

Oberflächenrezeptoren auf neutrophilen Granulozyten bei Patienten mit Chronischer Granulomatose

Natalie Lehmann

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. D. Reinhardt

Oberflächenrezeptoren auf neutrophilen Granulozyten bei Patienten mit Chronischer Granulomatose



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Natalie Lehmann
aus
Starnberg

2009

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Wintergerst
2. Berichtserstatter: Prof. Dr. Thomas Brocker
Mitberichtserstatter: Prof. Dr. Peter Thomas
Prof. Dr. Matthias Blumenstein

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. D. Hartl

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Oktober 2009

In Liebe und Dankbarkeit meinen einzigartigen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. Abkürzungsverzeichnis

2. Einleitung

- 2.1. Chronische Granulomatose
- 2.2. Neutrophile Granulozyten
- 2.3. Oberflächenrezeptoren
 - 2.3.1. Komplementrezeptoren
 - 2.3.2. Toll-like Rezeptoren
 - 2.3.3. Interleukin-8 Rezeptoren
 - 2.3.4. Leukotrien B4 Rezeptor

3. Zielsetzung

4. Material und Methoden

- 4.1. Patienten
- 4.2. Geräte
- 4.3. Glas- und Plastikmaterial
- 4.4. Antikörper
- 4.5. Stimulantien
- 4.6. Chemikalien und Puffer
- 4.7. Durchflusszytometrie
 - 4.7.1. Färbung
 - 4.7.2. Isolierung von neutrophilen Granulozyten
 - 4.7.3. Stimulation von isolierten neutrophilen Granulozyten
 - 4.7.4. Aufnahme

5. Ergebnisse

- 5.1. Komplementrezeptoren
- 5.2. Toll-like Rezeptoren
- 5.3. Interleukin-8 Rezeptoren
- 5.4. Leukotrien B4 Rezeptor

6. Diskussion

- 6.1. Neutrophile Granulozyten bei Patienten mit chronischer Granulomatose
- 6.2. Komplementrezeptoren
- 6.3. Toll-like Rezeptoren
- 6.4. Interleukin-8 Rezeptoren
- 6.5. Leukotrien B4 Rezeptor

Inhaltsverzeichnis

7. Zusammenfassung

8. Literaturverzeichnis

9. Tabellenverzeichnis

10. Abbildungsverzeichnis

11. Danksagung

12. Lebenslauf

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
AG	Antigen
AK	Antikörper
BLT1	Leukotrien B4 Rezeptor 1
CD	Cluster of Differentiation/ Differenzierungsantigen
CD11b	Komplementrezeptor 3
CD35	Komplementrezeptor 1
CGD	Chronic granulomatous disease/ Chronische Granulomatose
CpG-ODN	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Oligodesoxynukleotide
CRP	C reaktives Protein
CXCR1	Interleukin-8 Rezeptor 1
CXCR2	Interleukin-8 Rezeptor 2
d.h.	das heißt
DHR	Dihydrorhodamin
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
ENA	Epithelial neutrophil activating protein/ Epitheliales Aktivierungsprotein neutrophiler Granulozyten
et al.	Et alias
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FITC	Fluorescein isothiocyanate
fMLP	N-formyl-Met-Leu-Phe
FSC	Forward Scatter/ Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
GCP	Granulocyte chemotactic protein
GRO/CINC 1	Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1
HLA	Humane Leukozytenantigene
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
KMT	Knochenmarktransplantation
LPS	Lipopolysaccharid
LTA ₄	Leukotrien A ₄
LTB ₄	Leukotrien B ₄
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MPO	Myeloperoxidase

Abkürzungsverzeichnis

MyD88	Myeloid-Differenzierungs-Faktor 88
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-Adenosin-Dinucleotid-Phosphat
NAP	Neutrophil activating peptide
NBT	Nitroblautetrazolium
NG	Neutrophile Granulozyten
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Pam ₃ CSK ₄	Lipopolypeptid
PAMPs	Pathogen associated molecular Patterns/ Krankheitsassoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphate buffered saline/ Phosphatpuffer
PE	Phycoerythrin
PGN	Peptidoglycan
PRRs	Pattern Recognition Receptors / Pathogen erkennende Rezeptoren
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s.	siehe
s.o.	siehe oben
sek.	Sekunde
sog.	sogenannt
SSC	Side Scatter/ Seitwärtsstreulicht
Tab.	Tabelle
TIR	Toll/IL-1 Rezeptordomäne
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
vgl.	Vergleiche

2. EINLEITUNG

2.1. Chronischer Granulomatose

Die chronische Granulomatose (CGD) ist ein primärer Immundefekt und beruht auf einer Fehlfunktion der Neutrophilen Granulozyten (NG). Diese Fehlfunktion wird durch eine genetisch bedingte Störung der NADPH-Oxidase und damit der Sauerstoffradikalbildung von Phagozyten verursacht [1]. Die NADPH-Oxidase besteht aus mindestens 7 Proteinuntereinheiten, so dass man je nach Mutation verschiedene Formen von CGD unterscheidet. Neben der häufigsten X-chromosomal-rezessiven Form (ca 70%), bei der der Defekt im gp91-phox-Gen liegt, kann die Krankheit auch autosomal-rezessiv vererbt werden [2]. Hierbei handelt es sich nach Häufigkeit um Mutationen im p47-phox- (ca 25%), p67-phox- und p22-phox-Gen (je 5%), (s.Tab.1). Für die anderen beteiligten Proteine (z.B. Rac1, phox40) wurden bisher keine Erkrankungen beschrieben.

Tabelle 1: Verschiedene Formen der chronischen Granulomatose

Erbgang	Gen	Genlocus
X-chromosomal-rezessiv	gp91phox	Xp21.1
Autosomal-rezessiv	p22phox p47phox p67phox	16p24 7q11.23 1q25

Die Sauerstoffradikale werden dazu benötigt, phagozytierte Krankheitserreger intrazellulär zu eliminieren [3]. Somit besteht keine oder nur eine verringerte Fähigkeit, speziell katalasepositive Bakterien und Pilze abzutöten. Zwar können die NG pathogene Keime nach wie vor phagozytieren, doch fehlt ihnen die Fähigkeit sie nachfolgend unschädlich zu machen [4]. In der Folge leiden betroffene Kinder unter einer stark erhöhten Anfälligkeit für abszedierende Infektionen durch katalasepositive Erreger wie *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia* oder *Aspergillus spezies* [1]. Diese Infektionen treten meist schon im ersten Lebensjahr auf [5]. Durch Makrophagenansammlungen um nicht ausreichend überwundene Gewebeinfektionen kommt es zur Bildung von Granulomen, die dem Krankheitsbild ihren Namen gaben [6]. Therapieoptionen sind die lebenslange prophylaktische Gabe von Cotrimoxazol und Itraconazol [1], die Knochenmarkstransplantation (KMT) (bei Vorhandensein eines HLA-identischen Geschwister) [7;8] und als Ultima Ratio bei X-CGD die Gentherapie [4]. Beim Auftreten von Granulomen [6] oder Autoimmunerkrankungen kann zusätzlich die Gabe von Steroiden

Einleitung

indiziert sein. Die Prognose der Erkrankung ist nach wie vor nicht zufriedenstellend. Inwiefern auch Oberflächenstrukturen von NG einen Angriffspunkt für Therapieoptionen bieten könnten, ist noch nicht geklärt.

2.2. Neutrophile Granulozyten

NG stellen eine Untergruppe der Leukozyten dar und bilden mit 55-65% deren Hauptbestandteil. Zu ihrer Aufgabe gehört hauptsächlich die schnelle Bekämpfung von Mikroorganismen, was auch als unspezifische Abwehr bezeichnet wird [9]. NG werden im Knochenmark gebildet. Frühe NG werden als stabkernige, ausgereifte als segmentkernige Neutrophile bezeichnet. Sie haben im Blut eine mittlere Verweildauer von ca. 6 Stunden. Erhalten sie in dieser Zeit keine stimulierenden Signale, wird Apoptose induziert [10]. Bei Verletzungen oder Entzündungen entstehen jedoch chemotaktische Stimuli, die es den NG ermöglichen zum Krankheitsherd zu gelangen [11;12]. Dort sind sie in der Lage, durch intensiven Kontakt mit dem Endothel dieses zu durchwandern (Diapedese). NG sind also die ersten Abwehrzellen, die den Krankheitsherd erreichen. Dort angekommen phagozytieren und eliminieren sie die schädigenden Mikroorganismen [13]. Dabei benötigen sie Stoffe, die in ihrem Zytoplasma vorkommenden Granula enthalten. Man unterscheidet hierbei die azurophilen myeloperoxidase (MPO)-positiven Granula von den spezifischen MPO-negativen Granula [14]. Die azurophilen Granula entsprechen Lysosomen und enthalten u.a. Hydrolasen, Elastase und Defensine. Die spezifischen Granula enthalten mitunter Faktoren, die das Anheften der Zellen am Endothel ebenso fördern wie auch die NADPH-Oxidase für die Sauerstoffradikalbildung [15]. Normalerweise werden NG beim Auftreten von Infektionen vermehrt gebildet. Ist dies beispielsweise aufgrund verschiedener Erkrankungen oder im Rahmen einer Chemotherapie nicht der Fall spricht man von einer Neutropenie, die die Ausbildung schwerer Infektionen begünstigen kann [13]. NG werden charakterisiert durch die Expression von Oberflächenrezeptoren. Dabei spielen Komplementrezeptoren, Toll-like Rezeptoren und Chemokinrezeptoren eine entscheidende Rolle.

2.3. Oberflächenrezeptoren

2.3.1 Komplementrezeptoren

NG sind in der Lage, eigenständig und direkt an Mikroorganismen zu binden und diese zu phagozytieren. Mittels Opsonierung (Coating) der zu phagozytierenden Zelle kann die Bindungsrate an den Granulozyten aber noch erheblich gesteigert werden. Hierunter versteht man die Bedeckung der Erregeroberfläche mit Komplementfaktoren (C3b und C3bi) oder Antikörpern[16]. C3b und das von C3b abgeleitete Spaltprodukt C3bi werden von Komplementrezeptoren auf NG erkannt. Dadurch wird eine Brücke ausgebildet, die die Bindung zwischen Mikroorganismus und Phagozyt beträchtlich verstärkt. Die Komplementrezeptoren 1 (CD35) und 3 (CD11b) sind membranständige Glykoproteine, die von verschiedenen Abwehrzellen exprimiert werden [13]. Sie dienen u.a. der Adhäsion, Migration, so wie der erleichterten Phagozytose NG [17]. Im Rahmen einer Infektion kommt es zu einer verstärkten Expression von CD35 und CD11b auf NG [18]. Diese werden aus intrazellulären Granula an die Zelloberfläche transportiert. Darüber hinaus führen bestimmte Komplementproteine zu einer Anhäufung von NG am Ort der Entzündung. Zusätzlich wird CD35 auch auf Erythrozyten exprimiert, wo es der Bindung und dem Transport von Immunkomplexen dient [19]. Somit spielen sowohl CD35, als auch CD11b eine maßgebliche Rolle bei der Phagozytose von Bakterien oder Pilzen. Ob die Komplementrezeptoren auf NG von CGD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden verändert sind, soll in dieser Arbeit geklärt werden.

2.3.2 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLR) gehören zu der Gruppe der Pattern Recognition Receptors (PRRs) und stellen einen wichtigen Bestandteil des angeborenen Immunsystems dar. Sie erkennen bestimmte erregerassoziierte molekulare Muster, die PAMPs genannt werden (Pathogen associated molecular patterns) [20]. Hierbei handelt es sich um Antigene, die ausschließlich auf oder in pathogenen Mikroorganismen vorkommen. Jeder TLR erkennt spezifisch andere PAMPs [21]. Bisher sind 11 TLR bekannt, von denen TLR1-10 im Menschen vorkommen. (s.Tab.2)

Tabelle 2: Humane Toll-like Rezeptoren und ihre Antigene

TLR	Antigen (PAMP)
TLR1	Bakterielle Lipoproteine (in Heterodimerisation mit TLR2 und TLR6) [22]
TLR2	Lipoproteine von gramnegativen und grampositiven Bakterien, sowie von Mycobakterien und Spirochäten. Peptidoglykane von grampositiven Bakterien. Zymosan von Pilzen. [23]
TLR3	doppelsträngige RNA und Viren [24]
TLR4	Lipopolysaccharid (Endotoxin) [25]
TLR5	Flagellin (begeißelte Bakterien) [26]
TLR6	Zymosan (zusammen mit TLR2) [27]
TLR7	kurze einzel- und doppelsträngige RNA [28]
TLR8	kurze einzel- und doppelsträngige RNA [28]
TLR9	Bakterielle CpG-DNA (unmethyliert) [29]
TLR10	noch nicht bekannt

Die Entdeckung der TLR beruht auf dem Auffinden eines Proteins bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* [25], genannt Toll-Rezeptor. Es wurde gezeigt, dass dieser Rezeptor bei der Pathogenbekämpfung eine wichtige Rolle spielt. In der Folge wurde auf menschlichen Zellen nach einem solchen Rezeptor geforscht, den sogenannten TLR. TLR sind Transmembranmoleküle, haben also einen extrazellulären, einen transmembranösen und einen intrazellulären Anteil. Der extrazelluläre Anteil besteht aus Leuzin-reichen-Sequenzen, wohingegen der zytoplasmatische Teil in seinem Aufbau stark dem der Interleukin1-Rezeptor-Familie ähnelt [30]. Folglich wird dieser auch als Toll/IL-1 Rezeptor-Domäne (TIR) bezeichnet. TLR werden sowohl von Zellen des spezifischen, wie B- und T-Zellen [31], als auch des unspezifischen Immunsystems, wie beispielsweise NG, Makrophagen und dendritischen Zellen [32] gebildet. Wird nun ein PAMP von seinem spezifischen TLR auf NG erkannt, wird intrazellulär ein Signaltransduktionsweg in Gang gesetzt, der ebenfalls stark dem der IL1-R-Familie ähnelt. Durch die Aktivierung des Adapterproteins MyD88 [33] kommt es dann zu einer Expression verschiedener Gene, die letztendlich die spezifische Immunabwehr aktivieren. Zusätzlich wurde beobachtet, dass sich einige TLR zusammenschließen und somit bestimmte PAMPs noch besser erkennen können. Beim Fehlen von TLR auf NG konnten bei Mäusen konkordant schwere Immundefekte beobachtet werden. TLR unterliegen einem strengen Regulationsmechanismus, sowohl durch Pathogene [34], als auch durch Zytokine. Dies hat eine unterschiedliche Expression von TLR auf NG zur Folge. Mittels TLR können NG Pathogene erkennen [35], um diese danach abzutöten. Ob TLRs auf NG bei CGD-Patienten normal exprimiert sind, ist bislang noch nicht geklärt.

2.3.3 Interleukin-8 Rezeptoren

Die Migration von NG durch entzündlich verändertes Gewebe wird von IL-8 und den IL-8 Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 vermittelt [36]. CXCR1 und CXCR2 werden von NG hoch exprimiert [37] und bestehen zu 78% aus der selben Aminosäuresequenz. Die Expression von CXCR1/2 wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Stimuli induziert, u.a. durch IL-1, TNF- α und Lipopolysaccharide [38]. Während CXCR1 nur IL-8 mit hoher Affinität bindet, bindet CXCR2 auch eine Reihe anderer CXC-Chemokine (z.B. ENA-78, GRO alpha, -beta, -gamma und NAP-2), (s.Tab.3) [36]. Die IL-8 Rezeptoren dienen der Förderung von Chemotaxis, der vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen, sowie der Aktivierung und Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Granula [39].

Inwiefern CXCR1 und CXCR2 bei NG bei CGD-Patienten verändert sein könnten, ist bislang noch nicht geklärt.

