

**Untersuchungen zur Expression des NB1-
Glykoproteins (HNA-2a, CD177) auf neutrophilen
Granulozyten gesunder Personen, ausgewählter
Patientenkollektive und Neugeborener**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Katrin Carmen Göhring-Frischholz

aus Sindelfingen

Gießen 2006

Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin
des Universitätsklinikums Gießen
Leiter: Professor Dr. G. Bein

Gutachter: Prof. Dr. J. Bux

Gutachter: Prof. Dr. J. Lohmeyer

Tag der Disputation: 18.10.2006

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Entwicklung und Funktion neutrophiler Granulozyten	1
1.2 Antigene auf neutrophilen Granulozyten.....	5
1.2.1 Übersicht und Nomenklatur	5
1.2.2 HNA-2a / NB1 / CD177.....	7
1.2.3 Weitere Antigene auf Neutrophilen.....	12
1.2.3.1 Fcγ-Rezeptor IIIb (HNA-1; CD16).....	12
1.2.3.2 Fcγ-Rezeptor I (CD64).....	15
1.2.3.3 Fcγ-Rezeptor II (CD32).....	15
1.2.3.4 Komplementrezeptor 3 (CD11b/CD18-Komplex).....	16
1.2.3.5 LPS-Rezeptor (CD14).....	17
1.2.3.6 L-Selektin (CD62)	17
1.2.4 Expression neutrophiler Antigene auf Granulozyten aus Nabelschnurblut.....	17
1.2.5 Klinische Bedeutung neutrophiler Antigene	19
1.3 Aktivierung Neutrophiler.....	21
1.3.1 G-CSF	21
1.3.2 Entzündung	23
1.3.2.1 Sepsis	24
1.3.2.2 Virale Infektionen	25
1.3.2.3 Autoimmunerkrankung: Rheumatoide Arthritis	26
1.3.3 Klonale Proliferation von Blutstammzellen: Polyzythämia vera	27
1.4 Fragestellungen der Arbeit.....	29
2 Material und Methoden	30
2.1 Material.....	30
2.1.1 Blutproben.....	30
2.1.2 Antikörper	30
2.1.2.1 Primärantikörper	30
2.1.2.2 Sekundärantikörper	30
2.1.3 Verwendete Testkits	31
2.2 Methoden	31
2.2.1 Vorbereitung der Blutproben.....	31
2.2.1.1 Blutproben erwachsener Spender	31
2.2.1.2 Nabelschnurblutproben	33
2.2.2 Vorbereitung der Kalibrierungsbeads	33
2.2.3 Messung am Durchflußzytometer.....	34
2.2.3.1 Aufbau und Funktionsprinzip eines Durchflußzytometers	34
2.2.3.2 Geräteeinstellungen.....	34
2.2.3.3 Messung der Proben.....	35
2.2.4 Klinische Angaben	37
2.2.5 Auswertung	38
2.2.5.1 Auswertung der Messungen am Durchflußzytometer.....	38
2.2.5.2 Berechnung der mittleren Antigendichte.....	38
2.2.5.3 Auswertung der klinischen Angaben bei Nabelschnurblutproben	39
2.2.5.4 Statistische Auswertung	40
2.2.6 Statistische Testverfahren	45
2.2.7 Messung der G-CSF-Spiegel.....	45
2.2.7.1 Vorbereitung.....	45
2.2.7.2 Durchführung.....	45

3 Ergebnisse	47
3.1 <i>NB1-Glykoprotein</i>	47
3.1.1 Gesunde Spender	47
3.1.1.1 Zahl der NB1-Glykoproteine pro Neutrophilem.....	47
3.1.1.2 Anteil der NB1-exprimierenden Neutrophilen	47
3.1.1.3 Intraindividuelle Variation der NB1-Expression	51
3.1.2 Spender mit einer Hepatitisinfektion	53
3.1.3 Patienten mit rheumatoider Arthritis	54
3.1.4 Patienten mit Polyzythämia vera	56
3.1.5 Gesunde Personen nach Gabe von G-CSF.....	58
3.1.6 Patienten mit schwerer bakterieller Infektion.....	61
3.1.7 Zusammenfassung der Ergebnisse für das NB1-Glykoprotein	64
3.2 <i>Expression des Fcγ-Rezeptors IIIb (CD16) auf Neutrophilen</i>	66
3.2.1 Gesunde Personen.....	66
3.2.2 Patienten mit rheumatoider Arthritis	66
3.2.3 Patienten mit Polyzythämia vera	68
3.2.4 Gesunde Personen nach Gabe von G-CSF.....	69
3.2.5 Patienten mit schwerer bakterieller Infektion.....	70
3.3 <i>Expression des NB1-Glykoproteins und des FcγRIIIb bei gesunden Spendern nach Gabe von G-CSF und bei Patienten mit schwerer bakterieller Infektion.....</i>	70
3.4 <i>Expression weiterer Antigene auf Neutrophilen</i>	72
3.4.1 Fcγ-Rezeptor I (CD64).....	72
3.4.2 Fcγ-Rezeptor II (CD32)	73
3.4.3 CD11b (CR3, MAC-1).....	74
3.4.4 CD18.....	74
3.4.5 CD14.....	75
3.4.6 CD62L (L-Selektin).....	76
3.4.7 HLA-Klasse I	76
3.4.7.1 HLA-I: β ₂ -Mikroglobulin als Immunogen	76
3.4.7.2 HLA-I: Schwere Kette und β ₂ -Mikroglobulin als Immunogen	77
3.5 <i>Zahl der NB1-Glykoproteine, Anteil der NB1-exprimierenden Zellen und Zahl der FcγRIIIb auf Neutrophilen aus Nabelschnurblut</i>	78
3.5.1 NB1-Glykoprotein	78
3.5.1.1 Alle Neugeborene	78
3.5.1.2 Vergleich der NB1-GP-Expression bei weiblichen und männlichen Neugeborenen.....	78
3.5.1.3 Einfluß von Komplikationen vor und während der Geburt auf die NB1-Expression	80
3.5.1.4 Verteilung der Meßwerte für das NB1-Glykoprotein	81
3.5.1.5 Vergleich der NB1-Expression von Neutrophilen aus Nabelschnurblut und von Erwachsenen	83
3.5.2 Fcγ-Rezeptor IIIb.....	85
3.5.2.1 Zahl der FcγRIIIb bei Neugeborenen.....	85
3.5.2.2 Einfluß von Komplikationen während der Geburt auf die Zahl der FcγRIIIb.....	85
3.5.2.3 Vergleich der FcγRIIIb-Expression auf Neutrophilen Erwachsener und Neugeborener.....	86
3.6 <i>Bestimmung des G-CSF-Spiegels</i>	86
4 Diskussion.....	87
4.1 <i>Expression des NB1-Glykoproteins</i>	87
4.1.1 Gesunde Personen.....	87
4.1.2 Gesunde Personen nach Gabe von G-CSF.....	89
4.1.3 Patienten mit bakteriellen Infektionen	90
4.1.4 Patienten mit Polyzythämia vera	91
4.1.5 Patienten mit chronischer Hepatitis B oder C	93

4.1.6 Patienten mit rheumatoider Arthritis	93
4.2 Expression des NB1-Glykoproteins auf Neutrophilen aus Nabelschnurblut	95
4.3 Expression des FcγRIIIb auf Neutrophilen.....	97
4.4 Expression weiterer Antigene auf Neutrophilen	100
4.5 Regulation der NB1-Expression.....	103
4.5.1 G-CSF	103
4.5.2 Weitere mögliche Faktoren zur Regulation der NB1-Expression	105
4.6 Mögliche Funktion des NB1-Glykoproteins.....	108
4.7 Klinische Relevanz der Quantifizierung der NB1-Expression	111
5 Zusammenfassung.....	113
6 Summary	114
7 Literaturverzeichnis.....	115
8 Anhang	128
8.1 Übersicht über verwendete Geräte und Kleinmaterial.....	128
8.2 Verwendete Primärantikörper	129
8.3 Verwendete Reagenzien.....	130
8.4 Rezepturen der verwendeten Lösungen	131
8.4.1 PBS (phosphate-buffered saline) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	131
8.4.2 Dextranlösung 5%.....	131
8.4.3 Ammoniumchloridlösung.....	131
8.4.4 Paraformaldehydlösung 4%.....	131
8.5 Übersicht über die klinischen Parameter, die Expression des NB1-Glykoproteins und des FcγRIIIb bei Neugeborenen.....	132
8.6 Abkürzungsverzeichnis.....	138
9 Veröffentlichungen zum Thema	139
10 Erklärung	139
11 Danksagung.....	140
12 Lebenslauf	141

1 Einleitung

1.1 Entwicklung und Funktion neutrophiler Granulozyten

Das in der vorliegenden Arbeit im Vordergrund stehende Glykoprotein NB1 bzw. HNA-2a wird ausschließlich auf neutrophilen Granulozyten exprimiert. Aufgrund verschiedener mikroskopischer und biochemischer Merkmale wie Färbeverhalten, Granularität, Inhaltsstoffe werden basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten differenziert.

Die Lebensdauer von Neutrophilen ist mit ca. 1-3 Tagen relativ kurz. Dem steht eine kontinuierliche Neubildung zum Ausgleich des physiologischen Verlustes im Rahmen der Zellmauserung von täglich ca. 10^9 Granulozyten pro kg Körpergewicht gegenüber, was im Rahmen von bakteriellen Infektionen bis auf das 10-fache steigen kann [Demetri und Griffin 1991; Roos 1992; Nerl 1993a].

Die Dauer der Granulozytopoese beträgt ca. 10-14 Tage, mindestens jedoch 6 Tage. Aus einer pluripotenten Stammzelle des Knochenmarks entstehen determinierte Vorläuferzellen, woraus sich Myeloblasten entwickeln, die sich weiter differenzieren (Tabelle 1). Es wird unterschieden zwischen einem proliferierenden Teilungspool und einem postmitotischen Reifungs- oder Speicherpool, der auch als Reserve mit etwa der 20-fachen Kapazität der zirkulierenden Neutrophilen dient. Etwa die Hälfte der in der Zirkulation befindlichen Granulozyten ist in postkapillären Venulen vorzufinden. Von dort aus können sie ins Gewebe migrieren [Roos 1992; Nerl 1993a].

Wesentliche Regulatoren der Granulozytopoese sind die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren GM-CSF, G-CSF, IL-3 und IL-1. Daneben haben eine Reihe von Toxinen (z.B. Endotoxine), Hormone (z.B. ACTH, Glukokortikoide) und Zytokine (TNF- α , IL-1, IFN- γ) Einfluß auf die Reifung, die Ausschüttung aus dem Knochenmark, die Verteilung im peripheren Blutstrom und die Migration. Prostaglandine, v.a. PGE₂, Isoferritine und das von Neutrophilen selbst freigesetzte Laktoferrin inhibieren dagegen die Granulozytopoese [Maciejewski et al. 1991; Nerl 1993a; Matsushima et al. 2001].

Reife Neutrophile enthalten sowohl azurophile (primäre) Granula (Durchmesser ca. 0,5 μm) als auch spezifische (sekundäre) Granula (Durchmesser $<0,3 \mu\text{m}$). Die primären Granula enthalten die meisten der bisher bekannten antimikrobiellen Effektorstoffe wie Myeloperoxidase, Lysozym, Defensine, Kathepsin G, Hydrolasen und Proteasen. In den sekundären Granula sind u.a. alkalische Phosphatase, Lysozym, Laktoferrin, Proteinasen (Gelatinasen, Kollagenasen, Elastasen, Histaminase), Plasminogenaktivator und Rezeptoren wie Fc- (Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIIIb) oder Komplement-Rezeptoren (CR1=CD35 für C3b, CR3 = CD11/CD18-Komplex für iC3b) vorhanden [Lehrer und Ganz 1990; Roos 1992; Hampton et al. 1998; Nussler et al. 1999; Viedma Contreras 1999]. Auch NB1 läßt sich an der Membran sekundärer Granula nachweisen [Stroncek 1990; Goldschmeding et al. 1992].

	Entwicklungsstufe	Wesentlicher Wachstumsfaktor	Charakteristika
Stammzellen	Pluripotente Stammzelle	IL1, IL3, IL6	
	Determinierte Vorläuferzellen (CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-G)	GM-CSF, IL3	zunehmende Spezialisierung auf eine Zelllinie
Teilungspool	Myeloblast	GM-CSF, G-CSF	Durchmesser 12-20µm Auftreten von feinen Granulationen im Zytoplasma
	Promyelozyt		Durchmesser 10-25µm azurophile = primäre Granula
	Myelozyt		Durchmesser 14-20 µm spezifische = sekundäre Granula
Reifungs- und Speicherpool	Metamyelozyt	GM-CSF, G-CSF	Viele spezifische Granula im Zytoplasma
	Stabkerniger neutrophiler Granulozyt		Durchmesser 10-15µm Gelappter / segmentierter Kern, 2-5 Segmente Reifer Neutrophiler: ca. 200-300 Granula
	Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt		

Tabelle 1: Regulation und Ablauf der Granulozytopoese [nach Maciejewski et al. 1991; Roos 1992; Nerl 1993a].

Granulozyten spielen eine maßgebliche Rolle für die Integrität der primären Immunantwort bei bakteriellen und sterilen Entzündungen [Clement et al. 1983; Martins 2003]. Sie fungieren sowohl als frühe phagozytotisch aktive Zellen (Beseitigung von Mikroorganismen und Zelldetritus) sowie regulatorisch bei der Synthese von Zytokinen und Entzündungsmediatoren (Bildung von Chemotaxinen, Zytokinen, Leukotrienen) [Viedma Contreras 1999]. Bei überschießender Aktivität kann es jedoch auch zu Gewebsschäden durch Neutrophile kommen [Roos 1992].

Die wesentlichen Funktionen Neutrophiler lassen sich zusammenfassend beschreiben mit

Chemotaxis: zielgerichtete Zellbewegung entlang eines Gradienten aus chemotaktischen Faktoren in das Gebiet mit der höchsten Konzentration

(Leuko)Diapedese: zielgerichtetes Verlassen der Blutbahn durch die Kapillarwand und Überschreiten von Gewebsbarrieren

Phagozytose: Aufnahme von größeren Partikeln und Mikroorganismen

Degranulation/Bakterizidie: Liberierung granulärer Inhaltsstoffe und Abtötung von Mikroorganismen

Neutrophile exprimieren für zahlreiche chemotaktische Substanzen Rezeptoren. Dazu gehören Komplementrezeptoren, Fc-Rezeptoren, Rezeptoren für Wachstumsfaktoren wie G-CSF und Rezeptoren für Adhäsionsmoleküle wie CD11b. Die Expression dieser Oberflächenrezeptoren kann durch chemotaktische Substanzen selbst im Sinne einer positiven Rückkopplung erhöht werden [Nerl 1993]. Viele chemotaktische Substanzen, z.B. IL-8, wirken indirekt auf Neutrophile, indem sie beispielsweise Mastzellen aktivieren, die via Histamin Neutrophile beeinflussen [Enders et al. 1995; Perretti 1998]. Bei einer raschen Rekrutierung und Diapedese Neutrophiler an Stellen einer Infektion oder eines Gewebeschadens kommt es zu einer

komplexen Interaktion mit Gefäßendothelien und weiteren zirkulierenden Zellen [Ruchaud-Sparagano et al. 1998]. Im Entzündungsgebiet bewirken die unter dem Einfluß chemotaktischer Stoffe weitgestellten Gefäße einen verlangsamten Blutstrom, so daß die leichteren Leukozyten in Gefäßwandnähe, die schwereren Erythrozyten in den Axialstrom des Gefäßes gelangen, wodurch physikalisch die Abwanderung von Neutrophilen an die Gefäßwand und die Agglomeration ans Gefäßendothel begünstigt wird [Nerl 1993]. Es folgen die Vorgänge der Adhäsion und Migration, die vorzugsweise an postkapillären Venulen ablaufen [von Andrian et al. 1991; Kubes und Kanwar 1994; Perretti 1998]. Im Rahmen der Adhäsion kommt es zunächst zum sogenannten „Rolling“. Selektine des Endothels binden dabei an Oberflächenrezeptoren (PSGL-1, ESGL-1, L-Selektin) der Neutrophilen, so daß eine instabile Leukozyten-Endothel-Interaktion entsteht, wobei dem P-Selektin eine entscheidene Funktion zukommt [Kubes und Kanwar 1994; Enders et al. 1995; Perretti 1998; Ruchaud-Sparagano et al. 1998; Nussler et al. 1999]. Die Expression dieser Zellinteraktionsmoleküle wird unter dem Einfluß inflammatorischer Zytokine (IFN- γ , IL-1, TNF- α , Histamin) und Bakterienbestandteile (fMLP) rasch hochreguliert [Kubes und Kanwar 1994; Nussler et al. 1999]. In der Folge kommt es zu einem festen Zellkontakt von Granulozyt und Endothelzelle („granulocyte sticking“). Dieser Schritt wird im wesentlichen durch Interaktion von Integrinen auf Neutrophilen mit Ig-ähnlichen Rezeptoren des Endothels (P-Selektin, ICAM-1, -2, -3, VCAM-1, iC3b, Fibrinogen, Fibronectin) bestimmt, die konstitutiv oder zytokininduziert exprimiert werden [Kubes und Kanwar 1994; Enders et al. 1995; Perretti 1998; Nussler et al. 1999]. In entzündetem Gewebe scheinen Interaktionen zwischen ICAM-1 und CD11b/CD18 bzw. CD11c/CD18 für verstärkte Adhäsion verantwortlich zu sein, aber auch für Gewebeschäden durch dysregulierte Neutrophile [Nussler et al. 1999].

Es folgt eine Migration durch den Interzellularraum der Endothelzellen unter Beteiligung des Adhäsionsmoleküls PECAM-1 (CD31). U.a. können IL-1 β und TNF- α die Migration fördern [Casale und Carolan 1997; Perretti 1998].

Bei der Phagozytose werden Bakterien oder anderes zellfremdes Material in intrazelluläre Kompartimente der Neutrophilen aufgenommen [Nerl 1993a; Hampton et al. 1998]. Über Rezeptoren der Plasmamembran wie Mannose-, Fucoserezeptoren (Lectine), Fc-Rezeptoren für Immunglobuline und Komplement-Rezeptoren binden Mikroorganismen [Nerl 1993a; Nussler et al. 1999]. Im weiteren stülpt sich die granulozytäre Plasmamembran aus, umfließt das Objekt vollständig und schließt es damit vakuolär im sog. Phagosom ein. Die Effektivität der Phagozytose kann durch als Opsonin wirkende Antikörper (IgG), Komplementfaktoren (C3b, iC3b), CRP und Adhäsion gesteigert werden [Nussler et al. 1999; Viedma Contreras 1999]. Da in allen Phasen der Phagozytose und Degranulation auch eine Liberierung von Entzündungsmediatoren ins umgebende Milieu erfolgt, kann die Phagozytose als Initiation einer Entzündung gesehen werden.

Der Phagozytose schließt sich mit der Fusion von Lysosomen, Granula und Phagosom die Phase der

Degranulation und damit auch der Bakterizidie an. Durch die Fusion der Granula mit dem Phagosom werden die verschiedenen verdauungsaktiven und antimikrobiell wirkenden Stoffe zu den aufgenommenen Partikeln freigesetzt [Lehrer und Ganz 1990; Hampton et al. 1998; Nussler et al. 1999]. Da eine Degranulation bereits vor Verschluss der äußeren Zellmembran stattfinden kann, kann es dabei zu einer Freisetzung der Stoffe ins umliegende Gewebe mit der Folge einer lokalisierten chronischen Entzündung kommen.

Im wesentlichen werden drei Mechanismen zur Abtötung invasiver Pathogene beschrieben: 1. lysosomenabhängige Mechanismen, 2. sauerstoffabhängige Mechanismen, 3. stickstoffabhängige Mechanismen.

Die lysosomenabhängigen Mechanismen basieren auf den in den zytoplasmatischen Granula enthaltenen antimikrobiellen Polypeptiden [Lehrer und Ganz 1990].

Sauerstoffabhängige Mechanismen gehören zu den wichtigsten Abwehrmechanismen Neutrophiler bei bakteriellen Infektionen [Martins et al. 2003]. Durch eine erhöhte Sauerstoffaufnahme („respiratory burst“) über eine membranständige NADPH-Oxygenase und verschiedene Enzyme (z.B. Myeloperoxidase) kommt es zur Bildung verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). ROS können potentiell gesundes Gewebe über Inaktivierung von α_1 -Antitrypsin mit der Folge einer unkontrollierten Elastase-Aktivität schädigen und werden durch die Enzyme Katalase und Glutathionperoxidase inaktiviert [Nussler et al. 1999].

Über drei Isoenzyme der NO-Synthase laufen stickstoffabhängige Mechanismen ab. Als wirksamster Metabolit entsteht dabei das NO-Radikal, das die Entzündungsreaktion über eine Vasodilatation und Einfluß auf die DNA- und Proteinsynthese fördert. Andererseits wirkt NO entzündungshemmend, indem der thrombozytenabhängige Teil der Entzündungskaskade und damit die Adhäsion und chemotaktische Aktivität Neutrophiler gehemmt und ROS abgefangen werden [Nussler et al. 1999; Benjamin et al. 2002].

Nach dem Verdau des phagozytierten Materials wird es aus der Zelle nach außen sezerniert; unter normalen Umständen kommt es hiernach rasch zur Apoptose des Neutrophilen [Swartz et al. 2000].

1.2 Antigene auf neutrophilen Granulozyten

1.2.1 Übersicht und Nomenklatur

Auf Granulozyten werden sowohl Antigene exprimiert, die primär auch auf anderen Zellen nachgewiesen werden können, als auch solche, die für diese Zelllinie als spezifisch gelten. Zu ersteren gehören unter anderem Antigene der HLA-Klasse I, Antigene einiger Erythrozytenblutgruppensysteme z.B. I und P und Granulozyten-Monozyten-Endothelzell-Antigene wie die Selektine [McCullough et al. 1981, 1987; Kline et al. 1986]. Antigene des ABO-Systems wurden bisher nicht auf Granulozyten nachgewiesen [Bux 2000].

Erstmals wurde von Lalezari et al. [1960] mit HNA-1a (NA1) die Existenz granulozytenspezifischer Antigene beschrieben. Ihr Vorkommen beschränkt sich in der Hauptsache auf Neutrophile, wobei für viele Antigene die Expression auf Eosinophilen und Basophilen nicht eindeutig geklärt ist [McCullough et al. 1987; Bux 2000].

1998 wurde von der ISBT (International Society of Blood Transfusion) eine neue Nomenklatur für gut definierte granulozytäre Alloantigene verfaßt, die auf der Glykoprotein-Lokalisation des Antigens basiert. Granulozytäre Antigene werden als HNA (human neutrophil antigen) bezeichnet; durch eine Ziffer wird die Membranlokalisation angegeben. Bei verschiedenen Polymorphismen auf einem gemeinsamen Glykoprotein wird dies durch alphabetische Benennung in der Reihenfolge der Entdeckung ergänzt. Allele der kodierenden Gene werden nach den Richtlinien der „Human Gene Nomenclature“ benannt [Bux 1999a, 2000; Stroncek und Bux 2002]. Die meisten granulozytären Antigene wurden in die CD-Nomenklatur aufgenommen. Hierbei handelt es sich um eine Klassifikation der WHO, in der Zelloberflächenmoleküle katalogisiert sind, gegen die sich ein Cluster monoklonaler Antikörper richtet. Das NB1-GP wurde als CD177 klassifiziert (Tabelle 2). Weitere Antigene auf Granulozyten sind beschrieben, konnten aber bislang nicht weiter charakterisiert werden. Dazu gehört das 1978 beschriebene ND1 [Verheugt et al. 1978; McCullough et al. 1987], NE1 [McCullough et al. 1987], sowie die Antigene 9a, 5a, 5b, NB2 [Stroncek et al. 1993a, 2002; Bux 1999b, 2000].

Nomenklatur			Antigen-Häufigkeit in %; Genfrequenz in Klammer			
Antigen system CD- Nomenklatur	Antigen <i>Alte</i> Nomenklatur	Lokalisation <i>Allel</i>	Weißer	Asiaten	Afrikaner (Südafrika, Ghana)	Schwarze Indianer
HNA-1 CD16	HNA-1a NA1	FcγRIIIb FCGR3B*1	Europa: 54-64 (0,32- 0,40) USA: 56-62 (0,34- 0,37)	Indien 44 (0,30-0,68) China: 89-91 (0,68) Japan 88 (0,65)	67-74	59-68 (0,31-0,43) 91 (0,55)
	HNA-1b NA2	FcγRIIIB FCGR3B*2	Europa: 84-88 (0,60- 0,65) USA: 89 (0,67)	Indien 83 (0,70) China:52-54 (0,31) Japan: 51 (0,31)	77-81	77-78 (0,53-0,69) USA 80 (0,45) Bras 38 (0,21)
	HNA-1c SH	FcγRIIIB FCGR3B*3	5 (0,025-0,03)	Indien 16 (0,083) China 0 Japan <25 (0)	22-38	23-38 (0,12-0,21) Indianer <1
HNA-2 CD177	HNA-2a NB1	CD177 (NB1 GP) Nicht def.	Europa 87-94 (0,63- 0,76) USA 97 (0,83)	China: 99 (0,91) Japan: 89 (0,66)	nu	nu
HNA-3 -	HNA-3a 5b	70-95kDa GP Nicht def.	97-99 (0,91)	nu		nu
HNA-4 CD11b	HNA-4a Mart	CD11b (MAC-1; CR3) CD11B*1	96-99 (0,91)	nu		nu
HNA-5 CD11a	HNA-5a Ond	CD11a (LFA-1) CD11A*1	96 (0,82)	nu		nu

Tabelle 2: Nomenklatur humaner neutrophiler Antigene (HNA) und Übersicht über die Gen- und Antigenfrequenzen [nach: Korínková und Májský 1983; Madystha et al. 1984; Kline et al. 1986; Ohto et al. 1989; Bierling et al. 1990; Bux et al. 1992a, 1994, 1995; 1999a, 2000; Bux und Chapman 1997; Lin et al. 1994; Hessner et al. 1996; Kissel et al. 2000; Stroncek 2002a,b; Stroncek und Bux 2002; Clague et al. 2003].

“nu“ = nicht untersucht

1.2.2 HNA-2a / NB1 / CD177

Das neutrophilen-spezifische Antigen NB1 (HNA-2a, CD177) wurde 1971 im Rahmen einer neonatalen Immunneutropenie entdeckt, bei der Antikörper gegen NB1 zu einer selektiven Agglutination Neutrophiler führten [Lalezari et al. 1971]. Beschrieben ist die Expression von NB1 bisher auf Neutrophilen [Lalezari et al. 1971; Clement et al. 1983; Stroncek et al. 1990; Goldschmeding et al. 1992] und auf Monozyten während der Schwangerschaft [Taniguchi et al. 2004].

NB1 weist einen dominanten Erbgang mit Häufigkeit des Phänotyps von ca. 97% und einer entsprechenden Genfrequenz von ca. 0,9 auf [Lalezari et al. 1971; van de Reijden et al. 1979; Clay et al. 1984; Bux 2002a; Stroncek 2002b; Carrucio et al. 2003]. Bemerkenswerterweise wird NB1 nur auf einer Subpopulation neutrophiler Granulozyten, deren Anteil interindividuell von 0-100% variieren kann, exprimiert, wobei intraindividuell eine hohe Konstanz besteht [Verheugt et al. 1978; Ohto et al. 1989; Bierling et al. 1990; Goldschmeding et al. 1992; Stroncek et al. 1993b, 1996a; Lin et al. 1994; Matsuo et al. 2000]. NB1 wird sowohl auf der Plasmamembran als auch auf der Membran sekundärer Granula und zu einem geringen Teil in den Granula selbst exprimiert, wobei eine intrazelluläre Expression nur bei Zellen beobachtet wird, die NB1 auch auf der Plasmamembran exprimieren [Stroncek et al. 1990; Goldschmeding et al. 1992; Stroncek 2002b]. Eine Expression von NB1 läßt sich während der Granulozytopoese ab der Reifestufe des Myelozyten nachweisen, wobei der Anteil der NB1-exprimierenden Zellen während der weiteren Reifung konstant bleibt [Verheugt et al. 1977; Clement et al. 1983; Stroncek et al. 1998a].

Zur molekularen und genetischen Struktur von NB1 wurden viele Untersuchungen durchgeführt. Es zeigte sich, daß NB1 auf einem Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 58-64 kDa (Immunoblot) bzw. 49-55 kDa (Westernblot), bzw. 50,6 kDa (Massenspektrometrie) lokalisiert ist. Dieses Glykoprotein hat drei Asparagin-gebundene Glykan-Reste, zwei Zystein-reiche Regionen und am ω -Ende eine GPI (Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol)-Verankerung. Das NB1-Glykoprotein enthält zudem Disulfid-Bindungen [Stroncek 1990; Skubitz et al. 1991; Goldschmeding et al 1992; Kissel et al 2001], die für die Tertiärstruktur und die Antigenität entscheidend sind, denn die bekannten monoklonalen und polyklonalen Antikörper gegen NB1 erkannten das Epitop nur in dieser Form [Kissel et al. 2001].

Da Antikörper gegen NB1 häufig mit neutrophilen Molekülen von 85 und 60 kDa reagierten und einige humane (Allo-)Antikörper das Glykoprotein, aber nicht das NB1-Molekül erkannten, wird davon ausgegangen, daß das Glykoprotein mehrere Epitope aufweist [Stroncek et al. 1994b].

Erst vor wenigen Jahren gelang es, die zum Glykoprotein gehörende Primärstruktur zu identifizieren. Ausgehend von der Sequenz der cDNA ergibt sich ein Molekül mit 1311 bp, das für 437 AS kodiert. Dem Protein mit 416 AS geht ein Signalpeptid bestehend aus 21 AS voraus. 27 bzw. 276 bp am 5' und 3'-Ende werden nicht translatiert (UTR=untranslated regions). Die AS-Sequenz bestätigte die Befunde der

biochemischen Charakterisierung. Das dem NB1-Glykoprotein zugehörige Gen wurde auf dem humanen Chromosom 19q an Position 19q13.2 lokalisiert [Kissel et al. 2001; Bettinotti et al. 2002].

Vergleiche der cDNA und der genomischen Sequenz ergaben für NB1 eine Organisation des Gens in 9 Exons, die von 8 Introns mit einer Länge von 86-4158 bp unterbrochen werden [Bettinotti et al. 2002; Kissel et al. 2002]. An CD177 angrenzend befindet sich ein stark homologes Pseudogen, das eine partielle Duplikatur von CD177 (Exon 9-4) in entgegengesetzter Anordnung darstellt. Es ist bisher unklar, ob dieses Pseudogen selbst zu einer Proteinbildung führt oder die Expression von NB1 beeinflusst [Bettinotti et al. 2002; Dittmar et al. 2003].

Vergleiche der Gensequenz von NB1 zeigten eine Ähnlichkeit mit Proteinen der uPAR / CD59 / Ly-6 snake toxin-Superfamilie, so daß NB1 vermutlich dieser Proteinfamilie zugeordnet werden kann [Kissel et al. 2001]. Proteine dieser Ig-Superfamilie weisen insgesamt heterogene Funktionen auf wie Hemmung der Komplement-vermittelten Lyse, Bildung von Sauerstoffradikalen, Beteiligung an der Zelladhäsion, so daß aufgrund der Zugehörigkeit zu dieser Superfamilie kein Rückschluß auf die Funktion von NB1 möglich ist [Davies et al. 1989; Kissel et al. 2001].

Eine große Ähnlichkeit besteht zu PRV-1, einem Gen, das bei Patienten mit Polyzythämia vera überexprimiert wird [Temerinac et al. 2000; Klippel et al. 2001] und ebenfalls auf Chromosom 19q13.2 lokalisiert ist [Najfeld et al. 2003]. Die cDNA-Sequenz von PRV-1 und NB1 unterscheidet sich lediglich in vier Basenpaaren, so daß postuliert wird, daß es sich bei PRV-1 und NB1-GP um Allele von CD177 handelt, wobei davon ausgegangen wird, daß es sich bei PRV-1 um das häufigste Allel handelt [Temerinac et al. 2000; de Haas et al. 2001; Kissel et al. 2001; Bettinotti et al. 2002; Klippel et al. 2002; Caruccio et al. 2004; Stroncek et al. 2004].

Genauere Untersuchungen zur genomischen Struktur zeigten, daß es sich bei CD177 um ein Gen mit vielen Polymorphismen einzelner Nukleotide handelt, wovon einige zu einem AS-Austausch führen können. Einige dieser Polymorphismen waren mit einem großen oder kleinen Anteil NB1-exprimierender Neutrophiler assoziiert. Außerdem scheinen Polymorphismen der Proteinleitsequenz die Proteinexpression zu beeinflussen, da diese Sequenzen für den Transport durch das endoplasmatische Retikulum zur Plasmamembran bzw. sekundären Granula involviert sind [Wolff et al. 2003; Caruccio et al. 2004].

Die NB1-Expression variiert interindividuell und ist abhängig vom Lebensalter, Geschlecht, begleitenden Erkrankungen und den zum Nachweis verwendeten Antikörpern. Eine Vererbung der Expressionsdichte wurde von McCullough et al. [1987] beschrieben und wird durch die genomischen Untersuchungen gestützt [Wolff et al. 2003; Caruccio et al. 2004]. Für Neutrophile gesunder Erwachsener wird ein durchschnittlicher Anteil der NB1+ Granulozyten von 50-70% angegeben [Clement et al. 1983; Goldschmeding et al. 1992; Stroncek et al. 1994c; Matsuo et al. 2000; Wolff et al. 2006]. Aufgrund von Untersuchungen mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern wird davon ausgegangen, daß NB1 mindestens drei Epitope

aufweist und bei einem Individuum verschiedene Varianten vorkommen können [Clement et al. 1983; Stroncek et al. 1996a; Matsuo et al. 2000]. Die intraindividuelle Expression von NB1 ist über längere Zeit bei gesunden Individuen bemerkenswert konstant [Goldschmeding et al. 1992; Matsuo et al. 2000]. Die Expression des NB1-GP kann ab der Reifungsstufe des Myelozyten im Knochenmark nachgewiesen werden, wobei NB1 auf den verschiedenen Entwicklungsstufen in ähnlichen Anteilen exprimiert wird [Verheugt et al. 1978; Stroncek et al. 1998a]. Signifikante Unterschiede der NB1-Expression zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen konnten nicht gezeigt werden [Matsuo et al. 2000]. Bei ca. 8-11% gesunder Personen wurden mittels Immunfluoreszenz atypische Reaktionen mit zwei NB1+ Populationen beobachtet [Matsuo et al. 2000; Carrucio et al. 2003]. Lichtmikroskopisch besteht ein Unterschied zwischen NB1-exprimierenden und nicht-exprimierenden Neutrophilen [Goldschmeding et al. 1992; Stroncek et al. 1998b].

Ein größerer prozentualer Anteil NB1+ Neutrophiler wurde für Frauen beschrieben, wobei diese Beobachtung auch vom verwendeten Antikörper abhängig war [Matsuo et al. 2000; Carrucio et al. 2003]. Während der Schwangerschaft ist der Anteil NB1+ Neutrophiler mit im Mittel 78% signifikant gesteigert im Vergleich zu gesunden Männern und Frauen. Während der gesamten Schwangerschaft bleibt der Anteil NB1+ Neutrophiler relativ konstant; ein Unterschied zwischen 1., 2. und 3. Trimenon besteht nicht [Carrucio et al. 2003; Taniguchi et al. 2004].

Ein im Mittel geringerer Anteil NB1+ Neutrophiler wurde bei Patienten mit CML nachgewiesen. Bei diesem Patientenkollektiv war auch eine vollständige NB1-Defizienz häufiger [Stroncek et al. 1998b]. Bei Patienten mit paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie (PNH), bei der ein klonaler Defekt auf Stammzebene mit reduzierter Expression GPI-verankerter Proteine vorliegt, wird NB1 vermindert exprimiert und nur auf den Zellen, die nicht von diesem Defekt betroffen sind [Goldschmeding et al. 1992].

Ein größerer Anteil NB1+ Neutrophiler im Vergleich zu Erwachsenen wurde auf Neutrophilen in Nabelschnurblut beobachtet mit im Mittel 91% NB1+ Neutrophiler. Bereits bei Kindern ab dem 1. Lebensjahr bestand diesbezüglich kein Unterschied zu Erwachsenen mehr [Stroncek et al. 1998a].

Einmalige Stimulation Neutrophiler mit fMLP oder G-CSF veränderte den Anteil NB1+ Neutrophiler nicht [Goldschmeding et al. 1992; Wolff et al. 2003], während die Gabe von G-CSF an gesunde Personen über mehrere Tage den Anteil NB1+ Neutrophiler deutlich erhöhte [Stroncek et al. 1998b].

Die Zahl der NB1-GP pro Neutrophilem wurde bereits mehrfach untersucht, doch wurde meist die mittlere Fluoreszenzintensität angegeben, was einen Vergleich der Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen erschwert, da es sich bei der Fluoreszenzintensität um relative und geräteabhängige Angaben handelt. Bei gesunden Individuen wurden 36.000 – 318.000 NB1-GP pro Neutrophilem ermittelt [Bux et al. 1992b]. Die Zahl der Antigene bleibt von der Reifestufe des Promyelozyten bis zum reifen Neutrophilen weitestgehend konstant [Verheugt et al. 1978]. Für Frauen wird im Vergleich zu Männern eine erhöhte NB1-Expression

pro Neutrophilen angegeben, die im Alter abnimmt [Matsuo et al. 2000]. Während der Schwangerschaft ist die mittlere Fluoreszenz und damit die Expression von NB1 auf Neutrophilen signifikant höher als bei nichtschwangeren Frauen [Taniguchi et al. 2004]. Nach Stimulation Neutrophiler mit fMLP wurde in-vitro eine vermehrte NB1-Expression beobachtet [Skubitz et al. 1991; Goldschmeding et al. 1992]. Gabe von G-CSF an gesunde Personen führt zu einem Anstieg der NB1-mRNA in Neutrophilen um ca. den Faktor 1000 [Wolff et al. 2003, Wolff 2005] und zu einer deutlich erhöhten Expression des NB1-GP [Skubitz et al. 1991; Stroncek et al. 1998b; Matsuo et al. 2000]. Bei Granulozyten von Patienten mit einer schweren bakteriellen Infektion kommt es zu einer signifikant gesteigerten NB1-Expression [Göhring et al. 2004].

Bei PV-Patienten wurde die Expression von PRV-1, ein Allel zu NB1, bestimmt. Die mRNA-Expression von PRV-1 ist bei diesen Personen signifikant gesteigert [Johansson et al. 2003; Klippel et al. 2002; Liu et al. 2003; Cilloni et al. 2004; Florensa et al. 2004; Williams 2004].

Über die Funktion von NB1 ist bisher wenig bekannt, es liegen anhand verschiedener Versuche und Beobachtungen lediglich Vermutungen vor.

Untersuchungen zur Expression von NB1 bei Aktivierung Neutrophiler zeigten, daß Stimulation mit fMLP eine Hochregulation des Proteins bewirkt, allerdings nur auf den Zellen, die bereits in unstimuliertem Zustand NB1 auf ihrer Zelloberfläche exprimierten. Der prozentuale Anteil NB1-exprimierender Neutrophiler blieb dabei konstant, so daß davon ausgegangen wird, daß die Eigenschaft NB1 zu exprimieren bereits auf Ebene der Vorläuferzellen festgelegt ist [Skubitz et al. 1991; Goldschmeding et al. 1992]. Auch G-CSF führt zu einer Hochregulation von NB1 sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene [Skubitz et al. 1991; Stroncek et al. 1998b; Matsuo et al. 2000; Göhring et al. 2004; Passamonti et al. 2004; Wolff 2005]. Bei NB1-exprimierenden Neutrophilen kommt es nach Stimulation mit fMLP zu einer stärkeren chemotaktischen Reaktion im Gegensatz zu NB1-defizienten Neutrophilen [Stroncek et al. 1994a].

Die Adhäsion an Endothelzellen nach Stimulation mit fMLP, C5a, PMA war nicht von der NB1-Expression abhängig. Die Adhärenz an Endothelzellen ist stärker bei unstimulierten und NB1-defizienten Neutrophilen als bei stimulierten oder NB1-exprimierenden Neutrophilen. Andererseits hatten Antikörper gegen NB1 keinen meßbaren Effekt auf die Adhäsion Neutrophiler [Stroncek et al. 1993b; 1994a].

Antikörper gegen NB1 führten zu einer Hemmung der Phagozytose Neutrophiler [Nusbacher et al. 1979; Bux et al. 1993]. Inkubation von Neutrophilen mit spezifischen Antikörpern gegen NB1 führte zu einer Abnahme der Produktion von ROS, hatte jedoch keinen Einfluß auf die Phagozytose [Bartůňková et al. 1997]. Diese Beobachtungen sowie das Vorkommen von NB1 in sekundären Granula legen eine Funktion von NB1 im Rahmen der Phagozytose und der Bakterizidie mit Abtötung von Mikroorganismen nahe.

In Versuchen wurde bei Stimulation Neutrophiler eine Verlagerung von NB1 von der Plasmamembran in Endosomen und Lysosomen festgestellt, so daß eine mögliche Rezeptorfunktion dieses Moleküls vermutet wurde [Goldschmeding et al. 1992].

Das Gen für NB1 weist eine Ähnlichkeit mit Genen für Proteine der Ly-6 (uPAR/CD59/snake toxin) Superfamilie auf [Kissel et al. 2001] und ist in der Nähe des uPAR-Gens lokalisiert. Beim Menschen sind CD59 und uPAR am besten erforscht. Die Genfamilie ist durch zysteinreiche Domänen charakterisiert und enthält zwei Unterfamilien: GPI-verankerte und sekretorische Proteine. Die einzelnen Mitglieder weisen untereinander nur geringe Ähnlichkeit mit ca. 20-30% Homologie auf [Plesner et al. 1997]. CD59, das auf Leukozyten und auf Erythrozyten exprimiert wird, hemmt die Komplement-vermittelte Zellyse, indem es die Bindung von C9 an den C5b-C8-Komplex verhindert [Davies et al. 1989]. CD87 oder uPAR, ein hoch-affiner Rezeptor für den Plasminogen-Rezeptor vom Urokinase-Typ, wird von Neutrophilen, Monozyten und deren Vorläuferzellen exprimiert. Der uPAR-Rezeptor ist relevant für die Zell-Zell- und Zell-extrazelluläre-Matrix Adhäsion, wirkt an der Zellmigration mit und ist an der Chemotaxis beteiligt [Plesner et al. 1997]. Diskutiert wird eine Funktion von NB1-GP daher in der Adhäsion an extrazelluläre Matrixproteine und in der Zell-Zell-Adhäsion sowie der Migration [Bettinotti et al. 2002].

Die Tatsache, daß verschiedene Ly-6-Gene eine Rolle in der Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen haben und daß verschiedene Ly-6-Gene in stark proliferierenden und/oder malignen Zellen überexprimiert werden [Brakenhoff et al. 1995; Pearson et al. 2000; de Nooij-van Dalen et al. 2003; Shetty et al. 2003], läßt vermuten, daß auch CD177 eine bedeutende Funktion in der Hämatopoese haben könnte. Eine indirekte Rolle wird uPAR bei der Myelopoese zugeschrieben über die Aktivierung von Plasmin, welches wiederum Zytokine aktivieren kann. In vitro wiesen NB1+ Neutrophile ein schnelleres Wachstum und eine länger anhaltende Proliferation auf als NB1-defiziente, so daß gefolgert wurde, daß es sich bei NB1 um ein Molekül mit proliferativer Wirkung handeln könnte. Diskutiert wird daher ein Einfluß von NB1 auf die übermäßige Bildung Neutrophiler bei reaktiven Zuständen und myeloproliferativen Erkrankungen. Es wird vermutet, daß CD177 eine Rolle in der Pathogenese myeloproliferativer Erkrankungen haben könnte [Plesner et al. 1997; Mnjoyan et al. 2005].

Da während der Schwangerschaft der Anteil der NB1+ Neutrophiler und die Zahl der NB1-GP pro Zelle zunimmt, wurde eine pathophysiologische Rolle bei der Thrombozytose, Präeklampsie und Thrombophilie während der Schwangerschaft diskutiert [Caruccio et al. 2003; Taniguchi et al. 2004].

Bei im Rahmen alloimmuner Neutropenien gefundenen Antikörpern wurde dem NB-System ein zweites Antigen, NB2, zugeordnet, das das Produkt des Allels zu NB1 sein und bei ca. 3% der Bevölkerung homozygot vorliegen sollte. Nach weiteren Untersuchungen konnte NB2 kaum definiert werden und eine nahe Verwandtschaft zu NB1 nicht bestätigt werden [Stroncek et al. 1990, 1993a, 1993b; Bux und Chapmann 1997].

In der vorliegenden Arbeit liegt der Schwerpunkt auf der Expression von NB1 und deren Regulation. Dennoch soll kurz auf NB1-defiziente Neutrophile eingegangen werden. Die Beobachtung, daß anti-NB1-Seren nur eine Agglutination von NB1+ Zellen auslösen können [Lalezari et al. 1971] und die fehlende Reaktion mit Antiseren oder monoklonalen Antikörpern [Kissel et al. 2002] legt nahe, daß auf diesen Neutrophilen entweder kein oder ein deutlich unterschiedliches Glykoprotein exprimiert wird [Stroncek 2002]. Als Ursache der fehlenden NB1-Expression wird ein Genexpressionsdefekt aufgrund Mutationen in der Promoterregion oder in Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren vermutet [Wolff et al. 2003]. Es konnte gezeigt werden, daß die mRNA akzessorische Sequenzen mit Stopkodons (tga) enthält, wodurch es zu Splicing-Defekten - wahrscheinlich durch nicht korrekte Bildung des Splicing-Komplex – kommt und dem daraus abgeleiteten Protein die GPI-Verankerung und transmembranöse Segmente fehlen würden [Kissel et al. 2002; Wolff et al. 2003].

Ein lösliches NB1-GP, wie es für andere GPI-verankerte Proteine wie z.B. Fc γ RIIIb beschrieben wurde, konnte bisher nicht nachgewiesen werden [Kissel et al. 2002; Stroncek 2002].

1.2.3 Weitere Antigene auf Neutrophilen

1.2.3.1 Fc γ -Rezeptor IIIb (HNA-1; CD16)

Mit HNA-1b (NA1) wurde 1960 von Lalezari et al. erstmals ein Antigen beschrieben, das nur auf Neutrophilen nachgewiesen wurde [Lalezari et al. 1960]. HNA-1a (NA2), das antithetische Antigen zu HNA-1b, wurde wenig später entdeckt [McCullough et al. 1987].

Der Fc γ RIIIb und der stark homologe Fc γ RIIIa bilden die humane Fc γ R-Klasse III, die mit niedriger Affinität polymere, aber nicht monomere IgG-Antikörper binden. Der Fc γ RIIIa, ein transmembranärer Rezeptor, wird auf Monozyten, Makrophagen, natürlichen Killerzellen gefunden. Der GPI-verankerte Fc γ RIIIb wird auf fast allen reifen Neutrophilen, ca. 31-50% der Metamyelozyten und ca. 8-10% der Myelozyten exprimiert [Ravetch und Perussia 1989; Huizinga et al. 1990a,b; Barclay et al. 1993; Gessner et al. 1995; Stroncek et al. 1998a; Bux 2000]. In sekretorischen Vesikeln ist der intrazelluläre Pool an Fc γ RIIIb gespeichert [de Haas et al. 1994].

Der Fc γ RIIIb ist ein GPI-verankertes, hochgradig glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 50-65 kDa (HNA-1a) bzw. 62-80 kDa (HNA-1b) [Fleit und Kuhnle 1988; Huizinga et al. 1990a]. Der Fc γ RIIIb besitzt zwei IgG-ähnliche extrazelluläre Regionen, wovon die proximale Residuen für die Ligandenbindung enthält, während die distale sehr polymorph mit bisher unbekannter Funktion ist [Hibbs et al. 1994; Bux 1999b, 2000]. Der Fc γ RIIIb weist mehrere Polymorphismen auf, die bisher als HNA-1a, -1b, -1c klassifiziert wurden, wahrscheinlich auf der distalen Membrandomäne lokalisiert sind und genetisch drei Allelen entsprechen [Bux 2000; de Haas et al. 2001].

Das für den Fc γ RIIIb kodierende Gen wurde auf dem langen Arm von Chromosom 1 lokalisiert und besteht aus 5 Exons. Die zugehörige mRNA kodiert für 233 AS, wovon 188 AS das Glykoprotein und 17 AS das Signalpeptid bilden [Bux 1999b, 2000; Stroncek 2002]. In Exon 3 wurden die dem Polymorphismus des Fc γ RIIIb zugrundeliegenden Nukleotidaustausche lokalisiert. HNA-1b unterscheidet sich von HNA-1a in 5 Nukleotiden, woraus 4 AS-Substitutionen resultieren. Bei HNA-1c liegt zusätzlich eine weitere Punktmutation mit folgendem AS-Austausch vor [Bux et al. 1997b]. HNA-1c kann zusammen mit HNA-1a, aber auch alleine vorliegen, so daß zwei oder drei Gene vorhanden sein können [Koene et al. 1998; Gittinger et al. 2001, 2002].

Unter Verwendung von Antikörpern wurde eine Expression des Fc γ RIIIb auf der Plasmamembran von durchschnittlich 190.000 (100.000 - 400.000) bzw. 242.000 ± 36.000 Rezeptoren pro Zelle nachgewiesen [Huizinga et al. 1990a; Bux et al. 1994; Bux 2000], wobei eine geringe intraindividuelle Varianz beobachtet wurde [Huizinga et al. 1994]. Die Zahl der exprimierten Fc γ RIIIb ist abhängig vom HNA-Phänotyp: HNA-1b-homozygote Personen exprimieren mehr Fc γ RIIIb als heterozygote oder HNA-1a-homozygote Personen [Koene et al. 1996]. Stimulation Neutrophiler mit fMLP führt zu einer gesteigerten Expression von Fc γ RIIIb [Huizinga et al. 1989, 1990a, b; Skubitz et al. 1991], während PMA und G-CSF die Expression vermindert [Skubitz et al. 1991]. Die Zahl der exprimierten Fc γ RIIIb nimmt bei Gabe von G-CSF und bei Infektionen oder Sepsis ab [Kerst et al. 1993b; de Haas et al. 1994; Spiekermann et al. 1994; Michon et al. 1998; Stroncek et al. 1998b; Wagner et al. 2003].

Bei manchen Personen wird der Fc γ RIIIb nicht auf Neutrophilen exprimiert, was als „HNA-null-Phänotyp“ bezeichnet wird. Ursache ist ein fehlendes FCGR3B-Gen oder ein Defekt der GPI-Synthese. Eine erhöhte Neigung zu Infektionen, Autoimmun- oder Immunkomplexerkrankungen wird bei diesen Personen nicht beobachtet, allerdings kann es während einer Schwangerschaft zur Alloimmunisierung mit Bildung spezifischer Antikörper und in der Folge zur ANN des Neugeborenen kommen [Huizinga et al. 1988; Bux 2000; Stroncek 2002].

Eine lösliche Form des Fc γ RIIIb („sFc γ RIIIb“) konnte in Plasma, Aszites-, Synovialflüssigkeit (bei Arthritis), Lymphflüssigkeit und Urin nachgewiesen werden [Huizinga et al. 1994; 1990c]. Aktivierung Neutrophiler z.B. mit fMLP, PMA, G-CSF sowie Apoptose Neutrophiler führt zu einer proteolytischen Ablösung des Fc γ RIIIb von der Zelloberfläche, was ein Hinweis auf eine Funktion in Entzündungsreaktionen gewertet wird [Huizinga et al. 1988, 1990c; Viedma Contreras 1999]. Der sFc γ RIIIb dient als Maß für die Neutrophilenmasse im Körper, da die Plasmakonzentration des sFc γ RIIIb von der Neutrophilenproduktion abhängig ist und über einen längeren Zeitraum konstant bleibt [Huizinga et al. 1994]. Auch die Menge an sFc γ RIIIb im Plasma ist von HNA-1-Phänotyp abhängig und wie die Expression

auf der Zelloberfläche bei HNA-1b am höchsten [Koene et al. 1996]. Bei Sepsis und nach Gabe von G-CSF läßt sich mehr sFcγRIIIb im Plasma nachweisen [Kerst et al. 1993b; Muller Kobold et al. 1998].

Der FcγRIIIb ist das klinisch am bedeutsamsten immunogene Glykoprotein der Neutrophilenmembran. Ungefähr 30% aller granulozytären Autoantikörper erkennen Epitope auf diesem Rezeptor und können z.B. Immunneutropenien und Transfusionsreaktionen auslösen. Eine klinische Bedeutung des HNA-1-Polymorphismus ist bisher nicht bekannt [Bux 2000; Stroncek 2002].

Der FcγRIIIb gehört zu den niedrig-affinen Fcγ-Rezeptoren und bindet polymere IgG-Antikörper. Die wesentliche Funktion des FcγRIIIb liegt in Vorgängen bei der Phagozytose [Huizinga et al. 1990a; Witte und Schmidt 1992]. Der FcγRIIIb kann die opsonin-unabhängige Phagozytose von Bakterien induzieren [Huizinga et al. 1990a]. Antikörper gegen HNA reduzierten die Phagozytoserate in vitro um 50-80% mit einem dosisabhängigen Effekt und stärkerer Ausprägung bei homozygoten Zellen [Bux et al. 1993]. Eine Kreuzvernetzung des FcγRIIIb mit Immunkomplexen verstärkt die FcγRII-vermittelte Phagozytose und triggert verschiedene Neutrophilenfunktionen, u.a. die Degranulation. Die Bildung von ROS ist bei Blockade des FcγRIIIb signifikant vermindert [Huizinga et al. 1990b; Bux et al. 1993; Flesch et al. 1998]. Antikörper gegen den FcγRIIIb führten zu einer geringeren candidiziden Aktivität Neutrophiler [Bartůňková et al. 1997]. Damit bilden die niedrig-affinen Fcγ-Rezeptoren eine Brücke zwischen der humoralen und der zellulären Immunantwort [Witte und Schmidt 1992; Ravetch und Bolland 2001]. Auf die Chemotaxis und die Migration von Neutrophilen scheint der FcγRIIIb keinen Einfluß zu haben, da eine Blockade der Rezeptoren durch Antikörper keine Änderungen hervorrief [Bux et al. 1993a] (Tabelle 3).

Antikörper gegen	NB1	CD16	CD11B	CD18	CD11B+CD18
Funktion					
Chemotaxis	↔↓	↔			
Adhäsion	↔↓	↔	↓	↓	↓
Candidizität	↓	↓	↓	↓	↓↓
Phagozytose	↔↓	↓	↓	↓	↓
ROS-Produktion	↓	↓	↔↑	↓	↓

Tabelle 3: Einfluß von Antikörpern gegen verschiedene Antigene auf der Neutrophilenmembran. [Nusbacher et al. 1979; Bux et al. 1993a; Stroncek et al. 1993, 1994a; Bartůňková et al. 1997; Ruchaud-Sparagano et al. 1998]

Der Polymorphismus des FcγRIIIb hat Einfluß auf die Neutrophilenfunktion: HNA-1b homozygote Granulozyten wiesen eine geringere Phagozytoserate mit geringere Affinität zu IgG₃ auf als HNA-1a homozygote Neutrophile [Salmon et al. 1990; Stroncek 2002]. Funktionelle und klinische Bedeutung kommt auch der Zahl der exprimierten FcγRIIIb zu: Patienten mit einer präoperativ hohen FcγRIIIb-Expression pro Neutrophilem wiesen eine geringere Infektionsrate perioperativ auf [Viedma Contreras 1999].

1.2.3.2 Fc γ -Rezeptor I (CD64)

Der Fc γ RI ist ein hochaffiner Rezeptor für monomeres humanes IgG, der vorwiegend auf Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Auf nicht-aktivierten Neutrophilen wird der Fc γ RI nur in geringer Zahl und nur auf einem geringen Anteil <1% exprimiert. Es handelt sich um ein stark glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 72kD mit drei extrazellulären Domänen [Stroncek et al. 1998b; Buckle und Hogg 1989; Huizinga et al. 1990a; Barclay et al. 1993; Gericke et al. 1995].

Die Fc γ RI-Expression kann –in niedrigen Mengen- in vitro und in vivo durch IFN- γ innerhalb 24-48h induziert werden [Anderson und Looney 1986; Huizinga et al. 1990a; Klebanoff et al. 1992; Witte und Schmidt 1992; Kerst et al. 1993b; Flesch et al. 1998; Takano et al. 2000]. Auch G-CSF führt über einen Effekt auf myeloische Vorläuferzellen zu einer Expression von Fc γ RI auf Neutrophilen innerhalb 12-24h [Repp et al. 1991; Kerst et al. 1993a,b; Spiekermann et al. 1994; Gericke et al. 1995; Michon et al. 1998; Takano et al. 2000], wobei v.a. der Anteil der Fc γ RI-exprimierenden Neutrophilen von fast 0% auf ca. 40% nach etwa einem Tag und ca. 90% nach 2 Tagen Anwendung von G-CSF ansteigt [Stroncek et al. 1998b]. Beschrieben wird sowohl eine rasche Hochregulation innerhalb ca. 15 min durch einen Effekt über CD11b/CD18 („cross-linking“) als auch eine langsame Hochregulation nach Gabe von G-CSF oder IFN- γ [Perussia et al. 1983; Takano et al. 2000]. Bakterielle Infektionen und Sepsis führen zu einer vermehrten Fc γ RI-Expression auf Neutrophilen Neugeborener, Kinder und Erwachsener [Fjaertoft et al. 1999; Barth et al. 2001; Hirsh et al. 2001; Wagner et al. 2003]. In der Synovialflüssigkeit bei RA-Patienten wurde eine Expression des Fc γ RI auf Neutrophilen nachgewiesen, während im Blut zirkulierende Neutrophile dieser Patienten keine Fc γ RI-Expression aufwiesen [Quayle et al. 1997].

Die Hochregulation der Fc γ RI –Expression nach Stimulation Neutrophiler über Kreuzvernetzung von Integrinen und bei bakteriellen Infektionen zeigt, daß der Fc γ RI möglicherweise eine wesentliche Funktion in der Steigerung der Phagozytose und anderen Neutrophilenfunktionen hat [Gericke et al. 1995; Fjaertoft et al. 1999; Takano 2000]. Demgegenüber steht, daß eine vermehrte Expression des Fc γ RI bei Sepsis und ARDS mit einer geringeren Phagozytosefähigkeit und ROS-Produktion einherging [Hirsh et al. 2001].

1.2.3.3 Fc γ -Rezeptor II (CD32)

Der Fc γ RIIIa mit einem Molekulargewicht von 40 kDa wird konstitutiv auf Neutrophilen, Monozyten, Thrombozyten und B-Lymphozyten exprimiert. Es handelt sich um einen Rezeptor mit geringer Affinität für polymeres IgG [Anderson und Looney 1986; Huizinga et al. 1990a]. In ruhenden Neutrophilen ist er der wichtigste Phagozytose-induzierende Rezeptor und vermittelt Zellfunktionen wie z.B. die Degranulation und den oxidativen burst. [Huizinga et al. 1990a,b; Flesch et al. 1998]. Durch Phagozytose mit spezifischen Antikörpern opsonierter Bakterien stellt der Fc γ RIII wie die anderen Fc γ R eine Verbindung zwischen

humoralem und zellulären Immunsystem her [Witte und Schmidt 1992; Ravetch und Bolland 2001].

Die Expression des Fc γ RII auf Neutrophilen ist mit ca. 10.000 - 40.000 Rezeptoren pro Zelle gering [Huizinga et al. 1990a; Bux et al. 1992b]. Ein relevanter Einfluß von IFN- γ , GM-CSF, G-CSF oder Glucocorticoiden auf die Zahl der exprimierten Rezeptoren ist nicht beschrieben [Buckle und Hogg 1989; Huizinga et al. 1990a; Kerst et al. 1993b; de Haas et al. 1994; Michon et al. 1998; Stroncek et al. 1998b]. In vitro kommt es unter IFN- γ zu einer länger anhaltenden Expression des Fc γ RII [Klebanoff et al. 1992].

