, Hamvas A, Moxley MA, Gonzales LW, Guttentag SH, Solarin KO, Longmore WJ, Noguee LM, Ballard PL 2000 Pulmonary surfactant metabolism in infants lacking surfactant protein B. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22: 380-391
9. Beers MF, Shuman H, Liley HG, Floros J, Gonzales LW, Yue N, Ballard PL 1995 Surfactant protein B in human fetal lung: developmental and glucocorticoid regulation. *Pediatr Res* 38: 668-675
10. Bohnhorst B, Stuhmann M, Noguee LM, Brasch F, Müller KM, Poets CF 1996 Kongenitale Alveolarproteinose. *Monatsschr Kinderheilkd* 144:1214-1217
11. Botas C, Poulain F, Akiyama J, Brown C, Allen L, Goerke J, Clements J, Carlson E, Gillespie AM, Epstein C, Hawgood S 1998 Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 11869-11874

12. Chang R, Nir S, Poulain FR 1998 Analysis of binding and membrane destabilization of phospholipid membranes by surfactant apoprotein B. *Biochim Biophys Acta* 1371: 254-256
13. Clark JC, Weaver TE, Iwamoto HS, Igekami M, Jobe AH, Hull WM, Whitsett JA 1997 Decreased lung compliance and air trapping in heterozygous SP-B-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16: 46-52
14. Cole FS, Hamvas A, Noguee LM 2001 Genetic disorders of neonatal respiratory function. *Ped Res* 50: 157-162
15. Cole FS, Hamvas A, Rubinstein P, King E, Trusgnich M, Noguee LM, deMello DE, Colten HR 2000 Population-based estimates of surfactant protein B deficiency. *Pediatrics* 105:538-541
16. Couchard M, Polge J, Bomsel F 1974 Hyaline membrane disease: diagnosis, radiological surveillance, treatment and complications. *Ann Radiol* 17: 669-683
17. Creuwels LA, van Golde LM, Haagsman HP 1996 Surfactant protein B: effects on lipid domain formation and intermembrane lipid flow. *Biochim Biophys Acta* 1285: 1-8
18. Creuwels LAJM, van Golde LMG, Haagsman HP 1997 The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects. *Lung* 175: 1-39
19. Crowley PA 1995 Antenatal corticosteroid therapy: a meta-analysis of the randomized trials, 1972 to 1994. *Am J Obstet Gynecol* 173: 1078-1079
20. Dani C, Reali MF, Bertini G, Wiechmann L, Spagnolo A, Tangucci M, Rubaltelli FF 1999 Risk factors for the development of respiratory distress syndrome and transient tachypnoea in newborn infants. Italian group of neonatal pneumology. *Eur Respir J* 14: 155-159
21. de la Fuente AA, Voorhout WF, deMello DE 1997 Congenital alveolar proteinosis in the Netherlands: a report of five cases with immunohistochemical and genetic studies on surfactant apoproteins. *Pediatr Pathol Lab Med* 17: 221-231
22. deMello DE, Heyman S, Phelps DS, Hamvas A, Noguee L, Cole S, Colten HR 1994 Ultrastructure of lung in surfactant protein B deficiency. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11: 230-239
23. deMello DE, Noguee LM, Heyman S, Krous HF, Hussain M, Merritt TA, Hsueh W, Haas JE, Heidelberger K, Schumacher R 1994 Molecular and phenotypic variability in the congenital alveolar proteinosis syndrome associated with inherited surfactant protein B deficiency. *J Pediatr* 125: 43-50