Tabelle 3: Eigenschaften von IL-8-Rezeptoren

Rezeptor	CXCR1	CXCR2
Funktion	Chemotaxis von NG, Oxidativer Burst	Chemotaxis von NG, Makrophagenakkumulation, Neoangiogenese
Exprimiert auf	NG, Monozyten/Makrophagen, Basophilen Granulozyten, T-Lymphozyten, Endothelzellen	NG, Monozyten/Makrophagen, Basophilen Granulozyten, T-Lymphozyten, Endothelzellen, ZNS-Neuronen
Liganden	IL-8, GCP-2	IL-8; ENA-78; GRO- α , - β , - γ ; NAP-2; GCP-2

2.3.4 Leukotrien B4 Rezeptor

Leukotriene gehören zur Stoffgruppe der Eikosanoide und werden im Rahmen einer Infektion von diversen Abwehrzellen erzeugt. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Entzündungsreaktion von NG. Zunächst erfolgt die Bildung von Leukotrien A₄ (LTA₄), das mit Hilfe der 5-Lipoxygenase aus Arachidonsäure generiert wird [40]. LTA₄ stellt die direkte Ausgangsverbindung für alle weiteren Leukotriene dar. Hierbei unterscheidet man die Peptido-Leukotriene, die u.a. als potenter Bronchokonstriktor agieren von den Cysteinyl-freien Leukotrien B₄ (LTB₄), dem eine maßgebliche Bedeutung in der Vermittlung chemotaktische Stimuli zugeschrieben wird [41]. LTB₄ bindet an 2 Rezeptoren, die sich auf verschiedenen Zellen des Immunsystems befinden: Leukotrien B₄ Rezeptor 1 (BLT1) und Leukotrien B₄ Rezeptor 2 (BLT2). Die Wirkung von LTB₄ wird hierbei hauptsächlich von dem hochaffinen BLT1 vermittelt [42]. BLT1 ist ein membranständiger G-Protein gekoppelter Rezeptor [43], der hauptsächlich von Leukozyten exprimiert wird [44]. Bindet LTB₄ an BLT1 kommt es zu einer Aktivierung von Phospholipase C. Neben der Vermittlung chemotaktischer Stimuli fördert dies verschiedene Zellfunktionen, wie Degranulation, Bildung von Sauerstoffradikalen oder die Freisetzung von Arachidonsäure [45;46]. Über Leukotrienrezeptoren werden also inflammatorische Zellen aktiviert, womit ihnen eine maßgebliche Rolle bei der Regulation von Entzündungsgeschehen zukommt [45]. Es zeigte sich, dass BLT1 fast ausschließlich auf aktivierten Makrophagen, eosinophilen Granulozyten und NG exprimiert wird [45;46], weshalb man ihm auch eine besondere Bedeutung bei chronischen Entzündungen zuschreibt. Welche Bedeutung BLT1 auf NG von CGD-Patienten hat ist bislang unbekannt.

3. ZIELSETZUNG

Bei Patienten mit CGD liegt ein genetischer Defekt der NADPH-Oxidase der neutrophilen Granulozyten zugrunde, der zu einer drastischen Verminderung der Bildung von Sauerstoffradikalen führt. Trotz des klar definierten Defekts ist die klinische Ausprägung sehr variabel. Ziel dieser Dissertation ist es zu untersuchen, ob es durch die fehlende Bildung von Sauerstoffradikalen bei Patienten mit CGD auch zu Veränderungen in der Expression essentieller Rezeptoren für die angeborene Immunabwehr kommt, die das weite klinische Spektrum der Erkrankung besser zu verstehen helfen können. In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass vor allem die Toll-like Rezeptoren, aber auch Komplementrezeptoren und Chemokinrezeptoren eine fundamentale Rolle in der Funktion des angeborenen Immunsystems spielen.

Wir quantifizierten deshalb die Expression von TLRs, Komplementrezeptoren, BLT1 und CXCR1/2 auf NG im peripheren Blut von CGD- Patienten und gesunden Kontrollprobanden mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. Patienten

Die Probanden und Probandinnen für die vorliegende Arbeit wurden im Rahmen eines Routine-Termins in der Immundefekt-Ambulanz im Dr. von Haunerschen Kinderspital der LMU München rekrutiert. Bei den Probanden handelt es sich um Patienten mit der klinischen und genetisch-gesicherten Diagnose CGD. Insgesamt wurden 15 CGD-Patienten im Zeitraum von März 2006 bis März 2007 in die Studie aufgenommen. Alle Probanden wurden sorgfältig über den Inhalt, die Fragestellung und das Ziel dieser Studie aufgeklärt und nach schriftlicher Einverständniserklärung (bei Minderjährigen durch die Erziehungsberechtigten) in die Studie aufgenommen. Die Studie wurde von der Ethikkommission der LMU München genehmigt. Den Probanden wurde zusätzlich zum Routine-Labor 2ml EDTA-Blut abgenommen, das dann sogleich verarbeitet wurde. Alle Probanden waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme symptomfrei, d.h. sie hatten keine akute Infektion. Tabelle 4 zeigt eine Patientendatenübersicht, Tabelle 6 die genauen Patientendaten.

Tabelle 4: Patientendaten-Übersicht

N	15
Alter (Jahren) ± Standardabweichung	13 ± 12
Geschlecht (m:w)	13/2
Vererbung	6 Patienten autosomal rezessiv 9 Patienten X-chromosomal
CRP (mg/dl) ± Standardabweichung	0.4 ± 0.7
Leukozyten (/µl) ± Standardabweichung	7700 ± 3900
Restaktivität	12 Patienten keine Restaktivität 3 Patienten schwache Restaktivität
Dauermedikation	14 Patienten Itraconazol 14 Patienten Cotrimoxazol 1 Patient keine Dauermedikation

Angaben zu den von uns rekrutierten gesunden Kontrollprobanden sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Daten der Kontrollprobanden

N	15
Alter (Jahren) ± Standardabweichung	12 ± 6
Geschlecht (m:w)	6/9
CRP (mg/dl) ± Standardabweichung	0.2 ± 0.7
Leukozyten (/µl) ± Standardabweichung	8900 ± 3000

Tabelle 6: Genaue Patientendaten

Alter (Jahre)	Geschlecht	Vererbung	Mutation	Nukleotidänderung	Aminosäure oder mRNA-Änderung	CRP (mg/dl)	Leukozyten (G/l)	NBT-Test (% positiv)	DH R-Test	Medikation
1	m	gp91, X-chromosomal	Nonsense	1140 G → A	380 Trp → Stop	3,6	17,7	0% PMA, 0% Candida	neg	Itraconazol, Cotrimoxazol
18	m	gp91, X-chromosomal	Missense	1028 C → A	339 Pro → Stop	0,5	8,3	0% PMA, 0% Candida	neg	Itraconazol, Cotrimoxazol
5	m	p47, autosomal rezessiv	Deletion	GTGT Deletion, Exon2	Frameshift	0,03	7,4	4% PMA, 15% Candida	pos	Itraconazol, Cotrimoxazol
9	m	p47, autosomal rezessiv	Deletion	GTGT Deletion, Exon2	Frameshift	0,05	7,5	6% PMA, 5% Candida	pos	Itraconazol, Cotrimoxazol
11	m	gp91, X-chromosomal	Missense	578 C → T	193 Ser → Phe	0,1	5,3	0% PMA, 0% Candida	neg	Itraconazol, Cotrimoxazol
9	m	p47, autosomal rezessiv	Deletion	GTGT Deletion, Exon2	Frameshift	0,15	6,1	0% PMA, 0% Candida	neg	Itraconazol, Cotrimoxazol
12	m	gp91, X-chromosomal	Deletion	80-83 TCTG	Frameshift	0,32	4,7	0% PMA, 0% Candida	neg	Itraconazol, Cotrimoxazol
16	m	gp91, X-chromosomal	Missense	1106 T → C	Frameshift	0,49	4,1	0% PMA, 0% Candida	neg	Itraconazol, Cotrimoxazol
31	m	gp91, X-chromosomal	Insertion	A nach A742	Frameshift	0,1	3,7	0% PMA, 0% Candida	neg	Itraconazol, Cotrimoxazol
11	m	gp91, X-chromosomal	Deletion	1497 A Deletion	Frameshift	0,41	7,8	0% PMA, 0% Candida	neg	Itraconazol, Cotrimoxazol
54	m	p47, autosomal rezessiv	Deletion	GTGT Deletion, Exon2	Frameshift	0,1	5,8	10% PMA, 7% Candida	pos	Keine
8	f	p22, autosomal rezessiv	Deletion	AGTG Deletion	Donor splice site mutation in Intron 1	0,2	6,7	0% PMA, 0% Candida	pos	Itraconazol, Cotrimoxazol
4	m	gp91, X-chromosomal	Nonsense	469 G → T	157 Arg → Stop	0,92	15,5	0% PMA, 0% Candida	neg	Itraconazol, Cotrimoxazol
4	m	gp91, X-chromosomal	Nonsense	469 G → T	157 Arg → Stop	0,12	10,7	0% PMA, 0% Candida	neg	Itraconazol, Cotrimoxazol
12	f	p47, autosomal rezessiv	Deletion	GTGT Deletion, Exon2	Frameshift	0,1	4	0% PMA, 0% Candida	neg	Itraconazol, Cotrimoxazol

4.2. Geräte

- Ultrazentrifuge Varifuge 20 RS Heraeus Sepatech
- Tischzentrifuge 5415C Eppendorf
- Mischgerät: Vortex Genie 2 Scientific Industries
- Mikropipetten Eppendorf
(0-10µl; 10-100µl; 20-1000µl)
- Durchflusszytometer (FACS) Becton & Dickinson
FACSScan
- FACS-Auswertestation Apple
Macintosh Power PC
- FACS-Auswertesoftware Becton&Dickinson
Cell Quest 3.1f
- PC ACER
ACER
Windows XP
- Prism 3.0 Graph Pad Software

4.3. Glas- und Plastikmaterial

- Reaktionsgefäße Eppendorf
- Plastikspitzen für Mikropipetten Schubert/Pharmacia
- Plastikröhrchen Falcon
(15ml/50ml)
- Rundbodenröhrchen „Falcon“ Becton & Dickinson
(5ml)

4.4. Antikörper

- TLR1 - Phycoerythrin (PE) mouse IgG1 (eBioscience, San Diego, USA)
- TLR2 - fluorescein isothiocyanate (FITC) mouse IgG2a (eBioscience, San Diego, USA)
- TLR4 - PE mouse IgG2a (eBioscience, San Diego, USA)
- TLR5 - PE mouse IgG2a (Imgenex, San Diego, USA)
- TLR9 - PE rat IgG2a (eBioscience, San Diego, USA)

Material und Methoden

- CD11b – PE mouse IgG2a (R&D Systems, Minneapolis, USA)
- CD18 – PE mouse IgG1 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
- CD35 – PE mouse IgG1 (Becton & Dickinson, New Jersey, USA)
- CXCR1 – PE mouse IgG2b (Becton & Dickinson, New Jersey, USA)
- CXCR2 – PE mouse IgG1 (Becton & Dickinson, New Jersey, USA)
- LTb4 – PE mouse IgG1 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
- Isotyp Kontrolle PE mouse mouse IgG1
- Isotyp Kontrolle PE mouse mouse IgG2a
- Isotyp Kontrolle FITC mouse mouse IgG2a
- Isotyp Kontrolle PE rat IgG2a

4.5. Stimulantien

- Rekombinantes Flagellin (*Salmonella typhimurium*) (Invivogen, San Diego, CA, USA)
- Unmethylierte CpG-Oligonukleotide (CPG-ODN) Typ A (Invivogen, San Diego, CA, USA)
- Peptidoglykan (PGN) (*Staphylokokkus aureus*) (Invivogen, San Diego, CA, USA)
- Synthetisches bakterielles Lipoprotein Pam3CysSerLys4 (Pam3Csk4) (Invivogen, San Diego, CA, USA)
- Zymosan A (*Saccharomyces cerevisiae*) (Invivogen, San Diego, CA, USA)
- Lipopolysaccharid (LPS) (*P.aeruginosa*) (Invivogen, San Diego, CA, USA)
- Elastase (*P.aeruginosa*) (Elastin Products, Owensville, Missouri, USA)
- N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) (Sigma Chemical Co.)
- Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) (Sigma Chemical Co.)

4.6. Chemikalien und Puffer

- Phosphatpuffer (PBS)
10 x stock solution, 1 Liter
80g NaCl (Merk)
2g KCl (Merk)
13.06g Na₂HPO₄·2H₂O (Merk)
2g KH₂PO₄ (Merk)
pH 7.3

Material und Methoden

- Ammoniumchloridpuffer
4.15g NH₄Cl
500mg KHCO₃
18mg EDTA (Titriplex III)
ad 500ml aqua destillata
- Intraprep-Kit (Beckman-Coulter, Miami, USA)
- Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)
- Roswell Park Memorial Institute 1540 (RPMI 1540) Medium

4.7. Durchflusszytometrie

4.7.1. Färbung

Zunächst wurde das EDTA-Blut mit der selben Menge an 1-fach PBS verdünnt. Anschließend wurden jeweils 50 µl von diesem Gemisch auf 16 Eppendorfgefäße verteilt und mit je 10 µl konjugiertem Antikörper (AK) vermischt. Nach sorgfältiger Durchmischung (3 Sek. vortex) wurden die Proben bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss 15 Minuten inkubiert, um ein sicheres Binden der AK an die NG zu gewährleisten. Im nächsten Schritt wurden die Proben mit 100 µl Reagens 1 aus Intraprep (Beckman Coulter) vermengt und nochmals 15 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Reagens 1 dient als Stabilisator des AK-Zell-Komplexes in der Probe. Um die Zellen vom Serum zu trennen, wurden die Proben nach Zugabe von je 1 ml PBS für 5 Minuten bei 300xg zentrifugiert und darauf vorsichtig die Überstände mit einer Pipette abgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit 1ml Ammoniumchlorid-Puffer resuspendiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert, womit auch eine sichere Erythrozytenlyse gewährleistet werden konnte. Die fertigen Proben wurden dann mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

Die mit TLR9-AK inkubierte Probe wurde als einzige nicht resuspendiert, da TLR9-AK intrazellulär bindet. Um die Zellmembran zu permeabilisieren und somit die intrazelluläre Bindung zu ermöglichen wurde dieser Probe Reagens 2 aus Intraprep zugegeben. Nach 5-minütiger Inkubation und vorsichtiger Durchmischung durch leichtes Schütteln wurde der Probe ein weiteres Mal 10µl TLR9-AK zugefügt und noch mal 15 Minuten unter Lichtabschluss inkubiert. Nach nochmaliger Zentrifugation (wieder bei 300xg) und der behutsamen Abnahme des Überstandes wurde konkordant den anderen Proben weiter verfahren (s.o.). Zudem wurde eine Isotyp-Kontrolle gleich TLR9 verarbeitet. Nach erfolgreicher Erythrozytenlyse wurden die Proben in FACS-Tubes umpipettiert und anschließend mit Hilfe des FACS-Gerätes analysiert.

4.7.2. Isolierung von NG

Um die für die Stimulation notwendigen NG zu erhalten wurden einem CGD-Patienten zunächst ca. 20ml EDTA-Blut abgenommen. Anschließend wurde das Blut in einem Bluecap-Röhrchen mit der selben Menge PBS verdünnt und die verdünnte Zellsuspension vorsichtig auf 20ml Ficoll-Paque geschichtet. Zur Gewinnung der Zellen wurde das Gemisch dann 20 Minuten bei 20°C mit 1500rpm zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde im Anschluss vorsichtig abgenommen und das Bluecap-Röhrchen erneut mit PBS aufgefüllt. Nach nochmaligen 10 minütigen zentrifugieren bei 4°C mit 1000rpm wurde wieder der Überstand abgenommen und das Pellet mit Ammonium-Chlorid-Puffer resuspendiert. Damit die Erythrozyten sicher lysiert werden konnten, wurde die Probe nun 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erfolgreicher Erythrozytenlyse wurde die Probe ein letztes Mal für 10 Minuten bei 4°C mit 1000rpm zentrifugiert. Der dadurch erzeugte Überstand wurde abermals verworfen und das erzeugte NG-Pellet mit der erforderlichen Menge an RPMI resuspendiert.

4.7.3. Stimulation von isolierten NG

Die Suspension aus isolierten NG und RPMI wurde zu je 1ml auf 11 Eppendorfgefäße (2ml) verteilt. Anschließend wurden die Stimulantien in folgenden Konzentrationen zugegeben: *P. aeruginosa*-Elastase 50µg/ml, Flagellin 1µg/ml, N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) 10µg/ml, Lipopolysaccharid (LPS) 100ng/ml, CpG-ODN 100µg/ml, Lipopeptid (Pam₃CSK₄) 1µg/ml, Peptidoglykan (PGN) 1µg/ml, Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) 10µg/ml, Zymosan 50µg/ml.

Nach erfolgter Zugabe wurden die Proben verschlossen für eine Stunde im 37 °C warmen Wasserbad inkubiert und hinterher mit PBS aufgefüllt. Nun wurden die Proben bei 300xg für 5 Minuten zentrifugiert, das entstandene Zellpellet mit 1ml PBS resuspendiert und zu je 40 µl erneut auf 4 Eppendorfgefäße verteilt. Diese wurden dann wie oben beschrieben mit den Antikörpern TLR5, CXCR1, CD11b und IgG2b gefärbt und für die Durchflusszytometrie aufbereitet. Zudem wurde eine unstimulierte Probe als Isotypkontrolle verarbeitet.