1.2.3.4 Komplementrezeptor 3 (CD11b/CD18-Komplex)

Der CD11b/CD18-Komplex gehört zur Familie der Integrine und ist eines der wesentlichen Adhäsionsmoleküle neutrophiler Granulozyten. Der Komplex ist ein Heterodimer, bestehend aus einer β -Untereinheit (CD18) und einer α -Untereinheit (CD11). Es werden drei Formen von CD11 unterschieden: CD11a (HNA-5a, LFA-1, α^L -Untereinheit), CD11b (HNA-4a, CR3, Mac-1, α^M -Untereinheit), CD11c (p150, α^X -Untereinheit) [Arnaout 1990; Barclay et al. 1993; Stroncek et al. 1996b; Bux 2000]. CD11a und CD11b werden auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten bei 96-100% gesunder Personen exprimiert, wobei CD11b vorwiegend auf myeloischen und natürlichen Killerzellen vorkommt [Kline et al. 1986; Arnaout 1990; Barclay et al. 1993; Bux 1999b]. Eine hohe Expression von CD11b wird auf Granulozyten Neugeborener beobachtet [Kline et al. 1986]. Eine Punktmutation im Gen für CD11b mit folgendem AS-Austausch ist Ursache des CD11b-negativen Phänotyps [Fung et al. 2003].

CD11b wird auf der Plasmamembran exprimiert und ist intrazellulär in sekretorischen Vesikeln und spezifischen Granula gespeichert, so daß eine rasche Hochregulation möglich ist [Arnaout 1990; von Andrian et al. 1991; de Haas et al. 1994; Ruchaud-Sparagano et al. 1998]. Nach Applikation von G-CSF kommt es innerhalb 30 min zu einer signifikanten Hochregulation der CD11b-Expression mit einem Maximum nach 2h und einem Rückgang nach ungefähr 4h [de Haas et al. 1994; Stroncek et al. 1998b]. Eine Expressionssteigerung um den Faktor 2-3 wird unter dem Einfluß von WSP (=water soluble membrane proteins) verschiedener Bakterien (*H. pylori*, *C. jejuni*, *S. aureus*, *E. coli*, *H. felis*) und fMLP beobachtet [Enders et al. 1995; Ruchaud-Sparagano et al. 1998]. Bei Sepsispatienten wird eine signifikant höhere Expression von CD11b auf der Plasmamembran Neutrophiler beobachtet [Muller Kobold et al. 1998]. Gabe von G-CSF an septische Neugeborene führte zu einer vermehrten CD11b-Expression [Drossou-Agakidou et al. 1998].

CD11b hat eine wichtige Funktion in der Adhäsion Neutrophiler an Endothelzellen mittels CD54 als Liganden [Arnaout 1990; Ruchaud-Sparagano et al. 1998] und ist relevant für die Phagozytose und Lyse von Bakterien, insbesondere in inflammatorischen Geschehen [Enders et al. 1995].

1.2.3.5 LPS-Rezeptor (CD14)

CD14 ist der wichtigste Rezeptor für LPS gramnegativer Bakterien auf Monozyten und Neutrophilen und liegt in zwei Formen vor: lösliches CD14 (sCD14) und Membran-gebundenes CD14 (mCD14). Über CD14 ist eine Aktivierung Neutrophiler möglich. CD14 ist intrazellulär gelagert und wird auf nicht-aktivierten Neutrophilen nur gering exprimiert [Stroncek et al. 1998b; Nussler et al. 1999; Wagner et al. 2003].

Bei Patienten mit septischem Schock wird CD14 vermindert auf Neutrophilen und Monozyten exprimiert [Barth et al. 2001]. Gabe von G-CSF und Sepsis führen zu einer vermehrten Expression von CD14 auf neugebildeten Neutrophilen [Hansen et al. 1993; Kerst et al. 1993b; Spiekermann et al. 1994; Stroncek et al. 1998b; Wagner et al. 2003].

1.2.3.6 L-Selektin (CD62)

CD62L ist an der Vermittlung des „Rolling“ beteiligt und hat als Liganden auf aktivierten Endothelzellen CD54. Antikörper gegen CD62L können die Extravasation von Leukozyten in akut entzündetes Gewebe deutlich vermindern [von Andrian et al. 1991; Enders et al. 1995]. Die Expression des L-Selektin-Rezeptors ist konstitutionell hoch auf Neutrophilen, wird aber bei Aktivierung und Gabe von G-CSF durch Abgabe des Rezeptors ins Serum herunterreguliert [von Andrian et al. 1991; Enders et al. 1995; Stroncek et al. 1998b; Nussler et al. 1999].

1.2.4 Expression neutrophiler Antigene auf Granulozyten aus Nabelschnurblut

Die fetale Blutbildung findet ab ca. der 6. Woche bis unmittelbar pränatal im Leberparenchym statt. Ab dem 5. Schwangerschaftsmonat beginnt die Blutbildung im Knochenmark, das ab dem 7. Monat der Hauptbildungsort ist. Das Knochenmark und Nabelschnurblut Neugeborener weist eine andere Zellverteilung auf als peripheres Blut Erwachsener auf (Tabelle 4) [Nerl 1993b; Wulfhekel und Düllmann 1994; Ritter 2001].

ZELLART	NEUGEBORENE	ERWACHSENE	ZELLART	NEUGEBORENE	ERWACHSENE
Erythroblasten	35%	25,6%	Erythrozyten	4,7 Mio/ μ l	4,9 Mio/ μ l
Myeloische Vorläuferzellen	24%	33,1%			
Stab-, Segmentkernige	27,5%	19,8%	Neutrophile	2250-9750/ μ l 25-65%	2200-6300/ μ l 55-70%
Lymphozyten	5%	16,2%	Lymphozyten	1000-3600/ μ l 25-40%	1800-10500/ μ l 20-70%
%NB1+	86% \pm 9%	69% \pm 17%		91 \pm 3% bzw. 95-96%	56 \pm 19%

Tabelle 4: Zellverteilung im Knochenmark und peripheren Blut sowie Anteil der NB+ Neutrophilen bei Neugeborenen und Erwachsenen. Nach: Madystha et al. 1984; Nerl 1993b; Wulfhekel und Düllmann 1994; Stroncek et al. 1998a; Ritter 2001.

Infektionen und insbesondere eine Sepsis bei Neugeborenen und v.a. bei Frühgeborenen stellen eine lebensbedrohliche Erkrankung dar. Die Inzidenz beträgt ca. 1-10 pro 1000 Geburten mit einer Mortalitätsrate von 15-50% [Küster et al. 1998]. Die erhöhte Anfälligkeit für Infektionen erklärt sich durch das noch nicht ausgereifte Immunsystem auf humoraler, phagozytotischer und zellulärer Ebene und einem geringeren Speicherpool Neutrophiler. Die Bildung von ROS ist bei Neugeborenen und insbesondere bei Frühgeborenen geringer als bei Erwachsenen, vermutlich aufgrund einer geringeren Anzahl von Fc-Rezeptoren [Wolach 1997; Komatsu et al. 2001]. Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen (CFU-GM) im Nabelschnurblut haben bereits in nicht-infektiösem Zustand maximale Proliferationsraten, die signifikant höher sind als bei Erwachsenen, so daß bei Infektionen die zusätzlich induzierte Neutrophilenbildung begrenzt ist [Christensen et al. 1986]. Die Prodromi einer Infektion sind unspezifisch, und es fehlen verlässliche und frühzeitige spezifische Laborparameter, so daß eine Diagnose und Therapiebeginn mit Antibiose und z.T. G-CSF oft nicht rechtzeitig möglich ist. CRP als Infektionsmarker erwies sich in der Initialphase einer Sepsis als nur wenig sensitiver Parameter [Wolach 1997; Küster et al. 1998], eignet sich aber als sensitiver und spezifischer Parameter 1-2 Tage nach Beginn einer Infektion zur Kontrolle [Ng et al. 1997]. Daher wurden Parameter gesucht, die sicher und frühzeitig eine mögliche Sepsis erkennen lassen. Ein einfacher, nicht-invasiver Parameter ist die reaktive Hyperämie [Martin et al. 2001]. Untersuchungen ergaben, daß IL-6, der IL-1-Rezeptorantagonist signifikant ab 2 Tage vor Beginn einer Sepsis ansteigen und auch bei Beginn einer Infektion erhöht sind mit einer hohen Sensitivität [Ng et al. 1997; Küster et al. 1998]. Auch für TNF- α und IL-8 sind höhere Plasmaspiegel bei Infektionen bei Neugeborenen gemessen worden [Ng et al. 1997; Martin et al. 2001; Nupponen et al. 2001]. Bei Amnioninfektionssyndromen wurden höhere G-CSF-Spiegel in der Amnionflüssigkeit, im Serum der Mutter und im Urin des Neugeborenen sowie eine vermehrte Expression des G-CSF-Rezeptors auf Plazentazellen nachgewiesen [Calhoun et al. 2001]. Der Fc γ RI wird bei Neugeborenen wie bei Erwachsenen mit einer bakteriellen Infektion signifikant höher exprimiert als bei Gesunden [Fjaertoft et al. 1999], und CD11b wird bei Neugeborenen mit Infektion vermehrt exprimiert [Nupponen et al. 2001]. Ziel der Untersuchungen in dieser Arbeit war daher zu überprüfen, ob CD177 ein möglicher – frühzeitiger - Laborparameter zum Nachweis einer Sepsis oder bakteriellen Infektion sein könnte.

Über die Expression neutrophiler Antigene ist bislang wenig bekannt. Eine vollständige Expression mit etwa gleicher Antigenfrequenz wie bei Erwachsenen bereits bei Geburt wird beschrieben [Madyastha et al. 1984]. Takahashi et al. [1994] geben eine geringere Expression des Fc γ RIIIb auf Nabelschnurblut im Vergleich zu Erwachsenen an mit einem Anteil von 73,3% exprimierenden Neutrophilen im Gegensatz zu ca. 96% bei Erwachsenen. Die Expression des Fc γ RIIIb pro Neutrophilem ist bei Neugeborenen geringer als bei Erwachsenen und insbesondere bei Frühgeborenen und septischen Neugeborenen noch geringer und steigt in den ersten 2 Lebenswochen an auf vergleichbare Werte Erwachsener [Carr und Davies 1990]. Eine hohe Expression von CD11b wird auf Granulozyten Neugeborener beobachtet [Kline et al. 1986]. Der Fc γ RI und

auch der Fc γ RII wird bei Neugeborenen gleich stark exprimiert wie bei Erwachsenen und Kindern [Carr und Davies 1990; Takahashi et al. 1994; Fjaertoft et al. 1999]. Eine höhere Expression wurde auch für NB1 beschrieben mit einem signifikant größerem Anteil NB1+ Zellen sowohl im Knochenmark als auch im peripheren Blut [Stroncek et al. 1998a]. Zur Anzahl der exprimierten Antigene liegen keine Untersuchungen vor.

1.2.5 Klinische Bedeutung neutrophiler Antigene

Granulozytäre Antigene erlangen dann klinische Relevanz, wenn gegen sie Antikörper gebildet werden, die wiederum Immunneutropenien oder Transfusionsreaktionen [Stroncek 2002] sowie eine erhöhte Neigung zu Infektionen durch eine gestörte Phagozytose bedingen können [Bartůňková et al. 1997]. Granulozytäre Antikörper wurden u.a. in Seren polytransfundierter Personen, nach Schwangerschaften, bei Patienten mit Neutropenien und Transfusionsreaktionen gefunden [Bux 2000; Sachs und Bux 2003; Davoren et al. 2003]. Antikörper gegen Neutrophile werden bei ca. 1,1% der Schwangerschaften gebildet [Bux et al. 1992a] und können gegen membranassoziierte (Entwicklung auto- oder alloimmuner Neutropenien) oder gegen zytoplasmatische Antigene (z.B. bei Wegener-Granulomatose) gerichtet sein [Bartůňková et al. 1997]. Zur Diagnostik von Immunneutropenien und zur Prävention von Transfusionszwischenfällen wurden spezielle Testverfahren zum Nachweis antigranulozytärer Antikörper etabliert wie GIFT, GAT, MAIGA u.a. [Verheugt et al. 1977; Carrington et al. 1989; Bux et al. 1992b,c; Wallis 1999; Minchinton et al. 1997; Bux 1999b,d, 2002b; Felix und Calhoun 2000].

Häufige Zielstruktur der Antikörper sind HLA, HNA-1 oder HNA-2 [Bux et al. 1991, 1999b; Bux 1992c; Stroncek 2002; Maheshwari et al. 2002]. Unter den durch Antikörper gegen Granulozyten ausgelösten Erkrankungen sind am häufigsten Autoimmunneutropenien (64%), seltener febrile nicht-hämolytische Transfusionsreaktionen (6%), neonatale Alloimmunneutropenien (4%), TRALI (4%) und Medikamenten-induzierte Neutropenien (1%) zu finden [Bux et al. 1991, 1997a, 1999b].

Bei der neonatalen Immunneutropenie kommt es infolge einer Immunisierung der Mutter gegen Granulozytenantigene des Feten zur Bildung von granulozytenspezifischen Alloantikörpern, die in einem aktiven Prozeß über die Blut-Plazenta-Schranke transportiert werden und einen vermehrten Abbau der fetalen Granulozyten bewirken [Bux et al. 1994, 1999d; de Haas und von dem Borne 2001a]. Im Gegensatz zum M. hämolyticus neonatorum können diese Alloantikörper bereits das erste Kind betreffen [Lalezari et al. 1971; Bux et al. 1992a]. In seltenen Fällen (Inzidenz <0,1%) kann es auch zu einer Alloimmunisierung der Mutter gegen neutrophile Antigene des Kindes, häufig gegen Fc γ RIIIb oder CD177, kommen [Bux et al. 1992a; Felix und Calhoun 2000; Girlando et al. 2000; Maheshwari et al. 2002].

Im Rahmen von Granulozytentransfusionen wurden Alloimmunisierungen beobachtet, wobei eine steigende Zahl von Transfusionen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einer Immunisierung einhergeht [Bux et al. 1999b, 2003; Stroncek et al. 1994d, 1996b]. Das erfolgreiche Angehen einer Knochenmarkstransplantation

kann durch das Auftreten granulozyten-spezifischer Alloantikörper gefährdet werden [Schacter et al. 1980; Stroncek et al. 1993d; Bux 1999b].

Autoimmunneutropenien (AIN) lassen sich in primäre und sekundäre Formen unterscheiden [Bux et al. 1991, 1999b]. Die Ätiologie der primären AIN ist weitgehend unklar und betrifft meist Kinder vor dem 3. Lebensjahr. Vermutlich besteht ein Zusammenhang mit einer immunologischen Unreife und weiteren exogenen Triggerfaktoren; in der Regel erfolgt eine Spontanremission [Bux et al. 1991, 1999b; Yamada et al. 2002]. Die sekundäre AIN kommt vorwiegend bei Erwachsenen vor und tritt meist in Folge einer anderen Autoimmunkrankheit wie z.B. systemischer Lupus erythematoses, lymphoproliferative Erkrankungen, Autoimmunthrombozytopenie auf [Bux et al. 1991; Stroncek 1993c; Kwon et al. 2003].

Eine Medikamenten-induzierte Immunneutropenie ist für viele Substanzen oder ihre Metaboliten beschrieben, wobei am häufigsten β -Lactam-Antibiotika, Analgetika, Antiarrhythmika, Thyreostatika (Carbimazol), Antimalaria (Quinine) assoziiert sind [Stroncek et al. 1993c, 1994b; Bux 1998, 1999b].

Bei Transfusionen v.a. plasma- oder leukozytenhaltiger Präparate sind Transfusionsreaktionen aufgrund antileukozytärer Antikörper mit teilweise letalem Ausgang beobachtet worden, wobei TRALI bzw. pulmonale Zwischenfälle die häufigsten Komplikationen sind [Scully et al. 1998; Kopko et al. 1999; Wallis 1999; Lucas et al. 2000; Voss et al. 2001; Bux 2002b; Davoren et al. 2003]. Die klassische Form von TRALI ist gekennzeichnet durch die Entwicklung einer akuten Lungenschädigung innerhalb ca. 6h nach einer Bluttransfusion mit Entwicklung eines bilateralen Lungenödems. Antikörper gegen Granulozyten, meist HLA- oder HNA-Antigene, sind entscheidend für die Entwicklung von TRALI und wurden meist im Plasma des Spenders, seltener im Plasma des Empfängers nachgewiesen [Bux et al. 1996; Bux 1999b, 2000; Lucas et al. 2000; von Witzleben-Schürholz et al. 2000; Voss et al. 2001; Sachs und Bux 2003]. Durch die Antikörper kommt es zu einer Aktivierung der Neutropilen mit Expression von Adhäsionsmolekülen, Migration, Ausschüttung von Zytokinen, Proteasen, Sauerstoffradikalen mit der Folge eines kapillärem Endothelschadens, Hyperpermeabilität und letztlich Entwicklung eines Lungenödems [von Witzleben-Schürholz et al. 2000; Lucas et al. 2000; Bux 2002b]. Als Prädisposition werden zytotoxische Behandlungen, aktive Infektionen, kurz zurückliegende (chirurgische) Eingriffe sowie massive Transfusionen angesehen [Silliman et al. 1997].

1.3 Aktivierung Neutrophiler

1.3.1 G-CSF

Der Wachstumsfaktor G-CSF wird von Zellen der Monozyten- und Makrophagenlinie, sowie von Endothelzellen, Fibroblasten, Mesothelzellen, z.T. nach Stimulation mit Zytokinen wie TNF- α , IL-1, IFN- γ , gebildet [Demetri und Griffin 1991]. Auch in NK-Zellen und der Dezidua in der frühen Schwangerschaft wird G-CSF gebildet [Saito et al. 1993a].

G-CSF ist ein Glykoprotein aus 174 AS. Das Gen ist auf Chromosom 17q11-22 lokalisiert [Nagata et al. 1986]. Es werden zwei Rezeptoren für G-CSF beschrieben: ein hochaffiner oligomerer (812 AS) und ein niedrigaffiner monomerer (759 AS) Rezeptor. Auf humanen Granulozyten werden pro Zelle ca. 700-1500 hochaffine Rezeptoren für G-CSF exprimiert. Des Weiteren wurden G-CSF-Rezeptoren u.a. auf leukämischen Zellen, Plazenta-, Trophoblasten- und Endothelzellen, Monozyten, Makrophagen, Zellen des kleinzelligen Bronchial-Karzinoms sowie auf T- und B-Lymphozyten nachgewiesen [Avalos et al. 1990; Demetri und Griffin 1991; Morikawa et al. 2002; Franzke et al. 2003].

Die Vielzahl der Zelltypen, die G-CSF produzieren können, sowie die Variabilität der Stimuli, die einen Anstieg der G-CSF Produktion bewirken können wie z.B. Interleukin 1 [Zsebo et al. 1988], deuten auf eine komplexe Regulation auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene hin. In vitro–Untersuchungen zeigten einen synergistischen Effekt von G-CSF, GM-CSF und IL-3, IL-1 α , IL-6 [Demetri und Griffin 1991; Matsushima et al. 2001].

G-CSF beeinflusst die Zahl, die Bildung und die Funktion Neutrophiler [Nussler et al. 1999]. G-CSF ist ein Regulator sowohl der basalen Neutrophilenzahl zum Ausgleich der Zellmauserung als auch zur streßinduzierten Steigerung der Neutrophilenzahl bei z.B. bakteriellen Infektionen oder zytostatischer Therapie. Fehlende G-CSF Produktion oder ein fehlender G-CSF-Rezeptor führen zu einer chronischen Neutropenie [Watari et al. 1989; Demetri und Griffin 1991; Drossou-Agakidou et al. 1998; Basu et al. 2000, 2002; Matsushima et al. 2001]. Durch G-CSF werden im Knochenmark Stammzellen (CD34+ Zellen) zur Teilung und Differenzierung angeregt, indem die Zahl der Kolonien-bildenden Vorläuferzellen zunimmt, sogenannte G-CFU_s = granulocyte colony-forming units [Welte et al. 1987; Avalos et al. 1990; Demetri und Griffin 1991; Sawada et al. 1993] und die Reifung neutrophiler Vorläuferzellen sowie deren Freisetzung ins Blut gefördert [Welte et al. 1987; Nussler et al. 1999; Girlando et al. 2000]. G-CSF greift ferner in Vorgänge der Chemotaxis, Migration, Bildung von ROS, Phagozytose und intrazellulären Lyse ein. G-CSF vermag die Migrationsrate Neutrophiler vom Blut ins Gewebe und insbesondere in entzündete Gewebe unabhängig von chemotaktischen Gradienten zu erhöhen, indem die Expression spezifischer Adhäsionsmoleküle, wie z.B. CD11b/CD18 und CD66b, gesteigert wird [Yong 1996; Drossou-Agakidou et al. 1998; Nussler et al. 1999]. Die Chemotaxis und Superoxidproduktion Neutrophiler nimmt bei Gabe von G-CSF zu [Wolach et al. 2000], und die Apoptose wird gehemmt [Nussler et al. 1999; Basu et al. 2002], was die Effektivität der

Immunantwort steigert.

Wird G-CSF gesunden Probanden appliziert, kommt es nach ca. 15-30 min zu einem Rückgang der Zahl zirkulierender Neutrophiler, was als Folge der Aktivierung aufgefaßt wird. Diese Neutropenie besteht etwa 2 Stunden. Innerhalb 24 Stunden nach G-CSF-Applikation steigt die Anzahl der Neutrophilen deutlich an und kann bis zu 72 Stunden erhöht bleiben [Hansen et al. 1993; de Haas et al. 1994; Stroncek et al. 1998b]. Der Effekt tritt zwar rasch, aber nur vorübergehend ein [Girlando et al. 2000]. Eine Einmalgabe von G-CSF kann die Zahl der zirkulierenden Granulozyten um das vier- bis maximal zehnfache erhöhen [Caspar et al. 1993; Stroncek et al. 1998b; Schmitt et al. 2002; Bux et al. 2003]. Bei Applikation von G-CSF an mehreren aufeinander folgenden Tagen ist jeweils ein weiterer Anstieg der Zahl der peripheren Neutrophilen zu beobachten [Stroncek et al. 1998b]. G-CSF induziert überdies Veränderungen in der Expression verschiedener Membranmoleküle auf Neutrophilen (Tabelle 5).

Antigen	Expression unter G-CSF	Antigen	Expression unter G-CSF
HNA-2a (CD177)	gesteigert	CD14	zunächst unverändert, dann gesteigert
FcγRI (CD64)	unverändert, leicht gesteigert	MAC-1 (CD11b)	gesteigert
FcγRII (CD32)	unverändert	L-Selektin	vermindert
FcγRIIIb (CD16)	zunächst gesteigert, dann vermindert		

Tabelle 5: Einfluß von G-CSF auf die Expression verschiedener Antigene auf Neutrophilen. Nach Kerst et al. 1993a,b; de Haas et al. 1994; Drossou-Agakidou et al. 1998; Stroncek et al. 1998b; Maheshwari et al. 2002.

Klinische Anwendung findet (rekombinantes) G-CSF in der Behandlung von Patienten mit kongenitaler Neutropenie; bei Chemotherapie und Bestrahlungen wird es zur raschen Überwindung der Knochenmarksdepression eingesetzt [Pocock et al. 2001; Bux et al. 2003]. Im Rahmen autologer oder allogener Stammzelltransplantationen wird G-CSF zur Erhöhung der Zahl peripherer Blutvorläuferzellen beim Spender angewendet [Bensinger et al. 1993; Stroncek et al. 1998b]. Um eine größere Ausbeute zu erzielen, werden Spender für eine Granulozytentransfusion mit G-CSF vorbehandelt. Auch Kombinationen von G-CSF mit Dexamethason werden angewendet zur Steigerung der Neutrophilenzahlen [Price et al. 2000]. Im Tiermodell konnte durch Gabe von G-CSF eine höhere Überlebensrate bei Sepsis gezeigt werden [Demetri und Griffin 1991] und beim Menschen waren hohe G-CSF-Spiegel bei Sepsis mit einer geringeren Komplikationsrate und Mortalität assoziiert [Gross-Weege et al. 1997].

An Immunneutropenie erkrankte Neugeborene haben ein erhöhtes Infektionsrisiko, so daß rekombinantes humanes G-CSF zur Therapie bei schweren Infektionen oder vor Operationen eingesetzt wird [Drossou-Agakidou et al. 1998; Maheshwari et al. 2002; Yamada et al 2002].

Die Funktion der über G-CSF-Stimulation gewonnenen Neutrophilen sind bezüglich der Chemotaxis und Phagozytose unstimulierter vergleichbar, der oxidative Burst wird als normal bis verstärkt beschrieben [Avalos et al. 1990; Caspar et al. 1993; Drossou-Agakidou et al. 1998; Schmitt et al. 2002].

Neben den positiven Effekten von G-CSF werden auch unerwünschte Wirkungen beobachtet. Bei G-CSF-Stimulation gesunder Personen werden am häufigsten Nebenwirkungen in Form grippaler Symptome beschrieben [Bensinger et al. 1993; Bux et al. 2003]. Bei Patienten mit RA kann es bei Gabe von G-CSF zur Exazerbation kommen [Snowden et al. 1998]. Auch auf nicht-hämatopoetische Tumorzellen, z.B. beim Kolonkarzinom, können G-CSF, GM-CSF, IL-3 einen proliferativen Effekt haben, so daß die Anwendung von G-CSF bei diesen Patienten zum Progress des Tumors oder – bei Behandlung nach zytostatischer Therapie – durch Stimulation verbliebener Tumorzellen zum Rezidiv führen könnte [Berdel et al. 1989]. Bei Therapie einer Immunneutropenie mit G-CSF kann durch das Vorliegen von Antikörpern und die damit einhergehende Zerstörung der neugebildeten Zellen eine Verschlechterung oder Erfolglosigkeit auftreten kann [Pocock et al. 2001].

Bei Messungen des G-CSF-Spiegels im Plasma wurden bei Gesunden Konzentrationen von bis zu 100pg/ml gemessen [Watari et al. 1989; Kawakami et al. 1990; de Haas et al. 1994; Bux et al. 1999c]. Signifikante intraindividuelle Unterschiede bezüglich der Serum-G-CSF Konzentration wurden bei Gesunden nicht beobachtet, auch ein Zusammenhang zwischen dem Serum-G-CSF-Spiegel und Neutrophilenzahlen bzw. Leukozytenzahlen im Blut ließ sich nicht nachweisen [Kawakami et al. 1990].

Während der Akutphase von bakteriellen Infektionen ist der G-CSF Spiegel im Serum im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht ($731,8 \pm 895$ pg/ml, max. 3199 pg/ml), wobei es jedoch nach der Akutphase wieder zu einer Normalisierung kommt [Watari et al. 1989; Kawakami et al. 1990; Gross-Weege et al. 1997; Barth et al. 2001]. Stark erhöhte Spiegel von G-CSF im Serum wurden auch bei Patienten mit schwerer kongenitaler Neutropenie aufgrund einer Reifungsstörung der Neutrophilen [Mempel et al. 1991; Bux et al. 1999c] und bei Patienten mit aplastischer Anämie [Watari et al. 1989] beschrieben. Für Immunneutropenien wird jedoch eine Erhöhung der G-CSF-Spiegel nur zusammen mit dem Auftreten einer bakteriellen Infektion beschrieben; so daß naheliegt, daß eine Immunneutropenie per se kein ausreichender Stimulus zur Erhöhung des G-CSF-Spiegels darstellt [Bux et al. 1999c]. Bei Infektionen und Lungenkarzinomen konnte eine positive Korrelation von G-CSF-Spiegel und Neutrophilenzahlen gezeigt werden [Watari et al. 1989]. Das Amnioninfektionssyndrom ist mit einer vermehrten Expression von G-CSF-Rezeptoren auf Plazentazellen sowie einer höheren G-CSF-Konzentration in der Amnionflüssigkeit, Serum der Mutter und Urin des Neugeborenen assoziiert [Calhoun et al. 2001]. Bei PV-Patienten wurden normale G-CSF-Spiegel gemessen [Watari et al. 1989].

1.3.2 Entzündung

Eine Entzündung ist eine Abwehrreaktion des Organismus gegen schädliche Reize. Auslöser für eine Entzündung können Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten), Fremdkörper (Fremdeiweiß, feste Partikel wie Asbest), Gewebeerstörungen (mechanisch, chemisch, physikalisch, körpereigene

Auslöser wie bei Autoimmunreaktionen) sein. In der Folge kann es zu akuten oder chronischen Entzündungen kommen.

Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems bewirken eine Phagozytose von Erregern und Sekretion von Zytokinen wie TNF- α , Leukotriene, IFN- γ , TNF- α , IL-1, wodurch es wiederum zur vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen des Endothels mit der Folge einer gesteigerten Adhäsion und Migration Neutrophiler kommt, die sich entlang eines Gradienten einer chemotaktisch aktiven Substanz wie IFN- γ , C5a oder Leukotrienen bewegen. Degranulation von Mastzellen mit der Freisetzung von u.a. Histamin, IL-8, PAF, NCF (Neutrophilenchemotaktischer Faktor), PAF fördert die Adhäsion u.a. durch Erhöhung der Gefäßpermeabilität und Vasodilatation und aktiviert weitere Zellen wie Neutrophile, Thrombozyten [Perretti 1998]. Proteine des Komplementsystems tragen zur Lyse von zirkulierenden Erregern bei. Natürliche Killerzellen erkennen von Viren oder Tumoren befallene Zellen und bewirken über Perforine eine Zytolyse. Weiterer Bestandteil einer Entzündungsreaktion ist die sogenannte „Akute-Phase-Reaktion“, die verschiedene Proteine und Peptide umfasst. Wesentliche Bestandteile sind IL-1, TNF- α , IFN- α , IL-6, Prostaglandine, die u.a. von Endothelzellen, Phagozyten produziert werden und im Körper verschiedene Reaktionen auslösen wie Fieber, Leukozytose, gesteigerte Immunabwehr, katabole Stoffwechsellage, vermehrte Bildung von Komplementproteinen, CRP, Entzündungsmediatoren.

Eine Inhibition der Entzündungsaktivität kann durch Akute-Phase-Proteine selbst (IL-6), Suppression der Zytokinsynthese in Lymphozyten durch Prostaglandine und TGF- β , durch IL-1-Rezeptorantagonisten und durch Th2-Zytokine (IL-4, IL-10, IFN- γ) mit Förderung der zellulären und Hemmung humoraler Immunreaktionen stattfinden [Bone et al. 1997; Salzberger et al. 1998; Silbernagel 1998; Viedma Contreras 1999; Füssle und Sziegoleit 2001; Benjamin et al. 2002; Hotchkiss et al. 2003; Martins et al. 2003].

1.3.2.1 Sepsis

Als Sepsis wird eine potentiell lebensbedrohliche Allgemeininfektion durch Bakterien oder deren Bestandteile, in neueren Definitionen auch durch Pilze, Viren, mit schweren Krankheitssymptomen mit einer systemischen Reaktion definiert, wobei zwei der folgenden Kriterien - neben dem Infektionsnachweis - erfüllt sein müssen [Bone et al. 1997; Salzberger et al. 1998; Füssle und Sziegoleit 2001]:

- Temperatur >38°C oder < 36°C
- Herzfrequenz >90/min.
- Atemfrequenz >20/min oder PaCO₂ < 32mmHg (hyperventilationsbedingt)
- Leukozytenzahl > 12000/ml oder < 4000/ml oder >10% Stabkernige

Prädisponierende Faktoren für die Entwicklung septischer Syndrome sind eine immunsuppressive oder Zytostatikatherapie, vorangegangene Operationen, Verbrennungen, Abwehrschwäche, Vorhandensein von Implantaten oder Kathetern, hohes Alter, Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus, Leberzirrhose und

Malignome [Salzberger et al. 1998; Füssle und Sziegoleit 2001]. Trotz potenter Medikamente und intensivmedizinischen Maßnahmen gehört die Sepsis zu den häufigsten Todesursachen auf Intensivstationen und weist abhängig vom Schweregrad und Begleiterkrankungen eine hohe Mortalitätsrate von 15-60% auf [Hotchkiss et al. 2003; Martins et al. 2003].

Zur Pathogenese der Sepsis wurden verschiedene Modelle entwickelt. Vermutet wird, daß es – vereinfacht - zunächst zu einer lokalen und dann systemischen proinflammatorischen Reaktion auf eine Infektion kommt mit einer massiven Entzündungsreaktion, gefolgt von einer hypoinflammatorischen oder immunsuppressiven Phase, was letztendlich zu einer gestörten Immunantwort mit Schädigung des körpereigenen Gewebes führt [Bone et al. 1997; Viedma Contreras 1999; Hotchkiss et al. 2003]. Kommt es zum Überwiegen der proinflammatorischen Reaktion, führt dies zu einer endothelialen Dysfunktion mit erhöhter mikrovaskulärer Permeabilität, Störung der Mikrozirkulation, Aktivierung des Gerinnungssystems, Vasodilatation. Klinisch kommt es zu Fieber, Schüttelfrost, Hypotonie, Herzfrequenzerhöhung, Hyperventilation. Bedingt durch Minderperfusion und Entzündungsmediatoren kann es zur Organschädigung und Organversagen kommen, wobei insbesondere das Lungenversagen (ARDS) gefürchtet ist [Bone et al. 1997; Salzberger et al. 1998; Viedma Contreras 1999; Wyncoll and Evans 1999; Benjamin et al. 2002].

Zur Bedeutung Neutrophiler bei der Sepsis wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Im Vergleich zu Neutrophilen gesunder Probanden besitzen Neutrophile septischer Patienten eine signifikant erhöhte Phagozytosefähigkeit und weisen eine um den Faktor 4-5 gesteigerte ROS-Bildung auf [Martins et al. 2003]. Es konnte eine Korrelation von erhöhter Expression von Aktivitätsmarkern auf Neutrophilen mit dem Überleben nachgewiesen werden. Auch die ROS-Produktion Neutrophiler korreliert mit der Überlebensrate der septischen Patienten. Zudem wurde bei der Sepsis eine verspätete Apoptose Neutrophiler beobachtet, was als autoregulatorischer Mechanismus zur Verstärkung der Abwehr interpretiert wird [Martins et al. 2003].

1.3.2.2 Virale Infektionen

Die Vermehrung von Viren findet meist primär im Gewebe an der Eintrittspforte und den lokalen Lymphknoten statt; es folgt die primäre Virämie mit Befall des Zielorgans. Die Ausbreitung kann hämatogen, lymphogen oder über Nerven erfolgen, abhängig vom Virustyp. An der Beseitigung eingedrungener Viren sind beteiligt: 1. das T-Zell-System mit Makrophagen, 2. virusneutralisierende Antikörper und die antikörpervermittelte Zytotoxizität der Killerzellen, 3. die natürlichen Killerzellen. Manche Virusinfektionen (z.B. HIV) können Einfluß auf die Funktion Neutrophiler nehmen, z.B. durch Aktivierung des oxidativen burst, Hemmung der Fusion von Phago- und Lysosom, Hemmung oxidativer und sekretorischer Funktionen und damit die Immunabwehr des Organismus weiter beeinflussen [Crovatto et al. 2000].

Als Hepatitis wird eine entzündliche Schädigung des Leberparenchyms bezeichnet. Die Hepatitis B (DNA-Virus) und Hepatitis C (RNA-Virus) werden parenteral übertragen und kommen beide weltweit vor. Die Viren sind in Blut, u.a. in ca. 77% der Neutrophilen, in B-Lymphozyten, Monozyten, und in Drüsensekreten vorhanden und dort nachweisbar. Die Hepatitis B gehört weltweit zu den häufigsten Infektionskrankheiten und macht ca. 50% aller akuten Virushepatitiden aus; die Hepatitis C nur ca. 20%. Bei den Posttransfusionshepatitiden läßt sich in ca. 90% eine Hepatitis C nachweisen [Riede und Schäfer 1999; Riede et al. 1999; Crovatto et al. 2000; Liebert 2002;].

Beiden Virushepatitiden liegt eine Immunpathogenese zugrunde, d.h. die Symptome der Hepatitis werden durch die Apoptose infizierter Hepatozyten, bedingt durch zytotoxische T-Lymphozyten, induziert. Die Infektion kann zu einem inapparenten Verlauf oder zu einer akuten Hepatitis bis hin zum fulminanten Verlauf führen. In ca. 90% heilt die Hepatitis B folgenlos aus, lediglich in 5-10% kommt es zu einer chronischen Verlaufsform, während die Hepatitis C häufig protrahiert und in 50-70% chronisch verläuft. Als Ursachen für die Entwicklung eines chronischen Verlaufs werden eine gestörte zelluläre Immunität mit fehlerhafter Immunantwort oder eine Störung der Wechselwirkungen zwischen Viren und Hepatozyten mit einer defekten Virusreplikation oder einer unvollständigen Antigenpräsentation diskutiert. Extrahepatische Manifestationen umfassen die Bildung von Autoantikörpern, membranoproliferative Glomerulonephritiden, Polyarthrititis nodosa, Sjögren-Syndrom, Porphyria cutanea tarda [Riede und Schäfer 1999; Riede et al. 1999; Gerlich und Schaefer 2002; Roggendorf 2002].

1.3.2.3 Autoimmunerkrankung: Rheumatoide Arthritis

Die RA ist die häufigste entzündliche rheumatische Erkrankung mit einer Prävalenz von ca. 1-2%, im Alter über 55 Jahren bis 5%. Sie ist eine Systemerkrankung des mesodermalen Gewebes mit chronischer Entzündung hauptsächlich der Gelenke mit der Folge von Weichteil-, Knorpel-, Knochendestruktion, die bleibende, teilweise schwerwiegende Gelenkveränderungen verursachen können. Die Ätiologie der RA ist unklar, diskutiert wird eine Triggerung durch Virusinfektionen (Epstein-Barr-Virus) und andere Infektionen (Darmbakterien; Mykoplasmen). Es besteht eine genetische Prädisposition beim Tragen des HLA-Merkmals DR4 [Gross 1998; Schmidt et al. 2000]. Charakteristisch ist die Synovialitis, wobei der sog. Pannus entsteht. In der Synovialmembran lassen sich diffuse Infiltrate aus aktivierten T-Zellen (CD4-, Memoryzellen) nachweisen, die nur geringe Mengen an Lymphokinen (IL-2, IFN- γ) freisetzen, und Monozyten, Makrophagen und Fibroblasten der Synovia zur Produktion von Zytokinen (IL-1, TNF- α , GM-CSF, IL-6, Metalloproteinasen) stimulieren. Stromazellen der Synovia produzieren u.a. IL-8, wodurch weitere monozytäre und myeloische Zellen angelockt werden. Die aktivierten CD4-Zellen regen auch B-Lymphozyten zur Ig-Bildung an, unter anderem den sog. Rheumafaktor, der wiederum das Komplementsystem und damit u.a. Neutrophile aktiviert. Endothelzellen werden aktiviert, exprimieren

vermehrt Adhäsionsmoleküle, wodurch es zur Invasion von Entzündungszellen, z.B. Neutrophilen, kommt, die ca. 90% der Zellen in der Synovialflüssigkeit stellen. Neutrophile setzen Proteinase, Endopeptidasen (Kollagenase, Elastase, Kathepsin G, Plasmin), Eikosanoide frei, die Proteoglykane des Knorpels abbauen. Der Pannus überwächst, unterminiert und zerstört den Knorpel und führt dadurch zum Verlust von Knochensubstanz (Usur) [Weissmann und Korchak 1984; Roos 1992; Gross 1998; Choy und Panayi 2001; Hayashida et al. 2001]. Neutrophilen wird daher eine wichtige Funktion bei der Pathogenese der RA zugeschrieben. Auch G-CSF scheint einen Einfluß zu haben, denn Stimulation mit G-CSF vermag eine Exazerbation der RA auszulösen [Snowden et al. 2000], und G-CSF ließ sich in Serum und in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten nachweisen [Nakamura et al. 2000]. IL-1, TNF- α können die Produktion von G-CSF durch synoviale Fibroblasten und Chondrozyten fördern [Leizer et al. 1990; Campbell et al. 1991; Choy und Panayi 2001]. G-CSF Blockade im Tierexperiment führte zu einer geringen Manifestation rheumatoider Erkrankungen bzw. weniger ausgeprägten Zerstörungen an Knorpel und Knochen [Lawlor et al. 2004].

Diagnostische Kriterien sind zusätzlich zur klinischen Untersuchung Laborparameter wie Entzündungsparameter, Rheumafaktor und radiologische Kriterien [Schmidt et al. 2000]. Therapeutische Ansatzpunkte beinhalten im wesentlichen eine antiphlogistische und physikalische Therapie [Schmidt et al. 2000; Gross 1998; Choy und Panayi 2001].

1.3.3 Klonale Proliferation von Blutstammzellen:

Polyzythämia vera

Die PV gehört wie die CML, essentielle Thrombozytämie und die idiopathische Myelofibrose zu den myeloproliferativen Erkrankungen. Die Inzidenz der PV wird mit ca. 2/100.000 Einwohner angegeben. Die betroffenen Patienten sind in der Regel über 40 Jahre, das mediane Alter bei Diagnosestellung ist 60 Jahre, und Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen [Spivak 2002]. Als Ursache der PV wird eine klonale Expansion einer transformierten multipotenten Stammzelle vermutet. Vorläuferzellen von Patienten mit PV zeigen abnormale Reaktionen auf verschiedene Wachstumsfaktoren, was einen Defekt im Signalweg suggeriert. Verschiedene Ursachen der Transformation und Klonalität werden diskutiert: Inaktivierung eines X-Chromosoms, Hypersensitivität gegenüber Wachstumsfaktoren infolge eines defekten Signalwegs, chromosomale Abnormalitäten. Am häufigsten tritt eine Deletion des langen Arms von Chromosom 20 und Trisomie von Chromosom 8 oder 9 auf. Die häufigste strukturelle chromosomale Abnormalität ist die Deletion von 20q, die aber auch bei myelodysplastischen Syndromen sowie AML vorkommt. Es wird daher vermutet, daß die zerstörte Region auf Chromosom 20 den Ort von einem oder mehreren Genen für die Regulation der Hämatopoese oder für Tumorsuppressorgene darstellt [Pearson et al. 2000; Pahl 2002; Spivak 2002].

Da die molekulare Ursache der PV noch nicht bekannt ist, existieren keine spezifischen (klonalen) Marker. Seit einigen Jahren wird die Überexpression des PRV-1-Gens, ein Allel von CD177, als möglicher neuer Marker postuliert, wobei Untersuchungen ergaben, daß der Genlocus selbst intakt ist [Klippel et al. 2001; Pahl 2002; Klippel et al. 2003; Kralovics et al. 2003; Najfeld et al. 2003; Tefferi et al. 2003; Florensa et al. 2004].

Das Blutbild zeigt als diagnostisches Mittel typischerweise einen über den oberen Grenzwert erhöhten Hämatokrit als Zeichen der Erythrozytose, häufig eine Leukozytose (10.000-20.000/ μ l) mit relativer Lymphopenie und eine Thrombozytose (bis ca. 1×10^6 / μ l). Klinische Symptome sind u.a. Hautjucken, Kopfschmerz, Atemnot, Schmerzen der Extremitäten, Plethora, häufig (Hepato-) Splenomegalie Thromboseneigung, hämorrhagische Diathesen, Hypertonie und typischerweise chronischem Verlauf. Für eine Auflistung der diagnostischen Kriterien siehe nachfolgende Tabelle (Tabelle 6).

Therapieansätze sind Aderlaß, antithrombotische und myelosuppressive Therapie. Eingesetzt werden der Antimetabolit Hydroxurea, der die DNA-Synthese hemmt, 32 P (Radiophosphorthherapie), Zytostatika (alkylierende Substanzen), Anagrelide, IFN- α [Pearson et al 2000].

Bezeichnung	Bedeutung
A1	Erythrozytenzellmasse erhöht (>25% über Normalwert) oder Hämatokrit $\geq 0,60$ bei Männern, $\geq 0,56$ bei Frauen
A2	Keine Ursachen für sek. Erythrozytose
A3	Splenomegalie palpabel
A4	Marker für Klonalität (z.B. abnormaler KM-Karyotyp)
B1	Thrombozytose ($>400 \times 10^9$ /L)
B2	Neutrophile Leukozytose (Neutrophile $>10 \times 10^9$ /L, bei Rauchern $>12,5 \times 10^9$ /L)
B3	Splenomegalie mittels Ultraschall oder Isotopen gezeigt
B4	Charakteristisches BFU-E-Wachstum (Hypersensitivität auf Wachstumsfaktoren wie IL-3, Epo, insulin-like growth factor) oder Erythropoetin im Serum reduziert

Tabelle 6: Kriterien für die Diagnostik der PV, wobei für die Diagnose folgende Kriterien erfüllt werden müssen: A1+A2+A3 oder A4 oder A1+A2+2 B-Kriterien [Pearson et al. 2000; Spivak 2002].

1.4 Fragestellungen der Arbeit

Die Expression des NB1-Glykoproteins wird bei verschiedenen Patientengruppen untersucht mit dem Ziel, die Expression bei verschiedenen Patientengruppen zu bestimmen, eine mögliche Regulation der Expression aufzuklären und weitere Hinweise für die funktionelle Charakterisierung zu erhalten. Folgende Fragestellungen werden bearbeitet:

1. Bestehen Unterschiede in der NB1-Expression auf Neutrophilen bei viralen (chronische Hepatitis) oder bakteriellen Infektionen, bei abakteriellen Erkrankungen (rheumatoide Arthritis), bei klonalen Erkrankungen der Blutstammzellen (Polyzythämia rubra vera) oder bei Stimulation der Granulozytopoese durch Applikation von G-CSF im Vergleich zu gesunden Personen? Treten dabei Veränderungen des Anteils NB1-exprimierender Neutrophiler und / oder in der Zahl der NB1-Glykoproteine pro Zelle auf?
2. Hat der hämatopoetische Wachstumsfaktor G-CSF einen Einfluß auf die NB1-Expression?
3. Bestehen Unterschiede in der NB1-Expression bei Neutrophilen aus Nabelschnurblut im Vergleich zu Neutrophilen Erwachsener? Haben das Geschlecht, Geburtsumstände, perinatale Komplikationen und Infektionen sowie Erkrankungen der Mutter Einfluß auf die NB1-Expression bei Neutrophilen aus Nabelschnurblut?
4. Könnte das NB1-Glykoprotein aufgrund einer möglicherweise veränderten Expression ein potentieller Laborparameter zur frühzeitigen Diagnose einer Infektion z.B. bei Neugeborenen sein?
5. Lassen sich aufgrund der Expression bei den verschiedenen untersuchten Patientenkollektiven Rückschlüsse auf die Funktion des NB1-Glykoproteins ziehen?

Neben der NB1-Expression, die den Schwerpunkt dieser Arbeit darstellt, wird für verschiedene andere auf Neutrophilen exprimierte Antigene, insbesondere für den Fc γ RIIIb, der Einfluß der genannten Erkrankungen auf die Expression untersucht. Auch auf Neutrophilen aus Nabelschnurblut interessiert die Expression des Fc γ RIIIb im Vergleich zur Expression bei Erwachsenen und der Einfluß perinataler Komplikationen, Erkrankungen der Mutter und Geburtsumstände auf die Expression.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Blutproben

Für die Versuchsreihe wurden Blutproben folgender Spender verwandt: gesunde Spender (N = 38), gesunde Spender nach Gabe von 5 µg/kg Körpergewicht G-CSF am Vortag (N = 9), Patienten mit einer Hepatitis B oder C (N = 13), Patienten mit rheumatoider Arthritis (N = 20), Patienten mit Polycythämia vera (N = 7) und Patienten mit schwerer bakterieller Infektion (N = 15).

Für eine weitere Versuchsreihe wurde Nabelschnurblut von N = 52 Neugeborenen untersucht, wobei N = 23 weibliche und N = 29 männliche Neugeborenen waren.

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Primärantikörper

Es handelt sich bei den verwendeten Primärantikörpern allesamt um monoklonale Antikörper von der Maus. Die Arbeitskonzentration der Primärantikörper wurde durch Verdünnen mit PBS erreicht [vgl. Verheugt et al. 1978]. Für alle verwendeten Antikörper wurde zunächst die Sättigungskonzentration ermittelt, indem die Konzentration so lange erhöht wurde, bis die Fluoreszenzintensität und der Anteil der fluoreszierenden Zellen nicht weiter zunahm [vgl. Kleine und Freund 1996; Stroncek et al. 1996]. Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper ist in Anhang B zu finden.

Der monoklonale Antikörper 7D8 ist ein IgG1 Antikörper und spezifisch für NB1 (HNA-2a) [Stroncek et al. 1994b; 1996]. Der MAk 3G8 ist spezifisch für CD16 [Stroncek et al. 1996b; Kissel et al. 2002].

2.1.2.2 Sekundärantikörper

Als Sekundärantikörper wurde ein FITC-konjugiertes Fragment F(ab')₂ vom Kaninchen der Fa. DAKO (Glostrup, Dänemark) eingesetzt. Der Antikörper mit einer vom Hersteller angegebenen FITC/Protein Ratio von 2,3 reagiert mit allen Maus-IgG Subklassen sowie mit Maus-IgM und Maus-IgA. Die ermittelte Sättigungskonzentration wurde bei einer Verdünnung von 1:40 mit PBS erreicht, was einer Konzentration von 0,03 mg/ml entspricht.

2.1.3 Verwendete Testkits

Dako Qifikit Kalibrierungsbeads

DAKO Qifikit Kalibrierungsbeads („quantitative immuno-fluorescence indirect assay“) bestehen aus Beads mit einem Durchmesser von 10µm und imitieren Zellen unterschiedlicher Antigendichte. Die Beads wurden bereits vom Hersteller mit einem monoklonalen Antikörper der Maus (hoch-affines anti-humanes CD5, Klon ST1, Isotyp IgG2a) markiert. Die Anzahl gebundener monoklonaler Antikörper pro Bead wurde vom Hersteller ermittelt und angegeben. Es wurden zwei Sorten Beads bereitgestellt: „Set-Up“ Beads, die aus Leerwert-Beads und aus Beads mit einer hohen Anzahl gebundener Antikörper bestanden und Kalibrierungsbeads, die fünf Untergruppen mit einer jeweils unterschiedlichen Anzahl gebundener Antikörper auf der Oberfläche.

Immunoassay „Quantikine“

Der Immunoassay „Quantikine“ ist ein ELISA mit rekombinantem humanen G-CSF von E. coli und zur quantitativen Messung von humanem G-CSF in Zellüberstand, Plasma und Serum geeignet.

2.2 Methoden

2.2.1 Vorbereitung der Blutproben

2.2.1.1 Blutproben erwachsener Spender

a) Granulozytenisolation und -fixierung

Die Granulozytenisolation und -fixierung erfolgte in einer modifizierten Weise der von Verheugt et al. [1977] beschriebenen Methode. Den Probanden wurden jeweils 9 ml Blut in EDTA-Röhrchen entnommen. Das Blut wurde anschließend sofort weiterverarbeitet, um vorzeitigen Zelluntergang oder eine Änderung der Antigenexpression durch lange Lagerung zu vermeiden [Chun et al. 1999].

Zu jeweils 9 ml EDTA-Blut wurden 2 ml Dextranlösung gegeben, die Röhrchen mit Parafilm verschlossen und durch Schwenken vorsichtig vermischt. Anschließend wurden die Proben für 30 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert, wobei die Röhrchen zur besseren Sedimentation der Zellen in einem Winkel von etwa 45° schräg gestellt wurden. In je zwei 13 ml Polystyrolröhrchen wurden je 2 ml Ficoll-Paque vorgelegt. Das Dextranplasma wurde vorsichtig mit Pasteurpipetten auf das Ficoll-Paque geschichtet und 20 min bei 275 g (1200 upm) zentrifugiert. Durch die Verwendung von Ficoll-Paque (Dichte=1,077 g/cm³) wird ein Dichtegradient im Röhrchen hergestellt, der eine Auftrennung nach der Dichte bewirkt. Nur Stoffe mit größerer Dichte als Ficoll-Paque gelangen beim Zentrifugieren durch die Flüssigkeit, Stoffe geringerer

Dichte „schwimmen“ auf dem Ficoll-Paque. Hier ergab sich folgendes Bild: Granulozyten und restliche Erythrozyten sammelten sich am Boden des Röhrchens, darüber lag Ficoll-Paque, Lymphozyten und Thrombozyten blieben an der Oberfläche von Ficoll und bildeten die Grenze zum Überstand aus Dextranplasma. Von dem Überstand aus Dextranplasma wurden etwa 2 ml abgenommen und für die spätere Messung der G-CSF-Spiegel bei -20°C eingefroren. Das restliche Dextranplasma, Lymphozyten, Thrombozyten sowie Ficoll wurden mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt und verworfen. Es folgte nun die hypotonische Lyse der noch vorhandenen Erythrozyten. Dazu wurde das Pellet mit 2 ml Ammoniumchloridlösung vermischt und sofort für 5 min in Eiswasser gestellt. Um eine Lyse der Granulozyten zu verhindern, wurden danach die 13ml-Röhrchen mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ aufgefüllt und für 5 min bei 120g (800upm) zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstands wurden die Granulozyten ein zweites Mal mit PBS gewaschen. Zur Fixierung der Granulozyten wurden diese nun mit 2ml 1%iger Paraformaldehydlösung vermischt und 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Fixierung führt zu einer recht einheitlichen Zellpopulation, geringerem Zelluntergang und weniger Klumpenbildung und vor allem einer stabilen Fluoreszenzintensität über ca. 14 h ohne signifikanten Einfluß auf die Fluoreszenzintensität [Heins 1996; Chun et al. 1999; Wikman et al. 2001]. Nach zwei weiteren Waschgängen mit PBS bei jeweils 120 g wurde das Pellet mit etwa 1 ml PBS gemischt und die Zahl der Granulozyten pro μl am elektronischen Zellzähler gemessen. Mittels PBS wurde die Zellzahl auf 5000 Granulozyten pro μl eingestellt.

b) Indirekte Immunfluoreszenz

Zur Durchführung einer indirekten Immunfluoreszenz wurden je $10\mu\text{l}$ der primären monoklonalen Antikörper in den oben angegebenen Konzentrationen in 96-Loch-Platten pipettiert und je $40\mu\text{l}$ der Zellsuspension zu jedem primären monoklonalem Antikörper zugegeben und gut gemischt. Anschließend wurde für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert [vgl. Bux et al. 1992a, 1994]. Ungebundener primärer Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS für 30s (ohne Anlauf- und Nachlaufzeit der Zentrifuge) bei 300 g (1200 upm) in der Plattenzentrifuge entfernt. Dann wurden in jede Vertiefung je $40\mu\text{l}$ des verdünnten Sekundärantikörpers gegeben und wieder für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert [vgl. Bux et al. 1994]. Es folgten wiederum drei Waschschrte. In die einzelnen Vertiefungen der 96-Loch-Platte wurden anschließend je $100\mu\text{l}$ PBS pipettiert und mit den Zellen gemischt. Die Zellsuspension wurde anschließend in die mit je $400\mu\text{l}$ PBS vorbereiteten 5 ml Polystyrol Rundbodenröhrchen pipettiert. Die Proben wurden bis zur Messung im Dunkeln aufbewahrt, um einen Intensitätsverlust der Fluoreszenz („Fading“) des sekundären Antikörpers zu vermeiden.

2.2.1.2 Nabelschnurblutproben

Indirekte Immunfluoreszenz

Je 100 µl EDTA-Blut wurden in 5ml Polystyrol Rundbodenröhrchen mit je 10 µl eines irrelevanten monoklonalen Mausantikörpers, 15 µl des monoklonalen Antikörpers gegen FcγRIIIb und 10 µl des monoklonalen Antikörpers gegen NB1-Glykoprotein gemischt und anschließend 30 min bei 37°C inkubiert. Die Erythrozyten wurden lysiert, indem 1800 µl destilliertes Wasser für 30 sec zugegeben und anschließend mit 200 µl 10-fach konzentriertem PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ Ionen die Lyse gestoppt wurde. Nach zweimaligem Waschen mit PBS bei 120 g (800 upm) für jeweils 5 min wurden 100 µl des verdünnten Sekundärantikörpers pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS bei 120 g (800 upm) für jeweils 5 min wurden die Proben am Durchflußzytometer gemessen.

2.2.2 Vorbereitung der Kalibrierungsbeads

Zur Optimierung der Geräteeinstellungen des Durchflußzytometers und zur späteren quantitativen Auswertung der gemessenen Proben wurden DAKO Qifikit Kalibrierungsbeads (quantitative immunofluorescence indirect assay) bei jeder Messung eingesetzt.

Von den Beads wurden je 100 µl Set-Up Beads und 100 µl Kalibrierungsbeads mit 3 ml PBS in einem 5 ml Polystyrol Rundbodenröhrchen gemischt und 5 min bei 350 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und zu den Pellets je 100 µl des verdünnten Sekundärantikörpers pipettiert. Es folgte eine Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurden die Beads zwei Mal mit PBS gewaschen und je 5 min bei 350 g zentrifugiert. Die Beads wurden mit je 500 µl PBS vermischt, dunkel gelagert und innerhalb von 2 Stunden am Durchflußzytometer gemessen, um ein „Fading“ zu vermeiden.

2.2.3 Messung am Durchflußzytometer

2.2.3.1 Aufbau und Funktionsprinzip eines Durchflußzytometers

Die Probenflüssigkeit mit den enthaltenen Zellen wird unter Druck in eine Kapillare aufgenommen, so daß die Zellen infolge der hydrodynamischen Fokussierung in Serie durch die Kapillare fließen. Ein Laser als Lichtquelle sendet Licht einer bestimmten Wellenlänge aus, dies trifft auf die Zelle. Ein Teil der Lichtstrahlen strahlt am Rand der Zelle vorbei und wird daher nicht abgelenkt. Dieser Teil des Lichts wird Vorwärtsstreulicht (forward side scatter, FSC) genannt und ist proportional zum Durchmesser der Zelle bzw. der Zelloberfläche. Die Messung erfolgt entlang der Achse des einfallenden Lichtes. Ein anderer Teil der Lichtstrahlen trifft auf die verschiedenen intrazellulären und extrazellulären Strukturen der Zelle und wird dadurch reflektiert und abgelenkt. Dieses Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) ist proportional zur Zellkomplexität oder Zellgranularität und wird im rechten Winkel zum einfallenden Licht gemessen (Abbildung 1).

Das Vorwärts- und das Seitwärtsstreulicht wird mittels Photodektoren registriert, digitalisiert und die Daten an den angeschlossenen Computer zur Auswertung übertragen.

Trifft der einfallende Lichtstrahl auf ein Fluorochrommolekül, so absorbiert dies Energie und emittiert ein Photon mit einer größeren Wellenlänge als das einfallende Licht. Die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts ist proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrommoleküle und kann nach Detektion und Digitalisierung ebenfalls graphisch dargestellt werden (Abbildung 1) [Nebe 1996].

2.2.3.2 Geräteeinstellungen

Für die Einstellung des Durchflußzytometers, die Darstellung der Messungen am Bildschirm wurde das Programm „CellQuest“ verwendet.

Bei der Messung der Granulozyten und der Beads am Durchflußzytometer wurde für alle Messungen das gleiche Meßprotokoll mit konstanten Einstellungen der Verstärker und des Schwellenwertes beibehalten.

Das Durchflußzytometer wurde regelmäßig nach Herstellerempfehlung kalibriert.

Bei den Messungen erfolgte die Triggerung auf das Vorwärtsstreulicht, um Zelldetritus und kontaminierende Erythrozyten weitgehend zu eliminieren.

