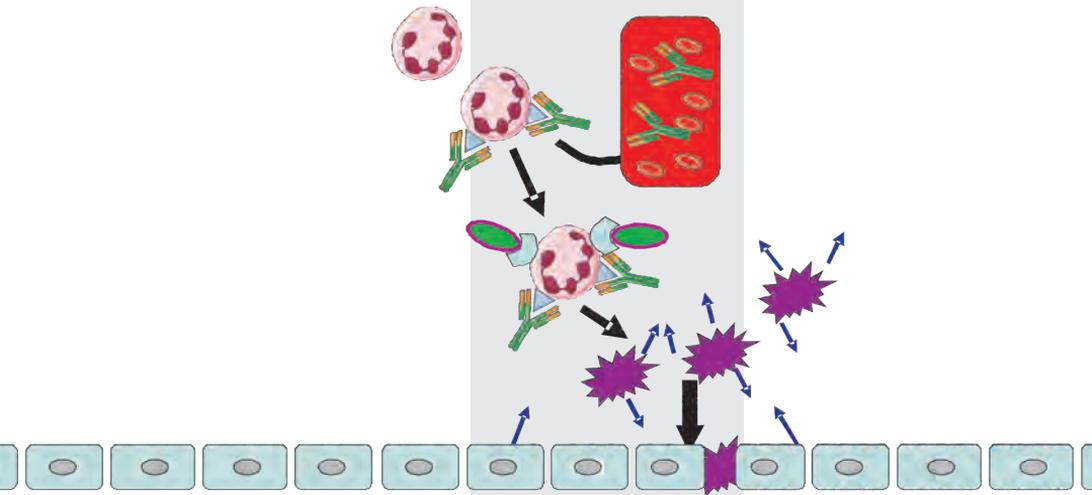


Rolle des NB-1 induzierten Neutrophilen Primings bei dem Transfusions assoziierten akuten Lungenversagen

HENNING TIEDE



INAUGURALDISSERTATION

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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Rolle des NB-1 induzierten Neutrophilen Primings bei
dem Transfusions assoziierten akuten Lungenversagen**

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von

Henning Tiede, geb. Gall

aus Cappenberg

Gießen 2009

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik und Poliklinik IV/V
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
Sonderforschungsbereich 547 „Kardiopulmonales Gefäßsystem“
Leiter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. F. Grimminger

Betreuerin: Dr. med. Katja Hattar

Gutachter: Prof. Dr. med. Ulf Sibelius

Gutachter: Prof. Dr. med. Holger Hackstein

Tag der Disputation: 29. Januar 2010

Meinen Eltern Helmut und Ellinor Gall

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Definition	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Klinik	1
1.1.3	Therapie	3
1.1.4	Spätfolgen	4
1.2	Leukozyten Immunologie	4
1.2.1	HLA-Klasse 1-Antikörper	4
1.2.2	HLA-Klasse 2-Antikörper	5
1.2.3	Neutrophilen-spezifische Antikörper	5
1.2.4	NB1	6
1.3	Pathophysiologie des TRALI	7
1.3.1	Pathophysiologie des ARDS	7
1.3.2	Popovsky's immunvermitteltes Modell	9
1.3.3	Silliman's Two-Hit Modell	10
1.4	Granulozytäre Mechanismen der Inflammation	12
1.4.1	Phagozytose	12
1.4.2	Neutrophile Granula und sekretorische Vesikel in der Inflammation	13
1.4.3	Der respiratorische Burst	14
1.4.4	fMLP und seine Rezeptoren	16
1.4.5	Priming	18
1.5	Fragestellung	19
2	Materialien und Methodik	20
2.1	Materialien	20
2.1.1	Materialien und Lösungen für die Zellisolation und Inkubation	20
2.1.2	Materialien und Lösungen für die Elastasemessung	20
2.1.3	Materialien für die FACS-Analytik	21
2.1.3	HPLC-Materialien	21
2.1.4	Experimentelle Agentien und Pharmaka	22
2.2	Methodik	23
2.2.1	Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten	23

2.2.2	Versuchsablauf.....	23
2.2.3	Durchflusszytometrie.....	24
2.2.4	Erfassung granulozytärer Funktionsparameter.....	26
2.2.5	Analytik der Arachidonsäure-Metaboliten.....	27
2.2.6	HPLC-Analytik.....	28
2.2.7	Statistische Analyse.....	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Übersicht.....	31
3.2	Charakterisierung der Spender-Granulozyten.....	31
3.3	Anti-NB1-Antikörper aktivieren nicht direkt den respiratory burst der neutrophilen Granulozyten.....	32
3.4	Anti-NB1-Antikörper verstärken den fMLP-induzierten neutrophilen respiratory burst.....	34
3.5	F(AB2)-Fragmente des Anti-NB1-Antikörpers sind wirksam zum primen der fMLP-induzierten Neutrophilen-Stimulation.....	35
3.6	Der Anti-NB1-Ak induzierte priming Effekt ist spezifisch für fMLP.....	36
3.7	Anti-NB1-Antikörper primen nicht die Degranulation oder Leukotrien-Formation in neutrophilen Granulozyten.....	37
3.8	fMLP-Rezeptoren-Dichte bleibt unbeeinflusst von Anti-NB-1-Inkubation.....	40
4	Diskussion	41
4.1	Grundlagen.....	41
4.2	NB-1 positive Granulozyten.....	41
4.3	Direkte Stimulation.....	41
4.4	NB-1 Vorinkubation primt die Neutrophilen-Reaktion durch spezifische Stimuli.....	42
4.5	Mechanismus des Primings.....	43
4.6	Pathophysiologie des TRALI.....	44
4.7	Ausblick.....	46
5	Zusammenfassung	48
6	Summary	49
7	Abkürzungen	50
8	Bibliographie	52
9	Erklärung gemäß Promotionsordnung	58
10	Danksagung	59
11	Lebenslauf	60

1 Einleitung

1.1 Definition

Es war 1951, als der erste, später einem Transfusions-assoziierten akuten Lungenversagen (transfusion related acute lung injury, TRALI) zugeschriebene Fall veröffentlicht wurde {Barnard, 1951}. 1968 beschrieben Ward et al. eine Transfusionsreaktion mit Einbeziehung der Lunge und stellten eine Verbindung zu Anti-Leukozyten-Antikörpern her {Ward, 1968}. 1983 berichtete Popovsky von fünf Fällen mit ähnlichem Verlauf eines akuten Lungenversagens nach Transfusion und führte den Begriff TRALI ein {Popovsky, 1983}.

1.1.1 Epidemiologie

Die Gefahr, ein TRALI zu entwickeln, wird mit 0,02 % pro übertragenes Blutprodukt oder mit 0,16 % pro mit Transfusion behandeltem Patienten angegeben {Popovsky, 1983}. Erythrozytenkonzentrate, Vollblut, Frischplasma (fresh frozen plasma), Plättchen, Granulozyten, Immunglobuline und Stammzellen werden mit TRALI in Verbindung gebracht {Menitove, 2007}; mit Albumin ist noch kein Fall bekannt.

Bei 8 % aller Transfusionsreaktionen und 13 % aller fatalen transfusionsassoziierten Reaktionen ist TRALI der auslösende Faktor {Wallis, 2007}. TRALI gilt als dritthäufigste Ursache für transfusionsassoziierte Todesfälle und in manchen Studien wird es als der häufigste Grund beschrieben. Die Mortalität wird mit 5 bis 10 % angegeben {Engelfriet, 2001, Popovsky, 1992, Popovsky, 1985}. Die Geschlechterverteilung ist ausgeglichen und die meisten Berichte beziehen sich auf Erwachsene, selten findet man Aussagen zu Erkrankungen von Kindern und Kleinkindern. Das mittlere Alter bei Diagnose beträgt 54 Jahre und das mittlere Alter für ein tödlich verlaufenes TRALI wird mit 58 Jahren angegeben {Leach, 1998}.

1.1.2 Klinik

TRALI ist charakterisiert durch eine plötzlich einsetzende Verschlechterung der respiratorischen Funktion, typischerweise 1 bis 6 Stunden nach Beginn einer Transfusion. Einige wenige Fälle von TRALI wurden mit wesentlich späterem Beginn mit bis zu 48 Stunden nach Transfusion beobachtet {Moore, 2006}. Bei fast jedem Patienten mit TRALI tritt

Dyspnoe oder eine respiratorische Verschlechterung auf, die eine Sauerstoffversorgung erfordert. 70 % der Patienten müssen mechanisch beatmet werden. Zyanose und Fieber sind häufige Begleiterscheinungen, Hypotension besteht bei der Mehrzahl der Fälle, Hypertension der systemischen Zirkulation ist unüblich {Popovsky, 1985}. Die aktuellen Konsensus-Stellungnahmen betonen, dass andere Ursachen von akutem Lungenversagen ausgeschlossen werden müssen, um die Diagnose TRALI zu stellen (Lungenödem aufgrund von Linksherzversagen, Pneumonie, Vorhofflimmern, zirkulatorischer Flüssigkeits-*Overload*, allergischer oder anaphylaktische Reaktion, etc.). Viele Konsensuskonferenzen haben diagnostische Kriterien vorgeschlagen (EHN, NHLBI). In der Tabelle 1 sind die aktuellen diagnostischen Kriterien der amerikanisch-europäischen Konsensus-Konferenz (AECC) genannt {Kleinman, 2004}:

Kriterien der amerikanisch-europäischen Konsensus-Konferenz:

TRALI und mögliche TRALI

1. TRALI

- a. ALI (akutes Lungenversagen) bewiesen durch
 - i. akuter Beginn
 - ii. Hypoxämie
 - $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$ oder $\text{SpO}_2 < 90\%$ bei Raumluft (Forschungseinrichtung)
 - $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$, $\text{SpO}_2 < 90\%$ bei Raumluft
 - oder andere klinische Evidenz von Hypoxämie
 - iii. bilaterale Infiltrate auf der ap-Röntgenthoraxaufnahme ohne Kardiomegalie
 - iv. Ausschluss einer linksatrialen Hypertonie ($\text{PCWP} < 18 \text{ mmHg}$)
- b. Ausschluss eines bereits bestehenden ALI vor der Transfusion
- c. Beginn während oder bis zu 6 Stunden nach der Transfusion
- d. keine zeitlicher Zusammenhang zu einem alternativen Risikofaktor für ALI (zirkulatorischer Flüssigkeits-Overload, Vorhofflimmern, etc.)

2. Mögliche TRALI

- a. ALI
- b. keine vorbestehende ALI vor der Transfusion
- c. Beginn während oder bis zu 6 Stunden nach der Transfusion
- d. eine sichere temporale Verbindung zu einem alternativen Risikofaktor für ALI

Tabelle 1: TRALI Kriterien der AECC

1.1.3 Therapie

Die Tatsache, dass Episoden von TRALI generell auf eine Dauer von 24 - 48 Stunden begrenzt sind, mag dazu beitragen, dass in einigen Fällen der Zustand des Patienten sich spontan so weit gebessert hat, dass die Diagnose erst retrospektiv klar gestellt werden konnte {Moore, 2006}. Bis heute gibt es keine randomisierten, kontrollierten Studien zur Therapie eines TRALI. Somit ist das therapeutische Management eines TRALI supportiv. Es ist ähnlich dem eines Patienten mit pulmonalem Ödem, das mit einer Schrankenstörung einhergeht. Ca. 72 % werden intubiert beatmet {Popovsky, 1985}. Die optimale Beatmungseinstellung sollte lungenprotektiv sein, d.h. es sollten kleine *tidal volumes* benutzt werden {Toy, 2004}. Die systemische Hypotension ist meistens durch intravenöse Flüssigkeitsgabe allein zu lösen, teilweise – besonders bei verlängerter oder bei besonders schwerer systemischer Hypotension – sind auch Vasopressoren angezeigt {Swanson, 2006}. Die Empfehlung, intravenöse Flüssigkeiten zu verabreichen, unterstreicht die Wichtigkeit der differentialdiagnostischen Abgrenzung zum Linksherzversagen oder zum Flüssigkeits-*Overload* von der Entität TRALI {Levy, 1986}. Über den Gebrauch von Kortikosteroiden wird oft berichtet, aber es gibt keine rechtfertigende Datengrundlage, die diese Aussage widerlegt oder unterstützt. Einen Vorschlag für ein therapeutisches Vorgehen gibt dieser Algorithmus aus der Publikation von Toy und Gajic an {Toy, 2004}:

1. Sofortiges Abbrechen der Transfusion
2. Symptomatische Therapie
3. Im Fall, dass der Patient intubiert ist, sofort unverdünnte Ödemflüssigkeit gewinnen (am besten innerhalb der ersten 15 Minuten) und gleichzeitig Blutplasma für die Bestimmung der totalen Plasmaproteinkonzentration gewinnen
4. Blutbild mit Differentialblutbild gewinnen und Röntgenthoraxaufnahme durchführen
5. Die Blutbank über eine mögliche Transfusionsreaktion informieren und andere Erythrozytenkonzentrate anfordern, zusätzlich die noch gelagerten Erythrozytenkonzentrate vom selben Spender sicherstellen
6. Die internen Betriebsanweisungen für Transfusionsreaktionen befolgen, zur Blutbank folgende Materialien schicken:
 - Patienten-Vollblut
 - die in den letzten 6 Stunden transfundierten Erythrozytenkonzentrate

- die Dokumentationsbögen der Erythrozytenkonzentrate mit zeitlichem Ablauf sicherstellen und die HLA-Typisierung des Patienten dokumentieren

1.1.4 Spätfolgen

Patienten, die die initiale Episode überstanden haben und deren Lungenfunktion wieder hergestellt ist, scheinen im Langzeitverlauf eine Lungenfunktion von Patienten zu haben, die niemals ein TRALI erlitten. Spätschäden des Lungenparenchyms wie Fibrose oder andere strukturelle Schäden als Konsequenz eines TRALI wurden nicht berichtet {Swanson, 2006}.

1.2 Leukozyten Immunologie

Wie weiter oben ausgeführt, werden in der Mehrzahl der Fälle Leukozyten-Antikörper im Spenderblut als Ursache eines TRALI gefunden. Aus diesem Grund werden im Folgenden Studien beschrieben, die Antikörper gegen humane Leukozyten-Antigene (HLA) aus Spenderblut als Auslöser einer TRALI-Reaktion beschreiben. Immunglobuline binden über ihren Fc-Teil an Effektor-Zellen. Es gibt verschiedene Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Immunzellen. Neutrophile besitzen die Fc-Gamma-Rezeptoren Typ II und III. Diese sind charakterisiert worden als CD 32 und CD 16.

1.2.1 HLA-Klasse 1-Antikörper

Klasse 1 und Klasse 2 Leukozyten-Antigene sind eine Gruppe von Glykoproteinen, die auf der Oberfläche von verschiedensten Zellen und Geweben gefunden werden {Curtis, 2006}. HLA-Klasse 1-Moleküle tragen die A-, B- und C-Antigene und finden sich auf der Oberfläche von Thrombozyten, den meisten kernhaltigen Zellen des Körpers (so auch Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten) und Zellen aus verschiedenen anderen Geweben. HLA-Klasse 2 Moleküle tragen die D-, DR- und DQ-Antigene und werden kontinuierlich nur auf B-Lymphozyten und Zellen der Monozyten-Makrophagen-Linie sowie auf T-Lymphozyten exprimiert. Andere Zellen tragen dieses Molekül nur temporär nach Stimulation {Curtis, 2006}.

Die hohe Prävalenz von HLA-Antikörpern in Blutprodukten, die im Zusammenhang mit einem TRALI stehen, passt zu der Beobachtung, dass die Hauptzahl der Blutspender Frauen sind, die durch mehrere Schwangerschaften gegen fetale Antigene sensibilisiert

worden sind. Allerdings ist es auch so, dass viele Blutprodukte von Multipari-Frauen, die ebenfalls diese Antikörper enthalten, nicht zu einer TRALI Reaktion führen. Die Abbildung 6 aus Curtis et al. zeigt die relative Häufigkeit von reaktiven Antikörpern im Serum von Blutspendern im Zusammenhang eines TRALI {Curtis, 2006}:

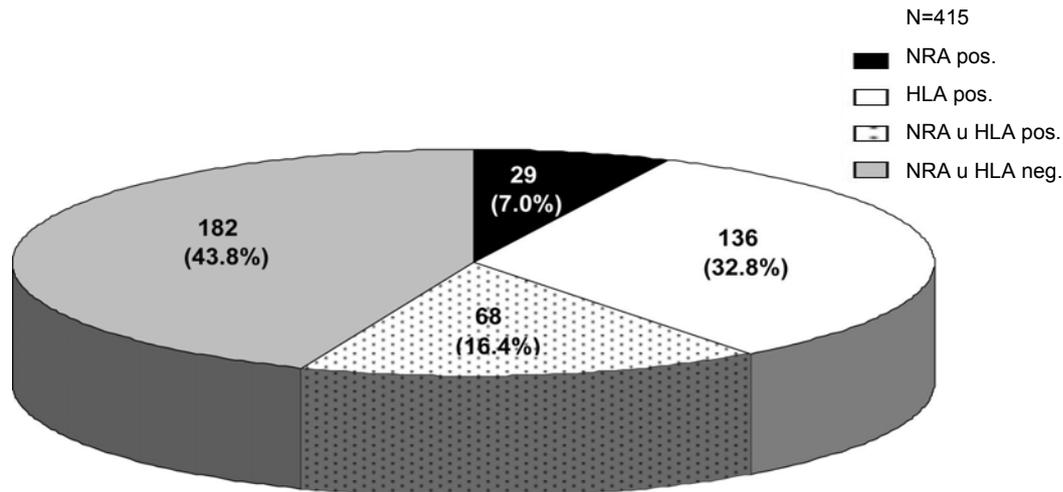


Abbildung 1: Häufigkeit von HLA- und Neutrophilen reaktiven Antikörpern (NRA) im Serum von Blutspendern bei einem TRALI. HLA-Klasse 1 und 2 -Tests wurden durch Durchflusszytometrie detektiert, aus {Curtis, 2006}

1.2.2 HLA-Klasse 2-Antikörper

Die erste Übersicht über HLA-Klasse 2-Antikörper bei TRALI wurde 2001 von Kopko et al. veröffentlicht, wobei er in 11 von 17 TRALI-Fällen diese Antikörper fand {Kopko, 2001}. Neutrophile scheinen die Haupt-Effektorzellen in der TRALI-Reaktion zu sein. Neutrophile tragen HLA-Klasse 1-Antigene, allerdings im Ruhezustand keine Klasse 2-HLA.

1.2.3 Neutrophilen-spezifische Antikörper

Aktuell sind sieben Neutrophilen-Antigene, die auf 5 verschiedenen Glykoproteinen getragen werden, komplett oder partiell charakterisiert und nach der humanen Neutrophilen-Antigen-Nomenklatur benannt. Eine Übersicht der Antigene mit den dazugehörigen Glykoproteinen, Allelen und den Häufigkeiten zeigt die Tabelle 2 nach Curtis et al.:

Alloantigen	Antigen-Häufigkeit (bei Kaukasiern), %	Glykoprotein	Allele
HNA-1a (NA1)	54	FcγRIIIb, CD16	FCGR3B*01
HNA-1b (NA2)	88	FcγRIIIb, CD16	FCGR3B*02
HNA-1c (SH)	5	FcγRIIIb, CD16	FCGR3B*03
HNA-2a (NB1)	97	CD177	CD177*01
HNA-3a (5b)	97	nicht bekannt	nicht bekannt
HNA-4a (Mart)	92	MAC-1, CD11b	CD11B*1
HNA-5 (OND)	99	LFA-1, CD11a	CD11A*1

Tabelle 2: Humane Neutrophilen Alloantigene, aus {Curtis, 2006}

Antikörper gegen Neutrophilen-Antigene sind in vielen Bereichen der klinischen Medizin relevant: Sie werden mit dem TRALI, der Neugeborenen Neutropenie und der febrilen Transfusionsreaktion in Zusammenhang gebracht. Es wurde über TRALI-Fälle mit Antikörpern gegen die Antigene HNA-1A,-1B,-2A und -3A berichtet.

1.2.4 NB1

NB1 wurde initial 1971 beschrieben als ein Neutrophilen-spezifisches Antigen im Falle einer neonatalen Alloimmunneutropenie {Lalezari, 1971}. In der jüngeren Vergangenheit ist NB1 in die Nomenklatur der human neutrophilen Antigene (HNA) aufgenommen worden als HNA-2a. Das Antigen-tragende NB1-Glykoprotein wurde als CD177 geclustert. Eine charakteristische Eigenschaft von NB1 ist die Tatsache, nur auf einer Subpopulation der Neutrophilen eines NB1-positiven Menschen exprimiert zu werden, die zwischen 0 und 100 % variieren kann {Goldschmeding, 1992, Stroncek, 1998b}. NB1 wird auf den Neutrophilen von 97 % aller Kaukasier, 95 % der Afroamerikaner und 88 % der Japaner exprimiert {Bierling, 1990, Bux, 2000, Clay, 1994, Matsuo, 2000, McCullough, 1989}.

