Prospektive Analyse von Leukozyten Subpopulationen bei Patienten mit Verdacht auf primäre Autoimmunneutropenie

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

vorgelegt von
Templin, Anja Margarethe
aus Pinneberg

Gießen 2019

Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin,
Direktor: Prof. Dr. Gregor Bein,
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Holger Hackstein
Gutachter: Prof. Dr. Ulf Müller-Ladner

Tag der Disputation: 16.12.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis IV

1 Einleitung 1

1.1 Granulozyten: Morphologie und Funktion 1

1.1.1 Neutrophile Granulozyten 2

1.1.2 Granulozytäre Antigene und Antikörper 4

1.2 Primäre Autoimmunneutropenie des Kindesalters 7

1.2.1 Epidemiologie 7

1.2.2 Klinische Symptomatik 8

1.2.3 Pathophysiologie 8

1.2.4 Diagnostik 10

1.2.5 Therapie 13

1.2.6 Differentialdiagnosen 14

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit 15

2 Material und Methoden 16

2.1 Material 16

2.1.1 Geräte und Zubehör 16

2.1.2 Verbrauchsmaterial und Gebrauchsgegenstände 16

2.1.3 Software 17

2.1.4 Antikörper 17

2.1.5 Chemikalien 19

2.2 Methoden 21

2.2.1 Klinische Proben 21

2.2.2 Durchflusszytometrie 22

2.2.3 Verfahren zum Nachweis von Granulozytenantikörpern 22

2.2.4 Verfahren zum Nachweis von HLA-Antikörpern 26

2.2.5 Immunstatus 27
2.2.6 Studiendesign 27
2.2.7 Statistische Analyse 29
3 Ergebnisse 30
3.1 Beschreibung des Patientenkollektivs 30
3.1.1 Demographische Daten des Patientenkollektivs 30
3.1.2 Neutropenie- und Antikörperausprägung 31
3.2 Durchflusszytometrische Analyse und *Gating* der Zellpopulationen 34
3.2.1 Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Subpopulationen 34
3.2.2 Durchflusszytometrische Analyse der Monozyten 37
3.2.3 Durchflusszytometrische Analyse der dendritischen Zellen 38
3.3 Validierung der klinischen Proben 40
3.4 Statistische Analyse 43
3.4.1 Analyse der Neutropenie-Ausprägung 43
3.4.2 Analyse möglicher geschlechtsabhängiger Zellpopulations-unterschiede 46
3.4.3 Analyse von Zellpopulationsunterschieden in Abhängigkeit der Antikörperausprägung 48
3.4.4 Analyse von Zellpopulationsunterschieden in Abhängigkeit vom Alter der Probanden 55
3.4.5 Vergleich der erhobenen Studienwerte mit altersspezifischen immunologischen Referenzwerten 59
4 Diskussion 62
4.1 Das Patientenkollektiv 62
4.2 Variabilität in der Neutropenieausprägung der Patienten 63
4.3 Geschlechtsabhängige Unterschiede der untersuchten Patientenproben 65
4.4 Der Einfluss von granulozytären Autoantikörpern auf die Erkrankung 65
4.4.1 Die Antikörperdiagnostik in der Ursachenfindung bei der primären Autoimmunneutropenie 65

4.4.2 Einfluss der Spezifität der Autoantikörper auf die primäre Autoimmunneutropenie....67
4.5 Die Rolle von Monozyten in der primären Autoimmunneutropenie....69
4.5.1 Veränderungen in Monozyten-Subpopulationen....69
4.5.2 Funktionelle Unterschiede von Monozyten-Subpopulationen....71
4.5.3 Autoantikörper gegen myeloide Vorläuferzellen....74
4.6 Der Einfluss von dendritischen Zellen auf die primäre Autoimmunneutropenie 77
4.7 Altersabhängige Entwicklung der Subpopulationen....79
4.8 Allgemeiner Ausblick....82
5 Zusammenfassung....83
6 Summary....85
7 Literaturverzeichnis....86
8 Anhang....93
8.1 Datenträger mit Rohdaten....93
8.2 Danksagungen....94
8.3 Eidesstattliche Erklärung....95

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIEOP	*Associazione Italiana Emato-Oncologia Pediatrica*
ANC	*absolute neutrophil count*
ANCA	*anti neutrophile cytoplasmatic antibody*
APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cyanin-Farbstoff 7 Konjugat
Aqua Dest.	Destilliertes Wasser
α	alpha
BSA	Bovines Serumalbumin
bsp.	beispielsweise
BV510	Brilliant Violet510
bzw.	beziehungsweise
β	beta
ca.	circa
CCR	C-C-Chemokinrezeptor
CCL	C-C-Chemokinligant
CD	*Cluster of Differentiation*
°C	Grad Celsius
d.h.	das heißt
dH_2O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbeccos Phosphat Gepufferte Saline
δ	delta
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELANE	*elastase neutrophil expressed*
FACS	*fluorescence-activated cell sorting*
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-5-Isothiocyanat
FSC	*Forwardscatter*
FOXP3	*Forkhead-Box-Protein P3*
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s^2)

GAT	Granulozyten Agglutinations-Test
GIFT	Granulozyten Immunfluoreszenz-Test
GPI	Glykosyl-Phosphatidlyinositol
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
γ	gamma
h	Stunde
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HNA	Humanes Neutrophilen Antigen
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettichperoxidase
H_2SO_4	Schwefelsäure
i.d.R.	in der Regel
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Kap.	Kapitel
l	Liter
LFA	*Lymphocyte function-associated antigen*
LIFT	Lymphozyten Immunfluoreszenz-Test
MAIGA	Monoklonaler Antikörperspezifischer Immobilisierungs-Assay von granulozytären Antigenen
MDS	myelodysplastische Syndrome
MFSG	*Neutropenia Comittee of the Marrow Failure Syndrome Group*
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MPO	Myeloperoxidase
µl	Mikroliter
N	Normale
NaCl	Natriumchlorid
Na_2CO_3	Natriumcarbonat
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
NaN_3	Natriumazid
NET	*neutrophil extracellular traps*
NG	neutrophile Granulozyten
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
OPD	*o*-Phenylenediamin Dihydrochlorid
PB	Pacific Blue
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PE	R-Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin - Cyanin-Farbstoff 7 Konjugat
Per-CPCy5.5	Peridinin Chlorophyll Protein-Cyanin-Farbstoff 5.5. Konjugat
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	*rounds per minute*
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SIRP	*Signal regulatory protein*
SOP	*Standard Operating Procedure*
SSC	*Sidescatter*
Tab.	Tabelle
Titriplex®	Ethylendinitrilotetraessigsäure dinatriumsalz-dihydrat
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton-X^{TM} 100	Tetramethylbutylphenyl-polyethylene-glycol
Tween®20	Polyoxymethylensorbitan-monolaurat
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel
Z. n.	Zustand nach
%	Prozent

1 Einleitung

Der medizinische Begriff „autoimmun“ beschreibt Krankheiten, die eine Immunreaktion gegen körpereigene Bestandteile zur Ursache haben. Die Ursache sind häufig Autoantikörper und autoreaktive T-Lymphozyten, die gesunde körpereigene Oberflächenstrukturen, sogenannte Antigene, als fremd erkennen und angreifen. Viele Autoimmunkrankheiten wie der Diabetes Mellitus Typ I und der Morbus Basedow sind in ihrem Pathomechanismus schon gut erforscht, bei anderen Erkrankungen ist die Ursache für die Fehlregulation des Immunsystems bisher unbekannt. Zu dieser Gruppe der weniger gut erforschten Autoimmunerkrankungen zählt die primäre Autoimmunneutropenie des Kindesalters, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wird.

1.1 Granulozyten: Morphologie und Funktion

Die zellulären Bestandteile des menschlichen Immunsystems stammen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark ab. Diese differenzieren sich in zwei Zelllinien: zum einen in die myeloische Stammzellreihe, aus der sich über weitere Zwischenschritte und Vorläuferzellen Thrombozyten, Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten und dendritische Zellen entwickeln. Zum anderen in die lymphatische Stammzellreihe, aus der sich die B- und T-Lymphozyten und die natürlichen Killerzellen entwickeln.

Die Granulozyten gehören neben den Monozyten, dendritischen Zellen und Lymphozyten zur Gruppe der weißen Blutzellen (Leukozyten). Sie stellen neben den dendritischen Zellen und den Monozyten die Zellen des angeborenen Immunsystems dar. Mit ca. 50 bis 70 % sind die Granulozyten die zahlenmäßig größte Gruppe der Leukozyten.

Die Funktion der Leukozyten ist die Abwehr pathogener Mikroorganismen und die Beseitigung abgestorbener körpereigener, infizierter, entarteter oder körperfremder Zellen (Lüllmann-Rauch 2012; Murphy und Weaver 2018). Zu diesem Zweck sind die Granulozyten zur Phagozytose befähigt und enthalten darüber hinaus Granula mit mikrobiziden Stoffen und Enzymen. Die reifen Granulozyten werden aus dem Knochenmark in das Blut abgegeben, wo sie weniger als einen Tag zirkulieren. Sie erreichen dann ihren Wirkort im Interstitium durch ihre Fähigkeit der Adhäsion an endovaskuläres Gewebe und der trans-endothelialen Migration (Diapedese). Dies kann sowohl para- als auch transzellulär, meist in postkapillären Venulen, erfolgen

(Borregaard 2010). Anhand einer Färbung der Granula lassen sich Granulozyten in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten einteilen (Lüllmann-Rauch 2012; Rink et al. 2012).

1.1.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten stellen mit einem Anteil von über 95 % die überwiegende Mehrheit der Granulozyten dar und sind die erste und schnellste Verteidigungslinie des Körpers gegen pathogene Mikroorganismen. Sie zirkulieren weniger als eine Stunde im Blut und wandern auf chemotaktische Signale von Makrophagen oder Komplementfaktoren in das Interstitium aus, wo sie für ein bis zwei Tage ihre immunologische Aufgabe erfüllen. Nach der Phagozytose gehen sie in den programmierten Zelltod (Apoptose) und werden von Makrophagen beseitigt. Der Anteil der im Blut frei zirkulierenden Zellen ist gering, der 10-fache Anteil davon liegt als Reserve im Knochenmark vor, dessen Zellen bei Bedarf schnell aus dem Knochenmark rekrutiert werden können (Lüllmann-Rauch 2012). Die neutrophilen Granulozyten enthalten spezifische Granula, die nach Paul Ehrlich in Abhängigkeit ihrer Myeloperoxidaseaktivität (MPO) in verschiedene Gruppen eingeteilt werden: azurophile (primäre) Granula enthalten MPO, spezifische (sekundäre) Granula dagegen enthalten keine (Borregaard und Cowland 1997). Neben diesen gibt es noch weitere sekretorische Vesikel, die sich in Abhängigkeit ihrer Inhaltsstoffe in weitere Untergruppen aufteilen lassen.

Die Aufgabe der neutrophilen Granulozyten ist die schnelle Beseitigung pathogener Mikroorganismen, noch Stunden bis Tage bevor Monozyten/Makrophagen und die adaptive Immunabwehr eingreifen. Weiterhin sezernieren sie Entzündungsmediatoren wie IL-8, um weitere Effektorzellen des Immunsystems zu rekrutieren (Borregaard 2010). Ihre Aufgabe erfüllen sie entweder durch die Phagozytose pathogener Mikroorganismen oder durch exozytotische Entleerung der Granula. Weiterhin sind sie zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO) befähigt. Die Aktivierung dafür erfolgt unter anderem durch chemotaktische Signale. Dabei erkennen beispielsweise Fc-Rezeptoren, Immunglobuline und Mannose-Rezeptoren glykosilierte Strukturen auf Bakterienoberflächen. Zusätzlich kann die Komplementaktivierung mittels C3b- oder C4-Komplement über die Komplementrezeptoren CR1, CR3 und CR4 erfolgen (Segal 2005). Die Aktivierung

von *Scavenger*-Rezeptoren über Phosphatidylserin erlaubt die Erkennung apoptotischer Partikel und die Phagozytose dieser ohne die Freisetzung von Granula oder Entzündungsmediatoren, wodurch das Auslösen einer Entzündungsreaktion verhindert wird (Mayadas et al. 2014; Rink et al. 2012). Zu diesem Zweck enthalten azurophile Granula neben den MPO-Proteinasen (Cathepsin G, Elastase, Proteinase B) antimikrobielle Proteine (Defensine, Lysozym). Diese werden durch einen pH-Anstieg aktiviert, was unter anderem durch die NADPH-Oxidase mitverursacht wird. Die spezifischen Granula enthalten Lactoferin, Lysozym und Proteinbestandteile des NADPH-Oxidase-Komplexes, während tertiäre (Gelastinase) Granula die Protease Gelastinase enthalten (Borregaard und Cowland 1997).

Die Granula sind nicht nur Speicherorte für Enzyme, sie tragen in ihrer Membran auch Rezeptoren, die bei der Exozytose in die Plasmamembran integriert werden und so zur Rezeptorvielfalt der neutrophilen Granulozyten beitragen (Borregaard und Cowland 1997). In der Membran der spezifischen Granula sind beispielsweise die Proteine β2-Integrin (CD11b/CD18) und Selektine vorhanden, die eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion an das Endothel und der Chemokin-vermittelten Diapedese spielen. Auch die NADPH-Oxidase, die für die Herstellung der ROS verantwortlich ist, befindet sich auf der Oberfläche der Granula (Borregaard 2010). Weiterhin ist dort der FcγRIIIb-Rezeptor vorhanden, welcher im folgenden Kapitel detailliert behandelt wird (s. Kap. 1.1.2). Ein weiterer Mechanismus der neutrophilen Granulozyten, der erst innerhalb der letzten sechs Jahren entdeckt und beschrieben wurde, ist die Befähigung zur sogenannten Netose. Dabei werden Netze aus entfalteter DNA, gebunden mit Histonen, Enzymen und antimikrobiellen Proteinen ausgeworfen. Mit diesen sogenannten NET-Strukturen (*neutrophil extracellular traps*) werden Bakterien (*Staphylococcus aureus*), Hefen (*Candida albicans*) und Pilze (*Aspergillus fumigatus*) gefangen und anschließend durch die enthaltenen bakteriziden und fungiziden Proteine abgetötet (Borregaard 2010).

1.1.2 Granulozytäre Antigene und Antikörper

Auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten befinden sich polymorphe Glykoproteine, die als HNA (*human neutrophil antigens*) bezeichnet werden (s. Tab. 1). Diese sind nicht ausschließlich auf Granulozyten beschränkt, sondern befinden sich teilweise auch in der Plasmamembran anderer Leukozyten und Thrombozyten und können je nach ethnischer Abstammung in ihrer Frequenz variieren (Farruggia 2016).

Tab. 1: HNA-System: (Bux 2008; Farruggia 2016)

Antigengruppe	Antigen	Glykoprotein	CD	Alte Nomenklatur
HNA-1	HNA-1a	FcγRIIIb	CD16b	NA1
	HNA-1b			NA2
	HNA-1c			NA3-SH
	HNA-1d			
HNA-2	HNA-2a	Gp 58-64	CD177	NB1
HNA-3	HNA-3a	Gp 70-95; Choline transporter-like Protein 2		5b
	HNA-3b			5ba
HNA-4	HNA-4a	MAC-1; CR3; $\alpha_M\beta_2$-Integrin	CD11b	MART
	HNA-4b			
HNA-5	HNA-5a	LFA-1; $\alpha_L\beta_2$-Integrin	CD11a	OND
	HNA-5b			

HNA-1 wird ausschließlich von neutrophilen Granulozyten exprimiert und ist das am stärksten immunogene Glykoprotein. Es sind vier Isoformen (HNA-1a, HNA-1b, HNA-1c und HNA-1d) beschrieben (Farrugia und Dufour 2014; Reil et al. 2013). Das HNA-1-Protein ist auf dem FcγIIIb-Rezeptor (CD16b) lokalisiert, der spezifisch IgG1- und IgG3-Dimere bindet und eine wichtige Rolle in der Phagozytose von Bakterien und Immunkomplexen spielt (Taniuchi et al. 2001). Der humane FcγRIII-Rezeptor besitzt zwei Isoformen, wobei FcγRIIIa ein Transmembranrezeptor ist, der auf Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, bestimmten Subpopulationen von T-Zellen und natürlichen Killerzellen exprimiert wird. Er bindet IgG mit mittlerer Affinität. Der FcγRIIIb-Rezeptor hingegen findet sich ausschließlich auf neutrophilen Granulozyten, weist eine geringe Affinität zu IgG auf und ist über einen Glykosyl-Phosphatidlyinositol (GPI)-Anker mit der Plasmamembran assoziiert (Radaev et al. 2001; Rascu et al. 1997).

Dieser ermöglicht dem Rezeptor eine große Reichweite und Mobilität auf der Membran (Bux 2008). Der Rezeptor kann auch in löslicher Form im Zytoplasma vorliegen (Bux 2008). Durch sein spezifisches Vorkommen ausschließlich auf neutrophilen Granulozyten spielt der FcγRIIIb-Rezeptor eine Rolle bei granulozytären Immundefekten. Granulozytäre Antikörper richten sich meist gegen die Isoformen HNA-1a und HNA-1b (Farrugia und Dufour 2014), wobei 30 % davon bevorzugt an HNA-1a binden (Bux 2008). Für die neonatale Immunneutropenie wurden spezifische Antikörper gegen das bis dahin unbekannte Epitop HNA-1d gefunden (Reil et al. 2013).

Das Vorkommen von HNA-2 ist auf eine Subpopulation der neutrophilen Granulozyten beschränkt. Es ist mit einem 58-64 kDa-großen Glykoprotein (CD177) über einen GPI-Anker in der Plasmamembran verankert. HNA-2 befindet sich neben dem Vorkommen in der Plasmamembran auch in der Membran von sekundären und sekretorischen Vesikeln von Granulozyten. Durch die Fusion mit der Plasmamembran wird die Rezeptorvielfalt der Granulozyten erhöht. Die immunologische Aufgabe von CD177-tragenden neutrophilen Zellen besteht in der schnellen Reaktion auf ein akutes Entzündungsgeschehen. Granulozytäre Antikörper gegen HNA-2 treten vor allem im Zusammenhang mit der neonatalen Alloimmunneutropenie und der transfusions-assoziierten Lungeninsuffizienz (TRALI) auf (Bux 2008).

Das Antigen HNA-3 ist über ein 70-95 kDa-großes Glykoprotein in der Plasmamembran von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten verankert. Über seine immunologische Funktion ist nicht viel bekannt. Granulozytäre Antikörper gegen HNA-3a werden meist im Zusammenhang mit febrilen Transfusionsreaktionen, der neonatalen Immunneutropenie und der transfusionsassoziierten Lungeninsuffizienz (TRALI) gefunden (Bux 2008).

HNA-4 ist ein Epitop der α_M-Untereinheit (CD11b) der β_2-Integrin-Familie (CD18) von Leukozyten, das auf der Zellmembran neutrophiler Granulozyten, Monozyten und natürlichen Killerzellen vorkommt. Es ist ein wichtiger Bestandteil der Leukozytenadhäsion an endotheliale Zellen und Thrombozyten sowie der Phagozytose pathogener Mikroorganismen. Es sind sowohl Alloantikörper, welche eine neonatale Alloimunneutropenie hervorrufen können, als auch Autoantikörper gegen HNA-4 bekannt (Bux 2008).

Das HNA-5-Epitop ist auf der α_L-Kette (CD11a) der Leukozyten β_2-Integrin-Familie (CD18) lokalisiert. Der CD11a/CD18-Komplex befindet sich auf der Zelloberfläche aller Leukozyten und spielt ebenfalls eine Rolle bei der Leukozytenadhäsion. Ansonsten

ist wenig über HNA-5 bekannt. Autoantikörper gegen HNA-5 wurden bisher weniger im Zusammenhang mit Autoimmunneutropenien beschrieben, sondern eher mit der aplastischen Anämie in Zusammenhang gebracht (Bux 2008).

Ein weiteres Oberflächenmolekül, das im Zusammenhang mit granulozytären Antikörpern beschrieben wird, ist der FcγRII-Rezeptor (CD32). Der Rezeptor wird von vielen hämatopoetischen Zellen wie Monozyten sowie neutrophilen und basophilen Granulozyten exprimiert. Die Isoformen FcγRIIa und FcγRIIc werden vor allem auf den Zellmembranen neutrophiler Granulozyten exprimiert. Sie binden den Fc-Teil von IgG1 und IgG2 mit geringer Affinität. Alle FcγR-Rezeptoren sind an der Phagozytose, an der Freisetzung von ROS und der Freisetzung von intrazellulären Granula beteiligt (Unkeless et al. 1995).

Gegen Polymorphismen dieser Oberflächenstrukturen können Allo- und Autoantikörper gebildet werden und diese sind somit Auslöser für eine Reihe von Erkrankungen und Transfusionsreaktionen. Alloantikörper verursachen unter anderem die neonatale Alloimmunneutropenie, die transfusions-assoziierte Lungeninsuffizienz (TRALI) sowie nicht-hämolytisch febrile Transfusionsreaktionen (NHFTR) und die Alloimmunneutropenie nach Knochenmarkstransplantationen. Autoantikörper verursachen die primäre Autoimmunneutropenie des Kindes- und Erwachsenenalters und können eine Rolle bei sekundären Autoimmunneutropenien spielen (Farruggia 2016; Lucas et al. 2013).

Es gibt neben den Antikörpern gegen Oberflächenstrukturen auch granulozytäre Antikörper, die gegen zytoplasmatische Strukturen in neutrophilen Granulozyten gerichtet sind. Diese sind mit Erkrankungen des rheumatologischen Formenkreises assoziiert. Die pANCA (*anti neutrophile cytoplasmatic antibody*, perinukleäres Fluoreszenzmuster) richten sich gegen das Enzym Myeloperoxidase und kommen vor allem bei Erkrankungen wie der mikroskopischen Polyangiitis und dem Churg-Strauss-Syndrom vor. cANCA (*anti neutrophile cytoplasmatic antibody*, cytoplasmatisches Fluoreszenzmuster) richten sich gegen die Proteinase-3 und sind bei der Wegener Granulomatose zu finden (Herold 2017). Diese Antikörper spielen bei den Autoimmunneutropenien keine Rolle (Farruggia 2016).

1.2 Primäre Autoimmunneutropenie des Kindesalters

Die primäre Autoimmunneutropenie des Kindesalters ist eine hämatologische Erkrankung, die die zellulären Bestandteile des Blutes betrifft und zu einer Verminderung der Anzahl an neutrophilen Granulozyten führt. Erstmals erwähnt wurde sie von Lalezari et al. (1975). Abhängig von den absoluten Zahlen der neutrophilen Granulozyten über einen Zeitraum von sechs Monaten lassen sich verschiedene Schweregrade der Erkrankung feststellen: Eine Zelldichte von 1,0 bis 1,5 x 10^9 Zellen/l definiert die milde Form, bei 0,5 bis 1,0 x 10^9 Zellen/l spricht man von einer moderaten und bei weniger als 0,5 x 10^9 Zellen/l von einer schweren Neutropenie (Farrugia und Dufour 2014). Diese Grenzwerte beziehen sich auf Kinder, die das erste Lebensjahr beendet haben, da die absoluten Zahlen neutrophiler Granulozyten (*absolut neutrophil count, ANC*) in Neugeborenen in den ersten zwei Lebenswochen stark variieren können. Des Weiteren ist der ANC abhängig von Geschlecht (Mädchen haben höhere Werte), Gestationsalter, Art der Geburt und intrauterinen Wachstumsretardierungen (Farrugia und Dufour 2014). Des Weiteren sollte bei der Diagnosestellung beachtet werden, dass der ANC in manchen ethnischen Gruppierungen wie schwarzen Amerikanern und Südafrikanern oder arabischen Populationen physiologisch vermindert sein kann (Farrugia und Dufour 2014).

1.2.1 Epidemiologie

Die Inzidenz der primären Autoimmunneutropenie wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine viel zitierte Studie zeigte Inzidenzen bei Kindern unter 10 Jahren von 1:100.000, basierend auf einer Studie in einer schottischen Population (Capsoni et al. 2005; Lyall et al. 1992). Aufgrund des benignen Verlaufs der Erkrankung wird die Erkrankungshäufigkeit jedoch deutlich höher eingeschätzt (Audrain et al. 2011; Bux et al. 1998). Farruggia et al. (2015) beschrieben sogar eine Inzidenz von 1:6300 in einer sizilianischen Population.

Die primäre Autoimmunneutropenie ist die häufigsten Ursache für chronische Neutropenien im Kindesalter (Bruin et al. 2005). Das mittlere Alter bei Diagnosestellung wird in einem Alter von sieben bis neun Monaten diskutiert (Bruin et al. 2005; Farruggia 2016). Der Ausbruch der Krankheit wird jedoch schon zu einem früheren Zeitpunkt vermutet, da Patienten teilweise schon Monate vor ersten diagnostischen Schritten an unspezifischen Symptomen leiden. In außergewöhnlichen

Fällen wurde ein Erkrankungsbeginn im Alter von weniger als einem Monat beschrieben (Farruggia et al. 2015).
Bux et al. (1998) und Farruggia (2016) beschreiben keine Geschlechterspezifität, während Lalezari et al. (1986) eine erhöhte Prävalenz in Mädchen feststellen.

1.2.2 Klinische Symptomatik

Die klinischen Symptome der erkrankten Kinder können sehr vielfältig sein. Ursächlich dafür ist die verminderte Zahl neutrophiler Granulozyten, die als Bestandteile des zellulären Immunsystems für die Abwehr bakterieller Infektionen und die Phagozytose opsonierter Pathogene verantwortlich sind. Hauptsächlich werden die Kinder aufgrund wiederkehrender Infektionen klinisch auffällig und so ersten diagnostischen Schritten zugeführt. Die häufigsten Erkrankungen sind Infektionen der oberen Atemwege und Pneumonien, Mittelohrentzündungen, Abszesse, Infektionen der Haut, Fieber unbekannter Ursache, Gastroenteritiden, Konjunktivitis oder urogenitale Infektionen bis hin zu Meningitiden oder Sepsis (Bux et al. 1998). Meist zeigen diese Infektionen einen relativ milden Verlauf (Zeidler 2013).

1.2.3 Pathophysiologie

Was diese Erkrankung zu etwas Besonderem macht, ist die Tatsache, dass es in ungefähr 90 % der Fälle innerhalb von 24 bis 30 Monaten Erkrankungsdauer (Bruin et al. 2005) zu einer spontanen Remission und damit Normalisierung der neutrophilen Zellzahlen im Blut kommt (Bux et al. 1998). Capsoni et al. (2005) beschrieben in 95 % der Fälle ein Gesunden bis zum Erreichen des Alters von zwei bis drei Jahren, Lalezari et al. (1986) hingegen bis zu einem Alter von vier bis fünf Jahren. Die Ursache hierfür ist bisher nicht ausreichend geklärt.
Als Ursache der primären Autoimmunneutropenie wurden von Lalezari et al. (1975) erstmals Autoantikörper gegen Granulozytenantigene beschrieben, die zu einer peripheren Zerstörung der Granulozyten führen. Die Ursache ihrer Entstehung ist bis heute aber ungeklärt. Die Antikörper, die bei Kindern mit primärer Autoimmunneutropenie detektiert wurden, waren zum größten Teil spezifisch gegen die granulozytären Oberflächenantigene HNA-1a oder HNA-1b. Es wurden aber auch einige Antikörper gegen den FcγRII-Rezeptor (CD32), das Leukozyten Adhäsionsmolekül b (CD11b/CD18; HNA-4) (Hartman und Wright 1991) und den

C3b-Komplement-Rezeptor (CR1, CD35) gefunden (Bux et al. 1998; Capsoni et al. 2005), wobei diese eher eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen. Bruin et al. (2005) beschrieben eine Wandlung der Antikörperspezifität im Laufe der Erkrankung. Zu Beginn wurden Antikörper mit einer pan-FcγRIIIb-Spezifität gefunden. Im weiteren Verlauf wurde eine auf die Epitope HNA-1a oder HNA-1b eingeschränkte Spezifität der Autoantikörper festgestellt. Im späteren Verlauf waren Antikörper mit pan-FcγRIIIb-Spezifität nur noch bei sekundären Neutropenien zu finden, die mit weiteren Erkrankungen beispielsweise aus dem rheumatologischen Formenkreis (Lupus Erythematodes, Feltys Syndrom) oder hämatologischen Erkrankungen vergesellschaftet waren und keinen benignen Verlauf aufwiesen (Bruin et al. 1999; Bruin et al. 2005; Capsoni et al. 2005). Hierbei muss beachtet werden, dass die Antigenfrequenz in bestimmten genetisch unterschiedlichen Populationen variiert, sodass die Antikörperspezifität sowohl vom ethischen Hintergrund als auch vom Zeitpunkt der Diagnosestellung abhängig ist (Farrugia und Dufour 2014). Die Antikörper sind zum größten Teil vom Typ IgG, wobei auch eine geringe Zahl IgM-Antiköper gefunden wurde (Bux et al. 1998). Ito et al. (2011) publizierten, dass die IgM-Antikörper vor allem zu Beginn der Erkrankung auftreten, während IgG im gesamten Verlauf der Erkrankung zu finden waren. Lange Zeit war der Zusammenhang zwischen der Antikörperstärke und der Ausprägung der klinischen Manifestation oder Dauer der Erkrankung unklar (Lalezari et al. 1986). Kobayashi et al. (2002) beschrieben eine Korrelation zwischen der Antikörperstärke zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, quantifiziert durch die relative Fluoreszenz-Intensität (RFI), und der Erkrankungsdauer der Neutropenie. Es erscheint möglich, dass die primäre Antikörperkonzentration die Erkrankungsdauer bestimmt, wobei der Entstehungsmechanismus der Antikörperproduktion weiterhin unklar bleibt. Keinen Zusammenhang scheint es hingegen zwischen der Antikörperkonzentration und der Neutropenie-Ausprägung zu geben (Capsoni et al. 2005).

Obwohl die granulozytären Antikörper als Ursache der primären Autoimmunneutropenie gelten, können sie nicht bei allen Kindern detektiert werden (Audrain et al. 2011; Ito et al. 2011; Kobayashi et al. 2002), auch wenn deren Symptomatik und klinischer Verlauf eindeutig für diese Diagnose sprechen. Dies liegt zum einen an dem niedrigen Titer der Antikörper, und zum anderen binden die Antikörper mit niedriger Affinität an den FcγRIIIb Rezeptor (Capsoni et al. 2005). Lalezari et al. (1986) und Audrain et al. (2011) zeigten zudem, dass die Antikörper mit

dem Fortschreiten der Erkrankung unter die Nachweisgrenze schwanden und so nicht mehr nachgewiesen werden konnten, obwohl diese Kinder weiterhin an einer Neutropenie litten. Dies stellt ein diagnostisches Dilemma dar, wenn die Patienten erst im späten Verlauf ihrer Erkrankung vorgestellt werden.

Der genaue immunologische Mechanismus ist bis heute unverstanden, es gibt allerdings eine Vielzahl an Theorien. Eine rein genetische Ursache konnte ausgeschlossen werden, da in einer Studie das Vorkommen der Autoimmunneutropenie in nur einem monozygoten Zwilling nachgewiesen wurde (Conway et al. 1987). Auch eine Infektion mit dem Parvovirus B19 als Auslöser konnte nicht bestätigt werden (Bux et al. 1998). Eine Theorie basiert auf der Annahme, dass Antikörper gegen Fremdantigene (z.B. viral, bakteriell, medikamenten-induziert, postinfektiös) mit körpereigenen Antigegen reagieren und dies zur Ausbildung von polyklonalen, autoreaktiven Antikörpern führen könnte. Diese können über einen Zeitraum von Monaten bis Jahren bestehen bleiben (Bruin et al. 1999). Des Weiteren kann molekulare Mimikry mikrobieller Antigene, die Modifikation endogener Antigene durch Noxen oder die verminderte Erkennung und Beseitigung entarteter, selbst-reaktiver Leukozytenklone zu einer Ausbildung von Autoantikörpern führen (Capsoni et al. 2005). Da die immunologischen Regulationsmechanismen in kleinen Kindern noch nicht vollständig entwickelt sind und bis zum Alter von circa drei Jahren heranreifen, wird der benigne Verlauf auf die vollständige Ausreifung des T-Zell-Suppressorsystems zurückgeführt (Bruin et al. 1999; Lalezari et al. 1986). Nakamura et al. (2009) fanden bei erkrankten Kindern eine signifikant erniedrigte Zahl an T-Regulatorzellen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe. T-Regulatorzellen sind für die Unterdrückung der körpereigenen Immunantwort zuständig. Als eine weitere Theorie beschrieben Lalezari et al. (1975) chimäre Lymphozyten und damit verbundene Alloimmunisierung als mögliche Ursache. Es gibt eine Vielzahl an Theorien, der genaue Mechanismus zur Entstehung der primären Autoimmunneutropenie bleibt allerdings weiterhin unbekannt.

1.2.4 Diagnostik

Um die Sensitivität der Diagnostik zu erhöhen hat das MFSG (*Neutropenia Comittee of the Marrow Failure Syndrome Group*) der AIEOP (*Associazione Italiana Emato-Oncologia Pediatrica*) Leitlinien zur Diagnostik der Neutropenie herausgebracht (Fioredda et al. 2011). Diese sind in Abb. 1 zusammengefasst. Die ersten

diagnostischen Schritte werden von den jeweiligen Kliniken durchgeführt, in denen sich erkrankte Patienten vorstellen, während die Antikörperdiagnostik in darauf spezialisierten Laboren durchgeführt wird. Zum Nachweis granulozytärer Antikörper wird eine Kombination aus Granulozyten Immunfluorenszenz-Test (GIFT) und Granulozyten Agglutinations-Test (GAT) durchgeführt, wobei der GIFT eine höhere Sensitivität aufweist (s. auch Kap. 2.2.3). Um unspezifisch gebundene, nicht-granulozytäre Antikörper wie etwa HLA-Antikörper auszuschließen, wird zudem der Lymphozyten Immunfluoreszenz-Test (LIFT) durchgeführt (Bux et al. 1998). Die Spezifität der Antikörper wird anschließend mittels des monoklonalen antikörper-spezifischen Immobilisierungs-Assays von granulozytären Antigenen (MAIGA) quantifiziert (Bux und Chapman 1997) (s. auch Kap. 2.2.3). Mit diesen Verfahren lassen sich in ungefähr 80 % der Fälle Antikörper nachweisen (Lalezari et al. 1986). Aufgrund der Schwierigkeit, mit den bisherigen Methoden die Antikörper in 100 % der Fälle nachzuweisen, wird eine dreimalige Mehrfachmessung empfohlen, wenn die Ergebnisse negativ waren (Audrain et al. 2011; Fioredda et al. 2011).