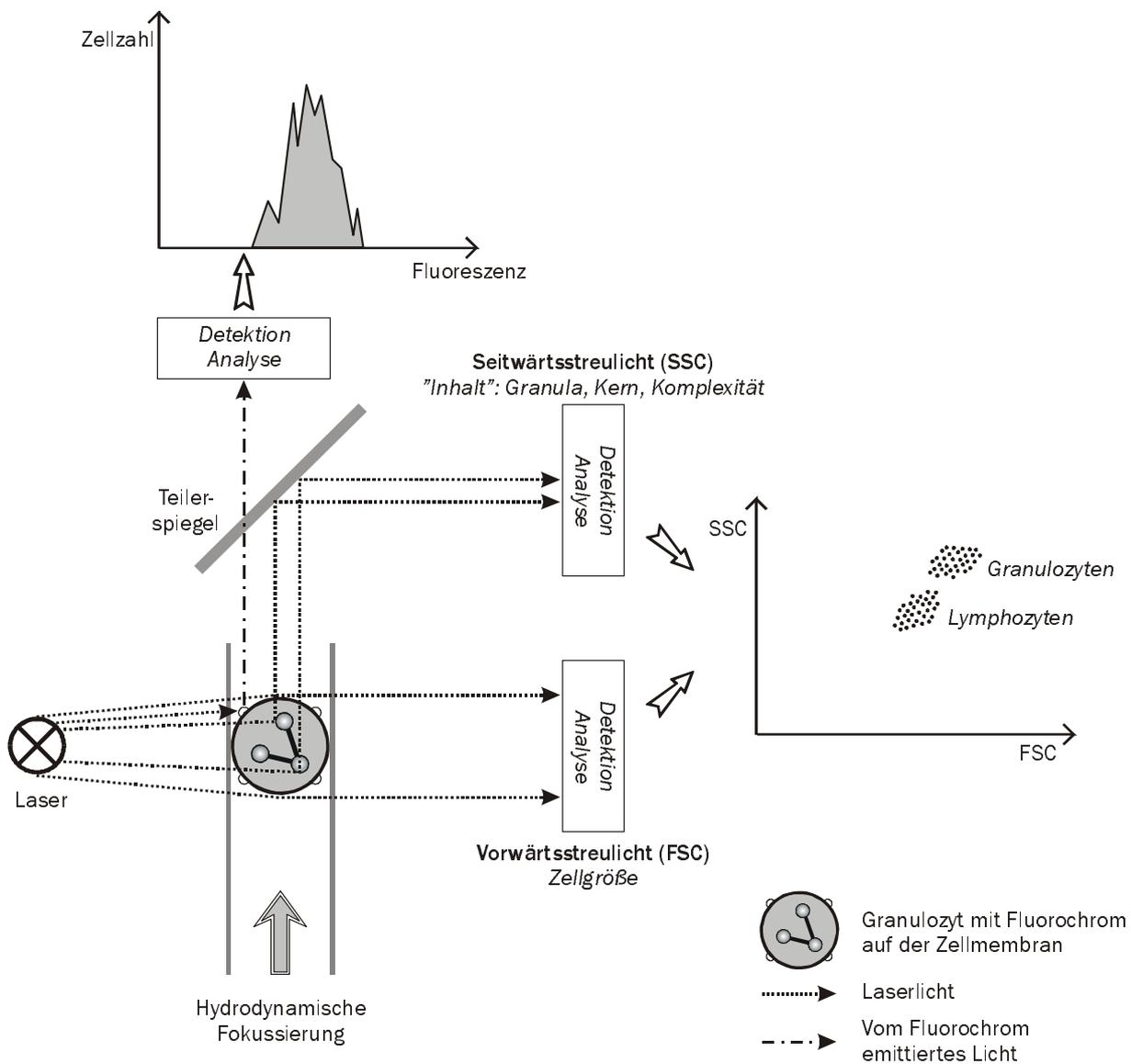


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Durchflußzytometers. Nach hydrodynamischer Fokussierung der Probenflüssigkeit trifft Laserlicht auf die Zelle. Das Licht wird aufgeteilt in Vorwärtsstreulicht, in das abgelenkte Seitwärtsstreulicht und das von Fluorochromen emittierte Licht. Alle Lichtstrahlen werden an Detektoren analysiert und können graphisch dargestellt werden.

2.2.3.3 Messung der Proben

Zuerst wurden die Set-Up Beads gemessen, um die Einstellung von Schwellenwert und der Verstärkung des Fluoreszenzsignals sowie die Funktionstüchtigkeit der Beads zu überprüfen. Zunächst wurden die zu messenden Zellen im Streulichtdiagramm durch Darstellung von Vorwärtsstreulicht gegen Seitwärtsstreulicht in logarithmischer Skalierung anhand ihrer Lage bezüglich Größe und Granularität identifiziert (Abbildung 2). Die Beads wurden durch eine Bereichsmarkierung („Gate“) ausgewählt und die Fluoreszenzintensität dieser so gewählten Zellpopulation wurde graphisch in einem Histogramm dargestellt, wobei zwei peaks, die die beiden Beadpopulationen repräsentieren, zu sehen waren (

Abbildung 3). Es wurde darauf geachtet, daß die Leerwert-Beads im Bereich der ersten Zehnerpotenz lagen. Als zweites wurden die Kalibrierungsbeads, die im gleichen Gate lagen, gemessen und ebenfalls im Histogramm sichtbar gemacht, wobei hier fünf Peaks entsprechend den fünf Subpopulationen unterschiedlicher Antigenbeladung zu sehen waren (Abbildung 4) [Vance et al. 1993; Höffkes und Schmidtke 1996].

Anschließend wurden die Granulozyten gemessen, wobei auch hier wieder die Granulozyten anhand ihrer Lage in der Punktwolkendarstellung identifiziert [Radtko 1996] (Abbildung 5) sowie markiert wurden und die Fluoreszenz in einem Histogramm dargestellt wurde (Abbildung 6). Durchschnittlich wurden je 10000 beads und je 5000 Granulozyten analysiert.

Alle Einzelmessungen wurden unter einem eindeutigen Dateinamen gespeichert, um für die anschließende Auswertung identifizierbar zu sein.

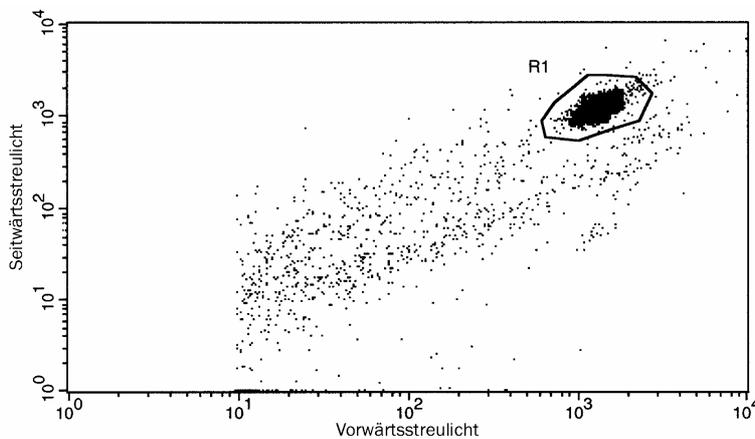


Abbildung 2: Darstellung der Beads in einer Punktwolke, wobei das Vorwärtsstreulicht gegen das Seitwärtsstreulicht aufgetragen ist. Mit R1 ist das Gate, in dem die Beads liegen, bezeichnet.

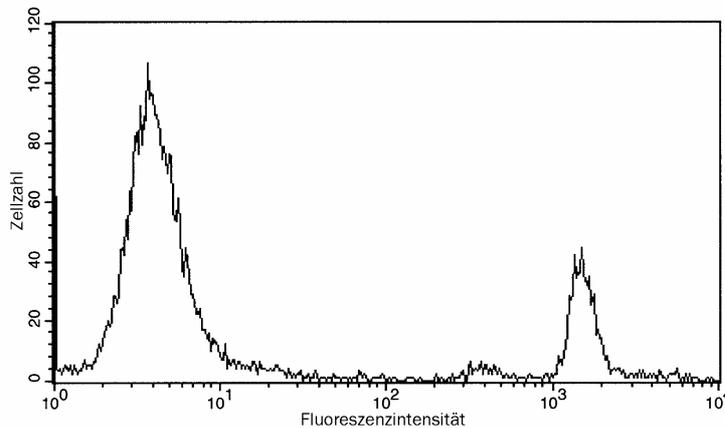


Abbildung 3: Darstellung der gemessenen Set-up Beads in einem Histogramm. Die Fluoreszenzintensität ist gegen die gemessene Zellzahl aufgetragen. Deutlich zu erkennen sind ein Fluoreszenzmaximum im Bereich der ersten und ein zweites im Bereich der vierten Zehnerpotenz.

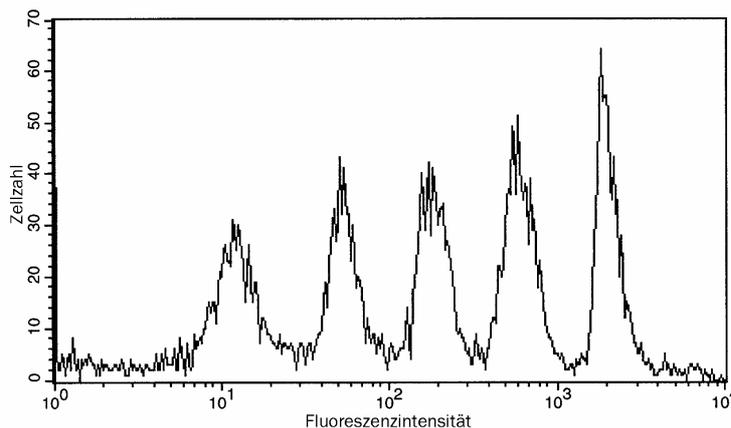


Abbildung 4: Die Fluoreszenzintensität der Kalibrierungsbeads ist gegen die gemessene Zellzahl aufgetragen. Man erkennt die fünf Untergruppen der Kalibrierungsbeads anhand der unterschiedlich starken Fluoreszenzintensität.

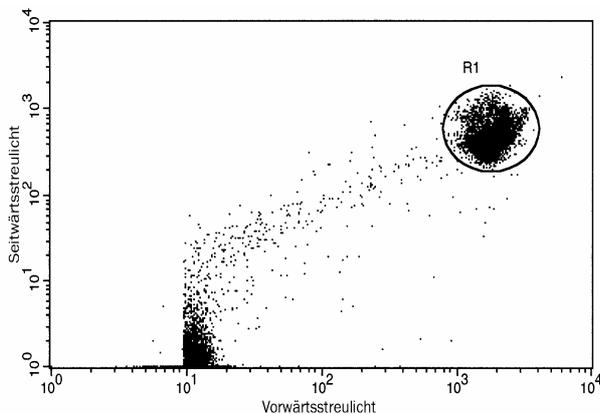


Abbildung 5: In der Punktwolkendarstellung mit Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht sind die Granulozyten durch die Markierung R1 gekennzeichnet. Sie lassen sich eindeutig von den übrigen Zellen und Zellteilen abgrenzen.

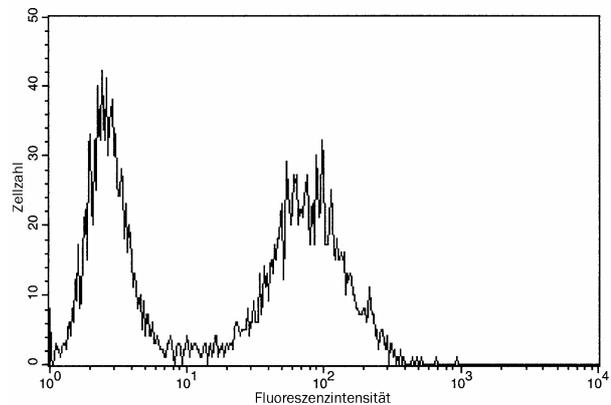


Abbildung 6: Die Darstellung von Granulozyten, die mit dem monoklonalen Antikörper 7D8 markiert wurden, im Histogramm, wobei die Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl aufgetragen ist. Deutlich erkennt man zwei Populationen: Im Bereich der ersten Zehnerpotenz die NB1-negativen, im Bereich der zweiten und dritten Zehnerpotenz die NB1-positiven Zellen.

2.2.4 Klinische Angaben

In der Gruppe der gesunden Spender stammte eine Blutprobe von einem als NB1-negativ bekannten Spender, bei dem bei früheren Tests kein NB1-Glykoprotein auf den Granulozyten, aber Antikörper gegen das Antigen NB1 nachgewiesen worden waren.

Von den untersuchten Patientengruppen wurden zusätzlich folgende Parameter erfasst: CRP, Zahl der Neutrophilen oder der Granulozyten und/oder Leukozyten, Diagnose, Krankheitsstadium und Medikation zur Zeit der Blutentnahme.

Bei den Nabelschnurblutproben wurden anhand eines Fragebogens nach der Geburt zu folgenden Parametern Angaben gemacht: Schwangerschaftswoche, Geburtsgewicht, pH-Wert des Nabelschnurbluts, Apgar 5', Geburtsmodus (spontan, Sectio), Mehrling, Geburts- und Abnahmezeit. Wurde eine Sectio vorgenommen, so wurde die Indikation (im weiteren als „Problem“, „Besonderheit“ bezeichnet) angegeben: Amnioninfektionssyndrom, Wehen, pathologisches CTG, vorzeitiger Blasensprung, sonstige Besonderheiten (Anhang 8.5).

2.2.5 Auswertung

2.2.5.1 Auswertung der Messungen am Durchflußzytometer

Für die Auswertung der Messungen am Durchflußzytometer wurde das Computerprogramm „CellQuest“ verwendet. Bei der Auswertung wurden nur Beads bzw. Zellen in den entsprechenden Gates der Streulichtistogramme berücksichtigt. Im Histogramm, in dem die emittierte Fluoreszenz gegen die gemessene Zellzahl aufgetragen war, wurden die Peaks markiert. Für den so ausgewählten Bereich konnten Anzahl der gemessenen Zellen, Anteil der fluoreszierenden Zellen an der Gesamtzahl der gemessenen Zellen, Mittelwert und Median der Fluoreszenzintensität berechnet werden.

2.2.5.2 Berechnung der mittleren Antigendichte

Das Tabellenkalkulationsprogramm „Excel97“ wurde zur Berechnung der mittleren Antigendichte pro Zelle anhand der mittleren Fluoreszenz der Zellen verwendet.

Da das emittierte Fluoreszenzlicht zur Zahl der gebundenen Fluorochrommoleküle (hier FITC) proportional ist, konnte anhand der mittleren Fluoreszenzintensität der Kalibrierungsbeads eine Eichkurve erstellt werden. Dafür wurden die Werte für die mittlere Fluoreszenzintensität der Beads auf der Ordinate und die Antigendichte auf der Abszisse aufgetragen, um eine Eichkurve zu erhalten (Abbildung 7). Aus den berechneten Werten für die mittlere Fluoreszenz und der vom Hersteller angegebenen Antigendichte pro Partikel der fünf Untergruppen der Beads konnte eine Geradengleichung der Form $y=m*x+c$ aufgestellt werden [Vance et al. 1993]. Mit dieser Geradengleichung konnte für jede beliebige mittlere Fluoreszenzintensität x die entsprechende Antikörperbindungskapazität y berechnet werden. Davon wurde noch die unspezifische Hintergrundstrahlung herausgenommen, indem die für die Negativkontrolle berechneten Werte abgezogen wurden. Der so berechnete Wert für die spezifische Antikörperbindungskapazität entspricht der mittleren Antigendichte pro Zelle und wird in Anzahl der Antigene pro Zelle angegeben.

Lag bei der Verteilung der mittleren Fluoreszenz keine Normalverteilung vor, sondern eine rechts- oder linksgipflige Verteilung, so wurde statt des Mittelwerts der Median der Fluoreszenzintensität für die Berechnung der mittleren Antigendichte eingesetzt. Dies wurde bei der Auswertung der Anzahl Fc γ RIIIb bei gesunden Spendern nach Stimulation mit G-CSF durchgeführt.

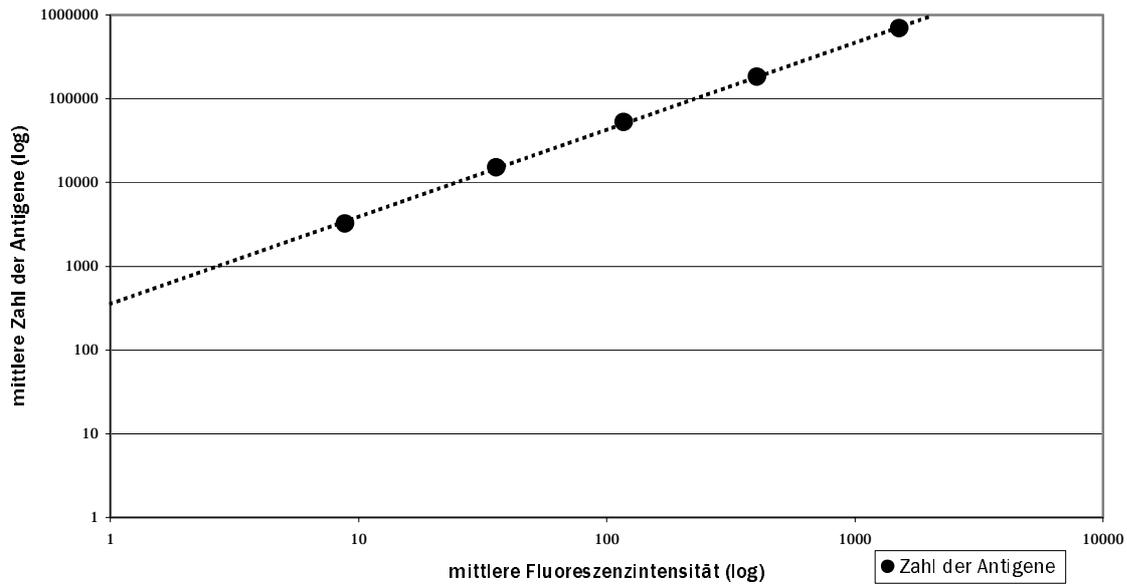


Abbildung 7: Eichkurve zur Berechnung der mittleren Antigendichte. Die mittlere Fluoreszenzintensität ist gegen die mittlere Anzahl der Antigene (log. Darstellung) aufgetragen. Für die Beads wurden beispielhafte Werte eingetragen und eine Ausgleichsgerade eingezeichnet, anhand der sich die mittlere Zahl der Antigene ablesen lässt.

2.2.5.3 Auswertung der klinischen Angaben bei Nabelschnurblutproben

Ein Teil der mittels Fragebogen erhobenen Parameter wurde zur Auswertung in Untergruppen wie folgt eingeteilt:

Geschlecht:	männlich, weiblich
Geburtsmodus:	Spontangeburt, Sectio
Schwangerschaftswoche:	< 32.; 32. – 38.; 38. – 41.; > 41.
Geburtsgewicht:	< 2kg; 2 - 2,8 kg; 2,8 – 4,0 kg; > 4 kg
pH-Wert des Nabelschnurbluts:	< 7,25; 7,25 – 7,29; 7,30 – 7,40; ≥ 7,41
APGAR 5':	≥9; <9

2.2.5.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte zum einen mit dem Tabellenkalkulationsprogramm „Excel 97“ und zum anderen mit dem Statistikprogramm „SPSS 10.0 für Windows“.

A Kriterien bei Blutproben erwachsener Personen

Mehrfache Messungen

Gesunde Personen

Wurden von einem gesunden Spender mehrmals Blutproben entnommen und die Antigendichte bestimmt, so wurde aus den Einzelmessungen der Mittelwert gebildet, der dann in die weitere statistische Analyse einging, da pro Proband nur ein Wert für die Statistik verwendet werden konnte.

Gesunde Personen nach Stimulation mit G-CSF und Patienten mit schwerer bakterieller Infektion

Bei den gesunden Spendern, die mit G-CSF stimuliert worden waren, wurde beim Vorliegen mehrerer Messungen der Wert mit dem höchsten Ansprechen des NB1-Glykoproteins in die Auswertung übernommen. Ebenso wurde der höchste gemessene Wert für das NB1-Glykoprotein bei den Patienten mit schwerer bakterieller Infektion in die statistische Auswertung genommen. Waren weitere Antigene ebenfalls mehrmals bestimmt worden, so gingen diejenigen Werte in die statistische Analyse ein, die am selben Tag wie der Extremwert des NB1-Glykoproteins gemessen wurden, auch wenn es sich hierbei nicht um Extremwerte handelte.

Anteil der NB1-positiven Granulozyten

In die statistische Auswertung gingen nur Messungen ein, bei denen nicht weniger als 10% der Granulozyten das NB1-Glykoprotein auf ihrer Zelloberfläche trugen. Spender mit einem Anteil von weniger als 10% NB1-positiven Zellen wurden als „NB1-negativ“ bezeichnet.

Datenanalyse aller untersuchten Antigene

Mit dem Statistikprogramm „SPSS“ wurde für jede der sechs Spendergruppen (gesunde Spender, gesunde Spender nach G-CSF-Stimulation, Patienten mit Hepatitisinfektion, Patienten mit rheumatoider Arthritis, Patienten mit PRV, Patienten mit schwerer bakterieller Infektion) eine explorative Datenanalyse durchgeführt, um Mittelwert, Median, Maximum, Minimum, Standardabweichung des Mittelwerts und Konfidenzintervall des Mittelwerts zu berechnen.

Nullhypothesen

Für den Vergleich der Antigenexpression auf der Zelloberfläche von gesunden Personen mit der Antigenexpression von Patienten mit Hepatitis, Patienten mit rheumatoider Arthritis, Patienten mit Polyzythämia vera, Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen und gesunden Spendern nach Stimulation mit G-CSF wurde jeweils folgende Nullhypothese geprüft:

Die Anzahl des jeweils untersuchten Antigens pro Granulozyt bei gesunden Spendern ist nicht verschieden von der Anzahl dieses Antigens pro Zelle bei

- mit G-CSF stimulierten Spendern
- Spendern mit einer Hepatitisinfektion
- Spendern mit rheumatoider Arthritis
- Spendern mit Polycythämia vera
- Spendern mit einer schweren bakteriellen Infektion.

Vergleich der Zahl der Antigene vor und nach Stimulation mit G-CSF

Für die Gruppe der gesunden Spender, die mit G-CSF stimuliert waren, wurde bei maximal N = 6 Spendern ein Vergleich der Werte vor und nach Stimulation durchgeführt.

Es wurde die relative Änderung zum Ausgangswert betrachtet und folgende Nullhypothesen aufgestellt:

- 1) Die Anzahl der untersuchten Antigene vor Stimulation mit G-CSF unterscheidet sich nicht von der Anzahl der Antigene nach Stimulation mit G-CSF.
- 2) Der Anteil der NB1-positiven Granulozyten vor Stimulation mit G-CSF ist nicht unterschiedlich von dem Anteil der NB1-positiven Granulozyten nach Stimulation mit G-CSF.

Zusätzliche Auswertung der Messungen des NB1-Glykoproteins

Größe der NB1-exprimierenden Subpopulation neutrophiler Granulozyten

Die Größe der Subpopulation neutrophiler Granulozyten, die das NB1-Glykoprotein auf ihrer Zelloberfläche tragen, wurde in allen Gruppen erfaßt und eine explorative Datenanalyse durchgeführt. Verglichen wurde der Anteil der NB1-positiven Granulozyten bei gesunden Spendern mit dem Anteil bei Patienten mit einer Hepatitisinfektion, Patienten mit rheumatoider Arthritis, Patienten mit PRV, gesunden Spendern nach Gabe von G-CSF und bei Patienten mit einer schweren bakteriellen Infektion. Folgende Nullhypothese wurde aufgestellt:

Die Größe der NB1-positiven Subpopulation neutrophiler Granulozyten bei gesunden Spendern unterscheidet sich nicht von der

- bei gesunden Spendern nach Gabe von G-CSF
- bei Spendern mit einer Hepatitisinfektion
- bei Spendern mit rheumatoider Arthritis
- bei Spender mit Polycythämia vera
- bei Spendern mit einer schweren bakteriellen Infektion.

Verteilung des NB1-Glykoproteins

Unter Verwendung des Tabellenkalkulationsprogramms „Excel 97“ wurden Tabellen und Diagramme erstellt, um die Verteilung der Zahl der NB1-Antigene sowie des Anteils NB1-positiver Zellen darzustellen. Dazu wurde eine Einteilung der Zahl der Antigene bzw. des prozentualen Anteils in Klassen vorgenommen und gegen die relative Häufigkeit des Vorkommens eines Wertes in einer Patientengruppe aufgetragen. Da die Anzahl der Antigene pro Zelle bei den einzelnen Patientengruppen eine andere Spannweite hatte, mußte für jedes Antigen die Klassenbreite individuell festgelegt werden, um eine sinnvolle Einteilung zu erhalten.

NB1-Glykoprotein im Verlauf einer bakteriellen Infektion

Die Expression des NB1-Glykoproteins auf der Granulozytenmembran und der prozentuale Anteil NB1-positiver Granulozyten wurde im Verlauf einer bakteriellen Infektion untersucht. Mit einbezogen wurde auch die Zahl der Neutrophilen und die Höhe des C-reaktiven Proteins in die Analyse. Dazu wurde von N=4 Patienten mehrmals Blut entnommen und auf das NB1-Glykoprotein untersucht. Betrachtet wurde zum einen, ob sich die Zahl der Antigene im Verlauf ändert, zum anderen, ob sich ein Zusammenhang zur Höhe des CRPs oder der Zahl der Neutrophilen zeigt.

NB1-Glykoprotein in Zusammenhang mit weiteren klinischen Daten

Bei der Untersuchung des NB1-Glykoproteins bei Patienten mit rheumatoider Arthritis, bei PRV-Patienten und bei Patienten mit schwerer bakterieller Infektion wurden als klinische Daten das CRP und die Zahl der Neutrophilen pro μl mit in die Auswertung einbezogen, um festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen Expression und klinischen Parametern gibt. Dazu wurden jeweils Streudiagramme erstellt.

Mehrfachmessungen bei gesunden Spendern

In der Gruppe der gesunden Spender wurde untersucht, ob die Anzahl der NB1-Glykoproteine und der Anteil der NB1-exprimierenden Zellen bei gesunden Probanden über einen längeren Zeitraum konstant bleibt. Dazu wurden von N = 11 Personen im Abstand von mindestens einer Woche die Granulozyten auf die Expression von NB1 untersucht. Es wurden mindestens zwei, bei N = 5 Spendern drei Messungen zur Untersuchung dieser Fragestellung durchgeführt und die maximalen Abweichungen vom Mittelwert berechnet.

Zahl der NB1-Antigene und Anteil der NB1-positiven Granulozyten bei gesunden Spendern

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob es bei gesunden Spendern einen Zusammenhang zwischen der Größe der Subpopulation NB1-positiver Granulozyten und der Zahl der Antigene pro Zelle gibt, wurde ein Streudiagramm erstellt.

Auswertung der Messungen des Fc γ RIIIb

Verteilung des Fc γ RIIIb bei den einzelnen Gruppen

Unter Verwendung des Tabellenkalkulationsprogramms „Excel 97“ wurden Tabellen und Diagramme erstellt, um die Verteilung der Zahl der Fc γ RIIIb für jede Patientengruppe darzustellen. Dazu wurde eine Einteilung der Zahl der Antigene in Klassen vorgenommen und gegen die relative Häufigkeit des Vorkommens eines Wertes in einer Patientengruppe aufgetragen.

Zahl der Fc γ RIIIb im Verlauf einer schweren Infektion

Als weiterer Aspekt wurde untersucht, wie sich die Expression des Fc γ RIIIb auf der Granulozytenmembran im Verlauf einer bakteriellen Infektion verhält. Mit einbezogen wurde auch die Höhe des C-reaktiven Proteins in die Analyse. Betrachtet wurde zum einen, ob sich die Zahl der Antigene im Verlauf der Expression ändert, zum anderen, ob sich ein Zusammenhang zur Höhe des CRPs zeigt.

Auswertung der Messungen des NB1-Glykoproteins und des Fc γ RIIIb

Bei gesunden Spendern nach Stimulation mit G-CSF wurde die Expression des NB1-Glykoproteins und des Fc γ RIIIb untersucht und statistisch auf eine mögliche Korrelation getestet.

Bei Patienten mit schwerer Infektion wurden die für die Zahl der NB1-Glykoproteine und die Zahl der Fc γ RIIIb gemessenen Werte im Verlauf einer bakteriellen Infektion parallel auf mögliche Zusammenhänge betrachtet.

B Nabelschnurblut

Nullhypothesen

Bei den Nabelschnurblutproben wurden sowohl alle Neugeborene im gesamten als auch männliche und weibliche Neugeborene separat betrachtet. Es erfolgte eine statistische Analyse der Daten für alle Neugeborenen, für die weiblichen und männlichen Neugeborenen, für die gebildeten Untergruppen der verschiedenen Parameter zur Geburt und für die verschiedenen Indikationen zur Sectio.

Folgende Nullhypothesen wurden formuliert:

- Die Zahl der NB1-Glykoproteine und der Fc γ RIIIb pro Granulozyt und die Größe der NB1-tragenden Subpopulation ist bei männlichen und weiblichen Neugeborenen nicht verschieden.
- Die Zahl der bestimmten NB1-Antigene und der Fc γ RIIIb pro Granulozyt in Nabelschnurblut ist unabhängig von dem Geburtsmodus, dem Geschlecht, der Schwangerschaftswoche, dem Gewicht, dem pH-Wert des Nabelschnurbluts, dem APGAR-Wert, Erkrankungen oder Problemen seitens der Mutter und den verschiedenen Indikationen zur Sectio vor oder während der Geburt, wie ein pathologisches CTG, ein vorzeitiger Blasensprung, ein AIS oder Wehen.

- Der Anteil der NB1-positiven Granulozyten unterliegt nicht dem Einfluß von Geburtsmodus, dem Geschlecht, der Schwangerschaftswoche, dem Gewicht, dem pH-Wert des Nabelschnurbluts, dem Wert für den APGAR 5' und den verschiedenen Indikationen zur Sectio (pathologisches CTG, vorzeitiger Blasensprung, AIS, Wehen) oder Problemen und Erkrankungen auf Seite der Mutter.
- Die Anzahl der gemessenen NB1-Glykoproteine bzw. der Fc γ RIIIb pro Zelle bei Neugeborenen unterscheidet sich nicht von der Anzahl bei erwachsenen gesunden Spendern oder erwachsenen Patienten mit schwerer Infektion.
- Die Größe der NB1-positiven Subpopulation neutrophiler Granulozyten in Nabelschnurblut Neugeborener ist nicht verschieden von der bei erwachsenen gesunden Spendern

Verteilung der Meßwerte

Um die Verteilung der Werte für das NB1-Glykoprotein, und den Fc γ RIIIb darzustellen, wurde eine Einteilung in sieben bzw. acht Klassen vorgenommen mit einer Klassenbreite von 30000 Antigenen pro Zelle und die relative Häufigkeit für das Vorkommen eines Wertes in einer Klasse dagegen aufgetragen. Diese Darstellung wurde für männliche, weibliche und alle Neugeborene gewählt.

Bei der Verteilung des Anteils NB1-exprimierender Granulozyten wurden fünf Klassen zu je 19,9% Breite gebildet und wieder gegen den relativen Anteil der Neugeborenen aufgetragen.

Vergleich der Antigenexpression bei Neugeborenen und Erwachsenen

Für den Vergleich der NB1-Expression bei Erwachsenen und Neugeborenen wurden diesselben graphischen Darstellungsformen wie bei der Verteilung der Meßwerte nur von Neugeborenen gewählt.

Berechnung des Anteils NB1-positiver Granulozyten

Die Proben von Nabelschnurblut wurden allesamt sowohl auf die Expression des Fc γ RIIIb als auch auf die Expression des NB1-Glykoproteins untersucht. Da bei den Nabelschnurblutproben sich die Granulozyten nicht immer von unvollständig lysierten Erythrozyten sowie von Lymphozyten und Thrombozyten unterscheiden ließen und somit diese Zellen bzw. Zellreste mit in die Auswertung einbezogen wurden, was einen falsch hohen Anteil NB1-negativer Zellen und einen falsch niedrigen Anteil NB1-positiver Zellen zur Folge hatte, wurde eine Korrektur durchgeführt. Anhand des Anteils der in der Positivkontrolle (Fc γ RIIIb) negativen Zellen wurde der Anteil der Zellen geschätzt, die keine Granulozyten waren. Dieser Anteil wurde dann von den als NB1-negativ erfaßten Granulozyten abgezogen und der Anteil der NB1-positiven Zellen neu berechnet.

2.2.6 Statistische Testverfahren

Aufgrund der Unkenntnis des Lageparameters „arithmetischer Mittelwert“, des Streuungsparameters „Standardabweichung“ und der Verteilung der Grundgesamtheiten der jeweiligen Stichproben kommen für die Testung der Hypothesen nur verteilungsfreie, nicht parametrische Prüfverfahren in Betracht.

Für den Vergleich der Anzahl der Antigene bzw. des prozentualen Anteils NB1-positiver Granulozyten zwischen zwei verschiedenen Gruppen wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben verwendet.

Beim Vergleich der Expression eines Antigens oder des prozentualen Anteils NB1-positiver Granulozyten bei gesunden Spendern vor und nach Stimulation mit G-CSF wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Rangtest für verbundene Stichproben eingesetzt.

Zur Korrelationsanalyse der Zahl der NB1-Glykoproteine und der Zahl der Fc γ RIIIb bei gesunden Spendern nach Stimulation mit G-CSF kam der Kendall-Tau-Test zur Verwendung.

Bestand eine Gruppe aus weniger als $n = 5$ Spendern, so wurde kein statistisches Testverfahren durchgeführt.

Das Signifikanzniveau wurde mit $p \leq 0,05$ festgelegt.

2.2.7 Messung der G-CSF-Spiegel

Zur quantitativen Messung von humanem Granulozytenkolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) im Plasma oder Serum wurde der Immunoassay „Quantikine“ der Fa. R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, verwendet. Es handelt sich hierbei um einen ELISA mit rekombinantem humanem G-CSF von E. coli, der für Messung von G-CSF in Zellüberstand, Plasma und Serum geeignet ist.

2.2.7.1 Vorbereitung

Die Standardlösungen wurden über eine Verdünnungsreihe ausgehend von einer Ausgangslösung mit 2500 pg G-CSF/ml hergestellt, so daß Lösungen mit folgenden Konzentrationen vorlagen: 2500 pg/ml, 1250 pg/ml, 625 pg/ml, 312 pg/ml, 156 pg/ml, 78 pg/ml und 39 pg/ml.

2.2.7.2 Durchführung

Zuerst wurden je 100 μ l Verdünnungsflüssigkeit RD1A in jede Vertiefung pipettiert. Dann wurden je 100 μ l der sieben Standardlösungen, des Leerwerts und der Proben hinzugefügt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde drei Mal mit je 400 μ l Waschlösung pro Vertiefung (gepufferter „Surfactant“ mit Konservierungsmittel) gewaschen und nach dem letzten Waschgang die Platte auf sauberen Papierhandtüchern ausgeklopft. Im Anschluß wurden je 200 μ l eines polyklonalen Peroxidase-markierten Antikörpers gegen rekombinantes humanes G-CSF zu jeder Probe zugegeben und die Proben

wieder zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten wieder drei Mal gewaschen, je 100 μ l einer 1:1 Mischung aus stabilisiertem Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin (Chromogen) den Proben hinzugefügt und für 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei erfolgt die Umsetzung zu Farbstoff und Wasser. Nachdem je 50 μ l der Stopplösung (2 N Schwefelsäure) pipettiert waren, wurde der Test innerhalb 30 min gemessen. Die Messung erfolgte am Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm sowie bei 540/570 nm zur Korrektur optischer Mängel der Platte. Anhand der mitgeführten Standards wurde eine Eichkurve erstellt und dadurch die G-CSF-Konzentration der Proben bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 NB1-Glykoprotein

3.1.1 Gesunde Spender

3.1.1.1 Zahl der NB1-Glykoproteine pro Neutrophilem

Von $n = 38$ Spendern konnte bei $n = 2$ Spendern (entsprechend 5,3%) das NB1 nicht auf der Granulozytenmembran nachgewiesen werden. Bei drei Personen wurden zwei NB1-exprimierende Zellpopulationen gesehen. Die einzelnen Meßwerte sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die niedrigste gemessene NB1-Expression pro Neutrophilem war 14.700, die höchste 139.875 und der Mittelwert 41.549 ± 20.573 (Tabelle 9).

Betrachtet man die Verteilung der Meßwerte, so fällt auf, daß am häufigsten (20 Personen bzw. 55,6%) 20.000 - 39.999 NB1-GP pro Neutrophilem exprimiert werden und insgesamt 28 bzw. 77,8% der Personen 20.000 – 60.000 NB1-GP exprimieren, während eine extrem niedrige oder hohe Expressionen selten ist (Abbildung 9). Ein signifikanter Unterschied NB1-Expression besteht zwischen Männern und Frauen nicht (Tabelle 8).

3.1.1.2 Anteil der NB1-exprimierenden Neutrophilen

Für die Größe der Subpopulation NB1-exprimierender Neutrophiler wurde ein Mittelwert von $50\% \pm 25\%$ berechnet, wobei der kleinste Anteil 10% und der größte Anteil 86% beträgt (Tabelle 7, Tabelle 10). Es zeigt sich eine bimodale Verteilung der Meßwerte mit Tendenz zu einem geringen Anteil NB1-positiver Zellen von 20-40% (11 bzw. 27,8% der Spender) und zu einem hohen Anteil von 60–80 % (10 bzw. 25% der Spender) (Abbildung 10).

Bei Frauen ist der Anteil NB1-exprimierender Neutrophiler im Vergleich zu Männern signifikant größer (Tabelle 8 und Abbildung 8).

Zwischen der Zahl der NB1-Glykoproteine und dem Anteil der NB1-positiven Subpopulation besteht eine statistisch signifikante Korrelation ($p=0,026$; Ergebnisse nicht dargestellt).

Spender	Zahl der NB1-GP pro Neutrophilem	%NB1+ Neutrophile	Zahl der FcγRIIIb pro Neutrophilem	Spender	Zahl der NB1-GP pro Neutrophilem	%NB1+ Neutrophile	Zahl der FcγRIIIb pro Neutrophilem
N1	45.594	16	17.6580	N20	29.152	45	213.724
N2	30.204	73	47.121	N21	35.453	39	319.710
N3	28.972	46	179.354	N22*	36.663	56	130.765
N4*	46.459	54	160.133	N23*	40.750	77	181.505
N5*	64.328	84	124.662	N24	47.536	13	185.451
N6	15.423	52	n.u.	N25	36.376	24	140.038
N7*	36.559	72	142.572	N26*	16.230	81	157.683
N8*	47.855	73	151.591	N27	37.900	74	n.u.
N9	22.634	10	201.057	N28	24.570	66	89.483
N10	32.001	34	236.727	N29	70.287	53	n.u.
N11*	56.078	30	198.114	N30*	27.907	22	213.016
N12	21.188	65	n.u.	N31*	98.004	81	249.366
N13	82.901	75	180.949	N32*	21.159	26	292.746
N14	39.800	31	139.124	N33	23.809	32	201.341
N15*	71.213	70	157.377	N34	29.809	28	213.047
N16*	44.306	60	252.253	N35	29.579	33	n.u.
N17	38.972	84	155.659	N36*	27.699	20	138.815
N18	42.861	82	n.u.	N37	0	< 1	173.294
N19*	95.528	81	148.410	N38	91	2	278.198

Tabelle 7: Zahl der NB1-Glykoproteine, der FcγRIIIb pro Neutrophilem und prozentualer Anteil der NB1-exprimierenden Neutrophilen (%NB1+) bei gesunden Personen. Bei mit „*“ bezeichneten Personen wurden mindestens zwei Messungen durchgeführt und hier der Mittelwert angegeben. „n.u.“ = „nicht untersucht“

	Zahl	NB1-GP pro Neutrophilem (Mittelwert)	Spannweite (Minimum - Maximum)	Signifikanz	%NB1+ Neutrophile (Mittelwert)	Spannweite (Minimum - Maximum)	Signifikanz
Männer	n=14	39.941 ± 19.935	21.159 - 95.528	n.s. (p=0,785)	40,1 ± 24,7	10 - 81	p = 0,013
Frauen	n=22	42.572 ± 21.816	15.423 - 98.004		59,1 ± 20,7	22 - 84	

Tabelle 8: Vergleich der NB1-Expression pro Neutrophilem und des prozentualen Anteils NB1-exprimierender Neutrophilen zwischen Frauen und Männern. Es wurden jeweils Mittelwerte angegeben. Während sich die Zahl der NB1-GP pro Neutrophilem nicht signifikant unterscheidet, wurde bei Frauen ein signifikant höherer Anteil NB1-exprimierender Neutrophiler gemessen.

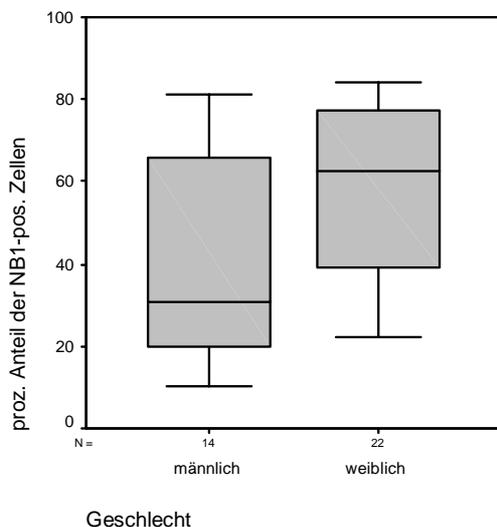


Abbildung 8: Boxplot-Darstellung des Anteils NB1-exprimierender Neutrophiler bei Frauen und bei Männern.

Gruppe	n	Mittelwert ± Standard- abweichung	95% Konfidenzintervall d. Mittelwerts		Median	Minimum	Maximum
			Untergrenze	Obergrenze			
gesunde Spender	36	41.549 ± 20.573	34.588	48.510	36.611	15.423	98.004
Hepatitispatienten	13	46.613 ± 22.463	33.039	60.187	46.387	16.700	85.000
RA-Patienten	19	83.694 ± 41.174	63.848	103.539	80.223	33.515	211.133
PV-Patienten	7	116.725 ± 59.582	61.620	171.829	81.774	74.596	236.618
Gesunde nach G-CSF-Stimulation	8	172.602 ± 85.815	100.858	244.345	179.831	48.817	284.483
Patienten mit bakt. Infektion	13	157.220 ± 103.514	94.667	219.773	152.071	25.670	336.326

Tabelle 9: In der Tabelle sind für die Anzahl der NB1-Glykoproteine pro Granulozyt bei gesunden Spendern, Patienten mit Hepatitisinfektion, RA-Patienten, PV-Patienten, gesunden Spendern nach Stimulation mit G-CSF und Patienten mit schwerer bakterieller Infektion jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung, das 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts, der Median, das Minimum und Maximum der gemessenen Werte aufgeführt. Auffällig ist die erhöhte Anzahl von NB1-Glykoproteinen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis, bei PV-Patienten, Patienten mit schwerer bakterieller Infektion und bei gesunden Spendern nach Stimulation mit G-CSF.

Gruppe	n	Mittelwert ± Standard- abweichung	95% Konfidenzintervall d. Mittelwerts		Median	Minimum	Maximum
			Untergrenze	Obergrenze			
gesunde Spender	36	51,7 ± 23,9	43,6	59,8	53,5	10	84
Hepatitispatienten	13	61,7 ± 18,5	50,5	72,9	64,0	26	84
RA-Patienten	19	54,8 ± 18,5	45,9	63,7	56,0	19	82
PV-Patienten	7	79,9 ± 7,5	73,0	86,8	82,0	64	86
Gesunde nach G-CSF-Stimulation	8	52,0 ± 28,3	28,3	75,7	58,0	13	87
Patienten mit bakt. Infektion	13	68,5 ± 20,8	55,9	81,0	70,0	37	92

Tabelle 10: Für den Anteil der NB1-positiven Granulozyten bei gesunden Spendern, Patienten mit Hepatitisinfektion, Patienten mit rheumatoider Arthritis, gesunden Spendern nach Stimulation mit G-CSF und Patienten mit schwerer bakterieller Infektion sind die statistisch ermittelten Parameter Mittelwert mit Standardabweichung, 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts, Median, Minimum und Maximum aufgelistet. Auffällig sind die erhöhten Werte im Vergleich zu gesunden Spendern bei PV-Patienten sowie bei Patienten mit schwerer bakterieller Infektion.

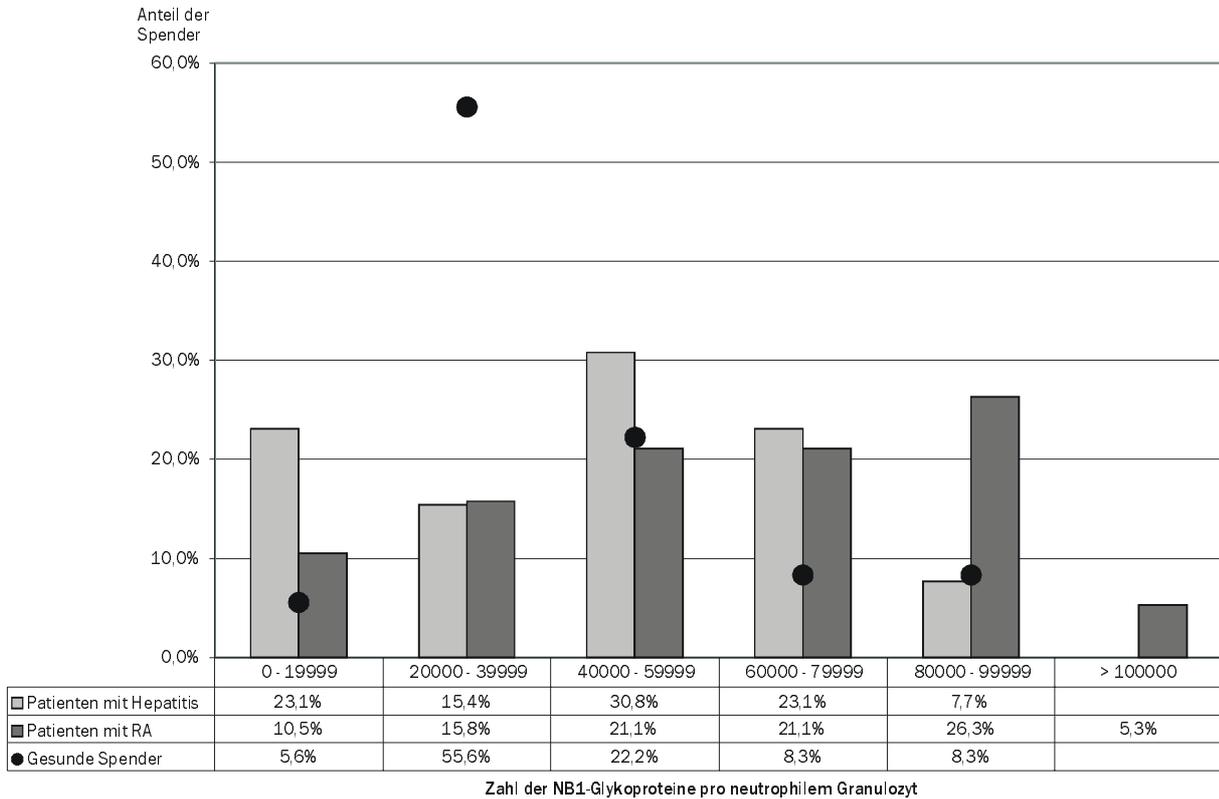


Abbildung 9: Für gesunde Spender, Patienten mit einer Hepatitisinfektion und RA-Patienten ist die Anzahl der NB1-GP und der jeweilige prozentuale Anteil der Personen einer Gruppe dargestellt. Die Mehrzahl der gesunden Personen exprimiert zwischen 20.000 und 39.999 NB1-GP pro Neutrophilem, während die meisten Patienten mit Hepatitisinfektion zwischen 40.000 und 59.999 NB1-GP exprimieren.

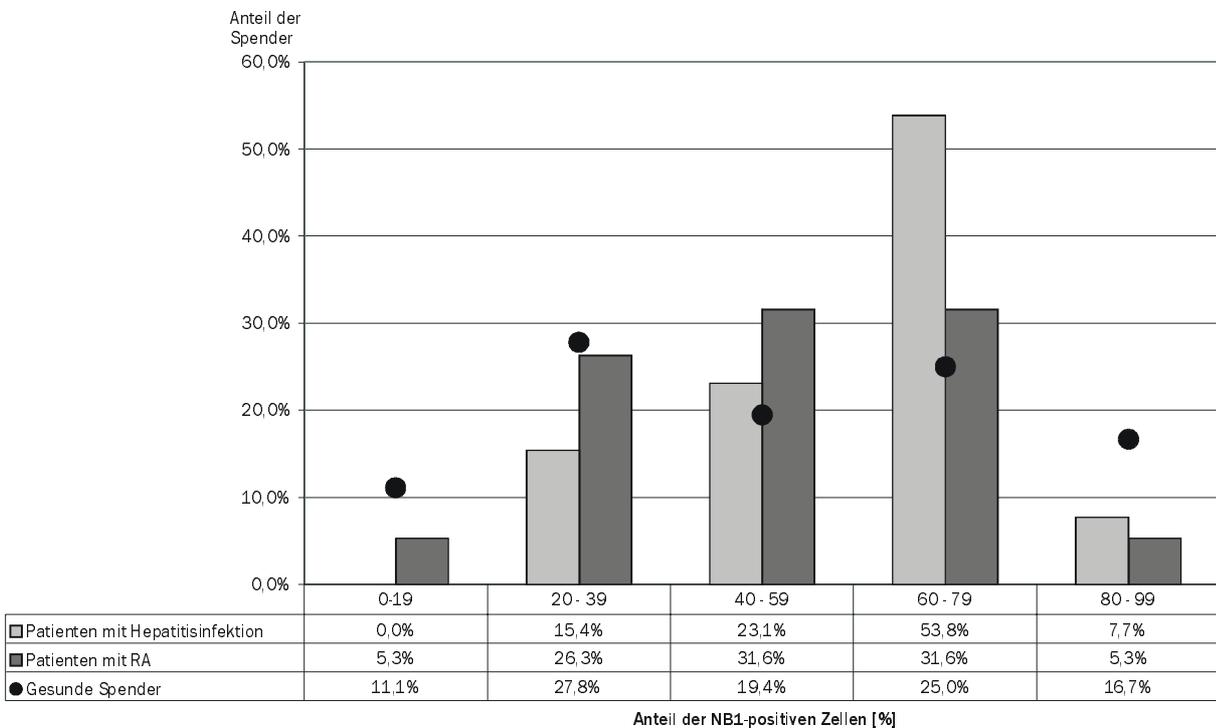


Abbildung 10: In der Abbildung ist der Anteil der NB1-positiven Neutrophilen, eingeteilt in fünf Klassen, für gesunde Spender, Patienten mit Hepatitisinfektion und RA-Patienten mit Angabe des prozentualen Anteils pro Klasse dargestellt. Es besteht eine zweipfellige Verteilung bei gesunden Spendern, während bei Patienten mit einer Hepatitisinfektion eine unimodale Verteilung vorliegt. Bei RA-Patienten liegt eine relativ gleichmäßige Verteilung zwischen 20-80% vor.

3.1.1.3 Intraindividuelle Variation der NB1-Expression

Mehrfache Bestimmung der NB1-Expression bei einzelnen Personen im Zeitraum von 3 Monaten zeigt, daß die Expression dabei bei den meisten Personen relativ konstant bleibt. (Abbildung 11). Bei den einzelnen Spendern unterscheidet sich die Anzahl der NB1-GP zwischen mehreren Messungen um 1.051 bis maximal 17.779. Differenzen von weniger als 10.000 NB1-GPs (7 Personen bzw. 64%) kommen häufiger vor als Differenzen von mehr als 10.000 NB1-GPs (4 bzw. 36% der Spender). Abweichung vom Mittelwert bis zu 10% werden bei 4 bzw. 36% der Personen beobachtet, Abweichungen vom Mittelwert bis 20% bei 5 bzw. 45,5% der Spende und mehr als 20% nur bei 2 bzw. 18% der Spender. Bei Betrachtung der Absolutwerte besteht ebenfalls eine hohe Konstanz der NB1-Expression bei gesunden Personen (Tabelle 11, Abbildung 11).

Auch der Anteil der NB1-exprimierenden Neutrophilen bleibt bei fast allen Personen über einen Zeitraum von ca. 3 Monaten sehr konstant mit einer Differenz von 1-14%. Bei 6 bzw. 55% Personen betrug die Differenz weniger als 5%, bei 3 bzw. 27% zwischen 5% und 10% und nur bei 2 bzw. 18% mehr als 10% (Abbildung 12, Tabelle 11).

Spender	Anzahl der NB1-Glykoproteine pro Zelle			proz. Anteil der NB1-positiven Zellen		
	Mittelwert	maximale Abweichung in % vom Mittelwert		Mittelwert	maximale Abweichung in % vom Mittelwert	
		nach unten	nach oben			
4	46.459	10,9	7,0	54	8,4	17,8
5	64.328	18,3	9,4	84	2,8	1,9
7	34.186	12,5	12,2	72	7,2	6,7
8	42.370	25,9	15,7	73	4,1	8,2
22	36.663	14,6	14,6	56	1,8	1,8
23	40.750	8,3	8,3	77	5,9	5,9
26	16.230	9,4	9,4	81	1,2	1,2
30	27.907	37,6	31,9	22	5,9	7,5
32	21.159	15,3	15,3	26	1,9	1,9
34	29.809	1,8	1,8	28	20,0	20,0
36	19.567	9,0	5,3	19	5,2	5,3

Tabelle 11: Für n = 11 gesunde Spender, bei denen die NB1-Expression mehrmals gemessen wurden, ist für die Zahl der NB1-Glykoproteine und für den prozentualen Anteil NB1-exprimierender Granulozyten jeweils der Mittelwert sowie die maximale Abweichung eines Wertes vom Mittelwert in Prozent aufgelistet.

Zahl der NB1-Glykoproteine
pro neutrophilem Granulozyt

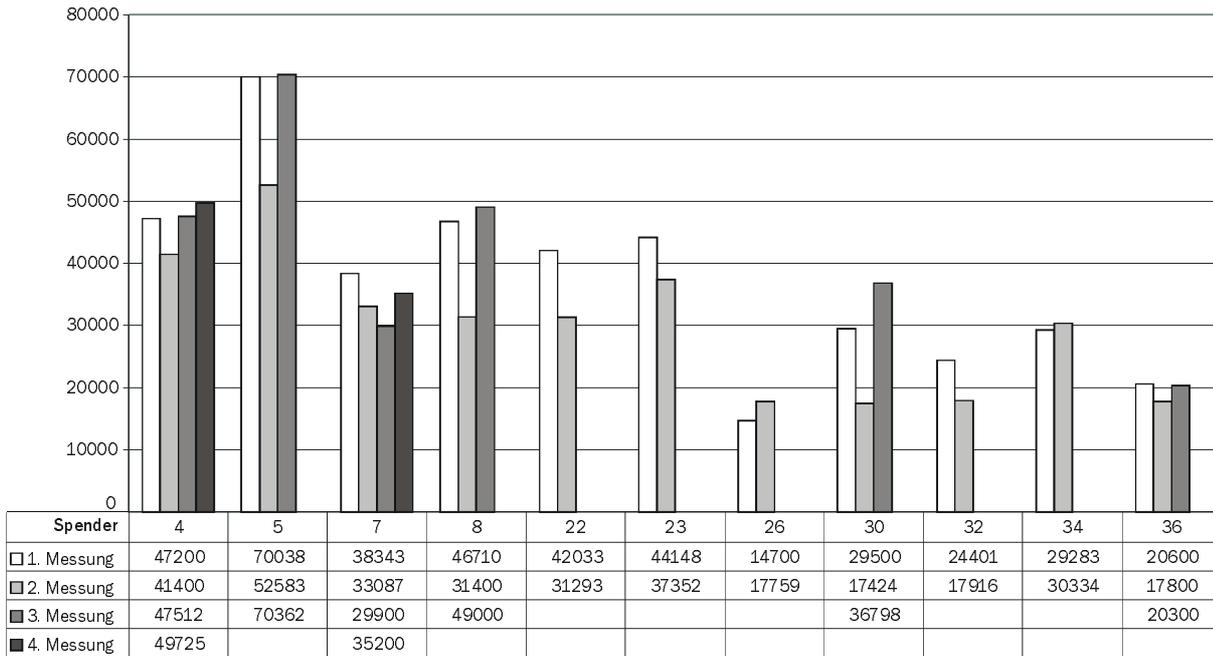


Abbildung 11: Für n = 11 gesunde Personen sind die gemessenen Werte für die NB1-Expression dargestellt, wobei pro Spender zwei bis vier Messungen im Abstand von vier Wochen durchgeführt wurden.

Anteil der
NB1-positiven
Zellen [%]

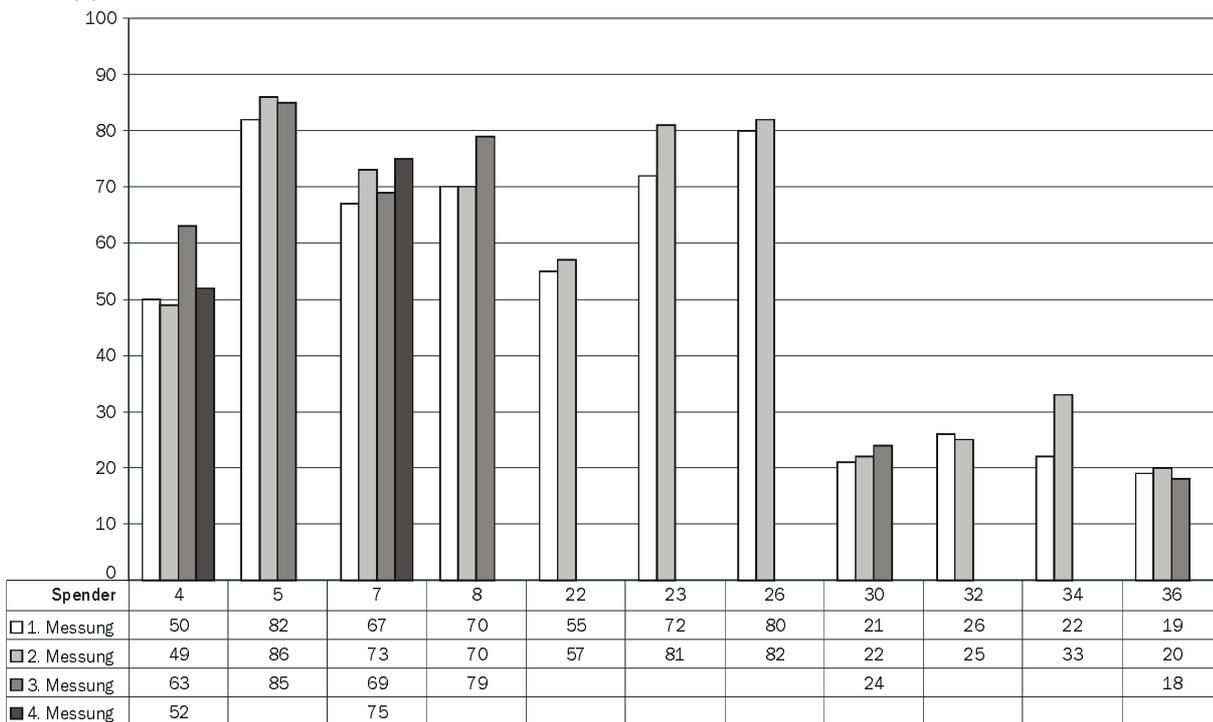


Abbildung 12: Der Anteil der NB1-positiven Granulozyten ist für n=11 gesunde Spender, bei denen mehrmals der Anteil der NB1-exprimierenden Neutrophilen bestimmt wurde, dargestellt. Bei den meisten Personen ist der Anteil NB1-exprimierender Neutrophiler zu den verschiedenen Meßzeitpunkten relativ konstant.

3.1.2 Spender mit einer Hepatitisinfektion

Die mittlere NB1-Expression bei Hepatitispatienten beträgt 46.613 ± 22.463 pro Neutrophilem mit einem Minimalwert von 16.700 und einem Maximalwert von 85.000 (Tabelle 9). Die einzelnen Meßwerte sowie Leukozytenzahlen und G-CSF-Spiegel sind in Tabelle 12 aufgeführt. Die Einteilung der Meßwerte in fünf Klassen zeigt ein Maximum im Bereich von 40.000 bis 59.999 NB1-GP (4 bzw. 30,8% der Patienten). Nur bei einem Patienten werden über 80.000 NB1-GP exprimiert (Abbildung 9).