Antikörper gegen NB1 sind mit einer Vielzahl von verschiedenen Krankheiten assoziiert, u.a. der alloimmunen neonatalen Neutropenie, der Autoimmun-Neutropenie, der Immunneutropenie nach Knochenmarkstransplantation, der Medikamenten induzierten Immunneutropenie und dem TRALI {Bux, 1996, Eastlund, 1992, Leger, 1999, Stroncek, 1994a, Stroncek, 1993a, Stroncek, 1993b}.

Innerhalb der NB1-Sequenz sind drei potentielle N-Glykosylierungsstellen gefunden worden, die passend wären zur biochemischen Charakterisierung des NB1-Proteins als ein Glycoprotein {Kissel, 2001}. Zusätzlich wurde am C-terminalen Ende der NB1-Sequenz ein GPI-Signal gefunden, das die bereits berichtete GPI-Verbindung zur Plasmamembran bzw. zur Granulamembran unterstützt {Goldschmeding, 1992, Skubitz, 1991}.

Homologiesuchen bezogen auf überlappende Proteinmotive und Proteindomänen erbrachten Homologien zu den Ly-6 (uPAR) Domänen, die gut charakterisiert sind für die uPAR/CD59/Ly-6-Schlangengift-Superfamilie, die verschiedene biologische Funktionen innehat.

Ähnliches wird für NB1 berichtet. Es wird ebenso exprimiert auf der neutrophilen Plasmamembran und auf intrazellulären Granula {Goldschmeding, 1992}. Nach Stimulation mit fLMP *in vitro* und Aktivierung mit G-CSF *in vivo* wird die NB1-Expression hochreguliert {Goldschmeding, 1992, Stroncek, 1998a}. Adhäsionsstudien deuten auf eine Rolle in der Granulozyten-Endothelzell-Interaktion hin {Stroncek, 1994b}.

1.3 Pathophysiologie des TRALI

Die Pathophysiologie eines TRALI ist nicht umfassend geklärt. Es gibt jedoch Ähnlichkeiten zum akuten Lungenversagen (ARDS, *acute respiratory distress syndrome*). Besonders auffällig ist bei beiden Krankheitsbildern die Rolle der neutrophilen Granulozyten (PMN). Ein Überblick über die Pathophysiologie des ARDS hilft auch beim Verstehen der TRALI-Pathophysiologie.

1.3.1 Pathophysiologie des ARDS

Seit der ersten Beschreibung des ARDS 1967 {Ashbaugh, 1967} spielen Neutrophile in pathogenetischen Modellen eine zentrale Rolle.

Die physiologische PMN-Funktion beinhaltet das *Recruitment* zu Gebieten von Inflammation, Aktivierung von vaskulären endothelialen Zellen, Freisetzung von Chemokinen, Binden von PMN an endotheliale Zellen, Diapedese, Phagozytose von Bakterien und die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Enzymen {Silliman, 1999}. Wenn diese Prozesse gestört sind, wie es beim ARDS der Fall ist, kann es zur Sequestration von Neutrophilen kommen {Thiel, 1996}. Diese sequestrierten Neutrophilen setzen toxische Sauerstoffradikale und proteolytische Enzyme nach extrazellulär frei, die endotheliales Gewebe zerstören, die Gewebeporosität steigern und extravasale Flüssigkeitsakkumulation, z.B. in pulmonalen Alveolen, herbeiführen {Murakami, 1995, Puneet, 2005}. Ein Schema aus der Publikation von Puneet et al. ist in Abbildung 2 aufgeführt. Sie zeigt die Phasen der Neutrophilen-Rekrutierung ins pulmonale Interstitium und zum Alveolarraum. Die Wirkungen der Chemokine und Zytokine sind den Kompartimenten zugeordnet dargestellt.

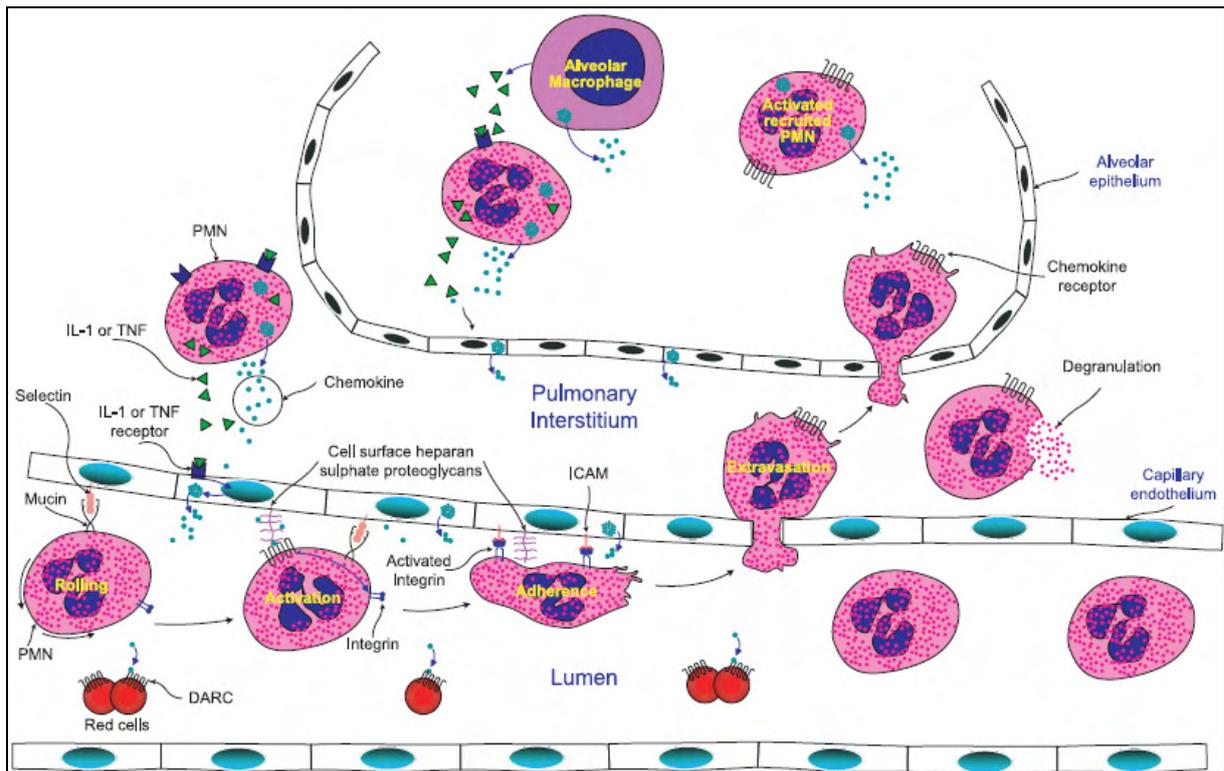


Abbildung 2: Polymorphkernige Leukozyten (PMN)-Chemotaxis im ARDS. {Puneet, 2005}

Die Aktivierung von Neutrophilen führt zur Stimulation der NAPDH-Oxidase, die freie Sauerstoffradikale produziert. Diese oxidative Reaktion kann zur Freisetzung von toxischen Sauerstoff-Metaboliten, Arachidonsäure-Derivaten, des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF) und verschiedenen Proteasen führen {Boxer, 1990}. Substanzen, die diese Reaktion induzieren, sind u. a. PAF selber, Interleukin 1 (IL-1), Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor GM-CSF und bakterielle Lipopolysaccharide (LPS). Der aktivierte Neutrophile produziert auch biologisch aktive Mediatoren, z. B. Thromboxan a 2 (Txa 2) und Endothelin 1 (ET-1) {Puneet, 2005}.

Auch beim TRALI findet man eine Granulozyten-vermittelte Inflammation und ein pulmonales Ödem, sodass gefolgert werden kann, dass viele Parallelen zwischen TRALI und ARDS bestehen. Unterschieden werden bei der TRALI die Antikörper vermittelte (immunologische) Form und die Form, bei der keine Antikörper nachgewiesen werden können {Bux, 2005}.

Im Folgenden sind zwei Modelle dargestellt, die zur Pathophysiologie des TRALI aufgestellt wurden:

1.3.2 Popovsky's immunvermitteltes Modell

In diesem Modell beschreibt Popovsky, dass Spender-Antikörper und weniger häufig Empfänger-Antikörper eine Immunreaktion erzeugen, die die Leukozyten-Antigene zum Ziel haben {Popovsky, 1983}. Lösliche zirkulierende Antikörper-Antigen-Komplexe aktivieren Komplementfaktoren in der Lunge und fördern den Neutrophilen-Einstrom. Die Akkumulation von Neutrophilen führt zur Schädigung der Mikrovaskulatur und zum Extravasat von proteinreicher Flüssigkeit in den Alveolarraum und ins Interstitium, ähnlich dem Pathogenese-Modell von ARDS.

Empfängerantikörper werden wesentlich seltener mit einem TRALI in Verbindung gebracht als Spenderantikörper. Diese Beobachtung stimmt mit der Dosisabhängigkeit des Effektes von Leukozyten überein, da ein wesentlich größerer Leukozytenpool im Empfänger vorherrscht als durch die Transfusion zugefügt wird {Swanson, 2006}.

Seeger et al. haben in einem ex vivo-Kaninchenlungenmodell zur Untermauerung der Popovsky-These beigetragen {Seeger, 1990}. Hierbei wurden isoliert perfundierte Kaninchenlungen mit Antikörpern gegen das 5B-Neutrophilen-Antigen und mit Neutrophilen, die das 5B-Antigen exprimierten, perfundiert. Infolge der Infusion wurde ein signifikanter Anstieg der vaskulären Permeabilität registriert. Zusätzlich konnten in den Neutrophilen der Lungen höhere Konzentrationen an Arachidonsäure und deren Lipoxygenase-Produkten gemessen werden {Seeger, 1990}.

Sachs und Kollegen konnten 2006 ebenfalls zur Bekräftigung des Popovsky-Modells beitragen. In einem ex vivo Rattenlungenmodell untersuchten sie den Einfluss von Anti-HNA-2a-Antikörpern auf die Entwicklung eines TRALI. Dem Perfusat wurden Leukozyten von hochexprimierenden versus niedrigexprimierenden (CD177) Individuen zugefügt und mit humane Neutrophilen-Antigen-2a-Antikörper oder Kontrollantikörpern stimuliert. In der Gruppe von Tieren, die Leukozyten von niedrigexprimierenden Individuen im Perfusat hatten, führte eine Gabe von anti-HNA-2a-Antikörpern zu keiner wesentlichen Veränderung des kapillären Filtrations-Koeffizienten oder des Lungengewichts. Wohingegen die anti-HNA-2a-Gabe bei Rattenlungen, die Leukozyten von hochexprimierenden Individuen im Perfusat führten, eine starke und rasche Zunahme sowohl des Gewichts als auch des kapillären Filtrations-Koeffizienten herbeiführte. Die

Zugabe von fMLP beschleunigte den Prozess der TRALI-Entwicklung. fMLP führte, wenn auch zögerlicher, bei den Rattenlungen mit niedrigexprimierenden Leukozyten ebenfalls zu einer TRALI {Sachs, 2006}.

Die wesentlichen Kritikpunkte an Popovsky's Modell zur Pathogenese eines TRALI sind, dass nicht in allen Fällen eines TRALI Antikörper gemessen werden können. Außerdem führt nur ein sehr geringer Anteil von Blutprodukten, die Antikörper enthalten, zu einem TRALI.

Ein alternatives Modell der Pathogenese wurde durch Silliman im folgenden Absatz beschrieben:

1.3.3 Silliman's „Two-Hit“-Modell

1992 stellte Silliman das *Two-Hit*-Modell für das TRALI auf. Der erste *Hit* ist ein physiologischer Vorgang, der das pulmonale Endothel aktiviert. Des Weiteren fördert der erste *Hit* die Voraktivierung (*priming*) und die Adhäsion von Neutrophilen, was diese in einen hyperaktiven Zustand versetzt {Silliman, 2003, Silliman, 1997, Silliman, 1998}. Der zweite *Hit* ist ein Ereignis, das die Neutrophilen aktiviert und zur Freisetzung von zytotoxischen Faktoren und zur Zerstörung des Endothels mit kapillärem *leakage* führt. Silliman schlug unter anderem folgende Möglichkeiten für den *first hit* vor: Sepsis, Herzerkrankungen, Traumata oder hämatologische Erkrankungen. Der zweite *Hit* beinhaltet die Konfrontation mit biologisch aktiven Substanzen aus dem transfundierten Blut wie Lysophosphatidylcholine (lyso-PCs), Interleukin 6 und 8 (IL-6 und IL-8) {Silliman, 2003, Silliman, 1997, Silliman, 1998}. Silliman testete seine "Zwei-Hit-Hypothese" am Modell der perfundierten Rattenlunge, wobei er die Neutrophilen mit LPS inkubierte. Im Anschluss daran transfundierte er Blutprodukte am Tag des Verfallsdatums und benutzte zum Vergleich frisch gefrorenes Plasma bzw. frisch gewonnene Blutprodukte. Nur die Gruppe, in der die Neutrophilen mit LPS voraktiviert waren und der das ältere Blut transfundiert wurde, reagierte mit einem signifikanten Anstieg des pulmonal-arteriellen Drucks und einem pulmonalen Ödem. Zusätzlich konnte Silliman zeigen, dass *in vitro* wiederum nur altes Blut in der Lage war, die Neutrophilen-NADPH-Oxidase zu aktivieren {Silliman, 2007, Silliman, 1998}.

In Abbildung 3, modifiziert nach Swanson et al. {Swanson, 2006}, werden die beiden Modelle zur Pathophysiologie des TRALI gegenübergestellt:

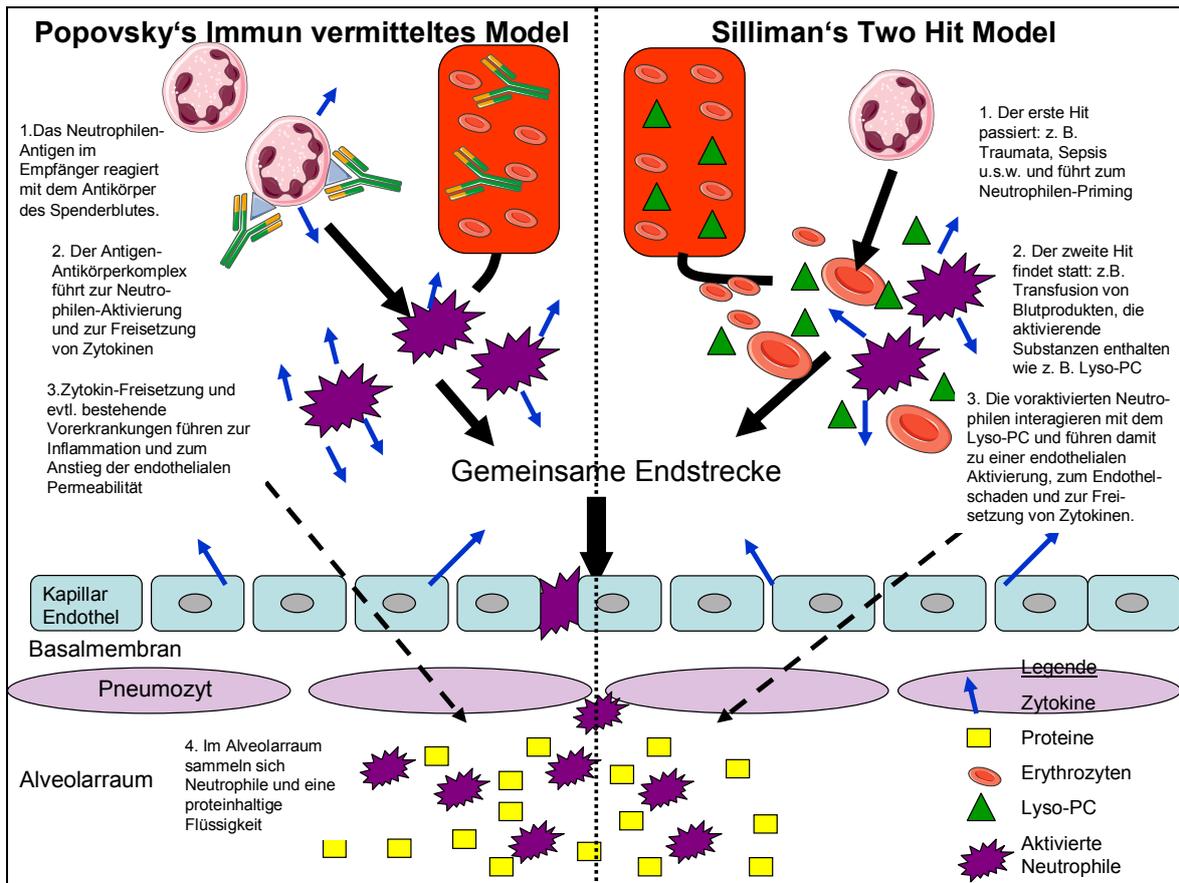


Abbildung 3: Schematische Gegenüberstellung der pathophysiologischen Modelle des TRALI, modifiziert nach {Swanson, 2006}

1.4 Granulozytäre Mechanismen der Inflammation

1.4.1 Phagozytose

Polymorphkernige neutrophile Leukozyten spielen eine entscheidende Rolle bei der initialen Abwehr gegen Bakterien, Pilze und Protozoen. Die durch die Neutrophilen erbrachte Abwehrreaktion umfasst mehrere Schritte: Erstens die initiale Adhäsion von zirkulierenden Neutrophilen an das aktivierte vaskuläre Endothel, die folgende Extravasation und Migration der Neutrophilen zum inflammatorischen Fokus und schließlich die Elimination der Mikroorganismen durch Phagozytose und Abgabe von reaktiven Sauerstoffmetaboliten und Proteasen {Edens, 2003}. Zu diesen Mechanismen gehören im Wesentlichen die Fusion von zytoplasmatischen Granula und sekretorischen Vesikeln mit dem Phagosom. Die verschiedenen Granula enthalten nicht nur antimikrobiell wirksame Proteine, Proteasen und Komponenten der *respiratory burst* Oxidasen, sondern auch eine große Zahl von Rezeptoren für den Adhäsionsprozess, extrazelluläre Matrix-proteine und Mediatoren für die Inflammation. Die kontrollierte Mobilisation dieser zytoplasmatischen Organellen erlaubt die Transformation von einem passiv durch die Blutbahn zirkulierenden Neutrophilen zu einem effektiven Werkzeug der angeborenen Immunität {Faurichou, 2003}.

Zusätzlich tragen polymorphkernige Neutrophile Granulozyten (PMNs) zum *Recruitment*, zur Aktivierung und zur Programmierung von antigen-präsentierenden Zellen bei. Die hierbei abgegebenen chemotaktischen Signale ziehen Monozyten und dendritische Zellen an und beeinflussen, ob die Makrophagen zu pro- oder antiinflammatorischen Zellen werden. Gleichzeitig erzeugen Neutrophile Signale, die deren eigene überschießende Akkumulation und überschießende Aktivierung unterdrücken. Sie können ihren eigenen Tod (Apoptose) herbeiführen und sie locken Makrophagen an, um den Schaden am körpereigenen Gewebe gering zu halten bzw. reparieren zu lassen {Moraes, 2003}. Eine überschießende PMN-Aktivierung mit Sekretion dieser toxischen Mikrobizide nach extrazellulär, führt dem entgegen zur Degradierung extrazellulärer Matrix und Gewebeschädigung.