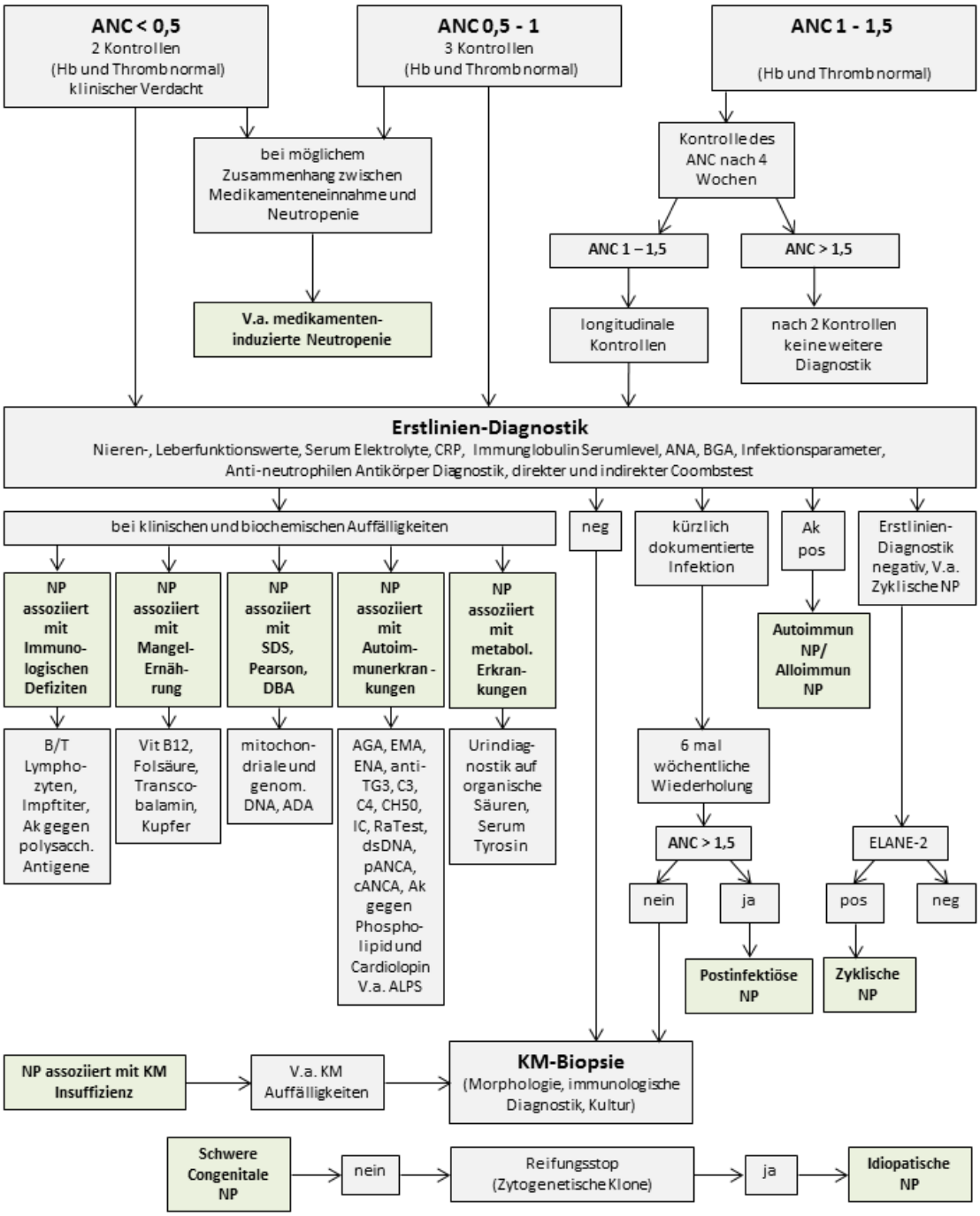

Abb. 1: Leitlinien zur Diagnostik von Neutropenien. Die Abbildung zeigt den diagnostischen Algorithmus bei einem klinischen Verdacht auf eine Neutropenie. Abkürzungen: NP: Neutropenie; BGA: Blutgasanalyse; neg: negativ; pos: positiv; Ak: Antikörper; ANC: *absolute neutrophil Count* in x 10^9 Zellen/l; Hb: Hämoglobin; Thrombo: Thrombozyten; CRP: C-reaktives Protein; ANA: antinukleäre Antikörper; KM: Knochenmark; ADA: Serum Adenosindeaminase; SDS: Schwachman-Diamond Syndrom; BDA: Diamond-Blackfan Anämie; AGA: antiglobulin Antikörper; IC: Immunkomplex; ra: rheumatoide Arthritis; EMA: antiendomysium Antikörper; ENA: Antikörper gegen extrahierbare nukleäre Antigene; antiTG: Tyreoglobulin Antikörper; ALPS: Autoimmunes lymphoproliferatives Syndrom; Pearson: Pearson Syndrom. Verändert nach Fioredda et al. (2011) mit Erlaubnis des Journals „Pedriatic Blood and Cancer“ (Lizenz-Nummer: 4573030885196).

1.2.5 Therapie

Da diese Erkrankung in den meisten Fällen einen relativ milden, selbstlimitierenden Verlauf nimmt, ist eine Therapie häufig nicht von Nöten. Präoperativ oder in besonders schweren Fällen der Neutropenie, begleitet von schweren Infektionen, ist eine Stoßtherapie mit G-CSF (rekombinanter humaner Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor) zurzeit die Standarttherapie. G-CSF ist ein Zytokin, das sowohl die Proliferation und Heranreifung von Granulozyten-Vorläufern aus myeloiden Vorläuferzellen im Knochenmark (Ganulopoese) unterstützt, als auch die Freisetzung der reifen Granulozyten ins Blut bewirkt. Daneben stimuliert G-CSF die Phagozytose-Funktion der neutrophilen Granulozyten, reduziert die Apoptose dieser und reduziert die Antigenexpression auf ihrer Oberfläche, was zu einer verminderten Antigen-Opsonisierung führt. Des Weiteren steigert G-CSF die Sezernierung des löslichen FcγRIIIb-Rezeptors, der so extrazellulär die zirkulierenden Antikörper abfängt und so den Antikörpertiter senkt (Smith und Smith 2001).

Das Ziel der Therapie ist das Erreichen von Neutrophilenzahlen über 1000 Zellen/µl. Dies erfolgt durch die tägliche, subkutane oder intravenöse Gabe von 5-10 µg/kg Körpergewicht G-CSF über einen Zeitraum von drei Tagen. Die weitere Therapie wird anhand der klinischen und laborchemischen Reaktion weitergeführt und adaptiert (Capsoni et al. 2005). Allerdings muss beachtet werden, dass bei solch einer Therapie ein erhöhtes Risiko für die Erkrankung an dem myelodysplastischen Syndrom (MDS), Leukämien (Fioredda et al. 2012), Osteopenien und die Bildung von anti-G-CSF Antikörpern besteht (Capsoni et al. 2005). Deshalb sollte vor einer Langzeittherapie eine kritische Indikationsstellung erfolgen. Eine prophylaktische Antibiotikatherapie, wie in manchen Studien beschrieben (Kobayashi et al. 2003), ist nach Fioredda et al. (2012) nicht zielführend und führt eher zu verstärkten Antibiotikaresistenzen. Bakterielle Infekte sollten im Falle einer schweren Infektion evidenzbasiert unter Beachtung der laufenden Therapie mit G-CSF und der Neutropenie erfolgen. Einige Studien berichteten auch über Erfolge mit einer intravenösen Immunglobulin-Therapie (Bussel et al. 1988). Von einer Steroidtherapie, wie sie bei vielen anderen Autoimmunkrankeiten angewandt wird, ist in diesen Falle laut Bussel et al. (1983) abzusehen. Zwar reduzieren Steroide die Antikörperformation, doch ihre immunsuppressive Komponente führt im Gegenteil eher zu einer Verstärkung der krankhaften Situation (Capsoni et al. 2005).

1.2.6 Differentialdiagnosen

Die wichtigen Differentialdiagnosen zur primären Autoimmunneutropenie des Kindesalters sind die neonatale Alloimmunneutropenie, die zyklische Neutropenie (Bux et al. 1998) und sekundäre Immunneutropenien (Bux et al. 1998; Farruggia 2016). Die neonatale Alloimmunneutropenie beruht auf maternalen Alloantikörpern, die bei maternalem Kontakt mit kindlichen Granulozyten gebildet werden. Diese Form der Neutropenie kann bis zu sechs Monate andauern und differentialdiagnostisch durch den Nachweis von granulozytären Antikörpern im mütterlichen Serum ausgeschlossen werden (Bux et al. 1998). Die zyklische Neutropenie ist ein angeborener, autosomal-dominanter genetischer Defekt im ELANE-Gen, bei dem es im Rhythmus von ungefähr 21 Tagen zu rezidivierenden Neutropenien kommt (Bux et al. 1998; Patil et al. 2016; Zeidler 2013). Die sekundären Immunneutropenien treten eher in der späten Kindheit oder dem Erwachsenenalter auf. Im Unterschied zur primären Autoimmunneutropenie sind hier oft keine Antikörper nachweisbar und es kommt hier zu keiner spontanen Remission der Erkrankung (Bux et al. 1998). Zudem sind diese Erkrankungen mit einer erhöhten Rate schwerer Infektionen vergesellschaftet und es liegt eine Koinzidenz mit weiteren Autoimmunerkrankungen wie autoimmunhämolytischen Anämien, der idiopatischen thrombozytopenischen Purpura, dem systemischen Lupus Erythemathodes und dem Sjögren Syndrom vor (Farruggia 2016; Zeidler 2013).

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Die primäre Autoimmunneutropenie des Kindesalters ist eine hämatologische Autoimmunkrankheit, die zu einer Verminderung der neutrophilen Granulozyten betroffener Kinder und als Folge davon zu einer erhöhten Rate bakterieller Infektionen führt. Als Ursache wurden Autoantikörper gegen Epitope neutrophiler Granulozyten detektiert. Die immunologische Fehlregulation, die zur Produktion dieser führt, ist jedoch gänzlich unverstanden. Als Ursache werden kreuzreagierende Antikörper oder molekulare Mimikry endogener oder mikrobieller Antigene vermutet. Die Beteiligung anderer leukozytärer Subpopulationen auf den Krankheitsverlauf oder als weitere Zielstruktur zirkulierender Antikörper stellt eine weitere Möglichkeit der immunologischen Einflussnahme in den Pathomechanismus dar.

Um die Beteiligung anderer leukozytärer Subpopulationen bei der Pathophysiologie der primären Autoimmunneutropenie zu untersuchen, wurden in einer prospektiven Studie EDTA-antikoagulierte Blutproben von Patienten mit dem klinischen Verdacht auf diese Krankheit durchflusszytometrisch auf das Vorhandensein anderer leukozytärer Subpopulationen wie T- und B-Lymphozyten, Monozyten, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen untersucht. Des Weiteren wurde eine Antikörperdiagnostik zur Detektion granulozytärer Antikörper und deren Spezifizierung durchgeführt. Ziel dieser Untersuchung war es festzustellen, ob zahlenmäßige Veränderungen einer anderen leukozytären Subpopulation, beispielsweise die der T-Regulatorzellen, die immunologischen Mechanismen in der Entstehung der primären Autoimmunneutropenie erklären könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Zubehör

Tab. 2: Geräte und Zubehör

Gerätename	Hersteller
Durchflusszytometer FACS Canto	BD Bioscience, San Jose, USA
Durchlicht-Mikroskop Leica DMI 3000B	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop Leica DMLS	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Rotina380R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Sterilbank Heraeus Klasse 2 TypH	Kendro Laboratory Products, Langenselbold
Sysmex	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt
Sunrise Mikrotiterplatten-Photometer	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Vortex Reax Top	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Wasserbad ED Klasse I	Julabo Labortechnik, Seelbach

2.1.2 Verbrauchsmaterial und Gebrauchsgegenstände

Tab. 3: Verbrauchsmaterial und Gebrauchsgegenstände

Gegenstand	Hersteller
FACS-Röhrchen 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Glaspipetten 2 - 25 ml	Hirschmann, Eberstadt
Pipetten 2µl - 5000µl	Eppendorf AG, Hamburg Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Stabpipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen
Vasco Nitril white Handschuhe in S, M, L	B. Braun, Melsungen AG, Melsungen

2.1.3 Software

Tab. 4: Verwendete Software

Computersoftware	Bezugsquelle
BD FACSDiva Software 8.0.1	BD Bioscience, San Jose, USA
Citavi 5.4	Swiss Academy Software, Wädenswil, Schweiz
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, La Jolla, USA
Microsoft Excel 2010	Microsoft, Unterschleißheim
Microsoft PowerPoint 2010	Microsoft, Unterschleißheim
Microsoft Word 2010	Microsoft, Unterschleißheim
SPSS Statistics 21.0	IBM, Armonk, USA

2.1.4 Antikörper

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden Antikörper verwendet, die mit folgenden Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt wurden: APC (Allophycocyanin), PB (*Pacific Blue*), FITC (Fluorescein-5-Isothiocyanat), PE (R-Phycoerythrin), BV510 (Brilliant Violet510). APC-Cy7 (Tandem-Konjugat aus Allophycocyanin und dem Cyanin-Farbstoff 7), PE-Cy7 (Tandem-Konjugat aus Phycoerythrin und Cyanin-Farbstoff 7), Per-CPCy5.5 (Konjugat aus dem Peridinin-Chlorophyll-Protein und dem Cyanin-Farbstoff 5.5). Die nicht- oder enzymgekoppelten Antikörper wurden zum Nachweis von Granulozyten- und HLA-Antikörper verwendet. Alle anderen wurden für die Durchführung des GIFT, LIFT und MAIGA verwendet.

Tab. 5: Antikörper: Maus (ms), Kaninchen (rb), Ziege (gt); Human (hm), polyklonal (pAk), monoklonal (mAk). Wenn nicht anderweitig angegeben sind alle Antikörper anti-human.

Antikörper (Klon)	Fluoro-chrom/ Enzym	Emissions-maximum	Eigen-schaften	Hersteller (Kat.-Nr.)
CD3 (UCHT1)	BV510	510 nm	ms, mAk	BioLegend, San Diego, USA (300448)
CD4 (RPA-T4)	APC/Cy7	785 nm	ms, mAk	BioLegend, San Diego, USA (300518)
CD11a (CLB-LFA-1/2, TB-133)			ms, mAk	Sanquin, Amsterdam, Niederlande (M1385)
CD11b (Bear1)			ms, mAk	Beckman Coulter, Brea, USA (IM0190)

CD14 (HCD14)	APC	660 nm	ms, mAk	BioLegend, San Diego, USA (325608)
CD14 (HCD14)	FITC	520 nm	ms, mAk	BioLegend, San Diego, USA (325604)
CD16 (B73.1)	PE	578 nm	ms, mAk	BioLegend, San Diego, USA (360704)
CD16 (3G8)			ms, mAk	Beckman Coulter, Brea, USA (IM0813)
CD16 (BW209)			ms, mAk	Calbiochem.-Behring Corp, La Jolla, USA (nicht mehr im Handel erhältlich)
CD18 (IB4)			ms, mAk	Abnova GmbH, Heidelberg (MAB6945)
CD25 (M-A251)	PE/Cy7	785 nm	ms, mAk	BioLegend, San Diego, USA (356108)
CD45 (2D1)	FITC	520 nm	ms, mAk	BioLegend, San Diego, USA (368508)
CD45 (HI30)	APC/Cy7	785 nm	ms, mAk	BioLegend, San Diego, USA (304014)
CD45RA (HI100)	PerCP/Cy 5.5	676 nm	ms, mAk	BioLegend, San Diego, USA (304122)
CD127 (A019D5)	AF647	668 nm	ms, mAk	BioLegend, San Diego, USA (351318)
CD177 (7D8)			mAk	Aus eigener Herstellung, Hybridoma Zellkultur
FOXP3 (259D)	PE	575 nm	ms, mAk	BioLegend, San Diego, USA (320207)
HLA-DR (L243)	PerCP/ Cy5.5	690 nm	ms, mAk	BioLegend, San Diego, USA (307630)
HLA-A 2			hm, pAk	Inno-Train Diagnostik GmbH, Kronberg (002A0201005)
HLA-B 7+27			hm, pAk	Inno-Train Diagnostik GmbH, Kronberg (002A0201005)
HLA-B 7+73			hm, pAk	Inno-Train Diagnostik GmbH, Kronberg (002A0201005)
γ/δ TCR (B1)	PE	575 nm	ms, mAk	BioLegend, San Diego, USA (331210)
IgG	FITC	520 nm	rb, pAk	Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, USA (F0315)

IgM	FITC	520 nm	rb, pAk	Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, USA (F0317)
IgA	FITC	520 nm	rb, pAk	Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, USA (F0316)
IgG (anti Maus)			gt, pAk	Dianova, Hamburg (115-005-71)
IgG	HRP-gekoppelt		gt, pAk	Dianova, Hamburg (109-035-098)
β2 – Mikroglobulin (B1G6)			ms, mAk	Beckman Coulter, Brea, USA (IM0114)

2.1.5 Chemikalien

Tab. 6: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Albumin, Rind, Fraktion V	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Aqua Dest.	Hauseigene Filteranlage
Aqua ad iniectabilia	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Aqua ad iniectabilia	B.Braun, Melsungen
BD FACS™ Lysing Solution	BD Bioscience, San Jose, USA
BD FACS™ Fluidics Startup	BD Bioscience, San Jose, USA
BD FACS™ Fluidics Shutdown	BD Bioscience, San Jose, USA
BD FACS Flow™	BD Bioscience, San Jose, USA
BD FACS Clean™	BD Bioscience, San Jose, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid Dihydrat	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom GmbH, Berlin
Dulbeccos Phosphat gepufferte Saline (D PBS)	Thermo Fischer Scientic, Langenselbold
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt
Isotonische Kochsalzlösung	B.Braun, Melsungen
Mineralöl	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Natriumazid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen

Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
o-Phenylenediamin Dihydrochlorid Tabletten (OPD)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Phosphat gepufferte Saline (PBS)	Anprotec, Bruckberg
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Schwefelsäure 2,5 mol/l (5N)	Merck KGaA, Darmstadt
Titriplex®	Merck KGaA, Darmstadt
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton-X™ 100	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Tween® 20	Carl Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck KGaA, Darmstadt
Zitronensäure Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt

2.2 Methoden

2.2.1 Klinische Proben

Die Grundlage dieser Studie waren EDTA-antikoagulierte Blutproben von Kindern bis einschließlich 17 Jahren mit dem Verdacht auf eine Autoimmunneutropenie. Die Proben stammten aus deutschlandweit verteilten Kliniken, die diese Blutproben an das Granulozytenlabor des Zentrums für Infusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Gießen Marburg am Standort Gießen zur Analyse der granulozytären Antikörpern schickten. Gemäß des Ethikantrages (AZ 104/06) wurden Reste dieser Proben für diese Studie zur Verfügung gestellt. Jede Probe wurde innerhalb von 48 h bearbeitet und analysiert.

Die Färbung der am FACS-Gerät (*fluoresence-activated cell sorting*) zu bestimmenden Proben erfolgte bei jeder Messung identisch. Nach Erhalt der Proben wurden diese entsprechend des Färbeschemas (s. Tab. 7) mit fluoreszenzgekoppelten monoklonalen Antikörpern angefärbt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Erythrozyten mithilfe der BD FACS™ *Lysing-Solution* für 15 min bei Raumtemperatur lysiert. Die Lysate wurden mithilfe von zwei Waschschritten mit jeweils 2 ml PBS inklusive 2 % FCS vom Reagenz gereinigt und anschließend am Durchflusszytometer gemessen. Für die Detektion von dendritischen Zellen wurde das *Blood Dendritic Cell Enumeration Kit* (Miltenyi Biotec) verwendet. Dies wurde nach den Empfehlungen des Herstellers aufgrund des geringen Probenvolumens in halber Dosierung verwendet.

Tab. 7: Färbeschema

	1	2	3	4	5	6	7
	FITC	PE	PE-Cy7	PerCPCy5.5	APC/A647	APC-Cy7	BV510
T-Reg 200 µl Blut	CD45 5 µl	γδ-TCR 6 µl	CD25 7 µl	CD45RA 8 µl	CD127 9 µl	CD4 4 µl	CD3 4 µl
ISO CD25/γδ-TCR 100 µl Blut	CD45 2,5 µl	mIgG1k 2,5 µl	mIgG1k 1,25 µl	CD45RA 2,5 µl	CD127 2,5 µl	CD4 2 µl	CD3 2 µl
ISO CD127 100 µl Blut			CD25 2,5 µl	CD45RA 2,5 µl	mIgG1k 2,5 µl	CD4 2 µl	CD3 2 µl
Monozyten 50 µl Blut		CD16 1,25 µl		HLA-DR 1,25 µl	CD14 1,25 µl	CD45 0,5 µl	

2.2.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Analyse von unterschiedlichen Merkmalen einer einzelnen Zelle in einer Zellsuspension. Dazu gehören beispielsweise die Oberflächenbeschaffenheit, Größe oder Granularität. Auch intrazelluläre Bestandteile wie die DNA oder RNA können quantifiziert werden. Das Verfahren beruht auf der Eigenschaft von Zellen, Licht zu streuen, wenn sie einen Laserstrahl passieren.

Durch hydrodynamische Fokussierung fließen die Zellen in der Suspension vereinzelt durch die Messkammer (*Flow Cell*) und passieren einen Laserstrahl. Das von den Zellen emittierte Streu- und Fluoreszenzlicht wird mittels verschiedener Filter und Detektoren (*Photomultiplyer*) erfasst und in elektrische Signale umgewandelt, die sich in der Auswertesoftware mittels unterschiedlicher Graphen darstellen lassen.

Das Streulicht korreliert mit der Größe und der Komplexität der Zelle. Über das Vorwärtsstreulicht (*FSC – Forward Scatter*) lässt sich die Größe einer Zelle bestimmen. Das Seitwärtsstreulicht (*SCC – Sideward Scatter)* gibt Auskunft über die Granularität, die Größe und Struktur des Zellkerns sowie die Menge an Vesikeln in der Zelle (BD Bioscience 2002). Durch Fluorochrom-gekoppelte monoklonale Antikörper lassen sich die verschiedenen Oberflächenmerkmale wie z. B. CD-Moleküle (*Cluster of Differentiation*) der Zelle quantifizieren. Fluorochrome absorbieren Licht einer bestimmten Wellenlänge. Beim Passieren des Lasers wird ein Elektron des Fluorochroms auf ein höheres Energieniveau gehoben. Bei der Rückkehr auf das ursprüngliche Energieniveau kommt es zu einer Lichtemission von Photonen, die Fluoreszenz genannt wird. Die Photonen werden anschließend durch ein System von verschiedenen Filtern und Spiegeln detektiert und in elektrische Signale umgewandelt. Da jedes Fluorochrom ein charakteristisches Emissionsspektrum aussendet, ist die Analyse von verschiedenen Oberflächenmerkmalen gleichzeitig möglich.

2.2.3 Verfahren zum Nachweis von Granulozytenantikörpern

Die folgenden Tests wurden von Mitarbeitern des Granulozytenlabors und HLA-Labors des Zentrums für Infusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Gießen Marburg am Standort Gießen durchgeführt. Die in den folgenden Unterkapiteln beschriebenen Versuchsabläufe sind den laborinternen Standard-Prozeduren (SOP)

entnommen. Die Ergebnisse dieser Versuche wurden freundlicherweise für diese Studie zur Verfügung gestellt.

2.2.3.1 Granulozyten Immunfluorenszenz-Test (GIFT)

Der Granulozyten Immunfluoreszenz-Test (GIFT) diente dem Nachweis freier Allo- oder Autoantikörper gegen Granulozyten und wurde erstmals von Verheugt et al. (1978) beschrieben. Nach Erhalt der Proben wurden diese 10 min bei 440 x g zentrifugiert und das Serum oder Plasma bei -10 °C gelagert. Zur Analyse wurden die Proben aufgetaut und 5 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Als nächster Schritt wurden 4 x 40 µl einer Suspension aus Patientenprobe und einer negativ Kontrolle (1:2 mit 1 x DPBS verdünnt) in senkrechter Reihe in eine 69-Loch-Rundbodenmikrotiterplatte pipettiert. Daneben wurden 4 x 10 µl einer positiv Kontrolle (HLA A2, HLA B7+27 und HLA B7+73) aufgetragen. Diese wurden mit 40 µl aufgereinigter Testgranulozyten (5 x 10^3 Zellen/µl) aus dem Vollblut von vier gesunden Spendern, welche in waagerechter Reihe hinzu pipettiert wurden, nach kurzem Mischen für 30 min bei 37 °C inkubiert. Es folgten drei Waschschritte mit 200 µl 1 x DPBS und 30 s Zentrifugation bei 160 x g. Die Suspensionen wurden anschließend mit jeweils 40 µl eines mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Kaninchen-anti-Human-IgG, IgM oder IgA Sekundär-Antikörpers (1:40 mit 1 x DPBS verdünnt) für 30 min bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Nach drei Waschschritten mit 200 µl 1 x DPBS und 30 s Zentrifugation bei 160 x g wurde die granulozytäre Antikörperbindung sichtbar gemacht. Nach Zugabe eines Tropfens Glycerin/PBS (30 ml Glycerin und 10 ml 1 x DPBS) erfolgte eine fluoreszenz-mikroskopische Auswertung. Die Reaktionsstärke wurde mittels einer Skala von eins (fraglich) bis vier (stark positiv) angegeben.

Da auch HLA-Antikörper (humanes Leukozyten Antigen) zu positiven Reaktionen führen konnten, wurde zusätzlich der Lymphozyten Immunfloureszenz-Test (LIFT) mit isolierten Lymphozyten eines Spenders durchgeführt. So wurde zwischen leukozytären und granulozytären Antikörpern unterschieden (s. Abschnitt 2.2.4.1).

2.2.3.2 Granulozyten Agglutinations-Test (GAT)

Der Granulozyten Agglutinations-Test (GAT) nutzte die Eigenschaft mancher Antikörper, die Granulozyten zur Agglutination anzuregen. Dazu wurden die Proben nach Erhalt für 10 min bei 440 x g zentrifugiert und das Serum oder Plasma bei -10 °C gelagert. Zur Analyse wurden die Proben aufgetaut und 5 min bei 13.000 x g

zentrifugiert. Dazu wurden auf zwei Terasaki-Mikrotiterplatten jeweils 2 µl der unfixierten Testgranulozyten (5 x 10^3 Zellen/µl) mit jeweils 6 µl des zu untersuchenden Patientenserums, einer negativ Kontrolle (jeweils 1:2 mit 1 x DPBS verdünnt) sowie einer unverdünnten positiv Kontrolle inkubiert und anschließend mikroskopisch untersucht. Die erste Platte wurde für zwei h bei 37 °C und die zweite für 12 h bei 30 °C inkubiert und anschließend am Durchlicht-Mikroskop untersucht. Die Anzahl der aggregierten Granulozyten wurde abgeschätzt und prozentual angegeben. Aufgrund von Spontanaggregationen wurde ein Wert kleiner gleich 20 % als fraglich positives und ein Wert ab ca. 80 % als stark positives Ergebnis angesehen. Da auch hier HLA-Antikörper zu positiven Ergebnissen führen konnten, erfolgte ebenfalls eine lymphozytäre Diagnostik.

2.2.3.3 Monoklonaler Antikörperspezifischer Immobilisierungs-Assay von granulozytären Antigenen (MAIGA)

Dieser Immobilisierungs-Test von granulozytären Antigenen mithilfe monoklonaler Antikörper basiert auf einem von Bux et al. (1993) entwickelten Glykoprotein-spezifischen Enzymimmunotest und ermöglichte die Bestimmung der Rezeptorspezifität der in den Suchtests identifizierten Antikörper.

Dazu wurde am Vortag eine Mikrotiterflachbodenplatte mit 100 µl einer Suspension aus 10 ml Beschichtungspuffer und 20 µl eines Ziege-anti-Maus-IgG Antikörpers mit einer Konzentration von 3 µg/ml pro Vertiefung beschichtet und diese bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden 100 µl einer Testgranulozyten-Suspension (10 x 10^3 Zellen/µl) mit 50 µl Patientenserum oder -plasma in PBS plus 0,2 % BSA auf eine Mikrotiterflachbodenplatte gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach einem Waschschritt mit 50 µl 0,2 % BSA in PBS pro Ansatz und 30 s Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit jeweils 10 µl des Glykoprotein-spezifischen monoklonalen Maus-Antikörpers (0,02 mg/ml) und 50 µl 0,2 % BSA in PBS für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit 50 µl 0,2 % BSA in PBS wurden zu den Zellpellets 100 µl Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren hinzugegeben, diese nach Überführung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß für 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend für 30 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Während der Inkubationszeit wurde die tags zuvor beschichtete Mikrotiterflachbodenplatte ausgeklopft und die Vertiefungen mit 200 µl 0,2 % BSA in PBS befüllt und ebenfalls

bei 4 °C inkubiert. Gleichzeitig wurden neue Eppendorf-Reaktionsgefäße mit 180 µl eines MAINA Waschpuffers mit 0,2 % BSA befüllt und ebenfalls bei 4 °C inkubiert.
Als nächster Schritt wurden je 2 x 100 µl einer Suspension aus 70 µl der Überstände aus den zentrifugierten Eppendorf-Reaktionsgefäßen und 180 µl eines MAINA Waschpuffers mit 0,2 % BSA auf die beschichtete Mikrotiterflachbodenplatte gegeben und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Diese wurde zuvor fünf Mal mit 0,05 % Tween20 in PBS gewaschen. Als Leerwert wurde der MAINA Waschpuffer mit 0,2 % BSA verwendet und die Platte ebenfalls über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden nach erneutem fünfmaligen Waschen mit 0,05 % Tween20 in PBS und anschließendem Ausklopfen der Platte jeweils 100 µl eines mit Peroxidaseenzym-markierten Tertiärantikörpers (2,5 µl Ziege-anti-Human-IgG in 10 ml MAINA Waschpuffer mit 0,2 % BSA) hinzugegeben und für 2 h bei 4 °C inkubiert. Das Vorhandensein humaner Antikörper wurde nach weiteren sechs Waschschritten mit 0,05 % Tween20 in PBS mittels Zugabe von jeweils 200 µl Substratpuffer und einer Inkubationszeit von 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur über einen Farbumschlag nachgewiesen. Die Reaktion wurde mit 50 µl 2,5 mol/l H_2SO_4 abgestoppt und die Absorption am Photometer bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen.
Der Nachweis von Antikörpern gegen HLA-Moleküle war ebenfalls möglich, wobei keine monoklonalen Antikörper gegen HNA-3 zur Verfügung standen, sodass Antikörper gegen HNA-3a und HNA-3b nicht nachgewiesen werden konnten.

PBS/Tween 0,05 %:

100 ml 1 x PBS
50 µl Tween 20

Beschichtungspuffer:

0,3975 g Na_2CO_3
0,7325 g $NaHCO_3$
0,05 g NaN_3

Lysepuffer:

2,4 g Tris
8,67 g NaCl
9,5 ml Triton-X 100
1,86 g EDTA
in 1 l Aqua dest. lösen, pH 7,4

MAINA Waschpuffer:

1,21 g Tris, 9,5 ml Triton-X 100
4,5 ml Tween 20
0,0725 g Calciumchlorid Dihydrat
In 1 l NaCl lösen, pH 7,4

Substratpuffer:

10 ml Substratperoxidase
1 Tablette OPD SIGMA 4 mg
4 µl H_2O_2

2.2.4 Verfahren zum Nachweis von HLA-Antikörpern

2.2.4.1 Lymphozyten Immunfluoreszenz-Test (LIFT)

Der Lymphozyten Immunfluoreszenz-Test (LIFT) diente dem Nachweis freier Allo- oder Autoantikörper gegen das HLA-Klasse-I-Antigen auf der Leukozytenoberfläche und beruhte ebenfalls, wie der Granulozyten Immunfluorenszenz-Test (GIFT), auf dem Prinzip der indirekten Immunfluorenszenz. Hierbei wurden die Proben zur Analyse aufgetaut und 5 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Als nächster Schritt wurden 4 x 20 µl einer Suspension aus Patientenprobe und einer negativ Kontrolle (1:2 mit 1 x DPBS verdünnt) in senkrechter Reihe in eine 69-Loch-Rundbodenmikrotiterplatte pipettiert. Daneben wurden 4 x 10 µl einer positiv Kontrolle (HLA A2, HLA B7+27 und HLA B7+73) aufgetragen. Diese wurden mit 40 µl aufgereinigter Testlymphozyten (5 x 10^3 Zellen/µl) aus dem Vollblut von vier gesunden Spendern, welche in waagerechter Reihe hinzu pipettiert wurden, nach kurzem Mischen für 30 min bei 37 °C inkubiert. Es folgten drei Waschschritte mit 200 µl 1 x DPBS und 30 s Zentrifugation bei 160 x g. Durch Zugabe von jeweils 40 µl des Floureszenz-markierten Kaninchen-anti-Human-

IgG Sekundärantikörpers wurden die Proben und Kontrollen markiert (1:40 mit 1 x DPBS verdünnt). Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln und erneutem dreimaligen Waschen mit 200 µl 1 x DPBS sowie einer Zentrifugation für 30 s bei 160 x g wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.5 Immunstatus

Die Erhebung des Immunstatus diente der Ermittlung spezifischer Leukozytensubpopulationen: T-Lymphozyten ($CD3^{pos}$), B-Lymphozyten ($CD19^{pos}$), helfer-T-Lymphozyten ($CD3^{pos}CD4^{pos}$), suppressor-/ zytotoxische T-Lymphozyten ($CD3^{pos}CD8^{pos}$) und natürlichen Killerzellen ($CD3^{neg}CD16^{pos}$ und/oder $CD56^{pos}$). Die Einheit ist in „Zellen/µl“ angegeben und diente als Bezugsgröße zur Berechnung der absoluten Zellzahlen der klinischen Proben.