4.7.4. Messung

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, um Zellen anhand bestimmter Eigenschaften zu differenzieren und wird mittels sog. FACS-Geräte durchgeführt (FACS = Fluorescence activated cell sorter). Das System beruht darauf, dass suspendierte Einzelzellen einen Laserstrahl passieren, der aufgrund spezifischer Zelleigenschaften abgelenkt wird, wodurch Streulicht entsteht. Dieses Streulicht wird von Detektoren gemessen, die es erlauben eine Aussage, sowohl über Zellgröße und –granularität, als auch über zelluläre

Material und Methoden

Oberflächenproteine, sowie intrazelluläre Moleküle zu treffen. Voraussetzung hierfür ist, dass die Zellen mit einem fluoreszierenden Antikörper inkubiert wurden, der an spezifische Oberflächenstrukturen bindet. Bevor die Zellen gemessen werden können ist also eine Anfärbung der AK mittels spezifischer Fluorochrome nötig. Fluorochrome können sowohl direkt als auch indirekt an einen AK binden, wobei direkt bedeutet, dass der spezifische AK selbst mit einem Fluorochrom konjugiert wurde. Demnach beruht die indirekte Färbung auf der Bildung eines nicht-markierten AG-AK-Komplexes und es muss erst ein fluoreszierender zweiter AK an den spezifischen AK binden, um das zu untersuchende Oberflächenmerkmal zu kennzeichnen.

Die häufigsten Fluorochrome sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Standardfluoreszenzfarben nach Becton & Dickinson / Pharmingen Research Product Catalog 2002

Fluorchrom	Max. Anregung	Emission	Farbe
FITC	488nm	520nm	Grün
APC	595nm/633nm	660nm	Rot
PC5	488nm	670nm	Rot
PE	488nm	575nm	Rot-Orange

Wie aus der Tabelle hervorgeht, hat jedes Fluorochrom ein anderes Emissionsspektrum, was die gleichzeitige Markierung verschiedener Oberflächenmoleküle in ein und derselben Probe ermöglicht. In unserer Studie wurden ausschließlich FITC- und PE-markierte AK verwendet. Nach Inkubieren der Proben mit den spezifischen fluoreszierenden AK und Umfüllung in die FACS-Tubes konnten sie nun mit dem FACS-Gerät analysiert werden.

Das FACS-Gerät besteht aus 3 Komponenten:

- a) Flüssigkeitssystem
- b) Optisches System
- c) Elektronisches System

Flüssigkeitssystem:

Damit die Zellen einzeln den Laserstrahl passieren können, ist es notwendig sie durch die sog. Hydrodynamische Fokussierung zu trennen. Die Zellsuspension wird hierbei unter hohem Druck in eine Stahlkapillare befördert, die von einer zellfreien Trägerflüssigkeit umspült wird.

Material und Methoden

Am Ende der Kapillare trifft die Zellsuspension auf diese Trägerflüssigkeit, wodurch eine laminare Strömung erzeugt und dadurch der Abstand zwischen den Zellen vergrößert wird. Somit werden alle Zellen einzeln und in der ungefähr selben Ausrichtung vom Laserstrahl erfasst.

Optisches System:

Jedes FACS-Gerät ist mit einem Laser ausgestattet, der, sobald er auf eine Zelle trifft Streulicht erzeugt. Dieses Streulicht wird sowohl von der Zellgröße, als auch von den intrazellulären Bestandteilen beeinflusst. Es gibt zwei Detektoren, die die Ablenkung des Laserstrahls messen, das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) und das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scatter). Das Vorwärtsstreulicht wird durch die Beugung des Lichtes hervorgerufen und erlaubt eine Aussage über die Zellgröße, hingegen das Seitwärtsstreulicht die Lichtbrechung widerspiegelt und als Maß für die Granularität (Zellkern, Zellmembran, etc.) einer Zelle dient. Ist nun ein fluoreszierender AK gebunden und wird dieser durch den Laser angeregt entsteht neben dem Streulicht Fluoreszenzlicht, das je nach Emissionsspektrum an bestimmte Detektoren weitergeleitet wird. Die hierbei erzeugten Fluoreszenzimpulse ermöglichen den Nachweis spezifischer Oberflächenmoleküle und intrazellulärer Proteine. Diesen Effekt machten wir uns bei dem Nachweis verschiedener Oberflächenmerkmale auf NG bei CGD-Patienten zu Nutze.

Elektronisches System:

Um die Messungen am Computer verarbeiten zu können ist es notwendig, die optischen Signale in elektronische Signale umzuwandeln. Hierbei werden proportional zu der Intensität des einfallenden Lichtes an den Detektoren elektrische Signale erzeugt, die dann entweder linear (Streulicht) oder logarithmisch (Fluoreszenz) verstärkt und über einen Analog/Digital-Wandler in digitale Signale verwandelt werden. Diese können dann mit Hilfe der geeigneten Software graphisch dargestellt und ausgewertet werden.

Die statistische und graphische Auswertung erfolgte mit Prism 4.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Die FACS-Daten-Auswertung erfolgte mit Cell Quest 3.1f von Becton&Dickinson.

5. ERGEBNISSE

Im Rahmen unserer Studie fanden wir eine erniedrigte Oberflächenexpression von den Komplementrezeptoren CD11b, CD18 und CD35, sowie von dem Toll-like Rezeptor 5, dem IL-8 Rezeptor CXCR1 und dem Leukotrien B4 Rezeptor BLT1 auf NG von CGD-Patienten im Vergleich zu NG von gesunden Kontrollprobanden. Außerdem fanden wir eine verminderte intrazelluläre Expression des Toll-like Rezeptors 9 bei Patienten mit CGD im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden. Unsere Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

5.1. Komplementrezeptoren

Komplementrezeptoren werden sowohl auf NG von gesunden Kontrollprobanden, als auch auf NG von CGD-Patienten exprimiert. Es zeigte sich allerdings, dass NG von CGD-Patienten signifikant geringer CD11b, CD18 und CD35 exprimieren als andere NG. CD11b und CD18 waren hierbei am deutlichsten erniedrigt.

Abb.1A: CD11b-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden

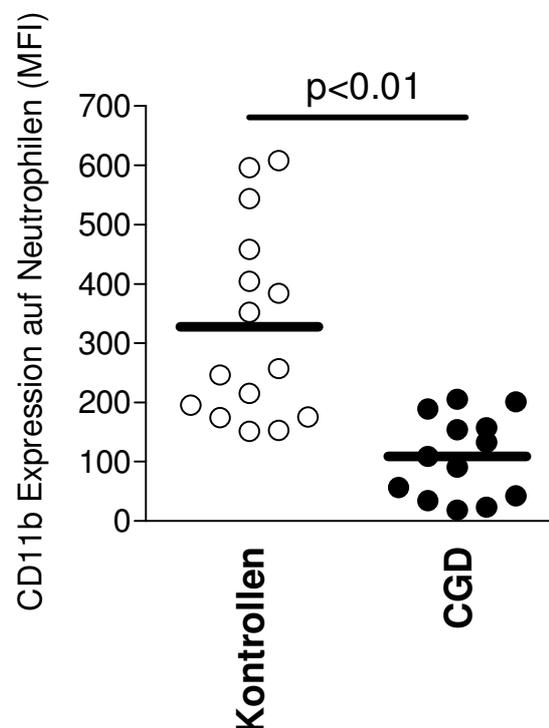


Abbildung 1A zeigt die Expression von dem Komplementrezeptor CD11b auf NG von Kontrollprobanden und CGD Patienten. NG von CGD Patienten tragen signifikant geringer CD11b auf ihrer Oberfläche als die getesteten Kontrollen.

Abb.1B: Histogramm der CD11b-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden

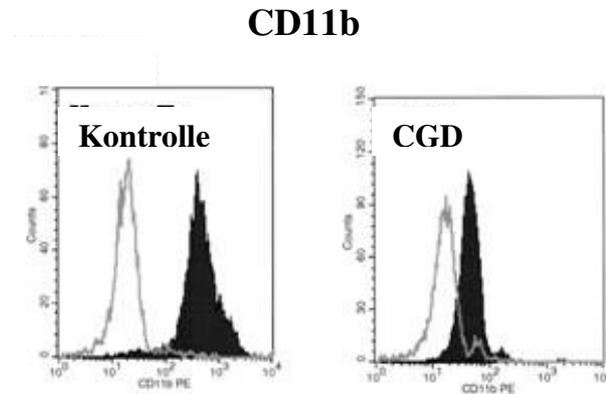


Abbildung 1B zeigt die Expression von CD11b anhand eines Histogrammes auf NG von einem repräsentativen gesunden Kontrollprobanden (links) und einem repräsentativen CGD Patienten (rechts). Die Y-Achse repräsentiert die Anzahl der Zellen, die X-Achse die Fluoreszenzintensität.

Abb.2A: CD18-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden

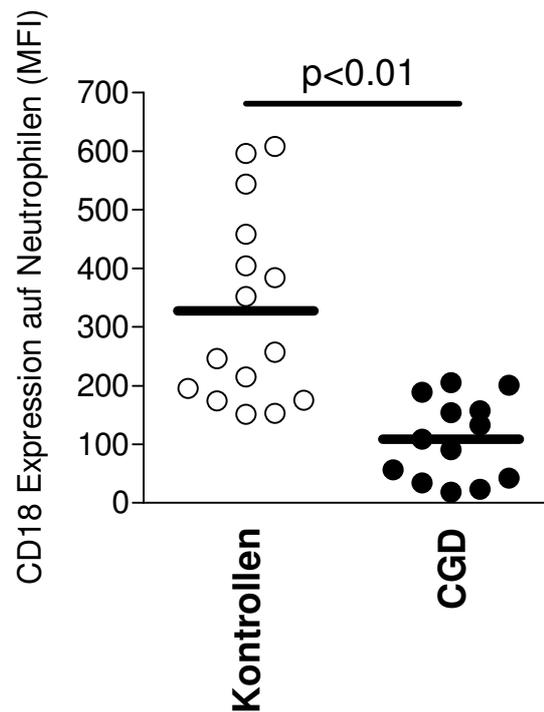


Abbildung 2A zeigt die Expression von dem Komplementrezeptor CD18 auf NG von Kontrollprobanden und CGD-Patienten. NG von CGD Patienten tragen signifikant geringer CD18 auf ihrer Oberfläche als die getesteten Kontrollen. Der Unterschied ist vergleichbar mit der verminderten CD11b-Expression.

Abb.2B: Histogramm der CD18-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden

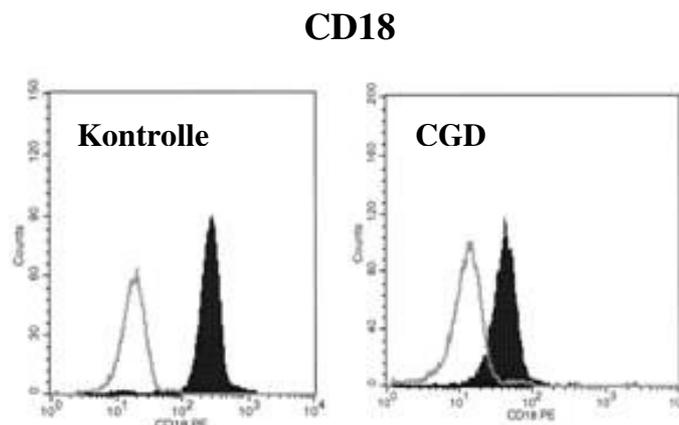


Abbildung 2B zeigt die Expression von CD18 anhand eines Histogrammes auf NG von einem repräsentativen gesunden Kontrollprobanden (links) und einem repräsentativen CGD Patienten (rechts). Die Y-Achse repräsentiert die Anzahl der Zellen, die X-Achse die Fluoreszenzintensität.

Abb.3A: CD35-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden

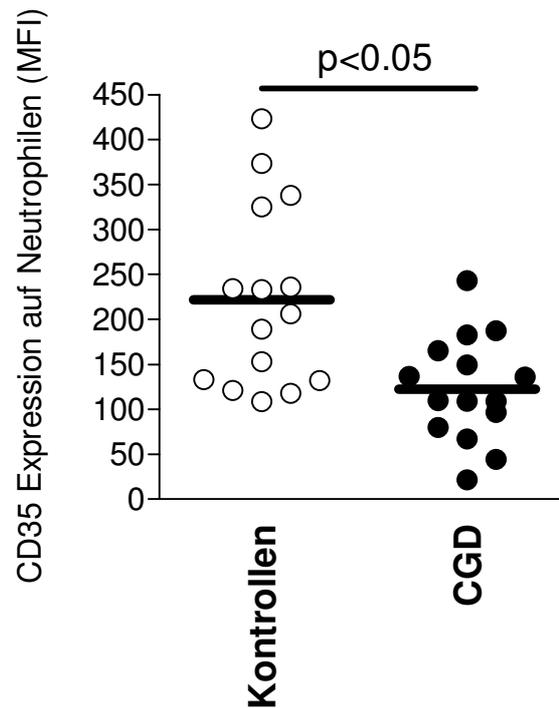


Abbildung 3A zeigt die Expression von dem Komplementrezeptor CD35 auf NG von Kontrollprobanden und CGD-Patienten. NG von CGD Patienten tragen signifikant geringer CD35 auf ihrer Oberfläche als die getesteten Kontrollen. Der Unterschied ist allerdings kleiner als bei CD11b/CD18.

Abb.3B: Histogramm der CD35-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden

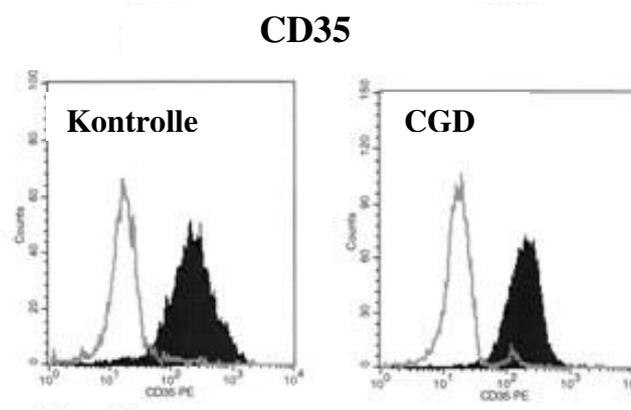


Abbildung 3B zeigt die Expression von CD35 anhand eines Histogrammes auf NG von einem repräsentativen gesunden Kontrollprobanden (links) und einem repräsentativen CGD Patienten (rechts). Die Y-Achse repräsentiert die Anzahl der Zellen, die X-Achse die Fluoreszenzintensität.

5.1.1. Zusammenhang der Expression von Komplementrezeptor CD18 und der Krankheitsaktivität

Es zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen der Expression von CD18 auf NG von CGD-Patienten und der Häufigkeit der auftretenden Pneumonien pro Jahr bei diesen Patienten.

Abb.4: CD18-Expression auf NG von CGD-Patienten in Korrelation mit den aufgetretenen Pneumonien pro Jahr

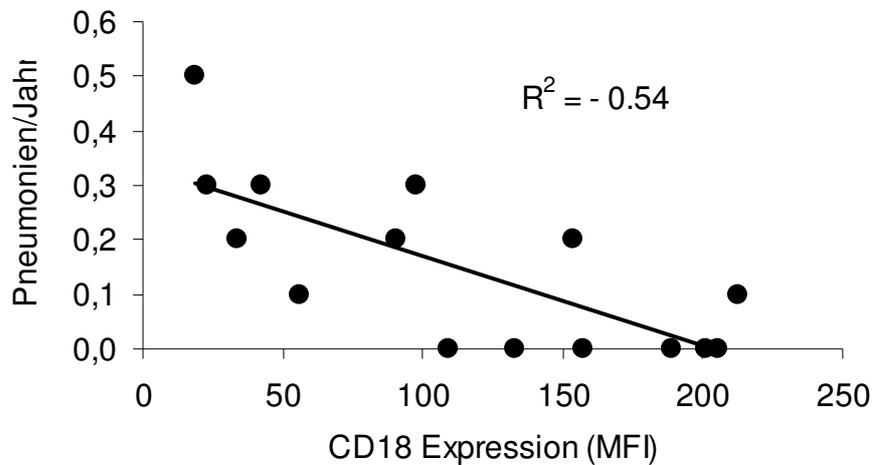


Abbildung 4 zeigt die Expression von CD18 auf NG von CGD-Patienten in Korrelation zu den aufgetretenen Pneumonien pro Jahr. Es zeigt sich eine inverse Korrelation.