1.4.2 Neutrophile Granula und sekretorische Vesikel in der Inflammation

Die Neutrophilen migrieren entlang eines Konzentrationsgradienten zum Wirkort, um dort zwei Gruppen von Granula zu entleeren und eine Angriffs- bzw. Verteidigungskaskade an

der Plasmamembran zu aktivieren. Sie sezernieren nukleäre Proteine und schließlich ihr eigenes Zytosol, zum Zweck der antimikrobiellen Verteidigung {Nathan, 2006}. Eine Über-sicht zeigt das Schema von Nathan et. al. {Nathan, 2006} in Abbildung 4:

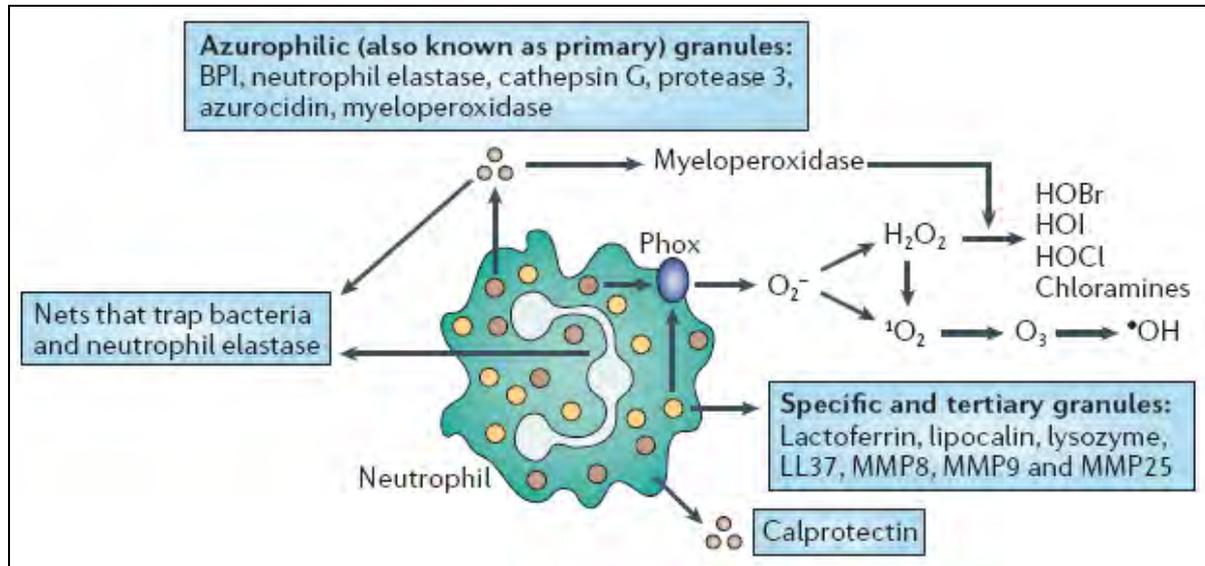


Abbildung 4: Neutrophilen Granula und weitere anti-mikrobiologische Mechanismen {Nathan, 2006}

Die mikrobioziden Produkte kommen von vielen Kompartimenten der Neutrophilen: Azurophile Granula (auch primäre Granula), spezifische Granula (auch sekundäre Granula) und tertiäre Granula, Plasma und Phagosomalmembran, dem Kern und dem Zytosol: BPI (bakterizides Permeabilität steigerndes Protein), H_2O_2 (Hydrogenperoxid), HOBr (hypobromide Säure), HOCl (hypochlore Säure), HOI (hypoiodische Säure), MMP (Matrixmetalloproteinase), 1O_2 (singulärer Sauerstoff), O_2^- (Superoxid), O_3 (Ozon), $^{\bullet}OH$ (Hydroxylradikaler), Phox (Phagozytenoxidase).

Die im Ablauf der Inflammation ersten Granula, die entleert werden, sind Peroxidase-negativ, hierzu zählen die spezifischen Granula (auch sekundäre Granula) und tertiären Granula (auch Gelatinasegranula). Diese enthalten verschiedene Proteine, die zum Teil in beiden Granula enthalten sind {Faurichou, 2003}. Hierzu zählen die Proteine Lactoferrin, Lipocalin, Lysozym und LL37. LL37 ist ein chemotaktisches und antimikrobiell wirksames Peptid, das durch die Protease 3 aus dem Vorläuferprotein Cathelicidin gebildet wird (kationisches antimikrobiologisches Protein 18, CAP 18). Ebenso findet man in den Peroxidase-negativen Granula die Matrixmetalloproteinasen 8, 9 und 25. Diese Matrixmetalloproteinasen degradieren Laminin, Kollagen, Proteoglykane und Fibronectin. Daher

wird ihnen eine entscheidende Rolle bei der Ermöglichung des neutrophilen Recruitments und auch bei der Gewebeerstörung zugeschrieben {Selsted, 2005}.

Die zeitlich nächste Phase beinhaltet die Entleerung der Peroxidase positiven und azurophilen Granula (auch primäre Granula). Diese enthalten u. a. vier α -Defensine und die Myeloperoxidase (MPO). MPO bildet aus H_2O_2 die viel aggressiveren und stärker antiseptisch wirkenden hypochlorischen, hypobromen und hypoiodischen Säuren. Die hypochlorische Säure reagiert mit Aminen und bildet dadurch das länger wirksamen Bakterizid Chloramin {Klebanoff, 2005}. Die primären Granula entlassen ebenso das gegen gramnegative Bakterien sehr wirksame BPI (bakterizides Permeabilität steigerndes Protein) und vier weitere antibiotische Proteine, die Serprocidine {Campanelli, 1990, Weiss, 1978}. Die Serprocidine beinhalten drei Serinproteasen: Cathepsin G, die Neutrophilenelelastase, die Protease 3 und ein weiteres homologes Protein, das zwar keine protolytische Aktivität mehr besitzt, aber gleich effizient in der antibakteriellen Aktivität ist. Es hat sowohl den Namen Azurocidin als auch kationisches antimikrobiologisches Protein 37 (CAP 37) erhalten {Campanelli, 1990, Pereira, 1990}.

1.4.3 Der respiratorische Burst

Die phagozytäre NADPH-Oxidase ist ein aus vielen Komponenten zusammengesetztes Enzym mit einem Redoxzentrum, das Elektronen vom zytoplasmatischen NADPH in den Extrazellulärraum transferiert.

Die Gesamtreaktion, die durch die NADPH-Oxidase katalysiert wird, kann in der folgenden Formel zusammengefasst werden:



Der Elektronentransfer von NADPH zum Sauerstoff ist ein vielschrittiger Prozess. Die Elektronen werden sequentiell über FAD und Häm transportiert, wie folgende Formel zeigt:



Obwohl FAD und 2 Häm-Gruppen Teil des Redoxzentrums des Enzyms sind, kann NADPH diese Proteine nicht binden, bevor nicht eine Assoziation des kompletten Enzyms stattfindet. Erst dann kann der Elektronentransfer erfolgen.

Cytochrom B 558, ein Flavohämprotein ist aus zwei Untereinheiten, gp91^{phox} und p22^{phox} in einem 1:1 Verhältnis aufgebaut {Roos, 2003}. Cytochrom B 558 wird auf den Membranen der Phagolysosomen sowie auf der Zelloberfläche exprimiert, wenn größere Vesikel oder Granula mit Membransystemen während der Aktivierung fusionieren.

Der Stimulus für die Aktivierung ist das Opsonieren von Mikroorganismen oder eine höhere Konzentration von chemotaktischen Stoffen. Als Teil dieser Aktivierung werden die drei zytosolischen Komponenten der NADPH-Oxidase, p47^{phox}, p67^{phox} und p40^{phox} ebenso wie das GTP-bindende Protein an das Cytochrom B 558 gebunden, um dann die komplette und aktive Form der NADPH-Oxidase zu bilden (Abbildung 5).

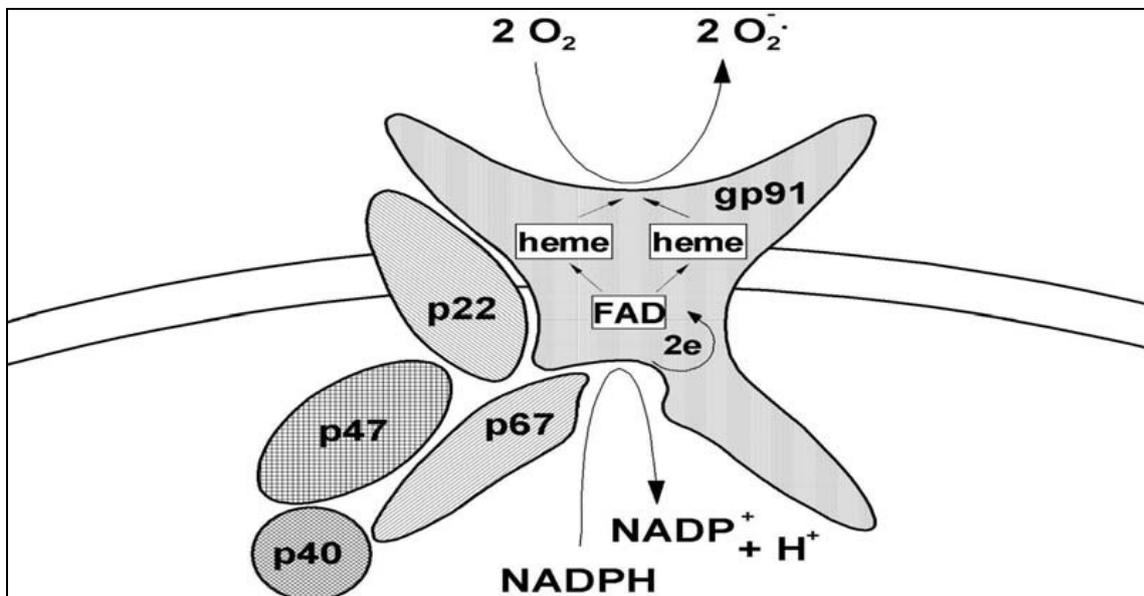


Abbildung 5: NADPH Oxidase {Roos, 2003}

Sowohl die Fusion als auch der Elektronenfluss wird reguliert und kann beeinflusst werden durch bisher drei bekannte kleine GTP-bindende Proteine: Rac1, Rac2 und Rap1A {Abo, 1991, Knaus, 1991}. Diese Proteine agieren als molekulare Schalter in der Signalkaskade: inaktiv, wenn sie GDP-gebunden sind und aktiv, wenn GTP an sie bindet. Es sind Rho-ähnliche GTP-asen, die ihrerseits unter der Kontrolle von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) und GTPase-aktivierenden Proteinen stehen (GAP). Bei Neutrophilen ist ein Rac-aktivierendes GEF identifiziert worden: p-Rex1, das synergistisch durch Phosphoinositole und $\beta\gamma$ -Untereinheiten eines trimerischen G-Proteins aktiviert wird {Welch, 2002}.

Rap1A nähert sich der NADPH-Oxidase phosphorylierungsabhängig und ist in die Regulationsprozesse eingebunden. Rap1 wird aktiviert durch die Stimulation von Neutrophilen mit Stimuli wie fMLP, PAF und GM-CSF {Gabig, 1995}.

Zusätzlich spielt die Arachidonsäure, die durch die zytosolische Phospholipase A2 von den Phospholipiden der Plasmamembran abgespalten wird, eine entscheidende Rolle in der Aktivierung der NADPH-Oxidase {Dana, 1998}. Ob die Arachidonsäure selbst ihren aktivierenden Effekt auf eine oder mehrere Oxidase-Untereinheiten ausübt, oder ob die Lysophospholipide der Plasmamembranen ein günstiges Mikromilieu für die Oxidase herstellen, ist bisher unbekannt.

1.4.4 fMLP und seine Rezeptoren

Formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) ist ein synthetisches Peptid, das die Wirkung von Bakterienpeptiden mit formylierten N-terminalen Methioningruppen nachahmt. fMLP ist seit Dekaden ein herausragendes Modell zum Verständnis der Phagozytenfunktion und deren Signalwege. fMLP wirkt als Chemokin chemoattraktiv auf Neutrophile und löst den *respiratory burst* aus. Es vermittelt seine Wirkung über die Bindung an einen spezifischen Rezeptor. Hierbei handelt es sich um den formyl-Peptidrezeptor (FPR) bzw. die formyl-peptid ähnlichen Rezeptoren 1 und 2 (formyl peptid-like receptor 1/2) {Jesaitis, 1993}.

Die Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR; G-protein linked receptors). Nach Binden des Liganden an den Rezeptor dissoziieren die β - und γ -Untereinheiten von der α -Untereinheit des G-Proteins ab. Die dissoziierte β/γ -Untereinheit aktiviert direkt eine Signalkaskade, die unter anderem die PI-3-K (Phosphoinositol-3-Kinase) und die PI-4,5-K (Phosphoinositol-4,5-Kinase) beinhaltet, die unterschiedliche Phosphoinositole herstellen. Diese Phosphoinositole inaktivieren Gelsolin und CapZ, die in der Folge keine freien Endungen *barbed ends* mehr verkappen können {During, 2007}.

Die β - und γ -Untereinheiten aktivieren außerdem die Phosphoinositol spezifische Phospholipase C (PLC), die nach Abspaltung von Membranphospholipiden *second messenger* generiert, die die Proteinkinase C aktivieren und die Konzentration an intrazellulärem freiem Calcium erhöht {Bokoch, 1995, Thelen, 1993}. Hierüber werden auch verschiedene Arten der Phospholipase A2 aktiviert {Hurley, 2008}.

Über GEFs (Guaninnukleotid Austauschfaktoren) werden kleine GTP-asen wie CDC 42 (*cell division cycle 42*) aktiviert, die wiederum die Bindung von N-WASP (Wiskott-

Aldrich-Syndrom Protein-Familie) an Arp2/3 auslösen und dadurch einen Polymerisations-Kern für die *Actin Filamente* bilden {During, 2007}. Über den Weg der p38 MAP-Kinase (Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase) wird unter anderem der Weg der Hsp27 (*heat shock protein 27*) zur Actin-Monomer-Freisetzung beschrieben.

Diese Zusammenhänge beschreibt sehr übersichtlich das Schema aus der Arbeit von During et al. {During, 2007}:

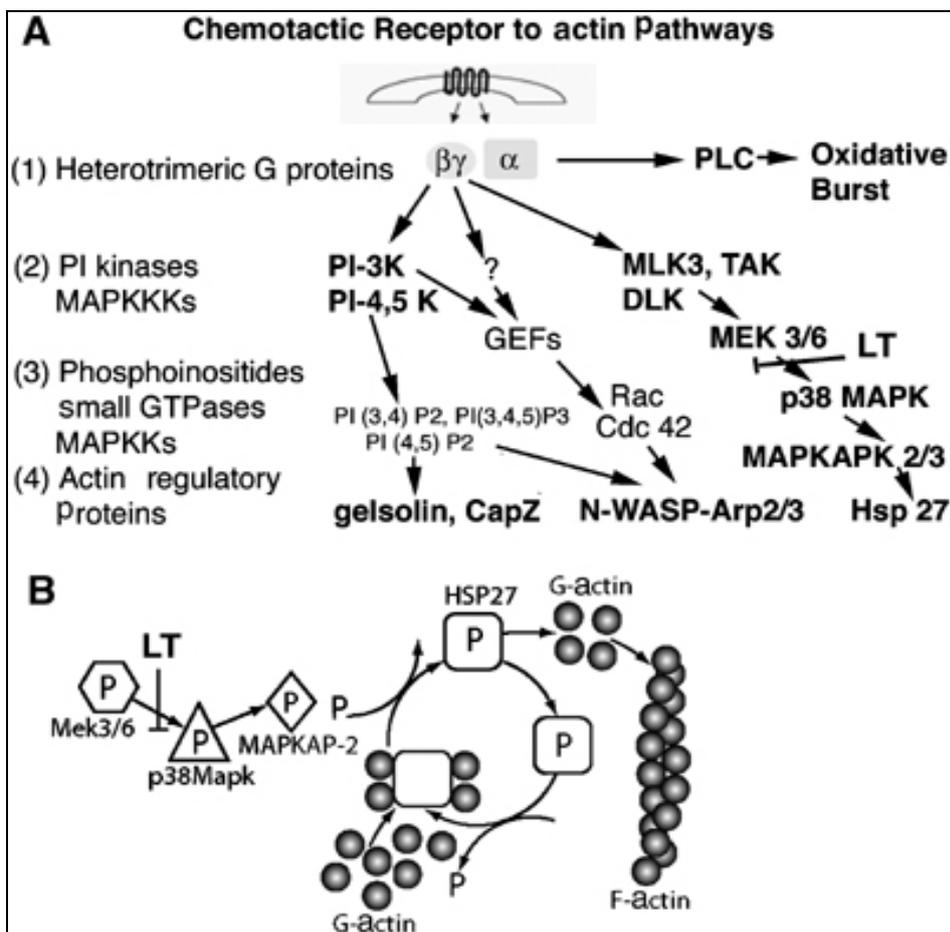


Abbildung 6: fMLP-Rezeptor: a) Signalweg und b) Interaktion mit Actin aus {During, 2007}.

LT = lethal toxin von *Bacillus anthracis*, MEK = MAP und ERK Kinase, weitere Abkürzungen im Text

Auch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch die NADPH-Oxidase wird durch die Bindung von fMLP an seine Rezeptoren vermittelt. Das „Abschalten“ der Signalkaskade geschieht durch Bindung der Rezeptoren samt Ligand an das Zytoskelett. Diese

Bindung ist in manchen Fällen reversibel {Fu, 2004}. Die molekulare Basis für die Zytoskelett-abhängige Beendigung des FPR-Signals ist die direkte Beendigung des transmembranösen Signals, wenn der gebundene Rezeptor sich vom signalgebenden G-Protein durch das Binden an das Zytoskelett abkoppelt. Dieses tritt bereits kurz nach Binden des fMLP an den FP-Rezeptor ein {Jesaitis, 1993}.

1.4.5 Priming

Der Grad der NADPH-Oxidase-Aktivität ist nicht nur abhängig von dem spezifischen Stimulus, sondern auch von dem Zustand, in dem sich die aktivierte Zelle befindet. Der Grad der Aktivität der NADPH-Oxidase kann durch vorhergehendes *Priming* verstärkt werden. *Priming* impliziert, dass einige Minuten bis zu einer Stunde vor dem eigentlichen Stimulus ein anderes als das aktivierende Agens die Zelle in einer Konzentration erreicht, die nicht zur vollständigen Aktivierung z. B. der NADPH-Oxidase, führt {Guthrie, 1984, Swain, 2002}. *Priming* geschieht durch Antikörper gegen zelluläre Antigene und durch eine Vielzahl anderer Makromoleküle wie TNF α und GM-CSF in sehr geringer Konzentration {Condliffe, 1998, Hallett, 1995}.

Die Mobilisation von präformierten Rezeptoren aus intrazellulären Lagerstätten ist ein wesentlicher Mechanismus des Neutrophilenprimings. Hierbei werden Neutrophilengranula und sekretorische Vesikel, die die spezifischen Rezeptoren für den eigentlich aktivierenden Stimulus beinhalten, zur Zelloberfläche mobilisiert {Almkvist, 2001, Bylund, 2002}. Komplementrezeptor 3 (CR3) und Rezeptoren aus der FPR-Familie befinden sich bei den ruhenden Neutrophilen in spezifischen und in Gelatinase-Granula {Bylund, 2002, Sengelov, 1994}.

1.5 Fragestellung

Vor dem oben skizzierten Hintergrund werden in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen untersucht:

1. Wie ist das NB1-Expressions-Verhalten der Granulozyten der 30 gesunden Spender?
2. Aktiviert der Anti-NB1-Antikörper polymorphkernige neutrophile Granulozyten direkt?
3. Können Anti-NB1-Antikörper Neutrophile für eine verstärkte Antwort auf proinflammatorische Agenzien sensibilisieren?
4. Ist der gesamte Anti-NB-1-Antikörper für die Sensibilisierung notwendig?
5. Ist diese Sensibilisierung spezifisch für bestimmte Neutrophilen-Stimuli?
6. Ist diese Sensibilisierung spezifisch für bestimmte Neutrophilen-Funktionen?
7. Kommt es nach Anti-NB-1 Gabe zu einer Änderung der fMLP-Rezeptor-Expression?