Hierzu wurden die Proben für 10 min auf dem Überkopfschüttler gemischt. Wurde eine Zellzahl von über 50.000 Leukozyten/µl im Sysmex Counter gemessen, wurde die Probe gegebenenfalls mit PBS verdünnt. Der Ansatz erfolgt in TruCount-Röhrchen. In zwei verschiedenen Ansätzen wurden zu jeweils 50 µl der Patientenprobe 20 µl des CD3/CD8/CD45/CD4-Reagenz bzw. 20 µl des CD3/CD16/CD56/CD45/CD19-Reagenz hinzugegeben. Diese wurden gemischt und für 15 min im Dunkeln inkubiert. Jedem Röhrchen wurden 450 µl FACS *Lysing Solution* (1:10 verdünnt, Anwendung nach Vorgabe des Herstellers) hinzugegeben, gemischt und die Proben für weitere 15 min lichtgeschützt lysiert. Es folgte die durchflusszytometrische Analyse der Proben. Die erhaltene Anzahl der Lymphozyten wurde mit der Zellzahl aus dem Sysmex verglichen. Die jeweiligen Zellzahlen sollten nicht um mehr als 10 % voneinander abweichen.

2.2.6 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelte es sich um eine prospektive explorative Untersuchung von Patienten mit dem klinischen und diagnostischen Verdacht auf eine primäre Autoimmunneutropenie. Voraussetzung für die Teilnahme an dieser Studie war ein Lebensalter von maximal 17 Jahren, der klinische und diagnostische Verdacht auf die vorliegende Erkrankung und ein Zeitraum von Abnahme der Blutprobe bis zur Messung von weniger als 48 h. Ansonsten wurden Kinder mit hämatologischen leukozytären Abnomalitäten von dieser Studie ausgeschlossen. Ein Patient mit einer

bekannten Beta-Thalassämie wurde in die Studie mit aufgenommen, da es sich bei der Erkrankung um eine genetisch vererbte Synthesestörung einer Hämoglobinkette handelt, die keinen Einfluss auf leukozytäre Veränderungen haben sollte.

Für diese Studie wurde das Blut von 83 Kindern mit der Verdachtsdiagnose Autoimmunneutropenie durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei mussten die Blutproben von acht Kindern ausgeschlossen werden, die an anderen hämatologischen Grunderkrankungen wie Leukämien litten oder sich im Zustand nach einer chemotherapeutischen Behandlung befanden. Des Weiteren wurden Proben von Kindern, die unter Therapie mit G-CSF standen sowie an anderen malignen Erkrankungen wie beispielsweise dem Hodgkin Lymphom litten, nicht zu dieser Studie herangezogen. Bei einem Patienten waren multiple Erythrozyten- und Thrombozytentransfusionen in der Vergangenheit durchgeführt worden. Da keine Grunderkrankung zu eruieren war und die Gefahr einer weiteren hämatologischen Erkrankung bestand, die eine Beteiligung von leukozytären Subpopulationen nicht ausschloss, wurde der Patient ebenfalls von der Studie ausgeschlossen. In Tab. 8 sind die Kriterien, die zum Ausschluss der Kinder geführt haben, einzeln aufgeführt. In der statistischen Analyse wurden letztendlich 75 der 83 analysierten Blutproben berücksichtigt.

Tab. 8: Ausschlusskriterien für Patientenproben

Patientenprobe	Ausschlusskriterium
G421/16	Akute Myeloische Leukämie, Z.n. chemotherapeutischer Behandlung
G700/16	Kongenitale Neutropenie, chronische Behandlung mit Filgrastim
G878/16	Neonatale Alloimmunneutropenie
G999/16	Z.n. Herztransplantation
G1140/16	chronische Therapie mit Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten
G1145/16	Myelodysplastisches Syndrom, aplastische Anämie
G1146/16	Akute Myeloische Leukämie, Z.n. Knochenmarktransplantation
G352/17	Non Hodgkin Lymphom

2.2.7 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Daten wurde mit der Software SPSS Statistics 21.0 (IBM) durchgeführt. Dies erfolgte mit der Unterstützung durch das Institut für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen mit Herrn Helge Hudel als Ansprechpartner.

Mithilfe der Tests nach Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk wurde eine mögliche Normalverteilung der Daten überprüft. Da die Annahme einer Normalverteilung für jede Zellpopulation abgelehnt werden musste, wurden im Folgenden nicht-parametrische Tests wie der Mann-Whitney-U-Test und der Kruskal-Wallis-Test zur statistischen Untersuchung von Unterschieden zwischen den Zellzahlen einzelner Populationen verwendet. Die Problematik des multiplen Testens und die hiermit verbundene α-Fehler-Kumulierung wurde aufgrund des explorativen Ansatzes der Fragestellung nicht berücksichtigt, sodass im Folgenden nicht von Signifikanzen sondern von Tendenzen die Rede sein wird.

Zur Erstellung der Graphen wurden die Software Graph Pad Prism 5.0 verwendet. Die Daten wurden als Boxplot-Diagramme nach der Turkey-Methode dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Für diese Studie wurde das Blut von 83 Kindern mit der Verdachtsdiagnose Autoimmunneutropenie durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei mussten die Blutproben von acht Kindern aufgrund verschiedener Ausschlusskriterien ausgeschlossen werden (vgl. Kap. 2.2.6). In der statistischen Analyse wurden letztendlich 75 der 83 analysierten Blutproben berücksichtigt.

3.1.1 Demographische Daten des Patientenkollektivs

Die in dieser Studie analysierten Blutproben der untersuchten Patienten stammten in 35 Fällen von Mädchen (46,7 %) und in 40 von Jungen (53,3 %). Die Altersverteilung reichte von 0,9 bis 207 Monaten, wobei ein Median von 34 Monaten errechnet wurde (s. Abb. 2).

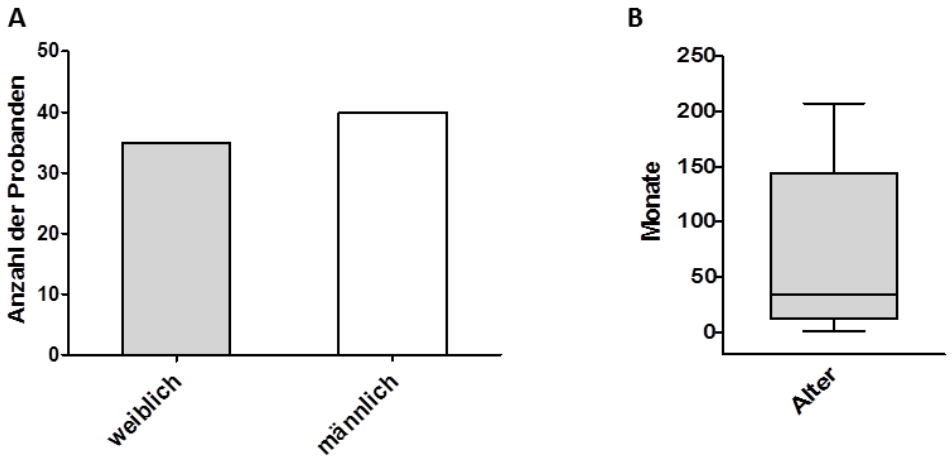

Abb. 2: Demographische Daten des Patientenkollektivs: (**A**) Die Geschlechtsverteilung der untersuchten Patientenproben. Es handelte es sich bei insgesamt 75 Patienten um 35 Mädchen (46,7 %) und 40 Jungen (53,3 %). (**B**) Die Altersverteilung der untersuchten Patienten zeigte eine Spanne von 0,9 bis 207 Monaten, wobei ein Mittelwert von 68,37 Monaten und ein Median von 34 Monaten ermittelt wurden. Die 25 bis 75 Perzentile umfasste Kinder im Alter von 12 bis 144 Monaten.

3.1.2 Neutropenie- und Antikörperausprägung

Um den Schweregrad der Neutropenie-Ausprägung der Patienten zu klassifizieren, wurde eine Einteilung nach Farrugia und Dufour (2014) anhand der Anzahl an neutrophilen Granulozyten (NG) im Blut durchgeführt. Dabei wurde wie folgt eingeteilt: Kinder mit 1,0 bis 1,5 x 10^9 NG/l wurden als „mild“ klassifiziert, solche mit 0,5 bis 1,0 x 10^9 NG/l als „moderat“ und Kinder mit Werten kleiner 0,5 x 10^9 NG/l wurden als „schwer“ neutropen eingestuft. Kinder, die zum Zeitpunkt der Untersuchung mehr als 1,5 x 10^9 NG/l aufwiesen, wurden der Gruppe „normal“ zugeteilt.

Die Gruppe der Kinder mit schwerer Neutropenie umfasste 17 Patienten (22,7 %), während 11 Kinder (14,7 %) moderate Granulozytenzahlen aufwiesen. Dann wurden 17 Kinder (22,7 %) der Gruppe mit milder Neutropenie-Ausprägung zugeordnet und insgesamt 30 Kinder (40 %) wiesen zum Zeitpunkt der Untersuchung normale Granulozytenzahlen im Blut auf.

Des Weiteren wurden die Patientenproben auf das Vorhandensein von granulozytären Antikörpern getestet. Hierbei ließen sich im Blut von 15 Kindern (20 %) Antikörper nachweisen, während die Untersuchungen der Blutproben der restlichen 60 Kinder (80 %) negativ ausfielen (s. Abb. 3).

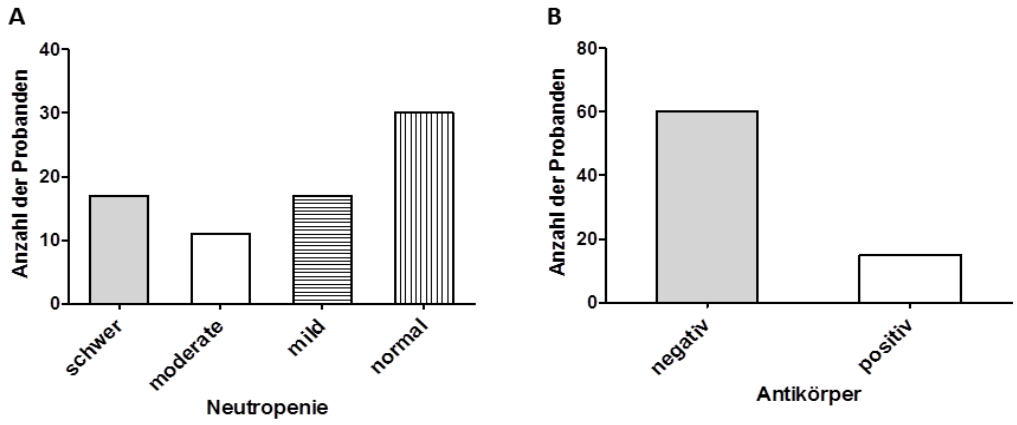

Abb. 3: Analyse der Neutropenie- und granulozytären Antikörperausprägung der Patienten: (**A**) Die Analyse der Neutropenieausprägung der Patienten erfolgte anhand der Anzahl an neutrophilen Granulozyten im Blut (Farrugia und Dufour 2014). Diese zeigte, dass 17 der insgesamt 75 untersuchten Kinder (22,7 %) eine schwere, 11 Kinder (14,7 %) eine moderate und 17 Kinder (22,7 %) eine milde Neutropenie-Ausprägung aufwiesen. Bei insgesamt 30 Kindern (40 %) wurden normale Granulozytenzahlen im Blut festgestellt. (**B**) Das Vorhandensein von granulozytären Antikörpern im Blut konnte für 15 Kinder (20 %) identifiziert werden, während in 60 Kindern (80 %) keine Antikörper nachweisbar waren.

Der Nachweis und die Spezifizierung von Antikörper in den Patientenproben erfolgten mittels GIFT, GAT, LIFT und MAIGA. In der Tab. 9 werden die Ergebnisse der Untersuchungen gezeigt. Im GIFT wurde die Reaktionsstärke quantitativ mittels einer Skala von null (negativ) bis vier (stark positiv) angegeben. Pro Patient wurden vier Testgranulozyten eingesetzt. Ein Wert von 2/4 bedeutete, dass die Granulozyten in zwei von vier Ansätzen mit Antikörpern beladen waren. Im GAT wurde die Anzahl der aggregierten Zellen prozentual angegeben, hierbei wurde eine Einteilung in 20 %, 40 %, 60 % und 80 % vorgenommen. Wie beim GIFT wurden pro Patient vier Testgranulozyten eingesetzt, dies bedeutet bei Patient G41/17, dass die Testzellen in einer von vier Proben eine Agglutination von 20 % aufwiesen. Der LIFT und der MAIGA wurden nur bei Kindern, die älter als drei Jahre waren, durchgeführt. Eine zusätzliche Bedingung des MAIGA war, dass die Patientenproben positive Befunde im GIFT aufwiesen. Alle in Tab. 9 aufgeführten Patienten zeigten positive Antikörperbefunde im GIFT, nur bei zwei Patienten wurden Agglutinationen im GAT detektiert. Ein Patient wies zusätzlich lymphozytäre Antikörperbefunde auf. Die Bestimmung der Rezeptorspezifität der in den Suchtests identifizierten Antikörper zeigte in vier Fällen positive Befunde.

Tab. 9: Positive Antikörpernachweise in den Patientenproben: negativ (neg), positiv (pos), nicht getestet (nt), monoklonale Antikörper (mAk). Der LIFT (Lymphozyten Immunfluoreszenz-Test) und MAIGA (Monoklonaler Antikörperspezifischer Immobilisierungs-Assay von granulozytären Antigenen) wurde nicht mit Proben von Kindern jünger als drei Jahre durchgeführt.

Patientenprobe	GIFT	GAT	LIFT	MAIGA
G390/16	2/4 pos, 2 x pos	neg	neg	CD16, CD11a
G413/16	1/4 pos, 2 x pos	neg	neg	CD11a
G421/16	2/4 pos, 2x pos	neg	nt	nt
G581/16	4/4 pos, 3x pos	neg	nt	nt
G716/16	4/4 pos, 2-3 x pos	neg	neg	alle mAk neg
G746/16	4/4 pos, 3-4 x pos	neg	pos	β_2-Mikroglobulin
G755/16	3/4 pos, 2 x pos	neg	nt	nt
G930/16	2/4 pos, 2-3 x pos	neg	nt	nt
G1059/16	4/4 pos, 3-4 x pos	neg	neg	alle mAk neg
G1141/16	4/4 pos, 3-4 x pos	neg	neg	alle mAk neg
G41/17	4/4 pos, 4 x pos	1/4, 20%	nt	nt
G167/17	2/4 pos, 2 x pos	neg	nt	nt
G479/17	4/4 pos, 3-4 x pos	neg	nt	nt
G510/17	2/4 pos, 4 x pos	neg	neg	alle mAk neg
G551/17	4/4 pos, 3 x pos	4/4, 20-40 %	nt	nt

3.2 Durchflusszytometrische Analyse und *Gating* der Zellpopulationen

Um mögliche Zusammenhänge zwischen der Anzahl verschiedener Immunzellen und der Neutropenie- sowie Antikörper-Ausprägung der Patienten zu analysieren, wurde das Blut der Probanden mittels Durchflusszytometrie quantitativ auf verschieden Zellpopulationen der myeloiden und dendritischen Stammzellreihe untersucht.

Die mithilfe der Durchflusszytometrie ermittelten Zellzahlen wurden für die einzelnen T-Zellsubpopulationen in relativen Anteilen von den $CD3^{pos}CD4^{pos}$ T-Lymphozyten berechnet. Die Subpopulationen der Monozyten und dendritischen Zellen wurden in Prozent von den $CD45^{pos}$ Leukozyten angegeben. In der parallel durchgeführten Analyse des Immunstatus wurden die absoluten Werte (Zellen/µl) für die $CD3^{pos}CD4^{pos}$ T-Lymphozyten und die $CD45^{pos}$ Leukozyten angegeben. Auf deren Grundlage wurden die absoluten Zellzahlen (Zellen/µl) für jede Zellpopulation berechnet. Im Immunstatus wurden außerdem die absoluten Zellzahlen für die $CD3^{pos}CD8^{pos}$ zytotoxischen T-Zellen, die $CD16^{pos}CD56^{pos}$ natürlichen Killerzellen und die $CD19^{pos}$ B-Lymphozyten angegeben.

3.2.1 Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Subpopulationen

Zur Identifizierung der T-Zell-Subpopulationen wurden die $CD3^{pos}CD4^{pos}$ T-Helferzellen, die $CD25^{pos}CD127^{low}$ T-Regulatorzellen, die $CD45RA^{pos}$ naiven T-Regulatorzellen, die $CD45RA^{neg}$ *memory* T-Regulatorzellen und die γδ T-Zellrezeptor-exprimierenden T-Zellen durchflusszytometrisch mithilfe der entsprechenden Antikörper (Boldt et al. 2014) in den Blutproben detektiert (s. Abb. 4 und Abb. 5). Dabei wurde zunächst die Zellpopulation der Lymphozyten von den restlichen Blutzellen sowie dem Detritus abgegrenzt. Aus dieser Population wurden mithilfe von CD3- und CD4-Antikörpern die T-Helferzellen isoliert, aus welchen wiederum die $CD25^{pos}CD127^{low}$ T-Regulatorzellen abgegrenzt wurden. Diese Zellsubpopulation wurde über einen CD45RA-Antikörpernachweis in naive und *memory* T-Regulatorzellen unterteilt (s. Abb 4).

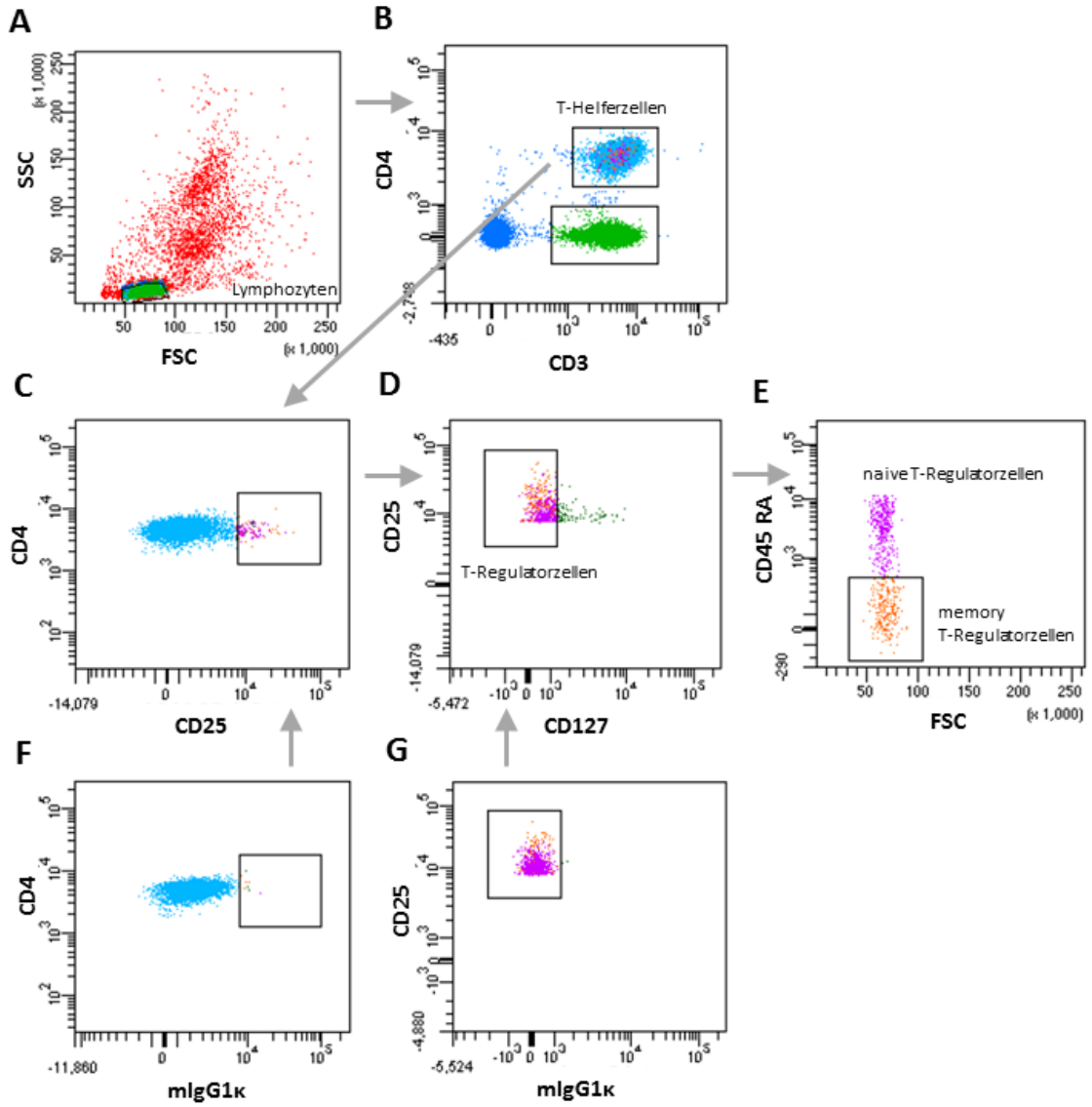

Abb. 4: Durchflusszytometrische Analyse und *Gating* von T-Regulatorzellen: (**A**) Mithilfe einer Antikörper-spezifischen durchflusszytometrischen Zellsortierung und der anschließenden Abgrenzung mittels des *Forward*- (FSC) und *Sidescatters* (SSC) wurde die Zellpopulation der Lymphozyten von den restlichen Zellen sowie dem Detritus der Blutproben abgegrenzt. (**B**) Mithilfe des Nachweises von CD3 und CD4 wurden ebenfalls die $CD3^{pos}CD4^{neg}$ T-Zellen isoliert. Unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers wurden daraus die $CD25^{pos}$ Zellen bestimmt. (**C** und **D**) Von diesen wurden mittels eines CD127-Antikörpers die $CD25^{pos}CD127^{low}$ T-Regulatorzellen abgegrenzt. (**F** und **G**) Die genaue Abgrenzung dieser Populationen erfolgte mittels Isotypenkontrolle mit den jeweiligen MausIgG1κ-Antikörpern. (**E**) Mittels eines CD45RA-Antikörpers erfolgte die Einteilung der $CD25^{pos}CD127^{low}$ T-Regulatorzellen in naive und *memory* T-Regulatorzellen.

Die Detektion der γδ T-Zellrezeptor-exprimierenden T-Zellen erfolgte bis zur Isolierung der $CD3^{pos}CD4^{pos}$ T-Helferzellen genauso wie für die naiven und *memory* T-Regulatorzellen. Mithilfe des Nachweises von CD3 und CD4 wurden ebenfalls die $CD3^{pos}CD4^{neg}$ T-Zellen isoliert. Unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers wurden daraus die $CD45^{pos}$ Zellen bestimmt, um in Abhängigkeit dieser die absoluten Zellzahlen bestimmen zu können. Von diesen wurden die den γδ T-Zellrezeptor-exprimierenden Zellen abgegrenzt (s. Abb. 5). Die Population der $CD3^{pos}CD4^{pos}$ T-Helferzellen diente hier als Negativkontrolle, da die den γδ T-Zellrezeptor exprimierenden Zellen CD4 nicht exprimieren.

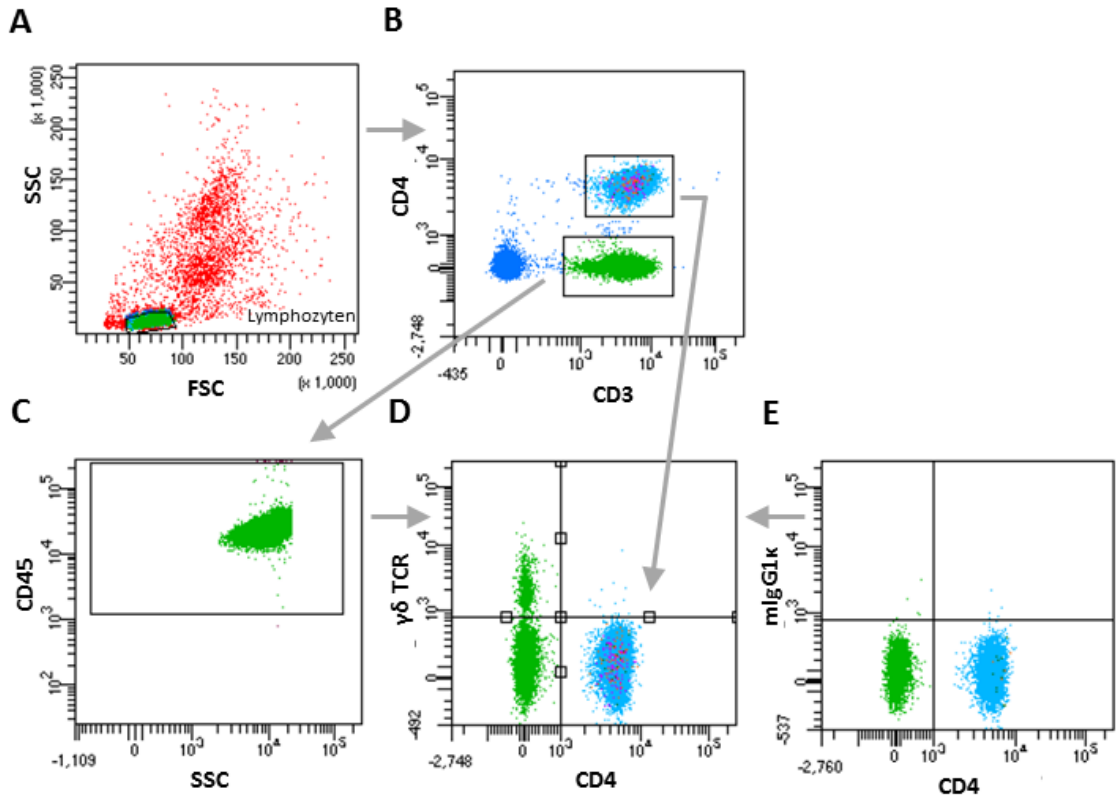

Abb. 5: Durchflusszytomterische Analyse und *Gating* von γδ-Rezeptor-positiven T-Zellen: (**A**) Mithilfe einer Antikörper-spezifischen durchflusszytometrischen Zellsortierung und der anschließender Abgrenzung mittels des *Forward*- (FSC) und *Sidescatters* (SSC) wurde die Zellpopulation der Lymphozyten von den restlichen Zellen sowie dem Detritus der Blutproben abgegrenzt. (**B**) Mithilfe des Nachweises von CD3 und CD4 wurden ebenfalls die $CD3^{pos}CD4^{neg}$ T-Zellen isoliert. (**C**) Unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers wurden daraus die $CD45^{pos}$ Zellen bestimmt, um in Abhängigkeit dieser die absoluten Zellzahlen bestimmen zu können. (**D**) Von diesen wurden die den γδ T-Zellrezeptor-exprimierenden Zellen abgegrenzt. Die Population der $CD3^{pos}CD4^{pos}$ T-Helferzellen wurde als Negativkontrolle verwendet. (**E**) Über die Isotypenkontrolle mit dem MausIgG1κ -Antikörper wurde die Subpopulation der γδ T-Zellrezeptor-exprimierenden Zellen exakt abgegrenzt.

3.2.2 Durchflusszytometrische Analyse der Monozyten

Mithilfe der durchflusszytometrischen Zellsortierung wurden drei Subpopulationen der Monozyten in den Blutproben der Patienten detektiert. Dabei wurden die „klassischen“ $CD14^{pos}CD16^{neg}$, die „intermediären“ $CD14^{pos}CD16^{pos}$ sowie die „nicht-klassischen“ $CD14^{dim}CD16^{pos}$ Monozyten voneinander abgegrenzt. Zunächst wurden unter Verwendung eines CD45-Antikörpers als Pan-Leukozytenmarker die Leukozyten durchflusszytometrisch vom Detritus abgegrenzt. Durch Verschiebung des *Forward-* und *Sidescatters* wurden aus der $CD45^{pos}$-Zellpopulation die Monozyten isoliert. Diese wurden wiederum mittels CD14- und CD16-Antikörper in die drei oben genannten Monozyten-Subpopulationen unterteilt (s. Abb. 6).

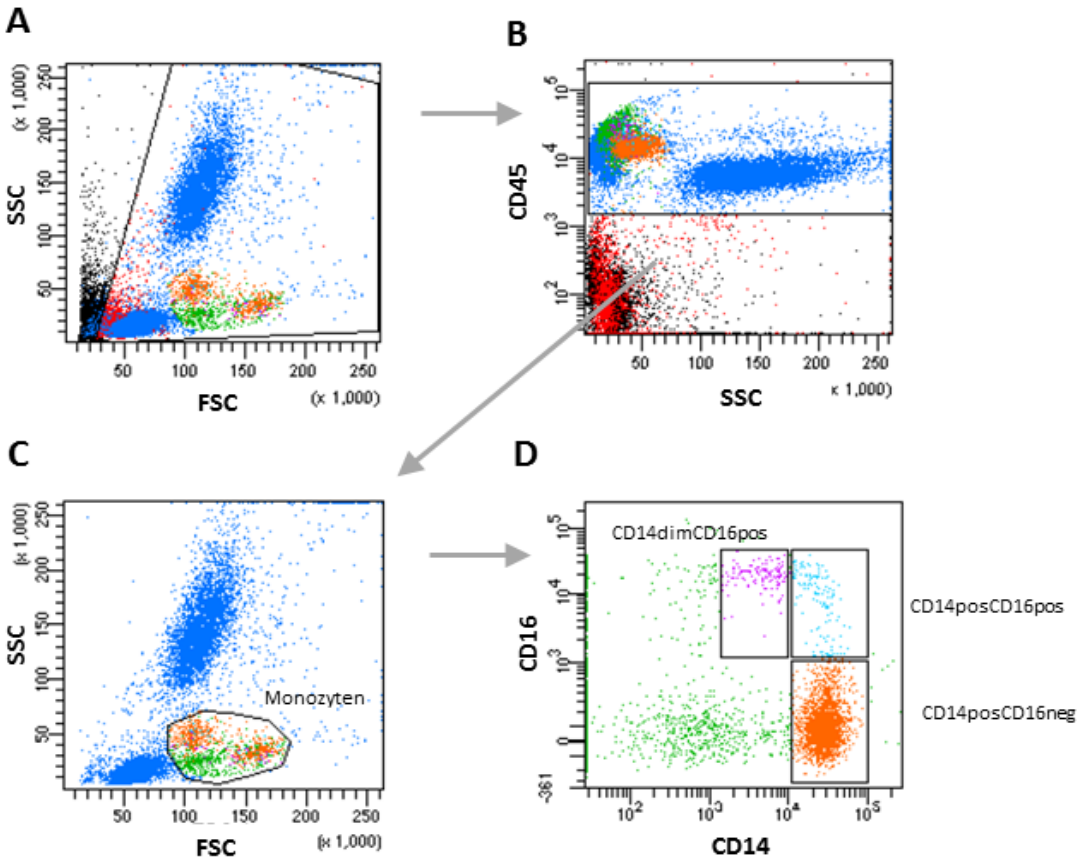

Abb. 6: Durchflusszytometrische Analyse und *Gating* der Monozytenpopulationen: (**A** und **B**) Unter Verwendung eines CD45-Antikörpers als Pan-Leukozytenmarker wurden die Leukozyten durchflusszytometrisch vom Detritus abgegrenzt. (**C**) Mithilfe des *Forward-* (FSC) und *Sidescatters* (SSC) wurden aus den $CD45^{pos}$-Zellen die Monozyten isoliert. (**D**) Diese wurden unter Verwendung von CD14- und CD16-Antikörpern in die drei Monozyten-Subpopulationen $CD14^{pos}CD16^{neg}$, $CD14^{pos}CD16^{pos}$ und $CD14^{dim}CD16^{pos}$ unterteilt.

3.2.3 Durchflusszytometrische Analyse der dendritischen Zellen

Für die durchflusszytometrische Detektion der Subpopulationen der dendritischen Zellen in den Blutproben wurde ein *Blood Dendritic Cell Enumeration*-Kit der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Dies wurde nach den Empfehlungen des Herstellers aufgrund des geringen Probenvolumens in halber Dosierung angewandt. Mithilfe des Kits wurden die drei Subpopulationen der myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 ($CD1c^{pos}CD303^{neg}$), der plasmazytären dendritischen Zellen ($CD1c^{neg}CD303^{pos}$) sowie der myeloiden dendritischen Zellen Typ 2 ($CD141^{pos}CD303^{neg}$) detektiert.

Dabei wurden unter Verwendung eines CD45-Antikörpers erneut zunächst die Leukozyten durchflusszytometrisch von den restlichen Blutzellen sowie dem Detritus getrennt. Über einen Nachweis der CD14- und CD19-Expression wurden die B-Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten ausgeschlossen. Mithilfe von CD1c- und CD303-Antikörpern wurden die Subpopulationen der myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 und die plasmazytären dendritischen Zellen detektiert. Die Identifizierung der Subpopulation der myeloiden dendritischen Zellen Typ 2 erfolgte über den Nachweis der CD141- sowie der CD303-Expression (s. Abb. 7).

