

Aus dem Charité Centrum 13 für Innere Medizin mit Kardiologie,
Gastroenterologie, Nephrologie
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und
Internistische Intensivmedizin
Charité Campus Virchow

DISSERTATION

Expression von Neutrophil Antigen B1 (CD177)
auf neutrophilen Granulozyten bei Patienten mit schweren
bakteriellen Infektionen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alexandra Jennerjahn

aus Berlin

Datum der Promotion: 30.05.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abstrakt.....	VI
Abstract.....	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Sepsis.....	1
1.2 Angeborenes und adaptives Immunsystem.....	5
1.3 Neutrophile Granulozyten.....	8
1.3.1 Entwicklung.....	8
1.3.2 Charakterisierung Neutrophiler auf Grundlage der Granula.....	9
1.3.3 Bedeutung neutrophiler Granulozyten und Grundzüge des humanen Immunsystems.....	10
1.4 NB1	11
1.4.1 Entdeckung.....	11
1.4.2 Strukturelle und genetische Grundlagen.....	12
1.4.3 Expression	13
1.4.4 Funktion und klinische Bedeutung	14
1.5 Fragestellung der Arbeit	17
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Material.....	18
2.1.1 Blutproben.....	18
2.1.2 Antikörper.....	18
2.1.3 Lysepuffer, Waschmedium.....	19
2.1.4 TNF- α	19
2.2 Methoden	19
2.2.1 Gewinnen der Blutproben	19
2.2.2 Aufbereitung der Blutproben	20

Inhaltsverzeichnis

2.2.3	Durchflusszytometrie	21
2.2.4	Stimulierungsversuche.....	22
2.3	Statistik.....	23
2.4	Charakterisierung der Kohorten.....	24
2.4.1	Patienten.....	24
2.4.2	Patientenkontrollen	33
2.4.3	Gesundkontrollen.....	34
2.5	Methodenvalidierung	34
2.5.1	Lagerung der Blutproben	34
2.5.2	Transport.....	35
2.5.3	Doppelbestimmungen	35
3	Ergebnisse	37
3.1	Übersicht über Anteil NB1-positiver Neutrophile und Intensität der NB1-Expression	37
3.1.1	Patienten.....	37
3.1.2	Patientenkontrollen	41
3.1.3	Gesundkontrollen.....	42
3.2	Vergleich der Kohorten.....	44
3.2.1	Vergleich der NB1-Expression zwischen Patienten und Kontrollkohorten 44	
3.2.2	Ausgewählte klinische Parameter zum Vergleich der Patienten und Patientenkontrollen	46
3.3	Zweizeitige Messungen der Patienten.....	46
3.3.1	Patienten mit klinischer Besserung des Gesundheitszustands.....	47
3.3.2	Patienten mit anhaltender Krankheitsaktivität	48
3.4	Stimulierungsversuche	51
3.5	Korrelationen zwischen NB1-Expression und medizinischen Parametern ..	52
3.5.1	Paraklinik	52

Inhaltsverzeichnis

3.5.2	Klinische Parameter.....	60
4	Diskussion.....	68
4.1	Eignung der Patientenkohorte.....	68
4.2	Expression des NB1-Glykoproteins.....	69
4.2.1	Gesunde Spender.....	69
4.2.2	Kontrollpatienten.....	69
4.2.3	Patienten mit schweren Infektionen.....	70
4.3	Zusammenhang des Ausmaßes der NB1-Expression mit paraklinischen und klinischen Parametern.....	71
4.4	Regulation der NB1-Expression.....	73
4.5	Mögliche Funktionen des NB1-Glykoproteins.....	77
4.6	Klinische Bedeutung und Implikationen.....	81
5	Literaturverzeichnis.....	82
6	Lebenslauf.....	89
7	Eidesstattliche Versicherung.....	90

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

ACCP/SCCM	American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine
ALT	<i>Alanin-Aminotransferase</i> , oft auch ALAT abgekürzt = GPT
ANCA	Anti Neutrophil Cytoplasmatic Autoantibodies
AST	<i>Aspartat-Aminotransferase</i> , oft auch ASAT abgekürzt =GOT
APACHE II	<i>Acute Physiology And Chronic Health Evaluation</i> : intensivmedizinisches Verfahren um Überlebenschancen vorherzusagen
CRP	<i>C-reaktives Protein</i> : Akute-Phase-Protein, Referenzbereich: 1 mg/dl
FcγRI/II	Rezeptoren für die Fc-Domäne des Immunglobulin Gs Typ I/II
fMLP	<i>N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin</i>
GPA	<i>Granulomatose mit Polyangiitis</i> ; früher: M. Wegener
INR	<i>International Normalized Ratio</i> : Folgenormung zum Quick-Wert
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen, Untergruppe der Lymphozyten
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
PKZ	<i>Patientenkennziffer</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , „Sauerstoffradikale“
SD	<i>Standard Deviation</i> : Standardabweichung
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> : Standardfehler
SOFA	<i>Sequential Organ Failure</i> : Score-System auf Intensivstationen

Abstrakt

Einleitung:

Sepsis ist die generalisierte inflammatorische Reaktion auf in die Blutbahn eingeschwemmte pathogene Erreger beziehungsweise deren Toxine, welche zur Auslösung komplexer Zytokinkaskaden und Aktivierung inflammatorischer Zellen führt.

Neutrophile Granulozyten, die mit 50 -70 % die größte Fraktion der Leukozyten darstellen, leisten hierbei die essentielle Erstabwehr des angeborenen Immunsystems gegen Bakterien. Sie werden durch Pathogenbestandteile sowie Zytokine wie TNF- α und IL-1, die in der hyperinflammatorischen Frühphase der Sepsis freigesetzt werden, aktiviert. Als antimikrobielle Abwehrstrategie kommen die Phagozytose und die Exozytose bakterizider Stoffe zum Einsatz.

Das Neutrophilen-spezifische Antigen NB1 (CD177, HNA-2a, PRV-1) ist ein GPI-verankertes Glykoprotein, das sich auf der Zelloberfläche Neutrophiler sowie in sekundären Granula befindet. Ein Charakteristikum ist die bimodale Membranexpression, sodass eine individuell unterschiedlich große Subpopulation an NB1-positiven und -negativen Neutrophilen unterschieden werden kann. Viele Fragen hinsichtlich konkreter Funktionen und der biologischen Bedeutung von NB1 sind noch ungeklärt. Bekannt ist, dass die Plasmamembranexpression von NB1 in Bezug auf den Gesamtanteil NB1-positiver Neutrophile bei schweren Infektionen und nach Gabe von G-CSF gesteigert ist. Auf noch unaktivierten Neutrophilen fungiert NB1 als Mediator der PR3-Membranexpression, dem Autoantigen in der GPA. Durch die Interaktion des Glykoproteins mit endothelialelem PECAM-1 verfügt die NB1-positive Neutrophilenfraktion über einen potentiellen Vorteil in der transendothelialen Migration.

In der vorliegenden Arbeit wird die NB1-Expression zwischen Patienten mit schweren Infektionen, ischämischen Inflammationsgeschehen und gesunden Spendern verglichen, sowie auf mögliche physiologische und prognostische Bedeutung des Ausmaßes der NB1-Expression eingegangen.

Methodik:

Blutproben von 96 septischen und 33 Kontrollpatienten, die auf der interdisziplinären Intensivstation des Charité Virchow-Klinikums ausgewählt wurden, sowie von 103 gesunden Spendern wurden per FACS-Analyse auf die NB1-Expression untersucht. Stimulierungsversuche wurden mittels rekombinantem TNF- α durchgeführt.

Ergebnisse:

Die NB1-Expression der Patientenkohorte bezüglich des prozentualen Anteils NB1-positiver Neutrophile und MFI ist signifikant ($p \leq 0,001$) höher als die der Patientenkontrollen sowie gesunder Spender. Eine Korrelation fand sich zwischen MFI und Höhe des CRP der Patienten. Das Ausmaß der NB1-Expression wirkt sich nicht auf das Outcome aus. Analysen der Stimulierungsversuche und eines septisch gewordenen Kontrollpatienten deuten darauf hin, dass die NB1-Expression im Entzündungsmilieu gesteigert wird.

Schlussfolgerung:

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen dar, dass die NB1-Expression im Entzündungsmilieu höher ist als bei Patienten- und Gesundkontrollen. Die Befunde konstatieren somit die potentielle Rolle des Neutrophilen-spezifischen Antigens bei inflammatorischen Abwehrreaktionen. Die NB1-Expression scheint sich dabei nicht auf das Outcome bei Patienten mit schweren Infektionen auszuwirken. Weitere Untersuchungen sind nötig, um spezifische Funktionen von NB1 darzulegen.

Abstract

Introduction:

Sepsis is a complex, general inflammatory reaction caused by a local or secondary systemic infectious trigger. It depicts a life threatening condition which requires a broad, targeted therapy.

Neutrophils constitute 50 - 70 % of the human leukocytes and are the dominant defence cell mediating the earliest innate immune response. They are activated by pathogen components, tissue damage and cytokines in the onset of sepsis. Antimicrobial strategies include phagocytosis and the release of bactericide agents.

The neutrophil-specific antigen NB1 (CD177) is a GPI-anchored glycoprotein which is located on the cell surface or in secondary granules of neutrophils. Characteristically, it demonstrates a bimodal surface expression - there is a NB1-positive and NB1-negative neutrophil subpopulation differing in size in each NB1-expressing individual. Hitherto, no precise function of NB1 has been exposed. Nevertheless, one can observe an increase in its plasma membrane expression regarding the ratio of NB1-positive neutrophils and NB1 glycoprotein molecules per cell in severe infectious diseases and after application of G-CSF. It became apparent that its physiological role is the intermediary of Proteinase-3-membrane expression, the main autoantigen in GPA, on not yet activated neutrophils. Furthermore, NB1 binds to endothelial PECAM-1, which supports the neutrophil transendothelial migration resulting in preferential transmigration of the NB1-expressing neutrophil subset. Herein, the NB1 expression between patients with acute inflammatory diseases, patients with ischemic affection and healthy donors is compared. Moreover, the hypothesis of a potential physiological and prognostic relevance of the magnitude of NB1 expression is tested.

Methods:

In whole blood samples of 96 septic and 33 control patients from the interdisciplinary intensive care unit at Charité Campus Virchow and of 103 healthy volunteers, NB1 expression was assessed by FACS analysis. TNF- α was used for neutrophil activation assays.

Abstract

Results:

Septic patients demonstrated a significantly higher percentage of NB1-positive neutrophils and mean fluorescence intensity than patient and healthy controls ($p \leq 0,001$). Besides, the mean fluorescence intensity correlated with CRP-levels in septic patients. However, the extent of NB1 expression had no influence on the patient's outcome. In stimulation trials and in samples of one control patient who contracted sepsis an increased NB1 expression was obtained.

Conclusion:

These data indicate that NB1 expression is upregulated in inflammatory conditions. Regarding the specifications the neutrophil specific antigen assumedly features a capacity in inflammatory immune responses. Yet, the magnitude of NB1 expression does not imply a prognostic factor. Further investigations are necessary to discover specific functions of NB1.

1 Einleitung

1.1 Sepsis

Das Syndrombild der Sepsis ist als eine systemische Entzündungsreaktion des Organismus auf eine Infektion durch Bakterien, deren Toxine, Viren oder Pilze anzusehen. Seit 1992 werden durch das ACCP/SCCM Consensus Conference Committee in dieser Beziehung vier Krankheitsbilder definiert, die als ein pathophysiologisches Kontinuum zu verstehen sind: Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS), Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock¹. Jeder dieser Schweregrade ist durch festgesetzte klinische und physiologische Parameter beschrieben. Für die Diagnose der Sepsis benötigt man dabei zusätzlich zum SIRS, welches sich durch mindestens zwei der Kriterien abnormale Körpertemperatur, erhöhte Herz- und Atemfrequenz, erhöhte oder erniedrigte Leukozytenzahl auszeichnet, den Nachweis oder klinischen Verdacht einer Infektion. Ein septisches Krankheitsgeschehen, das zu einer oder mehrerer Organdysfunktionen wie die Einschränkung renaler Funktionen oder Thrombozytopenie, führt, wird als schwere Sepsis bezeichnet. Ein septischer Schock liegt bei einer instabilen Kreislaufsituation mit arterieller Hypotonie vor, die unter anderem den pharmakologischen Einsatz von Vasopressoren erfordert.

In Deutschland herrscht die Empfehlung, die klinische Diagnose der Sepsis und des septischen Schocks nach den Leitlinien der Deutschen Sepsisgesellschaft zu stellen (siehe Tabelle 1)².

Die Inzidenz der Sepsis beträgt 300/100.000 Einwohner in den USA³. In Deutschland liegt die Inzidenz der schweren Sepsis und des septischen Schocks bei 100/100.000, wobei global steigende Fallzahlen zu verzeichnen sind⁴. Nach wie vor ist die Sepsis selbst bei intensivmedizinischer Behandlung mit einer hohen Sterblichkeit vergesellschaftet. Die Mortalitätsrate beträgt auch bei zeitnaher Krankenhauseinweisung mit antimikrobieller und supportiver Therapie bis zu 30 %, wobei sich diese mit dem Schweregrad der Krankheit erhöht. So versterben circa 30 - 70 % der Patienten mit septischem Schock⁵. Die Identifizierung des ursächlichen Pathogens ist für die Diagnosestellung und eine adäquate Behandlung erforderlich. Wegweisend ist die Begutachtung potentieller nosokomialer Sepsisquellen wie infizierte Katheter und Wunden, Urogenitalinfektionen und Pneumonien⁶. Um den infektiösen Mikroorganismus genau zu charakterisieren, ist die mikrobiologische Untersuchung von Blut- und Urinkulturen sowie von Sputum-, Liquorproben und Wundabstrichen notwendig.

Einleitung

Tabelle 1 Kriterien der AWMF-Leitlinien zur Diagnose einer Sepsis, einer schweren Sepsis und eines septischen Schocks.

KRITERIEN	
<p>I. Nachweis der Infektion <i>Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien</i></p>	
<p>II. Severe inflammatory host response (SIRS) (mind. 2 Kriterien) - <i>Fieber ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^{\circ}\text{C}$) bestätigt durch rektale, intravasale o. -vesikale Messung</i> - <i>Tachykardie: Herzfrequenz ≥ 90 /min</i> - <i>Tachypnoe (Frequenz ≥ 20/min) o. Hyperventilation ($\text{PaCO}_2 \leq 4.3$ kPa/ ≤ 33 mmHg)</i> - <i>Leukozytose (≥ 12000 /nl) o. Leukopenie (≤ 4000 /nl) o. $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild</i></p>	
<p>III. Akute Organdysfunktion (mind. 1 Kriterium) - <i>Akute Enzephalopathie: eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium.</i> - <i>Relative oder absolute Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozyten um mehr als 30% innerhalb von 24 Stunden o. Thrombozytenzahl ≤ 100.000 /nl.</i> Eine Thrombozytopenie durch akute Blutung o. immunologische Ursachen muss ausgeschlossen sein. - <i>Arterielle Hypoxämie: $\text{PaO}_2 \leq 10$ kPa (≤ 75 mmHg) unter Raumluft oder ein $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$-Verhältnis von ≤ 33 kPa (≤ 250 mmHg) unter Sauerstoffapplikation. Eine manifeste Herz- oder Lungenerkrankung muss als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen sein.</i> - <i>Renale Dysfunktion: Eine Diurese von ≤ 0.5 ml/kg/h für wenigstens 2 Stunden trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder ein Anstieg des Serumkreatinins $> 2\times$ oberhalb Referenzbereiches.</i> - <i>Metabolische Azidose: Base Excess ≤ -5 mmol /l o. Laktatkonzentration $> 1,5\times$ oberhalb des Referenzbereichs.</i></p>	
DIAGNOSEN	
<p>Sepsis: Kriterien I und II,</p> <p>Schwere Sepsis: Kriterien I, II und III</p>	<p>Septischer Schock: Kriterien I und II sowie für wenigstens 1 Stunde ein systolischer arterieller Blutdruck ≤ 90 mmHg bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck ≤ 65 mmHg oder notwendiger Vasopressoreinsatz, um den systolischen arteriellen Blutdruck ≥ 90 mmHg oder den arteriellen Mitteldruck ≈ 65 mmHg zu halten. Die Hypotonie besteht trotz adäquater Volumengabe und ist nicht durch andere Ursachen zu erklären.</p>

Die Grundlage der Therapie der Sepsis besteht aus der Elimination des Krankheitserregers, aus hämodynamisch supportiven Maßnahmen wie der intravenösen Flüssigkeitszufuhr und Anwendung von Vasopressoren sowie der apparativen Unterstützung von Organdysfunktionen wie zum Beispiel den Nierenersatzverfahren. Die kaum veränderte Letalitätsrate in den letzten 20 Jahren, die hauptsächlich der schweren Sepsis und des septischen Schocks geschuldet ist, beruht insbesondere auf Defiziten der frühzeitigen Diagnosestellung. Aus diesem Grund ist es angezeigt, eine kalkulierte antibiotische Therapie so früh wie möglich nach Diagnose einer Sepsis jedoch nach Abnahme von Kulturen anzusetzen, die dann nach klinischen und mikrobiologischen Kriterien optimiert wird². Resistenzentwicklung vieler Bakterien

Einleitung

begrenzen allerdings die Wirksamkeit dieser Therapiemaßnahme und sind zugleich Grund für die fortwährend steigende Inzidenz der Sepsis³.

Neben der pharmakologischen Behandlung steht die vollständige Sanierung der septischen Infektionsquelle als kausale Therapie im Vordergrund. Maßnahmen wie die Entfernung von Kathetern, Implantaten, Drainage von Abszessen und die Wundsanierung verbessern entscheidend das Outcome des Patienten⁷. Eine Volumenersatztherapie sollte früh und energisch angewandt werden zum Zweck der mikrovaskulären Stabilisierung und folglich zur Aufrechterhaltung einer adäquaten Sauerstoff- und Substratversorgung von Organzellen. Daher wird in den aktuellen Sepsis-Leitlinien in der frühen Sepsisphase die Gabe eines initialen Volumenbolus von circa 1000 ml kristalloider Lösungen zur hämodynamischen Stabilisierung empfohlen. Hydroxyethylstärke-Lösungen (HES) sollten aufgrund der höheren Rate von Nierenversagen und der infolgedessen höheren Sterblichkeit bei septischen Patienten nicht mehr eingesetzt werden⁸. Der arterielle Mitteldruck sollte 65 - 70 mmHg betragen^{108, 109}. Forciert höhere Drücke tragen laut aktuellen Studien nicht zu einer Senkung der Mortalität bei⁹. Andere Zielgrößen in der Steuerung der Hämodynamik sind der zentralvenöse Druck (8 - 12 mmHg), die Diurese (> 0,5 ml/kg/h) und die zentralvenöse Sättigung (70%)¹¹⁰. Eine unlängst veröffentlichte Studie zeigt indes, dass die von Rivers et al. entwickelte sogenannte „Early Goal Directed Therapy“, die als anerkanntes Behandlungsprotokoll auf eine hämodynamische Stabilisierung des septischen Patienten innerhalb der ersten sechs Stunden ausgerichtet ist und eine frühzeitige zentralvenöse Katheterisierung und großzügige Bluttransfusionen fordert, das Outcome in Relation zur Vergleichsgruppe mit Standardtherapie nicht verbessert¹¹¹. Dies deutet bereits an, dass Behandlungskonzepte der Sepsistherapie der aktuellen Studienlage und einem fortwährendem Paradigmenwechsel angepasst werden.

Sofern unter Volumengabe kein ausreichend hoher Perfusionsdruck erreicht wird, ist der Vasopressor Noradrenalin Mittel der ersten Wahl, wobei bei eingeschränkter kardialer Pumpfunktion die zusätzliche Gabe von Dobutamin als Inotropikum empfohlen wird^{112, 113}. Kürzlich wurde gezeigt, dass durch die zusätzliche Gabe von Albumin kein weiterer Nutzen erreicht wird¹¹⁴. Eine arterielle Sauerstoffsättigung von mindestens 90 % sollte aufrechterhalten werden, die gegebenenfalls den Einsatz maschineller Beatmung erfordert. Eine Thromboseprophylaxe mit unfraktionierten oder niedermolekularen Heparinen sowie eine Ulkusprophylaxe werden weiterhin empfohlen. Dagegen erwies sich eine Therapie mit hohen Dosen von Kortikosteroiden als nicht

Einleitung

effektiv und erhöhte überdies das Risiko einer Sekundärinfektion¹⁰. Ebenso wird eine bis dato propagierte strenge Einhaltung des Blutglukosespiegels zwischen 80 und 100 mg/ dl mittels intensivierter Insulintherapie kontrovers diskutiert und nicht mehr befürwortet, da dem potentiellen Nutzen eine hohe Rate Hypoglykämie-bedingter Komplikationen entgegensteht. Eine intravenöse Insulintherapie wird ab Glukosewerten von mehr als 180 mg/ dl angeraten unter strikter Vermeidung hypoglykämischer Episoden¹¹. Erweiterte Konzepte in der Sepsistherapie beruhen auf Erkenntnissen der Erforschung pathophysiologischer Mechanismen im septischen Krankheitsgeschehen und sind Bestandteil aktueller Studien, wozu beispielsweise die Anwendung von intravenösen Immunglobulinen und Selen gehört¹¹⁵.

Nicht jedes Individuum ist in gleichem Maß anfällig für die Ausbildung einer Sepsis. Diskutiert werden genetische Faktoren, die zu einer Prädisposition führen können. Hierzu gehören SNPs (single nucleotide polymorphisms) im TNF- α -, Interleukin 1-, Fc γ -, Toll-like-Rezeptor und in Zytokingenen wie TNF- α und TNF- β ¹². Daneben sind angeborene Immundefizite wie die Agammaglobulinämie und Phagozytosedefekte, wie sie bei den Leukozytenadhäsionsdefekten, Myeloperoxidasedefekt und der chronischen Granulomatose auftreten, klinisch von Bedeutung. Ebenso gelten erworbene Immundefizite wie hämatologische Malignome, medikamentöse Immunsuppression oder Splenektomie als Risikofaktoren³.

Auffassungen zur Pathophysiologie der Sepsis haben sich durch intensiviertere Forschung und Studien in den letzten Jahren bedeutend verändert. Demgemäß wird inzwischen die Theorie von Lewis Thomas¹³, nach der die Sepsis die Folge einer primär unkontrollierten Hyperinflammation ist, kritisch betrachtet. Verschiedene klinische Versuche zeigten auf, dass der medikamentöse Einsatz antiinflammatorischer Substanzen zur Therapie eines septischen Krankheitsbildes das Outcome der Patienten vielmehr negativ beeinflusst. So erhöhen Antagonisten der potenten proinflammatorischen Zytokine TNF- α und Interleukin-1 die Mortalität^{14, 15}. Ebenso zeigte sich, dass extrahierte Leukozyten septischer Patienten auf bakterielle Lipopolysaccharid-Stimulierung hin mit einer deutlich herabgesetzten Ausschüttung dieser Zytokine reagieren¹⁶. Wiederum wirkt die Verabreichung des Immunstimulans Interferon- γ dem entgegen und verbessert die Überlebenschance¹⁷. Folglich ist das Syndrombild der Sepsis nach einer initialen Phase der Hyperinflammation durch eine verminderte Kapazität des Immunsystems, Pathogenen effektiv entgegenzuwirken, charakterisiert. Dies wird als Imbalance der sich gegenseitig regulierenden pro- und

antiinflammatorischen Zytokine erfasst¹⁸. Ursächlich wird eine deutlich gesteigerte Apoptoserate von peripheren Lymphozyten, dendritischen Zellen, B-Zellen und Dünndarmepithelzellen angenommen, die zu einem antiinflammatorischen Typ 2-T-Helferzellen-Profil führen¹⁹. Dieser Zustand wird in seiner Endausprägung als Immunparalyse oder Anergie bezeichnet und ist mit einer Leukozytendysfunktion gleichzusetzen, die die Abwehrmechanismen gegen Mikroben und damit die Mortalität des Wirts negativ beeinflusst^{20, 21}.

1.2 Angeborenes und adaptives Immunsystem

Sepsis ist die systemische und lebensbedrohliche Ausprägung einer Entzündungsreaktion ausgelöst durch einen Erreger oder Gewebeschaden. Auf lokaler Ebene ist dieser Prozess gleichwohl lebensnotwendig. Zur Abwehr körperfremder Moleküle, Molekülverbände und Organismen steht eine umfangreiche Kaskade von signal- und zellvermittelten Reaktionen zur Verfügung, die sich in das unspezifische oder angeborene Abwehrsystem und das adaptive Immunsystem einteilen lässt.

Ersteres schützt den Organismus in der Frühphase einer Infektion bis das adaptierte System aktiv geworden ist. Eine zentrale Rolle spielen hier die Haut und Schleimhäute, die die oberflächliche Barriere gegen Mikroorganismen darstellen. Als zelluläre Elemente stehen Makrophagen und Granulozyten im Mittelpunkt, die sich vor allem durch ihre Phagozytoseaktivität auszeichnen. Daneben existieren NK-Zellen, die weder der B- noch der T-Zell-Reihe zugeordnet werden können und für die Beseitigung virusinfizierter Zellen stehen. Als humoraler Faktor kommt das Komplementsystem zum Einsatz, das hier über den alternativen Weg mittels der Komplementkomponente C3b auf Bakterienoberflächen aktiviert wird. Es kommt zum einen zur Opsonierung der Bakterienzelle, welches die Phagozytose durch Makrophagen erleichtert und andererseits zur Bildung des sogenannten lytischen Komplexes, bestehend aus den Komplementfaktoren C5b, C6, C7, C8, C9.

Der angeborenen Abwehr wird das erworbene, adaptive Immunsystem entgegengestellt. Es ermöglicht die hochspezifische Eliminierung körperfremder Moleküle. Diese Strukturen werden als Antigene bezeichnet. Als Voraussetzung für das Erwirken einer Immunantwort ist jedoch die Präsentation dieser Antigene beziehungsweise Antigenfragmente, die je nach chemischer Struktur und Genese Proteine, Nukleinsäuren, Polysaccharide, Oberflächenstrukturen von Bakterien, Viren, Pflanzen- und Staubbpartikel oder virale, in der Wirtszelle synthetisierte Proteine sind. Präsentiert werden die Antigene respektive Epitope über MHC-Moleküle, die so von TH-Zellen erkannt

Einleitung

werden können. MHC-Proteine der Klasse I befinden sich auf allen kernhaltigen Zellen, die intrazellulär synthetisierte Proteine, die zuvor im Proteasom zu Peptiden fragmentiert werden, präsentieren. Auf diese Weise können auch virusinfizierte Zellen, deren Proteinbiosyntheseapparat für virale Eiweiße genutzt wird, identifiziert und durch das Immunsystem eliminiert werden. Demgegenüber liegt hier möglicherweise der Schlüssel zu Autoimmunerkrankungen: Letztlich körpereigene Strukturen werden durch nicht immuntolerante T-Lymphozyten erkannt, die eine pathologische Aktivität des adaptiven Immunsystems gegen den eigenen Organismus auslösen.

MHC II-Proteine werden nur auf sogenannten professionellen Antigen-präsentierenden Zellen, APCs, exprimiert. Hierzu zählen Monozyten und Makrophagen, B-Lymphozyten und die dendritischen Zellen des Immunsystems in der Epidermis, Blut und Mukosa aller Hohlorgane. Aufgabe der APCs nach Bindung eines Antigens ist es, dieses mittels rezeptorvermittelter Endozytose aufzunehmen, im Lysosom zu spalten und die Peptidfragmente an das MHC-II-Molekül zu binden. Anschließend werden diese vesikulär an die Plasmamembran transloziert. In komplexen Interaktionen wird durch diese Antigenpräsentation in den sekundären lymphatischen Organen die Aktivierung und Differenzierung von T- und B-Lymphozyten bewirkt. Als Effektorzellen sind sie die bedeutsamsten Träger der adaptiven Immunantwort. Die aktivierten, nativen T-Lymphozyten spezialisieren sich je nach Korezeptor zu CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen, die Antigenpeptide über MHC-I-Proteine und somit virusinfizierte beziehungsweise transformierte Körperzellen erkennen oder CD4-positiven T-Helfer-Lymphozyten. Letztere reagieren durch ihren T-Zell-Rezeptor mit fremden Antigenpeptiden, die über MHC-II-Moleküle Antigen-präsentierender Zellen dargeboten werden. B-Lymphozyten werden stufenweise zu Antikörper- beziehungsweise Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen aktiviert: Initial wird der auf der Plasmamembran gebundene B-Zell-Rezeptor nach Bindung eines Antigens internalisiert, intrazellulär fragmentiert und mittels MHC-II-Molekülen wiederum auf der Zelloberfläche präsentiert. Bindet nun eine T-Helferzelle mit passendem T-Zell-Rezeptor, führt dies zur Aktivierung der B-Lymphozyten, damit zur klonalen Expansion und schließlich zur Produktion von Immunglobulinen. Gedächtniszellen sind eine weitere Form spezialisierter B-Lymphozyten, die bei erneutem Kontakt mit einem Antigen sogleich in der Lage sind, neutralisierende Immunglobuline zu bilden. Die Funktion der zur akuten Pathogenabwehr gebildeten Immunglobuline besteht darin, die Wirkung bakterieller Toxine zu dezimieren, aber auch an die Oberfläche von Mikro-

Einleitung

organismen zu binden und damit deren Phagozytose durch Makrophagen zu verbessern oder die Lyse des Pathogens durch das Komplementsystem auf dem klassischen Weg zu vermitteln. Hier liegt die Verknüpfung des angeborenen mit dem adaptiven Immunsystem und bescheinigt, dass die zwei Arme der humanen Abwehr nicht gänzlich unabhängig voneinander agieren, sondern sich in ihrer Wirkung komplettieren und verzahnen²².

Ein weiteres Exempel hierfür ist die Aktivierung von Makrophagen im Zuge der adaptiven Immunantwort, die durch Zytokine der Typ 1 T-Helferzellen wie Tumor Necrosis Factor-beta (TNF- β), Interleukin 2 (IL-2) und Interferon-gamma (INF- γ) hervorgerufen wird. Neueren Forschungsergebnissen zufolge tragen auch neutrophile Granulozyten zur Induktion der adaptiven Abwehr bei, indem sie dendritische Zellen zur Reifung anregen und damit die T-Zell-Antwort verstärken²³. Eine Eigenschaft Neutrophiler, die ebenso die T-Zell-Aktivitäten heraufsetzt, ist ihr Auftreten als antigenpräsentierende Zellen im Beisein weiterer Immunzellen²⁴. Auch von Neutrophilen sezernierte Serinproteasen wie Cathepsin G sind im Mausmodell in der Lage, die antigen-spezifische humorale Immunantwort anzuregen²⁵.

Der initiale Anstoß einer Entzündungsreaktion erfolgt mit Penetration von Haut- oder Schleimhautbarrieren durch Pathogene. Das Endothel der darunter liegenden postkapillären Venolen wird durch lokale Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-17 aktiviert, worauf es P- und L-Selektine aus intrazellulären Granula, den Weibel-Palade-Körpern, in die luminale Membran transloziert²⁶. Granulozyten gehen anhand ihrer konstitutionellen Expressierung von L-Selektinen mit dem endothelialen P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) eine lockere Bindung ein, was mit dem Begriff „Rolling“ beschrieben wird²⁷. Das hierdurch wiederum angeregte Endothel sezerniert Granulozyten-aktivierende Substanzen wie Plättchenaktivierender Faktor (PAF) und IL-8. Zusammen mit dem bakteriellen chemotaktischen Peptid fMLP kommt es zu einer stärkeren Neutrophilen-Endothel-Interaktion, die die Mobilisierung sekretorischer Vesikel triggert²⁸. Die dadurch an die Plasmamembran beförderten Moleküle, allen voran das β 2-Integrin (CD11b/18, Mac-1) und der fMLP-Rezeptor, bewerkstelligen mit dem entsprechenden endothelialen Gegenstück Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) die feste Adhäsion an der Gefäßwand. Die transzelluläre oder interzelluläre Transmigration, Diapedese genannt, wird hiermit eingeleitet²⁹. Die weitere Exozytose neutrophiler Granula erfolgt in geregelter Weise und ist teils abhängig

vom VAMP2-Gehalt der Granula. So wird sichergestellt, dass ein Gewebeschaden gering bleibt und mikrobizide Peptide wie Lysozym, Defensine sowie das an der Bildung toxischer Sauerstoffradikale beteiligte Enzym Myeloperoxidase (MPO) und beispielsweise Elastasen erst am Ort des Geschehens in die Extrazellulärmatrix entlassen werden³⁰. Neben der Phagozytose von Bakterien wirken granulozytäre Stoffe (Azurozidin, Defensine, humanes Cathelicidin hCAP18) ferner chemotaktisch auf CD4+, CD8+ T-Zellen, Makrophagen und weitere Neutrophile.

Die innerhalb von Minuten bis Stunden zum infizierten Gewebe rekrutierten neutrophilen Granulozyten leiten damit den essentiellen Akt zur akuten Phase der Abwehrreaktion ein und stellen einen unabdingbaren Teil des Immunsystems dar.

1.3 Neutrophile Granulozyten

1.3.1 Entwicklung

Unter den Leukozyten stellen die neutrophilen Granulozyten, kurz Neutrophile genannt, mit einem Anteil von 50 - 70 % die größte Subgruppe der humanen Abwehrzellen dar. Neutrophile unterscheiden sich in ihrer Zellkernmorphologie, ihren Granula und den darin enthaltenen spezifischen lysosomalen Enzymen und mikrobiziden Inhaltsstoffen von anderen Leukozyten. Anhand ihres Färbeverhaltens kann man neutrophile von eosinophilen und basophilen Granulozyten unterscheiden.

Etwa 90 % der Neutrophilen befinden sich im Knochenmark, 10 % im Blut und Gewebe. Im Blut verteilen sich die Granulozyten je zur Hälfte auf einen marginalen Pool an den Gefäßwänden postkapillärer Venolen und auf einen mit dem Blut zirkulierenden Pool³¹.