24. Dobbs LG, Pian MS, Maglio M, Dumars S, Allen L 1997 Maintenance of the differentiated type II cell phenotype by culture with an apical air surface. *Am J Physiol* 273: 347-354
25. Dulkerian SJ, Gonzales LW, Ning Y, Ballard PL 1996 Regulation of surfactant protein D in human fetal lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15: 781-786
26. Eliakim R, DeSChryver-Kecskemeti K, Noguee L, Stenson WF, Alpers DH 1989 Isolation and characterization of a small intestinal surfactant-like particle containing alkaline phosphatase and other digestive enzymes. *J Biol Chem* 264: 20614-20619
27. Floros J, Fan R 2001 Surfactant protein A and B genetic variants and respiratory distress syndrome: allele interactions. *Bil Neonate* 80: 22-25
28. Floros J, Fan R, Diangelo S, Guo X, Wert J, Luo J 2001 Surfactant protein (SP) B associations and interactions with SP-A in white and black subjects with respiratory distress syndrome. *Pediatr Int* 43: 567-576
29. Floros J, Kala P 1998 Surfactant proteins: molecular genetics of neonatal pulmonary diseases. *Annu Rev Physiol* 60: 365-384
30. Floros J, Lin Z 1999 Genetic variability of surfactant protein-B and respiratory distress syndrome: clinical implications. *Medscape Respiratory Care* 3(2)
31. Floros J, Veletza SV, Kotikalapudi P, Krizkova L, Karinch AM, Friedman C, Buchter S, Marks K 1995 Dinucleotide repeats in the human surfactant protein-B gene and respiratory distress syndrome. *Biochem J* 305: 583-590
32. Friedrich W, Schmalisch G, Stevens PA, Wauer RR 2000 Surfactant protein SP-B counteracts inhibition of pulmonary surfactant by serum proteins. *Eur J Med Res* 5: 277-282
33. Gebhardt F, Zanker KS, Brandt B 1999 Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *J Biol Chem* 274: 13176-13180
34. Glasser SW, Burhans MS, Korfhagen TR, Na CL, Sly PD, Ross GF, Ikegami M, Whitsett JA 2001 Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6366-6371
35. Guttentag SH, Beers MF, Bieler BM, Ballard PL 1998 Surfactant protein B processing in human fetal lung. *Am J Physiol* 275: 559-566
36. Haataja R, Rämetsä M, Marttila R, Hallman M 2000 Surfactant proteins A and B as interactive genetic determinants of neonatal respiratory distress syndrome. *Human Molec Genet* 9: 2751-2760

37. Hamvas A, Nogee LM, Mallory GB Jr, Spray TL, Huddleston CB, August A, Dehner LP, deMello DE, Moxley M, Nelson R, Cole FS, Colten HR 1997 Lung transplantation for treatment of infants with surfactant protein B deficiency. *J of Pediatrics* 130: 231-239
38. Hawgood S, Derrick M, Poulain F 1998 Structure and properties of surfactant protein B. *Biochim Biophys Acta* 1408: 150-160
39. Herman TE, Nogee LM, McAlister WH, Dehner LP 1993 Surfactant protein B deficiency: radiographic manifestations. *Pediatr Radiol* 23: 373-375
40. Hundertmark S, Ragosch V, Zimmermann B, Halis G, Arabin B, Weitzel HK 1999 Effect of dexamethasone, triiodothyronine and dimethyl-isopropyl-thyronine on lung maturation of the fetal rat lung. *J Perinat Med* 27: 309-315
41. Ikegami M, Jobe AH 1998 Surfactant protein metabolism in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1408: 218-225
42. Johansson J, Curstedt T 1997 Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components. *Eur J Biochem* 244: 675-693
43. Johansson J, Curstedt T, Robertson B 1994 The proteins of the surfactant system. *Eur Respir J* 7: 372-391
44. Kala P, Ten Have T, Nielsen H, Dunn M, Floros J 1998 Association of pulmonary surfactant protein A (SP-A) gene and respiratory distress syndrome: interaction with SP-B. *Pediatr Res* 43: 169-177
45. Karinch AM, deMello 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. *Biochem J* 321: 39-47
46. Kaser MR, Skouteris GG 1997 Inhibition of bacterial growth by synthetic SP-B1-78 peptides. *Peptides* 1997 18: 1441-1444
47. Kavvadia V, Greenough A, Dimitriou G, Hooper R 1998 Influence of ethnic origin on respiratory distress syndrome in very premature infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 78: 25-28
48. King RJ, Klass DJ, Gikas EG, Clements JA 1973 Isolation of apoproteins from canine surface active material. *Am J Physiol* 224: 788-795
49. Klaus MH, Clements JA, Havel RJ 1961 Composition of surface-active material isolated from beef lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 47: 1858-1859
50. Klein JM, Thompson MW, Snyder JM, George TN, Whittset JA, Bell EF, McCray PB Jr, Nogee LM 1998 Transient surfactant protein B deficiency in a term infant with severe respiratory failure. *J Pediatr* 132: 244-248