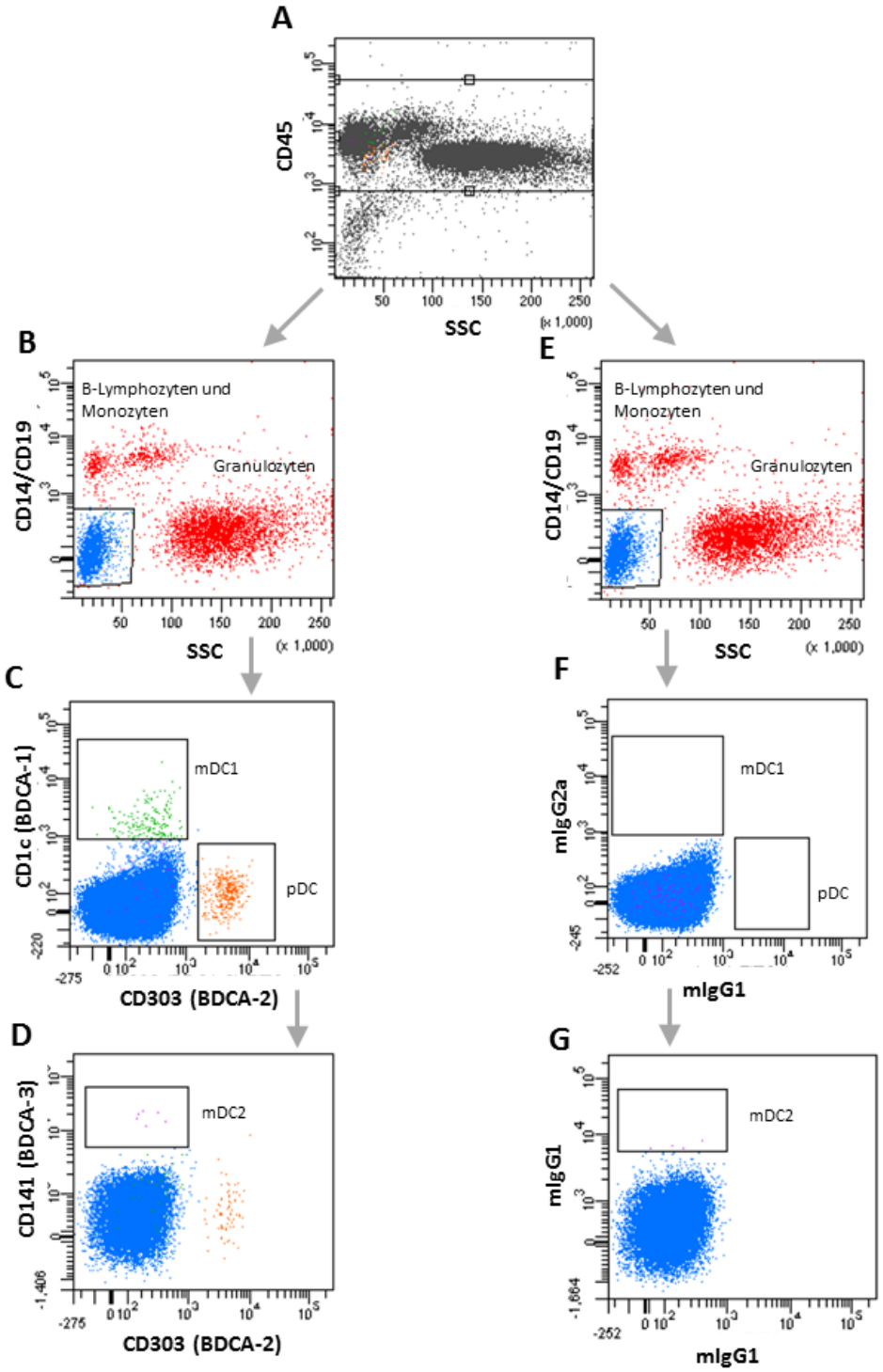

Abb. 7: Durchflusszytomterische Analyse und *Gating* der dendritischen Zellen: Mithilfe einer durchflusszytometrischen Zellsortierung wurden die drei Subpopulationen der myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 (mDC1), der plasmazytären dendritischen Zellen (pCD) sowie der myeloiden dendritischen Zellen Typ 2 (mDC2) detektiert. (**A**) Unter Verwendung eines CD45-Antikörpers wurden zunächst die Leukozyten durchflusszytometrisch von den restlichen Blutzellen sowie dem Detritus isoliert. (**B**) Über den Nachweis der CD14- und CD19-Expression wurden die B-Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten ausgeschlossen. (**C**) Mithilfe von CD1c- und CD303-Antikörpern wurden die Subpopulationen der mDC1 und die pCD identifiziert. (**D**) Die Identifizierung der Subpopulation der mDC2 erfolgte über den Nachweis der CD141- sowie der CD303-Expression. (**F** und **G**) Die entsprechenden *Gates* wurden mithilfe der MausIgG21- und MausIgG1-Isotypenkontrollen gesetzt.

3.3 Validierung der klinischen Proben

Um die Vergleichbarkeit der durchflusszytometrischen Messungen zu gewährleisten, wurde die Haltbarkeit der klinischen Proben über die Zeit validiert. Hierzu wurden die Überstände des Blutes dreier gesunder Blutspender aus den Beständen des Blutspendedienstes des Universitätsklinikums Gießen Marburg verwendet und entsprechend des Protokolls dieser Studie (s. Tab. 7) in definierten Zeitabständen (0 h, 24 h, 48 h, 72 h) nach Blutabnahme durchflusszytometrisch analysiert. Dies erfolgte für alle analysierten Zellsubpopulationen und ist in der Abb. 8 beispielhaft für sechs repräsentative Zellsubpopulationen gezeigt, bestehend aus den $CD3^{pos}CD4^{pos}$ T-Helferzellen, den $CD45^{pos}$ Leukozyten, den $CD25^{pos}CD127^{low}$ T-Regulatorzellen, den $CD16^{pos}CD56^{pos}$ natürlichen Killerzellen, den $CD14^{pos}CD16^{neg}$ Monozyten sowie den plasmazytären dendritischen Zellen. Es konnte festgestellt werden, dass die Zellzahlen der jeweiligen Populationen in den ersten 48 h vergleichsweise stabil blieben, während nach 72 h größere Schwankungen zu beobachten waren (vgl. Abb. 8). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde das maximal zulässige Alter der Proben auf 48 h nach Blutabnahme festgelegt.

Um die Reproduzierbarkeit der durchflusszytometrischen Analyse zu verifizieren, wurde eine Dreifachmessung der drei Blutproben gesunder Spender 24 h nach der Blutentnahme durchgeführt. Dies erfolgte mit Ausnahme der Monozyten für alle analysierten Subpopulationen. Gezeigt sind vier repräsentative Zellsubpopulationen bestehend aus den $CD25^{pos}CD127^{low}$ T-Regulatorzellen, den $CD45RA^{pos}$ naiven T-Regulatorzellen, den plasmazytären dendritischen Zellen sowie den myeloiden dendritischen Zellen Typ 1. Dabei konnten keine größeren Unterschiede zwischen den Einzelmessungen festgestellt werden, wodurch die Reproduzierbarkeit der durchflusszytometrischen Analyse validiert werden konnte (s. Abb. 9).

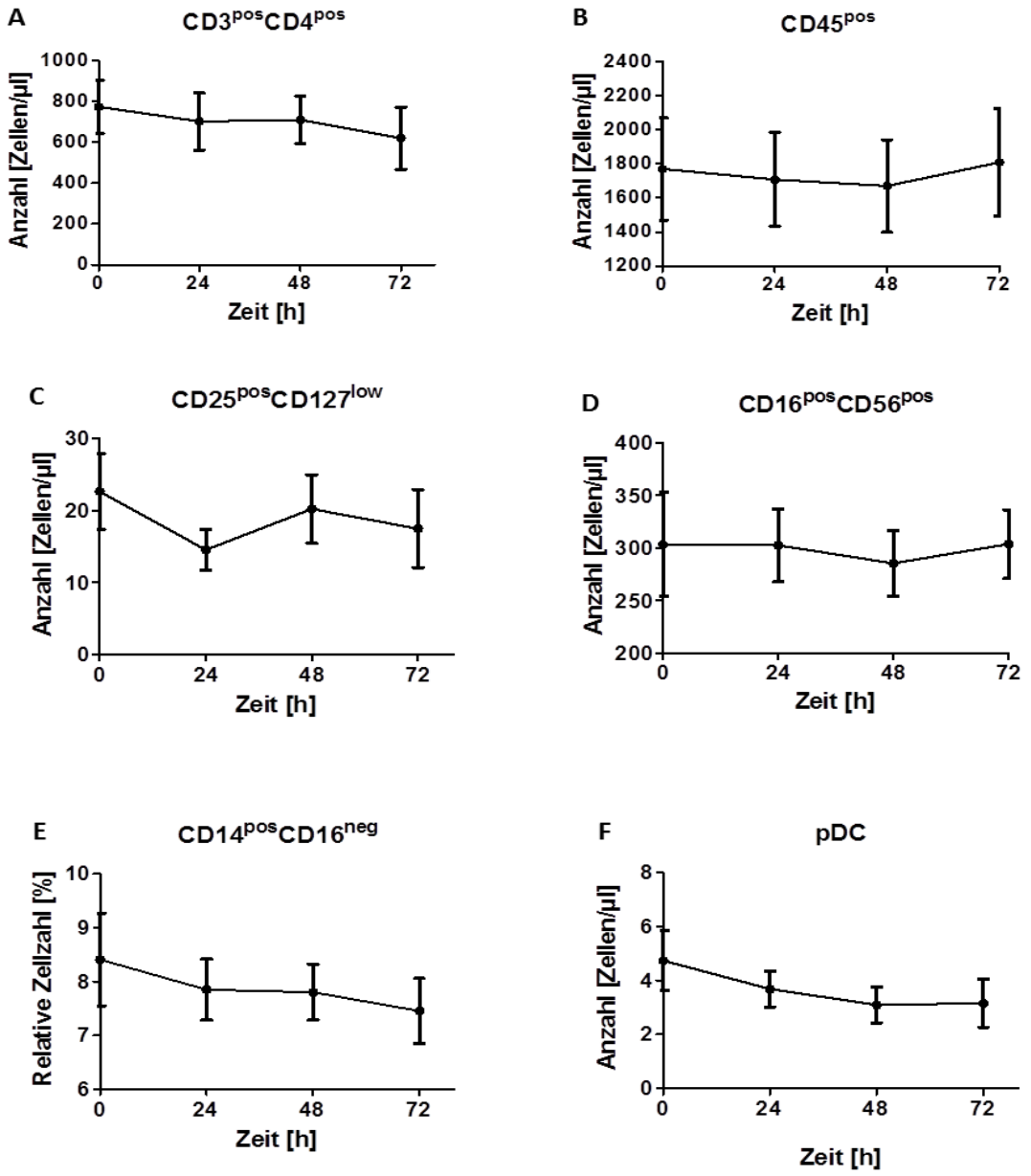

Abb. 8: Analyse der Haltbarkeit der Blutproben über einen Zeitraum von 72 h: Um die Vergleichbarkeit der durchflusszytometrischen Messungen zu gewährleisten, wurde die Haltbarkeit von drei Blutproben gesunder Spender zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Blutentnahme für alle alle Zellsubpopulationen validiert. (**A**) Die Zellzahl der $CD3^{pos}CD4^{pos}$ T-Helferzellen blieb in den ersten 48 h konstant, danach war ein Abfall der Zellzahl zu beobachten. (**B**) In den ersten 48 h war die Anzahl der $CD45^{pos}$ Leukozyten in den Blutproben konstant, worauf eine Zunahme der Zellzahl zu beobachten war. (**C**) Die Anzahl der $CD25^{pos}CD127^{low}$ T-Regulatorzellen verringerte sich stark nach 24 h. (**D**) Für die $CD16^{pos}CD56^{pos}$ natürlichen Killerzellen konnten konstante Zellzahlen über 72 h festgestellt werden. (**E**) Nach 48 h war für die $CD14^{pos}CD16^{neg}$ Monozyten ein starker Abfall in den Zellzahlen zu erkennen. Gezeigt ist die relative Menge an Monozyten im Verhältnis zur Gesamtzellzahl in Prozent. (**F**) Die plasmazytären dendritischen Zellen (pDC) zeigten eine leichte Reduzierung in der Zellzahl über einen Zeitraum von 72 h nach der Blutentnahme.

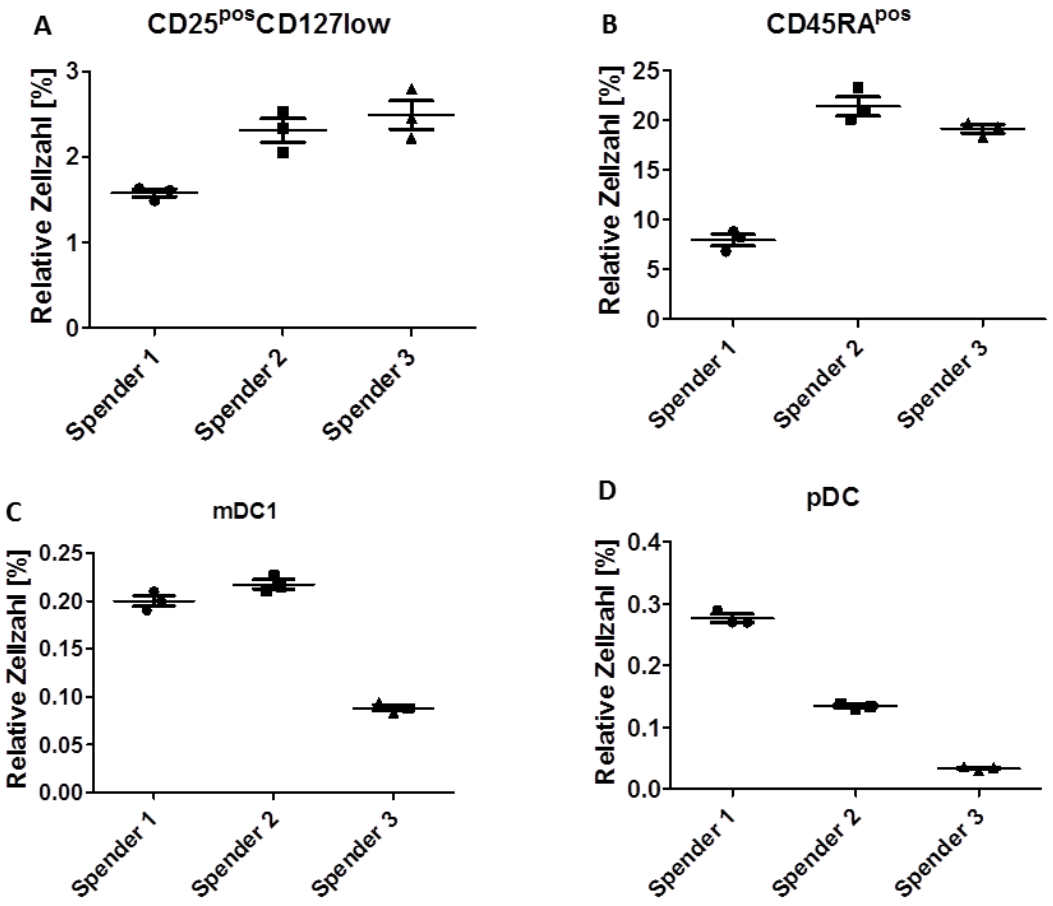

Abb. 9: Analyse der Reproduzierbarkeit der durchflusszytometrischen Messung: Um die Reproduzierbarkeit der durchflusszytometrischen Analyse zu verifizieren, wurde eine Dreifachmessung von drei Blutproben gesunder Spender 24 h nach der Blutentnahme durchgeführt. Dies erfolgte für die vier repräsentativen Zellsubpopulationen bestehend aus den (**A**) $CD25^{pos}CD127^{low}$ T-Regulatorzellen, den (**B**) $CD45RA^{pos}$ naiven T-Regulatorzellen, den (**C**) plasmazytären dendritischen Zellen (pDC) sowie den (**D**) myeloiden dentritischen Zellen Typ 1 (mDC1). Gezeigt werden die relativen Zellzahlen.

3.4 Statistische Analyse

Die unterschiedlichen Zellpopulationen wurden untereinander nach Auffälligkeiten und Tendenzen bezüglich des Schweregrades der Neutropenie, der Geschlechtszugehörigkeit der Patienten und dem Vorhandensein von granulozytären Antikörpern in den Blutproben untersucht. Des Weiteren wurden mittels Spearman-Korrelationsanalysen Zusammenhänge zwischen dem Alter der Patienten und der Anzahl der genannten Immunzellen analysiert. Um die Vergleichbarkeit der Stichprobe mit der Grundgesamtheit zu überprüfen, wurde für ausgewählte Subpopulationen ein Vergleich mit Referenzwerten aus der Primärliteratur durchgeführt.

3.4.1 Analyse der Neutropenie-Ausprägung

Wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben wurden die Patientenproben abhängig von der Anzahl ihrer neutrophilen Granulozyten in verschiedene Schweregrade der Neutropenie-Ausprägung unterteilt. Diese Gruppen wurden untereinander innerhalb der unterschiedlichen Zellpopulationen auf Auffälligkeiten bzw. Unterschiede bezüglich der Zellzahl untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Analyse exemplarisch anhand repräsentativer Zellpopulationen der T-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen dargestellt. In Abb. 10 sind die Neutropenie-Merkmale der Patienten für die Zellpopulationen der $CD3^{pos}CD4^{pos}$ T-Helferzellen, die $CD25^{pos}CD127^{low}$ T-Regulatorzellen, die den γδ T-Zellrezeptor-exprimierenden Zellen sowie die $CD45RA^{pos}$ naiven T-Regulatorzellen dargestellt. Dabei konnten bei keiner der untersuchten Populationen aussagekräftige Unterschiede bezüglich der Neutropenie-Ausprägungen festgestellt werden.

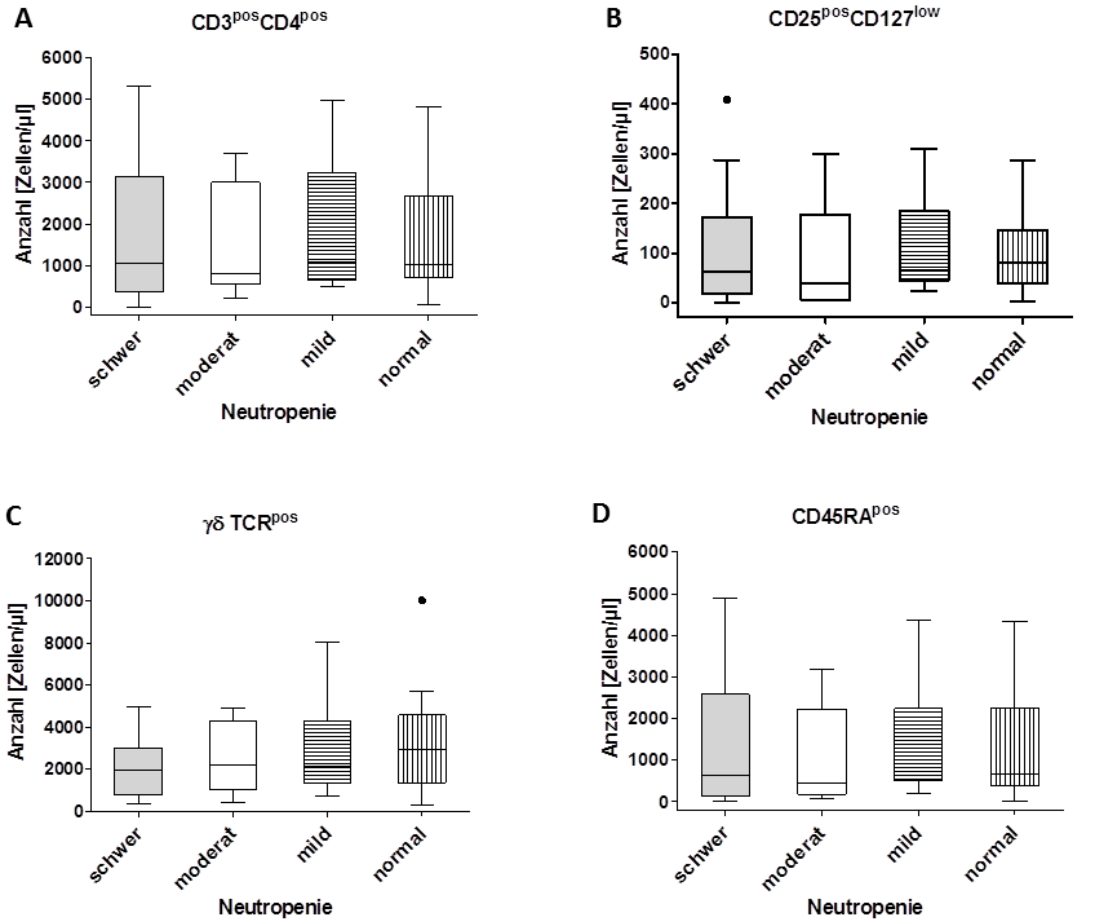

Abb. 10: Analyse der Neutropenie-Ausprägung verschiedener T-Zellsubpopulationen: Anhand der Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Blut wurde die Neutropenie-Ausprägung der Patienten in verschiedene Schweregrade (normal, mild, moderat und schwer) eingeteilt. Mithilfe eines Kruskal-Wallis-Tests wurden die T-Zellsubpopulationen der (**A**) $CD3^{pos}CD4^{pos}$ T-Helferzellen, der (**B**) $CD25^{pos}CD127^{low}$ T-Regulatorzellen, der (**C**) den γδ T-Zellrezeptor-exprimierenden Zellen ($\gamma\delta\ TCR^{pos}$) sowie der (**D**) $CD45RA^{pos}$ naiven T-Regulatorzellen statistisch auf mögliche Unterschiede in der Neutropenie-Ausprägung analysiert. Bei keiner der untersuchten Zellpopulationen konnten relevante Unterschiede in Bezug auf die Zellzahlen festgestellt werden. Die Punkte oberhalb einiger Graphen verdeutlichen Extremwerte, die außerhalb des 1,5-fachen Interquartilabstands oberhalb der 75. Perzentile liegen, die aber dennoch in die statistische Auswertung mit einbezogen wurden.

Die statistische Analyse zur Feststellung von Unterschieden in der Neutropenie-Ausprägung von $CD45^{pos}$ Leukozyten und verschiedenen Subpopulationen von Monozyten erfolgte ebenfalls mithilfe eines Kruskal-Wallis-Test (s. Abb. 11). In der durchflusszytometrischen Analyse wurden die $CD14^{pos}CD16^{neg}$, die $CD14^{pos}CD16^{pos}$ und die $CD14^{neg}CD16^{pos}$ Monozyten-Subpopulationen voneinander unterschieden. Auch für die Monozyten konnten nach Einteilung der Patientenproben anhand der Anzahl ihrer neutrophilen Granulozyten keine systematischen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen identifiziert werden.

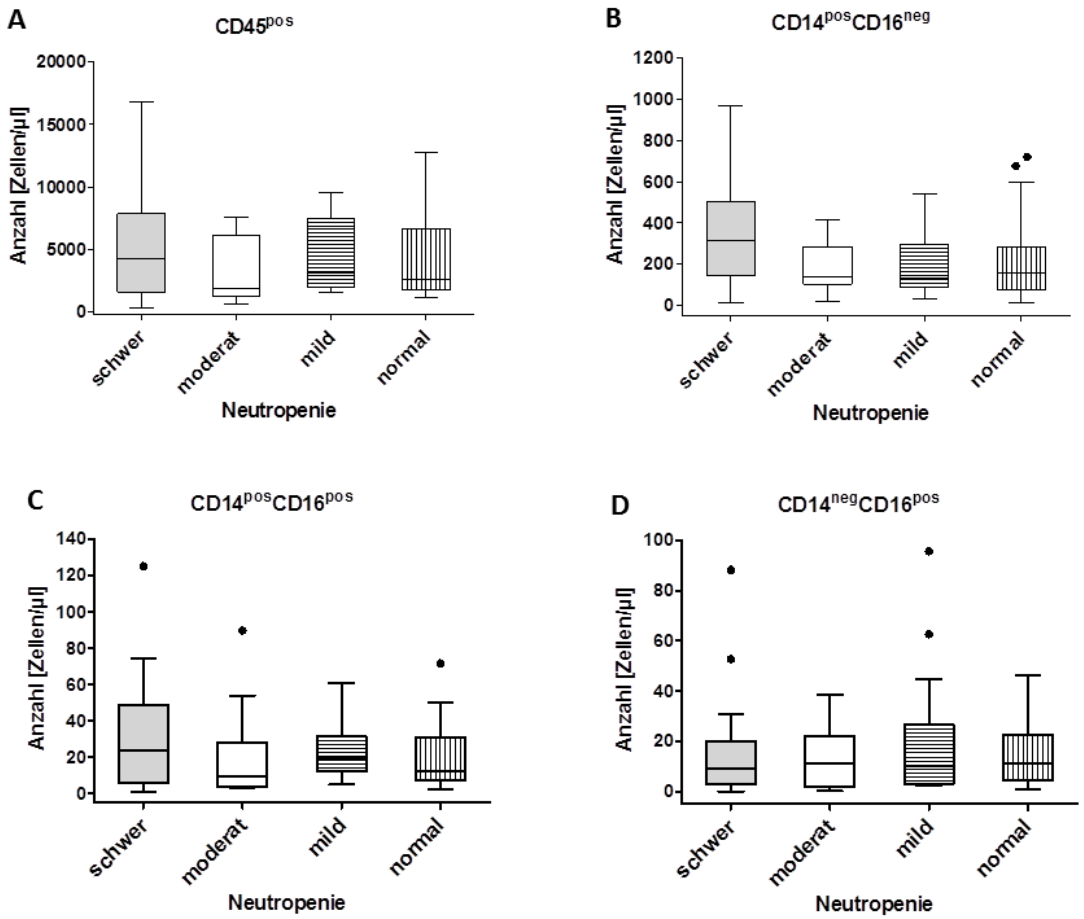

Abb. 11: Analyse der Neutropenie-Ausprägung der CD45^{pos} Leukozyten und Monozytenpopulationen: Anhand der Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Blut wurde die Neutropenie-Erkrankung der Patienten in verschiedene Schweregrade (normal, mild, moderat und schwer) eingeteilt. Mithilfe eines Kruskal-Wallis-Tests wurden die (**A**) CD45^{pos} Leukozyten und die Subpopulationen der (**B**) CD14^{pos}CD16^{neg}, der (**C**) CD14^{pos}CD16^{pos} und der (**D**) CD14^{neg}CD16^{pos} Monozyten statistisch auf mögliche Unterschiede in der Neutropenie-Ausprägung analysiert. Es konnten weder bei den CD45^{pos} Leukozyten noch bei den verschiedenen Subpopulationen der Monozyten relevante Unterschiede zwischen den Gruppen der verschiedenen Neutropenie-Schweregrade festgestellt werden. Die Punkte oberhalb einiger Graphen verdeutlichen Extremwerte, die außerhalb des 1,5-fachen Interquartilabstands oberhalb der 75. Perzentile liegen, die aber dennoch in die statistische Auswertung mit einbezogen wurden.

Eine statistische Auswertung von Subpopulationen dendritischer Zellen erfolgte ebenfalls exemplarisch für die beiden Populationen der myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 sowie den plasmazytären dendritischen Zellen. Dabei konnten für beide Subpopulation keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Proben der Patientengruppen festgestellt werden, die anhand der Schweregrade der Neutropenie-Erkrankung eingeteilt wurden (s. Abb. 12).

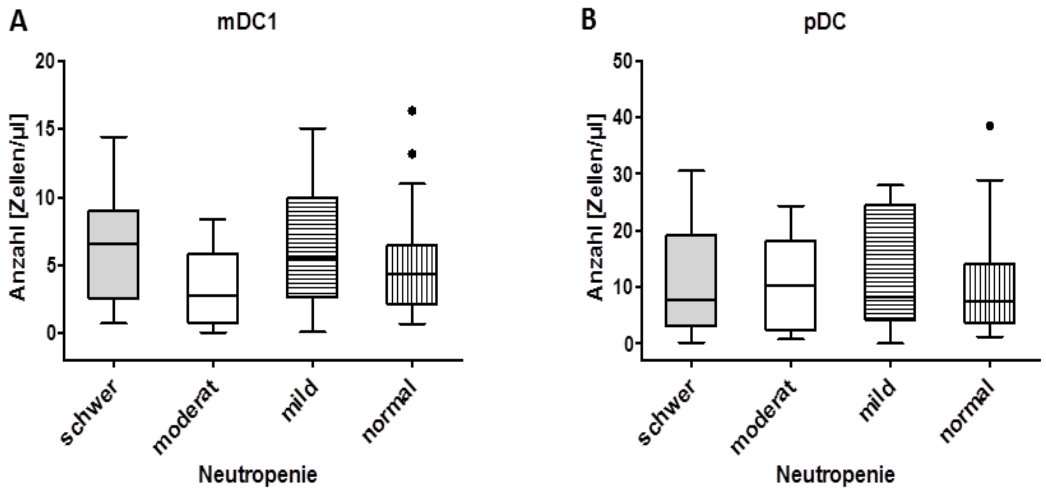

Abb. 12: Analyse der Neutropenie-Ausprägung der dendritischen Zellen: Anhand der Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Blut wurde die Neutropenie-Erkrankung der Patienten in verschiedene Schweregrade (normal, mild, moderat und schwer) eingeteilt. Mithilfe eines Kruskal-Wallis-Tests wurden exemplarisch die beiden Subpopulationen der (**A**) myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 (mDC1) sowie der (**B**) plasmazytären dendritischen Zellen (pCD) statistisch auf mögliche Unterschiede in der Neutropenie-Ausprägung analysiert. Dabei ergaben sich für keine der beiden Subpopulationen dendritischer Zellen relevante Unterschiede zwischen den Patientengruppen der verschiedenen Neutropenie-Schweregrade. Die Punkte oberhalb einiger Graphen verdeutlichen Extremwerte, die außerhalb des 1,5-fachen Interquartilabstands oberhalb der 75. Perzentile liegen, die aber dennoch in die statistische Auswertung mit einbezogen wurden.

3.4.2 Analyse möglicher geschlechtsabhängiger Zellpopulations-unterschiede

Um mögliche geschlechtsabhängige Unterschiede in den Zellzahlen verschiedener Zellpopulationen zu identifizieren, wurden die Patientenproben auf Auffälligkeiten in Abhängigkeit der Geschlechtszugehörigkeit statistisch analysiert. Wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben konnte mit 35 Mädchen (46,7 %) und 40 Jungen (53,3 %) eine ausgeglichene Geschlechterverteilung bei den im Rahmen dieser Arbeit analysierten Proben festgestellt werden.

Die statistische Analyse zur Feststellung von geschlechtsabhängigen Unterschieden erfolgte für alle Zellpopulationen mithilfe eines Mann-Whitney-U-Test (s. Abb. 13) und wird hier repräsentativ für acht verschiedene Zellpopulationen gezeigt. Dabei konnten für die $CD3^{pos}CD4^{pos}$ T-Helferzellen, die $CD25^{pos}CD127^{low}$ T-Regulatorzellen, die γδ T-Zellrezeptor-exprimierenden Zellen sowie die $CD3^{pos}CD8^{pos}$ zytotoxischen T-Zellen kein Hinweis auf einen systematischen Unterschied in Abhängigkeit vom Geschlecht des Spenders gefunden werden (s. Abb. 13 A-D). Weder für die $CD14^{pos}CD16^{neg}$ und die $CD14^{pos}CD16^{pos}$ Monozyten noch die myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 und die plasmazytären dendritischen Zellen konnten Unterschiede in der Zellzahl zwischen den

Proben identifiziert werden, die von weiblichen und männlichen Spendern stammten (s. Abb. 13 E-H).

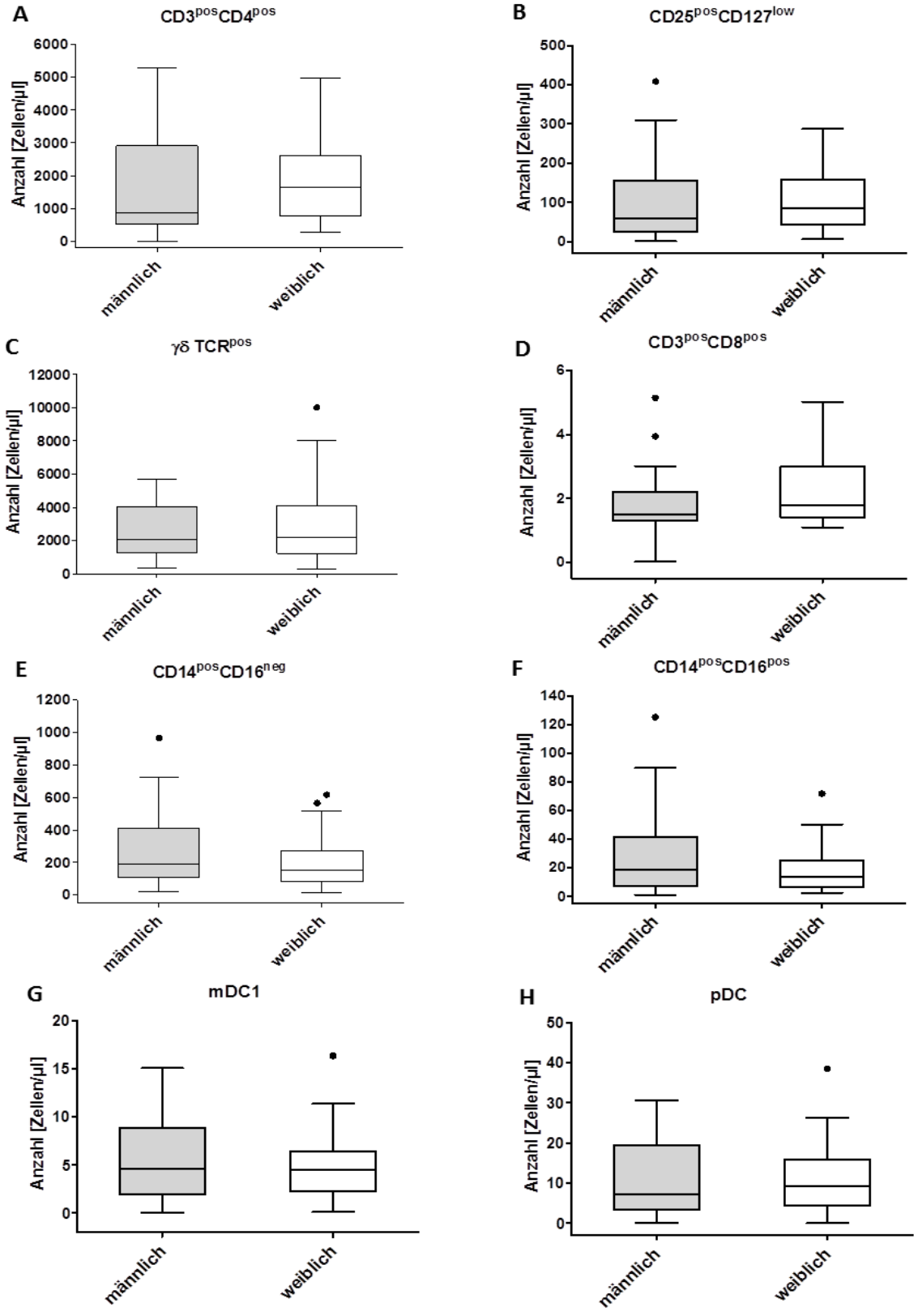

Abb. 13: Analyse von geschlechtsabhängigen Unterschieden der Populationsgrößen von T-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen: Mithilfe eines Mann-Whitney-U-Tests wurden die Subpopulationen von T-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen statistisch auf mögliche Zellzahl-Unterschiede in Abhängigkeit vom Geschlecht des Blutspenders analysiert. Gezeigt sind acht repräsentative Subpopulationen. Dabei konnten für die (**A**) $CD3^{pos}CD4^{pos}$ T-Helferzellen, die (**B**) $CD25^{pos}CD127^{low}$ T-Regulatorzellen, die (**C**) γδ T-Zellrezeptor-exprimierenden Zellen (γδ TCR^{pos}) sowie die (**D**) $CD3^{pos}CD8^{pos}$ zytotoxischen T-Zellen keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit vom Geschlecht des Spenders festgestellt werden. Auch für die (**E**) $CD14^{pos}CD16^{neg}$ und die (**F**) $CD14^{pos}CD16^{pos}$ Monozyten sowie die (**G**) myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 (mDC1) und die (**H**) plasmyzytoiden dendritischen Zellen (pDC) konnten keine geschlechtsabhängigen Unterschiede in der Zellzahl zwischen den Proben identifiziert werden. Die Punkte oberhalb einiger Graphen verdeutlichen Extremwerte, die außerhalb des 1,5-fachen Interquartilabstands oberhalb der 75. Perzentile liegen, die aber dennoch in die statistische Auswertung mit einbezogen wurden.

