



**Medizinische Fakultät  
Universitätsklinikum Düsseldorf  
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin  
Klinik für Kinder Onkologie, Hämatologie und Immunologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Göbel**

**Die Rolle des Granulozyten- Makrophagen  
Wachstumsfaktors für die Pathogenese der  
Alveolarproteinose**

Habilitationsschrift

Verfasst und vorgelegt  
der hohen Medizinischen Fakultät der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf  
zur Erlangung der Venia legendi für das Fach Kinderheilkunde

von  
Dr. med. Uta Dirksen  
Düsseldorf 2003

**Sich irren  
und doch seinem Inneren weiter Glauben schenken müssen,  
das ist der Mensch,  
und jenseits von Sieg und Niederlage  
beginnt sein Ruhm.**

**(Gottfried Benn)**

<b>1. KLINIK UND PATHOGENESE DER PULMONALEN ALVEOLARPROTEINOSE (PAP)</b>	<b>4</b>
1.1 Klinische Manifestation in Abhängigkeit vom Alter	4
1.2. Diagnostik der Alveolarproteinose	5
<b>2. MULTIFAKTORIELLE PATHOGENESE DER PAP</b>	<b>10</b>
<b>3. DER HÄMATOPOETISCHE WACHSTUMSFAKTOR GM-CSF UND PAP</b>	<b>13</b>
3.1 Zur Physiologie von GM-CSF	13
3.2. GM-CSF Rezeptordefekt und PAP bei $\beta$ c-gendeletierten Mäusen	13
3.3. $\beta$ c-Expression und Funktion sowie SP Analyse bei Kindern mit PAP	14
3.4 Rolle des GM-CSF– Signaltransduktionsweges bei der PAP	20
3.5 Sekundäre PAP und $\beta$ c-Defizienz bei Kindern mit AML	22
<b>4. THERAPEUTISCHE OPTIONEN FÜR PATIENTEN MIT <math>\beta</math>C-DEFIZIENTER PAP</b>	<b>23</b>
4.1. Heilung der PAP durch Knochenmarktransplantation im Mausmodell	23
4.2 Somatische Gentherapie	27
<b>6. AUSBLICK</b>	<b>29</b>
6.1. Diagnostik	29
6.2. Therapie	32
<b>7. LITERATUR</b>	<b>35</b>

## Abkürzungen

AML	akute myeloische Leukämie
BAL	Broncheoalveoläre Lavage
$\beta$ c	gemeinsame beta Kette der IL3, IL5, GM-CSF Rezeptoren
BG	Benzyguanin
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DHFR	Dehydrofolatreduktase
DSP	zweifachgesättigte Phospholipide
EPO	Erythropoetin
FAB	Französisch Britisch Amerikanische
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen Wachstumsfaktor
G-CSF	Granulozyten Wachstumsfaktor
HRCT	hochauflösende Computer Tomographie
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IL	Interleukin
KM	Knochenmark
MGMT	Methylguanin DNA-Methyltransferase
Mo	Alveolarmakrophage
MTX	Methotrexat
PAP	Pulmonale Alveolar Proteinose
PAS	Period Schiff Säure
SCF	Stammzellwachstumsfaktor
SP-A	Surfaktantprotein A
SP-B	Surfaktantprotein B
SP-C	Surfaktantprotein C
SP-D	Surfaktantprotein D
SZT	Stammzelltransplantation
SCID	schwerer kombinierter Immundefekt

## **1. Klinik und Pathogenese der pulmonalen Alveolarproteinose (PAP)**

Die pulmonale Alveolarproteinose (PAP) ist eine sehr seltene Reaktionsform der Lunge auf unterschiedliche Noxen, die sich klinisch in einheitlicher Weise manifestiert. Kennzeichen dieses Syndroms sind die mit proteinösem Material gefüllten Alveolen mit konsekutiv gestörtem pulmonalen Gasaustausch, welcher zu starker respiratorischer Insuffizienz führt. Die Erstbeschreibung der erworbenen PAP geht auf das Jahr 1958 zurück. Rosen et al. beschrieben die charakteristische Histologie der PAP an dem mit 127 Fällen bis dato größten Patientenkollektiv (Rosen, 1958). Trotz ihrer Seltenheit ist die PAP von hohem wissenschaftlichen Interesse, da die Untersuchungen zur Pathogenese dieser Erkrankung in den letzten Jahren einen enormen Wissenszuwachs zur Physiologie und Pathophysiologie des pulmonalen Systems erbracht haben (Griese, 2002). In der Regel ist der Krankheitsverlauf umso schwerer und die Prognose umso ungünstiger, je früher sich die Krankheit manifestiert.

### **1.1 Klinische Manifestation in Abhängigkeit vom Alter**

Neugeborene mit PAP sind in der Regel reifgeborene Kinder, die nach wenigen Lebensstunden durch eine progrediente respiratorische Insuffizienz auffallen (Schuhmacher, 1980). Die Symptome sind durch Therapiemaßnahmen wie Beatmung, Hochfrequenzbeatmung, Applikation von Stickstoffmonoxid (NO), Glukokortikoiden und Surfactant nicht zu beheben (Cornish, 1993; Spock, 1993; Hamvas, 1994). Die extrakorporale Membranoxygenierung ist zwar lebensverlängernd, bessert aber den pulmonalen Zustand nicht (Moulton, 1992). Therapie der Wahl ist eine Ganzlungentransplantation, wobei es in der Regel schwierig ist, zeitgerecht einen geeigneten Spender zu finden. Die Prognose der Neugeborenen mit PAP ist sehr schlecht und 80% der Kinder sterben trotz aller Bemühungen innerhalb des ersten Lebensjahres.

Der klinische Verlauf der PAP des Säuglings-, Kindes- oder Jugendalters ist schleichender als der der Neonatalzeit. Die Patienten zeigen lange Zeit

unspezifische Symptome wie Abgeschlagenheit und Gedeihstörung sowie pulmonale Symptome mit rezidivierendem Husten, Bronchitiden oder Pneumonien. Letztlich entwickelt sich ein schweres Atemnotsyndrom, welches zur Diagnosestellung führt. Im Kindesalter kann eine therapeutische Lavage hilfreich sein (Sakai, 1999).

Die PAP tritt in mehr als 80% der Fälle im mittleren Erwachsenenalter, also zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr auf. Bei den Erwachsenen ist der Beginn wie im Kindesalter schleichend. Die Erkrankung führt ebenfalls zu einer lebensbedrohlichen respiratorischen Insuffizienz (Goldstein, 1998). Therapie der Wahl ist seit 40 Jahren die bronchoalveoläre Lavage, die zu einer nachhaltigen Besserung der Symptome führt (Ramirez, 1963). Lediglich 10% der Patienten sprechen nicht auf eine Lavage an. In Einzelfällen ist die subkutane Gabe von Granulozyten- Makrophagen Wachstumsfaktor (GM-CSF) (Leukomax<sup>R</sup>) therapeutisch wirksam (Seymour, 1996; Kavuru, 2000).

## **1.2. Diagnostik der Alveolarproteinose**

Die Diagnose der Alveolarproteinose ist ohne invasive Diagnostik schwer zu stellen.

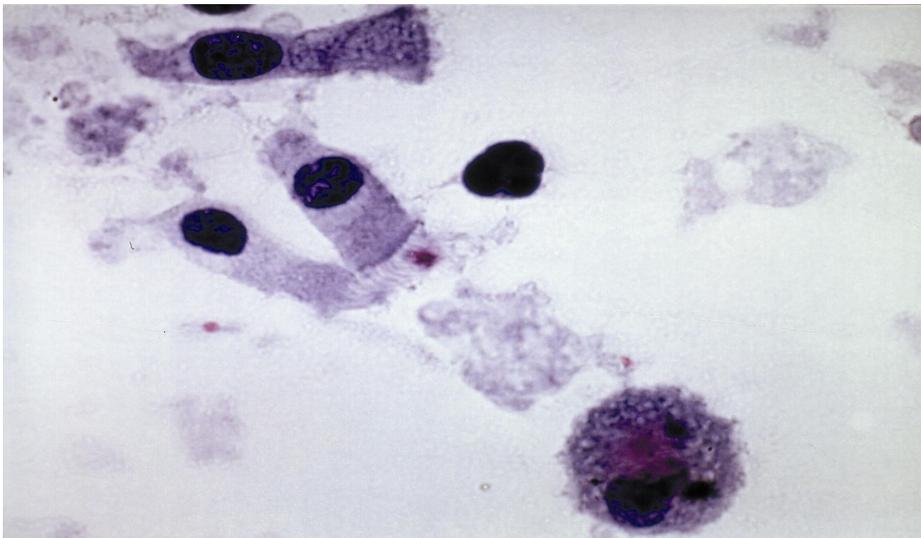
Bei der Lungenfunktionsdiagnostik finden sich eine restriktive Ventilationsstörung und eine reduzierte Diffusionskapazität (Goldstein, 1999).

Die Röntgenthoraxaufnahme zeigt eine bilaterale, schmetterlingsförmige, interstitielle Verschattung (Bat Wings Sign).

Aussagekräftiger ist die hochauflösende Computer Tomographie (HRCT), bei der sich die betroffenen Lungenabschnitte oft scharf von der gesunden Lunge abgrenzen. Diese Bezirke sind durch eine starke Verringerung der Belüftung und eine Verdickung der Alveolarsepten charakterisiert. Es gibt keinen Hinweis darauf, dass bestimmte Lungenabschnitte bevorzugt von der PAP befallen werden (Mahut, 1995).

Bei der diagnostisch entscheidenden Bronchiallavage wird eine milchig-trübe Flüssigkeit gewonnen. Die Bronchiallavageflüssigkeit wird zytopathologisch und biochemisch untersucht. Die zytopathologische Untersuchung zeigt amorphes, Protein- und Phospholipid reiches, Period -Schiff Säure (PAS)-positives Material. Die Alveolarmakrophagen präsentieren sich als Schaummakrophagen, die im Zellinneren massiv PAS- positives Material gespeichert haben. (Abbildung 1+2). Bei der biochemischen Untersuchung finden sich in der Bronchiallavage erhöhte Werte für SP-A und SP-B sowie ein Ungleichgewicht zwischen den Surfactantproteinen und Phospholipiden. Eine Ausnahme bildet die neonatale PAP mit einem angeborenen SP-B Defekt. Bei diesen Kindern ist kein SP-B, aber vermehrt Pro-SP-C nachweisbar, da Pro SP-C in Abwesenheit von SP-B nicht in SP-C umgewandelt werden kann.

**Abbildung 2** Proteinöses Material und typische Schaummakrophagen eines Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose

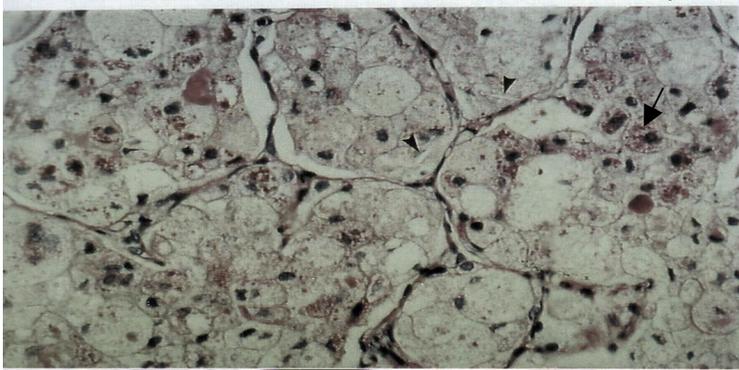


Zytospinpräparat;  
Patientin 2.  
sekundäre PAP  
bei AML.  
Siehe 3.4.  
Freundliche  
Überlassung von  
Prof. A. Böcking  
Zytopathologie  
des UKD

Diagnostisch- beweisend ist die Lungenbiopsie die mit PAS-positivem Material gefüllte Alveolen zeigt. Bei einigen Erwachsenen finden sich zusätzlich verdickte

Alveolarwände, die möglicherweise Ausdruck stattgehabter sekundärer Infektionen sind.

### Abbildung 3 Lungenbiopsie eines Patienten mit PAP



Mit PAS-positivem Material gefüllte Alveolen und Schaummakrophagen  
Freundliche Überlassung durch R Murray DNAX Palo Alto ,CA

Bereits 1963 wurde bei Untersuchungen an erwachsenen Patienten mit primärer oder sekundärer PAP vermutet, dass eine unzureichende Clearance des Alveolarraumes durch die Alveolarmakrophagen an der Pathogenese der PAP beteiligt ist (Ramirez, 1963; 1968). Spätere *in vitro* Untersuchungen an isolierten Alveolarmakrophagen von Erwachsenen PAP Patienten bestätigten diese These: die Alveolarmakrophagen haben eine verminderte Lebensdauer in Kultur, zeigen eine gestörte Chemotaxis und Adhärenzfähigkeit. Auch ist die Digestion phagozytierter Pathogene gestört (Golde, 1976).