In der Literatur findet man unterschiedliche Angaben für die Lebensdauer Neutrophiler, die von ein bis vier Tage reicht, wobei die Halbwertszeit im Blut zirkulierender Neutrophiler mit lediglich sechs bis acht Stunden beziffert wird. Neueren Forschungsergebnissen zufolge kann man jedoch mit einer zirkulatorischen Lebensspanne von bis zu 5,4 Tagen rechnen, was den möglichen Wirkungszeitraum neutrophiler Granulozyten um das Zehnfache verlängert im Vergleich zur bisherigen Datelage³².

Dem steht eine kontinuierliche Granulopoese von über 10^{11} Neutrophilen pro Tag gegenüber, welche in akuten Infektsituationen um ein Vielfaches heraufreguliert werden kann³³. Wie alle Blutzellen gehen neutrophile Granulozyten auf hämatopoetische

Stamm- und Progenitorzellen des Knochenmarks zurück. Von hier aus treten sie über die Sinusoide in das Blutgefäßsystem ein. Die terminale Differenzierung der Granulozyten ist ein sehr komplexer Prozess, in den mehr als 11000 Gene involviert sind. Eine wesentliche Rolle in der Proliferation und Reifung dieser Zellreihe kommt dem als Zytokin und Wachstumsfaktor agierenden Granulocyte colony-stimulating Factor (G-CSF) zu, das von Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen und Stromazellen des Knochenmarks sezerniert wird³⁴. Bei akuten Entzündungen und Infektionen findet man in der Regel erhöhte Serumlevel des G-CSF und eine damit verbundene Mobilisierung neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark, die sich im Blutbild in einer Leukozytose widerspiegelt³⁵. Nachfolgend wird der vermehrte Bedarf an Neutrophilen und anderen Immunzellen mit einer erhöhten Produktion kompensiert³⁶. Weitere Regulatoren der Granulozytopoese sind GM-CSF, Interleukin 3 und Interleukin 1. Daneben nehmen beispielsweise Endotoxine, Hormone wie Glukokortikoide und weitere Zytokine (TNF- α , IFN- γ) ebenfalls Einfluss auf Differenzierung, Mobilisierung aus dem Knochenmark, Verteilung im peripheren Blut und Migration. Prostaglandin E₂ aus Stromazellen des Knochenmarks und Laktoferrin aus Neutrophilen selbst hemmen die Granulopoese im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus.

1.3.2 Charakterisierung Neutrophiler auf Grundlage der Granula

Paul Ehrlich charakterisierte erstmalig gegen Ende des 19. Jahrhunderts Neutrophile von anderen Blutzellen und Granulozyten, die sich auf Basis ihres Verhaltens gegenüber basischen und sauren Farbstoffen morphologisch abgrenzen. Zudem weisen reife Neutrophile spezifische Granula und einen kennzeichnenden, gelappten Zellkern auf, welche das Synonym Polymorphnuclear Leukocytes, kurz PMNs, prägen. Neutrophilengranula werden in drei unterschiedliche Gruppen aufgeteilt, die sich durch ihre Zusammensetzung an spezifischen Proteinen wie Enzymen und antimikrobiellen Stoffen und ihr Färbeverhalten voneinander abgrenzen³⁷. Die Granula werden in unterschiedlichen Zeitfenstern im Rahmen der Granulopoese synthetisiert, was das Auftreten der verschiedenen Subtypen erklärt. Azurophile beziehungsweise primäre oder Peroxidase-positive Granula entstehen im Promyelozytenstadium. Sie zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an dem Enzym Myeloperoxidase (MPO), α -Defensinen als kleine kationische, antimikrobielle Peptide, an den Serinproteasen

Cathepsin G, Neutrophilen-Elastase, Azurocidin und Proteinase 3 aus³⁸. Die zweite große Gruppe an Granula, gemeinhin als Peroxidase-negative Granula bezeichnet, wird als Kontinuum während des Myelozyten-, Metamyelozyten- sowie stabförmigen und segmentförmigen Granulozytenstadiums gebildet. Diese lassen sich weiter differenzieren in spezifische, respektive sekundäre Granula, die typischerweise antimikrobielle Substanzen wie Lactoferrin oder Lysozym enthalten und Gelatinase-positive beziehungsweise tertiäre Granula mit vorwiegend Matrix-degradierenden Enzymen und einigen Membranrezeptoren³⁹. Schließlich werden noch sekretorische Vesikel abgegrenzt. Diese stellen im Gegensatz zu den drei voran beschriebenen Granulasubklassen Endozytosevesikel dar, die sich während der späten Neutrophilenreifung von der Plasmamembran abschnüren. Sie enthalten somit integrale Bestandteile der Plasmamembran wie Rezeptoren und andere funktionale Proteine wie Integrine. Da diese auf verschiedene Stimuli hin wieder in die Zellmembran eingebracht werden, besitzen sie eine Schlüsselstellung in der Interaktion mit aktiviertem Endothelium⁴⁰. Neben dem unterschiedlichen Besatz an Matrix- und Membranproteinen kann man eine differenzierte Exozytosedynamik der Granula bei Aktivierung des Neutrophilen im Rahmen einer Entzündungsreaktion ausmachen. Dabei erfolgt die mögliche Sekretion oder partielle Mobilisierung in umgekehrter zeitlicher Reihenfolge zu ihrer Synthese während der Granulozytenmaturation. So kommt den verschiedenen Granula mit ihren Matrixproteinen eine verhältnismäßig definierte Rolle in den einzelnen Schritten der antimikrobiellen Immunabwehr des Neutrophilen zu⁴¹.

1.3.3 Bedeutung neutrophiler Granulozyten und Grundzüge des humanen Immunsystems

Neutrophile Granulozyten agieren als elementare Abwehrzellen an vorderster Linie des angeborenen Immunsystems in der Bekämpfung gegen eindringende Pathogene und Mikroorganismen⁴². Die Bedeutung dieser Rolle wird an Patienten deutlich, die durch eine Chemotherapie an Neutropenie leiden und um ein vielfaches anfälliger für jegliche Art von bakteriellen und Pilzinfektionen sind⁴³. Eine verminderte Zahl an neutrophilen Granulozyten erhöht durch den herabgesetzten Schutz vor systemischen Infektionen die Mortalität und Morbidität entsprechender Personen beträchtlich. Verschiedene mikrobizide Strategien existieren bei der Abwehr gegen invadierte

Pathogene. Zum Spektrum gehören die phagozytotische Aufnahme und intrazelluläre Degradierung von Mikroorganismen, daneben die Degranulation mit Entlassen antimikrobieller Moleküle und Enzyme in den Extrazellulärraum. Die bisherige Ansicht der Wirksamkeit von Neutrophilen schloss einen Kollateralschaden mit ein, der vor allem dadurch zustande kommt, dass die freigesetzten Enzyme wie Proteasen und Kollagenasen, aber auch oxidativ wirkende reaktive Sauerstoffspezies (ROS) das wirtseigene Gewebe schädigen und eine potente lokale Entzündung hervorrufen^{44, 45}. Einerseits sieht man Neutrophile nicht mehr als unelegante, primitive Abwehrzellen an, die unkoordiniert den zytotoxischen Inhalt ihrer Granula in die Extrazellulärmatrix entlassen und unabdingbar eine Gewebedestruktion bewirken⁴⁶. Vielmehr stellen sie die ersten zum Ort der Infektion migrierenden Immunzellen dar, die organisiert und wirkungsvoll die Pathogene eindämmen und zudem andere Arme des angeborenen sowie adaptiven Immunsystems koordinieren. Gleichzeitig üben sie aber auch einen limitierenden Einfluss auf die Entzündungsreaktion aus. Aktuelles Interesse in der Neutrophilenforschung ist überdies neuen neutrophilen Proteinen wie NGAL oder Lipocalin 2 genannt und LL-37 sowie Abwehrstrategien gewidmet, die die Komplexität der Funktion neutrophiler Granulozyten unterstreichen^{47, 48}. Unter letzteren sind NET, neutrophil extracellular traps, zu nennen, die als Geflecht aus Neutrophilen-DNA und -Proteinen bakteriostatisch wirken und die Phagozytose pathogener Mikroorganismen erleichtern⁴⁹.

1.4 NB1

1.4.1 Entdeckung

Das Neutrophilen-spezifische Antigen NB1, auch als HNA-2a betitelt, wurde 1971 in Zusammenhang mit einer fetomaternalen Inkompatibilität und damit verbundener neonatalen Immunneutropenie entdeckt und erstmalig von Lalezari et al. beschrieben⁵⁰. Im engeren Sinne bezeichnet HNA-2a das Epitop des 58 - 64 kD großen NB1-Glykoproteins, wie die Arbeitsgruppe um Stroncek 1990 darlegen konnte⁵¹. Dennoch wurde das HNA-2a und NB1-Glykoprotein kodierende Gen, CD177, erst 2001 durch Kissel et al. identifiziert. Dieses ist auf Chromosom 19q13.31 lokalisiert⁵². In der gleichen Arbeit wurde zudem klar, dass es sich bei dem Neutrophilen-Antigen PRV-1, Polyzythämia rubra vera 1, und NB1 um zwei Allele des selben Gens CD177 handelt. Die Allele unterscheiden sich lediglich durch vier Aminosäuren innerhalb der Pro-

teinsequenz. PRV-1 wurde im Rahmen der Myeloproliferativen Erkrankung Polyzythämia vera beschrieben und hierbei benannt. Charakteristischerweise kommt es zu einer Überexprimierung des Gens, wodurch sich, ähnlich wie bei Patienten mit essentieller Thrombozythämie, erhöhte mRNA-Mengen des CD177/PRV-1-Gens nachweisen lassen⁵³. Vier für NB1 spezifische monoklonale Antikörper, die jeweils unterschiedliche Epitope des Glykoproteins erkennen, sind beschrieben: IB5, 7D8, MEM-166 und TAG4^{54, 55}.

1.4.2 Strukturelle und genetische Grundlagen

Auf molekularer Ebene ist NB1 als Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankertes Plasmamembranprotein charakterisiert, das nur bei einer Subpopulation neutrophiler Granulozyten detektierbar ist⁵⁶. Molekulargenetische Untersuchungen haben ergeben, dass der NB1-negativen Subpopulation NB1-exprimierender Individuen ein Transkriptionsdefekt zugrunde liegt. Hingegen geht man davon aus, dass die phänotypische Defizienz bei NB1-negativ typisierten Individuen mutmaßlich auf einen fehlerhaften Splicingkomplex zurückzuführen ist und keine Mutation auf DNA-Ebene vorliegt⁵⁷.

Außer auf der Plasmamembran ist NB1 in der Membran sekundärer Granula und sekretorischer Vesikel Neutrophiler zu finden. Diese werden durch intrazellulären Transport in die Plasmamembran eingebaut, wodurch das NB1-Molekül letztlich auf der Zelloberfläche erfassbar ist⁵⁸. Während der Granulozytopoese wird es ab dem Stadium des Myelozyten exprimiert⁵⁵. Die kodierende DNA besteht aus 1311 Basenpaaren, die ein Protein aus 416 und ein Signalpeptid aus 21 Aminosäuren verschlüsseln. Das resultierende NB1-Protein weist zwei cysteinreiche Domänen und drei N-Glykolisierungslokalisationen auf⁵⁹. Eine Omega-Bindungsstelle koppelt das NB1-Molekül an seinen GPI-Anker. Dieser verankert das Glykoprotein transmembranär an der Außenseite der Plasmamembran ohne eine intrazelluläre Bindungsdomäne bereitzustellen⁵². Formal verfügt das NB1-Glykoprotein somit über keinen direkten intrazellulären Signaltransduktionsweg. CD177 zeigt Homologie mit der Ly-6 (uPAR)-Domäne und wird deshalb zur urokinase plasminogen activator receptor/CD59/Ly-6 snake toxin-Superfamilie gezählt⁶⁰. Lösliche NB1-Produkte wie es für die Neutrophilen-Serinprotease PR3 oder für andere GPI-verankerte Proteine wie z.B. den Fcγ-Rezeptor IIb beschrieben ist, konnten bisher nicht nachgewiesen werden.

1.4.3 Expression

Einzigartig ist das NB1-Glykoprotein hinsichtlich seiner bimodalen Expression auf der Plasmamembran neutrophiler Granulozyten, sodass sich für jedes Individuum eine NB1-positive und -negative Subpopulation an neutrophilen Granulozyten unterscheiden lässt. Der individuelle Anteil von NB1-exprimierenden Neutrophilen rangiert in einer Spanne von 0 bis 100 %, wobei das Mittelmaß der NB1-positiven Neutrophilen ungefähr 45 % bis 65 % beträgt^{54, 61}. Dieser Verteilungstyp trifft auf 89 bis 97 % der Bevölkerung zu. Andere Expressionsmuster treten gleichwohl auf: bei annähernd 8 % gesunder Spender kann man eine trimodale Verteilung des NB1-Membranmoleküls beobachten⁶¹. Ungefähr 3 % der international untersuchten Individuen weisen überhaupt kein NB1-Glykoprotein auf der Oberfläche ihrer Neutrophilen auf. Verschiedene Haplotypen mit einzelnen Genpolymorphismen bestimmen offenbar den Anteil NB1-exprimierender Neutrophiler. So kam es in einer Untersuchung von Stroncek et al. zu einer Assoziation zwischen niedrigem Prozentsatz NB1-exprimierender Neutrophiler mit bestimmten cDNA-Polymorphismen auf Chromosom 19, wodurch eine genetische Grundlage für die Fähigkeit das NB1-Glykoprotein zu exprimieren postuliert wird⁶². Allgemein angenommen ist die Erkenntnis, dass der individuelle Anteil der NB1-exprimierenden Neutrophilen im Verlauf konstant bleibt. Darüber hinaus scheint es weitere Faktoren zu geben, die auf die Expression des untersuchten Zelloberflächenproteins Einfluss nehmen: Generell präsentieren Neutrophile von Frauen eine durchschnittlich 5 % höhere NB1-Expression als solche männlicher Testpersonen⁶³. Im Unterschied zu Männern soll die NB1-Expression bei Frauen mit steigendem Alter hingegen abnehmen⁵⁶. Ferner zeigen Untersuchungen, dass schwangere Frauen einen größeren Anteil NB1-positiver Neutrophile aufweisen im Vergleich zu nicht schwangeren weiblichen Spendern⁶⁴. Diese Umstände deuten auf einen regulatorischen Einfluss von Hormonen, vorrangig Östrogenen, auf die Genexpression von CD177 hin. Stroncek et al. dokumentierte bereits 1998, dass die Größe der NB1-positiven Subpopulation in Proben von Nabelschnurblut und fetalem Knochenmark signifikant höher ist als bei gesunden Spendern im Erwachsenen- und Kindesalter⁶⁵. Wie eingangs bereits erwähnt kommt es bei der Mehrzahl der an Polyzthämia vera und teilweise weiteren myeloproliferativen Erkrankungen wie der essentiellen Thrombozythämie und der idiopathischen Myelofibrose erkrankten Patienten zu einer übermäßig gesteigerten Transkription des CD177-Gens, wobei nicht

vermehrt das fertige Protein in die Membranen eingebaut wird, sondern eine ausgeprägte intrazelluläre Akkumulation der mRNA nachweisbar ist⁶⁶.

Im Gegensatz dazu sind medizinische Umstände bekannt, bei denen die Expression des NB1-Glykoproteins reduziert ist. Hierzu gehören die Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH)⁵⁸, bei der ein klonaler Defekt auf Stammzebene und eine damit verbundene verminderte Expression GPI-verankerter Proteine vorliegt, und die Chronische Myeloische Leukämie (CML)⁶⁷.

Eine wichtige Erkenntnis in Zusammenhang mit dieser Arbeit ist die Auswirkung einer bakteriellen Infektion auf die NB1-Expression. Es stellte sich heraus, dass im Entzündungsmilieu der Anteil NB1-positiver Neutrophile von Patienten mit schweren bakteriellen Erkrankungen signifikant höher ist als bei gesunden Individuen⁶⁸. Entsprechende Resultate ergaben in vivo-Versuche, in denen man gesunden Testpersonen G-CSF verabreichte und nach einer Latenzzeit eine gesteigerte NB1-Expression gemessen wurden⁶⁷.

Neben der prozentualen Verschiebung der neutrophilen Subpopulationen zugunsten der NB1-positiven Gruppe kann sich ebenso die Anzahl der einzelnen NB1-Glykoproteine pro Neutrophilem erhöhen, wie es insbesondere im Fall einer bakteriellen Infektion vorliegt⁶⁸. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression des Neutrophilen-Antigens NB1 von Alter, Geschlecht und Begleiterkrankungen abhängig ist. Sowohl der Anteil von Neutrophilen, die das Antigen NB1 exprimieren, als auch die Anzahl an NB1-Molekülen pro Zelle kann sich bei Aktivierung dieser Immunzellen erhöhen.

1.4.4 Funktion und klinische Bedeutung

Wie im vorangegangenen Abschnitt bereits angesprochen erlangt NB1 als Antigen für NB1-spezifische Alloantikörper Relevanz. Diese Kondition ist im Fall der neonatalen Neutropenie gegeben, bei der die NB1-defiziente Mutter während der Schwangerschaft Antikörper gegen Granulozyten des NB1-positiven Kindes bildet⁵⁰. Weitere Krankheitsbilder in dem Zusammenhang sind die Immunneutropenie nach Knochenmarkstransplantation, drug-induced immune neutropenia, febrile Transfusionsreaktionen und die transfusion-related acute lung injury (TRALI) nach Transfusion von Blutprodukten mit eben diesen humanen Neutrophilen-Antikörpern, die eine Agglutination der Granulozyten mit nachfolgendem Lungenödem bewirken^{69, 70}.

Einleitung

Die pathologisch erhöhte CD177-mRNA gilt als geeigneter wenn auch unspezifischer Marker für Myeloproliferative Erkrankungen, speziell Polyzythämia vera. Es wird jedoch nicht als Biomarker im klinischen Alltag genutzt.

Über eine definierte Funktion von NB1 ist bislang wenig bekannt. Anhand ausgeweiteter Forschungen und Beobachtungen liegen lediglich einzelne Ergebnisse oder Anhaltspunkte vor. So stellte sich heraus, dass NB1 als Rezeptor für PR3 (Proteinase 3) fungiert, dem Hauptautoantigen für ANCA (anti-Neutrophil cytoplasmatische Antikörper) bei der Granulomatose mit Polyangiitis (GPA; ehemals Wegener Granulomatose). Die Serinprotease PR3, die in azurophilen, sekundären Granula und sekretorischen Vesikeln aller Neutrophilen deponiert ist, wird zur Zelloberfläche transportiert und durch nicht näher bekannte Mechanismen an NB1 gekoppelt, das die PR3-Membranexpression und somit den Angriffspunkt der ANCA mit nachfolgender Aktivierung der Granulozyten vermittelt⁷¹. Der durchschnittliche Prozentsatz von PR3-NB1-positiven Neutrophilen ist bei Patienten mit ANCA-assoziierten Vaskulitiden erhöht, wiederum ist ein hoher prozentualer Anteil für den klinischen Verlauf prognostisch ungünstig⁷². Im Gegensatz zu NB1 ist PR3 auch in Granula von PR3/NB1-negativen Neutrophilen vorhanden und kann in vitro nach Priming der Neutrophilen mit Zytokinen beziehungsweise Aktivierung durch fMLP oder G-CSF auf der Zelloberfläche detektiert werden⁷³.

Untersuchungen zur NB1-Expression bei Aktivierung Neutrophiler zeigten gleichwohl, dass Stimulierung mit fMLP oder G-CSF zur Hochregulation von NB1 auf Protein- und mRNA-Ebene führt^{58, 63}. Daneben wurde von einer Internalisierung des NB1-Glykoproteins nach Neutrophilen-Aktivierung sowie Auslösen des „respiratory bursts“ nach Binden von NB1-spezifischen Antikörpern berichtet⁷⁴. Diese Erkenntnisse unterstützen die Vermutung einer möglichen Rezeptorfunktion von NB1.

Kürzlich wurde das transmembranäre Glykoprotein PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule/ CD31) als bedeutsamer Bindungspartner von NB1 beschrieben. Das Zelladhäsionsmolekül wird konstitutiv innerhalb der Tight Junctions und in luminalen Endothelzellen, überdies auf der Zelloberfläche von Thrombozyten, einigen T-Zellen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten exprimiert⁷⁵. PECAM-1 nimmt eine Schlüsselfunktion bei der Aufrechterhaltung der Gefäßwandintegrität des Endothels und der Leukozytentransmigration ein. Hierbei kommt es zu einer homophilen Interaktion zwischen den Ig-ähnlichen Domänen 1 und 2 der PECAM-1-Moleküle auf Leukozyten und endothelialen Zellen. In beweisenden Versuchen konn-

Einleitung

te demonstriert werden, dass anti-PECAM-1-Antikörper signifikant die Diapedese von Leukozyten *in vitro* und *in vivo* hemmen⁷⁶. Als heterophiler Bindungspartner an der Ig6-Domäne von PECAM-1 legt NB1 neue Aspekte im Prozess der Leukozytenrekrutierung dar. Auch wenn die exakte Bindungsregion des NB1-Glykoproteins noch nicht identifiziert ist, zeigte sich, dass die Interaktion zwischen PECAM-1 und NB1 circa 15 Mal stärker ist als die homophile Bindung zwischen zwei PECAM-1-Molekülen. Monoklonale Antikörper gegen NB1 und die Ig6-Domäne von PECAM-1 inhibierten in Experimenten nicht nur die Adhäsion sondern auch die transendotheliale Migration von Neutrophilen Granulozyten⁷⁷. Dies gibt Hinweise darauf, dass die NB1-positive Subpopulation besonders potente Immunzellen der angeborenen Abwehr darstellen. Das Neutrophilenantigen NB1 spielt bisher im klinischen Kontext eine Rolle als Zielantigen in immunvermittelten Syndromen wie der neonatalen Neutropenie und TRALI, bei denen immunisierte Schwangere beziehungsweise Blutspender Alloantikörper gegen das Oberflächenprotein bilden. Als Mediator der PR3-Oberflächenpräsentation scheint eine hohe NB1-Expression zudem für die Entwicklung einer schweren Verlaufsform einer Autoimmunvaskulitis, im speziellen der GPA, zu prädisponieren. Eine exakte Funktion ist dennoch weitgehend ungeklärt. Eine bezeichnende Hochregulation von NB1 wurde bei bakteriellen Infektionen, nach Behandlung mit G-CSF und während der Schwangerschaft demonstriert.

1.5 Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Forschungsarbeit wird die Expression des NB1-Glykoproteins bei Patienten mit schweren bakteriellen Erkrankungen, insbesondere bei septischen Patienten, im Vergleich zu Kontrollpatienten mit abakteriellen Entzündungskomponenten und gesunden Probanden analysiert. Das Ausmaß der NB1-Expression wird dabei mit der Schwere der Erkrankung und dem klinischen Verlauf gegenüberstellend untersucht.

Folgende Arbeitshypothesen werden dabei bearbeitet:

- Septische Patienten haben eine größere Subpopulation NB1-positiver Neutrophile und höhere Fluoreszenzintensität als Kontrollpatienten und gesunde Probanden.
- Die NB1-Expression korreliert mit klinischen Werten und Laborparametern, wobei eine höhere Expression für ein schlechteres Outcome prädisponiert.
- Der individuelle Prozentsatz an NB1-positiven Neutrophilen ändert sich im Fall einer bakteriellen Erkrankung, wohingegen er bei gesunden Kontrollpersonen intraindividuell stabil bleibt.
- Lässt sich zudem ein klinischer Nutzen aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ablesen, wie beispielsweise die veränderte Expression des NB1-Glykoproteins als frühzeitiger Diagnosemarker einer Infektion oder NB1 als therapeutisches Zielmolekül?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Blutproben

Für die Versuche wurden Blutentnahmen bei folgenden Teilnehmergruppen durchgeführt: Patienten mit schweren akut-entzündlichen Erkrankungen (Zielwert n = 100), Kontrollpatienten mit akuten nicht-bakteriellen Entzündungsgeschehen (Zielwert n = 35) und gesunde Spender (Zielwert n = 100). Die Blutentnahmen wurden mit dem gängigen System der Krankenstation durchgeführt. Die Heparin- und EDTA-Blutröhrchen „BD Vacutainer®“ stammen von der Firma BD (Becton, Dickinson; deutscher Firmensitz: Tullastr. 8-12, 69126 Heidelberg). Für weitere Versuchsreihen wurde aufgereinigtes Blut in Form von PMNs verwendet, das im Rahmen der täglichen Forschungsarbeiten im Labor gesunden Spendern entnommen wird. Die Untersuchungen und Blutabnahmen wurden von der Ethikkommission bewilligt.

2.1.2 Antikörper

Bei den direkt markierten Antikörpern handelt es sich um monoklonale Antikörper der Maus. In jedem Fall wurde eine Endkonzentration von 5 µg/ml angewendet.

Für die Detektion des NB1-Glykoproteins wurde ein FITC-markierter Anti-human CD177-Antikörper des Klons MEM-166 der Firma BioLegend (deutscher Vertriebs- händler: BioLegend, Zum Grundtal 1, D- 54341 Fell; Hauptgeschäftsstelle in den USA: 9727 Pacific Heights Blvd, San Diego, CA 92121) verwendet. Als Negativkontrolle kam der FITC-konjugierte IgG₁, K Isotype Control vom Klon P3 der Firma e-Bioscience (Vertriebsunternehmen in Deutschland: Herriotstrasse 1 Frankfurt D- 60528; Hauptgeschäftssitz in den USA: 10255 Science Center Drive, San Diego, CA 92121) zum Einsatz. Wurde das Antigen in zwei aufeinanderfolgenden Schritten fluoreszenzmarkiert, standen die Primärantikörper von ExBio (monoklonaler Maus-anti-NB1-Antikörper, Klon MEM-166; Firmensitz: Nad Safinou II 341, 252 42 Vestec, Czech Republic) und von Dako Cytomation (Maus- IgG₁ Negative Control; Hauptgeschäftsstelle: Dako Denmark A/S, Produktionsvej 42, DK-2600 Glostrup, Denmark) zur Verfügung. Als Sekundärantikörper wurde das FITC-konjugierte anti-Maus Immunglobulinfragment F(ab')₂ der Firma Dako Cytomation eingesetzt. Dieser reagiert mit allen Maus-IgG-Subklassen und Maus-IgMs.

2.1.3 Lysepuffer, Waschmedium

Um die Erythrozyten der Vollblutproben zu lysieren, kam Ammoniumchlorid in Natriumhydrogencarbonat-Puffer zum Einsatz. Dieser Erythrozyten-Lysepuffer wurde zuvor aus Ammoniumchlorid (E. Merck, Darmstadt), Natriumhydrogencarbonat (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe), 0,5 M EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, pH8, SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH Steinheim) und Aqua Dest nach Protokoll angefertigt. Die Zelllyse mittels des Ammoniumchloridpuffers wird im Anschluss an die Inkubation mit den oben beschriebenen Antikörpern durchgeführt.

Für die darauffolgende Wasch- beziehungsweise Zentrifugiervorgänge und zur abschließenden Resuspension der Zellen vor der FACS-Analyse wird ein geeignetes Medium, im Folgenden Cell Wash™ genannt, verwendet.

2.1.4 TNF- α

Für Versuche, bei denen die Expression des NB1-Glykoproteins auf aktivierten Neutrophilen in vitro untersucht werden soll, wurde humanes rekombinantes TNF- α (Tumor necrosis factor alpha, Katalognummer 210-TA-010) der Firma R&D Systems GmbH (Borsigstraße 7a, 65205 Wiesbaden-Nordenstadt) verwendet. Das als Zytokin wirksame purifizierte Protein liegt in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ vor und wird entsprechenden Protokollen nach bis zur endgültigen Zielkonzentration von 2 ng/ml mit HBSS (Gibco®/ Life Technologies GmbH, 64293 Darmstadt) verdünnt.

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnen der Blutproben

2.2.1.1 Patienten mit septischen Krankheitsbildern

Das Patientenkollektiv wurde auf den Intensivstationen der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und Internistische Intensivmedizin im Virchow Klinikum Berlin Charité rekrutiert. Lag bei neu aufgenommenen Patienten, die mindestens 18 Jahre alt sind, der Verdacht auf eine schwere, zumeist akut-bakterielle Inflammation vor, wurden diese in die Studie eingeschlossen. Die Abnahme des 5 ml Heparin- und EDTA-Bluts erfolgte im Rahmen der Routineabnahmen auf der ITS oder es wurde überschüssiges Material, welches nicht mehr für die Routinediagnostik benötigt wurde, verwendet. Heparinblut, das nach allen Messungen im Labor übrig blieb, wurde sachgerecht entsorgt. EDTA-Blut wurde für eventuelle weitergehende Analysen des

Forschungsteams eingefroren. Neben der Blutabnahme nach Aufnahme auf ITS wurde eine Verlaufskontrolle mit einer zweiten oder dritten Blutprobe angestrebt. Diese erfolgte frühestens nach sieben Tagen entweder innerhalb des Genesungsprozesses des Patienten und kann somit auch auf einer peripheren Station vollzogen worden sein oder bei einer offensichtlich Zustandsverschlechterung.

War der Patient nicht einwilligungsfähig, wurde die Einwilligungserklärung vom gesetzlichen Vertreter eingeholt. Zum Krankheitsbild der Neutrophilen-vermittelten bakteriellen Inflammationen werden hier Erkrankungen wie Pneumonie, Endokarditis, Meningitis, Pyelonephritis und der entzündlichen Endausprägung Sepsis gezählt.

Nach Ende des Rekrutierungszeitraums wurden die Patienten nochmals gründlich auf ihre Eignung für die Studie untersucht. Hier kamen die erneute Sichtung der Laborparameter und der Paraklinik zur Verwendung sowie Entlassungsbriefe nach Krankenhausaufenthalt, die Angaben zu Diagnosen beinhalten. Patienten, die im Nachhinein von der Studie ausgeschlossen wurden, sind im Abschnitt 2.4.1.1 mit Begründung beschrieben. Im Juni 2012 wurden alle bis dato überlebenden Patienten auf ihr zwischenzeitliches Versterben überprüft soweit dies im Datensystem des Klinikums verzeichnet war und die entsprechenden Datentabellen aktualisiert.

2.2.1.2 Patienten mit nicht-infektiösen Entzündungsreaktionen

Oben beschriebenes Prozedere trifft ebenso für Patienten zu, die ein steriles Inflammationsgeschehen nach Ischämie beziehungsweise Reperfusion in den betroffenen Organen aufweisen. Hierzu zählen beispielsweise Patienten mit akutem Koronarsyndrom und Nierentransplantierte. Sofern möglich wurde auch bei diesen Personen eine zweite Blutentnahme als Verlaufskontrolle durchgeführt.

2.2.1.3 Gesunde Spender

Die Kontrollgruppe der gesunden Spender setzt sich einerseits aus freiwilligen Blutabnahmen im Laboralltag des ECRC und im Verwandten- und Freundeskreis zusammen, andererseits konnten zu einem gewissen Teil die Daten bereits NB1-typisierter Personen aus vorangegangenen Forschungsprojekten der Arbeitsgruppe verwendet werden.

2.2.2 Aufbereitung der Blutproben

Nach Abnahme des arteriellen respektive venösen Bluts wurde darauf geachtet, dass die Proben kühl gelagert wurden und der Transport zum Labor zügig stattfand. Die Bearbeitung der Proben erfolgte innerhalb von zwei bis vier Stunden nach Abnahme.

Für die Charakterisierung der Membranausprägung des NB1-Glykoproteins wurden je 95 µl Vollblut des Spenders 5 µl des Anti-NB1- Antikörpers beigemischt um eine Endkonzentration von 5 µg/ml des FITC-markierten Antikörpers zu erreichen. Da der Isotyp eine höhere Ausgangskonzentration aufweist, wurde hier 1 µl den 95 µl Vollblut beigemischt. Eine 25-minütige Inkubationszeit unter lichtarmen Verhältnissen bei 4 °C soll eine suffiziente Antikörperfärbung bei ausbleibender Aktivierung der Neutrophilen gewährleisten. Im Anschluss erfolgt die Lyse der Erythrozyten, die mit 1000 µl Ammoniumchloridpuffer pro 100µl-Ansatz und einer Inkubationszeit von fünf Minuten bei 37 °C erreicht wurde. Anschließend werden die Zellfragmente für fünf Minuten bei 3 °C abzentrifugiert. Das aus vornehmlich Leukozyten bestehende Zellpellet wird im nächsten Schritt wieder in einem Cell Wash™-Medium aufgenommen und resuspendiert. Dieser zweite Waschschriff schließt wiederum mit einer fünfminütigen Zentrifugation ab. Danach werden die Zellen je nach Größe des Zellpellets in 400-600 µl Cell Wash™ aufgenommen und in für das FACS-Gerät geeignete Messröhrchen umgefüllt.

2.2.3 Durchflusszytometrie

Der Begriff FACS steht für Fluorescence Activated Cell Sorting und hat sich als Synonym für das Verfahren der Durchflusszytometrie eingebürgert. Diese Form der Flow Cytometry dient der Darstellung und Quantifizierung von Oberflächenmolekülen, intrazellulären Proteinen und DNA, wobei zudem die Möglichkeit besteht, bestimmte Zellpopulationen nach ihren zellulären Eigenschaften zu sortieren. Das Prinzip der Untersuchung basiert auf der Detektion von optischen Signalen der Zelle. Hierzu werden die gewünschten Antigene mittels an Antikörper-gebundene Fluoreszenzfarbstoffe markiert. Die Einzelzellsuspension wird unter Druck durch eine Kapillare angesaugt. Die Zellen passieren im Sensormodul einzeln einen Laser als Lichtquelle, wodurch das Licht abgelenkt wird. Diesen Streuungseffekt macht man sich zur Charakterisierung der Zellen zunutze: mit Hilfe des Vorwärtsstreulichts (forward scatter, FSC), das im flachen Winkel am Rand der Zellen abgelenkt wird, lässt sich die Größe der Zelle bestimmen. Treffen Lichtstrahlen auf intra- beziehungsweise extrazelluläre Strukturen, so werden sie im rechten Winkel abgelenkt. Dieses Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) ist ein Maß für die Zusammensetzung und Beschaffenheit und somit für die Granularität der Zelle. Das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht wird mittels Detektoren (Photomultiplier) gemessen und digitalisiert an die zugehörige Software des angeschlossenen PCs übermittelt.