3.4.3 Analyse von Zellpopulationsunterschieden in Abhängigkeit der Antikörperausprägung

Wie in den Kapiteln 2.2.3 und 2.2.4 beschrieben wurden die klinischen Proben mithilfe des Granulozyten-Immunfluorenszenz-Tests (GIFT), des Granulozyten-Agglutinations-Tests (GAT), des Immobilisierungs-Assay von granulozytären Antigenen durch spezifische monoklonale Antikörper (MAIGA) sowie des Lymphozyten-Immunfluoreszenz-Tests (LIFT) auf das Vorhandensein von granulozytären Antikörpern untersucht. Im Zuge dieser Analysen konnte in den Blutproben von 15 Kindern (20 %) die Expression der entsprechenden Antikörper nachgewiesen werden, wobei für die restlichen 60 Kinder (80 %) keine Antikörper im Blut detektiert werden konnten.

Um mögliche Zusammenhänge zwischen dem Vorhandensein von granulozytären Antikörpern in Abhängigkeit vom Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme sowie der Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Blut zu identifizieren, erfolgte eine statistische Analyse mithilfe eines Mann-Whitney-U-Tests (s. Abb. 14). Mithilfe dieser Analyse zeigte sich keine Altersabhängigkeit in Bezug auf die Antikörperausprägung. Die granulozytären Antikörper ließen sich im Blut von Patienten über die gesamte untersuchte Alterspanne nachweisen (s. Abb. 14 A). Somit konnten keine Rückschlüsse auf einen Zusammenhang zwischen dem Alter der Kinder und der Expression von Antikörpern gezogen werden.

Ein ähnliches Ergebnis konnte bei der Untersuchung der Verteilung der Antikörper in Bezug auf die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Blut der Patienten festgestellt werden. Die Antikörper waren sowohl im Blut von Kindern mit einer hohen Anzahl neutrophiler Granulozyten als auch in solchen mit einer geringen Anzahl nachweisbar (s. Abb. 14 B). Es konnten keine Unterschiede bezüglich der Expression granulozytärer

Antikörper und der Anzahl neutrophiler Granulozyten und somit der Neutropenie-Ausprägung festgestellt werden.

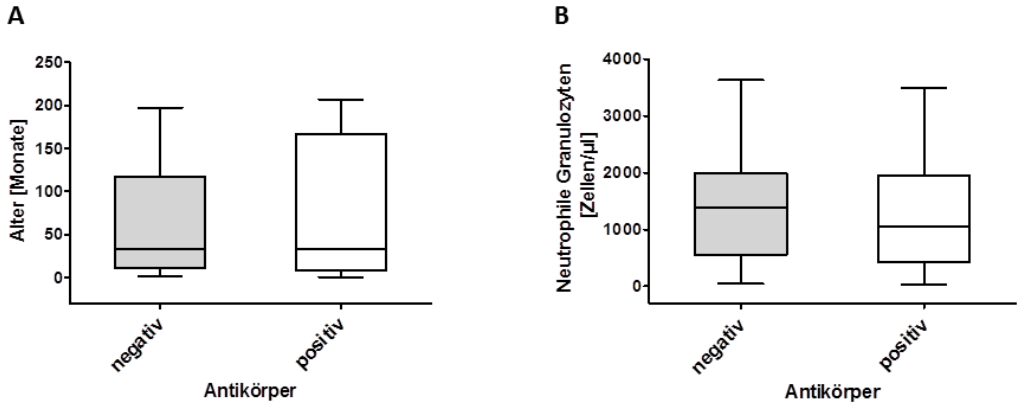

Abb. 14: Zusammenhänge zwischen der Antikörperausprägung und dem Alter der Patienten sowie der Anzahl neutrophiler Granulozyten im Blut: (**A** und **B**) Um mögliche Zusammenhänge zwischen dem Vorhandensein von granulozytären Antikörpern in Abhängigkeit vom Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme sowie der Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Blut zu identifizieren, erfolgte eine statistische Analyse mithilfe eines Mann-Whitney-U-Tests. Dabei konnten weder altersabhängige Unterschiede noch eine Abhängigkeit von der Zellzahl neutrophiler Granulozyten in der Expression granulozytärer Antikörper festgestellt werden.

Im Folgenden wurden Unterschiede in den Zellzahlen verschiedener Subpopulationen von Monozyten, dendritischen Zellen sowie T-Zellen in Abhängigkeit von dem Vorhandensein von granulozytären Antikörpern statistisch analysiert. Dabei konnten für zwei der untersuchten Subpopulationen der Monozyten statistisch relevante Auffälligkeiten bezüglich der Antikörperausprägung festgestellt werden (s. Abb. 15). Sowohl bei der Population der $CD14^{pos}CD16^{pos}$ als auch der $CD14^{dim}CD16^{pos}$ Monozyten wiesen Antikörper-positive Kinder eine geringere Zellzahl der entsprechenden Monozyten-Subpopulation im Blut auf als Kinder, bei denen keine granulozytären Antikörper nachgewiesen werden konnten ($CD14^{pos}CD16^{pos}$: $n = 75$, $p = 0{,}001$; $CD14^{dim}CD16^{pos}$: $n = 75$, $p = 0{,}01$). Für die Population der $CD14^{pos}CD16^{neg}$ Monozyten zeigten sich keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Antikörperausprägung ($CD14^{pos}CD16^{neg}$: $n = 75$, $p = 0{,}662$).

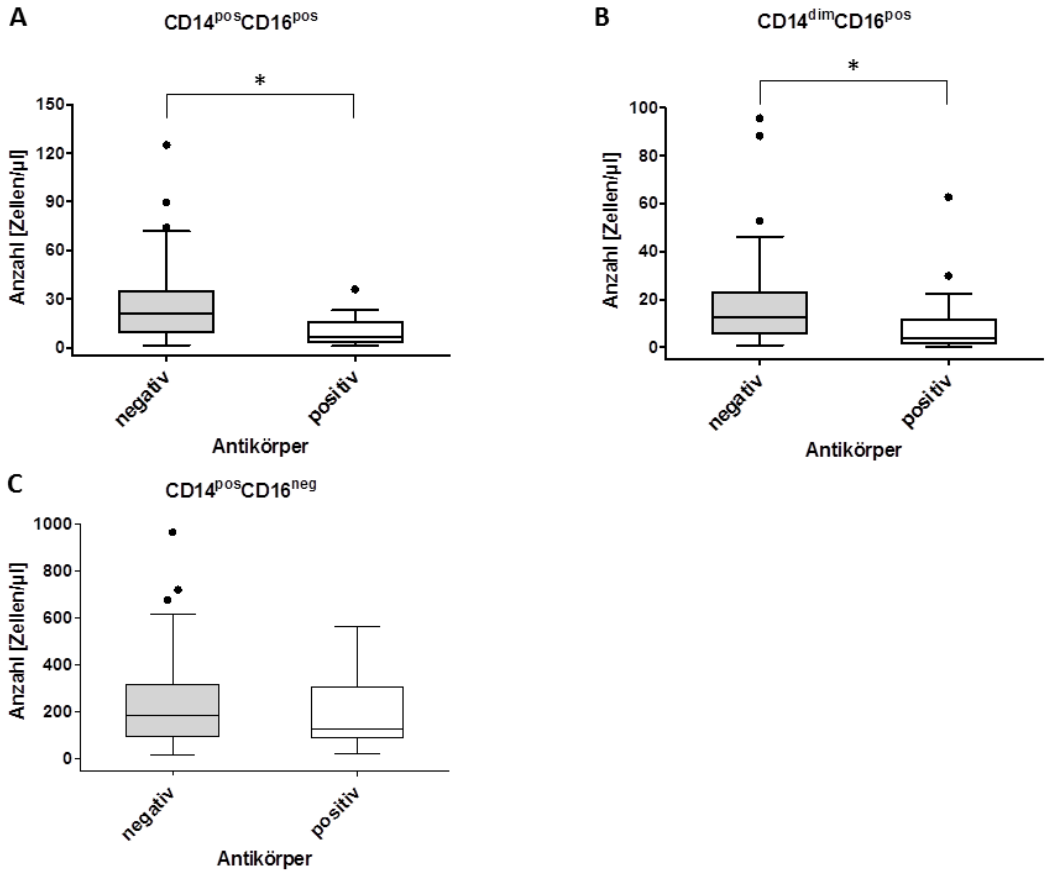

Abb. 15: Analyse möglicher Einflüsse der Antikörperausprägung auf die Größe verschiedener Monozyten-Subpopulationen: Die statistische Analyse möglicher Unterschiede in den Zellzahlen verschiedener Subpopulationen von Monozyten in Abhängigkeit von dem Vorhandensein von granulozytären Antikörpern erfolgte mithilfe eines Mann-Whitney-U-Tests. Dabei wurden die Subpopulationen der (**A**) $CD14^{pos}CD16^{pos}$, (**B**) $CD14^{dim}CD16^{pos}$ sowie der (**C**) $CD14^{pos}CD16^{neg}$ Monozyten aus Blutproben, die positiv auf granulozytäre Antikörper getestet wurden, mit denen verglichen, die von Spendern stammten, für die keine Antikörper nachgewiesen werden konnten. Dabei wiesen Antikörper-positive Kinder der $CD14^{pos}CD16^{pos}$ und der $CD14^{dim}CD16^{pos}$ Monozyten eine geringere Zellzahl der entsprechenden Monozyten-Subpopulation im Blut auf als Kinder, bei denen keine granulozytären Antikörper nachgewiesen werden konnten ($CD14^{pos}CD16^{pos}$: n = 75, p = 0,001; $CD14^{dim}CD16^{pos}$: n = 75, p = 0,01). Bei den $CD14^{pos}CD16^{neg}$ Monozyten konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden ($CD14^{pos}CD16^{neg}$: n = 75, p = 0,662). Die Punkte oberhalb einiger Graphen verdeutlichen Extremwerte, die außerhalb des 1,5-fachen Interquartilabstands oberhalb der 75. Perzentile liegen, die aber dennoch in die statistische Auswertung mit einbezogen wurden.

Bei der statistischen Analyse der Subpopulationen dendritischer Zellen konnten für die myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 ebenfalls Unterschiede zwischen den analysierten Proben in Abhängigkeit von der Antikörperausprägung festgestellt werden (s. Abb. 16 A). Dabei konnte für diese Subpopulation eine geringere Zellzahl in den Proben gezeigt werden, die aus Antikörper-positiven Kindern stammten im Vergleich zu Blutproben, in denen keine Antikörper nachgewiesen werden konnten (n = 75, p = 0,045). Für die plasmazytären dendritischen Zellen und die myeloiden dendritischen

Zellen Typ 2 konnten keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Antikkörperausprägung identifiziert werden (vgl. Abb. 17 E und F).

Auch bei der statistischen Analyse der Zellpopulation der $CD3^{pos}CD8^{pos}$ zytotoxischen T-Zellen zeigten sich Unterschiede zwischen den Blutproben aus Antikörper-positiven und Antikörper-negativen Kindern (s. Abb. 16 B). Im Blut von Spendern, in denen Antikörper nachgewiesen werden konnten, wurde eine geringere Anzahl an $CD3^{pos}CD8^{pos}$ zytotoxischer T-Zellen identifiziert im Vergleich zu solchen, in denen keine Antikörper vorhanden waren (n = 75, p = 0,032).

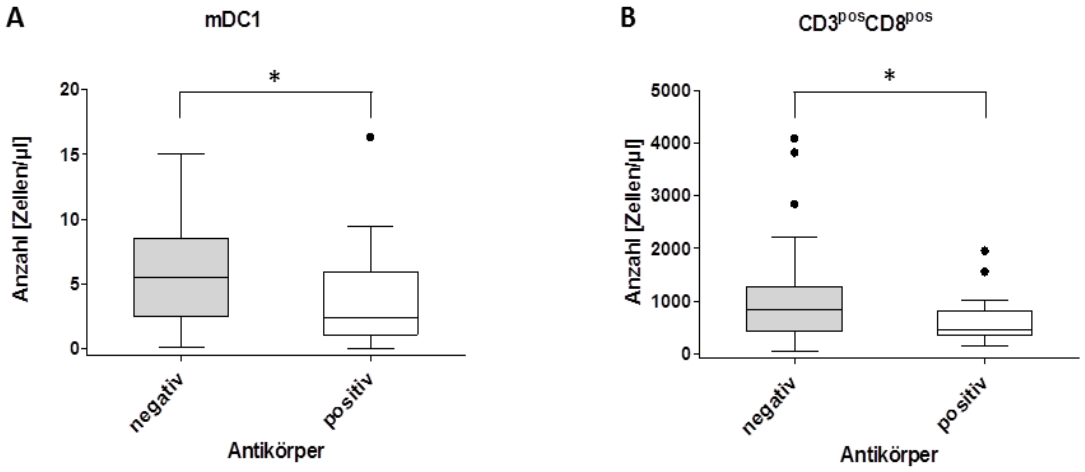

Abb. 16: Analyse möglicher Einflüsse der Antikörperausprägung auf die Populationsgröße der myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 und der $CD3^{pos}CD8^{pos}$ zytotoxischen T-Zellen: Um Unterschiede in den Zellzahlen verschiedener Subpopulationen von dendritischer Zellen und T-Zellen in Abhängigkeit vom Vorhandensein von granulozytären Antikörpern statistisch zu untersuchen, wurden Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. (**A**) Im Vergleich zu Blutproben, in denen keine Antikörper nachgewiesen werden konnten, konnte für Antikörper-positive Kinder eine geringere Zellzahl der myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 (mDC1) im Blut (n = 75, p = 0,045) nachgewiesen werden. (**B**) Auch im Rahmen der statistischen Analyse der Zellpopulation der $CD3^{pos}CD8^{pos}$ zytotoxischen T-Zellen konnte im Blut von Spendern, in denen Antikörper nachgewiesen werden konnten, eine geringere Zellzahl im Vergleich zu Antikörper-negativen Kindern identifiziert werden (n = 75, p = 0,032). Die Punkte oberhalb einiger Graphen verdeutlichen Extremwerte, die außerhalb des 1,5-fachen Interquartilabstands oberhalb der 75. Perzentile liegen, die aber dennoch in die statistische Auswertung mit einbezogen wurden.

Abgesehen von den bereits genannten $CD14^{pos}CD16^{pos}$ und $CD14^{dim}CD16^{pos}$ Monozyten (s. Abb. 15) sowie den myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 und den $CD3^{pos}CD8^{pos}$ zytotoxischer T-Zellen (s. Abb. 16) konnten bei keiner weiteren der analysierten Subpopulationen von Monozyten, dendritischen Zellen sowie T-Zellen systematische Unterschiede bezüglich der Antikörperausprägung festgestellt werden. Repräsentativ dafür werden die Ergebnisse der statistischen Analyse für die

Subpopulationen der $CD3^{pos}CD4^{pos}$ T-Helferzellen, den $CD45^{pos}$ Leukozyten, den γδ T-Zellrezeptor-exprimierenden Zellen, den $CD25^{pos}CD127^{low}$ T-Regulator Zellen sowie den myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 und den plasmazytären dendritischen Zellen in Abb. 17 gezeigt.

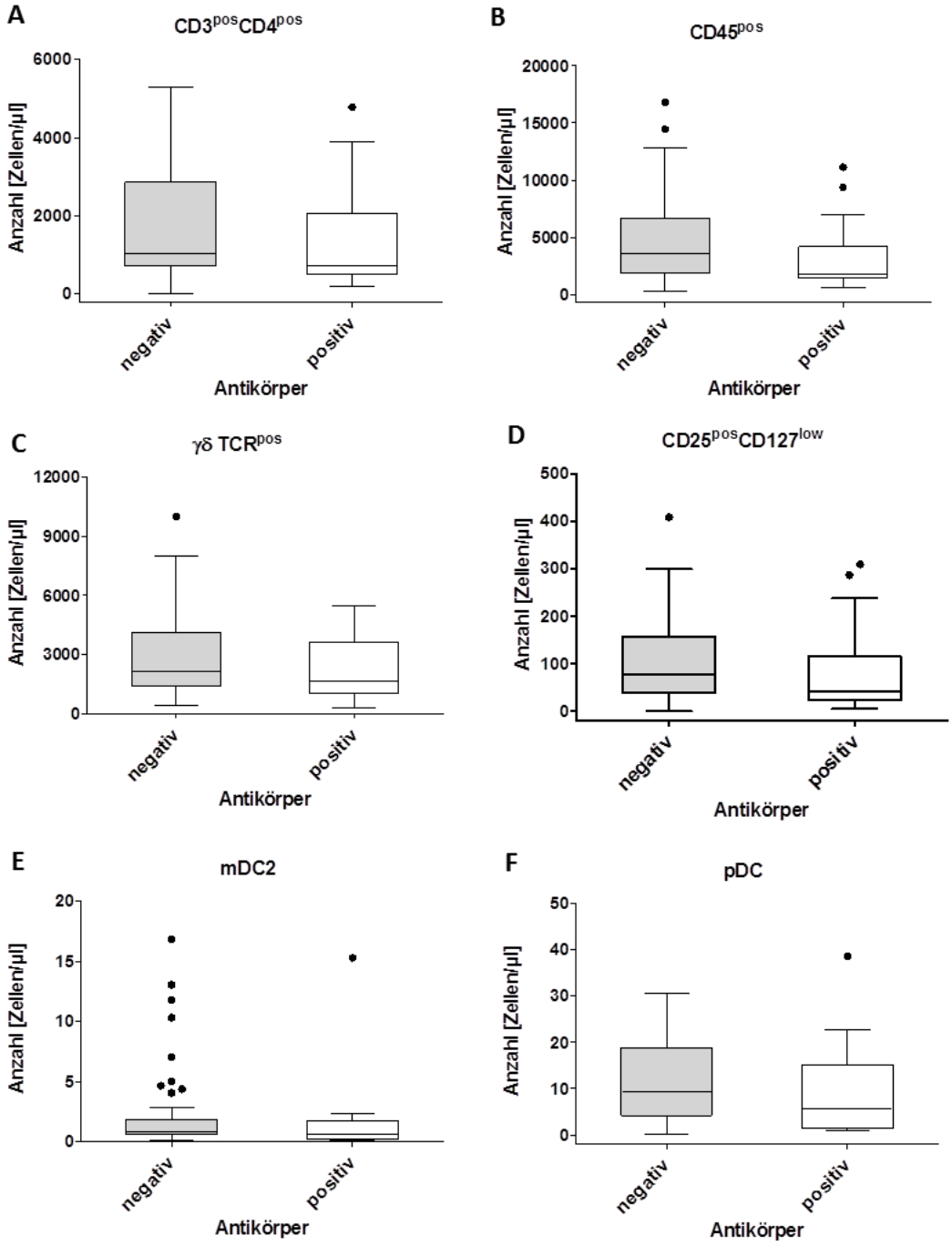

Abb. 17: Analyse möglicher Einflüsse der Antikörperverteilung auf die Populationsgröße verschiedener Subpopulationen von T-Zellen, Leukozyten und dendritischen Zellen: Um Unterschiede in den Zellzahlen verschiedener Subpopulationen von dendritischer Zellen und T-Zellen in Abhängigkeit vom Vorhandensein von granulozytären Antikörpern statistisch zu untersuchen, wurden Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Abgesehen von $CD14^{pos}CD16^{pos}$ und $CD14^{dim}CD16^{pos}$ Monozyten sowie myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 und $CD3^{pos}CD8^{pos}$ zytotoxischer T-Zellen konnten bei keiner weiteren analysierten Subpopulation von Monozyten, dendritischen Zellen sowie T-Zellen statistisch relevante Unterschiede bezüglich der Antikörperausprägung festgestellt werden. Repräsentativ dafür wurden die Ergebnisse der statistischen Analyse für die Subpopulationen der (**A**) $CD3^{pos}CD4^{pos}$ T-Helferzellen, den **(B)** $CD45^{pos}$ Leukozyten, den (**C**) γδ T-Zellrezeptors-exprimierenden Zellen ($\gamma\delta\ TCR^{pos}$), den (**D**) $CD25^{pos}CD127^{low}$ T-Regulator Zellen sowie den (**E**) myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 (mDC2) und den (**F**) plasmazytären dendritischen Zellen (pDC) gezeigt. Die Punkte oberhalb einiger Graphen verdeutlichen Extremwerte, die außerhalb des 1,5-fachen Interquartilabstands oberhalb der 75. Perzentile liegen, die aber dennoch in die statistische Auswertung mit einbezogen wurden.

Die oben gezeigten Ergebnisse zeigen Analysen an Patientendaten des gesamten im Rahmen dieser Studie untersuchten Patientenkollektivs (n = 75). Außerdem wurden statistische Analysen an einer Teilpopulation der Patientenproben durchgeführt. Capsoni et al. (2005) beschrieben ein Gesunden der betroffenen Patienten bis zu einem Alter von zwei bis drei Jahren. Aufgrund dieser Tatsache wurden Analysen an einer Teilpopulation der Probanden bis zu einem Alter von maximal 36 Monaten durchgeführt. Um die oben gezeigten statistischen Auffälligkeiten bezüglich der Monozyten-Subpopulationen sowie der dendritischen Zellen an dieser Teilmenge der Gesamtpopulation zu untersuchen, wurden statistische Analysen bezüglich der Antikörperausprägung an Kindern bis maximal 36 Monate mithilfe des Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Diese Teilpopulation umfasste 39 Probanden, von denen 31 Probanden keine Antikörper im Blut aufwiesen. Bei acht Probanden hingegen konnten Antikörper mittels der oben beschriebenen Methoden nachgewiesen werden. Dabei konnten bei einer der untersuchten Populationen der Monozyten die an der Gesamtpopulation gezeigten statistisch relevanten Auffälligkeiten bezüglich der Antikörperausprägung reproduziert werden (s. Abb. 18). In Bezug auf die Population der $CD14^{pos}CD16^{pos}$ Monozyten wiesen Antikörper-positive Kinder eine geringere Zellzahl dieser im Blut auf als Kinder, bei denen keine granulozytären Antikörper nachgewiesen werden konnten ($CD14^{pos}CD16^{pos}$: $n = 39$, $p = 0{,}001$). Die statistischen Auffälligkeiten bezüglich der Unterschiede in der Antikörperausprägung der $CD14^{dim}CD16^{pos}$ und der $CD14^{pos}CD16^{neg}$ Monozyten sowie der myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 am Gesamtkollektiv konnten für diese Subpopulationen nicht reproduziert werden ($CD14^{dim}CD16^{pos}$: $n = 39$, $p = 0{,}052$; $CD14^{pos}CD16^{neg}$: $n = 39$, $p = 0{,}421$; mDC1: $n = 39$, $p = 0{,}059$). Auch für alle weiteren untersuchten Subpopulationen zeigten sich keine statistisch relevanten Unterschiede bezüglich der Antikörperausprägung.

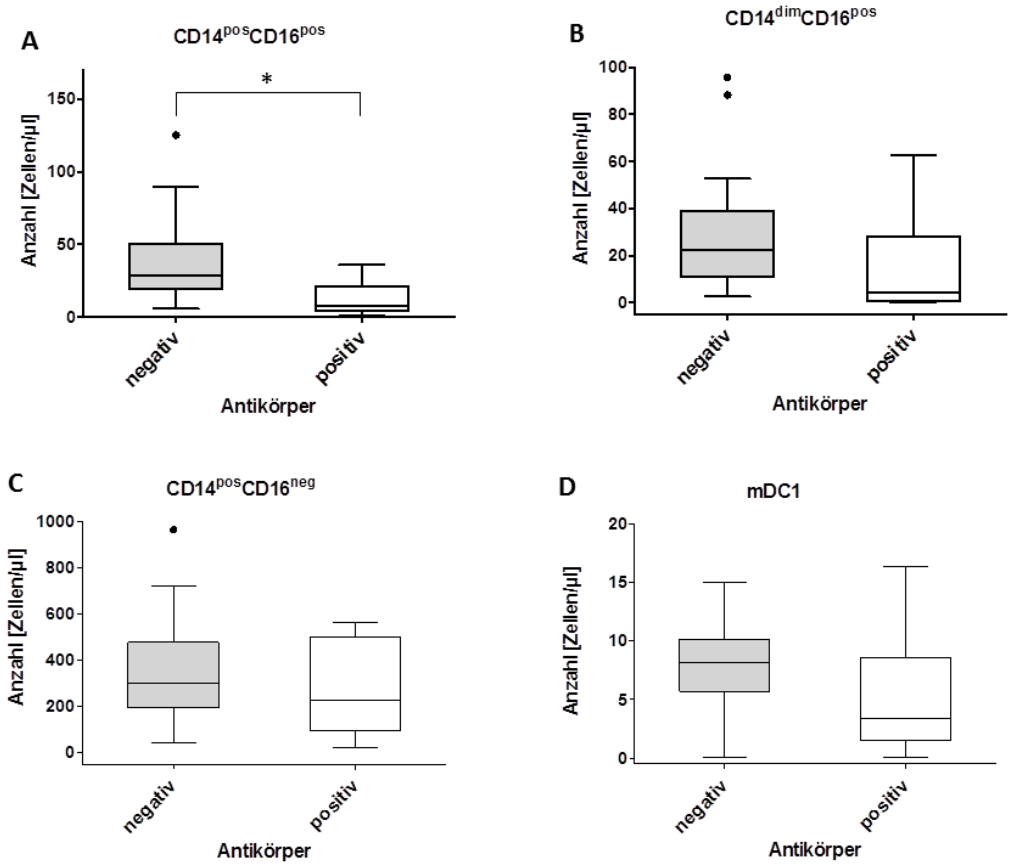

Abb. 18: Analyse möglicher Einflüsse der Antikörperausprägung auf die Größe verschiedener Monozyten-Subpopulationen und myeloiden dendritischen Zellen: Die statistische Analyse möglicher Unterschiede in den Zellzahlen verschiedener Subpopulationen von Monozyten und myeloiden dendritischen Zellen in Abhängigkeit von dem Vorhandensein von granulozytären Antikörpern erfolgte mithilfe eines Mann-Whitney-U-Tests. Dabei wurden die Subpopulationen der (**A**) $CD14^{pos}CD16^{pos}$, (**B**) $CD14^{dim}CD16^{pos}$, der (**C**) $CD14^{pos}CD16^{neg}$ Monozyten und der (**D**) mDC1 aus Blutproben, die positiv auf granulozytäre Antikörper getestet wurden, mit denen verglichen, die von Spendern stammten, für die keine Antikörper nachgewiesen werden konnten. Dabei wiesen Antikörper-positive Kinder eine geringere Zellzahl der $CD14^{pos}CD16^{pos}$ Monozyten-Subpopulation im Blut auf als Kinder, bei denen keine granulozytären Antikörper nachgewiesen werden konnten ($CD14^{pos}CD16^{pos}$: n = 39, p = 0,001). Bei den $CD14^{dim}CD16^{pos}$ Monozyten, den $CD14^{pos}CD16^{neg}$ Monozyten und den mDC1 konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden ($CD14^{dim}CD16^{pos}$: n = 39, p = 0,052; $CD14^{pos}CD16^{neg}$: n = 39, p = 0,421; mDC1: n =39, p = 0,059). Die Punkte oberhalb einiger Graphen verdeutlichen Extremwerte, die außerhalb des 1,5-fachen Interquartilabstands oberhalb der 75. Perzentile liegen, die aber dennoch in die statistische Auswertung mit einbezogen wurden.

3.4.4 Analyse von Zellpopulationsunterschieden in Abhängigkeit vom Alter der Probanden

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Alter der Probanden zum Zeitpunkt der Blutentnahme und unterschiedlichen Zellpopulationen von Leukozyten zu analysieren, wurde eine Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. Diese wurde gewählt, da die Annahme einer Normalverteilung der einzelnen Zellpopulationen verworfen werden musste. Bei einem Rangkorrelationskoeffizienten r von 0 wurde kein monotoner Zusammenhang angenommen, bei 0 bis 0,5 ein schwach monotoner Zusammenhang. Ein Rangkorrelationskoeffizient von 0,5 bis 0,8 beschreibt einen moderat monotonen Zusammenhang, wobei 0,8 bis 1 als ein stark monotoner Zusammenhang interpretiert wurde. Ein Rangkorrelationskoeffizient von 1 beschreibt einen perfekt monotonen Zusammenhang.

Mithilfe einer Korrelationsanalyse nach Spearman wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Alter der Probanden und der Anzahl von neutrophilen Granulozyten im Blut analysiert. Dabei konnte keine Korrelation festgestellt werden, wodurch ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Kinder und ihrer Neutropenieausprägung ausgeschlossen werden konnte (s. Abb. 19 A). Exemplarisch für T-Zellpopulationen wurde eine Korrelationsanalyse für drei Subpopulationen durchgeführt (s. Abb. 19 B-D). Im Rahmen der Analyse konnten sowohl für die $CD3^{pos}CD4^{pos}$ T-Helferzellen ($n = 75$; $p < 0{,}001$; $r = -0{,}672$), die $CD25^{pos}CD127^{low}$ T-Regulatorzellen ($n = 75$; $p < 0{,}001$; $r = -0{,}662$) als auch die den γδ T-Zellrezeptor-exprimierenden Zellen ($n = 75$; $p < 0{,}001$; $r = -0{,}612$) eine moderate, negative Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und der jeweiligen Zellanzahl identifiziert werden.

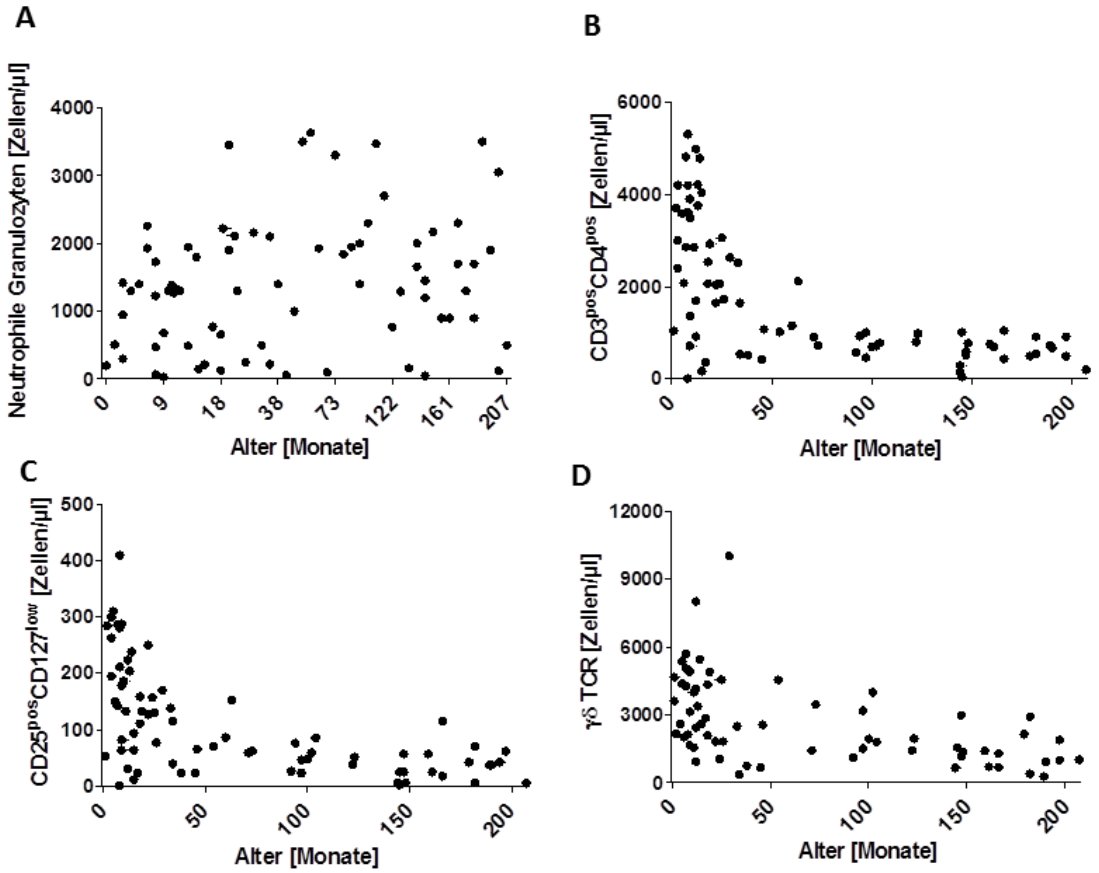

Abb. 19: Analyse einer möglichen Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und der Zellzahl von neutrophilen Granulozyten und ausgewählten T-Zellsubpopulationen: Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Alter der Probanden zur Zeit der Blutentnahme und der Zellzahl von neutrophilen Granulozyten sowie T-Zellsubpopulationen zu analysieren, wurde eine Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. (**A**) Eine Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und der Anzahl an neutrophilen Granulozyten im Blut konnte nicht festgestellt werden. Für die T-Zellsubpopulationen der (**B**) $CD3^{pos}CD4^{pos}$ T-Helferzellen ($n = 75$, $p < 0{,}001$, $r = -0{,}672$), der (**C**) $CD25^{pos}CD127^{low}$ T-Regulatorzellen ($n = 75$; $p < 0{,}001$; $r = -0{,}662$) sowie den (**D**) γδ T-Zellrezeptor-exprimierenden ($\gamma\delta\ TCR^{pos}$) Zellen ($n = 75$; $p < 0{,}001$; $r = -0{,}612$) konnte eine moderate, negative Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und der jeweiligen Zellzahl identifiziert werden.