2 Materialien und Methodik

2.1 Materialien

2.1.1 Materialien und Lösungen für die Zellisolation und Inkubation

- BSA (bovines Serum-Albumin, fettsäurefrei) (Calbiochem, La Jolla, USA)
- Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
- PBS-/(sine Ca⁺⁺ Mg⁺⁺)
 - 100ml PBS 10x (sine Ca⁺⁺ Mg⁺⁺) (Gibco, Karlsruhe, BRD)
 - + 900 ml aqua destillata
 - + 1N NaOH ad pH 7,4
- PBS +/+ (cum Ca⁺⁺ Mg⁺⁺)
 - 100 ml PBS 10 x (cum Ca⁺⁺ Mg⁺⁺) (Gibco, Karlsruhe, BRD)
 - + 900 ml aqua destillata
 - + 1N NaOH ad pH 7,4
- Polyvinylalkohol (PVA)
 - 1000 ml 0,9 % NaCl (Pharmacia und Upjohn, Nürnberg, BRD)
 - + 10 g PVA (Merck, Darmstadt, BRD)
- aqua ad iniectabilia (Pharmacia und Upjohn, Nürnberg, BRD)

2.1.2 Materialien und Lösungen für die Elastasemessung

- Substratlösung:
 - Chromogenes Substrat (S-2484, KabiVitrum, Erlangen, BRD)
 - 25 mg Trockensubstanz
 - + 7 ml DMSO (Merck, Darmstadt, BRD)
- Messpuffer :
 - 100 mmol/l Tris-HCl, 960 mmol/l NaCl, pH 8,3
 - 60 ml aqua dest.
 - + 1,21 g Tris
 - + 5,62 g NaCl
 - + 1 M HCl ad pH 8,3
 - mit aqua dest. auf 100 ml auffüllen

- Verdünnungspuffer:
0,1 M Na-Acetatpuffer pH 5,5 mit 0,1 % Tween 20
60 ml aqua dest.
+ 1,2 ml Essigsäure 98 %
+ 1 M NaOH ad pH 5,5
+ 1 g Tween 20
mit aqua dest. auf 100 ml auffüllen

2.1.3 Materialien für die FACS-Analytik

- FITC-konjugierter Ziege-anti-Maus-Antikörper (Serotec, München, BRD)
- NB-1 Antikörper (freundlich zur Verfügung gestellt von J.Bux, DRK Blutspendedienst, Hagen)
- Fluorescein-gebundenes fMLP-Analogon (fMLP-lys-FITC), das die fMLP-Aktivität und Bindungs-Eigenschaften erhält (Peninsula Laboratories, Belmont, CA, USA)
- Phycoerythrin-(PE) konjugierter Schaf-Anti-Maus IgG (Dako, Hamburg, Germany)

2.1.4 HPLC-Materialien

Authentische Standards:

- Omega-COOH-LTB₄, 10 µg in 0,5 ml Methanol (Paesel, Frankfurt/Main, BRD)
- Omega-OH-LTB₄, 10 µg in 0,5 ml Methanol (Paesel, Frankfurt/Main, BRD)
- LTB₄, 50 µg in 1 ml Methanol (Paesel, Frankfurt/Main , BRD)
- 5-HETE, 10 µg in 0,5 ml Methanol (Paesel, Frankfurt/Main, BRD)
- 6-trans-LTB₄, 0,2 mg in 0,1 ml Hexan (Merck-Frost, Toronto, Kanada)
- 6-trans-epi-LTB₄, 0,2 mg in 0,1 ml Hexan (Merck-Frost, Toronto, Kanada)
- 5,6-DiHETE, 0,2 mg in 0,1 ml Hexan (Merck-Frost, Toronto, Kanada)
- 5,6-epi-DiHETE, 0,2 mg in 0,1 ml Hexan (Merck-Frost, Totonto, Kanada)

Lösungsmittel:

- Ammoniaksche Lösung, 25 %; pro analysi (Merck, Darmstadt, BRD)
- Aqua tridestillata
- Chloroform reinst (Fluka AG, Bern, Schweiz)

- Essigsäure 100 % pro analysi (Merck, Darmstadt, BRD)
- Isopropanol pro analysi (Fluka AG, Bern, Schweiz)
- Methanol reinst (Fluka AG, Bern, Schweiz)

Säulenmaterial und Vorsäulen:

- Leersäulen 25 cm, Edelstahl (Shandon, Runcorn, UK)
- Packungsmaterial Octadecylsilyl-Hypersil, Partikelgröße 5 µm (Machery Nagel, Düren, BRD)
- C18-Silica-Gel-Säulen, 1 µm Volumen (Bond-Elut, Leverkusen, BRD)

2.1.5 Experimentelle Agentien und Pharmaka

- Cytochrom C (Sigma, Deisenhofen, BRD)
- EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatrium-Dihydrat, Merck, Darmstadt, BRD)
- LDH-Kit zur Lactatdehydrogenase-Messung (Boehringer, Mannheim, BRD)
- Superoxidedismutase (Sigma, Deisenhofen, BRD)
- Trypan-Blau (Boehringer, Mannheim, BRD)
- IgG Kontrolle (MOPC-21 ; Sigma, Deisenhofen, BRD)
- GM-GSF (Sigma, Deisenhofen, BRD)
- fMLP (Sigma, Deisenhofen, BRD)
- PAF (Sigma, Deisenhofen, BRD)
- A23187 (Sigma, Deisenhofen, BRD)
- NB-1 Antikörper (freundlich zur Verfügung gestellt von J.Bux, DRK Blutspendedienst, Hagen)

Alle verwendeten Salze und Chemikalien, wenn nicht anders angegeben (Merck, Darmstadt, BRD).

2.2 Methodik

2.2.1 Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten

Humane neutrophile Granulozyten werden aus peripherem Blut nach der Methode von Boyum {Boyum, 1976} durch Zentrifugation über einen Ficoll-Gradienten gewonnen. Die Zellisolation wird standardmäßig unter sterilen Bedingungen und bei Raumtemperatur (20° C – 25° C) durchgeführt. Die Isolationsdauer liegt im Durchschnitt bei ca. zwei Stunden.

Blutentnahme

Für die Isolierung humaner PMN wurde EDTA-antikoaguliertes venöses Blut von gesunden Spendern im durchschnittlichen Alter von 25 Jahren verwendet. Die Blutentnahme erfolgt durch Punktion einer peripheren Vene der Armbeuge mit einer Kanüle der Größe 19 G. Das Blut wird in eine zuvor mit EDTA-gefüllte Spritze aspiriert, wobei die EDTA-Endkonzentration 0,125 % beträgt.

Ficoll-Gradient

Das so gewonnene Blut wird zunächst 1:2 mit PBS -/- verdünnt. 35 ml dieses Gemisches werden nun vorsichtig mit einer sterilen 50 ml - Polypropylene-Pipette (Falcon) auf 15 ml Ficoll-Lösung, die zuvor in ein 50 ml fassendes steriles Propylene-Röhrchen (Falcon) vorgelegt wurde, aufgeschichtet. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 35 Minuten bei 400 x g. Durch diese Zentrifugation über den Ficoll-Gradienten wird eine Auftrennung von thrombozytenreichen Plasma, mononukleären Zellen (Mono- und Lymphozyten) und Granulo- und Erythrozyten bewirkt, die sich in einer gemeinsamen Bande am Boden des Röhrchens befinden. Nach Absaugen des Plasmas und der mononukleären Zellen erfolgt nun die Abtrennung der Erythrozyten von den PMN: zunächst werden die Bande mit 10 %-igem Polyvinylalkohol in NaCl gemischt (Verhältnis 1:3) und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, was eine Sedimentation der Erythrozyten bewirkt. Danach wird der PMN-reiche Überstand mit einer Pipette abgenommen, in frische Röhrchen übertragen und bei 150 x g 10 Minuten zentrifugiert. Verbleibende Erythrozyten werden durch eine hypotone Lyse entfernt: Dazu werden die Zellen in 18 ml aqua dest. resuspendiert; nach 20 Sekunden wird die Lyse durch Zusatz von 2 ml 10-fachem PBS-Konzentrat beendet.

Zur vollständigen Reinigung der PMN von Ficoll-Rückständen schließen sich zwei Waschschriffe in PBS +/- (150 x g; 10 Minuten) an.

Zellzählung, Identifizierung und Vitalität

Zwischen den beiden Waschschriffen erfolgt die Quantifizierung der Zellen durch lichtmikroskopische Zählung mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bei 400-facher Vergrößerung. Durchschnittlich lassen sich aus 50 ml Blut ca. 10×10^7 PMN isolieren. Die Reinheit der isolierten Granulozyten wird in regelmäßigen Abständen über Differentialblutbilder kontrolliert. Dabei ergibt sich ein PMN-Anteil von 97 %, Mono- und Lymphozyten sind mit jeweils 1 % vertreten, die restlichen Zellen werden als eosinophile und basophile Granulozyten identifiziert. Die Zellvitalität wird mithilfe der Trypan-Blau-Ausschluss-Methode und der LDH-Freisetzung überprüft, wobei 98 % der PMN am Ende der Isolation vital sind. Die spontane LDH-Freisetzung der PMN wird auf die durch das Bienengift Mellitin hervorgerufene absolute Enzymfreisetzung bezogen und liegt unter 3%.

2.2.2 Versuchsablauf

Nach dem letzten Waschschriff werden die PMN in PBS ++ aufgenommen, wobei die Dichte der Zellen auf 5×10^6 PMN/ml eingestellt wird und das Probenvolumen jeweils 1 ml beträgt. Die Stimulation erfolgt im Wasserbad bei 37° C unter regelmäßigem Schütteln, um einer Aggregation der Zellen vorzubeugen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Reaktion je nach dem anschließenden Analytikverfahren durch Kühlung auf 0° C und durch Zentrifugation bei 1200 x g (Leukotriene, Degranulierung, *respiratory burst*) oder durch das Zu-pipettieren von 2,5 ml 10mM Essigsäure in Methanol abgestoppt.

2.2.3 Durchflusszytometrie

Prinzip

Die Durchflusszytometrie wird zum Nachweis und zur Quantifizierung zellulärer Oberflächenantigene eingesetzt. In diesem Fall wurde die Expression von NB1 oder des fMLP-Rezeptors auf den polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten nachgewiesen. Hierbei bindet zugegebener Primär-Antikörper an das Oberflächenantigen und ein nach mehrfachem Waschen zugegebener fluoreszierender Sekundär-Antikörper bindet an den Fc-Teil des Primär-Antikörpers. Die Intensität der Fluoreszenz gibt indirekte Auskunft über das Vorhandensein und die Quantität der Oberflächenantigene.

Durchführung

Nach Isolation werden die PMNs in einer Konzentration von 5 Mio. Zellen/ml in PBS A/B + Azid + kaltem BSA aufgenommen. Die Aussähung erfolgt auf 96 Wellplatten á 100 µl, was 500.000 PMNs entspricht. Nach Zentrifugation mit 300 g über 3 Minuten bei 4° C wird der Überstand abgekippt und nach Abtupfen die PMNs aufgerüttelt. Nun wird Octagam 20 µl (IgG als Block für FC-Rezeptor) hinzugegeben. Anschließend werden die Zellen mit dem Primär-Antikörper (20 µl á 5 µg/ml) oder mit der Negativprobe (20 µl PBS A/B) über 30 Minuten bei 4° C inkubiert. Es folgen drei Waschschríte, in denen jeweils 150 µl PBS A/B auf alle Zellen gegeben werden, und erst nach dem Zentrifugieren mit 300 g über 4 Minuten bei 4° C ein Abkippen und Aufrütteln erfolgt. Nach den drei Waschschríten wird der Sekundär-Antikörper, ein Anti-Maus-PE (20 µl) hinzugegeben und 30 Minuten bei 4° C im Dunkeln inkubiert. Es erfolgen erneut drei Waschschríte nach dem oben genannten Schema. Die Zellen werden nun mit 100 µl PBS A/B resuspendiert und aufgenommen und im Zytometer der Firma Egston Dickinson fluoreszenz-aktiviert gemessen.

2.2.4 Erfassung granulozytärer Funktionsparameter

Degranulierung

Prinzip:

Das Auftreten von Inhaltsstoffen der verschiedenen sekretorischen Kompartimente des Granulozyten im Zellüberstand gilt als Indikator einer abgelaufenen Degranulationsreaktion. Das Ausmaß der Degranulierung wird anhand der Freisetzung des proteolytischen Enzyms Elastase in den Zellüberstand quantifiziert. Die Enzymaktivität wird kinetisch über die Entstehung eines photometrisch detektierbaren Reaktionsproduktes erfasst, dabei kommt die Methode von Kramps zum Einsatz {Kramps, 1983}.

Durchführung:

Nach Zusatz des Substrates L-pyroglutamyl-L-propyl-L-valine-p-nitro-anilid wird die Geschwindigkeit der Extinktionszunahme bei 405 nm als Marker für die Elastase-Aktivität gewertet. Zur Durchführung dieses Assays werden zunächst 200 µl Messpuffer und 100 µl Verdünnungspuffer in die Küvette vorgelegt. Nach Zugabe von 100 µl Zellüberstand wird die Reaktion durch Einpipettieren von 200 µl Substrat gestartet und die Extinktionszunahme bei 405 nm im Uvikon-Photometer kontinuierlich über einen Zeitraum von 3 Mi-

nuten registriert. Der Substratumsatz wird standardmäßig bei 37° C gemessen. Die errechnete Aktivität wird in Relation zum zellulären Gesamtgehalt des Enzyms gesetzt, der durch Ultraschallung (3 x 15 sec; 50 W) aus einem parallelen Zellansatz freigesetzt wird.

Respiratorischer Burst

Prinzip

Die Aktivierung des *respiratorischen Burst* wird über die Messung des primären Reaktionsprodukts der granulozytären NADPH-Oxidase, dem Sauerstoffsuperoxid, quantifiziert. Dazu wird die Methode von Cohen {Cohen, 1978} herangezogen, wonach die Superoxid-induzierte Reduktion von Cytochrom C photometrisch erfasst wird. Dabei wird den Versuchsansätzen vor Stimulation Cytochrom C zugesetzt, wobei Parallelansätze zusätzlich das Enzym Superoxiddismutase enthalten, welches selektiv die O₂-abhängige Cytochrom-Reduktion hemmt. Die Cytochrom-C-Reduktion, die aus der Differenz der beiden Ansätze resultiert, lässt somit einen Rückschluss auf die Menge an Sauerstoffsuperoxid zu.

Durchführung

Alle Proben werden paarweise angesetzt und enthalten 75 µM Cytochrom C, wobei jeweils einem der Ansätze 10 µg/ml Superoxiddismutase zugesetzt wird. Die Stimulation erfolgte bei 37° C im Wasserbad und wurde durch Kühlung auf Eis und anschließende Zentrifugation bei 4° C (1200 x g, 4 min) beendet. Die Zellüberstände werden photometrisch bei 546 nm (Absorptionsmaximum des reduzierten Cytochrom C) analysiert, wobei jeweils die Extinktion gegen den SOD-enhaltenden Parallelansatz gemessen wird. Die granulozytäre O₂-Produktion kann unter Einbeziehung eines Extinktionskoeffizienten von 21 mM⁻¹ bei einer 1:1 Stöchiometrie errechnet werden.

2.2.5 Analytik der Arachidonsäure-Metaboliten

Der Nachweis der Arachidonsäuremetabolite besteht aus einer Sequenz von Festphasenextraktion und HPLC-Analytik {Bligh, 1959, Mathews, 1981}. Die HPLC-Technik wird durch UV-Spektrenanalyse der separierten Mediatoren ergänzt.

Die Festphasenextraktion

Zur Aufreinigung und Anreicherung der granulozytären Arachidonsäure-Derivate aus dem Zellüberstand wird zunächst eine Festphasenextraktion durchgeführt. Hierzu werden 1 cm³ Vorsäulen (Bond-Elut) aus einer Silica-Gel Matrix verwendet (40 µm Partikelgröße), die kovalent mit gesättigten C18-Alkylresten verbunden sind. Diese Matrix zeichnet sich durch eine hohe Affinität für unpolare Verbindungen aus, wodurch die Extraktion der Lipoxygenase-Metaboliten aus dem wässrigen Zellüberstand und deren anschließende Elution durch Zugabe eines unpolaren Lösungsmittel (Methanol) ermöglicht wird. Für die Festphasenextraktion werden ausschließlich eisgekühlte Lösungen verwendet; um das Verfahren zu beschleunigen wird eine an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossene Vakuumkammer eingesetzt, die eine rasche Elution der eingesetzten Flüssigkeiten bewirkt.

Die einzelnen Schritte der Festphasenextraktion gestalten sich folgendermaßen: Zunächst werden die Säulen durch Zugabe von jeweils 1 ml Methanol und aqua dest. konditioniert. Danach werden die eisgekühlten Zellüberstände aufpipettiert und langsam durchgesaugt. Anschließend erfolgt eine zweimalige Waschung der Säulen mit aqua dest., um retinierte polare Verbindungen von der Säule zu spülen. Schließlich wird durch rasches Durchsaugen von 100 µl Chloroform die wässrige Phase vollständig von der Säule verdrängt.

Die Elution der gebundenen Arachidonsäuremetabolite erfolgte durch Zugabe von 250 µl Methanol, das schrittweise abgesaugt und in Eppendorf-Gefäßen aufgefangen wird. Die so gewonnenen Proben werden unter einem kontinuierlichen Stickstoffstrom eingedampft und können in dieser Form bis zur weiteren Analytik bei -20° C gelagert werden. Die Wiederfindungsrate (Recovery) für die einzelnen Metabolite, die mit dem beschriebenen Verfahren erreicht werden kann, wird in separat durchgeführten Recovery-Experimenten ermittelt (Mittelwerte +/- sem aus 6 unabhängigen Experimenten):

Substanz	Recovery [%]	
Omega-COOH-LTB4	79,3	(4,5)
Omega-OH-LTB4	84,6	(3,2)
LTB4	75,2	(2,8)
6-trans-LTB4	81,5	(4,7)
6-trans-epi-LTB4	82,3	(5,1)
5,6-DiHETE	70,4	(4,7)
5,6-epi-DiHETE	68,8	(3,3)
5-HETE	63,3	(2,9)

Tab. 3: HPLC-Materialien

2.2.6 HPLC-Analytik

Herstellung und Konditionierung der HPCL-Säulen

Die zur Auftrennung der Arachidonsäure-Metaboliten verwendeten HPLC-Säulen werden mithilfe einer Säulenpackvorrichtung (Knaur) hergestellt. Als Leersäulen kommen 25 cm lange Edelstahlsäulen mit einem Innendurchmesser von 0,46 cm zum Einsatz. Das Packungsmaterial besteht aus Octadecylsilyl-Hypersil-5 μ -Partikeln.

Die Herstellung der HPLC-Säulen wird folgendermaßen durchgeführt: Zunächst werden 3,8 g des Packungsmaterials in 35 ml Isopropanol in einem Glasbehälter gelöst. Nach 5-minütiger Behandlung im Ultraschallbad (Shandon) wird die Lösung in den Vorratsbehälter des Säulenpackgeräts eingefüllt, woraus sie anschließend maschinell unter einem Druck von 440 bar in die zuvor mit Methanol gereinigte, einseitig verschlossene Leersäule gepresst wird. Die fertiggestellte Säule wird verschlossen und durch einseitiges Anbringen einer Vorsäule ergänzt, die dem Schutz der Hauptsäule vor Verunreinigungen dient. Vor Inbetriebnahme wurde eine neu gepackte Säule mit einem Gemisch aus Methanol und aqua dest. (1:9) mit 0,5%-igem Na₂-EDTA-Zusatz konditioniert.

Herstellung der mobilen Phase

Die mobile Phase setzt sich aus Methanol/H₂O/Essigsäure im Verhältnis 72/28/0.16 zusammen, wobei der pH-Wert mit 10 % NH₄OH auf 4,9 eingestellt wird. Anschließend wird die fertiggestellte Phase mithilfe eines Ganzglas-HPLC-Filtersystems (Schott) mit 700

mbar Unterdruck durch eine Teflonmembran gesogen und somit von partikulären Verunreinigungen befreit und entgast.

Reversed-Phase-HPLC (isokratisch)

Dieses Trennverfahren wurde erstmals von Mathews et al. {Mathews, 1981} beschrieben und kommt in leicht modifizierter Form zum Einsatz.

Die für diese Methode konzipierte Anlage setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

1. Gynkotheke M600 Pumpe
2. Rheodyne-Probenaufgabeventil
3. Spektroflow 773 UV-Detektor
4. Shimadzu-Integrator

Die Arachidonsäuremetaboliten aus den Zellüberständen werden wie folgt quantifiziert:

Die eingedampften Proben werden in einem definierten Methanolvolumen (50 µl) aufgenommen und gründlich gemischt, um an der Wand haftende Probenbestandteile zu resuspendieren. Nach kurzer Zentrifugation (2 min, 1000 x g) werden 20 µl der Probe mithilfe einer Hamilton-Spritze über das Probenaufgabeventil auf die Säule gegeben. Eluiert wird bei einer konstanten Durchflussrate von 1,3 ml mobile Phase pro Minute und bei einem Druck von ca. 180 bar. Diese Methode ermöglicht eine hervorragende Einzeldarstellung von LTB₄, der LTA₄-Abbauprodukte 6-trans-LTB₄, 6-trans-epi-LTB₄, 5,6-di-HETE und 5,6-epi-di-HETE, sowie von 5-HETE, während die Abbauprodukte des LTB₄, ω-OH-LTB₄ und ω-COOH-LTB₄ koeluiieren. Alle Leukotriene werden bei 270 nm analysiert, während 5-HETE nur bei einer Wellenlänge von 237 nm detektiert werden können. Die einzelnen Arachidonsäure Metabolite unterscheiden sich hinsichtlich ihres Affinitätsverhaltens gegenüber der stationären Phase (Säule) und somit in ihrer Retentionszeit. Identifiziert werden die verschiedenen Metabolite durch Vergleich mit den Retentionszeiten isolierter Standards, die regelmäßig parallel zu den Proben analysiert werden. Die Menge der retinierten Metabolite kann über den Shimadzu-Integrator bestimmt werden und unter Einbeziehung der vorliegenden Response- und Recovery-Daten in pmol/ml umgerechnet werden.