Der Anteil der NB1-exprimierenden Neutrophilen beträgt im Mittel $61,7\% \pm 18,5\%$, wobei der kleinste Anteil 26%, der größte 84% beträgt (Tabelle 10, Tabelle 12). Bei 7 bzw. 53,8% der Patienten beträgt der Anteil NB1-exprimierender Neutrophiler 60% - 80 %. Weniger als 20% NB1+Neutrophile kommen in der untersuchten Stichprobe nicht vor (Abbildung 10).

Die statistische Testung ergibt mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0,336$, daß sich die Zahl der NB1-GP auf Neutrophilen gesunder Personen nicht von der bei Personen mit einer Hepatitisinfektion unterscheidet. Auch der Anteil NB1+ Neutrophiler unterscheidet sich zwischen Patienten mit einer Hepatitisinfektion und gesunden Personen nicht signifikant ($p = 0,170$; Abbildung 13).

Patient	Geschlecht, Alter	Typ der Hepatitis	Granulozyten (pro μ l)	CRP (mg/l)	G-CSF (pg/ml)	%NB1+ Neutrophile	NB1-GP Expression pro Zelle
1	m, 42	Hepatitis C	2.990	6,3	2.180	76	67.900
2	w, 46		2.790	<4		26	75.000
3	m, 46				2.210	49	16.700
4	w, 51		3.430	<4	1.890	78	61.100
5	m, 24		2.210			46	56.333
6	m, 42			<4		84	53.600
7	m, 68	Hepatitis B	2.270	5,5		38	46.387
8	m, 54	Hepatitis C		4,6	2.990	64	85.000
9	m, 45		1.430		1.430	64	25.900
10	w, 48			9,2	2.660	79	41.200
11	m, 43		1.890		3.430	74	39.600
12	w, 21		2.660		2.790	77	18.400
13	m, 64			<4	2.270	47	18.850

Tabelle 12: Alter, Geschlecht, Laborparameter, Zahl der NB1-GP pro Neutrophilem, Anteil NB1-exprimierender Neutrophiler (%NB1+) und G-CSF-Spiegel im Plasma bei Patienten mit chronischer Hepatitis B der C. Normwerte: Granulozyten 2.000-7.000/ μ l, CRP <4mg/l

	NB1-Glykoprotein	% NB1- pos. Zellen
gesunde Spender		
Patienten mit Hepatitis	n.s. (P = 0,336)	n.s. (P = 0,170)

Abbildung 13: Ergebnisse der statistischen Testung (Mann-Whitney-Test): die Zahl der NB1-GP pro Neutrophilem und der Anteil der NB1-positiven Zellen unterscheidet sich nicht bei gesunden Spendern und Patienten mit einer Hepatitisinfektion.

3.1.3 Patienten mit rheumatoider Arthritis

Von n = 20 Personen konnte bei einer Person keine NB1-Expression nachgewiesen werden, entsprechend 5% der Patienten.

Die Zahl der NB1-GP pro Neutrophilem beträgt im Mittel 79.514 ± 44.222 mit einem Minimum von 33.515 und einem Maximum von 211.133 (Tabelle 9, Tabelle 13). Die Verteilung der NB1-Expression zeigt ein Maximum bei 80.000 – 99.999 mit 26,3% der Patienten. Bei 68,5% der RA-Patienten wurden zwischen 40.000 und 100.000 NB1-GPs auf Neutrophilen exprimiert und nur bei einem Patienten über 100.000 NB1-GP (Abbildung 9).

Der Anteil der Granulozyten, die das NB1-Glykoprotein auf ihrer Zellmembran tragen, beträgt im Mittel $52,1\% \pm 21,5\%$ (Tabelle 10, Tabelle 13). Bei der Einteilung der Werte in fünf Klassen zeigt sich ein Häufigkeitsgipfel bei 60% - 80% (6 bzw. 30% der Patienten) und wie bei gesunden Personen eine zweigipflige Verteilung. Nur 4 Patienten haben weniger als 20% oder mehr als 80% NB1-positive Granulozyten (Abbildung 10).

Die statistische Testung ergibt mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$, daß die NB1-Expression RA-Patienten Arthritis signifikant höher ist als bei gesunden Personen. Der Anteil der NB1+ Neutrophilen unterscheidet sich zwischen gesunden Personen und RA-Patienten nicht (Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0,776$; Abbildung 14).

Ein (linearer) Zusammenhang zwischen der NB1-Expression und anderen Laborparametern wie Leukozytenzahlen, CRP konnte nicht gezeigt werden.

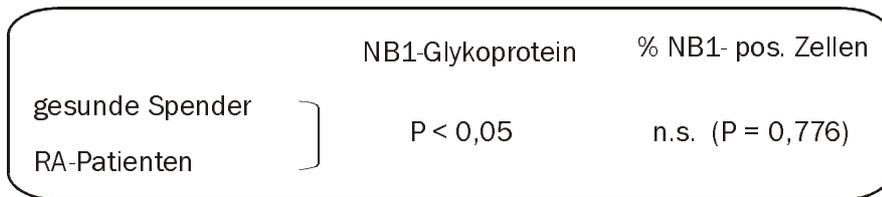


Abbildung 14: Darstellung der Ergebnisse der statistischen Testung (Mann-Whitney-Test): Die Zahl der NB1-GP pro Neutrophilem bei RA-Patienten ist im Vergleich zu gesunden Spendern signifikant erhöht, während der prozentuale Anteil der NB1-positiven Granulozyten sich statistisch nicht unterscheidet.

Patient	Geschlecht Alter	Erkrankungsphase, Medikamente	Granulozyten (pro µl)	CRP (mg/l)	G-CSF	%NB1+ Neutrophile	NB1-GP Expression pro Zelle	FcγRIIIb Expression pro Zelle
1	w, 64	IV, Prednisolon 5 mg, Diclofenac	3.477	8	normal	60	63.905	
2	w, 61	I, Prednisolon 5mg	6.468	16		75	80.223	104.413
3	w, 65	IV, Prednisolon 5mg, Leflunomid 20mg, Diclofenac	2.512	27	normal	49	33.515	253.782
4	w, 72	IV, Prednisolon 15 mg, Methotrexat 15 mg/Woche, Diclofenac	8.722	43		42	100.139	119.523
5	w, 56	Diclofenac	n.u.	n.u.		80	65.819	174.760
6	w, 71	I-II, Levodopa 50 mg, Benserazid 12, 5 mg, Celebrex 200mg	2.550	5		34	34.945	275.684
7	w, 62	II, Prednisolon 5mg	5.040	5		38	63.014	228.724
8	w, 68	I, Prednisolon 20 mg, Diclofenac	3.380	26		76	110.323	129.275
9	w, 33	III, akuter Schub	8.611	13		2	93	123.543
10	w, 65,	Prednisolon 10 mg	5.916	13		39	45.017	159.256
11	w, 56	IV	1.590	9	normal	56	82.683	278.301
12	m, 60	I, Diclofenac	3.306	6		19	48.388	117.138
13	w, 43	I, Prednisolon 7,5 mg	10.132	28	normal	59	116.263	323.200
14	m, 76	I-II, akuter Schub Prednisolon 30 mg	5.760	40		63	74.695	196.020
15	m, 70	Prednisolon 12,5 mg, Leflunomid 20 mg (Erstgabe)	7.702	52		82	107.100	108.185
16	m, 71	II, Prednisolon 12,5 mg	12.144	53	normal	54	211.133	257.428
17	w, 59	III, Prednisolon 35 mg	9.310	12		73	99.163	233.484
18	m, 45	II-III, Prednisolon 10 mg, Diclofenac, Methotrexat	10.496	88		32	47.244	137.740
19	w, 42	III, Methotrexat 20 mg/Woche	3.300	15	normal	39	118.806	159.245
20	w, 62	III-IV, Prednisolon 5 mg, Methotrexat 20 mg/Woche	2.480	27		71	87.807	170.463

Tabelle 13: Alter, Geschlecht, Erkrankungsphase, Therapie zum Zeitpunkt der Messung, Laborparameter, G-CSF-Spiegel im Plasma, Zahl der NB1-GP und des FcγRIIIb sowie Anteil NB1+ Neutrophiler bei RA-Patienten. Normwerte: Granulozyten 2.000-7.000/µl, CRP <4mg/l

3.1.4 Patienten mit Polyzythämia vera

Der Mittelwert für die NB1-Expression auf Neutrophilen bei PV-Patienten beträgt 116.725 ± 59.582 mit einem Minimum von 74.596 und einem Maximum von 236.618 (Tabelle 9). Die einzelnen Meßwerte, weitere Laborparameter, Erkrankungsphase und Therapie sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Die Verteilung der Werte zeigt ein Maximum zwischen 60.000 - 140000 NB1-GP pro Neutrophilem (5 bzw. 71,4% der Patienten). Je ein Patient weist eine NB1-Expression zwischen 140.000 - 220.000 bzw. 220.000 - 300.000 auf (Abbildung 16).

Der Anteil NB1+ Neutrophiler beträgt im Mittel $79,9\% \pm 7,4\%$. Als kleinster Wert wurden 64%, als größter Wert 86% NB1+ Neutrophile ermittelt (Tabelle 10 und Tabelle 14).

Die Betrachtung der Verteilung der NB1-exprimierenden Neutrophilen zeigte eine leicht unsymmetrische, rechtsgipflige Verteilung. Deutlich wird die Bevorzugung von Werten zwischen 60% und 90% deutlich, wobei 5 Personen Werte zwischen 80% und 90% NB1-positiver Zellen haben. Ein Anteil unter 60% NB1-positiver Zellen kommt in dieser Gruppe nicht vor (Abbildung 17).

Auf der Zellmembran Neutrophiler werden bei an PV erkrankten Personen signifikant mehr NB1-GP exprimiert als bei gesunden Spendern ($p < 0,05$). Der Anteil NB1+ Neutrophiler ist bei PV-Patienten signifikant höher als bei gesunden Personen (Abbildung 15).

Ein (linearer) Zusammenhang zwischen Neutrophilenzahlen und Zahl der NB1-GP pro Neutrophilem konnte nicht gezeigt werden.

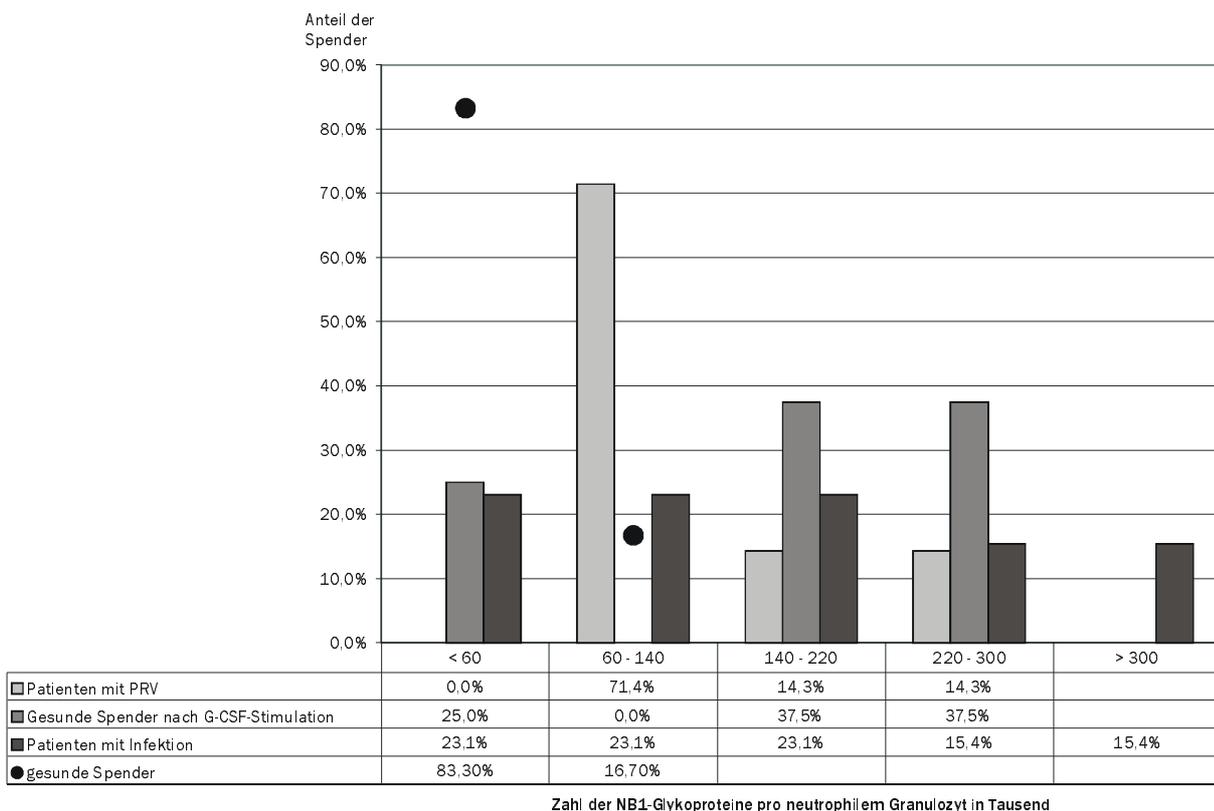
	NB1-Glykoprotein	% NB1- pos. Zellen
gesunde Spender	P < 0,05	P < 0,05
PRV-Patienten		

Abbildung 15: Die Ergebnisse des Mann-Whitney-Tests zeigen, daß sowohl die Zahl der NB1-GP pro Neutrophilem als auch der prozentuale Anteil der NB1-positiven Neutrophilen bei PV-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern signifikant höher ist.

Patient	Geschlecht Alter	Erkrankungsphase Therapie	Granulozyten (pro µl)	CRP (mg/l)	G-CSF	%NB1+ Neutrophile	NB1-GP Expression pro Zelle	FcγRIIIb Expression pro Zelle
P1	m, 67	Chronische Phase Hydroxycarbamid	5.300	< 4	erniedrigt	82	76.536	27.814
P2	m, 67	Chronische Phase Hydroxycarbamid	6.380	< 4	erniedrigt	84	236.618	111.918
P3	w, 61	Chronische Phase Hydroxycarbamid	6.330	< 4	erniedrigt	64	74.596	126.817
P4	m, 76	Chronische Phase	5.410	< 4	n.u.	81	125.257	103.449
P5	m, 72	Chronische Phase Hydroxycarbamid	1.1150	< 4	erniedrigt	86	81.774	84.607
P6	w, 80	Chronische Phase Hydroxycarbamid	4.030	< 4	erniedrigt	84	78.136	106.702
P7	w, 81	Chronische Phase Hydroxycarbamid Busulfan 2mg/Woche	10.000	< 4	erniedrigt	78	144.157	104.256

Tabelle 14: Für alle PV-Patienten sind Alter, Geschlecht, Erkrankungsphase, Therapie, Laborparameter (CRP, Granulozytenzahlen) G-CSF-Spiegel sowie die NB1- und FcγRIIIb-Expression mit dem Anteil NB1-exprimierender Zellen aufgeführt.

Normwerte: Granulozyten 2.000-7.000/µl, CRP <4mg/l.



Zahl der NB1-Glykoproteine pro neutrophilem Granulozyt in Tausend

Abbildung 16: Darstellung der Verteilung der NB1-Expression auf Neutrophilen bei gesunden Spendern, PV-Patienten, gesunden Spendern nach Stimulation mit G-CSF und Patienten mit schwerer bakterieller Infektion. Die Zahl der NB1-GP ist in fünf Klassen eingeteilt und der prozentuale Anteil der Patienten einer Gruppe pro Klasse angegeben. Neutrophile gesunder Spender exprimieren bevorzugt weniger als 60.000, während bei den übrigen Gruppen tendenziell eine höhere NB1-Expression besteht.

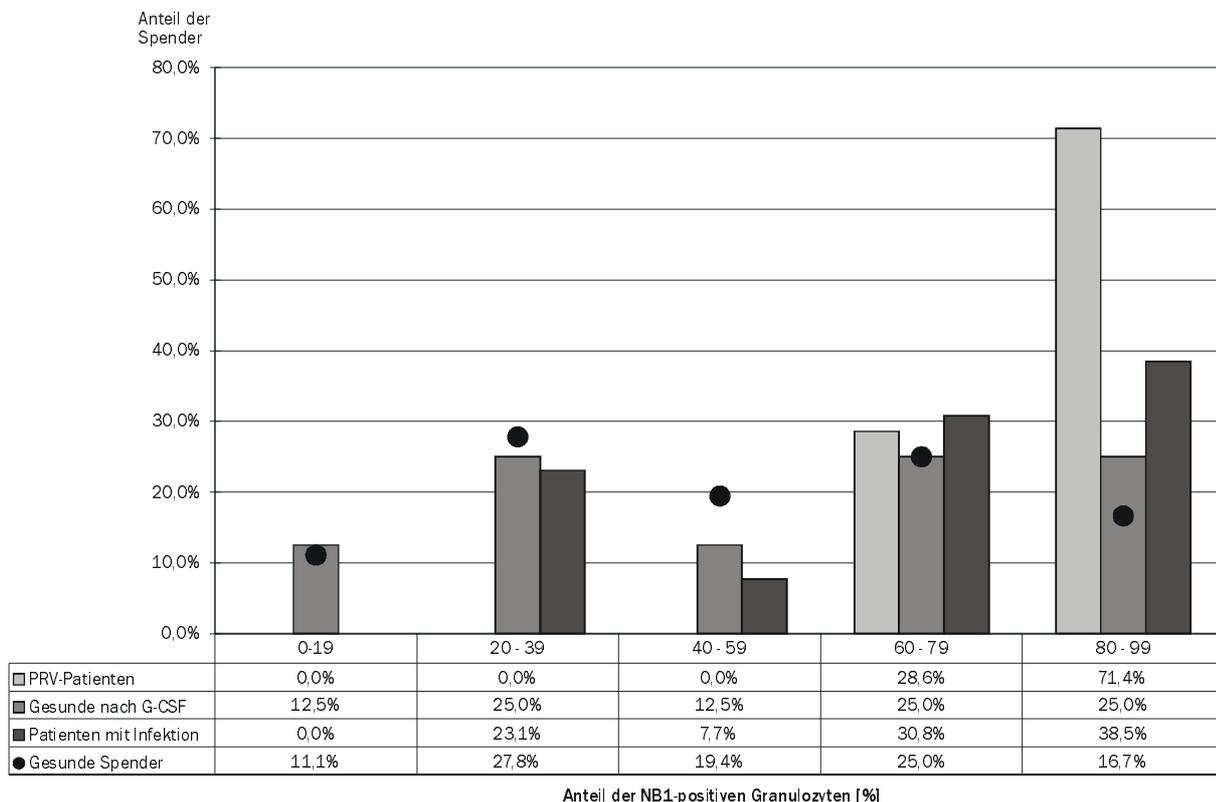


Abbildung 17: Darstellung der Verteilung des prozentualen Anteils NB1-positiver Neutrophiler bei gesunden Personen, PV-Patienten, gesunden Spendern nach Stimulation mit G-CSF und Patienten mit schwerer bakterieller Infektion. Der prozentuale Anteil der Spender einer Gruppe ist gegen den Anteil der NB1-positiven Zellen aufgetragen. Bei PV-Patienten ist der Anteil NB1-exprimierender Neutrophiler wesentlich größer als bei gesunden Personen ohne oder nach G-CSF-Stimulation. Auch Patienten mit schwerer bakterieller Infektion haben einen höheren Anteil NB1-exprimierender Neutrophiler als gesunde Personen.

3.1.5 Gesunde Personen nach Gabe von G-CSF

Für die mittlere NB1-Expression bei gesunden Personen nach Gabe von G-CSF ergibt sich ein Mittelwert von 154.437 ± 88.317 . Die geringste gemessene NB1-Expression bei dieser Gruppe beträgt 16.923, die höchste 284.483 NB1-GP pro Neutrophilem (Tabelle 9, Tabelle 15).

Die Verteilung zeigt, daß 2 (entsprechend 25%) der Spender weniger als 60.000 NB1-GP exprimieren und damit im Bereich gesunder Spender ohne G-CSF-Stimulation liegen. Bei den übrigen Personen wurde mit über 140.000 NB1-GP deutlich höhere Werte gemessen (Abbildung 16).

Bei der Untersuchung der NB1+ Subpopulation berechnet sich der Mittelwert mit $51\% \pm 30\%$. Die Spannweite beträgt 86%, wobei als niedrigster Wert 1% und als höchster Wert 87% NB1 positive Zellen vorkommen (Tabelle 10, Tabelle 15).

Die Verteilung der Meßwerte zeigt kein eindeutiges Maximum. Man kann eine Bevorzugung der Werte zwischen 20% - 40% und 60% - 80% sowie 80% - 100% mit jeweils 2 bzw. 25% der Spender erkennen. Die Verteilung ist somit der Verteilung des Anteils NB1-positiver Neutrophiler bei gesunden Spendern ohne

Stimulation mit G-CSF ähnlich (Abbildung 17).

Die Zahl der NB1-GP auf Neutrophilen ist nach Applikation von G-CSF bei gesunden Personen signifikant höher als bei gesunden Personen ohne G-CSF-Anwendung. Der Anteil NB1+ Neutrophiler unterscheidet sich nach Gabe von G-CSF nicht vom Anteil bei gesunden Personen ohne Stimulation mit G-CSF (Abbildung 18). Diese Ergebnisse können beim Vergleich der NB1-Expression der jeweiligen Personen vor und nach G-CSF-Gabe bestätigt werden: die Zahl der NB1-GP pro Neutrophilem nimmt um den Faktor 2,1-6,6 zu, während der Anteil der NB1-positiver Neutrophiler konstant bleibt (Faktor 0,8-1,1; Abbildung 19, Abbildung 20, Abbildung 21).

Betrachtet man die Ergebnisse von Personen, die mehrmals an aufeinanderfolgenden Tagen G-CSF erhielten wie Person G4 und G7, so fällt auf, daß an Tag 2 und 3 die Zahl der NB1-GP pro Zelle zunimmt. An Tag 3 wird ein größerer Anteil NB1-positiver Zellen beobachtet. Wird G-CSF an Tag 0 und Tag 2 verabreicht wie bei Person G3 und G5, so kommt es zu einer weiteren Expressionssteigerung von NB1-GP an Tag 3, jedoch bleibt der Anteil der NB1-exprimierenden Zellen konstant (Tabelle 15)

	NB1-Glykoprotein	% NB1- pos. Zellen
gesunde Spender	P < 0,05	n.s. (P = 0,873)
gesunde Spender nach Stimulation mit G-CSF		

Abbildung 18: Die Verwendung des Mann-Whitney-Tests zeigt einen signifikanten Unterschied in der Expression des NB1-Glykoproteins bei gesunden Spendern nach G-CSF im Vergleich zu gesunden Spendern ohne Stimulation. Der Anteil der NB1-positiven Zellen ist nicht signifikant verschieden.

	NB1-Glykoprotein	% NB1- pos. Zellen
gesunde Spender vor G-CSF	P < 0,05	n.s. (P = 0,141)
gesunde Spender nach G-CSF		

Abbildung 19: Ergebnisse der statistischen Testung (Wilcoxon-Rangtest für verbundene Stichproben) für die Expression des NB1-Glykoproteins vor und nach Stimulation gesunder Spender mit G-CSF. Zu erkennen ist die signifikant erhöhte Zahl der NB1-Glykoprotein pro neutrophilem Granulozyt nach Stimulation gesunder Spender mit G-CSF.

Spender	Geschlecht, Alter	2. Messung nach Erstgabe von G-CSF	G-CSF (pg/ml)	%NB1+ Neutrophile	NB1-GP Expression pro Zelle	FcγRIIIb Expression pro Zelle
G1	m		1.778	51	174.419	82.809
G2	m, 41		2.253	53	185.243	72.410
G3	m, 44		3.956	87	127.985	59.615
		3		87	257.822	45.436
G4	m, 40	2 (3. + 5. Tag)	2.973	68	284.483	60.345
		tägliche G-CSF-Gabe		85 (2 peaks)	194.216	48.771
G5	m, 32		4.519	12	77.396	57.520
		2		13	151.634	66.063
G6	f, 35		4.189	83	48.817	27.948
G7	m, 44		1.211	27	114.323	67.082
		1		21	221.693	33.783
G8	m, 38		1.138	28	56.693	100.828
G9	m			81	199.880	10.354

Tabelle 15: Alter, Geschlecht, G-CSF–Spiegel im Plasma am Untersuchungstag, NB1- und FcγRIIIb-Expression bei mit G-CSF stimulierten gesunden Personen. Wurde einer Person mehrmals kurz nacheinander G-CSF verabreicht, so sind die Meßwerte bei Zweitgabe nochmals aufgeführt.

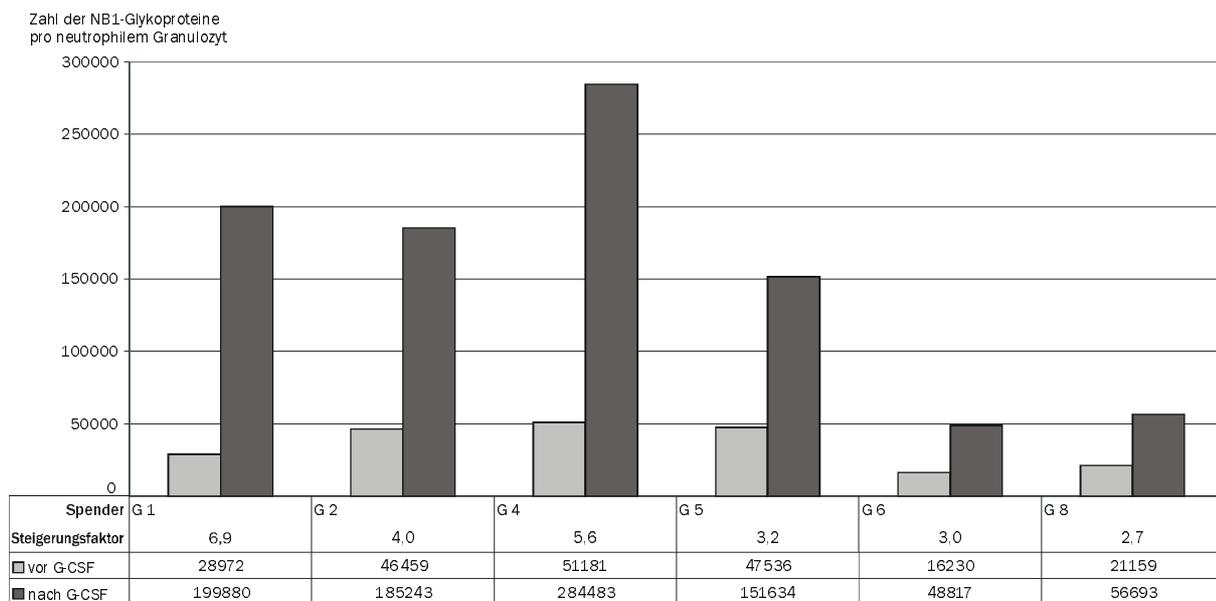


Abbildung 20: Es sind die Zahl der NB1-Glykoproteine pro Neutrophilem vor und nach Gabe von G-CSF für die einzelnen Personen dargestellt. Die Zahl der NB1-GP pro Neutrophilem ist nach Stimulation mit G-CSF deutlich erhöht um den Faktor 2,7 bis 6,9.

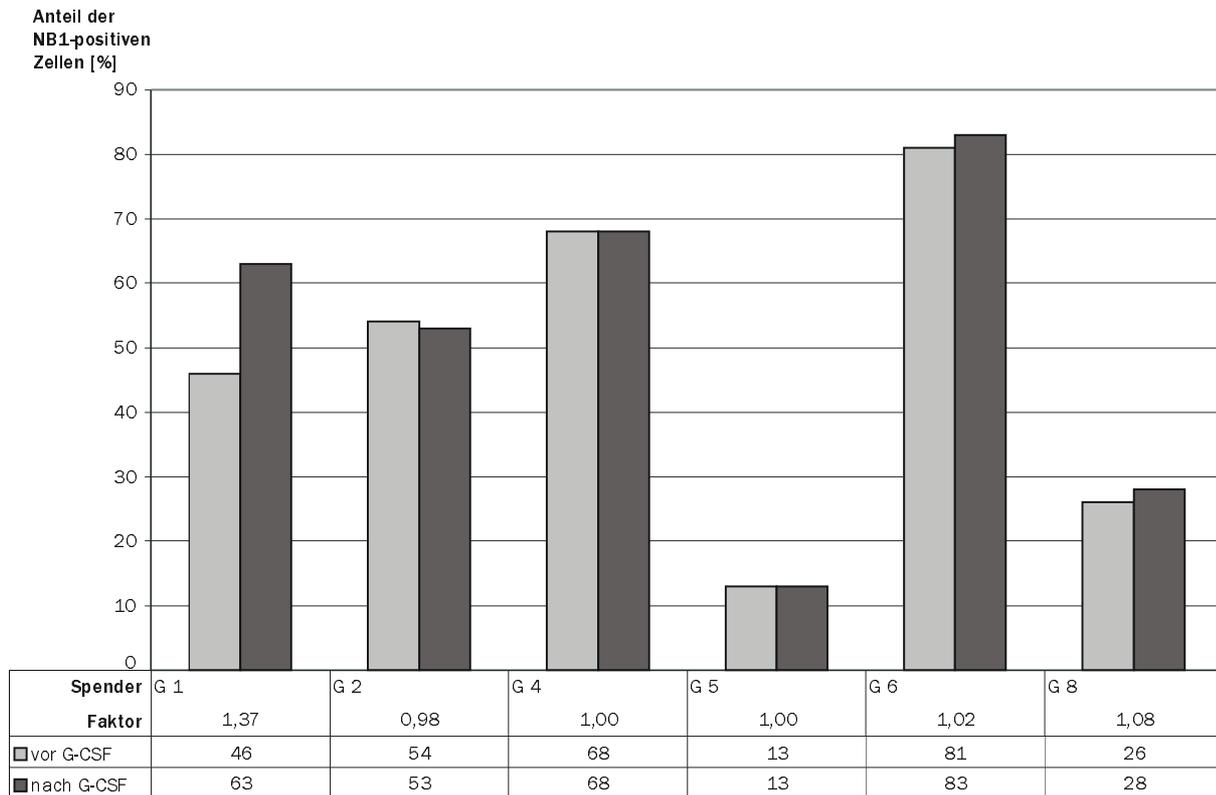


Abbildung 21: Für die einzelnen Spender ist der prozentuale Anteil der NB1-positiven Zellen vor und nach Stimulation mit G-CSF dargestellt. Aus der Abbildung geht hervor, daß der Anteil der NB1-positiven Granulozyten nach Stimulation mit G-CSF nahezu unverändert ist.

3.1.6 Patienten mit schwerer bakterieller Infektion

Von N = 15 Patienten waren bei 2 Personen die Neutrophilen für das NB1-GP negativ; der Anteil der NB1+ Neutrophilen kleiner als 10%., was einem Anteil von 13,3% der Patienten entspricht. Die mittlere NB1-Expression pro Zelle beträgt 144.288 ± 110.191 mit einem Minimalwert von 25.670 und einem Maximalwert von 336.326 (Tabelle 9, Tabelle 16). Im Histogramm zeigt sich eine gleichmäßige Verteilung für die Zahl der NB1-GP auf Werte zwischen 0 und 360.000. Bei 2 der Patienten wurden mehr als 300.000 NB1-GP bestimmt (Abbildung 16).

Die Messungen für den Anteil NB1+ Neutrophiler haben als Mittelwert $61\% \pm 31\%$ mit einem kleinsten Anteil von 35% und einem größten von 92% (Tabelle 10, Tabelle 16). Die ermittelten Werte für die Schiefe und die Kurtosis (-0,992 bzw. -0,069) deuten auf eine rechtsgipflige Verteilung hin zu höheren Werten mit einer weiteren Gruppierung als bei einer Normalverteilung. In der graphischen Darstellung erkennt man eine Bevorzugung der Klasse 80% - 100% NB1-positiver Zellen, in der 5 bzw. 38,5% der Werte liegen. 69,2% der Patienten haben einen Anteil NB1-positiver Neutrophiler zwischen 60% und 100% (Abbildung 17).

Die statistische Testung der Nullhypothesen ergab, daß die Zahl der NB1-GP pro Zelle signifikant größer ist bei Patienten mit einer schweren bakteriellen Infektion im Vergleich zu gesunden Spendern. Die Größe der Subpopulation NB1-positiver Neutrophiler ist bei Patienten mit einer schweren bakteriellen Infektion signifikant höher im Vergleich zu gesunden Personen (Abbildung 22).

	NB1-Glykoprotein	% NB1- pos. Zellen
gesunde Spender	P < 0,05	P < 0,05
Patienten mit schwerer Infektion		

Abbildung 22: Der Mann-Whitney-Test liefert für die Zahl der NB1-GP und den Anteil der NB1-positiven Neutrophilen signifikant höhere Werte bei Patienten mit schwerer bakterieller Infektion im Vergleich zu gesunden Personen.

Bei der Bestimmung der NB1-Expression im Verlauf einer Sepsis kommt es bei den Patienten I1 und I12 zu einem deutlichen Rückgang der NB1-Expression bei gleichzeitiger klinischer Besserung. Besonders deutlich wird der Zusammenhang zwischen klinischer Besserung des Gesundheitszustands, Rückgang von CRP, Verringerung der Neutrophilenzahlen und der Abnahme der NB1-Expression bei dem Patienten I1, da die Zahl zum Zeitpunkt der zweiten Messung auf 46% des Wertes der ersten Messung und beim dritten Meßzeitpunkt auf 20% fällt. Insgesamt nimmt die NB1-Expression um 80,1% ab. Während die Werte der ersten beiden Messungen noch in einem Bereich liegen, der von Gesunden nicht erreicht wird, ist der dritte Meßwert für das NB1-GP bereits auf dem Niveau Gesunder. Ähnlich ist der Verlauf bei Patient I12. Bei den Patienten I3 und I4, die beide verstarben, beobachtet man bei I3 nur einen geringen Rückgang der NB1-Expression, während es bei Patient I4 zu einem deutlichen Anstieg um 180% kam. Bei den Patienten I3 und I4 läßt sich keine eindeutige Korrelation zu anderen Laborparametern beobachten: Während bei Patient I3 die Leukozytenzahl anfangs sehr niedrig ist und im Verlauf steigt, sinkt die NB1-Expression, und auch das CRP nimmt ab. Bei Patient I4 kommt es zu einem CRP-Anstieg mit gleichzeitigem Abfall der Neutrophilenzahl von 12920/ μ l auf 8850/ μ l und stark vermehrter NB1-Expression. Ein (linearer) Zusammenhang der Zahl der NB1-GP mit der Neutrophilenzahl oder CRP besteht nicht. Bei Patienten mit sehr hohen Werten für das CRP liegt eine hohe NB1-Expression vor, wobei dies umgekehrt nicht zutrifft (Tabelle 16, Abbildung 23).

Der Anteil NB1-positiver Zellen nimmt bei gleichzeitiger Abnahme der Zahl der NB1-GP pro Neutrophilem um maximal 30% ab (Tabelle 16).

Patient	Geschlecht Alter	Erkrankung, Verlauf	Tag	Granulozyten (pro μ l)	CRP (mg/l)	G-CSF (pg/ml)	%NB1+ Neutrophile	NB1-GP Expression pro Zelle	Fc γ RIIIb Expression pro Zelle
11	m, 51	Sepsis (mit sept. Enzephalitis, ARDS), Besserung	1	14.420 ¹	236	465	52	336.326	37.670
			9	13.600 ¹	132		56	155.157	102.981
			22	13.300 ¹	68		41	66.768	176.032
			33	7.320 ¹	31		37	100.322	279.599
12	m, 66	Sepsis; Tod		19.720	194	143	<1	negativ	90.636
13	w, 66	Sepsis (Staph. Candida); Tod	1	3.150	163	68	89	152.071	57.637
			6	7.260	27		73	128.846	81.821
			13	11.320	127		61	105.603	125.916
14	w, 87	Sepsis (Staph. aureus); Tod	1	12.920	125		93	170.808	47.383
			6	8.850	144	30	91	308.317	58.981
15	w, 88	Pneumonie; Sepsis (koagulasene g. Staph.); Tod		7.250	133	30	62	238.831	291.009
16	m, 19	Pneumonie		9.000 ¹	29	290	79	136.626	249.748
17	m, 34	Pneumonie		3.620	257	361	92	106.303	99.590
18	m, 63	Abszeß		13.000 ¹	204	normal	40	40.670	244.288
19	m, 63	Pleuraempyem		8.830	161	normal	38	68.018	65.221
110	m, 55	Sepsis, bereits Phase der Besserung		12.400 ¹	15		86	44.720	57.993
111	w, 49	Urosepsis (E. Coli); ARDS, Besserung		24.020	39		37	39.379	94.868
112	m, 19	ARDS, Besserung	1	22.160	337		70	159.804	159.804
			24	10.100 ¹	11		65	138.029	213.399
113	m, 61	Sepsis		7.900 ¹	281		70	267.436	10.006
114	w, 80	Sepsis		15.300 ¹	121		84	160.361	120.637
115	m, 61	Stauungs- pneumonie					0	negativ	77.615

Tabelle 16: Alter, Geschlecht, Erkrankung, Verlauf, Laborparameter (CRP, Granulozytenzahl), NB1- und Fc γ RIIIb-Expression bei Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen.

Normwerte: Leukozyten 4.000-10.000/ μ l, Granulozyten 2.000-7.000/ μ l, CRP <4mg/l

¹Gesamtleukozytenzahl, da keine Neutrophilenzahl vorlagen

Zahl der NB1-Glykoproteine
pro neutrophilem Granulozyt

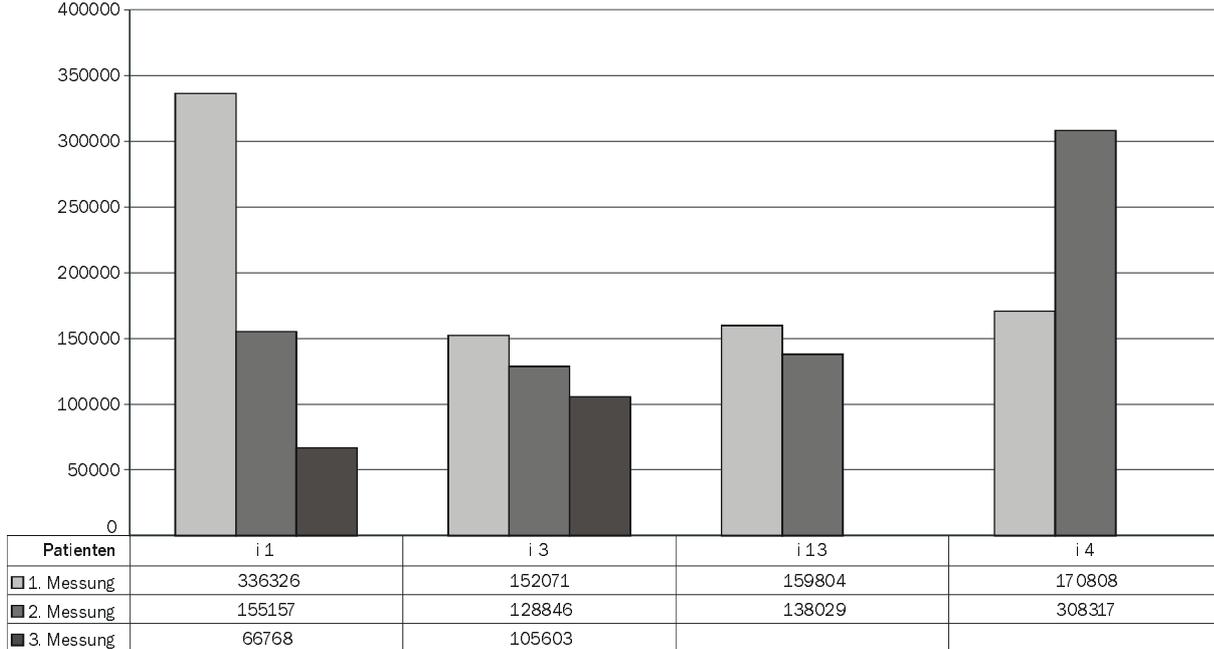


Abbildung 23: Es sind die einzelnen Meßwerte für die Zahl der NB1-GP im Verlauf einer Sepsis bei vier Patienten dargestellt. Bei drei Patienten ist ein Rückgang der NB1-Expression zu beobachten, während bei einem Patienten eine Zunahme vorliegt.

3.1.7 Zusammenfassung der Ergebnisse für das NB1-Glykoprotein

Das NB1-Glykoprotein wird auf Zellen von Gesunden bei etwa 97% der Personen exprimiert. Die NB1-Expression ist bei Personen mit PV, einer schweren bakteriellen Infektion oder einer rheumatoiden Arthritis sowie bei gesunden Spendern nach Stimulation mit G-CSF signifikant erhöht.

Ein signifikant höherer Anteil NB1-exprimierender Neutrophiler wird bei Patienten mit PV und bei Patienten mit schwerer bakterieller Infektion gezeigt (Abbildung 24, 25).

Anzahl der NB1-Glykoproteine pro neutrophilem Granulozyt

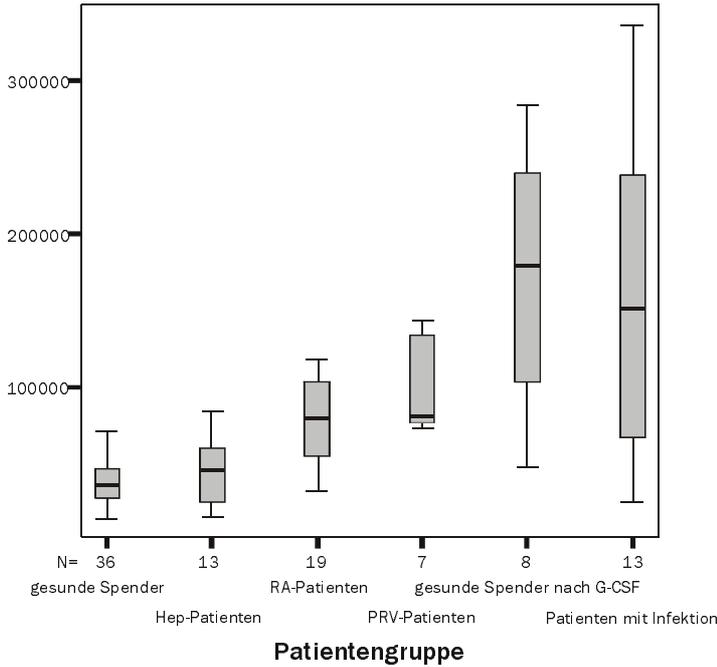


Abbildung 24: In dem Boxplot sind der Median, der Interquartilbereich sowie das Minimum und das Maximum der gemessenen Werte für die Anzahl der NB1-Glykoproteine pro neutrophilem Granulozyt dargestellt. Die Darstellung umfaßt die Gruppe der gesunden Spender, der Patienten mit Hepatitis, der Patienten mit rheumatoider Arthritis, der PRV-Patienten, der gesunden Spender nach Stimulation mit G-CSF und der Patienten mit schwerer Infektion. Deutlich zu erkennen ist die erhöhte Expression des NB1-Glykoproteins bei Patienten mit rheumatoider Arthritis, PRV-Patienten, gesunden Spendern nach G-CSF und Patienten mit schwerer Infektion im Vergleich zu gesunden Spendern.

Anteil der NB1-positiven Zellen [%]

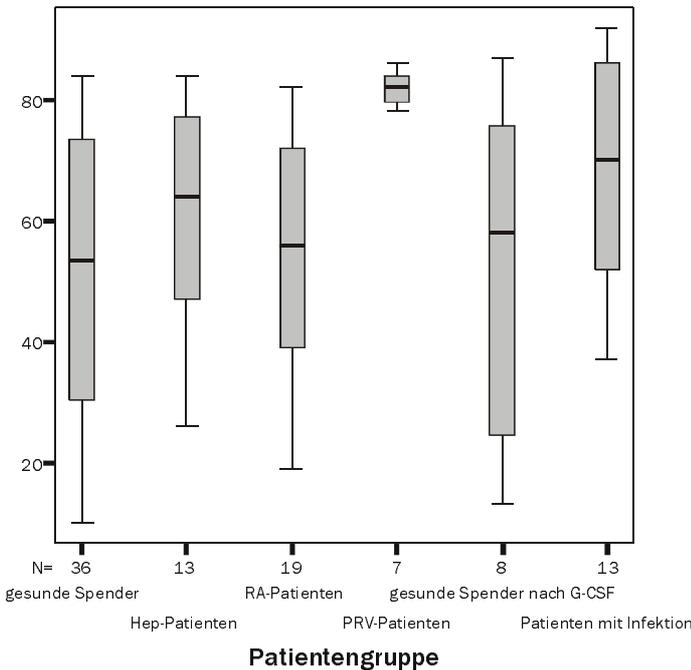


Abbildung 25: Darstellung des Anteils NB1-exprimierender Neutrophiler für gesunde Personen, Patienten mit Hepatitisinfektion, Patienten mit rheumatoider Arthritis, PV-Patienten, gesunde Spender nach Stimulation mit G-CSF und für Patienten mit schwerer Infektion in Form eines Boxplots mit Angabe des Medians, des Interquartilbereichs sowie des kleinsten und größten gemessenen Werts. Man erkennt, daß der Anteil der NB1-positiven Neutrophilen bei Patienten mit PV und bei Patienten mit schwerer bakterieller Infektion erhöht ist im Vergleich zu gesunden Personen.

3.2 Expression des Fcγ-Rezeptors IIIb (CD16) auf Neutrophilen

3.2.1 Gesunde Personen

Bei gesunden Personen werden im Mittel 178.113 ± 57.198 FcγRIIIb pro Neutrophilem gemessen mit einem Minimalwert von 47.121 und einem Maximalwert von 319.710 (Tabelle 7, Tabelle 17).

Die graphische Darstellung der einzelnen Werte in einem Histogramm zeigt annähernd eine Normalverteilung mit einem Maximum bei 150.000 – 200.000 FcγRIIIb (12 bzw. 37,5% der gesunden Personen). Mit jeweils 7 bzw. 21,9% der Spender sind 100.000 – 150.000 und 200.000 – 250.000 FcγRIIIb pro Granulozyt ebenfalls sehr häufige Meßwerte. Werte über 250.000 FcγRIIIb und Werte unter 100.000 FcγRIIIb sind relativ selten (Abbildung 26).

3.2.2 Patienten mit rheumatoider Arthritis

Bei RA-Patienten werden auf den Neutrophilen im Mittel 185.690 ± 67.501 FcγRIIIb gemessen, wobei die Werte zwischen 103.465 – 322.141 FcγRIIIb liegen (Tabelle 17). Betrachtet man die Verteilung des FcγRIIIb, so zeigt sich, daß 7 bzw. 36,8% der Patienten zwischen 100.000 – 150.000 dieser Rezeptoren exprimieren. Weniger als 100.000 Rezeptoren kommen nicht vor, mehr als 300.000 werden nur bei einer Person nachgewiesen (Abbildung 26).

Die Anzahl der FcγRIIIb auf Neutrophilen von RA-Patienten unterscheidet sich nicht signifikant von der Anzahl bei gesunden Personen (Abbildung 27).

Gruppe	N	Mittelwert ± Standard- abweichung	95% Konfidenzintervall d. Mittelwerts		Median	Minimum	Maximum
			Untergrenze	Obergrenze			
gesunde Spender	32	178.113 ± 57.198	161.593	202.774	176.580	47.121	319.710
RA-Patienten	19	185.690 ± 67.501	15.4246	219.455	169.489	103.465	322.141
PRV-Patienten	7	95.080 ± 32.183	65.316	124.845	104.256	27.814	126.817
Gesunde nach G-CSF-Stimulation	11	68.292 ± 52.516	38.308	73.682	60.345	10.354	100.828
Patienten mit bakt. Infektion	15	107.068 ± 76.957	67.652	161.108	87.984	14.968	293.238

Tabelle 17: Auflistung der Ergebnisse für die Expression des FcγRIIIb bei gesunden Spendern, RA-Patienten, gesunden Spendern nach Stimulation mit G-CSF und Patienten mit schwerer bakterieller Infektion. Angegeben sind der Mittelwert mit Standardabweichung, das 95%-Konfidenzintervall des Mittelwerts, der Median, das Minimum und das Maximum der Werte.

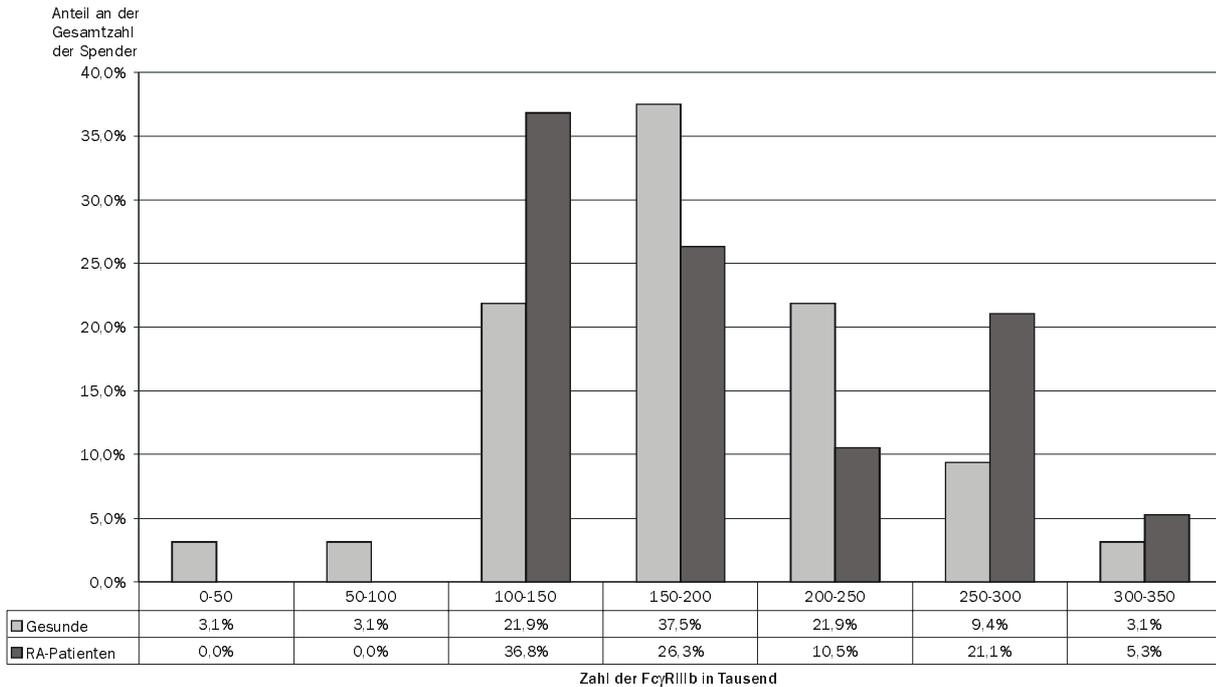


Abbildung 26: In dem Diagramm sind zur Darstellung der Verteilung des FcγRIIIb die Werte für die Zahl der FcγRIIIb in einer Einteilung zu sieben Klassen einer Breite von je 50.000 Rezeptoren gegen den prozentualen Anteil der Personen aufgetragen. Aufgenommen sind die gemessenen Werte bei gesunden Personen und bei Patienten mit rheumatoider Arthritis. Die Verteilung der Meßwerte ist für beide Gruppen ähnlich. Bei gesunden Personen werden Werte von 150.000 – 200.000 und bei RA-Patienten Werte von 100.000 – 150.000 FcγRIIIb pro Neutrophilem bevorzugt.

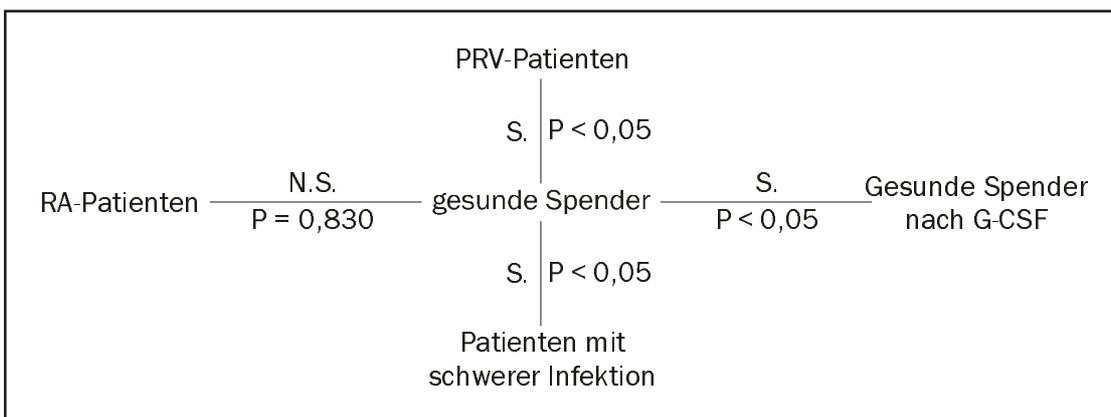


Abbildung 27: Darstellung der Ergebnisse der statistischen Testung (Mann-Whitney-Test) für die Zahl der Fcγ. Bei RA-Patienten besteht im Vergleich mit gesunden Spendern kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der FcγRIIIb pro Neutrophilem. Die Zahl der FcγRIIIb ist bei PV-Patienten, Patienten mit schwerer bakterieller Infektion und gesunden Spendern nach Stimulation mit G-CSF und signifikant niedriger als bei gesunden Personen ($p < 0,05$).

3.2.3 Patienten mit Polyzythämia vera

Bei PV-Patienten beträgt die mittlere Expression des FcγRIIIb pro Neutrophilem durchschnittlich 95.080 ± 32.183 mit einem Minimum von 27.814 und einem Maximum von 126.817 Rezeptoren, entsprechend einer Spannweite von 99.003 Rezeptoren (Tabelle 14, Tabelle 17).

Mit 5 bzw. 71,4% der Patienten ist eine Expression von 100.000 – 150.000 FcγRIIIb am häufigsten. Mehr als 150.000 FcγRIIIb pro Zelle wurden nicht gemessen (Abbildung 28).

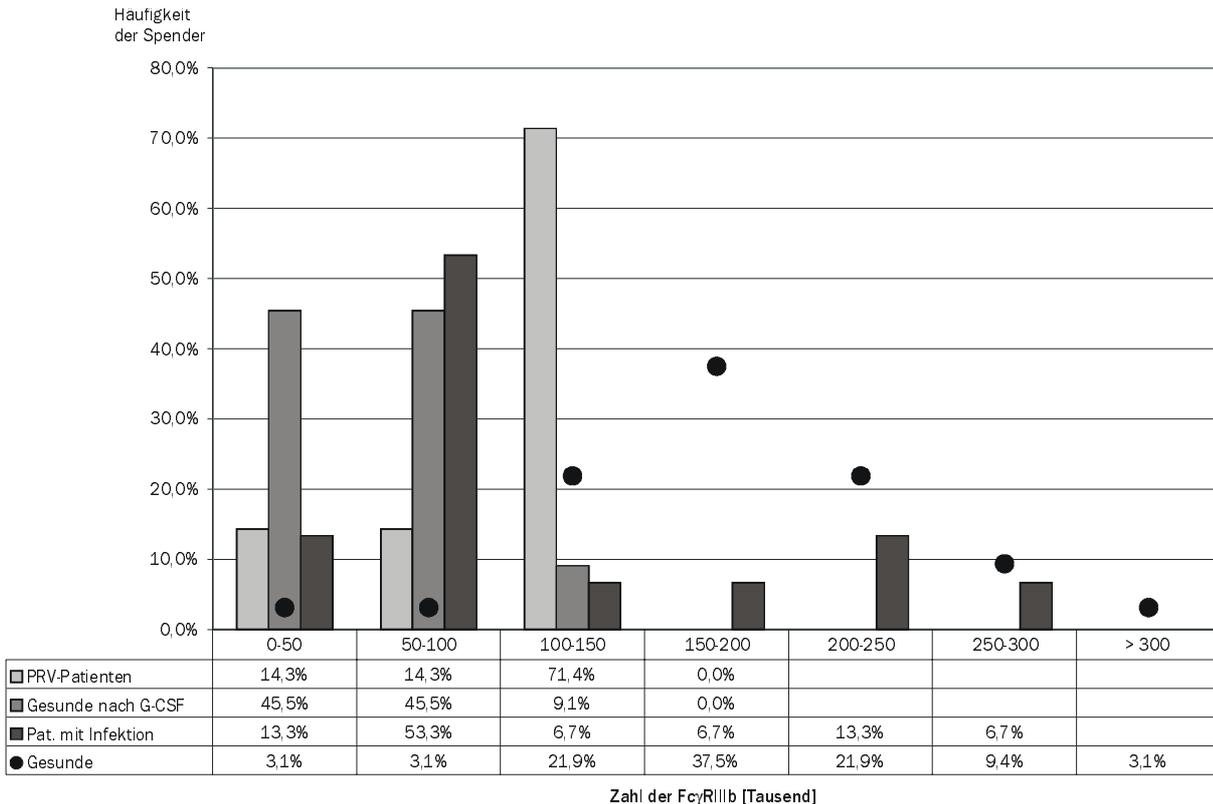


Abbildung 28: Die Zahl der FcγRIIIb pro Neutrophilem, eingeteilt in sieben Klassen, ist gegen den prozentualen Anteil der Personen einer Gruppe aufgetragen. Dargestellt ist die Verteilung der Zahl der FcγRIIIb bei PV-Patienten, Patienten mit schwerer bakterieller Infektion, gesunden Spendern nach Gabe von G-CSF und bei gesunden Personen. Die Anzahl der FcγRIIIb ist bei PV-Patienten sowie bei gesunden Personen nach Applikation von G-CSF und bei Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen niedriger als bei gesunden Personen.

Die statistische Testung zum Vergleich der Rezeptorenzahl bei gesunden Spendern und PV-Patienten ergab mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$, daß auf Granulozyten von PV-Patienten signifikant weniger FcγRIIIb exprimiert werden (Abbildung 27).

3.2.4 Gesunde Personen nach Gabe von G-CSF

Neutrophile gesunder Spender nach Gabe von G-CSF tragen im Mittel 68.292 ± 52.516 Fc γ RIIIb auf der Zellmembran. Der kleinste gemessene Wert sind 10.354, der höchste 100.828 Fc γ RIIIb pro Neutrophilem (Tabelle 15, Tabelle 17, Tabelle 18).

Betrachtet man die Verteilung der Werte, so erkennt man, daß bei 10 bzw. 91% der Spender weniger als 100.000 Fc γ RIIIb pro Neutrophilem gemessen werden. Mehr als 150.000 Fc γ RIIIb pro Granulozyt sind in dieser Stichprobe von gesunden Spendern nach Stimulation mit G-CSF nicht vorhanden (Abbildung 28).

Der statistische Test zum Vergleich der Zahl der Fc γ RIIIb bei gesunden Spendern mit und ohne Gabe von G-CSF zeigt, daß bei gesunden Spendern nach Stimulation mit G-CSF die Zahl der Fc γ RIIIb signifikant niedriger ist (Abbildung 27).

Beim Vergleich der Werte für die Zahl des Fc γ RIIIb vor und nach Stimulation mit G-CSF bei sieben Spendern zeigt sich, daß die Zahl der Fc γ RIIIb nach G-CSF nur noch 18% bis 45% der Anzahl vor G-CSF-Gabe beträgt und signifikant geringer ist (Abbildung 29, Tabelle 18).

