

Technische Universität München

Fakultät für Medizin

Die trunkierte Spleißvariante der beta-Kette des GM-CSF Rezeptors
dient als Biomarker für den Schweregrad der respiratorischen
Beeinträchtigung des Neugeborenen bei Geburt

Verena Roswitha Schulte

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades einer

Doktorin der Medizin

genehmigten Dissertation (Dr. med.)

Vorsitzender: Prof. Dr. Lars Mägdefessel

Prüfer*innen der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. Esther Rieger-Fackeldey, Ph.D.
2. apl. Prof. Dr. Vanadin Regina Seifert-Klauss

Die Dissertation wurde am 26.10.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 12.04.2022 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	4
1.1.	SURFACTANTHOMÖOSTASE UND PULMONALE ALVEOLARPROTEINOSE.....	4
1.2.	DER GRANULOZYTEN-MAKROPHAGEN-KOLONIE STIMULIERENDE FAKTOR (GM-CSF).....	7
1.3.	DER GM-CSF-REZEPTOR.....	9
1.4.	DIE ROLLE DES GM-CSF SIGNALWEGES BEI DER PULMONALEN ALVEOLARPROTEINOSE	11
1.5.	DIE TRUNKIERTE FORM DER β_C -KETTE DES GM-CSF-REZEPTORS: β_{IT}	13
1.6.	FRAGESTELLUNG	15
2.	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1.	PATIENTENKOLLEKTIV	16
2.2.	DER RESPIRATORISCHE SCORE.....	17
2.3.	LABORMETHODEN UND β_{IT} EXPRESSIONSKOEFFIZIENT.....	18
2.4.	STATISTIK UND ETHIK.....	19
3.	ERGEBNISSE.....	20
3.1.	PATIENTENKOLLEKTIV	20
3.2.	DER β_{IT} -EXPRESSIONSKOEFFIZIENT UND DER RESPIRATORISCHE SCORE	22
3.3.	DER β_{IT} -EXPRESSIONSKOEFFIZIENT BEI NEU- UND FRÜHGEBORENEN.....	24
3.4.	DER β_{IT} -EXPRESSIONSKOEFFIZIENT IM VERLAUF DER SERIELLEN BLUTPROBEN	25
4.	DISKUSSION.....	26
5.	ZUSAMMENFASSUNG	30
6.	DANKSAGUNG	31
7.	REFERENZEN	32

Abkürzungen

AA	Aminosäure
Bp	Basenpaar
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
f	weiblich
FG	Frühgeborenes
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GM-CSF-R	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor Rezeptor
IL	Interleukin
IQR	Interquartilbereich
JAK	Januskinase
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
NG	Neugeborenes
m	männlich
PAP	Pulmonale Alveolarproteinose
PAS	Periodic acid Schiff
Rt-PCR	real time Polymerase Kettenreaktion
RDS	Respiratory distress syndrome
RS	Respiratorischer Score
SP-A/B/C/D	Spezifisches Surfactantprotein A/B/C/D
SSW	Schwangerschaftswoche
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

1. Einleitung

1.1. Surfactanthomöostase und Pulmonale Alveolarproteinose

Surfactant (=surface active agent) bezeichnet ein Gemisch aus verschiedenen Lipiden (90%) und Proteinen (10%), welches im Rahmen der fetalen Lungenreifung ab der 35. Schwangerschaftswoche (SSW) in den Pneumozyten II gebildet und von diesen in den Alveolarraum sezerniert wird. Den Hauptteil der Lipide machen Phospholipide aus, das wichtigste mit einem Anteil von 70-80% stellt Phosphatidylcholin dar. Die Proteinfraction kann in eine spezifische Surfactant-Protein Fraktion (50%) und Surfactant-unspezifische Proteine (z.B. Albumin, Lysozym) unterteilt werden. Zu den spezifischen Surfactant-Proteinen (SP) gehören die hydrophilen Proteine SP-A und SP-D, sowie die hydrophoben Proteine SP-B und SP-C (Possmayer 1988). Surfactant-Lipide werden von den Pneumozyten II in Form sog. Lamellarkörperchen („lamellar bodies“) in die Alveole abgegeben, wo sie sich gitternetzartig anordnen und das sog. tubuläre Myelin bilden. Im Sinne einer alveolären Homoöstase erfolgt der Großteil (50-85%) des Surfactantabbaus durch Wiederaufnahme in die Pneumozyten II (Hallman, Epstein, and Gluck 1981; Jacobs et al. 1982; Magoon et al. 1983). Weitere Ursachen für Surfactantabbau sind Aufnahme in Alveolarmakrophagen (10-20%) (Nichols 1976; Miles, Ma, and Bowman 1988; Walker, Williams, and Benson 1986) oder in geringem Teil (<10%) durch mukoziliäre Clearance (Benson et al. 1983).

Surfactant erleichtert die Entfaltung der kollabierten Alveolen des Neugeborenen (NG), verhindert den expiratorischen Kollaps der Alveolen und terminalen Bronchiolen durch Minderung der Oberflächenspannung und spielt zudem eine Rolle in der Abwehr schädlicher exogener Einflüsse (z.B. Infektionen). Störungen des Surfactantmetabolismus und damit einhergehende Erkrankungen entstehen durch eine Dysbalance zwischen Sekretion und Abbau von Surfactantmaterial. Mangel an Surfactant führt beim Neugeborenen zum sog. respiratory distress syndrom (RDS), welches sich klinisch meist unmittelbar nach Geburt durch Symptome wie Tachypnoe, Nasenflügeln und Zyanose zeigt (Batenburg 1992). Während ca. 1% aller Neugeborenen am RDS erkranken, sind bei Frühgeborenen (FG) bis zur 30. SSW bis zu 60% betroffen.

Neben einem Mangel an Surfactant kann auch eine intraalveoläre Akkumulation von Surfactantlipiden und -proteinen zur respiratorischen Insuffizienz führen, was dem Krankheitsbild der Pulmonalen Alveolarproteinose (PAP) entspricht. Histopathologisch finden sich bei der PAP Alveolen, die mit eosinophilem, fein granuliertem Material gefüllt sind (Rosen et al. 1958). Die Pulmonale Alveolarproteinose ist eine seltene Erkrankung, in der Literatur wird ihre Inzidenz mit 0,36 Erkrankungen pro eine Millionen Patientenjahre angegeben und ihre Prävalenz mit 3,7 pro eine Million, zudem wird von einem Überwiegen männlicher Patienten ausgegangen (m:f = 3:1) (Seymour and Presneill 2002; Shah et al. 2000). Die Erkrankung kann in jedem Lebensalter vorkommen und es werden neonatale (Coleman et al. 1980) von kindlichen (Mahut et al. 1996) und adulten (Prakash et al. 1987) Manifestationen unterschieden. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr (Inoue et al. 2008). Typische Symptome der PAP im Erwachsenenalter sind subakute Belastungsdyspnoe, nicht produktiver Husten und Allgemeinsymptome wie Abgeschlagenheit und gelegentlich Fieber. Bei Kindern fallen initial trockener Husten, Gewichtsverlust und Dyspnoe auf. Neugeborene können sich bereits kurz nach Geburt mit schwerer respiratorischer Insuffizienz zeigen. Diagnostisch können körperliche Untersuchung mit Auskultation von Rasselgeräuschen, sowie ein Röntgen Thorax mit Nachweis von bilateralen, interstitiellen Verschattungen bereits hinweisend sein. Mittels hochauflösender Computertomographie können homogene, milchglasartige Trübungen, sowie verdickte Alveolarsepten gefunden werden (Holbert et al. 2001). Diagnostischer Goldstandard ist die Bronchiallavage mit Nachweis von milchig-trüber Lavageflüssigkeit mit Nachweis von PAS-positivem, Lipoprotein reichem Material (Chou et al. 2001), die Lavage kann zudem therapeutisch eingesetzt werden (Zhao et al. 2015).

1993 konnte bei Neugeborenen mit PAP erstmals eine vollständige SP-B Defizienz mit autosomal-rezessivem Erbgang als molekulare Ursache der Pulmonalen Alveolarproteinose nachgewiesen werden. Unter physiologischen Bedingungen trägt SP-B zur Organisation der Phospholipide in den Lamellarkörperchen sowie Strukturbildung des tubulären Myelins bei (Stahlman et al. 2000). Ferner spielt es eine Rolle bei der Geschwindigkeit der Ausbildung des Surfactantfilms entlang der Alveolarmembran (Nag et al. 1999), sowie der Prozessierung der Vorstufe Pro-SP-C zu SP-C (Vorbroker et al. 1995) und ist damit an der Surfactanthomöostase beteiligt. Fehlendes SP-B führt zu einer mangelhaften Umwandlung von Pro-SP-C zu SP-C und

es kommt zu einer Anhäufung von Pro-SP-C im Alveolarraum mit konsekutiver Beeinträchtigung des Gasaustausches entlang der Alveolarmembran (Nogee et al. 1993). Inzwischen sind mehr als 20 weitere Mutationen im SP-B Gen beschrieben, die zur kongenitalen SP-B-Defizienz und dem klinischen Bild einer PAP führen. Diese kranken Neugeborene zeigen klinisch bereits in den ersten Lebensstunden Zeichen eines schweren Atemnotsyndroms, welches stets fatal verläuft. Überleben ist aktuell nur durch eine Lungentransplantation möglich (Kurath-Koller et al. 2015; Hamvas et al. 1997). Daneben existieren weitere genetische Formen, die mit einem partiellen SP-B Mangel einhergehen. Klinisch verlaufen diese milder und reichen von Tachypnoe bis hin zu Intensiv- und Beatmungspflichtigkeit (Dunbar et al. 2000; Klein et al. 1998).