#### 1.2.1 Surfactant

Da der Alveolarproteinose Störungen der Reutilisation oder eine Überproduktion von Surfactant zugrunde liegen, soll im folgenden auf den Surfactantstoffwechsel näher eingegangen werden (siehe auch Abb. 2).

Surfactant ist ein Gemisch aus unterschiedlichen Proteinen und Lipiden, die vornehmlich in Typ II Pneumozyten, aber auch in Clara Zellen gebildet werden. Es werden vier Surfactantproteine (SP) unterschieden: SP-A, SP-B, SP-C und SP-D. Der Surfactant hat in den Alveolen folgende Aufgaben: er liegt mit seiner hydrophilen Seite der Hypophase auf und bildet so eine Grenzfläche zum

Alveolarraum. Der entstehende Spreitungsdruck verringert die Hypophasengröße und erleichtert den Gasaustausch in den Alveolen. Surfactant reduziert die Oberflächenspannung und schützt die Alveole vor dem Kollaps. Zudem wird die Hypophase vom Gasaustausch getrennt und somit vor der Austrocknung bewahrt. Mit dem Schutz vor dem Austrocknen wird auch das Risiko für das Eindringen exogener Noxen verringert (Wright, 1997).

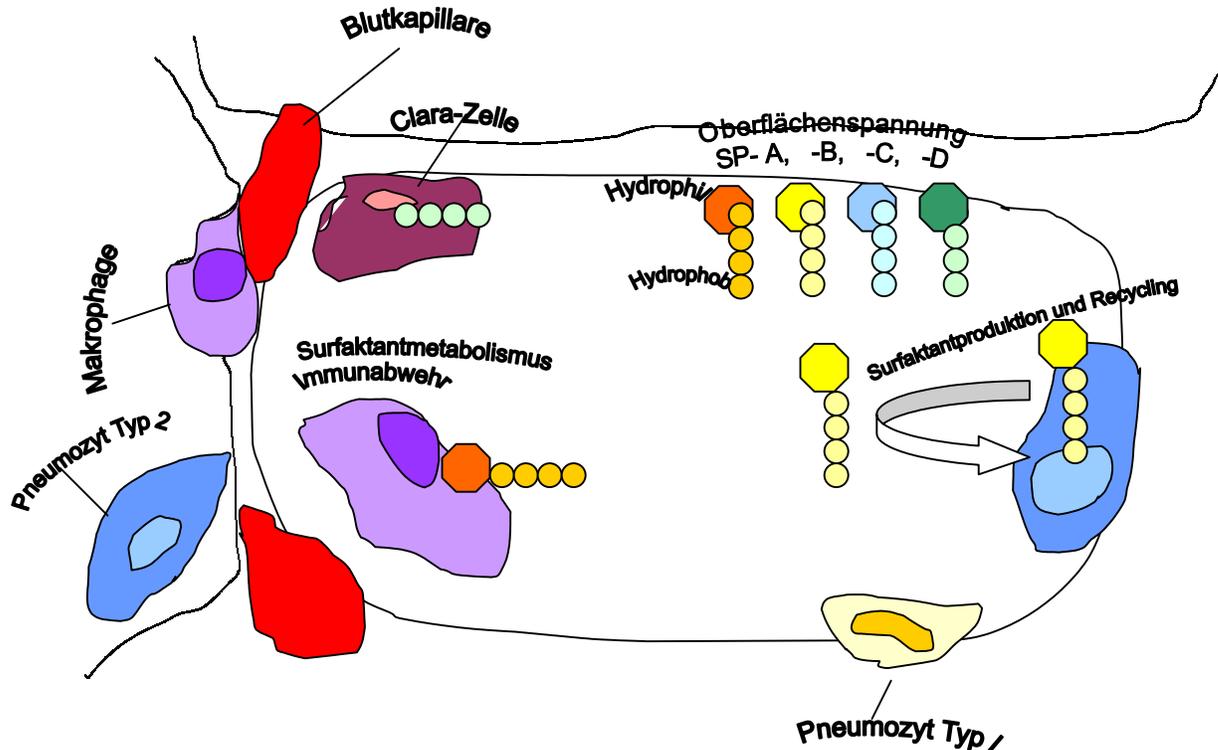
SP-A umfasst eine Familie ähnlich strukturierter Surfactantproteine, die zum einen unterschiedliche Genprodukte (Floros, 1986), zum anderen das Resultat alternativen Splicings einzelner SP-A Ribonukleinsäuren (RNA) sind. SP-A gewährleistet die Surfactant Homöostase und ist maßgeblich an der endogenen immunologischen Abwehr der Lungen beteiligt (Pison, 1994, Weaver, 1991). Zusammen mit Phospholipid und SP-B formt es tubuläres Myelin und reguliert die Produktion und den Abbau von Phospholipiden (Rice, 1989).

SP-B nimmt als hydrophobes Protein durch Senkung der Oberflächenspannung und Verhinderung eines Alveolarkollapses wesentlich die biophysikalischen Aufgaben des Surfactant wahr. Synthetisches SP-B wird als Surfactantersatz bei Frühgeborenen mit Atemnotsyndrom eingesetzt. SP-B ermöglicht die Bildung von SP-C aus Pro SP-C und scheint auch am Metabolismus von SP-A und Phosphatidylcholin beteiligt zu sein (Rice, 1989; Noguee, 1994).

SP-C trägt als hydrophobes Protein ebenfalls zur Senkung der Oberflächenspannung bei.

SP-D gehört, wie SP-A zu den hydrophilen Surfactantproteinen. Es ist ebenfalls an der Immunantwort der Lunge beteiligt (Reid, 1995).

Abbildung 2 Aufbau einer Alveole in schematischer Darstellung



Die Surfactantproteine werden in Pneumozyten Typ II produziert und nach intraalveolärer Umwandlung recycelt. Alveolarmakrophagen sind am Surfactantmetabolismus beteiligt. Surfactant erhält die Oberflächenspannung und verhindert den Kollaps der Alveolen. Neben den Alveolarmakrophagen sind auch SP-A und SP-D an der pulmonalen Immunabwehr beteiligt. Störungen des SP-Metabolismus führen zur Anhäufung von SP. Daraus kann eine Alveolarproteinose entstehen.

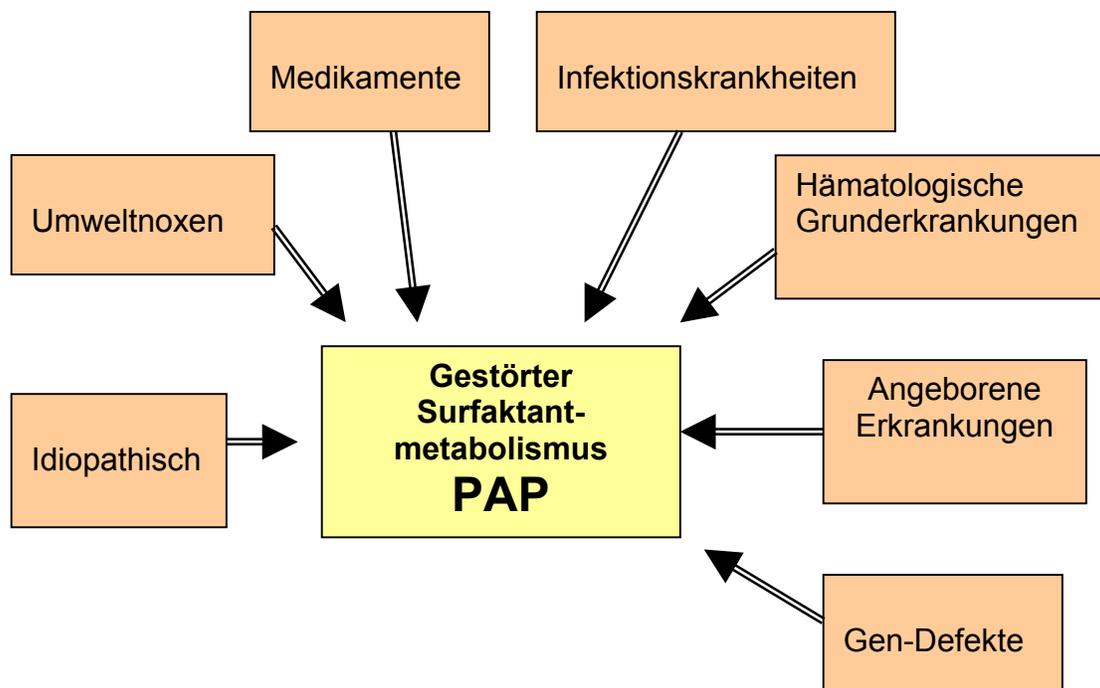
Zusammenfassend sollte bei Verdacht auf eine Alveolarproteinose, der sich aus der Klinik und den radiologischen Befunden ergibt, eine Bronchiallavage (BAL) durchgeführt werden. Die BAL-Flüssigkeit ist milchig-trübe. Im Zytospinpräparat sind Schaummakrophagen und reichlich PAS positives Material nachweisbar. Die biochemische Zusammensetzung des Surfactant zeigt fehlendes SP-B und erhöhte aberrantes SP-C bei Neonaten oder erhöhte Werte für SP-A, SP-D und Phospholipide bei älteren Patienten. Liegen diese Symptome vor, kann die Diagnose der PAP gestellt werden. Nur wenn die histopathologische und biochemische Analyse der BAL keine eindeutigen Schlüsse zulassen, oder es aufgrund anderer Befunde Zweifel an der Diagnose einer PAP gibt sollte eine

Lungenbiopsie durchgeführt werden. Mit Ausnahme der SP-B Defizienz geben diese diagnostischen Parameter keinen Anhalt für die Pathogenese der PAP.

## 2. Multifaktorielle Pathogenese der PAP

In der Pathogenese der PAP sind ganz unterschiedliche Faktoren nachgewiesen worden (Abbildung 4), so dass diese nicht als eine Krankheit, sondern als uniforme Reaktion der Lunge auf unterschiedliche Noxen zu werten ist.

**Abbildung 4** Multifaktorielle Genese der Pulmonalen Alveolar Proteinose (PAP)



Ursprünglich wurde die PAP als idiopathische Erkrankung angesehen. Doch inzwischen gibt es gesicherte oder vermutete Assoziationen mit einer größeren Zahl sehr unterschiedlicher Störungen oder Erkrankungen.

Zu den Umweltnoxen zählen Aluminium (Miller, 1984), Stickoxyd (NO<sub>2</sub>), Ozon (Hook, 1991), Silica (Buechner, 1969) oder Titanium (Keller, 1995).

Des Weiteren wurden Zusammenhänge mit Medikamenten wie Busulfan, Chlorambucil und Iprinol gezeigt (Watanabe, 1990).

Auch sind Assoziationen zwischen bakteriellen (Couderc, 1996), viralen (Ranchod, 1979, Tirnoveau, 1972) oder mykotischen Infektionen (Lee, 1999) und der PAP des Kindes- und Erwachsenenalters beschrieben worden. Bei keiner der Publikationen konnte jedoch geklärt werden, ob die jeweilige Infektion ein primärer oder nicht vielmehr ein sekundärer Faktor in Rahmen der PAP Erkrankung darstellt.

Bei erwachsenen Patienten mit myeloischen Leukämien wird die PAP relativ häufig als Sekundärerkrankung der hämatologischen Grunderkrankung gesehen (Green, 1980; Aymard, 1984). Die geschätzte Inzidenz dieser sekundären PAP liegt hier bei ca. 5%.

Zu den seltenen angeborenen, mit PAP assoziierten Erkrankungen zählen Immundefekte wie Immunglobulinmangel (Webster, 1980), Stoffwechseldefekte wie die lysinurische-Proteinintoleranz (Porto, 1993) und die Lipoidpneumonie (Parenti, 1995).

Eine weitere genetische Ursache für das Entstehen einer Form der PAP wurde erstmals mit der Beschreibung der Surfactant Protein B (SP-B) Defizienz bei neonataler PAP gezeigt (Nogee, 1993). Die SP-B Defizienz ist bei den meisten Neugeborenen auf die homozygote Mutation 121ins2 im SP-B Gen zurückzuführen. Es sind seit der Erstbeschreibung über 21 weitere Mutationen identifiziert worden, die zu einer fehlerhaften SP-B Produktion führen (deMello, 1994). Bei Vorliegen dieser Mutationen kann kein funktionelles SP-B produziert werden. Da die Bildung von SP-C aus Pro SP-C von SP-B abhängt, wird bei SP-B- Defizienz nur Pro SP-C sezerniert (Nogee, 1993).