5.1.2. Komplementrezeptor CD11b bei autosomal-rezessiven CGD-Patienten

Es zeigte sich, dass an der autosomal-rezessiven Form erkrankte CGD-Patienten deutlich geringer CD11b auf NG exprimieren, als NG von CGD-Patienten der X-chromosomalen Form.

Abb.5: CD11b-Expression auf NG von CGD-Patienten der X-chromosomalen und der autosomal-rezessiven Form

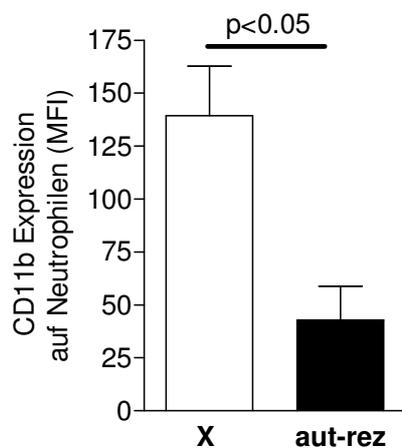


Abbildung 5 zeigt die Expression von CD11b auf NG von CGD-Patienten. Autosomal rezessive CGD-Patienten tragen signifikant geringer CD11b auf ihrer Oberfläche im Vergleich zu CGD-Patienten der X-chromosomalen Form.

5.1.3. Expression des Komplementrezeptors CD11b nach Stimulation

Wir haben NG von CGD-Patienten mit unterschiedlichen Stimulantien inkubiert. Dabei zeigte sich, dass NG von CGD-Patienten nach der Stimulation mit Pam3CSK4 geringer in der Lage sind CD11b hoch zu regulieren als NG von gesunden Kontrollprobanden.

Abb.6: CD11b-Expression auf NG von CGD-Patienten und Kontrollen nach Stimulation

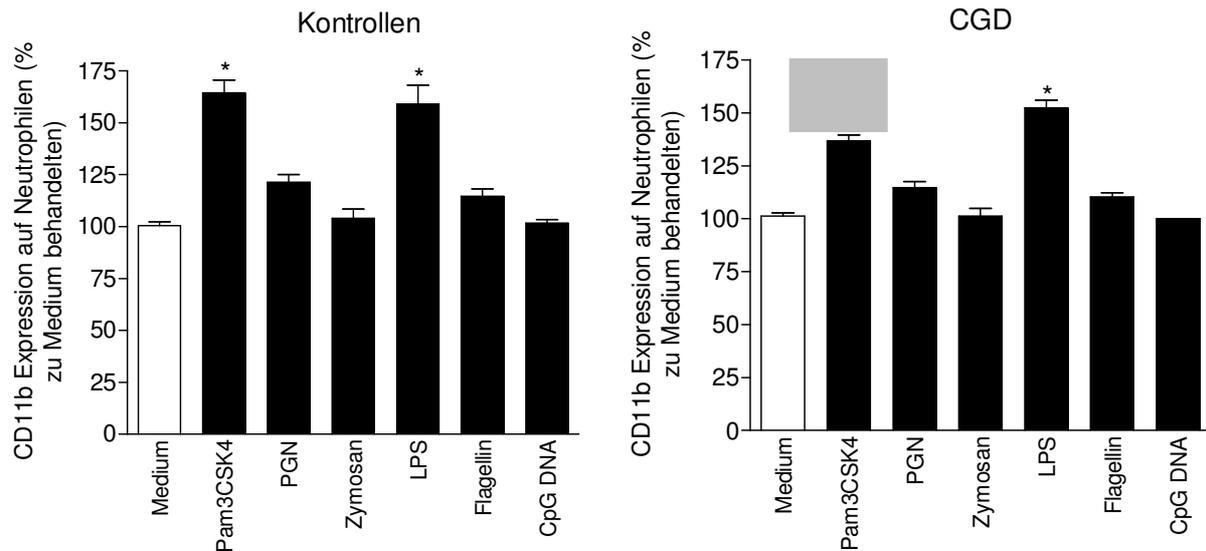


Abbildung 6 zeigt die CD11b-Expression auf NG von CGD-Patienten und Kontrollprobanden. Nach der Stimulation mit Pam3CSK4 regulieren nur NG von Kontrollprobanden die Expression von CD11b signifikant hoch, nicht aber NG von CGD-Patienten.

Abb.7: CD11b-Expression auf NG von CGD-Patienten und Kontrollen nach Stimulation mit Pam3CSK4

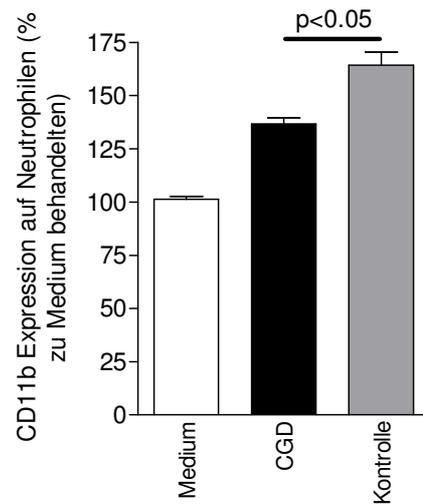


Abbildung 7 zeigt die CD11b-Expression auf NG von CGD-Patienten, Kontrollprobanden und Medium nach Stimulation mit Pam3CSK4. Nach der Stimulation mit Pam3CSK4 sind nur NG von Kontrollprobanden in der Lage die Expression von CD11b signifikant hoch zu regulieren, nicht aber NG von CGD-Patienten.

5.2. Toll-like Rezeptoren

Sowohl NG von gesunden Kontrollprobanden, als auch NG von CGD-Patienten exprimieren an ihrer Oberfläche TLR und intrazellulär TLR9. Während sich in der Expression von TLR1, TLR2 und TLR4 keine signifikanten Unterschiede darstellten, zeigte sich eine signifikant geringere Expression von TLR5 auf NG von CGD-Patienten im Vergleich zu NG von gesunden Kontrollprobanden. Außerdem fanden wir eine signifikant geringere intrazelluläre Expression von TLR9 in NG von CGD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden.

Abb.8A: TLR1-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden

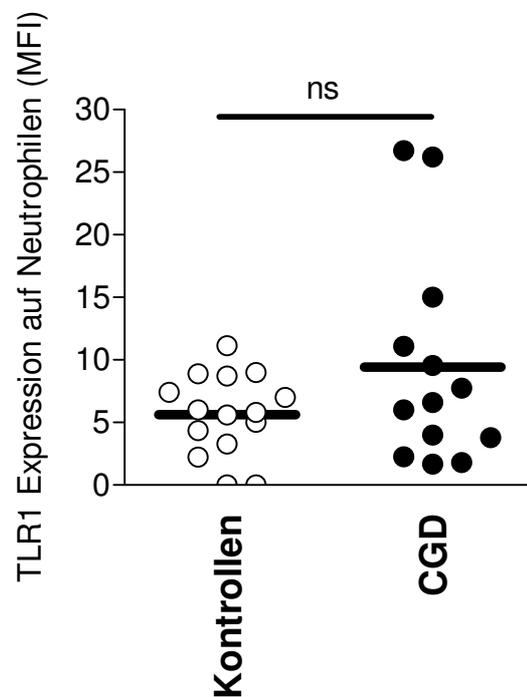


Abbildung 8A zeigt die Expression von TLR1 auf NG von Kontrollprobanden und CGD-Patienten. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von TLR1 auf NG von Kontrollen und CGD-Patienten.

Abb.8B: Histogramm der TLR1-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden

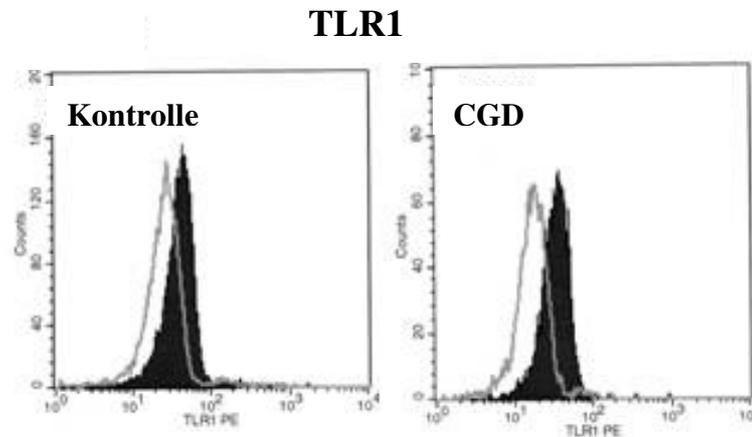


Abbildung 8B zeigt die Expression von TLR1 anhand eines Histogrammes auf NG von einem repräsentativen gesunden Kontrollprobanden (links) und einem repräsentativen CGD Patienten (rechts). Die Y-Achse repräsentiert die Anzahl der Zellen, die X-Achse die Fluoreszenzintensität.

Abb.9A: TLR2-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden

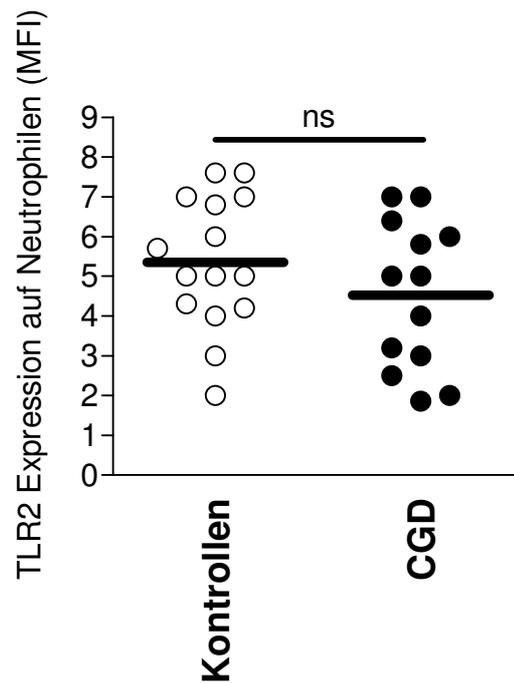


Abbildung 9A zeigt die Expression von TLR2 auf NG von Kontrollprobanden und CGD-Patienten. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von TLR2 auf NG von Kontrollen und CGD-Patienten.

Abb.9B: Histogramm der TLR2-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden

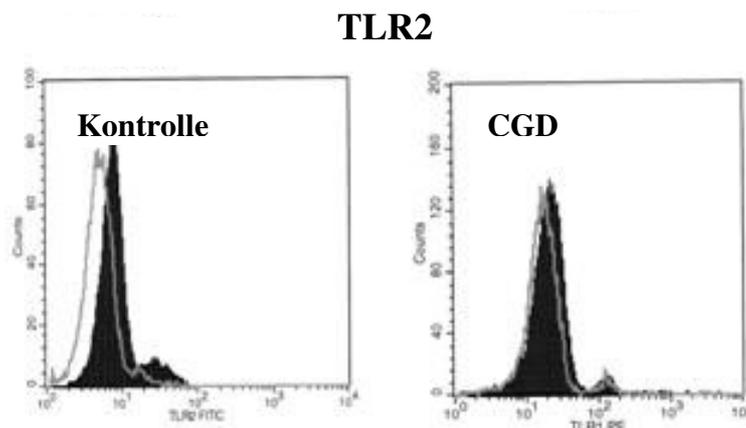


Abbildung 9B zeigt die Expression von TLR2 anhand eines Histogrammes auf NG von einem repräsentativen gesunden Kontrollprobanden (links) und einem repräsentativen CGD Patienten (rechts). Die Y-Achse repräsentiert die Anzahl der Zellen, die X-Achse die Fluoreszenzintensität.

Abb.10A: TLR4 Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden

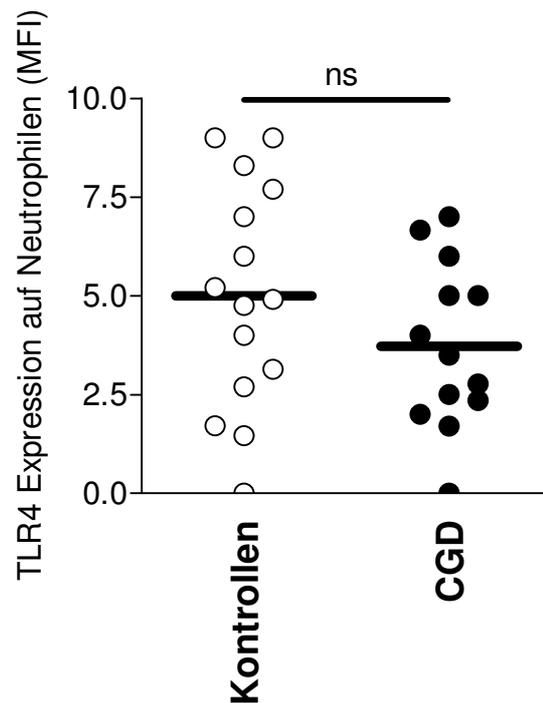


Abbildung 10A zeigt die Expression von TLR4 auf NG von Kontrollprobanden und CGD-Patienten. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von TLR4 auf NG von Kontrollen und CGD-Patienten.

Abb.10B: Histogramm der TLR4-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden

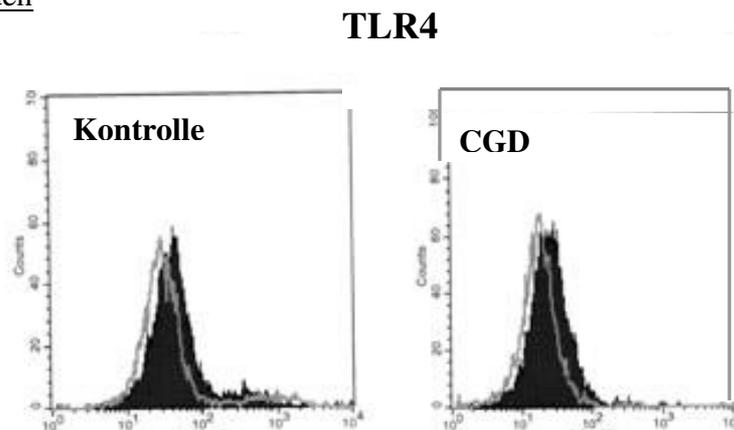


Abbildung 10B zeigt die Expression von TLR4 anhand eines Histogrammes auf NG von einem repräsentativen gesunden Kontrollprobanden (links) und einem repräsentativen CGD Patienten (rechts). Die Y-Achse repräsentiert die Anzahl der Zellen, die X-Achse die Fluoreszenzintensität.

Abb.11A: TLR5 Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden

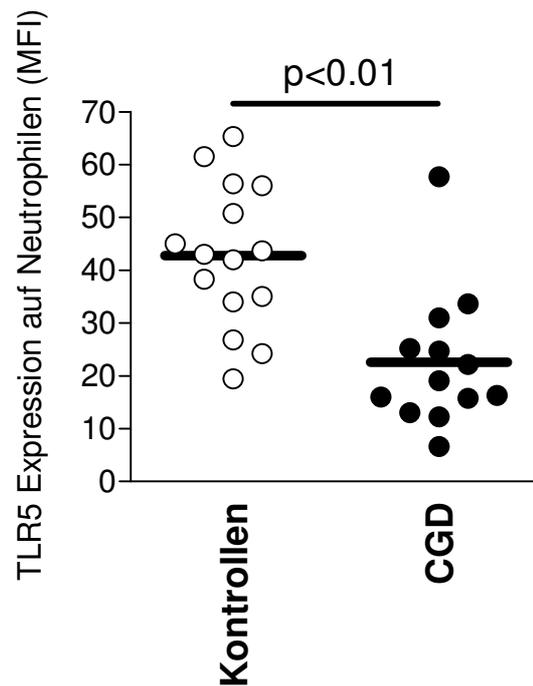


Abbildung 11A zeigt die Expression von TLR5 auf NG von Kontrollprobanden und CGD Patienten. NG von CGD Patienten tragen signifikant geringer TLR5 auf ihrer Oberfläche als die getesteten Kontrollen.