1.2. Der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierende Faktor (GM-CSF)

Der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierende Faktor ist ein 23kDa großes Glykoprotein, welches 1980 entdeckt wurde in seiner Funktion, die Ausdifferenzierung von Granulozyten und Makrophagen aus Vorläuferzellen im Knochenmark zu fördern (Burgess and Metcalf 1980). Später wurde seine Rolle als proinflammatorisches Zytokin in verschiedenen autoimmunen und inflammatorischen Prozessen erkannt. GM-CSF wird von verschiedenen Zellen produziert, u.a. von T- und B-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten. Verschiedene Zytokine können die Produktion von GM-CSF stimulieren (z.B. Interleukin-1 β , Interleukin-12, Prostaglandine) (Duhon and Campbell 2014; Quill, Gaur, and Phipps 1989), andere diese wiederum inhibieren (z.B. Interferon- γ , Interleukin-4, Interleukin-10) (Ozawa et al. 1996; Jansen 1989; Sagawa et al. 1996). GM-CSF selbst fördert die Produktion proinflammatorischer Zytokine, sowie die Antigenpräsentation, Phagozytose und Chemotaxis von Leukozyten (Fleetwood et al. 2007; Gomez-Cambronero et al. 2003; Morrissey et al. 1987; Alvaro-Gracia 1989; Shibata et al. 2001). Vermittelt wird die Signaltransduktion von GM-CSF über den GM-CSF-Rezeptor, auf dem im nächsten Kapitel weiter eingegangen werden soll. GM-CSF spielt u.a. eine zentrale Rolle bei der Entwicklung chronisch entzündlicher Erkrankungen des zentralen Nervensystems wie der Multiplen Sklerose. Auch bei der rheumatoiden Arthritis wird GM-CSF eine wichtige Bedeutung zugesprochen. Phase-I und -II Studien mit Antikörpern gegen GM-CSF wurden bei Patienten mit Multipler Sklerose bzw. Rheumatoider Arthritis bereits durchgeführt und zeigen erste positive Ergebnisse (Shiomi and Usui 2015).

In besonderem soll nun auf die Rolle von GM-CSF bei der PAP eingegangen werden, wo es entscheidend an deren Entstehung beteiligt ist. Mittels knock-out Mäusen für GM-CSF konnte gezeigt werden, dass GM-CSF benötigt wird, um den Surfactantkatabolismus zu stimulieren. Außerdem ist es von großer Bedeutung für die Ausdifferenzierung von Alveolarmakrophagen und damit für die Erhaltung der Immunabwehr (Shibata et al. 2001). Knock-Out Mäuse für GM-CSF haben eine erhöhte Anfälligkeit für pulmonale und intestinale Infekte, was dessen besondere Rolle in der Immunantwort v.a. in der Lunge und im Intestinum – beides Organe,

die in besonderem Maße Erregern aus der Umwelt ausgesetzt sind – anzeigt (Shiomi and Usui 2015; Stanley et al. 1994; LeVine et al. 1999; Hirata et al. 2010).

Im Mausmodell konnten ferner Deletionen im Gen für den GM-CSF oder für die beta-Untereinheit (β_c , s. 1.3) des GM-CSF-Rezeptors (GM-CSF-R, s. 1.3) als Ursache für eine PAP identifiziert werden (interessanterweise hatten die Mäuse nur minimale Einschränkungen der Hämatopoese) (Dranoff et al. 1994; Stanley et al. 1994; Nishinakamura et al. 1995). Das im Alveolarraum dieser Mäuse akkumulierte Material war strukturell, biochemisch und funktionell dem normalen Surfactant ähnlich (Ikegami et al. 1996; Carey and Trapnell 2010). Ursache der fehlerhaften Surfactanthomöostase und der Akkumulation war nicht eine reduzierte Surfactantclearance durch Pneumozyten Typ II, sondern durch Alveolarmakrophagen (Ikegami et al. 1997).

1.3. Der GM-CSF-Rezeptor

Der GM-CSF-Rezeptor wird hauptsächlich auf myeloischen Zellen (einschließlich Makrophagen) exprimiert, aber auch auf Pneumozyten II (Goodall et al. 1993; Huffman Reed et al. 1997). Er besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit: die α -Kette ist verantwortlich für die Ligandenbindung, ist spezifisch für GM-CSF und kann dieses mit niedriger Affinität binden. Die β -Kette dagegen ist für die Signaltransduktion in die Zelle notwendig. Sie ist zudem nicht nur Teil des GM-CSF-Rezeptors: die gleiche Rezeptoruntereinheit wird auch für die Signaltransduktion von Interleukin-3 (IL-3) und Interleukin-5 (IL-5) genutzt und als sog. β common chain bezeichnet (β_c). Diese gemeinsame Rezeptoruntereinheit kann die z.T. ähnlichen Funktionen von GM-CSF, IL-3 und IL-5 erklären (Stimulation von Proliferation, Differenzierung und Aktivierung myeloischer Zellen) (Nicola et al. 1996; Gearing et al. 1989).

Die extrazellulären Abschnitte der α - und β_c -Ketten sind über eine kleine juxtramembrane Domäne mit einer transmembranen Domäne verbunden, welche von einer zytoplasmatischen Domäne gefolgt ist. Über die juxtramembranen, transmembranen und intrazellulären Abschnitte gibt es bislang wenig strukturelle Untersuchungen, der extrazelluläre Abschnitt dagegen ist gut charakterisiert.

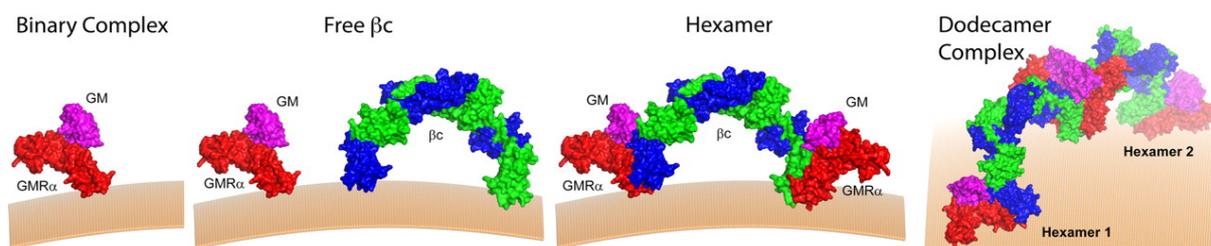


Abbildung 1: Bildung des GM-CSF-Rezeptorkomplex, einem Dodekamer aus vier α -Ketten, vier β_c -Ketten und vier GM-CSF Molekülen (Hercus et al. 2009)

Im Rahmen der Ligandenbindung bildet GM-CSF zunächst einen binären Komplex mit einer α -Kette. Zwei dieser binären Komplexe verbinden sich dann mit einem freien, homodimeren β_c -Komplex zu einer hexameren Konfiguration. Ein hexamer Komplex besteht somit aus zwei α -

Ketten, zwei β_c -Ketten und zwei GM-CSF Molekülen. In dieser Konfiguration ist allerdings aufgrund der räumlichen Entfernung der intrazellulär lokalisierten Januskinasen noch keine Signaltransduktion möglich. Erst durch die Bildung eines sog. dodekameren Komplex aus zwei dieser hexameren Konfigurationen kann β_c auf der proximalen, zytoplasmatischen Seite mit Januskinasen (JAK) assoziieren und diese transphosphorylieren, was im weiteren den intrazellulären Signalweg durch nachfolgende Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren in Gang setzt (Broughton et al. 2015; Sakamaki et al. 1992).

1.4. Die Rolle des GM-CSF Signalweges bei der Pulmonalen Alveolarproteinose

1997 gelangen Dirksen et al. der Nachweis einer weiteren genetischen Ursache für die Pulmonale Alveolarproteinose beim Menschen. Sie fanden bei drei von sieben pädiatrischen Patienten mit PAP eine verminderte Expression der β_c -Kette des GM-CSF-Rezeptors, bei einem dieser Patienten konnte ursächlich eine Punktmutation auf dem Gen des GM-CSF-Rezeptors gefunden werden (Dirksen et al. 1997). Auch Mutationen im Gen der α -Kette des GM-CSF-Rezeptors sind als Ursache der PAP beschrieben (Martinez-Moczygamba et al. 2008).

Der GM-CSF Signalweg ist von großer Bedeutung für die Regulation der Surfactanthomöostase, die Reifung der Alveolarmakrophagen, sowie der Aufrechterhaltung des Immunsystems in der Lunge (Griese 2017). Wie bereits ausgeführt (s. 1.2), kann eine genetisch bedingte, reduzierte Expression von GM-CSF im Mausmodell zum histopathologischen Bild einer PAP führen. Beim Menschen können Mutationen im Gen des GM-CSF-Rezeptors zur PAP führen (s.o.). Derartige Formen der PAP, die auf genetische Veränderungen im GM-CSF Signalweg zurückzuführen sind, werden als hereditäre PAP bezeichnet und gehören zu den sog. primären Formen der PAP. Als primäre PAP werden hierbei diejenigen Formen bezeichnet, die auf eine Störung des GM-CSF Signalweges zurückzuführen sind. Neben diesen primären, genetischen Formen existieren auch primäre, autoimmune Formen der PAP mit Nachweis neutralisierender Autoantikörper gegen GM-CSF (Inoue et al. 2008; Kitamura et al. 1999). Unabhängig vom Erkrankungsalter macht die autoimmune PAP mit 90% den Hauptteil aller PAP aus. Der Großteil der pädiatrischen PAP ist jedoch nicht autoimmun vermittelt, sondern gehört zu den primären genetischen, sowie den unten erwähnten kongenitalen Formen (Inoue et al. 2008).

Daneben existieren sog. sekundäre Formen, bei denen die PAP Epiphänomen einer zugrunde liegenden Erkrankung darstellt. Zu erwähnen ist hier v.a. das Vorkommen der PAP im Rahmen von hämatologischen Grunderkrankungen, z.B. bei Leukämien oder nach Knochenmarktransplantation. Die Pathogenese der sekundären PAP ist noch nicht gut verstanden, möglicherweise spielen aber auch hier Beeinträchtigungen des GM-CSF Signalweges eine Rolle (Carey and Trapnell 2010). So konnte bei Kinder mit akuter myeloischer

Leukämie und PAP eine verminderte Expression der β_c -Kette des GM-CSF-Rezeptors nachgewiesen werden (Dirksen et al. 1998).

Neben primären und sekundären Formen werden ferner kongenitale Formen der PAP unterschieden. Zu diesen werden angeborene Störungen des Surfactantmetabolismus gezählt, wie die bereits erwähnte autosomal-rezessive SP-B Defizienz (s. 1.1), diese sind somit unabhängig vom GM-CSF Signalweg.