51. Kopelman AE, Mathew GP 1995 Common respiratory disorders of the newborn. *Ped in Rev* 16:209-217
52. Korfhagen TR, Bruno MD, Ross GF, Huelsman KM, Ikegami M, Jobe AH, Wert SE, Stripp BR, Morris RE, Glasser SW, Bachurski CJ, Iwamoto HS, Whitsett JA 1996 Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9594-9599
53. Korimilli A, Gonzales LW, Guttentag SH 2000 Intracellular localization of processing events in human surfactant protein B biosynthesis. *J Biol Chem* 275: 8672-8679
54. Lin Z, deMello DE, Wallot M, Floros J 1998 An SP-B gene mutation responsible for SP-B deficiency in fatal congenital alveolar proteinosis: evidence for a mutation hotspot in exon 4. *Mol Genet Metab* 64: 25-35
55. Lin Z, Wang G, deMello DE, Floros J 1999 An alternatively spliced surfactant protein B mRNA in normal human lung: disease implication. *Biochem J* 343: 145-149
56. Matti P, Pistoia L, Fornale M, Brunn E, Zardini E 1996 Prevalence of RDS in diabetic pregnancy. *Minerva Ginecol* 48: 409-413
57. Myriantopoulos NC, Churchill JA, Baszynski AJ 1971 Respiratory distress syndrome in twins. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)* 20: 199-204
58. Nag K, Munro JG, Hearn SA, Rasmusson J, Petersen NO, Possmayer F 1999 Correlated atomic force and transmission electron microscopy of nanotubular structures in pulmonary surfactant. *J Struct Biol* 126: 1-15
59. Nag K, Tavena SG, Perez-Gil J, Cruz A, Keough KM 1997 Combinations of fluorescently labeled pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C in phospholipid films. *Biophys J* 72: 2638-2650
60. Nagourney BA, Kramer MS, Klebanoff MA, Usher RH 1996 Recurrent respiratory distress syndrome in successive preterm pregnancies. *J Pediatr* 129: 591- 596
61. Noguee LM 1998 Genetics of the hydrophobic surfactant proteins. *Bioch et Bioph Acta* 1408: 323-333
62. Noguee LM, deMello DE, Dehner LP, Colten HR 1993 Brief report: Deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *The New Engl J of Med* 328: 406-410
63. Noguee LM, Dunbar AE, Wert SE, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA 2001 A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N Engl J Med* 344: 573-579

64. Noguee LM, Garnier G, Dietz HC, Singer L, Murphy AM, deMello DE, Colten HR 1994 A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *J Clin Invest* 93: 1860-1863
65. Noguee LM, Wert SE, Proffit SA, Hull WM, Whitsett JA 2000 Allelic heterogeneity in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 973-981
66. Northway WH, Rosan RC, Porter DY 1967 Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary Dysplasia. *The New Engl J Med* 276: 357-368
67. Paananen R, Glumoff V, Sormunen R, Voorhout W, Hallman M 2001 Expression and localization of lung surfactant protein B in eustachian tube epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:214-220
68. Palaniyar N, Ridsdale RA, Hearn SA, Possmayer F, Harauz G 1999 Formation of membrane lattice structures and their specific interactions with surface protein A. *Am J Physiol* 276: 642-649
69. Pastrana-Rios B, Flach CR, Brauner JW, Mautone AJ, Mendelsohn R 1994 A direct test of the „squeeze-out“ hypothesis of lung surfactant function. External reflection FT-IR at the air/water interface. *Biochemistry* 33: 5121-5127
70. Perelman RH, Palta M, Kirby R, Farrell PM 1986 Discordance between male and female deaths due to the respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 78: 238-244
71. Pison U, Max M, Neuendank A, Weissbach S, Pietschmann S 1994 Host defence capacities of pulmonary surfactant: evidence for 'non-surfactant' functions of the surfactant system. *Eur J Clin Invest* 24: 586-599
72. Polin RA, Fox WW 1997 Fetal and neonatal physiology. 1275-1283
73. Possmayer F 1988 A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *Am Rev Respir Dis* 138: 990-998
74. Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV 1999 In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *Eur J Immunogenet* 26: 1-3
75. Pryhuber GS 1998 Regulation and function of pulmonary surfactant protein B. *Mol Genet Metab* 64: 217-228
76. Rämetsä M, Haataja R, Marttila R, Floros J, Hallman M 2000 Association between the surfactant protein A (SP-A) gene locus and respiratory distress syndrome in the Finnish population. *Am J Hum Genet* 66: 1569-1579