Zusätzlich erfolgte eine Untersuchung möglicher Zusammenhänge zwischen dem Alter der Patienten und der Zellzahl von allen Subpopulationen der Monozyten, dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen und B-Lymphozyten. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der T-Zellpopulation konnte eine moderate negative Korrelation festgestellt werden. Die durchflusszytometrisch bestimmte Zellzahl der $CD14^{pos}CD16^{neg}$ ($n = 75$; $p < 0{,}001$; $r = -0{,}546$) sowie der $CD14^{pos}CD16^{pos}$ Monozyten ($n = 75$; $p < 0{,}001$; $r = -0{,}610$) nahm mit steigendem Alter der Spender ab (s. Abb. 20 A und B). Auch für die plasmazytären dendritischen Zellen ($n = 75$; $p < 0{,}001$; $r = -0{,}636$) und die myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 ($n = 75$; $p < 0{,}001$; $r = -0{,}581$) konnte eine moderate negative Korrelation identifiziert werden (s. Abb. 20 C und D). Die

Populationsgröße der $CD16^{pos}CD56^{pos}$ natürlichen Killerzellen ($n = 75$; $p < 0{,}001$; $r = -0{,}436$) nahm mit steigendem Alter der Spender ebenfalls ab (s. Abb. 20 E). Auch für die Population der $CD19^{pos}$ B-Lymphozyten ($n = 75$; $p < 0{,}001$; $r = -0{,}584$) konnte eine moderate negative Korrelation der Zellzahl mit zunehmendem Alter der Patienten identifiziert werden (s. Abb. 20 F).

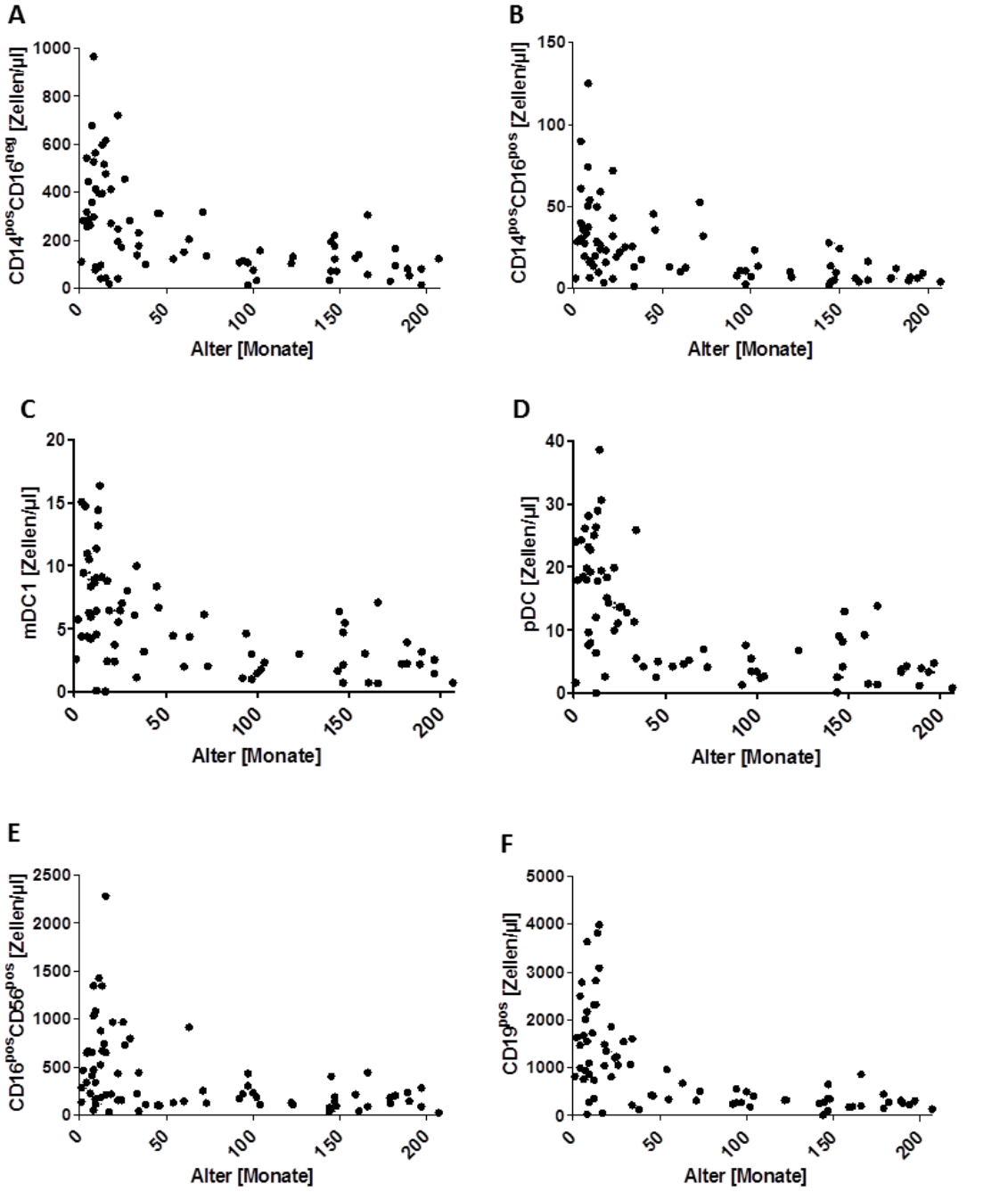

Abb. 20: Analyse einer möglichen Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und der Zellzahl von Monozyten, dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen und B-Lymphozyten: Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Alter der Probanden zur Zeit der Blutentnahme und der Zellzahl von Monozyten, dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen und B-Lymphozyten zu analysieren, wurde eine Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. Für die Populationen der (**A**) $CD14^{pos}CD16^{neg}$ (n = 75; p y 0,001; r = -0,546) und (**B**) $CD14^{pos}CD16^{neg}$ Monozyten (n = 75; p < 0,001; r = -0,546), die Populationen der (**C**) myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 (n = 75; p < 0,001; r = -0,581) (mDC1) und (**D**) plasmazytären dendritischen Zellen (n = 75; p < 0,001; r = -0,636) (pDC) sowie die (**E**) $CD16^{pos}CD56^{pos}$ natürlichen Killerzellen (n = 75; p < 0,001; r = -0,436) und die (**F**) $CD19^{pos}$ B-Lymphozyten (n = 75; p < 0,001; r = -0,584) konnte eine moderate, negative Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und der jeweiligen Zellzahl identifiziert werden.

3.4.5 Vergleich der erhobenen Studienwerte mit altersspezifischen immunologischen Referenzwerten

Um anhand der im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Werte Aussagen über die veränderten Populationsgrößen von Immunzellen treffen zu können, wurden abschließend die durchflusszytometrisch ermittelten Zellzahlen ausgewählter Zellpopulationen mit altersspezifischen immunologischen Referenzwerten gesunder Patienten von Garcia-Prat et al. (2018), van Gent et al. (2009) und Heinze et al. (2013) verglichen. Dabei wurden die berechneten Mediane aus den durchflusszytometrisch gemessenen Werten der Subpopulationen der $CD3^{pos}CD4^{pos}$ T-Helferzellen, der $CD25^{pos}CD127^{low}$ T-Regulatorzellen sowie der $CD19^{pos}$ B-Lymphozyten den entsprechenden Referenzwerten aus van Gent et al. (2009) graphisch gegenübergestellt (vgl. Abb. 21 A, C und F). Für die $CD45^{pos}$ Leukozyten, die $CD3^{pos}CD8^{pos}$ zytotoxischen T-Zellen, die $CD16^{pos}CD56^{pos}$ natürlichen Killerzellen und die drei Subpopulationen der Monozyten erfolgte der Vergleich der Mediane mit denen von Garcia-Prat et al. (2018) (vgl. Abb. 21 B, D und E und Abb. 22 C, D und E). Die myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 und 2 wurden zu einer Population der mDC zusammengefasst. Die berechneten Mediane dieser Population sowie die der plasmazytären dendritischen Zellen wurden mit Werten von Heinze et al. (2013) verglichen (vgl. Abb. 22 A und B).

Dabei konnte festgestellt werden, dass die Zellzahl der Subpopulationen aus den analysierten Proben dieser Studie mit denen aus gesunden Spendern übereinstimmten. Einzig für die Population der klassischen $CD14^{pos}CD16^{neg}$ Monozyten zeigten erkrankte Kinder erniedrigte Werte. Zusätzlich konnte eine Übereinstimmung mit der in Abschnitt 0 beschriebenen statistischen Analyse der Altersabhängigkeit der Probanden festgestellt werden, und zwar, dass auch hier die erhöhten Zellzahlen bei jüngeren Kindern mit zunehmendem Alter der Probanden stark abnahmen. Dieses Verhalten stimmte für alle Zellpopulationen sowohl für die im Rahmen dieser Studie ermittelten Werte als auch den altersspezifischen immunologischen Referenzwerten gesunder Patienten überein.

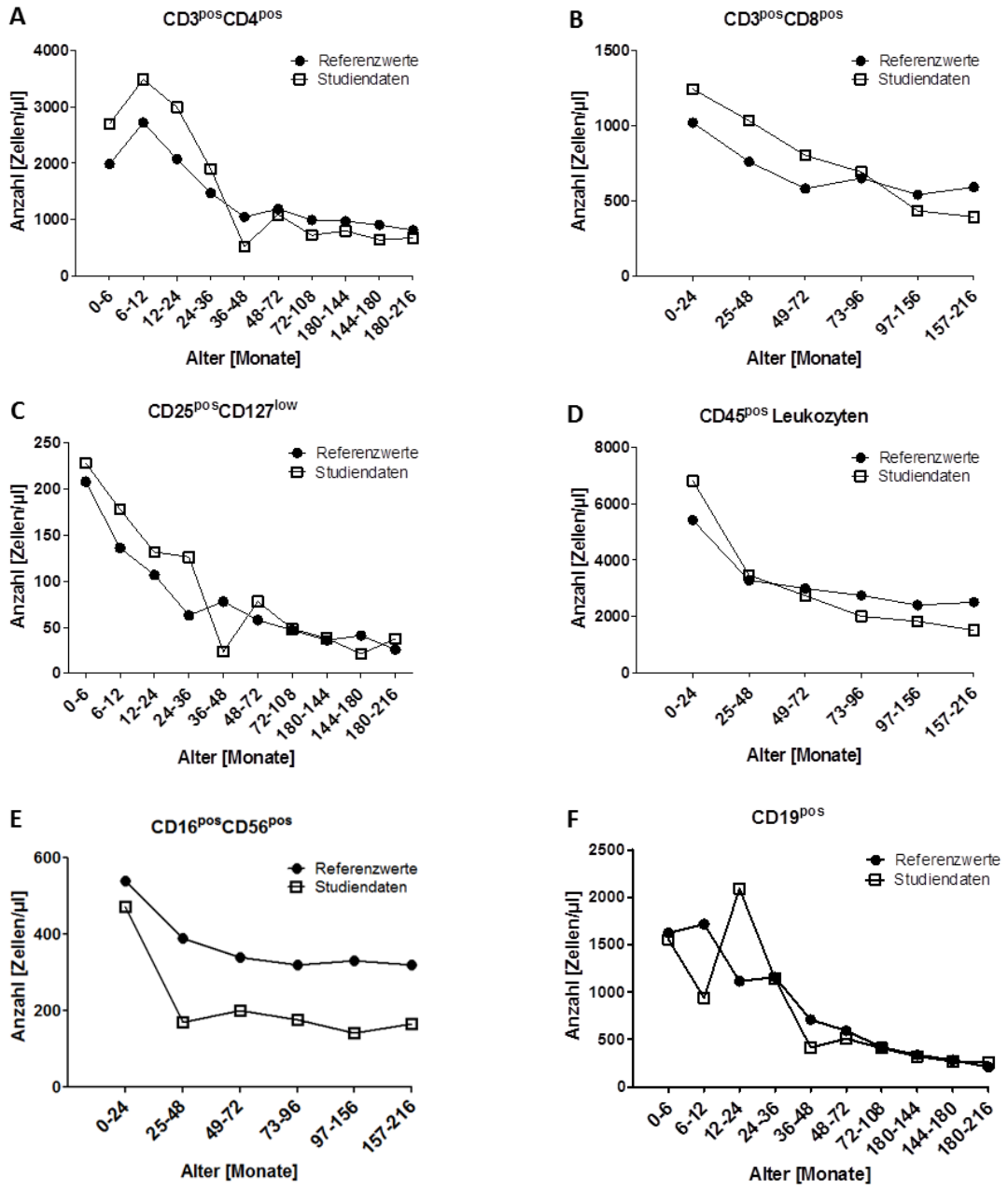

Abb. 21: Vergleich der altersspezifischen immunologischen Referenzwerte mit den erhobenen Studiendaten: Um anhand der im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Werte Aussagen über die veränderten Populationsgrößen von Immunzellen und somit der Neutropenieausprägung treffen zu können, wurden die durchflusszytometrisch ermittelten Zellzahlen ausgewählter Zellpopulationen mit altersspezifischen immunologischen Referenzwerten gesunder Patienten aus van Gent *et al.* (2009) und Garcia-Prat *et al.* (2018) verglichen. Dabei wurden die berechneten Mediane aus den durchflusszytometrisch gemessenen Werten der Subpopulationen der (**A**) $CD3^{pos}CD4^{pos}$ T-Helferzellen, der (**B**) $CD3^{pos}CD8^{pos}$ zytotoxischen T-Zellen, der (**C**) $CD25^{pos}CD127^{low}$ T-Regulatorzellen, (**D**) der CD45pos Leukozyten, der (**E**) $CD16^{pos}CD56^{pos}$ natürlichen Killerzellen und der (**F**) $CD19^{pos}$ B-Lymphozyten den entsprechenden Referenzwerten gegenübergestellt. $CD3^{pos}CD4^{pos}$ T-Helferzellen: Referenzwerte (n = 98), Studiendaten (n = 75). $CD3^{pos}CD8^{pos}$ zytotoxischen T-Zellen: Referenzwerte (n = 159), Studiendaten (n = 75). $CD25^{pos}CD127^{low}$ T-Regulatorzellen: Referenzwerte (n = 73), Studiendaten (n = 75). $CD16^{pos}CD56^{pos}$ natürlichen Killerzellen: Referenzwerte (n = 159), Studiendaten (n = 75). $CD19^{pos}$ B-Lymphozyten: Referenzwerte (n = 90), Studiendaten (n = 75).

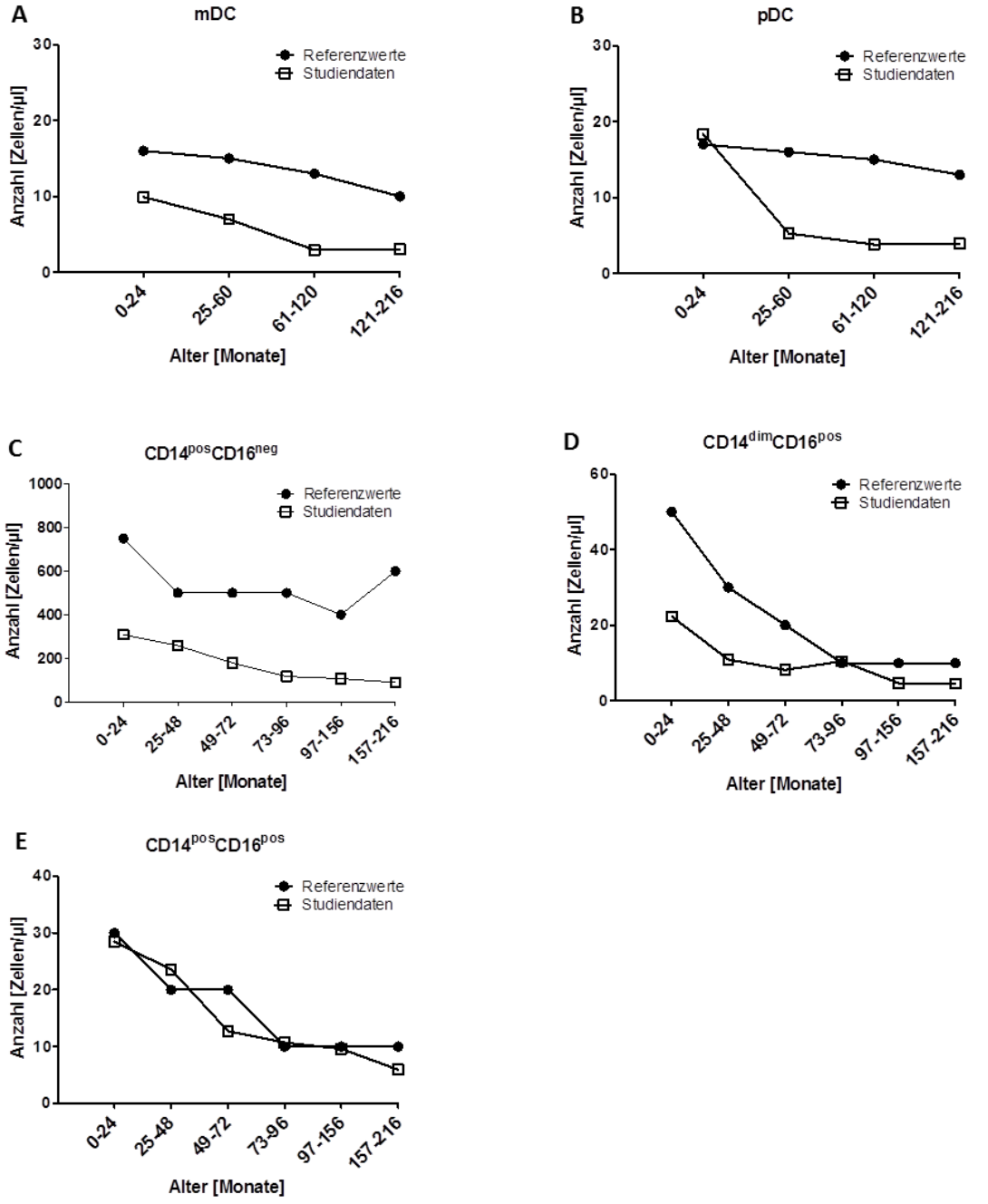

Abb. 22: Vergleich der altersspezifischen immunologischen Referenzwerte mit den erhobenen Studiendaten: Um anhand der im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Werte Aussagen über die veränderten Populationsgrößen von Immunzellen und somit der Neutropenieausprägung treffen zu können, wurden die durchflusszytometrisch ermittelten Zellzahlen ausgewählter Zellpopulationen mit altersspezifischen immunologischen Referenzwerten gesunder Patienten aus Heinze et al. (2013) und Garcia-Prat et al. (2018) verglichen. Dabei wurden die berechneten Mediane aus den durchflusszytometrisch gemessenen Werten der Subpopulationen der (**A**) myeloiden dendritischen Zellen, (**B**) plasmatytoiden Zellen, der (**C**) $CD14^{pos}CD16^{neg}$, der (**D**) $CD14^{dim}CD16^{pos}$ und der (**E**) $CD14^{pos}CD16^{pos}$ Monozyten den entsprechenden Referenzwerten gegenübergestellt. Myeloide dendritische Zellen: Referenzwerte (n = 100), Studiendaten (n = 75). plasmatytoide dendritische Zellen: Referenzwerte (n = 100), Studiendaten (n = 75). $CD14^{pos}CD16^{neg}$ Monozyten: Referenzwerte (n = 159), Studiendaten (n = 75). $CD14^{dim}CD16^{pos}$ Monozyten: Referenzwerte (n = 159), Studiendaten (n = 75). $CD14^{pos}CD16^{pos}$ Monozyten: Referenzwerte (n = 159), Studiendaten (n = 75).

4 Diskussion

4.1 Das Patientenkollektiv

Die primäre Autoimmunneutropenie des Kindesalters ist mit einer Inzidenz von 1:100.000 eine sehr seltene Erkrankung (Lyall et al. 1992). Durch die große Variabilität der Symptome ist eine klare Populationsabgrenzung oft schwer, da einige Kinder aufgrund der meist nur mild ausgeprägten bakteriellen Infektionen oft gar nicht einer klinischen Diagnostik zugeführt werden. In ca. 30 % der Fälle erfolgt die Diagnosestellung per Zufall durch Blutentnahmen aus anderen Gründen wie beispielsweise Operationen (Farrugia und Dufour 2014). Die Patientenproben, die die Grundlage dieser Studie waren, stammen aus deutschlandweit verteilten Kliniken, die eine Antikörperdiagnostik bei ihren Patienten anstrebten. Alle Kinder, die in diese Studie mit einbezogen wurden, wiesen den klinischen Verdacht auf eine Autoimmunneutropenie auf. Einige Patienten waren schon vordiagnostiziert und ihr Blut wurde nur zur Verlaufskontrolle eingesendet. Bei anderen Patienten ging es um eine Ursachenforschung ihrer Neutropenie. Um eine möglichst große Gruppe von Kindern zu detektieren, wurde die Altersbegrenzung auf die gesamte Kindheit bis einschließlich des 17. Lebensjahres ausgedehnt, obwohl die primäre Autoimmunneutropenie sich meist auf die frühe Kindheit beschränkt und im Alter von drei bis fünf Jahren einen benignen Verlauf aufweist. Es wurden allerdings auch Fälle in älteren Patienten beschrieben (Smith und Smith 2001). Da alle Patienten das klinische Bild einer Autoimmunneutropenie zeigten, wurden sie trotz der großen Altersspanne in diese Studie mit einbezogen.

Durch die Zeit- und Altersbegrenzung dieser Studie und die Begrenztheit des eingewiesenen Probenmaterials, da nur EDTA-antikoagulierte Proben verwertet werden konnten und viele Kliniken nicht antikoaguliertes und damit geronnenes Nativblut zusendeten, konnte eine gewisse Vorselektion der Patienten in dieser Studie nicht verhindert werden. Somit handelte es sich um eine artifizielle Population. Zudem wurde diese Studie ohne eine gesunde Kontrollgruppe durchgeführt, da aus ethischer und Ablaufs-technischer Sicht keine Möglichkeit zur Gewinnung von Vergleichsproben gesunder Kinder in dieser Altersspanne vorlag. Zusätzlich wurden nicht alle Proben zur Primärdiagnostik, sondern teils auch als Verlaufskontrollen bei bekannter Autoimmunneutropenie zugesendet. Somit zeigt die Studie einen Querschnitt durch eine artifizielle Population bei Patienten in verschiedenen Krankheitsstadien.

Die Altersverteilung der untersuchten Patienten zeigte eine Spanne von 0,9 bis 207 Monaten, wobei ein Mittelwert von 68,37 Monaten und ein Median von 34 Monaten erreicht wurde. Das ist im Vergleich zu dem publizierten Erkrankungsbeginn von durchschnittlich sieben bis neun Monaten (Farrugia und Dufour 2014) eine Abweichung. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass der Zeitpunkt der Blutentnahme bei vielen Kindern nicht bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, sondern erst im weiteren Krankheitsverlauf war. Außerdem zeigt der Krankheitsverlauf meist eine Regression nach ca. zwei Jahren Krankheitsdauer (Bux et al. 1998). Dem Studiendesign geschuldet lassen sich hierzu keine Aussagen treffen.

4.2 Variabilität in der Neutropenieausprägung der Patienten

Die klinische Symptomatik der primären Autoimmunneutropenie ist auf eine Verminderung der neutrophilen Granulozyten betroffener Patienten zurück zu führen. Deshalb wurden die Patienten in Abhängigkeit der Anzahl ihrer neutrophilen Granulozyten (NG) in verschiedene Schweregrade der Neutropenie-Ausprägung unterteilt. Diese Einteilung erfolgte nach Farrugia und Dufour (2014). Kinder mit 1,0 bis 1,5 x 10^9 NG/l wurden als „mild“ klassifiziert, solche mit 0,5 bis 1,0 x 10^9 NG/l als „moderat“ und Kinder mit Werten kleiner 0,5 x 10^9 NG/l wurden als „schwer“ neutropen eingestuft. Kinder, die zum Zeitpunkt der Untersuchung mehr als 1,5 x 10^9 NG/l aufwiesen, wurden der Gruppe „normal“ zugeteilt. Diese Einteilung wurde von Farrugia und Dufour (2014) für Kinder älter als ein Jahr publiziert. In jüngeren Kindern wurde eine erhöhte Variabilität in der Anzahl von Leukozyten beschrieben, hier vor allem in den ersten zwei Lebensmonaten. Ein Patient dieser Studie war zum Zeitpunkt der Diagnostik 28 Tage alt. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Studienteilnehmern zu gewährleisten, wurde der Patient trotzdem auch nach diesen Grenzwerten eingeteilt. Die Auswertung umfasste 17 Patienten (22,7 %) mit schwerer Neutropenie, 11 Kinder (14,7 %) wiesen moderate Granulozytenzahlen auf und 17 Kinder (22,7 %) zeigten eine milde Neutropenie-Ausprägung. Insgesamt 30 Kinder (40 %) wiesen zum Zeitpunkt der Untersuchung normale Granulozytenzahlen im Blut auf.

Ein diagnostisches Kriterium der Autoimmunneutropenie ist, wie der Name nahelegt, die Neutropenie. In vorliegender Population wiesen 30 Kinder zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Erniedrigung neutrophiler Granulozyten auf, obwohl sie klinische und laborchemische Hinweise auf das Vorliegen der oben genannten Erkrankung

zeigten. Ein Argument für das Vorliegen einer Autoimmunneutropenie trotz normaler Granulozytenzahlen ergibt sich dadurch, dass auch in der Gruppe von Kindern, die normale Granulozytenzahlen aufwiesen, granulozytäre Antikörper detektiert werden konnten, was ein diagnotisches Kriterium der primären Autoimmunneutropenie ist (vgl. Kapitel 4.4). In der Studie von Audrain et al. (2011) wurden ebenfalls Kinder mit neutrophilen Zahlen über 1,5 x 10^9 NG/l in die Gruppe derer mit Verdacht auf primäre Autoimmunneutropenie eingeschlossen.

Eine Erklärung für die normalen Granulozytenzahlen könnte sein, dass die Zahlen neutrophiler Granulozyten im Blut der Patienten bei einer Infektion reaktiv ansteigen und so eine vorliegende Neutropenie maskieren könnten (Bux et al. 1998; Smith und Smith 2001). Die meisten Kinder dieser Studie wurden aufgrund einer Infektion klinisch auffällig und so der Diagnostik zugeführt. Des Weiteren unterliegen die neutrophilen Granulozyten tagesabhängigen Schwankungen (Smith und Smith 2001), was eine Einordnung der Patienten abhängig von ihrer Anzahl neutrophiler Granulozyten in ihrer Aussagekraft reduziert und somit kein zuverlässiges Diagnosekriterium darstellt.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass zirkulierende Antikörper die immunologische Funktion neutrophiler Granulozyten einschränken, ohne diese in ihrer Zahl zu reduzieren. Shastri und Logue (1993) beschrieben einen Patienten mit rezidivierenden Hautinfektionen, bei dessen neutrophilen Granulozyten ein isolierter Defekt in der Fortbewegung detektiert wurde. Die anderen Funktionen wie Phagozytosefähigkeit und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zeigten sich nicht eingeschränkt. Durch die Inkubation von Granulozyten gesunder Spender mit IgG, das aus dem betroffenen Patienten isoliert wurde, ließen sich die Fortbewegungsdefekte der Granulozyten des Patienten reproduzieren. Effekte zirkulierender Antikörper auf die Funktionsfähigkeit neutrophiler Granulozyten beschrieben auch Capsoni et al. (2005). So konnten Antikörper die Adhäsion, Aggregation, Chemotaxis, Phagozytose und metabolische Aktivierung neutrophiler Granulozyten beeinflussen. Dies ist eine weitere Erklärung für normale Werte neutrophiler Granulozyten in Patienten mit primärer Autoimmunneutropenie.

Die Gruppen der vier Neutropenieausprägungen wurden untereinander innerhalb der unterschiedlichen Zellpopulationen auf Auffälligkeiten bzw. Unterschiede bezüglich ihrer Zellzahl untersucht. Wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben zeigten sich bei keiner der untersuchten Populationen statistisch aussagekräftige Unterschiede bezüglich der

Neutropenie-Ausprägungen. Damit stellt die Zahl neutrophiler Granulozyten in der Population kein verlässliches Kriterium für die Analyse der Erkrankung dar. Durch die hohe Variabilität der Zahlen aufgrund tagesabhängige Schwankungen und begleitende Infektionen ist es schwierig, anhand dieses Parameters verlässliche Rückschlüsse auf den zugrunde liegenden Pathomechanismus in der Entstehung der primären Autoimmunneutropenie zu ziehen.

4.3 Geschlechtsabhängige Unterschiede der untersuchten Patientenproben

In der vorliegenden Population konnte mit 35 Mädchen (46,7 %) und 40 Jungen (53,3 %) eine ausgeglichene Geschlechterverteilung festgestellt werden. Dies stimmte mit den Ergebnissen verschiedener publizierter Studien überein (Bux et al. 1998; Farruggia 2016; Lyall et al. 1992). Lalezari et al. (1986) hingegen beschrieben in ihrer Studie eine erhöhte Prävalenz in Mädchen. Da dies in keiner weiteren Studie verifiziert werden konnte, ist dies vermutlich auf eine Vorselektion der zugrundeliegenden Population zurück zu führen.

In dieser Arbeit erfolgte eine statistische Analyse zur Feststellung von geschlechtsabhängigen Unterschieden zwischen einzelnen leukozytären Subpopulationen (vgl. Kap. 3.4.2). Hierbei konnten bei keiner der analysierten Subpopulationen Unterschiede zwischen den Geschlechtern der Spender detektiert werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass gonosomale Regulationsmechanismen in der Pathophysiologie der primären Autoimmunneutropenie zu vernachlässigen sind.

4.4 Der Einfluss von granulozytären Autoantikörpern auf die Erkrankung

4.4.1 Die Antikörperdiagnostik in der Ursachenfindung bei der primären Autoimmunneutropenie

Als Ursache der primären Autoimmunneutropenie wurden von Lalezari et al. (1975) erstmals Autoantikörper gegen Granulozytenantigene beschrieben, die zu einer peripheren Zerstörung und damit Zellzahl-Erniedrigung der neutrophilen Granulozyten führten. Deshalb ist für die Diagnosesicherung dieser Erkrankung eine Antikörperdiagnostik des Patientenblutes essentiell. Allerdings stellt der Nachweis

zirkulierender Antikörper im kindlichen Blut eine schwierige Aufgabe dar. In vielen Studien konnten trotz des dringenden Verdachts auf eine primäre Autoimmunneutropenie nicht in allen Patienten zirkulierenden Antikörper nachgewiesen werden (Audrain et al. 2011; Ito et al. 2011; Kobayashi et al. 2002). Als Ursache hierfür wird ein niedriger Antikörpertiter im Blut der Patienten sowie eine niedrige Affinität dieser zum FcγRIIIb-Rezeptor diskutiert (Capsoni et al. 2005). Des Weiteren ist die Antikörperkonzentration stark vom Erkrankungsstadium abhängig. Mit Fortschreiten der Erkrankung fällt die Antikörperkonzentration oft unter die Nachweisgrenze (Audrain et al. 2011; Lalezari et al. 1986). Zur Detektion der Antikörper wird aufgrund der oben genannten Schwierigkeiten eine Kombination verschiedener Nachweismethoden empfohlen (Bux et al. 1998). In der vorliegenden Studie wurden die klinischen Proben deshalb mithilfe des Granulozyten-Immunfluorenszenz-Tests (GIFT), des Granulozyten-Agglutinations-Tests (GAT), des Immobilisierungs-Assay von granulozytären Antigenen durch spezifische monoklonale Antikörper (MAIGA) sowie des Lymphozyten-Immunfluoreszenz-Tests (LIFT) untersucht. Im Zuge dieser Analysen konnten in den Blutproben von 15 Kindern (20 %) zirkulierende Antikörper nachgewiesen werden, bei den restlichen 60 Kindern (80 %) nicht. Die Schwierigkeit des Antikörpernachweises zeigt sich somit auch in dieser Studie. Eine Ursache für das geringe Antikörpervorkommen könnte der Tatsache geschuldet sein, dass sich die Kinder zum Untersuchungszeitpunkt in unterschiedlichen Krankheitsstadien befanden und die Antikörper schon unter die Nachweisgrenze gefallen sein könnten.