1.5. Die trunkierte Form der β_c -Kette des GM-CSF-Rezeptors: β_{IT}

Wie im vorigen Kapitel beschrieben erreicht der menschliche Organismus für unterschiedliche Zytokine Rezeptorvielfalt, indem er eine gemeinsame Kette β_c , die für die Signaltransduktion in die Zelle verantwortlich ist, mit verschiedenen, spezifischen α -Ketten, die unterschiedliche Liganden binden, kombiniert. Eine andere Möglichkeit besteht darin, verschiedene sog. Isoformen einer Untereinheit eines Rezeptors zu exprimieren. Hierfür bedient sich der Organismus dem sog. alternativen Spleißen, d.h. der DNA-Abschnitt eines Gens kann in verschiedene mRNA-Abschnitte transkribiert werden, so dass aus einer Gen-Sequenz unterschiedliche Proteine entstehen können. Möglich wird dies, indem zunächst DNA in sog. prä-mRNA umgeschrieben wird, die noch eine exakte Kopie des DNA-Abschnitts darstellt und damit sämtliche Exons und Introns des DNA-Abschnitts enthält. mRNA und damit auch Proteinviefalt entsteht nun, indem erst im Rahmen des nun folgenden Spleißens durch variables Ausschneiden von Introns und Exons aus der prä-mRNA unterschiedliche Exons miteinander in einer reifen mRNA kombiniert werden.

Im Falle des GM-CSF-Rezeptors existiert eine durch alternatives Spleißen entstehende, natürlich vorkommende Isoform der β_c -Kette, welche erstmals 1997 in unserem Labor charakterisiert wurde (Hattenhorst, Dirksen, and Burdach 1997). Hierbei handelt es sich um ein Genprodukt mit deutlich verkürztem zytoplasmatischem Anteil im Vergleich zu β_c . Diese entsteht durch die Deletion eines 104bp großen Exons in der proximalen zytoplasmatischen Region mit konsekutiver Verschiebung des Leserasters. Während β_c einen zytoplasmatischen Teil von 423 Aminosäuren hat, ist dieser bei der Isoform mit 46 Aminosäuren (AA) deutlich kürzer, weshalb diese auch als trunkierte Form β_{IT} bezeichnet wird. Von diesen 46 zytoplasmatischen Aminosäuren sind die ersten 23 mit β_c identisch, die weiteren 23 Aminosäuren unterscheiden sich.

Das Vorhandensein von Splicevarianten von Rezeptoren ist nicht spezifisch für den GM-CSF Signalweg: Splicevarianten wurde ebenso bei der Interaktion des Granulozyten-stimulierenden Faktor, den Interleukinen 3 und 5, Erythropoetin, sowie Thrombopoetin mit

ihren jeweiligen Rezeptoren gefunden. Oft haben diese Splicevarianten inhibitorischen Charakter (Wang and Mehta 2020).

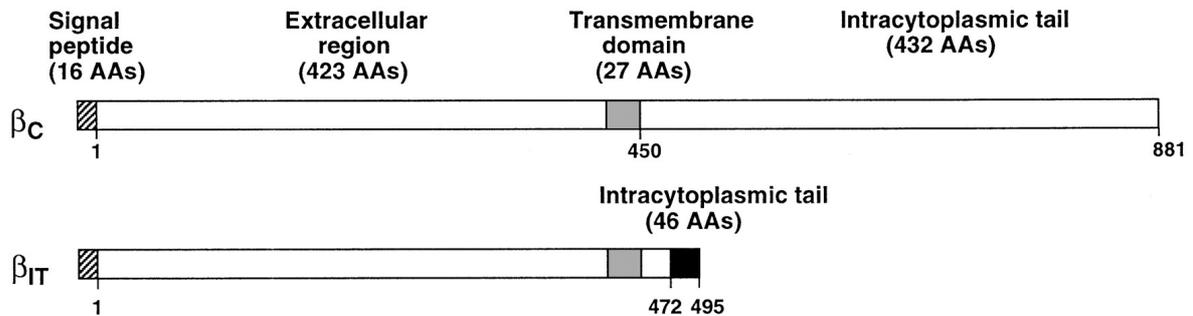


Abbildung 2: Proteinstruktur von β_c und β_{IT} : β_{IT} hat einen verkürzten zytoplasmatischen Teil mit 46 Aminosäuren (AAs) im Vergleich zu 432 Aminosäuren bei β_c (Gale et al. 1998)

Auch β_{IT} kann mit der α -Kette und GM-CSF einen hochaffinen Rezeptorkomplex bilden, ferner kann der verkürzte zytoplasmatische Teil von β_{IT} mit JAK assoziieren und diese transphosphorylieren. β_{IT} ist jedoch nicht in der Lage, ein mitogenes Signal in die Zelle zu transduzieren, es erfolgt keine Proliferation von GM-CSF stimulierten Zellen, die β_{IT} exprimieren. Ursächlich ist wohl das Fehlen einer weiteren Region des zytoplasmatischen Anteils der β -Kette, die für Übertragung des proliferativen Signals nach Binden von GM-CSF an den Rezeptor notwendig ist und welche zwar bei Bestandteil von β_c , nicht jedoch von β_{IT} ist (Gale et al. 1998). Vielmehr führt die Expression von β_{IT} sogar zu einer Inhibition der Zellproliferation (Wagner et al. 2001).

1.6. Fragestellung

1. Kann neben β_c die Isoform β_{IT} im peripheren Blut von Früh- und Neugeborenen nachgewiesen werden?
2. Korreliert die Expression von β_{IT} mit dem Ausmaß der pulmonalen Beeinträchtigung der Früh- und Neugeborenen unmittelbar nach Geburt?
3. Fällt die Expression von β_{IT} im weiteren zeitlichen Verlauf im Rahmen der pulmonalen Genesung wieder ab?

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

In die Studie wurden Kinder eingeschlossen, die zwischen dem 08.02.2018 und dem 25.06.2018 im Klinikum rechts der Isar geboren wurden. Es handelte sich um Kinder, bei denen innerhalb der ersten 24 Stunden im Rahmen des stationären Krankenhausaufenthaltes aus kindlicher oder mütterlicher Indikation eine venöse Blutabnahme durchgeführt wurde. Material aus diesen Blutabnahmen wurde – neben der Diagnostik für die eigentliche Indikation – zusätzlich für die vorliegende Studie verwendet. Bei einem Teil der Kinder wurden im weiteren Verlauf des stationären Aufenthaltes eine zweite sowie dritte Blutabnahme durchgeführt. Indikation war die Kontrolle pathologischer Werte aus der ersten Blutabnahme, es handelte sich hierbei ausschließlich um respiratorisch kranke Neu-/Frühgeborene (s. 2.2), die im Verlauf gesundeten. Diese Blutproben wurden ebenfalls für die vorliegende Studie verwendet.

Zu allen Kindern wurden zudem klinische Daten gesammelt: hierzu zählten Geschlecht, Alter, Schwangerschaftswoche bei Geburt, Geburtsgewicht, Diagnose bzw. medizinische Indikation der Blutabnahme, sowie Vitalparameter, Surfactantgabe und Parameter der nicht-invasiven und invasiven Beatmung.

2.2 Der respiratorische Score

Zur Beurteilung der Schwere der respiratorischen Beeinträchtigung innerhalb der ersten 24 Stunden nach Geburt wurde jedem Kind ein sog. respiratorischer Score (RS) zwischen 0 und 3 zugeordnet:

Score 0: keine Atemunterstützung notwendig/keine respiratorische Beeinträchtigung

Score 1: nicht-invasive Atemunterstützung mit „continuous positive airway pressure“ (CPAP) oder „spontaneous intermittent mandatory ventilation“ mit einem infant ventilator (Sophie®, Stephan Medizintechnik, Germany) für weniger als 30 Minuten nach Geburt

Score 2: nicht-invasive Atemunterstützung für 30 Minuten bis 48 Stunden nach Geburt

Score 3: nicht-invasive Atemunterstützung für mehr als 48 Stunden nach Geburt oder jede invasive Beatmung oder Surfactantgabe notwendig

Die Score 0 und 1 wurden zur Gruppe „gesund“ zusammengefasst, die Gruppen 2 und 3 zur Gruppe „krank“.

2.3. Labormethoden und β_{IT} Expressionskoeffizient

Die vorliegenden Blutproben wurden mittels Real-Time PCR (rt-PCR) auf das Vorhandensein von mRNA von β_{IT} und β_c untersucht. Hierbei wird zunächst die vorliegende RNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Im zweiten Schritt wird die gewonnene cDNA mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und durch Fluoreszenzmessung quantifiziert.

Zunächst wurde mittels QIAamp RNA Blood Mini KIT (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) RNA aus den Blutproben isoliert. Die vorliegende RNA wurde mit Hilfe des Agilent RNA 6000 Nano Kit auf Qualität geprüft und mit Hilfe des High Capacity cDNA Reverse Transcription KIT (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) in cDNA transkribiert. Als nächstes erfolgte die Amplifikation der so gewonnenen cDNA mittels TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Hierfür wurde 0,5 μ L cDNA, sowie 1 μ L eines Gen-spezifischen Primers inkl. Sonde (GM-CSF-R β_c bzw. GM-CSF-R β_{IT} bzw. beta-Actin (ACTB)) zu 18,5 μ L TaqMan Universal PCR Master Mix hinzugefügt, so dass sich ein Gesamtvolumen von 20 μ L ergab. ACTB diente hierbei als endogene Kontrolle. Im Folgenden wurde die Genexpression mittels Fluoreszenz Detektion im StepOnePlus Real-Time PCR System Terminal Cycling Block (Applied Biosystems) untersucht. β_{IT} und β_c Expression wurden zu ACTB in Relation gesetzt und mittel ddCt Methode quantifiziert.

Damit die Menge an Blutzellen der jeweiligen Blutprobe die Ergebnisse nicht beeinflusst, wurde bei jedem Kind ein Koeffizient aus der β_{IT} Expression und β_c Expression gebildet, der das Verhältnis der β_{IT} Expression zur β_c Expression angibt und im Folgenden: β_{IT} Expressionskoeffizient genannt wird. Zur weiteren statistischen Auswertung wurde der β_{IT} Expressionskoeffizient verwendet (s. 2.4).

2.4. Statistik und Ethik

Sämtliche Ergebnisse werden als Median mit 25. und 75. Quantile (= 1. bzw. 3. Quartile) dargestellt. Als Interquartilbereich (IQR) wird der Abstand zwischen 1. und 3. Quartile bezeichnet. Der Interquartilbereich, sowie der Median werden mithilfe von Boxplots visualisiert.