Material und Methoden

Trifft der Lichtstrahl des Lasers ein Fluorochrommolekül, wird dieses zur Emission von Licht größerer Wellenlänge angeregt und ebenfalls detektiert und digitalisiert. So kann man gleichzeitig bestimmte Moleküle der Zelle untersuchen, wobei hier die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts proportional zur Zahl des markierten Antigens ist. Abbildung 1 veranschaulicht das vereinfachte Messprinzip eines Durchflusszytometers. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Gerät handelt es sich um das FACSCalibur™ der Firma Becton Dickinson.

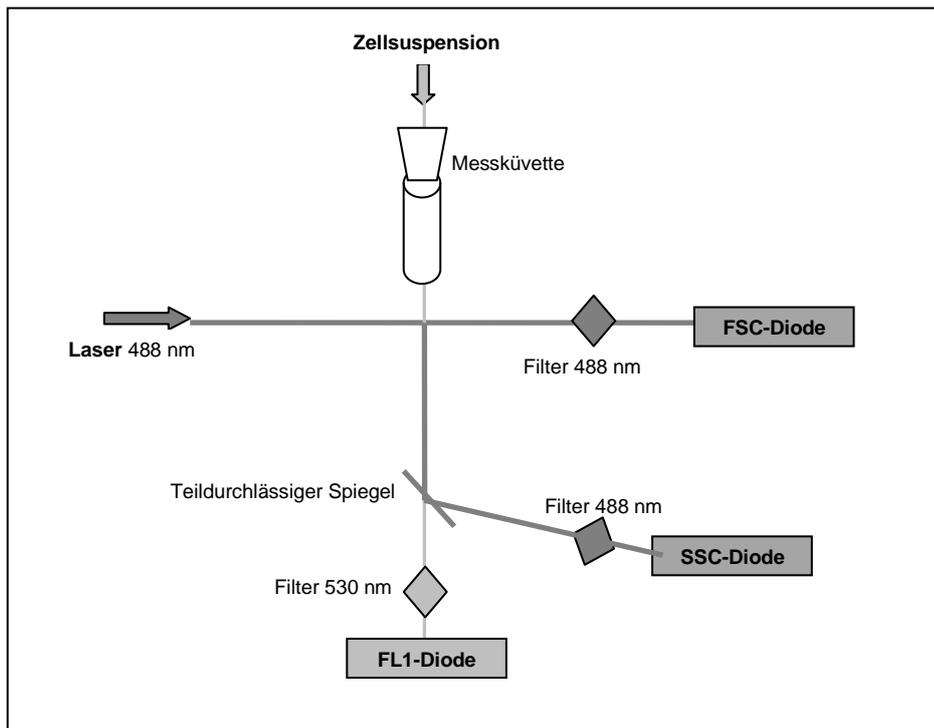


Abb. 1. Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers mit einem Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm. Beim Queren von Zellen im Laserstrahl wird die Intensität des Vorwärtsstrellichts durch den FSC (forward scatter)-Detektor gemessen, welches Informationen über die Zellgröße liefert. Das in circa 90° zum Laserstrahl entstehende Seitwärtsstrellicht, dessen Intensität über den SSC (side scatter)-Detektor berechnet wird, hängt v.a. von der Granularität der Zelle ab. Die Fluoreszenzintensität wird durch FL1 (Fluoreszenzkanal 1) bestimmt, der den an NB1- Antigenen-gekoppelten FITC-Fluoreszenzfarbstoff erkennt. Der Übersicht wegen wurde nur einer von vier Fluoreszenzkanälen eingezeichnet.

2.2.4 Stimulierungsversuche

Auch für diese Versuche wird Vollblut verwendet, das von ausgewählten Spendern, die mit einer möglichst gleichmäßigen bimodalen Verteilung der NB1-positiven Neutrophilen um die 60% aufwarten.

Um die neutrophilen Granulozyten in vitro zu aktivieren, kommt das rekombinante TNF- α zur Anwendung. Dieses wird wie bereits beschrieben mit HBSS versetzt, sodass pro Ansatz mit 98 μ l Vollblut eine TNF- α -Konzentration von 2 ng /ml entsteht.

Der Ansatz wird nun für 20 Minuten in einem 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Nach dieser Primingphase werden die Erythrozyten durch eine hypotone Lyse und anschließender Zentrifugation bei 2500 U/min für vier Minuten entfernt. Das übrig gebliebene Zellpellet wird nochmals in HBSS aufgenommen und erneut zentrifugiert. Das so gewonnene reine Zellpellet wird in FACS-geeignete Röhrchen übernommen. Es folgt die Analyse per FACS im Vergleich zur zuvor, im unstimulierten Zustand gemessenen NB1-Expression des selben Spenders.

Analog wurden Stimulierungsversuche mit isolierten Neutrophilen, sogenannten PMNs, eines Spenders durchgeführt, sodass man für diese Versuchsreihe eine Übersicht der NB1-Membranexpression für Neutrophile im Vollblut und isolierte PMNs jeweils im unstimulierten und aktivierten Zustand erhält.

2.3 Statistik

Für statistische Berechnungen und die graphische Auswertung der Resultate wurden das Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2007 und IBM SPSS 19 für Windows genutzt.

Die per FACS-Analysen ermittelten Resultate für den NB1-Prozentsatz und die Mean Fluorescence Intensity sind als Mittelwerte \pm SEM festgehalten. Andere Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Quantitative, stetige Merkmale wurden auf Normalverteilung untersucht und anschließend mit den entsprechenden Testverfahren behandelt: Ist ein Merkmal normalverteilt, kommt bei Vergleichen der Students-t-Test zum Einsatz. Liegt keine Normalverteilung vor, werden signifikante Unterschiede zwischen unverbundenen Stichproben mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test herausgestellt. Bei Untersuchungen der nichtparametrischen Korrelation zwischen einem Merkmal und der NB1-Membranexpression wird ein Zusammenhang mittels Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman angegeben.

Bei den unter 3.1.2.2 verwendeten nominalen Variablen „Beatmungspflichtigkeit“ und „Nierenersatztherapie“ wird der Chi-Quadrat-Test angewendet um signifikante Unterschiede herauszustellen. Allen Daten wird ein Signifikanzniveau $p < 0,05$ zugrunde gelegt.

Zur Analyse der Katecholaminmenge wurden alle Werte auf die Substanz Noradrenalin bezogen mit einer Konzentration von 1 mg/ ml NaCl. Andere Konzentrationen und Präparate wurden entsprechend umgerechnet, sodass jedem Patienten ein NB1-

Wert und die zum Zeitpunkt der Rekrutierung applizierte Menge an Blutdruckstabilisierenden Katecholaminen zugeordnet werden kann. War ein Patient nicht katecholaminpflichtig, wurde eine Null notiert und in die Berechnungen mit einbezogen.

2.4 Charakterisierung der Kohorten

2.4.1 Patienten

2.4.1.1 Auswahl und Ausschluss der Patienten

Patienten wurden in Anlehnung an die ACCP/SCCM-Kriterien (American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine) für das Krankheitsbild der Sepsis, deren Ausprägungsformen sowie weiteren schweren entzündlichen Erkrankungen in zusätzlicher Beratschlagung mit den diensthabenden Ärzten ausgewählt. Es ist gelungen, insgesamt 103 Patienten im Zeitraum von Oktober 2010 bis Mai 2011 zu rekrutieren. Davon wurden die folgenden sieben Patienten im Nachhinein aus der Studie ausgeschlossen:

- Die Patienten mit der PKZ (Patientenkennziffer) 56 und 66 befanden sich in einer neutropenen Sepsis nach allogener Stammzelltransplantation bei Myelodysplastischem Syndrom beziehungsweise Chemotherapie bei follikulärem Lymphom. Es waren keine Neutrophilen bei der Auswertung am FACS-Gerät zu messen, sodass die Patienten aufgrund des fehlenden NB1-Werts nicht mit einbezogen werden können.
- Patient 43 wird im nachträglichen Arztbrief nicht als septischer Patient geführt. Auch wenn der Verdacht auf eine CIM/ CIP (Critical Illness Myopathie/ Polyneuropathie) ausgesprochen wurde, besteht vielmehr ein kardiales Problem, das initial zu Kammerflimmern und Reanimation führte.
- Patient 44 litt unter einer Laryngitis und komplizierten Malaria tropica, welche durch Parasiten ausgelöst wird. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme befand sich der Patient nicht mehr im akuten Krankheitszustand. Aus diesem Grund und weil Malaria physiopathologisch nicht mit einer ausgeprägten Neutrophilenbeteiligung einhergeht, wird der Patient aus der Analyse genommen.
- Nummer 46 leidet primär an einem Bronchialkarzinom, weist infolge dessen zwar rezidivierende Pneumonien und auch zum Aufnahmezeitpunkt erhöhte Entzündungswerte auf, jedoch wurde der Patient auf Grund einer nicht zu stillenden Lungenblutung verlegt, die die Hauptdiagnose des damaligen Aufenthalts stellte.

Material und Methoden

- Patient 54 erhielt wegen eines Multiplen Myeloms eine autologe und allogene Stammzelltransplantation vor einigen Jahren, sodass davon auszugehen ist, dass nicht alle Neutrophilen „seine eigenen“ sind und man sie somit nicht in Korrelation mit dem Krankheitszustand setzen darf.
- Bei Patient 67 wurde bei Aufnahme der differentialdiagnostische Verdacht auf eine Sepsis erhoben, der im Nachhinein nicht zutraf. Aus dem Verlegungsbrief ist von einem rupturierten Aortenaneurysma zu lesen, das letztlich zu dem Kreislaufzusammenbruch führte. Somit wird auch dieser Patient von der Auswertung ausgeschlossen.

Bei der Aufarbeitung der Leukozytenwerte werden neun Patienten nicht berücksichtigt. Bei diesen Personen kam es durch maligne Erkrankungen und erforderliche Therapien zu einer Knochenmarksdepression mit zum Teil ausgeprägten Leukopenien. Da diese niedrigen Leukozytenzahlen mögliche Korrelationen mit NB1 oder der MFI verfälschen würden, werden die im Folgenden aufgelisteten Patienten bei allen Berechnungen, die den Leukozytenwert betreffen herausgefiltert.

Patienten mit der PKZ:

- 7) Leukopenie infolge eines Tonsillenkarcinoms mit begleitender Radiochemotherapie
- 10) Radiochemotherapie im Rahmen eines supraglottischen Larynxkarzinoms mit subsequentem starken Leukozytenabfall
- 11) Leukozytenwerte bis 130/nl bei CML und unter myelosuppressiver Behandlung starke Leukozytenerniedrigung
- 15) Panzytopenie durch Chemotherapie auf Grund eines Ovarialkarzinomrezidivs
- 50) Neutropenie unter Chemotherapie und funktionellem Antikörpermangel bei Multiple Myelom mit diffusen Knochenmarksinfiltrationen
- 64) Neutropenie unter Hochdosischemotherapie, Radiatio und autologer Stammzelltransplantation infolge eines Plasmozytoms
- 65) erhebliche Erniedrigung der Leukozytenzahlen durch myelo invasive B-CLL und Chemotherapie
- 81) AML mit Peakwerten bis zu 159 Leukozyten /nl und nachfolgendem Abfall unter Chemotherapie
- 96) Neutropenie unter Therapie eines Non-Hodgkin-Lymphoms der Schilddrüse mit Chemotherapie

2.4.1.2 Sozialmedizinische Aspekte

Der Altersdurchschnitt der Patienten zum Zeitpunkt der Datenerfassung beträgt $63,5 \pm 13,3$ Jahre mit einem Median von 66 Jahren und einer Spanne von 19 bis 90 Jahre. Von den 96 Patienten, die in die Auswertung eingehen, sind 38 Personen, entsprechend 40 %, weiblichen Geschlechts mit einem Altersdurchschnitt von $64,7 \pm 14$ Jahre. Männliche Patienten machen 60 % respektive 58 Individuen der Kohorte aus mit einem mittleren Alter von $62,7 \pm 13$ Jahre. An dieser Stelle sei bereits darauf hingewiesen, dass inzwischen 54 der Patienten verstorben sind, dies entspricht 56,25 %.

Zu den häufigsten Akutdiagnosen, die zur Aufnahme in die vorliegende Studie führten, zählen Pneumonie mit akut respiratorischer Insuffizienz beziehungsweise eine pneumogene Sepsis, daneben Sepsis durch eine bestehende Immunsuppression unter beispielsweise einer Radio-/ Chemotherapie und Urosepsis.

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht aller Patienten mit deren Aufnahmediagnose sowie weiteren erhobenen Akut- und Grunderkrankungen.

n	PKZ	Aufnahmediagnose für NB1-Studie	sonstige akute Erkrankungen	Grunderkrankungen
1	1	Pneumonie		Z.n. NTx
2	2	Urosepsis (mit E.coli-Nachweis)	infektiöse Endokarditis, ANV	niedrigmaligns NHL
3	3	Pneumonie	Z.n. (anurischem) ANV	chron. Pankreatitis
4	4	Sepsis: septischer Schock bei (Pilz(Pneumozystis jiroveci)-Pneumonie	ANV	metastasiertes Malignes Melanom
5	5	pneumogene Sepsis (Broncho-) Pneumonie		
6	6	(E.coli-)Sepsis	bakterielle Peritonitis, ANV, hepatorenales Syndrom, Aspergillus-Pneumonie	hepatische Enzephalopathie bei Alkoholabusus
7	7	Pneumonie unter Radiochemotherapie		Tonsillen-Karzinom mit Lymphknotenmetastasen
8	8	pneumogene Sepsis bei (Aspirations-) Pneumonie	Laktatazidose	Alk.abusus, Z.n. Krampfanfällen im Entzug, V.a. Leberzirrhose,

Material und Methoden

				DM
9	9	(E.coli-)Sepsis	Pneumonie	chron. Hepatitis B, Z.n. NTx + 2x LTx
10	10	Pneumonie	Pneumonie	bösartige Neubildung Supraglottis ("Rachen")
11	11	Pneumonie	Laktatazidose	V.a. atypische CML, Prostata-Ca
12	12	Pneumonie	Neudiagnose eines Bronchial-Ca	COPD, Bronchial-Ca
13	13	nekrotisierende Pankreatitis		Herzinsuffizienz, Z.n. Rea
14	14	Sepsis bei Chemotherapie	oligurisches ANV, Lungenversagen	Bronchial-Ca
15	15	Pneumonie bei Panzytopenie durch Chemo + OP		Rezidiv Eileiter-Ca
16	16	Sepsis	Maßnahme: Rea bei inspiratorischer Insuffizienz bei Sepsis	V.a. supraglott. Larynx-Ca, Alk.abusus
17	17	Pneumonie	Vigilanzminderung	chron. NI, DM II, HTN, Adipositas, hepatische Enzephalopathie bei Alkoholabusus;
18	18	cholangiogene Sepsis	Leberversagen bei Sepsis, Leberabszess, Pfortaderthrombose;	
19	19	Aortenklappen-Endokarditis	--> mit paravulvarem Abszess + ESBL, C.albicans in BK	
20	20	poststenotische Pneumonie bei V.a. zentrales Bronchial-Ca	akute respiratorische Insuffizienz	COPD, Bronchial-Ca, Pachydermoperiostose
21	21	Pneumonie, Vigilanzminderung bei V.a. Sepsis	ANV bei Infekt, septische Enzephalopathie	KHK, DM, chron. NI, aHTN, Prostatahyperplasie
22	22	Pneumonie, später mit Nachweis Staphylokokken in BK	akute respiratorische Insuffizienz bei hypertensivem Lungenödem	HTN
23	23	Urosepsis	post-OP bei Divertikulitis	KHK, DM, Z.n. Herzinfarkt
24	24	Pneumonie	akute respiratorische Insuffizienz	Z.n. intrazerebraler Blutung --> Hemiparese
25	25	septischer Schock bei exsudativer Pankreatitis		
26	26	pneumogene Sepsis	(Nachweis Pseudomonas + Staph.	

Material und Methoden

			Aureus im Trachealsekret)	
27	27	Pneumonie mit beginnender Sepsis	Maßnahme: Rea bei respir. Insuffizienz	Z.n. rezidivierenden Aspirationspneumonien
28	28	Sepsis mit Multiorganversagen u. unklarem Fokus		Leberzirrhose
29	29	Urosepsis	ANV, Elektrolytentgeisung, Vigilanzminderung	
30	30	schwerer Schub M. Crohn + Klostridienenteritis + toxisches Megakolon	im Verlauf Pilzperitonitis	
31	31	septische (Stauungs-)Pneumonie --> respiratorische Insuff.	kardiale Dekompensation bei NSTEMI (=Myokradinfarkt)	chron. NI, HTN
32	32	Sepsis bei Peritonitis (SBP)	Pneumonie mit Vigilanzminderung	persistierende Hepatitis B mit Aszitis, Ödemen, Dyspnoe + Leberumbau. Z.n. CLL mit Chemo (in kompletter Remission)
33	33	Pneumonie --> akute respiratorische Insuff.		Overlap systemische Sklerose/ Myositis; Lungenfibrose
34	34	Sepsis mit abdominellem Infektfokus	vorausgegangener Atemwegsinfekt, Exsikkose	Kurzdarmsyndrom nach Mesenterialinfarkt, Z.n. ANV, Z.n. Klostridienenteritis, Divertikulose, Tetraparese
35	35	intubationspflichtige Pneumonie im Rahmen der Radiatio (=Bestrahlung)		Rezidiv eines supraglottischen Larynx-Ca --> Chemo + Bestrahlung
36	36	Z.n. Rea bei STEMI + Kammerflimmern mit SIRS/ Infekt und ANV	entwickelt im Verlauf Pneumonie	HTN, DM, Vorhofflimmern, chron. NI
37	37	ARDS mit pneumonischer Sepsis ohne Keimnachweis, hoher Vasopressorbedarf		HTN, Vorhofflimmern
38	38	Neutropene Sepsis mit Nachweis gram-neg. Keime in BK	Thrombopenie	Asthma bronchiale
39	39	Pneumonie bei pulmonal metastasiertem Colon-Ca	(im Verlauf Anstieg der Infektparameter CRP + Leukos bis zum Tod)	metast. Colon-Ca

Material und Methoden

40	40	Pneumonie bei Sarkoidose	im Verlauf (7 d nach Aufnahme): Sepsis durch E.coli	Sarkoidose mit Nieren-, Leber-, Lungen-, GI-Beteiligung -> term. NI;
41	41	Sepsis mit respir. Insuff + Rea	im Verlauf Enterkolitis --> erneuter septischer Fokus, zudem Pilzsepsis mit Nachweis in BK	
42	42	Pneumonie + Pneumothorax bds. --> Sepsis mit Nachweis E. faeci- um in BK	ANV i.R. der Sepsis, CMV-Infekt	
43	45	Menigokokken-Sepsis		Asthma bronchiale, Neurodermi- tis
44	47	Pneumonie mit Nachw Pneumok- Ag + Staph. aur		ALS während Aufenthalt neu diagnostiziert
45	48	cholangiogene Sepsis bei V.a. Pankreas-Ca	Rea bei Asystolie (=Herzstillstand)	Alk.abusus, neu diagnostiziertes Bronchial-Ca
46	49	schwerer Infekt mit Fieber, grip- palen Symptomen, Petechien		
47	50	atypische Pneumonie in Neutro- penie bei Chemo + funktionellem Antikörpermangel	im Verlauf Nachweis Staph. Epi- derm. In BK	Multiples Myelom (Leichtketten- Typ kappa, IgG)mit diffusen Knochenmarksinfiltraten
48	51	pneumogene Sepsis	respir. Insuff. mit Vigilanzminde- rung; im Verlauf progrediente Sep- sis	<u>Rheumatoide Arthritis</u> mit AA- Amyloidose --> dialysepflichtige terminale NI; COPD, Z.n. Mamma-Ca
49	52	Pneumonie unter 2fach Immun- supression	respir. Insuff. + ANV bei Pneumo- nie	NTx '01; Z.n.Hodgkin-Lymphom + Hepatitis B
50	53	Pneumonie	prärenales ANV bei Exsikkose + hohen Entz.parametern; im Verlauf Influenza A + steigende Infektpa- ramter bis Tod	Mantelzelllymphom (seit'06) mit Rezidiv --> Z.n. autologer Stammzelltransplant.+ Chemo/Immunsuppression
51	55	Pneumonie	akute respir. Insuff. + ANV	terminale NI, 3x NTx, Z.n. Nephrektomie, Z.n. Hemiko- lektomie bei Kolon-Ca
52	57	Sepsis (am ehesten durch Keimeinschwemmung während Einlegung eines Stents in Gallen-		Autoimmunhepatitis --> Z.n. LTx'07, NI, Z.n. ischämischer Gallengangsläsion

Material und Methoden

		gang)		
53	58	infektexzerbierte COPD mit Atemstillstand --> Rea, respiratorischer Ins		metastasiertes Bronchial-Ca, HTN
54	59	neutropene Sepsis kurz vor Übernahme von anderer Station	Pneumonie	Plasmozytom ('09, keine Therapie), Mamma-Ca (11/10; OP), terminale NI bei Zystennieren
55	60	septische Pneumonie mit zunehmender Verschlechterung des Allg.zustands + Vigilanzmind.	Exsikkose + beginnende, Panzytopenie; Leberzirrh bei Autoimmunhep.; im Verlauf an erneuter Sepsis gestorben	Autoimmunhepatitis, chron. Bronchitis, Z.n. biliärer Pankreatitis
56	61	steigende Infektparameter bei Z.n. Rea bei Atemstillstand		KHK, terminale NI, V.a. Colon-Ca
57	62	septische Pneumonie mit ARDS unter Immunsuppression	ohne Keimnachweis, hoher CMV-Titer	seropositive <u>Polyarthrit</u> is --> <u>Immunsuppr.</u> mit Methotrexat, COPD
58	63	Sepsis mit unklarem Fokus, Vigilanzmind.	im Verlauf Pneumonie, erneute Sepsis, Pleuraempyem, Urosepsis bei Harnstauungsniere (Nachw. E.faec in BK)	terminale NI --> HD-pflichtig,
59	64	präseptisch mit Pneumonie in Neutropenie, Exsikkose, entgleiteten BZ,	im Verlauf Pleuraempyem mit Pleurektomie + Lungenteilresektion (verlegt nach Mitte)	Plasmozytom (ED'05) --> Z.n. Hochdosischemo +Radatio mit autologer SZT
60	65	Sepsis bei Z.n. Chemo bei B-CLL	akute respiratorische Verschlechterung + instabile Hämodynamik	B-CLL (ED'10), HD-pflichtige NI bei paraneoplastischer MPGN + membranöser GN
61	68	septische Kreislaufverhältnisse	NSTEMI --> CPR	
62	69	Aspirationspneumonie mit septischen Kreislaufverhältnissen	initial Aufnahme wegen Ulkusblutung; im Verlauf Reintubation bei pneumogener Sepsis + Pilzsepsis	
63	70	Sepsis bei H1N1-Inf. mit bakt. Superinfektion	H1N1-Inf. mit bakt. Superinfektion, Pneumonie; CPR bei Kreislaufstillstand am ehesten im Rahmen d. Sepsis	Nieren-Pankreas-Tx, DM I, KHK, Z.n. STEMI, pAVK bds., persistierendes Foramen ovale
64	71	pneumogene Sepsis	Pneumonie	(idiopathischer) DM, aHTN

Material und Methoden

65	72	ARDS bei Pneumonie durch H1N1-Inf	im Verlauf Candida-Sepsis	Down-Syndrom
66	73	pneumogene Sepsis mit ARDS		Z.n. E.coli-Sepsis + Pneumonie bds. (12/10), terminale NI bei diabet. Nephropathie, DM
67	74	Sepsis mit Focus Lunge (Pneumonie) DD Gallenblase		HIV; HCV, Epilepsie, Alk.abusus
68	75	Sepsis, Focus unklar: mit V.a. Urosepsis	ANV	COPD, KHK, NTx ('02)
69	76	schwerer Infekt nach CPR bei KF	CPR bei Kammerflimmern nach STEMI	
70	77	Sepsis mit unklarem Fokus: V.a. Cholangiosepsis DD Pneumonie	ANV, rezidivierende Cholangiotitiden, Influenza B	KHK
71	78	schwerer Infekt nach kardialer Dekompensation	initial Aufnahme wg. Kardial bedingter Dyspnoe	KHK, Z.n. kardialen Dekompensationen + Stauungspneumonie im Januar
72	79	cholangiogene Sepsis nach Stent-Neueinlage		chron. Pankreatitis mit Stenteinlage (PTCD)
73	80	pneumogene Sepsis: Nachw. Sprosspilze im Tracheobronchialsekret, kein Nachw. bakt. Erreger	ANV, Vigilanzmind.	B-CLL --> Chemo bis Vormonat der Aufnahme
74	81	pneumog Sepsis im Rahmen Vorphase-Chemo (mit Cytarabin)		AML
75	82	Sepsis	ANV	Z.n. AMI ('01), DM, Z.n. Staph. epid.-Sepsis
76	83	schwerstes septisches Multiorganversagen	ARDS, RPGN	Neudiagnose GPA
77	84	Sepsis bei Pneumonie + SBP	hepato-renales Syndrom bei dekompensierter Leberzirrhose	Ex-Alk.abusus,
78	85	Pneumonie	mit akuter respir. Insuffizienz	Bronchial-Ca mit ossären, Leber, Lymphknoten-, Nebennierenmetastasen; Leberzirrhose, KHK, aHTN, Hyperlipidämie

Material und Methoden

79	86	Candida-Sepsis	Cholestase + ANV, initial Behandlung wg. Ruptur Bauchaortenaneurysma mit hämorrhagischem Schock --> Kolitis --> Kolonteilresektion	
80	87	intubationspflichtiger Infekt		
81	88	Portsepsis bei Chemo (PE-Ca NNH)		Rezidiv Plattenepithel-Ca der Nasennebenhöhlen--> Radio-Chemo derzeit
82	89	septischer Schock	septisches Gerinnungsversagen, Schockleber	term. NI bei diabet./hypertensiver Nephropathie, DM, chr. VHF, Divertikulose Z.n. PankreasCa 1999
83	90	Sepsis bei Pneumonie (Pneumokokken-Ag pos.), Portinfektion + V.a. Peritonitis	progrediente respir. Globalinsuff., ANV	Rezidiv Peritoneal-Karzinose
84	91	Sepsis/ARDS unter Immunsuppression	Nachweis CMV im Vormonat der Aufnahme	seroneg. <u>Rheumatoide Arthritis</u> mit Vaskulitis
85	92	intubationspflichtige Pneumonie		Bronchial-CA --> Chemo zuletzt im Vormonat der Aufnahme; KHK, pAVK
86	93	Sepsis bei MRSA-pos. BK, Immunsuppression seit LTx		LTx ('03) aufgrund alk.toxischer Leberzirrhose, HD-pflichtige terminale NI unklarer Genese, fortgeschrittene Leberzirrhose mit portaler HTN, HTN mit hypertensiver Herzerkr,
87	94	schwerer Infekt mit septischen Kreislaufverhältnissen unter (Radiatio)	akut auf chron. NV durch mangelhafte Vol.zufuhr + Infekt	Multiple Myelom mit multiplen ossären Manifestationen--> Radio; KHK, DM
88	95	schwerer Infekt unklarer Genese, V.a. beginnende cholangiogene Sepsis	Vigilanzmind., Cholangitis	
89	96	V.a. auf akute Tracheitis + neutropenes Fieber unter Chemo	respirator. Dekompensation mit Dyspnoe + CO2-Retention	Non-Hodgkin-Lymphom der Schilddrüse --> Chemo
90	97	Urosepsis mit Nachw. ESBL + Pseudomonas im Urin	rezidiv. Pulmonale Infekte (MBL, E.cloacae im Trachealsekret) + HWIs, akut auf chron. NV, Gallen-	COPD --> LangzeitO2-th, DM II, aHTN, pulm HTN, Z.n. NET Rektum '08

Material und Methoden

			blasenempyem	
91	98	Sepsis	Hypotonie, respir. Insuff.	Rezidiv Ovarial-Ca --> Chemo bis vor 7 Monate vor Aufnahme in Studie, OPs + Portinfektion vor 1 Monat; Hypothyreose
92	99	septischer Schock bei Focus 1.) Lunge 2.) Knieempyem mit Unterschenkel-Phlegmone	Vigilanzmind.	Z.n. Ntx'00 bei term. NI; Guillan-Barré-S; HTN, pAVK, Bronchial-Ca 1988
93	100	Sepsis --> Focus: septische Einschwemmung bei ERCP		metastasiertes Ovarial-CA mit Lebermet., Peritoneal/Pleurakarzinose
94	101	EHEC-Infektion mit HUS + anurisches ANV		(keine wesentlichen Vorekrankungen)
95	102	(Aspirations-) Pneumonie/ Sepsis, Pneukokken-Antigen pos	mit ANV	
96	103	Sepsis bei E.coli-Pneumonie	initial Aufnahme wg. Rea bei KF + Asystolie, dann Entw. Pulmonaler Infekt	

2.4.2 Patientenkontrollen

Diese Kohorte zeichnet sich durch Patienten aus, die auf Grund einer Organtransplantation oder eines kardiovaskulären Ereignisses intensivmedizinisch überwacht wurden. Letzteres wirkt sich augenscheinlich auf das Verhältnis von Männern zu Frauen bei den Probanden aus: Von den 33 Personen sind 6 weiblichen Geschlechts (entspricht 18,2 %) mit einem Durchschnittsalter von $62,5 \pm 13,3$ Jahre. Männer machen (mit $n = 27$) 81,8 % der getesteten Individuen aus mit einem mittleren Alter von $60,5 \pm 12,3$ Jahre. Der Gesamterschnitt liegt bei $61 \pm 12,3$ Jahre.

Die Aufnahmediagnosen verteilen sich wie folgt: Akutes Koronarsyndrom wie akuter Myokardinfarkt und dessen Komplikationen 66,7 % ($n = 22$), Apoplex 3 % ($n = 1$). 30,3 % ($n = 10$) der Fallzahlen entfallen auf Nierentransplantierte, die innerhalb von 12 Stunden nach der Operation getestet wurden.

Soweit ersichtlich, sind zum Stand von Juni 2012 zwei Personen verstorben, dies entspricht 6 %.

2.4.3 Gesundheitskontrollen

Diese Gruppe an Probanden soll die gesunde Bevölkerung repräsentieren. Die 103 Personen teilen sich auf 57 Frauen (55,3 %) und 46 Männer (44,7 %) auf. Der Altersdurchschnitt liegt bei $39 \pm 14,5$ Jahre und unterscheidet sich bei den Geschlechtern nicht signifikant. Der Jüngste Spender ist 20 Jahre alt, der älteste 82. Trotz der Spannweite entfallen auf diese Kohorte überdurchschnittlich viele Studenten und Spender mittleren Alters im Vergleich zu den Patienten, was den Altersdurchschnitt jünger erscheinen lässt.

2.5 Methodvalidierung

2.5.1 Lagerung der Blutproben

Um die Auswirkung einer langen Lagerungszeit der Blutproben zwischen Abnahme im Krankenhaus und Bearbeitung im Labor auf den NB1-Wert herauszustellen, wurde einzelne Blutproben zwischen den Messungen 5 - 24 Stunden im Dunkeln bei vier °C gelagert. Die erste Messung der acht Proben ergab einen mittleren NB1-Prozentsatz von $56,6 \pm 19,2$ %, die Wiederholung zeigte im Mittel $56,2 \pm 18,8$ % NB1-positive Neutrophile. Abbildung 2 stellt das stabile Messergebnis für den NB1-Wert dar.

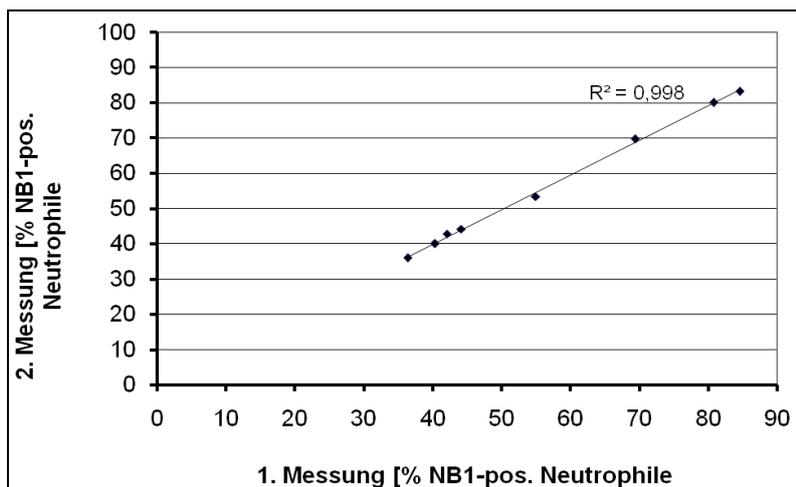


Abb. 2. Die Messwerte für den prozentualen Anteil NB1-positiver Neutrophile eines Individuums zeitnah nach der Blutentnahme sind auf der x-Achse aufgetragen. Dieselben Proben wurden bis zu 24 Stunden später nochmals Fluoreszenz-markiert, im FACS-Gerät ausgewertet und verglichen mit der vorherigen Messung (y-Achse). Der Graph veranschaulicht die Konstanz der Messergebnisse auch bei langer Lagerung der Blutproben.

2.5.2 Transport

Es erfolgten sieben Blutentnahmen gesunder Spender einmal im Labor und ein anderes Mal im Krankenhaus, um einen Einfluss der Umstände während des Transports der Blutproben von der Krankenstation zum Labor auszuschließen. Die Blutproben wurden genauso behandelt wie die von Patienten (gekühlter Transport per Fahrrad und öffentliche Verkehrsmittel). Der Abstand zwischen den Blutentnahmen betrug 1 Tag bis 2,5 Monate. Der Mittelwert der Messungen, die im Labor vorgenommen wurden, beträgt $75,0 \pm 17,9$ % NB1-positive Neutrophile. Unter Einbeziehung der Transportverhältnisse ergab sich ein mittlerer NB1-Prozentsatz von $74,3 \pm 19$ % derselben Individuen.