UV-Spektrenanalyse:

Ein zusätzliches Kriterium zur Identifizierung der einzelnen 5-LO-Metaboliten bildet die Bestimmung der UV-Spektren aller eluierenden Komponenten des Zellüberstands. Hierzu wird der HPLC-Anlage ein Photodiodenarray-Detektor nachgeschaltet, wobei das charakteristische dreigipflige UV-Spektrum der Leukotriene als Identifikationskriterium herangezogen wird. Dieses Verfahren ermöglicht die sensitive Erfassung von Verunreinigungen innerhalb der Leukotrienfraktionen und trägt somit wesentlich zur Charakterisierung der eluierenden Metaboliten bei.

Statistische Analyse

Alle erhobenen Daten sind als Mittelwerte +/- Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die Prüfung auf statistische Signifikanz erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way ANOVA) und anschließendem Tukey's honestly significant difference Test. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen, was einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % entspricht.

3 Ergebnisse

3.1 Übersicht

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der NB-1 Antikörper in der Pathophysiologie des TRALI zu untersuchen. Da die neutrophilen Granulozyten sowohl Effektorzellen im TRALI als auch Zielzelle der vermutlich pathophysiologisch relevanten NB1-Antikörper sind, wählten wir dieses Modell zur Untersuchung der Zusammenhänge. Für die vorliegende Schrift wurden folgende Parameter qualifiziert:

- der respiratorische Burst
- die Leukotrien-Freisetzung
- die Degranulation

3.2 Charakterisierung der Spender-Granulozyten

Für sämtliche Versuche wurden die Granulozyten aus Vollblut von gesunden Spendern täglich frisch isoliert. Die Spender waren im Mittel 26 Jahre alt, 12 von ihnen waren weiblich, und keine Spenderin hatte eine vorausgegangene Schwangerschaft. Vor dem Beginn aller Experimente wurden die Neutrophilen der Spender auf deren Expression von NB1 auf der Oberfläche untersucht. Die Charakterisierung der Spender-Granulozyten erfolgte mittels FACS-Analyse. Die Grafik stellt die relative Anzahl der NB1-positiven Granulozyten jeweils eines Spenders in Prozent dar:

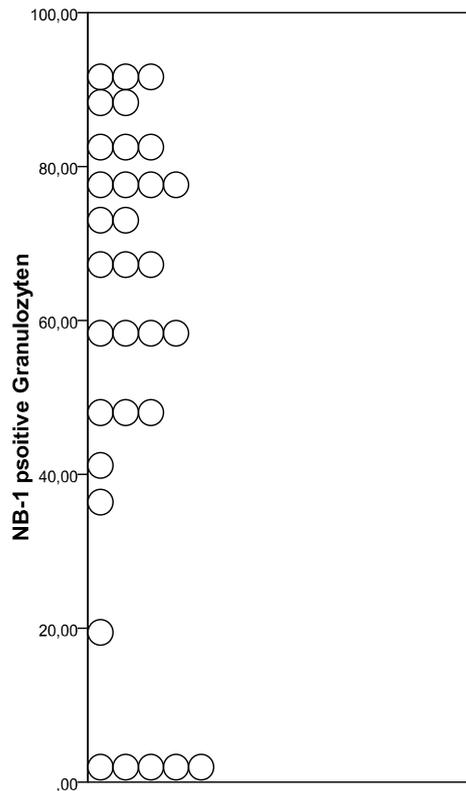


Abbildung 6: Anzahl der Spender mit n relativem Anteil an NB-1 positiven Granulozyten (1 Kreis = 1 Spender)

Es zeigte sich, dass 4 von 32 Spendern weniger als 1,0 % NB1-positive Granulozyten besitzen (= 12,5 %).

Nur die Spender, die eine hohe Rate (40 - 90 %) positiver Neutrophiler haben, wurden für die folgenden Experimente gewählt.

3.3 Anti-NB1-Antikörper aktivieren nicht direkt den respiratory burst der neutrophilen Granulozyten

Die Inkubation von isolierten Neutrophilen mit monoklonalen Antikörpern gegen das NB1-Glykoprotein in verschiedenen Konzentrationen (0,1 - 10 µg/ml) über 30 bis 90 Minuten führte nicht zu einer Aktivierung des Neutrophilen *respiratory burst* (30 Minuten Inkubation dargestellt in Abbildung 7). Die Anti-NB1-stimulierten Zellen zeigten keinen signifikanten Anstieg in ihrer O_2^- -Freisetzung im Vergleich zu IgG-Kontrollen. Auch eine vorausgehende Stimulation mit GM-CSF, was zu einer erhöhten Oberflächenexpression

von NB1 auf den Neutrophilen-Granulozyten führte, hatte keinen Einfluss auf die direkte Stimulation mit NB1.

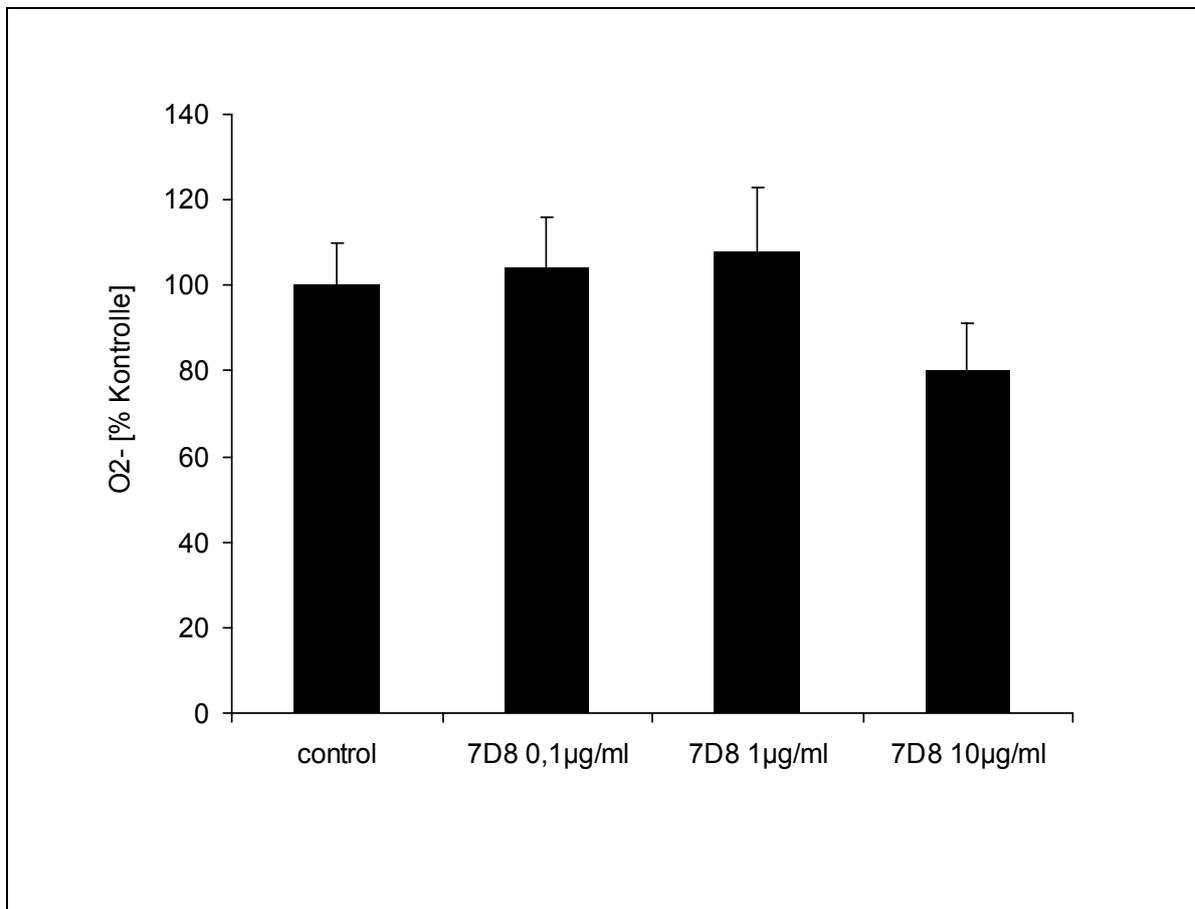


Abbildung 7: Effekt von Anti-NB1-Antikörpern auf die direkte Aktivierung des Neutrophilen respiratorischen Burst

NB1-positive-Neutrophile ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden mit murinen monoklonalen Anti-NB1-Antikörpern (7D8) inkubiert, nach 30 Minuten wurden die Reaktionen durch Zentrifugation mit $13000 \times g$ gestoppt, die Superoxid-Generation ist ausgedrückt in Prozent von Kontroll-IgG inkubierten Zellen (Kontrolle = 100 %). Die Daten sind angegeben in Mittelwert \pm SEM (n=4).

3.4 Anti-NB1-Antikörper verstärken den fMLP-induzierten neutrophilen *respiratory burst*

Wurden die Neutrophilen mit monoklonalen Anti-NB1-Antikörpern (7D8 1 und 10 µg/ml) für unterschiedliche Zeitperioden vorbehandelt und in der Folge mit fMLP (1 µM) für 10 Minuten stimuliert, führte dies zu einer deutlichen Verstärkung der fMLP-induzierten Freisetzung von Superoxid-Anionen (Abbildung 8). Bei optimaler Konzentration des NB1-Antikörpers war eine 3,5 bis 4-fache Erhöhung der Sauerstoffradikalen-Freisetzung durch

fMLP im Vergleich zur Vorinkubation mit Kontroll-Antikörpern sichtbar. Die optimale Konzentration von Anti-NB1-Antikörpern lag bei 10 µg/ml. Die Vorinkubation der Neutrophilen mit 10 µg/ml Kontroll-IgG hatte keinen Effekt auf die fMLP-induzierte Freisetzung von Sauerstoffradikalen. Da der *Priming*-Effekt nach 30-minütiger Präinkubation sichtbar wurde und nach 60 Minuten Präinkubation ein Plateau bot, wurden die folgenden Experimente mit 60-Minuten-Vorinkubation mit 10 µg/ml Anti-NB1-Antikörper durchgeführt.

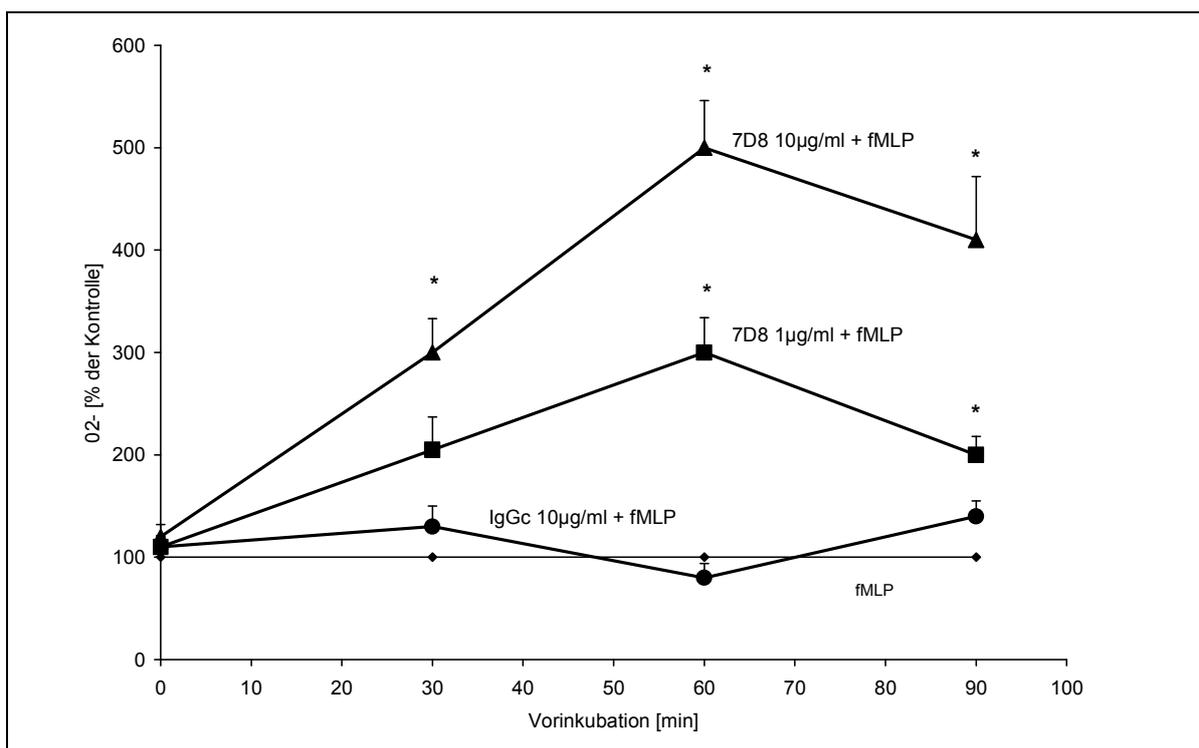


Abbildung 8: Effekt der Preinkubation mit Anti-NB1-Antikörpern auf die fMLP-induzierte Sauerstoffradikalen-Freisetzung der Neutrophilen

Neutrophile ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden für unterschiedliche Zeit (0 - 90 Minuten) mit unterschiedlichen Konzentrationen von murinen monoklonalen Anti-NB1-Antikörpern (7D8 0,1 – 10 µg/ml) vorinkubiert. Als Kontrollen dienten Isotypen-kontrollierte Maus-IgGs (IgHc 10 µg/ml) oder Puffer. Nach der Vorinkubationszeit wurden die Neutrophilen mit fMLP (1 µM) für 10 Minuten stimuliert. Die Superoxid-Generation ist als Prozent der Pufferinkubierten (und fMLP-stimulierten) Zellen ausgedrückt. Die Daten sind angezeigt als Mittelwert \pm SEM (n = 4). Die markierten Werte (*) zeigen eine signifikante Änderung gegenüber der Pufferkontrolle ($p < 0,05$).

3.5 F(ab)₂-Fragmente des Anti-NB1-Antikörpers sind wirksam zum „Priming“ der fMLP-induzierten Neutrophilen-Stimulation

Der F(ab)₂-Teil des Anti-NB1-Antikörpers wurde durch Verdauung mit Pepsin hergestellt und die erhaltene Bindungsfähigkeit durch Durchflusszytometrie gemessen. Verglichen mit dem kompletten Anti-NB1-Antikörper zeigte die Vorinkubation der Neutrophilen mit Anti-NB1-F(ab)₂-Fragmenten eine etwas geringere, jedoch immer noch signifikante verstärkende fMLP-induzierte Sauerstoffradikalen-Freisetzung (Abbildung 9). Wie erwartet zeigte die Kontrolle mit F(ab)₂-Fragmenten von IgG keinen Anstieg des fMLP-induzierten *respiratorischen Burst*.

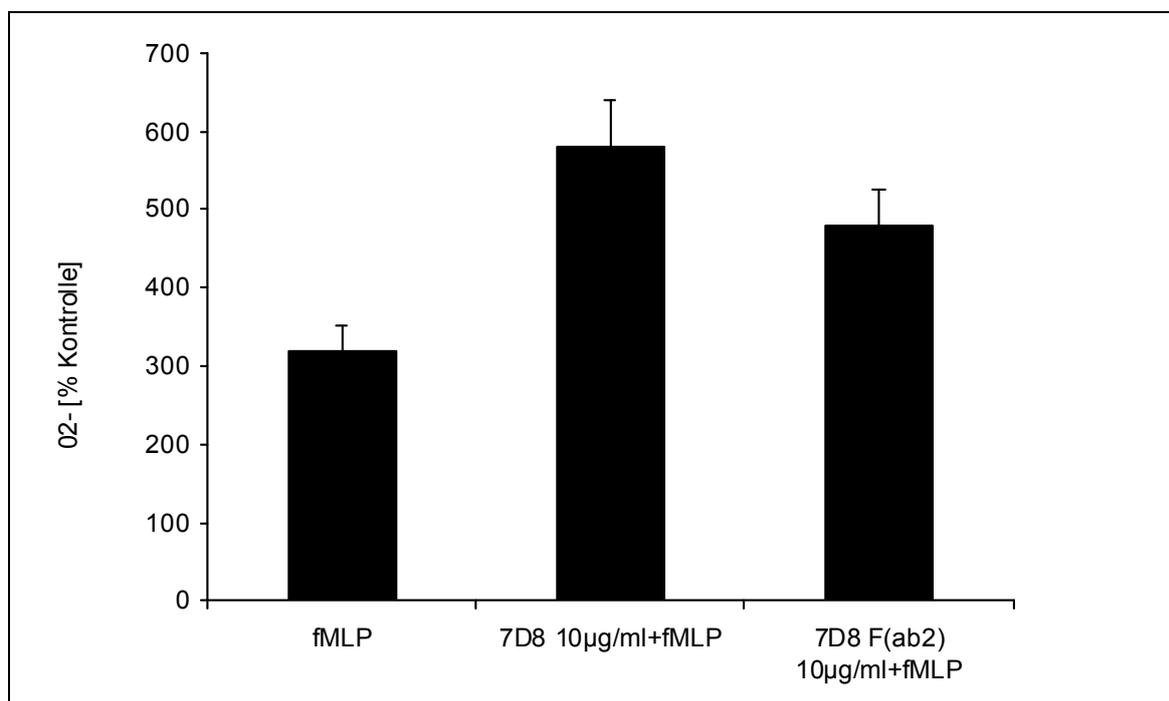


Abbildung 9: Effekt von F(ab)₂-Fragmenten des Anti-NB1-Antikörpers auf das Priming vor fMLP-induzierter Sauerstoffradikalen-Freisetzung

Neutrophile ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden mit murinen monoklonalen Anti-NB1-Antikörpern (7D8, 10µg/ml), F(AB₂)-Fragmenten von diesen Anti-NB1-Antikörpern (10 µg/ml), CD16-Antikörpern (10 µg/ml, 15 Minuten vor NB1), CD32-Antikörpern (10 µg/ml, 15 Minuten vor NB1) oder Puffer für 60 Minuten vorinkubiert. Dann wurden diese Zellen mit fMLP (1µM) für 10 Minuten stimuliert und die Superoxid-Generation analysiert. Die O₂⁻-Generation ist ausgedrückt als Prozent der nicht fMLP-stimulierten Zellen. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM (n= 4). Die markierten Werte (*) zeigen eine signifikante Änderung gegenüber den Kontrollen ($p < 0,05$).

3.6 Der Anti-NB1-Ak induzierte *priming*-Effekt ist spezifisch für fMLP

Die Anti-NB1-Ak-induzierte Verstärkung der inflammatorischen Reaktion der Neutrophilen war spezifisch für eine Stimulation mit fMLP. Nach optimierter Vorinkubation mit Anti-NB1-Antikörpern wurden andere Stimulantien für die Neutrophilen gewählt. Eine 60-minütige Vorinkubation mit Anti-NB1-Antikörpern zeigte keine Verstärkung der Neutrophilen-Antwort durch darauf folgende Stimulation mit PAF (5 μ M) oder dem Kalzium-Ionophor-A23187 (1 μ M).