Zunächst wurden die β_{IT} Expressionskoeffizienten aller Kinder aus der ersten Blutabnahme untersucht. Hierfür wurde mittels Mann-Whitney-U-Test auf dem 5%-Signifikanzniveau die Korrelation zwischen den Gruppen 0/1 und 2/3 untersucht. Ebenso wurde die Korrelation der β_{IT} Expressionskoeffizienten zwischen den Gruppen 0 und 3 auf Signifikanz untersucht. Ergebnisse werden folgendermaßen dargestellt: [Median₁ (25. Quantile – 75. Quantile) vs. Median₂ (25. Quantile – 75. Quantile)]; p. Mittels zweifaktorieller Varianzanalyse wurde im Weiteren bei Kindern, bei denen serielle Blutproben verfügbar waren, die β_{IT} Expression im zeitlichen Verlauf untersucht. Für die Analysen stand die Software Sigmaplot 12.0 zur Verfügung (Systat Software, Inc, San Jose, CA, USA, 2010).

Die Berechnung der notwendigen Kohortengröße erfolgte auf Basis unveröffentlichter Untersuchungen an älteren und lungenkranken Patienten aus unserem Labor. Um mit einer power von 80% einen Unterschied auf dem 5%-Signifikanzniveau zeigen zu können, sind mindestens 11 Kinder in jeder Gruppe notwendig.

Davon ausgehend, dass zum einen gesunde Neugeborene nicht in der Lage sind, die gleiche Menge β_C und β_{IT} zu exprimieren wie ältere oder kranke Kinder, wurde diese Gruppengröße mit dem Faktor 3 multipliziert. Aufgrund sehr kleiner Probengrößen lag die endgültige Fallzahl bei 22 mal Faktor 2,7.

Die Eltern der Kinder gaben ihr schriftliches Einverständnis für die Studie. Das Studienkomitee der Technischen Universität München genehmigte die Durchführung der Studie (Number 524/17 S). Die Studie wurde in Übereinstimmung mit der World Medical Association Declaration of Helsinki konzipiert.

3. Ergebnisse

3.1. Patientenkollektiv

Die vorliegenden Ergebnisse wurden bereits 2021 in *Neonatology* veröffentlicht (Schulte et al. 2021). In die Studie wurden 59 Kinder eingeschlossen, die zwischen dem 08.02.2018 und dem 25.06.2018 im Klinikum rechts der Isar geboren wurden. Hierunter befanden sich 17 reife Neugeborene, sowie 42 Frühgeborene, es handelte sich um 28 Mädchen und 30 Jungen, das Geschlecht eines Kindes ließ sich nicht eruieren. Die Grundcharakteristika sind in Tabelle 1 aufgeführt:

Weiblich, n (%)	28 (47.5)
Geburtsgewicht, g (Median (IQR))	2123 (1481; 2830)
Gestationsalter, Wochen (Median (IQR))	34.6 (32.6; 37.4)
Reife Neugeborene, n (%)	17 (28.8)
Gestationsalter, Wochen (Median (IQR))	39.9 (39.0; 40.6)
Frühgeborene, n (%)	42 (71.2)
Gestationsalter, Wochen (Median (IQR))	33.6 (31.3; 34.9)
Respiratorischer Score (RS)	
0, n (%)	21 (35.6)
1, n (%)	8 (13.6)
2, n (%)	9 (15.3)
3, n (%)	21 (35.6)
Gesunde Neugeborene (RS 0, 1), n	12
Gesunde Frühgeborene (RS 0,1), n	17
Respiratorische Erkrankungen:	
Respiratory distress syndrome (%)	78
Transiente Tachypnoe des Neugeborenen (“wet lung disease“) (%)	8
Respiratorisches Versagen aufgrund von Pneumothorax/Asphyxie/Meconiumaspiration/unbekannt (%)	14

Tabelle 1: Grundcharakteristika der Kohorte (Schulte et al. 2021)

3.2. Der β_{IT} -Expressionskoeffizient und der respiratorische Score

Bei allen Kindern konnte β_{IT} Expression gefunden werden, also ein β_{IT} -Expressionskoeffizient > 0 gebildet werden. Gesunde Neugeborene zeigten einen Trend zu geringerer β_{IT} Expression als kranke Neugeborene [0.45 (0.21-2.00) vs. 1.90 (0.31-4.71)]; $p = 0.066$.

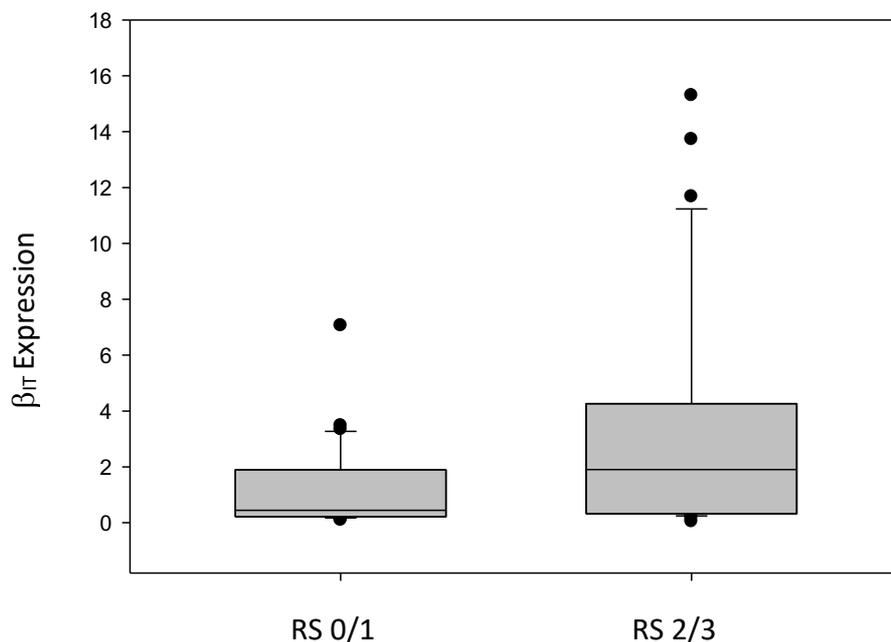


Abbildung 3: Die β_{IT} Expression in gesunden ($n=29$) und kranken ($n=30$) Neugeborenen zeigt einen Trend zu mehr β_{IT} Expression bei Kindern mit RS 2/3 im Vergleich zu Kindern mit RS 0/1 ($p=0.066$) (Schulte et al. 2021)

Neugeborene mit einem respiratorischen Score von 0 hatten signifikant weniger β_{IT} Expression als Neugeborene mit einem respiratorischen Score von 3 [(0.45 (0.21-1.80) vs. 2.08 (0.56-4.71)]; $p = 0.010$.

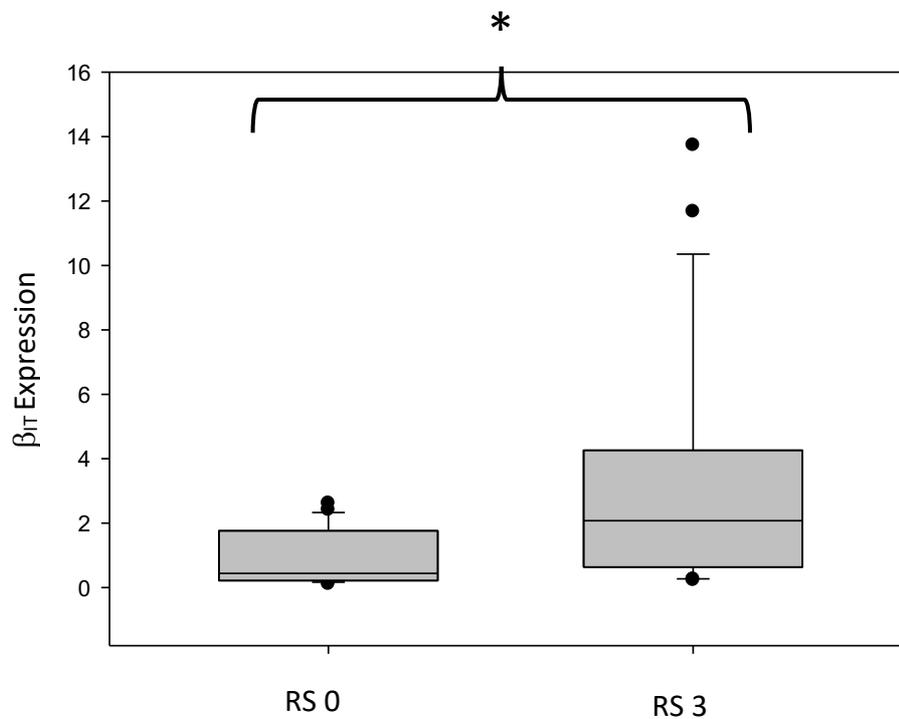


Abbildung 4: Die β_{IT} Expression bei Neugeborenen ist signifikant höher bei Kindern mit schwerer respiratorischer Beeinträchtigung (n=21; RS 3) als bei pulmonal gesunden Kindern (n=21; RS 0) (* $p=0.010$) (Schulte et al. 2021)

3.3. Der β_{IT} -Expressionskoeffizient bei Neu- und Frühgeborenen

Frühgeborene zeigten einen Trend zu vermehrter β_{IT} -Expression im Vergleich zu reifen Neugeborenen [1.75 (0.32 – 2.42) vs. 0.34 (0.17 – 1.53)]; $p=0.087$. Gesunde Frühgeborene exprimierten mehr β_{IT} als gesunde, reife Neugeborene [1.56 (0.27 – 2.34) vs. 0.28 (0.16 – 0.45)]; $p=0.019$.

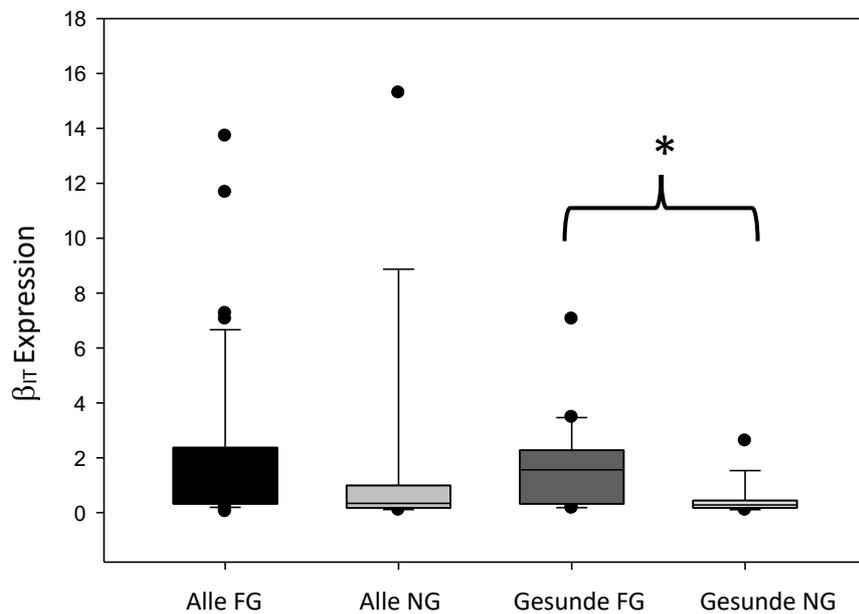


Abbildung 5: Die β_{IT} -Expression bei allen Früh- und Neugeborenen zeigt einen Trend zu mehr β_{IT} -Expression bei Frühgeborenen ($n=42$) im Vergleich zu reifen Neugeborenen ($n=17$) ($p=0.087$). Die β_{IT} -Expression bei pulmonal gesunden Frühgeborenen ($n=17$) ist signifikant höher als bei pulmonal gesunden, reifen Neugeborenen ($n=12$) ($*p=0.019$) (Schulte et al. 2021)

3.4. Der β_{IT} -Expressionskoeffizient im Verlauf der seriellen Blutproben

Der zeitliche Verlauf des β_{IT} Expression der pulmonal kranken Kinder (Respiratorischer Score 2/3) wurde im zeitlichen Verlauf untersucht. Hierfür standen bei 20 der 26 kranken Kinder eine zweite Blutprobe zur Verfügung, die innerhalb von zehn Wochen nach Geburt abgenommen wurde. Zum Zeitpunkt der zweiten Blutabnahme waren sämtliche der initial kranken Kinder pulmonal gesundet (sekundär gesundete Kinder). Die β_{IT} Expression der sekundär gesundeten Kinder war der β_{IT} Expression der primär gesunden Kinder (Respiratorischer Score 0/1) ähnlich [0.40 (0.23 – 0.92) vs. 0.45 (0.21 – 1.96)]; $p = 0.528$. Der IQR war in der Gruppe der primär gesunden Kinder größer als in der Gruppe der sekundär gesundeten (Abbildung 6).

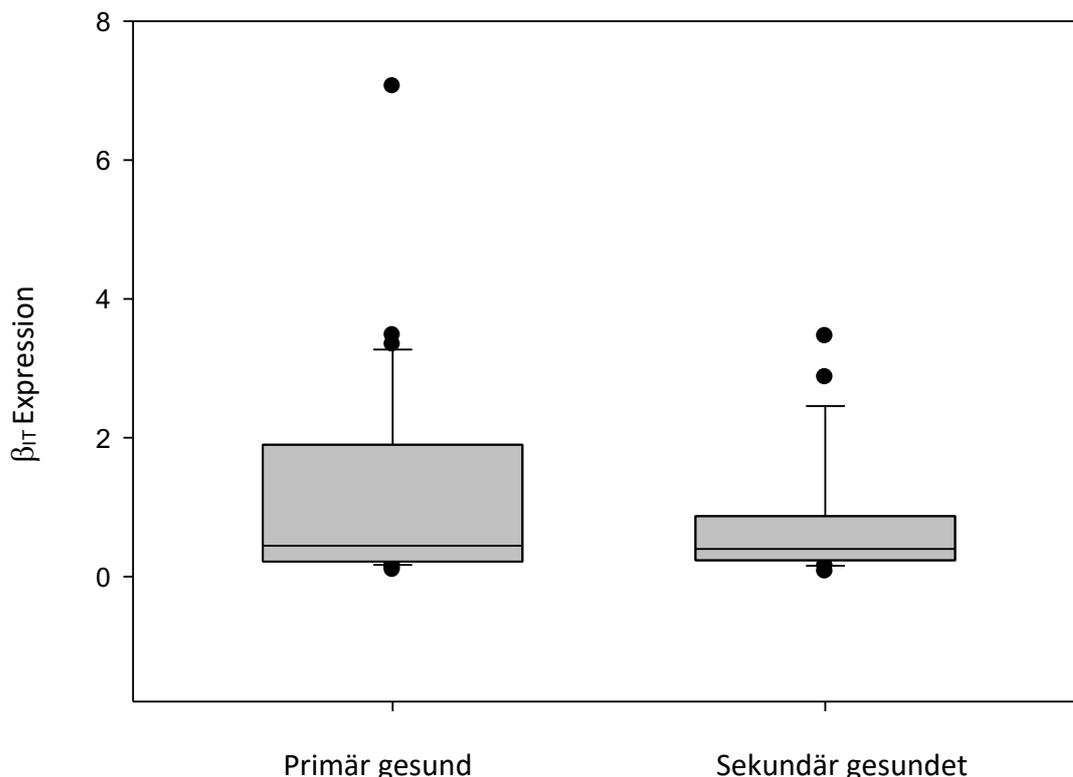


Abbildung 6: Die β_{IT} Expression der sekundär gesundeten Patienten (n=20) gleicht sich im zeitlichen Verlauf von maximal zehn Woche der β_{IT} Expression der primär gesunden Patienten (n=26) an ($p=0.528$) (Schulte et al. 2021)

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit gelang es, β_{IT} Expression bei neu- und frühgeborenen Kindern nachzuweisen: bei allen in die Studie eingeschlossenen 42 Frühgeborenen und 17 reifen Neugeborenen fand sich β_{IT} Expression. Unseres Wissens handelt es sich hierbei um den erstmaligen Nachweis von β_{IT} auf peripheren Immunzellen in einem Kollektiv von Neugeborenen. Dies, sowie die weiteren oben dargestellten Ergebnisse wurden von uns bereits veröffentlicht (Schulte et al. 2021). In der Vergangenheit war β_{IT} erstmals in einem Kollektiv von gesunden und an Leukämie erkrankten Kindern charakterisiert worden (Gale et al. 1998).

Der GM-CSF Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Surfactanthomöostase. Der Surfactantkatabolismus wird unter physiologischen Bedingungen durch die Interaktion von GM-CSF mit dem GM-CSF Rezeptor stimuliert, als beta-Untereinheit des GM-CSF Rezeptors fungiert der Wildtyp β_C (Huffman Reed et al. 1997; Goodall et al. 1993; Yoshida et al. 2001). Fehlen von GM-CSF hingegen führt zur Akkumulation von Surfactant und mündet in das Krankheitsbild der Pulmonalen Alveolarproteinose (Dranoff et al. 1994; Stanley et al. 1994). Bei Neugeborenen und vor allen bei Frühgeborenen liegt häufig ein Surfactantmangel vor, was zum klinischen Bild des akuten Atemnotsyndrom des Neugeborenen (RDS) führt. Wir postulierten, dass der GM-CSF Signalweg eine Rolle bei der Anpassung des Früh- und Neugeborenen an das durch Surfactantmangel ausgelöste Atemnotsyndrom spielt. Eine frühere Studie zeigte keinen Unterschied bzgl. der GM-CSF Level von reifen Neugeborenen, Frühgeborenen, sowie Neu-/Frühgeborenen mit RDS (Qi et al. 2010). Daher wurde postuliert, dass die Regulation eher auf Ebene des Rezeptors als auf Ligandenebene erfolgt. β_{IT} fungiert hierbei als inhibitorische Isoform der β_C -Untereinheit. Indem der Surfactantkatabolismus durch die vermehrte β_{IT} Expression reduziert wird, kommt es zu einer Anhäufung von Surfactant, wovon das Neugeborene mit drohendem RDS profitiert.

Tatsächlich konnten wir nachweisen, dass kranke Früh- und Neugeborene, insbes. solche mit invasiver Beatmung, nicht-invasiver Atemunterstützung > 48 Stunden oder notwendiger Surfactantgabe höhere β_{IT} Expression zeigten als gesunde Früh- und Neugeborene. Ferner

zeigten wir, dass Frühgeborene einen Trend zu mehr β_{IT} Expression zeigten als reife Neugeborene. Ferner exprimierten gesunde Frühgeborene mehr β_{IT} als gesunde, reife Neugeborene.

Während Surfactantakkumulation im Rahmen einer Pulmonalen Alveolarproteinose eine schwere Erkrankung verursacht, ist verminderter Surfactantabbau bei der pulmonalen Anpassung des Neugeborenen an ein RDS eine wünschenswerte Verbesserung der Situation. Wir nehmen an, dass die postnatale Adaptation an Surfactantmangel zumindest zu einem Teil durch vermehrte β_{IT} Expression vermittelt wird, da β_{IT} – im Gegensatz zu β_C – die Lunge des Neugeborenen vor Surfactantabbau schützt. Vermehrte β_{IT} - Expression könnte somit protektiv auf das Früh- und Neugeborene mit Surfactantmangel wirken (Abbildungen 7, 8). Passend hierzu zeigte sich, dass β_{IT} Expression im Verlauf der pulmonalen Gesundung des Neugeborenen sich wieder in Richtung β_C Expression verschiebt und das Niveau der primär pulmonal gesunden Neugeborenen erreicht (s. Abbildung 6).

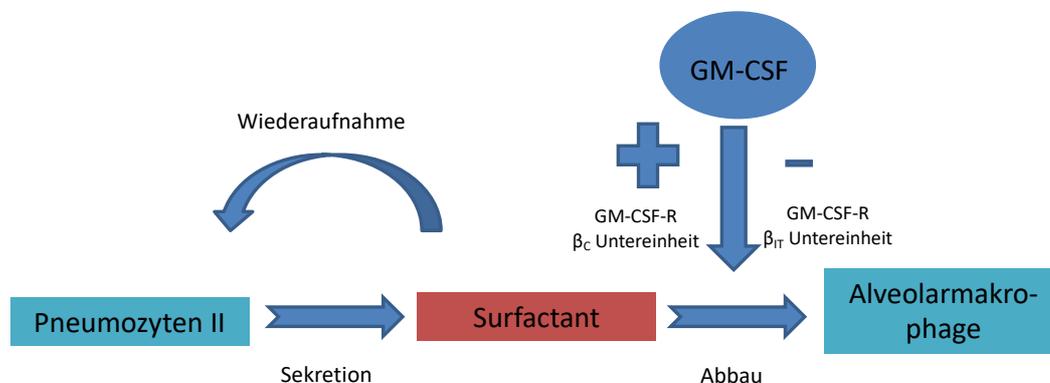


Abbildung 7: Surfactanthomöostase beim gesunden Neugeborenen: Gleichgewicht zwischen Sekretion/Wiederaufnahme und Abbau (Schulte et al. 2021)

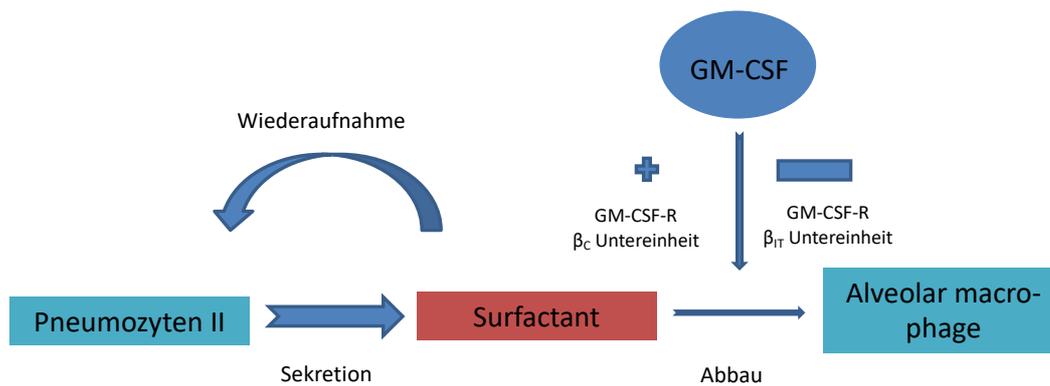


Abbildung 8: Sufactantmetabolismus bei pulmonal kranken Kindern: β_{IT} Expression führt zu vermindertem Sufactantabbau beim pulmonal kranken Neugeborenen (Schulte et al. 2021)

Die vorliegende Studie hat Limitationen: zunächst stellt sich die Frage, ob es zulässig ist, die Ergebnisse aus der Untersuchung von peripherem Blut auf den Sufactantmetabolismus der ortsständigen Alveolarmakrophagen zu übertragen. Eine frühere Studie konnte zeigen, dass die β_c Spiegel in peripherem Blut mit denen aus einer broncho-alveolären Lavage (BAL) korrelieren. Hierfür wurden β_c Spiegel sowohl in peripherem Blut und als auch in der BAL bei Kindern mit PAP, sowie gesunden Kontrollen gemessen. Es zeigten sich in beiden Kollektiven jeweils gleiche Werte für β_c in Blut und BAL (Dirksen et al. 1998). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch eine Knochenmarktransplantation die an PAP erkrankte Lunge mit gesunden Alveolarmakrophagen neu besiedelt werden kann (Nishinakamura et al. 1996; Tabata et al. 2009). Dennoch bleibt unklar, ob Alveolarmakrophagen im Rahmen von entzündlichen Prozessen auch ins periphere Blut migrieren. Bei anderen Krankheitsbildern konnte bereits in der Vergangenheit gezeigt werden, dass zirkulierende Monozyten/Makrophagen als Biomarker für entzündliche Lungenerkrankungen dienen können; so konnte bei der Systemischen Sklerose gezeigt werden, dass im Blut zirkulierende Monozyten/Makrophagen mit dem Schweregrad der Lungenbeteiligung korrelieren (Trombetta et al. 2018). Daneben gilt zu beachten, dass wir mRNA von β_c und β_{IT} und nicht die Proteine gemessen haben. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die Expression von β_c auf Ebene der Transkription reguliert wird (Dirksen et al. 1997; Nishinakamura et al.

1996). Weitere Studien konnten zeigen, dass die Level von β_c -mRNA, sowie -Protein sowohl in Patienten mit PAP als auch in gesunden Kontrollen korrelieren (Bewig et al. 2000).

Darüber hinaus gilt einschränkend, dass wir Blutproben aus dem klinischen Alltag verwendet haben, so dass unsere Gruppen nicht aufeinander abgestimmt sind. So wurden überproportional viele Frühgeborene, sowie kranke Früh- bzw. Neugeborene rekrutiert, da hier im klinischen Alltag mehr Blutproben anfielen. Ferner war auch nur von 2/3 der kranken Früh- bzw. Neugeborenen eine zweite Blutprobe im Verlauf verfügbar. Aus diesem Grund war u.a. die Untersuchung der Beziehung bestimmter Subgruppen zueinander (kranke Frühgeborene <-> kranke Neugeborene) nicht sinnvoll möglich.

Die zugrunde liegenden Erkrankungen unserer Kohorte von Neu- und Frühgeborenen sind zudem heterogen: auch wenn bei der Mehrzahl der Kinder das RDS Ursache der pulmonalen Beeinträchtigung war, lagen bei einigen andere Erkrankungen wie z.B. eine Mekoniumaspiration vor. Wir können mit der vorliegenden Untersuchung also belegen, dass die β_{IT} Expression in Früh- und Neugeborenen mit pulmonaler Beeinträchtigung unterschiedlicher Ursache erhöht ist.

5. Zusammenfassung

Der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierende Faktor spielt eine wichtige Rolle in der Surfactanthomöostase. β_C ist eine Untereinheit des GM-CSF Rezeptors und vermittelt Surfactant Abbau in der Lunge. β_{IT} ist eine physiologische, trunkierte Isoform von β_C und fungiert als Inhibitor von β_C . Die vorliegende Untersuchung behandelt die Frage, ob β_{IT} im Blut von Früh- und Neugeborenen mit pulmonaler Beeinträchtigung gefunden werden kann und mit dem Ausmaß der pulmonalen Beeinträchtigung korreliert. Hierfür wurden 59 Früh- und Neugeborene mit variabler pulmonaler Beeinträchtigung bei Geburt rekrutiert, wobei der Grad der Beeinträchtigung zwischen 0 (keine Beeinträchtigung) und 3 (invasive Beatmung) lag. β_{IT} und β_C Expression wurden im peripheren Blut mittels real-time PCR gemessen. Wir konnten nachweisen, dass Früh- und Neugeborene mit schwerer pulmonaler Beeinträchtigung signifikant mehr β_{IT} exprimierten als solche ohne pulmonale Beeinträchtigung bei Geburt. Im Verlauf der pulmonalen Gesundung glich sich die β_{IT} Expression der initial pulmonal kranken Kinder der β_{IT} Expression der primär gesunden Kinder an. Zudem zeigten pulmonal gesunde Frühgeborene signifikant mehr β_{IT} Expression als pulmonal gesunde Neugeborene. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass β_{IT} im peripheren Blut von Früh- und Neugeborenen exprimiert wird, wobei höhere Level bei pulmonal beeinträchtigten Kindern und bei Frühgeborenen gefunden wurden. Wir vermuten, dass β_{IT} einen protektiven Effekt auf die postnatale Adaptation des bei Geburt pulmonal beeinträchtigten Kindes hat, indem es als physiologischer Inhibitor von β_C fungiert und die Surfactanthomöostase reguliert.

6. Danksagung

Mein Dank geht als erstes und im Besonderen an meine Doktormutter Frau PD Dr. Esther Rieger- Fackeldey, sowie Herrn Professor Stefan Burdach, welche mir nicht nur die Erstellung dieser Arbeit ermöglicht haben, sondern mir zudem die großartige Welt der wissenschaftlichen Forschung eröffnet haben.

Ebenso möchte ich mich ganz ausdrücklich bei Frau Alexandra Sipol bedanken, welche als wissenschaftliche Kollegin mit großer Laborerfahrung, unendlicher Geduld und großer Hilfsbereitschaft besonders in den Stunden der Stagnation durch ihre produktiven, unkonventionellen Herangehensweisen maßgeblich dazu beigetragen hat, diese Arbeit fertigzustellen.

Ferner danke ich Frau Waschulzik, Mitarbeiterin am Institut für Statistik und Medizinische Informatik, die mich bei der Erstellung der Statistik maßgeblich unterstützt hat.

Mein größter Dank gilt meinem Ehemann.

7. Referenzen

1. Alvaro-Gracia, J. M. 1989. "Cytokines in Chronic Inflammatory Arthritis. IV. Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor-Mediated Induction of Class II MHC Antigen on Human Monocytes: A Possible Role in Rheumatoid Arthritis." *Journal of Experimental Medicine* 170 (3): 865–75. <https://doi.org/10.1084/jem.170.3.865>.
2. Batenburg, J. J. 1992. "Surfactant Phospholipids: Synthesis and Storage." *The American Journal of Physiology* 262 (4 Pt 1): L367-385. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1992.262.4.L367>.
3. Benson, B. J., J. A. Kitterman, J. A. Clements, E. J. Mescher, and W. H. Tooley. 1983. "Changes in Phospholipid Composition of Lung Surfactant during Development in the Fetal Lamb." *Biochimica Et Biophysica Acta* 753 (1): 83–88. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(83\)90101-7](https://doi.org/10.1016/0005-2760(83)90101-7).
4. Bewig, B., X. D. Wang, D. Kirsten, K. Dalhoff, and H. Schäfer. 2000. "GM-CSF and GM-CSF Beta c Receptor in Adult Patients with Pulmonary Alveolar Proteinosis." *The European Respiratory Journal* 15 (2): 350–57. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.2000.15b22.x>.
5. Broughton, Sophie E., Tracy L. Nero, Urmi Dhagat, Winnie L. Kan, Timothy R. Hercus, Denis Tvorogov, Angel F. Lopez, and Michael W. Parker. 2015. "The Bc Receptor Family - Structural Insights and Their Functional Implications." *Cytokine* 74 (2): 247–58. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.02.005>.
6. Burgess, A. W., and D. Metcalf. 1980. "The Nature and Action of Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factors." *Blood* 56 (6): 947–58.
7. Carey, Brenna, and Bruce C. Trapnell. 2010. "The Molecular Basis of Pulmonary Alveolar Proteinosis." *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 135 (2): 223–35. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.02.017>.
8. Chou, C. W., F. C. Lin, S. M. Tung, R. D. Liou, and S. C. Chang. 2001. "Diagnosis of Pulmonary Alveolar Proteinosis: Usefulness of Papanicolaou-Stained Smears of Bronchoalveolar Lavage Fluid." *Archives of Internal Medicine* 161 (4): 562–66. <https://doi.org/10.1001/archinte.161.4.562>.
9. Coleman, M., L. P. Dehner, R. K. Sibley, B. A. Burke, P. R. L'Heureux, and T. R.

- Thompson. 1980. "Pulmonary Alveolar Proteinosis: An Uncommon Cause of Chronic Neonatal Respiratory Distress." *The American Review of Respiratory Disease* 121 (3): 583–86. <https://doi.org/10.1164/arrd.1980.121.3.583>.
10. Dirksen, U., U. Hattenhorst, P. Schneider, H. Schroten, U. Göbel, A. Böcking, K. M. Müller, R. Murray, and S. Burdach. 1998. "Defective Expression of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor/Interleukin-3/Interleukin-5 Receptor Common Beta Chain in Children with Acute Myeloid Leukemia Associated with Respiratory Failure." *Blood* 92 (4): 1097–1103.
 11. Dirksen, U., R. Nishinakamura, P. Groneck, U. Hattenhorst, L. Noguee, R. Murray, and S. Burdach. 1997. "Human Pulmonary Alveolar Proteinosis Associated with a Defect in GM-CSF/IL-3/IL-5 Receptor Common Beta Chain Expression." *The Journal of Clinical Investigation* 100 (9): 2211–17. <https://doi.org/10.1172/JCI119758>.
 12. Dranoff, G., A. D. Crawford, M. Sadelain, B. Ream, A. Rashid, R. T. Bronson, G. R. Dickersin, C. J. Bachurski, E. L. Mark, and J. A. Whitsett. 1994. "Involvement of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Pulmonary Homeostasis." *Science (New York, N.Y.)* 264 (5159): 713–16. <https://doi.org/10.1126/science.8171324>.
 13. Duhon, Thomas, and Daniel J. Campbell. 2014. "IL-1 β Promotes the Differentiation of Polyfunctional Human CCR6⁺ CXCR3⁺ Th1/17 Cells That Are Specific for Pathogenic and Commensal Microbes." *The Journal of Immunology* 193 (1): 120–29. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302734>.
 14. Dunbar, A. E., S. E. Wert, M. Ikegami, J. A. Whitsett, A. Hamvas, F. V. White, B. Piedboeuf, C. Jobin, S. Guttentag, and L. M. Noguee. 2000. "Prolonged Survival in Hereditary Surfactant Protein B (SP-B) Deficiency Associated with a Novel Splicing Mutation." *Pediatric Research* 48 (3): 275–82. <https://doi.org/10.1203/00006450-200009000-00003>.
 15. Fleetwood, Andrew J., Toby Lawrence, John A. Hamilton, and Andrew D. Cook. 2007. "Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (CSF) and Macrophage CSF-Dependent Macrophage Phenotypes Display Differences in Cytokine Profiles and Transcription Factor Activities: Implications for CSF Blockade in Inflammation." *The Journal of Immunology* 178 (8): 5245–52. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.5245>.

16. Gale, R. E., R. W. Freeburn, A. Khwaja, R. Chopra, and D. C. Linch. 1998. "A Truncated Isoform of the Human Beta Chain Common to the Receptors for Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, Interleukin-3 (IL-3), and IL-5 with Increased MRNA Expression in Some Patients with Acute Leukemia." *Blood* 91 (1): 54–63.
17. Gearing, D. P., J. A. King, N. M. Gough, and N. A. Nicola. 1989. "Expression Cloning of a Receptor for Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor." *The EMBO Journal* 8 (12): 3667–76.
18. Gomez-Cambronero, Julian, Jeffrey Horn, Cassandra C. Paul, and Michael A. Baumann. 2003. "Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Is a Chemoattractant Cytokine for Human Neutrophils: Involvement of the Ribosomal P70 S6 Kinase Signaling Pathway." *The Journal of Immunology* 171 (12): 6846–55. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.12.6846>.
19. Goodall, G. J., C. J. Bagley, M. A. Vadas, and A. F. Lopez. 1993. "A Model for the Interaction of the GM-CSF, IL-3 and IL-5 Receptors with Their Ligands." *Growth Factors (Chur, Switzerland)* 8 (2): 87–97. <https://doi.org/10.3109/08977199309046929>.
20. Griese, Matthias. 2017. "Pulmonary Alveolar Proteinosis: A Comprehensive Clinical Perspective." *Pediatrics* 140 (2). <https://doi.org/10.1542/peds.2017-0610>.
21. Hallman, Mikko, Benita L. Epstein, and Louis Gluck. 1981. "Analysis of Labeling and Clearance of Lung Surfactant Phospholipids in Rabbit." *Journal of Clinical Investigation* 68 (3): 742–51. <https://doi.org/10.1172/JCI110310>.
22. Hamvas, A., L. M. Noguee, G. B. Mallory, T. L. Spray, C. B. Huddleston, A. August, L. P. Dehner, et al. 1997. "Lung Transplantation for Treatment of Infants with Surfactant Protein B Deficiency." *The Journal of Pediatrics* 130 (2): 231–39.
23. Hattenhorst, U., U. Dirksen, and S. Burdach. 1997. "Alternate Splicing in IL3/IL5/GM-CSF Receptor Common Beta-Chain Gene Expression." *Blood* 90 (10 Supplement 1): 3525–3525.
24. Hercus, Timothy R., Daniel Thomas, Mark A. Guthridge, Paul G. Ekert, Jack King-Scott, Michael W. Parker, and Angel F. Lopez. 2009. "The Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor: Linking Its Structure to Cell Signaling and Its Role in Disease." *Blood* 114 (7): 1289–98. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-164004>.
25. Hirata, Yoshihiro, Laia Egea, Sara M. Dann, Lars Eckmann, and Martin F. Kagnoff. 2010. "GM-CSF-Facilitated Dendritic Cell Recruitment and Survival Govern the Intestinal

- Mucosal Response to a Mouse Enteric Bacterial Pathogen." *Cell Host & Microbe* 7 (2): 151–63. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.01.006>.
26. Holbert, J. M., P. Costello, W. Li, R. M. Hoffman, and R. M. Rogers. 2001. "CT Features of Pulmonary Alveolar Proteinosis." *AJR. American Journal of Roentgenology* 176 (5): 1287–94. <https://doi.org/10.2214/ajr.176.5.1761287>.
27. Huffman Reed, J. A., W. R. Rice, Z. K. Zsengellér, S. E. Wert, G. Dranoff, and J. A. Whitsett. 1997. "GM-CSF Enhances Lung Growth and Causes Alveolar Type II Epithelial Cell Hyperplasia in Transgenic Mice." *The American Journal of Physiology* 273 (4): L715–725. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1997.273.4.L715>.
28. Ikegami, M., A. H. Jobe, J. A. Huffman Reed, and J. A. Whitsett. 1997. "Surfactant Metabolic Consequences of Overexpression of GM-CSF in the Epithelium of GM-CSF-Deficient Mice." *The American Journal of Physiology* 273 (4): L709–714. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1997.273.4.L709>.
29. Ikegami, M., T. Ueda, W. Hull, J. A. Whitsett, R. C. Mulligan, G. Dranoff, and A. H. Jobe. 1996. "Surfactant Metabolism in Transgenic Mice after Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor Ablation." *The American Journal of Physiology* 270 (4 Pt 1): L650–658. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1996.270.4.L650>.
30. Inoue, Yoshikazu, Bruce C. Trapnell, Ryushi Tazawa, Toru Arai, Toshinori Takada, Nobuyuki Hizawa, Yasunori Kasahara, et al. 2008. "Characteristics of a Large Cohort of Patients with Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis in Japan." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 177 (7): 752–62. <https://doi.org/10.1164/rccm.200708-1271OC>.
31. Jacobs, H., A. Jobe, M. Ikegami, and S. Jones. 1982. "Surfactant Phosphatidylcholine Source, Fluxes, and Turnover Times in 3-Day-Old, 10-Day-Old, and Adult Rabbits." *The Journal of Biological Chemistry* 257 (4): 1805–10.
32. Jansen, J. H. 1989. "Inhibition of Human Macrophage Colony Formation by Interleukin 4." *Journal of Experimental Medicine* 170 (2): 577–82. <https://doi.org/10.1084/jem.170.2.577>.
33. Kitamura, T., N. Tanaka, J. Watanabe, null Uchida, S. Kanegasaki, Y. Yamada, and K. Nakata. 1999. "Idiopathic Pulmonary Alveolar Proteinosis as an Autoimmune Disease with Neutralizing Antibody against Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor." *The Journal of Experimental Medicine* 190 (6): 875–80.

- <https://doi.org/10.1084/jem.190.6.875>.
34. Klein, J. M., M. W. Thompson, J. M. Snyder, T. N. George, J. A. Whitsett, E. F. Bell, P. B. McCray, and L. M. Noguee. 1998. "Transient Surfactant Protein B Deficiency in a Term Infant with Severe Respiratory Failure." *The Journal of Pediatrics* 132 (2): 244–48.
 35. Kurath-Koller, Stefan, Bernhard Resch, Raimund Kraschl, Christian Windpassinger, and Ernst Eber. 2015. "Surfactant Protein B Deficiency Caused by Homozygous C248X Mutation—A Case Report and Review of the Literature." *AJP Reports* 5 (1): e53-59. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1545668>.
 36. LeVine, Ann Marie, Jacquelyn A. Reed, Kim E. Kurak, Eli Cianciolo, and Jeffrey A. Whitsett. 1999. "GM-CSF–Deficient Mice Are Susceptible to Pulmonary Group B Streptococcal Infection." *Journal of Clinical Investigation* 103 (4): 563–69. <https://doi.org/10.1172/JCI5212>.
 37. Magoon, M. W., J. R. Wright, A. Baritussio, M. C. Williams, J. Goerke, B. J. Benson, R. L. Hamilton, and J. A. Clements. 1983. "Subfractionation of Lung Surfactant. Implications for Metabolism and Surface Activity." *Biochimica Et Biophysica Acta* 750 (1): 18–31. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(83\)90200-x](https://doi.org/10.1016/0005-2760(83)90200-x).
 38. Mahut, B., C. Delacourt, P. Scheinmann, J. de Blic, T. M. Mani, J. C. Fournet, and G. Bellon. 1996. "Pulmonary Alveolar Proteinosis: Experience with Eight Pediatric Cases and a Review." *Pediatrics* 97 (1): 117–22.
 39. Martinez-Moczygemba, Margarita, Minh L. Doan, Okan Elidemir, Leland L. Fan, Sau Wai Cheung, Jonathan T. Lei, James P. Moore, et al. 2008. "Pulmonary Alveolar Proteinosis Caused by Deletion of the GM-CSFRalpha Gene in the X Chromosome Pseudoautosomal Region 1." *The Journal of Experimental Medicine* 205 (12): 2711–16. <https://doi.org/10.1084/jem.20080759>.
 40. Miles, P. R., J. Y. Ma, and L. Bowman. 1988. "Degradation of Pulmonary Surfactant Disaturated Phosphatidylcholines by Alveolar Macrophages." *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md.: 1985) 64 (6): 2474–81. <https://doi.org/10.1152/jappl.1988.64.6.2474>.
 41. Morrissey, P. J., L. Bressler, L. S. Park, A. Alpert, and S. Gillis. 1987. "Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Augments the Primary Antibody Response by Enhancing the Function of Antigen-Presenting Cells." *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 139 (4): 1113–19.

42. Nag, K., J. G. Munro, K. Inchley, S. Schürch, N. O. Petersen, and F. Possmayer. 1999. "SP-B Refining of Pulmonary Surfactant Phospholipid Films." *The American Journal of Physiology* 277 (6): L1179-1189. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1999.277.6.L1179>.
43. Nichols, B. A. 1976. "Normal Rabbit Alveolar Macrophages. I. The Phagocytosis of Tubular Myelin." *The Journal of Experimental Medicine* 144 (4): 906–19. <https://doi.org/10.1084/jem.144.4.906>.
44. Nicola, N. A., L. Robb, D. Metcalf, D. Cary, C. C. Drinkwater, and C. G. Begley. 1996. "Functional Inactivation in Mice of the Gene for the Interleukin-3 (IL-3)-Specific Receptor Beta-Chain: Implications for IL-3 Function and the Mechanism of Receptor Transmodulation in Hematopoietic Cells." *Blood* 87 (7): 2665–74.
45. Nishinakamura, R., N. Nakayama, Y. Hirabayashi, T. Inoue, D. Aud, T. McNeil, S. Azuma, S. Yoshida, Y. Toyoda, and K. Arai. 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 (3): 211–22.
46. Nishinakamura, R., R. Wiler, U. Dirksen, Y. Morikawa, K. Arai, A. Miyajima, S. Burdach, and R. Murray. 1996. "The Pulmonary Alveolar Proteinosis in Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor/Interleukins 3/5 Beta c Receptor-Deficient Mice Is Reversed by Bone Marrow Transplantation." *The Journal of Experimental Medicine* 183 (6): 2657–62. <https://doi.org/10.1084/jem.183.6.2657>.
47. Nogee, L. M., D. E. de Mello, L. P. Dehner, and H. R. Colten. 1993. "Brief Report: Deficiency of Pulmonary Surfactant Protein B in Congenital Alveolar Proteinosis." *The New England Journal of Medicine* 328 (6): 406–10. <https://doi.org/10.1056/NEJM199302113280606>.
48. Ozawa, Hiroaki, Setsuya Aiba, Satoshi Nakagawa, and Hachiro Tagami. 1996. "Interferon- γ and Interleukin-10 Inhibit Antigen Presentation by Langerhans Cells for T Helper Type 1 Cells by Suppressing Their CD80 (B7-1) Expression." *European Journal of Immunology* 26 (3): 648–52. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260321>.
49. Possmayer, F. 1988. "A Proposed Nomenclature for Pulmonary Surfactant-Associated Proteins." *The American Review of Respiratory Disease* 138 (4): 990–98. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/138.4.990>.
50. Prakash, U. B., S. S. Barham, H. A. Carpenter, D. E. Dines, and H. M. Marsh. 1987. "Pulmonary Alveolar Phospholipoproteinosis: Experience with 34 Cases and a Review."

Mayo Clinic Proceedings 62 (6): 499–518. [https://doi.org/10.1016/s0025-6196\(12\)65477-9](https://doi.org/10.1016/s0025-6196(12)65477-9).

51. Qi, Yuanyuan, Liling Qian, Bo Sun, Chao Chen, and Yun Cao. 2010. "Circulating CD34(+) Cells Are Elevated in Neonates with Respiratory Distress Syndrome." *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]* 59 (10): 889–95. <https://doi.org/10.1007/s00011-010-0201-9>.
52. Quill, H., A. Gaur, and R. P. Phipps. 1989. "Prostaglandin E2-Dependent Induction of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Secretion by Cloned Murine Helper T Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 142 (3): 813–18.
53. Rosen, Samuel H., Benjamin Castleman, Averill A. Liebow, Frank M. Enzinger, and Richard T. N. Hunt. 1958. "Pulmonary Alveolar Proteinosis." *New England Journal of Medicine* 258 (23): 1123–42. <https://doi.org/10.1056/NEJM195806052582301>.
54. Sagawa, K., M. Mochizuki, S. Sugita, K. Nagai, T. Sudo, and K. Itoh. 1996. "Suppression by IL-10 and IL-4 of Cytokine Production Induced by Two-Way Autologous Mixed Lymphocyte Reaction." *Cytokine* 8 (6): 501–6. <https://doi.org/10.1006/cyto.1996.0068>.
55. Sakamaki, K., I. Miyajima, T. Kitamura, and A. Miyajima. 1992. "Critical Cytoplasmic Domains of the Common Beta Subunit of the Human GM-CSF, IL-3 and IL-5 Receptors for Growth Signal Transduction and Tyrosine Phosphorylation." *The EMBO Journal* 11 (10): 3541–49.
56. Schulte, Verena, Alexandra Sipol, Stefan Burdach, and Esther Rieger-Fackeldey. 2021. "The Truncated Splice Variant of the Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor Receptor β - Chain in Peripheral Blood Serves as Severity Biomarker of Respiratory Failure in Newborns." *Neonatology* 118 (2): 187–93. <https://doi.org/10.1159/000513356>.
57. Seymour, John F., and Jeffrey J. Presneill. 2002. "Pulmonary Alveolar Proteinosis: Progress in the First 44 Years." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 166 (2): 215–35. <https://doi.org/10.1164/rccm.2109105>.
58. Shah, P. L., D. Hansell, P. R. Lawson, K. B. Reid, and C. Morgan. 2000. "Pulmonary Alveolar Proteinosis: Clinical Aspects and Current Concepts on Pathogenesis." *Thorax* 55 (1): 67–77. <https://doi.org/10.1136/thorax.55.1.67>.
59. Shibata, Yoko, Pierre-Yves Berclaz, Zisis C Chroneos, Mitsuhiro Yoshida, Jeffrey A

- Whitsett, and Bruce C Trapnell. 2001. "GM-CSF Regulates Alveolar Macrophage Differentiation and Innate Immunity in the Lung through PU.1." *Immunity* 15 (4): 557–67. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00218-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00218-7).
60. Shiomi, Aoi, and Takashi Usui. 2015. "Pivotal Roles of GM-CSF in Autoimmunity and Inflammation." *Mediators of Inflammation* 2015: 1–13. <https://doi.org/10.1155/2015/568543>.
61. Stahlman, M. T., M. P. Gray, M. W. Falconieri, J. A. Whitsett, and T. E. Weaver. 2000. "Lamellar Body Formation in Normal and Surfactant Protein B-Deficient Fetal Mice." *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 80 (3): 395–403.
62. Stanley, E., G. J. Lieschke, D. Grail, D. Metcalf, G. Hodgson, J. A. Gall, D. W. Maher, J. Cebon, V. Sinickas, and A. R. Dunn. 1994. "Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor-Deficient Mice Show No Major Perturbation of Hematopoiesis but Develop a Characteristic Pulmonary Pathology." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (12): 5592–96. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5592>.
63. Tabata, Sumie, Sonoko Shimoji, Kimihiko Murase, Yoko Takiuchi, Daichi Inoue, Takaharu Kimura, Yuya Nagai, et al. 2009. "Successful Allogeneic Bone Marrow Transplantation for Myelodysplastic Syndrome Complicated by Severe Pulmonary Alveolar Proteinosis." *International Journal of Hematology* 90 (3): 407–12. <https://doi.org/10.1007/s12185-009-0404-4>.
64. Trombetta, Amelia Chiara, Stefano Soldano, Paola Contini, Veronica Tomatis, Barbara Ruaro, Sabrina Paolino, Renata Brizzolara, et al. 2018. "A Circulating Cell Population Showing Both M1 and M2 Monocyte/Macrophage Surface Markers Characterizes Systemic Sclerosis Patients with Lung Involvement." *Respiratory Research* 19 (1). <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0891-z>.
65. Vorbroker, D. K., S. A. Profitt, L. M. Noguee, and J. A. Whitsett. 1995. "Aberrant Processing of Surfactant Protein C in Hereditary SP-B Deficiency." *The American Journal of Physiology* 268 (4 Pt 1): L647-656. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1995.268.4.L647>.
66. Wagner, Katharina, Sabine Kafert-Kasting, Gerhard Heil, Arnold Ganser, and Matthias Eder. 2001. "Inhibition of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

- Receptor Function by a Splice Variant of the Common β -Receptor Subunit." *Blood* 98 (9): 2689–96. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.9.2689>.
67. Walker, S. R., M. C. Williams, and B. Benson. 1986. "Immunocytochemical Localization of the Major Surfactant Apoproteins in Type II Cells, Clara Cells, and Alveolar Macrophages of Rat Lung." *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 34 (9): 1137–48. <https://doi.org/10.1177/34.9.2426341>.
68. Wang, Borwyn, and Hrishikesh Mehta. 2020. "Cytokine Receptor Splice Variants in Hematologic Diseases." *Cytokine* 127 (March): 154919. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154919>.
69. Yoshida, M., M. Ikegami, J. A. Reed, Z. C. Chroneos, and J. A. Whitsett. 2001. "GM-CSF Regulates Protein and Lipid Catabolism by Alveolar Macrophages." *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 280 (3): L379-386. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.280.3.L379>.
70. Zhao, Yu-Yue, Hui Huang, Yong-Zhe Liu, Xin-Yu Song, Shan Li, and Zuo-Jun Xu. 2015. "Whole Lung Lavage Treatment of Chinese Patients with Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis: A Retrospective Long-Term Follow-up Study." *Chinese Medical Journal* 128 (20): 2714–19. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.167295>.