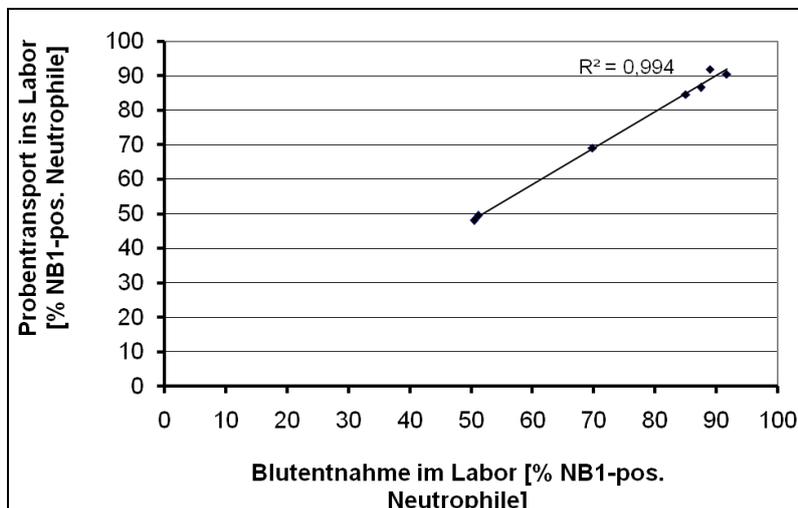


Abb. 3. Sieben Individuen wurde unter Laborbedingungen Blut entnommen und sofort per FACS-Analyse deren Anteil NB1-positiven Granulozyten bestimmt. Zu einem anderen Zeitpunkt wurde denselben Spendern auswärts Blut entnommen, dieses ins Labor transportiert und ebenso der NB1-Prozentsatz bestimmt. Die graphische Darstellung der Messpaare zeigt, dass sich FACS-Ergebnisse unabhängig sind vom Umgang mit den Proben.

2.5.3 Doppelbestimmungen

Nachstehendes Diagramm repräsentiert eine Messreihe, in der gesunden Spendern zu zwei verschiedenen Zeitpunkten Blut entnommen wurde und auf die NB1-Membranexpression untersucht wurde. Insgesamt wurden 20 Probanden auf ihren individuellen NB1-Prozentsatz getestet, der nach einem Zeitraum von 2 Wochen bis zu 1,5 Jahren auf Stabilität überprüft wurde.

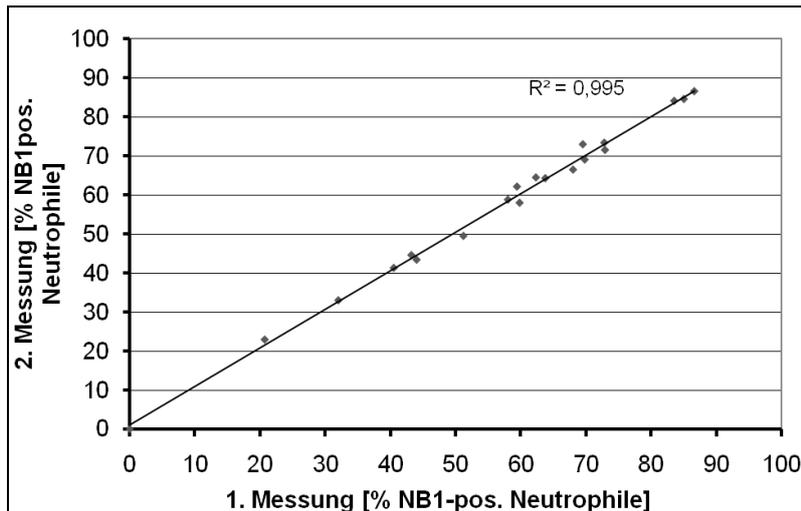


Abb. 4 Veranschaulicht die Beständigkeit der individuellen NB1-Membranexpression Neutrophiler Granulozyten unter medizinisch vergleichbaren Gesundheitsbedingungen der Spender: Auf der y-Achse sind Werte für den jeweils prozentualen Anteil NB1-positiver Neutrophile eingetragen, die die wiederholten FACS-Analysen derselben Personen nach unterschiedlich großen Zeitspannen darstellen.

Die drei Messreihen legen dar, dass der Umgang mit den Laborantien und den Blutproben unter gegebenen Transportbedingungen ordnungsgemäß ist und keinen Einfluss auf die Messergebnisse hat. Die Messungen am FACS-Gerät sind reproduzierbar und verlässlich, da alle Formen der Doppelbestimmungen eindeutig korrelieren und Abweichungen vernachlässigbar gering sind.

Eine grobe Einflussnahme der Versuchsanordnung und transporttechnische Bedingungen können daher als Störfaktor weitgehend ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der Testungen werden somit als verlässlich angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Übersicht über Anteil NB1-positiver Neutrophile und Intensität der NB1-Expression

3.1.1 Patienten

3.1.1.1 Anteil NB1-positiver Neutrophiler

Das Patientengut umfasst nach nachträglichem Ausschluss von sieben Personen, deren für die Studie unpassende Anamnesen im Methodikteil geschildert sind, 96 Patienten. Die folgenden Auswertungen analysieren folglich die Daten dieser 96 akut erkrankten Patienten.

Der in FACS-Analysen ermittelte Anteil der neutrophilen Granulozyten, die das NB1-Glykoprotein auf ihrer Zellmembran tragen, beträgt im Mittel $70,7 \pm 2,7$ %. Der kleinste Anteil beträgt hierbei ausgenommen der Nicht-Exprimierer 13 %, der Maximalwert 97,7 %, der Median liegt bei 78,6 %. Der berechnete Wert für die Schiefe (-1,045) im Shapiro-Wilk-Test deutet auf eine linksschiefe Verteilung hin, sodass eine Nicht-Normalverteilungsverteilung besteht ($p < 0,05$). In der graphischen Darstellung (Abbildung 5a) erkennt man die bevorzugten Klassen von 80 bis 89 % und 90 bis 100 %, in denen insgesamt 47 Patienten beziehungsweise 49 % der Patienten liegen.

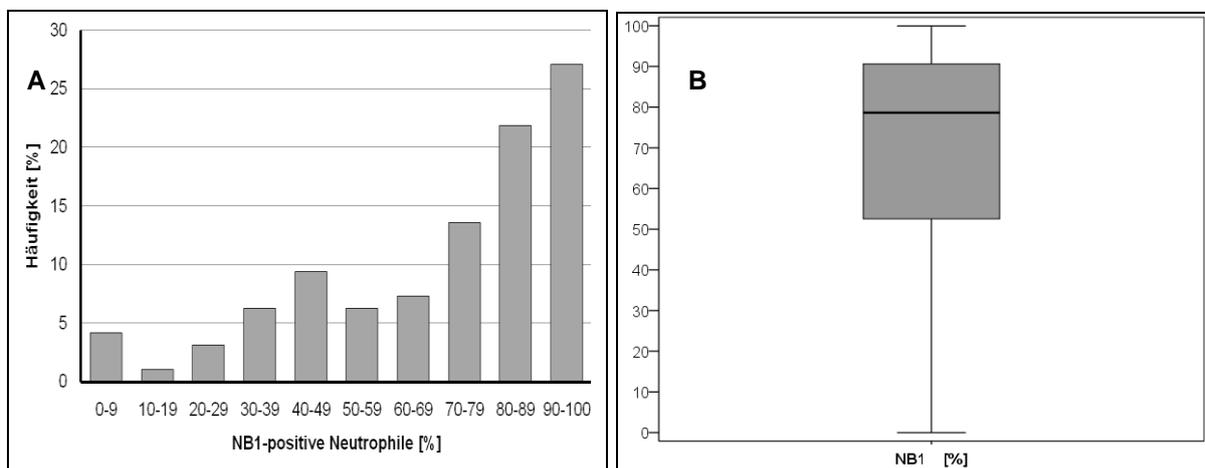


Abb. 5. Anteil NB1-pos. Neutrophile bei Patienten. **(A)** Verteilung der NB1-Prozentsätze bei 96 Patienten mit septischem Krankheitsbild. Bei der Unterteilung in 10 Gruppen (0-9%, 10-19% etc. NB1-pos. Neutrophile) erkennt man das gehäufte Auftreten von Prozentsätzen ab 80% NB1-pos. Neutrophilen der akut Erkrankten. **(B)** Boxplot für die Verteilung des Anteils NB1-pos. Neutrophile in der Patientenkohorte. Erkennbar ist der Median, der bei knapp 80% liegt, das 1. Quartil bei 52% u. das 3. Quartil bei 91%. Vertretene Werte reichen von 0-100%.

Von $n=96$ Patienten konnte bei vier Personen das NB1-Glykoprotein nicht nachgewiesen werden, dies entspricht 4,2 %.

Ergebnisse

Betrachtet man die NB1-Expression getrennt für männliche und weibliche Patienten, fällt eine intergeschlechtliche Differenz von 11,3 Prozentpunkten (66,2 % vs. 75,5 %) hinsichtlich des Anteils NB1-exprimierender Granulozyten auf (Abbildung 6a), welcher statistisch nicht signifikant ist ($p > 0,05$). Ebenso wenig unterscheiden sich die mittleren Fluoreszenzintensitäten von männlichen und weiblichen Patienten (durchschnittlich 959,0 vs. 1018,8) voneinander ($p > 0,05$; s. Abbildung 6b). Somit kann von einem intergeschlechtlichen Unterschied hinsichtlich der Anzahl der NB1-Molkeüle pro Neutrophilem bei den rekrutierten Patienten abgesehen werden.

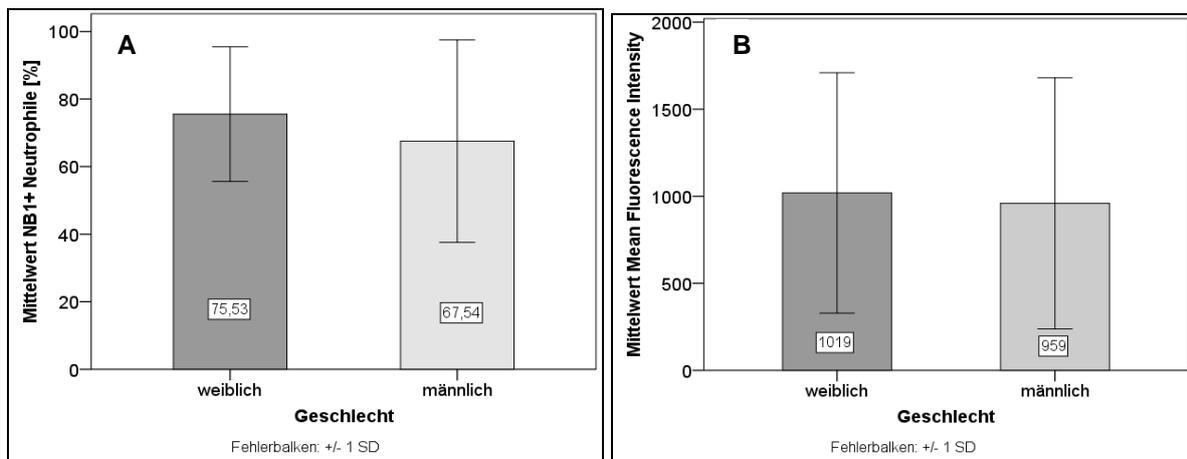


Abb. 6. Geschlechtsspezifische NB1-Expression. **(A)** Balkendiagramm zur Verdeutlichung der NB1-Prozentsätze bei Männern u. Frauen. Es liegt kein signifikanter Unterschied vor (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,4$). **(B)** Vergleichende Darstellung der NB1-Expression pro neutrophilem Granulozyt zwischen weiblichen u. männlichen Patienten. Statistisch unterscheiden sich die Gruppen nicht (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,6$).

3.1.1.2 Intensität der NB1-Expression

Die Auswertung der gemessenen Intensität der NB1-Expression als mittlere Fluoreszenzstärke (MFI) ergibt einen Mittelwert von $982,7 \pm 72,1$ für die Patientengruppe. Der Median der Messergebnisse ist bei 803 zu finden, das Maximum bei 3000. Die kleinste gemessene Fluoreszenzintensität der Patienten, die NB1 auf ihren Neutrophilen exprimieren, beträgt 35. Auch hier liegt keine Normalverteilung vor (Shapiro-Wilk-Test: $p < 0,05$). Zwei Patienten mit jeweils einer MFI von 3000 sind in der Abbildung 7b als Ausreißer mit den Nummern 7 (PKZ 7) und 91 (PKZ 98) markiert.

Ergebnisse

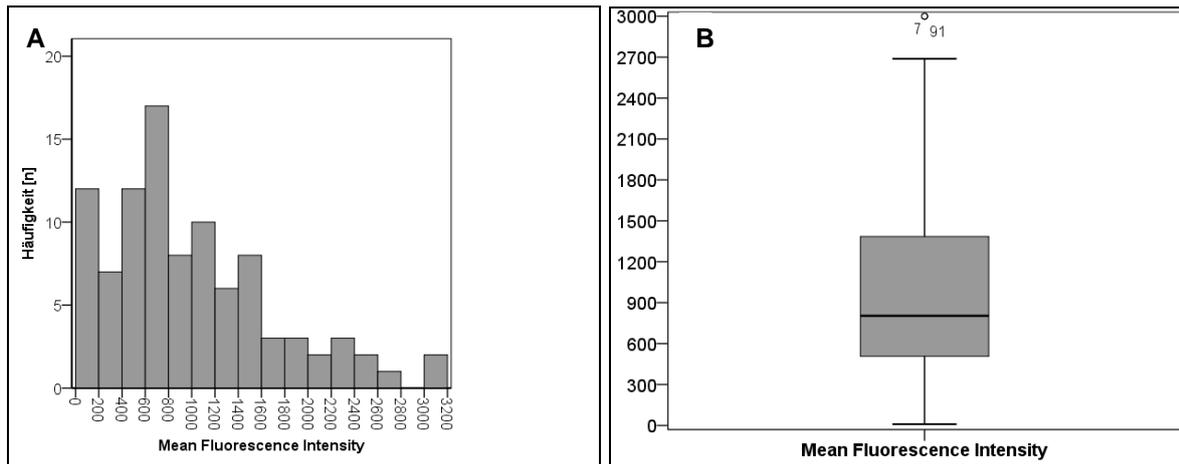


Abb. 7. (A) Intensität der NB1- Expression der Patienten. Der Balken der Klasse 600-800 verdeutlicht die verhältnismäßig hohe Ausprägung in diesem Bereich. **(B)** Boxplot der NB1-Expression pro Neutrophilem, dargestellt als Mittlere Fluoreszenzintensität. Der Median ist bei 803 zu erkennen. Es liegt eine große Spannweite des Wertebereichs vor mit 0 bis 3000. Die Interquartilsbreite beträgt 888,3.

3.1.1.3 Beziehung zwischen Anteil NB1-positiver Neutrophile und Fluoreszenzstärke

Das folgende Diagramm (Abbildung 8) stellt die Wechselbeziehung zwischen dem NB1-Prozentsatz und der Fluoreszenzintensität, die auf dem Niveau 0,01 signifikant korreliert, dar. Der Korrelationskoeffizient ergibt 0,7.

Je höher demnach der Anteil NB1-positiver Neutrophile ist, desto mehr NB1-Moleküle findet man gleichzeitig auf der Plasmamembran der einzelnen Zellen.

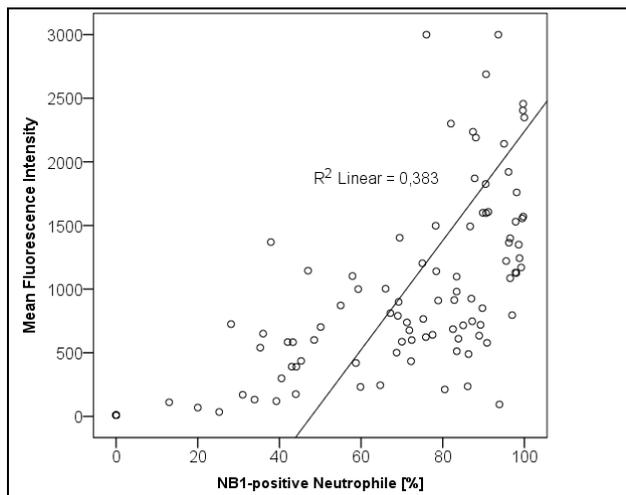


Abb. 8. Abhängigkeit der Intensität der NB1-Expression pro Neutrophilem (MFI) vom Anteil NB1-exprimierender Granulozyten. Mit steigendem Prozentsatz NB1-positiver Neutrophile erhöht sich entsprechend die parallel gemessene Fluoreszenzintensität.

Ergebnisse

3.1.1.4 Zweitbestimmungen der Non-Expriemierer

Unter den Patienten fanden sich vier Individuen, auf deren Zelloberfläche der Neutrophilen kein NB1-Protein per FACS-Analyse nachzuweisen ist. Es wurde jeweils eine Kontrollmessung im Abstand von ein bis vier Wochen durchgeführt, um erneut die NB1-Expression zu prüfen. Bei einem von insgesamt zwei Non-Expriemieren aus der Kohorte der gesunden Spender konnte ebenso eine Kontrollmessung durchgeführt werden. Bei keiner der untersuchten Personen kam es im Verlauf zu einer Oberflächenexpression des Neutrophilenantigens. Die Messwerte sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 4. Zweitmessungen der Non-Expriemierer. Sowohl ein gesunder Spender (HC) als auch vier Patienten (PKZ 27 - 68) in unterschiedlichem Gesundheitszustand exprimieren keine NB1-Glykoproteine auf der Zelloberfläche ihrer Neutrophilen im zeitlichen Verlauf.

	NB1 % 1)	NB1 % 2)	MFI 1)	MFI 2)
HC	0,0	0,0	9,5	9,6
PKZ 27	0,0	0,0	9,4	10,4
PKZ 45	0,0	0,0	9,8	10,4
PKZ 48	0,0	0,0	10,5	10,5
PKZ 68	0,0	0,0	9,9	9,7

Ergebnisse

3.1.2 Patientenkontrollen

Die Messungen für den Anteil NB1-positiver Neutrophile ergaben als Mittelwert $56 \pm 3,6$ % mit einem kleinsten Anteil von 14,4 % und einem größten von 94,6 %. Der Median liegt bei 56,9 %. Personen mit einer NB1-Defizienz wurden nicht beobachtet.

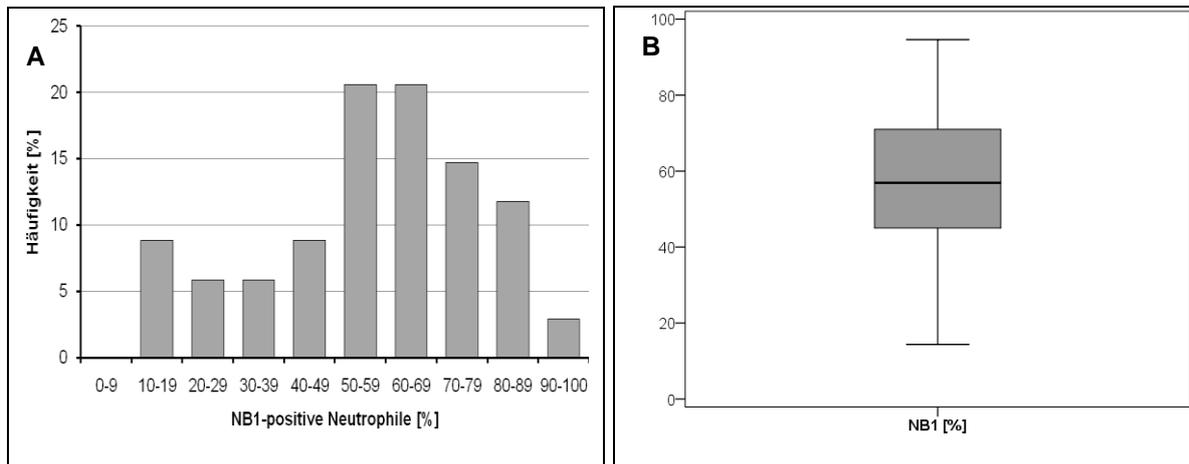


Abb. 9. Anteil NB1-pos. Neutrophile. **(A)** Verteilungsmuster der NB1-Prozentwerte der Patientenkontrollen. Mit insgesamt 57% dominieren die Gruppen 50 - 59%, 60 - 69% und 70 - 79%. Non-Expriemierer wurden unter den insg. 33 Probanden dieser Kontrollkohorte nicht gefunden. **(B)** Boxplot für die Verteilung des Anteils NB1-pos. Neutrophile der Kontrollkohorte. Der Median liegt bei knapp 60%. Vertretene Werte reichen von 14,4 - 94,6%.

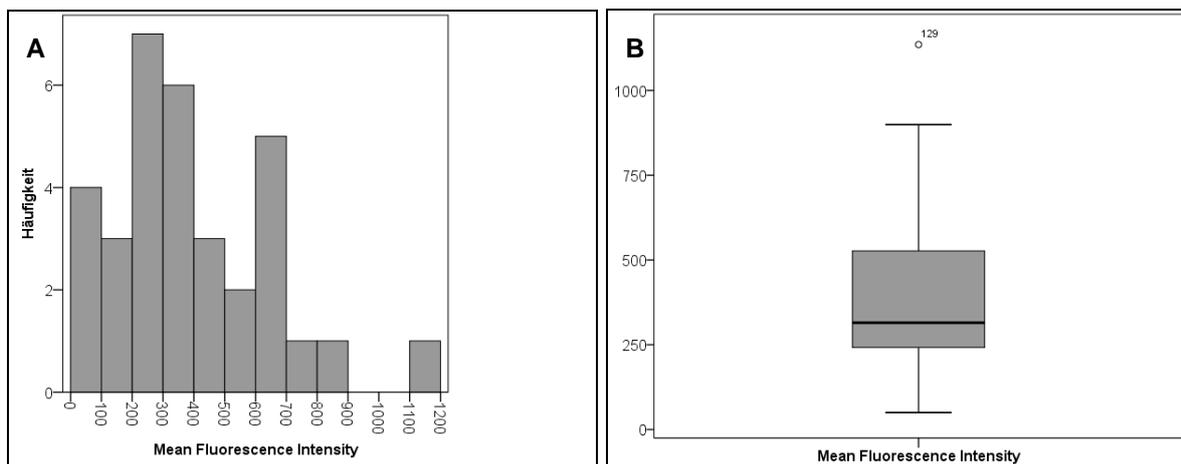


Abb. 10. Intensität der NB1- Expression der Patientenkontrollen. **(A)** Häufigkeitsverteilung der mittleren Fluoreszenzintensität der Kontrollpatienten, unterteilt in Abständen von 100. Die Balken der Klassen 200-400 und 600-700 verdeutlichen die verhältnismäßig hohe Ausprägung in diesem Bereich. Werte für die MFI über 700 werden nur selten registriert. **(B)** Boxplot für die Verteilung des Anteils NB1-positiver Neutrophile in der Patientenkohorte. Erkennbar ist der Median, der bei circa 300 liegt, das 1. Quartil bei knapp 250 und das 3. Quartil bei 515. Vertretene Werte reichen von 40 - 895.

Ergebnisse

Die mittlere Fluoreszenzintensität beträgt für alle 33 Patientenkontrollen $394 \pm 44,4$, wobei der Median bei 315 zu finden ist. Die kleinste gemessene MFI liegt bei 50, die größte bei 1135. Letztere stellt in der Abbildung 10 den Ausreißer mit der Nummer 129 dar.

Der Vollständigkeit halber sind klinische und paraklinische Parameter als Übersicht in einer Tabelle (Tabelle 5) gelistet. Auf eine weitergehende Analyse und expliziten Vergleich mit der Patientenkohorte wird im Einzelnen verzichtet, da dies nicht der Fragestellung der vorliegenden Arbeit entspricht.

Tabelle 5. Laborchemische Werte sowie ITS-Scores der Patientenkontrollen

	Mittelwert \pm SD	Minimum	Maximum
CRP [mg /dl]	$2,6 \pm 3,7$	0,06	14,1
Leukozyten [/nl]	$12,2 \pm 4,3$	5,7	24,1
Thrombozyten [/nl]	$215 \pm 68,4$	107	376
Hämoglobin [g /dl]	$12,1 \pm 2,3$	7,5	16,3
Kreatinin [mg /dl]	$2,5 \pm 2,3$	0,53	8,66
INR	$1,1 \pm 0,2$	0,89	2,2
APACHE II-Score	$16,6 \pm 8,1$	7	38
SOFA-Score	$3,75 \pm 2,3$	0	6

3.1.3 Gesundkontrollen

Die Größe der Subpopulation NB1-exprimierender Neutrophiler beträgt im Mittel $57,1 \pm 2$ %, wobei der Median bei 61 % liegt. Der kleinste ermittelte Anteil NB1-positiver Granulozyten der Gesundkontrollen ergab 20,4 %, der größte 91%. Bei drei Personen von insgesamt 101 untersuchten gesunden Spendern wurde eine NB1-Defizienz festgestellt werden. Dies entspricht 3 %. Die Graphik (Abbildung 11) veranschaulicht die im Vergleich zu den anderen bevorzugte NB1-„Klasse“ von 60 bis 69 %, in der 22 Personen oder 21,4 % der gesunden Probanden anzusiedeln sind. Die Hälfte (50,5 %) der Probanden liegen summarisch in dem Prozentbereich von 40 bis 69 %. Männliche mit durchschnittlich 56 % und weibliche Testpersonen mit 59 % unterscheiden sich hinsichtlich der Größe der NB1-positiven Subpopulation nicht signifikant.

Ergebnisse

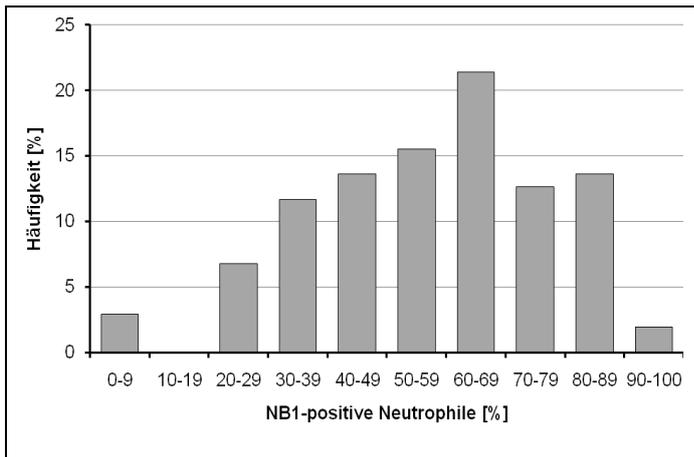


Abb. 11. Verteilung der NB1-Prozentsätze der 103 gesunden Spender. Bei der Unterteilung in 10 Gruppen (0-9 %, 10-19% etc. NB1-positive Neutrophile) erkennt man die Hauptverteilung bei Prozentsätzen zwischen 40 und 69%, in denen die Hälfte der Gesundkontrollen aufgeteilt ist.

Die mittlere Fluoreszenzstärke der gesunden Probanden ergibt $267 \pm 20,5$, der Median 198. Abgesehen von den nicht-Exprimierenden fand sich ein Minimum 32 und eine Maximalwert für die MFI von 1000. Drei Spender sind im Boxplot in Abbildung 12 (B) als Ausreißer dargestellt mit einer jeweiligen MFI von 779, 785 und 1000.

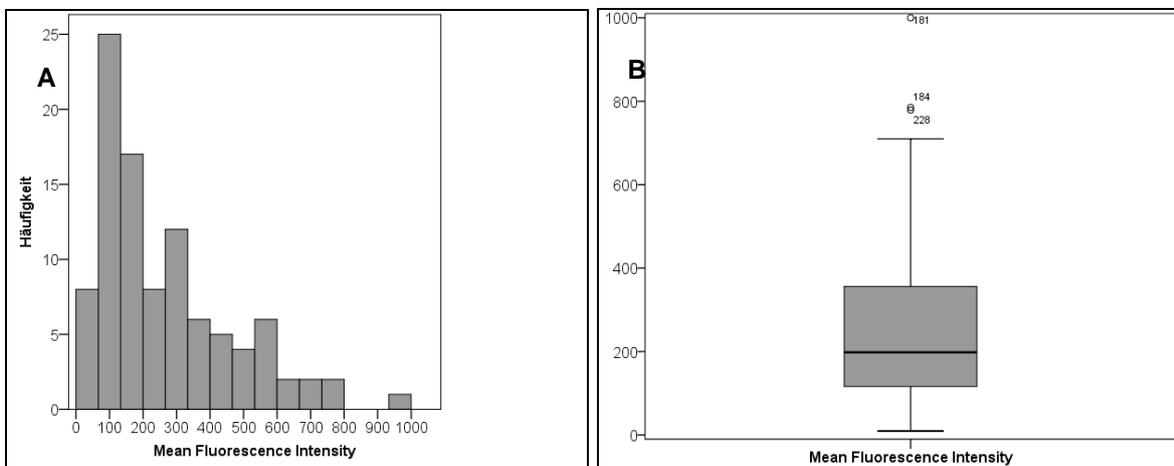


Abb. 12. Intensität der NB1- Expression der Gesundkontrollen. **(A)** Häufigkeitsverteilung der mittleren Fluoreszenzintensitäten, die bei der Analyse im FACS-Gerät für die einzelnen gesunden Probanden gemessen wurden. Während bei septischen Patienten eine hohe Ausprägung um den Bereich 600 - 800 und Maximalwerte um 3000 registriert wurden, konzentrieren sich die MFI-Werte bei dieser Kohorte im unteren Bereich. Die Hälfte der Fluoreszenzintensitäten ist bis 300 verteilt. **(B)** Boxplot der mittleren Fluoreszenzintensität der insgesamt 103 Gesundkontrollen. Der Median liegt bei 198, der Interquartilsabstand beträgt etwa 250. Die insgesamt drei Ausreißer sind mit der Ziffer 228 (HC Nr. 98, MFI: 779), 184 (HC Nr. 54, MFI: 785), und 181 (HC Nr. 51, MFI:1000) kenntlich gemacht.

3.2 Vergleich der Kohorten

3.2.1 Vergleich der NB1-Expression zwischen Patienten und Kontrollkohorten

Die statistische Testung ergab jeweilig, dass die Größe der Subpopulation NB1-exprimierender Neutrophiler bei Patienten mit schweren Infektionen höchst signifikant gesteigert ist im Vergleich zu gesunden Spendern und zu Kontrollpatienten ($p \leq 0,001$). Hingegen unterscheiden sich die Mittelwerte der Patienten- und Gesundkontrollen für den prozentualen Anteil NB1-positiver Granulozyten statistisch nicht ($p = 0,77$).

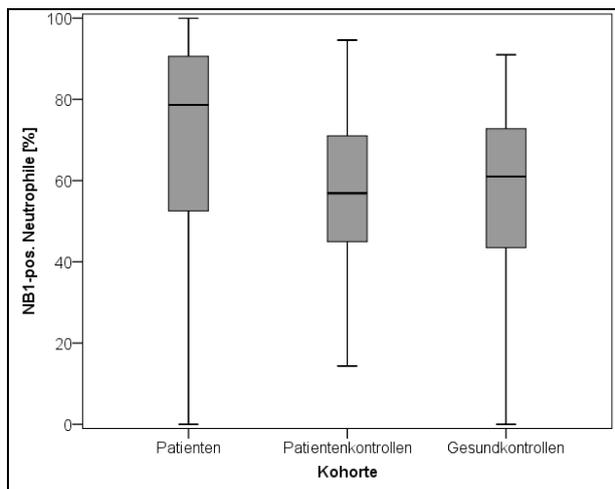


Abb. 13. Vergleichende Boxplot-Darstellung der drei Kohorten. Die Verteilung des prozentualen Neutrophilenanteils, der das NB1-Antigen exprimiert, ist bei septischen Patienten deutlich im oberen Bereich gelegen. Statistisch sind die Werte für diese Kohorte signifikant höher im Vergleich zu den Patientenkontrollen und gesunden Probanden (jeweils $p \leq 0,001$)

Ergebnisse

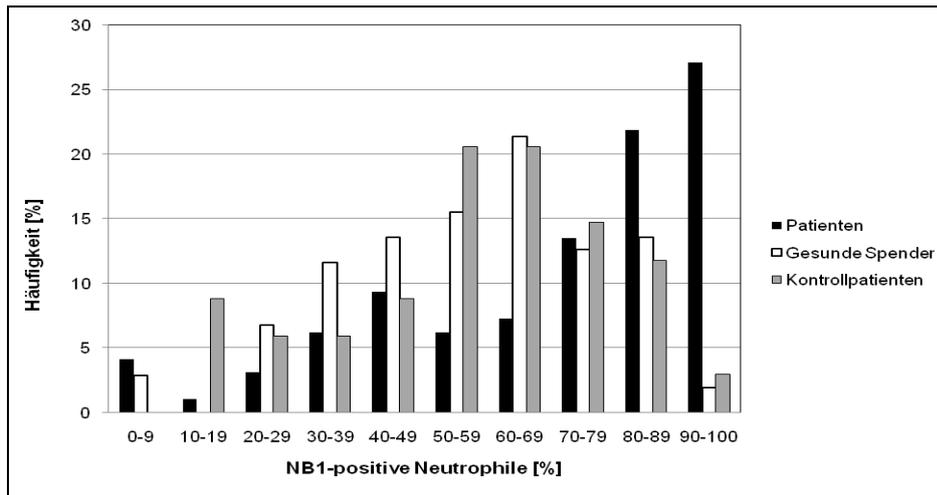


Abb. 14. Verteilung des NB1-Werts in den drei Kohorten als kombiniertes Balkendiagramm. NB1-Prozentsätze sind in 10 Gruppen (0 - 9 %, 10 - 19 % etc.) unterteilt. Die schwarzen Balken reflektieren die Werte der septischen Patienten, die im Gegensatz zu beiden Kontrollkohorten im Bereich 80 - 100 % gipfeln. Die höchste Dichte der NB1-Prozentsätze der Kontrollpatienten sowie gesunder Probanden findet sich im Bereich 50 - 70 % wieder und kommen eher einer Normalverteilung nahe. Auch rechnerisch ist der Mittelwert der Patientengruppe im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen statistisch höchst signifikant erhöht (jeweils $p \leq 0,001$).