Abb.11B: Histogramm der TLR5-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden

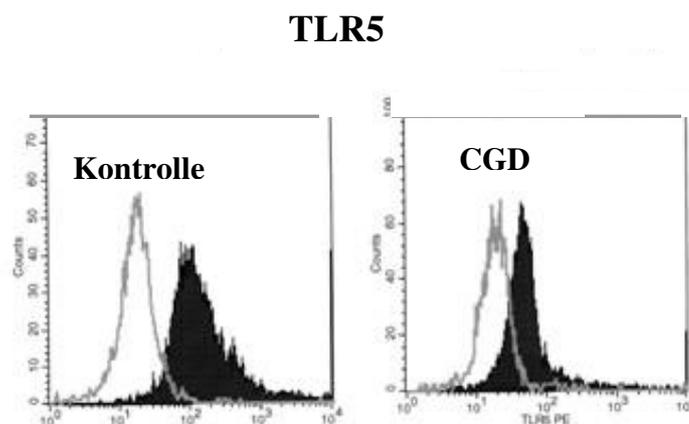


Abbildung 11B zeigt die Expression von TLR5 anhand eines Histogrammes auf NG von einem repräsentativen gesunden Kontrollprobanden (links) und einem repräsentativen CGD Patienten (rechts). Die Y-Achse repräsentiert die Anzahl der Zellen, die X-Achse die Fluoreszenzintensität.

Abb.12A: Intrazelluläre TLR9 Expression in NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden

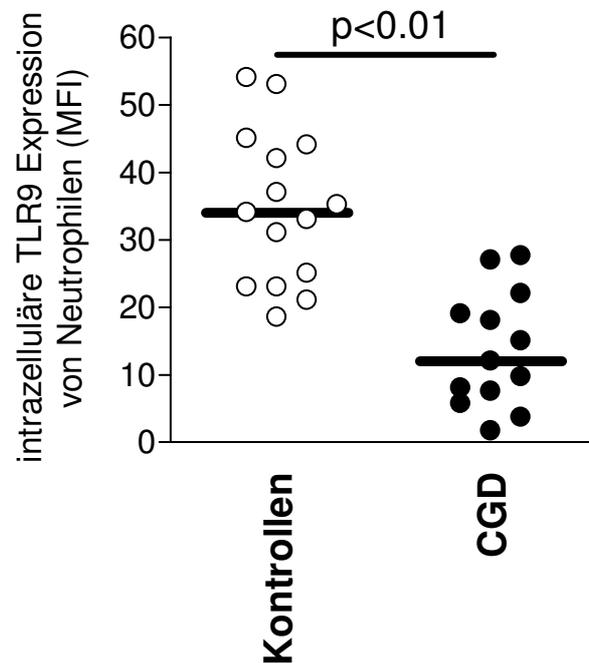


Abbildung 12A zeigt die intrazelluläre Expression von TLR9 in NG von Kontrollprobanden und CGD Patienten. NG von CGD Patienten exprimieren intrazellulär signifikant geringer TLR9 als die getesteten Kontrollen.

Abb.12B: Histogramm der TLR9-Expression in NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden

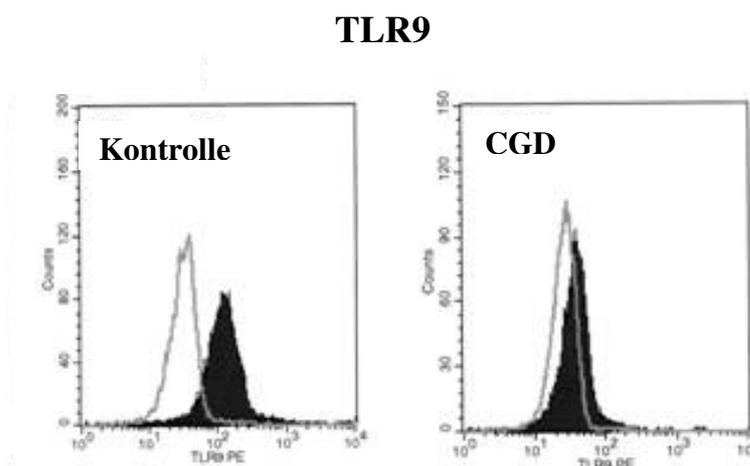


Abbildung 12B zeigt die Expression von TLR9 anhand eines Histogrammes in NG von einem repräsentativen gesunden Kontrollprobanden (links) und einem repräsentativen CGD Patienten (rechts). Die Y-Achse repräsentiert die Anzahl der Zellen, die X-Achse die Fluoreszenzintensität.

5.2.1. Zusammenhang der Expression von TLR 5 und der Krankheitsaktivität

Es zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen der Expression von TLR 5 auf NG von CGD-Patienten und der Häufigkeit der auftretenden Lymphadenitiden pro Jahr bei diesen Patienten.

Abb.13: TLR 5-Expression auf NG von CGD-Patienten in Korrelation mit den aufgetretenen Lymphadenitiden pro Jahr

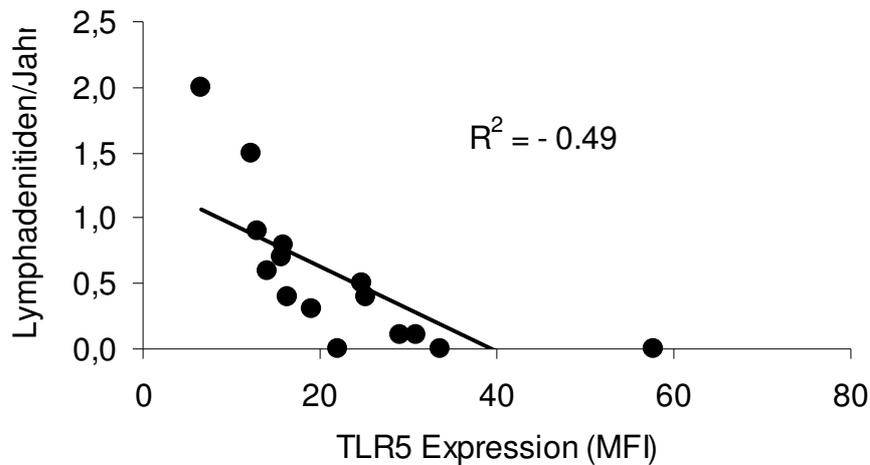


Abbildung 13 zeigt die Expression von TLR 5 auf NG von CGD-Patienten in Korrelation zu den aufgetretenen Lymphadenitiden pro Jahr. Es zeigt sich eine inverse Korrelation.

5.3. Interleukin-8 Rezeptoren

Die IL-8 Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 werden auf NG von CGD-Patienten und NG von gesunden Kontrollprobanden exprimiert. NG von CGD-Patienten exprimieren signifikant geringer CXCR1 als NG von gesunden Kontrollprobanden, hingegen bei CXCR2 kein Unterschied beobachtet werden konnte.

Abb.14A: CXCR1 Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden

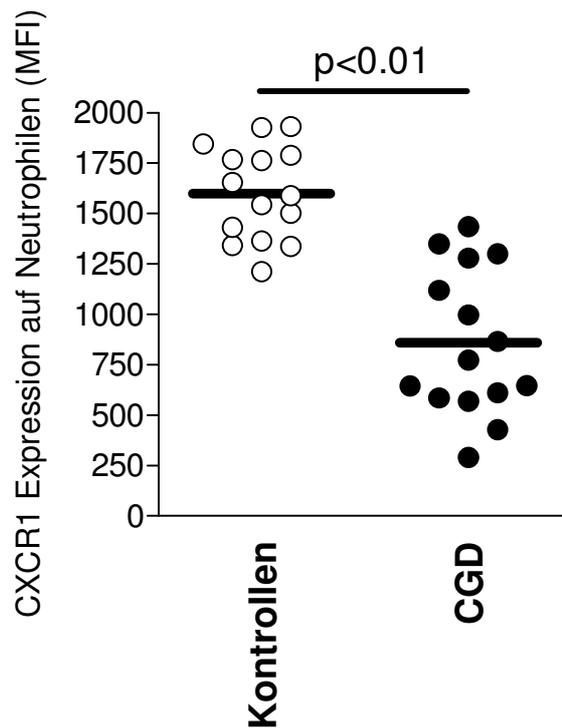


Abbildung 14A zeigt die Expression von CXCR1 auf NG von Kontrollprobanden und CGD Patienten. NG von CGD Patienten tragen signifikant geringer CXCR1 auf ihrer Oberfläche als die getesteten Kontrollen.

Abb.14B: Histogramm der CXCR1-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden

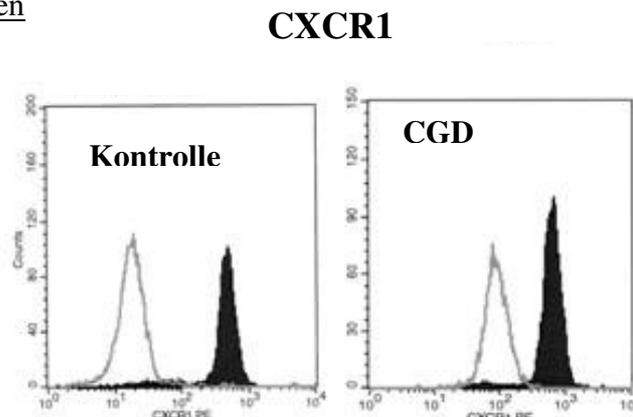


Abbildung 14B zeigt die Expression von CXCR1 anhand eines Histogrammes auf NG von einem repräsentativen gesunden Kontrollprobanden (links) und einem repräsentativen CGD Patienten (rechts). Die Y-Achse repräsentiert die Anzahl der Zellen, die X-Achse die Fluoreszenzintensität.

Abb.15A: CXCR2 Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden

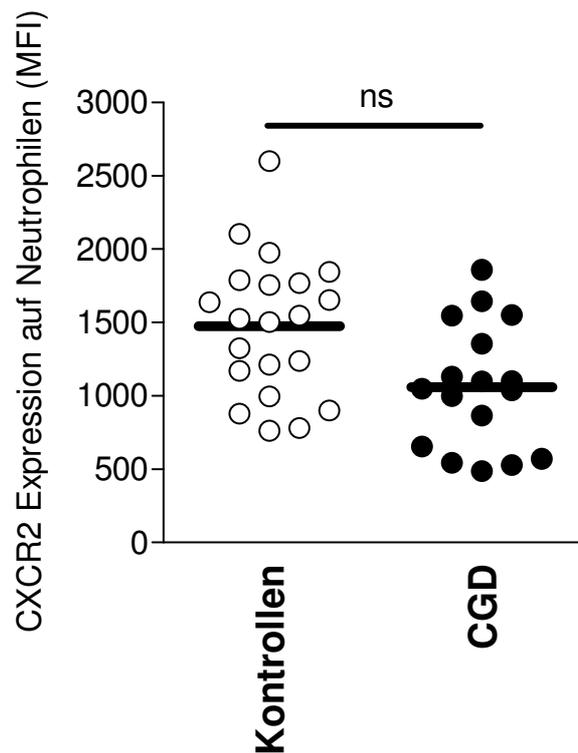


Abbildung 15A zeigt die Expression von CXCR2 auf NG von Kontrollprobanden und CGD-Patienten. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von CXCR2 auf NG von Kontrollen und CGD-Patienten.

Abb.15B: Histogramm der CXCR2-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden

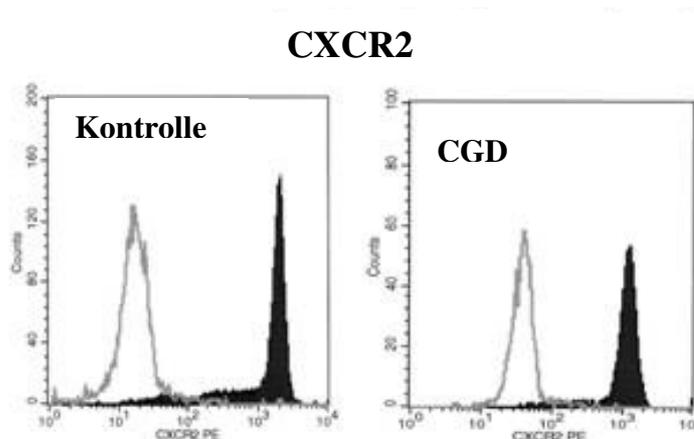


Abbildung 15B zeigt die Expression von CXCR2 anhand eines Histogrammes auf NG von einem repräsentativen gesunden Kontrollprobanden (links) und einem repräsentativen CGD Patienten (rechts). Die Y-Achse repräsentiert die Anzahl der Zellen, die X-Achse die Fluoreszenzintensität.

Abb.16B: Histogramm der BLT1-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden

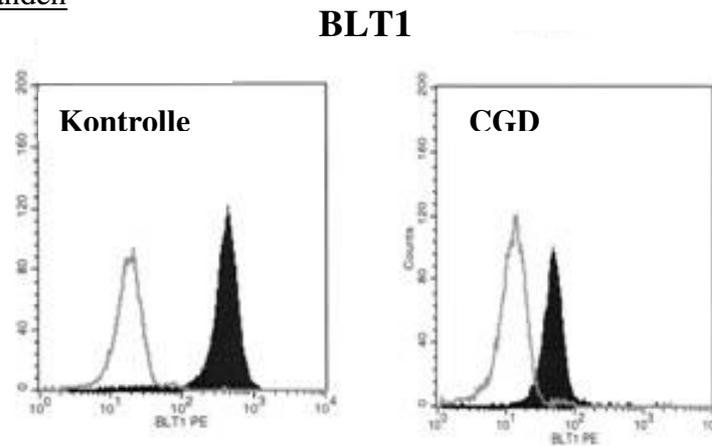


Abbildung 16B zeigt die Expression von BLT1 anhand eines Histogrammes auf NG von einem repräsentativen gesunden Kontrollprobanden (links) und einem repräsentativen CGD Patienten (rechts). Die Y-Achse repräsentiert die Anzahl der Zellen, die X-Achse die Fluoreszenzintensität.

6. DISKUSSION

Im Rahmen unserer Studie untersuchten wir mittels Durchflusszytometrie die Oberflächenexpression verschiedener Rezeptoren auf NG von CGD-Patienten. Es zeigte sich, dass sowohl der Komplementrezeptor CD11b, CD18, als auch CD35 auf der Oberfläche NG von CGD-Patienten signifikant erniedrigt ist, wobei CD11b und CD18 am deutlichsten erniedrigt waren. NG von autosomal-rezessiven CGD-Patienten waren hiervon nochmals stärker betroffen im Vergleich zu der X-chromosomalen Form. Auch die Oberflächenrezeptoren TLR5, CXCR1 und BLT1 zeigten in unserer Studie eine signifikant geringere Expression auf NG von CGD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden. Zudem zeigte sich eine signifikant geringere intrazelluläre TLR9-Expression bei NG von CGD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden. Außerdem zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen der Expression von CD18 auf NG von CGD-Patienten und den bei diesen Patienten aufgetretenen Pneumonien pro Jahr. Auch zwischen der TLR5-Expression auf NG von CGD-Patienten und den bei diesen Patienten auftretenden Lymphadenitiden pro Jahr konnte eine inverse Korrelation festgestellt werden. Nach der Stimulation mit Pam3CSK4 zeigte sich ferner, dass NG von CGD-Patienten die Expression von CD11b nicht signifikant steigern können, im Gegensatz zu NG von gesunden Kontrollprobanden.

Dies könnte darauf hinweisen, dass NG von CGD-Patienten neben dem genetischen Defekt zusätzliche Defizite bei der Oberflächenrezeptor-vermittelten Phagozytose, Chemotaxis und der Erkennung bestimmter Pathogene haben könnten.

6.1 Neutrophile Granulozyten bei CGD-Patienten

NG stellen den Hauptbestandteil der Leukozyten dar und sind die potentesten Abwehrzellen des angeborenen Immunsystems. Sind NG in ihrer Funktion eingeschränkt oder werden sie im Rahmen verschiedener Erkrankungen vermindert gebildet treten gehäuft schwerwiegende Infektionen auf [47]. Es stellte sich heraus, dass bei CGD-Patienten zwar genügend NG im Knochenmark gebildet werden, diese allerdings funktionelle Störungen aufweisen. Obwohl NG von CGD-Patienten Mikroorganismen phagozytieren können, sind sie nicht in der Lage diese intrazellulär abzutöten. Dies beruht auf einen angeborenen Defekt der NADPH-Oxidase, der entweder x-chromosomal oder autosomal-rezessiv vererbt werden kann [48]. Die NADPH-Oxidase katalysiert die Bildung von Sauerstoffradikalen in NG [49], die eine wesentliche Rolle bei der Abtötung von Mikroorganismen spielen. Demzufolge erleiden

CGD-Patienten häufig gravierende Infektionen, was mitunter die häufigste Todesursache bei diesen Patienten darstellt. Außerdem kommt es durch die fehlende Erregerabtötung zu einer Anhäufung von zerstörten NG am Infektionsort, was die Entstehung der bei dieser Erkrankung immer wieder auftretenden Granulome erklärt [50].