Allen ätiologisch unterschiedlichen Formen der PAP gemeinsam ist die Störung der Endstrecke des Surfactantmetabolismus, wodurch sich erhebliche Imbalancen in der Zusammensetzung des Surfactant ergeben: Bei den Erwachsenen lassen sich in der Regel erhöhte Werte für die Surfactantproteine A und B nachweisen wobei die relative Vermehrung der Surfactantproteine erheblichen Schwankungen unterliegt. Die SP-A/SP-B Ratio bleibt dabei denen der Kontrollen gleich. Dagegen ist das Verhältnis von SP-A zu zweifachungesättigten Phospholipiden (DSP) und die SP-B/DSP Ratio erhöht. Auch weist SP-A von PAP Patienten in

der *in vitro* Proteinanalyse ein anderes Muster seiner Komponenten auf, als das SP-A der Normalpersonen (Doyle, 1998).

Bei Neugeborenen, die eine Mutation im Gen für SP-B aufweisen, lässt sich in der BAL kein SP-B nachweisen. Ferner findet sich vermindert maturiertes SP-C, aber vermehrt Pro SP-C (Nogee, 1994). Des weiteren liegt eine Verteilungsstörung des SP-A vor, welches sich kaum in den Pneumozyten Typ 2, aber vermehrt in Alveolen und Alveolarmakrophagen nachweisen ließ (de Mello, 1994).

### 3. Der hämatopoetische Wachstumsfaktor GM-CSF und PAP

Völlig neue Einsichten in die Pathogenese der PAP haben eine Zufallsbeobachtung gebracht, bei der die Ausfallserscheinungen für den hämatopoetischen Granulozyten-Makrophagen-Wachstumsfaktor (GM-CSF) tierexperimentell abgeklärt werden sollte.

#### 3.1 Zur Physiologie von GM-CSF

GM-CSF ist seit langem als Zytokin bekannt, das Proliferation myeloischer Zellen und die Differenzierung myeloischer Vorläuferzellen zu reifen Granulozyten und Makrophagen stimuliert. Die *in vivo* Applikation von GM-CSF führt zu einer dosisabhängigen Stimulation der Hämatopoese mit Neutrophilie, Monozytose und Eosinophilie. Rekombinantes humanes GM-CSF wurde bei einigen Patienten zur Frührekonstitution der Hämatopoese nach myelosuppressiver Therapie eingesetzt (Lehrnbecher, 2002; Berghmans, 2002). GM-CSF stimuliert die Zellen ähnlich wie Interleukin-3 (IL-3) und IL-5 (Hayashida, 1990; Kitamura, 1995; Tavernier, 1991) über einen gemeinsamen hochaffinen Rezeptorkomplex, der aus zwei Polypeptidketten besteht: der für jedes Zytokin spezifischen  $\alpha$ -Kette und einer gemeinsamen  $\beta$ -Kette ( $\beta c$ ). Die GM-CSF-, IL-3- und IL-5- Rezeptoren gehören zur Gruppe der Wachstumshormonrezeptoren (Burdach, 1998). Die  $\alpha$ -Ketten binden den Liganden mit einer niedrigen Affinität von 1-100 nM, während der  $\alpha\beta$ -Rezeptorkomplex eine hohe Bindungsaffinität von 10-100 pM aufweist. Die isolierte gemeinsame  $\beta$ -Kette weist keine Bindungsaffinität auf, sie ist aber essentiell für die Konformationsänderung des Rezeptors zu einem hochaffinen Rezeptor und für die Signaltransduktion.

#### 3.2. GM-CSF Rezeptordefekt und PAP bei $\beta c$ -gendetierten Mäusen

Etwa zeitgleich veröffentlichten zwei Gruppen Arbeiten über Mäuse, denen durch gezielte Deletion das Gen für  $\beta c$  entfernt worden ist (Stanley, 1994; Nishinakamura, 1995). Entgegen allen Erwartungen hatten die Tiere nur marginale Einschränkungen ihrer Hämatopoese. Die Gesamtzahl der eosinophilen Leukozyten war erniedrigt und auf Infektionen mit Parasiten

reagierten die Tiere nicht mit einem adäquaten Anstieg der Eosinophilen. Erstaunlicherweise entwickelten die  $\beta$ c-gendelelierten Mäuse eine der humanen PAP ähnliche Erkrankung. Die Lungen zeigen eine intraalveoläre Akkumulation PAS- positiven Materials, welches als Surfactant identifiziert werden konnte. Des weiteren fanden sich Schaummakrophagen. Im Unterschied zur menschlichen PAP fiel bei den Mäusen eine peribronchovaskuläre Infiltration mit Lymphozyten auf, deren Ursache nicht geklärt ist (Nishinakamura, 1995).

### **3.3. $\beta$ c-Expression und Funktion sowie SP Analyse bei Kindern mit PAP**

Dirksen U, Nishinakamura R, Groneck P, Hattenhorst U, Noguee L, Murray R, Burdach S **Human Pulmonary Alveolar proteinosis associated with a defect in GM-CSF/IL-3/IL-5 receptor common  $\beta$  chain expression**  
J Clin Invest 1996; 100: 2211-2217

#### **Anlage 1**

Um zu überprüfen, ob bei Kindern mit PAP ebenfalls ein Defekt im  $\beta$ c-Rezeptor vorliegt wurde das Blut von acht pädiatrischen Patienten mit PAP auf die Expression des  $\beta$ c-Rezeptors untersucht. Drei dieser Patienten (A, B, C) hatten eine bereits in der Neonatalzeit diagnostizierte PAP. Patient A zeigte im Alter von einer Woche pulmonale Symptome. Bei initialem Infektverdacht wurde er antibiotisch behandelt und kontrolliert beatmet. Da sich der klinische Zustand nicht besserte wurde, bei unklarer Ätiologie der Lungenerkrankung, eine Lungenbiopsie durchgeführt. Die histopathologische Analyse des Lungenbiopsates ergab die Diagnose einer PAP. Nach zweimaliger therapeutischer Lavage konnte er von der Beatmung entwöhnt werden. Er war jedoch mit 20 Monaten zum Zeitpunkt unserer  $\beta$ c-Rezeptor Untersuchung weiterhin sauerstoffabhängig.

Patient B wurde unter der Diagnose einer neonatalen Sepsis postpartal beatmet; er entwickelte darunter eine bronchopulmonale Dysplasie. Im weiteren Verlauf traten rezidivierend Pneumonien auf, die in einer progredienten pulmonalen Insuffizienz unklarer Genese mündeten. Die PAP von Patient B wurde anhand der biochemischen Analyse eines tiefen Sputums gestellt. Zum Zeitpunkt der  $\beta$ c-Analyse war er 22 Jahre alt und sauerstoffabhängig.

Patient C entwickelte postpartal eine progrediente pulmonale Insuffizienz, so dass nach 5 Tagen eine kontrollierte Beatmung notwendig wurde. Die PAP des Patienten C wurde über die biochemische Analyse der diagnostischen BAL gestellt. Er wurde ebenfalls zunächst kontrolliert beatmet, nach einer therapeutischen BAL war keine Beatmung mehr erforderlich. Zum Zeitpunkt unserer Analyse war er 1.1 Jahre alt und weiter sauerstoffabhängig.

Die fünf weiteren Patienten entwickelten ihre PAP Symptome im Säuglingsalter.

Patient D erkrankte im Alter von drei Monaten. Die Diagnose der PAP wurde anhand der biochemischen Analyse der Lavage und einer Lungenhistologie gestellt. Er wurde einer extrakorporalen Membran Oxygenierung und einer therapeutischen BAL unterzogen. Da es zu keiner Besserung kam, erhielt er eine beidseitige Lungentransplantation. Zum Zeitpunkt der  $\beta$ c-Analyse war er 4 Monate alt und nach Transplantation noch sauerstoffabhängig.

Patient E entwickelte progrediente pulmonale Symptome mit 17 Monaten. Die Diagnose der PAP wurde anhand der Analyse der BAL-Flüssigkeit gestellt. Der Patient wurde beatmet. Er verstarb im Alter von zwei Jahren an den Folgen der PAP.

Patient F entwickelte im Alter von 3 Monaten eine pulmonale Insuffizienz. Er wurde kontrolliert beatmet. Die PAP wurde anhand der Lungenhistologie und der Surfactantanalyse diagnostiziert. Er wurde kontrolliert beatmet, erhielt mehrfach therapeutische Bronchiallavagen und eine supportive Surfactantgabe nach Lavage. Er war bis zum Alter von 2 Jahren sauerstoffbedürftig. Danach besserte sich sein Zustand. Zum Zeitpunkt der  $\beta$ c-Analyse, mit 5.9 Jahren, hatte er keine pulmonalen Symptome mehr.

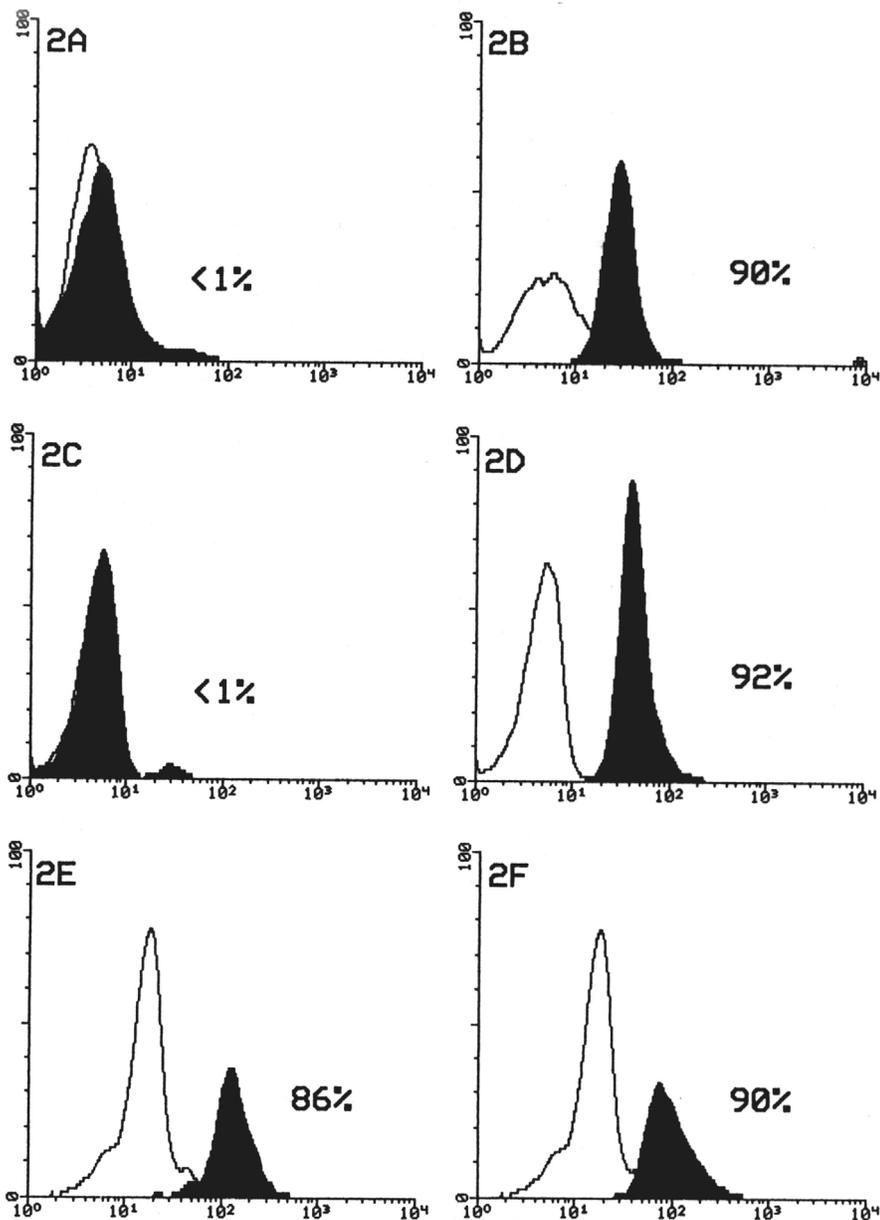
Patient G war 2 Monate alt als die PAP histologisch und mittels biochemischer Analyse der Bronchiallavage diagnostiziert wurde. Der Patient erhielt eine doppelseitige Lungentransplantation. Er war zum Zeitpunkt der  $\beta$ c-Analyse, im Alter von 8 Monaten, beschwerdefrei.

Patient H zeigte im Alter von 3 Monaten eine zunehmende respiratorische Insuffizienz, die eine Langzeitbeatmung erforderte. Eine Infektion wurde nicht diagnostiziert. Die Diagnose wurde über die biochemische Analyse der BAL

gestellt. Zum Zeitpunkt der  $\beta$ c-Analyse, mit 6.1 Jahren benötigte er weiterhin Sauerstoffgaben.

Mononukleäre Zellen dieser acht Kinder wurden mit  $\beta$ c-spezifischen Antikörpern markiert. Die gebundenen  $\beta$ c-spezifischen Antikörper wurden mit einem Fluoreszein-konjugierten Zweitantikörper sichtbar gemacht, der spezifisch an den  $\beta$ c Antikörper bindet. Die Quantifizierung der Expression des  $\beta$ c Rezeptors erfolgte im Durchflusszytometer. Als Kontrolle wurde die Oberflächenexpression der GM-CSF Rezeptor  $\alpha$ -Kette und der IL-3 Rezeptor  $\alpha$ -Kette untersucht. Bei 4 der 8 untersuchten Patienten wurde eine  $\beta$ c-Defizienz durchflusszytometrisch nachgewiesen, wie beispielhaft in Abbildung 5 wiedergegeben ist. Dreimal waren Neugeborene und einmal ein Säugling betroffen. Die mit primärem  $\beta$ c-Defekt assoziierte PAP scheint daher angeboren zu sein, wobei es offensichtlich Fälle mit einer verzögerten Manifestation der Symptome gibt.

**Abbildung 5** Expression der  $\beta_c$  Kette bei Patient A im Vergleich zur gesunden Kontrolle



Die Zellen wurden mit dem fluoreszein-konjugierten Zweitantikörper alleine inkubiert (weiße Felder), um unspezifische Bindungen zu erfassen. Die Expression von  $\beta_c$  wurde durch Bindung des nicht konjugierten  $\beta_c$ -spezifischen Antikörpers S-16 und dessen sekundäre Färbung durch Bindung des Zweitantikörpers sichtbar gemacht (schwarze Felder). Ein Shift nach rechts bedeutet eine positive Färbung.

Zur unabhängigen Bestätigung der durchflusszytometrisch erhobenen Befunde wurde ein Bindungsassay mit radioaktiv markiertem  $^{125}\text{I}$ -GM-CSF

durchgeführt. Die Patienten, die in der Durchflusszytometrie keinen nachweisbaren Rezeptor hatten, zeigten eine niedrig-affine Bindung für GM-CSF entsprechend der alleinigen Expression der GM-CSF Rezeptor  $\alpha$ -Kette. Die Bindung der Kontrollpersonen lag im Bereich des hochaffinen Rezeptors.

Um zu untersuchen, ob der  $\beta$ c Rezeptor auch funktionell ausgeschaltet war, wurden Wachstum und Differenzierung hämatopoetischer Zellen unter Stimulation mit  $\beta$ c-abhängigen Zytokinen wie GM-CSF und IL-3 sowie zur Kontrolle mit  $\beta$ c-unabhängigen Zytokinen wie G-CSF, IL-6 und SCF jeweils unter Zusatz von Erythropoetin (EPO) analysiert. Die Zellen der Patienten mit nachgewiesener  $\beta$ c-Defizienz zeigten kein Ansprechen auf  $\beta$ c-abhängige Zytokine, während das Ansprechen auf  $\beta$ c-unabhängige Zytokine den Kontrollen entsprach (Tabelle 1).

**Tabelle 1** Wachstumsassay an hämatopoetischen Zellen von Kindern mit PAP und  $\beta$ c-Defizienz, den Patienten A, B, C, H und von den nicht  $\beta$ c-defizienten PAP Patienten E und G sowie von gesunden Kontrollpersonen 1, 2, 3.

Die Stimulation erfolgte mit den  $\beta$ c-abhängigen Wachstumsfaktoren GM-CSF und IL-3. Des weiteren mit den  $\beta$ c-unabhängigen Wachstumsfaktoren IL-6, Granulozyten Wachstumsfaktor (G-CSF), Stammzellefaktor (SCF) und Erythropoetin (EPO). Patient F konnte nicht untersucht werden, da es keine Einwilligung zu dieser Untersuchung gab. \* $p < 0.05$  im Vergleich zu den Kontrollen

(modifiziert nach Tabelle 7 Anlage 1)

	EPO	EPO/GM-CSF	EPO/IL-3	EPO/G-CSF	EPO/IL-6/SCF
Patient A	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0*	1 $\pm$ 1*	69 $\pm$ 4	89 $\pm$ 12
Patient B	0 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1*	1 $\pm$ 1*	142 $\pm$ 50	102 $\pm$ 62
Patient C	3 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1*	0 $\pm$ 0*	67 $\pm$ 12	98 $\pm$ 6
Patient H	4 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1*	ND	45 $\pm$ 4	48 $\pm$ 8
Patient E	23 $\pm$ 5	54 $\pm$ 6	32 $\pm$ 8	65 $\pm$ 9	55 $\pm$ 4
Patient G	10 $\pm$ 5	89 $\pm$ 10	76 $\pm$ 4	77 $\pm$ 19	83 $\pm$ 13
Kontrolle 1	2 $\pm$ 2	71 $\pm$ 10	35 $\pm$ 4	109 $\pm$ 6	ND
Kontrolle 2	3 $\pm$ 1	64 $\pm$ 7	56 $\pm$ 3	91 $\pm$ 7	ND
Kontrolle 3	0 $\pm$ 0	31 $\pm$ 2	46 $\pm$ 1	53 $\pm$ 8	97 $\pm$ 2

Die Analyse des Surfactant aus der bronchoalveolären Lavage der Patienten zeigte bei den Patienten, deren Surfactant quantitativ untersucht wurde, eine Erhöhung der SP-B und SP-A Werte, also ein Surfactant Muster vergleichbar mit dem der PAP des Erwachsenen (Tabelle 2). Die Surfactant Analyse wurde bei

den Patienten D, E und G qualitativ mittels Western Blot (Abbildung 6) zum Ausschluss einer SP-B Defizienz durchgeführt. Die mit dem  $\beta$ c-Defekt einhergehende Alveolarproteinose ging in den untersuchten Fällen nicht mit einer SP-B Defizienz einher, somit wurde gezeigt, dass es sich um zwei unterschiedliche Krankheitsbilder handelt.

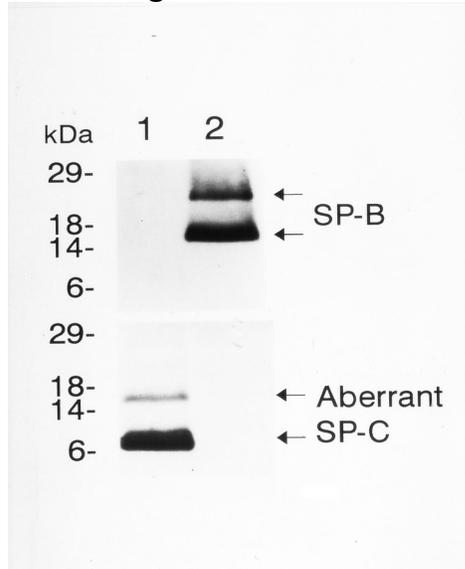
**Tabelle 2** Quantifizierung der Surfactantproteine bei 4 Kindern mit PAP im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Die Kinder zeigen eine Erhöhung der Surfactantproteine B und A im Vergleich zu den Kontrollen.

(modifiziert nach Tabelle 4 in Anlage 1)

Patient	SP-A (ng/ml)	SP-B ( $\mu$ g/ml)
A	5130	141
C	2700	ND
F	900	65
H	3210	450
Kontrollen (Mittelwert aus n=20)	748 $\pm$ 85	148 $\pm$ 31

SP-A= Surfactantprotein A; SP-B =Surfactant Protein B; n= Anzahl

**Abbildung 6** Western Blot einer Surfactantproteinanalyse



1) Lavagematerial eines PAP- Patienten mit SP-B Defekt; 2) Lavagematerial eines PAP- Patienten ohne SP-B Defekt. (Freundlicherweise überlassen von L. Noguee) kDa= kilodalton, Größenmarker;

Diese ersten Untersuchungen zeigten, dass bei einer Untergruppe von pädiatrischen PAP Patienten die Erkrankung mit einer defekten Expression des

$\beta$ c-Rezeptors assoziiert ist und von der bisherigen neonatalen Form mit SP-B Defekt sowohl mittels der biochemischen Analyse der Lavageflüssigkeit, als auch durch die immunologische Typisierung hämatologischer Zellen abgegrenzt werden kann.

### **3.4 Rolle des GM-CSF– Signaltransduktionsweges bei der PAP**

Seymour JF, Begley G, Dirksen U, Presneill JJ, Nicola NA, Moore PE, Schoch OD, van Asperen P, Roth B, Burdach S, Dunn A **Attenuated hematopoietic response to granulocyte– macrophage colony stimulating factor in patients with acquired pulmonary alveolar proteinosis.**  
Blood 1998; 92: 2657-2667

#### **Anlage 5**

Mäuse, bei denen das Gen für GM-CSF deletiert wurde, entwickeln ebenfalls eine der humanen PAP vergleichbare Erkrankung (Stanley, 1994, Robb, 1995). Die genetische Korrektur des GM-CSF Defektes durch Expression von GM-CSF unter Kontrolle des SP-C Promotors in pulmonalen Epithelzellen korrigierte die PAP dieser Mäuse (Huffman, 1996).

Diese Untersuchungen und die Untersuchungen zur  $\beta$ c Defizienz zeigen, dass die GM-CSF induzierte Stimulation myeloischer Zellen, besonders der Alveolarmakrophagen, eine kritische Rolle bei der pulmonalen Clearance spielt. Die Alveolarmakrophagen sind bei PAP Patienten funktionell gestört (Golde,1976). Es lag daher nahe, bei schwerkranken PAP Patienten einen Therapieversuch mit rekombinatem GM-CSF zu unternehmen. Es wurden 12 Kinder und Erwachsene (13 Jahre - 45 Jahre) mit idiopathischer PAP und 5 Säuglinge mit kongenitaler PAP (Beginn der Erkrankung im Alter von unter 1 Monat) behandelt. Bei einem der Säuglinge lag eine SP-B Defizienz vor. Alle anderen Patienten hatten eine idiopathische PAP. Von den Erwachsenen zeigte keiner eine adäquate hämatologische Response auf die GM-CSF Gabe, wie sie von Untersuchungen historischer Kontrollen bei gesunden Probanden bekannt sind. Im Gegenteil fiel die Leukozytenzahl bei 7 Patienten sogar ab.

**Tabelle 3** Hämatologische Response auf GM-CSF bei 12 Patienten mit erworbener PAP (Seymour et. Al) im Vergleich zu 16 Erwachsenen mit normaler Hämatopoese( Vadhan-Raj, Lieschke, Haas, Berthaud)

(Modifiziert nach Tabelle 3 in Anlage 3)

Erstautor	Anzahl der Patienten	GM-CSF Dosierung	Dauer (Tage)	Leukozyten ( $10^9/L$ )	
				Mittelwert der Maximalwerte	Mittelwert des Anstiegs
Seymour (PAP)	12	3.8-5.8 $\mu$ g/kg (147-229 $\mu$ g/m <sup>2</sup> )	21	6.8 $\pm$ 1.1	0.5 $\pm$ 1.1
Vadhan –Raj	3	120-250 $\mu$ g/m <sup>2</sup>	14	34.1 $\pm$ 12.2§	25.0 $\pm$ 13.3§
Lieschke	3	3 $\mu$ g/kg	10	22.6 $\pm$ 4.9§	15.3 $\pm$ 5.2#
Haas	7	250 $\mu$ g/m <sup>2</sup>	11.5*	36.6 $\pm$ 8.4§	29.7 $\pm$ 12.4§
Berthaud	3	250 $\mu$ g/m <sup>2</sup>	10	23.9 $\pm$ 5.9§	19.5 $\pm$ 5.8§

Die Tabelle gibt die Mittelwerte des Leukozytenanstiegs unter GM-CSF der eigenen Studie (Seymour) im Vergleich zu Kontrollen an. \* Die Patienten wurden zwischen 5 und 22 Tagen mit GM-CSF behandelt. §  $p < 0.004$  bei Vergleich der Seymour Studie mit der gekennzeichneten Studie mittels Dunnet's Test für gepaarte Stichproben. #  $p < 0.026$  bei Vergleich der Seymour Studie mit der gekennzeichneten Studie mittels Dunnet's Test für gepaarte Stichproben.