Die statistische Prüfung ergab weiterhin, dass sich die mittlere Fluoreszenzintensität der Patientenkohorte ($982,7 \pm 72,1$) gegenüber der Gruppe der Patientenkontrollen (394 ± 44) und der gesunden Probanden ($267 \pm 20,5$) höchst signifikant unterscheidet (jeweils $p < 0,001$). Die mittlere Fluoreszenzintensität der Kontrollpatienten ist sehr signifikant höher ($p = 0,006$) als die der gesunden Spender.

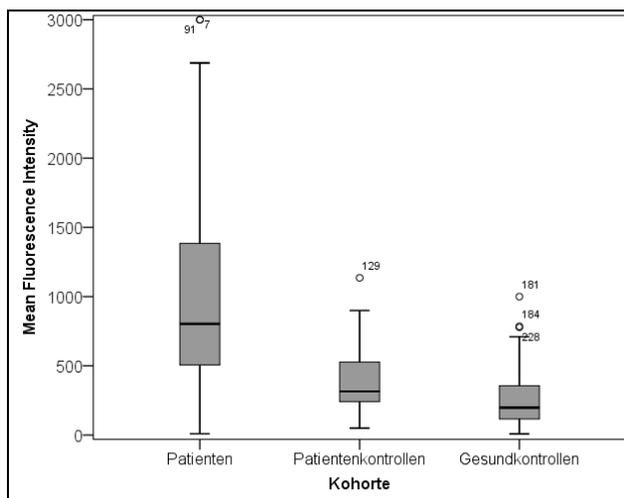


Abb. 15. Vergleichende Boxplot-Darstellung der Verteilung der mittleren Fluoreszenzintensität der drei Studiengruppen. Median und Gesamtverteilung der Patientenkohorte (linke Box) liegen graphisch und statistisch in signifikant höheren Bereichen als bei den Patientenkontrollen (mittlere Box) und gesunden Probanden (rechte Box); jeweils $p < 0,001$.

Ergebnisse

Tabelle 6. Übersicht der Mittelwerte zum prozentualen NB1-positiven Neutrophilenanteil und mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der drei Studiengruppen.

	Patienten	Patientenkontrollen	Gesunde Spender
NB1% MW ± SEM	70,7 ± 2,7 %	56 ± 3,6 %	57,1 ± 2 %
MFI MW ± SEM	982,7 ± 72,1	394 ± 44,4	267 ± 20,5

3.2.2 Ausgewählte klinische Parameter zum Vergleich der Patienten und Patientenkontrollen

Beim Vergleich der Entzündungsparameter der Kohorten fällt eine höchst signifikante Differenz im CRP auf, das bei den Patienten mit $22,5 \pm 11,3$ mg/ dl im Mittel deutlich höher ist als bei den Patientenkontrollen (Mittelwert $2,6 \pm 3,7$ mg/ dl; $p < 0,001$), dem gegenüber ist der Unterschied bei den Leukozytenzahlen nicht signifikant ($14,5$ /nl ± 8 vs. $12,2 \pm 4,3$ /nl; $p = 0,34$). Die Werte für Hämoglobin ($9,8 \pm 1,5$ g/ dl vs. $12,1 \pm 2,3$ g/ dl; $p < 0,001$) und den INR ($1,6 \pm 0,7$ vs. $1,1 \pm 0,2$; $p < 0,001$) unterscheiden sich statistisch signifikant zwischen den Kohorten.

3.3 Zweizeitige Messungen der Patienten

Insgesamt war bei zwei Drittel (63 von 96 Personen beziehungsweise 66,7 %) der Patienten eine wiederholte Überprüfung der NB1-Expression und Laborwerte möglich. Die restlichen 32 Patienten sind entweder verstorben, wurden in periphere Krankenhäuser verlegt oder entlassen, bevor eine erneute Testung sinnvoll war (ein Zeitraum von einer Woche wurde als Mindestabstand zwischen zwei Blutentnahmen vorausgesetzt).

Um zu überprüfen, ob die Expression des NB1-Glykoproteins und der Anteil NB1-exprimierender Neutrophile mit Änderung des Gesundheitszustands eines Individuums alteriert, wurden die weiterhin beobachteten Patienten bei offensichtlicher Veränderung des Allgemeinzustands erneut auf ihre NB1-Expression überprüft und je nach Besserung oder Verschlechterung ihres Zustands in Gruppen unterteilt. Können bei einem Patienten während eines längeren Verlaufs verschiedene Gesundheitszustände mit mehr als zwei Blutentnahmen koordiniert werden, so wird dieser auch in jeweils beide Analysegruppen aufgenommen; in der vorliegenden Arbeit trifft dies auf 14 Patienten zu.

3.3.1 Patienten mit klinischer Besserung des Gesundheitszustands

Von den Patienten, bei denen im Verlauf die Durchführung mindestens einer weiteren Blutentnahme möglich war, konnten 33 durch das klinische Erscheinungsbild und fallende Entzündungsparameter der Phase der Genesung zugeordnet werden. NB1-non-Expriemierer werden hierbei nicht betrachtet, da keine Veränderung der Expression zu erwarten ist. Deutlich macht der fallende durchschnittliche CRP-Wert dieser Gruppe von initial 21,8 mg/ dl auf 3,5 mg/ dl (entspricht - 84 %) bei der letzten Blutentnahme, dass sich die Personen in Rekonvaleszenz befinden. Daneben verringerten sich auch die Leukozyten von 11,8 /nl auf 8,6 /nl (- 27 %). Unter diesen Bedingungen konnte ein mittlerer NB1-Prozentsatz von 65 % in der Remissionsphase der Patienten registriert werden, der eingangs durchschnittlich 73,2 % betrug. Dies kommt einer Verringerung um 11,5 % gleich. Die Fluoreszenzstärke fällt um 52,3 % von 950,4 auf 453,4.

An dieser Stelle möchte ich zur Unterstützung dieser Daten einen Beispielpatienten darstellen. Der Patient mit der PKZ 16 wurde im septischen Zustand, invasiv beatmet und katecholaminpflichtig in die Studie aufgenommen. Die FACS-Analysen ergaben für den NB1-Prozentsatz 90,8 %, für die MFI 578. In der sich anschließenden Beobachtungsphase wurde eine zweite Messung nach 10 Tagen und eine dritte nach insgesamt 17 Tagen vorgenommen, die 76,6 % NB1-positive Neutrophile, eine MFI von 364,3 erbrachten beziehungsweise 52,4 % und 140,9. Das CRP fiel von initial 33 mg/ dl auf 23 mg/ dl beziehungsweise 16 mg/ dl. Auch klinisch besserte sich der Gesundheitszustand des Patienten bis zur Verlegung auf eine periphere Station nach 39 Tagen ITS-Aufenthalt. Bei einem anderen Patienten (PKZ 71) verringerte sich der Anteil NB1-positiver Neutrophile von 47 % auf 39,1 %, die MFI von 1145 auf 265 innerhalb von acht Tagen. Gleichzeitig verringerte sich das CRP von 32,7 mg/ dl auf 1,5 mg/ dl. Auch hier erkennt man die Parallelität von inflammatorischem Geschehen und NB1-Expression.

Ergebnisse

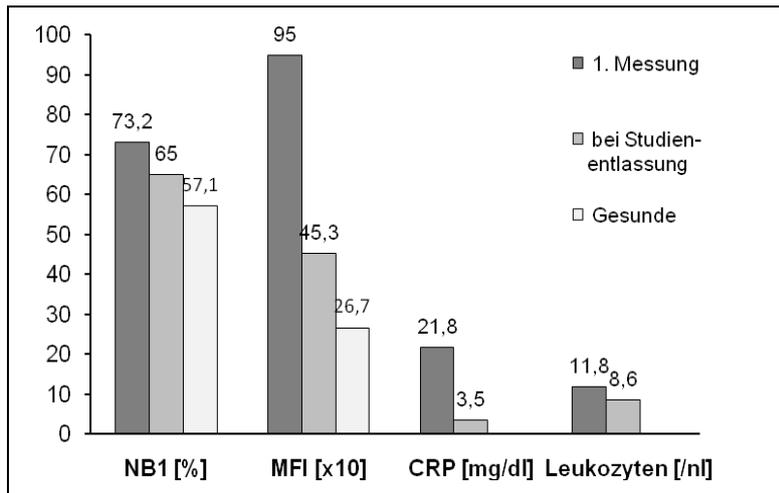


Abb. 16. Veränderung der Werte für den NB1-positiven Neutrophilenanteil (NB1), die mittlere Fluoreszenzstärke (MFI), C-reaktives Protein (CRP) und Leukozytenzahl bei Patienten, die mit einer Rekonvaleszenz aus der Studie entlassen wurden (dunkelgraue Balke = Werte bei Aufnahme, hellgraue Balke = Werte bei Entlassung). Zum Vergleich sind NB1- und MFI-Höhe der gesunden Kontrollgruppe als weiße Balken mit abgebildet. Der Übersichtlichkeit wegen ist die mittlere Fluoreszenzstärke um eine Zehnerereinheit gekürzt angegeben.

3.3.2 Patienten mit anhaltender Krankheitsaktivität

In diese Kategorie fallen Patienten, die unter Exazerbation ihrer Erkrankung oder in persistierend kritisch physischem Zustand einer neuerlichen Überprüfung ihrer NB1-Expression unterzogen wurden. Unter dieser Konstellation summiert sich die Anzahl der Patienten auf 27.

Die mittleren CRP-Werte von 23,1 mg/ dl bei Studienaufnahme und 20,2 mg/ dl bei wiederholter Blutentnahme spiegeln den anhaltenden schweren Krankheitszustand wider. Ebenso zeigen die Leukozytenzahlen diesen Trend an: im Durchschnitt 15,8 /nl in der ersten Untersuchung und 14,2 /nl bei weiterer Beobachtung.

Betrachtet man die Ergebnisse aus den FACS-Analysen für den Prozentsatz der NB1-Expression und die Fluoreszenzintensität, fällt eine dezente Zunahme der Beiträge auf. In der ersten Bestimmung bilden NB1-exprimierende Granulozyten im Mittel 70,2 % der Neutrophilen der Patienten. Der Anteil erhöht sich um 3,4 % auf 72,6 %. Eine ähnliche Steigerung (3 %) ist bei der Fluoreszenzstärke zu verzeichnen mit Erhöhung von initial 933 auf 961.

Exemplarisch für diese Gruppe sei Patient Nummer 80 genannt. Dieser unterlag über 10 Tage einem septischen Krankheitsgeschehen mit durchgehend hohen Infektparametern um 30 mg/ dl CRP und verstarb letztlich. Der Prozentsatz an NB1-positiven Neutrophilen stieg dabei von 87,8 % auf 95 % bei der zweiten Untersuchung:

Ergebnisse

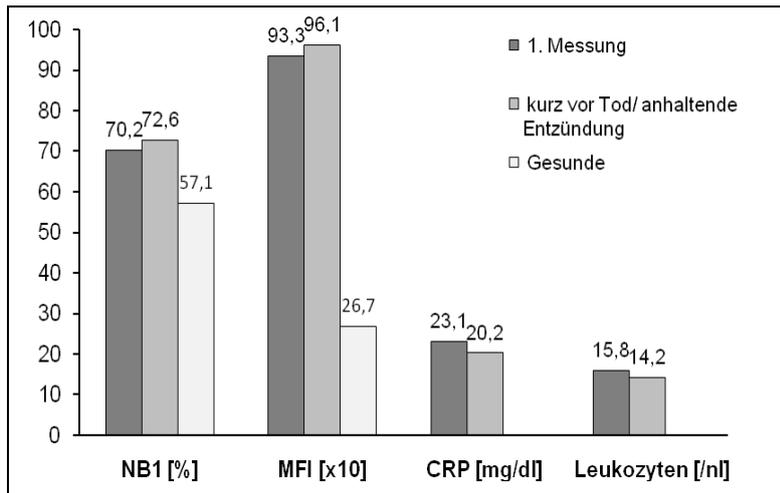


Abb. 17. Veränderung der Werte für den NB1-positiven Neutrophilenanteil (NB1), die mittlere Fluoreszenzstärke (MFI), C-reaktives Protein (CRP) und Leukozytenzahl bei Patienten, die eine klinische Verschlechterung erfuhren, und im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe für die ersten beiden Parameter.

Der Übersichtlichkeit wegen ist die mittlere Fluoreszenzstärke um eine Zehnereinheit gekürzt dargestellt.

3.3.2.1 Ausbildung einer Sepsis

Ein Proband der Kontrollpatientenkohorte (Nummer DC 17) wurde nach Reanimation bei Kammerflimmern in die Studie eingeschlossen mit einem CRP von 0,07 mg/ dl. FACS-Analysen ergaben einen NB1-Prozentsatz von 52,3 % und eine MFI von 390. Bei der ersten Verlaufskontrolle nach sechs Tagen wies der Patient steigende Infektparameter auf (CRP: 8,54 mg/ dl), zeitgleich erhöhte sich der NB1-positive Neutrophilenanteil auf 74 %, die MFI auf 803. Nach weiteren 11 Tagen Krankenhausaufenthalt war selbiger Patient im septischen Zustand anzutreffen mit weiterhin steigenden Infektparametern (CRP 33,7 mg/ dl; Procalcitonin 49 µg/ l) bei einer gesicherten E.coli-Pneumonie mit Pleuraempyem und einem konsekutiv gemessenen NB1-Prozentsatz von 83,4 % und einer mittleren Fluoreszenzintensität von 1098. Nach Anschlagen der antiinfektiösen Therapie verringerte sich der Anteil NB1-positiver Granulozyten des Patienten auf knapp 58 %, die MFI auf 440.

Es zeigt sich somit entsprechend zur Entwicklung der klinischen und laborchemischen Infektion ein kongruenter NB1-Prozentsatz und eine gleichsam veränderte Fluoreszenzstärke (MFI) in den FACS-Messungen.

Ergebnisse

Abbildung 18 und 19 zeichnen den Krankheitsverlauf des Patienten mit zugehörigen Ergebnissen der FACS-Analysen nach:

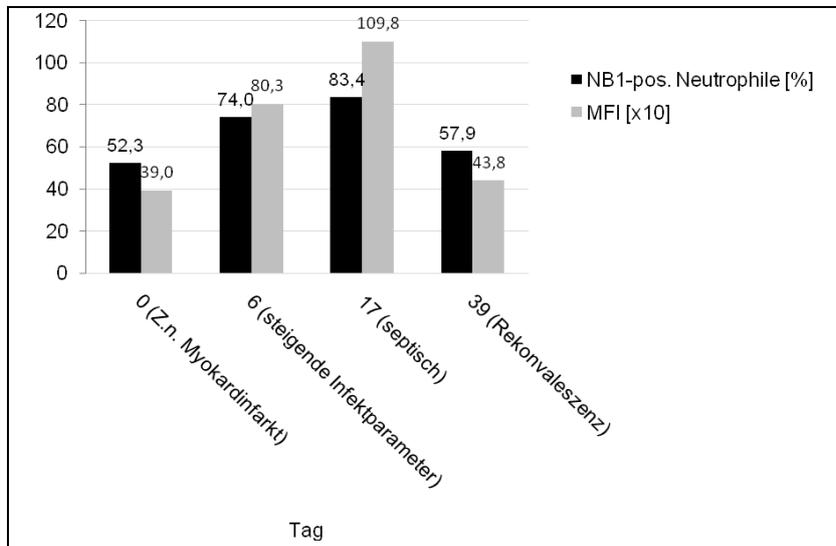


Abb. 18. Verlauf des NB1-Prozentsatzes und der MFI bei einem Patienten der Krankkontrollgruppe, der im Verlauf seines Krankenhausaufenthalts eine Sepsis entwickelte (Tag 17). Parallel dazu waren ein steigender Anteil NB1-positiver Neutrophile (schwarze Balken) und eine zunehmende Fluoreszenzintensität (graue Balken) messbar. Mit Abklingen der Infektion näherten sich beide Werte wieder dem Ausgangsniveau.

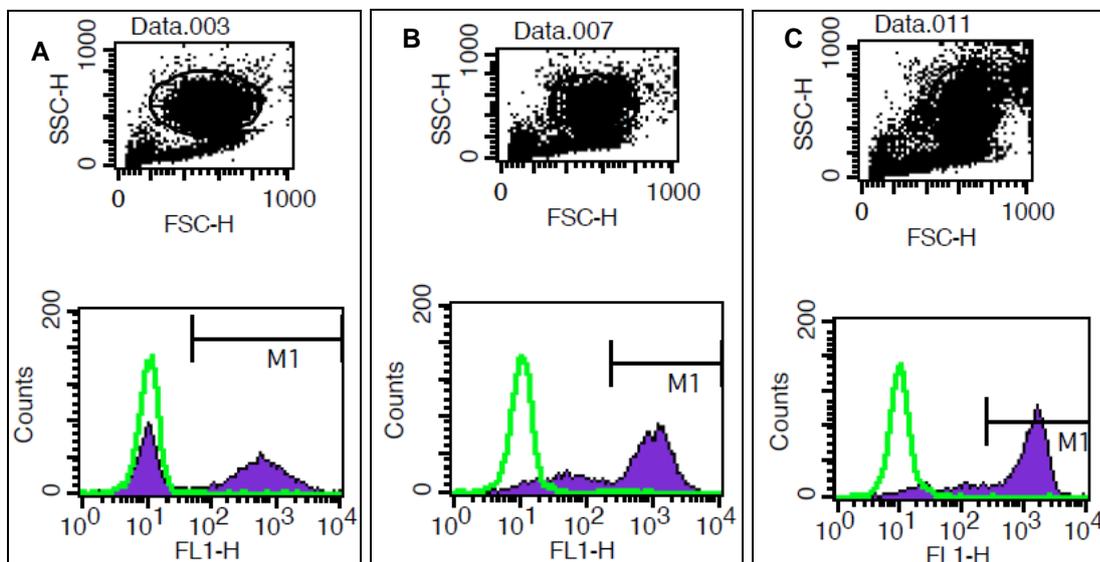


Abb. 19. FACS-Analysen des Patienten zum Zeitpunkt der Studienaufnahme Tag 0 mit 52,3 % NB1-pos. Neutrophilen **(A)**, im Zeitraum steigender Infektparameter Tag 6 mit 74 % **(B)** und im septischen Krankheitszustand Tag 17 mit weiterhin gestiegenem NB1-positivem Neutrophilenanteil von 83,4 % **(C)**.

3.4 Stimulierungsversuche

Die im Labor durchgeführte ex vivo-Inkubation von Neutrophilen gesunder Spender in Vollblut und isolierten Neutrophilen (PMNs) mit TNF- α erwirkte eine Zunahme der Fluoreszenzintensitäten in der FACS-Messung. Aus einer Reihe von 6 Versuchen konnten im Gesamtdurchschnitt Werte für die MFI bei Neutrophilen aus dem Vollblut von 572 vor dem Priming gemessen werden, die sich nach der Behandlung mit TNF- α auf 1191,5 erhöhten. Dies entspricht einer Zunahme um durchschnittlich 120 %. Die Inkubation von purifizierten Neutrophilen der gleichen Blutprobe ergab eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität (MFI) von im Mittel 433,3 auf 1052 nach Priming mit TNF- α , was einer prozentualen Steigerung um circa 174 % gleichkommt.

Anhand der FACS-Analysen ist ersichtlich, dass sich nur die MFI der NB1-positiven Subpopulation hin zu höheren Werten verschiebt, während bei den NB1-negativen Neutrophilen keine Veränderung wahrzunehmen ist.

Der Prozentsatz an NB1-positiven, anti-NB1-FITC-markierten Neutrophilen bleibt auch bei Aktivierung der Immunzellen durch das Zytokin konstant. Die folgende Abbildung veranschaulicht ein repräsentatives Exempel der Messreihe.

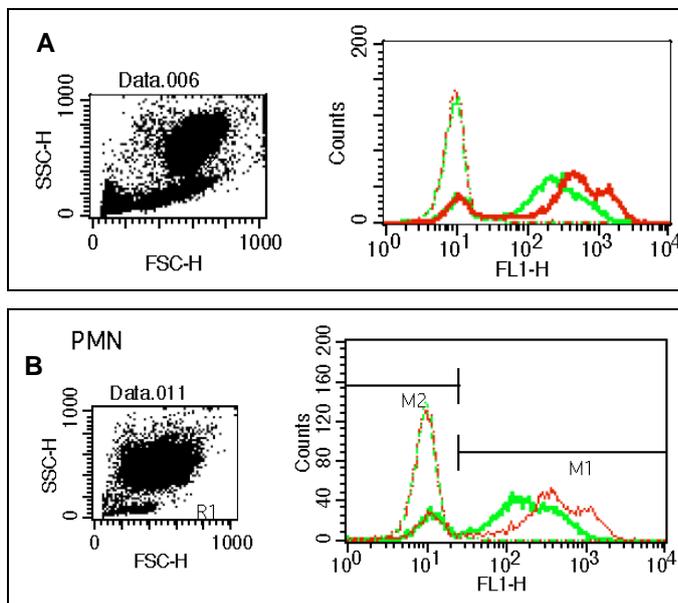


Abb. 20. (A) Kombinierte Darstellung einer FACS-Analyse von anti-NB1-FITC-markierten Neutrophilen vor (helle Kurve) und nach Priming mit TNF- α (dunkle Kurve). Man erkennt eine Anhebung der Intensität der NB1-Expression (MFI), ersichtlich an der nach rechts verschobenen dunkleren Kurve. Der prozentuale Anteil NB1-positiver Neutrophile ist hingegen konstant und liegt bei diesem Individuum bei circa 80%. Die Neutrophilen wurde im Vollblut mit TNF- α angeregt und in einem weiteren Schritt abzentrifugiert. **(B)** Kombinationsansicht einer FACS-Analyse von zuvor extrahierten, purifizierten Neutrophilen (PMNs) desselben Spenders. Auch hier sieht man eine Zunahme der MFI, wohingegen der Prozentsatz NB1-pos. Neutrophile gleich bleibt.

3.5 Korrelationen zwischen NB1-Expression und medizinischen Parametern

Um eine Abhängigkeit zwischen der NB1-Expression und medizinischen Laborparametern (siehe 3.5.1) sowie klinischer Beurteilung (siehe 3.5.2) abzuschätzen, werden Korrelationen nach Spearman auf Signifikanz erfasst und mögliche Abhängigkeiten in einem Punktdiagramm dargestellt. Zusätzlich wird die Patientenkohorte geteilt in eine Gruppe 1 mit einer NB1-Membranexpression von über 70 % der Neutrophilen, in die 59 Patienten einzuordnen sind, und eine Gruppe 2 mit unter 70 %. In Letztere fallen die restlichen 37 Patienten.

3.5.1 Paraklinik

Dieser Unterpunkt umfasst typische Laborparameter der klinischen Routinediagnostik, die in vier verschiedenen Testungen auf die Beziehung zur NB1-Expression untersucht werden. Diese beinhalten die Prüfung des jeweiligen Laborwerts, der einmal zum Zeitpunkt der Blutentnahme sowie als Maximalwert während des Krankenhausaufenthalts („peak“) notiert und getestet wurde, auf Korrelation zum Anteil NB1-positiver Neutrophile. Überdies wird jeder Parameter in den zwei NB1-Gruppen, die die Kohorte in eine Fraktion mit mehr beziehungsweise weniger als 70 % NB1-exprimierende Neutrophile trennt, untersucht. Schließlich werden die Laborwerte zur Fluoreszenzstärke, also der mittleren NB1-Expression pro Granulozyt, ins Verhältnis gesetzt.

3.5.1.1 Beziehung zwischen CRP und NB1-Expression

Der Mittelwert für das CRP für die gesamte Kohorte beträgt $22,5 \pm 11,3$ mg/ dl (Minimum 1,6; Maximum 50,2).

Anhand der Berechnung des Spearman-Korrelationskoeffizienten ($r = 0,03$; $p = 0,78$) und einer graphischen Darstellung der CRP-Werte der einzelnen Patienten in Abhängigkeit von der Größe der NB1-positiven Subpopulation stellt sich keine Beziehung zwischen den Parametern heraus (Abbildung 21(A)). Bei Aufteilung der Kohorte zeigt der CRP-Wert keine Unterschiede zwischen den zwei Gruppen (Abbildung 21(B): $p = 0,71$; Gruppe 1 mit ≥ 70 % NB1: mean $22, \pm 11,27$ mg/ dl; Gruppe 2 mit < 70 % NB1: mean $22,1 \pm 11,7$ mg/ dl).

Mit Erfassen der höchsten gemessenen CRP-Werte eines jeden Patienten und Auftragen gegen die jeweiligen NB1-Werte ergibt sich ebenso kein statistischer Zusam-

Ergebnisse

menhang: Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,072 bei einem p von 0,54 (Abbildung 21(C)).

Es besteht ein signifikanter, positiver Zusammenhang zwischen der Höhe der mittleren Fluoreszenzstärke (MFI) und der Höhe des CRPs. Der berechnete Korrelationskoeffizient r von 0,224 deutet auf eine eher als gering zu beurteilende, dennoch positive Korrelation hin (Abbildung 21(D)).

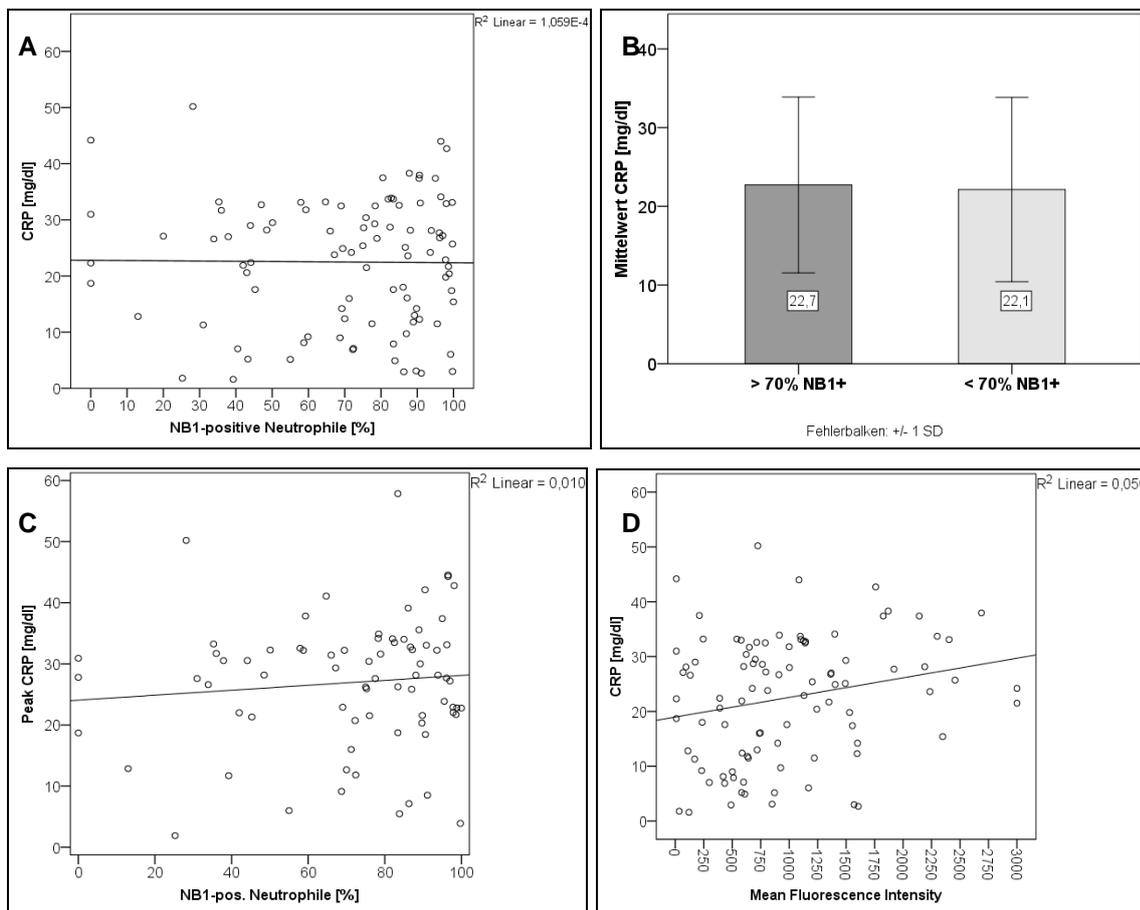


Abb. 21. Korrelation zwischen NB1-Expression und CRP. **(A)** Das Auftragen des NB1-Prozentsatzes gegen den CRP-Wert zum Zeitpunkt der Blutentnahme ergibt keine Wechselbeziehung der Parameter (Spearman-Korrelationskoeffizienten: 0,03; $p = 0,78$). **(B)** Vergleicht man den mittleren CRP-Wert der Patientengruppe mit mehr als 70 % NB1-pos. Neutrophilen mit selbigem der Patientengruppe unter 70 %, stellt sich kein Unterschied heraus ($p = 0,71$). **(C)** Dargestellt ist auf der y-Achse der jeweils höchste CRP-Wert, der während des Krankenhausaufenthalts des Patienten gemessen wurde. Der Wert für den Anteil NB1-pos. Neutrophile bezieht sich auf die Messung bei der initialen Blutentnahme. Auch hier stellt sich keine Abhängigkeit des CRP vom Prozentsatz heraus ($r = 0,072$; $p = 0,54$). **(D)** Je höher die MFI eines Individuums, desto höher stellte der Wert für den Entzündungsmarker CRP heraus. Diese Beziehung weist eine schwache positive, statistisch signifikante Korrelation auf ($r = 0,224$; $p < 0,05$).

3.5.1.2 Beziehung zwischen Leukozytenanzahl und NB1-Expression

Wie vorangehend im Methodikteil dargelegt, werden bei Auswertungen, die die Leukozyten betreffen, neun Patienten von den Berechnungen ausgeschlossen. Diese weisen durch Erkrankungen und notwendige Therapien eine Myelosuppression mit ausgeprägt verminderten Leukozytenzahlen auf, die mögliche Korrelationen manipulieren würden.

Es ergibt sich eine mittlere Leukozytenzahl von $14,5 \pm 8$ /nl für die Gesamtheit der ausgewählten Patienten. Der Median liegt bei 12,8 /nl, der kleinste und größte Wert 1,44 beziehungsweise 40,3 /nl.

Je höher der NB1-Prozentsatz der rekrutierten Patienten ist, desto niedriger scheinen die Leukozytenwerte auszufallen: Abbildung 22(A), die Wertepaare zwischen dem NB1- und Leukozytenwert darstellt, und Abbildung 22(B), in der beide Patientengruppen miteinander verglichen werden, veranschaulichen die Beobachtung. Beide Untersuchungen liefern jedoch keine signifikanten Resultate (jeweils $p > 0,05$), so dass von einem zufälligen Effekt ausgegangen werden muss.

Der Versuch, einen Zusammenhang zwischen der Höhe des NB1-Prozentsatzes und den größten Leukozytenzahlen beziehungsweise dem MFI und dem zeitgleich erstellten Leukozytenwert herauszustellen, ist in der Abbildung 22(C) beziehungsweise 22(D) demonstriert. Es stellt sich keine signifikante Korrelation heraus ($p = 0,48$ beziehungsweise 0,15).

Ergebnisse

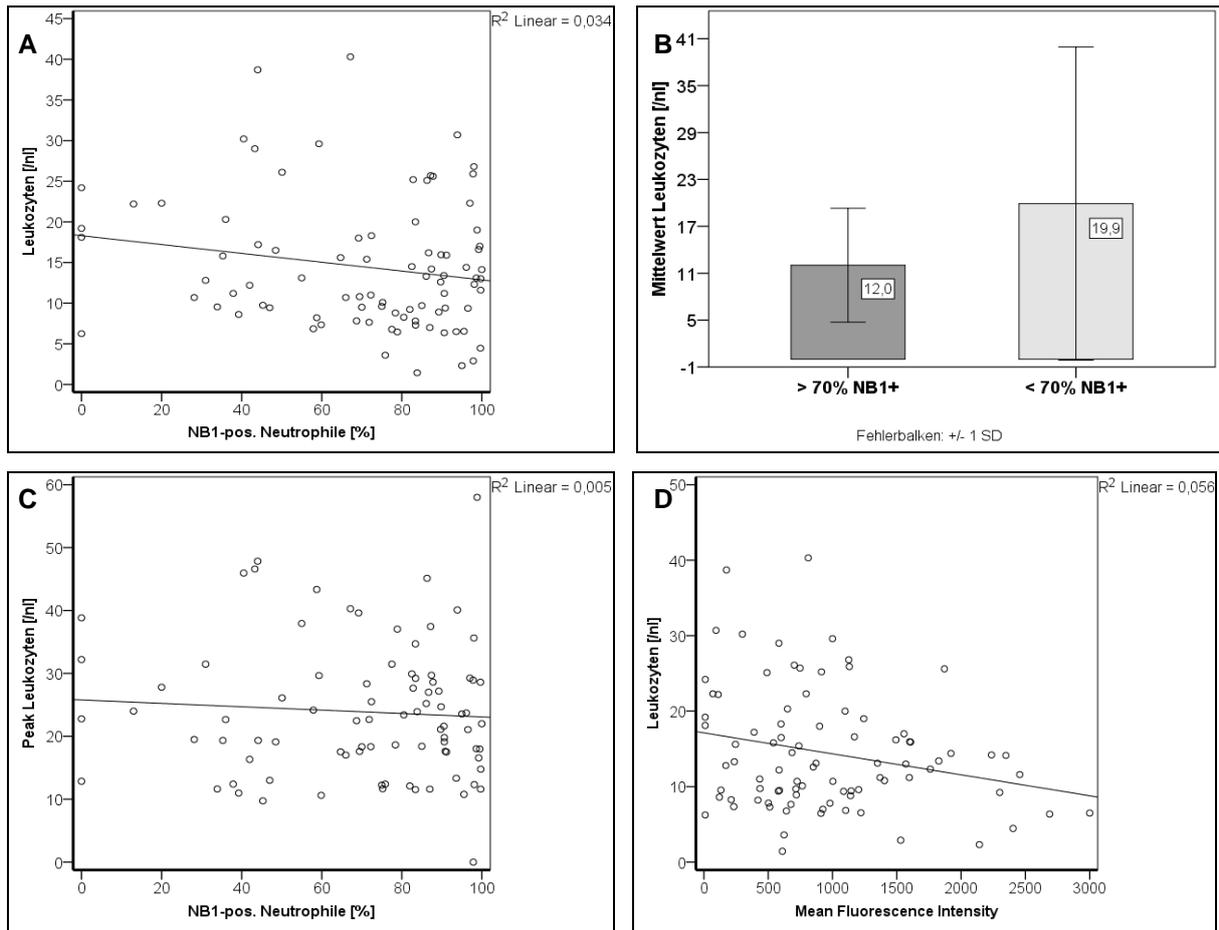


Abb. 22. Korrelation zwischen Leukozytenzahl und NB1-Expression. **(A)** Bei einem Großteil der Patienten mit höheren NB1-Prozentwerten wurden tendenziell niedrige Leukozytenzahlen registriert. Die Beobachtung entzieht sich jedoch einer statistischen Signifikanz ($p = 0,28$). Der Korrelationskoeffizient beträgt $-0,12$. **(B)** Die Aufteilung in NB1-Hoch- und Niedrigexprimierer mit dem Cut off-Wert von 70% reflektiert die obige Beschreibung, schließt aber ebenso wenig auf eine statistische Relevanz ($p = 0,072$). **(C)** veranschaulicht, dass die höchsten Leukozytenwerte des Krankenaufenthalts, aufgetragen auf der y-Achse, nicht mit einer hohen bzw. niedrigen Fluoreszenzstärke, MFI auf der x-Achse, gleichgerichtet sind ($r = 0,076$, $p = 0,48$). **(D)** Zwischen der Leukozytenzahl und der MFI besteht kein fassbarer Zusammenhang, die Irrtumswahrscheinlichkeit p liegt mit $0,145$ deutlich außerhalb des Signifikanzniveaus, der Korrelationskoeffizient beträgt $-0,157$.