77. Richardson DK, Torday JS 1994 Racial differences in predictive value of the lecithin/sphingomyelin ratio. *Am J Obstet Gynecol* 170: 1273-1278
78. Robertson B, Kobayashi T, Ganzuka M, Grossmann G, Li WZ, Suzuki Y 1991 Experimental neonatal respiratory failure induced by a monoclonal antibody to the hydrophobic surfactant-associated protein SP-B. *Pediatr Res* 30: 239-243
79. Robertson PA, Sniderman SH, Laros RK Jr, Cowan R Heilbron D, Goldenberg RL, Iams JD, Creasy RK 1992 Neonatal morbidity according to gestational age and birth weight from five tertiary care centers in the United States, 1983 through 1986. *Am J Obstet Gynecol* 166: 1629-1641
80. Rooney SA, Young SL, Mendelson CR 1994 Molecular and cellular processing of lung surfactant. *FASEB J* 8: 957-967
81. Ruf B, Klauwer D, Reiss I, Schiefer HG, Gortner L 2002 Colonisation of the airways with *Ureaplasma urealyticum* as a risk factor for bronchopulmonary dysplasia in VLBW infants? *Z Geburtshilfe Neonatol* 206: 187-192
82. Schurch S, Possmayer F, Cheng S, Cockshutt AM 1992 Pulmonary SP-A enhances adsorption and appears to induce surface sorting of lipid extract surfactant. *Am J Physiol* 263: 210-218
83. Shennan AT, Dunn MS, Ohlson A, Lennox K, Hoskins EM 1988 Abnormal pulmonary outcomes in premature infants: prediction from oxygen requirement in the neonatal period. *Pediatrics* 82:527-532
84. Somaschini M, Wert S, Mangili G, Colombo A, Noguee L 2000 Hereditary surfactant protein B deficiency resulting from a novel mutation. *Intensive Care Med* 26: 97-100
85. Stahlman MT, Gray MP, Falconieri MW, Whitsett JA, Weaver TE 2000 Lamellar body formation in normal and surfactant protein B-deficient fetal mice. *Lab Invest* 80: 395-403
86. Tavena SG, Keough KM 2000 Adsorption of pulmonary surfactant protein SP-A to monolayers of phospholipids containing hydrophobic surfactant protein SP-B or SP-C: potential differential role for tertiary interaction of lipids, hydrophobic proteins and SP-A. *Biochemistry* 39: 6083-6093
87. Thompson MW 2001 Surfactant protein B deficiency: insights into surfactant function through clinical surfactant protein deficiency. *Am J Med Sci* 321: 26-32
88. Vamvakopoulos NC, Modi WS, Floros J 1995 Mapping the human pulmonary surfactant-associated protein B gene (SFTP 3) to chromosome 2p12ap11.2. *Cytogenet Cell Genet* 68:8-10