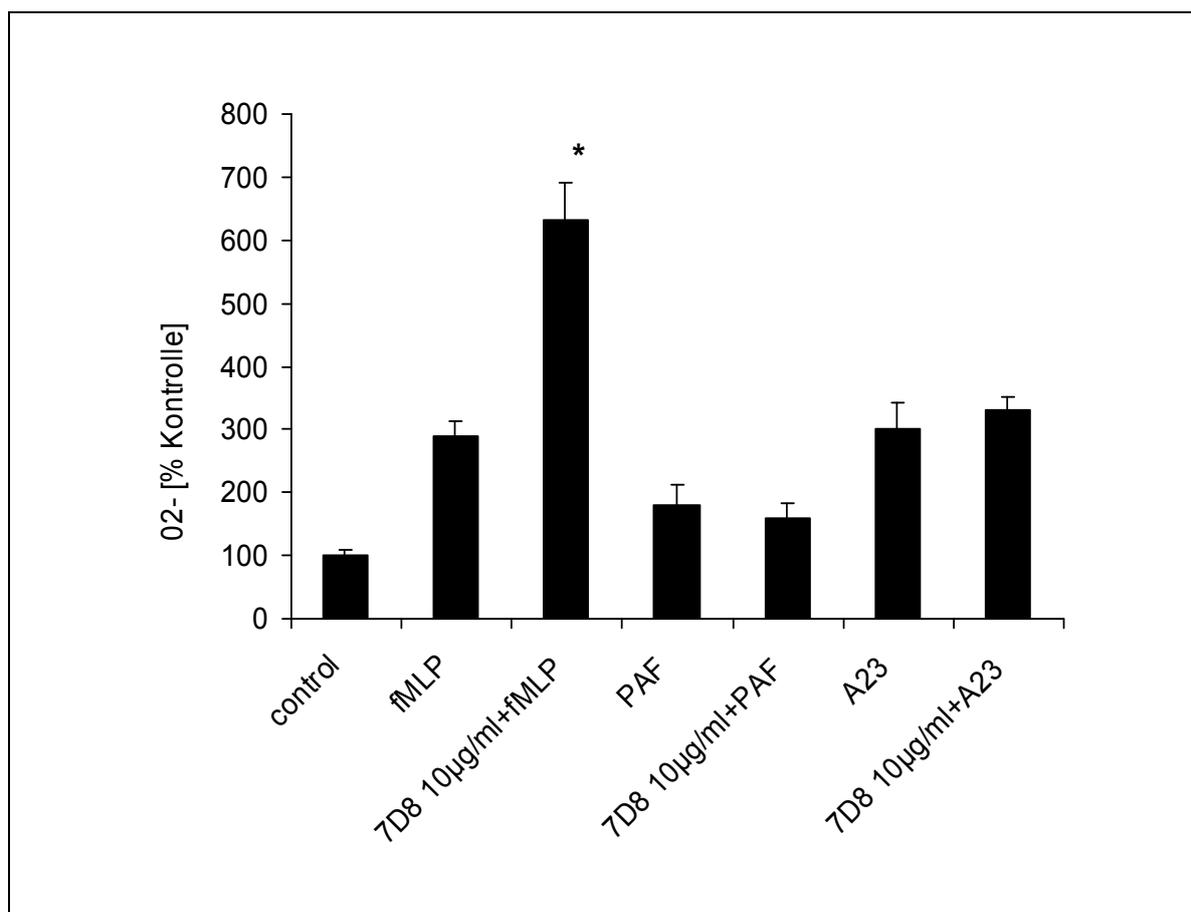


Abbildung 10: Effekt von Anti-NB1-Antikörpern auf die Neutrophilen-Aktivierung mit anderen Agonisten als fMLP

Neutrophile (5×10^6 /ml) wurden mit murinen monoklonalen Anti-NB1-Antikörpern (7D8, 10 μ g/ml) oder Puffer für 60 Minuten vorbehandelt und anschließend mit fMLP (1 μ M), PAF (5 μ M) oder A23187 (1 μ M) stimuliert. Nach zehn Minuten wurde im Überstand der Zellen die Sauerstoffradikalen-Freisetzung gemessen. Die Sauerstoffradikalen-Freisetzung ist gezeigt als Prozent der Pufferkontrollen bei unstimulierten Zellen. Die Daten sind angezeigt als Mittelwert \pm SEM (n=3). Markierte Werte (*) unterscheiden sich signifikant von Kontrollen ($p < 0,05$).

3.7 Anti-NB1-Antikörper *primen* nicht die Degranulation oder Leukotrien-Formation in neutrophilen Granulozyten

Der im *respiratorischen Burst* gesehene *Priming*-Effekt der NB1-Antikörper sollte bei anderen Leukozytenfunktionen ebenfalls gezeigt werden. Die Aktivierung der Elastase-Degranulation und die Leukotrien-Generation wurden nicht durch eine Vorinkubation mit Anti-NB1-Antikörpern verstärkt, was in den Abbildungen 11 und 12 dargestellt ist. Hierfür wurden Neutrophile mit murinen monoklonalen NB-1-Antikörpern für 30 Sekunden bis 60 Minuten vorinkubiert und anschließend mit fMLP stimuliert. Nach Abstoppen der Reaktion (10 Minuten Reaktionszeit) wurde der Überstand gewonnen, um darin die Elastase-Aktivität zu messen. Aus anderen Versuchen wurde im Überstand die Konzentration der Leukotriene bestimmt.

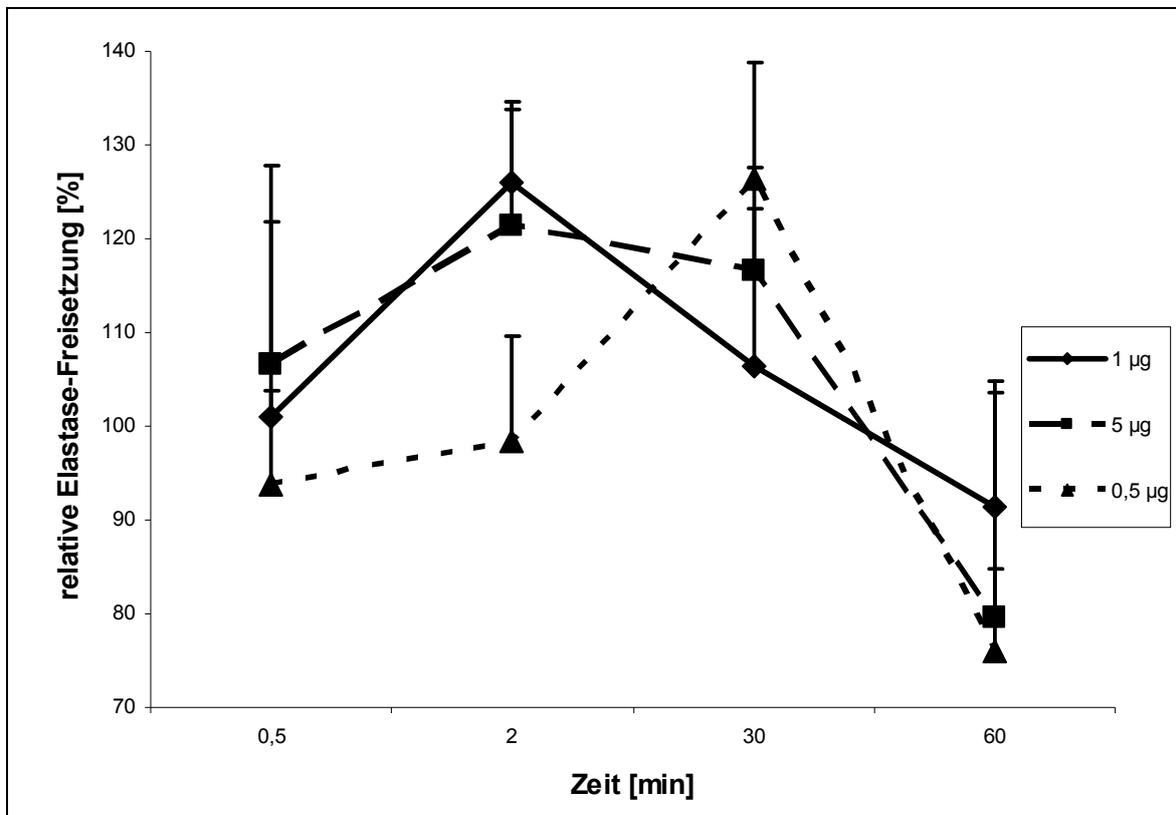


Abbildung 11: Zeiteinfluss auf den Primingeffekt von NB1 in verschiedenen Konzentrationen auf die fMLP abhängige Elastase-Freisetzung

Neutrophile ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden mit murinen monoklonalen Anti-NB1-Antikörpern (7D8, 0,5 µg/ml fein gestrichelt; 1 µg/ml grob gestrichelt; 5 µg/ml durchgezogene Linie) oder Puffer für 0,5, 2, 30 und 60 Minuten vorbehandelt und anschließend mit fMLP stimuliert (1µM). Nach zehn Minuten wurde im Überstand der Zellen die Elastase-Aktivität gemessen. Die Elastase-Aktivität ist dargestellt als Prozent der mit Puffer vorinkubierten und dann mit fMLP stimulierten Zellen. Die Daten sind angezeigt als Mittelwert +/- SEM (n=3). Keine Signifikanz.

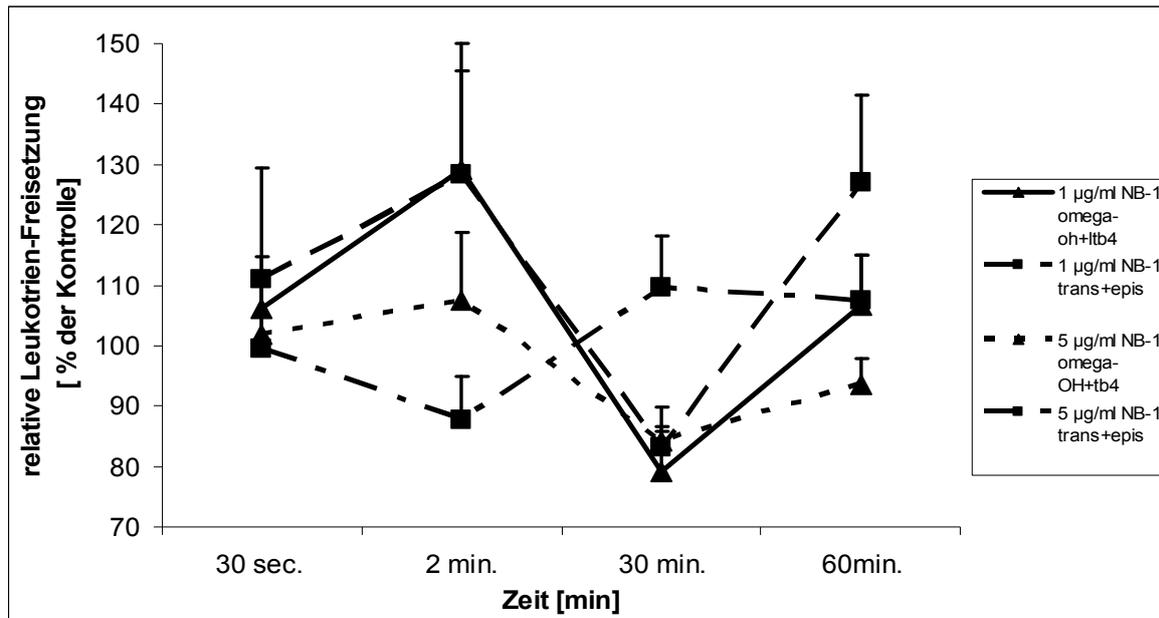


Abbildung 12: Zeitabhängigkeit des priming-Effekts von NB-1 auf den Leukotrienrelease durch fMLP

Neutrophile ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden mit murinen monoklonalen Anti-NB1-Antikörpern (7D8, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) oder Puffer für 30 Sekunden bis 60 Minuten vorinkubiert und anschließend mit fMLP ($1 \mu\text{M}$) stimuliert. Nach zehn Minuten wurde der Überstand der Zellen zur Leukotrien-Messung entnommen. Die Leukotrien-Konzentration ist dargestellt als Prozent der Pufferkontrollen bei unstimulierten Zellen. Die Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm SEM ($n=3$). Keine Signifikanz.

3.8 fMLP-Rezeptoren-Dichte bleibt unbeeinflusst von Anti-NB-1-

Inkubation

Die Spezifität des Priming-Effekts für fMLP als Stimulus konnte beschrieben werden. Aus diesem Grund untersuchten wir den Effekt einer Inkubation von neutrophilen Granulozyten auf die Expression des fMLP-Rezeptors auf der PMN-Oberfläche. Hierzu wurden Neutrophile 60 Minuten mit Anti-NB1-Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die Expression des fMLP-Rezeptors auf den neutrophilen Granulozyten mittels FACS-Analyse quantifiziert.

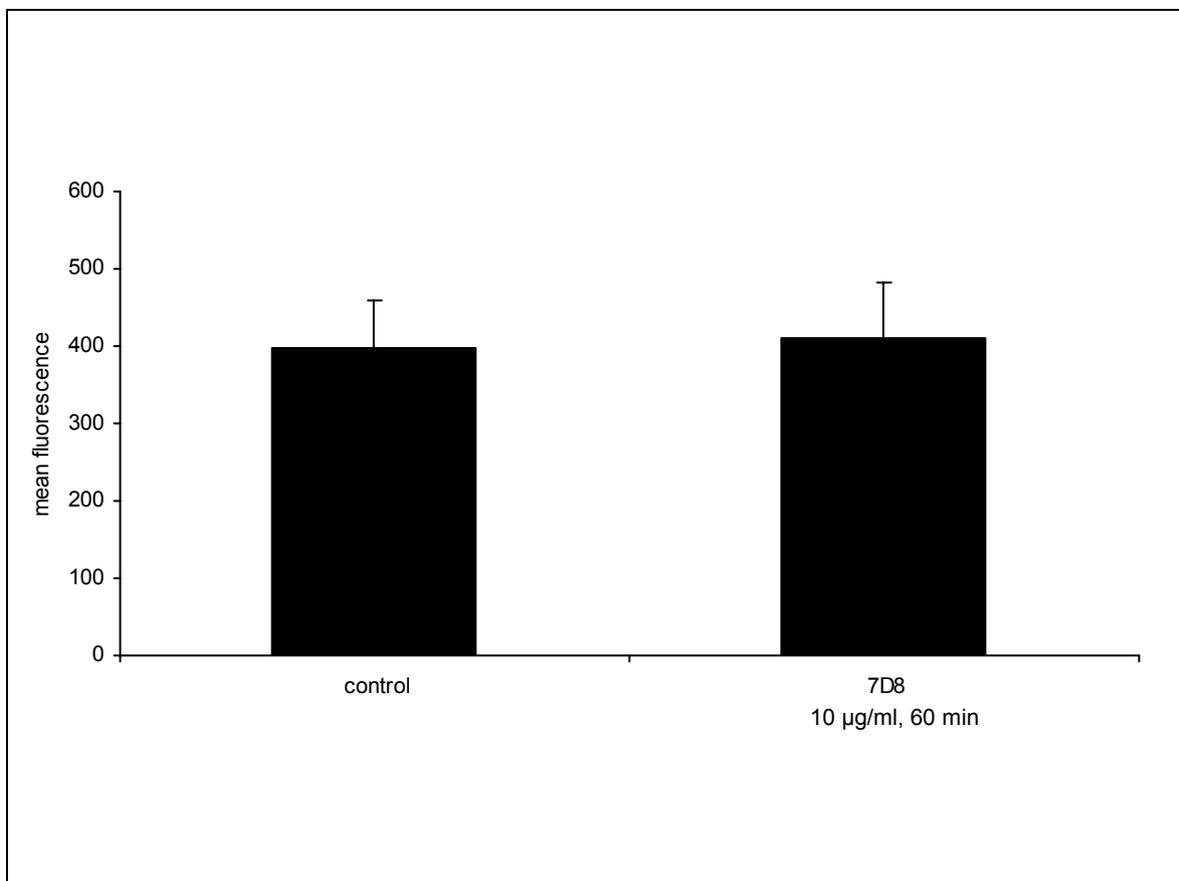


Abb.13: Einfluß der Anti-NB1-Inkubation auf die Dichte des fMLP-Rezeptors auf der PMN-Oberfläche.

Neutrophile ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden mit murinen monoklonalen Anti-NB1-Antikörpern (7D8, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) oder Puffer für 60 Minuten inkubiert. Die fMLP-Rezeptor-Oberflächen-Expression wurde mittels FACS-Analyse gemessen. Die fMLP-Rezeptor-Expression ist dargestellt als Prozent der Pufferkontrolle. Die Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm SEM ($n=7$). Keine Signifikanz.

4 Diskussion

4.1 Grundlagen

Das TRALI-Syndrom steht an der Spitze der aktuellen internationalen Statistiken für tödliche Transfusionsreaktionen, was die Wichtigkeit dieses Krankheitsbildes unterstreicht {Holness, 2004, Leach, 1998}.

Eine Rationale für die Durchführung der *Priming*-Experimente war der zuvor gelungene Nachweis, dass andere Granulozytäre Antikörper ein Priming durch die Vorinkubation und spätere Stimulation mit einem sekundären Stimulus bewirken. Hattar et. al beschrieben, dass eine geringe Konzentration von Anti-PR3-Antikörpern eine Sensibilisierung von Neutrophilen bewirkt {Hattar, 2001}. In der Arbeit von Sachs et al. konnte an der isolierten Rattenlunge durch ca. einstündige Vorbehandlung mit dem Neutrophilen-spezifischen Antikörper NB-1 der fMLP induzierte Lungenschaden vervielfacht werden {Sachs, 2006}. Generell ist der Mechanismus des Primings der Leukozytenfunktion seit langem bekannt {Swain, 2002}.

Diese Arbeit befasst sich mit dem Priming-Effekt des humanen Neutrophilen Antigen 2a (=NB-1) auf die neutrophilen Granulozyten. Wir führten die Experimente in der Art durch, dass wir zuerst für mindestens 30 Minuten mit einem nicht stimulierenden Agens (Anti-NB-1-Antikörper) vorinkubierten und danach mit verschiedenen bekannten Stimuli die Neutrophilen aktivierten.

4.2 NB-1 positive Granulozyten

Vor den Untersuchungen zur Neutrophilen-Inflammation wurden die neutrophilen Granulozyten der Spender auf ihren Anteil an NB-1 positiven Zellen untersucht. 12,5 % (4/30) der gesunden Spender hatten einen Anteil von weniger als ein Prozent NB-1 positiver Neutrophilen. Dieses Ergebnis stimmt mit den Werten aus der Literatur überein {Clay, 1994}.

4.3 Direkte Stimulation

Unsere Ergebnisse zeigen, dass unterschiedliche Konzentrationen an murinen monoklonalen Anti-NB-1-Antikörpern keine direkte Stimulation der neutrophilen Granulozyten,

gemessen als respiratorischer Burst, verursachen. Auch eine Injektion von GM-CSF vor Blutabnahme, was zu einer deutlichen Erhöhung des Anteils an NB-1 positiven Neutrophilen führte, konnte keine Stimulation der Neutrophilen durch NB1-Antikörper bewirken. Bux et al. konnten bereits 1993 zeigen, dass NB-1-Antikörper enthaltende humane Sera eine Verringerung der Superoxid-Anionen-Produktion wie auch eine reduzierte Phagozytose auslösen {Bux, 1993}. Allerdings steht unser Ergebnis im Gegensatz zu den Beobachtungen von Sachs et al. Sie fügten dem Perfusat von isolierten Rattenlungen Neutrophile von Spendern hinzu, die mehr als 70 % NB-1 positive Neutrophile besaßen. Nach Zugabe von Anti-NB1-Antikörpern zum Perfusat sahen sie eine erhebliche Zunahme des Lungengewichts und des kapillären Filtrations-Koeffizienten, was als TRALI interpretiert wird {Sachs, 2006}. Diese Diskrepanz mag dadurch erklärbar sein, dass die isolierte Lunge den Neutrophilen Möglichkeit zur Endothel-Zell-Interaktion bietet. Diese Möglichkeit zur Adhäsion (und Aktivierung) der Neutrophilen ist in unserem Modell nicht gegeben. Außerdem haben Sachs et al. sich mit mehr als 70 % auf Neutrophile von hochexprimierenden Spendern beschränkt, wir nahmen auch Neutrophile von Spendern bis herab zu 40 % positiven Neutrophilen. Des Weiteren erfassten Sachs et al. in ihrem Modell der isoliert perfundierten Lunge das Lungenödem als Zunahme des Gewichts und des kapillären Filtrations-Koeffizienten {Sachs, 2006}. Eventuell konnten wir mit unserer Methode der Neutrophilen-Funktionsparameter die Entwicklung eines Ödems nicht erfassen.

4.4. NB-1 Vorinkubation „primt“ die Neutrophilen Reaktion durch spezifische Stimuli

Nachdem wir gezeigt hatten, dass auch die monoklonalen Anti-NB-1-Antikörper keine direkt stimulierende Wirkung auf die Spender-Granulozyteninflammation hatten, begannen wir mit den *Priming*-Experimenten. Zuerst wurden in Zeitreihen und Konzentrationsreihen die optimalen Vorinkubations-Bedingungen gefunden. Anschließend zeigten wir, dass die Vorinkubation mit NB-1-Antikörpern die Sauerstoff-Radikalen-Freisetzung nach Stimulation mit fMLP auf den mehr als dreifachen Wert steigerte. Dieser durch Steigerung des respiratorischen burst bewirkte Priming-Effekt ist der am häufigsten beschriebene. Die Steigerung des respiratorischen burst durch Vorinkubation wird sogar oft als eigentlicher Beweis angesehen, dass eine Substanz die Fähigkeit zum Primen besitzt {Swain, 2002}.