3.5.1.3 Beziehung zwischen Höhe des Hämoglobins und NB1-Expression

Eine gegenläufige Korrelation zwischen dem NB1-Wert und der Höhe des Hämoglobins der Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme, die gemittelt $9,8 \pm 1,5$ mg/ dl beträgt, konnte nicht bestätigt werden: $r = -0,033$, $p > 0,05$ (Abbildung 21(A)).

Die Hämoglobinkonzentration der Gruppen 1 und 2 unterscheiden sich nicht, ($p = 0,6$; Abbildung 23(B)).

Ergebnisse

Auch beim Betrachten der jeweils niedrigsten gemessenen Werte für Hämoglobin der Patienten während ihres aktuellen Klinikaufenthalts sticht keine Wechselbeziehung zum NB1-Prozentsatz hervor ($p > 0,05$; $r = -0,007$; siehe Abbildung 23(C)).

Die Möglichkeit einer statistischen Korrelation zwischen dem MFI und dem Hämoglobinwert der Patienten wird nicht angenommen, da p deutlich außerhalb des Signifikanzniveaus von 0,05 und r bei 0,016 liegt (Abbildung 23(D)).

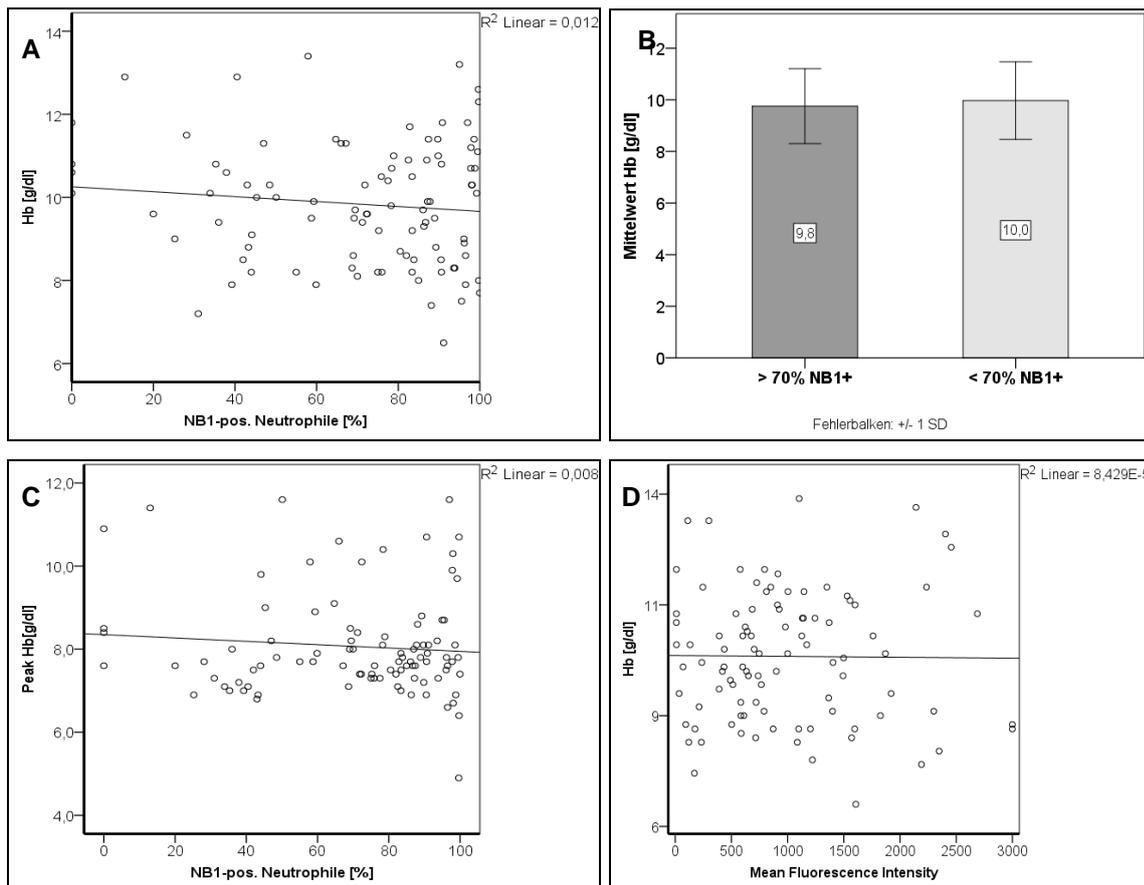


Abbildung 23. Korrelation zwischen Hämoglobinkonzentration und NB1-Expression. **(A)** Die graphische Darstellung zwischen dem Betrag des Hämoglobinwerts der Patienten (y-Achse) und deren Anteil NB1-positiver Neutrophile (x-Achse) legt keinen Zusammenhang zwischen den Parametern nahe. Die rechnerische Überprüfung dieser Gegebenheit ergibt einen äußerst kleinen Korrelationskoeffizienten von $r = -0,033$, der p -Wert ist größer als das Signifikanzniveau. **(B)** Zwischen den beiden Patientengruppen ist keine Differenz zwischen deren mittleren Hämoglobingehalt feststellbar ($p > 0,05$). **(C)** Zwischen dem Anteil NB1-positiver Neutrophile (x-Achse) und der niedrigsten erfassten Hämoglobinkonzentration während der Krankenhausverweildauer der jeweiligen Patienten (y-Achse) besteht keine Korrelation. **(D)** Das Punktdiagramm, in welchem die Fluoreszenzintensität (MFI) der Patienten auf der x-Achse zum dazugehörigen Hämoglobingehalt auf der y-Achse dargestellt wurde, gibt sichtlich wieder, dass beide Parameter nicht in einer gegenseitigen Wechselbeziehung stehen; erkennbar sind eine Punktwolke und eine Trendlinie, die nahezu parallel zur x-Achse verläuft.

3.5.1.4 Beziehung zwischen Thrombozytenanzahl und NB1-Expression

Die durchschnittliche Höhe der Thrombozyten beträgt 144 ± 90 /nl für die Grundgesamtheit der Patienten. Aus der graphischen Darstellung des Verhältnisses zwischen der Thrombozytenanzahl und dem NB1-Prozentsatz der Kohorte, unter Berücksichtigung eines negativen Korrelationskoeffizienten $r = -0,174$ geht eine schwache umgekehrte Beziehung hervor (siehe Abbildung 24(A)). Statistisch ist diese jedoch nicht signifikant, da der p-Wert größer ist als 0,05.

Der Trend spiegelt sich ebenfalls im Balkendiagramm wider, dass die Patienten in zwei Gruppen mit über oder weniger 70% NB1-positive Neutrophile aufteilt: Die Patienten mit einem höheren NB1-Wert haben eine geringere Thrombozytenanzahl (135 /nl für Gruppe 1 vs. 159 /nl für Gruppe 2). Die Differenz zwischen den Gruppen ist allerdings nicht signifikant ($p = 0,29$; Abbildung 24(B)).

Auch bei den jeweils niedrigsten Thrombozytenzahlen, die während des Krankenaufenthalts der Patienten ermittelt werden konnten, resultiert rechnerisch keine Korrelation: $r = -0,094$, $p = 0,392$, Abbildung 24(C).

Mit dem errechneten Spearman-Korrelationskoeffizienten für die Wechselbeziehung zwischen Anzahl der Thrombozyten der Patienten und den mittleren Fluoreszenzstärken (MFI) von 0,03 und einem dazugehörigen p-Wert von 0,77 kann man eine statistische Korrelation zurückweisen: Abbildung 24(D).

Ergebnisse

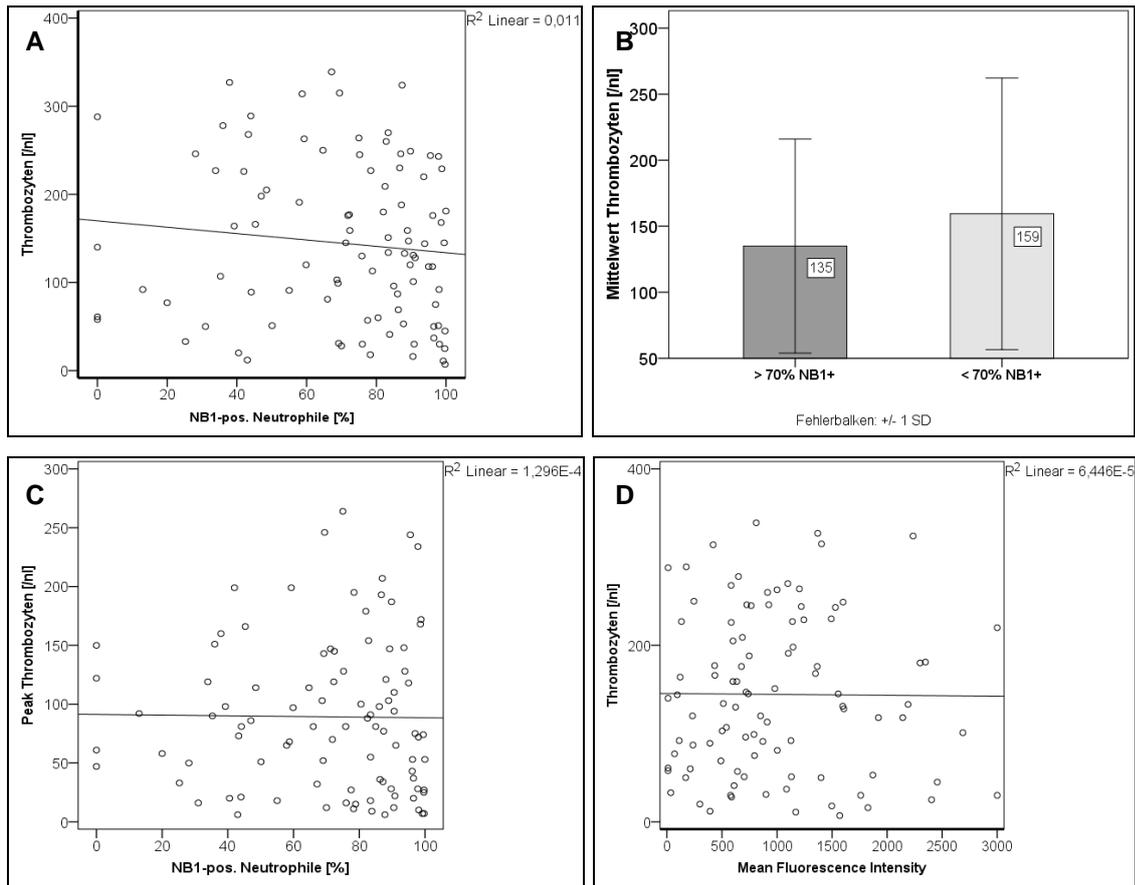


Abb. 24. Korrelation zwischen Thrombozytenzahl und NB1-Expression. **(A)** Die leicht fallende Trendlinie unterstreicht die Hypothese, dass je höher der Anteil NB1-positiver Granulozyten (x-Achse) ist, die Thrombozyten eher fallen. Statistisch steht dies jedoch in keinem Zusammenhang. **(B)** Auch die Mittelwerte der Blutplättchenkonzentration unterscheiden sich nicht zwischen Patienten, die insgesamt einen höheren (> 70 %) oder geringeren (< 70 %) Anteil NB1-positiver Neutrophile besitzen. **(C)** Das Streudiagramm zeichnet die Wertepaare zwischen den niedrigsten registrierten Thrombozytenkonzentrationen der Patienten und deren NB1-Wert ab. Eine Abhängigkeit ist nicht erkennbar. **(D)** Trägt man die Fluoreszenzintensität der FITC-NB1-markierten Granulozyten der Patienten auf der x-Achse und die dazugehörigen Thrombozytenzahlen auf der y-Achse ab, erhält man ein Streudiagramm, das eine Abhängigkeit beider Parameter ausschließt.

3.5.1.5 Beziehung zwischen Kreatinin und NB1-Expression

Die Berechnung des mittleren Kreatinins für die Gruppe ergibt $1,96 \pm 1,5 \text{ mg/dl}$. Die einzelnen Kreatininwerte scheinen nicht mit dem Anteil NB1-positiver Neutrophile zu korrelieren, da sich die p-Werte sowohl in der Darstellung der Messpaare als Punktediagramme (siehe Abbildung 25(A)) als auch bei der Aufteilung der Patientenkohorte in eine hoch und in eine niedrig exprimierende Gruppe (Abbildung 25(B)) eindeutig außerhalb des Signifikanzniveaus von 0,05 bewegen.

Ergebnisse

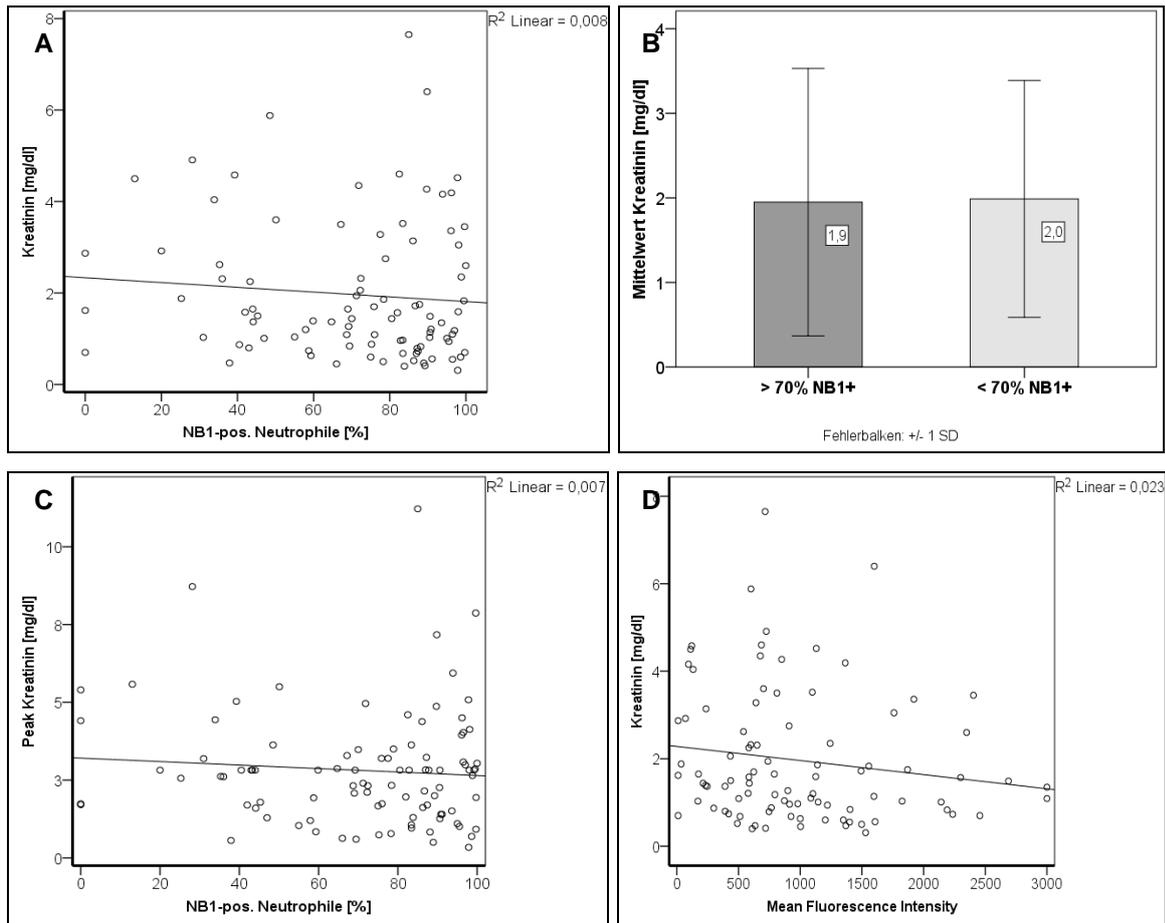


Abb. 25. Korrelation zwischen Kreatinin und NB1-Expression. **(A)** Zwischen den auf der y-Achse aufgetragenen Werten für Kreatinin und dem prozentualen Anteil von Neutrophilen, die NB1 auf ihrer Oberfläche aufweisen (x-Achse) ist kein Zusammenhang herauszustellen: der Korrelationskoeffizient beträgt $-0,11$ und der Test auf Signifikanz eines möglichen Zusammenhangs ergab einen p-Wert von $0,293$. **(B)** Gruppe 1, die alle Patienten mit einem Anteil von mindestens 70% NB1-pos. Neutrophilen umfasst, hat gemittelt eine Kreatinkonzentration von $1,9$ mg/dl. Gruppe 2 mit weniger als 70% NB1-pos. Neutrophilen weist eine Kreatinkonzentration von $2,0$ mg/dl im Mittel auf. Beide Patientengruppen unterscheiden sich nicht in ihrem mittleren Kreatininwert ($p = 0,533$). **(C)** Die für die Patienten höchsten Kreatininwerte sind auf der y-Achse gegen deren NB1-positiven Anteil von Neutrophilen auf der x-Achse aufgetragen. Es ergibt sich statistisch keine Relevanz zwischen den Parametern ($p = 0,765$). **(D)** Je größer der Betrag für die mittlere Fluoreszenzintensität der Person ist, desto niedriger erscheint deren Kreatininkonzentration ($r = -0,186$). Ein statistischer Zusammenhang konnte nicht ermittelt werden ($p = 0,074$).

Der während des Patientenaufenthalts erfasste höchste Kreatininwert wurde ebenfalls ermittelt und auf eine mögliche Wechselbeziehung zum Anteil NB1-positiver Neutrophile rechnerisch sowie graphisch überprüft (siehe Abbildung 25(C)). Mit einem Korrelationskoeffizienten $r = -0,031$ und einem im Signifikanztest ermittelten p-Wert, der deutlich größer ist als $0,05$, ist diese nicht evident:

In der graphischen Anordnung zwischen der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) und dem dazugehörigen Kreatininwert der Abbildung 25(D) erkennt man einen schwach

Ergebnisse

negativen Zusammenhang ($r = -0,2$), der aber über dem Signifikanzlevel von 0,05 bleibt und somit statistisch nicht signifikant ist.

3.5.2 Klinische Parameter

Der folgende Teilabschnitt eruiert mögliche statistische Zusammenhänge zwischen dem NB1-Wert und klinischen Angaben beziehungsweise Maßnahmen. Ziel ist es, Korrelationen zwischen dem Anteil NB1-positiver Neutrophile und der Schwere der Erkrankung herauszustellen.

3.5.2.1 Beatmungspflichtigkeit

Von den insgesamt 96 ausgewählten Patienten wurden 65, entsprechend 68 %, invasiv beatmet im Sinne einer Überdruckbeatmung mittels oralem oder nasalem Tubus. Die restlichen 31 Patienten oder 32 % erhielten eine nicht-invasive Beatmungsform, unter die beispielsweise die Maskenbeatmung und O₂-Brille fallen.

Teilt man die Patientenkohorte in zwei Gruppen und vergleicht die Werte, fällt auf, dass bei mehr Patienten in Gruppe 1 mit über 70 % NB1-positiven Neutrophilen eine invasive Beatmung appliziert wird als in Gruppe 2: 74,6 % in Gruppe 1 gegenüber 56,8 % in Gruppe 2. Die Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit ergab ein p von 0,07, sodass ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen auf dem Signifikanzniveau von 5 % zurückgewiesen wird.

3.5.2.2 Katecholaminbedarf

Wie im Methodikteil beschrieben, ist die applizierte Menge an Katecholaminen in den folgenden Berechnungen auf die Substanz Noradrenalin bezogen.

Der Graph in Abbildung 26(A) lässt einen sehr schwachen positiven Zusammenhang ($r = 0,14$) vermuten, der allerdings mit $p > 0,05$ statistisch nicht belegt ist. In ähnlicher Weise veranschaulicht das Balkendiagramm der Abbildung 26(B), dass die Patientengruppe mit einem Anteil von über 70 % NB1-positiven Neutrophilen eine höhere durchschnittliche Menge an Katecholaminen benötigte. Dem Unterschied von 0,46 mg /h Noradrenalin zwischen den Gruppen konnte jedoch keine statistische Signifikanz zugeschrieben werden ($p = 0,3$) und beruht daher eher auf einem zufälligen Effekt.

Ergebnisse

Ebenso wenig findet sich ein statistisch erkennbarer Zusammenhang beim Auftragen von MFI der Patienten gegen die Noradrenalinmenge ($r = 0,047$; $p = 0,648$; siehe Abbildung 26(C)).

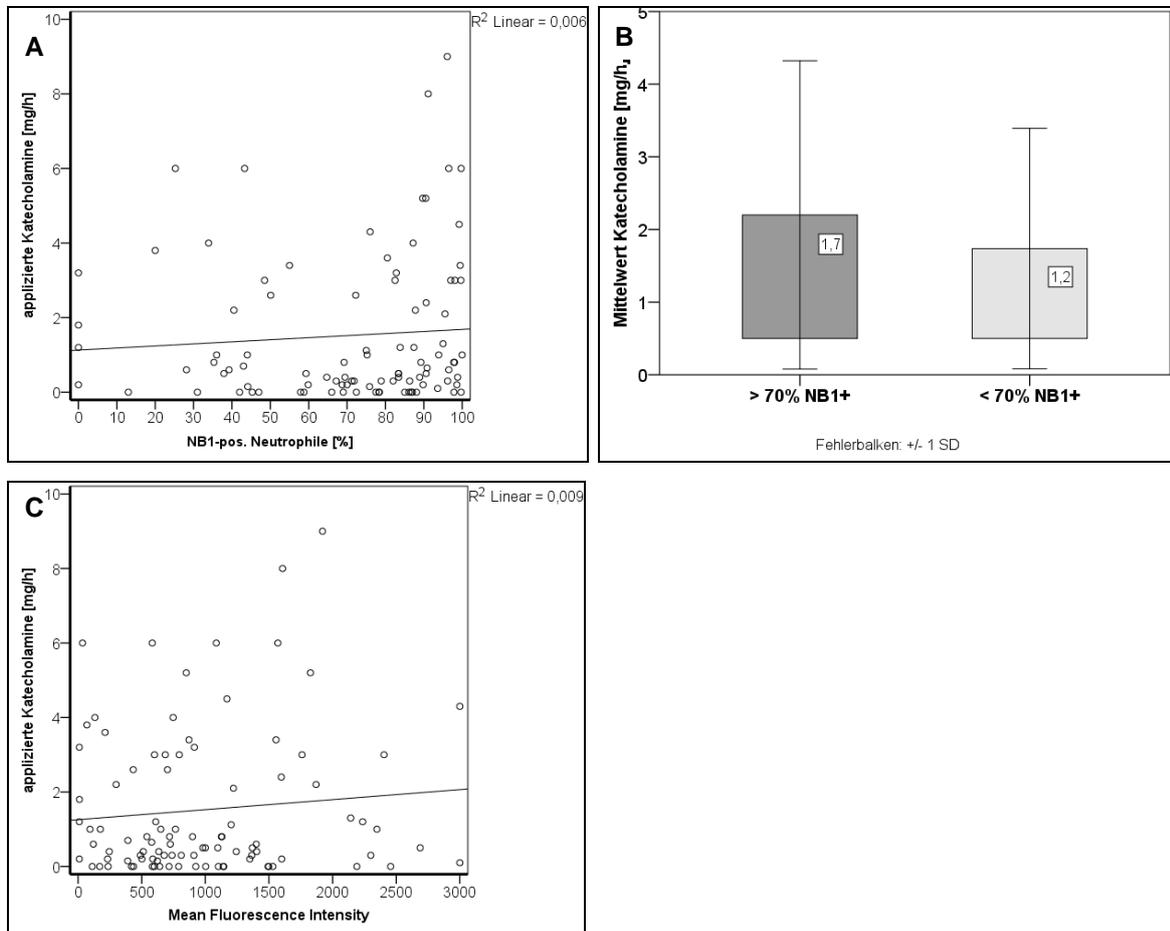


Abb. 26. Korrelation zwischen Katecholaminbedarf und NB1-Expression. **(A)** Erkennbar im Punktdiagramm ist, dass die Katecholaminmenge, die zum Zeitpunkt der Aufnahme der Patienten in die Studie angewendet wurde, mit dem Anteil NB1-positiver Neutrophiler nicht im Verhältnis steht.

(B) Im Vergleich der beiden Patientengruppen, die auf Basis ihres unterschiedlich großen Anteils NB1-positiver Granulozyten verteilt wurden, zeigt sich nach statistischer Prüfung eine Divergenz ($p > 0,05$). **(C)** Eine Abhängigkeit der erforderlichen adrenergen Substanzen zur Aufrechterhaltung stabiler Kreislaufparameter (abgebildet auf der y-Achse) vom NB1-Prozentsatz der jeweiligen Patienten ist nicht feststellbar. Eine Linearität ist mit einem Korrelationskoeffizienten r von 0,047 und einem p von 0,65 ausgeschlossen.

3.5.2.3 Nierenersatzverfahren

Unter dieser Fragestellung werden die Patienten hinsichtlich ihrer Dialysepflichtigkeit untersucht. Insgesamt musste bei 18,8 % der Kohorte, entsprechend 18 Personen, eine Dialyse angewendet werden.

Ergebnisse

Dieser Anteil steigt bei den Patienten, die mehr als 70 % NB1-positive Neutrophile aufweisen auf 23,7 % (14 von 59 Personen). Im Gegensatz dazu liegt der Einsatz von Nierenersatztherapien in Gruppe 2 mit weniger als 70 % NB1-positiven Neutrophilen bei 10,8 % (4 von 37 Personen). Die Abweichung der Häufigkeit von angewendeten Nierenersatzverfahren zwischen Gruppe 1 und 2 ist statistisch nicht signifikant (Chi-Quadrat-Test: $p > 0,05$).

3.5.2.4 Aufenthaltsdauer auf Intensivstation

Von allen Patienten wurde die reine ITS-Aufenthaltsdauer in Tagen notiert und verglichen, Aufenthalte auf Normalstation wurden nicht berücksichtigt. Die unterhalb des Abschnitts gelisteten Abbildungen und Tabelle 2 stellen alle Daten zusammen.

Betrachtet man die gesamte Kohorte (Abbildung 27(A)) kommt man auf eine durchschnittliche Aufenthaltszeit von 20 Tagen mit einem Minimum von einem Tag und einem Maximum von 114 Tagen.

Für eine bessere Bewertung der Ergebnisse werden für eine Analyse zuerst nur überlebende Patienten herangezogen, da das Versterben die Aufenthaltsdauer zusätzlich limitiert. So erhält man für die 42 Personen, die nicht verstorben sind, eine mittlere ITS-Verweildauer von 15,6 Tagen. Der kürzeste Aufenthalt beträgt hierbei zwei Tage, der längste 50 Tage.

Teilt man die Überlebenden in zwei Gruppen, die mit einem Anteil NB1-positiver Neutrophile über 70 % (Gruppe 1) und unter 70 % (Gruppe 2) definiert sind, so erhält man für Gruppe 1, die 25 Patienten umfasst, eine mittlere Aufenthaltsdauer von 16,8 Tagen mit einem Minimum von zwei Tagen und einem Maximum von 50 Tagen. Diese beträgt in Gruppe 2 durchschnittlich 13,8 Tage und umfasst 17 Personen; der Mindestaufenthalt liegt bei 3 Tagen, die längste Verweildauer bei 30 Tagen. Die Differenz in der Aufenthaltsdauer zwischen beiden Gruppen ist statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$; vgl. Abbildung 27(B)).

Überlebende und während der Studienzeit Verstorbene unterscheiden sich nicht signifikant in der mittleren Anwesenheitsdauer ($p > 0,05$; Abbildung 27(C)).

Ergebnisse

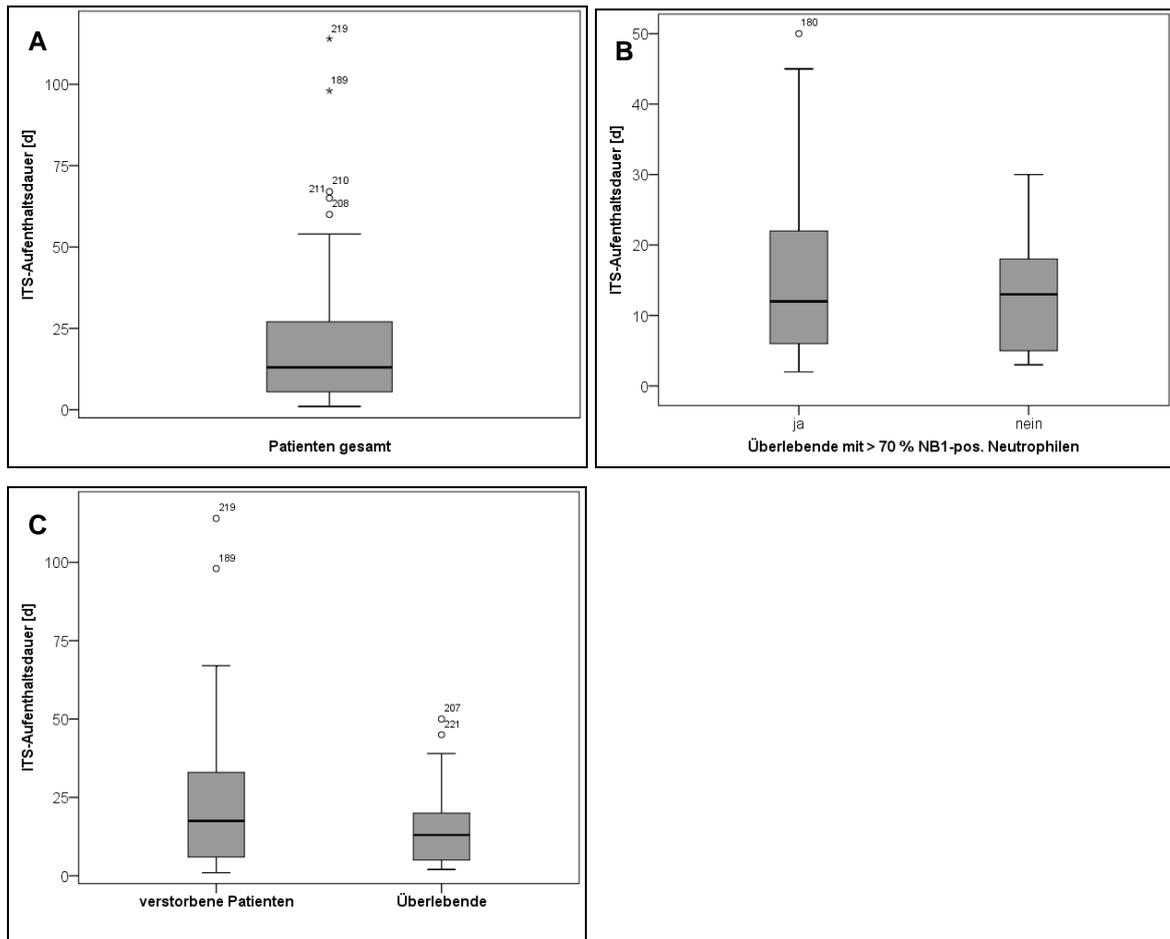


Abb. 27. Korrelation zwischen ITS-Aufenthaltsdauer und NB1-Expression. **(A)** Lage und Streuung der Verteilung der ITS-Aufenthaltsdauer aller Patienten ist als Boxplot dargestellt. Der Median (13 Tage) wird als horizontaler Strich in der Box, die 50 % der Wertausprägungen der Variablen definiert, dargestellt. Die mit einem Kreis gekennzeichneten Datenpunkte, die weiter entfernt von den Grenzen der Box liegen, sind als Ausreißer ausgewiesen. Datenpunkte mit einem Abstand von mehr als drei Interquartilsabständen sind als Extremwerte mit einem Stern gekennzeichnet. **(B)** Vergleich der beiden Patientengruppen über eine gepaarte Boxplot-Darstellung. Die nach ihrem NB1-Prozentsatz aufgeteilten Patienten unterscheiden sich nicht in ihrer mittleren Aufenthaltsdauer. Dargestellt sind nur Patienten, die während ihrer intensivmedizinischen Behandlung nicht verstorben sind. Der mit der Ziffer 180 gekennzeichnete Ausreißer entspricht der PKZ 59 mit 50 Tagen ITS-Aufenthalt. **(C)** Im Boxplot werden Patienten, die noch während der intensivmedizinischen Betreuung verstorben sind (linke Box), den überlebenden gegenübergestellt. Insgesamt ergibt sich bei den Verstorbenen mit 23,4 Tagen Durchschnittsverweildauer und einem Interquartilsabstand von 27 Tagen eine größere Spannweite (insg. 113 Tage) der ITS-Aufenthaltsdauer als bei Patienten, die die Akutphase ihrer Erkrankung überlebt haben (Spannweite 48 Tage, Interquartilsabstand 15 Tage). Die Ausreißer bei verstorbenen Patienten haben die PKZ 99 mit 114 Tagen (hier mit 219 beziffert) und PKZ 2 (hier: 189) mit 98 Tagen, bei den Überlebenden die PKZ 59 (hier: 207, 50 Tage) und PKZ 103 (hier: 221, 45 Tage).