Des Weiteren wurde untersucht, wie sich die Antikörperausprägung in Bezug zur Altersverteilung verhält. Hierbei zeigte sich, dass sich die Antikörper im Blut der Patienten über die gesamte untersuchte Alterspanne nachweisen ließen. Dies unterstützt die Vermutung, dass die primäre Autoimmunneutropenie in Einzelfällen auch bei älteren Patienten auftreten kann, wie es von Smith und Smith (2001) publiziert wurde, auch wenn es in den meisten Fällen eine Erkrankung der frühen Kindheit ist.

Ein ähnliches Ergebnis konnte bei der Untersuchung der Verteilung der Antikörper in Bezug auf die Anzahl neutrophiler Granulozyten im Blut der Patienten festgestellt werden. Die Antikörper waren sowohl im Blut von Kindern mit einer hohen Anzahl neutrophiler Granulozyten als auch in solchen mit einer geringen Zellzahl nachweisbar. Es konnte also kein Zusammenhang bezüglich der Expression granulozytärer Antikörper und der Anzahl neutrophiler Granulozyten und somit der Neutropenie-

Ausprägung festgestellt werden. Dies stimmt mit Erkenntnissen von Capsoni et al. (2005) und Shastri und Logue (1993) überein. Als Ursache hierfür wird eine verstärkte Aktivierung von Komplementfaktor-vermittelter Phagozytose durch die Autoantikörper diskutiert. Alternativ könnte der funktionelle Status des phagozytierenden Systems zu einer mehr oder weniger effektiveren Phagozytose der opsonisierten Zellen führen. Als eine weitere Erklärung wird diskutiert, dass myeloide Vorläuferzellen im Knochenmark die gleichen Epitope exprimieren wie reife neutrophile Granulozyten. Dadurch kommt es zu einer verminderten Destruktion peripherer neutrophiler Granulozyten, aber dafür zu einer erhöhten Zerstörung von meyloiden Vorläuferzellen. Als Folge hiervon zeigte sich eine Knochenmarkshypoplasie und eine vermehrte Infektanfälligkeit (Capsoni et al. 2005).

Das Vorkommen von Antikörpern gegen myeloide Vorläuferzellen wird in Kapitel 4.5.3 ausführlich diskutiert. Des Weiteren könnten wie in Kapitel 4.2 beschrieben zirkulierende Antikörper die immunologische Funktion neutrophiler Granulozyten einschränken, ohne hierbei einen großen Einfluss auf die Anzahl dieser zu haben (Shastri und Logue 1993). Dies stellt Erklärungsansätze für die Beobachtung dar, dass das Vorhandensein von Antikörpern keinen Einfluss auf die Anzahl neutrophiler Granuloyzten im Blut der erkrankten Kinder hatte.

4.4.2 Einfluss der Spezifität der Autoantikörper auf die primäre Autoimmunneutropenie

Die Spezifität der detektierten Antikörper wurde mittels MAIGA analysiert. Die Ergebnisse wurden in Tab. 9 zusammengefasst (siehe Kap. 3.1.2). Hierbei konnten nur bei vier der 15 Antikörper-positiven Patienten die Spezifität der Antikörper ermittelt werden. Dies liegt unter anderem an einer Altersbegrenzung der Patientenproben, da nur Kinder älter als drei Jahre und positiven Ergebnissen im GIFT einer Analyse mittels MAIGA zugeführt wurden. Bei Patient G390/16 ließen sich Antikörper gegen CD16 und CD11a nachweisen. CD16 stellt als FcγRIII-Rezeptor die häufigste Zielstruktur granulozytärer Antigenstrukturen bei Patienten mit primärer Autoimmunneutropenie dar (Bruin et al. 2005). Hierbei sind die Antikörper größtenteils gegen die b-Form des FcγRIII-Rezeptors (HNA-1) gerichtet. Der FcγRIIIb-Rezeptor bindet spezifisch IgG1- und IgG3-Dimere und spielt damit eine wichtige Rolle in der Phagozytose von Bakterien und Immunkomplexen (Taniuchi et al. 2001). Des Weiteren wiesen die

Patienten G390/16 und G413/16 Antikörper auf, die gegen das Epitop CD11a gerichtet waren. CD11a ist auf der α_L-Kette der Leukozyten β_2-Integrin (CD18) Familie lokalisiert und bildet das Epitop HNA-5. CD11a/CD18 findet sich auf allen Leukozyten und spielt eine Rolle bei der Leukozytenadhäsion. Autoantikörper gegen HNA-5 wurden bisher nicht im Zusammenhang mit Autoimmunneutropenien, sondern mit einer aplastischen Anämie beschrieben (Bux 2008). Insgesamt zeigte sich in dieser Studie die Schwierigkeit der Antikörperdetektion bei Patienten mit primärer Autoimmunneutropenie. Von 75 Patienten wiesen nur insgesamt 15 Patienten granulozytäre Antikörper auf und davon nur ein Patient Antikörper gegen CD16, was normalerweise die häufigste Zielstruktur granulozytärer Autoantikörper darstellt. Dies könnte einerseits darauf zurück zu führen sein, dass es sich bei der Population um eine artifizielle Population handelte und diese somit in gewisser Weise eine eingeschränkte Vergleichbarkeit zu publizierten Populationen aufwies. Andererseits wurden bei anderen Studien die Patienten über längere Zeit betreut und eine Antikörperdiagnostik zu mehreren Zeitpunkten durchgeführt, was bei dieser Querschnittsstudie nicht möglich war. Die Mehrfachmessung ermöglichte eine erhöhte Sensitivität der Diagnostik. Dies war bei diesem Studiendesign nicht möglich.

Bei dem Patient G746/16 wurden positive Befunde im LIFT gefunden. Zudem wurden im MAIGA Antikörper gegen das β_2-Mikroglobulin detektiert. Das β_2-Mikroglobulin bildet einen Teil des extrazellulären Anteils des Haupthistokompatibilitätskomplexes I (MHC), was auch einen anderen Namen für das HLA-I-System darstellt. Es kommt auf allen kernhaltigen Zellen des Menschen und somit auch Leukozyten vor und ist zur Antigenpräsentation befähigt. Das Auftreten von HLA-Antikörpern steht meist im Zusammenhang mit der Transfusion von Blutkonzentraten, Schwangerschaft oder Transplantationen (Nakamura et al. 2017), also in solchen Fällen, wo Kontakt mit fremden HLA-Antigenen bestand. Es wurden allerdings auch schon HLA-Antikörper in Patienten nachgewiesen, in denen keine Alloimmunisierung stattfand (Nakamura et al. 2017). Der betroffene Patient G746/16 leidet an einer bekannten Beta-Thalassämie. Bei dem Einschluss des Patienten in diese Studie lagen keine Informationen über stattgehabte Transfusionen von Erythrozytenkonzentraten vor. Eine mögliche Erklärung für das Auftreten von HLA-Antikörpern im Serum des Patienten ist eine stattgehabte Transfusion des Patienten zur Therapie der Beta-Thalassämie. Bei der Interpretation der Antikörperdiagnostik muss beachtet werden, dass HLA-Antiköper zu falsch positiven Befunden im GIFT führen können (Bux 2008). Andererseits könnten trotz vorhandener

HLA-Antikörper zusätzlich granulozytäre Autoantikörper vorhanden gewesen sein, da der GIFT eine stark positive Reaktion zeigte und der Patient klinische Zeichen einer Autoimmunneutropenie aufwies. In einer Studie von Lalezari et al. (1986) konnten bei einigen Probanden Antikörper nachgewiesen werden, die nicht gegen neutrophile Granulozyten gerichtet waren, sondern gegen eine nicht-identifizierte Subpopulation von Lymphozyten. Dies zeigte, dass das Vorhandensein weiterer Antikörper eine primäre Autoimmunneutropenie nicht ausschließt.

Das Kind wurde bei der statistischen Auswertung als Antikörper positives Kind berücksichtigt, da formal nicht ausgeschlossen werden konnte, dass nicht zusätzlich zu den HLA-Antikörpern noch granulozytäre Antikörper vorlagen. Zudem erfüllt das Kind ansonsten durch seine klinischen Auffälligkeiten die Einschlusskriterien und keines der Ausschlusskriterien der Studie.

4.5 Die Rolle von Monozyten in der primären Autoimmunneutropenie

4.5.1 Veränderungen in Monozyten-Subpopulationen

Die Monozyten entstehen wie die Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten aus einer gemeinsamen myeloischen Stammzelle. Sie werden nach ihrer Heranreifung im Knochenmark in das Blut abgegeben, wo sie ein bis zwei Tage zirkulieren, bis sie ihren Wirkort im Interstitium erreichen. Die Monozyten sind die größten Zellen im Blut. In den Geweben differenzieren sie sich größtenteils zu Makrophagen, teils auch zu bestimmten Subpopulationen von dendritischen Zellen und erfüllen dort als Teil der angeborenen Immunantwort ihre immunologische Aufgabe als Teil des phagozytierenden Systems. Im Vergleich zu Granulozyten sind sie langlebig und sowohl zur Phagozytose als auch der Ausschüttung von Entzündungsmediatoren befähigt (Rink et al. 2012; Ziegler-Heitbrock 2014). Monozyten lassen sich anhand ihrer Oberflächenrezeptoren CD14 und CD16 in drei Subpopulationen unterteilen: die klassischen $CD14^{pos}CD16^{neg}$, die intermediären $CD14^{pos}CD16^{pos}$ sowie die nicht-klassischen $CD14^{dim}CD16^{pos}$ Monozyten (Ziegler-Heitbrock et al. 2010).

Bei der statistischen Untersuchung des Einflusses der Antikörperausprägung auf die Zellzahl der Monozyten-Subpopulationen konnten für zwei der untersuchten Populationen statistisch-relevante Auffälligkeiten festgestellt werden. Sowohl bei der Population der $CD14^{pos}CD16^{pos}$ (intermediären) als auch der $CD14^{dim}CD16^{pos}$ (nicht-

klassischen) Monozyten wiesen Antikörper-positive Kinder eine geringere Zellzahl der entsprechenden Monozyten-Subpopulation im Blut auf als Kinder, bei denen keine granulozytären Autoantikörper nachgewiesen werden konnten. Für die Population der $CD14^{pos}CD16^{neg}$ (klassischen) Monozyten konnten diese Unterschiede in Abhängigkeit von der Antikörperausprägung nicht festgestellt werden. Verstärkend konnten diese statistischen Auffälligkeiten an einer Teilpopulation der Probanden reproduziert werden. Auch in der Altersgruppe der maximal 36 Monate alten Probanden zeigten sich die $CD14^{pos}CD16^{pos}$ (intermediären) Monozyten bei Antikörper-positiven Kindern erniedrigt im Vergleich zu Kindern, bei denen keine Antikörper nachgewiesen werden konnten. Die primäre Autoimmunneutropenie ist eine Erkrankung des Kindesalters, die in Einzelfällen auch im Erwachsenenalter angegeben wurde (Smith und Smith 2001). Capsoni et al. (2005) hingegen beschrieben ein Gesunden der betroffenen Patienten bis zu einem Alter von zwei bis drei Jahren. Die Altersspanne des gesamten Patientenkollektivs reicht von 0,9 bis 207 Monaten. Um die im Rahmen dieser Studie am Gesamtkollektiv untersuchten Daten in den Zusammenhang mit Kindern in dem von Capsoni et al. (2005) beschriebenen Haupterkrankungsalter zu bringen, wurden die statistischen Auffälligkeiten an der oben genannten Teilpopulation bis einschließlich 36 Monate überprüft. Die hier gezeigten Ergebnisse reproduzieren die Auffälligkeiten bezüglich der myloiden Zellreihe und unterstützen die Aussagekraft des Probandenkollektives dieser Studie.

Im Vergleich mit Literaturreferenzwerten gesunder Kinder gleicher Altersstufe für die genannten Monozyten-Subpopulationen zeigte sich, dass die Anzahl der nicht-klassischen und intermediären Monozyten mit denen gesunder Kinder übereinstimmten. Im Gegensatz dazu zeigte sich im Literaturvergleich, dass die erkrankten Kinder weniger klassische Monozyten aufwiesen, als gesunde Kinder in der gleichen Altersstufe (vgl. Abb. 22).

Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den meisten publizierten Studien. Diese berichteten, dass Kinder mit einer primären Autoimmunneutropenie meist normale bis erhöhte Zellzahlen der Monozyten aufwiesen (Bux et al. 1998; Capsoni et al. 2005; Conway et al. 1987; Farruggia 2016). Hier ist zu beachten, dass in den zitierten Studien keine Unterscheidung zwischen den unterschiedlichen Subpopulationen der Monozyten gemacht wurde, so wie es in der vorliegenden Studie der Fall ist. Es können also keine Rückschlüsse darauf gezogen werde, ob sich in den publizierten Studien die Subpopulationen der Monozyten in ihrer Zellzahl untereinander unterschieden. Zudem

handelt es sich in den meisten Fällen um relative Verschiebungen der Monozyten, im vorliegen Fall wurden absolute Zellzahlen bestimmt.

Des Weiteren wurde in anderen Studien kein Zusammenhang zwischen der Zellzahl der Monozyten und dem Vorhandensein zirkulierender Antikörper gefunden (Bux et al. 1998), wie es in der vorliegenden Studie der Fall ist. Zusätzlich zur Monozytose wird zudem in einigen Fällen von einer Leukopenie der Patienten berichtet (Farruggia 2016). Dies konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden, da die Zellzahl der $CD45^{pos}$ Leukozyten erkrankter Kinder keine zahlenmäßigen Unterschiede zu denen gesunder Kinder aufwies.

Die vorliegen Daten dieser Studie lassen die Vermutung zu, dass die zahlenmäßige Veränderung der Monozyten im Zusammenhang mit pathologischen Vorgängen im Rahmen einer primären Autoimmunneutropenie stehen könnte. Es bleibt zu diskutieren, ob die Monozyten eine mögliche Rolle im Pathomechanismus der Erkrankung spielen oder ob es sich um reaktive Veränderungen im Rahmen der Antikörperentwicklung handelt. Es gibt verschiedene Erklärungsansätze für eine mögliche Beteiligung von Monozyten im Rahmen der Erkrankung. Eine Erklärung könnten Unterschiede in der Funktion zwischen den einzelnen Subpopulationen sein. Zahlenmäßige Unterschiede in diesen könnten somit einen Einfluss auf den funktionellen Status des Immunsystems im Rahmen der Erkrankung haben. Auf der anderen Seite könnte es sich bei den detektierten Veränderungen auch um reaktive Veränderungen im Rahmen der Antikörperbildung handeln. Kreuzreagierende Antiköper gegen myeloische Vorläuferzellen könnten hier einen Erklärungsansatz darstellen. Diese Überlegungen werden in den folgenden Kapiteln diskutiert.

4.5.2 Funktionelle Unterschiede von Monozyten-Subpopulationen

Ein Erklärungsansatz für die zahlenmäßigen Unterschiede zwischen den Monozyten-Subpopulationen könnten funktionelle Unterschiede zwischen diesen sein. Vor 20 Jahren wurde gezeigt, dass Monozyten keine homogene Population sind, sondern sich in Phänotyp und Funktion unterscheiden (Grage-Griebenow et al. 2001). Die Population der klassischen Monozyten stellt mit ca. 90 % den größten Anteil der im Blut zirkulierenden Monozyten dar, wobei die $CD16^{pos}$ einen Anteil von ca. 10 % bilden. Die intermediären und nicht-klassischen Monozyten lassen sich als $CD16^{pos}$ Zellen anhand ihrer Funktionalität in einer Gruppe zusammenfassen (Siedlar et al. 2011).

Longitudinale Studien ließen die Vermutung zu, dass zwischen den intermediären und nicht-klassischen Monozyten ein sequenzieller Zusammenhang in der Entwicklung besteht (Ziegler-Heitbrock 2014).

Die klassischen Monozyten stellen den Großteil der im Blut zirkulierenden Monozyten dar. Sie weisen im Vergleich zu den $CD16^{pos}$ Monozyten eine erhöhte Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1β und IL-6 auf (Boyette et al. 2017). Im Gegensatz dazu weisen sie ebenfalls eine erhöhte Produktion des antiinflammatorischen IL-10 (Siedlar et al. 2011) und eine eher moderate Produktion von proinflammatorischem TNF-α auf. Bei der Analyse der Chemokinrezeptoren zeigte sich, dass die klassischen Monozyten mehr CCR2-Rezeptoren aufwiesen als intermediäre und nicht-klassische Subpopulationen (Grage-Griebenow et al. 2001). Durch die Bindung von u.a. CCL2 Chemokinen an diesen Rezeptortyp wird die Chemotaxis und damit die Migration der Monozyten in das Gewebe vermittelt (Ziegler-Heitbrock 2007). Eine weitere interessante Entdeckung ist ein Anstieg in der Anzahl der klassischen Monozyten unter eine Therapie mit Glukokortikoiden (Ziegler-Heitbrock 2014).

Im Vergleich zu den klassischen Monozyten ist die Population der $CD16^{pos}$ Monozyten u.a. durch eine erhöhte Expression von HLA II-Rezeptoren und der Adhäsionsmoleküle CD11a und CD11c gekennzeichnet. Das erhöhte Vorkommen von HLA II weist auf eine höhere Fähigkeit dieser Subpopulationen hin, Antigene für $CD4^{pos}$ T-Lymphozyten zu präsentieren (Ziegler-Heitbrock 2007). Zudem weisen sie eine erhöhte Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF-α und IL-12 auf (Siedlar et al. 2011). In Patienten mit Sepsis, HIV-Infektionen, Asthma, Sarkoidose und Pankreatitis, also Patienten mit inflammatorischen Vorgängen im Körper, ist die Populationsgröße der $CD16^{pos}$ Monozyten erhöht, was auf eine vorwiegend proinflammatorische Funktion dieser Subpopulation hindeutet. Ein weiterer Hinweis darauf ist die Reduzierung ihrer Anzahl unter einer Therapie mit Glukokortikoiden.

Im Gegensatz zu den klassischen Monozyten exprimieren die $CD16^{pos}$ Monozyten kein CCR2, was zu einer verminderten transendothelialen Migration und Mobilität der Zellen führt (Grage-Griebenow et al. 2001; Weber et al. 2000). Es wird vermutet, dass diese Monozyten eine verstärkte Adhäsion zu aktiviertem Endothel aufweisen bzw. es zu einem verstärkten Entlangrollen auf solchem kommt. Als Ursache für dieses Phänomen werden verschieden Liganden des CCR5-Rezeptors, der auf dieser Subpopulation verstärkt exprimiert wird, diskutiert (Weber et al. 2000). Auch eine Beteiligung des CX3CL-Chemokins auf aktiviertem Endothel wird angenommen

(Ziegler Heidbrock 2014, 2007). Eine weitere Entdeckung ist, dass nicht-klassische Monozyten eine erhöhte Expression des SIRPα-Moleküls aufweisen. Dieses Molekül wird von myeloiden Zellen exprimiert und kann als Ligand von CD47 zwischen der Phagozytose oder dem Überleben von Zellen entscheiden (Boyette et al. 2017). Dies könnte ein Hinweis auf eine zellregulatorische Funktion der nicht-klassischen Monozyten sein. Alle monozytären Subpopulationen waren in der Untersuchung von Boyette et al. (2017) befähigt, sich zu Makrophagen zu differenzieren. Im Vergleich zu undifferenzierten Monozyten und anderen mononukleären Zellen des peripheren Blutes zeigten alle eine starke Phagozytoseaktivität, welche in den klassischen Monozyten allerdings am stärksten ausgeprägt war.

Des Weiteren reicht die Bedeutung der $CD16^{pos}$ Monozyten über ihre Funktion bei Bekämpfung von mikrobiellen Infekten hinaus. Auch bei viralen Erkrankungen lassen sich Unterschiede zwischen den Monozyten-Subpopulationen feststellen. Das HI-Virus, das HC-Virus und das Dengue-Virus scheinen vor allem $CD16^{pos}$ Monozyten zu befallen (Ziegler-Heitbrock 2014). Wieso und ob hier das unterschiedliche Migrationsverhalten im Pathomechanismus der Erkrankungen eine Rolle spielt, ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Die Zusammenschau dieser Befunde lässt die Vermutung zu, dass die verschiedenen Subpopulationen der Monozyten unterschiedliche immunologische Funktionen bei inflammatorischen Vorgängen übernehmen. Dies zeigt sich durch ihre Unterschiede in der Produktion von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen, in ihrer unterschiedlichen Phagozytosefähigkeit und in der Expression von Oberflächenmolekülen, die zu Unterschieden in der transendothelialen Migration führen. Allerdings stellen diese Befunde keinen ausreichenden Erklärungsansatz für die zahlenmäßigen Unterschiede im Rahmen der primären Autoimmunneutropenie dar. Inwiefern die funktionellen Unterschiede der Subpopulationen der Monozyten nicht nur bei bakteriellen Infekten und viralen Erkrankungen eine Rolle spielen, sondern welche Rolle sie zudem in Autoimmunkrankheiten spielen, bleibt weiterhin ungeklärt. Aufgrund dieser unterschiedlichen Funktionen ist eine Erforschung ihrer Rolle in anderen Infektionen und Autoimmunerkrankungen ein lohnender Ansatz für weitere Untersuchungen.

Der funktionelle Status von Monozyten in Patienten, die an einer Neutropenie leiden, wurde bisher nur wenig untersucht, und die gegensätzlichen Ergebnisse werden kontrovers diskutiert. In Patienten mit zyklischer Neutropenie zeigte sich, dass in

Phasen einer absoluten Neutropenie die Patienten meist keine relevanten Infekte aufwiesen. Dies wurde auf eine volle Funktionsübernahme der Aufgaben der neutrophilen Granulozyten durch die Monozyten zurückgeführt. Eine Analyse der Monozytenfunktion zeigte hierbei keine Einschränkung in ihrer immunologischen Funktion (Deinard et al. 1980). Eine andere Studie von Baehner und Johnston (1972) zeigte eine eingeschränkte Phagozytosefähigkeit der Monozyten in Patienten mit zyklischer und kongenitaler Neutropenie im Vergleich zu den neutrophilen Granulozyten gesunder Probanden. Auch ein Defizit in der Zerstörung intrazellulärer Erreger wurde festgestellt. In beiden Studien waren die Infekte mit einem Anstieg der Monozytenzahlen verbunden. In allen diesen Untersuchungen wurde keine Differenzierung zwischen den genannten Subpopulationen der Monozyten durchgeführt. Diese kontroversen Befunde zeigen, dass über den funktionellen Status von Monozyten in Patienten mit primärer Autoimmunneutropenie nicht viel bekannt ist. Unter Beachtung vorheriger Überlegungen stellt dies ebenfalls einen Ansatz für weitere Untersuchungen dar.

4.5.3 Autoantikörper gegen myeloide Vorläuferzellen

Eine andere Erklärungsmöglichkeit für die Auffälligkeiten bezüglich der Monozyten in dieser Studie könnte neben funktionellen Unterschieden zwischen den Subpopulationen die Zerstörung der Monozyten aufgrund kreuzreagierender Autoantikörper sein. Eine Kreuzreaktion zirkulierender granulozytärer Antikörper mit Oberflächenstrukturen myeloider Vorläuferzellen im Knochenmark wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen bereits analysiert (Capsoni et al. 2005; Hartman und Wright 1991; Maheshwari et al. 2002).

In einer durchflusszytometrischen Untersuchung von Kansas et al. (1990) wurde das zeitliche Auftreten von Adhäsionsmolekülen auf hämatopoetischen Stammzellen in verschiedenen Reifungsstadien der Hämatopoese untersucht. Hierbei zeigte sich unter anderem, dass Stammzellen der myeloischen Zellreihe, die sich u.a. in Monozyten und Granulozyten differenzieren, gemeinsame Oberflächenmoleküle trugen. Als ein Molekül, das schon von sehr frühen hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird, wird das Leukozyten Funktionsassoziiertes Antigen I (LFA-1, CD11a/CD18) genannt. Dieses Integrin wird auf allen Leukozyten exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion (Bux 2008). Es trägt so einen Teil dazu bei, dass die im Blut

zirkulierenden Leukozyten ihren Wirkort im Interstitium erreichen können. Weiterhin publizierten Kansas et al. (1990), dass die Expression unterschiedlicher α-Untereinheiten (CD11a, CD11b und CD11c) der Leukozyten β_2-Integrine (CD18) im Laufe der Entwicklung variieren konnten. Wie in Kapitel 1.1.2 erwähnt können granulozytäre Antikörper im Rahmen der primären Autoimmunneutropenie gegen Moleküle des CD11/CD18-Komplexes als Teil des HNA-Systems gerichtet sein (Bux 2008). Der CD11/CD18-Komplex könnte somit eine Zielstruktur granulozytärer Autoantikörper bei Patienten mit primärer Autoimmunneutropenie darstellen, deren Opsonierung zu einer Zerstörung von myeloiden Vorläuferzellen führen könnte. Eine weitere interessante Entdeckung von Kansas et al. (1990) ist, dass Vorläuferzellen von neutrophilen Granulozyten kein CD16 und CD11b exprimierten, sondern dieses erst auf reifen zirkulierenden Granulozyten im Blut nachweisbar war. Eine ähnlich späte Expression war für CD14 bei Monozyten zu beobachten. Diese späte Differenzierung stellt eine weitere interessante Parallele zwischen der Entwicklung der beiden myeloiden Zellreihen dar.

Ein weiterer Baustein zur Unterstützung der Theorie granulozytärer Autoantikörper gegen myeloide Vorläuferzellen liegt in der Betrachtung von Knochenmarksbefunden betroffener Patienten. Dort zeigte sich ein heterogenes Bild. Bux et al. (1998) berichteten in 97 % der Fälle von normalem bis hyperzellulärem Knochenmark mit teilweise reduzierten Zahlen an Metamyelozyten und reifen neutrophilen Granulozyten. In einigen Fällen wurde allerdings auch ein Reifungsstopp der Hämatopoese im Metamyelozyten- und Myelozyten-Stadium festgestellt. Übereinstimmende Befunde wurden von Maheshwari et al. (2002) berichtet. Dort wurde ebenfalls normales bis hyperzelluläres Knochenmark in einem Großteil der Fälle detektiert, in einem bis fünf Prozent der Fälle zeigte sich hingegen ein hypozelluläres Knochenmark mit Antikörpern gegen myeloide Vorläuferzellen. In weiteren Studien wurde ein Reifungsstopp in der Entwicklung neutrophiler Granulozyten und myeloider Stammzellen, teilweise mit dem kompletten Fehlen reifer neutrophiler Granulozyten im Knochenmark, beschrieben (Hartman und Wright 1991; Mizuno et al. 1990). Dieses heterogene Bild an Befunden unterstützt die Annahme, dass Autoantikörper an myeloide Vorläuferzellen binden und zu einer Zerstörung dieser führen. Die Hyperzellularität des Knochenmarks in einigen Fällen könnte durch eine reaktive Proliferation anderer Vorläuferzellen erklärbar sein, die durch die Zerstörung von opsonierten Zellen angestoßen wird. Die Unterschiede zwischen hyper- und

hypozellulärem Knochenmark könnten durch verschiedene Krankheitsstadien erklärbar sein, zu der sich die Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung befanden. Somit könnten die Befunde in dieser Studie bezüglich der Monozytenausprägung durchaus auf kreuzreagierende Antikörper gegen myeloische Vorläuferzellen zurückgeführt werden. Allerdings liefern sie keine hinreichende Erklärung für die Unterschiede zwischen den Subpopulationen der Monozyten.

Hierzu machten Siedlar et al. (2011) eine interessante Entdeckung. Sie untersuchten den Einfluss einer intravenösen Immunglobulintherapie auf die Populationsgrößen verschiedener Monozyten-Subpopulationen bei Patienten mit dem variablen Immundefektsyndrom. Hierbei beobachteten sie, dass die Zellzahl der $CD16^{pos}$ Monozyten signifikant erniedrigt waren, die Zahl der klassischen Monozyten änderte sich hingegen nicht. Dies zeigte, dass sich die Immunglobuline von Typ IgG vor allen gegen die proinflammatorische $CD16^{pos}$ Monozytenpopulation richten. Obwohl die untersuchten Patienten durch ihre Immuninkompetenz häufig an Infekten litten, konnten in der Untersuchung keine erhöhten Werte für die Populationsgröße der $CD16^{pos}$ Monozyten festgestellt werden, obwohl diese bei Infektionen normalerweise ansteigen (Ziegler-Heitbrock 2007).

Diese Beobachtungen zeigen sich konkordant mit den Daten der vorliegenden Studie. In Antikörper-positiven Kindern waren die $CD16^{pos}$ Monozyten Populationen (intermediäre und nicht-klassische) im Vergleich zu erkrankten Kindern, die keine Antikörper im Serum aufwiesen, in ihrer Zellzahl erniedrigt. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Antikörper ein unterschiedliches Bindungsverhalten bei den Monozyten-Subpopulationen zeigen, was eine Erklärung für zahlenmäßige Unterschiede zwischen den Subpopulationen darstellen könnte. Eine Ursache hierfür könnte eine unterschiedliche Rezeptorvielfalt auf der Oberfläche der Subpopulationen sein. Beispielsweise können die CD11a- und CD11c-Moleküle als Heterodimer mit β_2-Integrinen (CD18) interagieren. Diese wurden als Antikgenstrukturen für granulozytäre Autoantikörper in dieser Studie identifiziert (vgl. Kapitel 1.1.2). Um weitergehend zu überprüfen, ob sich die oben genannten Befunde auf granulozytäre Autoantikörper bei Kindern mit primärer Autoimmunneutropenie übertragen lassen, sind weitere Untersuchungen der granulozytären Antikörper sowie der Oberflächenstrukturen monozytärer Subpopulationen nötig. Es würde allerdings einen weiteren möglichen Erklärungsansatz für die zahlenmäßigen Unterschiede zwischen Populationsgrößen der Monozyten-Subpopulationen darstellen.

Insgesamt zeigen die Betrachtungen der vorherigen Kapitel, dass über einen möglichen Einfluss von Monozyten auf die primäre Autoimmunneutropenie sehr wenig bekannt ist. Für die in dieser Studie erhobenen Befunde gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten, sowohl funktioneller als auch reaktiver Art. Die Ergebnisse dieser Studie bezüglich einer monozytären Beteiligung bei der primären Autoimmunneutropenie stellen als explorativer Ansatz einen orientierenden Wegweiser in eine neue Richtung dar. Bei der Interpretation der oben genannten Befunde sollte allerdings beachtet werden, dass es sich bei den vorliegenden Daten um eine explorative Untersuchung handelte, bei der die Problematik des multiplen Testens nicht beachtet wurde. Daher sind die vorangegangenen Überlegungen unter Vorbehalt zu diskutieren. Die diskreten Assoziationen dieser Studie bezüglich der unterschiedlichen Monozyten-Anzahlen sollten in einer nachfolgenden Studie unter Beachtung einer gesunden Kontrollgruppe systematisch überprüft werden.

4.6 Der Einfluss von dendritischen Zellen auf die primäre Autoimmunneutropenie

Die dendritischen Zellen sind eine heterogene Gruppe von Zellen, die sich aus unterschiedlichen hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark entwickeln. Die myeloischen dendritischen Zellen entstehen aus myeloiden Vorläuferzellen, während plasmazytäre dendritische Zellen aus lymphoiden Vorläuferzellen entstehen. In ihrer immunologischen Aufgabe stellen sie ein Bindeglied zwischen der angeborenen und erworbenen Immunantwort dar. Als Zellen des angeborenen Immunsystems sind sie als Teil des mononukleären Phagozytosesystems zur Phagozytose pathogener Mikroorganismen befähigt. Durch ihre Fähigkeit der Antigenpräsentation intra-und extrazellulärer Proteine an naive T-Zellen stellen sie das Bindeglied zur erworbenen Immunantwort dar (Collin und Bigley 2018). Anhand ihrer Oberflächenmoleküle und ihrer unterschiedlichen Entwicklung lassen sich die Subpopulationen der myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 (mDC1), der myeloiden dendritischen Zellen Typ 2 (mDC2) und der plasmazytären dendritischen Zellen (pDC) unterscheiden (Ziegler-Heitbrock et al. 2010).

Bei der statistischen Analyse der Subpopulationen dendritischer Zellen konnten für die mDC1 Unterschiede zwischen den analysierten Proben in Abhängigkeit von der Antikörperausprägung festgestellt werden. Dabei konnte für diese Subpopulation eine

geringere Zellzahl in den Proben gezeigt werden, die aus Antikörper-positiven Kindern stammten im Vergleich zu Blutproben, in denen keine Antikörper nachgewiesen werden konnten.

Für die pDC und die mDC2 dagegen konnten keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Antikörperausprägung identifiziert werden. Im Vergleich zu Referenzwerten gesunder Kinder der gleichen Altersstufe wiesen die erkrankten Kinder keine bedeutenden Unterschiede in der Zellzahl auf (vgl. Abb. 22). Diese Ergebnisse wiesen Parallelen zu den Ergebnissen der Untersuchung der Monozyten-Subpopulationen auf. Auch bei diesen zeigte sich als eine Reaktion auf zirkulierende Antikörper eine Erniedrigung der Zellzahl bestimmter Subpopulationen. Da die myeloischen dendritischen Zellen einen entwicklungs-geschichtlichen Zusammenhang mit Monozyten aufweisen, könnten die hier erhobenen Befunde auf strukturelle Ähnlichkeiten der Oberflächenmoleküle und damit ein ähnliches Muster der Antikörperopsonisierung zurückzuführen sein.