Viele endogene und exogene Substanzen wurden als mögliche *Priming*-Moleküle identifiziert, so auch die klassischen Neutrophilen primenden Substanzen LPS und TNF-alpha {Doerfler, 1989, Steinbeck, 1989}, aber auch, wie oben beschrieben, Anti-PR3-Antikörper {Hattar, 2001}. Interessanterweise zeigt die Reaktion auf eine Anti-NB1-Antikörper-Sensibilisierung von Neutrophilen Ähnlichkeiten und Unterschiede zu jedem der Obengenannten. Die Anti-NB1-Antikörper induzieren eine Sensibilisierung von Neutrophilen, die nur auf fMLP beschränkt ist, wohingegen der Effekt von PAF und A23187 nicht verstärkt wird.

Die Selektivität für dieses chemotaktische Peptid ist ein Phänomen, das zuerst für Anti-PR3-Antikörper beschrieben wurde {Hattar, 2001}.

4.5 Mechanismus des Primings

Der molekulare Mechanismus, dem die NB1-abhängige Sensibilisierung der humanen Neutrophilen-Granulozyten auf die fMLP-Stimulation unterliegt, ist unklar. Sowohl ein intakter NB1-Antikörper, als auch das F(ab)₂-Fragment des NB-1-Antikörpers sensibilisiert die Neutrophilen – jeweils in unterschiedlicher Stärke. Dies zeigt, dass ein *bridging* von den Antikörpern nicht Grundvoraussetzung für das *Priming* ist. Bridging bezeichnet das gleichzeitige Binden des Antigens an den Fc-gamma-Rezeptor durch das korrespondierende Antikörper-Fragment.

Die Notwendigkeit für das *Antigen-cross-linking* wird für die Anti-PR3-induzierte Sensibilisierung von Neutrophilen auf fMLP beschrieben. Dort sind die Involvierung von sowohl PR3- als auch Fc-gamma-Rezeptoren eine Voraussetzung für die komplette Neutrophilen-Aktivierung {Hattar, 2001, Kettritz, 1997}.

Das NB1-Antigen (CD177) ist ein 56 – 62 kDA Glykoprotein, das Glykosyl-phosphatidylinositol (GPI)-gebunden ist. Aktuelle Studien haben Homologien zu dem Ly-6(uPAR)-Rezeptor gezeigt, daher gehört NB1 zu der Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor/CD59/Ly-sanke-Toxin-Superfamilie {Pluskota, 2003, Sitrin, 2001, Skubitz, 1991}. Im Menschen sind das Komplement-Protektin CD59 und der Urokinase Plasminogen Aktivator Rezeptor (CD87, uPAR) sehr intensiv studiert worden. Die extrazelluläre Region von CD59 und CD87 bestehen aus einem bzw. drei Ly-6-Domänen {Davies, 1989}. CD59 schützt Zellen vor der autologen Lyse durch die Verhinderung der Bildung des Membranangriffskomplexes {Ninomiya, 1992}. Bei Granulozyten ist uPAR auf der Plasmamembran und in spezifischen Granula und sekretorischen Vesikeln lokalisiert und spielt eine ent-

scheidende Rolle bei der Zelladhäsion {Plesner, 1997}. Zusätzlich werden Neutrophile voraktiviert durch die Bindung eines Liganden an uPAR. Dieses *Priming* führt zur intensiveren Produktion von Superoxid nach Neutrophilenstimulation. Des Weiteren wird durch dieses *Priming* die Expression von uPAR erhöht {Plesner, 1997}. Hinzu kommt, dass uPAR einen Komplex mit CD11B/18 bildet {Pluskota, 2003}. Es konnte gezeigt werden, dass *cross-linking* von uPAR eine Mobilisierung von intrazellulärem Calcium aktiviert {Sitrin, 2001}. Diese Beobachtungen führen zu der Überlegung, ob die Bindung von NB1-Antikörpern an die entsprechenden Antigene zu einer ähnlichen Signalkaskade führt.

Ein weiterer Ansatz ist durch die Beobachtung gegeben, dass das NB1-*Priming* für die Stimulation mit fMLP spezifisch ist. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Neutrophilen nach NB1-Vorinkubation die Gesamtzahl der Formyl-Peptid-Rezeptoren steigert. Allerdings zeigen FACS-Untersuchungen, dass die NB1-Vorinkubation keine Steigerung der FITC-gelabelten fMLP hervorruft. Die Affinität für N-formylierte Peptide wird durch NB1-Vorinkubation gesteigert. Der Neutrophilen-fMLP-Rezeptor existiert in zwei Affinitätszuständen, welche dynamisch geregelt sind {Koo, 1982, Mackin, 1982}. Verschiedenste Agonisten können den Affinitätsstatus der Neutrophilen für N-formylierte Peptide *in vitro* ändern {Koo, 1983, Yuli, 1982}. Allerdings können die Änderungen der Affinität des Formyl-Peptid-Rezeptors nicht durch konventionelle Durchflusszytometrie gemessen werden.

Ein alternativer Ansatzpunkt ist, dass der Signaltransduktionsweg auf Post-Rezeptor-Ebene durch das Anti-NB1-*Priming* verändert wird, und so der Neutrophilen *respiratory Burst* verstärkt wird {Thelen, 1993}. Da das *Priming* durch Anti-NB1-Antikörper ein langwirkender Effekt mit einem Plateau nach 30 Minuten und einer Dauer von länger als 60 Minuten ist, kann die Induktion der NADPH-Oxidase als möglicher Mechanismus angenommen werden. Alternativ kann auch die Proteinkinase C, die bei Anti-PR3-Antikörpern induziert wird, als Mechanismus in Frage kommen {Radford, 1999}.

4.6 Pathophysiologie des TRALI

Bei den bisher aufgestellten Modellen zur Pathophysiologie unterscheidet man ein immunvermitteltes von einem nicht immunvermitteltem Modell.

Bei dem immunvermittelten Modell werden als ursächliche Faktoren im Wesentlichen die Spender-Antikörper, die gegen die Antigene auf den Empfänger-Neutrophilen gerichtet

sind in den Mittelpunkt gestellt {Popovsky, 1985}. Die Empfänger-Neutrophilen werden wahrscheinlich nach Antikörper-Antigen-Bindung aktiviert und führen so zum TRALI. Aber auch nach Transfusion inkompatibler Blutprodukte entwickelt sich nicht immer ein TRALI.

Die Hauptzahl der TRALI-Reaktionen entwickeln sich im Intensivstations- oder Operationssaal-Umfeld {Kopko, 2004, Popovsky, 1992}. Dies zeigt, dass höchstwahrscheinlich ein prädisponierender Status des Patienten essentiell für die Entwicklung des Lungenversagens nach Transfusion ist. Daher wurde als zweites Modell eine "two-hit-hypothese" entwickelt: Eine Infektion oder eine fortgeschrittene chronische Erkrankung kann den first-hit darstellen, wohingegen die Transfusion von einem Blutprodukt den *second hit* darstellt {Silliman, 2003, Silliman, 1997, Silliman, 1998}. Bei dieser "two-hit-hypothese" wird davon ausgegangen, dass das auslösende Agens nicht immunologisch agiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können weder das immun-vermittelte noch das nicht-immun-vermittelte Modell voll unterstützen. Vielmehr können wir ein drittes Modell entwickeln, das auch Sachs in seiner Arbeit unterstützt {Sachs, 2006}: Wir können durch unsere Ergebnisse zeigen, dass eine Vorinkubation mit dem Neutrophilen-spezifischen Antikörper NB-1 die Neutrophilen nicht direkt aktiviert. Aber diese Vorinkubation führt zu einer Verstärkung der Neutrophilen-Reaktion auf eine spätere Stimulation mit dem chemotaktischen Oligopeptid fMLP. Wir konnten die Verstärkung der Produktion der aggressiven Sauerstoff-Radikalen beweisen.

Übertragen auf die pathophysiologischen Vorstellungen des TRALI bei NB-1 positivem Spender können wir somit folgendes Modell skizzieren: Ein NB-1 Antikörper enthaltendes Blutprodukt wird dem Patienten transfundiert. Die Anti-NB-1-Antikörper binden an die NB-1-Antigene der Neutrophilen des Empfängers. Die gebundenen Neutrophilen werden dadurch in einen vor-aktivierten Zustand versetzt / „geprimt“. Dann führt z. B. ein bakterieller Infekt zu der vollständigen Aktivierung der Neutrophilen Granulozyten. Durch das vorherige *Priming* fällt die Reaktion der Neutrophilen jedoch wesentlich verheerender aus. Die von uns abgeleiteten Mechanismen sind in dem folgendem Modell veranschaulicht:

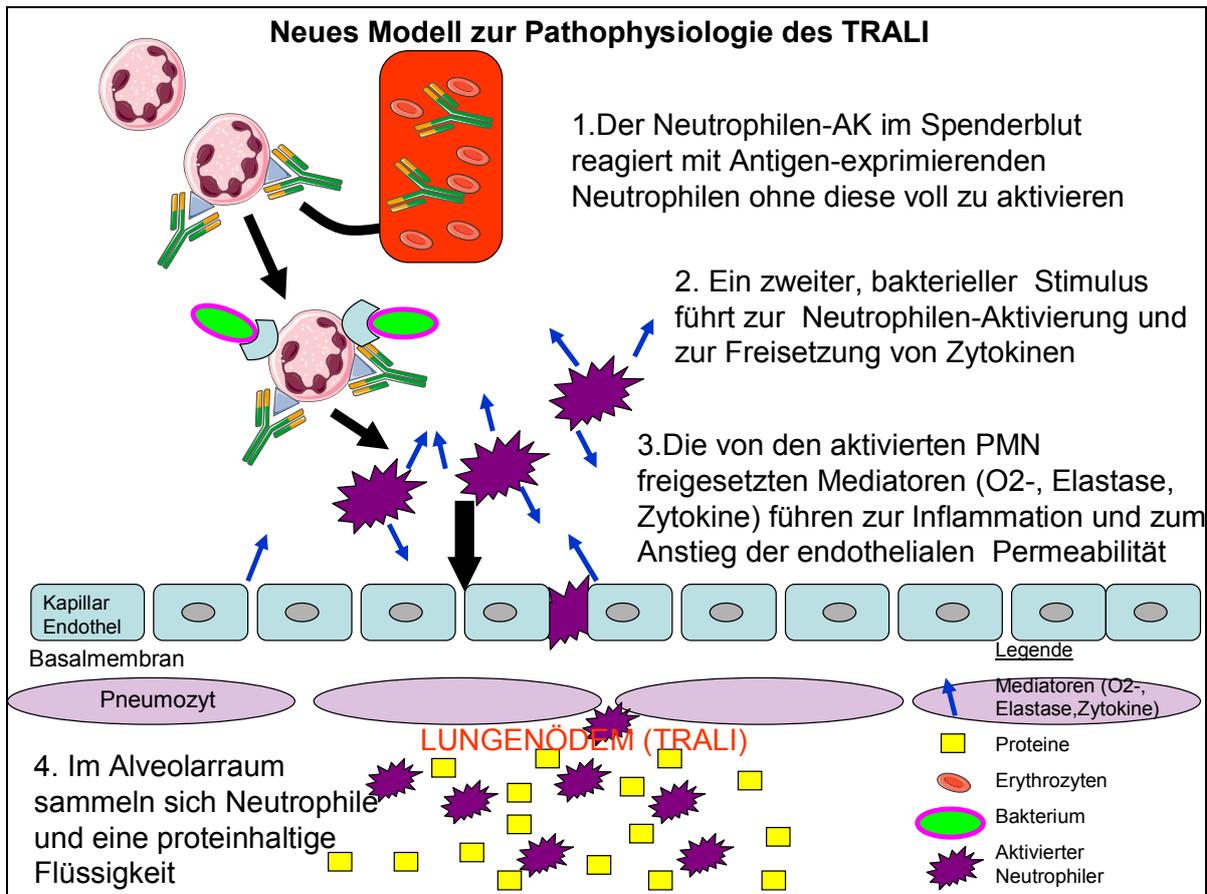


Abbildung 14 neu entwickeltes Modell zur Pathophysiologie des TRALI

4.7 Ausblick

Ein tiefer gehendes pathophysiologisches Verständnis des TRALI hilft uns, über mögliche präventive oder therapeutische Maßnahmen nachzudenken {Bux, 2005, Sachs, 2008}. Was führt zu einem erhöhten Risiko der Entwicklung eines TRALI? Was ist präventiv möglich und sinnvoll {Bierling, 2009}?

Weitere interessante Ansätze für das tiefere Verständnis des TRALI sind auf molekularbiologischer Seite bestimmt die Entschlüsselung der intrazellulären Signalwege des Primings {Bux, 2001}.

Im Tierexperiment könnte man mögliche Therapien evaluieren, die der immunologischen Genese des Krankheitsbildes Rechnung tragen {Sachs, 2006}.

Dies alles kann zu einem noch umfassenderen Verständnis des TRALI führen. In der Konsequenz sollte der Brückenschlag der Grundlagenforschung zum klinischen Alltag gelingen. Dann kann durch das intensivere Verständnis des TRALI den Patienten weltweit eine bessere klinische Versorgung zur Verfügung stehen.

5 Zusammenfassung

Das Transfusions-assoziierte Lungenversagen (TRALI) steht weltweit an der Spitze der Statistiken für tödliche Transfusionsreaktionen. Ursächlich sind im wesentlichen Spenderantikörper, die gegen Antigene auf den Empfänger-Neutrophilen reagieren. Etliche dieser Antigene sind bekannt und werden als humane Neutrophilen-Antigene (HNA) bezeichnet. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss des HNA-2a (= NB-1) auf das TRALI. Dazu wurden Neutrophile Granulozyten aus gesunden Spendern täglich frisch isoliert und verschiedenen Stimuli mit und ohne Zugabe von anti NB-1 Antikörpern zugeführt. Bei einigen Neutrophilen Antworten (Elastase-Freisetzung, respiratorischer Burst, Leukotrien-Abgabe) konnte gezeigt werden, dass eine reine NB-1 Inkubation nicht zur Stimulation der Neutrophilen Granulozyten führt. Eine Vorinkubation der Neutrophilen mit anti-NB-1 Antikörpern vor der Stimulation mit dem bekannten Neutrophilen-Stimuli fMLP erzeugte bemerkenswerter Weise eine stark erhöhte Antwort der Neutrophilen im Vergleich zur Puffer-Vorinkubation. Dieser Effekt war fMLP-spezifisch. Auch zeigte sich der *Priming*-Effekt nur bei der Freisetzung der Sauerstoffradikalen und konnte nicht bei der Elastase-Freisetzung oder der Leukotrien-Antwort gezeigt werden. Diese Ergebnisse können auf die pathophysiologischen Modelle des TRALI übertragen werden, passen jedoch nicht voll auf eines der beiden klassischen Modelle des TRALI. Eine Transfusion eines Blutprodukts mit NB-1-Antikörpern führt zur Bindung dieser Antikörper an die entsprechenden Antigene der Leukozyten des Empfängers. Diese Anti-NB-1-Bindung an NB-1 positive Neutrophile führt nicht zu einer vollständigen Aktivierung, sondern verstärkt die anschließende Reaktion der Neutrophilen auf eine spätere Leukozyten-Stimulation. Dieses Modell zur Pathophysiologie ist neu und trägt zum Verständnis der Erkrankung bei.

6 Summary

Transfusion associated acute lung injury (TRALI) is one of the worlds leading causes of Transfusion reaction related deaths. Antibodies of the blood donors directed against surface antigens on the patients neutrophils have been proven causative. These antigens have been clustered and are named according to the human neutrophil antigen (HNA) nomenclature. This thesis focused on the impact of HNA-2a (=NB-1) on TRALI. For this, human neutrophils from healthy donors have been freshly isolated daily. These freshly isolated neutrophils were then stimulated with and without prior anti NB-1 antibody incubation. The different read-outs included elastase-release, respiratory burst, and leukotrien release were not induced by stimulation of NB-1 alone. A pre-incubation of the neutrophils with anti-NB-1 antibodies before stimulation with fMLP resulted in an steep increase in respiratory burst compared with buffer-pre-incubation. This priming effect was fMLP specific and was not observed in elastase-release or leukotrien-release. The two classical models do not fit completely with our findings, so we can postulate a new pathophysiological model for TRALI. A blood compound containing anti-NB-1-antibodies is transfused to a patient. These anti-NB-1-Antibodies bind to the antigens on the neutrophils of the recipient, priming these neutrophils, without completely activating them. This priming leads to an increased reaction of the neutrophil in response to later stimulation of the, e.g. by a bacterial infection and thereby leading to lung edema and TRALI. This pathophysiological model is new and is enhancing the understanding of TRALI.

7 Abkürzungen

5-LO	5-Lipoxygenase
aqua dest.	Aqua destillata
ARDS	akutes Lungenversagen, acute respiratory distress syndrome
BSA	bovines Serum-Albumin
COOH	Carboxyl-Gruppe
DMSO	Dimethylsulfoxyd
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHN	European Haemovigilance Network
F(AB2)	Antigen bindendes Fragment
FACS	fluorescens activated cell sorting
fMLP	N-Formyl-L-Methyl-L-Leucyl-L-Phenylalanin
g	Gravitationskonstante
G-CSF	Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
GPI	Glykosyl-phosphatidyl-Inositol
HETE	Hydroperoxy-6,8,11,14-eicosatetraencarbonsäure
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HNA	humane neutrophile Alloantigene
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Ig	Immunglobulin (z.B. IgG)
IL	Interleukin (z.B. IL-1)
kDa	Kilo Dalton
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotrien (z.B. LT-A4, LT-B4)
µg	Mikrogramm
µM	mikromolar
ml	Milliliter
n	Anzahl der Versuche
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid

- Abkürzungen -

NAPDH	Nicotinamidadenindinukleotidhydrogenphosphat
NB-1	Neutrophilen Antikörper B1
NDGA	Nordihydroguaretic acid
NHLBI	National Heart, Lung, and Blood Institute
O ₂	molekularer Sauerstoff (Dioxygen)
OH	Hydroxy-Gruppe
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PBS-/-	Phosphate buffered Saline (sine Calcium et Magnesium)
pH	potentia hydrogenii
PMN	Polymorphkerniger Neutrophiler Granulozyt
PR3	Proteinase 3
PVA	Polyvinylalkohol
Tris-HCL	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid
SEM	standard error of mean
SOD	Superoxidedismutase
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRALI	Transfusions assoziiertes akutes Lungenversagen
uPAR	urokinase plasminogen activator - receptor
UV	ultra-violett
W	Watt

8 Bibliographie

- Abo, A, Pick, E, Hall, A, Totty, N, Teahan, CG, Segal, AW.** Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature*. 1991;353(6345):668-670.
- Almkvist, J, Falddt, J, Dahlgren, C, Leffler, H, Karlsson, A.** Lipopolysaccharide-induced gelatinase granule mobilization primes neutrophils for activation by galectin-3 and formylmethionyl-Leu-Phe. *Infect Immun*. 2001;69(2):832-837.
- Ashbaugh, DG, Bigelow, DB, Petty, TL, Levine, BE.** Acute respiratory distress in adults. *Lancet*. 1967;2(7511):319-323.
- Barnard, RD.** Indiscriminate transfusion: a critique of case reports illustrating hypersensitivity reactions. *N Y State J Med*. 1951;51(20):2399-2402.
- Bierling, P, Bux, J, Curtis, B, Flesch, B, Fung, L, Lucas, G, Macek, M, Muniz-Diaz, E, Porcelijn, L, Reil, A, Sachs, U, Schuller, R, Tsuno, N, Uhrynowska, M, Urbaniak, S, Valentin, N, Wikman, A, Zupanska, B.** Recommendations of the ISBT Working Party on Granulocyte Immunobiology for leucocyte antibody screening in the investigation and prevention of antibody-mediated transfusion-related acute lung injury. *Vox Sang*. 2009;96(3):266-269.
- Bierling, P, Poulet, E, Fromont, P, Seror, T, Bracq, C, Duedari, N.** Neutrophil-specific antigen and gene frequencies in the French population. *Transfusion*. 1990;30(9):848-849.
- Bligh, EG, Dyer, WJ.** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959;37(8):911-917.
- Bokoch, GM.** Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood*. 1995;86(5):1649-1660.
- Boxer, LA, Axtell, R, Suchard, S.** The role of the neutrophil in inflammatory diseases of the lung. *Blood Cells*. 1990;16(1):25-40; discussion 41-22.
- Boyum, A.** Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol*. 1976;Suppl 5:9-15.
- Bux, J.** Molecular genetics of granulocyte polymorphisms. *Vox Sang*. 2000;78 Suppl 2:125-130.
- Bux, J.** Molecular nature of granulocyte antigens. *Transfus Clin Biol*. 2001;8(3):242-247.
- Bux, J.** Transfusion-related acute lung injury (TRALI): a serious adverse event of blood transfusion. *Vox Sang*. 2005;89(1):1-10.
- Bux, J, Becker, F, Seeger, W, Kilpatrick, D, Chapman, J, Waters, A.** Transfusion-related acute lung injury due to HLA-A2-specific antibodies in recipient and NB1-specific antibodies in donor blood. *Br J Haematol*. 1996;93(3):707-713.
- Bux, J, Dickmann, JO, Stockert, U, Mueller-Eckhardt, C.** Influence of granulocyte antibodies on granulocyte function. *Vox Sang*. 1993;64(4):220-225.
- Bylund, J, Karlsson, A, Boulay, F, Dahlgren, C.** Lipopolysaccharide-induced granule mobilization and priming of the neutrophil response to Helicobacter pylori peptide Hp(2-20), which activates formyl peptide receptor-like 1. *Infect Immun*. 2002;70(6):2908-2914.
- Campanelli, D, Detmers, PA, Nathan, CF, Gabay, JE.** Azurocidin and a homologous serine protease from neutrophils. Differential antimicrobial and proteolytic properties. *J Clin Invest*. 1990;85(3):904-915.

- Clay, MEaS, D. F.** Granulocyte Immunology. In: Ness, PaA, K., ed. *Scientific basis of transfusion medicine*. Philadelphia: Saunders; 1994:244-280.
- Cohen, HJ, Chovaniac, ME.** Superoxide generation by digitonin-stimulated guinea pig granulocytes. A basis for a continuous assay for monitoring superoxide production and for the study of the activation of the generating system. *J Clin Invest*. 1978;61(4):1081-1087.
- Condliffe, AM, Kitchen, E, Chilvers, ER.** Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. *Clin Sci (Lond)*. 1998;94(5):461-471.
- Curtis, BR, McFarland, JG.** Mechanisms of transfusion-related acute lung injury (TRALI): anti-leukocyte antibodies. *Crit Care Med*. 2006;34(5 Suppl):S118-123.
- Dana, R, Leto, TL, Malech, HL, Levy, R.** Essential requirement of cytosolic phospholipase A2 for activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem*. 1998;273(1):441-445.
- Davies, A, Simmons, DL, Hale, G, Harrison, RA, Tighe, H, Lachmann, PJ, Waldmann, H.** CD59, an LY-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. *J Exp Med*. 1989;170(3):637-654.
- Doerfler, ME, Danner, RL, Shelhamer, JH, Parrillo, JE.** Bacterial lipopolysaccharides prime human neutrophils for enhanced production of leukotriene B4. *J Clin Invest*. 1989;83(3):970-977.
- During, RL, Gibson, BG, Li, W, Bishai, EA, Sidhu, GS, Landry, J, Southwick, FS.** Anthrax lethal toxin paralyzes actin-based motility by blocking Hsp27 phosphorylation. *EMBO J*. 2007;26(9):2240-2250.
- Eastlund, DT, Douglas, MS, Choper, JZ.** Monocyte chemotaxis and chemotactic cytokine release after exposure to hydroxyethyl starch. *Transfusion*. 1992;32(9):855-860.
- Edens, HA, Parkos, CA.** Neutrophil transendothelial migration and alteration in vascular permeability: focus on neutrophil-derived azurocidin. *Curr Opin Hematol*. 2003;10(1):25-30.
- Engelfriet, CP, Reesink, HW, Brand, A, Palfi, M, Popovsky, MA, Martin-Vega, C, Ribera, A, Rouger, P, Goldman, M, Decary, F, Freedman, J, Lucas, G, Navarette, C, Neppert, J, von Witzleben-Schurholz, E, Lin, M, Zupanska, B.** Transfusion-related acute lung injury (TRALI). *Vox Sang*. 2001;81(4):269-283.
- Faurschou, M, Borregaard, N.** Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*. 2003;5(14):1317-1327.
- Fu, H, Bylund, J, Karlsson, A, Pellme, S, Dahlgren, C.** The mechanism for activation of the neutrophil NADPH-oxidase by the peptides formyl-Met-Leu-Phe and Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met differs from that for interleukin-8. *Immunology*. 2004;112(2):201-210.
- Gabig, TG, Crean, CD, Mantel, PL, Rosli, R.** Function of wild-type or mutant Rac2 and Rap1a GTPases in differentiated HL60 cell NADPH oxidase activation. *Blood*. 1995;85(3):804-811.
- Goldschmeding, R, van Dalen, CM, Faber, N, Calafat, J, Huizinga, TW, van der Schoot, CE, Clement, LT, von dem Borne, AE.** Further characterization of the NB 1 antigen as a variably expressed 56-62 kD GPI-linked glycoprotein of plasma membranes and specific granules of neutrophils. *Br J Haematol*. 1992;81(3):336-345.
- Guthrie, LA, McPhail, LC, Henson, PM, Johnston, RB, Jr.** Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial

- lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *J Exp Med*. 1984;160(6):1656-1671.
- Hallett, MB, Lloyds, D.** Neutrophil priming: the cellular signals that say 'amber' but not 'green'. *Immunol Today*. 1995;16(6):264-268.
- Hattar, K, Sibelius, U, Bickenbach, A, Csernok, E, Seeger, W, Grimminger, F.** Subthreshold concentrations of anti-proteinase 3 antibodies (c-ANCA) specifically prime human neutrophils for fMLP-induced leukotriene synthesis and chemotaxis. *J Leukoc Biol*. 2001;69(1):89-97.
- Holness, L, Knippen, MA, Simmons, L, Lachenbruch, PA.** Fatalities caused by TRALI. *Transfus Med Rev*. 2004;18(3):184-188.
- Hurley, BP, McCormick, BA.** Multiple roles of phospholipase A2 during lung infection and inflammation. *Infect Immun*. 2008;76(6):2259-2272.
- Jesaitis, AJ, Klotz, KN.** Cytoskeletal regulation of chemotactic receptors: molecular complexation of N-formyl peptide receptors with G proteins and actin. *Eur J Haematol*. 1993;51(5):288-293.
- Kettritz, R, Jennette, JC, Falk, RJ.** Crosslinking of ANCA-antigens stimulates superoxide release by human neutrophils. *J Am Soc Nephrol*. 1997;8(3):386-394.
- Kissel, K, Santoso, S, Hofmann, C, Stroncek, D, Bux, J.** Molecular basis of the neutrophil glycoprotein NB1 (CD177) involved in the pathogenesis of immune neutropenias and transfusion reactions. *Eur J Immunol*. 2001;31(5):1301-1309.
- Klebanoff, SJ.** Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*. 2005;77(5):598-625.
- Kleinman, S, Caulfield, T, Chan, P, Davenport, R, McFarland, J, McPhedran, S, Meade, M, Morrison, D, Pinsent, T, Robillard, P, Slinger, P.** Toward an understanding of transfusion-related acute lung injury: statement of a consensus panel. *Transfusion*. 2004;44(12):1774-1789.
- Knaus, UG, Heyworth, PG, Evans, T, Curnutte, JT, Bokoch, GM.** Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science*. 1991;254(5037):1512-1515.
- Koo, C, Lefkowitz, RJ, Snyderman, R.** The oligopeptide chemotactic factor receptor on human polymorphonuclear leukocyte membranes exists in two affinity states. *Biochem Biophys Res Commun*. 1982;106(2):442-449.
- Koo, C, Lefkowitz, RJ, Snyderman, R.** Guanine nucleotides modulate the binding affinity of the oligopeptide chemoattractant receptor on human polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest*. 1983;72(3):748-753.
- Kopko, PM.** Leukocyte antibodies and biologically active mediators in the pathogenesis of transfusion-related acute lung injury. *Curr Hematol Rep*. 2004;3(6):456-461.
- Kopko, PM, Popovsky, MA, MacKenzie, MR, Paglieroni, TG, Muto, KN, Holland, PV.** HLA class II antibodies in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion*. 2001;41(10):1244-1248.
- Kramps, JA, van Twisk, C, van der Linden, AC.** L-Pyroglutamyl-L-prolyl-L-valine-p-nitroanilide, a highly specific substrate for granulocyte elastase. *Scand J Clin Lab Invest*. 1983;43(5):427-432.
- Lalezari, P, Murphy, GB, Allen, FH, Jr.** NB1, a new neutrophil-specific antigen involved in the pathogenesis of neonatal neutropenia. *J Clin Invest*. 1971;50(5):1108-1115.
- Leach, M, Vora, AJ, Jones, DA, Lucas, G.** Transfusion-related acute lung injury (TRALI) following autologous stem cell transplant for relapsed acute myeloid

- leukaemia: a case report and review of the literature. *Transfus Med.* 1998;8(4):333-337.
- Leger, R, Palm, S, Wulf, H, Vosberg, A, Neppert, J.** Transfusion-related lung injury with leukopenic reaction caused by fresh frozen plasma containing anti-NB1. *Anesthesiology.* 1999;91(5):1529-1532.
- Levy, GJ, Shabot, MM, Hart, ME, Mya, WW, Goldfinger, D.** Transfusion-associated noncardiogenic pulmonary edema. Report of a case and a warning regarding treatment. *Transfusion.* 1986;26(3):278-281.
- Mackin, WM, Huang, CK, Becker, EL.** The formylpeptide chemotactic receptor on rabbit peritoneal neutrophils. I. Evidence for two binding sites with different affinities. *J Immunol.* 1982;129(4):1608-1611.
- Mathews, WR, Rokach, J, Murphy, RC.** Analysis of leukotrienes by high-pressure liquid chromatography. *Anal Biochem.* 1981;118(1):96-101.
- Matsuo, K, Lin, A, Procter, JL, Clement, L, Stroncek, D.** Variations in the expression of granulocyte antigen NB1. *Transfusion.* 2000;40(6):654-662.
- McCullough, J, Clay, M., Press, C. and Kline, W. *Granulocyte serology: a clinical laboratory guide.* ASCP Press, 1989.
- Menitove, JE.** Transfusion related acute lung injury (TRALI): a review. *Mo Med.* 2007;104(3):270-275.
- Moore, SB.** Transfusion-related acute lung injury (TRALI): clinical presentation, treatment, and prognosis. *Crit Care Med.* 2006;34(5 Suppl):S114-117.
- Moraes, TJ, Downey, GP.** Neutrophil cell signaling in infection: role of phosphatidylinositol 3-kinase. *Microbes Infect.* 2003;5(14):1293-1298.
- Murakami, H, Nakao, A, Kishimoto, W, Nakano, M, Takagi, H.** Detection of O₂- generation and neutrophil accumulation in rat lungs after acute necrotizing pancreatitis. *Surgery.* 1995;118(3):547-554.
- Nathan, C.** Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(3):173-182.
- Ninomiya, H, Sims, PJ.** The human complement regulatory protein CD59 binds to the alpha-chain of C8 and to the "b"domain of C9. *J Biol Chem.* 1992;267(19):13675-13680.
- Pereira, HA, Shafer, WM, Pohl, J, Martin, LE, Spitznagel, JK.** CAP37, a human neutrophil-derived chemotactic factor with monocyte specific activity. *J Clin Invest.* 1990;85(5):1468-1476.
- Plesner, T, Behrendt, N, Ploug, M.** Structure, function and expression on blood and bone marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR. *Stem Cells.* 1997;15(6):398-408.
- Pluskota, E, Soloviev, DA, Plow, EF.** Convergence of the adhesive and fibrinolytic systems: recognition of urokinase by integrin alpha Mbeta 2 as well as by the urokinase receptor regulates cell adhesion and migration. *Blood.* 2003;101(4):1582-1590.
- Popovsky, MA, Abel, MD, Moore, SB.** Transfusion-related acute lung injury associated with passive transfer of antileukocyte antibodies. *Am Rev Respir Dis.* 1983;128(1):185-189.
- Popovsky, MA, Chaplin, HC, Jr., Moore, SB.** Transfusion-related acute lung injury: a neglected, serious complication of hemotherapy. *Transfusion.* 1992;32(6):589-592.
- Popovsky, MA, Moore, SB.** Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion.* 1985;25(6):573-577.
- Puneet, P, Moochhala, S, Bhatia, M.** Chemokines in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;288(1):L3-15.

- Radford, DJ, Lord, JM, Savage, CO.** The activation of the neutrophil respiratory burst by anti-neutrophil cytoplasm autoantibody (ANCA) from patients with systemic vasculitis requires tyrosine kinases and protein kinase C activation. *Clin Exp Immunol.* 1999;118(1):171-179.
- Roos, D, van Bruggen, R, Meischl, C.** Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.* 2003;5(14):1307-1315.
- Sachs, UJ, Hattar, K, Weissmann, N, Bohle, RM, Weiss, T, Sibelius, U, Bux, J.** Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an ex vivo rat lung model. *Blood.* 2006;107(3):1217-1219.
- Sachs, UJ, Link, E, Hofmann, C, Wasel, W, Bein, G.** Screening of multiparous women to avoid transfusion-related acute lung injury: a single centre experience. *Transfus Med.* 2008;18(6):348-354.
- Seeger, W, Schneider, U, Kreuzler, B, von Witzleben, E, Walmrath, D, Grimminger, F, Neppert, J.** Reproduction of transfusion-related acute lung injury in an ex vivo lung model. *Blood.* 1990;76(7):1438-1444.
- Selsted, ME, Ouellette, AJ.** Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol.* 2005;6(6):551-557.
- Sengelov, H, Boulay, F, Kjeldsen, L, Borregaard, N.** Subcellular localization and translocation of the receptor for N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. *Biochem J.* 1994;299 (Pt 2):473-479.
- Silliman, CC.** Transfusion-related acute lung injury. *Transfus Med Rev.* 1999;13(3):177-186.
- Silliman, CC, Boshkov, LK, Mehdizadehkashi, Z, Elzi, DJ, Dickey, WO, Podlosky, L, Clarke, G, Ambruso, DR.** Transfusion-related acute lung injury: epidemiology and a prospective analysis of etiologic factors. *Blood.* 2003;101(2):454-462.
- Silliman, CC, Curtis, BR, Kopko, PM, Khan, SY, Kelher, MR, Schuller, RM, Sannoh, B, Ambruso, DR.** Donor antibodies to HNA-3a implicated in TRALI reactions prime neutrophils and cause PMN-mediated damage to human pulmonary microvascular endothelial cells in a two-event in vitro model. *Blood.* 2007;109(4):1752-1755.
- Silliman, CC, Paterson, AJ, Dickey, WO, Stroneck, DF, Popovsky, MA, Caldwell, SA, Ambruso, DR.** The association of biologically active lipids with the development of transfusion-related acute lung injury: a retrospective study. *Transfusion.* 1997;37(7):719-726.
- Silliman, CC, Voelkel, NF, Allard, JD, Elzi, DJ, Tuder, RM, Johnson, JL, Ambruso, DR.** Plasma and lipids from stored packed red blood cells cause acute lung injury in an animal model. *J Clin Invest.* 1998;101(7):1458-1467.
- Sitrin, RG, Pan, PM, Blackwood, RA, Huang, J, Petty, HR.** Cutting edge: evidence for a signaling partnership between urokinase receptors (CD87) and L-selectin (CD62L) in human polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol.* 2001;166(8):4822-4825.
- Skubitz, KM, Stroneck, DF, Sun, B.** Neutrophil-specific antigen NB1 is anchored via a glycosyl-phosphatidylinositol linkage. *J Leukoc Biol.* 1991;49(2):163-171.
- Steinbeck, MJ, Roth, JA.** Neutrophil activation by recombinant cytokines. *Rev Infect Dis.* 1989;11(4):549-568.
- Stroneck, DF, Herr, GP, Maguire, RB, Eiber, G, Clement, LT.** Characterization of the neutrophil molecules identified by quinine-dependent antibodies from two patients. *Transfusion.* 1994a;34(11):980-985.

- Stroncek, DF, Herr, GP, Plachta, LB.** Neutrophil-specific antigen NB1 inhibits neutrophil-endothelial cell interactions. *J Lab Clin Med.* 1994b;123(2):247-255.
- Stroncek, DF, Jaszcz, W, Herr, GP, Clay, ME, McCullough, J.** Expression of neutrophil antigens after 10 days of granulocyte-colony-stimulating factor. *Transfusion.* 1998a;38(7):663-668.
- Stroncek, DF, Plachta, LB, Herr, GP, Dalmasso, AP.** Analysis of the expression of neutrophil-specific antigen NB1: characterization of neutrophils that react with but are not agglutinated by anti-NB1. *Transfusion.* 1993a;33(8):656-660.
- Stroncek, DF, Shankar, R, Litz, C, Clement, L.** The expression of the NB1 antigen on myeloid precursors and neutrophils from children and umbilical cords. *Transfus Med.* 1998b;8(2):119-123.
- Stroncek, DF, Shankar, RA, Herr, GP.** Quinine-dependent antibodies to neutrophils react with a 60-Kd glycoprotein on which neutrophil-specific antigen NB1 is located and an 85-Kd glycosyl-phosphatidylinositol-linked N-glycosylated plasma membrane glycoprotein. *Blood.* 1993b;81(10):2758-2766.
- Swain, SD, Rohn, TT, Quinn, MT.** Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. *Antioxid Redox Signal.* 2002;4(1):69-83.
- Swanson, K, Dwyre, DM, Krochmal, J, Raife, TJ.** Transfusion-related acute lung injury (TRALI): current clinical and pathophysiologic considerations. *Lung.* 2006;184(3):177-185.
- Thelen, M, Dewald, B, Baggiolini, M.** Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiol Rev.* 1993;73(4):797-821.
- Thiel, M, Zourelidis, C, Peter, K.** [The role of polymorphonuclear neutrophilic leukocytes in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome (ARDS)]. *Anaesthesist.* 1996;45(2):113-130.
- Toy, P, Gajic, O.** Transfusion-related acute lung injury. *Anesth Analg.* 2004;99(6):1623-1624, table of contents.
- Wallis, JP.** Transfusion-related acute lung injury (TRALI): presentation, epidemiology and treatment. *Intensive Care Med.* 2007;33 Suppl 1:S12-16.
- Ward, HN, Lipscomb, TS, Cawley, LP.** Pulmonary hypersensitivity reaction after blood transfusion. *Arch Intern Med.* 1968;122(4):362-366.
- Weiss, J, Elsbach, P, Olsson, I, Odeberg, H.** Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem.* 1978;253(8):2664-2672.
- Welch, HC, Coadwell, WJ, Ellson, CD, Ferguson, GJ, Andrews, SR, Erdjument-Bromage, H, Tempst, P, Hawkins, PT, Stephens, LR.** P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P₃- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell.* 2002;108(6):809-821.
- Yuli, I, Tomonaga, A, Synderman, R.** Chemoattractant receptor functions in human polymorphonuclear leukocytes are divergently altered by membrane fluidizers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79(19):5906-5910.

9 Erklärung gemäß Promotionsordnung

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

10 Danksagung

Allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, sei an dieser Stelle ganz herzlich gedankt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. med. Friedrich Grimminger als Direktor der Klinik für die Möglichkeit, in seiner Abteilung promovieren zu dürfen. Herrn Prof. Dr. med. Ulf Sibelius gilt mein ausdrücklicher Dank für die Vergabe des interessanten Themas und dafür, dass er wichtige Anregungen lieferte und in entscheidenden Momenten half.

Vom ersten Tag der Planung der Doktorarbeit, über die gesamte Zeit der Labortätigkeiten, während der Anfertigung des Manuskriptes und darüber hinaus war Frau Dr. med. Katja Hattar eine herausragende Betreuerin. Wissenschaftlich wie auch praktisch hat sie wesentlich zur Entstehung und Vollendung der vorliegenden Dissertation beigetragen. Ich bin ihr dafür überaus dankbar.

Ich danke auch meinen Freunden und Kommilitonen für die emotionale Unterstützung sowie für die freiwillige morgendliche Blutspende, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich bedanke mich bei allen Labor-Mitarbeitern, die mir immer wieder mit Tipps, Tricks und praktischer Hilfe die Arbeit im Labor erleichtert haben, insbesondere Frau Annette Tschuschner, Andrea Mohr, Gudrun Ahlbom, Tina Heep und Karin Quanz.

Frau Helga Pries vom Scriptus Bürodienst danke ich für die professionelle Korrektur und die Umsetzung meiner Wünsche im Layout.

Meiner Frau Svenja danke ich im Rahmen dieser Dissertation für die stete Motivation und die wissenschaftliche Diskussion und Korrektur.

Insbesondere möchte ich meinen Eltern für die Unterstützung und Geduld, Verständnis und Vertrauen danken, ohne die diese Arbeit nie möglich gewesen wäre.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5492-X



Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

9 17 8 3 8 3 5 19 5 4 9 2 2 1