Dagegen reagierten alle Säuglinge mit einem prompten, starken Leukozytenanstieg nach der Gabe von GM-CSF. In zwei Fällen wurde die GM-CSF Dosis bei extremer Leukozytose reduziert.

Alle von Seymour et al. behandelten Patienten hatte eine regelrechte Expression der  $\beta$ c Kette sowie der GM-CSF und IL3 Rezeptor  $\alpha$  Kette. Auch die Bindung von radioaktiv markiertem Iod <sup>125</sup> (<sup>125</sup>I) GM-CSF an die Zellen im Scatchard Plot war unauffällig. Dagegen zeigte sich im Proliferationsassay ein vermindertes Wachstum der Zellen in Gegenwart von GM-CSF und IL3 während das Ansprechen auf andere Wachstumsfaktoren wie G-CSF und IL6 unauffällig war. Keiner der Patienten profitierte pulmonal langfristig von der Therapie mit GM-CSF. Diese Daten zeigen, dass es offensichtlich eine Gruppe von PAP Patienten gibt, die bei regelrechter Expression der  $\beta$ c-Kette eine Störung der Signaltransduktion von GM-CSF haben. Da die Erkrankung erst im Erwachsenenalter auftrat, ist zu postulieren, dass bei diesen Patienten eine somatische Mutation des GM-CSF Signaltransduktionsweges in einer frühen hämatopoetische Stammzelle zu der PAP führte. Die Dauer der Erkrankung bei

diesen Patienten sollte somit auf die Dauer der Aktivität dieser Progenitorzelle beschränkt sein.

### 3.5 Sekundäre PAP und $\beta$ c-Defizienz bei Kindern mit AML

Dirksen U, Hattenhorst U, Schneider, Schroten H, Göbel U, Böcking , Müller HW, Murray R, Burdach S. **Defective Expression of GM-CSF/IL3/IL5 receptor common beta chain in children with acute myeloid leucemia associated with respiratory failure.**

Blood, 1998; 92: 1097-1103

#### Anlage 2

In einer weiteren Studie wurde die  $\beta$ c-Expression auch bei 3 Kindern mit sekundärer PAP bei akuter myeloischer Leukämie (AML) untersucht. Bei den drei untersuchten Patienten fanden wir die  $\beta$ c-Defizienz nur auf ihren myeloischen Blasten. Alle Patienten zeigten zum Zeitpunkt der Initialdiagnose ihrer AML pulmonale Symptome in Form von schwerer Dyspnoe. Patient 1, ein 2 Monate alter Säugling hatte eine AML 4 nach der Französisch- Amerikanisch- Britischen (FAB) Klassifikation. Patient 2, ein 11 Jahre altes Mädchen, war an einer nicht-klassifizierbaren AML erkrankt. Patient 3, ein 9 Monate altes Mädchen, hatte eine AML FAB Typ 5. Bei Patient 1 und 2 wurde die PAP anhand der Surfactantanalyse und der zytologischen Untersuchungen nach broncho-pulmonaler Lavage gestellt. Des weiteren hatten beide Kinder einen für die PAP typischen radiologischen Befund. Bei der dritten Patientin lag keine broncheoalveoläre Lavage vor. In ihrem Fall wurde die PAP retrospektiv wegen eines typischen radiologischen Befundes bei nicht-infektiösem respiratorischen Symptomen vermutet. Die Expressionen der  $\beta$ c Kette und der  $\alpha$  Ketten der GM-CSF- und IL-3- Rezeptoren wurden jeweils vor dem ersten Chemotherapiezyklus analysiert. Bei Patient 1 wurden zur Analyse Zellen des peripheren Blutes und der BAL- Flüssigkeit, bei Patient 2 und 3 Knochenmarkzellen und Zellen der BAL- Flüssigkeit untersucht. Eine  $\beta$ c-Expression konnte in keiner der untersuchten Proben nachgewiesen werden. Patient 1 zeigte eine regelrechte Expression der  $\alpha$  Ketten der GM-CSF und IL3 Rezeptoren, während bei Patient 2 und 3 nur die  $\alpha$  Kette des IL3 Rezeptors, nicht des GM-CSF Rezeptors, nachweisbar war.

Die Kinder wurden gemäss des gültigen AML-Protokolls der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) behandelt. Patient 1 und 3 erhielten nach Chemotherapie und Bestrahlung eine Stammzelltransplantation. Patient 2 erhielt eine chemotherapeutische Behandlung, verstarb aber vor der geplanten Stammzelltransplantation an einer Sepsis.

Die Erradikation der  $\beta$ c-defizienten Blasten durch die antineoplastische Therapie führte zu einer Remission der PAP bei allen drei Patienten. Analysen der myeloischen Zellen nach Therapie zeigten bei allen Patienten eine regelrechte Expression der  $\beta$ c und der GM-CSF Rezeptor  $\alpha$  Ketten. Aus diesen Daten konnte die Hypothese abgeleitet werden, dass es sich bei dieser Erkrankung um ein primär hämatopoetisches Krankheitsbild handelt. Die  $\beta$ c-defizienten Blasten wandelten sich in der Lunge der Patienten in defekte Alveolarmakrophagen um und verursachten die PAP. Die antineoplastische Behandlung führte zu einer Erradikation der  $\beta$ c-defizienten Blasten in Blut, KM und den sekundär infiltrierten Organen, so auch in den Lungen. Die PAP dieser Patienten ist somit als sekundäre Erkrankung hämatopoetischen Ursprungs zu deuten.

## 4. Therapeutische Optionen für Patienten mit $\beta$ c-defizienter PAP

### 4.1. Heilung der PAP durch Knochenmarktransplantation im Mausmodell

Nishinakamura R, Wiler R, Dirksen U, Morikawa Y, Arai KI, Miyama A, Burdach S, Murray R **The pulmonary alveolar proteinosis in granulocyte macrophage-stimulating factor /Interleukins 3/5 receptor deficient mice is reversed by bone marrow transplantation.**

J Exp Med 1996; 183:2657-2662

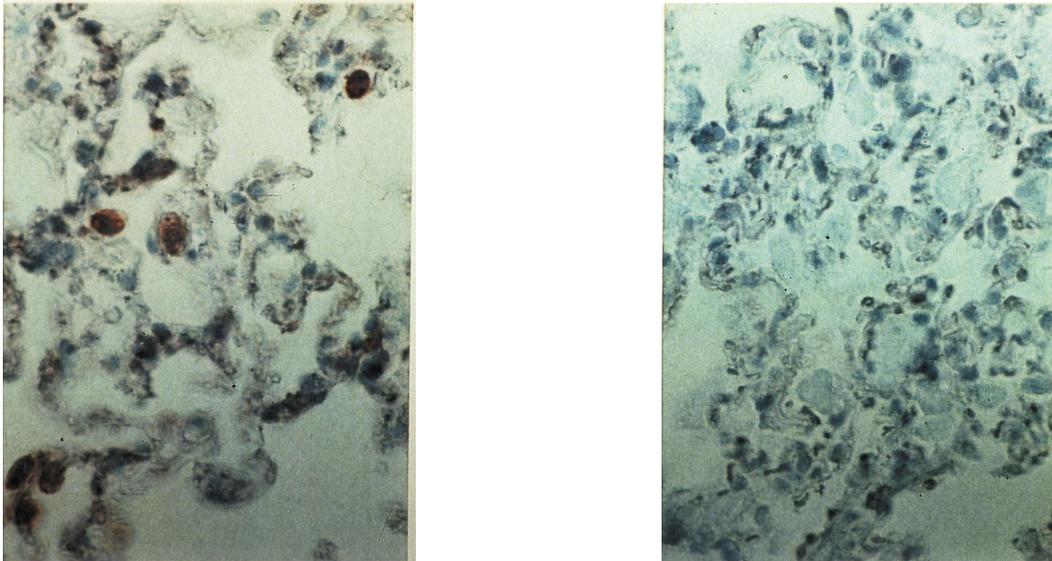
#### Anlage 3

Um zu beweisen, dass die PAP bei  $\beta$ c-Defizienz eine originär hämatologische Erkrankung ist, wurde Wild Typ (WT) Knochenmark sublethal-bestrahlten  $\beta$ c-/- Mäusen transplantiert (DNAX Research Institute, Palo Alto, CA).

Als negativ- Kontrolle wurde WT-Mäusen WT-Knochenmark transplantiert. Deren Lungenbefund war 8 und 12 Wochen nach Transplantation entsprechend dem nicht transplantierten WT- Mäuse.

Bei der positiven Kontrolltransplantation wurde  $\beta c^{-/-}$  Knochenmark in  $\beta c^{-/-}$  Mäuse transplantiert. Die Lungen dieser Tiere zeigten 8 und 12 Wochen nach Transplantation eine PAP Pathologie entsprechend der nicht transplantierten  $\beta c^{-/-}$  Mäuse. Im Hauptversuch zeigte die histologische Untersuchung nach Engraftment der WT-Zellen, 8 Wochen nach Transplantation, in den  $\beta c^{-/-}$  Mäusen keine Merkmale der PAP Pathologie. Die Alveolen waren frei von Surfactantmaterial und es fanden sich keine Schaummakrophagen. Anhand des für die Spenderzellen spezifischen Oberflächenantigens Ly 5.2 konnten wir immunhistochemisch dieses Merkmal im Lungengewebe detektieren. Auch wenn im Lungengewebe der Empfängertiere hauptsächlich Spenderzellen gesehen wurden waren aber auch noch einige der ursprünglichen Empfängerzellen vorhanden (Abbildung 7). Dies spricht für eine maßgebliche *in situ* Neubesiedlung der Lungen durch Blutmakrophagen in diesem syngenen Mausmodell. Aber auch beim Menschen ist nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation gezeigt worden, dass die Lunge mit Spenderzellen neubesiedelt wird (Nakata, 1999).

**Abbildung 7** Engraftment der Spender Zellen und Reversion der PAP in den Lungen  $\beta$ c-defizienter Mäuse nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation mit  $\beta$ c-positivem Knochenmark (links). Das rechte Bild stammt von einer  $\beta$ c-defizienten Maus, die mit  $\beta$ c-defizientem KM transplantiert worden ist. Die Schnitte sind mit einem Antikörper gegen Ly5.2 (rot), der spezifisch für das  $\beta$ c positive Knochenmark ist.

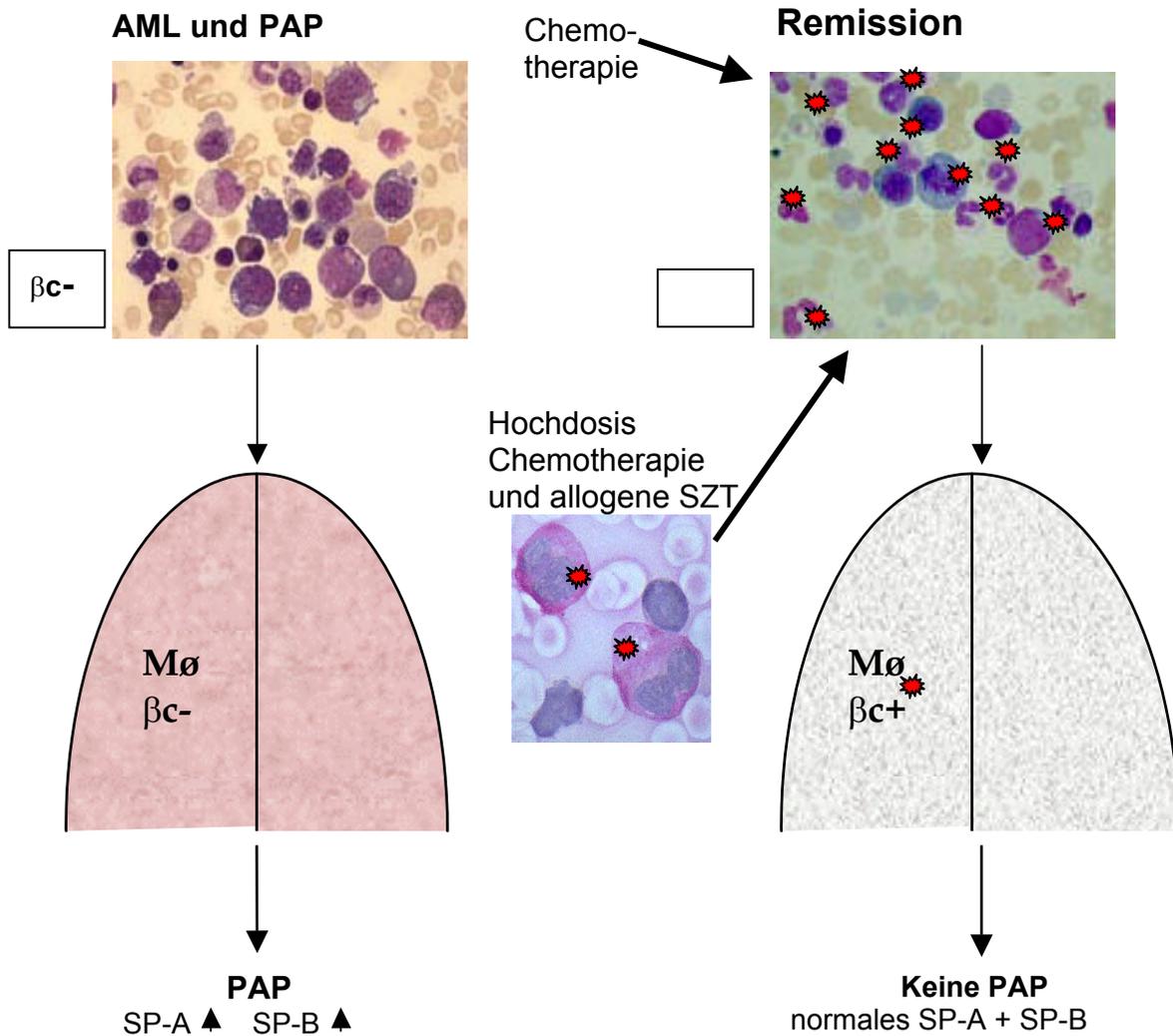


Um zu untersuchen, welche Zellreihen des Spenderknochenmarks die Rückbildung der PAP induziert wurden, in zusätzlichen Versuchen, Spenderzellen von RAG-2 Gen mutierten Mäusen gewählt. Diese Mäuse haben eine fehlende Lymphopoese. Das Engraften der ausschließlich myeloischen RAG-2 Spenderzellen in den  $\beta$ c<sup>-/-</sup> Mäusen revidierte die PAP. Der Lungenbefund bei den Empfängertieren entsprach dem nach Transplantation mit WT Knochenmark. Diese Daten weisen darauf hin, dass das Engraften  $\beta$ c tragender myeloischer Zellen essentiell für die Rückbildung der PAP ist.

Aus diesen Daten ergab sich folgendes Modell für die  $\beta$ c-PAP (Abbildung 8): Aus dem Knochenmark wandern  $\beta$ c-defiziente myeloische Vorläuferzellen in die Lunge wobei die Störung der  $\beta$ c-Defizienz angeboren oder erworben sein kann. In den Lungen reifen die  $\beta$ c-defizienten Zellen zu Alveolarmakrophagen aus und führen zu einer Störung des Sufaktantmetabolismus. Es entsteht das

Krankheitsbild der PAP. Die Elimination der  $\beta$ c-defizienten Zellen und das Engraften  $\beta$ c-tragender Zellen führt zur Revision der PAP.

**Abbildung 8** Modell zur Pathogenese der  $\beta$ c-defizienten PAP und ihrer Heilung durch eine onkologische Therapie mit Stammzelltransplantation  $\beta$ c positiver Zellen (rot markiert).



KM= Knochenmark,  $\beta$ c-=  $\beta$ c-defiziente hämatopoetische Progenitorzellen;  $M\phi$   $\beta$ c- =  $\beta$ c-defiziente Alveolarmakrophagen; SZT= Stammzelltransplantation;  $\beta$ c+ oder  =  $\beta$ c-tragende hämatopoetische Progenitorzellen;  $M\phi$   $\beta$ c+ =  $\beta$ c-tragende Alveolarmakrophagen; SP-A = Sufaktantprotein A, SP-B= Sufactant Protein B  = erhöht. Bildnachweis: AML KM: [www.mww.de](http://www.mww.de), KM [www.eufets.com](http://www.eufets.com), SZ: [www.lymphomainfo.net](http://www.lymphomainfo.net)

Eine allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation mit ihrer Konditionierung ist für die angeborene PAP wegen ihres vital bedrohlichen Zustandes aber auch der schweren Nebenwirkungen, wie Spender- gegen Empfänger- Krankheit oder Infektionen nicht tragbar. Daher begannen wir genkorrektive Strategien zur Heilung der  $\beta_c$  PAP zu entwickeln.

## 4.2 Somatische Gentherapie

Dirksen U, Moritz T, Burdach S, Flasshofe M, Hanenberg H **Fanconi anemia and  $\beta_c$  deficiency-associated pulmonary alveolar proteinosis as two hereditary diseases of childhood which are potentially curable by stem cell gene therapy but require different therapeutic approaches.**

Klin Päd 1999; 211:329-335

### Anlage 4

Die Gentherapie in hämatopoetische Stammzellen ist ein attraktives therapeutisches Konzept für Erkrankungen, die auch mit einer allogenen Stammzelltransplantation geheilt werden können. Wird ein therapeutisches Gen in das Genom einer hämatopoetischen Stammzelle integriert, so bringt diese weitere Stammzellen und ausreifende Zellen hervor, die alle das korrektive Gen tragen. Zwei der derzeit nach wie vor größten Probleme in der Stammzell-Gentherapie sind die geringe Transduktionseffizienz in diesen Zielzellen und der fehlende Wachstumsvorteil gegenüber den unkorrigierten Ursprungszellen.

Eine Möglichkeit dem ersten Problem zu begegnen ist die *in vitro* Selektion und Expansion der erfolgreich transduzierten Stammzellen (Abonour, 2000).

Die Expansion der Gen-korrigierten Stammzellen im Körper des Patienten nach Transplantation, kann durch eine myeloablative Vorbehandlung des Patienten erreicht werden, bedingt aber alle Risiken einer autologen KMT. Bei einigen kongenitalen Erkrankungen, wie der Fankoni Anämie, bei der unterschiedliche Mutationen gleiche funktionelle Defekte der hämatopoetischen Stammzellen induzieren, (Joenje, 1997, Hanenberg, 2002) bringt bereits die Expression der normalen cDNA einen *in vivo* Wachstumsvorteil für die erfolgreich transduzierten Zellen (Hanline, 1998). Bei anderen Erkrankungen, und hierzu gehört nach

heutigem Kenntnisstand auch die  $\beta$ c-PAP, ist ein solcher Wachstumsvorteil nicht zu erwarten.

Eine elegante Lösung bietet im autologen System die medikamentöse *in vivo* Selektion. Dazu wird in den Vektor, der das therapeutische WT  $\beta$ c-Gen trägt, als zweites Gen ein Selektionsmarker eingebaut.

In Tiermodellen sind effektive *in vivo* Selektionssysteme etabliert, die Zellen resistent gegen zytotoxische Substanzen machen. Eine solche Möglichkeit bietet z. B. der Transfer der mutierten Dihydrofolatreduktase (DHFR<sub>m</sub>), die die Zellen gegenüber Methotrexat resistent macht. Methotrexat ist für eine solche Anwendung ein geeignetes Medikament, da es keine mutagenen oder karzinogenen Eigenschaften hat (Allay, 1998).

Zur genkorrektiven Behandlung würden also dem Patienten autologe hämatopoetische Stammzellen entnommen und mit einem  $\beta$ c- Gen und DHFR<sub>m</sub>- Gen transduziert. Die Patienten würden vor der Transplantation eine Vorbehandlung mit Methotrexat erhalten und nach der Transplantation mit niedrig dosiertem Methotrexat solange nachbehandelt, bis es zum Engraften der genkorrigierten Zellen gekommen ist.

## 6. Ausblick

### 6.1. Diagnostik

Die Alveolarproteinose ist eine seltene Erkrankung. Durch interdisziplinäre Zusammenarbeit ist es in den letzten Jahren gelungen neue, therapeutisch-relevante Erkenntnisse zur Pathogenese der pulmonalen Alveolarproteinose zu gewinnen. Faszinierend an den Erkenntnissen zur Pathogenese war insbesondere die Bedeutung der GM-CSF/IL-3/IL-5 Rezeptor beta Kette und des GM-CSF, die entgegen den bisherigen Erkenntnissen (Vadhan-Raj, 1972, Burdach, 1998), eine eher geringe Relevanz für die Hämatopoese haben.

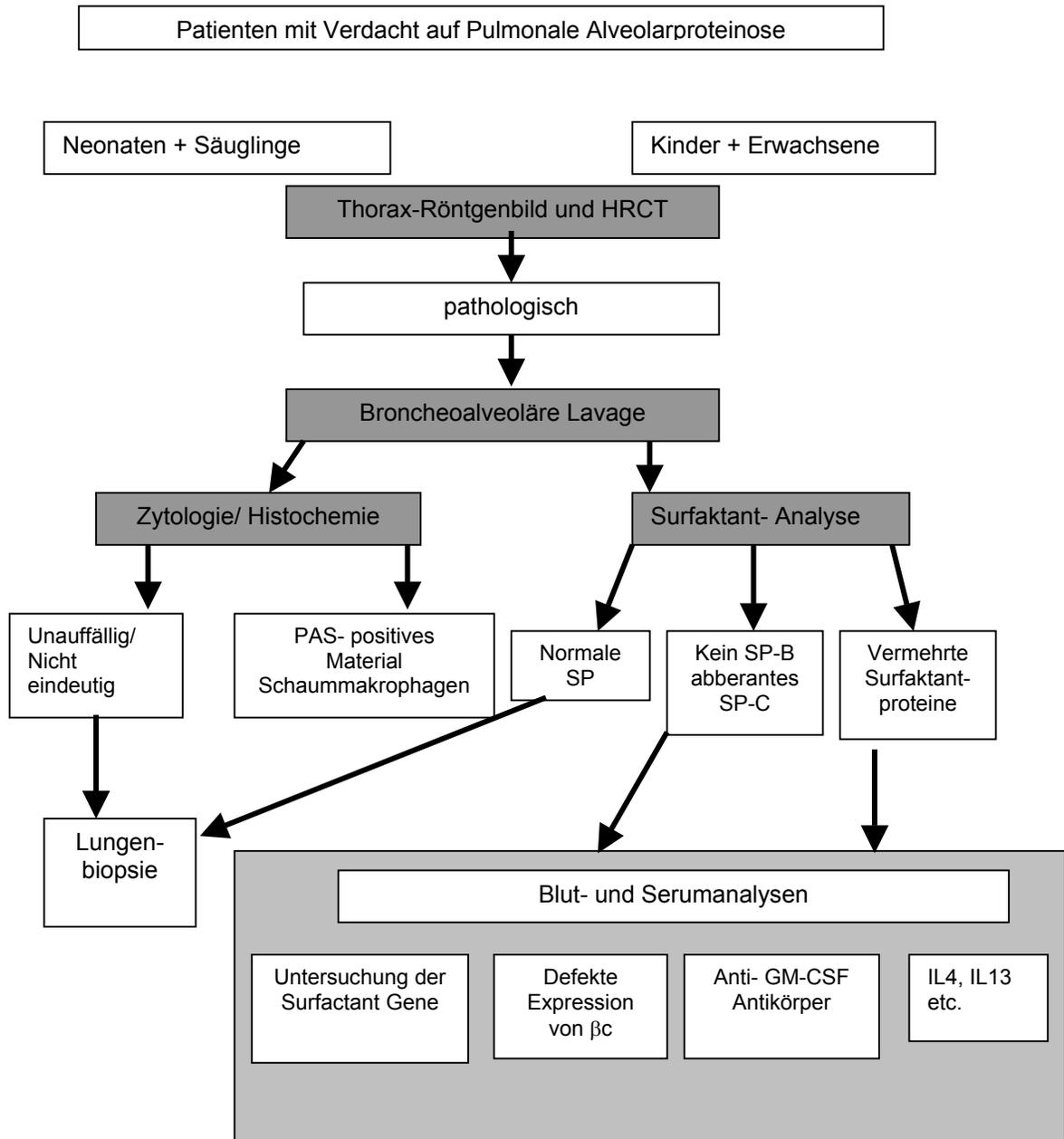
Die Beschreibung der SP-B Defizienz, der Störungen der SP-A Homöostase und der Störungen im GM-CSF Signaltransduktionsweg ermöglichten eine molekulare Differenzierung von Krankheiten, die phänotypisch in das Krankheitsbild der Alveolarproteinose münden (Shah, 2000). Eine Standardisierung der Diagnostik unter Einbeziehung der biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungsmöglichkeiten (Abbildung 9) und der Aufbau eines Registers würden entscheidende Beiträge zur Klärung der Inzidenz der verschiedenen Ursachen der Alveolarproteinose erbringen.

Die initiale Diagnostik, besteht aus einem Röntgenbild des Thorax und einer HRCT (Albafouille, 1999). Die konsekutive bronchoalveoläre Lavage erlaubt den Ausschluss infektiöser Ursachen und die Gewinnung von Material für zytologische Diagnostik und die biochemische Analyse des Surfactant. Bei typischer Zytologie und eindeutiger Verschiebung der Surfactant- Zusammensetzung darf die Diagnose einer PAP als gesichert gelten. Nur im Zweifelsfall ist bei den schwerkranken Patienten eine diagnostische Lungenbiopsie durchzuführen. Neben der bekannten SP-B Defizienz, die mittlerweile auch bei Erwachsenen diagnostiziert wurde (Nogee, pers. Kommunikation), sind SP-D und SP-A zu quantifizieren. Zu den bekannten Störungen der SP-A Homöostase gehört das Auftreten abnormen SP-A's mit einem hohen Anteil nicht- verknüpfbarer  $\beta$  Ketten oder verminderter Bindungsfähigkeit an Pneumozyten Typ II und konsekutiver Aufhebung der Rückkopplungshemmung der SP- Produktion (Berg, 2000). Es

kann auch abnormes SP-A nachgewiesen werden, das kein tubuläres Myelin bilden kann (Hattori, 1996) oder welches durch Bindung an Immunglobulin funktionsunfähig (Hattori, 1997) geworden ist. Des Weiteren kann nach Antagonisten für die Surfactantprotein- Rezeptoren gefahndet werden (Griese, 2002).

Unter den Zytokin-Imbalancen sind die verschiedenen Defekte im GM-CSF-Signaltransduktionsweg mit  $\beta$ c-Rezeptor Defizienz anti- GM-CSF Antikörpern (Kitamura, 1999) oder mangelnder GM-CSF Produktion (Thomassen, 2000) bisher am Besten untersucht. Im Mausmodell ist die IL4- (Ikegami, 2000) und die IL13- (Homer, 2002) Überexpression mit einer Alveolarproteinose assoziiert. Den hier benannten Untersuchungsparameter werden wahrscheinlich in den nächsten Jahren weitere hinzugefügt werden. Sie resultieren zum Teil auf Hypothesen, deren pathogenetische Relevanz es noch zu prüfen gilt. Da die Pathogenese für den Großteil der PAP Patienten bis dato nicht geklärt werden konnte, ist es lohnend allen Hinweisen auf mögliche Ursachen zu folgen, sofern für die Patienten keine großen Belastungen entstehen.

**Abbildung 9 Diagnostik der Alveolarproteinose**



## 6.2. Therapie

Die Therapieoptionen der PAP sind bis dato beschränkt und zumeist symptomatisch. Bei Erwachsenen kann die wiederholte Durchführung einer beidseitigen BAL kurativ sein. Eine Lungentransplantation kann bei kritischen Patienten im Säuglingsalter durchgeführt werden. Die 5-Jahres Überlebensrate dieser Patienten beträgt nach Lungentransplantation 55% und entspricht der Überlebensrate nach Lungentransplantationen, die aus anderen Indikationen durchgeführt wurden (Huddleson, 2002). Es ist jedoch oft nicht möglich ein geeignetes Spenderorgan zu bekommen. Für Patienten mit PAP und  $\beta$ c-Defizienz kann die Lungentransplantation keine therapeutische Option sein, da die transplantierten Lungen nach einiger Zeit wiederum von  $\beta$ c negativen Alveolarmakrophagen besiedelt sein würden und es zu einem Rezidiv der PAP kommen würde, wie es in Einzelfällen nach Lungentransplantation beschrieben wurde (Parker, 1997).

Die verbesserte ätiologische Einordnung der PAP öffnet den Weg zu neuen Therapiemöglichkeiten. Die kongenitale SP-B Defizienz kann prinzipiell durch Gentransfer in Pneumozyten Typ II mit einem SP-B Gen-tragenden Vektor geheilt werden. In den Arbeiten zur Gentherapie der zystischen Fibrose (CF) hat sich die Einbringung korrektiver Gene in die pulmonalen Zellen als äußerst schwierig erwiesen. Da die SP-B produzierenden Pneumozyten Typ II sich zudem nur selten teilen, wäre hierfür auf ein Vektorsystem zurückzugreifen, das auch in nicht-teilendes Gewebe integriert. Eine solche Möglichkeit bieten zum Beispiel die von dem humanen Immundefizienz Virus (HIV) abgeleiteten Lenti-Viren. Vor wenigen Monaten gelang erstmals eine *in vivo*- Korrektur des CF-Phänotyp durch intranasale Applikation des cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, (CFTR)- Gens in CFTR-gendeletierten Mäusen (Limberis, 2002).

Meine Arbeitsgruppe beschäftigt sich intensiv mit der genetischen Korrektur der  $\beta$ c-Defizienz. Dieses Krankheitsbild kann prinzipiell durch korrektiven

Gentransfer in hämatopoetische Zellen geheilt werden (Dirksen 1999, Anlage 5). Wir haben uns für den Einsatz retroviraler Vektorsysteme (Baum, 1997) entschieden, da diese vielfach klinisch erprobt wurden. In der bislang erfolgreichsten gentherapeutischen Behandlung einer monogenetischen Erkrankung, des X-Chromosom gekoppelten schweren kombinierten Immundefektes (X-SCID), bei der über einen retroviralen Vektor das korrektive Gen für die  $\gamma$  Kette des IL2 Rezeptors eingeschleust wurde, ist es allerdings 2002 zu zwei schweren unerwünschten Ereignissen mit Induktion von T-Zell Leukämien gekommen. Die bis dato erhobenen Daten lassen darauf schließen, dass diese Nebenwirkungen krankheitsspezifisch oder sogar Vektor-spezifisch sind. Die Arbeitsgruppe um Alain Fischer, Inserm, Paris, verwendete einen Vektor der die  $\gamma\delta$  Kette des T-Zellrezeptors aktiviert um so eine verstärkte Proliferation der genkorrigierten T-Zellen zu induzieren. Des weiteren integrierte das therapeutische Gen in beiden Fällen in der Nähe des Onkogens LMO2 (Kayser, 2003). Die Aktivierung von LMO2 Onkogen, findet sich gehäuft bei pädiatrischen Leukämien. Aufgrund der beiden Fälle ist eine erhöhte Wachsamkeit bei der Anwendung gentherapeutischer Strategien gefordert. Die Gentherapien für monogenetische Erkrankungen des Kindesalters wurden hierzulande bis auf weiteres gestoppt. Vor Anwendung einer klinischen Gentherapie wird nachgewiesen sein müssen, dass eine iatrogene Insertionsmutagenese unwahrscheinlich ist. Ein Schritt ist die Konstruktion von Vektoren die keine Aktivierung zelleigener Mechanismen zur Induktion einer vermehrten Proliferation induzieren. Zudem sollte in *in vivo* Versuchen, bei denen humane, genetisch korrigierte Zellen in immundefizienten Mäusen über Monate expandiert werden, die Sicherheit des Gentransfers überprüft werden. Mit Hilfe der Microarray Technologie kann gezielt festgestellt werden, ob das therapeutische Gen in der Nähe eines bekannten Onkogens integriert.

Es bleibt das Problem, dass der Gentransfer in Blutstammzellen mittels retroviraler Technologie, die derzeit für die klinische Umsetzung zur Verfügung steht, wenig effizient ist. Es ist daher eine *in vivo* Anreicherung genetisch korrigierter Zellen nach der Transplantation erforderlich die nicht in die

zelleigenen Regulationsmechanismen eingreift. Abgesehen von Erkrankungen, bei denen das therapeutische Gen selbst den korrigierten Zellen einen Selektionsvorteil verschafft, wird somit die Expression eines selektionierbaren Markergens erforderlich.

Da die  $\beta$ c-defizienten Zellen keine Alteration ihrer Proliferation und Differenzierung zeigen, ist zu erwarten, dass die  $\beta$ c-genkorrigierten Zellen keinen Wachstumsvorteil *in vivo* zeigen werden. Um den gentransduzierten Zellen einen Wachstumsvorteil zu ermöglichen und den Patienten eine belastende myelosuppressive Therapie zu ersparen, die bei dem kritischen Zustand der Kinder nicht tolerabel erscheint, haben wir den Selektionsmarker DHFR als zweites Gen in den retroviralen Vektor eingebaut. Die Selektion hämatopoetische Progenitoren mit niedrig dosiertem MTX erwies sich jedoch als nicht ausreichend, da die hämatopoetischen Vorläuferzellen einen alternativen Stoffwechselweg aktivieren können, mit dem sie der MTX Toxizität entgehen können (Publiktion in Vorbereitung). In einem aktuell genehmigten DFG Vorhaben wird meine Arbeitsgruppe daher zusammen mit einer Arbeitsgruppe aus dem Tumorzentrum Essen die O-Methylguanin DNA-Methyltransferase (MGMT) als Selektionsmarker für die hämatopoetische Gentherapie testen. Die MGMT- Mutante, die verwendet wird schützt die Zellen vor O<sup>6</sup>-Benzylguanin. Benzylguanin bindet an das katalytische Zentrum der MGMT und inaktiviert das Protein irreversibel. BG- resistente Mutanten der MGMT ermöglichen eine Anreicherung transduzierter Zellen während der chemotherapeutischen Behandlung. Ziel der Arbeit ist es, eine genetische Therapie der  $\beta$ c-PAP zu ermöglichen, um ein anwendbares Selektionssystem für die Gentherapie mit Blutstammzellen zu etablieren.

## 7. Literatur

Abonour R, Williams DA, Einhorn L, Hall KM, Chen J, Coffman J, Traycoff CM, Bank A, Kato I, Ward M, Williams SD, Hromas R, Robertson MJ, Smith FO, Woo D, Mills B, Srouf EF, Cornetta K. (2000) Efficient retrovirus-mediated transfer of the multidrug resistance 1 gene into autologous human long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* 6: 652-658

Albafouille V, Sayegh N, De Coudenhove S. (1999) CT Scan patterns of pulmonary alveolar proteinosis in children. *Pediatr. Radiol* 29: 147- 152

Allay JA, Persons DA, Galipeau J, Riberdy JM, Ashman RA, Blakeley L, Sorrentino BP (1998) In vivo selection of retrovirally transduced hematopoietic stem cells. *Nat Med.* 4: 1136-1143

Berg Z, Leth –Larson R, Holmskov U, Hojrup P. (2000) Structural characterisation of human proteinosis surfactant protein A. *Biochim Biophys Acta* 1543: 159- 173

Berthaud P, Eugene-Jolcine I, Spielmann M, Le chevalier T, Turz T. (1993) Essai de phase I d' un granulocyte-macrophage stimulating factor (GM-CSF) humaine recombinant. Resultats chez des maladies atteints de tumeurs solides. *Bull cancer* 80: 418

Baum C, Ithi K, Meyer J, Laker C, Ito J, Ostertag E. (1997) The potent enhancer activity of the polycythemic strain of spleen focus –forming virus in hematopoietic cells is governed by a binding site for Sp1 in the up-stream control region and by a unique enhancer core motif, creating an exclusive target for PEBP/CBF. *J. Virol.*71: 6323-6331

Berghmans T, Paesmans M, Lafitte JJ, Mascaux C. Meert AP, Jacquy C, Burniat A, Steels E, Vallot F, Sculier JP. (2002) Therapeutic use of granulocyte and granulocyte-macrophage colony –stimulating factors in febrile neutropenic cancer patients. A systematic review of the literature with meta analysis. *Support Care Cancer* 10: 181-188

Buechner HA, Ansari A. (1969) Acute silico proteinosis. A new pathological variant of acute silicosis in sandblasters characterized by histological features resembling alveolar proteinosis. *Dis Chest* 53: 274-284

Burdach S, Nishinakamura R, Dirksen U, Murray R. (1998) The physiologic role of interleukin-3, interleukin-5, granulocyte- macrophage colony-stimulating factor, and the beta c receptor system. *Curr. Opin. Hematol.* 5: 177-180

Cornish JD (1993) Reply to treatment of congenital alveolar proteinosis. *J Pediatr.* 123: 495-496

Couderc LJ, Bernaudin JF, Epardeau B, Caubarrere I. (1996) Pulmonary alveolar proteinosis and disseminated mycobacterium avium infection. *Respir Med* 90: 641-2.