Abgesehen von ihren inneren Funktionseigenschaften werden NG entscheidend durch die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle charakterisiert. Hierbei spielen Komplementrezeptoren [51], Toll-like Rezeptoren [52] und Chemokinrezeptoren [53] eine wichtige Rolle.

Wir stellten die Frage, inwiefern der Defekt der NADPH-Oxidase NG von CGD-Patienten Auswirkungen auf die Expression dieser Oberflächenrezeptoren zeigt. So zeigten Gaither et al. beispielsweise in ihrer Studie eine verminderte Expression von CD35 auf der Oberfläche von NG von CGD-Patienten [54]. Die Forschungsgruppe um Gallin et al. machte ebenfalls diese Beobachtung [55]. In unserer Studie zeigten sich deutliche Unterschiede in der Expression der Komplementrezeptoren CD11b, CD18 und CD35, sowie den Toll-like Rezeptoren TLR5 und TLR9, den IL-8 Rezeptor CXCR1 und dem LTB4 Rezeptor BLT1 bei NG von CGD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden. Über mögliche Ursachen und Konsequenzen dieser Variationen soll im Folgenden diskutiert werden.

6.2. Komplementrezeptoren

Die Komplementrezeptoren 1 (CD35) und 3 (CD11b) spielen eine wichtige Rolle für die normale Funktion NG. Sie vermitteln unter anderem die gerichtete Chemotaxis NG, die feste Adhäsion an aktivierte Endothelzellen und die erleichterte Phagozytose opsonierter Bakterien [56]. NG sind in der Lage die Oberflächenexpression von CD11b und CD35 zu regulieren. Unter Ruhebedingungen wird nur ein kleiner Teil von CD11b und CD35 an der Oberfläche NG exprimiert. Ein Großteil der Rezeptoren befindet sich dann in intrazellulären sekretorischen Vesikeln [57]. Im Rahmen einer Infektion werden NG bestimmten Stimuli, wie beispielsweise dem Bakterienwandbestandteil LPS ausgesetzt. Dadurch sind NG in der Lage den Inhalt ihrer Vesikel aktiv zu sezernieren. Es kommt zu einer verstärkten Expression von CD11b und CD35 [58], wodurch der Entzündungsprozess intensiv bekämpft werden kann.

Interessanterweise fanden wir heraus, dass die Expression von CD11b bei NG von CGD-Patienten im Vergleich zu NG von Kontrollprobanden signifikant erniedrigt ist. Dies könnte bedeuten, dass abgesehen von dem Defekt der NADPH-Oxidase ein weiteres Defizit in den von CD11b vermittelten Funktionen vorliegt. Da die Adhäsion an aktiviertes Endothel einen wichtigen Schritt in der Abwehr von Mikroorganismen darstellt [59], könnte dies eine zusätzliche Infektions-Anfälligkeit von CGD Patienten andeuten. Außerdem könnte die

Diskussion

verminderte CD11b Expression einen Hinweis auf eingeschränkte Phagozytosefähigkeit opsonierter Partikel darstellen, was bereits andere Arbeitsgruppen vermuteten [60].

Zudem fiel auf, dass CD11b bei autosomal rezessiven Patienten stärker erniedrigt ist als auf NG von X-chromosomalen Patienten. Was hierfür die Ursache sein könnte ist bislang ungeklärt.

Daneben fanden wir eine genauso starke Erniedrigung bei der CD18 Expression auf NG von CGD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden. CD 18 bildet mit CD11b einen Heterodimer, wobei CD18 die β -Untereinheit und CD11b die α -Untereinheit bildet [61]. Dieser Komplex wird auch als MAC-1 bezeichnet. MAC-1 erleichtert die Phagozytose opsonierter Partikel, was auch die schnelle Apoptose NG triggert [62]. Dies lässt vermuten, dass bei erniedrigter CD11b/CD18-Expression länger ein proinflammatorischer Stimulus aufrechterhalten wird, da der programmierte Zelltod verzögert stattfindet. Diese These wird durch unsere Beobachtung gestärkt, dass bei niedrigerer CD18-Expression auf NG von CGD-Patienten gehäuft Pneumonien beobachtet wurden [63]. Durch die prolongierte Entzündungsreaktion könnte außerdem die bei dieser Krankheit häufig beobachtete Granulombildung begünstigt werden.

Neben der erniedrigten CD11b- und CD18-Expression fanden wir ebenfalls eine Herunterregulation von CD35 auf NG von CGD-Patienten, die im Vergleich zu CD11b/CD18 allerdings schwächer war. Dieses Ergebnis stimmt mit Ergebnissen der Arbeit von Gaither et al. überein, die ebenfalls eine verringerte CD35-Expression auf NG von CGD-Patienten fanden [54]. Ein Argument für die noch auffallend niedrigere CD11b-Expression könnte sein, dass CD35 lediglich in sekretorischen Vesikeln vorkommt, hingegen CD11b in sowohl in sekretorischen, als auch in spezifischen Granula gespeichert wird [64].

Für die verminderte CD11b-Expression auf NG von CGD-Patienten kann es verschiedene Gründe geben. Gessler et al. fanden heraus, dass eine erhöhte Sauerstoffradikalbildung mit einer gesteigerten Expression von CD11b an der Oberfläche NG einhergeht [65]. Da der Defekt der NADPH-Oxidase den oxidativen Burst stark beeinträchtigt bzw. verhindert, stellt dies einen möglichen Grund für die verminderte CD11b-Expression auf NG von CGD-Patienten dar. Somit könnte die CD11b-Expression auch eine Rolle als Marker für die beeinträchtigte NG-Funktion spielen. Eine weitere denkbare Ursache ist eine verkürzte Reifung NG von CGD-Patienten im Knochenmark, da die Proteinsynthese größtenteils vor dem Aussenden in die Blutbahn stattfindet [56]. Ist der Reifungsprozess verkürzt, könnte eine verminderte Expression von CD11b die Folge sein. Eventuell spielt auch ein verändertes Bindungsverhalten von LPS an CD44 eine Rolle, was zu einer verminderten Expression von

CD11b führen würde. Denkbar wäre außerdem ein Faktor im Plasma von CGD-Patienten, der mit den NG interagiert und eine Antwort auf aktivierte Komplementkaskadenkomponenten verhindert. Letztlich ist aber noch nicht genau geklärt, warum CD11b bei NG von CGD-Patienten vermindert exprimiert wird.

Um zu untersuchen, wie sich NG von CGD-Patienten im Vergleich zu NG von gesunden Kontrollprobanden auf einen bakteriellen Stimulus verhalten, inkubierten wir diese mit dem synthetischen Lipopeptid Pam3CSK4, das einen Teil bakterieller Lipoproteine imitiert. Durch die Stimulation mit Pam3CSK4 wird NF-kappa B aktiviert [66]. Die NF-kappaB Aktivierung führt ihrerseits zu einer verstärkten Expression von Oberflächenrezeptoren auf NG [67]. Zudem wurde gezeigt, dass die Hemmung von NF-kappa B mit einer signifikanten Runterregulation von CD11b auf NG einhergeht [68]. Während NG von gesunden Kontrollprobanden nach Stimulation mit Pam3CSK4 signifikant die Expression von CD11b auf ihrer Oberfläche erhöhen, wird CD11b auf NG von CGD-Patienten nach Stimulation mit Pam3CSK4 nicht signifikant erhöht. Baeuerle et al. zeigten, dass NF-kappa B auch durch Sauerstoffradikale aktiviert werden kann [69]. Dies könnte einen weiteren Hinweis darauf geben, dass die CD11b-Expression mitbedingt werden könnte von der Sauerstoffradikalbildung in NG. Werden wie im Falle von CGD keine oder nur stark vermindert Sauerstoffradikale produziert, könnte also ein potenter Stimulus zur CD11b Hochregulierung fehlen.

6.3. Toll-like Rezeptoren

Aufgrund der Fähigkeit bestimmte molekulare Muster von Mikroorganismen spezifisch zu erkennen, nehmen TLR eine zentrale Bedeutung bei der Abwehr von Krankheitserregern ein [70]. Demzufolge spielen sie nicht nur für das unspezifische, sondern auch für das spezifische Immunsystem eine wichtige Rolle und werden somit sowohl von NG und Makrophagen, als auch von B- und T-Zellen exprimiert [71]. NG sind durch TLR in der Lage bestimmte Pathogene zu identifizieren. TLR schaffen somit die Voraussetzung für die Abtötung pathogener Keime. Unsere Arbeitsgruppe untersuchte die Expression von TLR auf NG von CGD-Patienten, um festzustellen, ob diese verändert ist im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden.

Dabei fanden wir, dass besonders die Expression von TLR 5 auf NG von CGD-Patienten signifikant erniedrigt ist. TLR 5 erkennt spezifisch Flagellin [72]. Z.B. exprimiert einer der bei CGD Patienten gefährlichsten Keime, *Burkholderia cepacia*, neben dem Hauptvirulenzfaktor Katalase auch Flagellin [73]. Eine erniedrigte TLR5-Expression könnte

Diskussion

mit einem schlechteren Erkennen Flagellin-tragender Bakterien einhergehen und so eine Infektion mit diesem Keim zusätzlich begünstigen. Zudem konnten wir ein vermehrtes Auftreten von Lymphadenitiden pro Jahr bei CGD-Patienten mit besonders niedriger TLR5-Expression feststellen [74].

Eine mögliche Ursache für die erniedrigte Expression könnte in dem Fehlen der Sauerstoffradikalbildung bei NG von CGD-Patienten liegen. Neben der Möglichkeit Bakterien direkt abzutöten, funktionieren die Sauerstoffradikale auch als Signalmoleküle und modulieren so unter anderem die Expression von Membranrezeptoren [75]. So könnte von einem sekundären Phänomen des NADPH-Oxidase Defekts ausgegangen werden.

TLR5 war in unserer Studie sowohl auf NG von CGD-Patienten der X-chromosomalen Form als auch der autosomal-rezessiven Form signifikant erniedrigt. Dies widerspricht der Untersuchung von Kobayashy et al., die bei 5 CGD-Patienten mit einem X-chromosomalen Defekt eine erhöhte Expression von TLR5 auf NG feststellte [76]. Das unterschiedliche methodische Vorgehen zur Quantifizierung der TLR5-Expression könnte ein möglicher Grund hierfür sein (Protein- versus mRNA-Expression). Auch die kleinere Studienpopulation muss hierbei berücksichtigt werden.

Zudem untersuchten wir die intrazelluläre Expression von TLR9 in NG von CGD-Patienten und NG von Kontrollprobanden. TLR9 kommt eine besondere Bedeutung bei der Erkennung unmethylierter, bakterieller CpG-DNA zu [77]. Wir fanden bei NG von CGD-Patienten eine signifikant geringere intrazelluläre TLR9-Expression im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden. Dies lässt vermuten, dass auch die intrazelluläre Expression bestimmter Rezeptoren durch die Sauerstoffradikalbildung stimuliert werden könnte.

Da jeder TLR charakteristisch bestimmte bakterielle Pathogene erkennt [78], könnte eine niedrigere Expression verschiedener TLR auch eine schlechtere Erkennung der spezifischen Pathogene und somit eine länger andauernde Entzündungsreaktion bedeuten. Eine länger andauernde Entzündungsreaktion könnte wiederum die bei dieser Krankheit häufig beobachtete Granulombildung begünstigen [79].

Die anderen, von unserer Arbeitsgruppe untersuchten TLR, TLR1, TLR2 und TLR4 zeigten keine wesentlichen Unterschiede in der Expression auf NG von CGD-Patienten und der auf NG von Kontrollprobanden. Dies könnte darauf hindeuten, dass insbesondere die Expression von TLR5 und TLR9 von der Bildung der Sauerstoffradikale stimuliert wird, hingegen bei der Expression von TLR1, 2, und 4 anderen Stimuli eine größere Bedeutung zukommt.

6.4. CXCR1 und CXCR2

IL-8 bindet mit hoher Affinität an die Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2 auf NG [80]. IL-8 fördert so unter anderem die Migration NG durch entzündlich verändertes Gewebe, die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen und die Degranulation der sich in NG befindenden Granula [81].

In unserer Studie zeigte sich eine signifikant geringere Expression von CXCR1, nicht aber von CXCR2 auf NG von CGD-Patienten im Vergleich zu denen von gesunden Kontrollprobanden. Bisher wurden zwei unterschiedliche Mechanismen für die Modulation der CXC-Rezeptoren beschrieben. Khandaker et al. zeigten einen Agonist-unabhängigen, Thyrosinkinase-abhängigen Mechanismus in der Herunterregulierung von Chemokinrezeptoren [82]. Dieser beruhte auf einer LPS-vermittelten Internalisierung von CXCR1 und CXCR2. Samanta et al. berichteten über einen IL-8 vermittelten Regulationsmechanismus, wonach CXCR1 und CXCR2 nach Bindung von IL-8 rapide herunterreguliert werden [83].

Frühere Studien haben gezeigt, dass CXCR2 eine Vielzahl an Liganden mit hoher Affinität bindet. Dazu gehören neben IL-8 verschiedene andere CXC-Chemokine, wie ENA-78, NAP-2 und GRO- α , - β und - γ [84]. CXCR1 hingegen bindet lediglich IL-8 und das CXC-Chemokin GCP-2 mit hoher Affinität [85]. Rezidivierende Infektionen könnten bei CGD-Patienten also vor allem eine latente Unterexpression von CXCR1 hervorrufen.

IL-8 und seinen beiden Rezeptoren wird daneben eine maßgebliche Rolle bei der Vermittlung von Apoptose der NG zugeschrieben [86;87]. Da IL-8 antiapoptotische Stimuli vermittelt, könnte eine Unterexpression von CXCR1 also vermehrte Apoptose und somit die Förderung der Granulombildung bei diesen Patienten bedeuten.

Zudem besteht eine wichtige Funktion von CXCR1 darin, den Oxidativen Burst NG zu fördern [88]. Da bei NG von CGD-Patienten keine oder nur eine stark verminderte Bildung von Sauerstoffradikalen möglich ist, beinhaltet dies eine weitere denkbare Ursache für die niedrigere CXCR1-Expression bei diesen Patienten.

Letztendlich bedarf es aber noch weiterer Klärung, weshalb CXCR1 auf NG von CGD-Patienten vermindert exprimiert wird und welche Auswirkungen diese gestörte Expression auf den Krankheitsverlauf hat.

6.5. BLT1

Im Rahmen von Entzündungsreaktionen wird in diversen Abwehrzellen LTB₄ erzeugt, das über BLT1 an NG bindet [89]. Dadurch werden wichtige Zellfunktionen, wie Degranulation, Bildung von Sauerstoffradikalen, aber auch chemotaktische Stimuli vermittelt [90].

Im Rahmen unserer Studie zeigte sich, dass BLT1 auf NG von CGD-Patienten signifikant geringer exprimiert wird im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden. Dies lässt wiederum ein zusätzliches Defizit in wichtigen NG Funktionen bei diesen Patienten vermuten.

Patrick et al. zeigten einen direkten Zusammenhang zwischen LTB₄ und der Fähigkeit NG CD11b hoch regulieren zu können [91]. Da auf NG von CGD-Patienten CD11b ebenfalls signifikant geringer exprimiert wird, könnte dies auf einen Synthesedefekt von LTB₄ bei diesen Patienten hinweisen. Sollte LTB₄ bei dieser Erkrankung wirklich vermindert gebildet werden, könnte dies möglicherweise eine Runterregulation von BLT1 auf NG nach sich ziehen.

Verschiedene Studien haben außerdem gezeigt, dass LTB₄ über die Bindung an BLT1 einen antiapoptotischen Effekt vermittelt [92;93]. Wird nun im Rahmen einer chronischen Granulomatose vermindert BLT1 exprimiert, könnte dies eine verstärkte Apoptose der NG und somit eine weitere Funktionseinbuße bedeuten. Durch eine überschießende Apoptose könnte außerdem die Granulombildung begünstigt werden.

Inwieweit die verminderte Expression von BLT1 auf NG von CGD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden eine weitere Funktionseinschränkung der NG bei dieser Erkrankung bedeutet, kann an dieser Stelle jedoch nur vermutet werden.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die chronische Granulomatose (CGD) ist ein primärer Immundefekt, der zu einer schweren Verminderung der Sauerstoffradikalbildung von neutrophilen Granulozyten (NG) führt. NG sind die wichtigsten Abwehrzellen des angeborenen Immunsystems. Durch die Bildung von Sauerstoffradikalen können sie Krankheitserreger direkt abtöten. Fehlt diese Bildung der Sauerstoffradikale, überleben phagozytierte Erreger und töten ihrerseits den Granulozyten ab, wobei nach Freisetzung des noch lebenden Erregers der Kreislauf von neuem beginnt. Patienten mit dieser Erkrankung leiden an rezidivierenden Abszessen innerer Organe und schweren, schlecht-heilenden Pneumonien. Der Grund für die fehlende Sauerstoffradikalbildung von NG bei CGD-Patienten ist ein genetisch bedingter Defekt der NADPH-Oxidase. Trotz der einheitlichen Störung ist der Krankheitsverlauf jedoch sehr unterschiedlich.

Deshalb stellten wir die Frage, ob neben der gestörten Sauerstoffradikalbildung noch weitere Immunfunktionen bei dieser Erkrankung verändert sind. Dazu untersuchten wir die Expression verschiedener Rezeptoren auf NG von CGD-Patienten, die zur Erkennung von Pathogenen erforderlich sind, mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression der Komplementrezeptoren CD11b, CD18 und CD35, der Toll-like Rezeptoren TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR9, sowie der Interleukin-8 Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 und des LTB₄ Rezeptors BLT1 auf NG von CGD-Patienten durchflusszytometrisch analysiert.

Dabei fanden wir eine signifikant erniedrigte Oberflächenexpression von CD11b/CD18 auf NG von CGD-Patienten im Vergleich zu NG von gesunden Kontrollprobanden. Außerdem zeigte sich, dass CD11b nach Stimulation mit dem Lipopeptid Pam3CSK4 bei CGD-Patienten signifikant schlechter hochreguliert wird als bei gesunden Kontrollprobanden. Zudem zeigte sich eine besonders starke Erniedrigung in der CD11b-Expression bei autosomal rezessiven Trägern dieser Erkrankung. Zwischen der Höhe der Expression von CD18 auf NG von CGD-Patienten und der Anzahl der auftretenden Pneumonien pro Jahr zeigte sich eine inverse Korrelation. Auch der Komplementrezeptor CD35 wird auf NG von CGD-Patienten geringer exprimiert, der Effekt ist allerdings schwächer als bei CD11b/CD18.

Zudem war die Expression von TLR5 auf und TLR9 in NG von CGD-Patienten im Vergleich zu NG von gesunden Kontrollprobanden signifikant geringer. Es zeigte sich außerdem, dass zwischen den auftretenden Lymphadenitiden pro Jahr und der Höhe der Expression von TLR5

Zusammenfassung

auf NG von CGD-Patienten eine inverse Korrelation besteht. Bei TLR1, TLR2 und TLR4 konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Von den beiden untersuchten IL-8 Rezeptoren zeigte sich lediglich bei CXCR1 eine signifikant geringere Oberflächenexpression bei NG von CGD-Patienten. CXCR2 wird auf NG von CGD-Patienten im Vergleich zu NG von gesunden Kontrollprobanden ähnlich exprimiert.

Schließlich zeigen unsere Ergebnisse noch eine signifikant geringere Oberflächenexpression von BLT1 auf NG von CGD-Patienten im Vergleich zu NG von gesunden Kontrollprobanden.

Unsere Ergebnisse zeigen erstmals, dass das Expressionsmuster von Oberflächenrezeptoren auf NG von CGD-Patienten deutlich verändert ist im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden. Die erniedrigte Expression von Oberflächenrezeptoren lässt neben der gestörten Sauerstoffradikalbildung zusätzliche funktionelle Einbußen bei der angeborenen Immunabwehr vermuten. So könnte die verminderte Expression der Komplementrezeptoren CD11b und CD18 auf NG von CGD-Patienten möglicherweise auf eine beeinträchtigte Opsonophagozytose hinweisen. Da IL-8 durch die Bindung an CXCR1 gezielte Chemotaxis vermittelt, könnte die verminderte CXCR1-Expression auf NG von CGD-Patienten auf eine Störung bei der Migration NG durch entzündlich verändertes Gewebe hindeuten. Auch die Pathogenerkennung könnte durch die verminderte Expression von TLR5 und TLR9 beeinträchtigt sein. Da TLR5 spezifisch Flagellin erkennt, könnte neben dem Hauptvirulenzfaktor Katalase also auch Flagellin Infektionen bei dieser Erkrankung begünstigen. Allgemein könnte durch die verminderte Expression von Oberflächenrezeptoren auf NG von CGD-Patienten im Vergleich zu NG von gesunden Kontrollprobanden auch von einer prolongierten Entzündungsreaktion ausgegangen werden. Eine verlängerte Entzündungsreaktion könnte wiederum die bei dieser Krankheit häufige Granulombildung fördern. Die wahrscheinlichste Ursache für die verminderte Expression von Oberflächenrezeptoren auf NG bei CGD-Patienten ist ein sekundäres Phänomen. So könnte sich der Defekt der NADPH-Oxidase und damit der Sauerstoffradikalbildung sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene auf die Expression von Membranrezeptoren auswirken.

Um die Auswirkungen und genauen Gründe der verminderten Expression von Oberflächenrezeptoren auf NG von CGD-Patienten zu erforschen bedarf es noch weiterer Forschung.

Insgesamt erlaubt diese Arbeit einen weiteren interessanten Einblick in die Funktion von NG bei CGD-Patienten und die Fehlregulation von angeborenen Oberflächenrezeptoren bietet

Zusammenfassung

möglicherweise nach weiteren Untersuchungen einen zusätzlichen diagnostischen und therapeutischen Angriffspunkt.

8. Literaturverzeichnis

References

1. **Wintergerst,U.**, Chronische Granulomatose. *Monatsschr.Kinderheilkd.* 2002. **10.2002**: 1180-1187.
2. **Baehner,R.L.**, Chronic granulomatous disease of childhood: clinical, pathological, biochemical, molecular, and genetic aspects of the disease. *Pediatr.Pathol.* 1990. **10**: 143-153.
3. **Shatwell,K.P. and Segal,A.W.**, NADPH oxidase. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 1996. **28**: 1191-1195.
4. **Assari,T.**, Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of CGD. *Med.Immunol.* 2006. **5**: 4.
5. **Ma,J.S., Chen,P.Y., Fu,L.S., Chi,C.S., Huang,Y.F., Lin,C.Y., and Shieh,C.C.**, Chronic granulomatous disease: a case report. *J.Microbiol.Immunol.Infect.* 2000. **33**: 118-122.
6. **Dinauer,M.C.**, Chronic granulomatous disease and other disorders of phagocyte function. *Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program.* 2005. 89-95.
7. **Palmblad,J., Gyllenhammar,H., Bratt,J., and Ahlin,A.**, [Chronic granulomatous disease--not only the lack of oxygen radicals]. *Lakartidningen* 2005. **102**: 1036-8, 1041.

8. **Leung,T., Chik,K., Li,C., Shing,M., and Yuen,P.,** Bone marrow transplantation for chronic granulomatous disease: long-term follow-up and review of literature. *Bone Marrow Transplant.* 1999. **24**: 567-570.
9. **Nauseef,W.M.,** The NADPH-dependent oxidase of phagocytes. *Proc.Assoc.Am.Physicians* 1999. **111**: 373-382.
10. **Simon,H.U.,** Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunological Reviews* 2003. **193**: 101-110.
11. **Eltzschig,H.K., Weissmuller,T., Mager,A., and Eckle,T.,** Nucleotide metabolism and cell-cell interactions. *Methods Mol.Biol.* 2006. **341**: 73-87.
12. **Kobayashi,S.D., Voyich,J.M., Burlak,C., and DeLeo,F.R.,** Neutrophils in the innate immune response. *Arch.Immunol.Ther.Exp.(Warsz.)* 2005. **53**: 505-517.
13. **Janeway,C.A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.,** *Immunologie.* Spektrum Akademischer Verlag, 2002.
14. **Dallegri,F. and Ottonello,L.,** Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm.Res.* 1997. **46**: 382-391.
15. **Dallegri,F. and Ottonello,L.,** Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm.Res.* 1997. **46**: 382-391.
16. **Gaither,T.A., Gallin,J.I., Iida,K., Nussenzweig,V., and Frank,M.M.,** Deficiency in C3b receptors on neutrophils of patients with chronic granulomatous disease and

- hyperimmunoglobulin-E recurrent infection (Job's) syndrome. *Inflammation* 1984. **8**: 429-444.
17. **Berends,C., Hoekstra,M.O., Dijkhuizen,B., de Monchy,J.G., Gerritsen,J., and Kauffman,H.F.,** Expression of CD35 (CR1) and CD11b (CR3) on circulating neutrophils and eosinophils from allergic asthmatic children. *Clin.Exp.Allergy* 1993. **23**: 926-933.
18. **Nuutila,J., Hohenthal,U., Laitinen,I., Kotilainen,P., Rajamaki,A., Nikoskelainen,J., and Lilius,E.M.,** Quantitative analysis of complement receptors, CR1 (CD35) and CR3 (CD11b), on neutrophils improves distinction between bacterial and viral infections in febrile patients: comparison with standard clinical laboratory data. *J.Immunol.Methods* 2006. **315**: 191-201.
19. **Tausk,F. and Gigli,I.,** The human C3b receptor: function and role in human diseases. *J.Invest Dermatol.* 1990. **94**: 141S-145S.
20. **Akira,S. and Takeda,K.,** Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* 2004. **4**: 499-511.
21. **Akira,S.,** TLR signaling. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 2006. **311**: 1-16.
22. **Nakata,T., Yasuda,M., Fujita,M., Kataoka,H., Kiura,K., Sano,H., and Shibata,K.,** CD14 directly binds to triacylated lipopeptides and facilitates recognition of the lipopeptides by the receptor complex of Toll-like receptors 2 and 1 without binding to the complex. *Cell Microbiol.* 2006. **8**: 1899-1909.

23. **Kirschning,C.J. and Schumann,R.R.**, TLR2: cellular sensor for microbial and endogenous molecular patterns. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 2002. **270**: 121-144.
24. **Flacher,V., Bouschbacher,M., Verronese,E., Massacrier,C., Sisirak,V., Berthier-Vergnes,O., de Saint-Vis,B., Caux,C., zutter-Dambuyant,C., Lebecque,S., and Valladeau,J.**, Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria. *J.Immunol.* 2006. **177**: 7959-7967.
25. **Hallman,M., Ramet,M., and Ezekowitz,R.A.**, Toll-like receptors as sensors of pathogens. *Pediatr.Res.* 2001. **50**: 315-321.
26. **Verma,A., Arora,S.K., Kuravi,S.K., and Ramphal,R.**, Roles of specific amino acids in the N terminus of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin and of flagellin glycosylation in the innate immune response. *Infect.Immun.* 2005. **73**: 8237-8246.
27. **Roeder,A., Kirschning,C.J., Rupec,R.A., Schaller,M., Weindl,G., and Korting,H.C.**, Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med.Mycol.* 2004. **42**: 485-498.
28. **Kawai,T. and Akira,S.**, Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res.Ther.* 2005. **7**: 12-19.
29. **Musette,P., Auquit,A., I, and Begon,E.**, [Innate immunity: cutaneous expression of Toll-like receptors]. *Med.Sci.(Paris)* 2006. **22**: 149-152.

30. **Janssens,S. and Beyaert,R.,** Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin.Microbiol.Rev.* 2003. **16**: 637-646.
31. **Delneste,Y., Beauvillain,C., and Jeannin,P.,** [Innate immunity: structure and function of TLRs.]. *Med.Sci.(Paris)* 2007. **23**: 67-74.
32. **Pulendran,B.,** Variiegation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors. *J.Immunol.* 2005. **174**: 2457-2465.
33. **Takeda,K., Kaisho,T., and Akira,S.,** Toll-like receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 2003. **21**: 335-376.
34. **Ozato,K., Tsujimura,H., and Tamura,T.,** Toll-like receptor signaling and regulation of cytokine gene expression in the immune system. *Biotechniques* 2002. **Suppl**: 66-8, 70, 72.
35. **Kawai,T. and Akira,S.,** Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr.Opin.Immunol.* 2005. **17**: 338-344.
36. **Doroshenko,T., Chaly,Y., Savitskiy,V., Maslakova,O., Portyanko,A., Gorudko,I., and Voitenok,N.N.,** Phagocytosing neutrophils down-regulate the expression of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. *Blood* 2002. **100**: 2668-2671.
37. **Zhang,W. and Chen,H.,** [The study on the interleukin-8 (IL-8)]. *Sheng Wu Yi.Xue.Gong.Cheng Xue.Za Zhi.* 2002. **19**: 697-702.

38. **Pease,J.E. and Sabroe,I.**, The role of interleukin-8 and its receptors in inflammatory lung disease: implications for therapy. *Am.J.Respir.Med.* 2002. **1**: 19-25.
39. **Jan,M.S., Huang,Y.H., Shieh,B., Teng,R.H., Yan,Y.P., Lee,Y.T., Liao,K.K., and Li,C.**, CC chemokines induce neutrophils to chemotaxis, degranulation, and alpha-defensin release. *J.Acquir.Immune.Defic.Syindr.* 2006. **41**: 6-16.
40. **Ihara,A., Wada,K., Yoneda,M., Fujisawa,N., Takahashi,H., and Nakajima,A.**, Blockade of Leukotriene B(4) Signaling Pathway Induces Apoptosis and Suppresses Cell Proliferation in Colon Cancer. *J.Pharmacol.Sci.* 2007.
41. **Kavelaars,A., Vroon,A., Raatgever,R.P., Fong,A.M., Premont,R.T., Patel,D.D., Lefkowitz,R.J., and Heijnen,C.J.**, Increased acute inflammation, leukotriene B4-induced chemotaxis, and signaling in mice deficient for G protein-coupled receptor kinase 6. *J.Immunol.* 2003. **171**: 6128-6134.
42. **Miyahara,N., Miyahara,S., Takeda,K., and Gelfand,E.W.**, Role of the LTB4/BLT1 pathway in allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *Allergol.Int.* 2006. **55**: 91-97.
43. **Tager,A.M. and Luster,A.D.**, BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 2003. **69**: 123-134.
44. **Lundeen,K.A., Sun,B., Karlsson,L., and Fourie,A.M.**, Leukotriene B4 receptors BLT1 and BLT2: expression and function in human and murine mast cells. *J.Immunol.* 2006. **177**: 3439-3447.

45. **Toda,A., Yokomizo,T., and Shimizu,T.,** Leukotriene B4 receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002. **68-69**: 575-585.
46. **Kato,K., Yokomizo,T., Izumi,T., and Shimizu,T.,** Cell-specific transcriptional regulation of human leukotriene B(4) receptor gene. *J.Exp.Med.* 2000. **192**: 413-420.
47. **Stossel,T.P.,** Congenital and acquired defects of neutrophil granulocytes. *Schweiz.Med.Wochenschr.* 1978. **108**: 1577-1579.
48. **El,K.R., Barbouche,M.R., Elloumi-Zghal,H., Bejaoui,M., Chemli,J., Mellouli,F., Tebib,N., Abdelmoula,M.S., Boukthir,S., Fitouri,Z., M'Rad,S., Bouslama,K., Touiri,H., Abdelhak,S., and Dellagi,M.K.,** Genetic and mutational heterogeneity of autosomal recessive chronic granulomatous disease in Tunisia. *J.Hum.Genet.* 2006. **51**: 887-895.
49. **Guichard,C., Pedruzzi,E., Fay,M., Ben,M.S., Coant,N., Daniel,F., and Ogier-Denis,E.,** [The Nox/Duox family of ROS-generating NADPH oxidases]. *Med.Sci.(Paris)* 2006. **22**: 953-959.
50. **Lean-Tooke,A.P., Aldridge,C., Gilmour,K., Higgins,B., Hudson,M., and Spickett,G.P.,** An unusual cause of granulomatous disease. *BMC.Clin.Pathol.* 2007. **7**: 1.
51. **Mobberley-Schuman,P.S. and Weiss,A.A.,** Influence of CR3 (CD11b/CD18) expression on phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human neutrophils. *Infect.Immun.* 2005. **73**: 7317-7323.

52. **Hayashi,F., Means,T.K., and Luster,A.D.,** Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 2003. **102**: 2660-2669.
53. **Smithson,A., Sarrias,M.R., Barcelo,J., Suarez,B., Horcajada,J.P., Soto,S.M., Soriano,A., Vila,J., Martinez,J.A., Vives,J., Mensa,J., and Lozano,F.,** Expression of interleukin-8 receptors (CXCR1 and CXCR2) in premenopausal women with recurrent urinary tract infections. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 2005. **12**: 1358-1363.
54. **Gaither,T.A., Gallin,J.I., Iida,K., Nussenzweig,V., and Frank,M.M.,** Deficiency in C3b receptors on neutrophils of patients with chronic granulomatous disease and hyperimmunoglobulin-E recurrent infection (Job's) syndrome. *Inflammation* 1984. **8**: 429-444.
55. **Gallin,J.I., Buescher,E.S., Seligmann,B.E., Nath,J., Gaither,T., and Katz,P.,** NIH conference. Recent advances in chronic granulomatous disease. *Ann.Intern.Med.* 1983. **99**: 657-674.
56. **Rodeberg,D.A., Bass,R.C., Alexander,J.W., Warden,G.D., and Babcock,G.F.,** Neutrophils from burn patients are unable to increase the expression of CD11b/CD18 in response to inflammatory stimuli. *J.Leukoc.Biol.* 1997. **61**: 575-582.
57. **Buyon,J.P., Philips,M.R., Merrill,J.T., Slade,S.G., Leszczynska-Piziak,J., and Abramson,S.B.,** Differential phosphorylation of the beta2 integrin CD11b/CD18 in the plasma and specific granule membranes of neutrophils. *J.Leukoc.Biol.* 1997. **61**: 313-321.

58. **Kishimoto,T.K., Jutila,M.A., Berg,E.L., and Butcher,E.C.,** Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 1989. **245:** 1238-1241.
59. **Rochon,Y.P., Kavanagh,T.J., and Harlan,J.M.,** Analysis of integrin (CD11b/CD18) movement during neutrophil adhesion and migration on endothelial cells. *J.Microsc.* 2000. **197:** 15-24.
60. **Stossel,T.P., Root,R.K., and Vaughan,M.,** Phagocytosis in chronic granulomatous disease and the Chediak-Higashi syndrome. *N.Engl.J.Med.* 1972. **286:** 120-123.
61. **Mazzone,A. and Ricevuti,G.,** Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance. *Haematologica* 1995. **80:** 161-175.
62. **Mayadas,T.N. and Cullere,X.,** Neutrophil beta2 integrins: moderators of life or death decisions. *Trends Immunol.* 2005. **26:** 388-395.
63. **Hartl,D., Lehmann,N., Hoffmann,F., Jansson,A., Hector,A., Notheis,G., Roos,D., Belohradsky,B.H., and Wintergerst,U.,** Dysregulation of innate immune receptors on neutrophils in chronic granulomatous disease. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2008. **121:** 375-382.
64. **Drouin,A., Favier,R., Masse,J.M., Debili,N., Schmitt,A., Elbim,C., Guichard,J., Adam,M., Gougerot-Pocidallo,M.A., and Cramer,E.M.,** Newly recognized cellular abnormalities in the gray platelet syndrome. *Blood* 2001. **98:** 1382-1391.

65. **Gessler,P. and Dahinden,C.,** Increased respiratory burst and increased expression of complement receptor-3 (CD11b/CD18) and of IL-8 receptor-A in neutrophil granulocytes from newborns after vaginal delivery. *Biol.Neonate* 2003. **83**: 107-112.
66. **Igarashi,A., Ohtsu,S., Muroi,M., and Tanamoto,K.,** Effects of possible endocrine disrupting chemicals on bacterial component-induced activation of NF-kappaB. *Biol.Pharm.Bull.* 2006. **29**: 2120-2122.
67. **Muller,J.M., Ziegler-Heitbrock,H.W., and Baeuerle,P.A.,** Nuclear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects. *Immunobiology* 1993. **187**: 233-256.
68. **Sokoloski,J.A., Sartorelli,A.C., Rosen,C.A., and Narayanan,R.,** Antisense oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B block CD11b expression and alter adhesion properties of differentiated HL-60 granulocytes. *Blood* 1993. **82**: 625-632.
69. **Baeuerle,P.A., Rupec,R.A., and Pahl,H.L.,** Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response. *Pathol.Biol.(Paris)* 1996. **44**: 29-35.
70. **He,H., Genovese,K.J., Nisbet,D.J., and Kogut,M.H.,** Profile of Toll-like receptor expressions and induction of nitric oxide synthesis by Toll-like receptor agonists in chicken monocytes. *Mol.Immunol.* 2006. **43**: 783-789.
71. **Majewska,M. and Szczepanik,M.,** [The role of Toll-like receptors (TLR) in innate and adaptive immune responses and their function in immune response regulation]. *Postepy Hig.Med.Dosw.(Online.)* 2006. **60**: 52-63.

72. **ndersen-Nissen,E., Smith,K.D., Bonneau,R., Strong,R.K., and Aderem,A.,** A conserved surface on Toll-like receptor 5 recognizes bacterial flagellin. *J.Exp.Med.* 2007. **204**: 393-403.
73. **Hales,B.A., Morgan,J.A., Hart,C.A., and Winstanley,C.,** Variation in flagellin genes and proteins of *Burkholderia cepacia*. *J.Bacteriol.* 1998. **180**: 1110-1118.
74. **Hartl,D., Lehmann,N., Hoffmann,F., Jansson,A., Hector,A., Notheis,G., Roos,D., Belohradsky,B.H., and Wintergerst,U.,** Dysregulation of innate immune receptors on neutrophils in chronic granulomatous disease. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2008. **121**: 375-382.
75. **Fialkow,L., Wang,Y., and Downey,G.P.,** Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic.Biol.Med.* 2007. **42**: 153-164.
76. **Kobayashi,S.D., Voyich,J.M., Braughton,K.R., Whitney,A.R., Nauseef,W.M., Malech,H.L., and DeLeo,F.R.,** Gene expression profiling provides insight into the pathophysiology of chronic granulomatous disease. *J.Immunol.* 2004. **172**: 636-643.
77. **Bauer,S. and Wagner,H.,** Bacterial CpG-DNA licenses TLR9. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 2002. **270**: 145-154.
78. **Kawai,T. and Akira,S.,** TLR signaling. *Cell Death.Differ.* 2006. **13**: 816-825.
79. **Roesler,J., Koch,A., Porksen,G., von,B.H., Brenner,S., Hahn,G., Fischer,R., Lorenz,N., Gahr,M., and Rosen-Wolff,A.,** Benefit assessment of preventive medical

- check-ups in patients suffering from chronic granulomatous disease (CGD).
J.Eval.Clin.Pract. 2005. **11**: 513-521.
80. **Pease,J.E. and Sabroe,I.**, The role of interleukin-8 and its receptors in inflammatory lung disease: implications for therapy. *Am.J.Respir.Med.* 2002. **1**: 19-25.
81. **Williams,M.A., Cave,C.M., Quaid,G., Robinson,C., Daly,T.J., Witt,D., Lentsch,A.B., and Solomkin,J.S.**, Interleukin 8 dimerization as a mechanism for regulation of neutrophil adherence-dependent oxidant production. *Shock* 2005. **23**: 371-376.
82. **Khandaker,M.H., Xu,L., Rahimpour,R., Mitchell,G., DeVries,M.E., Pickering,J.G., Singhal,S.K., Feldman,R.D., and Kelvin,D.J.**, CXCR1 and CXCR2 are rapidly down-modulated by bacterial endotoxin through a unique agonist-independent, tyrosine kinase-dependent mechanism. *J.Immunol.* 1998. **161**: 1930-1938.
83. **Samanta,A.K., Oppenheim,J.J., and Matsushima,K.**, Interleukin 8 (monocyte-derived neutrophil chemotactic factor) dynamically regulates its own receptor expression on human neutrophils. *J.Biol.Chem.* 1990. **265**: 183-189.
84. **Fan,X., Patera,A.C., Pong-Kennedy,A., Deno,G., Gonsiorek,W., Manfra,D.J., Vassileva,G., Zeng,M., Jackson,C., Sullivan,L., Sharif-Rodriguez,W., Opdenakker,G., Van,D.J., Hedrick,J.A., Lundell,D., Lira,S.A., and Hipkin,R.W.**, Murine CXCR1 is a functional receptor for GCP-2/CXCL6 AND IL-8/CXCL8. *J.Biol.Chem.* 2006.

85. **Wolf,M., Delgado,M.B., Jones,S.A., Dewald,B., Clark-Lewis,I., and Baggiolini,M.,** Granulocyte chemotactic protein 2 acts via both IL-8 receptors, CXCR1 and CXCR2. *Eur.J.Immunol.* 1998. **28**: 164-170.
86. **Dunican,A., Grutkoski,P., Leuenroth,S., Ayala,A., and Simms,H.H.,** Neutrophils regulate their own apoptosis via preservation of CXC receptors. *J.Surg.Res.* 2000. **90**: 32-38.
87. **Suzuki,R., Iwase,M., Miyaoka,K., Kondo,G., Watanabe,H., Ohashi,M., and Nagumo,M.,** Modulation of neutrophil apoptosis in plasma of patients after orthognathic surgery. *J.Surg.Res.* 2006. **130**: 110-118.
88. **Jones,S.A., Dewald,B., Clark-Lewis,I., and Baggiolini,M.,** Chemokine antagonists that discriminate between interleukin-8 receptors. Selective blockers of CXCR2. *J.Biol.Chem.* 1997. **272**: 16166-16169.
89. **Gaudreault,E., Thompson,C., Stankova,J., and Rola-Pleszczynski,M.,** Involvement of BLT1 endocytosis and Yes kinase activation in leukotriene B4-induced neutrophil degranulation. *J.Immunol.* 2005. **174**: 3617-3625.
90. **Murray,J., Ward,C., O'Flaherty,J.T., Dransfield,I., Haslett,C., Chilvers,E.R., and Rossi,A.G.,** Role of leukotrienes in the regulation of human granulocyte behaviour: dissociation between agonist-induced activation and retardation of apoptosis. *Br.J.Pharmacol.* 2003. **139**: 388-398.

91. **Partrick,D.A., Moore,E.E., Moore,F.A., Barnett,C.C., and Silliman,C.C.,** Lipid mediators up-regulate CD11b and prime for concordant superoxide and elastase release in human neutrophils. *J.Trauma* 1997. **43**: 297-302.
92. **Petrin,D., Turcotte,S., Gilbert,A.K., Rola-Pleszczynski,M., and Stankova,J.,** The anti-apoptotic effect of leukotriene B4 in neutrophils: a role for phosphatidylinositol 3-kinase, extracellular signal-regulated kinase and Mcl-1. *Cell Signal.* 2006. **18**: 479-487.
93. **Stankova,J., Turcotte,S., Harris,J., and Rola-Pleszczynski,M.,** Modulation of leukotriene B4 receptor-1 expression by dexamethasone: potential mechanism for enhanced neutrophil survival. *J.Immunol.* 2002. **168**: 3570-3576.

9. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Verschiedene Formen der Chronischen Granulomatose
- Tabelle 2: Humane Toll-like Rezeptoren und ihre Antigene
- Tabelle 3: Eigenschaften von IL-8-Rezeptoren
- Tabelle 4: Patientendaten-Übersicht
- Tabelle 5: Daten der Kontrollprobanden
- Tabelle 6: Genaue Patientendaten
- Tabelle 7: Standardfluoreszenzfarben nach Becton & Dickinson / Pharmingen
Research Product Catalog 2002

10. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1A: CD11b-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden
- Abbildung 1B: Histogramm der CD11b-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden
- Abbildung 2A: CD18-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden
- Abbildung 2B: Histogramm der CD18-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden
- Abbildung 3A: CD35-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden
- Abbildung 3B: Histogramm der CD35-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden
- Abbildung 4: CD18-Expression auf NG von CGD-Patienten in Korrelation mit den aufgetretenen Pneumonien pro Jahr
- Abbildung 5: CD11b-Expression auf NG von CGD-Patienten der X-chromosomalen und der autosomal-rezessiven Form
- Abbildung 6: CD11b-Expression auf NG von CGD-Patienten nach Stimulation
- Abbildung 7: CD11b-Expression auf NG von CGD-Patienten und Kontrollen nach Stimulation mit Pam3CSK4
- Abbildung 8A: TLR1-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden
- Abbildung 8B: Histogramm der TLR1-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden
- Abbildung 9A: TLR2-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden
- Abbildung 9B: Histogramm der TLR2-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden
- Abbildung 10A: TLR4 Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden
- Abbildung 10B: Histogramm der TLR4-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 11A: TLR5 Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden
- Abbildung 11B: Histogramm der TLR5-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden
- Abbildung 12A: Intrazelluläre TLR9 Expression in NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden
- Abbildung 12B: Histogramm der TLR9-Expression in NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden
- Abbildung 13: TLR 5-Expression auf NG von CGD-Patienten in Korrelation mit den aufgetretenen Lymphadenitiden pro Jahr
- Abbildung 14A: CXCR1 Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden
- Abbildung 14B: Histogramm der CXCR1-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden
- Abbildung 15A: CXCR2 Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden
- Abbildung 15B: Histogramm der CXCR2-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden
- Abbildung 16A: BLT1 Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden
- Abbildung 16B: Histogramm der BLT1-Expression auf NG von CGD-Patienten und gesunden Kontrollprobanden

Danksagung

11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Dr. med. Dominik Hartl für seine hochkompetente Betreuung.

Professor Dr. med. Uwe Wintergerst für die freundliche Überlassung dieses Themas und der Unterstützung bei der Probandenrekrutierung, sowie für die fachkundigen Hilfestellungen, wann immer Fragen auftraten.

Meinen Freunden und meiner Familie, insbesondere meiner Schwester **Anja Lehmann**, die mir durch ihre Herzengüte und Liebe in allen Lebenslagen Beistand und Trost spenden und mein Leben in jeder Hinsicht bereichern.

Meinen Mitdoktoranden **Marcus Schreiner** und **Veronica Marcos Nickol** für die gute Zusammenarbeit und die unvergesslich heiteren Teambesprechungen.

Dem Laborteam, insbesondere der MTA Stefanie Gruschka für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die technische Unterstützung.

Der AG Rudolph für die freundliche Bereitstellung des FACS-Gerätes.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Immundefekt-Ambulanz des Dr. von Haunerschen Kinderspitals für die zuverlässige Unterstützung bei der Probengewinnung.

Allen Probandinnen und Probanden, die sich für diese Studie zur Verfügung gestellt haben.

12. Lebenslauf

	Persönliche Daten
Name	Natalie Maren Lehmann
Geburtsdatum	04. März 1983
Geburtsort	Starnberg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig, keine Kinder
	Berufsleben:
Seit Januar 2009	Assistenzärztin im Fachbereich Innere Medizin, Spital Altstätten, Schweiz
	Praktisches Jahr
April 2008 bis Juli 2008	PJ im Fachbereich Pädiatrie Krankenhaus München Schwabing
Februar 2008 bis April 2008	Unterassistentin im Fachbereich Innere Medizin, Spital Wil, Schweiz
Dezember 2007 bis Februar 2008	PJ im Fachbereich Hämatonkologie, Universitätsklinikum Rechts der Isar, München
August 2007 bis Dezember 2007	PJ im Fachbereich Chirurgie, Krankenhaus München Schwabing
	Studium
Oktober 2002 bis September 2004	Studium der Humanmedizin an der Ludwigs-Maximilians- Universität München
Oktober 2004 bis November 2008	Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
November 2008	Abschluss des Studiums mit der Note 3,0
	Dissertation
seit März 2006	Forschungsarbeit zum Thema „Oberflächenrezeptoren auf

Lebenslauf

	Neutrophilen Granulozyten bei Patienten mit Chronischer Granulomatose“, Forschungslabor Kubus, Dr. von Haunersches Kinderspital, Ludwigs-Maximilians-Universität München
Februar 2008	Publikation mit dem Titel “Dysregulation of innate immune receptors on neutrophils in chronic granulomatous disease” im Journal of Allergy and Clinical Immunology
	Schulbildung
Juni 2002	nach Grund- und Gymnasialschulbesuch Abitur am Gisela-Gymnasium in München (Note 1,5)
	Praktische Erfahrungen
September 2006	Famulatur im Fachbereich Pädiatrie Kanti Children’s Hospital Kathmandu, Nepal
März 2006	Famulatur im Fachbereich Pädiatrie AKH Wien, Österreich
September 2005	Famulatur im Fachbereich Allgemeinmedizin Dr. Peter Cohn, München
August 2005	Famulatur im Fachbereich Gynäkologie und Geburtshilfe Krankenhaus München Schwabing
Februar 2005	Famulatur im Fachbereich Anästhesie Krankenhaus München Bogenhausen
	Sonstiges
Sprachkenntnisse: Englisch Französisch Latein	gut Grundkenntnisse Latinum
Praktische Tätigkeit: Januar 2003 bis Dezember 2006 seit August 2005	Aushilfskraft bei Karstadt Feinkost GmbH & Co.KG Aushilfskraft für administrative Tätigkeiten Praxis Dr. Kurt Lehmann, München
Interessen	Fitness, Lesen, Reisen, Yoga, Ski