Ergebnisse

Tabelle 7 Übersicht über die Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation.

	Mittlerer ITS-Aufenthalt (d)	Standardabweichung	Minimum (d)	Maximum (d)
Patienten gesamt	20	19,9	1	114
Verstorbene	23,4	23,9	1	114
Überlebende	15,6	12	2	50
Überlebende mit >70 % NB1+	16,8	14	2	50
Überlebende mit <70 % NB1+	13,8	8,5	3	30

3.5.2.5 Exitus

Über die Dauer des Beobachtungszeitraums der einzelnen Patienten, welcher sich zumeist bis zur Entlassung von Normalstation oder bis zum Eintritt des Todes im Subakut- oder Akutstadium der Erkrankung erstreckt, sind summarisch 54 von 96 Personen gestorben, dies entspricht 56,3 %. Die Verstorbenen haben einen mittleren NB1-positiven Anteil Neutrophiler von $71,4 \pm 3,6$ % (Spannweite 0 - 99,97 %). Der Mittelwert der Mean Fluorescence Intensity beträgt $961,4 \pm 91,5$ (10,5 - 3000). Dagegen weisen Patienten, die bis zum Ende der Studie am Leben waren, einen Mittelwert von $69,8 \pm 4,2$ % (0 - 99,7 %) NB1-positiven Neutrophilen und $1010,1 \pm 116,5$ (9,7 - 3000) Fluoreszenzintensität auf. Beide Fraktionen zeichnen sich nicht durch einen statistisch signifikanten Unterschied im NB1-Prozentsatz und in der mittleren Fluoreszenzintensität aus (jeweils $p > 0,05$).

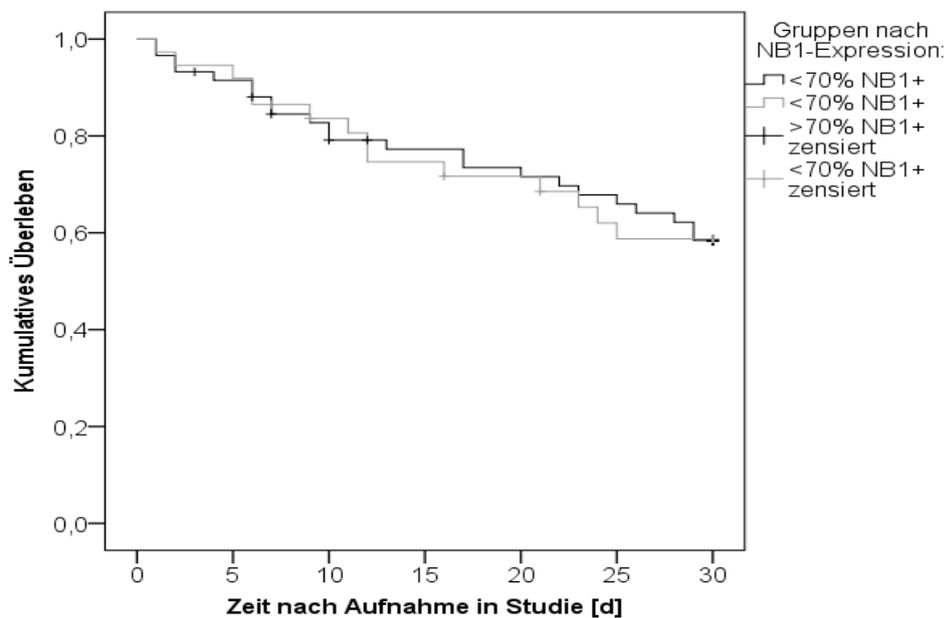
Betrachtet man wiederum die nach ihrem Anteil NB1-positiver Neutrophile separat untersuchten Patientengruppen, ist keine erhöhte Sterberate in einer der Gruppen zu verzeichnen ($p > 0,05$): Von den 59 Personen, deren Neutrophile zu mindestens 70 % das NB1-Antigen aufweisen, verstarben 34. Dies entspricht einer Sterbequote von 57 %. Bei den übrigen 37 Patienten mit unter 70 % NB1-positiven Neutrophilen endete der Beobachtungszeitraum für 20 Personen mit dem Tod, was einer Rate von 54 % gleichkommt. Das Relative Risiko zu versterben bei akut erkrankten Studienteilnehmern, die mehr als 70 % NB1-positive Granulozyten besitzen, beträgt 1,1 im Verhält-

Ergebnisse

nis zu Patienten mit einem kleineren NB1-Prozentsatz. Somit ist das Risiko des Todes in beiden Gruppen vergleichbar.

Bei der vorliegenden Studie umfasst der mittlere Zeitraum bis zum Todeseintritt $33,3 \pm 42,1$ Tage in Gruppe 1, in Gruppe 2 ergeben sich durchschnittlich $19,6 \pm 14,6$ Tage für verstorbene Patienten. Auch damit ist kein Unterschied zwischen den Kohorten feststellbar ($p = 0,5$).

Nachfolgendes Diagramm (Abbildung 28) entspricht der Analyse der Todesfälle im Kaplan-Meier-Verfahren als nicht parametrische Schätzung der Überlebensfunktion im Rahmen der Ereigniszeitanalyse. Hierbei spiegelt die Graphik die 30-Tage-Mortalität wider.



Patienten unter Risiko:

> 70 % NB1+	59	53	46	41	39	36	31
< 70 % NB1+	37	33	28	25	23	19	18

Abb. 28. Veranschaulichung der 30-Tage-Mortalität für beide Expressionsgruppen als Kaplan-Meier-Kurven. In der zeitlich begrenzten Überlebensanalyse, die die Akutphase und primäre Auswirkung der septischen Erkrankung widerspiegelt, zeigt sich kein Unterschied zwischen den Patienten, die nach Größe ihrer NB1-positiven Neutrophilenfraktion in zwei Gruppen geteilt wurden ($p = 0,97$). Innerhalb der ersten 30 Tage nach Studienaufnahme der einzelnen Patienten sind in Gruppe 1 (>70 % NB1-positive Neutrophile, $n = 59$) kumulativ 23 Personen, entsprechend 61 %, verstorben. In Gruppe 2 ($n = 37$) stehen dem 14 Todesfälle gegenüber, was 62 % gleichkommt.

Ergebnisse

Als zensierte und als solche graphisch markierte Ereignisse gelten Todesfälle, die nicht durch das aktuellen Krankheitsgeschehen bedingt waren sowie Personen, die nicht der Nachverfolgung beibehalten werden konnten. Wenn der Eintritt des Todes nicht innerhalb der Beobachtungszeit eintrat, wird dies ebenso als zensierter Fall bewertet.

Die Untersuchung der unterteilten Patientenkohorte ergab demnach, dass weder Patienten mit mindestens 70 % NB1-positiven Neutrophilen noch Personen mit einem geringeren Expressionsprofil einen Überlebensvorteil im Zuge einer akut-infektiösen Erkrankung haben.

3.5.2.6 Intensivmedizinische Scores

In Tabelle 3 sind die zusammenfassenden Ergebnisse für die intensivmedizinischen Scoresysteme SOFA und APACHE II dargestellt. Jeweils 92 gültige Werte wurden bei der Analyse erfasst.

Ein Unterschied zwischen Patienten mit einem Anteil von mehr als 70 % NB1-positiven Neutrophilen und den geringer exprimierenden besteht hinsichtlich der Scoresysteme nicht.

Im Gegensatz dazu differieren die Angaben zum SOFA und APACHE II zum Aufnahmezeitpunkt zwischen Überlebenden und Verstorbenen deutlich und mit statistischer Signifikanz. Deren höhere Werte unterstreichen den kritischen Krankheitszustand.

Tabelle 8. Übersicht über die Punktzahl der intensivmedizinischen Scoresysteme SOFA und APACHE II, die bei den Patienten mit Eintritt in die Studie zu Beginn ihres ITS-Aufenthalts erhoben wurden.

	SOFA	APACHE II
Mittelwert ± SD gesamt	10,01 ± 4,8	26,75 ± 11
Median ges.	10	27,5
Minimum ges.	0	0
Maximum ges.	22	58
Unterschied zw. Gruppe 1 (>70% NB1+) u. 2 (<70% NB1+)	n.s.: p > 0,05 (10,3 vs. 9,6)	n.s.: p > 0,05 (26,8 vs. 26,7)
Unterschied zw. Verstorbenen u. Überlebenden	Signifikant: p < 0,05 (12,1 vs. 7,4)	Signifikant: p < 0,001 (29,2 vs. 23,5)

3.5.2.7 Erregerspektrum

Um festzustellen, ob die Art des für das septische Krankheitsbild verantwortlichen Erregers die Ausprägung des NB1-Glykoproteins beeinflusst, wurden die Mittelwerte des prozentualen NB1-positiven Neutrophilenanteils sowie die mittlere Fluoreszenzstärke auf der einen Seite für gesicherte bakterielle Infektionen ($n = 34$) und auf der anderen für eine gemischte Gruppe aus viralen beziehungsweise Pilz-Erregern ($n = 15$). Die Prüfung auf einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen mittels Man-Whitney-U-Test ergab keine Relevanz ($p > 0,5$). Hierbei liegt der NB1-Wert für bakterielle Erreger bei 76,6 % und für systemische Mykosen und Pilzinfektion bei 63,1%, die mittlere Fluoreszenzstärke bei 1128 und 917,5. Unterteilt man die Bakterien wiederum gemäß ihrem Färbeverhalten, ergeben sich bei Patienten mit septischem Krankheitsbild durch grampositive Erreger ($n = 19$) ein NB1-Prozentsatz von 77,8 %, bei Patienten mit mikrobiologisch gesicherten gramnegativen Bakterien ($n = 13$) 73,5 %. Für die Fluoreszenzstärken erhält man für Erstere 1005, für Letztere 937,7. Da jeweils ein p-Wert von über 0,05 errechnet wurde, liegt kein Unterschied in den beiden Analyseparametern zwischen Patienten vor, deren Sepsis durch grampositive oder gramnegative Bakterien hervorgerufen wurde.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse der NB1-Expression bei Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen im Vergleich zu Kontrollkohorten. Es wurde untersucht, ob eine höhere Expression des Neutrophilen-spezifischen Antigens mit laborchemischen und klinischen Parametern und mit einem schlechteren Outcome der Patienten korreliert.

Es fand sich:

- 1) eine signifikant höhere NB1-Expression in der Patientengruppe in Bezug auf die NB1-positive Neutrophilenfraktion und mittlere Fluoreszenzintensität gegenüber den Kontrollkohorten.
- 2) eine signifikante Korrelation zwischen mittlerer NB1-Fluoreszenzstärke und Höhe des C-reaktiven Proteins der Patienten.
- 3) eine Änderung der NB1-Expression konkordant zum Gesundheitszustand der Patienten, so dass bei Patienten nach klinischer und laborchemischer Besserung im Mittel kleinere NB1-positive Neutrophilensubpopulation und eine verringerte MFI verzeichnet wurde im Vergleich zur initialen Untersuchung.

4.1 Eignung der Patientenkohorte

Zusätzlich zu den Auswahlkriterien vor der Blutentnahme vor Ort beschreiben klinische Größen und die etablierten intensivmedizinischen Scoresysteme SOFA und APACHE II, angewandte physikalische Therapien (maschinelle Beatmung, Kühlung, Nierenersatzverfahren) und bewährte Entzündungsparameter wie CRP den Gesundheitszustand der Kohorte. Mit einem durchschnittlichen CRP-Wert von 22,5 mg/dl, einer mittleren Leukozytenzahl von 14,5 /nl, einer Quote für invasive Beatmungs- und Katecholaminpflichtigkeit von 68 % beziehungsweise 79,2 % ist die Gesamtheit der Patientenkohorte als schwer krank zu bewerten. Die Diagnose einer Sepsis respektive eines septischen Schocks wurde in 88,3 % der Fälle gestellt. In 34 Fällen (35 %) wurde ein bakterieller Erreger mikrobiologisch gesichert. Pilz- und Virusinfektionen (n = 15; 16,6%) stellen untergeordnete Ursachen dar. Zudem unterstreichen die Beträge des SOFA-Scores von 10 (Skala von 0 bis 24 Punkte, ein höheres Ergebnis geht mit erhöhter Organdysfunktion und Mortalität einher) und des APACHE II-Scores von 27 (0 bis max. 71 Punkte, höhere Punktzahl ist mit herabgesetzter Überlebenschance assoziiert, z.B. 5 - 9 Punkte: \approx 8 % Todesrate, 25 - 29 Punkte: \approx 55 % Todesrate) die kritischen Krankheitsbilder. Damit setzt sich die Kohorte vornehmlich

aus Patienten zusammen, die im Rahmen einer schweren Infektion unter einer Sepsis leiden und entspricht damit den Einschlusskriterien der Forschungsarbeit.

4.2 Expression des NB1-Glykoproteins

4.2.1 Gesunde Spender

Diese Kohorte dient als Vergleichsgruppe, um Veränderungen im Expressionsmuster des NB1-Gens bei schweren Infektionen abzuleiten.

In der vorliegenden Studie konnte ein durchschnittlicher Anteil NB1-exprimierender Neutrophile von $57,1 \pm 2,0$ % festgestellt werden, was im Bereich des in der Literatur angegebenen Mittelmaßes von 45 - 65 % liegt^{54,63}. 97 % der getesteten Personen exprimieren NB1 auf ihren Neutrophilen. Offizielle Angaben für die Antigenfrequenz betragen 89 - 97 % bei gesunden Individuen^{63,78}. Folglich kann die untersuchte Stichprobe als repräsentativer Teil der Gesamtheit einer gesunden Bevölkerung angenommen werden.

Die Arbeitsgruppe um Matsuo postuliert einen signifikant höheren Anteil NB1-positiver Neutrophile bei Frauen (durchschnittlich 63,1 %) als bei Männern (53,1 %) ⁶³. Hingegen wird bei Goldschmeling et al. keine signifikante Differenz zwischen den Geschlechtern angegeben⁵⁸. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte kein signifikanter geschlechterabhängiger Unterschied im Anteil NB1-exprimierender Granulozyten festgestellt werden.

Trotz der großen interindividuellen Variabilität der NB1-Expression der hier untersuchten Probanden (Minimum 0 - Maximum 91 %) konnte durch wiederholte Messungen zum einen die Reliabilität der Bestimmung und zum anderen die Stabilität des NB1-positiven Anteils Neutrophiler eines Individuums demonstriert werden. Dies deckt sich mit Angaben einer im Allgemeinen konstanten NB1-Expression in der Literatur und unterstreicht die schon lange angenommene genetische Grundlage der NB1-Expression^{58, 63}.

4.2.2 Kontrollpatienten

Diese Gruppe wurde als Krankheitskontrollgruppe erfasst. Die Patienten leiden unter einem ischämischen Insult unterschiedlicher Genese mit dadurch bedingter steriler Inflammation, um über das Gegenstück und den Vergleich zu einer systemischen,

bakteriellen Infektion zu verfügen. Wie im Ergebnisteil detailliert beschrieben, unterscheiden sich die Kontrollpatienten von den septischen Patienten in Diagnose, geringen Entzündungsparametern (v.a. CRP und Leukozyten), stabilen, im Normbereich befindlichen Thrombozyten- und Hämoglobinwerten und wesentlich geringeren Punkten im SOFA- und APACHE II-Score. Eine Entzündungskomponente in betroffenen Organen, insbesondere im Myokard, ist durch die Anamnese des ischämischen Ereignisses gegeben. Der Anteil NB1-positiver Neutrophile ist mit $55,9 \pm 3,6$ % vergleichbar mit dem gesunder Spender: Die statistische Prüfung ergab keinen Unterschied zwischen diesen Kohorten. Daher kann die Gruppe ebenfalls zum Vergleich und der Untersuchung einer möglichen veränderlichen NB1-Expression unter der Bedingung einer schweren Infektion herangezogen werden.

4.2.3 Patienten mit schweren Infektionen

Wie einleitend erwähnt, sind neutrophile Granulozyten elementarer Bestandteil der angeborenen Abwehr und nehmen eine relevante Stellung in der Pathogenese einer Entzündungsreaktion und Sepsis ein. Um eine weitergehende Bedeutung und Regulation des Neutrophilen-Antigens NB1 darzulegen, wurde die Expression des Glykoproteins im Blut von Patienten mit schweren Infektionen untersucht. Es zeigte sich, dass die untersuchten Patienten einen signifikant höheren Anteil an NB1-positiven neutrophilen Granulozyten aufweisen als die gesunde Bevölkerung und die hier untersuchten Kontrollpatienten. Diese Feststellung deckt sich mit den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen um Mastuo et al.⁶³ und Göhring et al.⁶⁸. Im Weiteren fand sich eine vielfach höhere Fluoreszenzstärke auf Neutrophilen der Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen, was auf eine gesteigerte Expression des Glykoproteins pro Zelle hindeutet. Abbildung 8 verdeutlicht, dass der Anteil NB1-positiver Neutrophilen mit der gemessenen MFI korreliert. Dieses könnte durch einen Stimulus, der gleichzeitig sowohl die Rekrutierung der NB1-positiven Subpopulation als auch den Einbau des Proteins in die Plasmamembran bahnt, erklärbar sein. Bei Patienten, die in der initialen Typisierung kein NB1-Glykoprotein auf ihren Neutrophilen aufwiesen, kam es konform zu in der Literatur beschriebenen Versuchen zu keiner Änderung der Expression nach erneuten Messungen. Dieses Ergebnis bestärkt die Annahme, dass der NB1-negative Phänotyp auf einem Defekt der Genexpression im Rahmen der Translation beruht⁵⁷.

4.3 Zusammenhang des Ausmaßes der NB1-Expression mit paraklinischen und klinischen Parametern

Neben der vergleichenden Analyse zwischen Gesunden und Patienten mit schweren Infektionen war die Untersuchung, ob die NB1-Expression mit dem Erkrankungsverlauf korreliert, Ziel dieser Studie. Zu den erprobten laborchemischen Kenngrößen, die die Schwere einer Sepsis beschreiben, zählen CRP, Leukozyten- und Thrombozytenzahl, Hämoglobin und Kreatinin. Weitere Werte wie ALT, AST, Bilirubin, Glucose, pH, Temperatur, und INR, die weniger relevant sind bei der Beschreibung der Sepsis, wurden zwar auf statistische Korrelationen überprüft, auf eine Darstellung der allesamt nicht signifikanten Resultate wurde allerdings verzichtet. Grund hierfür ist die weitreichende Beeinflussung dieser Parameter durch gleichzeitig bestehende Erkrankungen und durch den Effekt von Medikamenten wie die angestrebte Senkung der Körpertemperatur durch Paracetamol oder physikalische Kühlung. Anstelle eines Vergleichs des mittleren Blutdrucks der Patienten wird an späterer Stelle auf die Katecholaminzufuhr eingegangen.

Es zeigt sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem prozentualen Anteil NB1-positiver Neutrophile sowie der mittleren Fluoreszenzintensität und der Höhe des C-reaktiven Proteins. Den stärksten Stimulus für einen Anstieg des Akute-Phase-Proteins, welcher zudem zur Beurteilung des Schweregrads einer akut-entzündlichen Erkrankung herangezogen werden kann, bilden bakterielle Infektionen. Die auf der Intensivstation akquirierten Patienten sind mit einem CRP-Betrag um 20 mg /dl als schwer erkrankt einzuordnen. In allen anderen Fällen konnte keine eindeutige Korrelation zwischen dem Anteil NB1-exprimierender Neutrophile respektive der Fluoreszenzintensität und ausgewählten Laborparametern aufgezeigt werden.

Lediglich die Leukozyten-, Thrombozytenzahl und Kreatinin lassen erkennen, dass mit steigender NB1-Expression bei schweren Infektionen eine tendenzielle Abnahme dieser Werte einhergeht. Ein hoher Anteil an Granulozyten, die das NB1-Glykoprotein auf ihrer Zelloberfläche tragen, könnte demnach potentiell Organkomplikationen im Rahmen einer septischen Entzündungsreaktion widerspiegeln. Diese sind unter anderem durch eine Thrombozytopenie, arterielle Hypoxämie oder arterielle Hypotension mit Einsatz adrenerger Substanzen gekennzeichnet. Eine Reduzierung des Hämoglobins, wie sie bei schweren septischen Verläufen vorkommen kann, wird in den vorliegenden Daten nur sehr schwach reflektiert.

Diskussion

Abgesehen von laborchemischen Parametern dienen auch klinische Kenngrößen und Therapiemaßnahmen der Analyse eines denkbaren Zusammenhangs mit der NB1-Expression. So erfolgte bei Patienten mit einem Anteil von über 70 % NB1-positiven Neutrophilen häufiger eine invasive Beatmungsform. Zudem erkennt man mit steigender NB1-Expression eine leicht angehobene Inzidenz der Katecholaminapplikation und der ITS-Aufenthaltsdauer. Die beschriebenen Verhältnisse beruhen jedoch nicht auf statistischer Signifikanz.

In der Patientenkohorte besteht mit 56,3 % Verstorbenen eine hohe Mortalität. Dabei findet sich jedoch weder beim mittleren Prozentsatz noch beim MFI ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Verstorbenen und Überlebenden. Ebenso wenig unterscheidet sich die durchschnittliche Zeitspanne bis zum Eintritt des Todes zwischen Patienten, die mehr als 70 % NB1-positive Granulozyten aufweisen, von denjenigen mit weniger als 70 %. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich der Anteil der NB1-positiven Zellen nicht unmittelbar auf das Outcome hinsichtlich des Überlebens auswirkt. Dementsprechend kann in dieser Arbeit nicht auf einen negativen Einfluss einer hohen NB1-Expression auf das Überleben bei schweren bakteriellen Infektionen geschlossen werden.

Im Kontrast zur publizierten Literatur findet sich jedoch in der aktuellen Untersuchung, dass sich der Prozentsatz der NB1-Expression bei den Patienten dynamisch verändern kann. Bei Patienten, deren Gesundheitszustand sich gebessert hat, findet sich ein Abfall des NB1-Prozentsatzes. Der durchschnittliche Wert kurz nach Aufnahme dieser Patienten auf ITS beträgt 73,2 %, welcher nach klinischer und laborchemischer Besserung auf 65 % NB1-positiven Neutrophilen fällt. Parallel dazu sinkt die MFI dabei um die Hälfte von im Mittel 950 auf 450 bei der letzten Blutentnahme. Komplementär zeigen Patienten ohne klinische oder laborchemische Besserung keine Änderung der Expression: Der Anteil von Granulozyten mit dem NB1-Antigen erhöht sich hier leicht von 70,2 % auf 72,6 %.

Diese Resultate deuten darauf hin, dass die NB1-Expression im Rahmen eines hochinflammatorischen Milieus dynamisch reguliert wird und entgegengesetzt zur publizierten Literatur keinen stabilen Marker darstellt. Es zeigt sich, dass sowohl die Anzahl der NB1-Oberflächenmoleküle als auch der Anteil der NB1-positiven Neutrophilen bei systemischen Infektionen zunehmen und mit dem Schweregrad der Inflammationsreaktion korrelieren.

4.4 Regulation der NB1-Expression

Der Ergebnisteil zum Vergleich der NB1-Expression zwischen den untersuchten Kohorten zeigt eine vermehrte Expression bei Patienten mit schweren, akuten Infektionen. Dabei sind sowohl mehr NB1-Moleküle pro Granulozyt, was sich in der gesteigerten Fluoreszenzintensität (MFI) abzeichnet, als auch ein gesteigerter Prozentsatz NB1-positiver Neutrophile vorhanden. Grundsätzlich kann dieses durch zwei Mechanismen erklärbar sein: Zum einen könnte ein höherer Prozentsatz in Verbindung mit einer starken Fluoreszenzintensität einen Risikofaktor für die Ausbildung einer schweren Verlaufsform einer systemischen Immunreaktion darstellen, die mit einem sogenannten septischen Cytokine-Storm⁷⁹ zur Ausprägung kommt. Andererseits liegt es nahe, dass Patienten einen höheren Prozentsatz und MFI infolge dieses Entzündungsmilieus entwickeln. In Betracht kommen Zytokine wie G-CSF, IL-8 oder IFN γ , sowie Leukotrien B4 und Komplementfaktor C5a, die mit Auslösen einer Immunreaktion gegen Pathogene ausgeschüttet werden, und fMLP als Bakterienbestandteil, die zirkulierende Granulozyten stimulieren⁸⁰. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte experimentell gezeigt werden, dass eine in vitro-Aktivierung von Neutrophilen, die hier mit dem proinflammatorische Zytokin TNF- α vorgenommen wurde, zu einer messbaren Steigerung der Fluoreszenzintensität führt. In diesen in vitro Versuchen zeigt sich jedoch keine Änderung des NB1-Prozentsatzes, so dass zwei parallel ablaufende Prozesse stattfinden: Zum einen erfolgt durch das Zytokinmilieu eine schnelle Translokation von intrazellulärem NB1 auf die granulozytäre Oberfläche (ohne Änderung des Prozentsatzes), zum anderen muss ein Stimulus bestehen, der unabhängig davon eine Hochregulation der ansonsten stabilen NB1-Expression stimuliert. Ein Anhaltspunkt für diese Hypothese stellt der Patient der Krankkontrollgruppe dar, der im Verlauf eine Sepsis entwickelte, und bei dem parallel zum Krankheitsverlauf ein steigender Anteil NB1-positiver Neutrophile sowie eine zunehmende MFI gemessen wurde.

Im Speziellen gehe ich an dieser Stelle auf das bei akuten bakteriellen Infektionen und Sepsis endogen stark erhöhte Zytokin G-CSF ein, dessen Einfluss auf die NB1-Expression bereits aufgezeigt wurde⁸¹⁻⁸³. G-CSF wirkt sowohl auf zirkulierende Neutrophile als auch auf den Granulozyten-Teilungspool im Knochenmark. Bei gesunden Spendern ist nach systemischer Verabreichung von G-CSF ein Anstieg sowohl der Fluoreszenzintensität als auch des Prozentsatzes der anti-NB1-markierten Neutrophilen zu verzeichnen^{63, 67, 84}. Einen weiteren Hinweis auf die dominierende

Diskussion

Wirkung von G-CSF ergaben Versuche, bei denen nach G-CSF-Gabe ein additiver Einfluss von simultan sezernierten Zytokinen nicht beobachtet wurde⁸⁵.

Zwei Erklärungen kommen für die G-CSF-vermittelte Erhöhung der NB1-Expression in Betracht: 1) Die erhöhte NB1-Oberflächenpräsentation der peripheren Neutrophilen könnte durch die Translokation der in den sekundären Vesikeln verbliebenden Glykoproteine in die Zellmembran bei Aktivierung geschehen. Die Stimulation durch G-CSF initiiert eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade, die unter anderem zu einer Vesikelausschüttung führt. Auch NB1-haltige Vesikel könnten so zur Zelloberfläche verlagert werden, was bewirkt, dass das Neutrophilen-spezifische Antigen vermehrt in die Zellmembran integriert wird. Dieses führt aber nicht zu einem Anstieg des Prozentsatzes.

2) G-CSF könnte die Gentranskription von NB1 mit konsekutiver Vermehrung der Gesamtproteinmenge stimulieren. Ein vormals beschriebener Zuwachs an NB1-mRNA unter G-CSF-Administration weist darauf hin⁶². Zudem zeigte eine kürzlich publizierte Studie, dass in septischen Patienten im sogenannten Zytokine-Storm NB1 das am stärksten regulierte Gen darstellt¹¹⁶. Die vorliegende Arbeit beinhaltet jedoch keine Daten zur Transkription um diese Aussage zu stützen.

Um neben der MFI, welche die NB1-Oberflächenexpression pro Granulozyt beschreibt, auch peripher den Anteil NB1-tragender Neutrophiler, zu verändern, ist eine längerfristige Einflussnahme auf teilungsfähige, granulozytäre Vorläuferzellen im Knochenmark nötig. In Betracht kommt 1) eine beschleunigte Teilungsrate NB1-positiver Vorläufer- und Stammzellen. Überträgt man Erkenntnisse aus der Pathogenese der Polyzythämia vera, könnte die erhöhte NB1-Subpopulation auf eine Überempfindlichkeit der neutrophilen Vorläuferzellen gegenüber Wachstumsfaktoren zurückgeführt werden⁸⁶. 2) Daneben ist eine verstärkte Mobilisierung ruhender, NB1-exprimierender Neutrophile denkbar. Durch G-CSF könnte die Rekrutierung solcher von den Gefäßinnenwänden postkapillärer Venolen veranlasst werden. Da sich 90 % des gesamten Neutrophilenpools im Knochenmark befinden, ist insbesondere die G-CSF-vermittelte Ausschwemmung NB1-positiver Neutrophile aus den Sinusoiden des Knochenmarks annehmbar. Um diese These zu untermauern, sind jedoch weitere Untersuchungen nötig.

Hypothetisch wäre die relative Verschiebung der Neutrophilen-Subpopulationen auch durch die vermehrte Abwanderung intravasaler NB1-defizienter Neutrophile ins Gewebe zu erklären, die somit nicht mehr aus den Blutproben extrahierbar sind. Eine

Diskussion

Untersuchung über die Interaktion von NB1 mit endotheliale PECAM-1, die zeigte, dass NB1-positiven Neutrophilen auf diese Weise die transendotheliale Migration vielmehr erleichtert wurde, spricht jedoch gegen die oben genannte Hypothese als Erklärung für die Verschiebung der Subpopulationen im Blut.

Von einem Beitrag der NB1-negativen Subpopulation zum gesteigerten Prozentsatz mittels Verlagerung von intrazellulär gespeichertem NB1 an die Zelloberfläche oder Aktivierung der CD177-Genexpression kann abgesehen werden, da die NB1-Defizienz dieser Neutrophilenfraktion auf einem Transkriptionsdefekt beruht. Durch die genetische Grundlage der NB1-Nonexpression sind NB1-negative Neutrophile NB1-exprimierender Individuen folglich grundsätzlich nicht in der Lage, das CD177-Genprodukt zu bilden⁶².

Die im Ergebnisteil dargestellte Korrelation zwischen CRP und der MFI, also im gewissen Maß der Quantität der NB1-Membranexpression, wirft die Frage auf, ob C-reaktives Protein die NB1-Expression regulieren kann. Das Akute-Phase-Protein CRP spielt eine elementare Rolle im angeborenen Immunsystem, die über die gebräuchliche Laborkontrolle als Verlaufsparemeter hinausgeht. CRP bindet und opsoniert spezifisch Phosphocholin, das Bestandteil bakterieller Membranen ist und auch bei apoptotischen oder beschädigten Körperzellen als Ligand verfügbar ist. Die direkte Interaktion mit dem Komplementfaktor C1q aktiviert das Komplementsystem und stimuliert die Phagozytose der Pathogene beziehungsweise des Areals der Gewebeschädigung⁸⁷. Darüber hinaus wurde demonstriert, dass CRP mit den Immunglobulinrezeptoren FcγRI und FcγRII (CD32) interagiert⁸⁸. Eine Isoform des FcγRII befindet sich auch auf der Oberfläche von Neutrophilen, der bei Bindung seiner Liganden durch eine calciumabhängige Signaltransduktion eine Zellaktivierung, heraufgesetzte Phagozytoseaktivität, das Auslösen des Respiratory Burst und eine Degranulation herbeiführt⁸⁹. Folgerichtig ist es möglich, dass CRP über den FcγRII an Neutrophile bindet, diese stimuliert und entweder durch eine gesteigerte Gentranskription oder Fusion NB1-haltiger Vesikel mit der Plasmamembran die Expression des Neutrophilen-spezifischen Antigens anhebt.

In der Literatur wird auf den mutmaßlich regulatorischen Effekt von Östrogenen verwiesen. Mehrere Arbeitsgruppen gaben eine signifikant höhere NB1-Expression mit einer größeren positiven Neutrophilen-Subpopulation auf Zellen der Nabelschnur⁶⁵, bei Neugeborenen^{65, 90} und während der Schwangerschaft^{64, 91} an. Zudem zeigten Frauen gegenüber Männern eine signifikant höhere NB1-Expression^{63, 64, 91}. Unter

Diskussion

den beschriebenen Konditionen werden angehobene Spiegel an weiblichen Sexualhormonen gemessen. Im Gegensatz dazu zeigen jedoch die Ergebnisse der vorliegenden Studie anhand des Expressionsvergleichs zwischen weiblichen und männlichen Probanden keinen statistischen Unterschied.

Zusammenfassend stellt sich somit ein Zusammenhang zwischen der Intensität der NB1-Expression und dem Entzündungsmilieu dar. In dem inflammatorischen Milieu kommt es zudem zur Stimulation verschiedener immunkompetenter Zellen der angeborenen Abwehr, die folgend auch Neutrophile in ihrer Aktivität regulieren. Dazu gehören unter anderem Mastzellen. Diese schütten bei Komplement-abhängiger Aktivierung unter anderem IL-1 und TNF- α aus und steuern so die Chemotaxis im Neutrophilen-Recruitment⁹². Dies stellt einen nötigen Schritt der protektiven Immunantwort bei bakteriellen Infektionen dar und könnte ebenfalls das Verhältnis von NB1-positiven und -negativen Neutrophilen zugunsten der NB1-exprimierenden Subpopulation beeinflussen.

Daneben kommt der wechselseitigen Interaktion zwischen TH17-Zellen und Neutrophilen eine relevante Stellung zu. Neuere Einsichten demonstrieren eine direkte chemotaktische Wirkung auf Neutrophile mittels der Freisetzung von IL-8. Zudem besteht eine indirekte Regulierung über die IL-17-induzierte Produktion von IL-6, IL-8 und G-CSF durch Fibroblasten und epitheliale Zellen⁹³. Da TH17-Zellen somit über freigesetzte Mediatoren in der Lage sind, die Granulopoese mit nachfolgender Proliferation und Akkumulation Neutrophiler am Ort des Entzündungsgeschehens zu bahnen, könnte man sie als einen weiteren indirekten Einflussfaktor der NB1-Regulation in Betracht ziehen.