Doyle IR, Davidson KG, Barr HA, Nicholas TE, Payne K, Pfitzner J. (1998) Quantity and Structure of Surfactant Proteins vary among patients with Alveolar Proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 658-664

Floros J, Steinbrinck R, Jacobs K, Phelbs D, Kriz R, Reeny M, Sultzmann L, Jones S, H. W. Tausch, Frank HA, Fritsch EF (1986) Isolation and characterization of cDNA clones for the 35 kDa pulmonary surfactant associated protein. *J. Biol. Chem.* 61: 9029-9033

Golde DW, Territo M, Finley TN, Cline MJ. (1976) Defective lung macrophages in pulmonary alveolar proteinosis. *Annals of Internal Medicine* 85: 304-309

Goldstein LS, Kavuru MS, Curtis Mc Carthy P, Christie HA, Farver C, Stoller JK. (1998) Pulmonary alveolar proteinosis: clinical features and outcomes. *Chest*:114: 1357-1362

Goldstein LS, Kavuru MS, Stoller JK. (1999) Pulmonary alveolar proteinosis: a review *Clin. Pulm. Med* 6: 102-109

Griese M, Tredano M, Nicolai T, Bahuau M. (2002) Molekulare Grundlagen und Klinik der pulmonalen Alveolarproteinosen. *Deutsches Ärzteblatt* 99: A-1013- A 1023

Haas R, Ho AD, Bredthauer U, Cayeux S, Egerer G, Knauf W, Hunstein W. (1990) Successful autologous transplantation of blood stem cells mobilized with recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Exp. Hematol* 18: 94

Hamvas A, Cole S de Mello DE, Moxley M, Whitsett JA, Colten HR, Nogee LM. (1994) Surfactant protein B deficiency: antenatal diagnosis and prospective treatment with surfactant replacement. *J Pediatr* 125: 356- 361

Haneline L, Broxmeyer H, Cooper S, Carreau M, Buchwald M, Clapp DW. (1998) Hematopoiesis in Fac mice. 10. Fanconi Anemia Scientific Symposium Denver. CO. Nov 1-2

Hanenberg H, Batish SD, Pollok KE, Vieten L, Verlander PC, Leurs C, Cooper RJ, Götsche K, Haneline L, Clapp DW, Lobitz S, Auerbach AD Williams DA. (1998) Phenotypic correction of primary T cells from patients with Fanconi anaemia with retroviral vectors as a diagnostic tool. *Exp Hematol* 30: 410-420

Hattori A, Kuroki Y, Katho T, Takahashi H, Shen HQ, Suzuki Y, Akino T. Surfactant protein accumulating in the alveoli of patients with pulmonary alveolar proteinosis: oligomeric structure and interaction with lipids. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14: 608-19

Hattori A, Kuroki Y, Takahashi H, Sohma H, Akino T. (1997) Immunglobulin G is associated with surfactant protein A aggregate isolated from patients with pulmonary alveolar proteinosis. 155: 1785-1788

Hawley RG. (1994) High titer retroviral vectors for efficient transduction of functional genes into murine hematopoietic stem cells. *Ann NY Acad Sci.* 716: 327- 330

Homer RJ, Zheng T, Chupp G, He S, Zhu Z, Chen Q, Ma B, Hite RD, Gobran LI, Rooney SA, Elias JA. (2002) Pulmonary type II cell hypertrophy and pulmonary lipoproteinosis are features of chronic IL-13 exposure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: 52- 59

Hook GER. (1991) Alveolar Proteinosis and phospholipidosis of the lung. *Toxicol Pathol* 19: 482- 513

Huddleson CB, Bloch JB, Sweet SC, de la Morena M, Patterson GA, Mendeloff EN. (2002) Lung transplantation in children. *Ann Surg* 236: 270- 276

Huffman JA, Hull WM, Dranoff G, Mulligan RC, Whitsett JA. (1996) Pulmonary epithelial cell expression of GM-CSF corrects the alveolar proteinosis in GM-CSF-deficient mice. *J. Clin Invest* 97: 649- 655

Ikegami M, Whitsett JA, Chroneos ZC, Ross GF, Reed JA, Bachurski CJ, Jobe AH. (2000) IL-4 increases surfactant and regulates metabolism in vivo. *Am J Lung Cell Mol Physiol* 278: 75- 80

Joenje H, Oostra AB, Wijker M, di Summma FM, van Berkel CG, Rooimans MA, Ebell W, van Weel M, Pronk JC. (1997) Evidence for at least eight Fanconi anemia genes. *Am J Hum Genet.*61: 940-944

Kayser J. (2003) Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial. *Science* 299: 495

Keller, CA, Frost A, Cagle PT, Abraham JL. (1995) Pulmonary alveolar proteinosis in a painter with elevated concentrations of titanium. *Chest*: 108: 277- 280

Kitamura T, Onishi M, Kinoshita S, Shibuya A, Miyajima A, Nolan GP. (1995) Efficient screening of retroviral cDNA expression libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92: 9146-9150

Kitamura T, Tanaka N, Watanabe J, Uchida, Kanegasaki S, Yamada Y, Nakata K. (1999) Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 190:875- 880

Kramer HJ, Schmidt R, Gunther A, Becker G, Suzuki Y(1995) ELISA technique for quantification of surfactant protein B (SPB) in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J.Respir Crit Care Med.* 152:1540-1544

Lee YC, Chew GT, Robinson BW. (1999) Pulmonary and meningeal cryptococcosis in pulmonary alveolar proteinosis. *Aust N Z J Med* 29: 843-844

Lehrnbecher T, Welte K. (2002) Haematopoietic growth factors in children with neutropenia. *Br J Haematol* 116: 28- 56

Lieschke GJ, Maher D, Ceborn J, O`Connor M, Green M, Sheridan W, Boyd A, Rallings M, Bonnem E, Metcalf D, Burgess AW, McGrath K, Fox RM, Morsztyn G. (1998) Effects of bacterial synthesized recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in patients with advanced malignancy. *Ann intern. Med* 110: 357

Limberis M, Anson DS, Fuller M, Parsons DW. (2002) Recovery of airway cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function in mice with cystic fibrosis after single-dosis Lentivirus-mediated gene transfer. *Human gene therapy* 13: 1961-1970

Mahut B, Delacout C, Scheinmann P, de Blic J, Mani TM, Fournet JC, Bellon G. (1995) Pulmonary alveolar proteinosis: Experience with eight pediatric cases and a review *Pediatrics.* 117-122

Moulton SL, Krous HF, Meritt TA, Odell RM, Gangitano E, Cornish JD. (1992) Congenital pulmonary alveolar proteinosis: failure of treatment with extracorporeal life support. *J Pediatr* 120: 297-302

Nakata K, Gotoh H, Watanabe J, Uetake T, Komuro I, Yuasa K, Watanabe S, Ieki R, Sakamaki H, Akiyama H, Kudoh S, Naitoh M, Satoh H, Shimada K. (1999) Augmented proliferation of human alveolar macrophages after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 93: 667- 673

Nishinakamura R, Nakayama N, Hirabayashi Y, Inoue T, Aud D, McNeil T, Azuma S, Yoshida S, Toyoda Y, Arai K. (1995) Mice deficient for the IL-3/GM-CSF/IL-5 beta c receptor exhibit lung pathology and impaired immune response, while beta IL3 receptor-deficient mice are normal. *Immunity*. 2: 211-222

Nogee LM, deMello DE, Dehmer LP, Colten HR. (1993) Brief report :deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis *N Engl J Med* 328: 406-410

Nogee 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

Onishi M, Kinoshita S, Morikawa Y, Shibuya A, Phillips J, Lanier LL, Gorman DM, Nolan GP, Miyajima A, Kitamura T. (1996) Applications of retrovirus-mediated expression cloning. *Exp. Hematol.* 24: 324-329

Parker LA, Novotny DB. (1997) Recurrent alveolar proteinosis following double lung transplantation. *Chest* 111: 1457- 1458

Pison U, Max M, Neuendank S, Weissbach S, Pietschmann S. (1994) Host defense capacities of pulmonary surfactant: evidence for non-surfactant functions of the surfactant system. *Eur. J. Clin. Invest.* 24: 586-599

Ramirez RJ, Schultz RB, Dutton RE. (1963) Pulmonary alveolar proteinosis: A new technique and rationale for treatment. *Arch. Intern. Med.* 112: 419-431

Ramirez –Rivera J, Harlan WR. (1968) Pulmonary alveolar proteinosis: nature and origin of alveolar lipid *Am J Med* 45: 502-512

Ranchod M, Bissell M. (1979) Pulmonary alveolar proteinosis and cytomegalovirus infection *103: 139-142*

Reid KBM, Lawson P, Hoppe HJ, Wang JY, Lu J, Lim LB, Holmskov U. (1995) Human and bovine lung surfactant protein D: cloning, expression and functional studies involving the binding to allergens and receptors. *Appl Cardiopulmonol Pathophysiol* 5: 96-98

Rice WR, Sarin VK, Fox JL, Baatz J, Wert S, Whitsett JR. (1989) Surfactant peptides stimulate uptake of phosphatidylcholine by isolated cells. *Biochem Biophys Acta* 1006: 237-245

Robb L, Drinkwater CC, Metcalf D, Li R, Kontgen F, Nicola NA, Begley CG. (1995) Hematopoietic and lung abnormalities in mice with a null mutation of the common beta subunit of the receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukins 3 and 5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92: 9565-9569

Rosen SH, Castleman B, Liebow AA. (1958). Pulmonary Alveolar Proteinosis. *N. Engl. J. Med.* 258: 1123-1125

Sakai Y, Abo W, Yoshimura H, Sano H, Kuroki Y, Satoh M, Kaimori M. (1999) Pulmonary alveolar proteinosis in infants. *Eur J Pediatr.* 158: 424- 426

Seymour JF, Dunn AR, Vincent JM, Presneill JJ, Pain MC. (1996) Efficacy of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in acquired alveolar proteinosis. *N Engl J Med* 335:1924-1925

Seymour JF, Begley CG, Dirksen U, Presneill JJ, Nicola NA, Moore PE, Schoch OD, van Asperen P, Roth B, Burdach S, Dunn AR. (1998) Attenuated hematopoietic response to granulocyte-macrophage colony- stimulating factor in patients with acquired pulmonary alveolar proteinosis. *Blood* 92: 2657-2667

Shah PL, Hansell D, Lawson PR, Reid KB, Morgan C. (2000) Pulmonary alveolar proteinosis: Clinical aspects and current concepts on pathogenesis. *Thorax* 55: 67-77

Stanley E, Lieschke GJ, Grail D, Metcalf D, Hodgson G, Gall JA, Maher DW, Cebon J, Siniskas V, Dunn AR. (1994) Granulocyte macrophage stimulating factor –deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc Natl. Acad. Sci.* 91: 5592-5596

Takahashi T, Munakata M, Suzuki I, Kawakami. (1998) Serum and bronchoalveolar fluid KL-6 levels in patients with pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Resp Crit Care Med* 158: 1294-1298

Thomassen MJ, Yi T, Raychaudhuri B, Malur A, Kavuru MS. (2000) Pulmonary alveolar proteinosis is a disease of decreased availability of GM-CSF rather than an intrinsic cellular defect. *95: 85-92*

Tirnoveau G, Dobresco G, Gheorghiu C. (1972) Alveolar proteinosis in infants coexisting with viral (cytomegalo-virus and measles virus) and microbial infections *Rev Med Chir Soc Med* 76: 187-193

Vadhan-Raj S, Buescher S, LeMaistre A, Keating M, Walters R, Ventura C, Hittelman W, Broxmeyer HE, Gutterman JU. (1988) Stimulation of hematopoiesis in patients with bone marrow failure and in patients with malignancy by recombinant human granulocyte – macrophage colony stimulating factor. *Blood* 72: 134

Watanabe K, Sueishi K, Tanaka K, Nagata N, Hirose N, Shigematsu N, Miake S, Yoshida M. (1990) Pulmonary alveolar proteinosis and disseminated atypical mycobacteriosis in a patient with busulfan lung. *Acta Pathol JPN* 40: 63-66

Weaver TE, Whitsett JA. (1991) Function and regulation of expression of pulmonary surfactant-associated proteins. *Biochem J* 273: 249-264

Wright JR. (1997) Immunomodulatory Functions of Surfactant. *Physiological Reviews* 77: 931-962