Eine Verwandtschaft von mDC und Monozyten wurde in verschiedenen Studien aufgrund übereinstimmender Oberflächenmoleküle und der Abstammung der mDC von der myeloischen Zellreihe diskutiert (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Es wurde festgestellt, dass sich Monozyten vor allem im Rahmen von inflammatorischen Vorgängen zu DC differenzieren können (Collin und Bigley 2018; Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Dies trifft jedoch nur auf die Population der mDC zu, Monozyten können sich nicht zu pDC differenzieren (Boyette et al. 2017). Des Weiteren zeigen die verschiedenen Monozyten-Subpopulationen eine unterschiedliche Kapazität, sich in dendritische Zellen zu differenzieren. Dieser Befund wird kontrovers diskutiert. Boyette et al. (2017) berichteten, dass sich die klassischen Monozyten verstärkt zu DC differenzierten, wobei Ziegler-Heitbrock (2007) dies für die $CD16^{pos}$ Monozyten zeigten. Aufgrund dieser morphologischen Übereinstimmungen könnte eine Kreuzreaktion von granulozytären Autoantikörpern mit Oberflächenstrukturen von mDC1-Zellen eine Erklärung für die im Rahmen dieser Studie festgestellte Erniedrigung der Größe dieser Zellpopulation sein. Die Beobachtungen, dass pDC als Zellen der lymphoiden Zellreihe nicht beteiligt waren, unterstützt diese Theorie. Weiterhin ungeklärt bleibt allerdings, warum die Population der mDC2 keine gleichartigen Effekte zeigte. Dies könnte auf die geringe Größe dieser Population und damit verbundene technische Schwierigkeiten in ihrer Detektion zurück zu führen sein. Zusammenfassend ist die Erniedrigung der myeloischen dendritischen Zellen Typ 1 in

der vorliegenden Studie weniger auf funktionelle Ursachen zurückzuführen, als auf Kreuzreaktionen der Autoantikörper mit dieser Population aufgrund entwicklungsgeschichtlicher Verwandtschaften der Zellpopulationen.

4.7 Altersabhängige Entwicklung der Subpopulationen

Die in dieser Studie ermittelten absoluten Zellzahlen wurden mit Literaturreferenzwerten von gesunden Kindern der gleichen Altersstufe verglichen (vgl. Kap. 3.4.5). Die Ergebnisse zeigten für die Subpopulationen der T-Zellen eine übereinstimmende zeitliche Entwicklung. Es wurden die Subpopulationen der $CD3^{pos}CD4^{pos}$ T-Helferzellen, der $CD25^{pos}CD127^{low}$ T-Regulatorzellen und der $CD3^{pos}CD8^{pos}$ zytotoxischen T-Zellen miteinander verglichen. Etwaige Schwankungen einzelner Werte bei den $CD25^{pos}CD127^{low}$ T-Regulatorzellen sind durch die unterschiedlichen Stichprobengrößen und Messungenauigkeiten zu erklären.

Des Weiteren wurden Vergleiche zwischen den Zellzahlen der Monozyten-Subpopulationen durchgeführt. Hierbei zeigten sich für die intermediären und nicht-klassischen Monozyten Übereinstimmungen zwischen den Werten gesunder und erkrankter Kinder. Bei der Subpopulation der klassischen Monozyten wiesen die erkrankten Kinder weniger Zellen auf als gesunde Kinder gleicher Altersstufe. Die Differenzen zwischen den Werten der nicht-klassischen Monozyten sind aufgrund der geringen Größe der Zellpopulation auf Messungenauigkeiten zurückzuführen und können bei der Interpretation vernachlässigt werden. Auch die dendritischen Zellen wurden mit Literaturreferenzwerten verglichen. Die myeloischen dendritischen Zellen Typ 1 und 2 wurden aufgrund der geringen Populationsgrößen als myeloische dendritische Zellen (mDC) zusammengefasst und als einheitliche Population mit Literaturwerten verglichen. Da es sich ebenfalls um sehr kleine Zellpopulationen handelte, sind die Unterschiede zwischen den Graphen der geringen Zellzahl geschuldet. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache zeigte sich eine Übereinstimmung der Studienwerte mit den Referenzwerten.

Des Weiteren wurden Vergleiche zwischen den Populationsgrößen der $CD45^{pos}$ Leukozyten, der $CD19^{pos}$ B-Lymphozyten sowie der $CD16^{pos}CD56^{pos}$ natürlichen Killerzellen durchgeführt. Es zeigten sich keine zahlenmäßigen Unterschiede zu den Referenzwerten. Etwaige Schwankungen einzelner Werte bei den $CD19^{pos}$

B-Lymphozyten sind durch die unterschiedlichen Stichprobengrößen und Messungenauigkeiten zu erklären.

Schließlich wurde in Kapitel 3.4.4 die durchgeführten Korrelationsanalysen zwischen den Subpopulationen und dem Alter der Probanden beschrieben. Hier zeigte sich für alle Populationen eine negative Korrelation zwischen dem Alter und der Größe der jeweiligen Subpopulation. Die jüngeren Kinder wiesen mehr Zellen auf als die älteren und mit zunehmendem Alter zeigte sich diese Entwicklung regredient.

Diese Vergleiche zeigten, dass die Altersentwicklung leukozytärer Subpopulationen von Kindern mit primärer Autoimmunneutropenie mit der physiologischen Altersentwicklung der Zellen gesunder Kinder übereinstimmte. Die meisten Zellreihen zeigen ein Maximum in ihrer Anzahl in den ersten Lebensmonaten gefolgt von einer stetigen Abnahme der Zahlen im Laufe der Kindheit (Garcia-Prat et al. 2018; Heinze et al. 2013; van Gent et al. 2009). Ein Erklärungsansatz für den benignen Verlauf der Erkrankung beruht auf der Theorie, dass das T-Zell-Suppressorsystem in den ersten Lebensjahren unreif ist und seine immunologische Aufgabe nicht gänzlich erfüllen kann. Dies könnte zur Entstehung reaktiver B-Zell-Klone und einer unkontrollierten Antikörperproduktion führen. Die vollständige Ausreifung des T-Zell-Suppressorsystems könnte somit den entscheidenden Terminationsmechanismus der Erkrankung darstellen (Nakamura et al. 2009; Yachie et al. 1981). Für die Aufgabe der Erhaltung der Selbstimmunität und Unterdrückung einer Immunantwort ist eine Subpopulation der T-Zellen, die T-Regulatorzellen, zuständig. Sie reifen im Thymus heran und stellen fünf bis zehn Prozent der $CD4^{pos}$ T-Zellen dar. Sie exprimieren u.a. CD4 und CD25 als Oberflächenmoleküle und im Zellkern den Transkriptionsfaktor *Forkhead-Box-Protein P3* (FOXP3). Durch ihre Fähigkeit der Unterdrückung selbst-gerichteter Immunreaktionen durch die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine stellen sie einen Bestandteil des körpereigenen Suppressorsystems dar (Pandiyan et al. 2011). Es ist bekannt, dass Fehlfunktionen der T-Regulatorzellen zu Immundefekten führen können (Grindebacke et al. 2009; Nakamura et al. 2009; Pandiyan et al. 2011).

Die Veränderungen von T-Regulatorzellen in den ersten Lebensjahren ist aufgrund ihrer möglichen Beteiligung in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen gegenwärtig Gegenstand vieler Untersuchungen. Hierbei zeigte sich, dass sich die Oberflächenstrukturen dieser Zellen im Laufe der ersten drei Lebensjahre verändern. Durch eine verstärkte Antigenexposition in den ersten Lebensjahren scheint sich die volle Funktion dieser Zellen erst im Laufe der Zeit zu entwickeln, wobei der genau

Zeitpunkt der Ausreifung noch nicht bekannt ist (Grindebacke et al. 2009). Dies scheint ein Hinweis darauf zu sein, dass die suppressive Funktion der T-Regulatorzellen in den ersten Lebensjahren eingeschränkt funktionsfähig ist.

Die Bedeutung von T-Regulatorzellen in Patienten mit primärer Autoimmuneutropenie wurde bisher wenig untersucht. Eine Studie von Nakamura et al. (2009) zeigte Unterschiede in der Anzahl von T-Regulatorzellen bei Kindern mit primärer Autoimmunneutropenie im Vergleich zu gesunden Probanden. Hierbei unterschieden die Forscher zwischen einer Oberflächenfärbung zum Nachweis von CD4 und CD25 sowie einer Intrazellularfärbung des Transkriptionsfaktors FOXP3. Hierbei zeigte sich, dass die Anzahlen FOXP3 exprimierender Zellen in erkrankten Kindern signifikant erniedrigt waren. Bei der Oberflächenfärbung konnte kein Unterschied zwischen den Subpopulationen festgestellt werden. Erst bei einer weiteren Unterscheidung der T-Regulatorzellen anhand ihrer CD25-Expression in $CD25^{high}$ und $CD25^{low}$ wurde gezeigt, dass die Populationsgröße der $CD25^{high}$-T-Regulatorzellen signifikant erniedrigt war. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Hier wurden keine Auffälligkeiten bezüglich der Expression von T-Regulatorzellen unter den Kindern aufgedeckt. Dies könnte einerseits auf zahlenmäßige Unterschiede zwischen den verschiedenen Studien und somit einer eingeschränkten Vergleichbarkeit zurückgeführt werden. Anderseits könnten unterschiedliche Strategien in der Detektion von T-Regulatorzellen eine Ursache sein. In der vorliegenden Studie erfolgte die Differenzierung von T-Regulatorzellen über eine reine Oberflächenfärbung der CD4-, CD25- und CD127-Moleküle (Boldt et al. 2014). Für diese Population konnten Nakamura et al. (2009) ebenfalls keine Auffälligkeiten feststellen. Im Vergleich dazu zeigten sich Unterschiede bei einer Intrazellularfärbung mit Nachweis von FOXP3. Somit könnte eine Oberflächenfärbung zur Differenzierung von T-Regulatorzellen nicht ausreichend sein (Dejaco et al. 2006). Außerdem besteht die Möglichkeit, dass es sich um unterschiedliche Populationen handelte. Diese Überlegungen sollten in weiteren Studien systematisch überprüft werden. Auf Grundlage der hier zugrunde liegenden Studie ließen sich keine Rückschlüsse ziehen, dass eine Verminderung von T-Regulatorzellen eine Rolle im Pathomechanismus der primären Autoimmunueutropenie spielt. Die physiologische Altersentwicklung lässt allerdings den Verdacht zu, dass der benigne Verlauf auf eine volle Ausreifung der T-Regulatorzellen zurückgeführt werden könnte. Trotzdem bleiben weiterhin viele Fragen offen, was die genaue Rolle der T-

Regulatorzellen bei der Erkrankung sowie den Mechanismus betrifft, der zur Produktion von Autoantikörpern führt.

4.8 Allgemeiner Ausblick

Zusammenfassend stellt diese Studie einen neuen Ansatz zur Erforschung der Beteiligung von leukozytären Subpopulationen in der Pathogenese der primären Autoimmunneutropenie des Kindesalters dar. Das explorative Studiendesign ermöglichte eine breite Betrachtung verschiedener Möglichkeiten und hat in diesem Fall einen neuen Blickwinkel für eine etwaige Beteiligung monozytärer Subpopulationen im Zusammenhang mit Autoimmunneutropenien geschaffen. Da bei dem explorativen Studiendesign die Problematik des multiplen Testens nicht berücksichtigt wurde, stellen die Ergebnisse Tendenzen dar, die in nachfolgenden Studien gezielter untersucht werden sollten. Auf der Grundlage der in den vorangehenden Kapiteln diskutierten Befunde könnten differenzierte Untersuchungen von Monozyten-Subpopulationen im Zusammenhang mit einer Autoimmunneutropenie und dem Vorhandensein granulozytärer Autoantikörper einen nächsten Schritt darstellen. Eine Problematik dieser Studie stellt die fehlende statistische Vergleichbarkeit mit gesunden Probanden im gleichen Studienaufbau dar. Dies war unter Ablaufs-technischen und ethischen Gesichtspunkten nicht durchführbar. Hier musste auf Referenzwerte der Literatur zurückgegriffen werden, die allerdings durch unterschiedliche Versuchsvoraussetzungen und Unterschieden in der durchflusszytometrischen Analyse eine reduzierte Aussagekraft aufwiesen. Die Durchführung einer nachfolgenden Studie mit Kindern mit primärer Autoimmunneutropenie unter den gleichen Voraussetzungen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe zur Überprüfung der gefundenen Tendenzen stellt einen logischen nächsten Schritt dar.

5 Zusammenfassung

Die primäre Autoimmunneutropenie des Kindesalters ist eine seltene hämatologische Erkrankung mit einer Inzidenz von 1:100.000, die die zellulären Bestandteile des Blutes betrifft und zu einer Verminderung der Anzahl an neutrophilen Granulozyten führt. Als Ursache hierfür gelten Autoantikörper gegen Granulozytenantigene, die zu einer Zerstörung der Granulozyten führen. Die verminderte Zahl neutrophiler Granulozyten, die als Bestandteil des zellulären Immunsystems für die Abwehr bakterieller Infektionen und die Phagozytose opsonierter Pathogene verantwortlich sind, ist für die klinische Symptomatik der Kinder verantwortlich. Hauptsächlich werden diese aufgrund wiederkehrender Infektionen klinisch auffällig und so ersten diagnostischen Schritten zugeführt. Nach einem Krankheitsverlauf von meist 24 bis 30 Monaten zeigt die Erkrankung einen benignen Verlauf. Die Ursache hierfür ist nicht ausreichend geklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Blut von 75 Kindern mit Verdacht auf eine primäre Autoimmunneutropenie hinsichtlich der Unterschiede zwischen den Populationsgrößen verschiedener leukozytärer Subpopulationen durchflusszytometrisch untersucht. Die statistische Analyse erfolgte zur Untersuchung von Unterschieden zwischen den Subpopulationsgrößen in Bezug auf die Neutropenieausprägung, die Geschlechtsverteilung, das Vorhandensein von granulozytären Antikörpern und dem Alter. Zusätzlich erfolgte der Vergleich der Zahlen einiger Subpopulationen mit Literaturreferenzwerten gesunder Kinder, um die Population der Kinder in den Bezug zu gesunden Kindern gleicher Altersstufe zu setzen. Die Auswertung ergab statistische Auffälligkeiten zwischen einzelnen Monozyten-Subpopulationen und den myeloiden dendritischen Zellen. Die Zahl der klassischen Monozyten zeigte sich im Vergleich zu denen gesunder Kinder erniedrigt. Des Weiteren wurde festgestellt, dass die Zellzahlen der intermediären und nicht-klassischen Monozyten sowie der myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 im Blut von Kindern mit positiven Antikörperbefunden erniedrigt waren im Vergleich zu den Werten von Kindern, bei denen keine Autoantikörper detektiert werden konnten. Diese Unterschiede könnten einerseits ein Hinweis auf funktionelle Unterschiede zwischen den Subpopulationen sein, die somit durch ihre unterschiedliche Zellzahl einen Einfluss auf den Pathomechanismus der Krankheit nehmen. Andererseits könnten diese Verschiebungen durch reaktive Vorgänge von Autoantikörpern mit myeloischen Vorläuferzellen zu erklären sein. Die Erniedrigung der dendritischen

Zellen ließe sich durch kreuzreagierende Antikörper gegen ähnliche Oberflächenstrukturen aufgrund entwicklungsgeschichtlicher Parallelen der dendritischen Zellen und Monozyten erklären.

Diese Studie ermöglichte durch das explorative Design die breite Betrachtung verschiedener Möglichkeiten der Beteiligung weiterer leukozytärer Subpopulationen im Pathomechanismus der primären Autoimmunneutropenie. Es wurde ein neuer Blickwinkel für eine etwaige Beteiligung monozytärer Subpopulationen im Zusammenhang mit Autoimmunneutropenien geschaffen. Die in dieser Studie beobachteten Tendenzen stellen eine Grundlage für weitere zielgerichtete Untersuchungen von Monozyten im Zusammenhang der primären Autoimmunneutropenie dar.

6 Summary

Primary autoimmune neutropenia is a rare haematological disease of the early childhood with an incidence of 1:100.000. It affects the cellular components of human blood and is characterized by a reduction of the absolute count of neutrophil Granulocytes in peripheral blood. This is caused by autoantibodies, which recognize antigens of Granulocytes and subsequently lead to the destruction of these cells. As a part of the cellular phagocytosis system of the immune system they play an important role in defending bacterial infections and the phagocytosis of opsonized pathogenes. The absence of Granulocytes explains the clinical abnormalities of the affected children, which are accompanied by recurring bacterial infections. Nevertheless, the disease shows a benign course as patients are healed spontaneously within a 24 to 30 month duration. The cause of this is unknown.

In this work, differences in the cell counts of different leukocyte subpopulations from the blood of 75 children with suspected autoimmune neutropenia were analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS). Statistical analyses were performed to identify differences regarding the severity of neutropenia, the presence of antibodies and the sex as well as the age of the patients from which the blood was taken. Additionally, the cell counts were compared to publicized cell counts of healthy infants of the same age. The analysis revealed statistical differences for some monocyte subpopulations and myeloid dendritic cells. The cell count of classical monocytes was reduced in diseased children compared to healthy ones. Furthermore, the number of intermediate and not-classical monocytes as well as the myeloid dendritic cells type 1 were reduced in children with positive antibody titers in the peripheral blood in comparison to those without detectable autoantibodies in their blood. These results could be explained either with functional differences between the subpopulations or cross reactions between autoantibodies and myeloid precursors. The reduction of the dendritic cells could be explained in a similar fashion as the dendritic cells could have developed from monocytes. Through its explorative design, this study opens a wide perspective of possible roles of leukocyte subpopulations in the pathomechanism of primary autoimmune neutropenia. In this case, especially different monocyte subpopulations were identified to play a role in autoimmune neutropenia.

7 Literaturverzeichnis

Audrain, M.; Martin, J.; Fromont, P.; Prie, N.; Thomas, C.; Muller, E. (2011): Autoimmune neutropenia in children: analysis of 116 cases. In: *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 22 (5), S. 494–496.

Baehner, R.; Johnston, R. (1972): Monocyte function in children with neutropenia and chronic infections. In: *Blood* 40 (1), S. 31–41.

BD Bioscience (2002): Introduction to Flow Cytometrie: A Learning Guide. Hg. v. BD Bioscience. San Jose.

Boldt, A.; Borte, S.; Fricke, S.; Kentouche, K.; Emmrich, F.; Borte, M. et al. (2014): Eight-color immunophenotyping of T-, B-, and NK-cell subpopulations for characterization of chronic immunodeficiencies. In: *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* 86 (3), S. 191–206.

Borregaard, N. (2010): Neutrophils, from marrow to microbes. In: *Immunity* 33 (5), S. 657–670.

Borregaard, N.; Cowland, J. B. (1997): Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. In: *Blood* 89 (10), S. 3503–3521.

Boyette, L. B.; Macedo, C.; Hadi, K.; Elinoff, B. D.; Walters, J.; Ramaswami, B. et al. (2017): Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. In: *PloS one* 12 (4), e0176460.

Bruin, M.; Dassen, A.; Pajkrt, D.; Buddelmeyer, L.; Kuijpers, T.; Haas, M. de (2005): Primary autoimmune neutropenia in children: a study of neutrophil antibodies and clinical course. In: *Vax Sanguinis* (88), S. 52–59.

Bruin, M.; dem Borne, A. von; Tamminga, R.; Kleijer, M.; Buddelmeijer, L.; Haas, M. de (1999): Neutrophil Antibody Specificity in Diffenrent Types of Childhood. Autoimmune Neutropenia. In: *The American society of Hematology*, S. 1789–1802.

Bussel, J.; Lalezari, P.; Fikrig, S. (1988): Intravenous treatment with gamma-globulin of autoimmune neutropenia of infancy. In: *The Journal of pediatrics* 112 (2), S. 298–301.

Bussel, J.; Lalezari, P.; Hilgartner, M.; Partin, J.; Fikrig, S.; O'Malley, J., Barandun, S. (1983): Reversal of neutropenia with intravenous gammaglobulin in autoimmune neutropenia of infancy. In: *Blood* 62 (2), S. 398–400.

Bux, J. (2008): Human neutrophil alloantigens. In: *Vox sanguinis* 94 (4), S. 277–285.

Bux, J.; Behrens, G.; Jaeger, G.; Welte, K. (1998): Diagnosis and clinical course of autoimmune neutropenia in infancy: analysis of 240 cases. In: *Blood* 91 (1), S. 181–186.

Bux, J.; Chapman, J. (1997): Report on the second international granulocyte serology workshop. In: *Transfusion* 37 (9), S. 977–983.

Bux, J.; Kober, B.; Kiefel, V.; Mueller-Eckhardt, C. (1993): Analysis of granulocyte-reactive antibodies using an immunoassay based upon monoclonal-antibody-specific immobilization of granulocyte antigens. In: *Transfusion medicine* 3 (2), S. 157–162.

Capsoni, F.; Sarzi-Puttini, P.; Zanella, A. (2005): Primary and secondary autoimmune neutropenia. In: *Arthritis research & therapy* 7 (5), S. 208–214.

Collin, M.; Bigley, V. (2018): Human dendritic cell subsets: an update. In: *Immunology* 154 (1), S. 3–20.

Conway, L.; Clay, M.; Kline, W.; Ramsay, N.; Krivit, W.; McCullough, J. (1987): Natural history of primary autoimmune neutropenia in infancy. In: *Pediatrics* 79 (5), S. 728–733.

Deinard, A.; Geehan, G.; Page, A.; Holmes, B. (1980): Function studies of monocytes from patients with cyclic neutropenia. In: *The American journal of pediatric hematology/oncology* 2 (3), S. 201–206.

Dejaco, C.; Duftner, C.; Schirmer, M. (2006): Are regulatory T-cells linked with aging? In: *Experimental gerontology* 41 (4), S. 339–345.

Farruggia, P. (2016): Immune neutropenias of infancy and childhood. In: *World journal of pediatrics* 12 (2), S. 142–148.

Farruggia, P.; Fioredda, F.; Puccio, G.; Porretti, L.; Lanza, T.; Ramenghi, U. et al. (2015): Autoimmune neutropenia of infancy: Data from the Italian neutropenia registry. In: *American journal of hematology* 90 (12), E221-2.

Farrugia, P.; Dufour, C. (2014): Diagnosis and management of primary autoimmune neutropenia in children: insights for clinicians. In: *Therapeutic Advances in Hematology*, S. 15–24.

Fioredda, F.; Calvillo, M.; Bonanomi, S.; Coliva, T.; Tucci, F.; Farruggia, P. et al. (2011): Congenital and acquired neutropenia consensus guidelines on diagnosis from the Neutropenia Committee of the Marrow Failure Syndrome Group of the AIEOP (Associazione Italiana Emato-Oncologia Pediatrica). In: *Pediatric blood & cancer* 57 (1), S. 10–17.

Fioredda, F.; Calvillo, M.; Bonanomi, S.; Coliva, T.; Tucci, F.; Farruggia, P. et al. (2012): Congenital and acquired neutropenias consensus guidelines on therapy and follow-up in childhood from the Neutropenia Committee of the Marrow Failure Syndrome Group of the AIEOP (Associazione Italiana Emato-Oncologia Pediatrica). In: *American journal of hematology* 87 (2), S. 238–243.

Garcia-Prat, M.; Alvarez-Sierra, D.; Aguilo-Cucurull, A.; Salgado-Perandres, S.; Briongos-Sebastian, S.; Franco-Jarava, C. et al. (2018): Extended immunophenotyping reference values in a healthy pediatric population. In: *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*.

Grage-Griebenow, E.; Flad, H.; Ernst, M. (2001): Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. In: *Journal of leukocyte biology* 69 (1), S. 11–20.

Grindebacke, H.; Stenstad, H.; Quiding-Jarbrink, M.; Waldenstrom, J.; Adlerberth, I.; Wold, A.; Rudin, A. (2009): Dynamic development of homing receptor expression and memory cell differentiation of infant CD4+CD25high regulatory T cells. In: *Journal of immunology* 183 (7), S. 4360–4370.

Hartman, K.; Wright, D. (1991): Identification of autoantibodies specific for the neutrophil adhesion glycoproteins CD11b/CD18 in patients with autoimmune neutropenia. In: *Blood* 78 (4), S. 1096–1104.

Heinze, A.; Elze, M.; Kloess, S.; Ciocarlie, O.; Konigs, C.; Betz, S. et al. (2013): Age-matched dendritic cell subpopulations reference values in childhood. In: *Scandinavian journal of immunology* 77 (3), S. 213–220.

Herold, G. (2017): Innere Medizin. Köln: Gerd Herold.

Ito, T.; Taniuchi, S.; Tsuji, S.; Iharada, A.; Hasui, M.; Kaneko, K. (2011): Diagnosis of Autoimmune Neutropenia by Neutrophil-bound IgG and IgM Antibodies. In: *J Pediatr Hematol Oncol* (33,7).

Kansas, G.; Muirhead, M.; Dailey, M. (1990): Expression of the CD11/CD18, leukocyte adhesion molecule 1, and CD44 adhesion molecules during normal myeloid and erythroid differentiation in humans. In: *Blood* 76 (12), S. 2483–2492.

Kobayashi, M.; Nakamura, K.; Kawaguchi, H.; Sato, T.; Kihara, H.; Hiraoka, A. et al. (2002): Significance of the detection of antineutrophil antibodies in children with chronic neutropenia. In: *Blood* 99 (9), S. 3468–3471.

Kobayashi, M.; Sato, T.; Kawaguchi, H.; Nakamura, K.; Kihara, H.; Hiraoka, A. et al. (2003): Efficacy of prophylactic use of trimethoprim-sulfamethoxazole in autoimmune neutropenia in infancy. In: *Journal of pediatric hematology/oncology* 25 (7), S. 553–557.

Lalezari, P.; Jiang, A.; Yegen, L.; Santorineou, M. (1975): Chronic autoimmune neutropenia due to anti-NA2 antibody. In: *The New England journal of medicine* 293 (15), S. 744–747.

Lalezari, P.; Khorshidi, M.; Petrosova, M. (1986): Autoimmune neutropenia of infancy. In: *The Journal of pediatrics* 109 (5), S. 764–769.

Lucas, G.; Porcelijn, L.; Fung, YL.; Green, F.; Reil, A.; Hopkins, M. et al. (2013): External quality assessment of human neutrophil antigen (HNA)-specific antibody detection and HNA genotyping from 2000 to 2012. In: *Vox sanguinis* 105 (3), S. 259–269.

Lüllmann-Rauch, R. (2012): Histologie. Unter Mitarbeit von Paulsen F. 4. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

Lyall, E.; Lucas, G.; Eden, O. (1992): Autoimmune neutropenia of infancy. In: *Journal of clinical pathology* 45 (5), S. 431–434.

Maheshwari, A.; Christensen, R.; Calhoun, D. (2002): Immune-mediated neutropenia in the neonate. In: *Acta paediatrica. Supplement* 91 (438), S. 98–103.

Mayadas, T.; Cullere, X.; Lowell, C. (2014): The multifaceted functions of neutrophils. In: *Annual review of pathology* 9, S. 181–218.

Mizuno, Y.; Hara, T.; Nagata, M.; Omori, F.; Shimoda, K.; Okamura, S. et al. (1990): Serum granulocyte colony-stimulating factor levels in chronic neutropenia of infancy. In: *Pediatric hematology and oncology* 7 (4), S. 377–381.

Murphy, K.; Weaver, C. (2018): Janeway Immunologie. 9. Aufl. Berlin: Springer-Verlag GmbH Deutschland.

Nakamura, J.; Nakajima, F.; Kamada, H.; Tadokoro, K.; Nagai, T.; Satake, M. (2017): Males without apparent alloimmunization could have HLA antibodies that recognize target HLA specificities expressed on cells. In: *HLA* 89 (5), S. 285–292.

Nakamura, K.; Miki, M.; Mizoguchi, Y.; Karakawa, S.; Sato, T.; Kobayashi, M. (2009): Deficiency of regulatory T cells in children with autoimmune neutropenia. In: *British journal of haematology* 145 (5), S. 642–647.

Pandiyan, P.; Zheng, L.; Lenardo, M. (2011): The molecular mechanisms of regulatory T cell immunosuppression. In: *Frontiers in immunology* 2, S. 60.

Patil, V.; Hugar, S.; Balikai, G.; Patil, S. (2016): Severe congenital cyclic neutropenia: A case report. In: *International journal of applied & basic medical research* 6 (4), S. 293–296.

Radaev, S.; Motyka, S.; Fridman, W.; Sautes-Fridman, C.; Sun, P. (2001): The structure of a human type III Fcgamma receptor in complex with Fc. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (19), S. 16469–16477.

Rascu, A.; Repp, R.; Westerdaal, N.; Kalden, J.; van de Winkel, J. (1997): Clinical relevance of Fc gamma receptor polymorphisms. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 815, S. 282–295.

Reil, A.; Sachs, U.; Siahanidou, T.; Flesch, B.; Bux, J. (2013): HNA-1d: a new human neutrophil antigen located on Fcgamma receptor IIIb associated with neonatal immune neutropenia. In: *Transfusion* 53 (10), S. 2145–2151.

Rink, L.; Kruse, A.; Haase, H. (2012): Immunologie für Einsteiger. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Segal, A. (2005): How neutrophils kill microbes. In: *Annual review of immunology* 23, S. 197–223.

Shastri, K.; Logue, G. (1993): Autoimmune neutropenia. In: *Blood* 81 (8), S. 1984–1995.

Siedlar, M.; Strach, M.; Bukowska-Strakova, K.; Lenart, M.; Szaflarska, A.; Weglarczyk, K. et al. (2011): Preparations of intravenous immunoglobulins diminish the number and proinflammatory response of CD14+CD16++ monocytes in common variable immunodeficiency (CVID) patients. In: *Clinical immunology* 139 (2), S. 122–132.

Smith, M.; Smith, J. (2001): The use of granulocyte colony-stimulating factor for treatment of autoimmune neutropenia. In: *Current opinion in hematology* 8 (3), S. 165–169.

Taniuchi, S.; Masuda, M.; Yamamoto, A.; Hasui, M.; Tsuji, S.; Komiyama, Y. et al. (2001): FcγRIII b and FcγRIIa polymorphism may affect the production of specific NA1 autoantibody and clinical course of autoimmune neutropenia of infancy. In: *Human Immunology* 62 (4), S. 408–413.

Unkeless, J.; Shen, Z.; Lin, C.; DeBeus, E. (1995): Function of human Fc gamma RIIA and Fc gamma RIIIB. In: *Seminars in immunology* 7 (1), S. 37–44.

van Gent, R.; van Tilburg, C.; Nibbelke, E.; Otto, S.; Gaiser, J.; Janssens-Korpela, P. et al. (2009): Refined characterization and reference values of the pediatric T- and B-cell compartments. In: *Clinical immunology* 133 (1), S. 95–107.

Verheugt, F.; dem Borne, A. von; Decary, F.; Engelfriet, C. (1978): The detection of granulocyte alloantibodies with an indirect immunofluorescence test. In: *British journal of haematology* 38 (1), S. 151.

Weber, C.; Belge, K.; Hundelshausen, P. von; Draude, G.; Steppich, B.; Mack, M. et al. (2000): Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. In: *Journal of leukocyte biology* 67 (5), S. 699–704.

Yachie, A.; Miyawaki, T.; Nagaoki, T.; Yokoi, T.; Mukai, M.; Uwadana, N.; Taniguchi, N. (1981): Regulation of B cell differentiation by T cell subsets defined with monoclonal OKT4 and OKT8 antibodies in human cord blood. In: *Journal of immunology* 127 (4), S. 1314–1317.

Zeidler, C. (2013): Primary and secondary neutropenia. In: *Zeitschrift für Rheumatologie* 72 (7), S. 663–668.

Ziegler-Heitbrock, L. (2007): The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. In: *Journal of leukocyte biology* 81 (3), S. 584–592.

Ziegler-Heitbrock, L. (2014): Monocyte subsets in man and other species. In: *Cellular immunology* 289 (1-2), S. 135–139.

Ziegler-Heitbrock, L.; Ancuta, P.; Crowe, S.; Dalod, M.; Grau, V.; Hart, D. et al. (2010): Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. In: *Blood* 116 (16), e74-80.

8 Anhang

8.1 Datenträger mit Rohdaten

Aufgrund der großen Menge an Rohdaten wurde dieser Arbeit ein Datenträger angefügt. Dieser enthält neben dem Ethikantrag AZ.: 104/06 (s. Ethikantrag AZ.: 104/06) eine anonymisierte Übersichtstabelle mit den Daten aller Probanden, die im Rahmen dieser Studie erhoben wurden (s. Übersichtstabelle Probanden) sowie die Syntax Datei der statistischen Auswertung mit der Software SPSS (s. Syntax SPSS).

8.2 Danksagungen

Zunächst möchte ich mich bei dem Direktor des Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, Herrn Prof. Dr. Gregor Bein herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, für die Möglichkeit, dieses an seinem Institut durchzuführen und für sein Interesse an dieser Arbeit bedanken.

Großer Dank gebührt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Holger Hackstein für seine umfassende Betreuung und Unterstützung, für seine konstruktive Kritik und stetige Diskussionsbereitschaft, welche sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Ulrich Sachs für seine vielen Telefonate mit den Kliniken und der Unterstützung in der praktischen Umsetzung dieser Studie danken.

Ein herzliches Dankeschön gilt Frau Dr. Nelli Baal und Frau Gabriela Michel für die geduldige Einarbeitung und Betreuung im Labor. Vielen Dank für die endlose Geduld, für ein offenes Ohr zu jeder Zeit, das angenehme Arbeitsklima und die netten Gespräche, die meine Zeit im Labor sehr bereichert haben.

Ebenso möchte ich Frau Christine Hofmann, Frau Sabine Haas und Frau Claudia Zwingel aus dem Granulozytenlabor für die Durchführung der Antikörperdiagnostik, die tolle Zusammenarbeit und die vielen Nachrichten auf meiner Mailbox danken.

Ferner bedanke ich mich herzlich bei Katja Müller, Christina Lang und Kristina Hau aus dem HLA-Labor für die Erstellung des Immunstatus für jede Patientenprobe neben ihrem täglichen Arbeitspensum und die netten Gespräche zwischen Tür und Angel. Im gleichen Sinne danke ich Frau Heike Berghöfer für die freundliche Bearbeitung meiner Bestellungen. Ein weiteres großes Dankeschön gilt Herrn Helge Hudel vom Institut für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen für seine umfassende Betreuung und geduldige Beratung bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit.

Abschließend möchte ich allen weiteren hier namentlich nicht genannten Mitarbeitern des Instituts für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin und der AG Hackstein für ihr freundliches Entgegenkommen und ihre ständige Hilfsbereitschaft danken.

8.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Gießen, d. 20.12.2019 _____

(Anja Margarethe Templin)