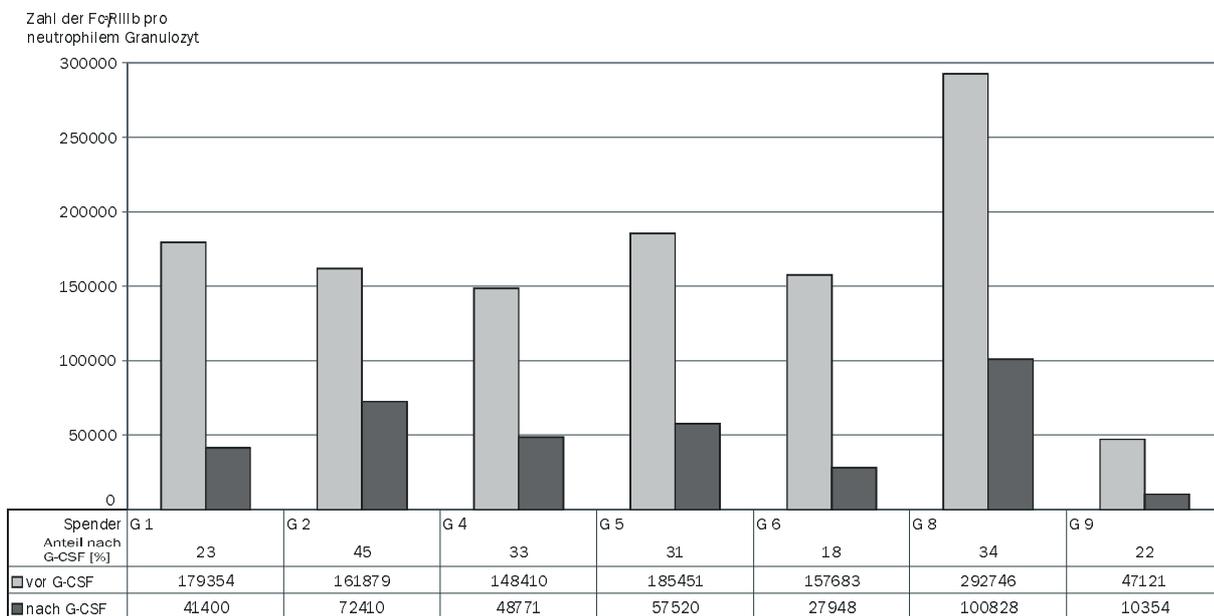


Abbildung 29: Es ist die Zahl der Fc γ RIIIb bei gesunden Spendern vor und nach Gabe von G-CSF dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die verringerte Anzahl der Fc γ RIIIb nach G-CSF, wobei gemessen an der Zahl der Fc γ RIIIb vor G-CSF-Gabe nur noch 18 bis 45% erreicht werden.

Spender	Expression des FcγRIIIb			NB1-Expression		
	vor G-CSF	nach G-CSF	Abnahme	vor G-CSF	nach G-CSF	Zunahme
G 1	179.354	41.400	0,77	2.8972	199.880	6,9
G 2	161.879	72.410	0,55	46.459	185.243	4,0
G 4	148.410	48.771	0,67	51.181	284.483	5,6
G 5	185.451	57.520	0,69	47.536	151.634	3,2
G 6	157.683	27.948	0,82	16.230	48.817	3,0
G 8	292.746	100.828	0,66	21.159	56.693	2,7

Tabelle 18: Die Anzahl der FcγRIIIb und des NB1-Glykoproteins pro Granulozyt bei gesunden Spendern vor und nach Stimulation mit G-CSF sowie die Faktoren der Zu- und Abnahme sind dargestellt.

3.2.5 Patienten mit schwerer bakterieller Infektion

Die Zahl der FcγRIIIb bei Patienten mit bakterieller Infektion beträgt im Mittel 107.068 ± 76.957 mit einem Minimum von 14.968 und einem Maximum von 293.238 Rezeptoren pro Neutrophilem (Tabelle 16, Tabelle 17). Die Verteilung der Anzahl FcγRIIIb läßt eine deutliche Bevorzugung von Werten zwischen 50.000 – 100.000 Rezeptoren pro Neutrophilem erkennen (8 bzw. 53,3% der Patienten; Abbildung 28).

Bei Patienten mit bakterieller Infektion werden signifikant weniger FcγRIIIb auf Neutrophilen nachgewiesen als bei gesunden Personen ($p < 0,05$; Abbildung 27).

Bei $n = 4$ Patienten (I1, I3, I4, I12) zeigt sich bei mehrmaliger Messung der FcγRIIIb-Expression eine Zunahme der Rezeptoren bei gleichzeitiger klinischer Besserung des Gesundheitszustands. Bei $n = 3$ Patienten steht dies in Zusammenhang mit einem verringerten CRP-Wert (Abbildung 30, Tabelle 16).

3.3 Expression des NB1-Glykoproteins und des FcγRIIIb bei gesunden Spendern nach Gabe von G-CSF und bei Patienten mit schwerer bakterieller Infektion

Beim Vergleich der Zahl der FcγRIIIb und der NB1-Glykoproteine pro Neutrophilem bei Patienten mit schwerer bakterieller Infektion und bei gesunden Spendern nach Applikation von G-CSF fällt auf, daß die Zahl der NB1-Glykoproteine während der Stimulation bzw. während der Krankheit stark erhöht ist; die Zahl der FcγRIIIb ist jedoch zum selben Zeitpunkt wesentlich geringer als in Abwesenheit dieser Faktoren. Bei drei von vier Patienten mit schwerer Infektion zeigt sich ein Rückgang der NB1-Expression mit einer gleichzeitigen Zunahme der Expression des FcγRIIIb. Gleichzeitig ist ein Rückgang des CRP um 71,5% -

96,6% zu verzeichnen. Nur bei einem Patienten wird eine deutliche Zunahme der NB1-Expression (Faktor 1,8) und eine vermehrte Expression des FcγRIIIb (Faktor 1,2) sowie ein gleichzeitiger CRP-Anstieg registriert (Tabelle 9, Abbildung 30).

Bei gesunden Spendern nach Stimulation mit G-CSF läßt sich diese Beobachtung eindeutig belegen: die Zahl der NB1-GP steigt unter dem Einfluß von G-CSF um den Faktor 2,7 bis 6,9, gleichzeitig nimmt die Expression des FcγRIIIb um den Faktor 0,55 bis 0,82 ab. Das Streudiagramm liefert einen linearen Zusammenhang zwischen beiden Variablen. Der Korrelationskoeffizient (Kendall-Tau-Test, $\rho = -0,576$) zeigt einen signifikanten negativen Zusammenhang zwischen der NB1- und der FcγRIIIb-Expression bei gesunden Personen vor und nach Gabe von G-CSF (Tabelle 18).

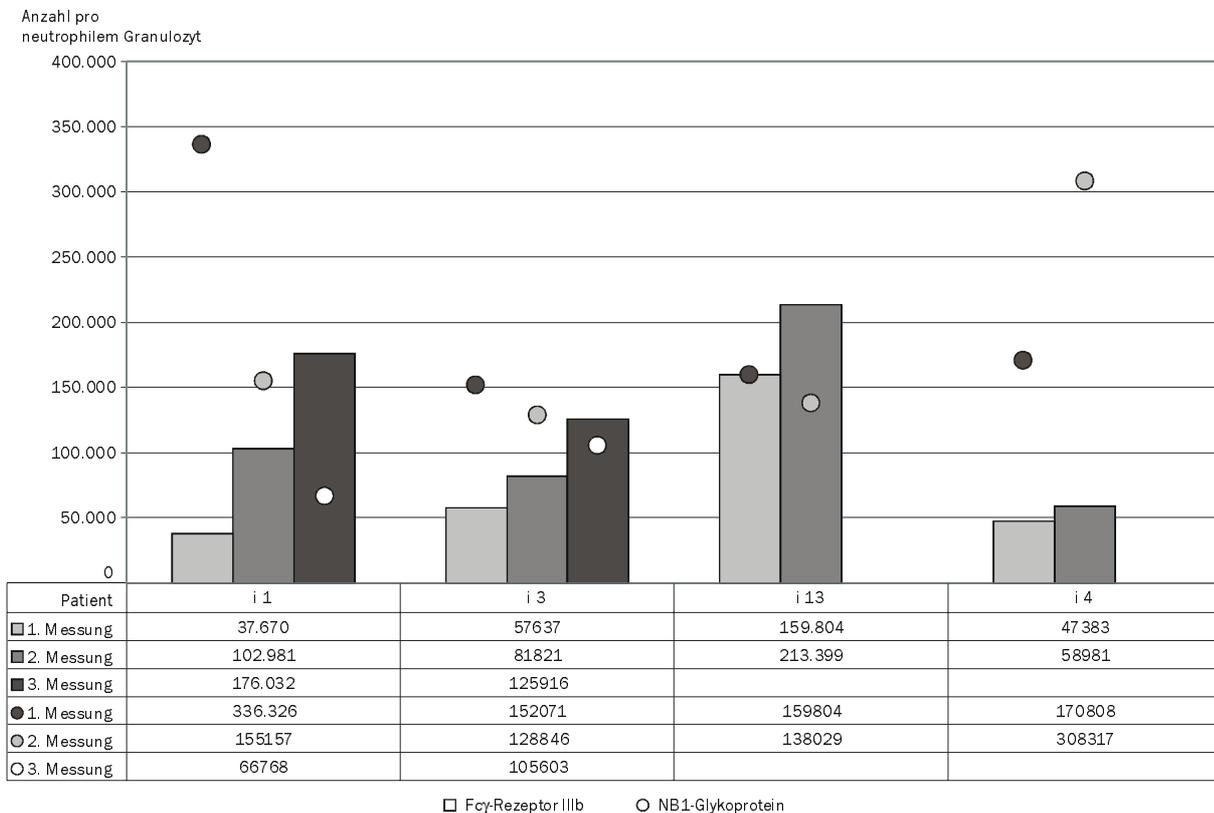


Abbildung 30: Für vier Patienten mit schwerer bakterieller Infektion ist die Zahl der NB1-GP (Punkte) und die Zahl der FcγRIIIb (Säulen) für die einzelnen Meßzeitpunkte dargestellt. Man erkennt bei 3 Patienten mit dem Rückgang der Zahl der NB1-Glykoproteine gleichzeitig eine Zunahme der FcγRIIIb-Expression.

3.4 Expression weiterer Antigene auf Neutrophilen

3.4.1 Fcγ-Rezeptor I (CD64)

Der FcγRI wird auf Neutrophilen gesunder Personen nur in geringer Zahl exprimiert. Bei RA-Patienten, Patienten mit schwerer bakterieller Infektion sowie bei gesunden Personen nach G-CSF ist die Expression des FcγRI signifikant höher als bei gesunden Personen (Tabelle 19; Abbildung 31; Abbildung 32).

Gruppe	n	Mittelwert ± Standard- abweichung	95% Konfidenzintervall d. Mittelwerts		Median	Minimum	Maximum
			Untergrenze	Obergrenze			
gesunde Spender	27	237 ± 251	138	336	197	0	1.000
RA-Patienten	19	816 ± 919	373	1.259	352	0	2.811
PV-Patienten	7	810 ± 1434	0	2.137	0	0	3.636
Gesunde nach G-CSF-Stimulation	10	1.561 ± 1.288	639	2.482	1.671	0	3.256
Patienten mit bakt. Infektion	15	3.580 ± 1.678	2.650	4.509	3.308	1.190	7.434

Tabelle 19: Aufgenommen sind der Mittelwert mit Standardabweichung, das 95%-Konfidenzintervall des Mittelwerts, der Median, der kleinste und der größte gemessene Wert für den FcγRI bei gesunden Personen, RA-Patienten, PV-Patienten, gesunden Spendern nach Stimulation mit G-CSF und Patienten mit schwerer bakterieller Infektion. Deutlich erkennt man die erhöhte Anzahl der FcγRI bei G-CSF-Stimulation und bei bakteriellen Infektionen.

Zahl der FcγRI
pro Zelle

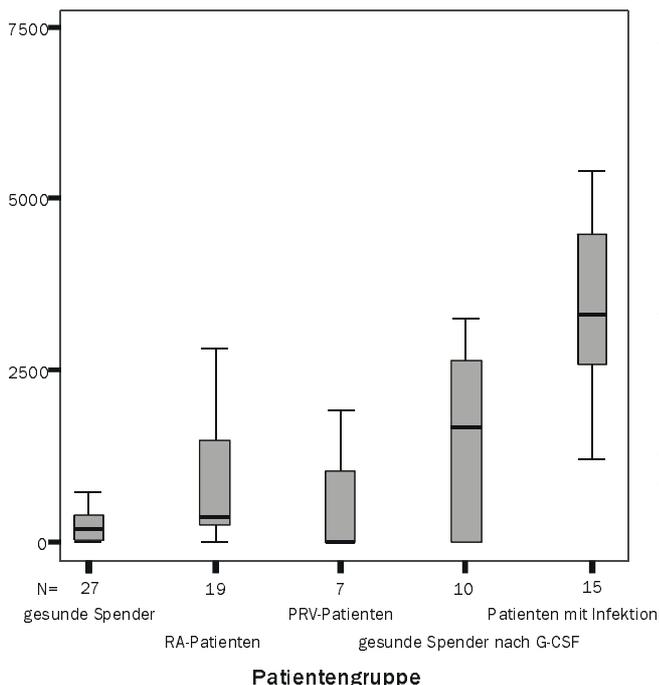


Abbildung 31: Für die Zahl der FcγRI bei gesunden Personen, Patienten mit rheumatoider Arthritis, PRV-Patienten, gesunden Spendern nach Stimulation mit G-CSF und Patienten mit schwerer Infektion sind der Median, der Interquartilbereich, das Minimum und das Maximum der gemessenen Werte dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die geringe Expression bei gesunden Spendern sowie die im Vergleich zu gesunden Spendern erhöhte Expression bei Patienten mit rheumatoider Arthritis und gesunden Spendern nach G-CSF. Man sieht, daß die Zahl der FcγRI bei Patienten mit schwerer Infektion im Vergleich zu gesunden Spendern, aber auch im Vergleich zu den übrigen Gruppen, stark erhöht ist.

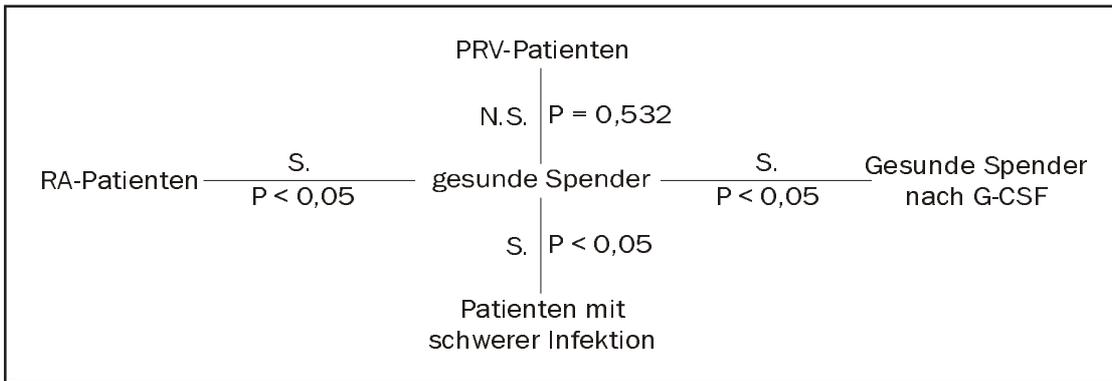


Abbildung 32: Darstellung der Ergebnisse des Man-Whitney-Tests. Die Zahl der $Fc\gamma RI$ pro Neutrophilem ist bei RA-Patienten, gesunden Spendern nach Gabe von G-CSF und bei Patienten mit schwerer bakterieller Infektion im Vergleich zu gesunden Spendern signifikant höher. Keine signifikant höheren Werte wurden für PV-Patienten gemessen.

3.4.2 $Fc\gamma$ -Rezeptor II (CD32)

Gruppe	n	Mittelwert ± Standard- abweichung	95% Konfidenzintervall d. Mittelwerts		Median	Minimum	Maximum
			Untergrenze	Obergrenze			
gesunde Spender	26	20.187 ± 7.487	17.164	23.211	17.290	10.037	43.553
RA-Patienten	11	24.302 ± 3.775	21.766	26.838	24.712	16.304	30.520
PV-Patienten	3	27.449 ± 17.484	0	70.881	35.656	7.371	39.319
Gesunde nach G-CSF-Stimulation	9	25.637 ± 8.258	19.289	31.985	23.631	14.292	41.997
Patienten mit bakt. Infektion	13	26.047 ± 10.063	19.966	32.128	22.329	15.129	46.231

Tabelle 20: In der Tabelle sind der Mittelwert mit Standardabweichung, das 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts, der Median sowie Minimum und Maximum der Meßwerte für den $Fc\gamma RII$ bei gesunden Spendern, Patienten mit rheumatoider Arthritis, PRV-Patienten, gesunden Spendern nach Stimulation mit G-CSF und Patienten mit schwerer Infektion eingetragen.

Bei RA-Patienten ergab die statistische Testung mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$, daß die Zahl der $Fc\gamma RII$ im Vergleich zu gesunden Spendern erhöht ist. Eine erhöhte Zahl an $Fc\gamma RII$ ist bei gesunden Spendern nach Gabe von G-CSF und bei Patienten mit schwerer bakterieller Infektion statistisch wahrscheinlich ($p = 0,073$ bzw. $p = 0,066$, Abbildung 33).

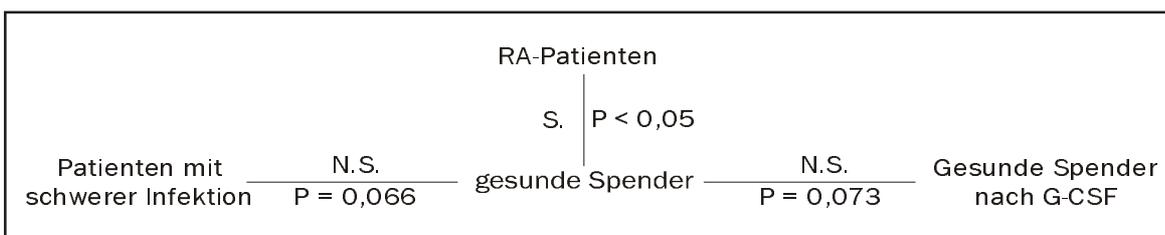


Abbildung 33: Darstellung der Ergebnisse der statistischen Testung (Mann-Whitney-Test) für die Expression des $Fc\gamma RII$ auf Neutrophilen bei Gesunden, Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen und RA-Patienten.

3.4.3 CD11b (CR3, MAC-1)

Gruppe	n	Mittelwert ± Standard- abweichung	95% Konfidenzintervall d. Mittelwerts		Median	Minimum	Maximum
			Untergrenze	Obergrenze			
gesunde Spender	28	37.576 ± 18.511	30.398	44.754	32.159	15.015	103.843
PV-Patienten	7	38.853 ± 20.047	20.313	57.394	36.371	23.360	81.662
Gesunde nach G-CSF-Stimulation	10	57.848 ± 30.034	36.363	79.332	42.097	30.322	102.591
Patienten mit bakt. Infektion	13	37.490 ± 16.231	27.681	47.298	42.352	15.774	67.247

Tabelle 21: Die Tabelle gibt eine Übersicht über die Zahl der CD11b-Antigene bei gesunden Spendern, PV-Patienten, gesunden Spendern nach Gabe von G-CSF und Patienten mit schwerer bakterieller Infektion. Angegeben sind jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung, das 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts, der Median, der kleinste und der größte gemessene Wert. Zu beachten ist, daß der Mittelwert bei gesunden Spendern nach Stimulation mit G-CSF wesentlich höher ist als bei den anderen Gruppen.

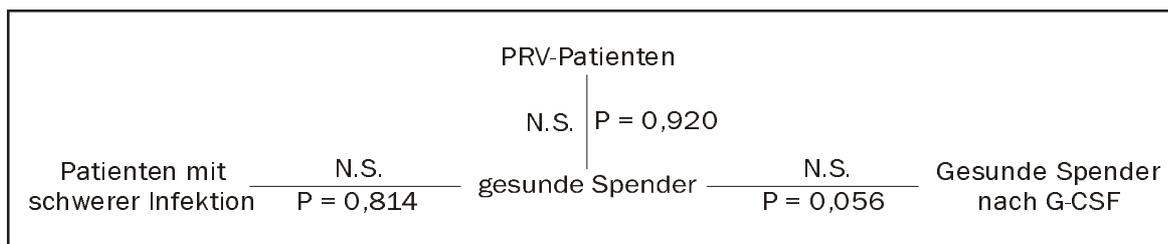


Abbildung 34: Die Verwendung des Mann-Whitney-Tests zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied für die Zahl der CD11b-Antigene pro Neutrophilem bei PV-Patienten, Patienten mit schwerer bakterieller Infektion und gesunden Spendern nach Gabe von G-CSF im Vergleich zu gesunden Personen. Bei gesunden Spendern nach G-CSF-Applikation ist eine erhöhte Expression wahrscheinlich.

3.4.4 CD18

Gruppe	n	Mittelwert ± Standard- abweichung	95% Konfidenzintervall d. Mittelwerts		Median	Minimum	Maximum
			Untergrenze	Obergrenze			
gesunde Spender	29	29.371 ± 10.988	25.191	35.551	29.252	11.608	65.146
PV-Patienten	7	25.178 ± 9.231	16.641	33.715	21.208	16.886	41.105
Gesunde nach G-CSF-Stimulation	10	37.535 ± 14.658	27.049	48.020	36.163	20.581	61.329
Patienten mit bakt. Infektion	11	30.082 ± 15.334	21.228	38.936	27.423	6.683	69.523

Tabelle 22: Es sind für gesunde Personen, PV-Patienten, gesunde Spender nach Stimulation mit G-CSF und Patienten mit schwerer bakterieller Infektion für die mittlere Antigendichte von CD18 auf Neutrophilen der Mittelwert mit Standardabweichung, das 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts, der Median sowie das Minimum und das Maximum angegeben. Die Werte bei mit G-CSF stimulierten gesunden Spendern sind leicht erhöht.

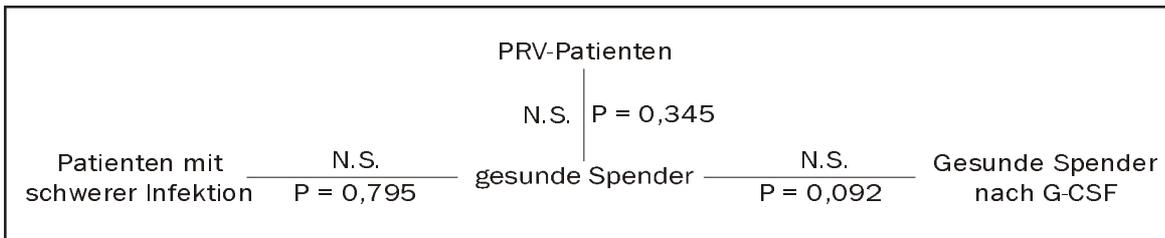


Abbildung 35: Darstellung der Ergebnisse der statistischen Testung (Mann-Whitney-Test). Die Zahl der CD18-Antigene pro Neutrophilem unterscheidet sich bei keiner Patientengruppe signifikant von gesunden Spendern.

3.4.5 CD14

Gruppe	n	Mittelwert ± Standard- abweichung	95% Konfidenzintervall d. Mittelwerts		Median	Minimum	Maximum
			Untergrenze	Obergrenze			
gesunde Spender	26	1.800 ± 1.075	1.366	2.234	1.698	0	3.987
RA-Patienten	11	1.912 ± 639	1.483	2.341	1.912	892	2.771
PV-Patienten	2	4.941				3.148	6.733
Gesunde nach G-CSF-Stimulation	8	8.240 ± 2.494	6.154	10.325	8.352	4.578	10.992
Patienten mit bakt. Infektion	11	4.363 ± 5.308	7.97	7.928	2.394	0	17.855

Tabelle 23: Aufgelistet sind für die mittlere Expression von CD14 der Mittelwert mit Standardabweichung, das 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts, der Median, der kleinste und der größte gemessene Wert jeweils für gesunde Spender, RA-Patienten, PV-Patienten, gesunde Spender nach Gabe von G-CSF und Patienten mit schwerer bakterieller Infektion. Auffällig sind die im Vergleich zu gesunden Spendern erhöhten Werte bei RA-Patienten, gesunden Spendern nach G-CSF-Stimulation und Patienten mit schwerer bakterieller Infektion.

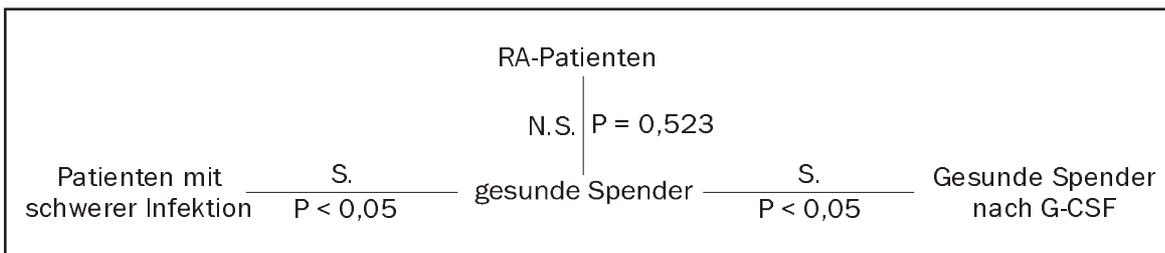


Abbildung 36: Der Mann-Whitney Test zum Vergleich der Zahl der CD14-Antigene pro Neutrophilem bei gesunden Personen, gesunden Personen nach Stimulation mit G-CSF und Patienten mit schwerer bakterieller Infektion liefert als Ergebnis eine signifikant höhere CD14-Expression bei gesunden Spendern nach G-CSF-Stimulation und bei Patienten mit schwerer Infektion.

3.4.6 CD62L (L-Selektin)

Gruppe	n	Mittelwert ± Standard- abweichung	95% Konfidenzintervall d. Mittelwerts		Median	Minimum	Maximum
			Untergrenze	Obergrenze			
gesunde Spender	18	1.849 ± 1.224	1.240	2.458	1.454	40	4.439
PV-Patienten	3	4.459				0	10.034
Gesunde nach G-CSF-Stimulation	8	3.154 ± 1.164	2.181	4.127	3.466	1.098	4.787
Patienten mit bakt. Infektion	13	2.913 ± 3.960	520	5306	2.026	0	14.376

Tabelle 24: Es sind für die mittlere Antigendichte von CD62L auf Neutrophilen aufgeführt der Mittelwert mit Standardabweichung, das 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts, der Median, der kleinste und der größte gemessene Wert jeweils für gesunde Personen, PV-Patienten, gesunde Spender nach Applikation von G-CSF und Patienten mit schwerer bakterieller Infektion. Auffällig sind die im Vergleich zu gesunden Spendern erhöhten Werte bei PV-Patienten, gesunden Spendern nach G-CSF und Patienten mit schwerer Infektion.

Patienten mit schwerer Infektion	N.S. P = 0,890	gesunde Spender	S. P = 0,019	Gesunde Spender nach G-CSF
----------------------------------	-------------------	-----------------	-----------------	----------------------------

Abbildung 37: Darstellung der Ergebnisse des statistischen Tests (Mann-Whitney-Test). Bei Patienten mit schwerer Infektion unterscheidet sich die Zahl der CD62L pro Neutrophilem nicht von gesunden Spendern, bei Spendern nach Stimulation mit G-CSF ist sie signifikant höher.

3.4.7 HLA-Klasse I

3.4.7.1 HLA-I: β_2 -Mikroglobulin als Immunogen

Gruppe	n	Mittelwert ± Standard- abweichung	95% Konfidenzintervall d. Mittelwerts		Median	Minimum	Maximum
			Untergrenze	Obergrenze			
gesunde Spender	37	53.040 ± 15.682	47.811	58.268	50.717	30.174	103.285
RA-Patienten	19	67.802 ± 24.645	55.923	79.680	64.040	30.644	118.560
PV-Patienten	7	44.661 ± 13.296	32.365	56.959	45.383	29.379	70.666
Gesunde nach G-CSF-Stimulation	11	42.013 ± 14.656	32.167	51.859	39.256	26.627	73.639
Patienten mit bakt. Infektion	14	82.118 ± 54.038	50.918	113.318	63.642	31.507	223.713

Tabelle 25: In der Tabelle sind für die Anzahl der HLA-Klasse I assoziierten β_2 -Mikroglobuline pro Neutrophilem bei gesunden Spendern, RA-Patienten, PV-Patienten, gesunden Spendern nach Stimulation mit G-CSF und für Patienten mit schwerer Infektion jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung, das 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts, der Median, das Minimum und das Maximum der Meßwerte aufgeführt. Auffällig ist die erhöhte Anzahl von β_2 -Mikroglobulin bei Patienten mit schwerer Infektion und bei RA-Patienten sowie die geringere Anzahl bei PV-Patienten und gesunden Spendern nach G-CSF-Gabe.

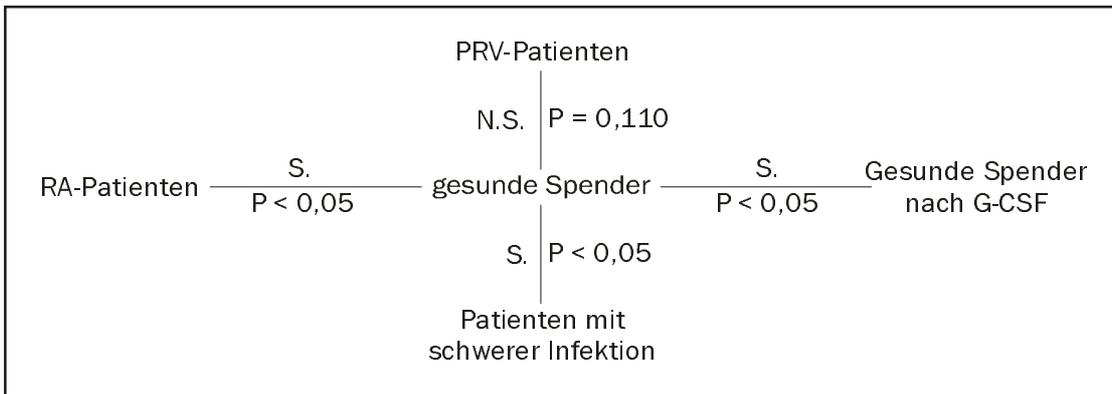


Abbildung 38: Dargestellt sind die Ergebnisse des statistischen Tests (Mann-Whitney-Test) zum Vergleich der Anzahl HLA-Klasse I assoziierter β_2 -Mikroglobulins bei verschiedenen Patientengruppen mit gesunden Spendern. Die Anzahl β_2 -Mikroglobuline ist bei PV-Patienten nicht verschieden, nach Stimulation gesunder Spender mit G-CSF niedriger und bei RA-Patienten und Patienten mit schwerer bakterieller Infektion signifikant höher. Allerdings ist bei Vergleich der Expression bei gesunden Personen vor und nach Stimulation mit G-CSF keine signifikante Veränderung der Expression des β_2 -Mikroglobulins zu sehen ($p > 0,05$).

3.4.7.2 HLA-I: Schwere Kette und β_2 -Mikroglobulin als Immunogen

Gruppe	n	Mittelwert ± Standard- abweichung	95% Konfidenzintervall d. Mittelwerts		Median	Minimum	Maximum
			Untergrenze	Obergrenze			
gesunde Spender	36	69.573 ± 18.563	63.292	75.854	65.194	42.279	125.076
PV-Patienten	7	60.966 ± 16.803	45.026	76.106	57.096	41.626	93.275
Gesunde nach G-CSF-Stimulation	11	56.366 ± 17.919	44.327	68.404	51.069	37.883	92.038
Patienten mit bakt. Infektion	15	111.313 ± 67.909	73.706	148.926	90.225	39.921	293.008

Tabelle 26: Dargestellt sind für die Zahl der HLA-Klasse I der Mittelwert mit Standardabweichung, das 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts, der Median sowie der kleinste und größte gemessene Wert bei folgenden untersuchten Gruppen: gesunde Spender, gesunde Spender nach Stimulation mit G-CSF, PV-Patienten und Patienten mit schwerer bakterieller Infektion. Bei Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen sind die Werte höher als in den anderen Gruppen.

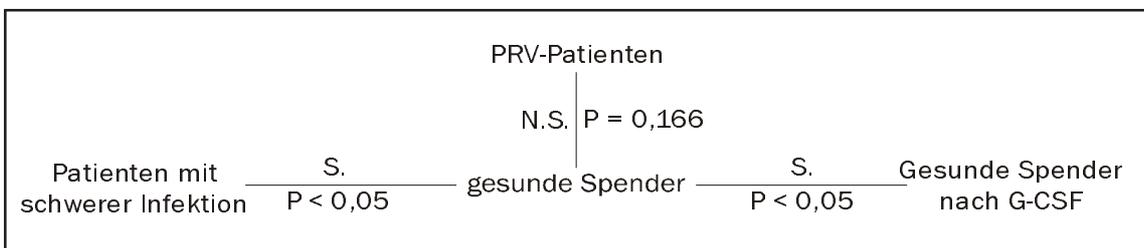


Abbildung 39: Ergebnisse des statistischen Tests (Mann-Whitney-Test): Bei gesunden Spendern nach Stimulation mit G-CSF werden –wie auch bei Verwendung des β_2 -Mikroglobulins alleine als Immunogen – signifikant weniger, bei Patienten mit schwerer Infektion signifikant mehr HLA-Klasse I exprimiert. Allerdings ergibt sich auch hier beim direkten Vergleich der Werte eines Spenders vor und nach Gabe von G-CSF keine signifikant niedrigere Zahl ($p > 0,05$).

3.5 Zahl der NB1-Glykoproteine, Anteil der NB1-exprimierenden Zellen und Zahl der Fc γ RIIIB auf Neutrophilen aus Nabelschnurblut

3.5.1 NB1-Glykoprotein

3.5.1.1 Alle Neugeborene

Betrachtet man zunächst die gesamte Gruppe der Neugeborenen, so beträgt die Zahl der durchflußzytometrisch bestimmten NB1-GP pro Neutrophilem im Mittel 109.125 ± 47.978 . Die geringste gemessene Anzahl von NB1-Glykoproteinen sind 35.734, die höchste 246.348 (Tabelle 27, Anhang 8.5).

Der Mittelwert des Anteils NB1-exprimierender Neutrophiler liegt bei $75\% \pm 15\%$, wobei in dieser Stichprobe kein Neugeborenes enthalten ist, auf dessen Neutrophilen das NB1-GP nicht nachweisbar war (Tabelle 27, Anhang 8.5).

3.5.1.2 Vergleich der NB1-GP-Expression bei weiblichen und männlichen Neugeborenen

Vergleicht man die Mittelwerte des NB1-Antigens weiblicher und männlicher Neugeborener, so fällt auf, daß auf den Granulozyten aus Nabelschnurblut weiblicher Neugeborener durchschnittlich mehr NB1-GP nachgewiesen werden konnten als bei männlichen Neugeborenen (Tabelle 27, Abbildung 40, Anhang 8.5). Bei der Gegenüberstellung des Anteils NB1-exprimierender Zellen ist der Mittelwert bei männlichen Neugeborenen mit $77\% \pm 15\%$ etwas höher als bei denen von weiblichen Neugeborenen mit $71\% \pm 15\%$. Kleinster und größter gemessener NB1-positiver Anteil sind mit 34% und 97% bei weiblichen bzw. 39% und 94% bei männlichen Neugeborenen ähnlich (Tabelle 27, Abbildung 41, Anhang 8.5).

Die statistische Testung ergab für die Zahl der NB1-Glykoproteine eine signifikant höhere Expression bei weiblichen Neugeborenen als bei männlichen ($p < 0,05$). Der prozentuale Anteil NB1-positiver Granulozyten unterscheidet sich nicht signifikant (Anhang 8.5).

Gruppe	n	Zahl der NB1-GP		%NB1+ Neutrophile		Zahl der FcγRIIb	
		Mittelwert ± Standard- abweichung	Minimum Maximum	Mittelwert ± Standard- abweichung	Minimum Maximum	Mittelwert ± Standard- abweichung	Minimum Maximum
alle Neugeborene	52	109.125 ±47.978	35.734 246.348	75 ± 15	34 97	147.288 ± 69.822	38.505 375.915
weibliche Neugeborene	23	12.7767 ± 55.029	50.786 246.348	71 ± 15	34 97	164.646 ± 77.018	38.505 332.051
männliche Neugeborene	29	94.982 ± 36.867	35.734 195.685	77 ± 15	39 95	134.120 ± 61.970	54.462 375.915
Keine „Probleme“	15	102.099 ± 43.511	35.734 222.411	67 ± 18	34 93	151.826 ± 48.630	66.954 248.224
„Probleme“ vorhanden	36	112.052 ± 50.011	46.313 246.348	77 ± 13	42 97	145.397 ± 77.498	38.505 375.915
Pathologisches CTG	27	111.401 ± 50.327	46.313 246.348	78 ± 14	42 97	154.444 ± 86.345	38.505 375.915
Vorzeitiger Blasensprung	14	142.937 ± 59.911	51.955 246.348	80 ± 12	54 97	155.656 ± 95.956	62.614 375.915
Infektion	6	78.980 ± 33.477	51.363 134.482	73 ± 20	42 90	130.082 ± 33.021	102.954 182.894
Probleme oder Erkrankungen der Mutter	8	89.338 ± 32.034	50.786 140.855	78 ± 15	58 97	105.615 ± 29.802	66.630 150.285

Tabelle 27: Dargestellt sind für den Anteil der NB1-exprimierenden Neutrophilen (%NB1+), die Zahl der NB1-Glykoproteine und der FcγRIIb pro Granulozyt bei Neugeborenen und darunter ausgewählten Gruppen der Mittelwert, Minimum und Maximum. Als „Probleme“ wurden perinatale Komplikationen und Auffälligkeiten bezeichnet.

Zahl der NB1-Glykoproteine pro neutrophilem Granulozyt

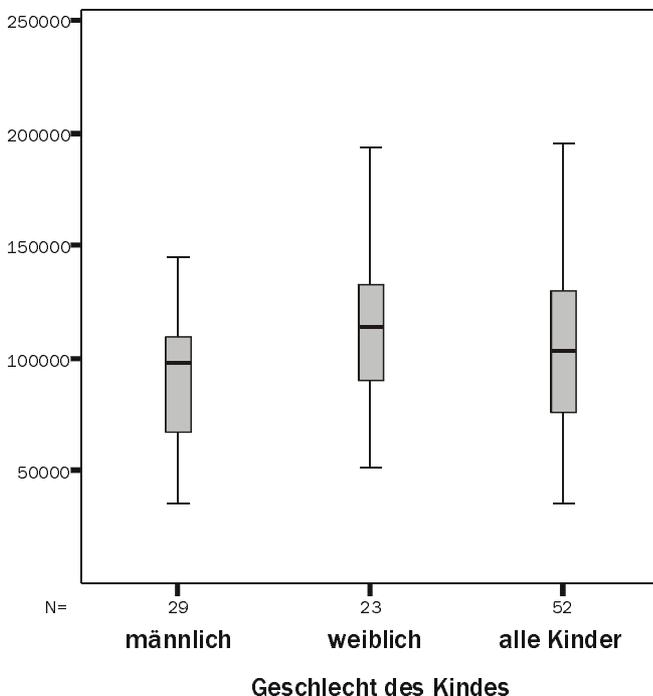


Abbildung 40: In der Boxplotdarstellung sind jeweils der Median, der Interquartilbereich, der größte und kleinste Wert für die Zahl der NB1-Glykoproteine auf Neutrophilen männlicher, weiblicher und aller Neugeborener dargestellt. Bei weiblichen Neugeborenen ist die NB1-Expression höher als bei männlichen Neugeborenen.

Anteil der NB1-positiven Granulozyten [%]

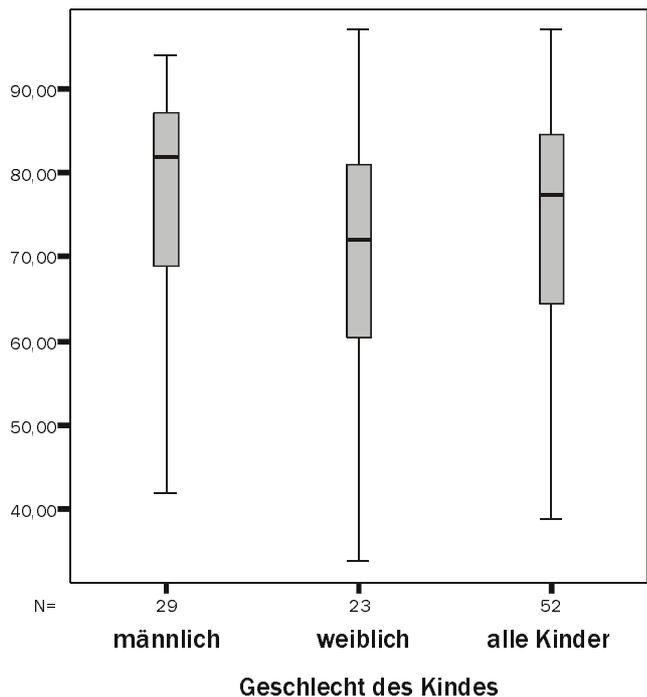


Abbildung 41: Für den prozentualen Anteil Neutrophiler, die das NB1-GP auf der Zelloberfläche tragen, ist im nebenstehenden Boxplot jeweils der Median, der Interquartilbereich, der kleinste und der größte Wert eingezeichnet. Dargestellt sind die Ergebnisse der Messungen von Neutrophilen männlicher, weiblicher und aller Neugeborener. Männliche Neugeborene scheinen einen größeren Anteil NB1-positiver Zellen zu haben als weibliche Neugeborene.

3.5.1.3 Einfluß von Komplikationen vor und während der Geburt auf die NB1-Expression

Bei der Betrachtung der Mittelwerte für NB1-Expression findet man bei unkomplizierten Geburten 102.099 ± 43.512 , bei Vorhandensein von Komplikationen 112.052 ± 50.011 und nach einem vorzeitigem Blasensprung 142.937 ± 59.911 NB1-Glykoproteine (Tabelle 27; Anhang 8.5).

Die Betrachtung der NB1-positiven Zellen zeigt einen prozentualen Anteil bei Geburten ohne Komplikationen $67\% \pm 18\%$, bei einer oder mehreren Komplikationen $77\% \pm 13\%$, bei einem vorzeitigem Blasensprung kombiniert mit einem pathologischen CTG $80\% \pm 13\%$ (Tabelle 27, Anhang 8.5).

Die statistische Testung für die NB1-Expression ergibt, daß die Zahl der NB1-GP bei Neugeborenen mit vorzeitigem Blasensprung im Vergleich zu Neugeborenen ohne Komplikation signifikant erhöht ist ($p=0,023$). Bei der Kombination eines pathologischen CTG mit einem vorzeitigem Blasensprung ist mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p=0,059$ statistisch wahrscheinlich, daß die NB1-Expression bei diesen Kindern erhöht ist. Andere Besonderheiten unter der Geburt wie ein pathologisches CTG, Amnioninfektionssyndrom oder Fehlbildungen des Kindes geben keinen Hinweis auf eine veränderte NB1-Expression. Auch Probleme und Erkrankungen der Mutter vor und während der Geburt zeigen keinen Einfluß auf die Expression des NB1-GP (Anhang 8.5).

Bei Neugeborenen mit einem pathologischen CTG ($p=0,059$) oder einem vorzeitigem Blasensprung ($p=0,07$)

ist es statistisch wahrscheinlich, daß der Anteil NB1+ Zellen höher ist als bei Neugeborenen ohne Komplikationen. Erkrankungen der Mutter, der Geburtsmodus, die Schwangerschaftswoche, der APGAR-Score 5 Minuten nach Geburt, das Geburtsgewicht und der pH-Wert des Nabelschnurbluts scheinen keinen wesentlichen Einfluß auf die Zahl der NB1-Glykoproteine pro Granulozyt oder auf den Anteil der NB1-positiven Zellen zu haben (Anhang 8.5).

Die getrennte Betrachtung von weiblichen und männlichen Neugeborenen im Hinblick auf einen Einfluß von Komplikationen wie pathologisches CTG, vorzeitiger Blasensprung, Infektionen, Erkrankungen der Mutter zeigt keinen signifikanten Unterschied in der NB1-Expression. Auch der Anteil der NB1-exprimierenden Neutrophilen ist weder bei weiblichen noch bei männlichen Neugeborenen mit Besonderheiten während der Geburt signifikant verändert im Vergleich zu Neugeborenen ohne Besonderheiten (Anhang 8.5).

3.5.1.4 Verteilung der Meßwerte für das NB1-Glykoprotein

Betrachtet man die Verteilung der NB1-Expression, so fällt auf, daß sich ein Maximum im Bereich von 91.000 – 121.000 mit 16 bzw. 30,8% aller Einzelwerte befindet. 71,2% aller Neugeborenen tragen auf ihren Granulozyten zwischen 61.000 – 151.000 NB1-GP. Mehr als 91.000 NB1-GP werden bei 63,6% der Neugeborenen exprimiert (Abbildung 42).

Bei männlichen Neugeborenen fällt eine relativ gleichmäßige Verteilung der Werte für das NB1-GP pro Zelle von 31.000 bis 150.999 auf. Die Verteilung des NB1-Glykoproteins bei weiblichen Neugeborenen weist ein deutliches Maximum in der Klasse 91.000 – 120.999 Antigenen mit 8 bzw. 33,3% auf. 5 bzw. 20,8% der weiblichen Neugeborenen weisen eine stark erhöhte Expression des NB1-Glykoproteins auf mit 181.000 – 240.999 NB1-GP pro Zelle (Abbildung 42).

Die Verteilung des Anteils der NB1+ Zellen zeigt bei allen Neugeborenen, weiblichen und männlichen Neugeborenen eine Zunahme zu einem höheren Anteil NB1+ Neutrophiler mit dem Maximum in der Klasse 81% - 100%. (Abbildung 43).

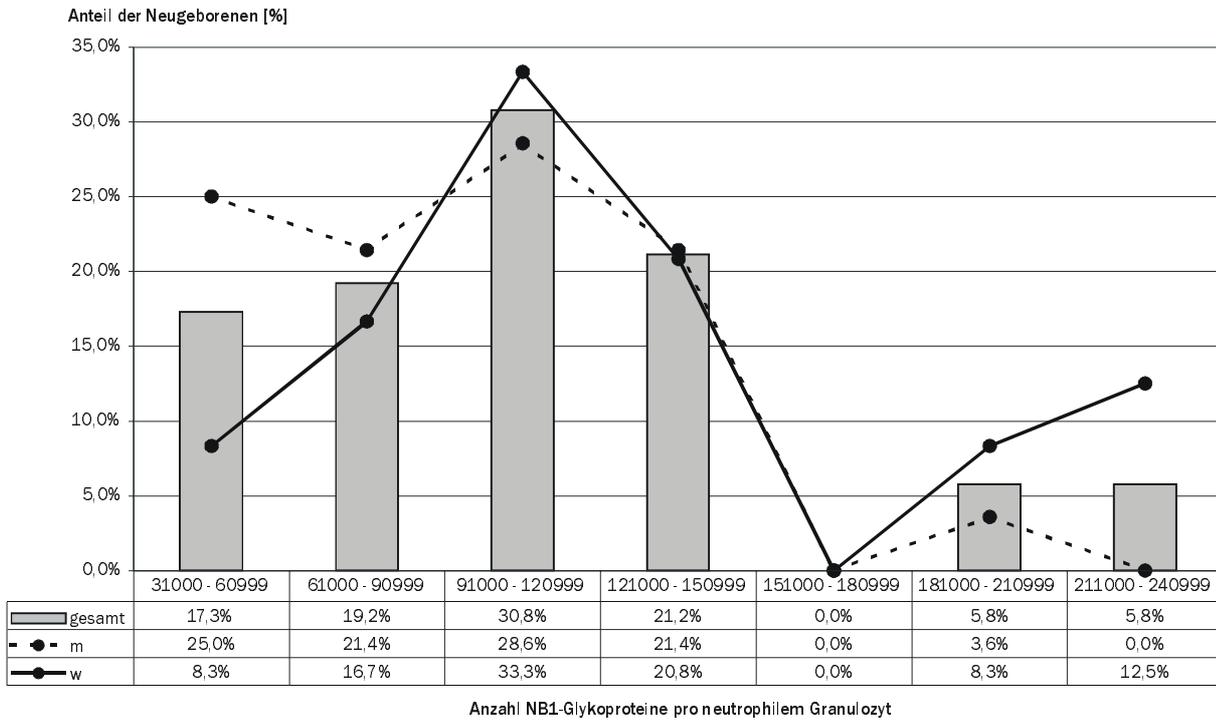


Abbildung 42: Dargestellt ist die Zahl der NB1-Glykoproteine pro Neutrophilem und der jeweilige prozentuale Anteil der Neugeborenen, unterteilt in alle Neugeborene, weibliche und männliche Neugeborene. Es wird die Klasse 91.000 - 120.999 NB1-GP von allen Gruppen bevorzugt. Der größte Anteil der Neugeborenen exprimiert 61.000 - 150.999 NB1-GP auf der Granulozytenmembran.

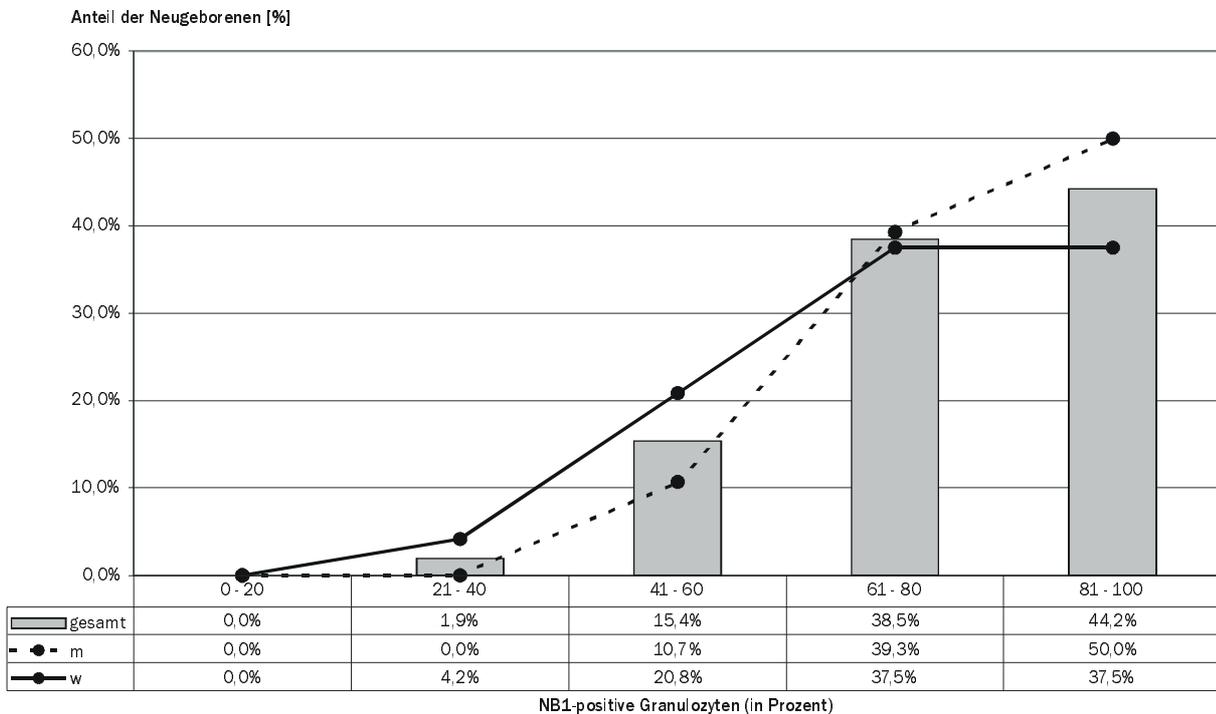


Abbildung 43: Der prozentuale Anteil NB1-positiver Granulozyten ist für alle Neugeborenen, weibliche und männliche Neugeborene dargestellt. Bei allen drei Gruppen ist der Anteil NB1-positiver Granulozyten hoch.

3.5.1.5 Vergleich der NB1-Expression von Neutrophilen aus Nabelschnurblut und von Erwachsenen

Sowohl die Zahl der NB1-GP pro Neutrophilem als auch der Anteil NB1-positiver Zellen ist bei Neugeborenen signifikant höher als bei gesunden Erwachsenen (Tabelle 28, Abbildung 44, Abbildung 45, Abbildung 46).

Betrachtet man die NB1-Expression Neugeborener ohne Komplikationen während der Geburt und vergleicht mit der Expression, die Neutrophile gesunder erwachsener Spender nach Stimulation mit G-CSF haben, so zeigt sich, daß Neugeborene zwar eine höhere Expression als gesunde Erwachsene, aber eine niedrigere als gesunde Erwachsene nach Stimulation mit G-CSF haben ($p < 0,05$). Beim Vergleich von Werten für das NB1-Glykoprotein von Neugeborenen mit vorzeitigem Blasensprung vor der Geburt und von Erwachsenen mit schwerer Infektion kann man feststellen, daß sich die Werte wenig unterscheiden ($p = 0,821$), (Tabelle 28; Abbildung 45).

Gruppe	n	Zahl der NB1-GP		%NB1+ Neutrophile		Zahl der FcγRIIIb	
		Mittelwert ± Standard- abweichung	Minimum Maximum	Mittelwert ± Standard- abweichun- g	Minimum Maximum	Mittelwert ± Standard- abweichun- g	Minimum Maximum
Neugeborene	52	109.125 ±47.978	35.734 246.348	75 ± 15	34 97	147.288 ± 69.822	38.505 375.915
weibliche Neugeborene	23	127.767 ± 55.029	50.786 246.348	71 ± 15	34 97	164.646 ± 77.018	38.505 332.051
männliche Neugeborene	29	94.982 ± 36.867	35.734 195.685	77 ± 15	39 95	134.120 ± 61.970	54.462 375.915
Neugeborene ohne Komplikation	15	102.099 ± 43.511	35.734 222.411	67 ± 18	34 93	151.826 ± 48.630	66.954 248.224
Neugeborene mit Komplikationen	36	112.052 ± 50.011	46.313 246.348	77 ± 13	42 97	145.397 ± 77.498	38.505 375.915
Blasensprung	14	142.937 ± 59.911	51.955 246.348	80 ± 12	54 97	155.656 ± 95.956	62.614 375.915
gesunde Erwachsene	36	41.549 ± 20.573	15.423 98.004	51,7 ± 23,9	10 84	178.113 ± 57.198	47.121 319.710
gesunde Erwachsene nach G-CSF	8	172.602 ± 85.815	48.817 284.483	52,0 ± 28,3	13 87	68.292 ± 52.516	10.354 206.099
Erwachsene mit Infektion	13	157.220 ± 103.514	25.670 336.326	68,5 ± 20,8	37 92	107.068 ± 76.957	14.968 293.238

Tabelle 28: Es sind für die Zahl der NB1-GP pro Neutrophilem bei Neugeborenen und Erwachsenen jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung, das 95%-Konfidenzintervall des Mittelwerts, der Median sowie der kleinste und der größte gemessene Wert angegeben. Bei Neugeborenen ist die NB1-Expression im Vergleich zu gesunden Erwachsenen höher, im Vergleich zu gesunden Erwachsenen nach G-CSF-Stimulation und zu Patienten mit einer schweren bakteriellen Infektion niedriger.

Anteil der NB1-positiven Granulozyten [%]

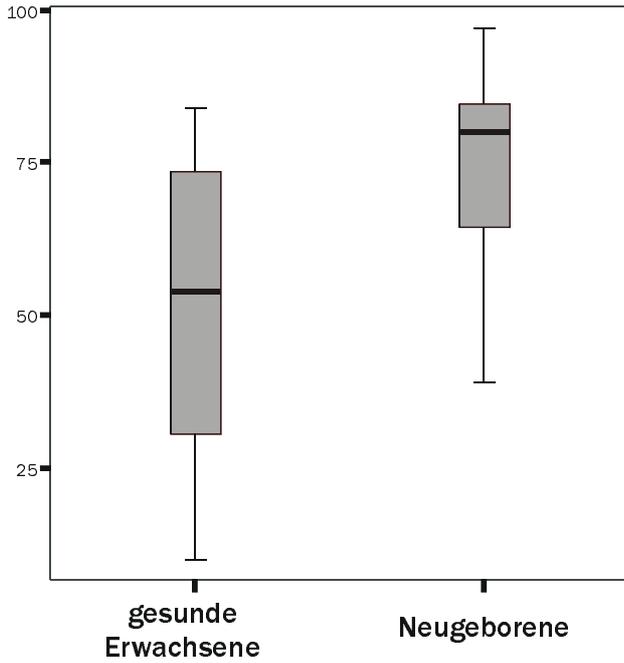


Abbildung 44: Die Boxplotdarstellung für den Anteil der NB1-positiven Neutrophilen bei gesunden Erwachsenen und bei Neugeborenen mit Angabe des Medians, des Interquartilbereichs sowie des Minimums und Maximums zeigt deutlich, daß der Anteil NB1-positiver Neutrophiler bei Neugeborenen höher ist als bei gesunden Erwachsenen. Spendern.

Zahl der NB1-Glykoproteine pro neutrophilem Granulozyt

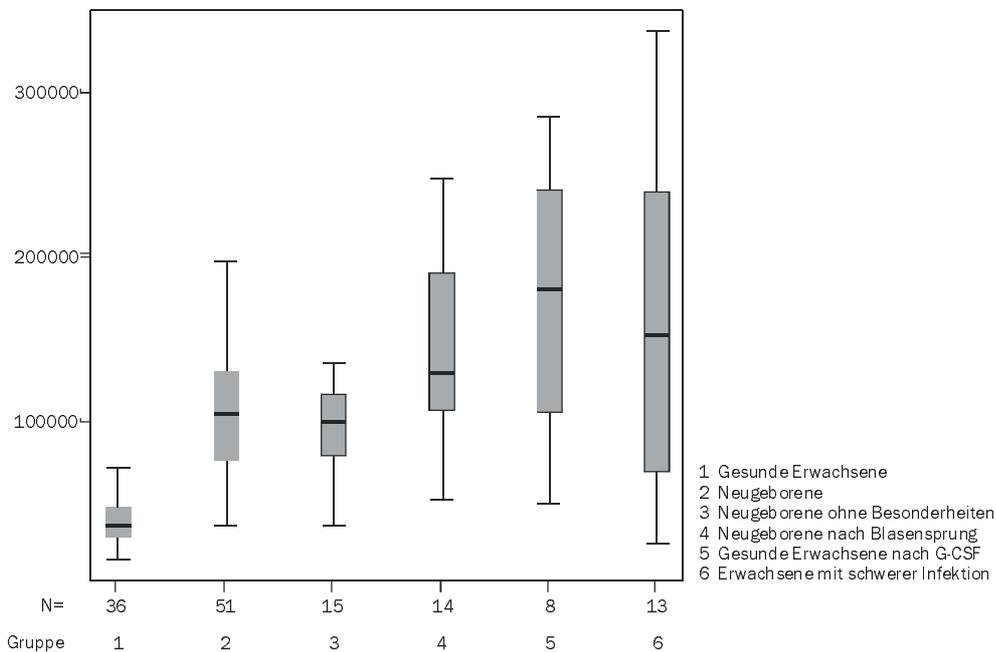


Abbildung 45: In der Boxplotdarstellung sind jeweils der Median, der Interquartilbereich, das Minimum sowie das Maximum für die Zahl der NB1-GP bei gesunden Erwachsenen, Neugeborenen, gesunden Neugeborenen, Neugeborenen nach vorzeitigem Blasensprung, gesunden Erwachsenen nach Stimulation mit G-CSF sowie bei Erwachsenen mit schwerer bakterieller Infektion eingezeichnet. Bei gesunden Erwachsenen wird wesentlich weniger NB1 exprimiert als bei Neugeborenen, jedoch ist die NB1-Expression höher bei schwer erkrankten Erwachsenen oder gesunden Erwachsenen nach G-CSF-Gabe als bei Neugeborenen.

	Zahl der NB1-Glykoproteine	Anteil der NB1-positiven Granulozyten (in Prozent)
Neugeborene	} P < 0,05	} P < 0,05
gesunde Erwachsene		
Neugeborene ohne Komplikationen	} P < 0,05	} P < 0,05

Abbildung 46: Die Verwendung des Mann-Whitney-Tests liefert einen signifikanten Unterschied in der Expression des NB1-Antigens bei gesunden Erwachsenen und Neugeborenen. Auch bei Neugeborenen ohne Komplikation während der Geburt werden signifikant mehr NB1-Glykoproteine und ein signifikant höherer Anteil NB1-positiver Neutrophiler beobachtet als bei gesunden erwachsenen Spendern.

3.5.2 Fcγ-Rezeptor IIIb

3.5.2.1 Zahl der FcγRIIIb bei Neugeborenen

Bei Neugeborenen werden im Mittel auf 147.288 FcγRIIIb pro Neutrophilem exprimiert (Tabelle 27, Anhang 8.5). Neutrophile weiblicher Neugeborener tragen im Mittel mehr FcγRIIIb (164.646 ± 77.018) als die männlicher Neugeborener (134.120 ± 61.970). Der Test auf Signifikanz ergibt mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0,078$, daß sich die Zahl der FcγRIIIb bei männlichen und weiblichen Neugeborenen nicht signifikant unterscheidet, aber wahrscheinlich ist (Abbildung 47).

	Zahl der FcγRIIIb
männliche Neugeborene	} n.s. (P = 0,078)
weibliche Neugeborene	

Abbildung 47: Der Mann-Whitney-Test auf Signifikanz liefert einen nicht signifikanten, aber wahrscheinlichen Unterschied der Zahl der FcγRIIIb auf Neutrophilen männlicher und weiblicher Neugeborener mit einer höheren Expression bei weiblichen Neugeborenen.

3.5.2.2 Einfluß von Komplikationen während der Geburt auf die Zahl der FcγRIIIb

Unter der Geburt klinisch unauffällige Neugeborene exprimieren im Mittel 151.826 ± 48.630 FcγRIIIb auf ihren Neutrophilen. Bei den vier Kindern, die nach der 41. Schwangerschaftswoche geboren wurden, ist der Mittelwert mit 217.379 ± 137.577 FcγRIIIb höher als bei Kindern, die zwischen der 38. und der 41. Woche geboren wurden. Mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0,157$ kann jedoch nicht von einem statistisch wahrscheinlichen Unterschied in der Zahl der FcγRIIIb ausgegangen werden. Auch alle anderen Besonderheiten unter der Geburt, der Geburtsmodus, die Schwangerschaftswoche, der pH-Wert des Nabelschnurbluts und der Apgar-Wert 5 Minuten nach der Geburt zeigen keinen Einfluß auf die Expression des FcγRIIIb auf der Granulozytenmembran (Anhang 8.5, Tabelle 27, Tabelle 28).

3.5.2.3 Vergleich der FcγRIIIb-Expression auf Neutrophilen Erwachsener und Neugeborener

Beim Vergleich der Zahl der FcγRIIIb bei gesunden Erwachsenen und bei Neugeborenen zeigt sich, daß die Anzahl der FcγRIIIb auf Neutrophilen Neugeborener signifikant geringer ist als auf Neutrophilen Erwachsener (Abbildung 48).

Bei Neutrophilen Neugeborener mit einem vorausgegangenem vorzeitigem Blasensprung ist die Anzahl der FcγRIIIb mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ signifikant erniedrigt im Vergleich zu gesunden Erwachsenen. Auch bei Neugeborenen mit einem pathologischen CTG ist die Zahl der FcγRIIIb mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ geringer als bei Erwachsenen (Abbildung 48).

Neutrophile erwachsener Spender nach Gabe von G-CSF oder bei schweren bakteriellen Infektionen exprimieren wesentlich weniger FcγRIIIb als Neutrophile Neugeborener ($p < 0,05$).

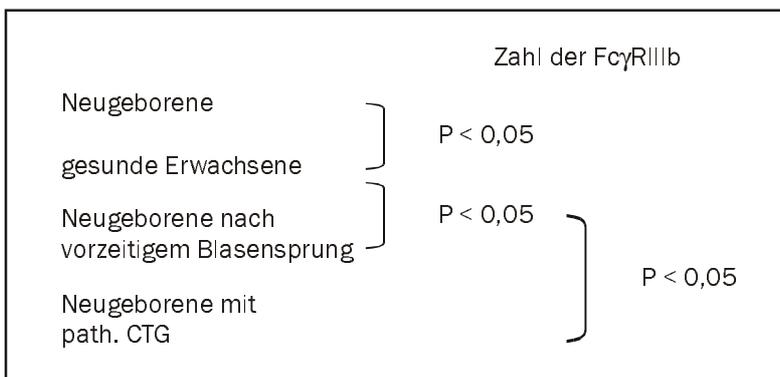


Abbildung 48: Der Signifikanztest (Mann-Whitney-Test) liefert einen signifikanten Unterschied in der Zahl der FcγRIIIb auf der Granulozytenoberfläche bei Erwachsenen und Neugeborenen. Neugeborene exprimieren signifikant weniger FcγRIIIb als gesunde erwachsene Spender, unabhängig davon, ob ein vorzeitiger Blasensprung oder ein pathologisches CTG vorausgegangen ist.

3.6 Bestimmung des G-CSF-Spiegels

Der G-CSF-Spiegel im Plasma wurde bei einigen zufällig ausgewählten Personen jeder Patientengruppe bestimmt.

Bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis B oder C sind die G-CSF-Spiegel erhöht. Auch bei Patienten mit schwerer bakterieller Infektion und bei gesunden Spendern nach Gabe von G-CSF werden erhöhte G-CSF-Spiegel gemessen. Im Normbereich war der G-CSF-Spiegel bei RA-Patienten. Niedrigere G-CSF-Spiegel als bei gesunden Personen wurden bei PV-Patienten gemessen. Die Meßwerte sind jeweils in den Tabellen zur NB1-Expression bei den einzelnen Patientengruppen aufgeführt.

4 Diskussion

4.1 Expression des NB1-Glykoproteins

4.1.1 Gesunde Personen

Es wurde die NB1-Expression pro Neutrophilem und der Anteil NB1 exprimierender Zellen bestimmt. Neutrophile gesunder Personen dienten als Vergleichsgruppe, um Veränderungen der NB1-Expression unter verschiedenen Bedingungen wie Sepsis, PV, Hepatitis, rheumatoider Arthritis und unter G-CSF-Stimulation festzustellen.

Neutrophile von 94,7% der untersuchten gesunden Personen exprimieren NB1. In der Literatur wird die Antigenfrequenz von NB1 mit 87-100% bei gesunden Individuen verschiedener Bevölkerungsgruppen angegeben [Lin et al. 1994; Bux 2000a; Matsuo et al. 2000; Stroncek 2002a]. Die hier untersuchte Stichprobe kann daher als repräsentativer Teil der Grundgesamtheit NB1-exprimierender Bevölkerungsgruppen angesehen werden.

Es zeigt sich eine große interindividuelle Variabilität des Anteils NB1+ Zellen (0-86%) mit einem Mittelwert von 50% sowie eine zweigipflige Verteilung mit einem Verteilungsmaximum bei 20-40% und 60-80%. Diese Verteilung entspricht im wesentlichen den bisher publizierten Werten zum Anteil NB1+ Neutrophiler [Goldschmeding et al. 1992; Stroncek et al. 1994b; Matsuo et al. 2000]. Auch die doppelgipflige Verteilung mit einer Tendenz zu sowohl kleinen Anteilen NB1+ Subpopulation (<40% NB1+ Neutrophile) als auch zu großen (>60% NB1+ Neutrophile) wurde beschrieben [Goldschmeding et al. 1992; Wolff et al. 2003]. Die von Matsuo et al. [2000] beschriebene „atypische Reaktion“ bei ca. 8-11% gesunder Personen mit zwei NB1-exprimierenden Neutrophilenpopulationen wird ebenfalls bei zwei Personen (5%) beobachtet.

Matsuo et al. [2000] geben einen signifikant höheren Anteil NB1+ Zellen bei Frauen (63,1±19,6%) im Vergleich zu Männern (53,1±19,2) an, während Goldschmeding et al. [1992] keine Geschlechtsabhängigkeit des Anteils NB1+ Granulozyten feststellen konnte. In dieser Arbeit kann ein signifikant höherer Anteil NB1+ Zellen bei Frauen nachgewiesen werden. Ein Einfluß des Alters auf die Expression kann aufgrund der Homogenität der untersuchten Gruppe nicht ausgemacht werden.

Die mehrmalige Bestimmung des Anteils NB1+ Zellen über einen Zeitraum von 3 Monaten zeigt bei den meisten gesunden Personen einen recht konstanten Wert, nur bei wenigen treten starke Fluktuationen auf, was sich mit den Literaturangaben deckt [Goldschmeding et al. 1992; Matsuo et al. 2000].

Die gut charakterisierten, spezifischen MAks gegen das NB1-GP (1B5, 4D1 und 7D8) sowie humane Antiseren [Clement et al. 1983; Goldschmeding et al. 1992; Stroncek et al. 1994b; Stroncek 1996a] erkennen

das gleiche Glykoprotein der gleichen Subpopulation Neutrophiler, aber jeweils andere Epitope, so daß die Angaben zum Anteil NB1+ Zellen leicht variieren. Für NB1 werden mindestens drei verschiedene Epitope postuliert, die meist eine gemeinsame Expression aufweisen [Clement et al. 1983; Stroncek et al. 1996a; Matsuo et al. 2000]. Aktuellere Untersuchungen der mRNA und DNA zeigten viele Polymorphismen, so daß man weitere Epitopen erwarten kann [Wolff et al. 2003; Caruccio et al. 2004]. Eine Erklärung für das bei manchen Personen unterschiedliche Bindungsverhalten NB1-spezifischer Antikörper können Polymorphismen mit veränderter Tertiärstruktur oder Mutationen in der Promotorregion bieten [Matsuo et al. 2000; Wolff et al. 2003], wodurch die gängigen Antikörper nicht mehr „passen“.

Neben dem Anteil NB1-positiver Neutrophiler interessiert bei der Frage nach einer physiologischen Funktion des NB1-GP die quantitative Expression pro Neutrophilem und mögliche Variationen. Es wurden durchschnittlich 41.549 NB1-GP pro Zelle mit einer Spannweite von 14.700-139.875 bestimmt, was anzeigt, daß große interindividuelle Unterschiede in der Expression bestehen. In der gegenwärtigen Literatur herrscht Mangel an quantitativen Angaben zur Zahl der NB1-GP auf Neutrophilen gesunder Personen. Angaben zur mittleren Fluoreszenzintensität lassen sich aufgrund unterschiedlicher Geräteeinstellungen nicht direkt vergleichen. Bei gesunden Individuen wurden 36.000 – 318.000 NB1-GP pro Neutrophilem ermittelt [Bux et al. 1992b], etwas mehr als in der vorliegenden Arbeit. Auf mRNA-Ebene bestätigt sich, daß eine hohe interindividuelle Variabilität der CD177-Expression besteht [Wolff et al. 2003; Göhring et al. 2004; Passamonti et al. 2004]. Bestimmungen der NB1-Expression über einen längeren Zeitraum an einigen zufällig ausgewählten gesunden Personen zeigen geringe intraindividuelle Schwankungen. Diese Ergebnisse werden dadurch bestätigt, daß auch die mRNA-Menge bei Gesunden relativ konstant bleibt [Wolff 2005]. Bei zwei gesunden Personen wurden mehr als 100000 NB1-GP pro Neutrophilem gemessen, wobei Kontrollmessungen jeweils niedrigere Werte ergaben, so dass bei diesen Personen möglicherweise eine bislang subklinische Infektkonstellation vorlag.

Diese Konstanz sowohl in der Zahl der exprimierten NB1-GP als auch im Anteil NB1+ Neutrophiler ist ein weiterer Hinweis auf die genetische Determination der NB1-Expression, wie dies schon lange vermutet wird [Verheugt et al. 1978; Goldschmeding et al. 1992]. Diese Ergebnisse werden dadurch bestätigt, daß für einige genetische Polymorphismen, teilweise mit nachfolgenden AS-Austausch, eine Assoziation mit einem kleinen oder großen Anteil NB1+ bzw. mit einer hohen oder niedrigen Proteinexpression gefunden wurde [Wolff et al. 2003; Caruccio et al. 2004]. Ein genetischer Defekt mit folgender fehlerhafter mRNA-Bildung wird als Ursache der NB1-defizienten Neutrophilen angesehen [Kissel et al. 2001, 2002; Wolff et al. 2003]. Dies impliziert, daß bei jedem Menschen mindestens zwei bezüglich NB1 genetisch unterschiedliche Stammzellen vorkommen. Bei Personen mit zwei NB1+ Subpopulationen müßten daher mindestens drei unterschiedliche Stammzellen vorliegen. Unklar ist dennoch, warum sich bei fast allen Personen NB1+ und

NB1- Neutrophile finden. Möglicherweise haben beide Subpopulationen unterschiedliche Aufgaben zu erfüllen oder NB1+ Neutrophile werden unter bestimmten Bedingungen, z.B. Infektionen, vermehrt benötigt.

4.1.2 Gesunde Personen nach Gabe von G-CSF

Von Interesse war der Einfluß des hämatopoetischen Wachstumsfaktors G-CSF auf die NB1-Expression bei gesunden Individuen, um eine mögliche Regulation der Expression aufzuklären.

Bei einmaliger Verabreichung von G-CSF (5µg/kg Körpergewicht) an gesunde Personen nimmt die Zahl der auf der Zellmembran exprimierten NB1-GP signifikant zu im Vergleich zur Expression vor G-CSF-Gabe und im Vergleich zu unstimulierten Gesunden. Dies deckt sich mit den Beobachtungen, daß bei Markierung mit einem CD177-spezifischen Antikörper die Fluoreszenzintensität Neutrophiler von G-CSF-stimulierten Stammzellspendern und mit G-CSF aktivierten Neutrophilen stärker ist als bei unstimulierten Granulozyten [Skubitz et al. 1991; Stroncek et al. 1998b; Matsuo et al. 2000]. Bei Anwendung von G-CSF über mehrere Tage kommt es zu einer weiteren Zunahme der Expression pro Zelle, wie dies bei Spender G3, G5, G7 zu sehen ist (Tabelle 15). Eine Zunahme der NB1-Expression bei G-CSF-Anwendung über mehrere Tage ist vorbeschrieben, wobei interessant ist, daß es nach 4-5 Tagen zu einer Abnahme der NB1-Expression kam [Stroncek et al. 1994c; 1998b]. Auch dies wird bei einer Person (G4) beobachtet, bei der die Expression bei täglicher G-CSF Applikation von Tag 3 auf Tag 5 wieder abnimmt. Eine höhere NB1-Expression auf Neutrophilen aus Knochenmark oder peripherem Blut nach G-CSF-Stimulation wurde auch auf mRNA-Ebene beobachtet mit einem ca. 1000fachen Anstieg [Wolff et al. 2003, 2005; Göhring et al. 2004; Passamonti et al. 2004].

Der Anteil der NB1+ Neutrophilen bleibt bei einmaliger Gabe von G-CSF an gesunde Personen konstant und unterscheidet sich auch nicht von der Kontrollgruppe. Ähnlich ist das Ergebnis nach in-vitro Versuchen mit fMLP, wo es zu einer vermehrten Expression von NB1 pro Neutrophilem bei konstantem Anteil der NB1-exprimierenden Zellen kam [Goldschmeding et al. 1992]. Nach Stimulation mit G-CSF ließ sich nur in bereits NB1-exprimierenden Neutrophilen mehr NB1-mRNA nachweisen [Wolff et al. 2003], so daß auch nur auf diesen Neutrophilen eine Zunahme der Proteinexpression zu erwarten ist. Bei Gabe von G-CSF an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen an zwei Personen bleibt der Anteil NB1+ Neutrophiler bis Tag 2 weitgehend konstant und nimmt an Tag 3 etwas zu, wie dies auch von Stroncek et al. [1998b] beschrieben wurde. Bei Anwendung von G-CSF über 10 Tage wurde eine Zunahme der NB1+ Neutrophilen auf im Mittel bis 90% beobachtet, was bis 3 Tage nach der letzten G-CSF-Applikation anhielt [Stroncek et al. 1998b]. Auch bei Spender G4 steigt der Anteil der NB1-exprimierenden Neutrophilen von 68% auf 85%

nach fünfägiger Anwendung von G-CSF. Ein Einfluß von G-CSF auf die NB1-GP-Expression konnte somit in mehreren Arbeiten gezeigt werden.

4.1.3 Patienten mit bakteriellen Infektionen

Neutrophile sind, wie eingangs erwähnt, relevant in der Pathogenese von Infektionen und Sepsis und haben wichtige Aufgaben in der Abwehr. Um mehr über eine mögliche Funktion und Regulation der NB1-Expression zu erfahren, wurde die NB1-Expression auf Neutrophilen von Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen untersucht.

Es zeigt sich in dieser Arbeit eine signifikant gesteigerte NB1-Expression bei Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen. Aufgrund der nicht ganz homogenen Patientengruppe mit unterschiedlich schweren Infektionen und unterschiedlichem Krankheitsstadium ergibt sich eine relativ große Streuung der Ergebnisse. Im Mittel ist die NB1-Expression pro Neutrophilem bei Infektionen geringer als nach G-CSF-Stimulation gesunder Personen, aber es werden auch weitaus höhere Werte gemessen. Eine Expression auf dem Niveau von Gesunden besteht bei Patienten mit bereits deutlicher Besserung der Erkrankung und bei lokalisierten und abgekapselten Infektionen (Abszeß, Pleuraempyem), so daß hier wohl keine ausgeprägte systemische Beteiligung mehr vorliegt. Alle anderen noch schwer kranken Patienten weisen – sofern nicht eine NB1-Defizienz vorliegt – pro Neutrophilem >100000 NB1-GP auf und meist noch darüber, was bei Gesunden kaum erreicht wird. Bei einigen Patienten wurde die NB1-Expression mehrmals bestimmt und gesehen, daß die Zahl der NB1-GP bei klinischer und laborchemischer Verbesserung des Gesundheitszustands abnimmt. Dennoch kann keine Korrelation von NB1-Expression und Laborparametern wie Neutrophilenzahl, CRP festgestellt werden. Demgegenüber steht Patient I4, bei dem es zu einer maximalen NB1-Expression und im Verlauf zum Tod kam. Daher ist anhand der vorliegenden Ergebnisse ein Zusammenhang von Schwere einer Infektion mit der NB1-Expression möglich.

Die bei einigen zufällig ausgewählten Patienten bestimmten G-CSF Spiegel zeigen, daß bei allen schwer kranken Patienten G-CSF im Plasma erhöht ist. Auch andere Autoren fanden hohe G-CSF-Spiegel bei Patienten mit akuten (bakteriellen) Infektionen, septischem Schock bzw. Sepsis [Watari et al. 1989; Kawakami et al. 1990; Gross-Weege et al. 1997; Bux et al. 1999c; Barth et al. 2001]. Bei den Patienten, deren NB1-Expression auf dem Niveau von Gesunden lag und bei denen schon die Rekonvaleszenz begonnen hatte, lag auch der G-CSF-Spiegel im Normbereich. Dies impliziert, daß bei bakteriellen Infektionen ein Einfluß von G-CSF auf die Expression von NB1 vorliegt. Unterstützt wird dies dadurch, daß andere Arbeitsgruppen eine vermehrte Expression von CD177-mRNA bei sekundären Leukozytosen zeigen konnten [Passamonti et al. 2004].

Ein interessanter Aspekt ist, daß auch der Anteil NB1-exprimierender Granulozyten im Vergleich zu Gesunden bei Patienten mit schwerer Infektion signifikant höher ist. Bei Patient I1 und I12, bei denen eine klinische Besserung eintrat, wurde im Verlauf auch ein geringerer Anteil NB1+ Neutrophiler gemessen. Ähnliche Beobachtungen wurden bisher von anderen Autoren nicht berichtet, so daß als Analogie nur die Zunahme des Anteil NB1-exprimierender Neutrophiler nach längerer G-CSF-Anwendung wie oben erwähnt dienen kann. Erklären läßt sich der höhere Anteil NB1+ Neutrophiler dadurch, daß die Patienten meist nicht am ersten Krankheitstag untersucht wurden und daher G-CSF und andere Zytokine bereits einige Tage wirkten und möglicherweise vermehrt NB1-exprimierende Neutrophile aus dem Knochenmark in die Peripherie freigesetzt wurden. Eine andere Hypothese ist, daß vornehmlich NB1-negative Neutrophile die Blutbahn verlassen und daher eine relative Veränderung des Anteils eintritt. Eine vermehrte Adhäsion von unstimulierten und NB1-defizienten Neutrophilen an Endothelzellen ist beschrieben [Stroncek et al. 1993b; 1994a].

4.1.4 Patienten mit Polyzythämia vera

Bei an PV erkrankten Patienten als Beispiel einer klonalen myeloproliferativen Erkrankung mit einer gesteigerten Hämatopoese werden signifikant mehr NB1-GP pro Neutrophilem als bei gesunden Personen exprimiert. Damit konkordant sind die Ergebnisse bezüglich der mRNA für NB1, die in Granulozyten von PV-Patienten in signifikant größerer Menge nachgewiesen werden konnte als in Granulozyten gesunder Personen [Göhring et al. 2004; Passamonti et al. 2004]. Auch mRNA für PRV-1 wird bei PV-Patienten signifikant vermehrt exprimiert [Temerinac et al. 2000; Kissel et al. 2001; Klippel et al. 2002; Johansson et al. 2003; Florensa et al. 2004; Stroncek et al. 2004]. Wurde für PRV-1 zunächst nur die Expression auf aktivierten Neutrophilen und Neutrophilen von PV-Patienten postuliert, so konnte zwischenzeitlich gezeigt werden, daß PRV-1 wie auch NB1 bei Gesunden exprimiert wird, aber eben in geringerer Menge [Temerinac et al. 2000; Bock et al. 2003; Johansson et al. 2003]. Dem entgegen steht eine Arbeit von Klippel et al. [2002], in der zwar eine vermehrte mRNA-Expression für CD177 bei PV-Patienten, jedoch keine vermehrte Expression auf der Zelloberfläche beschrieben ist. Eine vermehrte Expression von CD177-mRNA ist auch bei anderen hämatologischen Erkrankungen beschrieben, die mit einer vermehrten Blutzellbildung einhergehen wie die essentielle Thrombozytämie, das myelodysplastische Syndrom, die CML und Osteomyelofibrose, so daß die gesteigerte CD177-Expression nicht als spezifisch für die PV gilt, aber bei PV-Patienten häufiger auftritt [Teofili et al. 2002; Bock et al. 2003; Liu et al. 2003; Tefferi et al. 2003; Passamonti et al. 2004].

Der Einfluß einer medikamentösen Therapie der PV auf die Expression von CD177-mRNA wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen untersucht. Es zeigte sich, daß Hydroxyurea und Aderlaßbehandlung keinen

Einfluß haben, es unter Interferon- α jedoch zu einem Rückgang der CD177-mRNA-Expression auf das Niveau gesunder Kontrollpersonen kommt [Fruehauf et al. 2003]. Johansson et al. [2004] wiederum beschreiben eine Zunahme der CD177-Expression zu Beginn einer Behandlung mit Hydroxyurea-Präparaten. Das hier untersuchte Patientenkollektiv wurde überwiegend mit Hydroxyureapräparaten oder nur mit Aderlaß therapiert, so daß ein Einfluß der Therapie auf die Ergebnisse bestehen könnte, aber bei bereits langjähriger Therapie unwahrscheinlich erscheint und auch bisher nicht eindeutig belegt ist.

Bemerkenswert ist, daß bei PV-Patienten auch der Anteil NB1+ Zellen im Vergleich zu Gesunden signifikant gesteigert ist. Bei allen untersuchten Personen exprimieren mindestens 60% der Neutrophilen, meist sogar 80% NB1 auf der Zelloberfläche. Diese Beobachtung ist bisher in der Literatur nicht beschrieben, da meist die CD177-Expression auf mRNA-Ebene untersucht wurde. Bei der CML als einer weiteren myeloproliferativen Erkrankung ist dagegen der Anteil NB1+ Granulozyten im Vergleich zu Gesunden geringer [Stroncek et al. 1998a]. Für Gesunde wird ein im Verlauf weitgehend konstantes, individuelles und möglicherweise genetisch determiniertes Verhältnis NB1+ und NB1- Zellen beschrieben, wie dies auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte [Goldschmeding et al. 1992, Matsuo et al. 2000; Wolff et al. 2003]. Unklar ist bisher, ob PV-Patienten bereits vor der Erkrankung einen großen Anteil NB1+ Neutrophiler aufweisen oder ob dies eine Folge der Erkrankung ist. Denkbar wäre, daß vorwiegend NB1+ Vorläuferzellen von dieser klonalen Erkrankung betroffen sind oder daß NB1+ Vorläuferzellen vermehrt auf Wachstumsfaktoren ansprechen.

Im Gegensatz zu Patienten mit schweren Infektionen, bei denen ebenfalls der Anteil NB+ Neutrophiler erhöht ist, wird bei PV-Patienten ein verminderter G-CSF-Spiegel im Plasma gemessen in Übereinstimmung mit der Literatur [Watari et al. 1989]. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit der vermuteten Ätiologie der PV mit einem vermehrten Ansprechen der Vorläuferzellen auf Wachstumsfaktoren. Da G-CSF wesentlich zur Regulation der basalen Neutrophilenzahl beiträgt [Basu et al. 2000, 2002], ist davon auszugehen, daß der Regulationsmechanismus noch funktioniert und es im Sinne des Regelkreises aufgrund der bei unbehandelten Patienten hohen Neutrophilenzahl zu einem verminderten G-CSF-Spiegel kommt. Interessant ist, daß trotz der im Normbereich liegenden Neutrophilenzahlen die NB1-Expression vermehrt ist, während bei Patienten mit bakteriellen Infektionen und bei Gesunden nach Stimulation mit G-CSF gleichzeitig auch die Zahl der im peripheren Blut vorhandenen Neutrophilen erhöht war.

Genomische Veränderungen der NB1-mRNA wie Deletionen, Translokationen oder Insertionen wurden bei PV-Patienten nicht nachgewiesen. [Klippel et al. 2002; Najfeld et al. 2003], so daß man den Schluß ziehen kann, daß die vermehrte NB1-Expression nicht auf genetische Ursachen zurückgeführt werden kann. NB1 weist zwischen PV-Patienten und Gesunden biochemisch keine Unterschiede auf [Klippel et al. 2002], so daß auch von einem unveränderten Protein ausgegangen werden kann, das jedoch vermehrt exprimiert wird.

4.1.5 Patienten mit chronischer Hepatitis B oder C

Neben bakteriellen Erkrankungen interessierte die NB1-Expression bei viralen Infektionen. Die NB1-Expression bei Patienten mit einer chronischen Virushepatitis ist nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu gesunden Personen. Auch der Anteil NB1+ Neutrophiler unterscheidet sich nicht signifikant von Gesunden. Bei allen untersuchten Personen waren Laborparameter wie Leukozyten- und Granulozytenzahlen im Normbereich und das CRP allenfalls gering erhöht. Die G-CSF-Spiegel lagen über dem Normbereich. Während bei allen anderen Patientengruppen ein hoher G-CSF-Spiegel mit vermehrter NB1-Expression einherging, hatte hier der G-CSF-Spiegel offenbar keinen Einfluß, was bislang noch ungeklärt ist. Diese Ergebnisse zeigen, daß kein relevanter Einfluß (chronischer) systemischer viraler Infektionen auf die NB1-Expression besteht. Interessant ist, daß sich bei ca. 77% der Patienten mit Hepatitis C HCV-RNA in den Neutrophilen nachweisen läßt ohne klinisch oder laborchemisch korrelierende Parameter [Crovatti et al. 2000] oder Konformationsänderung von Membranproteinen, so daß die RNA entweder gar nicht als fremd erkannt oder „akzeptiert“ wird. Da bei der Immunabwehr viraler Infektionen vorwiegend das T-Zell-System, Makrophagen, virusneutralisierende Antikörper und natürliche Killerzellen involviert sind [Riede und Schäfer 1999; Liebert 2002], war eine ausgeprägte Aktivierung Neutrophiler und damit eine Änderung der Expression verschiedener Membranproteine nicht zu erwarten. Koyama et al. [1991] beschreiben einen Fall alkoholtoxischer Hepatitis, bei der es zu einer Freisetzung von G-CSF aus geschädigten Hepatozyten mit nachfolgender Hyperleukozytose kam.

Tierversuche mit experimentellen viralen Infektionen des ZNS indizieren eine relevante Funktion Neutrophiler bei der Regulation von Entzündungsvorgängen und der viralen Replikation. Es wird ein Einfluß von Neutrophilen auf die Blut-Hirn-Schranke und die Einwanderung mononukleärer Leukozyten vermutet [Zhou et al. 2003]. Es wäre daher interessant, eine Untersuchung der NB1-Expression bei akuten viralen Infektionen wie z.B. Varizellen, Influenza durchzuführen, um diese Ergebnisse zu ergänzen und zu klären, ob NB1 auch in akuten Erkrankungsphasen keine wesentliche Expressionsänderung zeigt.

4.1.6 Patienten mit rheumatoider Arthritis

Bei Patienten mit RA als eine abakterielle, systemische Autoimmunerkrankung besteht im Vergleich zu gesunden Personen eine signifikant höhere NB1-Expression pro Neutrophilem. Extrem hohe Werte über 120000 NB1-GP pro Zelle wie bei schweren bakteriellen Infektionen und nach Gabe von G-CSF wurden allerdings nur bei einer Person erreicht. Meist war die Zahl der NB1-GP pro Neutrophilen nur mäßig im Vergleich zu Gesunden erhöht. Es ist daher eine signifikante, aber insgesamt eher mäßige Expressionssteigerung bei Patienten mit RA zu beobachten.

Der Anteil der NB1+ Neutrophilen ist bei RA-Patienten im Vergleich zu Gesunden nicht signifikant verschieden und entspricht mit einem Mittelwert von 52% dem gesunder Personen. Auch dies ist als Hinweis zu werten, daß es nur zu einer geringgradig erhöhten Expression von NB1 kommt. Entsprechende Ergebnisse zur NB1-Expression bei RA-Patienten in der Literatur liegen nicht vor. Daß NB1 bei RA-Patienten vermehrt exprimiert wird, läßt sich dadurch erklären, daß es sich um eine Systemerkrankung mit Schwerpunkt der Entzündungsreaktion an den Gelenken handelt. Zudem war bei vielen Patienten mit einer hohen NB1-Expression das CRP erhöht als Hinweis auf eine systemische Entzündungsreaktion, und häufig lag auch eine Leukozytose vor. Da fast alle Patienten mit Kortikosteroiden behandelt wurden, die eine Granulozytose auslösen können, ist die Zahl der Granulozyten allerdings vorsichtig zu werten. Ob Kortikosteroide die NB1-Expression beeinflussen, ist unbekannt. Bekannt ist, daß bei der RA viele proinflammatorische Zytokine in der Synovia, aber auch systemisch vermehrt vorkommen, wie z.B. G-CSF [Nakamura et al. 2000], GM-CSF, IL-8 [Choy und Panayi 2001], wodurch eine Aktivierung stattfinden könnte mit nachfolgend vermehrter NB1-Expression. Interessant wäre in diesem Zusammenhang, die Expression von NB1 in der Synovia zu bestimmen, da darin bis zu 90% der Zellen Neutrophile sind und sich viele proinflammatorische Zytokine nachweisen lassen [Choy und Panayi 2001; Hayashida et al. 2001].

4.2 Expression des NB1-Glykoproteins auf Neutrophilen aus Nabelschnurblut

Die Untersuchungen zur NB1-Expression auf Neutrophilen aus Nabelschnurblut Neugeborener ergeben, daß NB1 in signifikant größerer Zahl auf der Zellmembran exprimiert wird als bei gesunden Erwachsenen. Im Vergleich zu Erwachsenen nach Gabe von G-CSF oder mit schweren Infektionen ist die Expression geringer. Eine signifikant höhere Expression wurde auch für CD177-mRNA aus Granulozyten aus Nabelschnurblut im Vergleich zu Erwachsenen nachgewiesen [Wolff 2005; Wolff et al. 2006]. Interessant ist, daß die Expression bei Mädchen signifikant höher als bei Jungen ist, sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene [Wolff 2005; Wolff et al. 2006].

Bezüglich der Geburtsumstände wie Gewicht, Schwangerschaftswoche, pH-Wert des Nabelschnurbluts und des APGAR-Index zeigen sich keine signifikanten Einflüsse auf die NB1-Expression.

Bei Neugeborenen, bei denen ein vorzeitiger Blasensprung bestand, womit eine erhöhte Infektionsgefahr einhergeht, wird NB1 signifikant höher exprimiert. Man kann vermuten, daß Neutrophile bei dieser potentiellen Infektion aktiviert werden, wie dies bei Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen nachgewiesen werden konnte. Bekannt ist die Assoziation eines Amnioninfektionssyndroms mit einer vermehrten Expression von G-CSF-Rezeptoren auf Plazentazellen und einer höheren G-CSF-Konzentration in der Amnionflüssigkeit, im Serum der Mutter und Urin des Neugeborenen [Calhoun et al. 2001]. Länger bestehende Komplikationen während der Schwangerschaft wie Fehlbildungen, Erkrankungen der Mutter (Hypertonie, Diabetes) oder auch vorzeitige Wehen hatten keinen Einfluß auf die NB1-Expression. Dem gegenüber stehen eine Hochregulation der NB1-mRNA im Nabelschnurblut von Mädchen - nicht jedoch bei Jungen-, bei denen ein auffälliges CTG, Probleme der Mutter während der Schwangerschaft und perinatal bestanden hatten [Wolff 2005, Wolff et al. 2006].

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß eine vermehrte NB1-Expression auf Neutrophilen Neugeborener sehr früh in der Entwicklung besteht und im Verlauf weitestgehend konstant bleibt. Ein Einfluß von Hormonen und die Geburt an sich könnte die Expression auch beeinflussen, doch dann wäre ein Unterschied von per sectionem und spontan entbundenen Kindern zu erwarten.

Der Anteil NB1+ Neutrophiler in Nabelschnurblut ist im Vergleich zu gesunden Erwachsenen signifikant höher (75% versus 50%). Ähnliche Ergebnisse wurden bei Erwachsenen nur bei PV-Patienten erreicht. Der größere Anteil NB1+ Neutrophiler ist konkordant mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls einen signifikant höheren Anteil NB1-exprimierender Granulozyten in Nabelschnurblut nachweisen konnten im Vergleich zu Erwachsenen [Madyastha et al. 1984; Stroncek et al. 1998a]. Auch im fetalen Knochenmark war der Anteil NB1+ myeloischer Zellen höher als bei Erwachsenen [Stroncek et al.

1998a]. Bezüglich Geburtsgewicht, Schwangerschaftswoche, pH-Wert des Nabelschnurbluts, APGAR-Index bestehen keine signifikanten Unterschiede des Anteils NB1+ Neutrophiler in dieser Arbeit. Lediglich bei einem vorzeitigen Blasensprung kommt es zu einem signifikant höheren Anteil NB1+ Zellen.

Daß sowohl die Zahl der NB1-GP pro Zelle als auch der Anteil NB1+ Zellen bei Neugeborenen unabhängig vom Gestationsalter und Geburtsgewicht signifikant höher als bei Erwachsenen ist, deutet auf eine konstitutionelle Expression und weniger auf eine situative Regulation hin. Diese Hypothese stützen Ergebnisse, die bei Untersuchungen an Schwangeren erhoben wurden: Bereits ab der Frühschwangerschaft, vermutlich mit Beginn kurz nach der Fertilisation, kommt es zu einer vermehrten Expression von NB1, die noch einige Wochen post partum anhält [Carrucio et al. 2003; Taniguchi et al. 2004]. Bei Schwangeren wurde keine signifikante Änderung der NB1-Expression bei vorzeitigen Wehen oder drohendem Abort beobachtet [Taniguchi et al. 2004]. Mit der vermehrten NB1-Expression ging ein Anstieg der Neutrophilenzahl einher [Taniguchi et al. 2004], so daß damit wiederum ein G-CSF-Effekt zur Regulation der Neutrophilenzahl vermutet werden kann (siehe Kapitel „Regulation der NB1-Expression“). Im Vergleich zu Erwachsenen enthält Blut Neugeborener weder prozentual noch absolut deutlich mehr Neutrophile, was wiederum G-CSF als Ursache für die vermehrte Expression unwahrscheinlich erscheinen läßt. Andererseits wird die verstärkte Anfälligkeit von Neugeborenen für Infektionen u.a. mit einer verminderten Knochenmarksreserve erklärt. Der G-CSF-Rezeptor wird auf Neutrophilen aus Nabelschnurblut im Vergleich zu Erwachsenen geringer exprimiert [Gessler et al. 2000], was man zum einen als vermehrte Empfindlichkeit für Wachstumsfaktoren oder als eine Herunterregulation bei bereits maximaler Zellbildung erklären kann.

4.3 Expression des Fc γ RIIIb auf Neutrophilen

Bei Gesunden ergibt sich eine mittlere Expression des Fc γ RIIIb von ca. 178.000/Neutrophilem mit deutlichen interindividuellen Unterschieden. Dies entspricht den in der Literatur genannten Zahlen mit 173.000 - 242.000 Fc γ -Rezeptoren IIIb pro Zelle mit großer interindividueller Varianz [Huizinga et al. 1989, 1990c; Bux et al. 1992b, 1994; Bux 2000a]. Bei einem Spender war bekannt, daß es sich um HNA-1c mit drei Genen handelt, und interessanterweise lag auch die Expression mit 249.366 Fc γ RIIIb pro Neutrophilem deutlich über dem Mittelwert. Die bekannten Unterschiede in der Expression abhängig vom HNA-1-Phänotyp [Koene et al. 1996] wurden für die vorliegende Arbeit als nicht relevant angesehen und daher nicht untersucht.

Bei Spendern, deren Fc γ RIIIb-Expression mehrmals innerhalb 3 Monaten bestimmt wurde, zeigen sich geringe Unterschiede. Auch die im Plasma vorliegende Menge sFc γ RIIIb bleibt über einen längeren Zeitraum konstant. Da die Menge des sFc γ RIIIb mit der Neutrophilenproduktion und damit der Neutrophilenzahl korreliert [Huizinga et al. 1994], stützt dies die vorliegenden Ergebnisse.

Wird G-CSF gesunden Personen verabreicht, kommt es innerhalb von 8-24h zu einer signifikant geringeren Expression des Fc γ RIIIb um ca. 50-80% und zu einer weiteren Abnahme bei erneuter G-CSF-Gabe [de Haas et al. 1994; Spiekermann et al. 1994; Michon et al. 1998; Stroncek et al. 1998a,b]. Bei G-CSF-Gabe an 10 aufeinanderfolgenden Tagen bleibt die Expression des Fc γ RIIIb auf konstantem Niveau vermindert und kehrt 3 Tage nach der letzten G-CSF-Gabe auf Ausgangswerte zurück [Stroncek et al. 1994c, 1998b]. In Übereinstimmung hiermit wird in der vorliegenden Arbeit eine signifikant geringere Expression des Fc γ RIIIb auf Neutrophilen ca. 8-14h nach einmaliger G-CSF-Gabe bei gesunden Personen beobachtet.

Bei Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen wurde ebenfalls eine signifikant geringere Expression des Fc γ RIIIb gemessen. Dies wurde übereinstimmend auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet und zudem eine verminderte Expression nach Exposition mit LPS gesehen [Wagner et al. 2003]. Bei Sepsispatienten mit mehrmaliger Bestimmung der Fc γ RIIIb-Expression beobachtet man eine Zunahme im Zuge der klinischen Besserung, so daß eine Korrelation mit der Schwere der Erkrankung möglicherweise besteht. Dies lässt sich durch Versuche anderer Arbeitsgruppen stützen, die zeigten, daß die Menge an sFc γ RIIIb bei septischen Patienten im Vergleich zu gesunden Personen erhöht ist und mit der Krankheitsaktivität korreliert [Muller-Kobold et al. 1998]. Zudem ist eine Korrelation der Menge von sFc γ RIIIb mit dem auf der Zellmembran exprimiertem Fc γ RIIIb beschrieben [Koene et al. 1996]. Bekannt ist zudem, daß eine Aktivierung Neutrophiler mit fMLP eine vermehrte Abgabe des Fc γ RIIIb von der Zellmembran bewirkt [Huizinga et al. 1988]. Somit läßt sich die signifikant geringere Expression des

Fc γ RIIIb nach Applikation von G-CSF und bei Infektionen auf diese Weise erklären.

Ein weiterer Grund für die geringere Expression des Fc γ RIIIb bei Infektionen und nach Gabe von G-CSF könnte sein, daß vermehrt auch unreifere Neutrophile in die Blutbahn gelangen, was als „Linksverschiebung“ im Blutbild bei Infektionen bekannt ist. Der Fc γ RIIIb wird auf fast allen reifen Neutrophilen exprimiert, auf ca. 31-50% der Metamyelocyten und auf ca. 8-10% der Myelozyten [Barclay et al. 1993; Stroncek et al. 1998a; Stroncek 2002a]. Damit ließe sich vor allem die geringere Expression nach Gabe von G-CSF erklären, denn durchflußzytometrisch zeigt sich hierbei eine breitbasige rechtsgipflige Verteilung, was Neutrophiler verschiedener Reifegrade mit entsprechend unterschiedlicher Fc γ RIIIb-Expression entsprechen könnte [Kerst et al. 1993b; de Haas et al. 1994; Stroncek et al. 1998a].

Es wird vermutet, daß durch die geringere Expression des Fc γ RIIIb die Zellen der vorzeitigen Apoptose entgehen und damit länger der Immunabwehr zu Verfügung stehen [Wagner et al. 2003]. Die Zahl der Fc γ RIIIb scheint klinisch relevant zu sein, denn bei Patienten mit einer hohen präoperativen Fc γ RIIIb-Expression und deutlicher postoperativer Herunterregulation traten seltener Infektionen im Verlauf auf als bei Patienten mit einer präoperativ geringen Expression des Fc γ RIIIb und nur geringer Abnahme [Viedma Contreras 1999]. Andererseits ist der Fc γ RIIIb relevant für die Phagozytosefähigkeit Neutrophiler, so daß eine hohe Expression einen Vorteil in der Infektionsabwehr vermuten läßt. Möglicherweise sind bei Infektionen viele der Rezeptoren an Vorgängen der Phagozytose beteiligt und bereits mit Antikörpern beladen bzw. internalisiert, so daß kein Nachweis mit Antikörpern gelingen kann. Zudem ist nicht die absolute Zahl der exprimierten Rezeptoren, sondern auch das Verhältnis der verschiedenen Fc γ -Rezeptoren untereinander entscheidend für die Funktion Neutrophiler [Ravetch und Bolland 2001].

Bei RA-Patienten zeigt sich in diesen Untersuchungen keine signifikant unterschiedliche Expression des Fc γ RIIIb im Vergleich zu Gesunden, so daß die Aktivierung der Neutrophilen systemisch gering ist. In der Gelenkflüssigkeit bei Arthritis wurde der sFc γ RIIIb nachgewiesen, so daß von einer lokalen Aktivierung Neutrophiler auszugehen ist [Huizinga et al. 1990c]. Da der G-CSF-Spiegel im Plasma bei den untersuchten RA-Patienten teilweise erhöht war, scheint entweder kein ausreichender hoher G-CSF-Spiegel erreicht zu werden oder weitere Zytokine, z.B. TNF- α gegenregulatorisch auf die Expression von G-CSF-Rezeptoren zu wirken [Gessler et al. 2000].

Eine signifikant geringere Expression des Fc γ RIIIb im Vergleich zu Gesunden wurde bei PV-Patienten gemessen, wie dies auch andere Arbeitsgruppen belegen [Kabutomori et al. 1997]. Auch bei an CML erkrankten Patienten ist die Expression des Fc γ RIIIb geringer als bei Gesunden [Kabutomori et al. 1997; Stroncek et al. 1998a]. Da bei der Ätiologie der PV u.a. eine Hypersensitivität auf verschiedene

Wachstumsfaktoren eine Rolle spielen, könnte dadurch die vermehrte Expression des Fc γ RIIIb erklärt werden.

Auf Neutrophilen aus Nabelschnurblut wird im Vergleich zu Neutrophilen bei Erwachsenen signifikant weniger Fc γ RIIIb exprimiert. Tendenziell exprimieren Neutrophile von Jungen weniger Fc γ RIIIb als Neutrophile von Mädchen, was wiederum umgekehrt zu den Ergebnissen der NB1-Expression paßt (s.o.), da sich bei den verschiedenen Untersuchungen gezeigt hatte, daß eine hohe NB1-Expression meist mit einer niedrigen Fc γ RIIIb-Expression einhergeht. Neben der geringeren Expression pro Neutrophilem wird eine Expression auf einem geringeren Anteil der Neutrophilen als bei Erwachsenen beschrieben [Carr und Davies 1990; Takahashi et al 1994].

Ein signifikanter Einfluß von Geburts Umständen, Reife des Kindes, (vermuteten) Infektionen besteht in der vorliegenden Arbeit nicht. Lediglich Erkrankungen und Probleme auf Seite der Mutter bewirken eine geringere Expression. Die Expression nimmt tendenziell mit der Reife des Kindes zu, so daß bei Kindern, die nach der 41. Woche geboren wurden, die höchste Fc γ RIIIb-Expression gemessen wurde. Bei Frühgeborenen wird eine geringere Fc γ RIIIb-Expression berichtet als bei termingerecht geborenen Kindern, wobei sich die Expression innerhalb ca. 5 Tage nach Geburt angleicht. Eine deutlich geringere Fc γ RIIIb – Expression ist für septische Neugeborene beschrieben, wobei nicht nur Nabelschnurblut, sondern Blut von Kindern bis zum 21. Lebenstag verwendet wurde, was den Vergleich erschwert [Carr und Davies 1990]. Zudem erkrankten in der vorliegenden Arbeit nur wenige der untersuchten Neugeborenen an Infektionen, so daß über die Funktion des Fc γ RIIIb als prädiktiver Parameter für Infektionen hier keine Aussage getroffen werden kann.

Neutrophile Neugeborener und insbesondere Frühgeborener haben eine geringere Fähigkeit zur Bildung von ROS, was auf die geringere Expression und/oder Funktion von Fc γ -Rezeptoren zurückgeführt wird und als eine der Ursachen für die erhöhte Infektanfälligkeit angesehen wird [Komatsu et al. 2001]. Somit könnte die Messung der Fc γ RIIIb-Expression Hinweise geben, ob bei einem Neugeborenen und insbesondere bei Frühgeborenen eine vermehrte Infektanfälligkeit vorliegt.

4.4 Expression weiterer Antigene auf Neutrophilen

Neben dem NB1-GP als dem für diese Arbeit im Vordergrund stehendem Protein interessierte die Expression weiterer Proteine und Fc γ -Rezeptoren auf Neutrophilen, da das Zusammenwirken der verschiedenen Membranproteine die Aktivität und Funktion Neutrophiler wesentlich bestimmt.

Bei gesunden Personen wird der hochaffine **Fc γ RI (CD64)** nur in geringer und nur auf einem geringen Anteil Neutrophiler exprimiert. [Stroncek et al. 1998b; Buckle und Hogg 1989; Huizinga et al. 1990a; Gericke et al. 1995]. Die nur geringe Expression konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Bei Patienten mit RA, PV, schweren bakteriellen Infektionen und nach Gabe von G-CSF bei Gesunden wurde in dieser Arbeit eine signifikant höhere Fc γ RI-Expression bestimmt. Dabei ist die Expressionssteigerung bei chronischen Erkrankungen wie der RA und der PV mäßig, während nach Applikation von G-CSF eine deutliche Hochregulation auftritt. Die höchste Expression mit Werten stets über dem Niveau von Gesunden besteht bei Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen. Eine Expression des Fc γ RI auf Neutrophilen wurde in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten nachgewiesen [Quayle et al. 1997]. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen ist eine vermehrte Expression des Fc γ RI auf Neutrophilen und Monozyten bei bakteriellen Infektionen Neugeborener, Kinder und Erwachsener sowie bei (postoperativem) septischem Schock beschrieben [Fjaertoft et al. 1999; Barth et al. 2001; Hirsh et al. 2001]. Ein Einfluß verschiedener Zytokine (IFN- γ , G-CSF) auf die Expression von Fc γ RI ist bekannt [Anderson und Looney 1986; Buckle und Hogg 1989; Huizinga et al. 1990a; Repp et al. 1991; Klebanoff et al. 1992; Witte und Schmidt 1992; Kerst et al. 1993a,b; Spiekermann et al. 1994; Gericke et al. 1995; Flesch et al. 1998; Michon et al. 1998; Takano et al. 2000]. Anwendung von G-CSF über mehrere Tage führt zu einer weiteren Expressionssteigerung mit Zunahme des Anteils Fc γ RI-exprimierender Neutrophiler [Spiekermann et al. 1994; Michon et al. 1998; Stroncek et al. 1998b]. Damit läßt sich die in der vorliegenden Arbeit beobachtete nur mäßige Hochregulation der Fc γ RI-Expression bei einmaliger Applikation von G-CSF erklären und die deutlich höhere bei Patienten mit bakteriellen Infektionen, da in diesem Fall die Zytokine bereits einige Zeit wirken konnten.

Für die Expression des **Fc γ RII** auf Neutrophilen wurden bei Gesunden im Mittel 20.187 Rezeptoren nachgewiesen. Dies entspricht in etwa den mittels quantitativen Enzym-Immunoassay ermittelten Werten mit ca. 27.000 [Bux et al.1992b] bzw. 10.000 - 40.000 Rezeptoren pro Zelle [Huizinga et al. 1990a]. Eine einmalige Stimulation mit G-CSF bewirkte eine nicht-signifikante, geringgradige Expressionssteigerung. G-CSF, GM-CSF oder IFN- γ haben nach einmaliger Anwendung weder in vitro [de Haas et al. 1994; Buckle und Hogg 1989] noch in vivo einen Effekt auf die Fc γ RII-Expression [Kerst et al. 1993b; de Haas et al.

1994; Michon et al. 1998; Stroncek et al. 1998b], was die hier vorliegenden Ergebnisse stützt. Wird G-CSF an mehreren Folgetagen verabreicht, steigt die Fc γ RII-Expression nach 3 bis 10 Tagen um 60-100% an [Stroncek et al. 1998b], so daß man davon ausgehen muß, daß keine kurzfristige Hochregulation aus einem intrazellulären Pool, sondern vielmehr eine Neubildung Ursache ist.

Für die Expression von **CD11b** und **CD18** wurde keine signifikante Expressionsänderung nach Gabe von G-CSF und bei bakteriellen oder viralen Infektionen gesehen. Nach Applikation von G-CSF kommt es zu einer statistisch wahrscheinlichen vermehrten Expression von CD11b. Für CD11b ist eine Hochregulation während der frühen Aktivierungsphase mit Rückgang auf Normalwerte innerhalb 12h beschrieben [de Haas et al. 1994]. Die hier gefundenen leicht erhöhten Werte könnten Resultat eines individuell unterschiedlich schnellen Ansprechens auf G-CSF und unterschiedlicher Dauer des Rückgangs auf das Ausgangsniveau sein. Auch bei G-CSF-Gabe über mehrere Tage ist keine signifikante Expressionsänderung beschrieben [Stroncek et al. 1994c, 1998b], so daß die Ergebnisse dieser Arbeit damit konkordant sind. Eine vermehrte Expression wird allerdings bei septischen Neugeborenen beschrieben, die G-CSF erhielten [Drossou-Agakidou et al. 1998]. Neutrophile von erwachsenen Sepsispatienten wiesen eine höhere CD11b-Expression auf [Muller Kobold et al. 1998], was in dieser Arbeit nicht gezeigt werden konnte.

Der LPS-Rezeptor **CD14** läßt sich bei gesunden Spendern nur in geringer Zahl auf der Zellmembran Neutrophiler nachweisen und wird nach Gabe von G-CSF signifikant vermehrt exprimiert, wie dies auch andere Arbeitsgruppen zeigen konnten [Hansen et al. 1993; Spiekermann et al. 1994; Stroncek et al. 1998b; Nussler et al. 1999; Wagner et al. 2003]. Beschrieben ist, daß CD14 nur auf neu gebildeten bzw. freigesetzten Neutrophilen vermehrt exprimiert wird [Kerst et al. 1993b].

Eine signifikant höhere Zahl von CD14 zeigte sich bei Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen und bei PV-Patienten. Im Gegensatz dazu berichtet Barth et al. [2001] eine verminderte Expression von CD14 bei Patienten mit septischem Schock und gleichzeitig erhöhten Spiegeln für G-CSF und IFN- γ . Da eine Hochregulation von CD14 nach Gabe von G-CSF von mehreren Autoren beschrieben wird, G-CSF bei Sepsispatienten in hohen Konzentrationen gemessen wurde und CD14 intrazellulär gespeichert ist [Nussler et al. 1999; Wagner et al. 2003], ist eine rasche Hochregulation durch Mobilisierung der intrazellulären Vorräte zu erklären. Das unterschiedliche Niveau der CD14-Expression bei Infektionen könnte auch durch das Erregerspektrum bedingt sein, da CD14 v.a. bei Infektionen mit gramnegativen Bakterien relevant ist und in der vorliegenden Arbeit ein heterogenes Patientengut mit häufig grampositiven Krankheitserregern vorlag.

Der Rezeptor für L-Selektin, **CD62L**, wurde bei allen untersuchten Gruppen in recht geringer Zahl exprimiert, was im Gegensatz zu der beschriebenen hohen Expression auf Neutrophilen steht [von Andrian

et al. 1991; Enders et al. 1995; Stroncek et al. 1998b; Nussler et al. 1999]. Eine gesteigerte Expression findet sich in dieser Arbeit nach Gabe von G-CSF und bei schweren bakteriellen Infektionen, während andere Arbeitsgruppen eine geringere Expression nach Aktivierung und Applikation von G-CSF durch Abgabe des Rezeptors ins Serum beschreiben [von Andrian et al. 1991; Enders et al. 1995; Stroncek et al. 1998b; Nussler et al. 1999]. Aufgrund der Funktion von L-Selektin mit Vermittlung des „Rollings“ der Leukozyten im Blutstrom und entscheidender Funktion für die Extravasation in akut entzündetes Gewebe [von Andrian et al. 1991; Enders et al. 1995], wäre eine höhere Expression bei Aktivierung zu erwarten, wobei bei der Blutentnahme die rollenden und teilweise adhärierenden Neutrophilen kaum erfaßt werden und dadurch nur ein unvollständiges Bild der Expression entsteht. Stroncek et al. [1998b] vermuten, daß durch die geringere Expression des L-Selektins nach Gabe von G-CSF eine Leukostase, insbesondere auch in den Lungengefäßen vermindert wird, was das Risiko pulmonaler Ereignisse, z.B. bei Granulozytentransfusionen reduziert.

Die Menge an **Antigenen des HLA-I-Systems** pro Zelle variiert interindividuell beträchtlich [Araki et al. 1999], wie dies auch bei den untersuchten Personen gesehen wurde. Für Antigene des HLA-Systems wurden bei Bestimmung mittels Enzymimmunoassays durchschnittlich 139.000 Antigene pro Zelle gemessen [Bux et al. 1992b], während in dieser Arbeit deutlich geringere Zahlen bestimmt wurden (53.000 – 70.000), so daß ein deutlicher Unterschied besteht, der eventuell auch mit der Vorbehandlung der Zellen, der Meßmethode und den verwendeten Antikörpern zusammenhängt. Ein signifikanter Einfluß von G-CSF oder Infektionen ließ sich nicht zeigen, tendenziell ist aber eine höhere Expression bei schweren bakteriellen Infektionen vorhanden. Daten aus der Literatur zum Vergleich liegen nicht vor. Auf Monozyten kam es unter Stimulation mit G-CSF zu einer unveränderten oder sogar leicht reduzierten Expression von MHC-I-Molekülen [Aman et al. 1996], was die eigenen Ergebnisse stützt.

4.5 Regulation der NB1-Expression

4.5.1 G-CSF

Die Ergebnisse zur NB1-Expression bei Gesunden und verschiedenen Patientenkollektiven zeigen eine vermehrte Expression nach Gabe von G-CSF an gesunde Personen, bei Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen, bei PV-Patienten und bei Patienten mit RA. Der Anteil der Neutrophilen, die NB1 auf der Zellmembran tragen, ist bei schweren Infektionen, PV-Patienten und nach ca. 3-tägiger G-CSF-Gabe ebenfalls signifikant höher. Nach (einmaliger) Anwendung von G-CSF bei Gesunden waren die G-CSF-Konzentrationen im Plasma deutlich erhöht. Auch bei Patienten mit schweren Infektionen waren NB1-Expression und G-CSF-Spiegel erhöht, wobei normale G-CSF-Spiegel bei Patienten in der Rekonvaleszenz mit bereits „normaler“ NB1-Expression gemessen wurden. Hohe G-CSF-Konzentrationen mit Normalisierung nach Überwinden der akuten Erkrankungsphase wurden auch von anderen Arbeitsgruppen bei akuten Infektionen und Sepsis gemessen, wobei große interindividuelle Unterschiede bestehen [Watari et al. 1989; Kawakami et al. 1990; Gross-Weege et al. 1997; Bux et al. 1999c; Barth et al. 2001], so daß damit ein Einfluß von G-CSF auf die NB1-Expression in mehreren Arbeiten gezeigt werden konnte. Bei rezidivierenden Infektionen des Respirations- und/oder Harntrakts wurden geringere G-CSF-Spiegel als bei Kontrollpersonen gemessen, so daß möglicherweise eine Art „Gewöhnungseffekt“ eintritt [Kawakami et al. 1990]. Eine Korrelation des G-CSF-Spiegels mit der Neutrophilenzahl bei Infektionen wurde beschrieben [Watari et al. 1989], während von Kawakami et al. [1990] und in dieser Arbeit keine Korrelation des G-CSF-Spiegels zu Leukozyten-, Neutrophilenzahlen, CRP, Körpertemperatur gefunden werden konnte. Es ist bekannt, daß G-CSF notwendig ist für die Regulation der basalen Neutrophilenzahl und zur Steigerung der Neutrophilenzahl bei vermehrtem Bedarf [Caspar et al. 1993; Drossou-Agakidou et al. 1998; Basu et al. 2000, 2002; Matsushima et al. 2001; Schmitt et al. 2002] durch Erhöhung der Kolonien-bildenden Vorläuferzellen und Reifung neutrophiler Vorläuferzellen sowie Freisetzung in die Peripherie [Avalos et al. 1990; Demetri und Griffin 1991; Nussler et al. 1999; Girlando et al. 2000]. Da eine Neutrophilie sowie erhöhte G-CSF-Spiegel bei Infektionen und nach G-CSF-Gabe charakteristisch sind und dabei eine signifikant höhere NB1-Expression im Vergleich zu Gesunden auftritt, weist dies auf einen wesentlichen Effekt von G-CSF auf die NB1-Expression hin. Die Gabe von G-CSF an gesunde Personen minimiert einen möglichen Einfluß anderer Zytokine und Faktoren. Bei mit G-CSF behandelten Tumorpatienten wurden unveränderte Plasmakonzentrationen von IL-6, IL-8 und IL-1-Rezeptorantagonist gemessen [Aman et al. 1996], so daß eine maßgebliche Regulation der NB1-Expression durch G-CSF naheliegt.

Eine Überempfindlichkeit der Vorläufer- und Stammzellen auf Wachstumsfaktoren wird bei der PV als wesentlich für die Pathogenese angenommen [Spivak 2002], so dass bei PV-Patienten wahrscheinlich G-

CSF die signifikant höhere NB1-Expression bedingt. Der signifikant höhere Anteil NB1+ Neutrophiler bei PV-Patienten könnte auch hierauf zurückgeführt werden, da eine G-CSF-Gabe über mehrere Tage an Gesunde ebenfalls zu einem höheren Anteil NB1+ Neutrophiler führt [Stroncek et al. 1998b], so daß G-CSF möglicherweise vermehrt auf NB1+ (Vorläufer)Zellen wirkt.