89. van Iwaarden JF, Welmers B, Verhoef J, Haagsman HP, van Golde LMG 1990 Pulmonary surfactant protein A enhances the host defence mechanism of rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2: 91-98
90. Veldhuizen EJ, Batenburg JJ, van Golde LM, Haagsman HP 2000 The role of surfactant proteins in DPPC enrichment of surface films. *Biophys J* 79: 164-171
91. Veldhuizen EJA, Haagsman HP 2000 Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1467: 255-270
92. Veletzka SV, Rogan PK, TenHave T, Olowe SA, Floros J 1996 Racial differences in allelic distribution at the human pulmonary surfactant protein B gene locus (SP-B). *Exp Lung Res* 22: 489-494
93. von Nahmen A, Post A, Galla HJ, Sieber M 1997 The phase behavior of lipid monolayers containing pulmonary surfactant protein C studied by fluorescence light microscopy. *Eur Biophys J* 26: 359-369
94. von Nahmen A, Schenk M, Sieber M, Amrein M 1997 The structure of a model pulmonary surfactant as revealed by scanning force microscopy. *Biophys J* 72: 463-469
95. von Neegaard K 1929 Neue Auffassungen über einen Grund-begriff der Atemmechanik. *Z Gesamte Exp Med* 66: 373-394
96. Voorhout WF, Veenendaal T, Haagsman HP, Weaver TE, Whitsett JA, van Golde LM, Geuze HJ 1992 Intracellular processing of pulmonary surfactant protein B in an endosomal/lysosomal compartment. *Am J Physiol* 263: 479-486
97. Voorhout WF, Weaver TE, Haagsman HP, Geuze HJ, van Golde LM 1993 Biosynthetic routing of pulmonary surfactant proteins in alveolar type II cells. *Am J Physiol* 26:366-373
98. Wallot M, Wagenvoort C, deMello D, Muller KM, Floros J, Roll C 1999 Congenital alveolar proteinosis caused by a novel mutation of the surfactant protein B gene and misalignment of lung vessels in consanguineous kindred infants. *Eur J Pediatr* 158: 513-518
99. Weaver T, Conkright J 2001 Function of surfactant proteins b and c. *Annu Rev Physiol* 63: 555-578
100. Weaver TE 1998 Synthesis, processing and secretion of surfactant proteins B and C. *Biochim Biophys Acta* 1408: 173-179
101. Weaver TE, Beck DC 1999 Use of knockout mice to study surfactant protein structure and function. *Biol Neonate* 76: 15-18



102. Weber B, Borkhardt A, Stoll-Becker S, Reiss I, Gortner L 2000 Polymorphisms of surfactant protein A genes and the risk of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Turk J Pediatr* 42: 181-185
103. Whitsett JA, Noguee LM, Weaver TE, Horowitz AD 1995 Human surfactant protein B: structure, function, regulation and disease. *Physiol Rev* 75: 749-757
104. Williams GD, Christodoulou J, Stack J, Symons P, Wert SE, Murrell MJ, Noguee LM 1999 Surfactant protein B deficiency: clinical, histological and molecular evaluation. *J Pediatr Child Health* 35:214-220
105. Yusef RD, Cohen AH, Hamvas A 1999 Normal lung function in subjects heterozygous for surfactant protein-B deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 159:411-414

# LEBENS LAUF

## **Persönliche Angaben**

Name Vassiliki Makri  
Geburtstag 24.02.1975  
Geburtsort Athen Griechenland

## **Schul Ausbildung**

1992 griechisches und deutsches Abitur an der Deutschen Schule Athen

## **Studienverlauf**

1993-1999 Studium der Humanmedizin an der Universität Athen

## **Famulaturen**

1997 Famulatur auf der Intensivstation der Allgemeinen Chirurgie  
(Universität Freiburg)  
1998 Famulatur in der Unfallchirurgie (Humboldt Universität zu Berlin)  
1999 Famulatur in der Kinderheilkunde (Universität Essen)

## **Arzt im Praktikum / Promotion**

1999-2001 Ärztin im Praktikum und Promotionsarbeit im Zentrum für  
Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Justus-Liebig-Universität  
Giessen

## **Arzt in Weiterbildung**

seit 09.2001 Ärztin in Weiterbildung im Krankenhaus G.N.Chios in Griechenland

## **Veröffentlichungen**

11.2002 „Polymorphisms of surfactant protein B encoding gene: modifiers of  
the course of neonatal respiratory distress syndrome?“  
Makri V, Hospes B, Stoll-Becker S, Borkhardt A, Gortner L.  
Eur J Pediatr 2002 Nov;161(11):604-8

## **DANKSAGUNG**

Sehr zu Dank verpflichtet bin ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med Ludwig Gortner für die Bereitstellung von Thema und Arbeitsplatz, für sein förderndes Interesse und seine Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. vet. Birgit Hospes, die mich bei dieser Arbeit betreute, für das geduldige Einarbeiten in die Labortechniken und ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft, die zum Gelingen dieser Arbeit außerordentlich beigetragen hat.

Herzlichen Dank an allen Mitarbeitern des Gen- und IGF-Labors für die freundliche Aufnahme und die gute Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Geller vom Institut für medizinische Informatik in Marburg für die Berechnung des Hardy-Weinberg Gleichgewichts bei der statistischen Auswertung der Daten danken.

Nicht zuletzt danke ich dem Deutschen Akademischen Austauschdienst, der durch seine finanzielle Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat.