

1 Einleitung	12
1.1 Neutrophile Granulozyten und ihre Rolle im Entzündungsgeschehen	12
1.2 Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Verankerung	18
1.2.1 Struktur und Eigenschaften des GPI-Ankers	18
1.2.2 Funktion des GPI-Ankers	20
1.3 NB1 (HNA-2a, CD177)	22
1.3.1 Phänotypische Eigenschaften	22
1.3.2 Genotypische Eigenschaften	24
1.3.3 Struktur und biochemische Eigenschaften	26
1.3.4 Funktion von NB1	28
1.3.5 Die Rolle von NB1 bei verschiedenen Erkrankungen	30
1.4 Zielsetzung der Arbeit	32
2 Material und Methoden	33
2.1 Material	33
2.1.1 Antikörper	33
2.1.2 Proteine	33
2.1.3 Zellkulturmedien	34
2.1.4 Lösungen und Puffer	34
2.1.5 Chemikalien und Reagenzien	37
2.2 Methoden	42
2.2.1 Probensammlung und Probenaufbereitung	42
2.2.1.1 Isolierung von Granulozyten aus EDTA-Blut	42
2.2.1.2 Fixierung von Granulozyten	43
2.2.1.3 Herstellung von Granulozytenlysat	43
2.2.1.4 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration von Granulozytenlysat	43
2.2.1.5 Gewinnung von Plasma	43
2.2.1.6 Kopplung des mAk 7D8 an CNBr-aktivierte Sepharose 4B	44
2.2.1.7 Isolierung von NB1 durch Immunaffinitätschromatographie	44
2.2.1.8 IgG-Aufreinigung von Plasmaproben	45
2.2.2 Phänotypische Untersuchungen	45
2.2.2.1 Quantitative Durchflusszytometrie	45
2.2.2.2 ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)	47

2.2.2.3 Erstellung einer Standardkurve zur Bestimmung der NB1-Konzentration.....	49
2.2.2.4 Depletion von Plasma-NB1 durch Sepharose 4B.....	49
2.2.2.5 Ultrazentrifugation.....	50
2.2.2.6 Phasen-Separation mit Triton X-114	50
2.2.3 Zellkulturarbeiten	51
2.2.3.1 Allgemeine Zellkulturarbeiten.....	51
2.2.3.2 Auftauen von Zellen.....	51
2.2.3.3 Einfrieren von Zellen	51
2.2.3.4 Transfektion von CHO-Zellen.....	51
2.2.3.5 Kultivierung von 7D8 Hybridomzellen.....	52
2.2.3.6 Bestimmung der Zellzahl.....	52
2.2.3.7 Zellselektion mit CELlection™ Pan Mouse IgG Kit.....	52
2.2.3.8 Isolierung von Endothelzellen aus Nabelschnüren	53
2.2.4 Proteinanalytische Methoden.....	53
2.2.4.1 Herstellung biotinmarkierten Endothelzelllysats	53
2.2.4.2 Immunpräzipitation	54
2.2.4.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
2.2.4.4 Immunoblot (Western Blot)	55
2.2.4.5 Rehybridisierung	56
2.2.4.6 Silberfärbung.....	56
2.2.4.7 Funktionelle Untersuchungen	57
A) In vitro Stimulationsexperiment.....	57
B) In vivo Stimulationsexperiment.....	57
2.2.4.8 Zellsortierung mit dem Durchflusszytometer.....	57
2.2.4.9 Quantitative Bestimmung der Burstaktivität nach Inkubation mit Anti-NB1 Ak.....	58
2.2.4.10 Adhäsionstest mit Kristall-Violett-Anfärbung	58
2.2.4.11 Adhäsionstest mit Fluoreszenzmarkierung.....	59
2.2.5 Funktionelle Untersuchungen am Durchflusszytometer	59
2.2.5.1 Funktionelle Untersuchungen an Endothelzellen	59
2.2.5.2 Funktionelle Untersuchungen an E-Selektin	60
2.3 Statistische Auswertung	60

3 Ergebnisse	61
3.1 Standardkurve	61
3.2 Etablierung des ELISA-Testsystems	63
3.3 Quantifizierung	64
3.4 Alters- bzw. geschlechtsspezifische Unterschiede	65
3.5 Heterogene Expression von NB1	66
3.5.1 Durchflusszytometrische Bestimmung der NB1-Oberflächenexpression und -Oberflächenkonzentration	66
3.5.2 Konstanz der NB1-Expression und der NB1-Oberflächenkonzentration	69
3.5.3 Alters- bzw. geschlechtsspezifische Unterschiede der NB1-Expression	72
3.5.4 Vergleich des NB1-Gesamtgehalts mit der NB1-Expression, der -Oberflächenkonzentration und der -Gesamtoberflächenmenge	75
3.6 Untersuchungen zur löslichen Form von NB1	79
3.6.1 Depletion von NB1 aus dem Plasma durch Sepharose A	79
3.6.2 Nachweis von NB1 im Plasma mittels Immunpräzipitation	80
3.6.3 Nachweis durch Ultrazentrifugation	82
3.6.4 Biochemischer Nachweis durch Triton X-114-Trennung	83
3.6.5 Quantitative Bestimmung des NB1-Plasmagehalts	84
3.6.6 Vergleich von löslichen und zellulären NB1	87
3.6.7 NB1 im Urin	89
3.7 Untersuchungen zur NB1-Expression nach Zellstimulation	89
3.7.1 In vitro Untersuchungen	90
3.7.2 In vivo Untersuchungen	92
3.7.3 NB1 defiziente Subpopulation	94
3.8 Funktionelle Untersuchungen zu NB1	95
3.8.1 Oxidativer Burst	95
3.8.2 NB1-Counterrezeptor	97
3.8.2.1 Isolierung des NB1-Proteins mittels Immunaffinitätschromatographie	97
3.8.2.2 Durchflusszytometrische Untersuchungen	98
3.8.2.3 Zell-Adhäsion	100

3.8.2.4 Immunpräzipitationsstudien mit Endothelzellen zur Detektion eines möglichen Partnermoleküls für NB1	102
3.8.2.5 Interaktionsstudien mit spezifischen Partnern	103
A) Interaktion zwischen NB1 und E-Selektin (CD62E)	103
B) Interaktion zwischen NB1 und PECAM-1 (CD31)	104
4 Diskussion.....	108
5 Zusammenfassung	120
6 Summary	121
7 Literaturverzeichnis	122
8 Anhang	134
8.1 NB1-Standardkurve.....	134
8.2 NB1-Phänotyp	135
8.3 Konstanz der NB1-Expression und NB1-Oberflächenkonzentration.....	138
8.4 NB1-Plasmagehalt.....	142
8.5 In Vitro Zellstimulation	144
9 Publikationen, Vorträge und Poster	146
10 Erklärung	147
11 Danksagung.....	148