Bei RA-Patienten wurde eine vermehrte NB1-Expression gemessen mit normalen G-CSF-Spiegeln. Da G-CSF im Serum und v.a. auch in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden kann [Nakamura et al. 2000], G-CSF eine Exazerbation der RA verursachen kann [Snowden et al. 1998] und Zytokine wie TNF- α , IL-1 die Bildung von G-CSF sowie GM-CSF durch synoviale Fibroblasten und Chondrozyten anregen können [Leizer et al. 1990; Campbell et al. 1991; Choy und Panayi 2001], könnte auch hierbei G-CSF eine vermehrte NB1-Expression bedingen. Ein weiterer Hinweis für die Bedeutung von G-CSF bei der RA ist, daß im Tiermodell die Blockade von G-CSF-Rezeptoren oder G-CSF-Defizienz zu einer weniger schweren Manifestation der Arthritis führte, am ehesten bedingt durch eine geringere Infiltration mit Neutrophilen [Lawlor et al. 2004]. Zu bedenken ist aber auch die bei allen Patienten gleichzeitig bestehende Therapie meist mit Glukokortikoiden, deren Einfluß auf die NB1-Expression noch nicht bekannt ist.

Da G-CSF sowohl bei kurzfristiger als auch längerfristiger Anwendung Änderungen in der NB1-Expression verursachen kann, muß ein Effekt sowohl auf zirkulierende Neutrophile als auch auf Vorläuferzellen im Knochenmark bestehen. Die rasche Hochregulation der Expression nach Gabe von G-CSF oder bei Infektionen kann zum einen durch Verlagerung von in sekundären Granula gelagertem NB1 an die Zelloberfläche [Goldschmeding et al. 1992], zum anderen durch eine vermehrte Bildung erklärt werden, wie dies an der höheren Menge von NB1-mRNA [Wolff et al. 2003, Wolff 2005] zu sehen ist. Da NB1 ab der Reifungsstufe des Myelozyten auf einem etwa gleichbleibendem Anteil Neutrophiler exprimiert wird [Stroncek et al. 1998a] und bei PV-Patienten und Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen eine Zunahme der NB1+ Subpopulation beobachtet wird, handelt es sich hierbei wahrscheinlich um neugebildete Neutrophile. Da ein Genexpressionsdefekt die Ursache für die NB1-Defizienz ist [Kissel et al. 2002; Wolff et al. 2003], kann man annehmen, daß G-CSF im Knochenmark vorwiegend Stammzellen und Zellen des Teilungspools stimuliert, die fähig zur Bildung von NB1 sind. Ein ähnliches Expressionsverhalten mit rascher Hochregulation und vermehrter Expression auf einem größeren Anteil der Neutrophilen wurde auch für den Fc γ RI beschrieben [Repp et al. 1991; Kerst et al. 1993b], so daß die Expression beider Proteine ähnlich reguliert sein könnte.

Auf Neutrophilen aus Nabelschnurblut wurde eine signifikant höhere Zahl von NB1 und ein höherer Anteil NB1+ Neutrophiler gemessen. Der G-CSF-Rezeptor sowie dessen mRNA ist bei Neutrophilen aus Nabelschnurblut vermindert im Vergleich zu Erwachsenen [Gessler et al. 2000]. Dies könnte bedeuten, daß

Neutrophile aus Nabelschnurblut ähnlich wie Neutrophile bei PV-Patienten auf geringe Konzentrationen von Wachstumsfaktoren reagieren, oder aber bereits maximal stimuliert sind und es im Sinne einer Regulation zu einer geringeren Expression kommt. Die Proliferationsrate von CFU-GM ist im Nabelschnurblut bei gesunden Kindern signifikant höher als bei Erwachsenen [Christensen et al. 1986], was auf eine bereits bestehende erhöhte Stimulation Neutrophiler und deren Vorläuferzellen hindeutet.

G-CSF und der G-CSF-Rezeptor können während der gesamten Schwangerschaft auf Deziduazellen der Plazenta und auf Trophoblastenzellen nachgewiesen werden und sind beim Amnioninfektionssyndrom vermehrt [Demetri und Griffin 1991; Calhoun et al. 2001]. Auch werden bereits ab der frühen Schwangerschaft in NK-Zellen der Dezidua Zytokine, u.a. G-CSF, GM-CSF, M-CSF und IFN- γ gebildet [Saito et al. 1993a]. Zusätzlich wird in verschiedenen Zellarten der Plazenta (Makrophagen, Drüsenzellen, Trophoblasten, Lymphozyten) M-CSF und GM-CSF gebildet [Saito et al. 1993b; Jokhi et al. 1994]. Diskutiert wird eine relevante Funktion dieser Zytokine für die Entwicklung und Funktion der Plazenta [Saito et al. 1993a,b; Jokhi et al. 1994]. Die vermehrte NB1-Expression bzw. die verminderte Expression des Fc γ RIIIb während der Schwangerschaft bzw. in Nabelschnurblut ließe sich somit durch Einfluß der Zytokine und hämatopoetischen Wachstumsfaktoren erklären.

4.5.2 Weitere mögliche Faktoren zur Regulation der NB1-Expression

Ein Zusammenhang der **Neutrophilenzahl** mit der NB1-Expression wurde untersucht. Bisher konnte weder bei gesunden Spendern [Matsuo et al. 2000] noch bei Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen ein Einfluß der Neutrophilenzahl auf die Fluoreszenzintensität oder den Anteil NB1+ Zellen gezeigt werden. Bei PV-Patienten liegen verschiedene Angaben vor: Johansson et al. [2003] konnten keine Assoziation von Granulozytenzahl und Überexpression von PRV-1-mRNA nachweisen, während Passamonti et al. [2004] bei myeloproliferativen Erkrankungen (PV, essentielle Thrombozythämie, Osteomyelofibrose) eine Korrelation von Leukozytenzahl und Menge an PRV-1-mRNA fanden.

Bei Schwangeren ist eine vermehrte NB1-Expression und Zunahme des NB1-exprimierenden Anteils der Neutrophilen sowie eine Zunahme der Neutrophilenzahl beschrieben [Taniguchi et al. 2004], doch der Schluß, daß die Neutrophilenzahl die NB1-Expression reguliert, kann daraus nicht gezogen werden. Beide Phänomene sind eher als Folge einer veränderten Aktivitätslage durch andere regulierende Faktoren wie Zytokine und Wachstumsfaktoren aufzufassen. So konnte bei bakteriellen Infektionen und der aplastischen Anämie eine Korrelation von G-CSF-Konzentration und Neutrophilenzahlen gezeigt werden [Bux et al. 1999c]. Dies zeigt, daß die gesteigerte NB1-Expression und Neutrophilenzahl am ehesten beide wiederum auf den Effekt von G-CSF zurückzuführen sind. Auch andere Parameter wie CRP, Körpertemperatur, Krankheitserreger zeigen in dieser Arbeit keinen Zusammenhang mit der NB1-Expression.

Insbesondere bei Patienten mit schweren Infektionen und Sepsis wurde in vielen Studien der Einfluß verschiedenster **Zytokine** auf Neutrophile untersucht, da man sich durch Kenntnis der Entzündungskaskade therapeutische Optionen erhofft. Neben G-CSF wurde eine gesteigerte Konzentration von **IFN- γ** im Serum bei Sepsis gemessen [Barth et al. 2001], so daß möglicherweise auch IFN- γ die NB1-Expression beeinflusst. Da es bei PV-Patienten unter der Therapie mit **Interferon- α** zu einer Reduktion der NB1-mRNA auf das Niveau gesunder Kontrollpersonen innerhalb von 6 Monaten kam, wird ein langfristiger gegenregulatorischer Effekt, wahrscheinlich auf Stammzebene, vermutet, der die Überempfindlichkeit gegenüber G-CSF vermindert [Fruehauf et al. 2003].

Für die Funktion Neutrophiler sind auch **Mastzellen** relevant, da über die Degranulation und Freisetzung von Histamin, IL-8, NCF (Neutrophilenchemotaktischer Faktor) es u.a. zu einer Aktivierung und verbessertem Rolling Neutrophiler kommt [Kubes und Kanwar 1994; Perretti 1998]. Somit könnte auch z.B. Histamin die NB1-Expression beeinflussen.

Verschiedene Autoren vermuten einen Einfluß von **Östrogenen** auf die NB1-Expression. Bei Frauen wird eine höhere NB1-Expression im Vergleich zu Männern beschrieben, die im Alter abnimmt [Matsuo et al. 2000]. Bei schwangeren Frauen ist sowohl der Anteil der NB1+ Neutrophiler als auch die NB1-Expression pro Neutrophilem im Vergleich zu gesunden Frauen und Männern signifikant erhöht. Zudem ist eine zusätzliche Expression von NB1 auf Monozyten während der Schwangerschaft beschrieben [Caruccio et al. 2003; Taniguchi et al. 2004]. Bei Neutrophilen aus Nabelschnurblut läßt sich eine signifikant gesteigerte NB1-Expression und eine vermehrte Menge an mRNA im Vergleich zu gesunden Erwachsenen nachweisen [Stroncek et al. 1998a; Matsuo et al. 2000; Caruccio et al. 2003; Taniguchi et al. 2004; Wolff 2005; Wolff et al. 2006], wobei bei Mädchen mehr NB1-mRNA als bei Jungen vorliegt [Wolff 2005; Wolff et al. 2006]. Diese gesteigerte Expression während der Schwangerschaft und bei Frauen wird von vielen Autoren mit dem veränderten Hormonhaushalt erklärt, wobei insbesondere Östrogene als relevant gelten [Matsuo et al. 2000; Caruccio et al. 2003; Taniguchi et al. 2004; Wolff 2005; Wolff et al. 2006]. Dies würde auch die Abnahme der NB1-Expression bei Frauen mit zunehmendem Alter erklären. Da Östrogene während einer Schwangerschaft erhöht sind, kann die vermehrte NB1-Expression während der Schwangerschaft und auf Neutrophilen aus Nabelschnurblut als konstitutionell und proliferationsbedingt angesehen werden. Die bei weiblichen Neugeborenen im Vergleich zu männlichen höhere NB1-Expression könnte auf ein vermehrtes Ansprechen z.B. auf Östrogene zurückgeführt werden. Östrogene scheinen daher eine langfristige Regulation der NB1-Expression zu bewirken, während G-CSF eher kurzfristig die NB1-Expression z.B. bei Infektionen steigert.

Zusammenfassend ist von einer komplexen und multifaktoriellen Regulation der NB1-Expression auszugehen, wobei G-CSF eine wesentliche Rolle zukommt. Eine vermehrte Expression auf Protein- und /oder mRNA Ebene wurde für PV, CML, essentielle Thrombozythämie, myelodysplastische Syndrom, Infektionen, sekundäre Leukozytosen, Gabe von G-CSF und Niereninsuffizienz beschrieben [Stroncek et al. 1998b; Matsuo et al. 2000; Klippel et al. 2001; Pahl 2002; Teofili et al. 2002, Klippel et al. 2003; Tefferi et al. 2003; Wolff et al. 2003; Florensa et al. 2004; Göhring et al. 2004; Passamonti et al. 2004; Zhang et al. 2004; Wolff 2005], wobei allen gemeinsam ist, daß entweder eine erhöhte G-CSF-Konzentration oder eine erhöhte Empfindlichkeit für G-CSF vorliegt. Man kann von einer genetisch festgelegten basalen NB1-Expression ausgehen [Matsuo et al. 2000; Wolff et al. 2003; Göhring et al. 2004], die von verschiedenen Faktoren modifiziert und der aktuellen Situation angepaßt werden kann. Die Expressionsänderungen scheinen durch veränderte Genexpression und Proteinprozessierung und weniger durch genetische Polymorphismen bedingt zu sein [Caruccio et al. 2003].

4.6 Mögliche Funktion des NB1-Glykoproteins

Die Funktion von NB1 ist noch unbekannt. Die signifikant gesteigerte NB1-Expression nach Stimulation mit G-CSF und unter septischen Bedingungen impliziert eine Beteiligung von NB1 in Entzündungsvorgängen und der Infektionsabwehr. Verschiedene mögliche Funktionen werden diskutiert:

Zur Frage nach einer Beteiligung von NB1 bei der **Adhäsion** wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt, die teilweise keinen Effekt, teilweise eine bessere Adhäsion NB1-negativer Neutrophiler zeigten [Stroncek et al. 1993b; 1994a]. Es wird eine Assoziation von NB1 mit CD11b, CD46, CD50 und CD66b vermutet, die für die Adhäsion an Endothelzellen relevant sind und teilweise auch in sekretorischen Vesikeln vorkommen [de Haas et al. 1994; Yong 1996; Minchinton et al. 1997]. Aufgrund der Ähnlichkeit mit der Ly-6 Proteinfamilie wird eine Beteiligung bei der Adhäsion an extrazelluläre Matrixproteine und der Zell-Zell-Adhäsion vermutet [Bettinotti et al. 2002]. Bezüglich der höheren NB1-Expression in der Schwangerschaft wird eine stärkere Neigung zur Adhäsion und eine pathogenetische Rolle bei der Präeklampsie und Thrombophilie diskutiert [Caruccio et al. 2003; Taniguchi et al. 2004]. Somit liegt eine Funktion von NB1 bei der Adhäsion nahe.

Aufgrund der GPI-Verankerung von NB1 in der äußeren Schicht der Phospholipiddoppelmembran besteht eine hohe laterale Mobilität [Goldschmeding et al. 1992], so daß eine Funktion als **Rezeptor** vermutet wird, möglicherweise auch eine Interaktion mit anderen Rezeptoren, z.B. Fc γ RIII und Fc γ RII. Für diese Funktion spricht auch die Beobachtung, daß bei aktivierten Neutrophilen NB1 von der Plasmamembran in Endo- und Lysosomen verlagert wurde [Goldschmeding et al. 1992].

Die rasche Hochregulation nach Stimulation u.a. mit G-CSF, fMLP und das Vorkommen von NB1 in den sekundären Granula Neutrophiler [Goldschmeding et al. 1992; de Haas et al. 1994; Stroncek et al. 1998a], könnten für eine Funktion bei der **Phagozytose**, Bakterizidie und der Chemotaxis sprechen. Mit fMLP stimulierte NB1+ Neutrophile wiesen eine bessere chemotaktische Reaktion auf als NB1-defiziente Neutrophile [Stroncek et al. 1994a]. Antikörper gegen NB1 beeinflussten die chemotaktische Funktion aber nicht [Bux et al. 1993]. Es wird sowohl eine unveränderte [Bartůňková et al. 1997] als auch verminderte [Nusbacher et al. 1979; Bux et al. 1993] Phagozytosefähigkeit bei Inkubation mit Antikörpern gegen NB1 berichtet. Nach G-CSF-Applikation ist eine verbesserte Phagozytosefunktion Neutrophiler beschrieben [Stroncek et al. 1998b]. NB1 könnte daher eine wichtige Funktion im Rahmen der Phagozytose, insbesondere nach Aktivierung durch Bakterienbestandteile und G-CSF, haben.

Versuche mit spezifischen Antikörpern gegen NB1 zeigten eine mögliche Funktion bei der Bildung von **ROS** [Bartůňková et al. 1997]. Nach Gabe von G-CSF kommt es zu einer Degranulation und vermehrter

ROS-Bildung Neutrophiler [de Haas et al. 1994; Muller Kobold et al. 1998; Wolach et al. 2000]. Neutrophile septischer Patienten weisen eine signifikant höhere NB1-Expression, Phagozytosefähigkeit und gesteigerte ROS-Bildung auf. Zudem besteht eine Korrelation von ROS-Bildung, erhöhter Expression von Aktivierungsmarkern mit einer höheren Überlebensrate [Martins et al. 2003]. Damit könnte NB1 relevant für die Bildung von ROS sein.

G-CSF führt zu einer vermehrten **Migration** Neutrophiler durch Gefäßendothel. Die Migration in Orte lokaler Infektion ist unter dem Einfluß von G-CSF auch ohne chemotaktische Gradienten über eine vermehrte Expression spezifischer Adhäsionsmoleküle möglich [Yong 1996; Drossou-Agakidou et al. 1998; Nussler et al. 1999]. Der uPA Rezeptor, ein weiteres Mitglied der Ly-6-Genfamilie, ist ebenfalls an der Zellmigration beteiligt [Plesner et al. 1997]. Die höhere NB1-Expression nach Gabe von G-CSF und bei Infektionen könnte daher auch einen Einfluß auf die Migration haben. Klempner und Gallin [1978] beschreiben zwei funktionelle Subpopulationen von Neutrophilen anhand deren Reaktion mit IgG-markierten Erythrozyten. Dabei fielen etwa 80% der Neutrophilen durch eine verstärkte Adhäsion, vermehrte Phagozytose und Bakterizide sowie ausgeprägtere Chemotaxis auf. Interessanterweise ließen sich in der Exsudationsflüssigkeit von Entzündungen fast 100% dieser Neutrophilen nachweisen. Man kann vermuten, daß es sich um NB1+ Zellen handelt, so daß sich in Entzündungsherden fast nur NB1+ Neutrophile nachweisen lassen müßten, was eine Funktion in der Migration und Abtötung von Mikroorganismen implizieren würde. Zur Überprüfung dieser Hypothese sind weitere Untersuchungen nötig.

Aufgrund der signifikant gesteigerten NB1-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene und der deutlich erhöhten Neutrophilenzahlen bei Infektionen, Verbrennungen, nach Gabe von G-CSF und bei Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen wird eine Funktion von NB1 in der **Hämatopoese** und insbesondere der Myeloproliferation diskutiert [Temerinac et al. 2000; Klippel et al. 2003; Wolff et al. 2003; Göhring et al. 2004]. Bereits in der Frühschwangerschaft werden von Trophoblasten, NK-Zellen, Lymphozyten und weiteren Zellen der Dezidua Zytokine (u.a. G-CSF, GM-CSF, IFN- γ) gebildet [Saito et al. 1993a; Jokhi et al. 1994]. Da diesen Zytokinen eine Funktion in der Entwicklung, Wachstum und Funktion der Plazenta zugeschrieben wird, NB1 nach Gabe von G-CSF und bereits ab der Frühschwangerschaft vermehrt exprimiert wird, wird für das NB1-GP eine physiologische proliferative Funktion diskutiert [Caruccio et al. 2003; Taniguchi et al. 2004; Wolff et al. 2006].

In vitro wiesen NB1-exprimierende Neutrophile ein schnelleres Wachstum und eine länger anhaltende Proliferation als NB1-defiziente auf, so daß es sich bei NB1 um ein Molekül mit proliferativer Wirkung handeln könnte [Mnjoyan et al. 2005]. Verschiedene Gene der Ly-6-Familie haben eine Funktion in der Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen oder werden in stark proliferierenden und/oder

malignen Zellen überexprimiert [Brakenhoff et al. 1995; Plesner et al. 1997; Pearson et al. 2000; de Nooij-van Dalen et al. 2003; Shetty et al. 2003]. Diese Befunde weisen auf eine Funktion von NB1-GP bei der Myelopoese und möglicherweise der Pathogenese myeloproliferativer Erkrankungen hin [Stroncek et al. 2004; Mnjoyan et al. 2005], wobei es sich auch um ein unspezifisches Merkmal klonaler Myeloproliferation handeln könnte [Sirhan et al. 2005]. Nach Gabe von G-CSF wird die Apoptose Neutrophiler gehemmt [Nussler et al. 1999; Basu et al. 2002], so daß NB1 möglicherweise durch die vermehrte Expression die Apoptose verzögert und damit die Effektivität der Immunantwort steigern kann.

Zusammenfassend ist bis heute die physiologische Funktion von NB1 nicht geklärt, doch die aus verschiedenen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse lassen vermuten, daß NB1 vorwiegend bei der Entzündungsregulation mit am ehesten proinflammatorischer Wirkung aufgrund der schnellen Hochregulation nach Gabe von G-CSF involviert ist. Bei viralen Infektionen wurde keine vermehrte Expression beobachtet, so daß NB1 hierbei eher eine untergeordnete Funktion hat. Da eine geringe oder fehlende NB1-Expression nicht mit einer gesteigerten Infektionsneigung verbunden ist, wird diese Funktion durch andere Proteine oder Mechanismen kompensiert.

4.7 Klinische Relevanz der Quantifizierung der NB1-Expression

Es lag nahe, die signifikant höhere NB1-Expression bei PV-Patienten zur Diagnose der Erkrankung zu verwenden. In verschiedenen Arbeiten wurde die Überexpression von PRV-1, einem Allel zu NB1, gezeigt. Für die klinische Routine eignet sich die Quantifizierung der NB1- bzw. CD177-mRNA besser als die Quantifizierung des Proteins, da sich durch die exponentielle Zunahme der Kopienzahl bei der Polymerasekettenreaktion geringere Überschneidungsbereiche zwischen Patienten und der Kontrollgruppe ergeben. Allerdings könnte die genetische Heterogenität mit fehlender oder geringer NB1-Expression auch hier Fehlerquelle für die Routine sein [Wolff et al. 2003].

Eine vermehrte Expression von CD177-mRNA ist auch bei anderen hämatologischen Erkrankungen beschrieben, so daß dies als nicht spezifisch für die PV, sondern als Zeichen einer abnormalen Neutrophilenbildung oder –freisetzung angesehen wird [Pahl 2002; Teofili et al. 2002; Klippel et al. 2003; Liu et al. 2003; Tefferi et al. 2003; Passamonti et al. 2004; Mnjoyan et al. 2005; Sirhan et al. 2005]. Damit könnte NB1 als diagnostischer Parameter zur Einschätzung der Neutrophilenbildung dienen. Die PRV-1-Expression korreliert mit der Fähigkeit der Vorläuferzellen, zirkulierende burst-forming Units endogen zu bilden (eBFU-E), so daß die Kombination aus beiden Tests einen der verlässlichsten Parameter für die Diagnose einer PV bildet, zusätzlich zu den bestehenden diagnostischen Methoden [Florensa et al. 2004]. Zudem ist die Quantifizierung der CD177-mRNA sinnvoll zur Differenzierung myeloproliferativer Erkrankungen von sekundären polyklonalen Erkrankungen [Cilloni et al. 2004].

Da G-CSF bei Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen signifikant höher exprimiert wird, wurde eine Anwendung als weiterer Parameter zur frühzeitigen Diagnostik diskutiert. Insbesondere zur frühzeitigen Erkennung von Infektionen und Sepsis bei Risikopatienten wurden viele Zytokine (IL-6, IL-8, IL-2) und andere Proteine untersucht, wobei nur wenige, z.B. Procalcitonin, sich in der klinischen Anwendung bewährten [Du et al. 2003]. Da bisher keine eindeutige Abhängigkeit der NB1-Expression von anderen Laborparametern wie CRP, Neutrophilenzahlen gezeigt werden konnte, wäre NB1 ergänzend zu diesen klinischen Routineparametern zu sehen.

Für den löslichen Fc γ RIIIb konnte eine Korrelation mit der Schwere der Erkrankung gezeigt werden [Muller Kobold et al. 1998]. Da sowohl der Fc γ RIIIb als auch NB1 in der Zellmembran GPI-verankert sind, wäre es interessant, ob auch NB1 als lösliches Protein im Serum nachweisbar ist und sich ein analoger Zusammenhang zeigen läßt.

Die frühe Diagnose einer Infektionen von Neugeborenen ist schwierig, da gängige Laborparameter wie das CRP relativ spät ansteigen und die Neutrophilenzahl aufgrund der verminderten Speicherpools bei Neugeborenen nicht verlässlich ist [Christensen et al. 1986; Wolach 1997; Küster et al. 1998]. Daher wurden diverse Parameter bei Neugeborenen untersucht. Für IL-6, IL-1-Rezeptorantagonist, IL-2, IL-8, TNF- α wurde ein vermehrtes Vorkommen im Plasma vor bzw. bei Beginn einer Infektion beschrieben [Ng et al. 1997; Küster et al. 1998; Martin et al. 2001; Nupponen et al. 2001]. Eine vermehrte Expression des Fc γ RI und CD11b auf Neutrophilen ist bei Infektionen Neugeborener beschrieben [Fjaertoft et al. 1999; Nupponen et al. 2001]. Für NB1 konnte kein Zusammenhang bezüglich der Expression auf Nabelschnurblut mit perinatalen Komplikationen gefunden werden, doch besteht bei Untersuchung der mRNA [Wolff et al. 2006], insbesondere bei weiblichen Neugeborenen, eine Hochregulation bei perinatalen Komplikationen.

Um die Bestimmung von NB1 in der klinischen Routine diagnostisch nutzen zu können, müßte ein schnelleres und einfacheres Verfahren entwickelt und eindeutige Normwerte definiert werden (können). Ein Ansatzpunkt hierzu wäre die Suche nach löslichem NB1 im Serum analog zum Fc γ RIIIb und eine einfache Nachweismethode.

5 Zusammenfassung

1. Es zeigt sich eine signifikante Steigerung der NB1-Expression auf Neutrophilen von Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen, nach Applikation von G-CSF bei gesunden Personen und bei Patienten mit Polyzythämia vera im Vergleich zu Neutrophilen von gesunden Personen. Auch bei Patienten mit rheumatoider Arthritis ist die NB1-Expression höher als bei Gesunden, allerdings deutlich geringer als bei den oben genannten Gruppen. Der Anteil der NB1-exprimierenden Neutrophilen nimmt bei schweren bakteriellen Infektionen und nach an mehreren Tagen erfolgter Gabe von G-CSF zu. Chronische Virushepatitiden als Beispiel für virale Infektionen zeigen keinen signifikanten Einfluß auf die NB1-Expression.
2. NB1 wird auf Neutrophilen aus Nabelschnurblut im Vergleich zu Neutrophilen von Erwachsenen signifikant vermehrt exprimiert. Auch der Anteil der NB1-exprimierenden Zellen ist in Nabelschnurblut signifikant höher als bei gesunden Erwachsenen. Die NB1-Expression auf Granulozyten aus Nabelschnurblut ist bei Mädchen höher als bei Jungen und bei Neugeborenen mit vorzeitigem Blasensprung höher als bei Neugeborenen ohne perinatale Komplikationen.
3. Die Expressionssteigerung von NB1 auf Neutrophilen nach Gabe von G-CSF und bei schweren bakteriellen Infektionen mit gleichzeitig erhöhten Konzentrationen von G-CSF im Plasma weist auf einen Einfluß von G-CSF auf die NB1-Expression hin. Auch die vermehrte Expression bei PV-Patienten kann auf einem Effekt von G-CSF beruhen, da eine Überempfindlichkeit der Vorläuferzellen auf hämatopoetische Wachstumsfaktoren als Ursache der Erkrankung vermutet wird.
4. Die quantitative Bestimmung der NB1-Expression auf Neutrophilen mittels Durchflußzytometrie eignet sich nicht als Laborparameter für eine frühzeitige Diagnose einer Infektion bei Neugeborenen, da bei Neugeborenen bereits eine hohe NB1-Expression vorliegt und die Durchführung für die klinische Routine noch zu aufwendig ist. Zudem traten nur bei wenigen der untersuchten Kinder postpartal Infektionen auf, so daß zur Klärung höhere Fallzahlen untersucht werden müßten.
5. Die Expressionssteigerung von NB1 bei bakteriellen Infektionen und nach Gabe von G-CSF läßt auf eine wesentliche Funktion des NB1-Glykoproteins in der Abwehr vorwiegend bakterieller Infektionen schließen. In Zusammenschau mit der Literatur liegt eine Beteiligung des NB1-Glykoproteins bei Vorgängen der Adhäsion, Phagozytose und der Hämatopoese nahe.

6 Summary

1. The expression of NB1-gp is significantly upregulated on neutrophils of patients with severe bacterial infections, after application of G-CSF to healthy people and on neutrophils of patients with polycythemia vera compared to healthy individuals. NB1 expression is increased in patients with rheumatoid arthritis compared to healthy individuals but is lower than in the groups named above. The proportion of NB1 expressing neutrophils is elevated in severe bacterial infections and after stimulation with G-CSF for several days. Chronic viral hepatitis as an example for viral infections does not significantly influence neutrophil NB1 expression.
2. NB1 expression is significantly elevated on neutrophils separated from cord blood compared to neutrophils from adults. Also the proportion of NB1-expressing cells is significantly higher in cord blood than in blood of healthy adults. NB1-expression on neutrophils from cord blood is higher in female than in male newborns and more elevated in cases with premature rupture of the amniotic membrane than in cases without perinatal complications.
3. The increased expression of NB1 on neutrophils after stimulation with G-CSF and in severe bacterial infections is associated with elevated G-CSF levels in plasma and therefore suggests an influence of G-CSF on the expression of NB1-gp. The upregulation of NB1 expression in patients with polycythemia vera also may be an effect of G-CSF since hypersensitivity of progenitor cells to hematopoietic growth factors is thought to be an important reason of polycythemia vera.
4. Quantitative determination of NB1 expression by flow cytometry is not a suitable marker for an early diagnosis of infection in newborns because newborns already show an elevated NB1 expression and feasibility still is too complicated for routine diagnostic. Owing to very low numbers of newborns developing postpartal infections more cases should be studied.
5. The significantly increased NB1 expression in cases of bacterial infections and after application of G-CSF suggests an essential function of the NB1-gp in the defence mainly of bacterial infections. Regarding the present literature a role of NB1 in the processes of adhesion, phagocytosis and hematopoiesis seems to be obvious.

7 Literaturverzeichnis

- Aman MJ, Stockdreher K, Thews A, Kienast K, Aulitzky WE, Färber L, Haus U, Koci B, Huber C, Peschel C.** Regulation of immunomodulatory functions by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in vivo. *Ann Hematol* 1996; 73: 231-238
- Anderson CL, Looney RJ.** Human leukocyte Ig Fc receptors. *Immunol Today* 1986; 7: 264-266
- Araki N, Nose Y, Kohsaki M, Mito H, Ito K.** Anti-granulocyte antibody screening with extracted granulocyte antigens by a micro-mixed passive hemagglutination method. *Vox Sang* 1999; 77(1): 44-51
- Arnaout A.** Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 1990; 75(5): 1037-1050
- Avalos BR, Gasson JC, Hedvat C, Quan SG, Baldwin GC, Weisbart RH, Williams RE, Golde DW, DiPersio JF.** Human granulocyte-colony stimulating factor: biologic activities and receptor characterization on hematopoietic cells and small cell lung cancer cell lines. *Blood* 1990; 75(4): 851-857
- Barclay AN, Birkeland ML, Brown MH, Beyers AD, Davis SJ, Chamorro Somoza, Williams AF (Hrsg.).** The leucocyte antigens. in: *The Leucocyte Antigen Facts Book* 1993: 124-128, 132-134, 136-138, 140-141, 170-173, 240-241, 244-245
- Barth E, Fischer G, Schneider EM, Wollmeyer J, Georgieff M, Weiss M.** Differences in the expression of CD64 and mCD14 on polymorphonuclear cells and on monocytes in patients with septic shock. *Cytokine* 2001; 14(5): 299-302
- Bartůňková J, Araujo A, Hrusák O, šedivá A.** Autoimmunity to polymorphonuclears: functional consequences of the binding of antibodies to membrane and cytoplasmic target antigens of polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Immunol* 1997; 17(6): 455-461
- Basu S, Hodgson G, Zhang HH et al.** "Emergency" granulopoiesis in G-CSF-deficient mice in response to candida albicans infection. *Blood* 2000; 95: 3725-3733
- Basu S, Hodgson G, Katz , Dunn AR.** Evaluation of the role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood* 2002; 100(3): 354-361
- Benjamin CF, Silva JS, Fortes ZB, Oliveira MA, Ferreira SH, Cunha FQ.** Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infection and Immunity* 2002; 70(7): 3602-3610
- Bensinger WI, Price TH, Dale DC, Appelbaum FR, Clift R, Lilleby K, Williams B, Storb R, Thomas ED, Buckner CD.** The effects of daily recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration on normal granulocyte donors undergoing leukapheresis. *Blood* 1993; 81(7): 1883-1888
- Berdel WE, Danhauser-Riedl S, Steinhäuser G, Winton EF.** Various human hematopoietic growth factors (Interleukin-3, GM-CSF, G-CSF) stimulate clonal growth of nonhematopoietic tumor cells. *Blood* 1989; 73: 80-83
- Bettinotti MP, Olsen A, Stroncek D.** The use of bioinformatics to identify the genomic structure of the gene that encodes neutrophil antigen NB1, CD177. *Clin Immunol* 2002; 102(2):138-144
- Bierling P, Poulet E, Fromont P, Seror T, Bracq C, Duedari N.** Neutrophil-specific antigen and gene frequencies in the french population. *Transfusion* 1990; 30: 848-849
- Bock O, Serinsöz E, Neusch M, Schlué Jerome, Kreipe H.** The polycythaemia rubra vera-1 gene is constitutively expressed by bone marrow cells and does not discriminate polycythaemia vera from reactive and other chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 2003; 123(3): 472-474
- Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA.** Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1997; 112: 235-243
- Brakenhoff RH, Gerretsen M, Knippels EM, van Dijk M, van Essen H, Weghuis DO, Sinke RJ, Snow GB, van Dongen GA.** The human E48 antigen, highly homologous to the murine Ly-6 antigen ThB, is a GPI-anchored molecule apparently involved in keratinocyte cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 1995; 129(6): 1677-1689
- Buckle AM, Hogg N.** The effect of IFN-g and colony-stimulating factors on the expression of neutrophil cell membrane receptors. *J Immunol* 1989; 143(7): 2295-2301

- Bux J, Kissel K, Nowak K, Spengel U, Müller-Eckardt C.** Autoimmune neutropenia: clinical and laboratory studies in 143 patients. *Ann Hematol* 1991; 63: 249-252
- Bux J, Jung K-D, Müller-Eckhardt G, Müller Eckhardt C.** Granulozytenspezifische und HLA-Antikörper während der Schwangerschaft: Häufigkeit und klinische Bedeutung. *Beitr Infusionsther* 1992a; 30: 446-449
- Bux J, Sohn M, Hachmann R, Mueller-Eckhardt C.** Quantitation of granulocyte antibodies in sera and determination of their binding sites. *Br J Haematol* 1992b; 82: 20-25
- Bux J, Jung KD, Kauth T, Mueller-Eckhardt C.** Serological and clinical aspects of granulocyte antibodies leading to alloimmune neonatal neutropenia. *Transfusion Medicine* 1992c; 2: 143-149
- Bux J, Dickmann JO, Stockert U, Mueller-Eckhardt C.** Influence of granulocyte antibodies on granulocyte function. *Vox Sang* 1993; 64: 220-225
- Bux J, Hartmann C, Mueller-Eckhardt C.** Alloimmune neonatal neutropenia resulting from immunization to a high-frequency antigen on the granulocyte Fc γ receptor III. *Transfusion* 1994; 34(7): 608-611
- Bux J, Stein EL, Santoso S, Müller-Eckhardt C.** NA-gene frequencies in the German population, determined by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Transfusion* 1995; 35(1): 54-57
- Bux J, Becker F, Seeger W, Kilpatrick D, Chapman J, Waters A.** Transfusion-related acute lung injury due to HLA-A2-specific antibodies in recipient and NB1-specific antibodies in donor blood. *Br J Haematol* 1996; 93: 707-713
- Bux J, Stein EL, Bierling P, Fromont P, Clay M, Stroncek D, Santoso S.** Characterization of a new alloantigen (SH) on the human neutrophil Fc γ RIIIb. *Blood* 1997; 89(3): 1027-1034
- Bux J, Chapman J.** Report on the second international granulocyte serology workshop. *Transfusion* 1997; 37: 977-983
- Bux J, Ernst-Schlegel M, Rothe B, Schäfer H, Santoso S.** Carbimazole-dependent antibodies in patients with carbimazole-induced anemia and neutropenia. *Blood* 1998; 92: 524a
- Bux J.** Nomenclature of granulocyte antigens. *Transfusion* 1999a; 39: 662-663
- Bux J.** Granulocyte antibody-mediated neutropenias and transfusion reactions. *Infus Ther Transfus Med* 1999b; 26: 152-157
- Bux J, Hofmann C, Welte K.** Serum G-CSF levels are not increased in patients with antibody-induced neutropenia unless they are suffering from infectious diseases. *Br J Haematol* 1999c; 105: 616-617
- Bux J.** Immunneutropenien. in: Wahn U, Seger R, Wahn V (Hrsg.): *Pädiatrische Allergologie und Immunologie*, Verlag Urban&Fischer 1999d; 3. Auflage: 682-686
- Bux J.** Molecular genetics of granulocyte polymorphisms. *Vox Sanguinis* 2000; 78(Suppl 2): 125-130
- Bux J.** Molecular nature of antigens implicated in immune neutropenias. *Int J Hematol* 2002a; 76(Suppl 1): 399-403
- Bux J.** Transfusion-related acute lung injury: a neglected but life-threatening transfusion reaction. *Infus Ther Transfus Med* 2002b; 22: 271-276
- Bux J, Cassens U, Dielschneider T, Duchscherer M, Edel E, Eichler H, Haas C, Moog R, Peschke H, Peters C, Ryzenkov I, Schlenke P, Ullrich H, Wiesneth M.** Tolerance of granulocyte donors towards granulocyte colony-stimulating factor stimulation and of patients towards granulocyte transfusions: results of a multicentre study. *Vox Sang* 2003; 85: 322-325
- Calhoun DA, Chegini N, Polliotti BM, Gersing JA, Miller RK, Christensen RD.** Granulocyte colony-stimulating factor in preterm and term pregnancy, parturition, and intra-amniotic infection. *Obstet Gynecol* 2001; 97: 229-234
- Calkins CM, Bensard DD, Patrick DA, Karrer FM, McIntyre RC.** Altered neutrophil function in the neonate protects against sepsis-induced lung injury. *J Pediatr Surg* 2002; 37(7): 1042-1047
- Campbell IK, Novak U, Cebon J, Layton JE, Hamilton JA.** Human articular cartilage and chondrocytes produce hemopoietic colony-stimulating factors in culture in response to IL-1. *J Immunol* 1991; 147(4): 1238-1246
- Carr R, Davies JM.** Abnormal FcRIII expression by neutrophils from very preterm neonates. *Blood* 1990; 76(3): 607-611

- Carrington PA, Walsh SE, Houghton JB.** Use of frozen neutrophils in serological testing. *Vox Sang* 1989; 57: 67-71
- Caruccio L, Bettinotti M, Matsuo K, Sharon V, Stroncek D.** Expression of human neutrophil antigen-2a (NB1) is increased in pregnancy. *Transfusion* 2003; 43(3): 357-363
- Caruccio L, Walkovich K, Bettinotti M, Schuller R, Stroncek D.** CD177 polymorphisms: correlation between high-frequency single nucleotide polymorphisms and neutrophil surface protein expression. *Transfusion* 2004; 44: 77-82
- Casale TB, Carolan EJ.** Cytokine-induced sequential migration of neutrophils through endothelium and epithelium. *Inflamm Res* 1999; 48: 22-27
- Caspar CB, Seger RA, Burger J, Gmur J.** Effective stimulation of donors for granulocyte transfusions with recombinant methionyl granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1993; 81: 2866-2871
- Choy EHS, Panayi GS.** Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001; 344: 907-916
- Christensen RD, Harper TE, Rothstein G.** Granulocyte-macrophage progenitor cells in term and preterm neonates. *J Pediatr* 1986; 109(6): 1047-1051
- Chun H, Cipolone K, Procter J, Stroncek DF.** Granulocyte storage and antigen stability. *Transfusion* 1999; 39: 983-990
- Cilloni D, Carturan S, Gottardi E, Messa F, Fava M, Defilippi I, Arruga F, Saglia G.** Usefulness of the quantitative assessment of PRV-1 gene expression for the diagnosis of polycythemia vera and essential thrombocythemia patients. *Blood* 2004; 103: 2428
- Clague HD, Fung YL, Minchinton RM.** Human neutrophil antigen-4a gene frequencies in an Australian population, determined by a new polymerase chain reaction method using sequence-specific primers. *Transf Med* 2003; 13: 149-152
- Clay M, Kline W, McCullough J.** The frequency of granulocyte-specific antibodies in postpartum sera and a family study of the 6B antigen. *Transfusion* 1984; 24(3): 252-255
- Clement L.T., Lehmeier J.E., Gartland G.L.** Identification of neutrophil subpopulations with monoclonal antibodies. *Blood* 1983; 61: 326-332
- Crovatto M, Pozzato G, Zorat F, Pussini E, Nascimben F, Baracetti S, Grando MG, Mazzaro C, Reitano M, Modolo ML, Martelli P, Spada A, Santini G.** Peripheral blood neutrophils from hepatitis C virus-infected patients are replication sites of the virus. *Haematologica* 2000; 85(4): 356-361
- Davies A, Simmons DL, Hale G, Harrison RA, Tighe H, Lachmann PJ, Waldmann H.** CD59, a ly-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. *J Exp Med* 1989; 170: 637-654
- Davoren A, Curtis BR, Shulman IA, Mohrbacher AF, Bux J, Kwiatkowska BJ, McFarland JG, Aster RH.** TRALI due to granulocyte-agglutinating human neutrophil antigen-3a (5b) alloantibodies in donor plasma: a report of 2 fatalities. *Transfusion* 2003; 43: 641-645
- de Haas M, Kerst JM, van der Schoot CE, Calafat J, Hack CE, Nuijens JH, Roos D, van Oers RHJ, von dem Borne AEGKr.** Granulocyte colony-stimulating factor administration to healthy volunteers: analysis of the immediate activating effects on circulating neutrophils. *Blood* 1994; 84(1): 3885-3894
- de Haas M, von dem Borne AEGK.** Neutrophil-specific alloantigen NB1, finally cloned but many questions remain. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1299-1300
- de Nooij-van Dalen AG, van Dongen GA, Smeets SJ, Nieuwenhuis EJ, Stigter-van Walsum M, Snow GB, Brakenhoff RH.** Characterization of the human Ly-6 antigens, the newly annotated member Ly-6K included, as molecular markers for head-and-neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 103(6): 768-774
- Demetri GD, Griffin JD.** Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 1991; 78(11): 2791-2808
- Dittmar K, Lim JB, Caruccio L, Bettinotti M, Stroncek D.** Assessment of the relative number of copies of the gene encoding human neutrophil antigen-2a (HNA-2a), CD177, and a homologous pseudogene by quantitative real-time PCR. *Immunohematol.* 2003; 19(4): 122-126
- Drossou-Agakidou V, Kanakoudi-Tsakalidou F, Sarafidis K, Taparkou A, Tzimouli V, Tsandali H, Kremenopoulos G.** Administration of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor to septic

neonates induces neutrophilia and enhances the neutrophil respiratory burst and b2 integrin expression. Results of a randomized controlled trial. *Eur J Pediatr* 1998; 157: 583-588

Du B, Pan J, Chen D, Li y. Serum procalcitonin and interleukin-6 levels may help to differentiate systemic inflammatory response of infectious and non-infectious origin. *Chin Med J* 2003; 116(4): 538-542

Dutcher JP, Schiffer CA, Johnston GS, Papenburg D, Daly PA, Aisner J, Wiernik PH. Alloimmunization prevents the migration of transfused indium-111-labeled granulocytes to sites of infection. *Blood* 1983; 62(2): 354-360

Enders G, Brooks W, von Jan N, Lehn N, Bayerdörfer E, Hatz R. Expression of adhesion molecules on human granulocytes after stimulation with helicobacter pylori membrane proteins: Comparison with membrane proteins from other bacteria. *Infection and Immunity* 1995; 63(7):2473-2477

Ertel W, Kremer J-P, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, Schildberg FW. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood* 1995; 85(5): 1341-1347

Felix JK, Calhoun DA. Neonatal alloimmune neutropenia in premature monozygous twins. *Pediatrics* 2000; 106(2): 340-342

Fjaertoft G, Hakansson L, Ewald U, Foucard T, Venge P. Neutrophils from term and preterm newborn infants express the high affinity Fcγ-receptor I (CD64) during bacterial infections. *Pediatr Res* 1999; 45(6): 871-876

Fleit HB, Kuhnle M. Biochemical characterization of an Fcγ receptor purified from human neutrophils. *J Immunol* 1988; 140: 3120-3125

Flesch BK, Maas W, Neppert J. NA1/NA2 antisera inhibit FcγRI but not FcγRII-mediated phagocytosis. *Vox Sang* 1998; 75: 247-252

Florensa L, Besses C, Zamosa L, Bellosillo B, Espinet B, Serrano S, Woessner S, Solé F. Endogenous erythroid and megakaryocytic circulation progenitors, HUMARA clonality assay, and PRV-1 expression are useful tools for diagnosis of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood* 2004; 103: 2427

Franzke A, Piao W, Lauber J, Gatzlaff P, Konecke C, Hansen W, Schmitt-Thomsen A, Hertenstein B, Buer J, Ganser A. G-CSF as immune regulator in T cells expressing the G-CSF receptor: implications for transplantation and autoimmune diseases. *Blood* 2003; 102: 734-739

Fruehauf S, Topaly J, Villalobos M, Veldwijk MR, Laufs S, Ho AD. Quantitative real-time polymerase chain reaction shows that treatment with interferon reduces the initially upregulated PRV-1 expression in polycythemia vera patients. *Haematologica* 2003; 88: 349-351

Fung YL, Pitcher LA, Willett JE, Reed C, Mison L, Bux J, Eiber G, Minchinton RM. Alloimmune neonatal neutropenia linked to anti-HNA-4a. *Transfusion Medicine* 2003; 13: 49-52

Füssle R, Sziegoleit A. Sepsis/SIRS. in: *Praxis der Infektiologie: Organbezogene Diagnostik und Therapie*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2001; 1. Auflage 2001: 211-213;

Gericke GH, Ericson SG, Pan L, Mills LE, Guyre PM, Ely P. Mature polymorphonuclear leukocytes express high-affinity receptors for IgG (Fc gamma RI) after stimulation with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *J Leukoc Biol* 1995; 57(3): 455-461

Gerlich WH, Schäfer S. Hepadnaviren: Hepatitis-B-Virus. in: *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie virologischer Krankheitsbilder*; Georg Thieme Verlag Stuttgart 2002; 1. Auflage: 191-210

Gessler P, Neu S, Brockmann Y, Speer CP. Decreased mRNA expression of G-CSF receptor in cord blood neutrophils of term newborns. *Biol Neonate* 2000; 77: 168-173

Gessner JE, Grussenmeyer T, Kolanuss W, Schmidt RE. The human low affinity immunoglobulin G Fc Receptor III-A and III-B genes. *J Biol Chem* 1995; 270(3): 1350-1361

Girlando P, Zuppa AA, Romagnoli C, Tortorolo G. Transient effect of granulocyte colony-stimulating factor in allo-immune neonatal neutropenia. *Biol Neonate* 2000; 78: 277-280

Gittinger FS, Bux J. Study of four families concerning the linkage and inheritance of the allele encoding the granulocyte-specific antigen HNA-1c (SH). *Transfusion* 2001; 41: 847-848

Gittinger FS, Schindler-Wuepper L, Kissel K, Bux J. Quantitative determination of Fcγ receptor genes by means of fluorescence-based real-time polymerase chain reaction. *Tissue Antigens* 2002; 60: 64-70

- Goehring K*, Wolff J*, Doppl W, Schmidt KL, Pralle H, Sibelius U, Bux J *zu gleichen Teilen.** Neutrophil CD177 (NB1 gp, HNA-2a) expression is increased in severe bacterial infections and polycythaemia vera. *Br J Haematol* 2004; 126: 252-254
- Goldschmeding R, van Dalen CM, Faber N, Calafat J, Huizinga TW, van der Schoot CE, Clement LT, von dem Borne AEG.** Further characterization of the NB1 antigen as a variably expressed 56-62 kD GPI-linked glycoprotein of plasma membranes and specific granules of neutrophils. *Br J Haematol* 1992; 81: 336-345
- Gross WL.** Rheumatoide Arthritis (RA). in: *Innere Medizin*; Hrsg. Classen M, Diehl V, Kochsiek K; Georg Thieme Verlag Stuttgart 1998; 4. Auflage: 477-485
- Gross-Weege W, Dumon K, Dahmen A, Schneider EM, Roher HD.** Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) serum levels in surgical intensive care patients. *Infection* 1997; 25(4): 213-216
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC.** Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 1998; 92(9): 3007-3017
- Hansen PB, Kjaersgaard E, Johnsen HE, Gram J, Pedersen M, Nikolajsen K, Hansen NE.** Different membrane expression of CD11b and CD14 on blood neutrophils following in vivo administration of myeloid growth factors. *Br J Haematol* 1993; 85(1): 50-56
- Hayashida K, Nanki T, Girschick H, Yavuz S, Ochi T, Lipsky PE.** Synovial stromal cells from rheumatoid arthritis patients attract monocytes by producing MCP-1 and IL-8. *Arthritis Res* 2001; 3(2): 118-126
- Heins M.** Quality control in the preanalytical phase of flow cytometrie. *Infus Ther Transfus Med* 1996; 23: 107-108
- Hessner MJ, Curtis BR, Endean DJ, Aster RH.** Determination of neutrophil antigen gene frequencies in five ethnic groups by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Transfusion* 1996; 36: 895-899
- Hibbs ML, Tolvanen M, Carpén O.** Membrane-proximal Ig-like domain of FcγRIII (CD16) contains residues critical for ligand binding. *J Immunol* 1994; 152: 4466-4474
- Hirsh M, Mahamid E, Bashenko Y, Hirsh I, Krausz MM.** Overexpression of the high-affinity Fcγgamma receptor (CD64) is associated with leucocyte dysfunction in sepsis. *Shock* 2001; 16(2): 102-108
- Höffkes H-G, Schmidtke G.** Qualitätskontrolle durchflußzytometrischer Meßverfahren mittels fluoreszenter Partikel ("beads"). *Infus Ther Transfus Med* 1996; 23: 115-116
- Hotchkiss RS, Karl IE.** The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348(2): 138-150
- Huizinga TWJ, van der Schoot CE, Jost C, Klaassen R, Kleijer M, von dem Borne AEGKr, Roos D, Tetteroo PAT.** The PI-linked receptor FcRIII is released on stimulation of neutrophils. *Nature* 1988; 333: 667-669
- Huizinga TWJ, Kerst JM, Nuyens JH, Vlug A, von dem Borne AEGKr, Roos D, Tetteroo PAT.** Binding characteristics of dimeric IgG subclass complexes to human neutrophils. *J Immunol* 1989; 142: 2359-2364
- Huizinga TWF, Roos D, von dem Borne AEGKr.** Neutrophil Fcγ receptors: a two-way bridge in the immune system. *Blood* 1990a; 75(6): 1211-1214
- Huizinga TWJ, Dolman KM, van der Linden NJM, Kleijer M, Nuijens JH, von dem Borne AEGK, Roos D.** Phosphatidylinositol-linked FcRIII mediates exocytosis of neutrophil granule proteins, but does not mediate initiation of the respiratory burst. *J Immunol* 1990b; 144: 1432-1437
- Huizinga TWJ, de Haas M, Kleijer M, Nuijens JH, Roos D, von dem Borne AEGK.** Soluble Fcγ receptor III in human plasma originates from release by neutrophils. *J Clin Invest* 1990c; 86: 416-423
- Huizinga TWJ, de Haas M, van Oers MH, Kleijer M, Vile H, van der Wouw PA, Moulijn A, van Weezel H, Roos D, von dem Borne AE.** The plasma concentrations of suluble Fc-gamma RIII is related to production of neutrophils. *Br J Haematol* 1994; 87(3): 459-463
- Johansson P, Andréasson B, Safai-Kutti S, Wennström L, Palmqvist L, Ricksten A, Lindstedt G, Kutti J.** The presence of a significant association between elevated PRV-1 mRNA expression and low plasma erythropoietin concentration in essential thrombocythaemia. *Eur J Haematol* 2003; 70: 358-362

- Johansson P, Ricksten A, Wasslavik C, Johansson B, Andreasson B.** The effects of hydroxyurea on PRV-1 expression in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Haematologica* 2004; 89(10): 1264-1266
- Jokhi PP, King A, Loke YW.** Production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human trophoblast cells and by decidual large granular lymphocytes. *Hum Reprod* 1994; 9: 1660-1669
- Kabutomori O, Iwatani Y, Koh T, Yanagihara T.** CD16 antigen density on neutrophils in chronic myeloproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 1997; 107(6): 661-664
- Kawakami M, Tsutsumi H, Kumakawa T, Abe H, Hirai M, Kurosawa S, Mori M, Fukushima M.** Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections. *Blood* 1990; 76(10): 1962-1964
- Kerst JM, van de Winkel JG, Evans AH, de Haas M, Slaper-Cortenbach IC, de Wit TP, von dem Borne AE, van der Schoot CE, van Oers RH.** Granulocyte colony-stimulating factor induces hFc gamma RI (CD64)-positive neutrophils via an effect on myeloid precursor cells. *Blood* 1993a; 81(6): 1457-1464
- Kerst JM, de Haas M, van der Schoot E et al.** Recombinant granulocyte colony-stimulating factor administration to healthy volunteers: induction of immunophenotypically and functionally altered neutrophils via an effect on myeloid progenitor cells. *Blood* 1993b; 82: 3265-3272
- Kissel K, Hofmann C, Gittinger FS, Daniels G, Bux J.** HNA-1a, HNA-1b, and HNA-1c (NA1, NA2, SH) frequencies in african and american blacks and in chinese. *Tissue Antigens* 2000a; 56(2):143-148
- Kissel K, Santoso S, Hofmann C, Stroncek D, Bux J.** Molecular basis of the neutrophil glycoprotein NB1 (CD177) involved in the pathogenesis of immune neutropenias and transfusion reactions. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1301-1309
- Kissel K, Scheffler S, Kerowgan M, Bux J.** Molecular basis of NB1 (HNA-2a, CD177) deficiency. *Blood* 2002; 99(11): 4231-4233
- Klebanoff SJ, Olszowski S, van Voorhis WC, Ledbetter JA, Waltersdorff AM, Schlechte KG.** Effects of gamma-Interferon on human neutrophils: protection from deterioration on storage. *Blood* 1992; 80(1): 225-234
- Kleine H-D, Freund M.** Monoklonale Antikörper und Immunmarkierung. *Infus Ther Transfus Med* 1996; 23: 109-110
- Klempner MS, Gallin JI.** Separation and functional characterization of human neutrophil subpopulations. *Blood* 1978; 51 (4): 659-669
- Kline WE, Press C, Clay M, Keashen-Schnell M, Hackel E, McCullough J.** Three sera defining a new granulocyte-monocyte-T-lymphocyte antigen. *Vox Sang* 1986; 50: 181-186
- Klippel S, Strunck E, Temerinac S, Kralovics R, Prchal JT, Grieshammer M, Heimpel H, Pahl HL.** Quantification of PRV-1 expression, a molecular marker for the diagnosis in PRV. *Blood* 2001; 98: 470a
- Klippel S, Strunck E, Busse CE, Behringer D, Pahl HL.** Biochemical characterization of PRV-1, a novel hematopoietic cell surface receptor, which is overexpressed in polycythemia rubra vera. *Blood* 2002; 100: 2441-2448
- Klippel S, Strunck E, Temerinac S, Bench AJ, Meinhardt G, Mohr U, Leichtle R, Green AR, Grieshammer M, Heimpel H, Pahl HL.** Quantification of PRV-1 mRNA distinguishes polycythemia vera from secondary erythrocytosis. *Blood* 2003; 102: 3569-3574
- Koene HR, de Haas M, Kleijer M, Roos D, von dem Borne AEGK.** NA-phenotype-dependent differences in neutrophil FcγRIIIb expression cause differences in plasma levels of soluble FcγRIII. *Br J Haematol* 1996; 93: 235-241
- Koene HR, Kleijer M, Roos D, de Haas M, von dem Borne AEGK.** FcγRIIIb gene duplication: evidence for presence and expression of three distinct FcγRIIIb genes in NA(1+,2+)SH(+) individuals. *Blood* 1998; 91(2): 673-679
- Komatsu H, Tsukimori K, Hata K, Satoh.** The characterization of superoxide production of human neonatal neutrophil. *Early Hum Dev* 2001; 65 (1): 11-19
- Kopko PM, Holland PV.** Transfusion-related acute lung injury. *Br J Haematol* 1999; 105: 322-329
- Korínková P, Májský A.** Granulocyte specificities detected by cytotoxicity and agglutination. *Transfusion* 1983; 23: 391-393

- Koyama Y, Imoto M, Fukuda Y, Nakano I, Hattori M, Urano F, Muzzillo DA, Nishimura D, Kato K, Kanzaki M.** Alcoholic hepatitis with hyperleukocytosis. *Jpn J Med.* 1991; 30(5): 473-476
- Kralovics R, Buser AS, Teo SS et al.** Comparison of molecular markers in a cohort of patients with chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2003; 102: 1869-1871
- Kubes P, Kanwar S.** Histamin induces leukocyte rolling in post-capillary venules. *J Immunol* 1994; 152: 3570-3577
- Küster H, Weiss M, Willeitner AE, Detlefsen S, Jeremias I, Zbojan J, Geiger R, Lipowsky G, Simbruner G.** Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation. *Lancet* 1998; 352: 1271-1277
- Kwon SW, Procter J, Dale JK, Strauss SE, Stroncek DF.** Neutrophil and platelet antibodies in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Vox Sang* 2003; 85: 307-312
- Lalezari P, Nussbaum M, Gelman S, Spaet TH.** Neonatal neutropenia due to maternal isoimmunization. *Blood* 1960; 15: 236-243
- Lalezari P, Murphy GB, Allen FH.** NB1, a new neutrophil-specific antigen involved in the pathogenesis of neonatal neutropenia. *J Clin Invest* 1971; 50: 1108-1115
- Lawlor KE, Campbell IK, Metcalf D, O'Donnell K, van Nieuwenhuijze A, Roberts AW, Wicks IP.** Critical role for granulocyte colony-stimulating factor in inflammatory arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101(31): 11398-11403
- Lehrer RJ, Ganz T.** Antimicrobial polypeptides of human neutrophils. *Blood* 1990; 76(11): 2169-2181
- Leizer T, Cebon J, Layton JE, Hamilton JA.** Cytokine regulation of colony-stimulating factor production in cultured human synovial fibroblasts: I. Induction of GM-CSF and G-CSF production by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Blood* 1990; 76(10): 1989-1996
- Li N, Halldén G, Hjendahl P.** A whole-blood flow cytometric assay for leukocyte CD11b expression using fluorescence signal triggering. *Eur J Haematol* 2000; 65: 57-65
- Liebert UG.** Resistenz, Immunabwehr und Pathogenese. in: *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie virologischer Krankheitsbilder*; Georg Thieme Verlag Stuttgart 2002; 1. Auflage: 29-41
- Lin M, Chen C et al.** Frequencies of neutrophil specific antigens among chinese in Taiwan. *Vox Sang* 1994; 66: 247
- Liu E, Jelinek J, Pastore YD, Guan Y, Prchal JF, Prchal JT.** Discrimination of polycythemia and thrombocytoses by novel, simple, accurate clonality assays and comparison with PRV-1 expression and BFU-E response to erythropoietin. *Blood* 2003; 101(8): 3294-3301
- Lucas G, Rogers S, Evans R, Hambley H, Win N.** Transfusion-related acute lung injury associated with interdonor incompatibility for the neutrophil-specific antigen HNA-1a. *Vox Sang* 2000; 79: 112-115
- Maciejewski J, Weber H, Neuhaus K, Wächter M, Elstner E, Seiler FR, Volk H-D.** Comparative analysis of the influences of IL-1, IL-3 and GM-CSF on the commitment of granulocyte-macrophage progenitors in vitro. *Ann Hematol* 1991; 63: 242-248
- Madyastha PR, Glassman AB, Levine DH.** Incidence of neutrophil antigens on human cord neutrophils. *Am J Reprod Immunol* 1984; 6(3): 124-127
- Maheshwari A, Christensen RD, Calhoun DA.** Resistance to recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in neonatal alloimmune neutropenia associated with anti-human neutrophil antigen-2a (NB1) antibodies. *Pediatrics* 2002; 109(4): 64-67
- Martin H, Olander B, Norman M.** Reactive hyperemia and interleukin 6, interleukin 8, and tumor necrosis factor- α in the diagnosis of early-onset neonatal sepsis. *Pediatrics* 2001; 108(4): 61-66
- Martins PS, Kallas EG, Neto MC, Dalboni MA, Blecher S, Salomão R.** Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock* 2003; 20(3): 208-212
- Matsuo K, Lin A, Procter JL, Clement L, Stroncek D.** Variations in the expression of granulocyte antigen NB1. *Transfusion* 2000; 40: 654-662
- Matsushima T, Saitoh T, Karasawa M, et al.** Effect of cytokines on growth and differentiation of leukaemic cells with translocation t(6;9)(p23;q34). *Br J Haematol* 2001; 115: 812-816

- McCullough J, Weiblen BJ, Clay ME, Forstrom L.** Effect of leukocyte antibodies on the fate in vivo of indium-111-labeled granulocytes. *Blood* 1981; 58(1): 164-170
- McCullough J., Clay M., Kline W.** Granulocyte Antigens and Antibodies. *Transfusion Medicine Reviews* 1987; 1(3): 150-160
- Mempel K, Pietsch T, Menzel T, Zeidler C, Welte K.** Increased serum levels of granulocyte colony-stimulating factor in patients with severe congenital neutropenia. *Blood* 1991; 77(9): 1919-1922
- Michinton RM, Noonan K, Johnson TJ.** Examining technical aspects of the monoclonal antibody immobilisation of granulocyte antigen assay. *Vox Sang* 1997; 73: 87-92
- Michon JM, Gey A, Moutel S, Tartour E, Meresse V, Fridman W, Teillaud JL.** In vivo induction of functional Fc γ RI (CD64) on neutrophils and modulation of blood cytokine mRNA levels in cancer patients treated with G-CSF (rMethHuG-CSF). *Br J Haematol* 1998; 100: 550-556
- Mnjoyan Z, Li J, Afshar-Khargan V.** Expression of polycythaemia rubra vera-1 decreases the dependency of cells on growth factors for proliferation. *Haematologica* 2005; 90(3): 405-406
- Morikawa K, Morikawa S, Nakamura M, Miyawaki T.** Characterization of granulocyte colony-stimulating factor receptor expressed on human lymphocytes. *Br J Haematol* 2002; 118: 296-304
- Muller Kobold AC, Zijlstra JG, Koene HR, de Haas M, Kallenberg CGM, Cohen Tervaert JW.** Levels of soluble Fc γ RIIIb correlate with disease severity in sepsis. *Clin Exp Immunol* 1998; 114: 220-227
- Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, Yamamoto O, Hirata Y, Kubota N, Oheda M, Nomura H, Yamazaki T.** The chromosomal gene structure and two mRNAs for human granulocyte colony-stimulating factor. *EMBO J* 1986; 5(3): 575-581
- Najfeld V, Fuchs S, Merando P, Lezon-Geyda K, Fruchtman S.** Fluorescence in situ hybridization analysis of the PRV-1 gene in polycythemia vera: implications for its role in diagnosis and pathogenesis. *Exp Hematol* 2003; 31: 118-121
- Nakamura H, Ueki Y, Sakito S, Matsumoto K, Yano M, Miyake S, Tominga T, Tominga M, Eguchi K.** High serum and synovial fluid granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2000; 18(6): 713-718
- Nebe CT.** Durchflußzytometrische Meßtechnik und Datenauswertung. *Infus Ther Transfus Med* 1996; 23: 111-113
- Nerl C.** Normale Zellverteilung im peripheren Blut. in: *Klinische Hämatologie*, Hrsg. Begemann H, Rastetter J; Georg Thieme Verlag Stuttgart 1993; 4. Auflage: 5-9
- Nerl C.** Zellen der Granulozytopoese. in: *Klinische Hämatologie*, Hrsg. Begemann H, Rastetter J; Georg Thieme Verlag Stuttgart 1993; 4. Auflage: 66-77
- Ng PC, Cheng SH, Chui KM, Fok TF, Wong MY, Wong W, Wong RPO, Cheung KL.** Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants. *Arch Dis Child* 1997; 77: F221-F227
- Nupponen I, Andersson S, Järvenpää A-L, Kautiainen H, Repo H.** Neutrophil CD11b expression and circulating interleukin-8 as diagnostic markers for early-onset neonatal sepsis. *Pediatrics* 2001; 108(1): 12-17
- Nusbacher J, MacPherson JL, Gore I, Grinberg R.** Inhibition of granulocyte erythrophagocytosis by HLA antisera. *Blood* 1979; 53(3): 350-357
- Nussler AK, Wittel UA, Nussler NC, Beger HG.** Leukocytes, the janus cells in inflammatory disease. *Langenbeck's Arch surg* 1999; 384: 222-232
- Ohto H, Matsuo Y.** Neutrophil-specific antigens and gene frequencies in the Japanese. *Transfusion* 1989; 29: 654
- Pahl HL.** Polycythaemia vera: will new markers help us answer old questions?. *Acta Haematol* 2002; 108: 120-131
- Passamonti F, Pietra D, Malabarba L, Rumi E, Della Porta MG, Malcovati L, Bonfichi M, Pascutto C, Lazzarino M, Cazzola M.** Clinical significance of neutrophil CD177 mRNA expression in Ph-negative chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 2004; 126(5): 650-656
- Pearson TC, Messinezy M, Westwood N, Green AR, Bench AJ, Green AR, Huntly BJP, Nacheva EP, Barbui T, Finazzi G.** A polycythemia vera update: Diagnosis, pathobiology, and treatment. *Hematology (Ann Soc Hematol Educ Program)* 2000; 51-68

- Perretti M.** Lipocortin 1 and Chemokine Modulation of Granulocyte and Monocyte Accumulation in Experimental Inflammation. *Gen Pharmac* 1998; 31(4): 545-552
- Perussia B, Dayton ET, Lazarus R, Fanning V, Trinchieri G.** Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG1 on human monocytic and myeloid cells. *J Exp Med* 1983; 158: 1092
- Plesner T, Behrendt N, Ploug M.** Structure, function and expression on blood and bone marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR. *Stem Cells* 1997; 15(6): 398-408
- Pocock CF, Lucas GF, Giles C, Vassiliou G, Cwynarski K, Rezvani K, Apperley JF, Goldman JM.** Immune neutropenia associated with anti-human neutrophil antigen-2a (NB1) antibodies following unrelated donor stem cell transplantation for chronic myeloid leukaemia: perpetuation by granulocyte colony-stimulating factor. *Br J Haematol* 2001; 113(2): 483-485
- Price TH, Bowden RA, Boeckh M, Bux J, Nelson K, Liles WC, Dale DC.** Phase I/II trial of neutrophil transfusions from donors stimulated with G-CSF and dexamethasone for treatment of patients with infections in hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2000; 95(11): 3302-3309
- Quayle JA, Watson F, Bucknall RC, Edwards SW.** Neutrophils from the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis express the high affinity immunoglobulin G receptor, Fc gamma RI (CD64): role of immune complexes and cytokines in induction of receptor expression. *Immunology* 1997; 91(2): 266-273
- Radtke H.** Quantitative Durchflußzytometrie: Absolutzellzahlmessungen in Vollblut und Blutkomponenten. *Infus Ther Transfus Med* 1996; 23: 114
- Ravetch JV, Perussia B.** Alternative membrane forms of Fc γ RIII (CD16) on human natural killer cells and neutrophils. *J Exp Med* 1989; 170: 481-497
- Ravetch JV, Bolland S.** IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 275-290
- Reijden HJ, von dem Borne AEGK, Verheugt FWA, Floor-van Gent AB, Melief CJM, Engelfriet CP.** Granulocyte-specific alloantigen loss in chronic granulocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1979; 43: 589-594
- Repp R, Valerius T, Sandler A, Gramatzki M, Iro H, Kalden JR, Platzer E.** Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc gamma RI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1991; 78(4): 885-889
- Riede U-N, Denk H, Schäfer H-E.** Virushepatitis. in: *Allgemeine und spezielle Pathologie*; Georg Thieme Verlag Stuttgart 1999; 4. Auflage: 754-758
- Riede U-N, Schäfer H-E.** Virale Läsionen. in: *Allgemeine und spezielle Pathologie*; Georg Thieme Verlag Stuttgart 1999; 4. Auflage: 249
- Ritter J.** Hämatologie. in: *Pädiatrie*; Hrsg. Speer CP, Gahr M; Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2001; 1. Auflage: 663-666
- Robins RA.** Counting antigens using antibodies. *Immunol Today* 2000; 21
- Roggendorf M.** Hepatitis-C-Virus. in: *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie virologischer Krankheitsbilder*; Georg Thieme Verlag Stuttgart 2002; 1. Auflage: 216-225
- Roos D.** Neutropils. *Encyclopedia of Immunology*, Band 3; Hrsg. Ivan M Roitt, Peter J Delves; Academic Press, London 1992; 2. Auflage: 1163-1166
- Ruchaud-Sparagano M-H, Drost EM, Donnelly SC, Bird MI, Haslett C, Dransfield I.** Potential pro-inflammatory effects of soluble E-selectin upon neutrophil function. *Eur J Immunol* 1998; 28: 80-89
- Sachs UJ, Bux J.** TRALI after the transfusion of cross-match-positive granulocytes. *Transfusion* 2003; 43: 1683-1686
- Saito S, Nishikawa K, Morii T, et al.** Cytokine production by CD16-CD56 bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua. *Int Immunol* 1993a; 5: 559-563
- Saito S, Motoyoshi K, Saito M, Kato Y.** Localization and production of human macrophage colony-stimulating factor (hM-CSF) in human placental and decidual tissues. *Lymphokine Cytokine Res* 1993b; 12(2): 101-107
- Salmon JE, Edberg JC, Kimberley Ruhepotential.** Fc γ Receptor II on human neutrophils: allelic variants have functionally distinct capacities. *J Clin Invest* 1990; 5: 1287-1295
- Salzberger B, Fätkenheuer G, Diehl V.** Sepsis und Sepsis-Syndrom. in: *Lehrbuch Innere Medizin*, Hrsg. Classen M, Diehl V, Kochsiek K; Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore 1998; 4. Auflage: 281-284

Sawada K, Sato N, Tarumi T, Sakai N, Koizumi K, Sakurama S, Ieko M, Yasukouchi T, Koyanagawa Y, Yamaguchi M, et al. Proliferation and differentiation of myelodysplastic CD34+ cells in serum-free medium: response to individual colony-stimulating factors. *Br J Haematol* 1993; 83(3): 349-358

Schacter B, Preis P, Kadushin JM, Herzig R, Gross S. Family studies of neutrophil alloantigens in bone marrow transplantation. *Tissue Antigens* 1980; 16(4): 267-273

Schmidt KL, Hellmich B, Manger B, Tillman K, Truckenbrodt H. Rheumatoide Arthritis. in: Checkliste Rheumatologie; Hrsg. Schmidt KL; Georg Thieme Verlag Stuttgart 2000; 2. Auflage: 101-118

Schmitt A, Reinhardt P, Schmitt M, Nowak-Harnau S, Maccari B, Schulz A, Kubanek B, Wiesneth M. Functional state of steroid- versus G-CSF-mobilized granulocytes: considerations about the storage of granulocyte concentrates for neutropenic patients. *Infus Ther Transfus Med* 2002; 29: 57-64

Scully RE, Mark EJ, McNeely WF, Ebeling SH. Case records of the Massachusetts general hospital: Case 40-1998. *N Engl J Med* 1998; 339(27): 2005-2012

Shetty J, Wolkowicz MJ, Digilio LC, Klotz KL, Jayes FL, Diekmann AB, Westbrook VA, Farris EM, Hao Z, Coorod SA, Flickinger CJ, Herr JC. SAMP14, a novel, acrosomal membrane-associated, glycosylphosphatidylinositol-anchored member of the Ly-6/urokinase-type plasminogen activator receptor superfamily with a role in sperm-egg interaction. *J Biol Chem* 2003; 278(33): 30506-30515

Silbernagel S. Blut: Immunabwehr, Entzündung. in: Silbernagel S, Lang F: Taschenatlas der Pathophysiologie; Georg Thieme Verlag Stuttgart 1998; 1. Auflage: 43-57

Silliman CC, Paterson AJ, Dickey WO, Stroncek DF, Popovsky MA, Caldwell SA, Ambruso DR. The association of biologically active lipids with the development of transfusion-related acute lung injury: a retrospective study. *Transfusion* 1997; 37: 719-725

Sirhan S, Lasho TL, Elliott MA, Tefferi A. Neutrophil polycythemia rubra vera-1 expression in classic and atypical myeloproliferative disorders and laboratory correlates. *Haematologica* 2005; 90(3): 406-408

Skubitz KM, Stroncek DF, Sun B. Neutrophil-specific antigen NB1 is anchored via a glycosylphosphatidylinositol linkage. *J Leukoc Biol* 1991; 49: 163-171

Snowden JA, Biggs JC, Milliken ST, Fuller A, Staniforth D, Passuello F, Renwick J, Brooks PM. A randomised, blinded, placebo-controlled, dose escalation study of the tolerability and efficacy of filgrastim for haemopoietic stem cell mobilisation in patients with severe active rheumatoid arthritis. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22(11): 1035-1041

Spiekermann K, Emmendoerffer A, Elsner J, Raeder E, Lohmann-Matthes ML, Prahst A, Link H, Freund M, Welte K, Roesler J. Altered surface marker expression and function of G-CSF-induced neutrophils from test subjects and patients under chemotherapy. *Br J Haematol* 1994; 87(1): 232-233

Spivak JL. Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management. *Blood* 2002; 100: 4272-4290

Stroncek DF, Skubitz KM, McCullough JJ. Biochemical characterization of the neutrophil-specific antigen NB1. *Blood* 1990; 75(3): 744-755

Stroncek DF, Shapiro RS, Filipovich AH, Plachta LB, Clay ME. Prolonged neutropenia resulting from antibodies to neutrophil-specific antigen NB1 following marrow transplantation. *Transfusion* 1993d; 33(2):158-163

Stroncek DF, Plachta LB, Herr GP, Dalmaso AP. Analysis of the expression of neutrophil-specific antigen NB1: characterization of neutrophils that react with but are not agglutinated by anti-NB1. *Transfusion* 1993b; 33(8): 656-660

Stroncek DF, Shankar RA, Herr GP. Quinine-dependent antibodies to neutrophils react with a 60-kD Glycoprotein on which neutropil-specific antigen NB1 ist located and an 85-kD glycosylphosphatidylinositol-linked-N-glycosylated plasma membrane glycoprotein. *Blood* 1993c; 81(10): 2758-2766

Stroncek DF, Shapiro RS, Filipovich AH, Plachta LB, Clay ME. Prolonged neutropenia resulting from antibodies to neutrophil-specific antigen NB1 following marrow transplantation. *Transfusion* 1993d; 33(2):158-163

Stroncek DF, Herr GP, Plachta LB. Neutrophil-specific antigen NB1 inhibits neutrophil-endothelial cell interactions. *J Lab Clin Med* 1994a; 123(2): 247-255

- Stroncek DF, Herr GP, Maguire RB, Eiber G, Clement LT.** Characterization of the neutrophil molecules identified by quinine-dependent antibodies from two patients. *Transfusion* 1994b; 34(11): 980-985
- Stroncek D, Clay M, Herr G, McCullough J.** Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) treatment decreases the expression of granulocyte alloantigens. *Transfusion* 1994c; 34(Suppl): 77S
- Stroncek DF, Leonard K, Gallin JI, Malech HL, Leitman SF.** Alloimmunization following granulocyte transfusions. *Transfusion* 1994d; 34(Suppl): 77S
- Stroncek DF, Shankar RA, Norén PA, Herr GP, Clement LT.** Analysis of the expression of NB1 antigen using two monoclonal antibodies. *Transfusion* 1996a; 36: 168-174
- Stroncek DF, Leonard K, Eiber G, Malech HL, Gallin JI, Leitman SF.** Alloimmunization after granulocyte transfusions. *Transfusion* 1996b; 36:1009-1015
- Stroncek DF, Shankar RA, Litz C, Clement L.** The expression of the NB1 antigen on myeloid precursors and neutrophils from children and umbilical cords. *Transfus Med* 1998a; 8(2): 119-123
- Stroncek DF, Jaszcz W, Herr GP, Clay ME, McCullough J.** Expression of neutrophil antigens after 10 days of granulocyte-colony-stimulating factor. *Transfusion* 1998b; 38: 663-668
- Stroncek D.** Neutrophil alloantigens. *Transfusion Medicine Reviews* 2002a; 16 (1): 67-75
- Stroncek D.** Neutrophil-specific antigen HNA-2a (NB1, CD177): serology, biochemistry, and molecular biology. *Vox Sang* 2002b; 83 (Suppl 1): 359-361
- Stroncek D, Bux J.** Is it time to standardize granulocyte alloantigen nomenclature?. *Transfusion* 2002; 42: 393-395
- Stroncek DF, Caruccio L, Bettinotti M.** CD177: a member of the Ly-6 gene superfamily involved with neutrophil proliferation and polycythemia vera. *J Transl Med* 2004; 2: 8-16
- Swartz DE, Seely AJE, Ferri L, Giannias B, Christou NV.** Decreased systemic polymorphonuclear neutrophil (PMN) rolling without increased PMN adhesion in peritonitis at remote sites. *Arch Surg* 2000; 135: 959-966
- Takahashi N, Nishida H, Kuratsuji T.** Fc gamma RI and Fc gamma RIII on polymorphonuclear leucocytes in cord blood. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 1994; 70(1): F31-F35
- Takano K, Kaganoi J, Yamamoto K, Takahashi A, Kido T, Sasada M.** Rapid and prominent up-regulation of high-affinity receptor for immunoglobulin G (Fc gamma RI) by cross-linking of beta 2 integrins on polymorphonuclear leukocytes. *Int J Hematol* 2000; 72(1): 48-54
- Taniguchi K, Nagata H, Katsuki T, Nakashima C, Onodera R, Hiraoka A, Takata N, Kobayashi M, Kambe M.** Significance of human neutrophil antigen-2a (NB1) expression and neutrophil number in pregnancy. *Transfusion* 2004; 44: 581-585
- Tefferi A, Lasho TL, Wolanskyj AP, Mesa RA.** Neutrophil PRV-1 expression across the chronic myeloproliferative disorders and in secondary or spurious polycythemia. *Blood* 2004; 103(9): 3547-3548
- Temerinac S, Klippel S, Strunck E, Roder S, Lubbert M, Lange W, Azema M, Meinhardt G, Schaefer HE, Pahl H-L.** Cloning of PRV-1, a novel member of the uPAR receptor superfamily, which is overexpressed in polycythaemia rubra vera. *Blood* 2000; 95(8): 2569-2576
- Teofili L, Martini M, Luongo M, Di Mario A, Leone G, De Stefano V, Larocca LM.** Overexpression of the polycythemia rubra vera-1 gene in essential thrombocytopenia. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4249-4254
- Vance BA, Huizinga TWJ, Wardwell K, Guyre PM.** Binding of monomeric human IgG defines an expression polymorphism of FcγRIII on large granular lymphocyte/natural killer cells. *J Immunol* 1993; 151: 6429-6439
- Verheugt FWA, von dem Borne AEGK, Décary F, Engelfriet CP.** The detection of granulocyte antibodies with an indirect immunofluorescence test. *Br J Haematol* 1977; 36: 533-544
- Verheugt FWA, von dem Borne AEGK, van Noord-Bokhorst JC, van Elven EH, Engelfriet CP.** Serological, immunochemical and immunocytological properties of granulocyte antibodies. *Vox Sang* 1978; 35(5): 294-303
- Viedma Contreras JA.** Leucocyte activation markers in clinical practice. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37(6): 607-622

- von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors K-E, Butcher EC.** Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte b2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7538-7542
- von Witzleben-Schürholz E, Neppert J, Schmidt L, Rohr A, Leger R.** Another case of transfusion-related lung injury due to anti-HNA-3a (-5b). *Infus Ther Transfus Med* 2000; 27: 208-210
- Voss J, Westphal K, Böhme J, Bux J, Greinacher A.** Das TRALI-Syndrom: Eine lebensbedrohliche Transfusionsreaktion. *Anaesthesist* 2001; 50: 930-932
- Wagner C, Deppisch R, Deneffle B, Hug F, Andrassy K, Hansch GM.** Expression patterns of the lipopolysaccharide receptor CD14, and the Fcγ receptors CD16 and CD64 on polymorphonuclear neutrophils: data from patients with severe bacterial infections and lipopolysaccharide-exposed cells. *Shock* 2003; 19(1): 5-12
- Wallis JP.** Transfusion-related acute lung injury. *Transfusion Medicine* 1999; 9:175
- Watari K, Asano S, Shirafuji N, Kodo H, Ozawa K, Takaku F, Kamachi S-I.** Serum granulocyte colony-stimulating factor levels in healthy volunteers and patients with various disorders as estimated by enzyme immunoassay. *Blood* 1989; 73(1): 117-122
- Weissmann G, Korchak H.** Rheumatoid Arthritis. The role of neutrophil activation. *Inflammation* 1984; 8(Suppl): S3-14
- Welte K, Bonilla MA, Gabrilove JL, Gillio AP, Potter GK, Moore MA, O'Reilly RJ, Boone TC, Souza LM.** Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor: in vitro and in vivo effects on myelopoiesis. *Blood Cells* 1987; 13(1-2): 17-30
- Wikman A, Olsson I, Shanwell A, Lundahl J.** Detection by flow cytometry of antibodies against surface and intracellular granulocyte antigens. *Scand J Clin Lab Invest* 2001; 61: 307-316
- Witte T, Schmidt RE.** Fcγ-Rezeptoren: Struktur, Funktion und klinische Bedeutung. *Immun Infekt* 1992; 20: 76-80
- Wolach B.** Neonatal sepsis: pathogenesis and supportive therapy. *Semin Perinatol* 1997; 21(1): 28-28
- Wolach B, Sonnenschein D, Gavrieli R.** Neonatal neutrophil inflammatory responses: parallel studies of light scattering, cell polarization, chemotaxis, superoxide release, and bactericidal activity.. *Am J Hematol* 1998; 58: 8-15
- Wolach B, Gavrieli R, Pomeranz A.** Effect of granulocyte and granulocyte macrophage colony stimulating factors (G-CSF and GM-CSF) on neonatal neutrophil functions. *Ped Res* 2000; 48(3): 369-373
- Wolff J, Brendel C, Fink L, Bohle RM, Kissel K, Bux J.** Lack of NB1 GP (CD177/HNA-2a) gene transcription in NB1 GP- neutrophils from NB1 GP-expressing individuals and association of low expression with NB1 gene polymorphisms. *Transfusion Medicine* 2003; 102(2): 731-733
- Wolff J.** Untersuchungen zur molekularen Expression des granulozytären Glykoproteins NB1 (CD177) bei Gesunden und ausgewählten Patienten-Kollektiven. Inauguraldissertation 2005; S. 42-70
- Wolff J, Goehring K, Heckmann M, Bux J.** Sex-dependent upregulation of CD177-specific mRNA expression in cord blood due to different stimuli. *Transfusion* 2006; 46: 132-136
- Wulfhekel U, Düllmann J.** Das Blut und die Organe der Blutbildung (Sanguis). in: *Anatomie: makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen*; Benninghoff; Band 1; Hrsg. Drenckhahn D, Zenker W; Urban und Schwarzenberg München, Wien, Baltimore 1994; 15. Auflage: 600-601; 606-608; 612-613
- Wyncoll DL, Evans TW.** Acute respiratory distress syndrome. *Lancet* 1999; 354: 497-501
- Yamada S, Yasui K, Shinozaki K, Nagumo H, Kumagai T.** Detection of neutrophil-associated immunoglobulin using flow cytometry in autoimmune neutropenia of infancy. *Ped Internat* 2002; 44:269-272
- Yong KL.** Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) increases neutrophil migration across vascular endothelium independent of an effect on adhesion: comparison with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Br J Haematol* 1996; 94: 40-47
- Zhang J, Pellagatti A, Campbell L, Eagleton H, Gal S, Fiddler C, Boulwood J, Wainscoat JS.** Neutrophil PRV-1 gene expression in myeloproliferative, myelodysplastic and reactive blood disorders. *Br J Haematol* 2004; 125: 53

Zhou J, Stohlmann SA, Hinton DR, Marten NW. Neutrophils promote mononuclear cell infiltration during viral-induced encephalitis. *J Immunol* 2003; 3331-3336

Zsebo KM, Yuschenkoff VN, Shiffer S, Chang D, MacCall E, Dinarello CA, Brown MA, Altrock B, Bagby GC Jr. Vascular endothelial cells and granulopoiesis: Interleukin-1 stimulates release of G-CSF and GM-CSF. *Blood* 1988; 71: 99-103

8 Anhang

8.1 Übersicht über verwendete Geräte und Kleinmaterial

Durchflußzytometer „FACSCalibur“ mit Argonlaser der Wellenlänge 488nm und angeschlossenem PC „Power G3“ zur Auswertung (Software: CellQuest)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Zentrifuge „Rotina 35“	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge „Rotixa A“	Hettich, Tuttlingen
Plattenzentrifuge „Labofuge GL“	Heraeus-Christ, Osterode am Harz
Zellzähler „Sysmex CC 130“	Sysmex, Hamburg
Feinwaage Mettler „AE 100, Waage J-Serie“	Mettler-Toledo, Gießen
Schüttelwasserbad „SW-21-C“	Julabo, Seelbach
Wärmeschrank	Heraeus Christ, Hanau
pH-Meter Radiometer PHM 61	Kalensee, Gießen
Kolbenhubpipetten 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Pasteurpipetten	Kalensee, Gießen
Glaspipetten 5, 10, 20 ml	Hirschmann, Eberstadt
Blutentnahmeröhrchen 9 ml und 3 ml, EDTA	Sarstedt, Nümbrecht
95x16,8 mm Polystyrolröhrchen, 12 ml	Sarstedt, Nümbrecht
5 ml Polystyrol Rundbodenröhrchen	Becton Dickinson, Meylan Cedex, Frankreich
PP-Teströhrchen steril, 50 ml	Greiner, Nürtingen
96-Loch-Platten	Greiner, Nürtingen
Filter 0,22 µm „Millex-GS“	Millipore, Molsheim, Frankreich
Verschußfolie „Parafilm“	American Can Company, Greenwich, CT, USA
Pipettenspitzen 10,100,1000 µl	Greiner, Nürtingen

8.2 Verwendete Primärantikörper

Antigen, Immunogen	Antikörper, Klon, Isotyp	Arbeitskonzentration	Hersteller
Maus IgG	komplettes Maus IgG	0,02 mg/ml	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; West Grive, PA, USA
HNA-2a (CD177, NB1-Glykoprotein)	anti-HNA-2a 7D8 IgG1 (Maus)	0,05 mg /ml	Inst. f. klin. Immunologie u. Transfusionsmed., Gießen
FcγRI (CD64) humane Monozyten	anti-FcγRI 10.1 IgG ₁ (Maus)	0,02 mg/ml	Dianova, Hamburg
FcγRII (CD32) K 562 Zellen (Erythroleukämische Zelllinie der Maus)	anti-FcγRII 2E1 IgG2a (Maus)	0,04mg/ml	Immunotech, Marseille, Frankreich
FcγRIIIb (CD16) humane neutrophile Granulozyten	anti-FcγRIIIb 3G8 IgG1 (Maus)	0,02mg/ml	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD11b, α- Kette humane Monozyten	anti-CD11b BEAR 1 IgG1 κ (Maus)	0,03 mg/ml	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD 18 gereinigter gp90-160 Komplex	anti-CD18 7E4 IgG1 (Maus)	0,03mg/ml	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD 14 (MY4) humane, myelomonozytische Leukämiezellen	anti-CD14 322 IgG2b (Maus)	0,025mg/ml	Coulter Immunology, Hialeah, FL, USA
LECAM-1 (CD62L, L-Selectin)	anti-LECAM-1 Dreg-56 IgG1 κ (Maus)	0,02mg/ml	PharMingen, Hamburg
humanes β ₂ -Mikroglobulin gereinigtes humanes β ₂ -Mikroglobulin	anti-β ₂ -Mikroglobulin B1G6 IgG2a κ (Maus)	0,05mg/ml	Immunotech, Marseille, Frankreich

Antigen, Immunogen	Antikörper, Klon, Isotyp	Arbeitskonzentration	Hersteller
HLA Klasse I schwere Kette + β_2 -Mikroglobulin	anti-HLA- β_2 -Mikroglobulin w6/32 IgG2a κ (Maus)	0,03 mg/ml	Institut f. klin. Immunologie u. Transfusionsmed., Gießen

Tabelle B: Übersicht über die verschiedenen verwendeten Primärantikörper mit Angaben zu Immunogen, Arbeitskonzentration und Hersteller.

8.3 Verwendete Reagenzien

„FACSFlow“	Becton-Dickinson, Heidelberg
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid NH_4Cl	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat KHCO_3	Merck, Darmstadt
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$ Titriplex III	Merck, Darmstadt
Dextran T 500	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Ficoll-Paque (Dichte $\rho=1,077$ g/l)	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
PBS 10x ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Ionen	Gibco, Paisley, Schottland
aqua ad iniectabilia	Baxter, Unterschleißheim
NaOH, 1M	Merck, Darmstadt
HCl 1M	Merck, Darmstadt

8.4 Rezepturen der verwendeten Lösungen

8.4.1 PBS (phosphate-buffered saline) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

1	Teil	PBS (phosphat buffered saline) ohne Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen
9	Teile	acqua ad iniectabilia

Beide Lösungen werden gut vermischt, und anschließend wird der pH-Wert zwischen 7,2 -7,4 eingestellt.

8.4.2 Dextranlösung 5%

20	g	Dextran
400	ml	PBS ohne Ca^{2+} / Mg^{2+}

Dextran wird in PBS ohne Ca^{2+} / Mg^{2+} gelöst, der pH-Wert durch Titrieren von 3 M Natronlauge und 3 M Salzsäure in den Bereich von 7,0-7,4 gebracht. Zur Vermeidung der Kontamination mit Bakterien wird die Lösung durch einen 0,22 μm Filter in sterile Röhrchen filtriert.

8.4.3 Ammoniumchloridlösung

8,3	g	NH_4Cl
1,0	g	KHCO_3
0,037	g	$\text{Na}_2\text{-EDTA}$
1	l	aqua dest.

Der pH-Wert wird unter Verwendung von 3 M HCl und 3 m NaOH auf 7,2-7,4 eingestellt.

8.4.4 Paraformaldehydlösung 4%

800	mg	Paraformaldehyd
20	ml	PBS-Lösung ohne Ca^{2+} / Mg^{2+}
600	μl	3 M NaOH
200	μl	3 M HCl

Paraformaldehyd, PBS-Pufferlösung und Natronlauge werden in einem lichtgeschützten Gefäß gemischt und im Wasserbad bei 56 °C für ca. 30 min inkubiert, um eine vollständige Auflösung des Paraformaldehyds zu erreichen. Nach Abkühlung auf 4°C im Kühlschrank werden 200 μl 3 molare Salzsäure langsam dazugegeben und anschließend der pH-Wert auf 7,5 mit 3 M Natronlauge bzw. 3 M Salzsäure eingestellt.

8.5 Übersicht über die klinischen Parameter, die Expression des NB1-Glykoproteins und des FcγRIIIb bei Neugeborenen

Geschlecht	Nr.	„gesund“	Zahl der NB1-GP	%NB1+	Zahl der FcγRIIIb	Sectio	SSW	Gewicht (g)	pH des NSB	APGAR 5 min	Blasen-sprung	patholog. CTG	sonstige Besonderheiten
männlich	1	+	35.734	80	66.954	-	38	3.380	7,31	10	-	-	-
	2	-	51.363	90	129.336	+	40	4.030	7,26	10	-	+	grünes Fruchtwasser
	3	-	102.511	90	106.748	+	32	1.890	7,27	9	-	+	AIS
	4	-	76.244	66	182.894	+	32	1.670	7,25	8	-	+	AIS
	5	-	140.855	92	95.848	+	27	900	7,41	8	+	+	vag. Blutung
	6	-	134.482	84	155.552	+	32	1.420	7,27	9	-	+	Infektion
	7	-	67.288	94	179.380	+	31	1.500	7,33	8	-	+	-
	8	-	75.349	68	193.010	+	37	2.160	7,32	10	-	+	-
	9	-	52.036	63	375.915	-	41	3.490	7,27	10	+	+	EPH-Gestose
	11	+	94.508	90	167.835	+	39	3.880	7,3	9	-	-	-
	10	+	98.429	73	165.916	-	39	3.820	7,35	10	-	-	-
	12	-	57.326	86	103.008	+	33	2.280	7,21	9	-	+	Wehen, Infektion
	14	+	101.816	68	142.220	-	40	3.160	7,33	10	-	-	-
	13	-	127.228	69	130.303	-	39	3.190	7,31	10	-	+	-
	15	-	46.313	77	54.462	+	41	3.760	7,25	10	-	+	-
	17	+	47.329	83	191.943	-	41	3.450	7,17	7	-	-	-
	63	-	79.921	78	168.732	+	37	3.100	7,36	8	-	-	fet. Hydronephrose
	18	-	136.829	93	62.614	-	41	4.010	7,33	10	+	+	-
	20	-	87.816	65	109.939	-	39	3.400		10	-	-	Präeklampsie
	19	-	109.961	91	89.725	-	35	2.860	7,23	8	-	+	-
	21	-	195.685	81	133.413	-	40	3.150	7,34	10	+	-	-
	23	-	108.972	85	106.499	-	41	4.110	7,37	10	-	-	vitium cordis
	22	-	144.827	78	122.316	+	37	3.500	7,27	10	-	-	Beckenendlage
	25	+	134.161	81	97.504	-	40	3.500	7,3	10	-	-	-
	26	-	103.880	86	117.429	+	41	3.420	7,26	10	+	+	-
	27	-	58.438	90	66.630	-	40	4.250	7,39	10	-	-	Gestationsdiabetes
	28	+	79.660	90	144.383	-	39	3.930	7,4	10	-	-	-
	29	-	98.446	89	160.611	-	36	3.250	7,29	9	-	+	-
	30	-	107.083	87	68.348	+	38	2.820	7,31	10	+	+	-
	weiblich	64	+	94.581	59	195.706	-	35	2.450	7,3	10	-	-
31		-	108.955	97	84.271	+	27	1.190	7,28	7	+	+	vag. Blutung
32		-	50.786	62	147.838	+	41	3.900	7,31	10	-	-	protrahierte Austreibungsphase
33		-	185.156	84	121.830	-	40	4.020	7,32	10	+	-	-
34		-	129.286	80	170.131	+	40	2.320	7,31	9	+	+	Geburtsstillstand
35		-	229.980	84	133.799	+	40	2.590	7,32	10	+	+	Geburtsstillstand
36		+	74.622	84	191.359	-	40	3.010	7,16	10	-	-	-
37		-	96.072	91	150.285	+	32	1.390	7,29	10	-	+	Salzverlust-Syndrom
38		+	122.177	72	146.885	-	41	3.010	7,29	10	-	-	-
40		+	106.890	83	129.908	-	40	3.700	7,28	10	-	-	-
61		-	69.562	67	195.892	+	41	4.600	7,27	10	+	-	-
39		+	222.411	67	74.386	-	38	4.080	7,35	10	-	-	-
41		-	51.955	54	102.954	-	35	2.870	7,24	10	+	+	vorzeitige Wehen
43		-	128.945	79	240.179	-	40	3.160	7,25	8	-	+	-
45		-	130.007	78	332.051	+	40	3.560	7,3	10	-	+	-

Nr.	„gesund“	Zahl der NB1-GP	%NB1+	Zahl der FcγRIIIb	Sectio	SSW	Gewicht (g)	pH des NSB	APGAR 5 min	Blasen-sprung patholog. CTG	sonstige Besonderheiten	
47	-	246.348	87	255.673	-	38	3.080	7,27	10	+	+	vorzeitige Wehen, Beckenendlage
46	-	193.422	83	326.091	+	41	3.940	7,28	10	+	+	Diabetes der Mutter
48	+	76.171	34	248.224	-	35	2.250	7,34	10	-	-	-
49	-	119.645	69	130.862	+	32	1.890	7,33	9	+	+	-
50	+	108.053	93	183.578	-	41	3.400	7,24	10	-	-	-
54	-	86.018	70	38.505	-	39	2.865	7,32	10	-	+	-
51	+	134.948	54	130.586	-	40	3.300		10	-	-	-
52	-	114.454	76	87.103	-	40	3.620	7,33	10	-	-	Vakuum-Extr.

Tabelle 8.5.1: Es sind die Zahl der NB1-GP pro Neutrophilem, der Anteil der NB1-exprimierenden Zellen und die Zahl der FcγRIIIb pro Neutrophilem bei Granulozyten aus Nabelschnurblut aufgeführt sowie die erfassten klinischen Parameter bei der Geburt.

Erläuterung der Abkürzungen:

SSW = Schwangerschaftswoche am Geburtstermin, APGAR = nach 5min bestimmter APGAR-Wert, „BS“ = Blasensprung, „AIS“ = Amnioninfektionssyndrom, „Extr“ = Extraktion, NSB = Nabelschnurblut, CTG = Kardiotokogramm, „NG“ = Neugeborenes, „Vor.“ = vorzeitig, „+“ = „trifft zu“, „-“ = „trifft nicht zu“

Diese Abkürzungen gelten auch für alle folgenden Tabellen des Anhangs D.

Gruppe	n	Zahl der NB1-GP / Zelle			Anteil der NB1+ Zellen [%]			Zahl der FcγRIIIb		
		Mittelwert ± Standardabweichung	Minimum Maximum	p	Mittelwert ± Standardabweichung	Minimum Maximum	p	Mittelwert ± Standardabweichung	Minimum Maximum	p
alle Neugeborene	52	109.125 ± 47.978	35.734 246.348		75 ± 15	34 97		147.288 ± 69.822	38.505 375.915	
weibliche Neugeborene	23	127.767 ± 55.029	50.786 246.348	0,042	71 ± 15	34 97	0,104	164.646 ± 77.018	38.505 332.051	0,119
männliche Neugeborene	29	94.982 ± 36.867	35.734 195.685		77 ± 15	39 95		134.120 ± 61.970	54.462 375.915	
Spontangeburt	29	111.216 ± 50.258	35.734 246.348	0,79	73 ± 15	34 93	0,381	144.533 ± 71.763	38.505 375.915	0,634
Sectio	23	106.368 ± 45.813	46.313 229.980		76 ± 15	39 97		150.919 ± 68.677	54.462 332.051	
38-41. SSW	32	116.663 ± 55.407	35.734 246.348		74 ± 13	39 93		141.990 ± 71.339	38.505 332.051	
32..38. SSW	8	95.068 ± 26.612	57.326 144.827	0,396	72 ± 19	34 91	0,908	153.754 ± 55.104	89.725 248.224	0,496
>41 SSW	3	75.192 ± 40.692	51.363 122.177	0,264	75 ± 14	63 90	1,0	217.379 ± 137.577	129.336 375.915	0,347
<32. SSW	8	105.757 ± 25.954	67.288 140.855	0,934	78 ± 20	42 97	0,309	135.730 ± 37.487	84.271 182.894	0,855
Apgar 9-10	43	111.765 ± 50.212	35.734 246.348	0,584	73 ± 14	34 93	0,076	146.016 ± 72.436	38.505 375.915	0,516
Apgar <9	8	94.937 ± 32.278	47.329 140.855		81 ± 18	42 97		154.122 ± 57.243	84.271 240.179	
Geburtsgewicht 2,8-4,0 kg	30	108.089 ± 46.025	35.734 246.348		74 ± 13	39 93		155.761 ± 81.321	38.505 375.915	
Geburtsgewicht 2-2,8kg	6	110.449 ± 63.440	57.326 229.980	0,694	68 ± 20	34 86	0,694	173.980 ± 51.015	103.008 248.224	0,201

Gruppe	n	Zahl der NB1-GP / Zelle			Anteil der NB1+ Zellen [%]			Zahl der FcγRIIIb		
		Mittelwert ± Standard- abweichung	Minimum Maximum	p	Mittelwert ± Standard- abweichung	Minimum Maximum	p	Mittelwert ± Standard- abweichung	Minimum Maximum	p
Geburtsgewicht <2kg	8	105.757 ± 25.954	67.288 140.855	0,875	78 ± 20	42 97	0,265	135.730 ± 37.487	84.271 182.894	0,792
Geburtsgewicht >4kg	7	116.279 ± 68.718	50.786 222.411	0,835	80 ± 14	59 93	0,172	101.305 ± 33.723	62.614 147.838	0,054
BlutpH-Wert 7,3-7,4	26	113.062 ± 49.478	35.734 229.980		72 ± 15	34 94		137.468 ± 63.851	38.505 332.051	
BlutpH-Wert 7,25-7,29	16	113.307 ± 51.717	46.313 246.348	0,877	77 ± 13	42 97	0,294	171.160 ± 86.945	54.462 375.915	0,351
BlutpH-Wert <7,25	5	74.925 ± 31.320	47.329 109.961	0,103	81 ± 16	54 93	0,159	134.242 ± 49.244	89.725 191.943	0,938
BlutpH-Wert >7,40	2	107.389 ± 46.834	74.622 140.855	1,0	88	84 92	0,132	143.604	95.848 191.359	0,825
Keine Besonderheiten zur Zeit des Geburtsstermins	15	102.099 ± 43.511	35.734 222.411		67 ± 18	34 93		151.826 ± 48.630	66.695 248.224	
Besonderheiten vorhanden	36	112.052 ± 50.011	46.313 246.348	0,408	77 ± 13	42 97	0,067	145.397 ± 77.498	38.505 375.915	0,247
Pathologisches CTG	27	111.401 ± 50.327	46.313 246.348	0,439	78 ± 14	42 97	0,059	154.444 ± 86.345	38.505 375.915	0,503
Vorzeitiger Blasensprung	14	142.937 ± 59.911	51.955 246.348	0,023	80 ± 12	54 97	0,070	155.656 ± 95.956	62.614 375.915	0,377
Fehlbildung	2	94.447 ± 20.542	20.542 79.921		80	75 85		137.616	106.499 168.732	
Infektion	6	78.980 ± 33.477	51.363 134.482	0,340	73 ± 20	42 90	0,340	130.082 ± 33.021	102.954 182.894	0,267
Probleme oder Erkrankungen der Mutter	8	89.338 ± 32.034	50.786 140.855	0,728	78 ± 15	58 97	0,190	105.615 ± 29.802	66.630 150.285	0,040
Path. CTG + vorzeitiger BS	12	135.023 ± 61.307	51.955 246.348	0,059	80 ± 13	54 97	0,075	160.328 ± 103.483	62.614 375.915	0,516
Path. CTG + Probleme d. Mutter	4	100.802 ± 34.560	57.326 140.855	0,730	83 ± 17	58 97	1,0	108.353 ± 29.001	84.271 150.285	0,152
Vorz. BS + Probleme d. Mutter (± path. CTG)	2	124.905	108.955 140.855	0,176	95	92 97	0,029	90.960	84.271 95.848	0,132

Tabelle 8.5.2: Übersicht über die statistischen Werte Mittelwert mit Standardabweichung, Minimum und Maximum für die Zahl der NB1-GP pro Zelle, den Anteil NB1-exprimierender Granulozyten und die Zahl der FcγRIIIb pro Zelle bei Granulozyten aus Nabelschnurblut. Die Werte sind für alle Neugeborenen und für die analysierten Untergruppen anhand der Geburtsumstände und klinischen Angaben aufgeführt. Der jeweils angegebene P-Wert bezieht sich auf die erste Gruppe des jeweiligen Abschnitts.

Die Abkürzungen sind bei Tabelle D1 erläutert.

Kategorie	Weibliche Neugeborene				Männliche Neugeborene			
	n	p für Zahl der NB1-GP	p für %NB1+	p für Zahl der FcyRIIIb	n	p für Zahl der NB1-GP	p für %NB1+	p für Zahl der FcyRIIIb
Gesunde NG	8				7			
Probleme	14	0,441	0,482	0,868	22	0,328	0,098	0,438
Path. CTG	11	0,351	0,492	0,840	16	0,413	0,076	0,579
Vorzeitiger BS	8	0,161	0,328	0,798	6	0,051	0,181	0,295
Infektion	1				5	0,876	0,202	
Probleme Mutter	4	0,683	0,683	0,368	4	1,0	0,164	0,109
Patholog. CTG + vorzeitiger BS	7	0,232	0,397	1,0	5	0,106	0,149	0,343

Tabelle 8.5.3: Übersicht über die Ergebnisse der statischen Tests zum Vergleich der NB1-Expression gesunder Neugeborener mit Neugeborenen mit perinatalen Komplikationen. Die Angaben sind getrennt für weibliche und männliche Neugeborene aufgeführt.

Gruppe	n	Zahl der NB1-GP / Zelle		Anteil der NB1+ Zellen [%]		Zahl der FcyRIIIb	
		Mittelwert ± Standardabweichung	Minimum Maximum	Mittelwert ± Standardabweichung	Minimum Maximum	Mittelwert ± Standardabweichung	Minimum Maximum
männliche Neugeborene	29	94.982 ± 36.867	35.734 195.685	77 ± 15	39 95	134.120 ± 61.970	54.462 375.915
Spontangeburt	15	98.169 ± 41.449	35.734 195.685	77 ± 13	51 93	136.305 ± 76.753	62.614 375.915
Sectio	14	91.568 ± 32.449	46.313 144.827	77 ± 17	39 94	131.778 ± 43.771	54.462 193.010
38.-41. SSW	16	96.245 ± 40.695	35.734 195.685	75 ± 15	39 93	117.356 ± 44.660	54.462 191.943
32.- 38. SSW	6	98.298 ± 30.125	57.326 144.827	81 ± 9	68 91	131.017 ± 38.649	89.725 193.010
>41. SSW	2	51.700 ± 4.76	51.363 52.036	77	63 90	252.626 ± 174.358	129.336 375.915
< 32. SSW	5	104.276 ± 33.194	67.288 140.855	79 ± 21	42 94	144.084 ± 40.633	95.848 182.894
Apgar 9-10	23	97.082 ± 38.145	35.734 195.685	76 ± 13	39 93	129.606 ± 65.594	54.462 375.915
Apgar <9	6	86.933 ± 33.334	47.329 140.855	80 ± 20	42 94	151.420 ± 46.062	89.725 191.943
Geburtsgewicht 2,8 - 4,0 kg	18	96.935 ± 39.228	35.734 195.685	73 ± 13	39 91	139.330 ± 70.732	54.462 375.915
Geburtsgewicht 2-2,8 kg	2	66.338 ± 12.744	57.326 75.349	77	68 86	148.009	103.008 193.010
Geburtsgewicht <2 kg	5	104.276 ± 33.194	67.288 140.855	79 ± 21	42 94	144.084 ± 40.633	95.848 182.894
Geburtsgewicht > 4 kg	4	88.901 ± 40.976	51.363 136.829	90 ± 4	85 93	91.270 ± 32.193	62.614 129.336
pH-Wert des Bluts 7,3-7,4	15	100.073 ± 38.674	35.734 195.685	76 ± 16	39 94	126.249 ± 45.299	62.614 193.010
pH-Wert des Bluts 7,25-7,29	9	90.011 ± 36.120	46.313 144.827	76 ± 15	42 90	156.140 ± 90.261	54.462 375.915
pH-Wert des Bluts <7,25	3	71.539 ± 33.648	47.329 109.961	87 ± 4	83 91	128.225 ± 55.579	89.725 191.943
pH-Wert des Bluts >7,40	1	140.855		92		95.848	

Gruppe	n	Zahl der NB1-GP / Zelle		Anteil der NB1+ Zellen [%]		Zahl der FcγRIIIb	
		Mittelwert ± Standard- abweichung	Minimum Maximum	Mittelwert ± Standard- abweichung	Minimum Maximum	Mittelwert ± Standard- abweichung	Minimum Maximum
Keine Besonderheiten	7	84.520 ± 33.772	35.734 134.161	68 ± 18	39 88	139.536 ± 43.414	66.954 19.194
Besonderheiten vorhanden	22	98.312 ± 37.924	46.313 195.685	80 ± 13	42 94	132.396 ± 67.595	54.462 375.915
Pathologisches CTG	16	92.950 ± 32.604	46.313 140.855	81 ± 14	42 94	137.824 ± 76.835	54.462 375.915
Vorzeitiger Blasensprung	6	122.728 ± 47.849	52.036 195.685	82 ± 11	63 93	142.261 ± 117.686	62.614 375.915
Fehlbildung	2		79.921 108.972	80	75 85	137.616	106.499 168.732
Infektion	5	84.385 ± 34.377	51.363 134.482	77 ± 20	42 94	135.508 ± 33.796	103.008 182.894
Probleme d. Mutter	4	86.109 ± 39.133	57.326 140.855	83 ± 12	65 92	93.856 ± 19.041	66.630 109.939
Path CTG+vorz. BS	5	108.137 ± 35.568	52.036 140.855	83 ± 12	63 93	144.031 ± 131.488	62.614 375.915
Path CTG + Probleme Mutter	2		57.326 140.855	89	86 93	99.428	95.848 103.008

Tabelle 8.5.4: Übersicht über die statistischen Werte Mittelwert mit Standardabweichung, Minimum und Maximum für die Zahl der NB1-GP pro Zelle, den Anteil NB1-exprimierender Granulozyten und die Zahl der FcγRIIIb pro Zelle bei Granulozyten aus Nabelschnurblut männlicher Neugeborener. Die Werte sind für alle männlichen Neugeborenen mit den analysierten Untergruppen anhand der Geburtsumstände und klinischen Angaben aufgeführt.

Gruppe	n	Zahl der NB1-GP / Zelle		Anteil NB1+ Zellen [%]		Zahl der FcγRIIIb	
		Mittelwert ± Standard- abweichung	Minimum Maximum	Mittelwert ± Standard- abweichung	Minimum Maximum	Mittelwert ± Standard- abweichung	Minimum Maximum
weibliche Neugeborene	23	127.767 ± 55.029	50.786 246.348	71 ± 15	34 97	164.646 ± 77.018	38.505 332.051
Spontangeburt	14	125.195 ± 56.422	51.955 246.348	69 ± 16	34 93	153.348 ± 67.721	38.505 255.673
Sectio	9	132.269 ± 56.002	50.786 229.980	76 ± 13	58 97	184.416 ± 92.608	84.271 332.051
38.-41. SSW	16	137.080 ± 61.636	50.786 246.348	74 ± 12	52 93	166.623 ± 85.022	38.505 332.051
32.- 38. SSW	2	85.376	76.171 94.581	46 ± 17	34 58	221.965	195.706 248.224
>41. SSW	1	122.177		72		146.885	
< 32. SSW	3	108.224 ± 11.804	96.072 119.645	75 ± 20	58 97	121.806 ± 33.926	84.271 150.285
Apgar 9-10	20	128.649 ± 57.684	50.786 246.348	70 ± 15	34 93	164.888 ± 76.914	38.505 332.051
Apgar <9	2	118.950	108.955 128.945	87	77 97	162.225	84.271 240.179
Geburtsgewicht 2,8 - 4,0 kg	12	124.820 ± 51.938	51.955 246.348	74 ± 12	52 93	180.406 ± 92.728	38.505 332.051
Geburtsgewicht 2-2,8 kg	4	132.505 ± 68.614	76.171 229.980	64 ± 23	34 84	186.965 ± 48.094	133.799 248.224

Gruppe	n	Zahl der NB1-GP / Zelle		Anteil NB1+ Zellen [%]		Zahl der FcγRIIIb	
		Mittelwert ± Standard- abweichung	Minimum Maximum	Mittelwert ± Standard- abweichung	Minimum Maximum	Mittelwert ± Standard- abweichung	Minimum Maximum
Geburtsgewicht <2 kg	3	108.224 ± 11.804	96.072 119.645	75 ± 20	58 97	121.806 ± 33.926	84.271 150.285
Geburtsgewicht > 4 kg	3	152.784 ± 90.276	50.786 222.411	68 ± 13	59 82	114.684 ± 37.244	74.386 147.838
pH-Wert des Bluts 7,3-7,4	11	130.772 ± 58.551	50.786 229.980	67 ± 15	34 84	152.767 ± 82.905	38.505 332.051
pH-Wert des Bluts 7,25-7,29	7	143.258 ± 55.556	96.072 246.348	78 ± 12	58 97	190.470 ± 85.221	84.271 326.091
pH-Wert des Bluts <7,25	2	80.004	51.955 108.053	74	54 93	143.266	102.954 183.578
pH-Wert des Bluts >7,40	1	74.622		84		191.359	
Keine Besonderheiten	8	117.482 ± 47.217	74.622 222.411	67 ± 19	34 93	162.579 ± 53.207	74.386 248.224
Besonderheiten vorhanden	14	133.645 ± 59.908	50.786 246.348	74 ± 12	54 97	165.826 ± 89.742	38.505 332.051
Pathologisches CTG	11	138.239 ± 60.446	51.955 246.348	75 ± 13	54 97	178.618 ± 97.180	38.505 332.051
Vorzeitiger Blasensprung	8	158.093 ± 66.467	51.955 246.348	78 ± 13	54 97	165.701 ± 83.293	84.271 326.091
Fehlbildung	0						
Infektion	1	51.955		54		102.954	
Probleme d. Mutter	4	92.567 ± 28.900	50.786 114.454	72 ± 18	58 97	117.374 ± 36.621	84.271 150.285
Path CTG+vorz BS	7	154.227 ± 70.815	51.955 246.348	78 ± 13	54 97	171.969 ± 87.905	84.271 326.091
Path CTG + Probleme Mutter	2	102.514	96.072 108.955	78	58 97	117.278	84.271 150.285

Tabelle 8.5.5: Übersicht über die statistischen Werte Mittelwert mit Standardabweichung, Minimum und Maximum für die Zahl der NB1-GP pro Zelle, den Anteil NB1-exprimierender Granulozyten und die Zahl der FcγRIIIb pro Zelle bei Granulozyten aus Nabelschnurblut weiblicher Neugeborener. Die Werte sind für alle weiblichen Neugeborenen mit den analysierten Untergruppen anhand der Geburtsumstände und klinischen Angaben aufgeführt.

8.6 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
ACTH	Adreno-Corticotropes Hormon	kDa	Kilodalton
Ag	Antigen	LFA	„leukocyte function antigen“
AIN	Autoimmunneutropenie	LPS	Lipopolysaccharid
Ak	Antikörper	LTB ₄	Leukotrien B ₄
AML	akute myeloische Leukämie	MCP	Metacarpophalangeal (gelenk)
ANCA	antineutrophile cytoplasmatische Antikörper	mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure
ANN	Alloimmune neonatale Neutropenie	NB1+	NB1-exprimierend (e Neutrophile)
ARA	American Rheumatism Association	%NB1+	Prozentualer Anteil der NB1-exprimierenden Neutrophilen
ARDS	adult respiratory distress syndrome	NIN	Neonatale Immunneutropenie
AS	Aminosäure	NK-Zellen	natürliche Killerzellen
BAC	bacterial artificial chromosome	NSB	Nabelschnurblut
bp	Basenpaare	PAF	„platelet activating factor“
CML	chronisch myeloische Leukämie	PDGF	„platelet derived growth factor“
CR3	Komplementrezeptor 3	PIP	proximal interphalangeal
CRP	C-reaktives Protein	PNH	paroxysmale nocturnale Hämoglobinurie
Da	Dalton	PRV; PV	Polyzythämia rubra vera; Polyzythämia vera
DNS od. DNA cDNA	Desoxyribonucleinsäure (acid) codierende DNA	RA	rheumatoide Arthritis
FcγR	Fcγ-Rezeptor	RF	Rheumafaktor
fMLP	N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (von Bakterien freigesetztes Chemotaxin)	rh-G-CSF	rekombinantes humanes G-CSF
G6PD	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	RNA	Ribonukleinsäure (acid)
GAT	Granulozyten-Agglutinations-Test	ROS	radikale Sauerstoff (oxygen) Spezies
G-CSF	„granulocyte-colony stimulating factor“ (Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor)	SCF	„stem cell factor“, Stammzellfaktor (Wachstumsfaktor)
GIFT	Granulozyten-Immunfluoreszenz-Test	TGF	„transforming growth factor“ (Wachstumsfaktor)
GP	Glykoprotein	TNF	Tumornekrosefaktor
GPI	Glykosyl-phosphatidyl-inositol	TRALI	„transfusion-related acute lung injury“; transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz
HNA	„human neutrophil antigen“, humanes Neutrophilantigen	TXA ₂	Thromboxan A ₂
Ig	Immunglobulin	uPAR	Urokinase-Plasminogen-aktivierender Rezeptor
IFN	Interferon	UTR	„untranslated regions“
IL	Interleukin		

9 Veröffentlichungen zum Thema

Originalarbeiten

Göhring K*, Wolff J*, Doppl W, Schmidt KL, Pralle H, Sibelius U, Bux J

Neutrophil CD177 (NB1 gp, HNA-2a) expression is increased in severe bacterial infections and polycythaemia vera.

Br J Haematol 2004; 126: 252-254

*zu gleichen Teilen

Wolff J-C, Göhring K, Heckmann M, Bux J.

Sex-dependent up regulation of CD177-specific mRNA expression in cord blood due to different stimuli.

Transfusion 2006, 46: 132-136

Poster und Vorträge

7th European Symposium on Platelet, Granulocyte and Red Cell Immunobiology, Belgirate (Italien), 11.-14.04.2002:

Poster: Expression of NB1 Glykoprotein (HNA-2a, CD177) on neutrophils is upregulated during severe bacterial infections or G-CSF treatment.

Autoren: Göhring K, Wolff J, Kissel K, Bux J (Universität Gießen).

9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immungenetik (DGI), Frankfurt/Main, 08.09.2001:

Vortrag: Die Expression von NB1-Glykoprotein (HNA-2a, CD 177) auf humanen Granulozyten wird entzündungsabhängig reguliert.

10 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

11 Danksagung

Herzlichen Dank allen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Bux danke ich für die Überlassung des Themas, die stetige Gesprächsbereitschaft und die ausgezeichnete Betreuung während der Durchführung der Untersuchungen und der Abfassung dieser Arbeit.

Besonderen Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Gießen für die konstruktiven Anregungen und praktische Unterstützung. Herzlichen Dank den Mitarbeitern des Leukozytenlabors, insbesondere Christine Hofmann, Dr. Karin Kissel, Stefanie Scheffler, Ingrid Wallon, Dr. Liesel Schindler für die gute Einführung in die Methodik, die Betreuung der Laborarbeit und Hilfe bei technischen Problemen sowie Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Untersuchungen. Herrn Dr. U. Sachs danke ich für die Einweisung in die Durchflußzytometrie herzlich. Die Arbeit mit allen hat sehr viel Freude bereitet.

Diese Arbeit hätte ohne die Unterstützung der klinisch tätigen Kollegen auf der Intensivstation, der gastroenterologischen und hämatologischen Ambulanz, der Frauenklinik und der Rheumaklinik nicht stattfinden können. Ihnen allen vielen Dank für die Rekrutierung der Patienten. Stellvertretend für alle spreche ich meinen Dank insbesondere Herrn Prof. Schmidt (ehemaliger Leiter der Rheumaklinik Bad Nauheim), Herrn Dr. Heckmann (Kinderklinik der Universität Gießen), Herrn PD Dr. Sibelius, Herrn Prof. Pralle, Herrn Dr. Fenchel und Herrn Dr. Doppl (Medizinische Klinik der Universität Gießen), Frau Dr. Vollerthun (Chirurgische Klinik der Universität Gießen) sowie den Ärzten und Hebammen der Universitätsfrauenklinik Gießen aus.

Nicht zuletzt gebührt meinen Eltern großer Dank für die zahlreiche, nicht zu ersetzende Unterstützung. Meinem Mann Christian Frischholz danke ich für viele konstruktive Gespräche und für die ausgezeichnete Hilfe in allen technischen Fragen bei der Abfassung der Arbeit und des Layouts.

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Katrin Carmen Göhring-Frischholz, geb. Göhring
Geburtsdatum und-ort	01.11.1977, Sindelfingen
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	R. Göhring, MTA, Dr. med. P. Göhring, Arzt

Schulbildung

1984-1988	Grundschule Althengstett
1988-1997	Hermann Hesse-Gymnasium, Calw-Stammheim Abitur am 20.06.1997

Studium

10/1997-11/2004	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
06.09.1999	Ärztliche Vorprüfung
29.08.2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04.04.2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08.11.2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
4/2003-3/2004	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Gießen und am St. Vincenz-Krankenhaus Limburg (Lahn), Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Gießen
11.11.2004	Approbation als Ärztin

Promotion

seit 10/1999	bei Prof. Dr. J. Bux am Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen
--------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Beruf

seit 1.1.2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Medizinischen Klinik, Abteilung Kardiologie, der Universitätsklinik Tübingen
---------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------