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Erkenntnisse zur Regulation der NB1-Expression zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit, dass unter dem Einfluss von Zytokinen im Zuge einer systemischen Immunantwort auf eine schwere Infektion die Oberflächenexpression von NB1 verstärkt wird. Daneben scheint der Anteil der Granulozyten, die das Neutrophilen-spezifischen Antigen auf ihrer Zellmembran tragen, durch ein vermutlich selektives Recruitment erhöht. Der signifikant größere MFI-Betrag und Prozentsatz der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientenkohorte gegenüber den gesunden Testpersonen und auch der Patientenkontrollgruppe legt die Grundlage für die These. Ein im Rahmen dieser Studie vorgenommenes in vitro-Priming von Neutrophilen ergab eine Zunahme der Fluoreszenzintensität und kann

als weiterer Anhaltspunkt für eine Hochregulation der NB1-Expression im Entzündungsmilieu angenommen werden. Bei dem aus der Kontrollkohorte stammenden Patienten konnte neben einer ansteigenden Fluoreszenzintensität auch ein wachsender Anteil NB1-positiver Neutrophile parallel zur Ausbildung einer Sepsis gemessen werden. Damit stellt sich die Hypothese, dass im physiologischen Entzündungsmilieu NB1-positive Neutrophile über die vermehrte Integrierung des Glykoproteins in die Zellmembran die MFI erhöhen und dass in vivo ein Recruitment peripherer NB1-positiver Neutrophile stattfinden könnte, welches die Verschiebung der Subpopulationen bewirkt.

4.5 Mögliche Funktionen des NB1-Glykoproteins

Die physiologische Funktion des NB1-Antigens konnte bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht definiert werden. Wie vorangestellt ausführlich diskutiert, findet sich eine Korrelation der CD177-Expression mit akuten infektiösen Erkrankungen. Daher könnte NB1 eine potentielle Bedeutung in der Neutrophilen-vermittelten Wirtsabwehr spielen. In Zusammenhang mit der angeborenen Immunantwort sind folgende Funktionen und funktionelle Teilaspekte vorstellbar:

- Adhäsion und Transmigration

Die Arbeitsgruppe um Sachs et al. demonstrierte unlängst, dass NB1 zur Adhäsion am Endothel und damit zur darauffolgenden Transmigration zum infizierten Gewebe Neutrophiler beiträgt. Durch direkte Interaktion mit dem Adhäsionsmolekül PECAM-1 der Endothelzellen wird die NB1-exprimierende Subpopulation als eine besonders potente Neutrophilenfraktion in Zusammenwirken mit dem aktivierten Endothel definiert⁷⁷. Es zeigte sich eine schnellere und effektivere Transmigration in vitro als bei den NB1-negativen Granulozyten. Ob dieser Effekt unter physiologischen Bedingungen auch in vivo relevant ist, ist noch unklar. Zumindest würde man eine verringerte Anzahl NB1-positiver Neutrophile in der Blutbahn erwarten, falls diese schneller aus der Zirkulation treten als NB1-negative. In der vorliegenden Arbeit und in bereits erwähnten Untersuchungen trifft das entgegengesetzte Verhältnis zu. Als Erklärung wäre anzunehmen, dass 1) die Freisetzung von NB1-positiven Neutrophilen aus dem Knochenmark den Abzug durch das Endothel hindurch übersteigt; 2) eine oftmals auf Intensivstationen durchgeführte arterielle Blutentnahme den „neuen“, stark NB1-exprimierenden Neutrophilenpool widerspiegelt im Gegensatz zu venösen Blutent-

Diskussion

nahmen nachdem vor allem NB1-exprimierende Granulozyten in postkapillären Venolen die Blutbahn verließen; 3) oder aber bei septischen Geschehen mit Erregernachweis die Pathogene intravasal vorkommen, sodass NB1-positive Granulozyten eher in der Blutbahn verbleiben.

- Interaktionspartner mit thrombozytärem PECAM-1

Aus der funktionellen Interaktion von NB1 mit endothelialelem PECAM-1 liegt die Schlussfolgerung auf eine gleichwertige Funktionsweise mit PECAM-1-Molekülen der Thrombozyten nahe. Thrombozyten üben ebenfalls eine proinflammatorische Rolle aus, indem sie an Gefäßwände und auch an Neutrophile adhären können, diese über sezernierte Mediatoren aktivieren und so das Neutrophilen-Recruitment zum Ort des infizierten Gewebes begünstigen⁹⁴. Interessanterweise ergaben entsprechende Versuchsanordnungen, dass NB1 weder bei der Aggregation zwischen Neutrophilen und Thrombozyten noch bei der Neutrophilen-Transmigration zwischen adhären Thrombozyten hindurch von Bedeutung ist⁹⁵. Interaktionen zwischen Plättchen und Neutrophilen im Rahmen der Wirtsabwehr, die eine Adhäsion zwischen den beiden Zelltypen voraussetzen, ist demnach nicht durch Assoziation von NB1 mit Thrombozyten-PECAM-1 vermittelt.

- Phagozytose

NB1 vermittelt die Membranpräsentation von PR3. Die Neutrophilen-spezifische Serinprotease ist das Hauptautoantigen in ANCA-assoziierten Vaskulitiden wie der GPA (ehemals M.Wegener) und spielt eine potentielle Rolle in der Pathogenese dieser Autoimmunerkrankung⁷¹. Daneben gibt es Hinweise, dass die enzymatische Aktivität von PR3 ebenfalls einen wesentlichen Faktor in der Neutrophilen-Transmigration darstellt, da die Diapedese sowohl durch Anti-NB1-, PECAM-1-blockierende Antikörper als auch durch PR3-spezifische Inhibitoren herabgesetzt ist⁹⁶. Überdies stellte sich kürzlich heraus, dass membrangebundener Proteinase 3 auch die Funktion eines nicht-opsonierenden Phagozytoserezeptors bei bakteriellen Infektionen zukommt⁹⁷. Dieser Prozess wird wahrscheinlich über die Aktivierung von PAR2 (Protease activated receptor 2) in Neutrophilen vermittelt. Die physiologische Assoziation von NB1 und PR3 auf der Oberfläche Neutrophiler Granulozyten betont die Möglichkeit, dass NB1 in Prozesse der Phagozytose und Transmigration involviert ist.

- „Don't eat me“ –Signal

Diskussion

Möglicherweise kann die Wirkung von PR3 als „dont eat me“ –Signal, welches die Phagozytose der exprimierenden Zellen durch Makrophagen hemmt, auf seinen assoziierten Partner NB1 übertragen werden⁹⁸. Damit würden NB1-positive Neutrophile länger funktionell präsent sein als NB1-Negative. Zudem wurde berichtet, dass die homophile Bindung von PECAM-1-Molekülen auf Makrophagen und Leukozyten ebenso die phagozytische Aufnahme durch Makrophagen verhindert⁹⁹. Da NB1 ein Bindungspartner von PECAM-1 ist, wird die These, wonach das Neutrophilenspezifische Antigen die Phagozytose verzögert, bekräftigt. Damit würde das NB1-Glykoprotein die von neutrophilen Granulozyten ausgehende inflammatorische Reaktion potenzieren.

- Rolle während Fetalperiode und Schwangerschaft

Die Steigerung der NB1-Expression in der Schwangerschaft, in Granulozyten des Nabelschnurbluts und bei Neugeborenen deutet auf eine gesonderte Stellung in der fetalen Periode hin. Im Rahmen der NB1-vermittelten Adhäsion wird eine pathophysiologische Stellung bei der Präeklampsie und Thrombophilie in der Schwangerschaft diskutiert^{64, 91}.

- NB1 als Rezeptor

Neuere Daten deuten auf eine Rezeptorfunktion von NB1 hin. Zum einen vermittelt NB1 als Rezeptor die Membranexpression von PR3, wodurch diese Neutrophilensubpopulation durch PR3-ANCA und Priming aktiviert werden kann^{71, 100}, andererseits verursachen Antikörper gegen NB1 Immuneutropenien und TRALI^{50, 69, 70, 101}. Indes bewirkt eine Interaktion von NB1 mit endotheliale PECAM-1 als komplementärer Rezeptor eine gesteigerte Adhäsion von Neutrophilen am Endothel⁷⁷. Da NB1 per GPI-Verankerung in die Plasmamembran integriert ist und somit keine Transmembrandomäne für die Signaltransduktion aufweist, müsste von einem NB1-PR3-Signalkomplex ausgegangen werden. In der Tat wurde vor kurzem das β -Integrin Mac-1 (CD11b/ CD18) als funktioneller Rezeptor in diesem Signaltransduktionsweg deklariert, dessen CD11b- und CD18-Ketten an der Degranulation und ROS-Bildung NB1/PR3-positiver Neutrophilen bei Stimulation mit PR3-ANCA beteiligt sind. NB1 und Mac-1 interagieren dabei räumlich und in funktioneller Weise auf der Zellmembran. Zudem stellt sich heraus, dass NB1, Mac-1 und PR3 gemeinsam in sogenannten „lipid rafts“ der Neutrophilenmembran vorkommen, die eine hohe Lateralität aufweisen und Signalproteine dynamisch regulieren können¹⁰².

Demzufolge ist NB1 in der Lage, als Rezeptor in einem Signalkomplex intrazelluläre Signalwege auszulösen, die zur Aktivierung Neutrophiler Granulozyten führen einschließlich einer verbesserten Adhäsion am aktivierten Endothel, der Degranulierung und Bildung reaktiver Sauerstoffspezies.

- Proliferative Wirkung

Die CD177-Überexpression und dessen pathophysiologische Rolle in myeloproliferativen Erkrankungen, die gleichzeitige Steigerung der Neutrophilenzahlen und der NB1-Expression bei Sepsis, nach Gabe von G-CSF und in der Schwangerschaft erhebt die Annahme, dass NB1, ähnlich anderen Mitgliedern der Ly-6-Familie, eine pro-proliferative Wirkung und Funktion in der Differenzierung hämatopoetischer Zellen aufweist^{103,104}. Da in der vorliegenden Arbeit nur gezeigt werden konnte, dass eine erhöhte Expression von NB1 bei septischen Infektionen vorliegt ohne eine Übersicht der Neutrophilenzahlen anhand eines Differentialbild zur Verfügung zu stellen, kann die Studie nur als unterstützender Anhalt für die physiologische proliferative Funktion von NB1 gelten.

- Verzögerung der Apoptose Neutrophiler

Die Hypothese, dass NB1-positive Neutrophile durch eine verzögerte Induzierung der Apoptose länger zur Verfügung stehen als NB1-Negative, wurde durch die Studienergebnisse aufgestellt, die zeigen, dass mit Gabe von G-CSF die Apoptose Neutrophiler gehemmt wird¹⁰⁵. Gleichsame Beobachtungen wurden von Mnjayan et al. gemacht, die einen erhöhten Anteil nekrotischer Zellen unter der NB1-negativen Subpopulation feststellten¹⁰³. Der erhöhte Prozentsatz NB1-exprimierender Neutrophile unter septischen Bedingungen könnte hierdurch begründet werden. Allerdings konnte mit der bis dato vorliegenden Literatur kein konkreter physiologischer Zusammenhang zwischen dem NB1-Glykoprotein und der Apoptose von Neutrophilen nachgewiesen werden, sodass weitere Untersuchungen notwendig sind.

Da sich experimentell zeigte, dass NB1-exprimierende Neutrophile einen kompetitiven Vorteil haben bei der Migration durch das Endothel gegenüber NB1-negativen Neutrophilen desselben Individuums^{77, 106}, würde man eine herabgesetzte Transmigrationsfähigkeit der Neutrophilen von Personen, die überhaupt kein NB1-Protein exprimieren, annehmen. Überraschenderweise konnte bei Neutrophilen dieser Non-Expriemierer kein Transmigrationsdefekt nachgewiesen werden, sodass Kompensationsmechanismen für entsprechende NB1-Interaktionen existieren müssen⁹⁶.

4.6 Klinische Bedeutung und Implikationen

Die oben ausführlich diskutierten Befunde zeigen, dass NB1 eine Potenzierung der inflammatorischen Immunantwort bewirken kann.

NB1 kann potentiell zu einer immunkompetenten Abwehr gegen bakterielle Erreger beitragen, auf der anderen Seite aber auch die Gegenregulation und Auflösung einer proinflammatorische Situation herabsetzen. In der vorliegenden Arbeit zeigen Patienten mit einem Prozentsatz von über 70% NB1-positiven Neutrophilen einen höheren Anteil Nierenersatzverfahrens- und Beatmungspflichtiger. Zudem zeigt sich eine Korrelation von CRP und der mittleren Fluoreszenzintensität. Daneben findet sich eine Korrelation zwischen der Dynamik der NB1-Expression und dem klinischem Verlauf. Letztendlich stellt sich jedoch kein Unterschied in der Mortalität der Patienten dar.

Die erfassten klinischen Werte lassen infolge der multiplen Einflussfaktoren und Heterogenität der Patientenkohorte keine unmittelbare Erkenntnis hinsichtlich einer physiologischen Funktion von NB1 zu.

Mit der nicht endgültig identifizierten physiologischen Rolle des Neutrophilenspezifischen Antigens NB1 ist es daher nicht zweckmäßig, spezielle medikamentöse Therapien für den Klinikalltag zu entwickeln, die etwa als Agonist oder Inhibitor in die Mechanismen der NB1-Interaktionen eingreifen.

Auch als diagnostischer Marker für eine schwere bakterielle Infektion oder Sepsis erscheint NB1 als wenig sinnvoll, da eine Erhöhung des Anteils NB1-positiver Neutrophile durch G-CSF-Einfluss erst mit einigen Tagen Verzögerung einsetzt⁶⁷. Zudem setzt ein vergleichender Anstieg der NB1-Expression einen bereits bekannten Ausgangswert für den Anteil NB1-positiver Neutrophile mit dazugehöriger Fluoreszenzintensität für den Patienten im gesunden Zustand voraus. Im Verhältnis zum Nutzen wäre eine solche generelle Typisierung vieler Personen aus technischer und monetärer Sicht zu aufwendig.

Im Gegensatz dazu könnten mehrmalige Überprüfungen der NB1-Expression zur Verlaufs- und Therapiekontrolle einer schweren, systemischen Infektion in Ergänzung zu Routineparametern dienen. Voraussetzung für die Bestimmung von NB1 in der klinischen Routine sind etablierte und vereinfachte Messverfahren und die Entwicklung von Richtwerten.

Die zugrundeliegenden Mechanismen der in dieser Arbeit dargestellter dynamischer Regulation der NB1 Expression sollten in weiteren Untersuchungen näher untersucht werden.

5 Literaturverzeichnis

1. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992;101(6):1644-55.
2. Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone H-G, et al. Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis. *Intensivmedizin und Notfallmedizin* 2010;47(3):185-207.
3. Lever A, Mackenzie I. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *BMJ*:2007;335(7625):879.
4. Moerer O, Quintel M. Definition, Epidemiologie und ökonomische Aspekt der Sepsis bei Erwachsenen. *Der Internist* 2009;(50):788-98.
5. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *CRITICAL CARE MEDICINE-BALTIMORE-* 2001;29(7):1303-10.
6. Klompas M, Yokoe DS. Automated Surveillance of Health Care-Associated Infections. *Clinical Infectious Diseases* 2009;48:1268-75.
7. Koperna T, Schulz F. Relaparotomy in Peritonitis: Prognosis and Treatment of Patients with Persisting Intraabdominal Infection. *World Journal of Surgery* 2000;24:32-7.
8. Dellinger R P, Carlet J M , Masur H et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2004 ; 32 : 858 - 873
9. Asfar P, Meziani F, Hamel JF et al. High versus low blood-pressure target in patients with septic shock. *New England Journal of Medicine* 2014;370(17): 1583-93
10. Cronin L, Cook D, Carlet J, Heyland D. Corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature. *Crit Care Med* 1995;(23(8)):1430-9.
11. Brunkhorst F, Engel C, Bloos F, Meier-Hellmann A. Intensive Insulin Therapy and Pentastarch Resuscitation in Severe Sepsis. *N Engl J Med* 2008;358(12):5-39.
12. Van Deventer S. Cytokine and cytokine receptor polymorphisms in infectious disease. *Intensive care medicine* 2000;26(13):98-102.
13. Thomas L. Germs. *N Engl J Med* 1972;(287):553-5.
14. Fisher CJ, Agosti JM, Opal SM, Lowry SF. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein. *N Engl J Med* 1996;334:1697-702.
15. Fisher CJ, Slotman G, Opal S, Pribble J. Initial evaluation of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of septic syndrome: a randomized, open-label, placebo-controlled multicenter trial. *Crit Care Med* 22(1):12-21.
16. Ertel W, Kremer JP, Kenney J, et al. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood* 1995;85(5):1341-7.
17. Döcke WD, Randow F, Syrbe U, et al. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 1997;3(6):678-81.
18. Lyn-Kew K, Standiford T. Immunosuppression in sepsis. *Curr Pharm Des* 2008;14(19):1870-81.

19. Hotchkiss RS, McConnell KW, Bullok K, et al. Sepsis-Induced Apoptosis Causes Progressive Profound Depletion of B and CD41 T Lymphocytes in Humans. *The Journal of Immunology* 2006;176(9):5471.
20. Gogos C, Drosou, Bassaris H, et al. Pro- versus Anti-inflammatory Cytokine Profile in Patients with Severe Sepsis: A Marker for Prognosis and Future Therapeutic Options. *J Infect Dis* 2000;181(1):176-80.
21. Voll R, Herrmann M, Roth E, et al. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 1997;390(6658):350-1.
22. Löffler G. Unspezifische und spezifische Abwehr. In: *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Springer; 2003.
23. Megiovanni AM, Sanchez F, Robledo-Sarmiento M, Morel C, Gluckman JC, Boudaly S. Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *Journal of leukocyte biology* 2006;79(5):977-88.
24. Mudzinski S, Christian T, Guo T, Cirenza E, Hazlett K, Gosselin E. Expression of HLA-DR (major histocompatibility complex class II) on neutrophils from patients treated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for mobilization of stem cells [letter]. *Blood* 1995;86(6):2452 -2453.
25. Tani K, Murphy WJ, Chertov O, Oppenheim JJ, Wang JM. The Neutrophil Granule Protein Cathepsin G Activates Murine T Lymphocytes and Upregulates Antigen-Specific Ig Production in Mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001;282(4):971-6.
26. Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, et al. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 1990;343(6260):757-60.
27. Norman K, Moore K, McEver R, Ley K. Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* 1995;86(12):4417 -4421.
28. Borregaard N, Kjeldsen L, Sengelov H, et al. Changes in subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators. *Journal of Leukocyte Biology* 1994;56(1):80 -87.
29. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994;84(7):2068-101.
30. Faurischou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 2003;5(14):1317-27.
31. Nerl C. Zellen der Granulozytopoese. In: *Klinische Hämatologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart; 1993. p. 5-9.
32. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, et al. In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 2010;116(4):625 -627.
33. Normale Zellverteilung im peripheren Blut. In: *Klinische Hämatologie*, Hrsg. Begemann H, Rastetter J; Georg Thieme Verlag Stuttgart: 5-9.
34. Theilgaard-Mönch K, Jacobsen L, Borup R, Rasmussen T. The transcriptional program of terminal granulocytic differentiation. *Blood* 2005;105(4):1785-96.
35. Eirunn Knudsen, Iversen PO, Boyum A, Seierstad T. G-CSF enhances the proliferation and mobilization, but not the maturation rate, of murine myeloid cells - Knudsen - 2011 - *European Journal of Haematology* - Wiley Online Library. *Eur J Haematol* 2011;87(4):302-11.
36. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H. Entzündung. In: *Pathologie*. Urban & Fischer Verlag/ Elsevier GmbH; 2008. p. 117-46.
37. Bainton DF, Farquhar MG. Differences in enzyme content of azurophil and specific granules of polymorphonuclear leukocytes. I. Histochemical staining of bone marrow smears. *J Cell Biol* 1968;39(2):286-98.

Literaturverzeichnis

38. Bainton DF, Farquhar MG. Differences in enzyme content of azurophil and specific granules of polymorphonuclear leukocytes. II. Cytochemistry and electron microscopy of bone marrow cells. *J Cell Biol* 1968;39(2):299-317.
39. Mollinedo F, Nakajima M, Llorens A, et al. Major co-localization of the extracellular-matrix degradative enzymes heparanase and gelatinase in tertiary granules of human neutrophils. *Biochem J* 1997;327 (Pt 3):917-23.
40. Borregaard N, Sørensen OE, Theilgaard-Mönch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol* 2007;28(8):340-5.
41. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010;33(5):657-70.
42. Kaufmann SHE. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nat Immunol* 2008;9(7):705-12.
43. Vento S, Cainelli F. Infections in patients with cancer undergoing chemotherapy: aetiology, prevention, and treatment. *Lancet Oncol* 2003;4(10):595-604.
44. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320(6):365-76.
45. Henson PM, Johnston RB Jr. Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. *J Clin Invest* 1987;79(3):669-74.
46. Kumar V, Sharma A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol* 2010;10(11):1325-34.
47. Flo TH, Smith KD, Sato S, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 2004;432(7019):917-21.
48. Nagaoka I, Tamura H, Hirata M. An antimicrobial cathelicidin peptide, human CAP18/LL-37, suppresses neutrophil apoptosis via the activation of formyl-peptide receptor-like 1 and P2X7. *J Immunol* 2006;176(5):3044-52.
49. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;303(5663):1532-5.
50. Lalezari P, Murphy GB, Allen FH. NB1, a new neutrophil-specific antigen involved in the pathogenesis of neonatal neutropenia. *J Clin Invest* 1971;50(5):1108-15.
51. Stroncek DF, Skubitz KM, McCullough JJ. Biochemical characterization of the neutrophil-specific antigen NB1. *Blood* 1990;75(3):744-55.
52. 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. *European Journal of Immunology* 2001;31(5):1301-9.
53. Caruccio L, Bettinotti M, Director-Myska AE, Arthur DC, Stroncek D. The gene overexpressed in polycythemia rubra vera, PRV-1, and the gene encoding a neutrophil alloantigen, NB1, are alleles of a single gene, CD177, in chromosome band 19q13.31. *Transfusion* 2006;46(3):441-7.
54. Stroncek DF, Shankar RA, Noren PA, Herr GP, Clement LT. Analysis of the expression of NB1 antigen using two monoclonal antibodies. *Transfusion* 1996;36(2):168-74.
55. Clement LT, Lehmeyer JE, Gartland GL. Identification of neutrophil subpopulations with monoclonal antibodies. *Blood* 1983;61(2):326-32.
56. Stroncek D. Neutrophil-specific antigen HNA-2a (NB1, CD177): serology, biochemistry, and molecular biology. *Vox Sang* 2002;83 Suppl 1:359-61.
57. Kissel K, Scheffler S, Kerowgan M, Bux J. Molecular basis of NB1 (HNA-2a, CD177) deficiency. *Blood* 2002;99(11):4231-3.
58. Goldschmeding R, van Dalen CM, Faber N, et al. Further characterization of the NB 1 antigen as a variably expressed 56-62 kD GPI-linked glycoprotein of plas-

- ma membranes and specific granules of neutrophils. *Br J Haematol* 1992;81(3):336-45.
59. Bux J. Molecular genetics of granulocyte polymorphisms. *Vox sanguinis* 2000;78 Suppl 2:125.
 60. Bettinotti MP, Olsen A, Stroncek D. The use of bioinformatics to identify the genomic structure of the gene that encodes neutrophil antigen NB1, CD177. *Clin Immunol* 2002;102(2):138-44.
 61. Matsuo K, Lin A, Procter JL, Clement L, Stroncek D. Variations in the expression of granulocyte antigen NB1. *Transfusion* 2000;40(6):654-62.
 62. Wolff J, Brendel C, Fink L, Bohle RM, Kissel K, Bux J. Lack of NB1 GP (CD177/HNA-2a) gene transcription in NB1 GP- neutrophils from NB1 GP-expressing individuals and association of low expression with NB1 gene polymorphisms. *Blood* 2003;102(2):731-3.
 63. Matsuo K, Lin A, Procter JL, Clement L, Stroncek D. Variations in the expression of granulocyte antigen NB1. *Transfusion* 2000;40(6):654-62.
 64. Caruccio L, Bettinotti M, Matsuo K, Sharon V, Stroncek D. Expression of human neutrophil antigen-2a (NB1) is increased in pregnancy. *Transfusion* 2003;43(3):357-63.
 65. Stroncek, Shankar, Litz, Clement. The expression of the NB1 antigen on myeloid precursors and neutrophils from children and umbilical cords. *Transfusion Medicine* 1998;8(2):119-23.
 66. Tefferi A, Lasho TL, Wolanskyj AP, Mesa RA. Neutrophil PRV-1 expression across the chronic myeloproliferative disorders and in secondary or spurious polycythemia. *Blood* 2004;103(9):3547-8.
 67. Stroncek DF, Jaszcz W, Herr GP, Clay ME, McCullough J. Expression of neutrophil antigens after 10 days of granulocyte-colony-stimulating factor. *Transfusion* 1998;38(7):663-8.
 68. Göhring K, Wolff J, Doppl W, et al. Neutrophil CD177 (NB1 gp, HNA-2a) expression is increased in severe bacterial infections and polycythaemia vera. *Br J Haematol* 2004;126(2):252-4.
 69. Stroncek DF, Shapiro RS, Filipovich AH, Plachta LB, Clay ME. Prolonged neutropenia resulting from antibodies to neutrophil-specific antigen NB1 following marrow transplantation. *Transfusion* 1993;33(2):158-63.
 70. 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):707-13.
 71. Von Vietinghoff S, Tunnemann G, Eulenberg C, et al. NB1 mediates surface expression of the ANCA antigen proteinase 3 on human neutrophils. *Blood* 2007;109(10):4487-93.
 72. Schreiber A, Otto B, Ju X, et al. Membrane Proteinase 3 Expression in Patients with Wegener's Granulomatosis and in Human Hematopoietic Stem Cell-Derived Neutrophils. *JASN* 2005;16(7):2216-24.
 73. Van Rossum AP, Rarok AA, Huitema MG, Fassina G, Limburg PC, Kallenberg CGM. Constitutive membrane expression of proteinase 3 (PR3) and neutrophil activation by anti-PR3 antibodies. *J Leukoc Biol* 2004;76(6):1162-70.
 74. Bux J, Dickmann JO, Stockert U, Mueller-Eckhardt C. Influence of granulocyte antibodies on granulocyte function. *Vox Sang* 1993;64(4):220-5.
 75. Newman PJ. The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 1997;99(1):3-8.
 76. Nakada MT, Amin K, Christofidou-Solomidou M, et al. Antibodies against the first Ig-like domain of human platelet endothelial cell adhesion molecule-1

- (PECAM-1) that inhibit PECAM-1-dependent homophilic adhesion block in vivo neutrophil recruitment. *J Immunol* 2000;164(1):452-62.
77. Sachs UJH, Andrei-Selmer CL, Maniar A, et al. The Neutrophil-Specific Antigen CD177 Is a Counter-Receptor for Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31). *J Biol Chem* 2007;282(32):23603-12.
 78. Stroncek D. Neutrophil alloantigens. *Transfus Med Rev* 2002;16(1):67-75.
 79. D'Elia R, Harrison K, Oyston P, Lukaszewsk R, Clark G. Targeting the "Cytokine Storm" for Therapeutic Benefit. *Clin Vaccine Immunol* 2013;20(3):319-27.
 80. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 1989;84(4):1045-9.
 81. Barth E, Fischer G, Schneider EM, Wollmeyer J, Georgieff M, Weiss M. DIFFERENCES IN THE EXPRESSION OF CD64 AND mCD14 ON POLYMORPHONUCLEAR CELLS AND ON MONOCYTES IN PATIENTS WITH SEPTIC SHOCK. *Cytokine* 2001;14(5):299-302.
 82. Watari K, Asano S, Shirafuji N, et al. Serum granulocyte colony-stimulating factor levels in healthy volunteers and patients with various disorders as estimated by enzyme immunoassay. *Blood* 1989;73(1):117-22.
 83. Bux J, Hofmann C, Welte K. Serum G-CSF levels are not increased in patients with antibody-induced neutropenia unless they are suffering from infectious diseases. *Br J Haematol* 1999;105(3):616-7.
 84. Skubitz KM, Stroncek DF, Sun B. Neutrophil-specific antigen NB1 is anchored via a glycosyl-phosphatidylinositol linkage. *J Leukoc Biol* 1991;49(2):163-71.
 85. Aman MJ, Stockdreher K, Thews A, et al. Regulation of immunomodulatory functions by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in vivo. *Ann Hematol* 1996;73(5):231-8.
 86. Vannucchi A. Insights into the pathogenesis and management of thrombosis in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Internal and Emergency Medicine* 2010;5(3):177-84.
 87. Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure* 1999;7(2):169-77.
 88. Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive Protein. *J Biol Chem* 2004;279(47):48487-90.
 89. Naziruddin B, Duffy BF, Tucker J, Mohanakumar T. Evidence for cross-regulation of Fc gamma RIIIB (CD16) receptor-mediated signaling by Fc gamma RII (CD32) expressed on polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol* 1992;149(11):3702-9.
 90. Wolff J, Goehring K, Heckmann M, Bux J. Sex-dependent up regulation of CD177-specific mRNA expression in cord blood due to different stimuli. *Transfusion* 2006;46(1):132-6.
 91. Taniguchi K, Nagata H, Katsuki T, et al. Significance of human neutrophil antigen-2a (NB1) expression and neutrophil number in pregnancy. *Transfusion* 2004;44(4):581-5.
 92. Von Stebut E, Metz M, Milon G, Knop J, Maurer M. Early macrophage influx to sites of cutaneous granuloma formation is dependent on MIP-1alpha /beta released from neutrophils recruited by mast cell-derived TNFalpha. *Blood* 2003;101(1):210-5.
 93. Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* 2010;115(2):335-43.
 94. Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: Linking hemostasis and inflammation. *Blood Reviews* 2007;21(2):99-111.

95. Pliyev BK, Menshikov M. Comparative evaluation of the role of the adhesion molecule CD177 in neutrophil interactions with platelets and endothelium. *European Journal of Haematology* 2012;:n/a-n/a.
96. Kuckleburg CJ, Tilkens SB, Santoso S, Newman PJ. Proteinase 3 Contributes to Transendothelial Migration of NB1-Positive Neutrophils. *J Immunol* 2012;188(5):2419-26.
97. Kim YC, Shin JE, Lee SH, et al. Membrane-bound proteinase 3 and PAR2 mediate phagocytosis of non-opsonized bacteria in human neutrophils. *Molecular Immunology* 2011;48(15-16):1966-74.
98. Gabillet J, Millet A, Pederzoli-Ribeil M, et al. Proteinase 3, the Autoantigen in Granulomatosis with Polyangiitis, Associates with Calreticulin on Apoptotic Neutrophils, Impairs Macrophage Phagocytosis, and Promotes Inflammation. *J Immunol* [Internet] 2012 [cited 2012 Aug 9];Available from: <http://www.jimmunol.org/content/early/2012/07/27/jimmunol.1200600>
99. Brown S, Heinisch I, Ross E, Shaw K, Buckley CD, Savill J. Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature* 2002;418(6894):200-3.
100. Savage CO, Pottinger BE, Gaskin G, Pusey CD, Pearson JD. Autoantibodies developing to myeloperoxidase and proteinase 3 in systemic vasculitis stimulate neutrophil cytotoxicity toward cultured endothelial cells. *Am J Pathol* 1992;141(2):335-42.
101. Sachs UJH, Hattar K, Weissmann N, et al. Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an ex vivo rat lung model. *Blood* 2006;107(3):1217-9.
102. Jerke U, Rolle S, Dittmar G, et al. Complement Receptor Mac-1 Is an Adaptor for NB1 (CD177)-mediated PR3-ANCA Neutrophil Activation. *J Biol Chem* 2011;286(9):7070-81.
103. Mnjoyan Z, Li J, Afshar-Kharghan V. Expression of polycythemia rubra vera-1 decreases the dependency of cells on growth factors for proliferation. *Haematologica* 2005;90(3):405-6.
104. Stroncek DF, Caruccio L, Bettinotti M. CD177: A member of the Ly-6 gene superfamily involved with neutrophil proliferation and polycythemia vera. *J Transl Med* 2004;2:8.
105. Basu S, Hodgson G, Katz M, Dunn AR. Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood* 2002;100(3):854-61.
106. Bayat B, Werth S, Sachs UJH, Newman DK, Newman PJ, Santoso S. Neutrophil Transmigration Mediated by the Neutrophil-Specific Antigen CD177 Is Influenced by the Endothelial S536N Dimorphism of Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1. *J Immunol* 2010;184(7):3889-96.
107. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *New England Journal of Medicine* 2003;348(2):138-50.
108. Bendjelid K, Romand J A. Fluid responsiveness in mechanically ventilated patients: a review of indices used in intensive care. *Intensive Care Med* 2003;29:352-360
109. Rivers E, Nguyen B, Havstad S et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001;345: 1368-1377
110. Dellinger R P, Carlet J M, Masur H et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2003;32:858-873

Literaturverzeichnis

111. ProCESS Investigators, Yealy DM, Kellum JA et al. A Randomized Trial of Protocol-Based Care for Early Septic Shock. *N Engl J Med.* 2014;371(4):386-7
112. Martin C, Viviani X, Leone M et al. Effect of norepinephrine on the outcome of septic shock. *Crit Care Med* 2000;28:2758-2765
113. Di Giandomenico D, Morimatsu H, May CN et al. Intrarenal blood flow distribution in hyperdynamic septic shock: Effect of norepinephrine. *Crit Care Med* 2003 Oct;31(10):2509-13
114. Caironi P, Tognoni G, Masson S et al. Albumin replacement in patients with severe sepsis or septic shock. *N Engl J Med* 2014; 370:1412-1421
115. Huang TS, Shyu YC, Chen HY et al. Effect of parenteral selenium supplementation in critically ill patients: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8(1):e54431
116. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J et al. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med* 2011;208(13):2581-90

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Alexandra Jennerjahn, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Expression von Neutrophil Antigen B1 (CD177) auf neutrophilen Granulozyten bei Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift