

**PHÄNOTYP DER CHRONISCHEN GRANULOMATOSE
ASSOZIIERT MIT EINEM SCHWEREN G6PD-MANGEL IN
GRANULOZYTEN**



Theoni Petropoulou

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

Direktor: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

**PHÄNOTYP DER CHRONISCHEN GRANULOMATOSE ASSOZIIERT MIT EINEM
SCHWEREN G6PD-MANGEL IN GRANULOZYTEN**

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

vorgelegt von
Theoni Petropoulou
aus
Tripolis/Arkadien, Griechenland
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Bernd H. Belohradsky
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan K. Bohlander
Prof. Dr. med. Michael R. Speicher
Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.2008

Meiner Familie gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	ÜBERSICHT	4
2.1	Bakterizide Abwehrmechanismen der Phagozyten.....	4
2.1.1	Das Phagozytensystem - Definition	4
2.1.2	Neutrophile Granulozyten - Reifung und Struktur.....	5
2.1.3	Neutrophile Granulozyten - Funktion	6
2.2	Sauerstoffunabhängige bakterizide Aktivität	8
2.3	Sauerstoffabhängige bakterizide Aktivität	8
2.4	Das NADPH-Oxidase-System der Phagozyten	11
2.4.1	Struktur der NADPH-Oxidase.....	11
2.4.2	Aktivierung der NADPH-Oxidase.....	13
2.4.3	Klinische Bedeutung des NADPH-Oxidase-Systems.....	14
2.5	Laborbestimmung des oxidativen Metabolismus der Phagozyten	16
2.6	Defekte des oxidativen Metabolismus der Phagozyten	19
2.6.1	Die chronische Granulomatose.....	19
2.6.2	Der Myeloperoxidase (MPO)-Mangel	23
2.6.3	Defekte des Glutathionmetabolismus	25
2.6.4	Der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD)-Mangel.....	26
2.6.4.1	Der G6PD-Mangel in Leukozyten.....	34
2.6.4.2	Therapie.....	36
2.6.4.3	Labordiagnostik.....	37
3	PATIENTEN UND METHODEN	42
3.1	PATIENTEN.....	42
3.1.1	Familie H - Klinische Angaben	42
3.1.2	Familie G - Klinische Angaben	43
3.2	METHODEN	44
3.2.1	Untersuchungsmaterial	44
3.2.2	Isolierung der Zellen	44
3.2.3	Methodenbeschreibung.....	45
3.2.3.1	G6PD-Aktivitätsbestimmung	45
3.2.3.2	NBT-Test.....	45
3.2.3.3	DHR-Test	46
3.2.3.4	Superoxidanion-Produktion.....	48
3.2.3.5	Sauerstoffverbrauch	48
3.2.3.6	Bakterizidie	49
3.2.3.7	Cytochrom <i>b</i> -Expression - Spektrumanalyse.....	49
3.2.3.8	Cytochrom <i>b</i> -Expression - Nachweis mittels monoklonaler 7D5-Antikörper	50
3.2.3.9	Myeloperoxidase-Färbung.....	50

3.2.3.10	Chemotaxis unter Agarose.....	51
3.2.3.11	Lymphozytenkultur.....	51
3.2.3.12	Molekulargenetische Untersuchungen	51
3.2.3.13	Immunoblot (Westernblot)-Analyse des G6PD-Proteins	52
3.2.3.14	G6PD-Expression in einem <i>E. coli</i> -System	53
3.2.3.15	Isolierung des rekombinanten G6PD-Proteins.....	53
3.2.3.16	Bestimmung der enzymatischen Eigenschaften.....	53
4	ERGEBNISSE	54
4.1	Oxidativer Metabolismus - „oxidative burst“ - der Granulozyten.....	54
4.2	Cytochrom <i>b</i> -Expression	55
4.3	Bakterizidie	56
4.4	Myeloperoxidase-Färbung und Chemotaxis	56
4.5	G6PD-Aktivität	56
4.6	DNA-Sequenzierung des G6PD-Gens	57
4.7	DNA-Analyse der CYBB-Region	57
4.8	Expression des G6PD-Proteins in Erythrozyten und Neutrophilen.....	57
4.9	Expression des G6PD-Proteins in sich schnell vermehrenden, PHA-stimulierten Lymphozyten.....	57
4.10	Enzymatische Eigenschaften des mutierten G6PD-Proteins	58
4.11	mRNA-Stabilität des G6PD-Amsterdam	58
4.12	Familienuntersuchungen.....	59
5	DISKUSSION	68
6	ZUSAMMENFASSUNG	83
7	LITERATURVERZEICHNIS	85
8	DANK	124
9	LEBENS LAUF	125

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1: Schematische Darstellung der Funktionen neutrophiler Granulozyten
- Abb. 2: Schematische Darstellung des Metabolismus neutrophiler Granulozyten während der Phagozytose
- Abb. 3: Oxidativer Metabolismus („respiratory burst“) neutrophiler Granulozyten
- Abb. 4: NADPH-Oxidase: Struktur und Aktivierung
- Abb. 5: Pathogenese der selektiven Infektionsanfälligkeit gegenüber Katalase-positiven Mikroorganismen bei chronischer Granulomatose
- Abb. 6: Interaktionen zwischen Antibiotika und Phagozyten in Relation zu intrazellulär gelegenen Bakterien
- Abb. 7: Weltatlas: Prävalenz des G6PD-Mangels
- Abb. 8: X-Chromosom: Lokalisation der identifizierten Gene
- Abb. 9: X-Inaktivierung: schematische Darstellung
- Abb. 10: NBT-Test: mikroskopische Befunde bei der Familie H und bei einem Patienten mit X91⁻ CGD
- Abb. 11: DHR-Test: durchflußzytometrische Befunde bei der Familie H
- Abb. 12: Expression des Cytochrom *b* mittels 7D5-Antikörper: durchflußzytometrische Befunde
- Abb. 13: Cytochrom *b*-Spektrum
- Abb. 14: Sequenzierung von DNA und cDNA
- Abb. 15: Westernblot: G6PD-Proteinnachweis a. in Erythrozyten und Granulozyten und b. in sich schnell vermehrenden, PHA-stimulierten Lymphozyten
- Abb. 16: Thermostabilität des mutierten Proteins im Vergleich zum Wildtyp-Protein
- Abb. 17: Stammbäume der Familien H und G
- Abb. 18: DHR-Test: durchflußzytometrische Befunde bei einem Patienten mit X91⁻ CGD und seiner heterozygot betroffenen Mutter

TABELLENVERZEICHNIS

- Tab. 1: Molekulargenetische Klassifikation der chronischen Granulomatose
- Tab. 2: Klinische Manifestationen des G6PD-Mangels
- Tab. 3: G6PD-Mangel in anderen Zellen als Erythrozyten
- Tab. 4: Erregerspektrum für schwere Infektionen bei dem schweren G6PD-Mangel in Granulozyten
- Tab. 5: Übersicht publizierter Patienten mit schwerem G6PD-Mangel und Granulozytendysfunktion: klinische Angaben
- Tab. 6: Übersicht publizierter Patienten mit schwerem G6PD-Mangel und Granulozytendysfunktion: laborchemischer Phänotyp, klinischer Phänotyp und Genetik
- Tab. 7: Übersicht publizierter Patienten mit schwerem G6PD-Mangel und Granulozytendysfunktion: Neutrophilenfunktion
- Tab. 8: Auflistung der verwendeten Primer für die PCR-Amplifikation und die DNA-Sequenzierung
- Tab. 9: NBT-Test: Ergebnisse in der Familie H
- Tab. 10: DHR-Test: Ergebnisse in der Familie H
- Tab. 11: Messung der O_2^- -Produktion: Ergebnisse in der Familie H
- Tab. 12: Sauerstoffverbrauch: Ergebnisse in den Familien H und G
- Tab. 13: Cytochrom *b*-Expression: Ergebnisse in der Familie H
- Tab. 14: G6PD-Aktivität in Erythrozyten und Granulozyten in den Familien H und G
- Tab. 15: Biochemische Charakteristika von rekombinantem G6PD-Amsterdam
- Tab. 16: Sekundärstrukturvorhersage des G6PD-Amsterdam

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

cDNA	complementary DNA
CGD	Chronic G ranulomatous D isease
CNSHA	Chronic N onspherocytic H emolytic A nemia
DCF	2'7'- D ichlorofluorescein
DCFH	2'7'- D ichlorofluorescin
DHR-123	D ihydrorhodamin-123
DMF	d imethylformamide
DMSO	d imethylsulfoxide
DNA	d eoxyribonucleic acid
EB	E thidium b romid
EDTA	ethylene d iamine t etra- a cetate
FACS	fluorescence- a ctivated cell sorting
FAD	flavin a denine d inucleotide
fMLP	formyl- m ethionyl- l eucyl- p hanylalanine
G6PD	G lucose- 6 - P hospat D ehydrogenase
GOL	G lucose- O xidase-haltige L iposomen
gp	glycosylated p rotein
GSH	reduziertes Glutathion
GT	G lutathion
HBSS	H ank's b alanced salts solution
HE	H ydroethidium
K_i	Hemmkonstante
K_m	Michaelis-Konstante
MIM	M endelian I nheritance in M an
MPO	M yeloperoxidase
mRNA	messenger ribonucleic acid
NADP	N ikotinamid- A denin- D inukleotid- P hospat
NADPH	reduziertes NADP
NBT	n itroblue t etrazolium
p	p rotein
PCR	p olymerase c hain r eaction

PBS	phosphate-buffered saline
PHA	Phytohaemagglutinin
<i>phox</i>	phagocyte oxidase
PMA	phorbol myristate acetate
PMN	polymorphonuclear leukocytes
RBC	red blood cells
RH-123	Rhodamin-123
ROS	reactive oxygen species
SDS	sodium dodecyl sulfate
SNARF-1/AM	carboxy-seminaphthorhodafluor-1 acetoxymethyl ester
TMP/SMX	Trimethoprim/Sulfamethoxazol
WBC	white blood cells
WHO	World Health Organization

1 EINLEITUNG

Der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD)-Mangel (Mendelian Inheritance in Man, MIM 305900) ist der häufigste genetisch determinierte Enzymdefekt des Menschen mit klinischer Bedeutung (Beutler 1994; Luzzatto et al. 2001). Man rechnet mit 400 Millionen Merkmalsträgern weltweit (Luzzatto et al. 2001). G6PD katalysiert im Hexosemonophosphat-Shunt die Konversion von Glucose-6-Phosphat zu 6-Phosphogluconolakton bei gleichzeitiger Reduktion von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP) zu NADPH. Die physiologische Bedeutung des Enzyms liegt in der Regeneration von NADPH und der Reduktion von Glutathion. NADPH ist notwendig für zahlreiche biosynthetische Reaktionen sowie für die Stabilität von Katalase und die permanente Reduktion von Glutathion. Katalase und reduziertes Glutathion schützen die Zellen vor Oxidationsprozessen (Peroxide). Mitochondrienfreie Zellen wie Erythrozyten, bei denen andere NADPH-produzierende Enzyme fehlen, sind bei einem G6PD-Mangel besonders empfindlich gegenüber oxidativen Prozessen.

G6PD weist eine breite genetische Heterogenität auf. Das kodierende Gen ist auf dem X-Chromosom (Xq28) lokalisiert. Symptomatisch werden daher die hemizygoten Männer und homozygoten Frauen sowie heterozygote Frauen mit einer extremen Lyonisierung und Expression des mutierten G6PD-Allels bei der Mehrzahl der Zellen.

Obwohl G6PD in allen Zellen vorhanden ist (Luzzatto & Battistuzzi 1985) und das kodierende Gen in allen Geweben das gleiche ist, sind bei einem Enzymmangel primär die Erythrozyten betroffen. Die häufigste klinische Manifestation des Defektes in den Erythrozyten ist die akute hämolytische Anämie. Sie kann unter dem Einfluß zahlreicher chemischer Substanzen, wie z.B. Arzneimitteln, nach dem Genuß von Favabohnen oder im Verlauf von Infektionen ausgelöst werden. Die klinische Ausprägung des Defektes variiert zwischen der asymptomatischen Form (World Health Organization - WHO Klasse IV-Defekt) bis hin zu einer chronischen nichtsphärozytären hämolytischen Anämie mit Episoden von schwerer Hämolyse bei Exposition gegenüber Risikofaktoren (WHO Klasse I-Defekt).

Ein ausgeprägter Enzymmangel in den Leukozyten ist in Relation zu der Häufigkeit des Defektes äußerst selten und kann mit einer abnormen Granulozytenfunktion assoziiert sein. Patienten mit diesem Defekt zeigen neben der Hämolyse pathologisch niedrige Aktivität des „oxidative burst“ der Phagozyten. Es treten ähnlich der chronischen Granulomatose (CGD), ein primärer

Defekt des oxidativen Metabolismus der Phagozyten, rezidivierende bakterielle und mykotische Infektionen auf.

Mit dem Begriff „oxidative burst“ wird die Produktion von Superoxidanion (O_2^-) und weiterer reaktiver Sauerstoffmetaboliten (OH^\cdot , $HOCl$, H_2O_2) in phagozytierenden Zellen bezeichnet, die für die Abtötung der aufgenommenen Mikroorganismen notwendig sind. Initial wird Superoxidanion aus molekularem Sauerstoff gebildet. Diese Reaktion wird durch ein komplexes Enzymsystem - die NADPH-Oxidase - katalysiert, wobei der Hexosomonophosphat-Shunt hierfür die Elektronen zur Verfügung stellt.

Die Unfähigkeit der phagozytierenden Zellen O_2^- zu bilden, tritt bei der chronischen Granulomatose und selten bei dem schweren G6PD-Mangel in Leukozyten bzw. Granulozyten auf. Obwohl beide Defekte klinisch und metabolisch phänotypische Ähnlichkeiten aufweisen, handelt es sich um zwei verschiedene Krankheitseinheiten. Die chronische Granulomatose ist durch einen Defekt in einer der Komponenten der NADPH-Oxidase charakterisiert. Bei dem schweren G6PD-Mangel in Granulozyten liegt der Defekt nicht innerhalb der NADPH-Oxidase selbst, sondern an der eingeschränkten Bildung von NADPH, dem Elektronendonator im Oxidase-System, zuständig für die Produktion von Superoxidanion aus molekularem Sauerstoff. Bei allen beschriebenen Patienten lag die G6PD-Aktivität in den Leukozyten bzw. Granulozyten unter 5% des Normalwertes. Wegen der phänotypischen Ähnlichkeiten mit der chronischen Granulomatose wird diese Form des G6PD-Mangels auch „CGD like syndrome“ (Dinauer 1998) genannt. Der G6PD-Mangel in Neutrophilen wird nach der IUIS-Klassifikation primärer Immundefekte zu den kongenitalen Defekten der Phagozytenfunktion mit defekter Bakterizidie durch mangelhafte O_2^- -Produktion gezählt [International Union of Immunological Societies (IUIS) Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee] (Notarangelo et al. 2006).

Obwohl der G6PD-Mangel häufig auftritt, wurde die mit „CGD like disease“ assoziierte Form bisher weltweit nur bei wenigen Patienten beschrieben [10 Fälle zwischen 1972 und 1987 (Cooper et al. 1972; Baehner et al. 1972; Gray et al. 1973; Kahn et al. 1973; Vives Corrons et al. 1982; Mamlok et al. 1985, 1987), 2 weitere Fälle im Jahr 1999 (Roos et al. 1999) und im Jahr 2002 (Costa et al. 2002) und die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen 4 Patienten (van Bruggen et al. 2002)]. Eine molekulargenetische Charakterisierung des Defektes erfolgte bis jetzt, außer bei den hier beschriebenen Fällen, nur bei einer Patientin (Roos et al. 1999). Es ist mit undiagnostizierten Fällen zu rechnen, da die G6PD-Aktivität in den Leukozyten sowie die Granulozytenfunktion bei der Diagnostik des G6PD-Mangels routinemäßig nicht erfaßt werden. Wolach et al. (2004) berichteten über weitere Patienten mit einer G6PD-Aktivität $<5\%$ in den

Neutrophilen und dem laborchemischen CGD-Phänotyp, die innerhalb einer Studie der Granulozytenfunktion beim G6PD-Mangel in Israel identifiziert wurden, jedoch ohne Infektionsanfälligkeit.

Die klinische Bedeutung dieser Form des G6PD-Mangels liegt wie bei der CGD im erhöhten Infektionsrisiko vorwiegend durch Katalase-positive Bakterien und Pilze. Die Prognose ist aufgrund der kleinen Zahl der berichteten Fällen unklar, aber wahrscheinlich ähnlich der CGD ungünstig. Infektionen mit tödlichem Verlauf sind bereits beschrieben (Cooper et al. 1972; Mamlouk et al. 1985, 1987). Es ergibt sich die Frage, ob eine antimikrobielle und eventuell auch eine antimykotische Prophylaxe wie bei der CGD indiziert ist. Diesbezüglich liegen keine Daten bzw. Studien vor.

In der vorliegenden Arbeit werden die klinischen, biochemischen, immunologischen und molekulargenetischen Befunde von 4 Patienten aus 2 verschiedenen Familien mit einem schweren G6PD-Mangel in Erythrozyten und Granulozyten und dem CGD-Phänotyp präsentiert und mit Daten von bekannten Fällen aus der Literatur verglichen. In beiden Familien wurde eine Deletion von 3 Nukleotiden in Position 180-182 des G6PD-Gens identifiziert, die ein Fehlen von Leucin in Position 61 zur Folge hatte. Die molekularbiologischen Charakteristika des mutierten Enzyms und die Korrelation mit dem Phänotyp des Defektes werden dargestellt. Es handelt sich um eine erstmals beschriebene G6PD-Variante, die G6PD-Amsterdam genannt wurde. Interessanterweise variiert die klinische Ausprägung des gleich schweren und molekulargenetisch identischen Enzymdefektes bei den 4 Patienten zwischen der asymptomatischen Form und der typischen Symptomatik des Defektes in Erythrozyten und Phagozyten. Der Erythrozytendefekt ist durch eine milde kompensierte chronische nichtsphärozytäre hämolytische Anämie (chronic nonspherocytic hemolytic anemia, CNSHA) in Kombination mit akuten hämolytischen Krisen charakterisiert. Erstaunlicherweise weisen nur 2 von den 4 Patienten klinische Symptome des Granulozytendefektes mit schweren, lebensbedrohlichen Infektionen auf.

Die molekulargenetischen Ergebnisse sind in der Zwischenzeit publiziert (van Bruggen et al. 2002).

2 ÜBERSICHT

2.1 Bakterizide Abwehrmechanismen der Phagozyten

2.1.1 Das Phagozytensystem - Definition

Elias Metschnikoff (Ilja Iljitsch Metschnikow, russischer Zoologe, 1845-1916) entdeckte Ende des 19. Jahrhunderts die Phagozytose und lieferte durch seine experimentellen Beobachtungen die Basis des Verständnisses der Phagozytenfunktionen. Er berichtete 1883 (Metschnikoff 1883) über „wandernde Mesodermzellen“ in Metazoen mit der Fähigkeit injizierte Fremdpartikeln aufzunehmen. Bei der Beobachtung des Lebens der beweglichen Zellen einer durchsichtigen Seesternlarve kam ihm der Gedanke, daß die gleichen Zellen dem Organismus bei seinem Kampf gegen schädliche Eindringlinge nützen müßten. Er steckte einen Dorn in eine Larve, um zu sehen, ob dieser von den beweglichen Zellen umflossen und verdaut würde. Sein vollkommen geglückter Versuch stellte das Fundament für seine Phagozytentheorie dar, die er während der folgenden Jahre seines Lebens entwickelte (Zeiss 1932) und welche heute noch weitgehend gilt. Nach Metschnikoffs Theorie (Metschnikoff 1901) schützt sich der Makroorganismus gegen eindringende Mikroorganismen durch Fresszellen, die Phagozyten [nach dem griechischen Verb phagein (φαγεῖν) für fressen] genannt wurden. Als Anerkennung seiner Arbeit über die Immunität erhielt er 1908 zusammen mit Paul Ehrlich den Nobelpreis für Medizin und Physiologie.

Das Phagozytensystem ist für die zelluläre Abwehrantwort der natürlichen (unspezifischen) Immunität verantwortlich. Es wird traditionell in zwei Zellgruppen geteilt: in die polymorphkernigen Leukozyten oder Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile, Basophile) und die mononukleären Phagozyten (Monozyten, Makrophagen) (Dinauer 1998; Lydyard & Grossi 2001). Granulozyten werden nach der Anfärbbarkeit ihrer spezifischen Granula mit optischen Färbemethoden in Neutrophile, Eosinophile und Basophile unterteilt (Lydyard & Grossi 2001). Die Phagozyten sind hämopoetische Zellen der myeloischen Reihe. Sie entstehen im Knochenmark nach Differenzierung (Proliferation und Reifung) aus den Knochenmark-Progenitorzellen unter dem Einfluß von CSFs (colony stimulating factors) (Sieff 1987; Lieschke & Burgess 1992; Metcalf 1989; Babior & Golde 2001). Ihre Hauptaufgabe ist es, unbelebte oder belebte Fremdpartikeln - vor allem Mikroorganismen - aufzunehmen, intrazellulär abzutöten und zu verdauen. Weitere Funktionen betreffen die Synthese und Sekretion von Zytokinen und anderer zellulärer Mediatoren sowie die Beseitigung von apoptotischen Zellen und partikulären Fremdstoffen (Debris). Das Phagozytensystem spielt außerdem eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Inflammation.

on und bei Autoimmunmechanismen. Seine Rolle wird sowohl durch die eigene Aktivität als auch durch Verbindungen zu anderen Immunmechanismen erfüllt. Die durch Lymphozyten vermittelte spezifische Immunität hängt beispielsweise auch von der einwandfreien Funktion der Phagozyten ab.

Zu den Zellen mit phagozytischer Aktivität werden die neutrophilen Granulozyten, die Monozyten des peripheren Blutes und die sich aus ihnen differenzierenden gewebeständigen Makrophagen gezählt (Male 2001). Eosinophile und basophile Granulozyten sind vorwiegend bei inflammatorischen und allergischen Prozessen involviert. Eosinophile Granulozyten weisen phagozytische und bakterizide Mechanismen auf (Lydyard & Grossi 2001; Shurin 1988; Levy 2000) und spielen bei der Beseitigung von Parasiten eine wichtige Rolle.

Im folgenden wird ausschließlich die Funktion der neutrophilen Granulozyten behandelt, da diese Zellen bei akuten Entzündungen als primäre Effektorzellen im Vordergrund stehen. Dies entspricht auch ihrem mengemäßigen Überwiegen im peripheren Blut. Sie stellen über 90% der zirkulierenden Granulozyten und 60-70% der Leukozyten bei Erwachsenen dar.

2.1.2 Neutrophile Granulozyten - Reifung und Struktur

Die Neutrophilen sind kurzlebige Endzellen. Sie verlassen das Knochenmark nach einem Reifungsprozess von 1 bis 2 Wochen (Cartwright et al. 1964; Cronkite & Flidner 1964; Warner & Athens 1964; Cartwright et al. 1965; Dancy et al. 1976; Cronkite 1979), kreisen einige Stunden [Mittelwert (mean) $T_{1/2}$ 6.6 ± 1.4 h, Variationsbreite (range) 4-9 h] in der Blutbahn (Mauer et al. 1960; Athens et al. 1961) und dringen dann in das Gewebe ein (Lunge, oropharyngealer Raum, Gastrointestinaltrakt, Leber, Milz) (Osgood 1954; Babior & Golde 2001). Sie werden durch Verlust über die Mucosa (Flidner et al. 1964a) oder durch Apoptose und anschließende Aufnahme durch Makrophagen eliminiert (Savill et al. 1989; Colotta et al. 1992; Fadok et al. 1992; Squier et al. 1995). Bei einer Infektion werden die Granulozyten in kurzer Zeit aus dem Knochenmark mobilisiert und treffen schnell am Entzündungsort ein (Flidner et al. 1964b), wo sie nach Aufnahme und intrazellulärer Abtötung der Mikroorganismen zugrunde gehen. Die Überlebenszeit der neutrophilen Granulozyten am Infektionsort beträgt ca. 2 Tage (Buescher & Galin 1982).

Wie bereits der Name sagt, enthalten reife Formen gewöhnlich einen gelappten Kern (Segmentkern) und viele zytoplasmatische Granula und Vesikeln (Bainton 2001; Lydyard & Grossi 2001). Diese stellen Speicherorganellen für Zelloberflächenrezeptoren sowie für Enzyme und

Proteine dar. Sie werden in primäre bzw. azurophile, sekundäre bzw. spezifische, tertiäre bzw. gelatinase Granula und sekretorische Vesikeln unterteilt (Borregaard et al. 1993).

Neutrophile Granulozyten sind hochspezialisierte Phagozyten mit der Hauptaufgabe des Abtötens und Verdauens pathogener Mikroorganismen sowie der Ingestion partikulärer Fremdstoffe. Ihre Abwehrleistung hängt von ihrer Absolutzahl und ihrer Funktion ab.

2.1.3 Neutrophile Granulozyten - Funktion

Die Neutrophilen, die im Blut kreisen, sind Bereitschaftszellen des Phagozytensystems, die sich beim Gesunden im wesentlichen passiv verhalten. Die meisten gehen zugrunde, ohne ihre Funktion ausgeübt zu haben. Sie können auf spezifische Reize hin die Blutbahn verlassen und zum Ort der Infektion bzw. Entzündung gelangen, wo sie mikrobielle Erreger und makromolekulare Fremdstoffe phagozytieren. Die Rekrutierung der Neutrophilen aus dem Blutstrom ist eine wesentliche Bedingung dieser gezielten Infektionsabwehr sowie der Entzündungsreaktion.

Das Eindringen eines infektiösen Erregers in das Körpergewebe führt zur Auslösung der Entzündungsmechanismen und zur Mobilisierung und Aktivierung der Neutrophilen. Nach ihrer Aktivierung wandern die Neutrophilen von chemotaktischen Stimuli angelockt in das Entzündungsgebiet, wo sie ihre weitere Funktion durch Anheftung, Endozytose und nachfolgende Zerstörung der aufgenommenen Partikeln entfalten (Klebanoff & Clark 1978) (Abb. 1).

Die Phagozyten sind bei entsprechender Stimulation nach Reorganisation ihres „Zytoskeletts“ bewegungsfähig (Valerius et al. 1981; Howard & Watts 1994). Diese Eigenschaft wird in die spontane oder zufällige Motilität (Chemokinesis) und die gerichtete Motilität (Chemotaxis) unterteilt.

Chemotaxis ist der Vorgang, durch den die Phagozyten zu Entzündungsherden hingezogen werden. Chemotaktische Faktoren, die am Entzündungsort freigesetzt werden, bedingen die gerichtete Wanderung. Sie diffundieren zu den angrenzenden Kapillaren und bewirken die Anheftung der vorbeikommenden Neutrophilen an das Endothel (Adhärenz). Die Neutrophilen lockern die Basalmembran auf, indem sie Pseudopodien in die Verbindungsbereiche zwischen den Endothelzellen schieben, die auseinandergedrängt aber nicht geschädigt werden und so verlassen sie das Blutgefäß. Dieses Phänomen heißt Diapedese. Entlang des Konzentrationsgradienten der chemotaktischen Peptide wandern die Zellen dann zum Entzündungsort. Dort erfolgt nach dem Kontakt der Neutrophilen mit den Partikeln die intrazelluläre Aufnahme, die sogenannte Phagozytose.

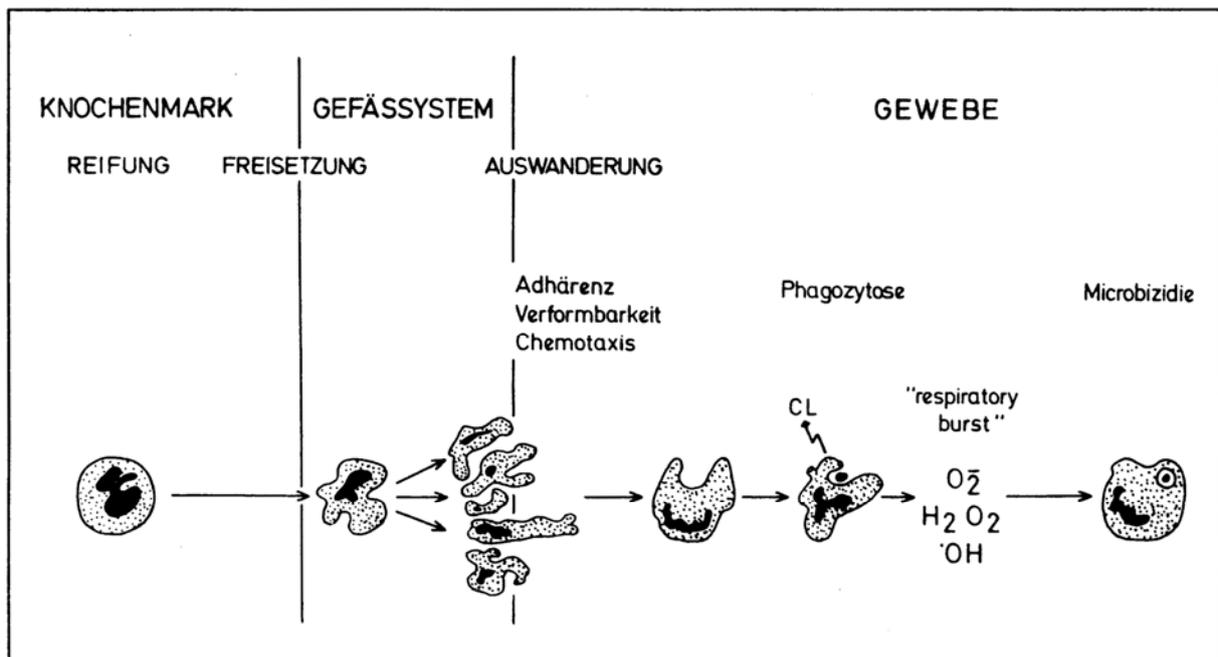


Abb. 1: Schematische Darstellung der Funktionen neutrophiler Granulozyten (Gahr et al. 1989)

Nach der Anlagerung beginnen die Phagozyten Pseudopodien um den Mikroorganismus herum auszubilden. Diese fließen zusammen und der Mikroorganismus wird schließlich in einem Vesikel, welches als Phagosom oder Endosom bezeichnet wird, eingeschlossen. Die Ingestion von Mikroorganismen und partikulären Fremdstoffen wird durch unterschiedliche Makromoleküle, den sogenannten Opsoninen, erleichtert. Die Aufnahme von Antigenen kann durch Makropinozytose, rezeptorvermittelte Endozytose oder Phagozytose erfolgen.

Durch den Kontakt des Mikroorganismus mit der Zelloberfläche wird eine Reihe mikrobizider Effektormechanismen ausgelöst, die zur Abtötung und Verdauung der eingeschlossenen Mikroorganismen (Bakterizidie) führen. Diese Mechanismen werden in sauerstoffunabhängige und sauerstoffabhängige Systeme unterteilt (Spitznagel 1977; Klebanoff 1975; Klebanoff & Clark 1978). Eine effektive Bakterizidie erfolgt durch die Wirkung beider Systeme, wobei die einzelne Bedeutung dieser Mechanismen von der Art des aufgenommenen Pathogens abhängt (Ganz 1999; Jones & Amirault 1990; Weiss et al. 1982; Weiss et al. 1985; Kaplan et al. 1968; Reeves et al. 2002).

2.2 Sauerstoffunabhängige bakterizide Aktivität

Die in den präformierten zytoplasmatischen Granula und sekretorischen Vesikeln gespeicherten Komponenten sind für die sauerstoffunabhängigen Abwehrmechanismen gegenüber verschiedenen Erregern wichtig (für Übersicht: Dinauer 1998; Klebanoff 1975; Spitznagel 1977; Klebanoff & Clark 1978; Spitznagel & Shafer 1985; Lehrer et al. 1988; Ganz 1999; Boxer & Smolen 1988; Levy 2000). Diese nicht oxidativen Mechanismen ermöglichen in Kooperation mit den oxidativen Abwehrsystemen eine erfolgreiche Bakterienabtötung, wobei bei Hypoxie und Azidose am Infektionsherd ihre Bedeutung im Vordergrund steht (Dinauer 1998).

Während der Phagozytose fusionieren die präformierten zytoplasmatischen Granula mit dem Phagosom und entleeren ihren Inhalt an toxischen und verdauungsfähigen Komponenten (kationische Proteine, Defensine, Hydrolasen, Laktoferrin und Lysozym) in das gebildete Phagolysosom. Dieses Phänomen ist morphologisch durch die Degranulation des Zytoplasmas erkennbar. Die im Phagolysosom freigesetzten Komponenten führen zusammen mit den gebildeten Sauerstoffmetaboliten zu der Beseitigung des aufgenommenen Mikroorganismus.

Die in den azurophilen Granula lokalisierte Myeloperoxidase (Borregaard et al. 1993) bildet in Anwesenheit von produziertem H_2O_2 und einem Halogenid ein potenziert bakterizides System, das die Aktivität der oxidativen Abtötungsmechanismen verstärkt (Ganz 1999; Klebanoff 1999; Nauseef 1990; Gerber 1996; Hampton et al. 1998; Klebanoff & Hamon 1972; Klebanoff & Clark 1978). Die Aktivierung von Proteasen durch Kalium-Ionen-Flux in Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffmetaboliten stellen einen weiteren Abtötungsmechanismus dar (Reeves et al. 2002).

2.3 Sauerstoffabhängige bakterizide Aktivität

Die Systeme der oxidativen Abtötungsmechanismen sind in der Membran und im Zytosol der Phagozyten lokalisiert (Roos et al. 1983) und werden durch die Phagozytose oder bei Permeabilisierung der Zellmembran aktiviert. So wird die oxidative Reaktion der Phagozyten (der sogenannte „respiratory burst“ oder „oxidative burst“) ausgelöst, die zur Bildung reaktiver bakterizider Sauerstoffmetaboliten innerhalb des gebildeten Phagosoms führt (für Übersicht: Klebanoff 1975; Klebanoff & Clark 1978; Babior 1978a, 1978b; Clark 1990; Roos 1991; Hampton et al. 1998; Babior 1999; Babior et al. 2002).

Diese Reaktion ist sowohl mit einem erheblichen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs (oft bis auf das 100fache) (Cutnutte & Tauber 1983) als auch mit der Aktivierung des Hexosemo-

nophosphat-Shunts (Sbarra & Karnovsky 1959; Iyer et al. 1961; Babior 1978a) verbunden. Der Anstieg des Sauerstoffverbrauchs während der Phagozytose ist seit 1933 bekannt (Baldrige & Gerard 1933) und wurde zuerst auf den erhöhten Energiemetabolismus zurückgeführt. Sbarra & Karnovsky (1959) zeigten, daß dieses Phänomen mit der Phagozytose und nicht mit der mitochondrialen Respiration zusammenhängt. Iyer et al. (1961) identifizierten die Produktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in aktivierten Neutrophilen als Produkt des Sauerstoffverbrauchs und stellten den Zusammenhang des Wasserstoffperoxids zu der Bakterienabtötung fest. Erst innerhalb des Studiums der chronischen Granulomatose wurde die Bedeutung der Sauerstoffradikalbildung für die intrazelluläre Abtötung deutlich. Bei Neutrophilen von Patienten mit chronischer Granulomatose wurde eine abnorme *in vitro* Bakterizidie (Quie et al. 1967) bei fehlender „respiratory burst“-Antwort nach Aufnahme von Bakterien entdeckt (Holmes et al. 1967). Später wurde das Superoxidanion (O_2^-) als das initial gebildete Produkt und als Vorläufer von anderen bakteriziden Sauerstoffmetaboliten identifiziert (Babior et al. 1973) und es wurde gezeigt, daß bei aktivierten Neutrophilen von CGD-Patienten die Superoxidanion-Produktion fehlte (Curnutte et al. 1974). In zahlreichen nachfolgenden Studien wurde die Funktion sowie die molekulargenetische Grundlage dieses Systems charakterisiert (für Übersicht: Cheson et al. 1977; Babior 1978a, 1978b; Babior 1999; Clark 1990; Roos 1991).

Das Schlüsselenzym für die Reaktion ist die NADPH-Oxidase oder -Oxidoreduktase der Phagozyten, welche die Ein-Elektronenreduktion von molekularem Sauerstoff zu Superoxidanion unter Verwendung von NADPH (reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) als Elektronendonator katalysiert (Cross et al. 1985). Der Hexosemonophosphat-Shunt stellt hierfür durch Bereitstellung von NADPH die Elektronen zur Verfügung (Abb. 2 und 3).

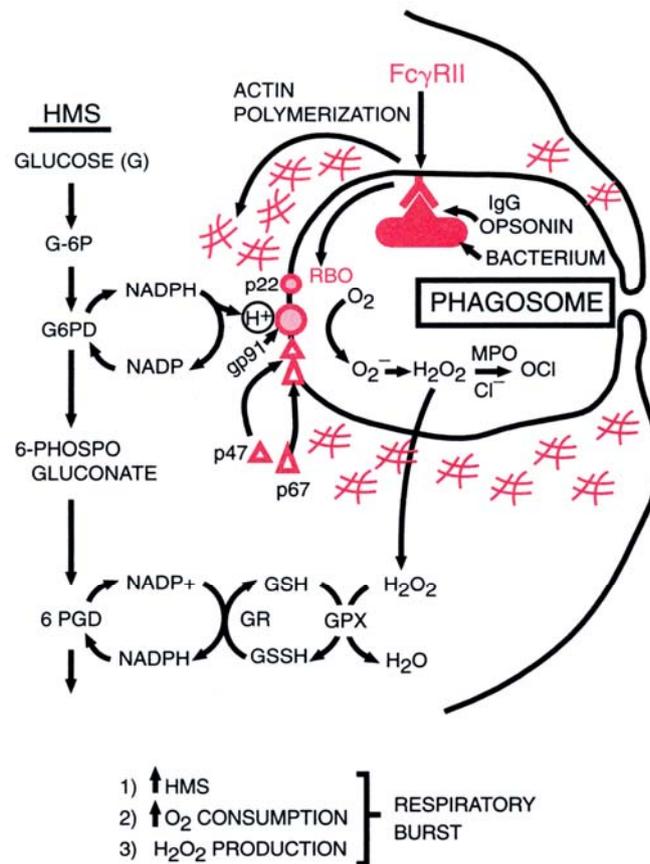


Abb. 2: Schematische Darstellung des Metabolismus neutrophiler Granulozyten während der Phagozytose (Paraskevas 1999)

NADPH stammt aus dem Pentosephosphatzyklus und zu einem geringeren Teil aus der Reduktion von Glutathion durch die Glutathionreduktase. NADPH entsteht im Zytosol und reagiert mit der Oxidase auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran. Sauerstoff reagiert dagegen auf der Gegenseite, womit Superoxidanion in das Lumen des Phagosoms abgegeben wird, wo es seine bakterizide Wirkung ausübt.

Im Zytosol befinden sich Enzyme, die Superoxidanion und Wasserstoffperoxid zu Wasser inaktivieren. Diese Enzyme sind die Superoxid-Dismutase, die Katalase und die Glutathion-Peroxidase (siehe Abbildung 3).

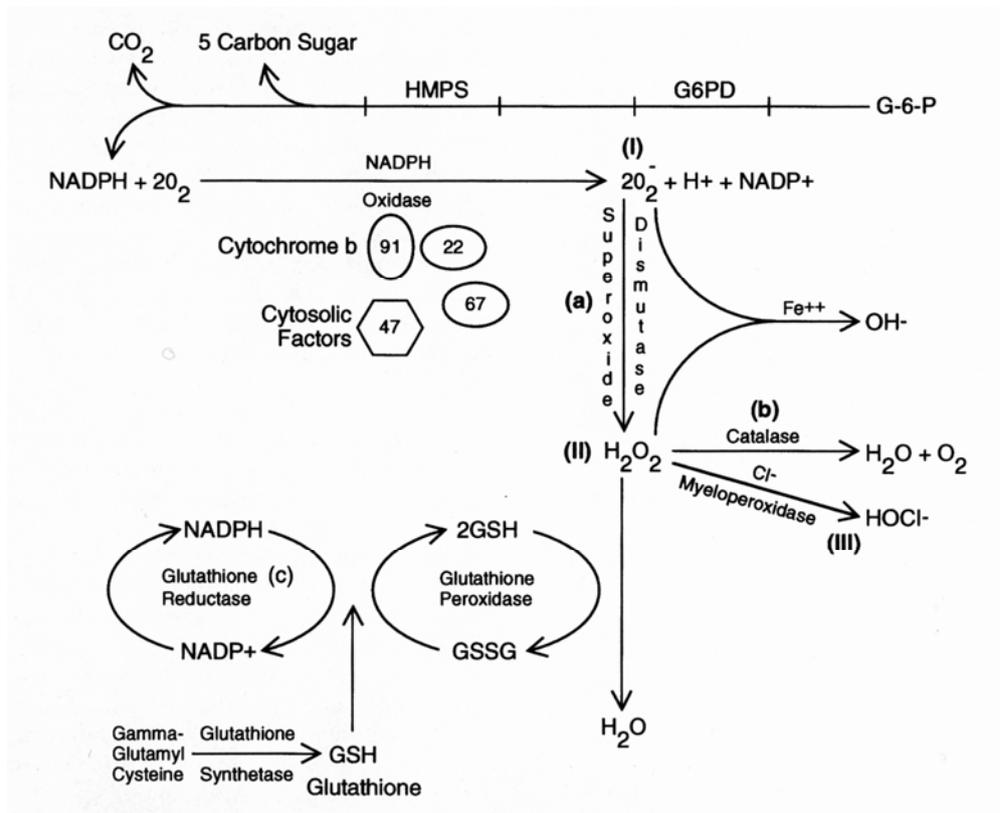


Abb. 3: Oxidativer Metabolismus („respiratory burst“) neutrophiler Granulozyten (Yang & Hill 1991)

2.4. Das NADPH-Oxidase-System der Phagozyten

2.4.1 Struktur der NADPH-Oxidase

Die NADPH-Oxidase der Phagozyten (für Übersicht: Babior 1999; Babior et al. 2002) ist ein multikomponentes Enzymsystem bestehend aus membranständigen und zytoplasmatischen Untereinheiten, die sich erst nach Stimulation der Zelle zu einem aktiven Komplex zusammenlagern (Abb. 4). Das funktionelle Zentrum der NADPH-Oxidase ist das membrangebundene Cytochrom *b*, ein heterodimeres Flavohämprotein (Babior 1999), das in phagozytierenden Zellen (Neutrophilen, Eosinophilen, Monozyten und Makrophagen) vorhanden ist (Segal et al. 1981). Segal und Mitarbeiter identifizierten Cytochrom *b* in menschlichen Neutrophilen (Segal & Jones 1978; Segal & Jones 1979) und nannten es Cytochrom *b*₂₄₅ (Cross et al. 1981) aufgrund des außergewöhnlich niedrigen Redoxpotentials (-245mV bei pH 7.0) für ein *b*-Typ Cytochrom. Entsprechend seiner spektralen und strukturellen Eigenschaften wird es auch als Cytochrom *b*₅₅₈ (für „ α -peak“ im Lichtabsorptionsspektrum bei 558nm) (Lutter et al. 1985) oder Flavocytochrom *b* bezeichnet. Cytochrom *b* ist bei der Mehrzahl der Patienten mit chronischer Granuloma-

tose spektrophotometrisch nicht nachweisbar (Segal et al. 1983). Als heterodimeres Transmembranprotein besteht es aus zwei Untereinheiten (Verhoeven et al. 1989; Segal 1987; Parkos et al. 1987; Parkos et al. 1988): der β -Kette, ein 91 kDa schweres Glykoprotein (gp91*phox*, *phox* für *phagocyte oxidase*) und der α -Kette, ein 22 kDa schweres Protein (p22*phox*). Mit dem Cytochrom *b* sind zwei Moleküle Häm (Cross et al. 1995), ein FAD (flavin adenine dinucleotide) (Cross et al. 1982; Segal et al. 1992) sowie ein niedrigmolekulares Guaninnukleotid-bindendes G Protein (Rap 1 A) pro Heterodimer assoziiert. Das Cytochrom *b* besitzt außerdem eine Bindungsstelle für NADPH (Segal et al. 1992).

Zu den zyttoplasmatischen Untereinheiten des NADPH-Oxidase Komplexes werden ein 47 kDa (p47*phox*), ein 67 kDa (p67*phox*) und ein 40 kDa (p40*phox*) schweres Protein gezählt. Ein weiteres zyttoplasmatisches, niedrigmolekulares Guaninnukleotid-bindendes G Protein (Rac) (in Neutrophilen sind Rac 1 und Rac 2 Subtypen bekannt) ist in die Aktivierung des Enzymsystems involviert (Knaus et al. 1991; Kwong et al. 1993; Heyworth et al. 1994; Dusi et al. 1995).

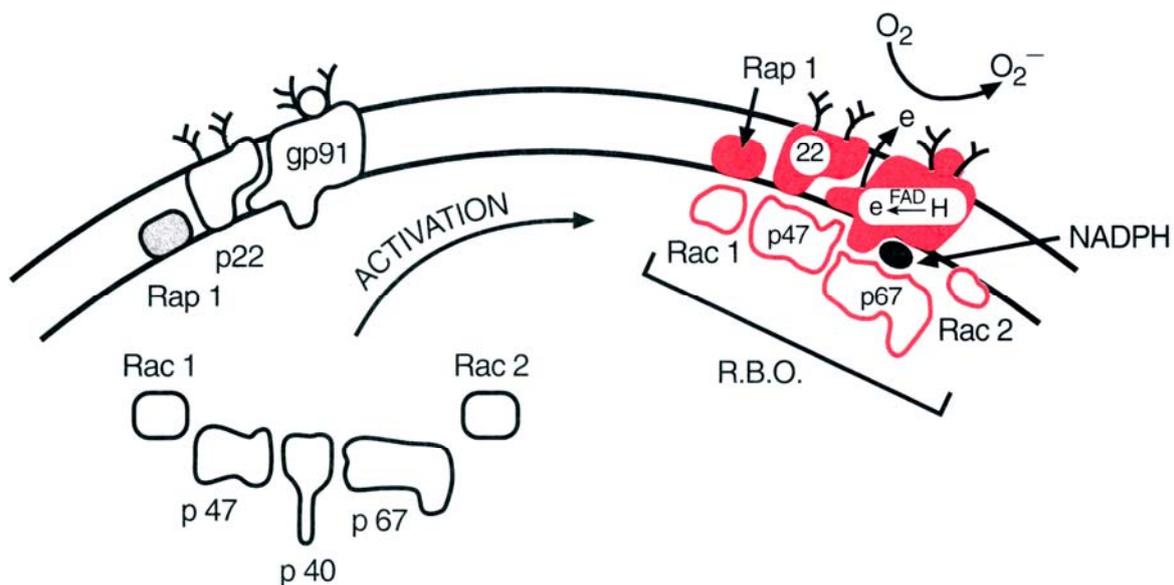


Abb. 4: NADPH-Oxidase: Struktur und Aktivierung (Paraskevas 1999)

2.4.2 Aktivierung der NADPH-Oxidase

Die Phagozyten-Oxidase kann durch eine Vielzahl partikulärer sowie löslicher Stimulanzien aktiviert werden (Repine et al. 1974a, 1974b; DeChatelet et al. 1976; Cheson et al. 1977; Newburger et al. 1980; Curnutte & Tauber 1983; Baggiolini et al. 1993). Unter den partikulären Substanzen sind opsonierte Bakterien, opsoniertes Zymosan (Hefezellwand-Polysaccharid) und Latex-Partikeln, die eine direkte Aktivierung ohne Opsonierung ermöglichen, zusammengefaßt. Zu den löslichen Substanzen werden Phorbol-12-myristat-13-acetat (phorbol myristate acetate - PMA), fMLP (formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine), verschiedene Ionophoren, das Komplement-Peptid C5a und das Fluorid-Ion (F^-) gezählt.

In ruhenden Phagozyten ist die NADPH-Oxidase inaktiv. An der Aktivierung des Enzymsystems sind beide membrangebundene und zytosolische Komponenten beteiligt (Repine et al. 1974a, 1974b; DeChatelet et al. 1976; Newburger et al. 1980; Babior 1994; Babior 1999). Beim Erregerkontakt wandern die zytosolischen Faktoren an die Plasmamembran und bilden mit dem Cytochrom *b* einen aktiven Komplex (Abb. 4). Durch die Abgabe eines Elektrons von NADPH an molekularen Sauerstoff (O_2) wird Superoxidanion (O_2^-) gebildet. Das initial gebildete Superoxidanion wird spontan oder enzymatisch (über die Superoxid-Dismutase - SOD) zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umgewandelt. Bis zu 90% des Sauerstoffverbrauchs aktivierter Neutrophilen wird zur Bildung von Wasserstoffperoxid verwendet (Reiss & Roos 1978). Wasserstoffperoxid wird in Anwesenheit von Chlor- und Iodanionen durch die Aktivität von MPO zu toxischen Oxyhaliden (hypochlorige Säure-HOCl) katalysiert oder zu Hydroxylradikalen (OH^\cdot) abgebaut (Abb. 3) (Klebanoff & Clark 1978; Hampton et al. 1998; Klebanoff 1999). Diese intrazellulär gebildeten Produkte des Sauerstoffmetabolismus in phagozytierenden Zellen (O_2^- , H_2O_2 , HOCl and OH^\cdot) werden reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species - ROS) genannt. Alle wirken auf lebende Mikroorganismen abtötend.

Während der Phagozytose wird durch Umschließen („engulfment“) des Mikroorganismus durch die Plasmamembran das Phagosom gebildet. Somit bildet die Außenseite der Plasmamembran die Innenseite des Phagosoms (Abb. 2). Die Freisetzung der toxischen Moleküle erfolgt intrazellulär innerhalb des gebildeten Phagosoms, wo auch die Abtötung und Verdauung der gefangenen Mikroorganismen stattfindet. Außerdem ist eine extrazelluläre Abtötung von nicht phagozytierten Mikroorganismen durch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen an Kontaktstellen mit lebenden Mikroorganismen möglich (Ohno et al. 1982; Weiss et al. 1985). Die extrazelluläre Freisetzung von Sauerstoffradikalen kann unter Umständen zu Gewebeschäden führen. Im Zyto-

sol befinden sich Enzyme, die Superoxidanion und Wasserstoffperoxid zu Wasser inaktivieren und somit die Zellen vor deren toxischer Wirkung schützen. Diese Enzyme sind die Superoxid-Dismutase, die Katalase und die Glutathion-Peroxidase (Abb. 3).

Die respiratorische Reaktion in phagozytierenden Zellen ist ein selbstlimitierendes Phänomen, das auf multiple Faktoren zurückzuführen ist (Segal & Coade 1978; Jandl et al. 1978; Whitin & Cohen 1988). *In vitro* Ergebnisse weisen darauf hin, daß das MPO-Halid-System eine wichtige Rolle in der Beendigung der oxidativen Reaktion spielt (Jandl et al. 1978).

2.4.3 Klinische Bedeutung des NADPH-Oxidase-Systems

Die Bedeutung der NADPH-Oxidase der Phagozyten bei der Abwehr pathogener Mikroorganismen wird deutlich, wenn ihre Funktion aufgehoben ist. Molekulare Defekte im NADPH-Oxidase-System führen dazu, daß die morphologisch normalen Phagozyten zwar in normalem Umfang phagozytieren, aber nicht effektiv abtöten können. In den sechziger Jahren zeigten mehrere Untersuchungen, daß die Produkte des sogenannten „respiratory burst“ - der oxidativen Reaktion, die durch die Phagozytose ausgelöst wird - für die mikrobizide Funktion unerlässlich sind.

Die klinische Bedeutung des Systems wurde durch das Studium der chronischen Granulomatose, ein primärer Defekt der NADPH-Oxidase, deutlich. Die von den Phagozyten aufgenommenen Mikroorganismen akkumulieren in den Zellen und führen zur Bildung von Abszessen und Granulomen. Klinisch weisen die Patienten schwere rezidivierende Infektionen vorwiegend durch Katalase-produzierende Bakterien und Pilze auf (Abb. 5). Unbehandelt ist die Lebenserwartung schlecht, die Patienten sterben in der ersten Lebensdekade an schweren Infektionen durch Bakterien oder Pilze (Tauber et al. 1983). Entscheidend für die Prognose ist der Einsatz antibiotischer und eventuell antimykotischer Dauerprophylaxe sowie die Wahl intrazellulär wirksamer Substanzen (Abb. 6) (Tauber et al. 1983; Weening et al. 1985a; Belohradsky 1986; Fischer et al. 1993; Wahn & Seger 1998; Goldblatt & Thrasher 2000; Goldblatt 2002).

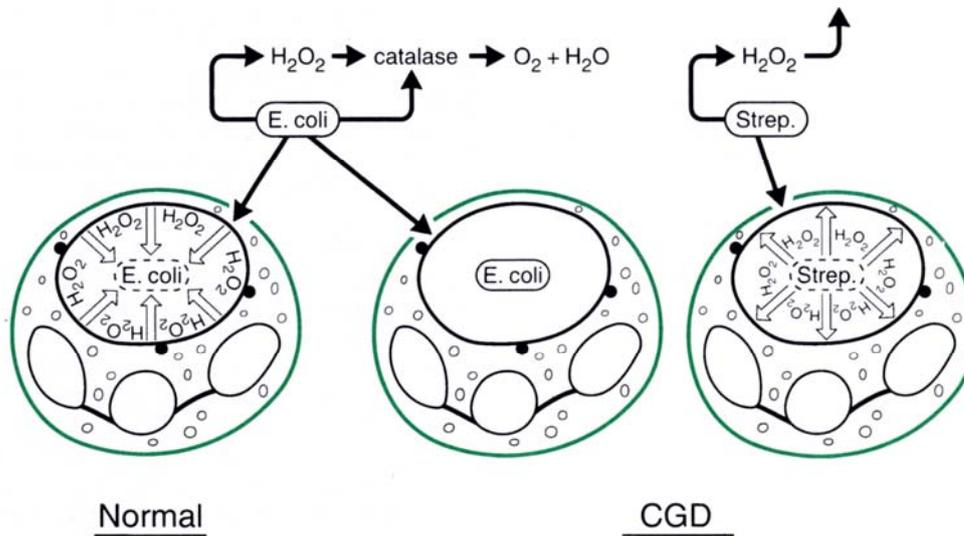


Abb. 5: Pathogenese der selektiven Infektionsanfälligkeit gegenüber Katalase-positiven Mikroorganismen bei chronischer Granulomatose (Boxer 1995)

In Neutrophilen mit normalem Sauerstoffmetabolismus führen die toxischen Sauerstoffmetabolite (O_2^- , H_2O_2 , OH) zu intrazellulärer Abtötung der aufgenommenen Mikroorganismen unabhängig davon, ob diese über Katalase verfügen. In geringem Umfang bilden auch die Mikroorganismen selbst H_2O_2 . Katalase ist ein H_2O_2 -katabolisierendes Enzym von vielen aeroben Mikroorganismen wie gramnegative Enterobakterien, *S. aureus* oder *Candida albicans* bzw. *Aspergillus* spp.

In normalen Neutrophilen führen die gebildeten Sauerstoffmetabolite zur Abtötung der aufgenommenen Katalase-produzierenden Mikroorganismen (*E. coli*), da die Menge des produzierten H_2O_2 über die Kapazität der Katalase hinaus geht.

Werden Katalase-produzierende Mikroorganismen (*E. coli*) in CGD-Neutrophilen aufgenommen, es werden keine Sauerstoffmetabolite produziert und das von den Mikroorganismen selbstproduzierte H_2O_2 wird durch die eigene Katalase katabolisiert. Die Mikroorganismen überleben in dem Fall innerhalb der Phagosomen.

Werden Katalase-negative Mikroorganismen wie Streptokokken oder Pneumokokken in CGD-Neutrophilen aufgenommen, werden diese durch selbst produziertes H_2O_2 intrazellulär abgetötet.

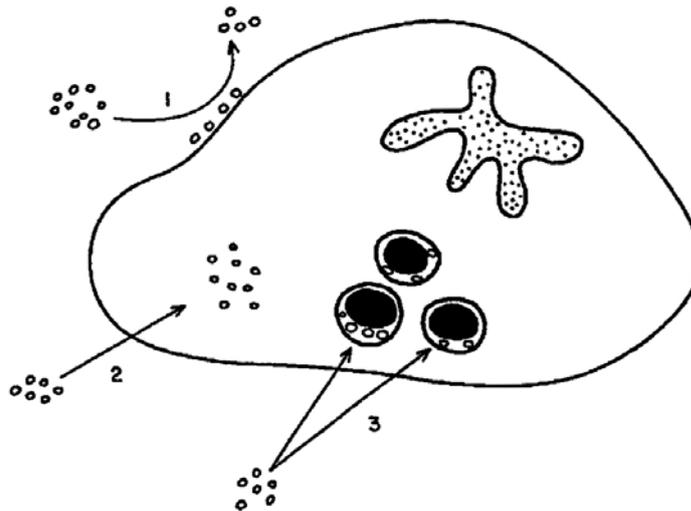


Abb. 6: Interaktionen zwischen Antibiotika und Phagozyten in Relation zu intrazellulär gelegenen Bakterien (Gemmel 1993)

Antibiotika können: 1. an die Zellmembran binden oder sind nicht in der Lage, die Zellmembran zu penetrieren
 2. die Zellmembran penetrieren und im Zytoplasma akkumulieren 3. die Zellmembran penetrieren und in den Phago-lysosomen akkumulieren.

2.5 Laborbestimmung des oxidativen Metabolismus der Phagozyten

Für die Bestimmung des Sauerstoffmetabolismus phagozytischer Zellen, des sogenannten „oxidative burst“, sind zahlreiche Methoden entwickelt worden (Virella 1993; Roos & Curnutte 1999; Metcalf et al. 1986). Eine ausreichende Standardisierung ist bisher noch nicht erfolgt.

Eine maximale Stimulation der Granulozyten durch lösliche Stimulantien wie PMA (Stimulation durch Aktivierung der Proteinkinase C) oder partikuläre Stimulantien wie opsoniertes Zymosan oder *Candida* (Stimulation durch Ingestion) sollte gewährleistet sein. Latex-Partikeln sind wegen der schwächeren Zellstimulation nicht geeignet (Curnutte & Tauber 1983).

Generell werden isolierte Neutrophile mit PMA, Serum-opsoniertem Zymosan oder *Candida* maximal stimuliert. Mit PMA wird eine optimale Stimulation durch Aktivierung der Proteinkinase C erreicht (Smith & Weidemann 1993). Die dadurch resultierende Sauerstoffradikalproduktion kann bestimmt werden durch:

- den Sauerstoffverbrauch (mit einer Sauerstoffelektrode) (Weening et al. 1974; Metcalf et al. 1986).

- die Superoxidanion-Produktion (durch Reduktion von Cytochrom *c*) (Newburger 1982; Metcalf et al. 1986). Cytochrom *c* wird durch Superoxidanion reduziert und wechselt somit das Lichtabsorptionsspektrum. Der Wechsel des Lichtabsorptionsspektrums kann spektrophotometrisch gemessen werden. Nachteile dieser Methode sind die niedrige Sensitivität und die schlechte Reproduzierbarkeit.
- die Wasserstoffperoxid-Produktion (Roos et al. 1983; Metcalf et al. 1986). Die Menge von generiertem Wasserstoffperoxid wird fluorometrisch durch die Oxidation eines Fluoreszenzindikators (Homovanillinsäure oder Scopoletin) erfaßt.
- die Bestimmung der Chemilumineszenz (Cheson et al. 1976; Nelson et al. 1976; Rosen & Klebanoff 1976; Khan & Kasha 1979; Mills et al. 1980; Kato et al. 1981; Schopf et al. 1984; Weening et al. 1985b; Metcalf et al. 1986; Gerber et al. 1996). Diese Methode basiert auf der Instabilität von Superoxidanion. Die Dissoziation von Superoxidanion kann als Lichtemission direkt oder indirekt durch die Zugabe von Luminol oder Lucigenin als Substrat - welche während der Dissoziation von Superoxidanion aktiviert werden - gemessen werden. Es handelt sich um eine quantitative Methode mit einer hohen Sensitivität. Zur Durchführung des Tests ist allerdings ein spezielles Gerät erforderlich.
- die durchflußzytometrische Bestimmung der intrazellulären Bildung von H_2O_2 oder O_2^- . Diese Methode bietet eine quantitative Bestimmung des Sauerstoffmetabolismus in der einzelnen Zelle und basiert auf der intrazellulären Konversion durch H_2O_2 oder O_2^- von nichtfluoreszierenden Indikatoren (Dihydrorhodamin-123 - DHR-123, Hydroethidium - HE, 2'7'-Dichlorofluorescein - DCFH) zu fluoreszierenden Farbindikatoren (Rhodamin-123 - RH-123, Ethidiumbromid - EB, 2'7'-Dichlorofluorescein - DCF) (Bass et al. 1983; Kinsey et al. 1987; Rothe et al. 1988; Rothe & Valet 1990a, 1990b). Die Prozentzahl der fluoreszierenden Zellen sowie die Fluoreszenzintensität (entspricht der Menge der gebildeten Sauerstoffmetaboliten) können durchflußzytometrisch bestimmt werden. Dihydrorhodamin-123 ist der sensitivste Farbindikator und daher der geeignetste für Screening-Untersuchungen (Rothe et al. 1988; Rothe & Valet 1990a; Rothe et al. 1991; Smith & Weidemann 1993; Vowells et al. 1995).
- den Nitroblautetrazolium (nitroblue tetrazolium, NBT)-Test (Baehner & Nathan 1967; Baehner & Nathan 1968; Preisig & Hitzig 1971; Ochs & Igo 1973; Segal 1974; Mills et al. 1980; Johansen 1983; Schopf et al. 1984; Meerhof & Roos 1986; Metcalf et al. 1986). Das in seiner oxidierten Form farblose bis gelbliche, lösliche NBT wird intrazellulär durch das gebildete O_2^- zu blauem Formazan reduziert. Es gibt zahlreiche technische Varianten. Die einfachste und meist verbreitete Methode ist der sog. NBT-Slide-Test (semiquantitative zytochemische

Methode). Neutrophile werden mit PMA, opsonierten Zymosan-Partikeln oder *Candida* stimuliert und mit löslichem NBT inkubiert. Das intrazellulär gebildete Formazan wird durch blaugefärbtes Zytoplasma erkennbar. Die Auswertung erfolgt mikroskopisch. Eine Standardisierung der Auswertung der Methode ist schwierig, da die Interpretation der Farbintensität subjektiv ist. Aus dem Grund sind quantitative Modifikationen der Methode entwickelt worden. Zur Objektivierung des Ergebnisses wurde der quantitative NBT-Test entwickelt (Schopf et al. 1984; Baehner & Nathan 1968; Metcalf et al. 1986), der die Menge des Formazans spektrophotometrisch im Zellysat bestimmt.

Als Screening-Tests sind der DHR-Test, der NBT-Test und die Bestimmung der Chemilumineszenz geeignet (Roos & Curnutte 1999; IUIS/WHO Working Group 1988). Interessanterweise gilt der NBT-Test, einer der erstentwickelten Methoden für die Bestimmung der „oxidative burst“-Aktivität (Baehner & Nathan 1967; Baehner & Nathan 1968; Preisig & Hitzig 1971) immer noch als Standardtest, die Fähigkeit der Granulozyten zur Bildung von Sauerstoffradikalen zu untersuchen. Bei dieser Methode kann aber in Einzelfällen die Identifizierung von Konduktorinnen mit einer extremen Lyonisierung sowie von Varianten mit Restaktivität versäumt werden (Borregaard et al. 1983; Roesler et al. 1991; Vowells et al. 1996). Hier eignen sich die FACS (fluorescence-activated cell sorting)-Methoden, die die Funktion in der einzelnen Zelle quantitativ bestimmen und eine höhere statistische Aussagekraft gegenüber dem NBT-Test (Auswertung von 10000 Zellen versus 100 Zellen beim NBT-Test) haben. Dihydrorhodamin-123 ist der sensitivste Indikator für diese Methoden (Rothe et al. 1988; Rothe & Valet 1990a; Rothe et al. 1991; Smith & Weidemann 1993; Vowells et al. 1995). Zur sicheren Identifizierung von Konduktorinnen mit einer extremen Lyonisierung sowie von Varianten mit Restaktivität sollte eine Kombination mehrerer Tests erfolgen. Der DHR-Test ist Peroxidase-abhängig und kann bei Patienten mit komplettem MPO-Mangel falsch pathologische Befunde mit Werten wie bei Patienten mit CGD und Restaktivität liefern (van Pelt et al. 1996; Badolato et al. 2002; eigene unpublizierte Daten aus dem Immunologischen Labor des Dr. von Haunerschen Kinderspitals). Im Gegensatz zur CGD sind beim MPO-Mangel die weiteren Screening-Tests des Sauerstoffmetabolismus normal.

2.6 Defekte des oxidativen Metabolismus der Phagozyten

Zu den molekularen Defekten, die die Reaktionen des oxidativen Metabolismus phagozytischer Zellen betreffen, werden die chronische Granulomatose, der schwere Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangel in Granulozyten, der Myeloperoxidasemangel und die Defekte des Glutathionmetabolismus gezählt (Yang et al. 1999; Dinauer 1998). Defekte, die mit einer Unfähigkeit der Neutrophilen zur Bildung von Sauerstoffmetaboliten einhergehen, sind die chronische Granulomatose (molekularer Defekt in einem der Komponenten der NADPH-Oxidase) und der schwere G6PD-Mangel in Granulozyten (mangelnde Bereitstellung von NADPH). Die Folge ist eine defekte Abtötungsfähigkeit, die klinisch durch schwere rezidivierende bakterielle und mykotische Infektionen gekennzeichnet ist. Der MPO-Mangel und die Defekte des Glutathionmetabolismus sind in Einzelfällen mit einer abnormen *in vitro* Bakterizidie assoziiert. Beide Defekte betreffen regulatorische Sekundärreaktionen des Sauerstoffmetabolismus (MPO: Oxyhalid-Bildung, Glutathion: H₂O₂-Inaktivierung) (Whitin & Cohen 1988) und gehen mit einer erhöhten Aktivität von H₂O₂ bzw. einer toxischen Wirkung auf die NADPH-Oxidase einher. Die Fähigkeit der Zellen zur Bildung von Sauerstoffmetaboliten ist im Gegensatz zur CGD und dem schweren G6PD-Mangel in Granulozyten nicht beeinträchtigt.

Nach der neuesten Klassifikation primärer Immundefekte der IUIS-Expertengruppe [International Union of Immunological Societies (IUIS) Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee Meeting in Budapest, 2005] (Notarangelo et al. 2006) werden zu den kongenitalen Phagozytenfunktionsstörungen mit defektem oxidativen Metabolismus die chronische Granulomatose (CGD) und der G6PD-Mangel in Neutrophilen gezählt. Im Gegensatz zu den früheren IUIS-Klassifikationen wird der Myeloperoxidasemangel nach dem letzten Update wegen der geringen klinischen Bedeutung nicht mehr zu den primären Phagozytendefekten gerechnet (Notarangelo et al. 2006).

2.6.1 Die chronische Granulomatose

Die chronische Granulomatose (Chronic Granulomatous Disease, CGD) oder septische Granulomatose ist eine genetisch determinierte primäre Störung des oxidativen Sauerstoffmetabolismus in phagozytierenden Zellen. CGD ist durch eine defekte Bakterizidie bei intakter intrazellulärer Aufnahme der Mikroorganismen charakterisiert. Die Ursache liegt an der Unfähigkeit der Phagozyten mit einem „oxidative burst“ zu antworten. Das Krankheitsbild wurde gleichzeitig von Landin und Shirkey (1957) und Berendes et al. (1957) beschrieben.

Die Prävalenz variiert in verschiedenen Populationen zwischen 1:200 000 - 1:250 000 in den USA (Winkelstein et al. 2000), 1:220 000 - 1:287 000 in Japan (Ishibashi et al. 2000; Hasui 1999), 1:450 000 in Schweden (Åhlin et al. 1995) und 1:1 180 000 in Australien (Baumgart et al. 1997).

Es handelt sich um ein genetisch heterogenes Krankheitsbild. Der Erbgang ist in 65-70% der Fälle X-chromosomal rezessiv und in 30-35% autosomal rezessiv (Casimir et al. 1992; Curnutte 1993; Segal et al. 2000; Winkelstein et al. 2000).

Mutationen in 4 Komponenten der NADPH-Oxidase sind bisher bei Patienten mit chronischer Granulomatose identifiziert worden. Die X-chromosomale Form tritt bei Mutationen an dem membrangebundenen gp91phox (*CYBB* auf Chromosom Xp21.1, MIM 306400) (Abb. 8) auf. Die autosomal-rezessiven Formen betreffen entweder das membrangebundene p22phox (*CYBA* auf Chromosom 16q24, MIM 233690) oder die zytosolischen Proteine p47phox (*NCF1* auf Chromosom 7q11.23, MIM 233700) und p67phox (*NCF2* auf Chromosom 1q25, MIM 233710) (Roos et al. 1996; Roos & Curnutte 1999; Dinauer et al. 2000). Cytochrom *b*₅₅₈ ist bei der Mehrzahl der Patienten mit chronischer Granulomatose nicht nachweisbar oder vermindert (Segal et al. 1978; Segal et al. 1983; Nakamura et al. 1987, 1988-89; Minegishi et al. 1988; Mizuno et al. 1988; Mühlebach et al. 1991) (Tab. 1).

Tab. 1: Molekulargenetische Klassifikation der chronischen Granulomatose (nach Curnutte 1993)

Betroffene Komponente	Gen-Lokalisation	Vererbungsmodus	Subtyp	NBT-Test (% positiv)	O ₂ -Produktion (% der Norm)	Cytochrom <i>b</i> -Spektrum (% der Norm)	Häufigkeit (% der Fälle)
gp91phox	Xp21.1	X	X91 ^o	0	0	0	56
			X91 ⁻	80-100 (schw)	3-30	3-30	5
			X91 ⁻	5-10	5-10	5-10	2
			X91 ⁺	0	0	100	2
p22phox	16p24	AR	A22 ^o	0	0	0	6
			A22 ⁺	0	0	100	1
p47phox	7q11.23	AR	A47 ^o	0	0-1	100	23
p67phox	1q25	AR	A67 ^o	0	0-1	100	6

schw: schwach positiv. Proteinexpression der betroffenen Komponente als fehlend (°), vermindert (-) oder normal (+) bezeichnet. Die Häufigkeit der Fälle bezieht sich auf 121 Familien mit 132 Patienten.

Nach der quantitativen Produktion von Sauerstoffmetaboliten unterscheidet man zwei Formen der CGD: die klassische Form mit komplettem Fehlen an Bildung von Sauerstoffmetaboliten und die CGD-Variaten mit sogenannter Restaktivität (Tauber et al. 1983; Newburger et al. 1986; Casimir et al. 1992; Roos et al. 1992; Roos et al. 1996; Roos & Curnutte 1999).

Patienten mit chronischer Granulomatose haben eine vermehrte Anfälligkeit für bakterielle Infektionen, vor allem durch Katalase-produzierende Bakterien (Abb. 5). Dies äußert sich in Form von Hautabszessen, Lymphadenitiden, Perianalabszessen, Leberabszessen, Pneumonien, Osteomyelitiden u.a. Außerdem treten gehäuft Pilzinfektionen, vor allem durch *Aspergillus* spp., auf. Betroffen sind vorwiegend die Organe, die zu den anatomischen Barrieren gehören (Haut, Respiations- und Gastrointestinaltrakt) (Forrest et al. 1988; Roos & Curnutte 1999; Winkelstein et al. 2000; Goldblatt & Thrasher 2000; Segal et al. 2000).

Die Diagnose wird in der Regel in den ersten Lebensjahren gestellt. Ein milderes Krankheitsbild mit verzögerter Diagnose sowie Spätmanifestationen im Jugend- oder Erwachsenenalter sind bei der CGD mit Restaktivität beschrieben (Balfour et al. 1971; Chusid et al. 1975; Dilworth & Mandell 1977; Perry et al. 1980; Höger et al. 1984a; Newburger et al. 1986; Schapiro et al. 1991; Roos et al. 1992; Liese et al. 1996).

Für das einst als letal beschriebene Krankheitsbild läßt sich heute aufgrund des besseren Verständnisses der Pathophysiologie und des aggressiveren Einsatzes von Antibiotika (dabei bevorzugt intrazellulär wirksame Substanzen) und Antimykotika sowie der Infektionsprophylaxe mit Trimethoprim/Sulfamethoxazol (TMP/SMX), Itraconazol und evtl. gamma-Interferon eine deutlich bessere Prognose ableiten (Regelmann et al. 1983; Tauber et al. 1983; Mouy et al. 1989; Margolis et al. 1990; The International CGD Cooperative Study Group 1991; Curnutte 1992; Fischer et al. 1993; Bemiller et al. 1995; Weening et al. 1995; Hasui 1999; Gallin et al. 2003). Bei schweren, lebensbedrohlichen Infektionen können Granulozytentransfusionen mit Erfolg eingesetzt werden (Dougherty et al. 1983; Fanconi et al. 1985; Quie 1987; Fischer et al. 1993; Lekstrom-Himes et al. 1994; von Planta et al. 1997; Segal et al. 2000). Eine Wiederherstellung der mikrobiziden Eigenschaft der Zellen durch Aufnahme von Glucose-Oxidase-haltigen Liposomen (GOL) stellt eine interessante zukünftige therapeutische Möglichkeit bei schweren Infektionen dar (Gerber et al. 2001). Ergebnisse einer klinischen Anwendung der GOL bei Menschen liegen noch nicht vor.

Als erfolgreichste Therapie hat sich eine Dauerprophylaxe mit einem zellgängigen Antibiotikum und einem Antimykotikum etabliert. Als Standardprophylaxe wird TMP/SMX gegeben

(Ezer & Soothill 1974; Kobayashi et al. 1978; Gmünder & Seger 1981; Seger et al. 1981; Gallin et al. 1983; Regelman et al. 1983; Weening et al. 1983; Höger 1984b, 1985; Belohradsky 1986; Forrest et al. 1988; Seger & Mühlebach 1988-89; Mouy et al. 1989; Margolis et al. 1990; Fischer et al. 1993; Wahn & Seger 1998; Segal et al. 2000; Goldblatt 2002). Alternativ kann bei Unverträglichkeitsreaktionen oder bei bakteriellen Infektionen unter TMP/SMX Trimethoprim allein, TMP/Rifampicin, Rifampicin, Vancomycin, Ciprofloxacin, Clindamycin, oder Fosfomycin eingesetzt werden (Mandell & Vest 1972; Ezer & Soothill 1974; Zimmerli et al. 1983; Jacobs & Wilson 1983; Höger et al. 1984b; Höger et al. 1985; Belohradsky 1986; Seger & Mühlebach 1988-89; Hand & King-Thompson 1990; van Rensburg et al. 1990; Hof 1991; van der Auwera et al. 1991; Trautmann et al. 1992; Gemmel 1993; Pemán et al. 1994; Wahn & Seger 1998; Cantón et al. 1999; Goldblatt 2002), wobei die Sicherheit von Ciprofloxacin als Langzeitbehandlung bei Kindern nicht geprüft ist. Bei TMP/SMX-Unverträglichkeit kann eine Hyposensibilisierung erfolgreich sein (Hasui et al. 2002). Die orale Gabe von Itraconazol gilt als gut verträgliche und effektive Dauerprophylaxe gegen Pilzinfektionen, insbesondere lebensbedrohlichen Aspergillosen (Mouy et al. 1994; Petropoulou et al. 1994; Gallin et al. 2003).

Der Einsatz von γ -Interferon kann zusätzlich als Infektionsprophylaxe oder bei der Therapie schwerer Infektionen angewandt werden (Tauber et al. 1983; Newburger & Ezekowitz 1988; The International CGD Cooperative Study Group 1991; Fischer et al. 1993; Malmvall & Follin 1993; Bemiller et al. 1995; Weening et al. 1995; Pasic et al. 1996; Åhlin et al. 1999; Conte et al. 1999; Tsumura et al. 1999; Dinauer et al. 2000; Segal et al. 2000; Saulsbury 2001; Goldblatt 2002; Marciano et al. 2004). Der exakte Wirkmechanismus von Interferon ist nicht geklärt. Neueste Untersuchungen weisen auf eine verstärkte NO-Produktion hin (Åhlin et al. 1999).

Obwohl der Einsatz der prophylaktischen Infektionstherapie die Prognose deutlich verbessert hat, deuten Infektionen mit fatalem Verlauf, insbesondere durch *Aspergillus* spp., weiterhin auf eine ungünstige Langzeitprognose bei CGD hin (Winkelstein et al. 2000). Die allogene HLA-identische Blutstammzelltransplantation (Leung et al. 1999; Segal et al. 2000; Goldblatt & Thrasher 2000; Goldblatt 2002; Seger et al. 2002) ist eine kurative Therapiemöglichkeit bei der CGD. Neue alternative kurative therapeutische Ansätze stellen die allogene Blutstammzelltransplantation nach reduzierter Konditionierung bei Risikopatienten und die Gentherapie, die zur Zeit in klinischen Studien erprobt wird, dar (Malech et al. 1997; Horwitz et al. 2001; Barese et al. 2004; Güngör et al. 2005; Ott et al. 2006; Stein et al. 2006; Sastry et al. 2006).

Die Diagnose wird durch die Bestimmung des oxidativen Metabolismus in aktivierten Neutrophilen gestellt. Als Screening-Tests sind der DHR-Test, der NBT-Test und die Chemilumineszenz geeignet. Die molekulargenetische Klassifikation der CGD erfolgt durch den Nachweis der einzelnen verschiedenen Komponenten des NADPH-Oxidase-Systems [Cytochrom *b*-Spektrum, monoklonale Antikörper gegen Cytochrom *b* (7D5-Antikörper), Immunoblot (Westernblot)-Verfahren zum Proteinnachweis] sowie durch die DNA-Sequenzierung zum Nachweis der verantwortlichen Mutation. Für die Identifizierung der weiblichen Merkmalsträger in der mütterlichen Familie beim X-chromosomalen Erbgang sind die sogenannten Screening-Tests geeignet. Um eine sichere Identifizierung im Fall einer extremen Lyonisierung zu gewährleisten, eignen sich der DHR-Test und der NBT-Slide-Test. Bei beiden Methoden wird die Funktion in der einzelnen Zelle bestimmt, wobei der DHR-Test wegen der quantitativen Bestimmung und der höheren statistischen Aussagekraft (Auswertung von 10000 Zellen versus 100 Zellen beim NBT-Test) deutlich überlegen ist. Heute stellt die DNA-Diagnostik eine sichere und reproduzierbare Methode zur Identifizierung der Konduktorinnen mit einer extremen oder kompletten Lyonisierung dar. Die Identifizierung von heterozygot Betroffenen der autosomal rezessiven Formen kann nur über die DNA-Analyse erfolgen.

2.6.2 Der Myeloperoxidase (MPO)-Mangel

Der hereditäre totale oder partielle MPO-Mangel (MIM 254600) [früher als Alius-Grignaschi Anomalie beschrieben (Undritz 1966a, 1966b)] ist durch einen selektiven Mangel dieses lysosomalen Enzyms in den azurophilen Granula der Neutrophilen und Monozyten charakterisiert. Das Enzym bildet in Anwesenheit von H₂O₂ und einem Halogenid ein potenziert bakterizides System, das die Aktivität des oxidativen Abtötungsmechanismus verstärkt. Primär wird das bakterizide Molekül HOCl gebildet, das dann mit Aminen zur Bildung von Chloraminen reagiert, die ebenso eine toxische Wirkung haben (Klebanoff & Clark 1978).

Eosinophile Granulozyten enthalten die Eosinophilen-Peroxidase, ein Protein mit einer 70%igen DNA-Sequenzhomologie im Vergleich zur Myeloperoxidase (Sakamaki et al. 1989). Eosinophile von Patienten mit MPO-Mangel weisen daher üblicherweise Peroxidase in normalen Mengen auf (Grignaschi et al. 1963; Undritz 1966a; Salmon et al. 1970; Shurin 1988; Gerber et al. 1996).

Der hereditäre MPO-Mangel wird autosomal rezessiv vererbt (Larrocha et al. 1982; Nauseef 1990). Erworbene und transitorische Formen sind beschrieben worden (Huhn et al. 1978; Kitahara et al. 1979; Cech et al. 1983; Bendix-Hansen & Kerndrup 1985; Bendix-Hansen 1986;

Bendix-Hansen et al. 1986; Nauseef 1988; Nauseef 1990). Das verantwortliche Gen ist auf dem Chromosom 17 (17q23.1) lokalisiert (Law et al. 1995).

Der MPO-Mangel ist der häufigste aller identifizierten Neutrophilendefekte mit einer Häufigkeit von ungefähr 1:2000 für den partiellen Mangel und 1:4000 für den totalen Mangel (Kitahara et al. 1981; Parry et al. 1981; Nauseef 1988). Die klinische Bedeutung des Defektes ist jedoch gering, da die Patienten in der Regel asymptomatisch sind (Nauseef 1988; Winterbourn et al. 2000). Einzelfälle mit schweren Infektionen (bakterielle Infektionen, aseptische Meningitis) sind bereits beschrieben worden (Kitahara et al. 1981; Parry et al. 1981; Larrocha et al. 1982). Candidiasis, v.a. systemisch oder rezidivierend, wurde mehrmals bei Patienten mit MPO-Mangel beschrieben (Lehrer & Cline 1969; Moosmann & Bojanovsky 1975; Cech et al. 1979b; Robertson et al. 1979; Parry et al. 1981; Weber et al. 1987; Okuda et al. 1991; Ludviksson et al. 1993; Nguyen & Katner 1997; Chiang et al. 2000). Die Empfänglichkeit gegenüber *Candida* spp. ist allerdings zum Teil auf zusätzliche prädisponierende Faktoren wie Diabetes mellitus bei 3 Erwachsenen (Lehrer & Cline 1969; Cech et al. 1979b; Parry et al. 1981), transitorische insulinbedürftige Hyperglykämie bei einem unreifen Neugeborenen (Chiang et al. 2000), chronische Infektionsherde oder Operationen (Parry et al. 1981; Weber et al. 1987; Ludviksson et al. 1993) zurückzuführen.

Eine *in vitro* abnorme bakterizide Aktivität der Neutrophilen gegenüber *C. albicans* und *S. aureus* wurde mehrmals bei Patienten mit MPO-Mangel beschrieben (Lehrer & Cline 1969; Cech et al. 1979a; Diamond et al. 1980; Kitahara et al. 1981; Parry et al. 1981). Diese Daten weisen auf eine Mitbeteiligung der MPO in der Abwehr gegen Pilzinfektionen hin, obwohl eine klinische Manifestation selten ist.

Die Diskrepanz zwischen den *in vitro* Ergebnissen und der milden klinischen Manifestation kann verschiedene Ursachen haben. Entweder das MPO-abhängige mikrobizide System spielt nur eine untergeordnete Rolle in der Abwehr von Infektionen oder andere MPO-unabhängige Systeme, wie z.B. sauerstoffunabhängige bakterizide Mechanismen, übernehmen bei einem MPO-Mangel die Funktion (Winterbourn et al. 2000). Außerdem ist die erhöhte H₂O₂-Produktion bei MPO-defizienten Neutrophilen als kompensatorischer Mechanismus angesehen (Hamers et al. 1984). Es ist außerdem denkbar, daß die Eosinophilen, die MPO in normalen Mengen besitzen, am Infektionsort möglicherweise den Defekt der Neutrophilen partiell ersetzen.

Darüber hinaus weisen *in vitro* Ergebnisse darauf hin, daß das MPO-Halid-System eine wichtige Rolle in der Beendigung der respiratorischen Reaktion bei der direkten toxischen Wirkung von

HOCl auf die NADPH-Oxidase spielt. Der oxidative Metabolismus dauert länger und die H₂O₂-Produktion ist höher in Neutrophilen von Patienten mit MPO-Mangel (Klebanoff & Hamon 1972; Rosen & Klebanoff 1976; Jandl et al. 1978; Nauseef et al. 1983; Hamers et al. 1984; Nauseef 1990).

Eine prophylaktische Therapie ist nicht erforderlich, da der klinische Phänotyp mild ist. Bei systemischen Infektionen ist eine aggressive Therapie indiziert (Dinauer 1998). Patienten mit einem MPO-Mangel in Eosinophilen weisen keine klinischen Symptome auf (Cappelletti et al. 1992).

Die Diagnose des MPO-Mangels kann im Ausstrich des peripheren Blutes mittels einer zytochemischen Färbung mit Benzidin (Goodpasture 1919), Benzidin-Dihydrochlorid (Kaplow 1965) oder o-Tolidin (Jacobs 1958; Quaglino & Flemans 1958) erfolgen. Bei einem MPO-Mangel erscheinen die Neutrophilen als ungefärbte Zellen, da ihnen pathologischerweise die Peroxidaseaktivität fehlt. Eine weitere Methode stellt die automatisierte zytochemische Analyse dar, die die MPO-Aktivität in Neutrophilen und Eosinophilen mittels 4-chloro-1-naphthol als Substrat bei der Leukozyten-Differenzierung am Hämatologieautomat nachweist (Kitahara et al. 1979). Diese Methode ist für Screening-Untersuchungen geeignet (Kitahara et al. 1979; Kutter 1998).

2.6.3 Defekte des Glutathionmetabolismus

Die Glutathion (GT)-Peroxidase schützt die neutrophilen Granulozyten vor H₂O₂ sowie vor toxischen, in den Mikrotubuli sitzenden Proteinen (Roos et al. 1979; Spielberg et al. 1979). Voraussetzung ist das Vorhandensein von reduziertem Glutathion (GSH) in ausreichenden Mengen. Glutathion wird durch NADPH, GT-Reduktase und GT-Synthetase reguliert. Das Erhalten von adäquaten GSH-Mengen wird sowohl durch die Reduktion von GSSG (oxidierte Glutathion) zu GSH (durch die GT-Reduktase) als auch durch die *de novo* Synthese von Glutathion (durch die GT-Synthetase) reguliert (Abb. 3). Bei Defekten in einem dieser Enzyme (Reduktase - Synthetase) wurde eine *in vitro* eingeschränkte Bakterizidie nachgewiesen, wobei die Phagozytose und die Produktion von Sauerstoffmetaboliten durch die NADPH-Oxidase intakt waren (Loos et al. 1976; Boxer et al. 1979; Roos et al. 1979; Spielberg et al. 1979). Möglicherweise führen die intrazellulär produzierten toxischen Sauerstoffderivate, die normalerweise durch Glutathion reguliert werden, zu Autotoxizität und/oder defektiver mikrobizider Aktivität. Beide Defekte sind extrem selten: Familiendaten sprechen für einen autosomal-rezessiven Vererbungsmodus. Beim Glutathion-Reduktase-Defekt ist die Dauer des oxidativen Metabolismus kürzer als in normalen

Zellen und die Reaktion wird akut beendet, vermutlich durch den toxischen Effekt von intrazellulär akkumuliertem H_2O_2 auf die NADPH-Oxidase (Cohen et al. 1987). Dieser kurzdauernde oxidative Metabolismus scheint effizient für die Bakterienabtötung zu sein, da die wenigen bisher beschriebenen Patienten keine Infektionsanfälligkeit aufweisen (Loos et al. 1976). Diese Patienten zeigen eine hämolytische Anämie als Folge der erniedrigten Mengen von Glutathion-Reduktase in Erythrozyten. Die Hämolyse wird bei oxidativem Streß manifest (Loos et al. 1976).

Bei dem Glutathion-Synthetase-Defekt stellt die Hämolyse das Hauptsymptom dar (Mohler et al. 1970; Boxer et al. 1979; Jain et al. 1994). Die Patienten können rezidivierende Infektionen aufweisen und zeigen eine schwere metabolische Azidose als Folge von erhöhten 5-Oxoprolin-Werten (Jain et al. 1994). Dieser Metabolit steigt bei fehlender Rückbildung von GSH zu GSSG an. Patienten mit einem Glutathion-Synthetase-Defekt weisen eine intermittierende Neutropenie möglicherweise als Folge der Azidose (Spielberg et al. 1979; Boxer et al. 1979) sowie eine toxische Hämolyse (Spielberg et al. 1979) auf. Patienten mit weniger schwerem Defekt benötigen in der Regel keine Therapie. Bei symptomatischen Patienten mit einem schweren GT-Synthetase-Mangel konnte ein positiver Effekt durch eine Therapie mit Vitamin-E oder *N*-Acetylcystein gezeigt werden (Boxer et al. 1979; Jain et al. 1994). Die Neutrophilen von Patienten mit GT-Synthetase-Defekt zeigten *in vitro* eine im Vergleich zur Kontrolle eingeschränkte Bakterizidie bei normaler Phagozytose und normaler Produktion von H_2O_2 (Boxer et al. 1979; Spielberg et al. 1979).

Eine signifikante Aktivitätsverminderung von Glutathion-Peroxidase in Neutrophilen wurde als verantwortlich für den Phänotyp der autosomal rezessiven Form der chronischen Granulomatose bei 3 Patienten angesehen (Quie et al. 1968; Holmes et al. 1970; Matsuda et al. 1976). Bei 2 dieser Patienten wurde zum späteren Zeitpunkt eine normale Glutathionaktivität gemessen und es konnte molekulargenetisch eine CGD gesichert werden. Daher sollte der GT-Peroxidase-Mangel nicht mehr als Ursache des CGD-Phänotyps angesehen werden (Newburger et al. 1994).

2.6.4 Der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD)-Mangel

Der G6PD-Mangel (MIM 305900) ist die häufigste angeborene klinisch signifikante Enzymopathie des Menschen (Beutler 1994; Luzzatto et al. 2001). G6PD ist ein zytoplasmatisches Enzym, das in allen Zellen vorhanden ist (Luzzatto & Battistuzzi 1985). G6PD katalysiert den ersten Schritt im Hexosemonophosphat-Shunt und produziert NADPH, was sowohl für eine Reihe

biosynthetischer Reaktionen als auch für die Stabilität von Katalase und die Bereitstellung von reduziertem Glutathion (GSH) notwendig ist (Abb. 2 und 3). Katalase und Glutathion (via Glutathion-Peroxidase) sind wichtig für die Detoxifikation von Hydrogen-Peroxid. Dieser Schutzmechanismus ist besonders wichtig für die mitochondrienfreien Erythrozyten, die durch das Fehlen weiterer NADPH-produzierender Enzyme besonders empfindlich gegenüber oxidativen Prozessen sind. Eine verminderte Enzymaktivität führt unter dem Einfluß von Oxidantien zur Hämolyse.

Es handelt sich um ein längst bekanntes Krankheitsbild. Die Synonyme Favismus und Primaquin-sensitive hämolytische Anämie beziehen sich auf dem Zusammenhang der Hämolyse mit dem Genuß von Favabohnen (*Vicia faba* = die Feldbohne, Saubohne, Fava) bzw. der Einnahme von Primaquin. Die Erstbeschreibung des Krankheitsbildes stammt von dem Portugiesen Manuel Pereira de Mira Franco im Jahr 1843, der bei einem 30jährigen Mann nach dem Genuß von Favabohnen wiederholt Gelbsucht beobachtete. Pythagoras, griechischer Mathematiker und Philosoph, untersagte seinen Schülern den Genuß von Saubohnen („κυάμων ἀπέχεσθαι“ - kyamon apechesthe: Saubohnen meiden). Es wird daher behauptet, daß Favismus bereits in der Antike bekannt war, wobei die Bedeutung dieser viel umstrittenen Aussage jedoch bis heute unklar bleibt (Meletis & Konstantopoulos 2004).

Die Identifizierung des verantwortlichen Enzyms durch Carson et al. (1956) war das Ergebnis der Suche nach der Ursache des hämolytischen Effektes von Primaquin innerhalb der Malaria-therapie in den 50er Jahren. Daraufhin wurde der G6PD-Mangel als Ursache anderer ungeklärter klinischer Manifestationen, wie z.B. Favismus, infektionsinduzierte Hämolyse und hereditäre chronische nichtsphärozytäre hämolytische Anämie, identifiziert.

Unter der Weltbevölkerung ist mit 400 Millionen Merkmalsträgern zu rechnen (Luzzatto et al. 2001). Die höchste Prävalenz (bis 35%) findet sich im tropischen Afrika, im Mittleren Osten, im tropischen und subtropischen Asien, in einigen Regionen des Mittelmeerraums und in Papua Neu Guinea (Abb. 7) (WHO Scientific Group 1967; WHO Working Group 1989). Die höchste bekannte Genfrequenz bezogen auf 0,67 (Cohen 1971; Oppenheim et al. 1993) wurde bei den in Kurdistan lebenden Juden beobachtet, bei denen etwa 50% der männlichen Bevölkerung betroffenen sind. In Mittel- und Nordeuropa ist der G6PD-Mangel mit einer Prävalenz von 0,1% selten (Beutler 2001; WHO Working Group 1989). In Südeuropa und im Mittelmeerraum ist die Häufigkeit mit einer breiten regionalen Variabilität höher (WHO Scientific Group 1967).

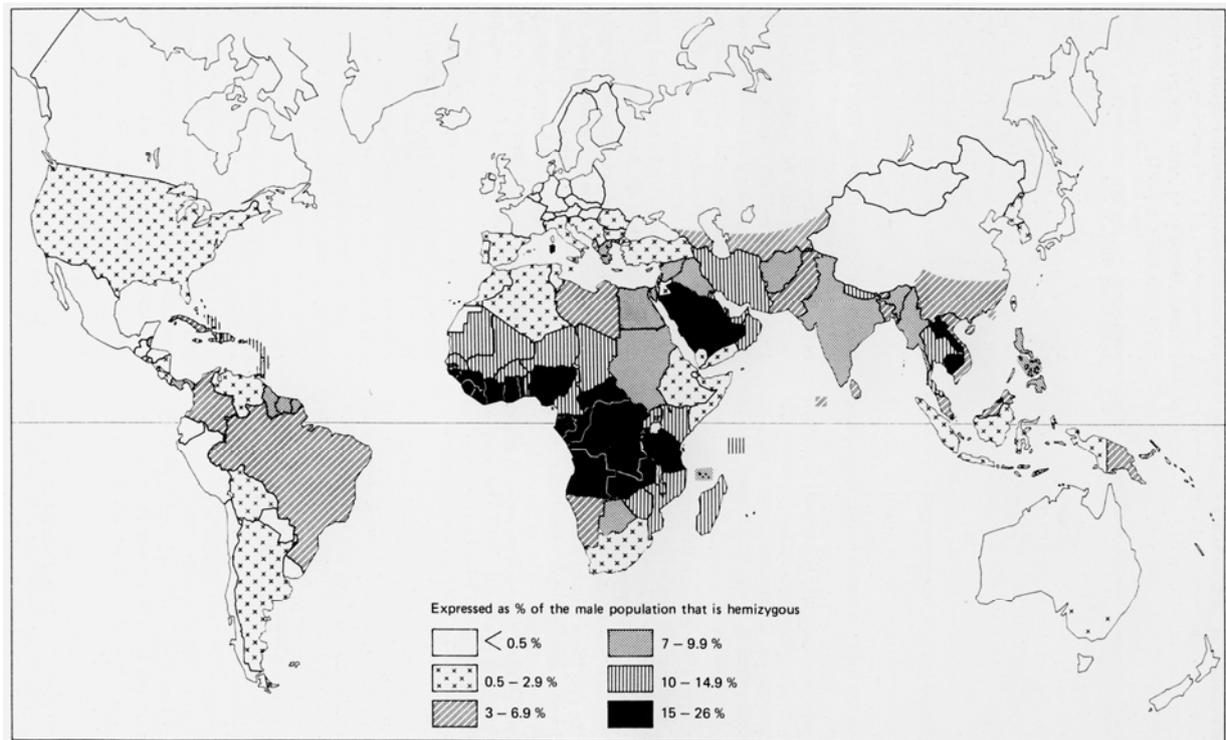


Abb. 7: Weltatlas: Prävalenz des G6PD-Mangels (WHO Working Group 1989)

Die geographische Verbreitung des Defektes entspricht weitgehend dem Verbreitungsgebiet der Malaria (Choremis et al. 1962; Luzzatto & Battistuzzi 1985; Beutler 1994), da nach klinischen Beobachtungen ein Selektionsvorteil für Träger der G6PD-Mangel-Erbanlage besteht. *In vitro* Untersuchungen sowie klinische Studien belegen den Selektionsvorteil der mit Malaria-Parasiten infizierten G6PD-defekten Erythrozyten gegenüber normalen Erythrozyten (Luzzatto et al. 2001).

In den letzten 30 Jahren wurden die molekulargenetische Basis des Enzymmangels und der klinische Zusammenhang weitgehend etabliert (für Übersicht: Luzzatto & Battistuzzi 1985; Beutler 2001; Luzzatto et al. 2001; Beutler & Vulliamy 2002).

Es handelt sich um ein genetisch heterogenes Krankheitsbild. Das kodierende Gen ist auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Xq28, Gene Bank Accession Code: AH003054) (Pai et al. 1980) lokalisiert (Abb. 8) und wurde erst von Persico et al. (Toniolo et al. 1984; Persico et al. 1986; Martini et al. 1986) und später von Takizawa et al. (1986) kloniert und sequenziert. Das G6PD-Gen besitzt 13 Exons und ist 18 kb lang (Martini et al. 1986).

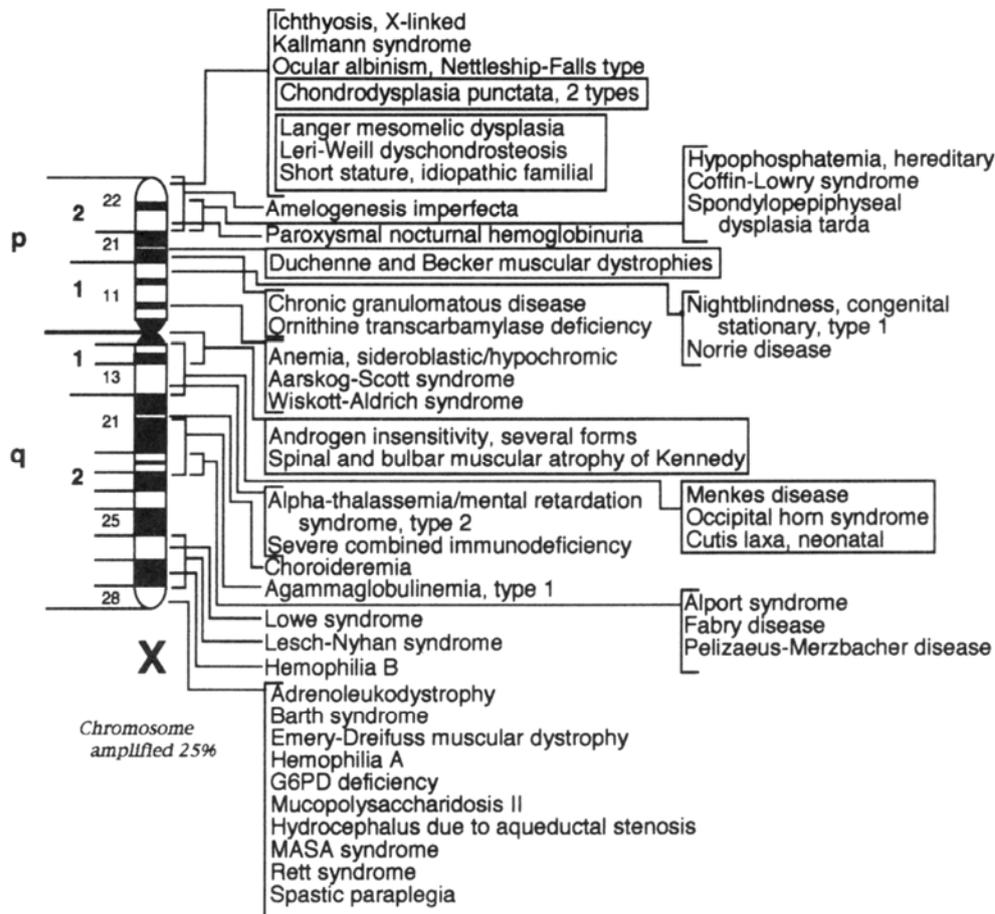


Abb. 8: X-Chromosom: Lokalisation der identifizierten Gene (Scriver et al. 2001)

Mehr als 140 verschiedene Mutationen sind bisher identifiziert worden (Beutler & Vulliamy 2002). Bei der Mehrzahl handelt es sich um Mutationen, welche zum Austausch einer Aminosäure führen und somit sog. „missense-Mutationen“ darstellen. Zu den wenigen Ausnahmen gehören sog. „small deletions“ (Klein-Deletionen), multiple Mutationen und eine „stop codon“-Mutation, die bei einer weiblichen heterozygoten Trägerin identifiziert worden ist (Xu et al. 1995). Bisher wurde keine Leserasterverschiebende Mutation dokumentiert (Beutler & Vulliamy 2002). Null-Mutationen sind nicht identifiziert worden. Ein totaler Enzymmangel ist ebenso nicht bekannt, obwohl in der frühen Literatur von „komplettem“ Fehlen des Enzyms berichtet wurde (Escobar et al. 1964). Es ist anzunehmen, daß das komplette Fehlen des Enzyms letal wäre (Luzzatto et al. 2001).

Die X-chromosomal rezessive Vererbung des Enzymdefektes ermöglicht verschiedene Ausprägungen. Weibliche Genträger können, je nachdem ob ein oder beide X-Chromosomen Träger

eines abnormen Gens sind, heterozygot oder homozygot erkranken. In Bevölkerungen mit hoher Genfrequenz ist der Homozygotenstatus bei Frauen nicht ungewöhnlich. Männliche Erbträger weisen bereits hemizygot eine Defizienz auf.

Der Enzymdefekt ist bei homozygoten weiblichen und hemizygoten männlichen Personen gleich stark ausgeprägt, obwohl im ersten Fall zwei und im zweiten nur ein Chromosom betroffen ist. Dieses Phänomen wird nach der Lyon-Hypothese (Lyon 1961, 1962) durch die Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen erklärt. Nach der Lyon-Theorie (besser als Lyon-Hypothese, da es sich inzwischen um ein gut dokumentiertes Phänomen der Entwicklungsbiologie handelt) erfolgt die Inaktivierung des X-Chromosoms in einem sehr frühen Stadium der embryonalen Entwicklung und gilt für alle Zellen des weiblichen Organismus (für Übersicht: Lyon 1962, 1968, 1972, 1992). Die Entscheidung, welches der beiden X-Chromosomen inaktiviert wird, folgt dem Zufall und ist irreversibel. Damit erklärt sich einerseits das Phänomen, daß heterozygote Frauen zwei unterschiedliche Erythrozytenpopulationen besitzen (Mosaik), d.h. es kommen Erythrozyten mit normaler und Erythrozyten mit defizienter Aktivität und nicht eine Zellpopulation mit intermediärer Aktivität vor. Andererseits wird damit auch die unterschiedliche Ausprägung des Defektes bei weiblichen heterozygoten Erbträgern sogar innerhalb einer Familie plausibel.

Das Verhältniss von normalen zu defekten Zellen, das im Idealfall 1:1 (d.h. 50% Enzymaktivität im Zellysat) betragen sollte, kann in der einen oder anderen Richtung verschoben sein. Somit ist im Extremfall die Expression des normalen (Filosa et al. 1996; Vulliamy et al. 1997a) oder des mutierten Allels (Miyazaki et al. 1976; Luzzatto et al. 1979; Mills et al. 1980; Williams et al. 1983, 1984; Johnston et al. 1985; Newburger et al. 1994; Roos et al. 1999; Rösen-Wolf et al. 2001; Lun et al. 2002; Anderson-Cohen et al. 2003) bei der Mehrzahl der Zellen möglich. Heterozygote Frauen können in solchen Fällen nahezu normale oder stark herabgesetzte Enzymaktivität aufweisen. Dieses Phänomen der extremen Lyonisierung kann familiär (Luzzatto et al. 1979; Roos et al. 1999) oder erworben (Hizeroth & Bender 1981; Johnston et al. 1985; Busque et al. 1996; Rösen-Wolf et al. 2001; Lun et al. 2002) auftreten. Es konnte gezeigt werden, daß der X-Inaktivierungsprozeß genetisch determiniert ist (Belmont 1996). Somit werden die familiären Formen erklärt. Bei den erworbenen Formen handelt es sich um eine Verschiebung der Lyonisierungsratio in bestimmtem Gewebe, wie das hämopoetische System, im Laufe des Lebens (Busque et al. 1996; Champion et al. 1997; Gale et al. 1997; Tonon et al. 1998). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen stellt die Zellselektion in somatischen Zellen, wie in hä-

mopoetischen Stammzellen (Abkowitz et al. 1998; Christensen et al. 2000; Vickers et al. 2001), zu einem Zeitpunkt nach der embryonalen X-Inaktivierung dar (Abb. 9).

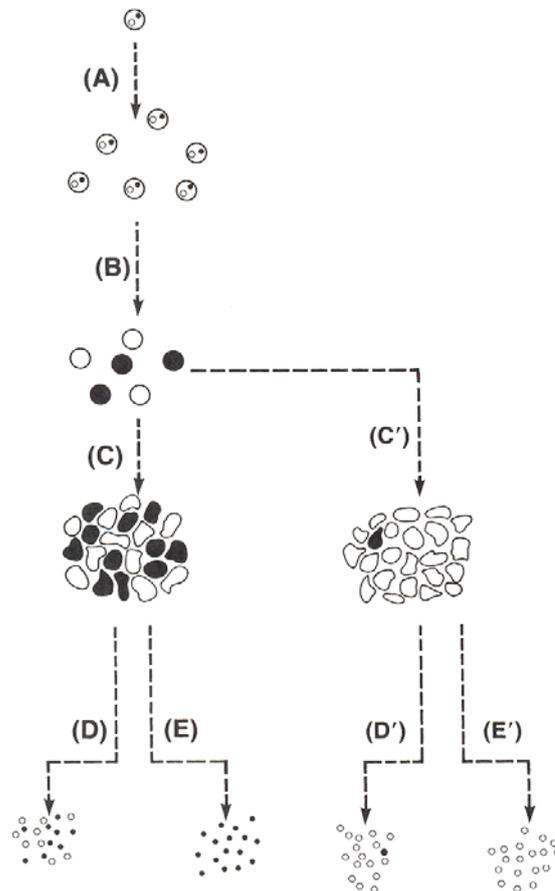


Abb. 9: X-Inaktivierung: schematische Darstellung (Luzzatto et al. 2001)

A. Embryonale Zellen vor der X-Inaktivierung. In allen Zellen werden beide Allele des X-Chromosoms exprimiert (schwarze und weiße Punkte). B. Inaktivierung eines der beiden Chromosomen in jeder Zelle führt zur Produktion von zwei Zellpopulationen. C. Gleichmäßige Proliferation beider Zelllinien führt zum Mosaik in allen Körpergeweben. C'. Ungleichmäßige Proliferation nach der X-Inaktivierung (somatische Zellselektion) führt zur Produktion einer homogenen Population. Das kann alle Körpergewebe oder einzelne Gewebe betreffen, wie z.B. beim selektiven Proliferationsvorteil für Zellen, die ein bestimmtes X-Gen exprimieren. D. Pathologische Gewebe (z.B. beim inflammatorischen Prozeß oder Wundheilung) weisen ebenso ein Mosaik auf. E. Pathologische Proliferation einer einzelnen Zelle (monoklonal) in Gewebe des Erwachsenen kann zur Produktion einer homogenen Population führen. D' und E'. Wenn die pathologische Proliferation aus einem Gewebe mit homogener Verteilung (z.B. C') ausgeht, ist die resultierte Zellpopulation ebenso homogen (monoklonal oder polyklonal).

Ähnlich wie bei den Hämoglobinopathien existiert eine Vielzahl von Varianten des G6PD-Moleküls, die nach dem Ort der Erstbeschreibung benannt wurden und mit unterschiedlicher Aktivitätsverminderung im Vergleich zur Aktivität des normalen G6PD-Moleküls einhergehen.

G6PD besteht in der aktiven Form entweder aus zwei oder aus vier (Dimer oder Tetramer) identischen Ketten. Jede Kette hat ein Molekulargewicht von 59,256 kDa und besteht aus 515 Aminosäuren (Beutler 1994; Luzzatto et al. 2001).

Nach den biochemischen Eigenschaften des Enzyms sind über 440 G6PD-Varianten beschrieben worden (Beutler 1994; Luzzatto et al. 2001). Es ist anzunehmen, daß die große Zahl dieser Varianten auf verschiedene Allelmutationen im G6PD-Gen zurückzuführen ist. Es sind außerdem bereits Mutationen mit Auswirkung ausschließlich auf die Struktur des Moleküls und nicht auf die Enzymaktivität beschrieben worden. Heute ermöglichen PCR (polymerase chain reaction)-Methoden die Identifizierung der G6PD-Varianten durch die Detektion von Mutationen. Mehr als 140 verschiedene Mutationen sind dokumentiert worden (Beutler & Vulliamy 2002). Interessanterweise ergab die Identifizierung der verantwortlichen Mutationen die gleiche Mutation für einige Enzymvarianten, die nach den biochemischen Eigenschaften als unterschiedlich charakterisiert worden waren und umgekehrt (Beutler & Vulliamy 2002).

Die G6PD-Varianten werden nach WHO je nach Enzymaktivität und klinischer Manifestation in 5 Klassen eingeteilt: Klasse I (schwerer Mangel assoziiert mit CNSHA), Klasse II (schwerer Mangel, <10% Restaktivität), Klasse III (moderater Mangel, 10-60% Restaktivität), Klasse IV (normale Enzymaktivität, 60-150%) und Klasse V (erhöhte Enzymaktivität) (WHO Working Group 1989).

Die häufigsten klinischen Manifestationen des Defektes sind der neonatale Ikterus und die akute hämolytische Anämie (Tab. 2). Der neonatale Ikterus kann zu einem Kernikterus führen, der einen letalen Ausgang oder schwere neurologische Komplikationen zur Folge haben kann (Doxiadis et al. 1960; Fessas et al. 1962; Doxiadis et al. 1964; Valaes et al. 1969). Die hämolytischen Krisen können durch Medikamenteneinnahme (u.a. Acetylsalicylsäure, Primaquin, Sulfonamide) (Beutler 1994; Luzzatto et al. 2001), durch Infektionen (Beutler 1994; Luzzatto et al. 2001) oder durch Ingestion von Favabohnen (Favismus) (Belsey 1973; Beutler 1994; Luzzatto et al. 2001) induziert werden. Favismus kann einen schweren und in manchen Fällen einen letalen Verlauf, insbesondere im Kindesalter, haben und ist mit einer individuellen Disposition und mit einer familiären Häufung verbunden (Stammatoyannopoulos et al. 1966; Kattamis et al. 1969a; Kattamis et al. 1969b; Belsey 1973; Missiou-Tsagaraki 1991). Der genaue Mechanismus

der Hämolyse ist nicht geklärt. Substanzen in Favabohnen wie die Pyrimidin-Aglykone Divicin und Isouramil werden als verantwortlich angesehen (Belsey 1973; Arese et al. 1989; Arese & De Flora 1990). Glücklicherweise sind die meisten Patienten mit G6PD-Mangel meist asymptomatisch mit Ausnahme der akuten hämolytischen Episoden.

Es gilt generell, daß der Mangel an G6PD nur bei den Erythrozyten eine signifikante klinische Bedeutung hat und daß der Enzymmangel in anderen Zellen keine klinisch signifikante phänotypische Ausprägung zeigt. Innerhalb dieser Regel gibt es wenige Ausnahmen. In Tabelle 3 sind die klinischen Manifestationen des G6PD-Mangels in anderen Zellen als Erythrozyten zusammengefaßt. Von besonderer klinischer Bedeutung sind der Enzymmangel in den Leukozyten, der mit einer Granulozytendysfunktion assoziiert sein kann und der neonatale Ikterus.

Eine seltene Manifestation mit besonderer klinischer Bedeutung stellt die chronische nichtsphärozytäre hämolytische Anämie (CNSHA, Klasse I-Defekt) dar, die bei extrem niedrigen Enzymaktivitätswerten in Erythrozyten auftritt. Es handelt sich um seltene Enzymvarianten, die im Gegensatz zu den meistens polymorphen G6PD-Varianten der anderen Klassen sporadisch auftreten, eine weltweite Verteilung haben und auf verschiedene Mutationen im G6PD-Gen zurückzuführen sind. Der neonatale Ikterus ist bei vielen Patienten die erste klinische Manifestation. Einige Patienten weisen Granulozytendysfunktion bei extrem niedrigen Werten in den Leukozyten auf. Der Schweregrad der chronischen Hämolyse weist eine breite Variabilität auf. In der Regel handelt es sich um eine milde kompensierte Hämolyse. Die Retikulozytenzahl ist erhöht (4-34%). Schwere akute hämolytische Krisen treten unter dem Einfluß exogener Faktoren, meistens nach Medikamenteneinnahme oder bei Infektionen auf. In einzelnen Fällen kann die chronische Hämolyse zu transfusionsbedürftiger Anämie führen. Regelmäßige Erythrozytentransfusionen sind selten nötig. Einige Patienten weisen eine Splenomegalie sowie Gallensteine auf (Luzzatto et al. 2001; Beutler 2001).

Tab. 2: Klinische Manifestationen des G6PD-Mangels (Luzzatto & Battistuzzi 1985)

<i>Häufig</i>	
Akute hämolytische Anämie	
Medikamentinduziert	
Infektionsinduziert	
Favismus	
Neonataler Ikterus	
<i>Selten</i>	
Chronische nichtsphärozytäre hämolytische Anämie	
Infektionsdisposition assoziiert mit Granulozytendysfunktion	
Interaktion mit Sichelzellanämie	

Tab. 3: G6PD-Mangel in anderen Zellen als Erythrozyten (Luzzatto et al. 2001)

Gewebe	Klinische Manifestation
<i>Blut</i>	
Leukozyten	
Granulozyten	Erhöhte Disposition an Infektionen
Lymphozyten	Vermutlich keine
Thrombozyten	Vermutlich keine
<i>Andere</i>	
Linsen	Katarakt
Leber	Prädisponierender Faktor für Hyperbilirubinämie z.B. neonataler Ikterus
Niere, Nebenniere, Myokard, Speicheldrüsen, Speichel	Vermutlich keine
Muskel	Myopathie (?)

2.6.4.1 Der G6PD-Mangel in Leukozyten

Obwohl G6PD durch das gleiche Gen in allen Zellen kodiert wird, sind die Enzymaktivitätswerte gewebespezifisch und weisen eine breite Variabilität auf (Battistuzzi et al. 1985). Bei gesunden Personen zeigen die Leukozyten eine höhere Enzymaktivität als die Erythrozyten (Ramot et al. 1959; Justice et al. 1966; Battistuzzi et al. 1985; Luzzatto & Battistuzzi 1985; Wolach et al. 2004). Bei G6PD-defizienten Personen weisen die Enzymaktivitätswerte in Leukozyten bzw. Neutrophilen eine breite Variabilität zwischen unmeßbaren Werten und Normbereich auf. Bei der Mehrzahl der Fälle liegt die Aktivität zwischen 20 und 75% des Normalwertes (Justice et al. 1966; Ramot et al. 1959; Chan et al. 1965; Tzortzidou-Stathopoulou et al. 1980; Schilirò et al. 1976), wobei normale Aktivität ebenso beschrieben ist (Marks et al. 1959).

Eine klinische Bedeutung entsteht bei einer Enzymaktivitätsabnahme in den Leukozyten unter 5% des Normalwertes und geht mit einem defekten Sauerstoffmetabolismus der Granulozyten

einher (Cooper et al. 1972; Baehner et al. 1972; Gray et al. 1973; Kahn et al. 1973; Vives Corrons et al. 1982; Mamlok et al. 1985, 1987; Roos et al. 1999; Costa et al. 2002; van Bruggen et al. 2002). Die Produktion von Sauerstoffmetaboliten in phagozytierenden Zellen ist ähnlich der CGD pathologisch. Klinisch weisen die Patienten neben einer chronischen nichtsphärozytären hämolytischen Anämie rezidivierende bakterielle und mykotische Infektionen auf. Die verantwortlichen Erreger entsprechen dem Spektrum der chronischen Granulomatose und sind in erster Linie Katalase-positive Bakterien aber auch andere opportunistisch pathogene Erreger, wie z.B. Pilze (Tab. 4). Dieser mit einem G6PD-Mangel assoziierte Granulozytendefekt tritt äußerst selten auf und ist bisher bei nur 16 Patienten beschrieben worden (Cooper et al. 1972; Baehner et al. 1972; Gray et al. 1973; Kahn et al. 1973; Vives Corrons et al. 1982; Mamlok et al. 1985, 1987; Roos et al. 1999; Costa et al. 2002; van Bruggen et al. 2002). In Tabelle 5 sind die klinischen Charakteristika der bisher beschriebenen Fälle zusammengefaßt.

Neutrophile mit einer Enzymaktivität über 15% des Normalwertes weisen einen normalen oxidativen Metabolismus und eine normale bakterizide Aktivität auf (Rodey et al. 1970; Baehner et al. 1972; Miller & Wollman 1974; Schilirò et al. 1976; Ardati et al. 1997). Für Werte zwischen 5 und 15% gibt es einen Bericht von Matsuura et al. (1983) über 2 Geschwister ohne Infektionsanfälligkeit mit einer G6PD-Aktivität von 6-7% in den neutrophilen Granulozyten. Beide Patienten zeigten Normalwerte für den qualitativen NBT-Test und die bakterizide Aktivität aber erniedrigte Werte für die Superoxidanion-Produktion, den Sauerstoffverbrauch und die Chemilumineszenz. Der quantitative NBT-Test war in einem erniedrigt. Wolach et al. (2004) haben zum ersten Mal eine positive Korrelation zwischen der G6PD-Aktivität, der HMP-Aktivität und der Superoxidanion-Produktion in Granulozyten von Patienten mit G6PD-Mangel gezeigt. In dieser Studie konnten weitere Patienten mit einem schweren G6PD-Mangel in Neutrophilen (<5% Aktivität) identifiziert werden, die interessanterweise keine Infektionsanfälligkeit aufwiesen.

Tab. 4: Erregerspektrum für schwere Infektionen bei dem schweren G6PD-Mangel in Granulozyten

<i>E. coli</i> (Cooper et al. 1972)
<i>K. pneumoniae</i> (Cooper et al. 1972)
<i>S. aureus</i> (Gray et al. 1973)
<i>Campylobacter jejuni</i> (Mamlok et al. 1987)
<i>C. violaceum</i> (Mamlok et al. 1985, 1987; van Bruggen et al. 2002)
<i>S. pneumoniae</i> (Roos et al. 1999)
<i>A. nidulans</i> (van Bruggen et al. 2002)

2.6.4.2 Therapie

Eine kausale Therapie des G6PD-Mangels ist nicht bekannt. Wichtig ist die Expositionsprophylaxe. Eine Vorbeugung der hämolytischen Krisen wird durch Vermeidung des auslösenden Agens sowie durch Bekämpfung von Infektionen erreicht. Die Hämolyse ist meistens selbstlimitierend und bedarf keiner Behandlung. Bei schwerer Anämie sind Erythrozytentransfusionen indiziert. Favismus kann schwer verlaufen, insbesondere im Kindesalter (Belsey 1973; Missiou-Tsagaraki 1991; Kattamis et al. 1969b). Besonders gefährlich ist der neonatale Ikterus (Kernikterus), der mit Austauschtransfusionen behandelt wird (Doxiadis et al. 1960; Fessas et al. 1962). Es gibt keine Angaben über den Einsatz einer prophylaktischen Therapie bei einer Granulozytendysfunktion. Infektionen sollten bei Patienten mit schwerem G6PD-Mangel und Granulozytendysfunktion mit intrazellulär wirksamen Antibiotika und/oder Antimykotika wie bei der chronischen Granulomatose mit besonderer Berücksichtigung der Hämolysegefahr behandelt werden.

Die CNSHA ist bei der Mehrzahl der Patienten mild und bedarf keiner Therapie. Folsäure wird häufig gegeben. Bei schwerer Hämolyse müssen Erythrozytenkonzentrate transfundiert werden. Regelmäßige Erythrozytentransfusionen sind selten nötig. Bei Eisenüberladung, eine ungewöhnliche Komplikation der CNSHA, ist eine Therapie mit Eisen-Chelatoren indiziert. In einzelnen Fällen mit schwerem Verlauf hat die Splenektomie einen positiven therapeutischen Effekt gezeigt (Forni et al. 1994; Luzzatto et al. 2001; Hamilton et al. 2004).

2.6.4.3 Labordiagnostik

Zum Zeitpunkt einer akuten Hämolyse kann die Diagnosestellung des G6PD-Mangels sehr schwierig sein, da nach Destruktion der Zellen mit niedriger Enzymaktivität, diejenigen mit relativ hoher Aktivität übrig bleiben.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität gibt es quantitative Methoden und Screening-Tests. Das methodische Prinzip der quantitativen Methoden besteht in einer spektrophotometrischen Messung der Reduktion oder Oxidation von Nikotinamid-Adenin-Nukleotiden in Anwesenheit von G6PD im Hämolysat (WHO Scientific Group 1967; Kornberg & Horecker 1955). Dieses wird bei 37°C mit einem Testgemisch aus Substrat und Hilfsreagenzien inkubiert, das so konzipiert ist, daß die zu bestimmende Enzymaktivität geschwindigkeitsbegrenzend für die Reaktion ist. Meßgröße ist die Konzentrationsänderung der Pyridinnukleotide NADP bzw. NADPH, die photometrisch erfaßt wird. Mit Hilfe standardisierter Formeln wird die Enzymaktivität berechnet. Für G6PD gibt es orientierende Screening-Tests (WHO Scientific Group 1967).

Für die spektrophotometrische quantitative Bestimmung des Enzyms ist ein entsprechendes Labor erforderlich. Für die Bestimmung in Entwicklungsländern sind einfache Screening-Methoden entwickelt worden. Einfache semiquantitative Screening-Methoden für die Identifizierung defizienter Männer und homozygot betroffener Frauen sind beschrieben worden (WHO Scientific Group 1967). Diese Methoden sind allerdings für die Detektion heterozygoter Frauen nicht geeignet.

Die unterschiedliche Enzymaktivität zwischen defizienten Männern bzw. homozygot defizienten Frauen und gesunden Personen kann mittels der spektrophotometrischen Messung der G6PD-Aktivität im Hämolysat bestimmt werden. Besonders schwierig ist die Identifizierung heterozygot betroffener Frauen, deren Enzymaktivitätswerte im Hämolysat je nach Lyonisierungsrate eine breite Variabilität aufweisen. Etwa 20% der heterozygot betroffenen Frauen können spektrophotometrisch nicht erfaßt werden (Fairbanks & Fernandez 1969). In dem Fall sind zytochemische Tests zur Bestimmung der G6PD-Aktivität im einzelnen Erythrozyt geeignet (Kleihauer & Betke 1963; Tönz & Rossi 1964; Fairbanks & Lampe 1968; Stuart et al. 1975; van Noorden et al. 1982). Außerdem eignen sich diese Tests zur Detektion heterozygot betroffener Frauen mit extremer Lyonisierung sowie G6PD-defizienter Patienten nach vor kurzem abgelaufener Hämolyse oder nach Bluttransfusion. Heute stellt die DNA-Diagnostik eine einfache, sichere und reproduzierbare Methode zur Identifizierung der Betroffenen dar (Beutler 1994).

Zum Teil äußert sich der G6PD-Mangel durch ein breites Spektrum an biologischen Funktionsstörungen mit charakteristischen Veränderungen von physikalisch-chemischen Eigenschaften. Hierbei reicht die alleinige Bestimmung der Enzymaktivität nicht aus, vielmehr müssen zusätzliche Parameter, z.B. Enzymkinetik, Enzymelektrophorese, pH-Optimum oder Thermostabilität zur Diagnose mit herangezogen werden. Im Jahr 1967 standardisierte ein WHO-Experten-Komitee die Methoden für die Isolierung und Charakterisierung der G6PD-Varianten (WHO Scientific Group 1967).

Tab. 5: Übersicht publizierter Patienten mit schwerem G6PD-Mangel und Granulozytendysfunktion: klinische Angaben

Publikation	Patient	Geschlecht	Alter (Jahre)	Klinische Manifestation
Cooper et al. 1972	P1	w	52	30J: Splenomegalie, leukämoide Reaktion, CNSHA 34J: Splenektomie Rezidivierende Infektionen der oberen Atemwege 46J: tiefe Cellulitis 49J: Bronchopneumonie 52J: Sepsis (<i>E. coli</i>), Rezidiv (<i>E. coli</i> + <i>Klebsiella pneumoniae</i>) mit tödlichem Verlauf
Baehner et al. 1972	P2	m	6	Keine Infektionen Milde kompensierte CNSHA (Retikulozytenzahl: 2-5%)
Gray et al. 1973	P3 [■]	m	17	4J: akute Hämolyse mit Hämoglobinurie nach Sulphamethazin-Gabe bei Infektion der oberen Luftwege 10J: Bronchopneumonie, CNSHA, Diagnose des G6PD-Mangels 13-18J: 12 Episoden zervikaler Lymphadenitiden (<i>S. aureus</i>) assoziiert mit milder Anämie und Ikterus
	P4 [■]	m	16	Neonataler Ikterus prolongatus Rezidivierende Infektionen der oberen Luftwege assoziiert mit leichter Anämie und Ikterus, CNSHA 8J: Diagnose des G6PD-Mangels 15J: zervikale Lymphadenitis
	P5 [■]	m	8	Nonataler Ikterus prolongatus Keine akute Hämolysen, keine Infektionen Kompensierte CNSHA (Retikulozytenzahl: 8,5%)
Kahn et al. 1973	P6 ^{■■}	m	25	Seit der Kindheit hämolytische Krisen auf dem Boden einer CNSHA, keine Infektionen
	P7 ^{■■}	m	n.a.	Moderate CNSHA, keine Infektionen
Vives Corrons et al. 1982	P8	m	34	Im Kindesalter rezidivierende Episoden mit Fieber, Ikterus und dunkel gefärbtem Urin sowie rezidivierende infektionen der oberen Atemwege Rezidivierende transfusionsbedürftige hämolytische Krisen, CNSHA 25J: Diagnose des G6PD-Mangels 3 Episoden bakterieller Pneumonien zwischen 25-34J
Mamlok et al. 1985, 1987	P9*	m	3	Schwerer neonataler Ikterus, hämolytische Krisen, 2J: Diagnose einer CNSHA bei Klasse I G6PD-Mangel 3J: <i>C. violaceum</i> -Sepsis mit tödlichem Verlauf
	P10*	m	3	Schwerer neonataler Ikterus, hämolytische Krisen, 2J: Diagnose einer CNSHA bei Klasse I G6PD-Mangel 3J: schwere <i>Campylobacter jejuni</i> -Gastroenteritis
Roos et al. 1999	P11	w	39	Schwerer neonataler Ikterus Rezidivierende hämolytische Krisen bei Einnahme von Aspirin im Rahmen von Infektionen Pneumokokken-Pneumonie, Zystitis Rezidivierende Infektionen der Luftwege Milde CNSHA
Costa et al. 2002	P12	m	5	Schwerer neonataler Ikterus Hämolytische Krisen vorwiegend bei Infektionen Rezidivierende Infektionen der Luftwege, Gastroenteritiden CNSHA mit erhöhter Retikulozytenzahl und Splenomegalie
van Bruggen et al. 2002	GH**	m	20	15J: disseminierte Aspergillose (<i>A. nidulans</i>) mit transfusionsbedürftiger Hämolyse Milde kompensierte CNSHA
	WH**	m	19	Neonataler Ikterus, hämolytische Krisen bei Infektionen, keine Infektionen Milde kompensierte CNSHA
	MtH**	m	11	Keine akute Hämolyse, keine Infektionen Milde kompensierte CNSHA
	MG	m	8	3J: <i>C. violaceum</i> -Sepsis mit Hämolyse Milde kompensierte CNSHA

m: männlich, w: weiblich, n.a.: nicht angegeben, J: Jahre, CNSHA: chronische nichtsphärozytäre hämolytische Anämie
[■], ^{■■}, *, ** Geschwister, * identische Zwillinge

Tab. 6: Übersicht publizierter Patienten mit schwerem G6PD-Mangel und Granulozytendysfunktion: laborchemischer Phänotyp, klinischer Phänotyp und Genetik

Patient	G6PD-Aktivität		„oxidative burst“	Klinische Manifestation		G6PD-Variante	Mutation
	RBC	PMN / WBC		Hämolyse	Infektionen		
P1	erniedrigt [■]	0% WBC <1% PMN	p	CNSHA	+		
P2	erniedrigt	5% PMN	p	CNSHA	-		
P3	0%	0% WBC	p	CNSHA	+		
P4	0%	0% WBC	p	CNSHA	+		
P5	0%	0% WBC	p	CNSHA	-		
P6 ^{■■}	0%	<5% PMN <5% WBC	p	CNSHA	-	Benaventolike	
P7 ^{■■}	0%	<5% PMN <5% WBC	p	CNSHA	-	Benaventolike	
P8	0%	2% WBC	p	CNSHA	+	Barcelona	
P9*	0%	n.d.	n.d.	CNSHA	+		
P10*	0%	3,5% PMN	p	CNSHA	+	Baumont	
P11	0%	3-4% PMN <3% WBC	p	CNSHA	+	Volendam	heterozygot: 514 C→T, 172 Pro→Ser
P12	0%	0% PMN	p	CNSHA	+		
GH	0%	0% PMN	p	CNSHA	+	Amsterdam	180-182 - Deletion, 61: Fehlen von Leucin
WH	0%	0% PMN	p	CNSHA	-	Amsterdam	180-182 - Deletion, 61: Fehlen von Leucin
MtH	0%	0% PMN	p	CNSHA	-	Amsterdam	180-182 - Deletion, 61: Fehlen von Leucin
MG	0%	0% PMN	p	CNSHA	+	Amsterdam	180-182 - Deletion, 61: Fehlen von Leucin

■ 36% der Kontrolle, aber nach Erythrozytentransfusion. Die G6PD-Aktivität in den Erythrozyten der Patientin sollte signifikant niedriger sein.

■■ Geschwister; ein klinisch asymptomatischer Bruder mit gleich schwerem G6PD-Mangel in RBC wurde nicht eingeschlossen, weil es keine Angaben über die Granulozytenfunktion gibt.

* identische Zwillinge

p: pathologisch

n.d.: nicht untersucht

CNSHA: chronische nichtsphärozytäre hämolytische Anämie

RBC: Erythrozyten, WBC: Leukozyten, PMN: Granulozyten bzw. Neutrophile

Tab. 7: Übersicht publizierter Patienten mit schwerem G6PD-Mangel und Granulozytendysfunktion: Neutrophilenfunktion

Patient	Methode	„oxidative burst“	
			Ergebnis
P1	NBT-Test quantitativ H ₂ O ₂ -Produktion	0%	erniedrigt
P2	H ₂ O ₂ -Produktion		erniedrigt
P3	NBT-Slide-Test	<1%	
P4	NBT-Slide-Test	<1%	
P5	NBT-Slide-Test	<1%	
P6	NBT-Slide-Test	21%	
P7	NBT-Slide-Test	17%	
P8	NBT-Slide-Test NBT-Test quantitativ O ₂ ⁻ -Produktion	10%	erniedrigt erniedrigt
P9*	n.d.	n.d.	
P10*	NBT-Slide-Test NBT-Test quantitativ Chemilumineszenz	4%	15% der Kontrolle erniedrigt
P11	H ₂ O ₂ -Produktion O ₂ -Verbrauch		erniedrigt erniedrigt
P12	DHR-Test		erniedrigt
GH	NBT-Slide-Test DHR-Test O ₂ -Verbrauch O ₂ ⁻ -Produktion	100% schwach positiv	erniedrigt erniedrigt erniedrigt
WH	NBT-Slide-Test DHR-Test O ₂ -Verbrauch	44% positiv, 56% schwach positiv	erniedrigt erniedrigt
MtH	NBT-Slide-Test DHR-Test O ₂ -Verbrauch O ₂ ⁻ -Produktion	20% positiv, 80% schwach positiv	erniedrigt erniedrigt erniedrigt
MG	NBT-Slide-Test DHR-Test O ₂ -Verbrauch	100% schwach positiv	erniedrigt erniedrigt

NBT-Slide-Test: Ergebnis als % der Formazan-positiven Zellen angegeben.

* identische Zwillinge

3 PATIENTEN UND METHODEN

3.1 PATIENTEN

3.1.1 Familie H - Klinische Angaben

Patient GH wurde 1981 geboren. Er ist der zweite von 4 Söhnen deutscher Eltern. Bis zum Alter von 15 Jahren war er gesund. Anamnestisch gab es keine Infektionsanfälligkeit, keinen Ikterus in der Neugeborenenperiode oder in späteren Zeiten und keine akute Hämolyse. Im Alter von 15 Jahren traten bei ihm während eines Praktikums als Tierpfleger im Zoo rezidivierendes Fieber, Gastroenteritis, Husten und Appetitlosigkeit auf. Der Allgemeinzustand war dabei reduziert. Es wurden eine Gastroenteritis und eine Infektion der Luftwege diagnostiziert. Dabei fiel eine Anämie sowie eine leichte intermittierende Hyperbilirubinämie [Hb-Werte: 10-12g/dl, gesamt Bilirubin um 1,5mg/dl (Normbereich bis 1,0mg/dl)] auf. Die Transaminasen lagen im Normbereich. Im linken Oberschenkel trat eine knotige Hautveränderung von ca. 3cm Durchmesser auf, die operativ entfernt wurde. In der Biopsie wurde eine teils nekrotische, teils abszedierende entzündliche Weichteil-Infiltration mit Eosinophilie nachgewiesen. Die mikrobiologische Untersuchung war positiv für Schimmelpilze.

Kurz nach dem operativen Eingriff erfolgte eine stationäre Aufnahme wegen mehrerer generalisierter Krampfanfälle. Es wurde eine disseminierte invasive Aspergillose mit Beteiligung der Lunge, des Zentralnervensystems und der Weichteile (Haut-Muskel) festgestellt. Die bildgebende Diagnostik [Schädel- und Thorax-CT (Computertomographie)] zeigte einen hochparietal rechtsseitig gelegenen Rundherd mit einem Durchmesser von etwa 2cm, eine 3cm große Raumforderung im rechten Hilus sowie Infiltrate im rechten Unterlappen. Im Verlauf entwickelte sich eine zervikale Querschnittsymptomatik als Folge eines zervikalen epiduralen Empyems. In mehreren Wundabstrichen (Oberschenkel, Gesäß) sowie im Punktat eines Ileopsoas-Abszesses und im Material des epiduralen Empyems wurde *Aspergillus nidulans* nachgewiesen.

Die Infektion wurde zunächst erfolgreich über 2 Monate mit Amphotericin B und Flucytosin gefolgt von liposomalem Amphotericin B und Itraconazol behandelt. Die mit der Infektion assoziierte hämolytische Anämie bedurfte mehrerer Erythrozytentransfusionen.

Der Patient erhielt im weiteren Verlauf eine orale Therapie mit Itraconazol in therapeutischer Dosierung über 2 Jahre und in prophylaktischer Dosierung über 1 Jahr. Daraufhin sind innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 4 Jahren ohne antibiotische und antimykotische Prophylaxe keine weiteren Infektionen aufgetreten.

Die neurologische Symptomatik (Hypertonie) der unteren Extremitäten besserte sich nach intensiver Physiotherapie sowie operativen Maßnahmen.

Im infektionsfreien Intervall liegen die Hämoglobin-Werte zwischen 11,2 und 14g/dl, das Gesamt-Bilirubin zwischen 1,6 und 3,1mg/dl (Normbereich bis 1,0), der Haptoglobin-Wert zwischen 29 und 44mg/dl (Normalwerte: 40-270) und die Retikulozytenzahl zwischen 75 und 99⁰/₀₀. Die absolute Neutrophilenzahl im peripheren Blut liegt im Normbereich.

Familienanamnese:

GH hat drei Brüder (MfH geb. 1977, WH geb. 1982 und MtH geb. 1990). Beim Bruder WH ist ein G6PD-Mangel der Erythrozyten bekannt, der klinisch durch einen neonatalen Ikterus und hämolytischen Krisen im Rahmen von banalen Infektionen manifest wurde. Es besteht keine vermehrte Infektionsanfälligkeit. Im infektionsfreien Intervall weist er eine erhöhte Retikulozytenzahl bei normalen Hämoglobin- und Hämatokrit-Werten auf (Retikulozyten: 32⁰/₀₀, Hb: 14,5g/dl, Hkt: 42%). Die weiteren 2 Brüder MtH und MfH sind klinisch gesund. MtH weist ebenso im infektionsfreien Intervall erhöhte Retikulozytenzahlen bei normalen bis leicht erniedrigten Hämoglobin- und Hämatokrit-Werten auf (Retikulozyten: 56⁰/₀₀, Hb: 12.9g/dl, Hkt: 39.4%). MfH hat normale Blutbild-Werte.

Beide Eltern sind gesund. Die Mutter AH weist erhöhte Retikulozytenzahlen bei normalen Hämoglobin- und Hämatokrit-Werten auf (Retikulozyten: 39⁰/₀₀, Hb: 13.5g/dl, Hkt: 40.5%). In der maternalen Familie sind alle Personen gesund (siehe Stammbaum in Abbildung 17).

3.1.2 Familie G - Klinische Angaben

Patient MG wurde 1993 geboren und ist der einzige Sohn indischer Eltern (aus Hindustan). Bis zum Alter von 3,5 Jahren war er gesund. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte eine stationäre Aufnahme aufgrund von Fieber, Husten, Tachypnoe und Tachykardie. Es wurde eine Pneumonie diagnostiziert. Die Röntgen-Aufnahme der Lunge zeigte eine Infiltration rechts basal. In der Blutkultur wurde *Chromobacterium violaceum* nachgewiesen. Zusätzlich fiel eine Anämie (Hb: 7,5g/dl) auf, die zunächst auf die Sepsis zurückgeführt wurde. Die initiale Behandlung mit Cephalosporin wurde nach Antibiogramm auf Meropenem für weitere 14 Tage umgestellt. Es zeigte sich dadurch eine deutliche klinische Besserung. Die laborchemischen Entzündungsparameter normalisierten sich, wobei die Anämie weiterhin persistierte. Einen Tag nach Absetzen der antibiotischen Therapie erfolgte ein Rückfall hinsichtlich der Sepsis. In der Blutkultur wurde erneut *Chromobacterium violaceum* nachgewiesen. In der MRT (Magnetresonanztomographie) wurden

osteomyelitische Veränderungen des Wirbelkörpers Th10 nachgewiesen. Eine intravenöse antibiotische Therapie mit Meropenem und Ciprofloxacin für 28 Tage gefolgt von oraler Gabe von Ciprofloxacin für weitere 2 Wochen führte zur Beseitigung der Infektion.

Im folgenden Beobachtungszeitraum von 4 Jahren blieb der Patient ohne eine prophylaktische antibiotische Therapie infektionsfrei.

Im infektionsfreien Intervall liegen die Hb-Werte zwischen 9,7 und 11,3g/dl, die Haptoglobin-Werte zwischen 20 und 30mg/dl (NW: 40-180), die Retikulozytenzahl zwischen 35 und 67⁰/₁₀₀ und das Gesamt-Bilirubin um 1,16mg/dl (Normbereich bis 1,0). Die absolute Neutrophilenzahl im peripheren Blut liegt im Normbereich.

Familienanamnese:

MG ist das einzige Kind gesunder Eltern. In der maternalen Familie sind alle Personen gesund.

3.2 METHODEN

3.2.1 Untersuchungsmaterial

Für die Laboruntersuchungen wurde peripheres Vollblut je nach angewendetem Test entweder mit Heparin (Natrium-Heparin ohne Konservierungsmittel, 10 IU/ml) oder mit EDTA (ethylenediamine tetra-acetate) versetzt.

3.2.2 Isolierung der Zellen

Die Isolierung der Granulozyten (für folgende Bestimmungen: Cytochrom *b*-Spektrum, Cytochrom *b*-Expression mittels 7D5-Antikörper, NBT-Test, O₂⁻-Produktion, Chemotaxis und MPO-Färbung) erfolgte aus heparinisiertem Blut über Dextran und Ficoll. Drei Teile Blut wurden mit einem Teil 3%igem Dextran (Dextran T 500, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala Sweden, 3g in 100ml 0,9 NaCl) gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der nach Aggregation und Sedimentation der Erythrozyten gebildete Überstand wurde vorsichtig über Ficoll (Biochrom, Berlin) geschichtet und 20 Minuten bei 2000 Umdrehungen/Minute (U/Min) zentrifugiert. Die im Pellet mit den Granulozyten abgesunkenen Erythrozyten wurden mit Aqua bidest. lysiert. Die Zellen wurden anschließend mit HBSS (Hank's balanced salts solution) ohne Phenolrot (Biochrom, Berlin) gewaschen und auf die gewünschte Konzentration je nach Testverfahren eingestellt.

Für den DHR-Test wurden Leukozyten im autologen Serum verwendet. Die Isolierung erfolgte aus heparinisiertem Blut nach Entfernung der Erythrozyten durch Sedimentation mittels der Hi-

stopaque-Methode (Rothe 1994). Mit einer Pasteur-Pipette wurden je 2ml heparinisieretes Blut auf 3ml Histopaque-1077 (Polysucrose-Natriumdiatrizoat-Lösung, Dichte 1,077g/ml) geschichtet. Bei dieser Methode bildet sich nach Sedimentation der Erythrozyten (ohne Zentrifugation) durch Aggregation an der Grenzfläche bei Raumtemperatur nach 30-40 Minuten ein klarer Plasmaüberstand, der ca. 2×10^7 unseparierte Leukozyten pro ml sowie Thrombozyten enthält. Die oberen 0,8ml des Plasmaüberstandes wurden abgezogen und in Eis gestellt. Der Vorteil der Methode ist, daß der Plasmaüberstand nicht mit dem Medium kontaminiert ist und daher auf das nachfolgende Waschen der Zellen verzichtet werden kann.

Die Erythrozyten wurden aus EDTA-Blut mittels Zentrifugation (2000 U/Min für 10 Minuten) bei Raumtemperatur gefolgt von Aspiration des Überstandes (Plasma und „buffy coat“) isoliert. Die Zellen wurden anschließend 3 mal mit 0,154M Saline gewaschen (Loos et al. 1976).

Die Leukozyten wurden aus EDTA-Blut mittels Zentrifugation, Aspiration des Plasmaüberstandes und Lysis der Erythrozyten mit isotonischer NH_4Cl -Lösung isoliert (Weening et al. 1974).

Die Lymphozyten und die neutrophilen Granulozyten (für die Bestimmung von O_2 -Verbrauch und G6PD-Enzymaktivität) wurden aus Leukozyten mittels Zentrifugation über isotonischem Percoll isoliert.

Die neutrophilen Granulozyten (für die *E. coli*-Bakterizidie) wurden aus EDTA-Blut mittels Zentrifugation über Ficoll-Isopaque (Dichte 1,077g/ml) und anschließender Lysis der Erythrozyten mit isotonischer NH_4Cl -Lösung isoliert (Weening et al. 1974).

3.2.3 Methodenbeschreibung

3.2.3.1 G6PD-Aktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der G6PD-Aktivität in Erythrozyten und Granulozyten erfolgte mittels einer modifizierten Methode von Kornberg und Horecker (Kornberg & Horecker 1955).

3.2.3.2 NBT-Test

Die intrazelluläre O_2^- -Produktion der Neutrophilen wurde durch den Nitroblautetrazolium-Test (NBT-Slide-Test), eine semiquantitative zytochemische Methode, bestimmt (Preisig & Hitzig 1971). Eine maximale Aktivierung der Zellen erfolgte durch PMA oder *Candida*.

Zur Vorbereitung der resultierenden PMA-Arbeitslösung (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurden zu der vorportionierten Stammlösung von PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) (Sigma, Deisenhofen) [10 μl ,

2mg/ml in DMSO (dimethylsulfoxide)] 990µl HBSS (Hank's balanced salts solution) ohne Phenolrot (Biochrom, Berlin) hinzugegeben. NBT (Nitroblautetrazolium) (Serva, Heidelberg) wurde in Sörensen-Puffer (1mg/ml) gelöst. *Candida albicans* wurde 24-48 Stunden in Nähr-Bouillon bei 37°C bebrütet und danach zentrifugiert, 2 mal in NaCl gewaschen, 10 Minuten autoclaviert, nochmals zentrifugiert, 2 mal in NaCl gewaschen, mit McFarland-Standard auf ca. 5×10^8 /ml eingestellt und in Portionen eingefroren.

Die isolierten Granulozyten wurden auf 1×10^7 eingestellt. Für den Testansatz wurden 250µl ($2,5 \times 10^7$ Zellen) mit Albumin-Sörensen-Puffer [15mg Humanalbumin (Behring, Marburg) in 100ml Sörensen-Puffer, pH 7,2] gewaschen und zentrifugiert.

Für den Ansatz mit *Candida* wurden 250µl abzentrifugierte Granulozyten ($2,5 \times 10^7$ Zellen) mit 100µl Patienten- bzw. Kontroll-Serum, 200µl NBT-Lösung und 100µl *Candida* gemischt. Für den Ansatz mit PMA wurden 250µl abzentrifugierte Granulozyten ($2,5 \times 10^7$ Zellen), 200µl NBT-Lösung und 50µl PMA gemischt.

Nach Inkubation der Proben über 15 Minuten bei 37°C auf dem Schüttler wurden Ausstriche angefertigt. Die luftgetrockneten Ausstriche wurden mit Methanol fixiert und 10 Minuten mit einer 2%igen Methylgrünlösung zur Anfärbung der Zellkerne behandelt.

Die Auswertung erfolgte im Mikroskop. Es wurden 100 segmentkernige Granulozyten gezählt. Das Ergebnis wurde als Prozentzahl der Zellen mit intrazellulärem Nachweis von blauem Formazan angegeben. Die Farbintensität wurde als positiv, schwach positiv oder negativ angegeben. Eine gesunde Testperson wurde zur Kontrolle mitgetestet.

3.2.3.3 DHR-Test

Die quantitative Bestimmung der intrazellulären H₂O₂-Produktion in PMA-stimulierten Granulozyten erfolgte durchflußzytometrisch mittels Dihydrorhodamin-123 (Rothe et al. 1991; Rothe et al. 1994).

Als Reagenzien wurden Dihydrorhodamin (DHR)-123 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) (Sigma, Deisenhofen), DMF (dimethylformamide) (Sigma, Deisenhofen), SNARF-1/AM (carboxy-seminaphthorhodafluor-1 acetoxymethyl ester) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) und PBS (phosphate-buffered saline, PBS-Dulbecco) mit Ca, Mg (Biochrom, Berlin) verwendet.

Aus den vorportionierten Stammlösungen von DHR (100µl, 1,1mM in DMF), PMA (10µl, 1mM in DMF) und SNARF-1/AM (10µl, 1mM in DMF) wurden durch Zugabe von je 1ml PBS

die resultierenden Arbeitslösungen (DHR 100 μ M; PMA: 10 μ M; SNARF-1/AM: 10 μ M) präpariert.

In Polypropylenröhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg) wurde je 1ml PBS zugegeben und im Blockthermostat auf 37°C gestellt. Nach 10 Minuten folgte die Zugabe von je 20 μ l der isolierten Leukozytensuspension und je 10 μ l Arbeitslösung von DHR (Endkonzentration 1 μ M), 10 μ l PMA (Endkonzentration 0,1 μ M) und 10 μ l SNARF (Endkonzentration 0,1 μ M). Nach 25 Minuten Inkubation der Zellen wurde die Stimulation durch Stellen der Proben ins Eiswasserbad beendet.

Die aus der Oxidation von DHR-123 durch H₂O₂ zu Rhodamin (RH)-123 resultierende Grünfluoreszenz (510-530nm) sowie die Orangefluoreszenz (575-595nm) bei SNARF-1-Färbung der Zellen wurden im Durchflußzytometer (Beckton Dickinson, Heidelberg) simultan mit der zellulären Vorwärts- (Forward Scatter, FSC) und Seitlichstreuung (Side Scatter, SSC) analysiert. Die Abgrenzung lebender Leukozyten von Erythrozyten oder Thrombozytenaggregaten wurde anhand der in lebenden Zellen vorhandenen intrazellulären Spaltung von nichtfluoreszenten SNARF-1/AM zu SNARF-1-Orangefluoreszenz ermöglicht.

In Neutrophilen mit normalem oxidativen Metabolismus bewirkt die maximale Stimulation mit PMA einen über 200fachen Intensitätsanstieg der grünen Fluoreszenz (500-540nm) (Rothe et al. 1991; Rothe et al. 1994). Die Methode erlaubt eine quantitative Bestimmung der Wasserstoffperoxidproduktion in der einzelnen Zelle. Eine sichere Abgrenzung von Subpopulationen mit unterschiedlicher H₂O₂-Produktion ist gewährleistet. Das Ergebnis wurde als Mittelwert der Fluoreszenzintensität (entspricht der H₂O₂-Produktion) der Neutrophilen angegeben. Bei Zellpopulationen mit unterschiedlicher H₂O₂-Produktion wurde zusätzlich der prozentuale Anteil der Zellen angegeben.

Als Negativkontrolle wurde eine Probe ohne Stimulus und als Positivkontrolle Zellen einer gesunden Testperson mitgetestet.

3.2.3.4 Superoxidanion-Produktion

Die intrazelluläre Produktion von O_2^- in stimulierten Granulozyten wurde photometrisch mittels der Reduktion des Cytochroms *c* bestimmt. Für die Vorbereitung aller Lösungen wurde HBSS ohne Phenolrot (Biochrom, Berlin) verwendet.

Cytochrom *c* (Sigma, Deisenhofen) wurde in HBSS gelöst (12,8mg/ml) und bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt. PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) (Sigma, Deisenhofen) wurde in DMSO (dimethylsulfoxide) (Serva, Heidelberg) (2mg/ml) gelöst und in 10µl Portionen eingefroren. Für den Ansatz wurde die vorportionierte Stammlösung in HBSS gelöst [10µl in 990µl HBSS (=20µg/ml)] und bei 4°C aufbewahrt. fMLP (formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine) (Sigma, Deisenhofen) wurde in DMSO gelöst [50mg in 1140µl (=10⁻¹Mol/l)] und in 10µl Portionen eingefroren. Für den Ansatz wurde die vorportionierte Stammlösung in HBSS gelöst [10µl in 990µl HBSS (=10⁻³Mol/l)] und bei 25°C aufbewahrt.

Die isolierten Granulozyten wurden auf eine Zellzahl von 1x10⁷ Zellen/ml in HBSS eingestellt. Für den Ansatz mit PMA wurden zu 875µl HBSS 25µl Granulozytensuspension, 50µl PMA und 50µl Cytochrom *c* zugefügt. Für den Ansatz mit fMLP wurden zu 915µl HBSS 25µl Granulozytensuspension, 10µl fMLP und 50µl Cytochrom *c* zugegeben. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Stimulus (PMA bzw. fMLP) getestet. Eine gesunde Testperson wurde zur Kontrolle mitgetestet.

Die Proben wurden 1 Stunde lang bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert und anschließend 5 Minuten lang ins Eiswasserbad zur Beendigung der Stimulation gestellt. Danach wurden sie 5 Minuten bei 4000 U/Min zentrifugiert.

In einem Photometer wurde die Extinktion des Überstandes bei 550nm gegen Luft gemessen. Das Ergebnis (in Mol/l) wurde als das Resultat der Extinktion der Probe nach Abzug der Extinktion des Leerwertes multipliziert mit dem Faktor 47,4 angegeben.

3.2.3.5 Sauerstoffverbrauch

Es wurde der Sauerstoffverbrauch während der „respiratory burst“-Reaktion neutrophiler Granulozyten gemessen (Weening et al. 1974).

Isolierte Neutrophile wurden in einem Medium bestehend aus 138mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄, 0,6mM CaCl₂, 1,0mM MgCl₂, 5,5mM Glucose und 0,5% (wt/vol) Humanalbumin (pH 7.4) suspensiert. Die Stimulation der Granulozyten erfolgte mittels opsonierten Zymosan-Partikeln oder PMA. Der Sauerstoffverbrauch wurde polarographisch

mittels einer Sauerstoffelektrode gemessen (Weening et al. 1974). Das Ergebnis wurde in $\text{nM}/10^6$ Granulozyten pro Minute angegeben.

3.2.3.6 Bakterizidie

Die bakterizide Aktivität (Phagozytose - Perforation der Zellwand - Abtötung von *E. coli*-Bakterien) der neutrophilen Granulozyten wurde nach bereits beschriebener Methode durchgeführt (Hamers et al. 1984). Für den Testansatz wurden isolierte Neutrophile mit opsonierten *E. coli*-Bakterien in einem Neutrophilen-zu-Bakterien Verhältnis von 1:10 inkubiert. Die Kinetik für die Phagozytose, die Perforation der Bakterienzellwand sowie die Inaktivierung bakterieller Proteinen erfolgte mittels der β -Galaktosidase-Aktivitätsmessung.

Die Auswertung erfolgte mittels eines Computer-Programms nach einem mathematischen Modell. Das Ergebnis wurde mit einem Wert für die Phagozytose (k_1), einem Wert für die Perforation (k_2) und einem Wert für die Bakterien-Inaktivierung (k_3) angegeben. Eine gesunde Testperson wurde zur Kontrolle mitgetestet.

3.2.3.7 Cytochrom *b*-Expression - Spektrumanalyse

Der Nachweis von Cytochrom *b* erfolgte mittels der spektrophotometrischen Analyse (Segal et al. 1983).

Die isolierten Granulozyten wurden in HBSS ohne Phenolrot (Biochrom, Berlin) auf eine Endkonzentration von mindestens 2×10^7 Zellen/ml suspensiert. In Eppendorfgläsern wurde je 1ml der Zellsuspension abpipettiert und 10 Minuten bei 12000 U/Min zentrifugiert. Zu Pellet wurden 0,4ml Tris-Puffer (50mM, pH 8,0) und 0,5ml 2%iges Triton X-100 (Serva, Heidelberg) in Tris-Puffer (50mM, pH 8,0) zugegeben. Die Proben wurden 30 Minuten lang bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation (10 Min bei 12000 U/Min) wurde der Überstand (ca. 1ml) zur Messung entnommen. Vor der Messung wurden einige Körnchen Natriumdithionit (Merck, Darmstadt) zugegeben. Der Leerwert wurde mit einer Probe ohne Natriumdithionit bestimmt. Eine gesunde Testperson wurde zur Kontrolle mitgetestet.

Die Messung erfolgte mit einem Spektralphotometer (Fa Gilford). Es wurde der „peak“ zwischen 425 und 428nm ausgewertet (Metcalf et al. 1986). Das Ergebnis wurde in $\text{pMol}/10^6$ Zellen angegeben.

3.2.3.8 Cytochrom *b*-Expression - Nachweis mittels monoklonaler 7D5-Antikörper

Die Expression des Cytochrom *b* wurde durchflußzytometrisch (Emmendorffer et al. 1991) mittels monoklonaler 7D5-Antikörper (Maus-IgG1-Isotyp) (Nakamura et al. 1987) gegen die membrangebundene gp91*phox* Untereinheit (Yamauchi et al. 2001; Burritt et al. 2001) bestimmt.

Die isolierten Granulozyten wurden auf 2×10^7 in PBS (Dulbecco) (Biochrom, Berlin) ohne Ca, Mg zu 0,02% Natriumazid eingestellt.

Zur Markierung von Granulozyten wurden anti-Leu M1-Antikörper (CD15) (Becton Dickinson, Heidelberg) und zur Markierung von Monozyten anti-Leu M3-Antikörper (CD14) (Becton Dickinson, Heidelberg) verwendet. Die Zellen wurden mit 7D5-Antikörpern oder Maus-IgG1-Antikörpern (Coulter, Miami, FL, USA) (als Kontrolle für die nicht spezifische Bindung von IgG1 in Zellen) inkubiert. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei 4°C wurden die Zellen mit PBS/Azid (PBS ohne Ca und Mg + 0,02% Natriumazid) gewaschen und danach mit DTAF (dichlorotriazinyl-amino-fluorescein)-konjugierten F(ab')₂-Fragmenten Ziege-anti-Maus-IgG+IgM (H+L)-Antikörpern (Dianova, Hamburg) 30 Minuten lang bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS/Azid gewaschen, mit 1% Paraformaldehyd in PBS fixiert und im FACScan analysiert. Das Ergebnis wurde als Prozentzahl der 7D5-positiven Zellen angegeben. Eine gesunde Testperson wurde zur Kontrolle mitgetestet.

3.2.3.9 Myeloperoxidase-Färbung

Der Nachweis des Enzyms in Granulozyten erfolgte im Ausstrich des peripheren Blutes mittels einer modifizierten zytochemischen Methode von Goodpasture (Goodpasture 1919) ohne Natrium-Nitroprussid und mit Hämalun-Lösung für die Zellkernfärbung.

Der angefertigte Ausstrich aus dem peripheren Blut wurde mit Fixier-Lösung [10ml 37% Formaldehyd (Merck Darmstadt) + 90ml 96% Alkohol] 30 Sekunden bedeckt. Danach wurde der Ausstrich mit Peroxidase-Reagenz [30ml 96% Alkohol, 20ml Aqua dest., 0,2ml 3% Wasserstoffperoxid, 0,02g Benzidin (Merck, Darmstadt)] 1 Stunde bedeckt. Zur Anfärbung der Zellkerne wurde der Ausstrich anschließend mit Hämalun-Lösung (Merck, Darmstadt) behandelt.

Die Auswertung erfolgte mikroskopisch in Neutrophilen und Eosinophilen. Normal positive Reaktion: gelb-braune zytoplasmatische Granula, blauer Kern. Negative Reaktion: helles Zytoplasma, blauer Kern.

3.2.3.10 Chemotaxis unter Agarose

Die gerichtete Wanderung der Neutrophilen wurde mittels fMLP als chemotaktischer Stimulus in einem 1,3%igen Agarose-Gel bestimmt (Nelson et al. 1981).

Zur Anfertigung des 1,3%igen Agarose-Gels wurden 144mg Agarose (Behring, Marburg) in 6ml Aqua dest. aufgelöst, 10 Minuten aufgekocht, bei 56°C ca. 1 Stunde ins Wasserbad gestellt und anschließend in 50x15mm Petrischalen gefüllt. Mit einer Schablone und einer Stanzkanüle (2,5mm Durchmesser) wurden sternförmig 3 Löcher pro Ansatz mit Zwischenabständen von 4mm gestanzt. Die isolierten Granulozyten wurden auf 1×10^7 /ml eingestellt, davon wurden 10µl (1×10^5 Zellen) pro Ansatz entnommen. Als chemotaktischer Stimulus wurde fMLP (Sigma, Deisenhofen) in einer Konzentration von 5×10^{-5} M und als negative Puffer-Lösung 10x199 Lösung (ICN Pharmaceuticals, Ohio) verwendet. Die Platten wurden 2 Stunden lang bei 37°C und CO₂-Milieu inkubiert und anschließend für 30 Minuten mit 3ml Methanol und für weitere 30 Minuten mit Formaldehyd bedeckt. Nach Entfernung des Gels wurden die Präparate bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend wurde die Wanderstrecke der Granulozyten bestimmt. Eine gesunde Testperson wurde zur Kontrolle mitgetestet.

3.2.3.11 Lymphozytenkultur

Isolierte Lymphozyten wurden in Iscove's Modified Dulbecco's Medium mit 10%igem fetalen Kalbsserum, Penicillin/Streptomycin, L-Glutamin und Phytohaemagglutinin (PHA) inkubiert.

3.2.3.12 Molekulargenetische Untersuchungen

DNA und mRNA wurden aus Blutleukozyten isoliert (Sambrook et al. 1989). Die isolierte mRNA wurde in cDNA umgeschrieben (Roos et al. 1999).

Die Analyse der DNA und der cDNA (complementary DNA) erfolgte wie bereits beschrieben (Roos et al. 1999) mittels eines ABI Prism 377 automatischen Sequenzers (Applied Biosystems, Forster City, CA). Die verwendeten Primer für die PCR-Amplifikation und DNA-Sequenzierung sind in Tabelle 8 aufgelistet. Eine gesunde Testperson wurde zur Kontrolle mitgetestet.

Tab. 8: Auflistung der verwendeten Primer für die PCR-Amplifikation und die DNA-Sequenzierung

	Primer-Sequenz	Amplifiziertes Fragment Basenpaare (Größe)	Annealing-Bereich	G6PD-Protein-Region
PRS	5' CTCTGCAGGCCCGCGGAAGCTCGTT 3'	-1336 bis -908 (428)	-1336 bis -1312 vom ATG	Promotor-Region
Pras	5' CCGCTGCCGCTGTCTGCATCCCA 3'		-932 bis -908 vom ATG	
1s	5' CGGCGATGGGGATGCGGGAGCACTA 3'	-987 bis -578 (409)	-987 bis -963 vom ATG	Exon I, nichtkodierende Sequenz
1as	5' GCGGAGCGCGGGACAGTACGCTCCT 3'		Intron I 56 bis 32	
2s	5' AGGACCTCTCAAGAAAAGGGGCTAAC 3'	-87 bis 182 (269)	Intron I -78 bis -54	Exon II, Met1-Ser40
2as	5' AAAAGCTGAGGCATGGAGCAGGCAC 3'		Intron II 63 bis 39	
3s	5' AAGGGTGGAGGATGATGTATGTAGG 3'	9902 bis 10272 (370)	Intron II -73 bis -49	Exon III-IV, Gly41-Lys88
4as	5' TGGGGGCTGGTAGAGAGGGCAGAAC 3'		Intron IV 54 bis 30	
5s	5' TTGGGCGAGAACACACACGGACTCA 3'	10691 bis 11052 (361)	Intron IV -76 bis -52	Exon V, Ala89-Ile162
5as	5' ATAGAGTGGTGGGAGCACTGCCTGG 3'		Intron V 68 bis 44	
6s	5' TGGGAGGGCGTCTGAATGATGCAGC 3'	11569 bis 11876 (307)	Intron V -87 bis -63	Exon VI, Gly163-Arg215
6as	5' GGCCAGGTGAGGCTCCTGAGTACCA 3'		Intron VI 61 bis 37	
7s	5' GGGTGACCCTCACATGTGGCCCTC 3'	11917 bis 12166 (249)	Intron VI -74 bis -50	Exon VII, Phe216-Arg257
7as	5' GGCTTGCCACCCTGTGCCAGCCT 3'		Intron VII 49 bis 26	
8s	5' GTTGGGGTCCCCATGCCCTTGAAC 3'	12405 bis 12628 (223)	Intron VII -77 bis -53	Exon VIII, Asp258-Lys288
8as	5' CAGATGGCCTGCGACAGGGCATGC 3'		Intron VIII 52 bis 28	
9s	5' TGCACATCTGTGGCCACAGTATCC 3'	12943 bis 13268 (325)	Intron VIII -80 bis -56	Exon IX, Val289-Asp350
9as	5' TGCCCGCACACAGGGCATGCCAGT 3'		Intron IX 58 bis 34	
10s	5' GCTCCCACTGAGACACTCACGCACT 3'	13273 bis 13631 (358)	Intron IX -76 bis -52	Exon X, Gly351-Lys429
10as	5' GGCCAGGCCGCCACCCTCCACA 3'		Intron X 46 bis 23	
11s	5' CTGGGGCCCGGGGACTCCACATGGT 3'	13624 bis 13811 (187)	Intron X -67 bis -41	Exon XI, Asn430-Ser455
11as	5' ACCCCATAGCCACAGGTATGCAG 3'		Intron X 45 bis 22	
12s	5' GGGGTGGCCTTTGCCCTCCCTCC 3'	13806 bis 14037 (231)	Intron XI -65 bis -43	Exon XII, Asp456-Ser486
12as	5' GGCATGAGGTAGCTCCACCCTCAC 3'		Intron XII 73 bis 50	
13s	5' AGGAAAGGGTGGGGGCTGGGGACAGA 3'	13967 bis 14239 (272)	Intron XII -94 bis -69	Exon XIII, Arg487-Leu515
13as	5' GTCAATGGTCCCGGAGTCTCCCGA 3'		Exon XIII 177 bis 153	
3'UTRs	5' TTTCCAGTATGAGGGCACCTACAAG 3'	14104 bis 14802 (698)	Exon XIII 43 bis 66	Exon XIII, 3' UTR
3'UTRas	5' AAGTGGGTCTCAGGGAAGCA 3'		3' UTR -42 bis -21	
CDNAs	5' ATATTCATCATCATGGGTGC 3'	96 bis 262 (166)	Exon II 96 bis 115	Exon II-III, Ser40-Ile80
CDNAas	5' GAAGGGCTCACTCTGTTTC 3'		Exon III 262 bis 243	

Sequenzen sind vom genomischen Contig X55448, Accession X55448 Z29527 (11 Mai 2001), Version GI:450527 abgeleitet. Die Nukleotid-Positionen sind in Bezug zum ATG des Codons 1 durchnummeriert. Die kodierende Sequenz ist von dem cDNA-Klon XM_049337 abgeleitet.

3.2.3.13 Immunoblot (Westernblot)-Analyse des G6PD-Proteins

Es wurden 10^5 Zellen in Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate - SDS)-Puffer [125mM Tris, pH 6.8; 20% (wt/vol) SDS and 12.5% (vol/vol) β -Mercaptoethanol] erhitzt. Die Proteine wurden nach ihrem Molekulargewicht über einem 12,5% Polyacrylamid-Gel nach Laemmli (Laemmli 1970) in einem Gel-Apparat (Mini-Protean II, BioRad, Hercules, CA) aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf Nitrozellulose-Papier (Mini Trans-Blot cell, BioRad) transferiert. Der Proteinnachweis erfolgte mittels polyklonaler Antikörper gegen G6PD. Die anti-Human-G6PD-Antikörper von Kaninchen wurden von Dr. Jose Bautista aus Madrid zur Verfügung gestellt. Die Protein-Antikörper-Komplexe wurden mittels Immunperoxidase-Reaktion (HRP-konjugierte anti-Kaninchen-IgG-Antikörper vom Schwein) nachgewiesen. Eine gesunde Testperson wurde zur Kontrolle mitgetestet.

3.2.3.14 G6PD-Expression in einem *E. coli*-System

Die Expression des G6PD-Proteins in *E. coli*-Bakterien wurde wie bereits in der Literatur beschrieben durchgeführt (Roos et al. 1999).

3.2.3.15 Isolierung des rekombinanten G6PD-Proteins

Die Isolierung des rekombinanten Enzyms erfolgte durch Affinitätschromatographie wie bereits in der Literatur beschrieben (Bautista et al. 1992; Town et al. 1992).

3.2.3.16 Bestimmung der enzymatischen Eigenschaften

Die elektrophoretische Mobilität des rekombinanten Enzyms wurde mittels Elektrophorese im nativen Polyacrylamid in Tris-Puffer (pH 8.8) bei 4°C determiniert (Kirkman & Hendrickson 1963). Anschließend erfolgte die G6PD-Aktivitätsbestimmung mit Phenazinmethosulfat (phenazine methosulfate, PMS) und Methylthiotetrazol (3-(4,5-dimethylthiazolyl-1,2)-2,3-diphenyltetrazolium bromide, MTT) (WHO Scientific Group 1967).

Thermostabilitätsbestimmungen wurden nach den Richtlinien der WHO (WHO Scientific Group 1967) durchgeführt. Die Proben mit dem isolierten rekombinanten Enzym wurden 60 Minuten lang bei 51°C inkubiert. Aliquots wurden in Abständen von 20 Minuten für die Messung der G6PD-Aktivität entnommen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Oxidativer Metabolismus - „oxidative burst“ - der Granulozyten

Der NBT-Test war bei 3 von den 4 Geschwistern sowie bei der Mutter in der Familie H pathologisch (Tab. 9, Abb. 10). Beim Patienten GH wurde nach Stimulation der Neutrophilen mit *Candida* eine Mischpopulation aus schwach positiven und negativen Zellen nachgewiesen. Beim gleichen Patienten wurden nach Stimulation mit PMA 100% schwach positive Zellen nachgewiesen. Bei den Brüdern WH und MtH und der Mutter AH wurde sowohl nach Stimulation mit *Candida* als auch nach Stimulation mit PMA eine Mischpopulation aus schwach positiven und positiven Zellen entdeckt. Beim Bruder MfH war der Befund normal.

Beim Patienten MG in der Familie G wurden nach Stimulation mit PMA 100% schwach positive Neutrophile nachgewiesen.

Tab. 9: NBT-Test: Ergebnisse in der Familie H

	GH	WH	MtH	MfH	Mutter AH	Kontrolle
<i>Candida</i>	52 schw 48 neg	34 pos 66 schw	27 pos 73 schw	100 pos 100 pos	47 pos 53 schw	100 pos 100 pos
PMA	100 schw	44 pos 56 schw	20 pos 80 schw	100 pos 100 pos	69 pos 31 schw	100 pos 100 pos

Ergebnis als % der Formazan-positiven Zellen angegeben (100 Neutrophile ausgewertet).
Die zytoplasmatische Farbtintensität vom blauen Formazan als pos: positiv, schw: schwach positiv oder neg: negativ angegeben.

Der DHR-Test war ebenso bei den 3 Geschwistern GH, WH und MtH sowie bei der Mutter in der Familie H pathologisch (Tab. 10, Abb. 11). Die drei betroffenen Geschwister zeigten eine homogene Stimulierbarkeit der Neutrophilen mit niedriger Fluoreszenzintensität (H_2O_2 -Nachweis, 2-4% der Kontrolle), was mit einer Restaktivität vereinbar ist. Beim Bruder MfH war der Befund normal. Bei der Mutter AH wurden 2 Zellpopulationen mit unterschiedlicher Funktion nachgewiesen, eine mit normaler Fluoreszenzintensität (30% der Zellen) und eine zweite mit erniedrigter Fluoreszenzintensität (70% der Zellen). Die nachgewiesene Restaktivität entsprach der von den betroffenen Söhnen.

Beim Patienten MG in der Familie G war die Fluoreszenzintensität nach Stimulation mit PMA ebenso erniedrigt (7% der Kontrolle) entsprechend einer Restaktivität.

Tab. 10: DHR-Test: Ergebnisse in der Familie H

	GH	WH	MtH	MfH	AH
Mittelwert der Fluoreszenzintensität	18 (666)	45 (1286)	17 (897)	660 (897)	807 (1286)
Patient (Kontrolle)					30% der Zellen 17 (1286) 70% der Zellen

Die O_2^- -Produktion der Granulozyten wurde mittels Reduktion von Cytochrom *c* bestimmt und war bei GH und MtH erniedrigt und bei MfH normal (Tab. 11).

Tab. 11: Messung der O_2^- -Produktion: Ergebnisse in der Familie H

	GH	WH	MtH Patient (Kontrolle)	MfH	Mutter AH
fMLP	0,81 (4,08)	n.d.	0,0 (8,30)	7,40 (8,30)	n.d.
PMA	5,5 (22,23)	n.d.	11,60 (24,40)	25,30 (24,20)	n.d.
O_2^-, Mol/l					

n.d.: nicht untersucht

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit opsonierten Zymosan-Partikeln ergab stark erniedrigte Werte bei den Patienten GH, WH, MtH und MG und Werte zwischen Kontrollen und Patienten bei beiden Müttern (Tab. 12). Beim Patienten MG war der Wert nach Stimulation der Granulozyten mit PMA ebenso stark erniedrigt (1.6, Kontrolle 5.2).

Tab. 12: Sauerstoffverbrauch: Ergebnisse in den Familien H und G

	Mutter AH	GH	WH	MtH	Mutter TG	MG	Kontrolle
O_2-Verbrauch, nM/10⁶ Granulozyten/Min	3,9	1,2	1,2	1,3	4,4	2,0	6,1 - 11,7

Stimulation mit opsonierten Zymosan-Partikeln

4.2 Cytochrom *b*-Expression

Der Nachweis des membrangebundenen Cytochrom *b* in den Granulozyten mittels Spektralanalyse und mittels monoklonaler 7D5-Antikörper ergab Normalwerte sowohl bei den betroffenen Patienten GH und WH als auch beim nicht betroffenen Bruder MfH und bei der Mutter in der Familie H (Tab. 13, Abb. 12 und 13).

Tab. 13: Cytochrom *b*-Expression: Ergebnisse in der Familie H

	GH	WH	MtH Patient (Kontrolle)	MfH	AH
Cytochrom <i>b</i>-Spektrum pMol/10⁶ Zellen	11,50 (14,52)	19,10 (10,80)	n.d.	8,12 (7,69)	16,80 (10,80)
7D5-Antikörper % positive Zellen	96 (98)	97 (97)	n.d.	n.d.	98 (97)

n.d.: nicht untersucht

4.3 Bakterizidie

Beim Patienten MG wurde die Abtötungsfähigkeit der Neutrophilen gegenüber *E. coli* bestimmt und war nicht beeinträchtigt.

Phagozytose (k1): MG >1.0, Kontrolle 0.6 (Normalwerte >0.2)

Perforation (k2): MG 0.029, Kontrolle 0.06 (Normalwerte 0.025-0.09)

Inaktivierung (k3): MG 0.040, Kontrolle 0.110 (Normalwerte 0.040-0.160)

4.4 Myeloperoxidase-Färbung und Chemotaxis

Der zytochemische MPO-Nachweis in den Granulozyten war normal positiv bei allen 4 Geschwistern in der Familie H und bei ihrer Mutter. Die Chemotaxis wurde bei den Patienten GH und WH und bei ihrer Mutter AH getestet und war bei allen normal.

4.5 G6PD-Aktivität

Bei den Patienten GH, WH, MtH und MG lag die G6PD-Aktivität sowohl in den Erythrozyten als auch in den Granulozyten unter der Nachweisgrenze. Bei beiden Müttern lag die Enzymaktivität zwischen der der Patienten und der der Kontrollen (Tab. 14).

Tab. 14: G6PD-Aktivität in Erythrozyten und Granulozyten in den Familien H und G

	Mutter AH	GH	WH	MtH	Mutter TG	MG	Kontrolle
G6PD-Aktivität in RBC, U/g Hb	2,9	0,1	0,1	0,1	2,8	0,1	4,8 - 7,2
G6PD-Aktivität in Granulozyten, mU/10⁶ Zellen	8,2	0	0	0	7,9	0	9,7 - 20

Ergebnis als Mittelwert aus 3 Meßwerten derselben Probe angegeben. Für die Kontrollwerte wurden 10 gesunde Personen getestet.

4.6 DNA-Sequenzierung des G6PD-Gens

Für die Identifizierung der verantwortlichen G6PD-Mutation wurde DNA von den 4 betroffenen Patienten und beiden Müttern sequenziert und analysiert. Es wurde eine Deletion von 3 Nukleotiden in Positionen 180-182 innerhalb der kodierenden Sequenz des G6PD-Gens gefunden, die zu einer Leucin-Deletion in Position 61 geführt hatte (Abb. 14). Diese Mutation wurde bei allen betroffenen Patienten GH, WH, MtH und MG nachgewiesen, wobei beide Mütter als heterozygot für die gleiche Deletion identifiziert worden sind.

4.7 DNA-Analyse der CYBB-Region

Die DNA-Analyse der CYBB-Region (kodierende Region für *gp91^{phox}* des Cytochrom *b* assoziiert mit der X-chromosomalen Form der chronischen Granulomatose) bei den Patienten GH und TG ergab keine Auffälligkeiten.

4.8 Expression des G6PD-Proteins in Erythrozyten und Neutrophilen

Um die Auswirkung der nachgewiesenen Deletion auf die Proteinexpression zu prüfen, wurde Immunoblot (Westernblot)-Verfahren zum Nachweis des G6PD-Proteins bei den 4 Patienten und bei beiden Müttern durchgeführt (Abb. 15a). Bei allen 4 betroffenen Patienten war sowohl in den Erythrozyten als auch in den Granulozyten kein G6PD-Protein nachweisbar. Bei beiden Müttern war G6PD in den Erythrozyten sowie in den Granulozyten nachweisbar, aber im Vergleich zur Kontrolle vermindert.

4.9 Expression des G6PD-Proteins in sich schnell vermehrenden, PHA-stimulierten Lymphozyten

Ein komplettes Fehlen des G6PD-Proteins wurde bisher nicht beobachtet und es wird angenommen, daß es mit dem Leben nicht vereinbar ist. Daher wurde vermutet, daß die nachgewiesene Deletion zu der Expression eines instabilen Proteins führte. Um das zu untersuchen, wurde die Expression von G6PD in sich schnell vermehrenden, PHA-stimulierten Lymphozyten vom Patienten MG und seiner Mutter TG analysiert. G6PD konnte bei beiden nachgewiesen werden. Die Proteinexpression war beim Patienten MG schwach und bei seiner Mutter vermindert (Abb. 15b). Diese Ergebnisse weisen auf das Vorliegen eines instabilen G6PD-Proteins bei der vorliegenden 180-182 - Deletion hin.

4.10 Enzymatische Eigenschaften des mutierten G6PD-Proteins

Das mutierte Enzym (G6PD-Amsterdam) wurde in einem *E. coli*-System exprimiert und isoliert. Das isolierte Protein zeigte leicht veränderte enzymatische Charakteristika im Vergleich zum Wildtyp-Protein G6PD-B (Tab. 15). Die spezifische Aktivität sowie die Thermostabilität von G6PD-Amsterdam waren reduziert (Tab. 15, Abb. 16). G6PD-Amsterdam zeigte normale K_m -Werte für NADP und G6P. Die Utilisation von 2-deoxy-G6P und Galaktose-6-Phosphat war ungefähr doppelt so hoch. Das mutierte Enzym verbrauchte einen normalen Prozentsatz von deamino-NADP. Der K_i -Wert für NADPH war normal. Die elektrophoretische Beweglichkeit (Mobilität) von G6PD-Amsterdam war 10% höher als die des Wildtyp-Enzyms. Die Sekundärstrukturvorhersage des mutierten Proteins im Vergleich zum Wildtyp-Enzym ist in Tabelle 16 angegeben (Eisenhaber et al. 1996a, 1996b). G6PD-Amsterdam weist Strukturveränderung im Bereich der Mutation auf.

Tab. 15: Biochemische Charakteristika von rekombinantem G6PD-Amsterdam

	G6PD-B	G6PD-Amsterdam
K_m G6P (μ M)	64 \pm 4	55 \pm 5
K_m NADP (μ M)	11 \pm 1	11 \pm 1
Thermostabilität	normal	vermindert
% Utilisation 2-deoxy-G6P	4	7.5
% Utilisation GalP	8	17
% Utilisation deamino-NADP	59	62
% Mobilität	100	110
Spezifische Aktivität (IU/mg)	210 \pm 20	95 \pm 3
K_i NADPH (μ M)	15 \pm 2	14 \pm 3

Ergebnisse als MW \pm SD aus 3 Meßwerten angegeben.

Tab. 16: Sekundärstrukturvorhersage des G6PD-Amsterdam

	G6PD-B	G6PD-Amsterdam
Schleife	RDGLLPEN 15% α -Helix 85% <i>coil</i>	RDGLPEN 100% <i>coil</i>
Schleife + β -Faltblatt	RDGLLPENTFIVGYA 40% β -Faltblatt 60% <i>coil</i>	RDGLPENTFIVGYA 28% β -Faltblatt 72% <i>coil</i>

4.11 mRNA-Stabilität des G6PD-Amsterdam

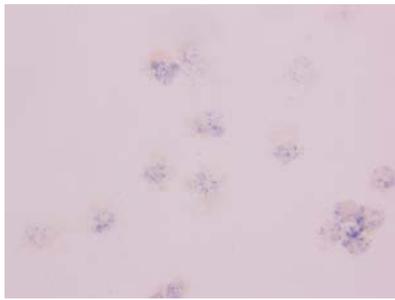
Der Schweregrad des Enzymdefektes ließ sich durch die leicht veränderten enzymatischen Eigenschaften des mutierten Proteins nicht erklären. Deswegen wurde die Stabilität der mRNA (messenger ribonucleic acid) für G6PD-Amsterdam untersucht. Durch die cDNA-

Sequenzierung wurde die mRNA-Menge für die Kodierung vom Wildtyp-G6PD und vom mutierten G6PD bestimmt. Es wurde mRNA von Leukozyten der Mutter AH und ihrer 3 betroffenen Söhne GH, WH und MtH isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels der cDNA-Sequenzierung konnte die 180-182 - Deletion bei der Mutter AH nicht nachgewiesen werden (Abb. 14). Im Gegensatz dazu war die 180-182 - Deletion bei ihrer 3 Söhne nachweisbar. Diese Ergebnisse zeigen, daß die kodierende mRNA für G6PD-Amsterdam in geringerem Maße exprimiert wird als die kodierende mRNA für das Wildtyp-Protein bei der heterozygot betroffenen Mutter. Das ist ein Hinweis, daß die mutierte mRNA weniger stabil ist als die Wildtyp-mRNA. Diese mRNA-Instabilität könnte die Erklärung für die verminderte Expression von G6PD-Amsterdam sein.

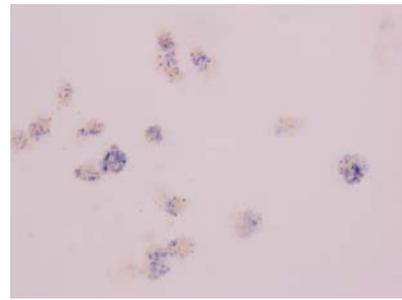
4.12 Familienuntersuchungen

Screening-Untersuchungen des Sauerstoffmetabolismus - „oxidative burst“ der Neutrophilen mittels NBT-Test und DHR-Test bei 3 Angehörigen der Familie H (maternale Tante des Patienten GH und 2 Söhne, siehe Stammbaum in Abbildung 17) ergaben Normalwerte. Die Bestimmung der G6PD-Aktivität in den Erythrozyten sowie in den Leukozyten ergab ebenso bei allen Normalwerte.

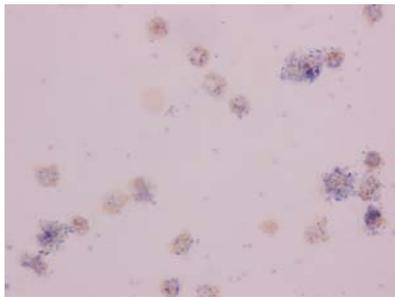
PMA-stimulierte Granulozyten



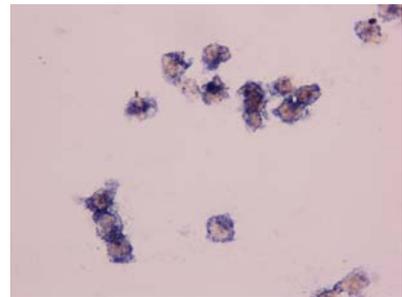
GH



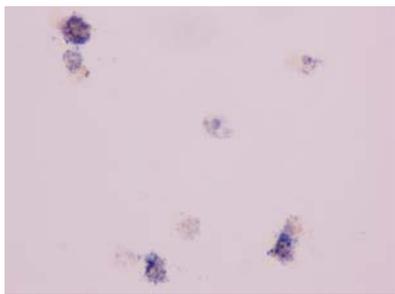
WH



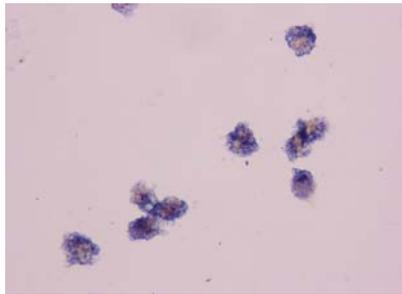
MtH



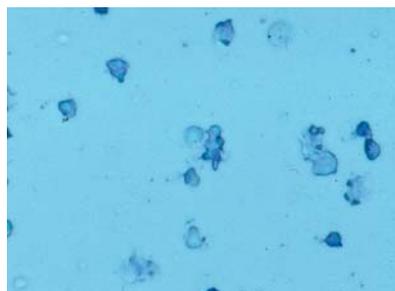
MfH



Mutter AH



Kontrolle



Patient mit X91⁻ CGD

Abb. 10: NBT-Test: mikroskopische Befunde bei der Familie H und bei einem Patienten mit X91⁻ CGD (siehe Abschnitt 4.1 auf Seite 54)

PMA-stimulierte Granulozyten

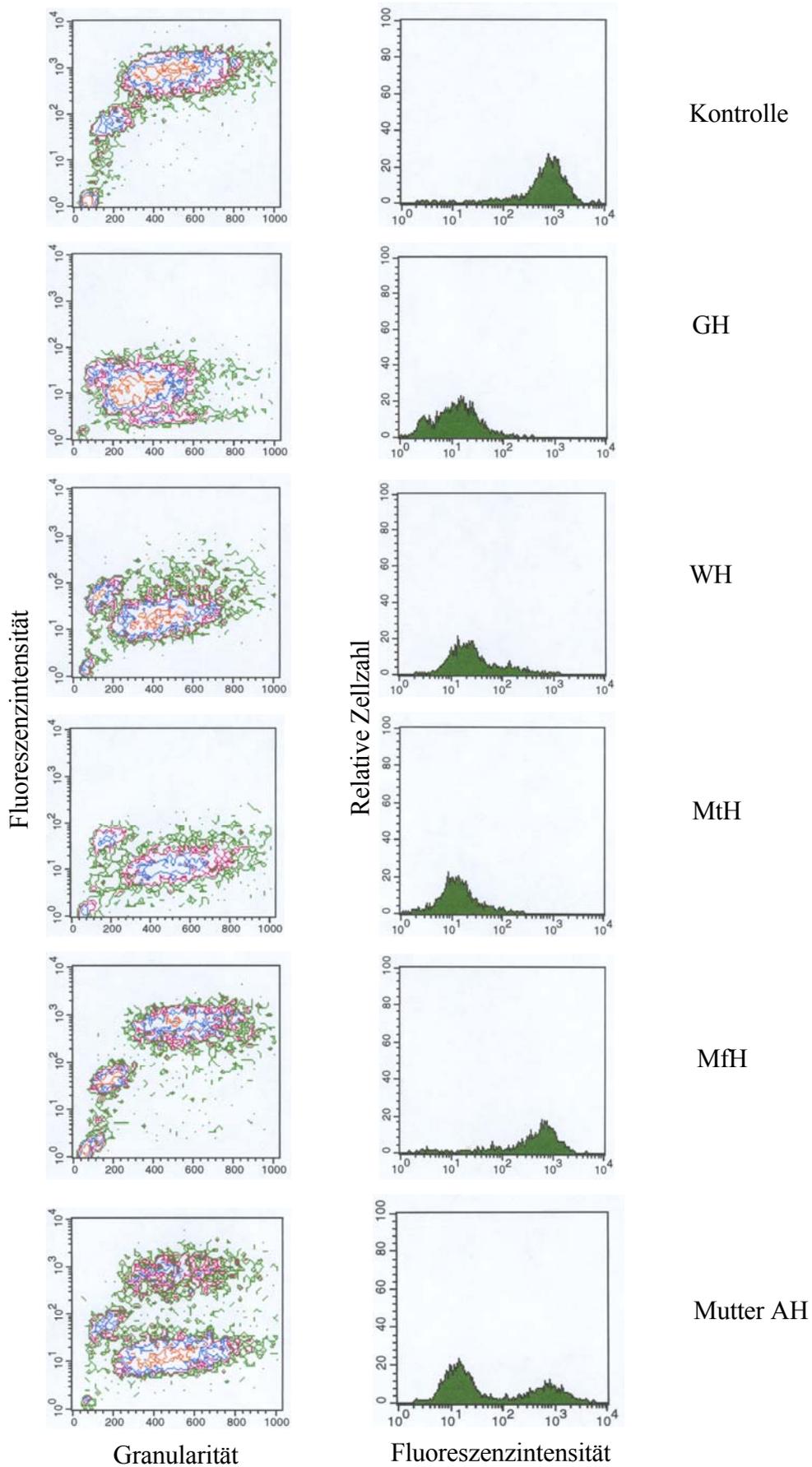


Abb. 11: DHR-Test: durchflußzytometrische Befunde bei der Familie H (siehe Abschnitt 4.1 auf Seite 54)

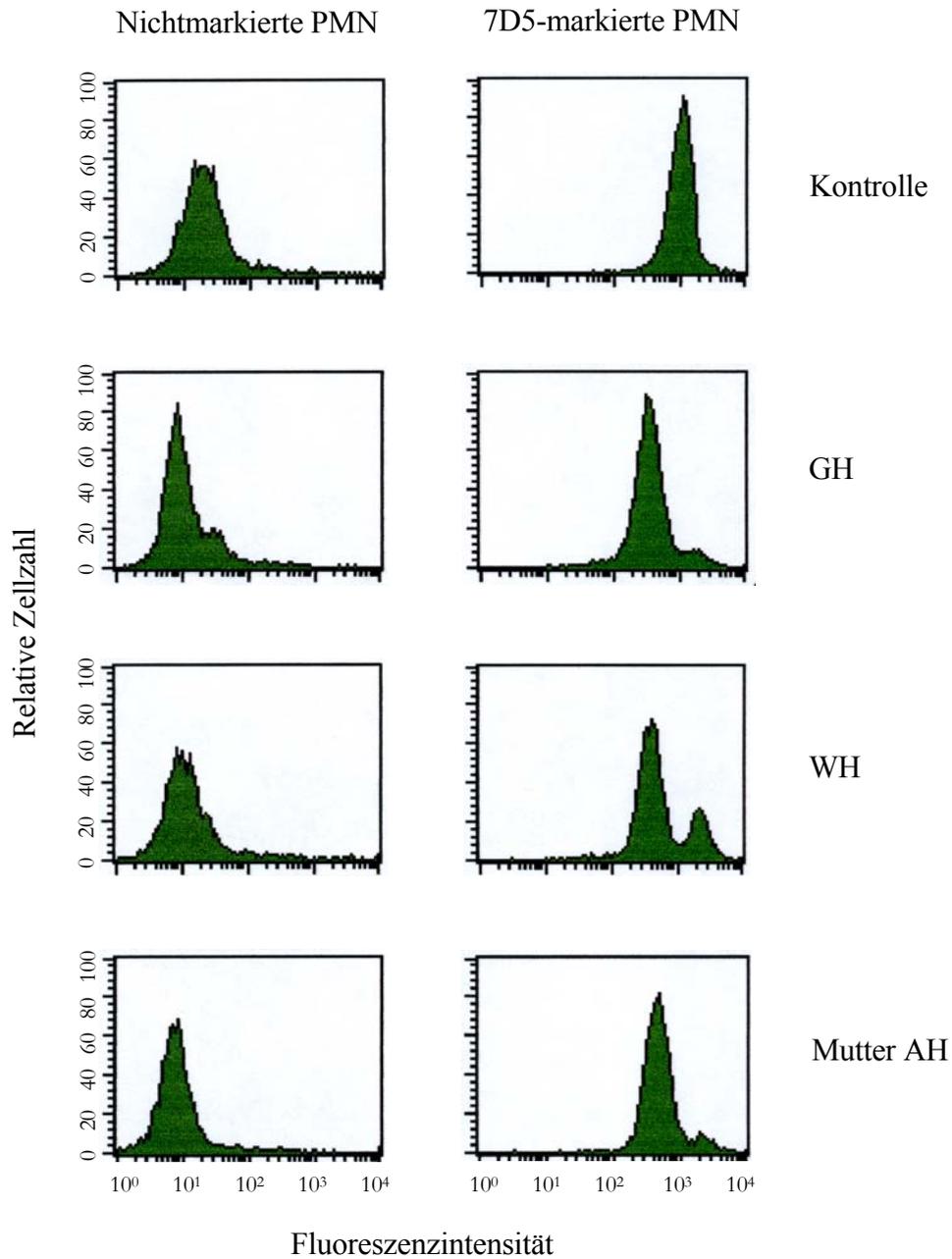


Abb. 12: Expression des Cytochrom *b* mittels 7D5-Antikörper: durchflußzytometrische Befunde (siehe Abschnitt 4.2 auf Seite 55)

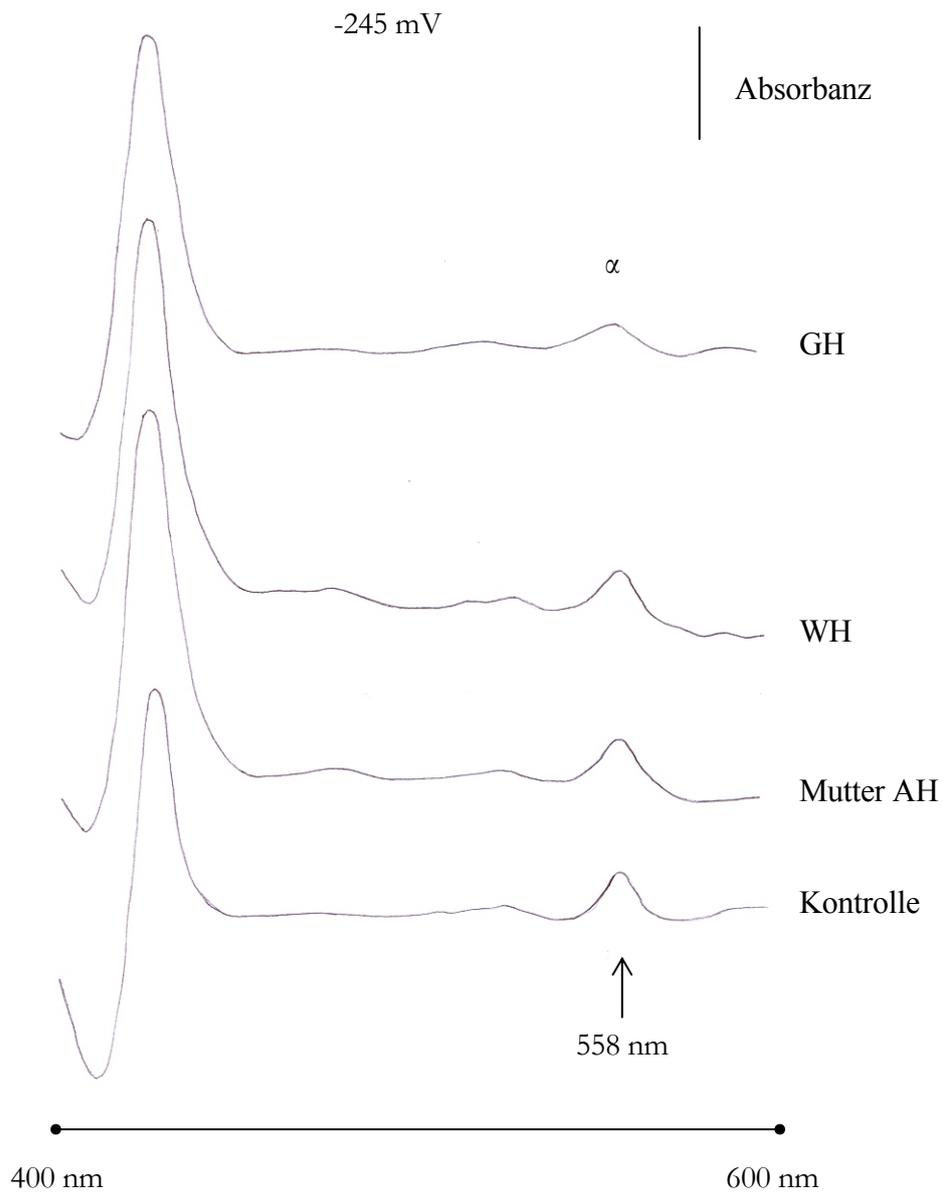


Abb. 13: Cytochrom *b*-Spektrum (siehe Abschnitt 4.2 auf Seite 55)

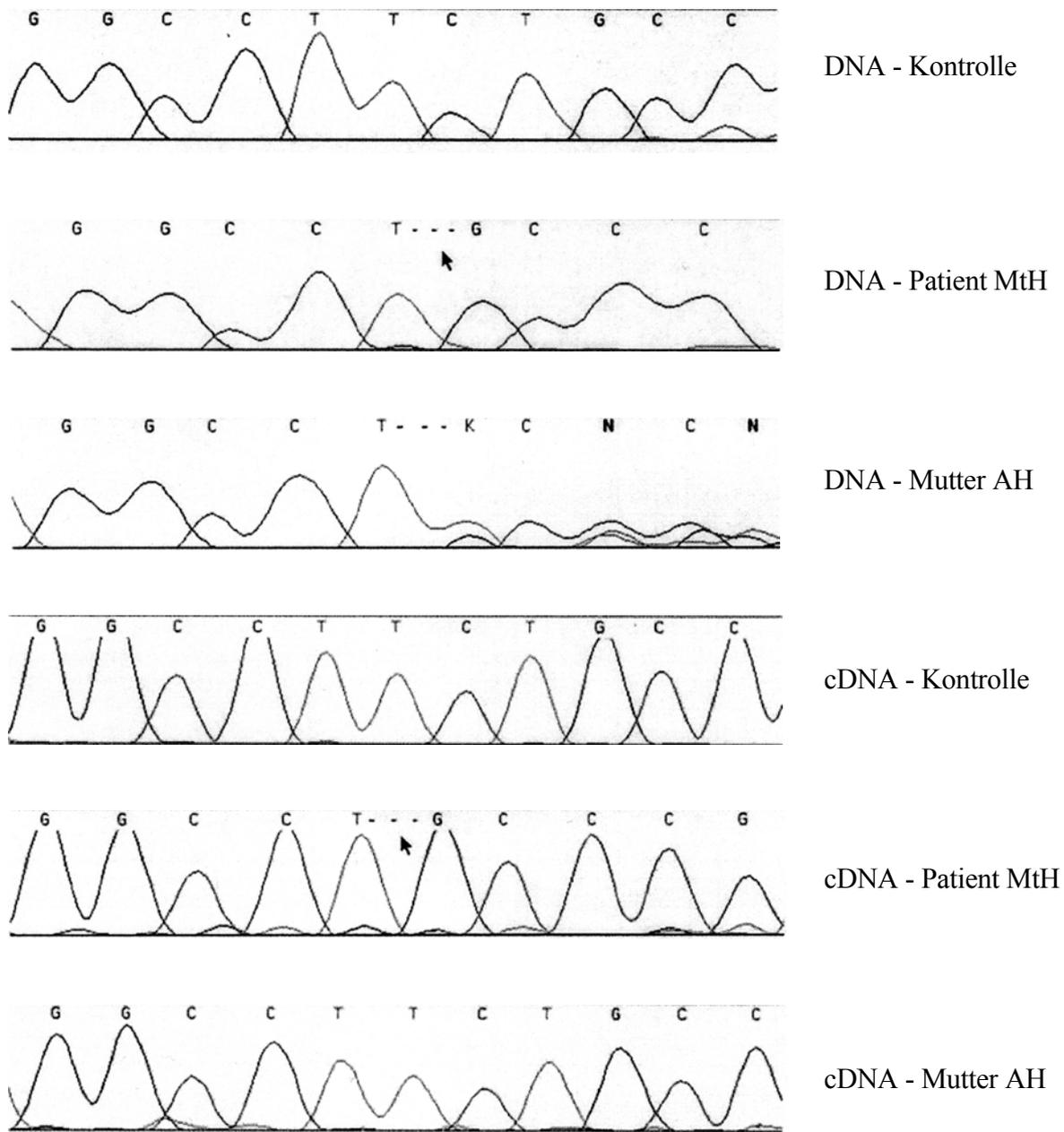


Abb. 14: Sequenzierung von DNA und cDNA (siehe Abschnitt 4.6 auf Seite 57 und Abschnitt 4.11 auf Seite 58)

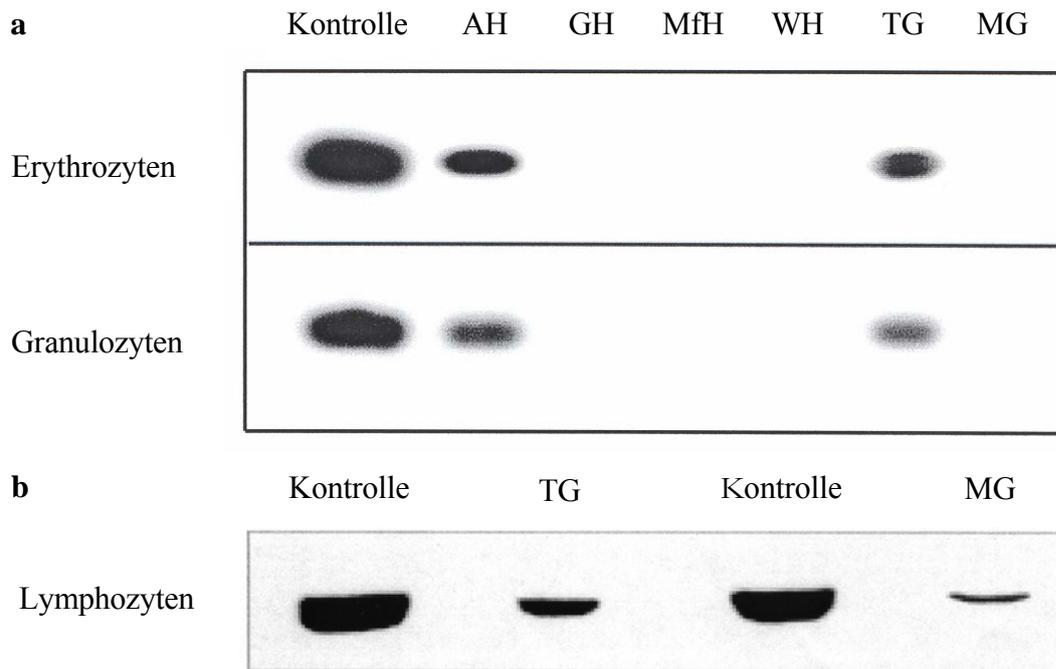


Abb. 15: Westernblot: G6PD-Proteinnachweis a. in Erythrozyten und Granulozyten und b. in sich schnell vermehrenden, PHA-stimulierten Lymphozyten (siehe Abschnitte 4.8 und 4.9 auf Seite 57)

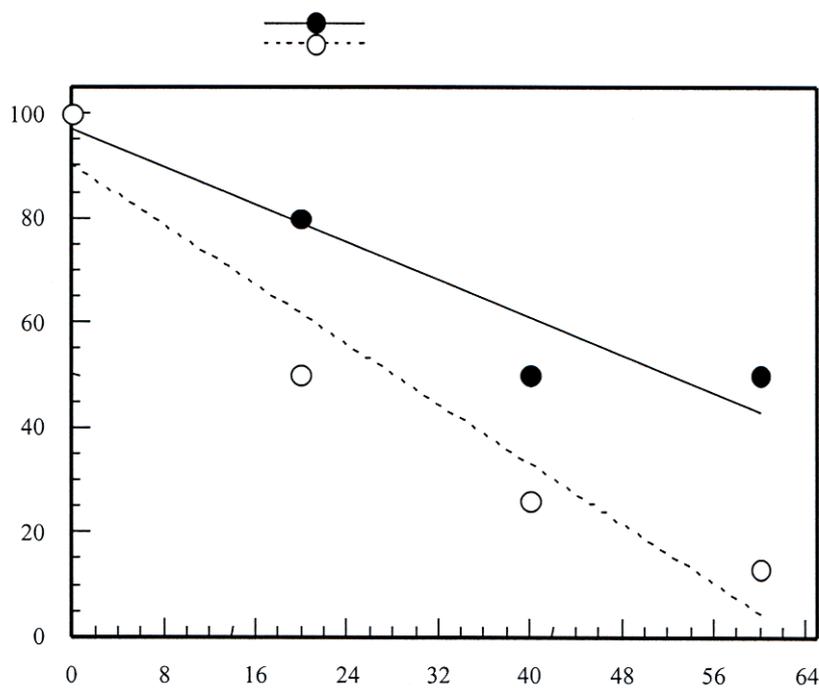
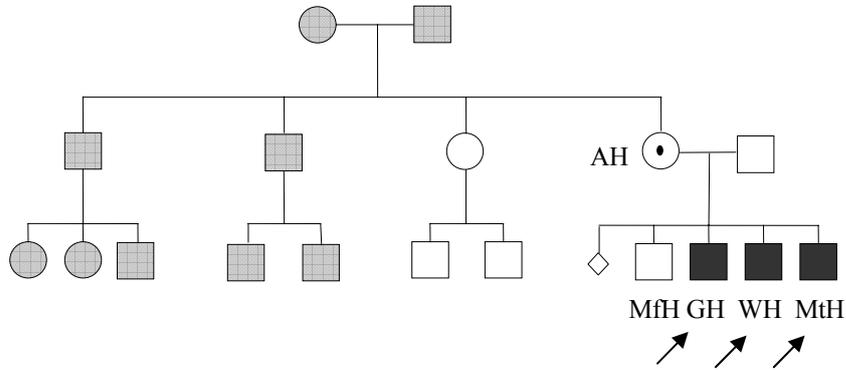
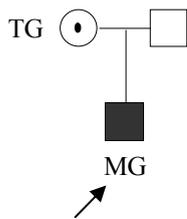


Abb. 16: Thermostabilität des mutierten Proteins im Vergleich zum Wildtyp-Protein (siehe Abschnitt 4.10 auf Seite 58)

Familie H :



Familie G:



- ↗ Patient ■ G6PD-Mangel ○ □ kein G6PD-Mangel ⊙ Konduktorin
 ◇ Abort ● ■ nicht untersucht

Abb. 17: Stammbäume der Familien H und G

PMA-stimulierte Granulozyten

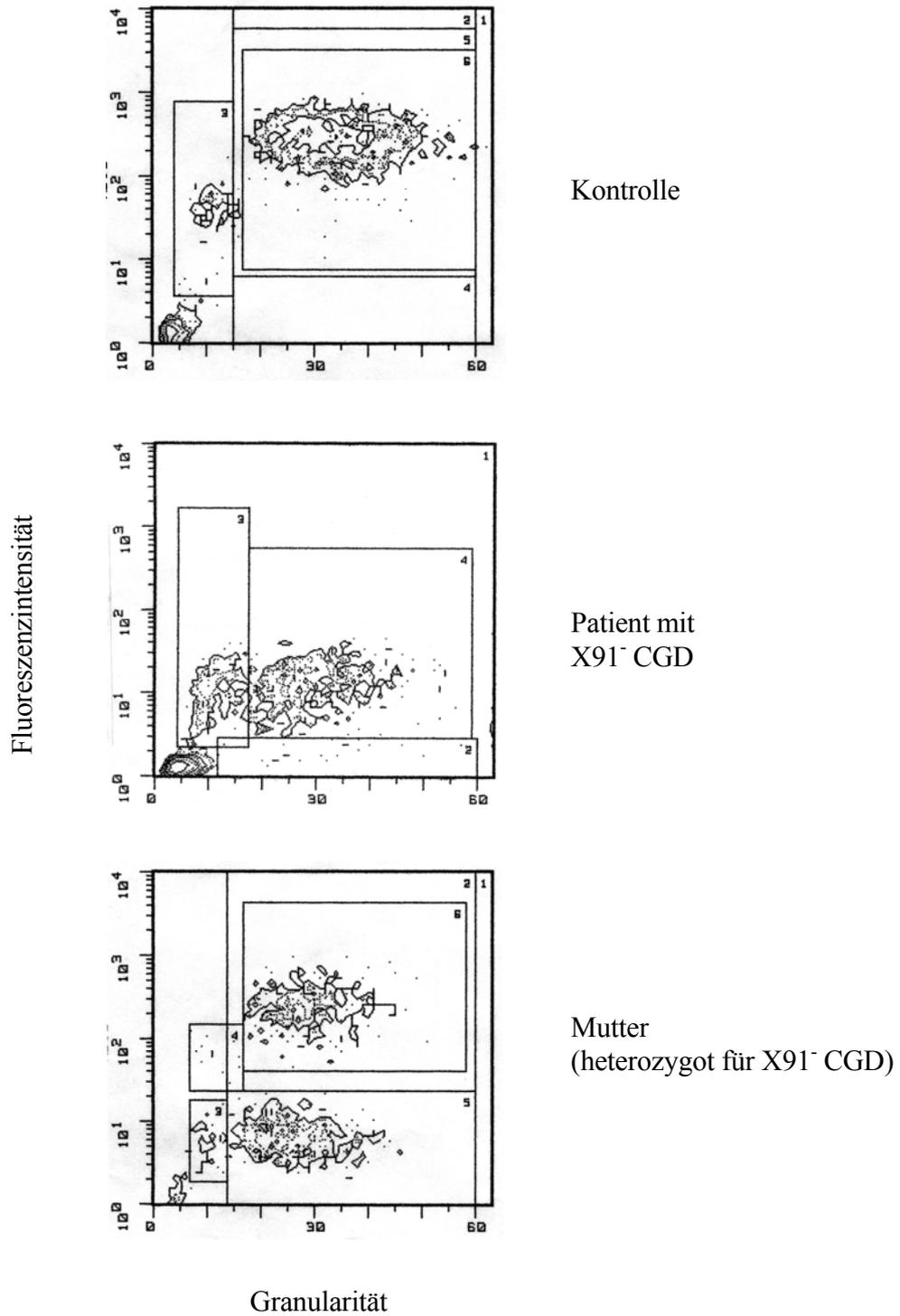


Abb. 18: DHR-Test: durchflußzytometrische Befunde bei einem Patienten mit X91⁻ CGD und seiner heterozygot betroffenen Mutter

5 DISKUSSION

In zwei miteinander nicht verwandten Familien wurde ein X-chromosomal vererbter Defekt des oxidativen Metabolismus der Granulozyten und ein Klasse I Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangel mit einer Enzymaktivität in den Erythrozyten sowie in den Granulozyten unter der Nachweisgrenze festgestellt. Betroffen sind 4 männliche Patienten, davon 3 Geschwister.

Der Defekt wurde identifiziert, nachdem bei zwei Patienten schwere Infektionen auftraten. Patient GH aus der Familie H erkrankte im Alter von 15 Jahren an einer schweren invasiven disseminierten Aspergillose durch *A. nidulans*. Beim Patienten MG aus der Familie G trat im Alter von 3,5 Jahren eine Sepsis durch *C. violaceum* auf. Die Vorgeschichte war bei beiden Patienten unauffällig. Da bei den verantwortlichen Erregern eine Assoziation mit Immundefekten, insbesondere den Granulozytendefekten, besteht, wurde nach Ausschluß einer Neutropenie die Neutrophilenfunktion geprüft. Die Bestimmung des oxidativen Metabolismus der Granulozyten ergab pathologische Befunde bei den Patienten GH und MG und deren Müttern und überraschenderweise bei 2 von den 3 Brüdern des Patienten GH, die klinisch bis zu dem Zeitpunkt keine Infektionsanfälligkeit aufwiesen. Die quantitative Bestimmung des Sauerstoffmetabolismus (O_2^- -Produktion, O_2 -Verbrauch) ergab bei allen 4 Patienten pathologische Befunde wie bei der chronischen Granulomatose mit einer Restaktivität. Bei beiden Müttern wurde eine mittlere Aktivität mit Werten zwischen denen der Patienten und denen der Kontrollen nachgewiesen. Zur Prüfung der Funktion in der einzelnen Zelle wurde die durchflußzytometrische Bestimmung der Wasserstoffperoxid-Produktion mittels Dihydrorhodamin-123 (DHR-Test) bei der Familie H durchgeführt (Tab. 10, Abb. 11). Diese Methode bietet eine quantitative H_2O_2 -Messung in der einzelnen Zelle und somit die Möglichkeit der Identifizierung von Zellpopulationen mit unterschiedlicher Aktivität. Bei allen drei betroffenen Geschwistern war eine homogen stimulierbare Neutrophilenpopulation mit einer sehr niedrigen H_2O_2 -Produktion (2-4% der Kontrolle) erkennbar. Bei der Mutter waren zwei Neutrophilenpopulationen mit unterschiedlicher Funktion erkennbar: eine in normalen Mengen H_2O_2 -produzierende (30% der Zellen) und eine zweite mit einer erniedrigten H_2O_2 -Produktion (70% der Zellen) mit Werten wie bei den betroffenen Söhnen. Diese Befunde sprechen für einen X-chromosomalen Defekt mit einer Restaktivität. Die NBT-Reduktion zu Formazan (semiquantitativer zytochemischer Test) ergab bei der gleichen Familie ebenso Befunde vereinbar mit einer Restaktivität. Es wurde eine Mischpopulation aus schwach positiven und positiven bzw. schwach positiven und negativen Zellen nachgewiesen (Tab. 9,

Abb. 10). Beim Patienten MG in der zweiten Familie wurde gleichfalls eine Restaktivität sowohl im DHR-Test (7% der Kontrolle) als auch im NBT-Test (100% schwach positiv) nachgewiesen.

Diese Befunde entsprechen dem Phänotyp der X-chromosomal vererbten Form der chronischen Granulomatose mit einer Restaktivität (X91⁻ CGD, verminderte Expression von gp91*phox* des Cytochrom *b*) (Tab. 1). In den Abbildungen 10 und 18 sind mikroskopische (NBT-Test) sowie durchflußzytometrische (DHR-Test) Befunde eines Patienten mit X91⁻ CGD und seiner heterozygot betroffenen Mutter zum Vergleich dargestellt. Beim X-chromosomal erblich kommt differentialdiagnostisch neben der chronischen Granulomatose der schwere G6PD-Mangel in Leukozyten bzw. Granulozyten in Betracht, der sowohl den klinischen als auch den metabolischen Phänotyp der CGD hervorrufen kann. Passend zu dieser Differentialdiagnose ist die infektionsinduzierte hämolytische Anämie bei beiden Patienten GH und TG sowie ein bereits bekannter G6PD-Mangel der Erythrozyten bei einem Bruder (WH) des Patienten GH. Eine Assoziation beider Defekte durch benachbarte Gene wie z.B bei der CGD und der Duchenne-Muskeldystrophie oder dem McLeod-Phänotyp (Marsh et al. 1975; Francke et al. 1985) ist auszuschließen, da die kodierenden Gene für den G6PD-Mangel und die X-chromosomal vererbte CGD auf verschiedenen Armen des X-Chromosoms liegen (Abb. 8). Eine zufällige Koexistenz der CGD mit dem häufig auftretenden G6PD-Mangel wäre möglich und ist bisher einmal in der Literatur beschrieben (Rosa-Borges et al. 2001; Agudelo-Flórez et al. 2004). Sowohl die Bestimmung des Cytochrom *b* (Cytochrom *b*₅₅₈-Spektrum, Nachweis mittels monoklonaler 7D5-Antikörper gegen gp91*phox*) in der Familie H als auch die DNA-Analyse des CYBB-Gens (X-linked Gen für die Kodierung von gp91*phox*) bei den Patienten GH und TG ergaben keine Auffälligkeiten. Somit konnte eine chronische Granulomatose ausgeschlossen werden.

Die Bestimmung der G6PD-Aktivität ergab pathologische Werte. Sowohl in den Erythrozyten als auch in den Granulozyten lag die Enzymaktivität bei allen 4 betroffenen Patienten unter der Nachweisgrenze. Beide Mütter hatten Enzymaktivitätswerte zwischen denen der Patienten und denen der Kontrollen (Tab. 14). Die Untersuchung weiterer Funktionen der Granulozyten (Chemotaxis und MPO-Nachweis) ergab Normalbefunde.

Diese Befunde sind mit einer Granulozytendysfunktion durch schweren G6PD-Mangel in den Leukozyten vereinbar. Es handelt sich um ein X-chromosomal vererbtes Krankheitsbild, das bereits bei noch nur 12 Patienten in der Literatur beschrieben worden ist (Cooper et al. 1972; Baehner et al. 1972; Gray et al. 1973; Kahn et al. 1973; Vives Corrons et al. 1982; Mamlok et al. 1985, 1987; Roos et al. 1999; Costa et al. 2002). Bei allen bereits publizierten Patienten lag die

G6PD-Aktivität in den Erythrozyten unter der Nachweisgrenze und in den Leukozyten bzw. Neutrophilen zwischen 0 und 5% des Normalwertes (bei der Mehrzahl ebenso unter der Nachweisgrenze) (Tab. 6). Wolach et al. (2004) berichteten über weitere Patienten mit einer G6PD-Aktivität <5% in den Neutrophilen und dem laborchemischen CGD-Phänotyp, die innerhalb einer Studie der Granulozytenfunktion beim G6PD-Mangel in Israel identifiziert wurden, jedoch ohne Infektionsanfälligkeit.

Obwohl die Funktionsstörung der Neutrophilen mit einer stark reduzierten G6PD-Aktivität phänotypisch der einer chronischen Granulomatose entspricht, handelt es sich um ein Krankheitsbild mit unterschiedlicher molekularer Basis. Baehner et al. (1972) führten vergleichende Untersuchungen des Granulozytenmetabolismus und der bakteriziden Kapazität bei den zwei erstbeschriebenen Patienten sowie bei Patienten mit CGD durch und konnten zeigen - bevor eine molekulargenetische Charakterisierung beider Defekte möglich war - daß es sich um unterschiedliche pathogenetische Mechanismen handelt. Bei dem schweren G6PD-Mangel lag die fehlende Produktion von bakterizidem H_2O_2 an der mangelnden Bereitstellung von NADPH bei einer sonst intakten Oxidase. Im Gegensatz dazu lag die metabolische Störung bei der CGD an der defekten NADPH-Oxidase selbst.

G6PD katalysiert die ersten 2 Reaktionen im Hexosemonophosphat-Shunt und dabei wird NADPH produziert (Abb. 2 und 3). Bei einem Enzymmangel kommt es zu einer mangelnden Bereitstellung von NADPH. NADPH stellt die Elektronen für die Bildung von Superoxidation aus molekularem Sauerstoff durch die NADPH-Oxidase während der Phagozytose zur Verfügung. Ein schwerer G6PD-Mangel in Neutrophilen führt durch eine geringe Bereitstellung von NADPH zu einer Verminderung des oxidativen Metabolismus und in manchen Fällen zum klinischen Phänotyp der chronischen Granulomatose bei sonst intakter NADPH-Oxidase. Voraussetzung für eine signifikante Einschränkung der O_2^- -Produktion in den Granulozyten wie bei der CGD ist eine G6PD-Enzymaktivitätsverminderung in den Leukozyten <5% des Normalwertes.

Die Sequenzierung des G6PD-Gens ergab bei allen 4 Patienten eine neue Deletion von 3 Nucleotiden (TCT) in Position 180-182, die zum Fehlen von Leucin in Position 61 geführt hat. Beide Mütter sind als heterozygot für diese Mutation identifiziert worden (Abb. 14). Die biochemische und molekulargenetische Charakterisierung des Enzyms führte zu der Identifizierung einer neuen, erstmals beschriebenen G6PD-Variante, die G6PD-Amsterdam genannt wurde.

Um die Auswirkung der vorliegenden Mutation auf die Proteinexpression zu untersuchen, wurde Immunoblot (Westernblot)-Verfahren zum Nachweis des mutierten Proteins in den Granulo-

zyten sowie in den Erythrozyten bei allen Patienten und bei beiden Müttern durchgeführt. G6PD war sowohl in den Erythrozyten als auch in den Granulozyten von allen 4 Patienten nicht nachweisbar, wobei beide Mütter eine verminderte Proteinexpression aufwiesen (Abb. 15a). Vorausgesetzt, daß ein kompletter Enzymmangel bisher nicht bekannt ist und wahrscheinlich mit dem Leben nicht vereinbar ist, weist dieser Befund eher auf das Vorhandensein eines instabilen Proteins hin. Um das zu untersuchen, wurde die Expression des G6PD-Proteins in sich schnell vermehrenden durch PHA stimulierten Lymphozyten des Patienten MG und seiner Mutter analysiert und war beim Patienten MG schwach und bei seiner Mutter erniedrigt (Abb. 15b).

Die biochemischen Charakteristika des mutierten Enzyms wurden nach Isolierung des rekombinanten Proteins nach Expression in einem *E. coli*-System analysiert (Tab. 15). Die *in vitro* Bestimmung der Aktivität und Stabilität des rekombinanten Proteins ergab keine große Abweichung vom Wildtyp-Protein. Durch die leicht veränderten enzymatischen Eigenschaften läßt sich der Schweregrad des Defektes wiederum nicht erklären. Darüberhinaus waren sowohl die Stabilität als auch die Aktivität der vorliegenden G6PD-Amsterdam-Variante im Vergleich zur bereits beschriebenen G6PD-Volendam-Variante (die ebenso mit einem Granulozytendefekt einhergeht) sowie zu anderen mit Klasse I assoziierten G6PD-Varianten (Roos et al. 1999; Beutler 1990) besser. Diese Daten lassen an einen anderen Faktor denken, der die Expression von G6PD-Amsterdam *in vivo* beeinflusst. Mittels der cDNA-Sequenzierung (Abb. 14) konnte eine weniger stabile mRNA für die G6PD-Amsterdam-Variante als für das Wildtyp-Protein festgestellt werden. Daher stellt die mRNA-Instabilität die wahrscheinlichste Erklärung für die schwere Enzymaktivitätsverminderung bei unseren Patienten dar. Es handelt sich um die erste Mutation im G6PD-Gen, die zu einer mRNA-Instabilität und damit zu einem schweren Enzymmangel geführt hat.

Eine Bestimmung der enzymatischen Eigenschaften (Enzymcharakterisierung) wurde noch 4 mal im gesamten literaturbekannten Patientenkollektiv durchgeführt (Kahn et al. 1973; Vives Corrons et al. 1982; Mamlok et al. 1985; Roos et al. 1999) und ergab den Nachweis vier neuer Enzymvarianten: G6PD-Benaventolike (Kahn et al. 1973), G6PD-Barcelona (Vives Corrons et al. 1982), G6PD-Baumont (Mamlok et al. 1985) und G6PD-Volendam (Roos et al. 1999). Nur bei G6PD-Volendam (Roos et al. 1999) liegt eine Mutationsanalyse (514 C→T) vor, da die restlichen Patienten vor der Möglichkeit der Klonierung und Sequenzierung des G6PD-Gens (Martini et al. 1986; Persico et al. 1986) beschrieben wurden. Bei allen Varianten konnten leicht veränderte enzymatische Eigenschaften des mutierten Proteins festgestellt werden, was auf das Vorliegen anderer Ursachen wie reduzierte Proteinsynthese oder Proteininstabilität für den

Schweregrad des Defektes hinweist. Roos et al. (1999) konnten bei der G6PD-Volendam-Variante neben der eingeschränkten katalytischen Aktivität des Enzyms eine Proteininstabilität feststellen. Bei der von Gray et al. (1973) beschriebenen Familie mit 3 betroffenen Geschwistern war die Isolierung des G6PD-Proteins aus einer Menge von 300ml Blut nicht möglich, was bei dieser Variante ebenso für eine quantitative Verminderung des Enzyms spricht.

Das klinische Bild ist sowohl durch die Auswirkung des Enzymmangels in den Erythrozyten (verkürzte Lebensdauer - Hämolyse) als auch durch die begleitende Granulozytendysfunktion (CGD-Phänotyp) charakterisiert. Bei den 4 hier beschriebenen Patienten weist die klinische Symptomatik eine variable Ausprägung auf, obwohl der Schweregrad der Enzymaktivitätsverminderung und die molekulargenetische Basis bei beiden Familien die gleichen sind. Das typische klinische Bild des Defektes, charakterisiert durch schwere Infektionen in Assoziation mit einer hämolytischen Anämie, weisen lediglich der Patient TG in der Familie G und nur einer (Patient GH) der 3 betroffenen Brüder in der Familie H auf. Der Bruder WH zeigt nur das klinische Bild des Enzymmangels in den Erythrozyten, welcher durch einen neonatalen Ikterus sowie durch hämolytische Krisen im Rahmen von banalen Infektionen charakterisiert ist. Er hat keine Infektionsanfälligkeit. Beim anderen Bruder MtH wurde der Defekt im Rahmen des Familienscreenings entdeckt. Er wies keine Infektionsanfälligkeit, keine Anämie und keinen Ikterus auf. Bei allen 4 Patienten sprechen die Laborparameter im infektionsfreien Intervall für eine milde kompensierte chronische nichtsphärozytäre hämolytische Anämie (CNSHA), die nur über die erhöhte Retikulozytenzahl und die leicht erniedrigten Hb-Werte erkennbar ist. Das klinische Bild und die enzymatische Aktivität entsprechen den Kriterien des WHO Klasse I G6PD-Mangels.

Bisher wurden noch 3 Familien mit mehr als einem betroffenen Mitglied beschrieben. Mamlok et al. 1985 und 1987 berichteten über 2 betroffene männliche eineiige Zwillinge in einer Familie mit 3 Kindern; Gray et al. (1973) berichteten über eine Familie mit 3 betroffenen männlichen Geschwistern; Kahn et al. (1973) berichteten über 2 betroffene männliche Patienten von insgesamt 5 Geschwistern. Ein klinisch asymptomatischer Bruder in dieser Familie mit gleich schwerem G6PD-Mangel in den Erythrozyten dürfte den gleichen Phagozytendefekt haben, es fehlen hier jedoch die Granulozytenfunktionstests zur Bestätigung.

Auch in der Gesamtgruppe der bisher beschriebenen Patienten weist die klinische Manifestation eine bemerkenswerte Variabilität auf. Der Enzymdefekt in den Erythrozyten manifestiert sich als eine CNSHA (Klasse I G6PD-Mangel) mit variabler klinischer Ausprägung zwischen einer

milden, klinisch asymptomatischen Form und einer chronischen Anämie (Tab. 5). Hämolytische Krisen treten unter dem Einfluß von auslösenden Faktoren auf. Ein neonataler Ikterus wurde bei 7 einschließlich der hier beschriebenen Patienten beobachtet (Gray et al. 1973; Mamlok et al. 1985; Roos et al. 1999; Costa et al. 2002; van Bruggen et al. 2002). Der Einfluß von Umweltfaktoren sowie anderer genetischer prädisponierender Faktoren scheint für die variable klinische Ausprägung verantwortlich zu sein. Diesbezüglich gibt es auch bei dem G6PD-Mangel in den Erythrozyten oft keine direkte Korrelation zwischen der *in vitro* Proteinaktivität und der klinischen Symptomatik (Yoshida 1973), was auf die Beteiligung anderer prädisponierender Faktoren hinweist.

Die klinischen Symptome des Granulozytendefektes treten selten im frühen Kindesalter auf (Vives Corrons et al. 1982; Mamlok et al. 1985, 1987), meist sogar erst in der zweiten Lebensdekade oder später und bestehen zunächst vorwiegend in einer erhöhten Empfänglichkeit für schwere bakterielle Infektionen. Ein infektionsfreies Intervall wird für die ersten 3 Lebensjahre (Mamlok et al. 1985, 1987, van Bruggen et al. 2002) bis zum 46 (!) Lebensjahr (Cooper et al. 1972) beschrieben. Etwa ein Drittel der Patienten (6 von 16) weisen keine gehäuften Infektionen auf (Tab. 5). Die von Wolach et al. (2004) beschriebenen weiteren Patienten (keine Patientenzahl angegeben) weisen ebenso keine Infektionsanfälligkeit auf.

Die verantwortlichen Mikroorganismen (Tab. 4) sind wie bei der CGD (Roos & Curnutte 1999) an erster Stelle Katalase-positive Bakterien sowie andere opportunistisch pathogene Erreger einschließlich Pilze. Eine Aspergillose, die zu den typischen Infektionen der CGD gehört, wird zum ersten Mal beim Patienten GH (*A. nidulans*) beschrieben. Eine *C. violaceum*-Sepsis wurde bereits einmal beschrieben (Mamlok et al. 1985, 1987). Erregerisolation bei weiteren Patienten ergab *E. coli* und *K. pneumoniae* bei einer Patientin mit Sepsis (Cooper et al. 1972), *S. aureus* bei einem Patienten mit rezidivierenden zervikalen Lymphadenitiden (Gray et al. 1973), *S. pneumoniae* bei einer Patientin mit Pneumonie (Roos et al. 1999) und *Campylobacter jejuni* bei einem Patienten mit schwerer Gastroenteritis (Mamlok et al. 1987).

Im Vergleich zu der klassischen Form der chronischen Granulomatose weisen die Patienten mit einem Granulozytendefekt durch schweren G6PD-Mangel eine verzögerte klinische Manifestation und zum Teil sogar keine Infektionsanfälligkeit auf. Die bei allen Patienten nachgewiesene Restaktivität im Sauerstoffmetabolismus scheint einen gewissen Schutz gegenüber Infektionen zu gewährleisten und kann das mildere klinische Bild erklären. Bei allen 4 hier beschriebenen Patienten wurde eine Restaktivität bei der Bestimmung des oxidativen Metabolismus mittels

quantitativer Methoden nachgewiesen. Die Bestimmung der H₂O₂-Produktion im DHR-Test bei der Familie H ergab Werte zwischen 2 und 4% der Kontrollen. Die mittels der gleichen Methode nachgewiesene Restaktivität bei 10 Patienten mit CGD-Varianten lag zwischen 1 und 5% der Kontrollen (eigene unpublizierte Daten aus dem Immunologischen Labor des Dr. von Haunerschen Kinderspitals) und ist dementsprechend vergleichbar. Patienten mit CGD und einer Restaktivität weisen im Vergleich zu der klassischen CGD ein milderes Krankheitsbild und eine Verzögerung der klinischen Manifestation auf (Höger et al. 1984a; Weening et al. 1985a; Newburger et al. 1986; Finn et al. 1990; Margolis et al. 1990; The International CGD Cooperative Study Group 1991; Bemiller et al. 1991; Schapiro et al. 1991; Casimir et al. 1992; Liese et al. 1996; Roos et al. 1992; Winkelstein et al. 2000), wobei schwere Infektionen einschließlich invasiver Aspergillosen bereits beschrieben sind (Newburger et al. 1986; Dean et al. 1993; Jung et al. 1993). Darüberhinaus kann das mildere klinische Bild durch die Übernahme der bakteriziden Funktion durch andere Systeme erklärt werden.

Wie bei der CGD konnte in Neutrophilen von Patienten mit schwerem G6PD-Mangel eine *in vitro* defekte Abtötungsfähigkeit gegenüber Katalase-positiven Mikroorganismen (Cooper et al. 1972; Baehner et al. 1972; Gray et al. 1973; Mamluk et al. 1987) und eine normale Abtötungsfähigkeit gegenüber Katalase-negativen festgestellt werden (Cooper et al. 1972; Gray et al. 1973). Im Gegensatz dazu war die bakterizide Aktivität gegenüber *E. coli* beim Patienten TG normal. Eine ebenso normale Bakterizidie gegenüber Katalase-positiven Mikroorganismen wurde mittels der gleichen Methode bei der Patientin mit der G6PD-Volendam-Variante (Roos et al. 1999) sowie bei weiteren Patienten mit schwerem G6PD-Mangel in den Leukozyten (Wolach et al. 2004) beobachtet, wobei Neutrophile von CGD-Patienten mittels der gleichen Methode eine eingeschränkte Bakterizidie aufwiesen (Hamers et al. 1984). Diese Befunde weisen auf die Funktion alternativer Abtötungs-Systeme hin (Levy 2000; Reeves et al. 2002; Wolach et al. 2004), wobei die Diskrepanz zwischen diesen und früheren Ergebnissen an den unterschiedlichen Methoden liegen kann. Wolach et al. (2004) stellten tagesperiodische (diurnale) Schwankungen der G6PD-Aktivität als eine mögliche Erklärung für die normale Bakterizidie und die fehlende Infektionsanfälligkeit bei Patienten mit schwerem G6PD-Mangel in Neutrophilen dar. Darüberhinaus hängt die Wichtigkeit des einen oder anderen Abtötungsmechanismus von der Art des aufgenommenen Mikroorganismus ab (Weiss et al. 1982; Weiss et al. 1985). Möglicherweise sind die Neutrophilen dieser Patienten in der Lage, *in vivo* eindringende Bakterien in geringem Umfang durch die sauerstoffunabhängigen Mechanismen mit der Unterstützung der in geringen Mengen produzierten Sauerstoffmetabolite abzutöten, wohingegen die bakterizide Ka-

pazität bei einem massiven Befall unzureichend ist. Andererseits stellt die Exposition durch exogene Risikofaktoren einen weiteren wichtigen Faktor dar. Patient GH erkrankte an einer Aspergillose während seiner Tätigkeit im Zoo als Tierpfleger; hier ist die Exposition mit *Aspergillus*-Sporen als ein prädisponierender Faktor anzusehen. Newburger et al. (1986) beschrieben einen Patienten mit CGD und Restaktivität, der ebenso erstmals im Alter von 15 Jahren nach einer Exposition mit *Aspergillus*-Sporen während einer Sommerarbeit an einer schweren Pneumonie erkrankte. Weitere genetische Faktoren oder Genpolymorphismus wie bei der CGD (Foster et al. 1998) sind bei der variablen klinischen Ausprägung des Defektes denkbar.

Beide heterozygot betroffenen Mütter sind symptomlos. Die erhöhten Retikulozytenzahlen im infektionsfreien Intervall bei normalen Hb-Werten weisen bei beiden auf eine milde chronische Hämolyse hin. Klinische Symptome wie Lupus erythematodes, Hautausschlag an lichtexponierten Körperstellen, rezidivierende Stomatitis aphthosa und Raynaud-Phänomen, die bei Konduktorinnen für die chronische Granulomatose auftreten können (Brandrup et al. 1981; Roesler et al. 1990; Sillevs Smitt et al. 1990; Hafner et al. 1992, 1993; Rupec et al. 2000), sind bisher bei Konduktorinnen für den schweren G6PD-Mangel mit Granulozytendysfunktion nicht beobachtet worden. Yeaman et al. 1992 beschrieben eine 13jährige Patientin mit diskoidem Lupus erythematodes und dem Phänotyp einer Konduktorin für die Cytochrom *b*-positive Form der CGD in der Neutrophilenfunktion. Diese Patientin wies erniedrigte G6PD-Aktivität in den Neutrophilen aber normale Enzymaktivität in den Erythrozyten auf. Weitere Untersuchungen zur Differentialdiagnose zwischen CGD und G6PD-Mangel fehlen und somit kann in diesem Fall der Zusammenhang des diskoiden Lupus erythematodes mit dem CGD-Phänotyp durch einen G6PD-Mangel nicht sicher gestellt werden.

Die zwei Zellpopulationen der Mütter sind durch die zufällige Inaktivierung eines X-Chromosoms nach der Lyon-Theorie (Lyon 1972) bedingt. Charakteristischerweise weisen die peripheren Blutzellen ein Mosaik aus normalen und defizienten Zellen mit intermediären Enzymaktivitätswerten im Zellysatz auf.

Zwei Patienten (Cooper et al. 1972; Roos et al. 1999) sind weiblichen Geschlechts. Eine X-chromosomale Vererbung ist auch in diesen Fällen nicht auszuschließen und kann folgende Erklärungen haben: Abnormalitäten der geschlechtsgebundenen Chromosomen (Turner Syndrom oder XY weiblich), welche bisher nicht mit einem G6PD-Mangel in Neutrophilen beschrieben wurden; Mutationen in beiden X-Chromosomen, was in Bevölkerungen mit hoher Genfrequenz des G6PD-Mangels nicht unwahrscheinlich ist, aber ebenfalls noch nicht beschrieben wurde

oder eine extreme Lyonisierung mit Expression des mutierten G6PD-Allels bei der Mehrzahl der Zellen. In dem Fall weisen heterozygot betroffene Frauen laborchemische Befunde und klinische Symptomatik in der gleichen Ausprägung wie die männlichen heterozygot Erkrankten auf. Eine extreme Lyonisierung konnte bei einer der zwei weiblichen Patienten mit dem schweren G6PD-Mangel in Neutrophilen nachgewiesen werden (Roos et al. 1999). Bei der zweiten (Cooper et al. 1972) wird ein Heterozygotenstatus angenommen, da ihr Sohn nicht G6PD-defizient war. Obwohl nicht untersucht, ist in dem Fall eine extreme Lyonisierung denkbar.

In der Literatur ist sowohl bei der X-chromosomal vererbten Form der CGD (Miyazaki et al. 1976; Mills et al. 1980; Johnston et al. 1985; Newburger et al. 1994; Lun et al. 2002; Rösen-Wolf et al. 2001; Anderson-Cohen et al. 2003) als auch bei dem G6PD-Mangel (Luzzatto et al. 1979; Roos et al. 1999) eine extreme Lyonisierung mit Expression des mutierten Allels bei der Mehrzahl der Zellen bereits beschrieben worden.

Zu den möglichen Erklärungen für diese Konstellation zählen die zufällige Inaktivierung des gleichen Chromosoms in früher Embryogenese, eine genetisch determinierte extreme X-Inaktivierung oder eine erworbene somatische Zellselektion.

Vorausgesetzt, daß die X-Inaktivierung in einem frühen Stadium der Embryogenese mit ca. 8 vorhandenen hämopoetischen Zellen stattfindet (Buescher et al. 1985), ist die Wahrscheinlichkeit der Inaktivierung des gleichen Chromosoms in allen myeloischen Zellen ca. 1 in 256 (i.e. $1:2^8$) (Newburger et al. 1994). Obwohl die Wahrscheinlichkeit gering ist, kann dies im Einzelfall nicht ausgeschlossen werden.

Es konnte gezeigt werden, daß der X-Inaktivierungsprozeß genetisch determiniert ist (Belmont 1996). Roos et al. (1999) berichteten über eine extreme X-Inaktivierung in drei Generationen bei einer Familie mit weiblichen heterozygoten Merkmalsträgern für den G6PD-Mangel in Neutrophilen. Eine extreme X-Inaktivierung wurde bereits ebenso in drei Generationen bei einer Familie mit G6PD-Mangel in Erythrozyten beobachtet (Luzzatto et al. 1979). Angenommen, daß die X-Inaktivierung ein zufälliger Prozeß ist, weist die selektive Expression einer der beiden resultierenden Zelllinien in diesen Familien auf ein sekundäres Phänomen auf genetischer Basis hin. Eine vererbte Form der extremen Lyonisierung wurde bereits in weiteren Familien mit X-chromosomalen Erkrankungen beschrieben (Belmont 1996; Puck & Willard 1998; Parolini et al. 1998).

Einen weiteren Mechanismus stellt die klonale Proliferation somatischer Zellen, die das defekte X-Chromosom tragen, zu einem Zeitpunkt nach der X-Inaktivierung dar (Abb. 9). Bei den sich

schnell vermehrenden hämopoetischen Zellen ist eine Selektion auf somatischer Ebene bei einer der beiden Zelllinien möglich. In dem Fall ist die unbalancierte Lyonisierungsrate kein generalisiertes Phänomen und betrifft charakteristischerweise die peripheren Blutzellen, wohingegen andere Zellen wie Fibroblasten nicht betroffen sind (Williams et al. 1983; Williams et al. 1984).

Darüberhinaus ist eine Verschiebung der Lyonisierungsrate im Laufe der Jahre innerhalb der Blutzellen mit zunehmender prozentualer Expression einer der beiden Zelllinien möglich (Hizeroth & Bender 1981; Busque et al. 1996; Filosa et al. 1996). Eine altersabhängige zunehmende Expression des betroffenen Allels ist sowohl beim G6PD-Mangel (Hizeroth & Bender 1981) als auch bei der CGD (Rösen-Wolf et al. 2001; Lun et al. 2002; Johnston et al. 1985) beschrieben worden und kann zu einer klinischen Manifestation des X-chromosomal vererbten Defektes im Erwachsenenalter bei weiblichen Heterozygoten führen (Rösen-Wolf et al. 2001; Lun et al. 2002; Johnston et al. 1985). Die von Cooper et al. (1972) erstmals beschriebene Patientin mit einem schweren G6PD-Mangel und einer Neutrophilendysfunktion wurde erst in der dritten Lebensdekade symptomatisch. Da sie wahrscheinlich heterozygot betroffen war (ihr Sohn hatte eine normale G6PD-Aktivität), ist bei der späten Manifestation eine erworbene altersabhängige extreme Lyonisierung denkbar. Obwohl extrem selten wäre noch bei dieser Patientin ein somatisches Mosaik mit einer Neumutation im Knochenmark, wie bereits bei der CGD beschrieben wurde (Wolach et al. 2005), möglich.

Die wohl interessantesten Fragen, die sich aus den erhobenen Daten ergeben, sind die folgenden:

- Warum tritt der Defekt so selten auf, obwohl der G6PD-Mangel häufig ist?
- Ist eine Therapie bzw. Infektionsprophylaxe wie bei der CGD indiziert?
- Wie kann man die Identifizierung der Patienten und der Konduktorinnen optimieren?

Obwohl der G6PD-Mangel sowohl geographisch als auch ethnisch weit verbreitet ist und relativ häufig auftritt, wurde eine Assoziation mit einer Granulozytendysfunktion nur in wenigen Fällen beobachtet. Eine Erklärung dafür ergibt sich aus der Tatsache, daß die G6PD-Aktivität in den Neutrophilen unter 5% des Normalwertes liegen muß, damit diese Zellen einen pathologischen oxidativen Metabolismus mit klinischer Bedeutung aufweisen. Solche extrem niedrige Enzymwerte in den Neutrophilen sind bei seltenen, sporadisch auftretenden Enzymvarianten der Klasse I und nicht bei den häufigen polymorphen G6PD-Varianten beobachtet worden. Neutrophile mit einer Enzymaktivität über 15% des Normalwertes weisen einen normalen oxidativen Metabolismus und eine normale bakterizide Aktivität auf (Rodey et al. 1970; Baehner et al. 1972;

Miller & Wollman 1974; Schilirò 1976; Ardati et al. 1997). Für Werte zwischen 5 und 15% liegen beschränkte Daten vor. Matsuura et al. (1983) berichteten über 2 Geschwister mit einer G6PD-Aktivität von 6-7% in den neutrophilen Granulozyten ohne Infektionsanfälligkeit. Beide Patienten zeigten Normalwerte für den qualitativen NBT-Test und die bakterizide Aktivität aber erniedrigte Werte für die Superoxidanion-Produktion, den Sauerstoffverbrauch und die Chemilumineszenz. Der quantitative NBT-Test war bei einem Patienten erniedrigt. Wolach et al. (2004) haben zum ersten Mal eine positive Korrelation zwischen der G6PD-Aktivität, der HMP-Aktivität und der Superoxidanion-Produktion bei Granulozyten von Patienten mit G6PD-Mangel gezeigt. In dieser Studie konnten weitere Patienten mit einem schweren Mangel in Neutrophilen (<5% Aktivität) identifiziert werden, die interessanterweise keine Infektionsanfälligkeit aufwiesen.

Die Enzymaktivitätswerte weisen eine breite gewebespezifische Variabilität auf (Battistuzzi et al. 1985), obwohl das kodierende Gen für das G6PD-Protein in allen Zellen das gleiche ist. Bei den meisten G6PD-Varianten liegen die Enzymaktivitätswerte in den Leukozyten zwischen 20 und 75% des Normalwertes (Ramot et al. 1959; Chan et al. 1965; Justice et al. 1966; Tzortzotou-Stathopoulou et al. 1980) oder im Normbereich (Marks et al. 1959). Interessanterweise ist die Enzymaktivität in den Leukozyten bei gesunden Testpersonen höher als in den Erythrozyten (Ramot et al. 1959; Justice et al. 1966; Battistuzzi et al. 1985; Luzzatto & Battistuzzi 1985; Wolach et al. 2004).

In der Regel ist die Enzymaktivität in jungen Erythrozyten höher und nimmt dann innerhalb von Tagen bis Wochen ab. Die höhere Aktivität in den Neutrophilen korreliert gut mit der deutlich kürzeren Lebensdauer dieser Zellen (14 Tage) gegenüber der Lebensdauer der Erythrozyten (120 Tage). So wird die Aktivität des Enzyms in den Neutrophilen bei der Mehrzahl der Fälle nicht erheblich reduziert, so daß eine adäquate Funktion der Zellen gewährleistet ist. Außerdem ist die Bereitstellung von NADPH durch alternative Systeme in den Leukozyten denkbar. Aus diesen Daten wäre ein schwerer Aktivitätsverlust in den Leukozyten nur bei seltenen Mutationen, die beispielsweise zu einer verminderten Proteinexpression führen, zu erwarten. Sowohl bei unseren 4 als auch bei 2 weiteren Patienten (Roos et al. 1999; Vives Corrons et al. 1982) konnte eine Auswirkung der Mutation auf die Proteinexpression bzw. Stabilität festgestellt werden. Bei der von Gray et al. (1973) beschriebenen Familie konnte das mutierte Protein aus einer Menge von 300ml nicht isoliert werden, was in dem Fall auch für eine verminderte Proteinexpression sprechen könnte.

Trotz der begrenzten Patientenzahl gehören die einzelnen Patienten verschiedenen ethnischen Gruppen an. Bisher wurde kein Patient mit einem Granulozytendefekt durch schweren G6PD-Mangel innerhalb der schwarzen Bevölkerung beschrieben, obwohl der G6PD-Mangel besonders häufig in dieser Bevölkerung vorkommt. Die beschriebenen Patienten, über die es Informationen gibt, sind kaukasischer (Baehner et al. 1972), isländisch-französisch-deutscher (Gray et al. 1973), spanischer (Vives Corrons et al. 1982; Mamlok et al. 1985), italienischer (Kahn et al. 1973), holländischer (Roos et al. 1999), portugiesischer (Costa et al. 2002) und israelischer (Wolach et al. 2004) Herkunft. Von den hier beschriebenen Familien stammt eine aus Hindustan und eine aus Deutschland. Bei der Häufigkeit des Defektes und der oft milden klinischen Symptomatik ist mit undiagnostizierten Fällen zu rechnen.

Die Prognose ist relativ ungewiß, da bisher nur vereinzelt erwachsene Patienten bekannt sind und eine Langzeitbeobachtung fehlt. Die Prognose hängt vom Granulozytendefekt und der damit verbundenen erhöhten Empfänglichkeit für schwere Infektionen ab und dürfte mit der Prognose der CGD vergleichbar sein. Infektionskomplikationen mit tödlichem Verlauf sind bereits bei 2 Patienten beschrieben worden. Ein 3jähriger Patient verstarb an einer *C. violaceum*-Sepsis (Mamlok et al. 1985, 1987) und eine 52jährige Patientin an einer Sepsis durch *E. coli* und *K. pneumoniae* (Cooper et al. 1972).

Eine kausale Therapie gibt es bisher nicht. Eine Vorbeugung der hämolytischen Krisen wird durch Vermeidung des auslösenden Agens (z.B. kontraindizierte Medikamente) sowie durch Bekämpfung von Infektionen erreicht. Bei einer schweren Hämolyse sind Bluttransfusionen indiziert. Bezüglich einer Infektionsprophylaxe bei Patienten mit schwerem G6PD-Mangel und Granulozytendysfunktion liegen keine Daten bzw. Studien vor. Der Nutzen einer antimikrobiellen und eventuell antimyoktischen Dauerprophylaxe beruht auf Studienergebnissen bei der CGD. Die Phagozyten können wie bei der CGD in normalem Maß phagozytieren, aber nicht effektiv abtöten. Zur Beseitigung der Infektionen sind intrazellulär wirksame Antibiotika erforderlich. Diese Substanzen sind in der Lage, in den polymorphkernigen Granulozyten zu akkumulieren, intrazellulären Bakterien abzutöten und dadurch den fehlenden bakteriziden Effekt der Phagozyten teilweise auszugleichen (Höger et al. 1984b).

Als Standardtherapie für die CGD hat sich eine Dauerprophylaxe mit einem Antibiotikum und einem oralen Antimykotikum etabliert. Die prophylaktische Therapie mit γ -Interferon, die sich bei der CGD bewährt hat (The International CGD Cooperative Study Group 1991), bleibt bei

einem G6PD-Mangel ungewiß. Der Wirkmechanismus von γ -Interferon ist unbekannt, möglicherweise wird die Produktion anderer Abtötungsderivaten wie NO induziert (Åhlin et al. 1999).

Die Indikation zur antimikrobiellen und/oder antimykotischen Infektionsprophylaxe sollte individuell begutachtet werden. Beim Einsetzen von Medikamenten sollte das Hämolyserisiko berücksichtigt werden. Eine Standardprophylaxe mit TMP/SMX wie bei der CGD sollte bei dem schweren Enzymmangel wegen des hämolytischen Effektes nicht eingesetzt werden (Beutler 1994; Luzzatto et al. 2001), obwohl in klinischen Studien eine Hämolyse nur selten beobachtet wurde (Markowitz & Saravolatz 1987). Als alternative Staphylokokken-Präparate mit intrazellulärer Wirksamkeit und sicherem Einsatz bei einem G6PD-Mangel können Fosfomycin, Clindamycin, Vancomycin, Rifampicin oder Ciprofloxacin eingesetzt werden (Mandel & Vest 1972; Ezer & Soothill 1974; Jacobs & Wilson 1983; Zimmerli et al. 1983; Höger et al. 1984b; Höger et al. 1985; Belohradsky 1986; Seger & Mühlebach 1988-89; Hand & King-Thompson 1990; van Rensburg et al. 1990; Hof 1991; van der Auwera et al. 1991; Trautmann et al. 1992; Gemmel 1993; Pemán et al. 1994; Wahn & Seger 1998; Cantón et al. 1999; Goldblatt 2002).

Der Defekt könnte mit einer Blutstammzelltransplantation geheilt werden, bisher gibt es damit jedoch keine Erfahrung. Durch das intakte T-Zellsystem besteht die Gefahr der Transplantatabstoßung und es bedarf einer myeloablativen Therapie. Alternativ wäre eine Blutstammzelltransplantation nach reduzierter Konditionierung denkbar. Die somatische Gentherapie wäre eine weitere kurative Behandlung des Defektes. Erste Versuche in Tiermodellen belegen Wirksamkeit des Gentransfers (Rovira et al. 2000) und lassen Hoffnungen auf eine zukünftige Anwendung bei Patienten. Eine kurative Behandlung könnte bei Patienten mit schwerem klinischen Verlauf und Komplikationen versucht werden, wobei man das therapeutische Risiko einerseits mit der unklaren Prognose des Defektes andererseits abwägen muß.

Eine frühe Diagnose ist wünschenswert, um irreversible Komplikationen bei schweren Infektionen mit einer früh einsetzenden Breitspektrum-Therapie zu verhindern. Darüberhinaus ist die Wahl von zell- und gewebeängigen Antibiotika wie bei der chronischen Granulomatose (Höger et al. 1984b, 1985; Belohradsky 1986; Mouy et al. 1989; Gemmel 1993; Fischer et al. 1993; Seger & Mühlebach 1988-89; Wahn & Seger 1998; Segal et al. 2000; Goldblatt 2002) unter Berücksichtigung des Hämolyserisikos sowie die rechtzeitige antimykotische Therapie bei unklaren Infektionen für den Verlauf entscheidend. Bei schweren, lebensbedrohlichen Infektionen könnten Granulozytentransfusionen wie bei der CGD (Dougherty et al. 1983; Fanconi et al. 1985; Quie 1987; Fischer et al. 1993; Lekstrom-Himes et al. 1994; von Planta et al. 1997; Segal et al. 2000) eingesetzt werden.

Bei Patienten, die keine antibiotische bzw. antimykotische Prophylaxe erhalten, ist eine klinische Langzeitüberwachung unerlässlich. Vermeidung der Exposition durch exogene Risikofaktoren, wie z.B. *Aspergillus*-Sporen, ist zur Vorbeugung schwerer Infektionen ebenso wichtig.

Daher ist für den Kliniker die Identifizierung der Patienten mit diesem Defekt hinsichtlich einer Prophylaxe sowie einer zufriedenstellenden und wirksamen Therapie wichtig. Bei allen Patienten mit CNSHA und extrem niedrigen Werten an G6PD-Aktivität in den Erythrozyten und/oder Infektionsanfälligkeit sollte die Enzymaktivität in den Leukozyten gemessen werden. Screening-Tests für die Bestimmung des Sauerstoffmetabolismus können vorgenommen werden.

Die Identifizierung weiblicher heterozygoter Merkmalsträger ist für die genetische Beratung wichtig. Vom Lyon-Konzept ausgehend ist vorauszusehen, daß die Enzymaktivitätswerte im Zellysat bei den Konduktorinnen extrem variieren können. Weibliche heterozygot Betroffene können normale, intermediäre oder niedrige G6PD-Aktivität entsprechend der Lyonisierungsra-
tio aufweisen. Da bei einer unbalancierten Lyonisierung mit Expression des normalen Allels bei der Mehrzahl der Zellen (Filosa et al. 1996; Vulliamy et al. 1997a) die große Zahl der normalen Zellen die kleinere Zahl anormaler Zellen verdecken kann, kann die Bestimmung der Enzymaktivität im Hämolysat sowie die Bestimmung des oxidativen Metabolismus im Zellysat falsch normale Befunde liefern. Somit kann der Überträgerstatus übersehen werden. In dem Fall muß zur Identifizierung der Konduktorinnen die Funktion in der einzelnen Zelle geprüft werden. Für den Nachweis des Enzyms in der einzelnen Zelle sind spezielle Methoden entwickelt worden (WHO Scientific Group 1967). Für die Bestimmung der Sauerstoffradikalbildung in der einzelnen Zelle eignen sich die durchflußzytometrischen Methoden mit sensitivstem Indikator Dihydro-rhodamin-123 (Rothe et al. 1988; Rothe & Valet 1990a; Rothe et al. 1991; Smith & Weidemann 1993; Vowells et al. 1995).

Differentialdiagnostisch kommen weitere Defekte, die mit Störungen des Sauerstoffmetabolismus einhergehen, in Betracht. Diese sind der Myeloperoxidasemangel und die Defekte des Glutathionmetabolismus. Es handelt sich um autosomal-rezessiv vererbte Defekte, bei denen im Gegensatz zu der CGD und dem G6PD-Mangel in Neutrophilen die Fähigkeit der Granulozyten zur Bildung von Sauerstoffmetaboliten nicht beeinträchtigt ist. Das Screening hinsichtlich des „oxidative burst“ verläuft normal, wobei zu beachten ist, daß der Peroxidase-abhängige DHR-Test beim kompletten MPO-Mangel falsch pathologische Befunde liefern kann (van Pelt et al. 1996; Badolato et al. 2002; eigene unpublizierte Daten aus dem Immunologischen Labor des Dr. von Haunerschen Kinderspitals). Eine in der Litaratur beschriebene *in vitro* defekte Bakterizidie

konnte in klinischen Beobachtungen nicht bestätigt werden. Patienten mit Myeloperoxidase-mangel oder Glutathion-Synthetase-Defekt weisen nicht das schwere klinische Bild einer chronischen Granulomatose auf. Bei einem G6PD-Mangel kommt besonders der Glutathion-Synthetase-Defekt differentialdiagnostisch in Frage, da bei beiden Defekten eine Hämolyse in Streßsituationen auftritt.

Bei Patienten mit einem schweren G6PD-Mangel in Erythrozyten (CNSHA, Klasse I-Defekt) sollte die Enzymaktivität in den Leukozyten bestimmt werden und/oder eine Screening-Untersuchung des Sauerstoffmetabolismus der neutrophilen Granulozyten vorgenommen werden. Auch bei weiblichem Geschlecht und bei Bevölkerungen mit niedriger Genfrequenz für den G6PD-Mangel sowie bei einer späten klinischen Manifestation ist bei entsprechender klinischer Symptomatik und bei einem pathologischen Sauerstoffmetabolismus der Granulozyten an den schweren G6PD-Mangel in Leukozyten zu denken. Eine CGD sollte molekulargenetisch ausgeschlossen werden, da eine zufällige Koexistenz beider Defekte möglich ist (Agudelo-Flórez et al. 2004). Patienten mit dem schweren G6PD-Mangel in Granulozyten sind genauso wie Patienten mit einer chronischen Granulomatose durch schwere, lebensbedrohliche Infektionen gefährdet und daher ist eine dauerhafte Infektionsprophylaxe indiziert. Darüberhinaus ist die Identifizierung asymptomatischer Patienten in betroffenen Familien sowie die genetische Beratung eine sehr wichtige Konsequenz, die sich aus der korrekten Diagnose ergibt. Register der identifizierten Patienten sollten geführt werden, um wichtige Informationen über die Prognose, den Verlauf, die Indikation einer Prophylaxe sowie den Nutzen neuer kurativer therapeutischer Ansätze wie Blutstammzelltransplantation oder Gentherapie zu bekommen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das klinische und biochemische Bild der chronischen Granulomatose kann bei einem schweren G6PD-Mangel in Granulozyten mit einer Enzymaktivität unter 5% des Normalwertes hervorgerufen werden. Obwohl der G6PD-Mangel der häufigste aller klinisch bedeutsamen Enzymdefekte des Menschen mit etwa 400 Millionen Gendefekträgern weltweit ist, tritt der schwere Enzymmangel in Granulozyten sehr selten auf und ist mit sporadischen Enzymvarianten der Klasse I verbunden. In der vorliegenden Arbeit werden die klinischen, biochemischen, immunologischen und molekulargenetischen Befunde bei 4 Patienten aus zwei verschiedenen Familien mit einem schweren G6PD-Mangel in Erythrozyten und Granulozyten und einem daraus folgenden Phagozytendefekt zusammengestellt und mit Daten von bekannten Fällen aus der Literatur verglichen. Es konnte eine Deletion von 3 Nukleotiden in Position 180-182 im G6PD-Gen festgestellt werden, die zu einem Fehlen von Leucin in Position 61 geführt hat. Der ausgeprägte Enzymmangel konnte auf eine instabile mRNA als Folge der verantwortlichen Mutation zurückgeführt werden. Das zum ersten Mal beschriebene mutierte Enzym wurde G6PD-Amsterdam genannt.

Die klinischen und laborchemischen Daten der hier beschriebenen Patienten sowie die aus der Literatur erhobenen Daten weisen auf ein heterogenes Krankheitsbild mit unterschiedlicher klinischer Ausprägung hin. Voraussetzung für die Granulozytendysfunktion ist eine G6PD-Aktivitätsabnahme unter 5% in den Leukozyten bzw. Granulozyten. Der Phagozytendefekt ist klinisch durch Infektionen, vor allem durch Katalase-positive Bakterien und Pilze, charakterisiert, obwohl es Patienten gibt, die trotz der pathologischen Neutrophilenfunktion keine Infektionen aufweisen. Der Erythrozytendefekt entspricht den Kriterien des WHO Klasse I G6PD-Mangels und ist durch eine chronische nichtsphärozytäre hämolytische Anämie gekennzeichnet, die klinisch zwischen einer milden kompensierten Anämie und einer schweren Anämie mit hämolytischen Krisen unter dem Einfluß exogener Faktoren variieren kann.

Bei Patienten mit einem schweren G6PD-Mangel in Erythrozyten (CNSHA, Klasse I-Defekt) sollte die Enzymaktivität in den Leukozyten bestimmt werden und/oder eine Screening-Untersuchung des Sauerstoffmetabolismus der neutrophilen Granulozyten vorgenommen werden. Auch bei weiblichem Geschlecht und bei Bevölkerungen mit niedriger Genfrequenz für den G6PD-Mangel sowie bei einer späten klinischen Manifestation ist bei einer entsprechenden klinischen Symptomatik und bei einem pathologischen Sauerstoffmetabolismus der Granulozyten nach Ausschluß einer CGD an den schweren G6PD-Mangel in Leukozyten zu denken. Patienten mit diesem Defekt sind genauso wie Patienten mit einer chronischen Granulomatose durch

schwere, lebensbedrohliche Infektionen gefährdet und daher ist eine dauerhafte Infektionsprophylaxe indiziert. Darüberhinaus ist die Identifizierung asymptomatischer Patienten in betroffenen Familien sowie die genetische Beratung eine sehr wichtige Konsequenz aus der korrekten Diagnose. Register der identifizierten Patienten sollten geführt werden, um wichtige Informationen über die Prognose, den Verlauf, die Indikation einer Prophylaxe sowie den Nutzen neuer kurativer therapeutischer Einsätze wie Blutstammzelltransplantation oder Gentherapie zu bekommen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Abkowitz JL, Taboada M, Shelton GH, Catlin SN, Gutter P, Kiklevich JV. An X chromosome gene regulates hematopoietic stem cell kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(7):3862-6.

Agudelo-Flórez P, Costa-Carvalho BT, López JA, Redher J, Newburger PE, Olalla-Saad ST, Condino-Neto A. Association of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and X-linked chronic granulomatous disease in a child with anemia and recurrent infections. *Am J Hematol* 2004;75(3):151-6.

Åhlin A, De Boer M, Roos D, Leusen J, Smith CIE, Sundin U, Rabbani H, Palmblad J, Elinder G. Prevalence, genetics and clinical presentation of chronic granulomatous disease in Sweden. *Acta Paediatr* 1995;84(12):1386-94.

Åhlin A, Larfars G, Elinder G, Palmblad J, Gyllenhammar H. Gamma interferon treatment of patients with chronic granulomatous disease is associated with augmented production of nitric oxide by polymorphonuclear neutrophils. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6(3):420-4.

Anderson-Cohen M, Holland SM, Kuhns DB, Fleisher TA, Ding L, Brenner S, Malech HL, Roesler J. Severe phenotype of chronic granulomatous disease presenting in a female with a de novo mutation in gp91-phox and a non familial, extremely skewed X chromosome inactivation. *Clin Immunol* 2003;109(3):308-17.

Ardati KO, Bajakian KM, Tabbara KS. Effect of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on neutrophil function. *Acta Haematol* 1997;97(4):211-5.

Arese P, Mannuzzu L, Turrini F. Pathophysiology of favism. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch* 1989;116(5):745-52.

Arese P, De Flora A. Pathophysiology of hemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Semin Hematol* 1990;27(1):1-40.

Athens JW, Haab OP, Raab SO, Mauer AM, Ashenbrucker H, Cartwright GE, Wintrobe MM. Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. *J Clin Invest* 1961;40(6):989-95.

Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 1973;52(3):741-4.

Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). *N Engl J Med* 1978a;298(12):659-68.

Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (second of two parts). *N Engl J Med* 1978b;298(13):721-5.

Babior BM. Activation of the respiratory burst oxidase. *Environ Health Perspect* 1994;102 Suppl 10:53-6.

Babior BM, Golde DW. Production, distribution, and fate of neutrophils. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, editors. *Williams Hematology*. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 753-9.

Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999;93(5):1464-76.

Babior BM, Lanbeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2002;397(2):342-4.

Badolato R, Verardi R, Lanfranchi A, Romano M, Mazzi P, Dusi S, Vermi W, Moratto D, Fontana S, Cattalini M, Notarangelo LD, Plebani A. Pitfalls of flow cytometric analysis by dihydrorodamine-123 in the diagnosis of chronic granulomatous disease. *Ital J Pediatr* 2002;28:326-9.

Baehner RL, Nathan DG. Leukocyte oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease. *Science* 1967;155(764):835-6.

Baehner RL, Nathan DG. Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med* 1968;278(18):971-6.

Baehner RL, Johnston RB, Nathan DG. Comparative study of the metabolic and bactericidal characteristics of severely glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient polymorphonuclear leukocytes and leukocytes from children with chronic granulomatous disease. *J Reticuloendothel Soc* 1972;12(2):150-69.

Baggiolini M, Boulay F, Badwey JA, Curnutte JT. Activation of neutrophil leukocytes: chemoattractant receptors and respiratory burst. *FASEB J* 1993;7(11):1004-10.

Bainton DF. Morphology of neutrophils, eosinophils, and basophils. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, editors. *Williams Hematology*. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 729-43.

Baldrige CW, Gerard RW. The extra respiration of phagocytosis. *Am J Physiol* 1933;103:235-6.

Balfour HH Jr, Shehan JJ, Speicher CE, Kauder E. Chronic granulomatous disease of childhood in a 23-year-old man. *JAMA* 1971;217(7):960-1.

Barese CN, Goebel WS, Dinauer MC. Gene therapy for chronic granulomatous disease. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4(9):1423-34.

Bass DA, Parce JW, DeChatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* 1983;130(4):1910-7.

Battistuzzi G, D'Urso M, Toniolo D, Persico GM, Luzzatto L. Tissue-specific levels of human glucose-6-phosphate dehydrogenase correlate with methylation of specific sites at the 3' end of the gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82(5):1465-9.

Baumgart KW, Britton WJ, Kemp A, French M, Robertson D. The spectrum of primary immunodeficiency disorders in Australia. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100(3):415-23.

Bautista JM, Mason PJ, Luzzatto L. Purification and properties of human glucose-6-phosphate dehydrogenase made in *E. coli*. *Biochim Biophys Acta* 1992;1119(1):74-80.

Belmont JW. Genetic control of X inactivation and processes leading to X-inactivation skewing. *Am J Hum Genet* 1996;58(6):1101-8.

Belohradsky BH. *Primäre Immundefekte: Klinik, Immunologie und Genetik*. Stuttgart: Kohlhammer; 1986.

Belsey MA. The epidemiology of favism. *Bull World Health Organ* 1973;48(1):1-13.

Bemiller LS, Rost JR, Ku-Balai TL, Curnutte JT. The production of intracellular oxidants by stimulated neutrophils correlates with the clinical severity of chronic granulomatous disease (CGD) [abstract]. *Blood* 1991;78(10 Suppl 1):377a.

Bemiller LS, Roberts DH, Starko KM, Curnutte JT. Safety and effectiveness of long-term interferon gamma therapy in patients with chronic granulomatous disease. *Blood Cells Mol Dis* 1995;21(3):239-47.

Bendix-Hansen K, Kerndrup G. Myeloperoxidase-deficient polymorphonuclear leucocytes (V): relation to FAB-classification and neutrophil alkaline phosphatase activity in primary myelodysplastic syndromes. *Scand J Haematol* 1985;35(2):197-200.

Bendix-Hansen K. Myeloperoxidase-deficient polymorphonuclear leucocytes (VII): incidence in unrelated myeloproliferative disorders. *Scand J Haematol* 1986;36(1):8-10.

Bendix-Hansen K, Kerndrup G, Pedersen B. Myeloperoxidase-deficient polymorphonuclear leucocytes (VI): relation to cytogenetic abnormalities in primary myelodysplastic syndromes. *Scand J Haematol* 1986;36(1):3-7.

Berendes H, Bridges RA, Good RA. A fatal granulomatosis of childhood: the clinical study of a new syndrome. *Minn Med* 1957;40(5):309-12.

Beutler E. The genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Semin Hematol* 1990;27(2):137-64.

Beutler E. G6PD deficiency. *Blood* 1994; 84(11):3613-36.

Beutler E: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and other red cell enzyme abnormalities. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, editors. *Williams Hematology*. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 527-45.

Beutler E, Vulliamy TJ. Hematologically important mutations: glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Blood Cells Mol Dis* 2002;28(2):93-103.

Borregaard N, Cross AR, Herlin T, Jones OTG, Segal AW, Valerius NH. A variant form of X-linked chronic granulomatous disease with normal nitroblue tetrazolium slide test and cytochrome b. *Eur J Clin Invest* 1983;13(3):243-8.

Borregaard N, Lollike K, Kjeldsen L, Sengelov H, Bastholm L, Nielsen MH, Bainton DF. Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J Haematol* 1993;51(4):187-98.

Boxer LA, Oliver JM, Spielberg SP, Allen JM, Schulman JD. Protection of granulocytes by vitamin E in glutathione synthetase deficiency. *N Engl J Med* 1979;301(17):901-5.

Boxer LA, Smolen JE. Neutrophil granule constituents and their release in health and disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 1988;2(1):101-34.

Boxer LA. Neutrophil disorders: qualitative abnormalities of the neutrophil. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, editors. *Williams Hematology*. 5th ed. New York: McGraw-Hill; 1995. p. 828-44.

Brandrup F, Koch C, Petri M, Schiødt M, Johansen KS. Discoid lupus erythematosus-like lesions and stomatitis in female carriers of X-linked chronic granulomatous disease. *Br J Dermatol* 1981;104(5):495-505.

Buescher ES, Gallin JI. Leukocyte transfusions in chronic granulomatous disease: persistence of transfused leukocytes in sputum. *N Engl J Med* 1982;307(13):800-3.

Buescher ES, Alling DW, Gallin JI. Use of an X-linked human neutrophil marker to estimate timing of lyonization and size of the dividing stem cell pool. *J Clin Invest* 1985;76(4):1581-4.

Burritt JB, DeLeo FR, McDonald CL, Prigge JR, Dinauer MC, Nakamura M, Nauseef WM, Jesaitis AJ. Phage display epitope mapping of human neutrophil flavocytochrome *b₅₅₈*. Identification of two juxtaposed extracellular domains. *J Biol Chem* 2001;276(3):2053-61.

Busque L, Mio R, Mattioli J, Brais E, Blais N, Lalonde Y, Maragh M, Gilliland DG. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. *Blood* 1996;88(1):59-65.

Cantón E, Peman J, Cabrera E, Velert M, Orero A, Pastor A, Gobernado M. Killing of gram-negative bacteria by ciprofloxacin within both healthy human neutrophils and neutrophils with inactivated O₂-dependent bactericidal mechanisms. *Chemotherapy* 1999;45(4):268-76.

Cappelletti P, Doretto P, Signori D, Bizzaro N. Eosinophilic peroxidase deficiency. Cytochemical and ultrastructural characterization of 21 new cases. *Am J Clin Pathol* 1992;98(6):615-22.

Carson PE, Flanagan CL, Ickes CE, Alving AS. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science* 1956;124(3220):484-5.

Cartwright GE, Athens JW, Wintrobe MM. The kinetics of granulopoiesis in normal man. *Blood* 1964;24(6):780-803.

Cartwright GE, Athens JW, Boggs DR, Wintrobe MM. The kinetics of granulopoiesis in normal man. *Ser Haematol* 1965;1:1-12.

Casimir C, Chetty M, Bohler MC, Garcia R, Fischer A, Griscelli C, Johnson B, Segal AW. Identification of the defective NADPH-oxidase component in chronic granulomatous disease: a study of 57 European families. *Eur J Clin Invest* 1992;22(6):403-6.

Cech P, Papathanassiou A, Boreux G, Roth P, Miescher PA. Hereditary myeloperoxidase deficiency. *Blood* 1979a;53(3):403-11.

Cech P, Stalder H, Widmann JJ, Rohner A, Miescher PA. Leukocyte myeloperoxidase deficiency and diabetes mellitus associated with *Candida albicans* liver abscess. *Am J Med* 1979b;66(1):149-53.

Cech P, Markert M, Perrin LH. Partial myeloperoxidase deficiency in preleukemia. *Blut* 1983;47(1):21-30.

Champion KM, Gilbert JG, Asimakopoulos FA, Hinshelwood S, Green AR. Clonal haemopoiesis in normal elderly women: implications for the myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1997;97(4):920-6.

Chan TK, Todd D, Wong CC. Tissue enzyme levels in erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *J Lab Clin Med* 1965;66(6):937-42.

Cheson BD, Christensen RL, Sperling R, Kohler BE, Babior BM. The origin of the chemiluminescence of phagocytosing granulocytes. *J Clin Invest* 1976;58(4):789-96.

Cheson BD, Curnutte JT, Babior BM. The oxidative killing mechanisms of the neutrophil. *Prog Clin Immunol* 1977;3:1-65.

Chiang AK, Chan GC, Ma SK, Ng YK, Ha SY, Lau YL. Disseminated fungal infection associated with myeloperoxidase deficiency in a premature neonate. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19(10):1027-9.

Choremis C, Zannos-Mariolea L, Kattamis MDC. Frequency of glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency in certain highly malarious areas of Greece. *Lancet* 1962;1(7219):17-8.

Christensen K, Kristiansen M, Hagen-Larsen H, Skytthe A, Bathum L, Jeune B, Andersen-Ranberg K, Vaupel JW, Ørstavik KH. X-linked genetic factors regulate hematopoietic stem-cell kinetics in females. *Blood* 2000;95(7):2449-51.

Chusid MJ, Parrillo JE, Fauci AS. Chronic granulomatous disease. Diagnosis in a 27-year-old man with *Mycobacterium fortuitum*. *JAMA* 1975;233(12):1295-6.

Clark RA, Malech HL, Gallin JI, Nunoi H, Volpp BD, Pearson DW, Nauseef WM, Curnutte JT. Genetic variants of chronic granulomatous disease: prevalence of deficiencies of two cytosolic components of the NADPH oxidase system. *N Engl J Med* 1989;321(10):647-52.

Clark RA. The human neutrophil respiratory burst oxidase. *J Infect Dis* 1990;161(6):1140-7.

Cohen T. Genetic markers in migrants to Israel. *Isr J Med Sci* 1971;7(12):1509-14.

Cohen HJ, Tape EH, Novak J, Chovaniec ME, Liegey P, Whitin JC. The role of glutathione reductase in maintaining human granulocyte function and sensitivity to exogenous H₂O₂. *Blood* 1987;69(2):493-500.

Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 1992;80(8):2012-20.

Conte D, Fraquelli M, Capsoni F, Giacca M, Zentilin L, Bardella MT. Effectiveness of IFN- γ for liver abscesses in chronic granulomatous disease. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19(7):705-10.

Cooper MR, DeChatelet LR, McCall CE, LaVia MF, Spurr CL, Baehner RL. Complete deficiency of leukocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase with defective bactericidal activity. *J Clin Invest* 1972;51(4):769-78.

Costa E, Vasconcelos J, Santos E, Laranjeira A, Castro e Melo J, Barbot J. Neutrophil dysfunction in a case of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency [letter]. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002;24(2):164-5.

Cronkite EP. Kinetics of granulopoiesis. *Clin Haematol* 1979;8(2):351-70.

Cronkite EP, Fliedner TM. Granulocytopoiesis. *N Engl J Med* 1964;270(25):1347-52.

Cross AR, Jones OTG, Harper AM, Segal AW. Oxidation-reduction properties of the cytochrome *b* found in the plasma-membrane fraction of human neutrophils. A possible oxidase in the respiratory burst. *Biochem J* 1981;194(2):599-606.

Cross AR, Jones OTG, Garcia R, Segal A. The association of FAD with the cytochrome *b*₂₄₅ of human neutrophils. *Biochem J* 1982;208(3):759-63.

Cross AR, Parkinson JF, Jones OTG. Mechanism of the superoxide-producing oxidase of neutrophils. O₂ is necessary for the fast reduction of cytochrome *b*-245 by NADPH. *Biochem J* 1985;226(3):881-4.

Cross AR, Rae J, Curnutte JT. Cytochrome *b*-245 of the neutrophil superoxide-generating system contains two nonidentical hemes. Potentiometric studies of a mutant form of gp91^{phox}. *J Biol Chem* 1995;270(29):17075-7.

Curnutte JT, Whitten DM, Babior BM. Defective superoxide production by granulocytes from patients with chronic granulomatous disease. *N Engl J Med* 1974;290(11):593-7.

Curnutte JT, Tauber AI. Failure to detect superoxide in human neutrophils stimulated with latex particles. *Pediatr Res* 1983;17(4):281-4.

Curnutte JT. Molecular basis of the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Immunodef Rev* 1992;3(2):149-72.

Curnutte JT. Chronic granulomatous disease: the solving of a clinical riddle at the molecular level. *Clin Immunol Immunopathol* 1993;67(3 Pt 2):S2-15.

Dancey JT, Deubelbeiss KA, Harker LA, Finch CA. Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest* 1976;58(3):705-15.

Dean AF, Janota I, Thrasher A, Robertson I, Mieli-Vergani G. Cerebral aspergilloma in a child with autosomal recessive chronic granulomatous disease. *Arch Dis Child* 1993;68(3):412-4.

DeChatelet LR, Shirley PS, Johnston RB. Effect of phorbol myristate acetate on the oxidative metabolism of human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 1976;47(4):545-54.

Diamond RD, Clark RA, Haudenschild CC. Damage to *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae by the myeloperoxidase system and oxidative products of neutrophil metabolism in vitro. *J Clin Invest* 1980;66(5):908-17.

Dilworth JA, Mandell GL. Adults with chronic granulomatous disease of „childhood“. *Am J Med* 1977;63(2):233-43.

Dinauer M. The phagocyte system and disorders of granulopoiesis and granulocyte function. In: Nathan DG, Orkin SH, editors. *Nathan and Oski's hematology of infancy and childhood*. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1998. p. 889-967.

Dinauer MC, Lekstrom-Himes JA, Dale DC. Inherited neutrophil disorders: Molecular basis and new therapies. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2000;1:303-18.

Dougherty SH, Peterson PK, Simmons RL. Granulocyte transfusion as adjunctive therapy for qualitative granulocytopenia. Multiple liver abscesses in a patient with chronic granulomatous disease. *Arch Surg* 1983;118(7):873-4.

Doxiadis SA, Fessas P, Valaes T. Erythrocyte enzyme deficiency in unexplained kernicterus. *Lancet* 1960;2(7140):44-5.

Doxiadis SA, Valaes T, Karaklis A, Stavrakakis D. Risk of severe jaundice in glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency of the newborn. *Lancet* 1964;2(7371):1210-2.

Dusi S, Donini M, Rossi F. Mechanisms of NADPH oxidase activation in human neutrophils: p67^{phox} is required for the translocation of rac 1 but not of rac 2 from cytosol to the membranes. *Biochem J* 1995;308(Pt 3):991-4.

Eisenhaber F, Frömmel C, Argos P. Prediction of secondary structural content of proteins from their amino acid composition alone. II. The paradox with secondary structural class. *Proteins* 1996a;25(2):169-79.

Eisenhaber F, Imperiale F, Argos P, Frömmel C. Prediction of secondary structural content of proteins from their amino acid composition alone. I. New analytic vector decomposition methods. *Proteins* 1996b;25(2):157-68.

Emmendorffer A, Lohmann-Matthes ML, Roesler J. Kinetics of transfused neutrophils in peripheral blood and BAL fluid of a patient with variant X-linked chronic granulomatous disease. *Eur J Haematol* 1991;47(4):246-52.

Escobar MA, Heller P, Trobaugh FE. „Complete“ erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Arch Intern Med* 1964;113:428-34.

Ezer G, Soothill JF. Intracellular bactericidal effects of rifampicin in both normal and chronic granulomatous disease polymorphs. *Arch Dis Child* 1974;49(6):463-6.

Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, Henson PM. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 1992;149(12):4029-35.

Fairbanks VF, Lampe LT. A tetrazolium-linked cytochemical method for estimation of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: applications in the study of heterozygotes for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Blood* 1968;31(5):589-603.

Fairbanks VF, Fernandez MN. The identification of metabolic errors associated with hemolytic anemia. *JAMA* 1969;208(2):316-20.

Fanconi S, Seger R, Gmür J, Willi U, Schaer G, Spiess H, Otto R, Hitzig WH. Surgery and granulocyte transfusions for life-threatening infections in chronic granulomatous disease. *Helv Paediatr Acta* 1985;40(4):277-84.

Fessas P, Doxiadis SA, Valaes T. Neonatal jaundice in glucose-6-phosphate-dehydrogenase-deficient infants. *Br Med J* 1962;2:1359-62.

Filosa S, Giacometti N, Wangwei C, De Mattia D, Pagnini D, Alfinito F, Schettini F, Luzzatto L, Martini G. Somatic-cell selection is a major determinant of the blood-cell phenotype in heterozygotes for glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations causing severe enzyme deficiency. *Am J Hum Genet* 1996;59(4):887-95.

Finn A, Hadžić N, Morgan G, Strobel S, Levinsky RJ. Prognosis of chronic granulomatous disease. *Arch Dis Childhood* 1990;65(9):942-5.

Fischer A, Segal AW, Seger R, Weening RS. The management of chronic granulomatous disease. *Eur J Pediatr* 1993;152(11):896-9.

Fliedner TM, Cronkite EP, Robertson JS. Granulocytopoiesis. I. Senescence and random loss neutrophilic granulocytes in human beings. *Blood* 1964a;24(4):402-14.

Fliedner TM, Cronkite EP, Killmann SA, Bond VP. Granulopoiesis. II. Emergence and pattern of labeling of neutrophilic granulocytes in humans. *Blood* 1964b;24(6):683-700.

Forni GL, Napoli G, Gaetani GF, Ferraris AM. G6PD deficiency-related chronic hemolysis treated with splenectomy: a case report. *Am J Hematol* 1994;47(2):146-7.

Forrest CB, Forehand JR, Axtell RA, Roberts RL, Johnston RB. Clinical features and current management of chronic granulomatous disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 1988; 2(2):253-66.

Foster CB, Lehrnbecher T, Mol F, Steinberg SM, Venzon DJ, Walsh TJ, Noack D, Rae J, Winkelstein JA, Curnutte JT, Chanock SJ. Host defense molecule polymorphisms influence the risk for immune-mediated complications in chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 1998;102(12):2146-55.

Francke U, Ochs HD, De Martinville B, Giacalone J, Lindgren V, Disteché C, Pagon RA, Hofker MH, van Ommen GJB, Pearson PL, Wedgwood RJ. Minor Xp21 chromosome deletion in a male associated with expression of Duchenne muscular dystrophy, chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa, and McLeod syndrome. *Am J Hum Genet* 1985;37(2):250-67.

Gahr M, Jendrossek V, Speer CP. Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie von Granulozytenfunktionsstörungen. *Monatsschr Kinderheilkd* 1989;137(7):380-9.

Gale RE, Fielding AK, Harrison CN, Linch DC. Acquired skewing of X-chromosome inactivation patterns in myeloid cells of the elderly suggests stochastic clonal loss with age. *Br J Haematol* 1997;98(3):512-9.

Gallin JI, Buescher ES, Seligmann BE, Nath J, Gaither T, Katz P. Recent advances in chronic granulomatous disease. *Ann Intern Med* 1983;99(5):657-74.

Gallin JI, Alling DW, Malech HL, Wesley R, Koziol D, Marciano B, Eisenstein EM, Turner ML, DeCarlo ES, Starling JM, Holland SM. Itraconazole to prevent fungal infections in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med* 2003;348(24):2416-22.

Ganz T. Oxygen-independent microbicidal mechanisms of phagocytes. *Proc Assoc Am Physicians* 1999;111(5):390-5.

Gemmel CG. Antibiotics and neutrophil function-potential immunomodulating activities. *J Antimicrob Chemother* 1993;31 Suppl B:23-33.

Gerber CE, Kuçi S, Zipfel M, Niethammer D, Bruchelt G. Phagocytic activity and oxidative burst of phagocytes in persons with myeloperoxidase deficiency. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34(11):901-8.

Gerber CE, Bruchelt G, Falk UB, Kimpfler A, Hauschild O, Kuçi S, Bächli T, Niethammer D, Schubert R. Reconstitution of bactericidal activity in chronic granulomatous disease cells by glucose-oxidase-containing liposomes. *Blood* 2001;15;98(10):3097-105.

Gmünder FK, Seger RA. Chronic granulomatous disease: mode of action of sulfamethoxazole/trimethoprim. *Pediatr Res* 1981;15(12):1533-7.

Goldblatt D, Thrasher AJ. Chronic granulomatous disease. Clin Exp Immunol 2000;122(1):1-9.

Goldblatt D. Current treatment options for chronic granulomatous disease. Expert Opin Pharmacother 2002;3(7):857-63.

Goodpasture EW. A peroxidase reaction with sodium nitroprusside and benzidine in blood smears and tissues. J Lab Clin Med 1919;4(7):442-4.

Gray GR, Stamatoyannopoulos G, Naiman SC, Kliman MR, Klebanoff SJ, Austin T, Yoshida A, Robinson GCF. Neutrophil dysfunction, chronic granulomatous disease, and non-spherocytic haemolytic anaemia caused by complete deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Lancet 1973;2(7828):530-4.

Grignaschi VJ, Sperperato AM, Etcheverry MJ, Macario AJL. Un nuevo cuadro citoquímico: negatividad espontánea de las reacciones de peroxidasas, oxidasas y lipido en la progenie neutrofila y en los monocitos de dos hermanos. Rev Asoc Méd Argent 1963;77(5):218-21.

Güngör T, Halter J, Klink A, Junge S, Stumpe KDM, Seger R, Schanz U. Successful low toxicity hematopoietic stem cell transplantation for high-risk adult chronic granulomatous disease patients. Transplantation 2005;79(11):1596-606.

Hafner J, Enderlin A, Seger RA, Wüthrich B, Bruckner-Tudermann L, Panizzoni P, Burg G. Discoid lupus erythematosus-like lesions in carriers of X-linked chronic granulomatous disease. Br J Dermatol 1992;127(4):446-7.

Hafner J, Panizzoni R, Bruckner-Tudermann L, Wüthrich B, Seger RA, Burg G. Lupus-erythematoses-discoides-artige Dermatose bei einer Konkordantin der septischen Granulomatose. Hautarzt 1993;44(7):452-6.

Hamers MN, Bot AAM, Weening RS, Sips HJ, Roos D. Kinetics and mechanism of the bactericidal action of human neutrophils against *Escherichia coli*. Blood 1984;64(3):635-41.

Hamilton JW, Jones FGC, McMullin MF. Glucose-6-phosphate dehydrogenase Guadalajara - a case of chronic non-spherocytic haemolytic anaemia responding to splenectomy and the role of splenectomy in this disorder. Hematology 2004;9(4):307-9.

Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 1998;92(9):3007-17.

Hand WL, King-Thompson NL. Uptake of antibiotics by human polymorphonuclear leukocyte cytoplasts. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34(6):1189-93.

Hasui M. Chronic granulomatous disease in Japan: incidence and natural history. The Study Group of Phagocyte Disorders of Japan. *Pediatr Int* 1999;41(5):589-93.

Hasui M, Kotera F, Tsuji S, Yamamoto A, Taniuchi S, Fujikawa Y, Nakajima M, Yoshioka A, Kobayashi Y. Successful resumption of trimethoprim-sulfamethoxazole after oral desensitisation in patients with chronic granulomatous disease. *Eur J Pediatr*. 2002;161(6):356-7.

Heyworth PG, Bohl BP, Bokoch GM, Curnutte JT. Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47^{phox} and p67^{phox}. Evidence for its interaction with flavocytochrome *b*₅₅₈. *J Biol Chem* 1994;29(49):30749-52.

Hizeroth HW, Bender K. Age-dependency of somatic selection in South African Negro G-6-PD heterozygotes. *Hum Genet* 1981;58(3):338-43.

Höger P, Seger R, Belohradsky BH, Hitzig WH. Septische Granulomatose im Erwachsenenalter. *Schweiz Med Wochenschr* 1984a;114(40):1382-6.

Höger PH, Seger RA, Hitzig WH. Chronic granulomatous disease: correction of the defect by intracellular active antibiotics. In: Griscelli C, Vossen J, editors. *Progress in Immunodeficiency Research and Therapy*. Volume I. Proceedings of the First Meeting of the European Group for Immunodeficiencies (E.G.I.D.); 1984 March 29-31; Château de Fillerval, France. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV; 1984b. p. 173-4.

Höger PH, Seger RA, Schaad UB, Hitzig WH. Chronic granulomatous disease: uptake and intracellular activity of fosfomycin in granulocytes. *Pediatr Res* 1985;19(1):38-44.

Hof H. Intracellular microorganisms: a particular problem for chemotherapy. Introduction. *Infection* 1991;19 Suppl 4:S193-4.

Holmes B, Page AR, Good RA. Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with genetic abnormality of phagocytic function. *J Clin Invest* 1967;46(9):1422-32.

Holmes B, Park BH, Malawista SE, Quie PG, Nelson DL, Good RA. Chronic granulomatous disease in females. *N Engl J Med* 1970;283(5):217-21.

Horwitz ME, Barrett AJ, Brown MR, Carter CS, Childs R, Gallin JI, Holland SM, Linton GF, Miller JA, Leitman SF, Read EJ, Malech HL. Treatment of chronic granulomatous disease with nonmyeloablative conditioning and a T-cell-depleted hematopoietic allograft. *N Engl J Med* 2001;344(12):881-8.

Howard TH, Watts RG. Actin polymerization and leukocyte function. *Curr Opin Hematol* 1994;1(1):61-8.

Huhn D, Belohradsky BH, Haas R. Familiärer Myeloperoxidasedefekt und akute myeloische Leukämie. *Acta Haematol* 1978;59(3):129-43.

Ishibashi F, Nuno H, Endo F, Matsuda I, Kanegasaki S. Statistical and mutational analysis of chronic granulomatous disease in Japan with special reference to gp91-phox and p22-phox deficiency. *Hum Genet* 2000;106(5):473-81.

IUIS/WHO Working Group. Laboratory investigations in clinical immunology: methods, pitfalls and clinical indications. A second IUIS/WHO report. *Clin Immunol Immunopathol* 1988;49(3):478-97.

Iyer GYN, Islam DMF, Quastel JH. Biochemical aspects of phagocytosis. *Nature* 1961;192(4802):535-41.

Jacobs A. Staining for leukocyte peroxidase [letter]. *Lancet* 1958;1(7022):697

Jacobs RF, Wilson CB. Activity of antibiotics in chronic granulomatous disease leukocytes. *Pediatr Res* 1983;17(11):916-9.

Jain A, Buist NRM, Kennaway NG, Powell BR, Auld PAM, Martensson J. Effekt of ascorbate or *N*-acetylcysteine treatment in a patient with hereditary glutathione synthetase deficiency. *J Pediatr* 1994;124(2):229-33.

Jandl RC, André-Schwartz J, Borges-DuBois L, Kipnes RS, McMurrich BJ, Babior BM. Termination of the respiratory burst in human neutrophils. *J Clin Invest* 1978;61(5):1176-85.

Johansen KS. Nitroblue tetrazolium slide test. Use of the phorbol-myristate-acetate-stimulated NBT-reduction slide test for routine and prenatal detection of chronic granulomatous disease and diagnosis of heterozygous carriers. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [C]* 1983;91(6):349-54.

Johnston RB 3rd, Harbeck RJ, Johnston RB Jr. Recurrent severe infections in a girl with apparently variable expression of mosaicism for chronic granulomatous disease. *J Pediatr* 1985;106(1):50-5.

Jones GS, Amirault HJ. Killing of *Mycobacterium tuberculosis* by neutrophils: a nonoxidative process. *J Infect Dis* 1990;162(3):700-4.

Jung K, Elsner J, Emmendörffer A, Bittrich A, Lohmann-Matthes ML, Roesler J. Severe infectious complications in a girl suffering from atopic dermatitis were found to be due to chronic granulomatous disease. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 1993;73(6):433-6.

Justice P, Shih LY, Gordon J, Grossman A, Hsia DY. Characterization of leukocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase in normal and mutant human subjects. *J Lab Clin Med* 1966;68(4):552-9.

Kahn A, Leger J, Boivin P, Hollard D, Hakim J. Anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire par déficit en G-6PD: étude physiologique et biochimique d'une variante inhabituelle. Rapport avec la G-6PD „Benavento“. *Biochimie* 1973;55(9):1121-8.

Kaplan EL, Laxdal T, Quie PG. Studies of polymorphonuclear leukocytes from patients with chronic granulomatous disease of childhood: bactericidal capacity for streptococci. *Pediatrics* 1968;41(3):591-9.

Kaplow LS. Simplified myeloperoxidase stain using benzidine dihydrochloride. *Blood* 1965;26(2):215-9.

Kato T, Wokalek H, Schöpf E, Eggert H, Ernst M, Rietschel ET, Fischer H. Measurement of chemiluminescence in freshly drawn human blood. I. Role of granulocytes, platelets, and plasma factors in zymosan-induced chemiluminescence. *Klin Wochenschr* 1981;59(5):203-21.

Kattamis CA, Chaidas A, Chaidas S. G6PD deficiency and favism in the island of Rhodes (Greece). *J Med Genet* 1969a;6(3):286-91.

Kattamis CA, Kyriazakou M, Chaidas S. Favism: clinical and biochemical data. *J Med Genet* 1969b;6(1):34-41.

Khan AU, Kasha M. Direct spectroscopic observation of singlet oxygen emission at 1268 nm excited by sensitizing dyes of biological interest in liquid solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76(12):6047-9.

Kinsey BM, Kassis AI, Fayad F, Layne WW, Adelstein SJ. Synthesis and biological studies of iodinated (127/125I) derivatives of rhodamine 123. *J Med Chem* 1987;30(10):1757-61.

Kirkman HN, Hendrickson EM. Sex-linked electrophoretic difference in glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Am J Hum Genet* 1963;15(3):241-58.

Kitahara M, Simonian Y, Eyre HJ. Neutrophil myeloperoxidase: a simple, reproducible technique to determine activity. *J Lab Clin Med* 1979;93(2):232-7.

Kitahara M, Eyre HJ, Simonian Y, Atkin CL, Hasstedt SJ. Hereditary myeloperoxidase deficiency. *Blood* 1981;57(5):888-93.

Klebanoff SJ, Hamon CB. Role of myeloperoxidase-mediated antimicrobial systems in intact leukocytes. *J Reticuloendothel Soc* 1972;12(2):170-96.

Klebanoff SJ. Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *Semin Hematol* 1975;12(2):117-42.

Klebanoff SJ, Clark RA. *The neutrophil: Function and clinical disorders*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press; 1978

Klebanoff SJ. Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians* 1999;111(5):383-9.

Kleihauer E, Betke K. Elution procedure for the demonstration of methaemoglobin in red cells of human blood smears. *Nature* 1963;199(4899):1196-7.

Knaus UG, Heyworth PG, Evans T, Curnutte JT, Bokoch GM. Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science* 1991;254(5037):1512-5.

Kobayashi Y, Amano D, Ueda K, Kagosaki Y, Usui T. Treatment of seven cases of chronic granulomatous disease with sulfamethoxazole-trimethoprim (SMX-TMP). *Eur J Pediatr* 1978;127(4):247-54.

Kornberg A, Horecker BL. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: Colowick SP, Kaplan NO, editors. *Methods in Enzymology*. Volume I. New York: Academic Press; 1955. p. 323-7.

Kutter D. Prevalence of myeloperoxidase deficiency: population studies using Bayer-Technicon automated hematology. *J Mol Med* 1998;76(10):669-75.

Kwong CH, Malech HL, Rotrosen D, Leto TL. Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by *rho*-related G-proteins. *Biochemistry* 1993;32(21):5711-7.

Kwok CJ, Martin ACR, Au SWN, Lam VMS. *G6PDb*, an integrated database of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations. *Hum Mutat* 2002;19(3):217-24.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(259):680-5.

Landing BH, Shirkey HS. A syndrome of recurrent infection and infiltration of viscera by pigmented lipid histiocytes. *Pediatrics* 1957;20(3):431-8.

Larrocha C, Fernández de Castro M, Fontan G, Vilorio A, Fernández-Chacón JL, Jiménez C. Hereditary myeloperoxidase deficiency: study of 12 cases. *Scand J Haematol* 1982;29(5):389-97.

Law DJ, Prasad MA, King SE, Spranger KD, Lee YH, Fox RE, Collins EE, Gebuhr TC, Miller DE, Petty EM. Localization of the human estrogen-responsive finger protein (EFP) gene (ZNF147) within a YAC contig containing the myeloperoxidase (MPO) gene. *Genomics* 1995;28(2):361-3.

Lehrer RI, Cline MJ. Leukocyte myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis: the role of myeloperoxidase in resistance to *Candida* infection. *J Clin Invest* 1969;48(8):1478-88.

Lehrer RI, Ganz T, Selsted ME. Oxygen-independent bactericidal systems. Mechanisms and disorders. *Hematol Oncol Clin North Am* 1988;2(1):159-69.

Lekstrom-Himes JA, Holland SM, DeCarlo ES, Miller J, Leitman SF, Chang R, Baker AR, Gallin JI. Treatment with intralesional granulocyte instillations and interferon-gamma for a patient with chronic granulomatous disease and multiple hepatic abscesses. *Clin Infect Dis* 1994;19(4):770-3.

Leung T, Chik K, Li C, Shing M, Yuen P. Bone marrow transplantation for chronic granulomatous disease: long-term follow-up and review of literature. *Bone Marrow Transplant* 1999;24(5):567-70.

Levy O. Antimicrobial proteins and peptides of blood: templates for novel antimicrobial agents. *Blood* 2000;96(8):2664-72.

Lieschke GJ, Burgess AW. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (part I). *N Engl J Med* 1992;327(1):28-35.

Liese JG, Jendrossek V, Jansson A, Petropoulou T, Kloos S, Gahr M, Belohradsky BH. Chronic granulomatous disease in adults. *Lancet* 1996;347(8996):220-3.

Loos H, Roos D, Weening R, Houwerzijl J. Familial deficiency of glutathion reductase in human blood cells. *Blood* 1976;48(1):53-62.

Ludviksson BR, Thorarensen O, Gudnason T, Halldorsson S. *Candida albicans* meningitis in a child with myeloperoxidase deficiency. *Ped Inf Dis J* 1993;12(2):162-4.

Lun A, Roesler J, Renz H. Unusual late onset of X-linked chronic granulomatous disease in an adult woman after unsuspecting childhood. *Clin Chem* 2002;48(5):780-1.

Lutter R, van Schaik MLJ, van Zwieten R, Wever R, Roos D, Hamers MN. Purification and partial characterization of the *b*-type cytochrome from human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 1985;260(4):2237-44.

Luzzatto L, Usanga EA, Bienzle U, Esan GFJ, Fusuan FA. Imbalance in X-chromosome expression: evidence for a human X-linked gene affecting growth of hemopoietic cells. *Science* 1979;205(4413):1418-20.

Luzzatto L and Battistuzzi G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Adv Hum Genet* 1985;14:217-329, 386-8.

Luzzatto L, Mehta A, Vulliamy T: Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 4517-53.

Lydyard PM, Grossi CE. Cells, tissues and organs of the immune system. In: Roitt I, Brostoff J, Male D, editors. *Immunology*. 6th ed. Edinburgh: Mosby; 2001. p. 15-45.

Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 1961;190(4773):372-3.

Lyon MF. Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *Am J Hum Genet* 1962;14:135-48.

Lyon MF. Chromosomal and subchromosomal inactivation. *Annu Rev Genet* 1968;2:31-52.

Lyon MF. X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. *Biol Rev* 1972;47(1):1-35.

Lyon MF. Some milestones in the history of X-chromosome inactivation. *Annu Rev Genet* 1992;26:16-28.

Male D. Introduction to the immune system. In: Roitt I, Brostoff J, Male D, editors. *Immunology*. 6th ed. Edinburgh: Mosby; 2001. p. 1-13.

Malech HL, Maples PB, Whiting-Theobald N, Linton GF, Sekhsaria S, Vowells SJ, Li F, Miller JA, DeCarlo E, Holland SM, Leitman SF, Carter CS, Butz RE, Read EJ, Fleisher TA, Schnei-

derman RD, Van Epps DE, Spratt SK, Maack CA, Rokovich JA, Cohen LK, Gallin JI. Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(22):12133-8.

Malmvall BE, Follin P. Successful interferon- γ therapy in a chronic granulomatous disease (CGD) patient suffering from *Staphylococcus aureus* hepatic abscess and invasive *Candida albicans* infection. *Scand J Infect Dis* 1993;25(1):61-6.

Mamlok RJ, Mills GC, Goldblum RM, Daeschner CW. Glucose-6-phosphate dehydrogenase Beaumont: a new variant with severe enzyme deficiency and chronic nonspherocytic hemolytic anemia. *Enzyme* 1985;34(1):15-21.

Mamlok RJ, Mamlok V, Mills GC, Daeschner CW, Schmalstieg FC, Anderson DC. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, neutrophil dysfunction and *Chromobacterium violaceum* sepsis. *J Pediatr* 1987;111(6 Pt 1):852-4.

Mandell GL, Vest TK. Killing of intraleukocytic *Staphylococcus aureus* by rifampin: in-vitro and in-vivo studies. *J Infect Dis* 1972;125(5):486-90.

Marciano BE, Wesley R, De Carlo ES, Anderson VL, Barnhart LA, Darnell D, Malech HL, Gallin JI, Holland SM. Long-term interferon- γ therapy for patients with chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis* 2004;39(5):692-9.

Margolis DM, Melnick DA, Alling DW, Gallin JI. Trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis in the management of chronic granulomatous disease. *J Infect Dis* 1990;162(3):723-6.

Markowitz N, Saravolatz LD. Use of trimethoprim-sulfamethoxazole in a glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient population. *Rev Infect Dis* 1987;9 Suppl 2:S218-29.

Marks PA, Gross RT, Hurwitz RE. Gene action in erythrocyte deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase: tissue enzyme-levels. *Nature* 1959;183(4670):1266-7.

Marsh WL, Uretsky SC, Douglas SD. Antigens of the Kell blood group system on neutrophils and monocytes: their relation to chronic granulomatous disease. *J Pediatr* 1975;87(6 Pt 2):1117-20.

Martini G, Toniolo D, Vulliamy T, Luzzatto L, Dono R, Viglietto G, Paonessa G, D'Urso M, Persico MG. Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *EMBO J* 1986;5(8):1849-55.

Matsuda I, Oka Y, Taniguchi N, Furuyama M, Kodama S, Arashima S, Mitsuyama T. Leukocyte glutathione peroxidase deficiency in a male patient with chronic granulomatous disease. *J Pediatr* 1976;88(4 Pt 1):581-3.

Matsuura R, Kishi T, Okahata H, Kobayashi M, Tanabe A, Sakura N, Sawano K, Usui T. Functional analysis of polymorphonuclear leukocytes in siblings of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Hir J Med Sci* 1983;32(2):173-8.

Mauer AM, Athens JW, Ashenbrucker H, Cartwright GE, Wintrobe MM. Leukokinetic studies. II. A method for labeling granulocytes *in vitro* with radioactive diisopropylfluorophosphate (DFP³²). *J Clin Invest* 1960;39(9):1481-6.

Meerhof LJ, Roos D. Heterogeneity in chronic granulomatous disease detected with an improved nitroblue tetrazolium slide test. *J Leukoc Biol* 1986;39(6):699-711.

Meletis J, Konstantopoulos K. Favism - from the „avoid fava beans” of Pythagoras to the present. *Haema* 2004;7(1):17-21.

Metcalf JA, Gallin JI, Nauseef WM, Root RK. Laboratory manual of neutrophil function. New York: Raven Press; 1986.

Metcalf D. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature* 1989;339(6219):27-30.

Metschnikoff E. Untersuchungen über die intracelluläre Verdauung bei wirbellosen Thieren. *Arb Zoologischen Inst Univ Wien* 1883;5:141-68.

Metschnikoff E. L'immunité dans les maladies infectieuses. Paris: Masson; 1901.

Miller DR, Wollman MR. A new variant of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency hereditary hemolytic anemia, G6PD Cornell: erythrocyte, leukocyte and platelet studies. *Blood* 1974;44(3):323-31.

Mills EL, Rholl KS, Quie PG. X-linked inheritance in females with chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 1980;66(2):332-40.

Minegishi N, Nakamura M, Suzaki K, Terasawa M, Minegishi M, Tsuchiya S, Konno T. Chronic granulomatous disease with neutrophil membrane cytochrome b deficiency: demonstration by immunochemical staining with monoclonal antibody. *Tohoku J Exp Med* 1988;154(2):143-8.

Missiou-Tsagaraki S. Screening of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency as a preventive measure: prevalence among 1,286,000 Greek newborn infants. *J Pediatrics* 1991;119(2):293-9.

Miyazaki S, Shin H, Goya N, Nakagawara A. Identification of a carrier mother of a female patient with chronic granulomatous disease. *J Pediatr* 1976;89(5):784-6.

Mizuno Y, Hara T, Nakamura M, Ueda K, Minakami S, Take H. Classification of chronic granulomatous disease on the basis of monoclonal antibody-defined surface cytochrome *b* deficiency. *J Pediatr* 1988;113(3):458-62.

Mohler DN, Majerus PW, Minnich V, Hess CE, Garrick MD. Glutathione synthetase deficiency as a cause of hereditary hemolytic disease. *N Engl J Med* 1970;283(23):1253-7.

Moosmann K, Bojanovsky A. Rezidivierende Candidosis bei Myeloperoxidasemangel. *Monatsschr Kinderheilkd* 1975;123(5):408-9.

Mouy R, Fischer A, Vilmer E, Seger R, Griscelli C. Incidence, severity, and prevention of infections in chronic granulomatous disease. *J Pediatr* 1989;114(4 Pt 1):555-60.

Mouy R, Veber F, Blanche S, Donadieu J, Brauner R, Levron JC, Griscelli C, Fischer A. Long-term itraconazole prophylaxis against *Aspergillus* infections in thirty-two patients with chronic granulomatous disease. *J Pediatr* 1994;125(6 Pt 1):998-1003.

Mühlebach TJ, Erny C, Suter R, Brägger C, Yalman N, Kobayashi S, Nakamura M, Seger RA. Analysis of various types of chronic granulomatous disease with the monoclonal antibody 7D5 directed against the small subunit of surface cytochrome *b*₅₅₈. *Pediatr Allergy Immunol* 1991;2(3):124-30.

Nakamura M, Murakami M, Koga T, Tanaka Y, Minakami S. Monoclonal antibody 7D5 raised to cytochrome b₅₅₈ of human neutrophils: immunocytochemical detection of the antigen in peripheral phagocytes of normal subjects, patients with chronic granulomatous disease, and their carrier mothers. *Blood* 1987;69(5):1404-8.

Nakamura M, Kobayashi S, Sendo S, Koga T, Kanegasaki S. Deficiency of cytochrome b₅₅₈ in chronic granulomatous disease demonstrated by monoclonal antibody 7D5. *Acta Paediatr Hung* 1988-89;29(1-2):179-83.

Nauseef WM, Metcalf JA, Root RK. Role of myeloperoxidase in the respiratory burst of human neutrophils. *Blood* 1983;61(3):483-92.

Nauseef WM. Myeloperoxidase deficiency. *Hematol Oncol Clin North Am* 1988;2(1):135-58.

Nauseef WM. Myeloperoxidase deficiency. *Hematol Pathol* 1990;4(4):165-78.

Nelson RD, Mills EL, Simmons RL, Quie P. Chemiluminescence response of phagocytizing human monocytes. *Infect Immun* 1976;14(1):129-34.

Nelson RD, Bauman MP, Gracyk JL, Fiegel VD, Herron MJ. Leukocyte chemotaxis: migration under agarose method. In: Douglas SD, Quie PG, editors. *Investigation of phagocytes in disease*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1981. p. 20-31.

Newburger PE, Chovaniec ME, Cohen HJ. Activity and activation of the granulocyte superoxide-generating system. *Blood* 1980;55(1):85-92.

Newburger PE. Superoxide generation by human fetal granulocytes. *Pediatr Res* 1982;16(5):373-6.

Newburger PE, Luscinskas FW, Ryan T, Beard CJ, Wright J, Platt OS, Simons ER, Tauber AI. Variant chronic granulomatous disease: modulation of the neutrophil defect by severe infection. *Blood* 1986;68(4):914-9.

Newburger PE, Ezekowitz RAB. Cellular and molecular effects of recombinant interferon gamma in chronic granulomatous disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 1988; 2(2):267-76.

Newburger PE, Malawista SE, Dinauer MC, Gelbart T, Woodman RC, Chada S, Shen Q, van Blaricom G, Quie PG, Curnutte JT. Chronic granulomatous disease and glutathione peroxidase deficiency, revisited. *Blood* 1994;84(11):3861-9.

Notarangelo L, Casanova JL, Conley ME, Chapel H, Fischer A, Puck J, Roifman C, Seger R, Geha RS. International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee Meeting in Budapest, 2005. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(4):883-96.

Nguyen C, Katner HP. Myeloperoxidase deficiency manifesting as pustular candidal dermatitis. *Clin Infect Dis* 1997;24(2):258-6.

Ochs HD, Igo RP. The NBT slide test: a simple screening method for detecting chronic granulomatous disease and female carriers. *J Pediatr* 1973;83(1):77-82.

Ohno YI, Hirai KI, Kanoh T, Uchino H, Ogawa K. Subcellular localization of H₂O₂ production in human neutrophils stimulated with particles and an effect of cytochalasin-B on the cells. *Blood* 1982;60(1):253-60.

Okuda T, Yasuoka T, Oka N. Myeloperoxidase deficiency as a predisposing factor for deep mucocutaneous candidiasis: a case report. *J Oral Maxillofac Surg* 1991;49(2):183-6.

Oppenheim A, Jury CL, Rund D, Vulliamy TJ, Luzzatto L. G6PD Mediterranean accounts for the high prevalence of G6PD deficiency in Kurdish Jews. *Hum Genet* 1993;91(3):293-4.

Osgood EE. Number and distribution of human hemic cells. *Blood* 1954;9(12):1141-54.

Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, Stein S, Siler U, Koehl U, Glimm H, Köhlcke K, Schilz A, Kunkel H, Naundorf S, Brinkmann A, Deichmann A, Fischer M, Ball C, Pilz I, Dunbar C, Du Y, Jenkins NA, Copeland NG, Lüthi U, Hassan M, Thrasher AJ, Hoelzer D, von Kalle C, Seger R, Grez M. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* 2006;12(4):401-9.

Pai GS, Sprengle JA, Do TT, Marenzi CE, Migeon BR. Localization of loci for hypoxanthine phosphoribosyltransferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase and biochemical evidence of nonrandom X chromosome expression from studies of a human X-autosome translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77(5):2810-3.

Paraskevas F. Phagocytosis. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM, editors. *Wintrobe's clinical hematology*. 10th ed. Baltimore, Maryland USA: Williams & Wilkins; 1999. p. 415-29.

Parkos CA, Allen RA, Cochrane CG, Jesaitis AJ. Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000. *J Clin Invest* 1987;80(3):732-42.

Parkos CA, Allen RA, Cochrane CG, Jesaitis AJ. The quaternary structure of the plasma membrane *b*-type cytochrome of human granulocytes. *Biochim Biophys Acta* 1988;932(1):71-83.

Parolini O, Ressmann G, Haas OA, Pawlowsky J, Gander H, Knapp W, Holter W. X-linked Wiskott-Aldrich syndrome in a girl. *N Engl J Med* 1998;338(5):291-5.

Parry MF, Root RK, Metcalf JA, Delaney KK, Kaplow LS, Richar WJ. Myeloperoxidase deficiency: prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med*. 1981;95(3):293-301.

Pasic S, Abinun M, Pistignjat B, Vlajic B, Rakic J, Sarjanovic L, Ostojic N. *Aspergillus* osteomyelitis in chronic granulomatous disease: treatment with recombinant gamma-interferon and itraconazole. *Pediatr Infect Dis J* 1996;15(9):833-4.

Pemán J, Cantón E, Hernández MT, Gobernado M. Intraphagocytic killing of Gram-positive bacteria by ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother* 1994;34(6):965-74.

Perry HB, Boulanger M, Pennoyer D. Chronic granulomatous disease in an adult with recurrent abscesses. *Arch Surg* 1980;115(2):200-2.

Persico MG, Viglietto G, Martini G, Toniolo D, Paonessa G, Moscatelli C, Dono R, Vulliamy T, Luzzatto L, D'Urso M. Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones: primary structure of the protein and unusual 5' non-coding region. *Nucleic Acids Res* 1986;14(6):2511-22.

Petropoulou T, Liese J, Tintelnot K, Gahr M, Belohradsky BH. Langzeitbehandlung mit Itracozazol zur Prophylaxe von *Aspergillus*-Infektionen bei Patienten mit chronischer Granulomatose (CGD). *Mycoses* 1994;37 Suppl 2:64-9.

Preisig E, Hitzig WH. Nitroblue-tetrazolium test for the detection of chronic granulomatous disease-technical modification. *Eur J Clin Invest* 1971;1(6):409-12.

Puck JM, Willard HF. X inactivation in females with X-linked disease. *New Engl J Med* 1998;338(5):325-8.

Quaglino D, Flemans R. Peroxidase staining in leukocytes [letter]. *Lancet* 1958;2(7054):1020.

Quie PG, White JG, Holmes B, Good RA. *In vitro* bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. *J Clin Invest* 1967;46(4):668-79.

Quie PG, Kaplan EL, Page AR, Gruskay FL, Malawista SE. Defective polymorphonuclear-leukocyte function and chronic granulomatous disease in two female children. *N Engl J Med* 1968;278(18):976-80.

Quie PG. The white cells: use of granulocyte transfusions. *Rev Infect Dis* 1987;9(1):189-93.

Ramot B, Fisher S, Szeinberg A, Adam A, Sheba C, Gafni D. A study of subjects with erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. II. Investigation of leukocyte enzymes. *J Clin Invest* 1959;38(12):2234-7.

Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CGM, Bolsover S, Gabella G, Potma EO, Warley A, Roes J, Segal AW. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K^+ flux. *Nature* 2002;416(6878):291-7.

Regelmann W, Hays N, Quie PG. Chronic granulomatous disease: historical perspective and clinical experience at the University of Minnesota Hospitals. *Adv Host Def Mechanisms* 1983;3:3-23.

Reiss M, Roos D. Differences in oxygen metabolism of phagocytosing monocytes and neutrophils. *J Clin Invest* 1978;61(2):480-8.

Repine JE, White JG, Clawson CC, Holmes BM. The influence of phorbol myristate acetate on oxygen consumption by polymorphonuclear leukocytes. *J Lab Clin Med* 1974a;83(6):911-20.

Repine JE, White JG, Clawson CC, Holmes BM. Effects of phorbol myristate acetate on the metabolism and ultrastructure of neutrophils in chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 1974b;54(1):83-90.

Robertson CF, Thong YH, Hodge GL, Cheney K. Primary myeloperoxidase deficiency associated with impaired neutrophil margination and chemotaxis. *Acta Paediatr Scand* 1979;68(6):915-9.

Rodey GE, Jacob HS, Holmes B, McArthur JR, Good RA. Leucocyte G.-6.-P.D. levels and bactericidal activity. *Lancet* 1970;1(7642):355-6.

Rösen-Wolff A, Soldan W, Heyne K, Bickhardt J, Gahr M, Roesler J. Increased susceptibility of a carrier of X-linked chronic granulomatous disease (CGD) to *Aspergillus fumigatus* infection associated with age-related skewing of lyonization. *Ann Hematol* 2001;80(2):113-5.

Roesler J, Melter M, Emmendorffer A, Rohde S, Brodehl J. Chronisch rezidivierende Stomatitis aphthosa bei einer 15jährigen Konduktorin für x-chromosomal vererbte Cytochrom b₅₅₈-negative septische Granulomatose. *Monatsschr Kinderheilkd* 1990;138(12):811-3.

Roesler J, Hecht M, Freihorst J, Lohmann-Matthes ML, Emmendorffer A. Diagnosis of chronic granulomatous disease and of its mode of inheritance by dihydrorhodamine 123 and flow microcytofluorometry. *Eur J Pediatr* 1991;150(3):161-5.

Roos D, Weening RS, Voetman AA, van Schaik MLJ, Bot AAM, Meerhof LJ, Loos JA. Protection of phagocytic leukocytes by endogenous glutathione: studies in a family with glutathione reductase deficiency. *Blood* 1979;53(5):851-66.

Roos D, Voetman AA, Meerhof LJ. Functional activity of enucleated human polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol* 1983;97(2):368-77.

Roos D. The involvement of oxygen radicals in microbicidal mechanisms of leukocytes and macrophages. *Klin Wochenschr* 1991;69(21-23):975-80.

Roos D, de Boer M, Borregaard N, Bjerrum OW, Valerius NH, Seger RA, Mühlebach T, Belohradsky BH, Weening RS. Chronic granulomatous disease with partial deficiency of cytochrome *b*₅₅₈ and incomplete respiratory burst: variants of the X-linked, cytochrome *b*₅₅₈-negative form of the disease. *J Leukoc Biol* 1992;51(2):164-71.

Roos D, de Boer M, Kuribayashi F, Meischl C, Weening RS, Segal AW, Åhlin A, Nemet K, Hossle JP, Bernatowska-Matuszkiewicz E, Middleton-Price H. Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood* 1996;87(5):1663-81.

Roos D, van Zwieten R, Wijnen JT, Gómez-Gallego F, de Boer M, Stevens D, Pronk-Admiraal CJ, de Rijk T, van Noorden CJF, Weening RS, Vulliamy TJ, Ploem JE, Mason PJ, Bautista JM, Khan PM, Beutler E. Molecular basis and enzymatic properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase Volendam, leading to chronic nonspherocytic anemia, granulocyte dysfunction, and increased susceptibility to infections. *Blood* 1999;94(9):2955-62.

Roos D, Curnutte JT. Chronic granulomatous disease. In: Ochs HD, Smith CIE, Puck JM, editors. Primary immunodeficiency diseases. A molecular and genetic approach. New York: Oxford University Press; 1999. p. 353-74.

Rosa-Borges A, Sampaio MG, Condino-Neto A, Barreto OCO, Nudelman V, Carneiro-Sampaio MMS, Nogueira SA, de Abreu TF, Rehder J, Costa-Carvalho BT. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency with recurrent infections. *J Pediatr (Rio J)* 2001;77(4):331-6.

Rosen H, Klebanoff SJ. Chemiluminescence and superoxide production by myeloperoxidase-deficient leukocytes. *J Clin Invest* 1976;58(1):50-60.

Rothe G, Oser A, Valet G. Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften* 1988;75(7):354-5.

Rothe G, Valet G. Flow cytometric characterisation of oxidative processes in neutrophils and monocytes with dihydrorhodamine 123, 2',7'-dichlorofluorescein and hydroethidine. In: Burger G, Oberholzer M, Vooijs GP, editors. *Advances in Analytical Cellular Pathology: Proceedings of the First Conference of the European Society for Analytical Cellular Pathology*; 1989 Nov 12-17; Schloss Elmau, Germany. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV; 1990a. p. 313-4.

Rothe G, Valet G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J Leukoc Biol* 1990b;47(5):440-8.

Rothe G, Emmendörffer A, Oser A, Roesler J, Valet G. Flow cytometric measurement of the respiratory burst activity of phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J Immunol Methods* 1991;138(1):133-5.

Rothe G, Kellermann W, Schaerer B, Valet G. Messung der phagosomalen Wasserstoffperoxidproduktion von Granulozyten und Monocyten mit Dihydrorhodamin 123. In: Schmitz G, Rothe G, Hrsg. Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Stuttgart: Schattauer; 1994. p. 331-50.

Rovira A, De Angioletti M, Camacho-Vanegas O, Liu D, Rosti V, Gallardo HF, Notaro R, Sadelain M, Luzzatto L. Stable in vivo expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and rescue of G6PD deficiency in stem cells by gene transfer. *Blood* 2000;96(13):4111-7.

Rupc RA, Petropoulou T, Belohradsky BH, Walchner M, Liese JG, Plewig G, Messer G. Lupus erythematosus tumidus and chronic discoid lupus erythematosus in carriers of X-linked chronic granulomatous disease. *Eur J Dermatol* 2000;10(3):184-9.

Sakamaki K, Tomonaga M, Tsukui K, Nagata S. Molecular cloning and characterization of a chromosomal gene for human eosinophil peroxidase. *J Biol Chem* 1989;264(28):16828-36.

Salmon SE, Cline MJ, Schultz J, Lehrer RI. Myeloperoxidase deficiency. Immunologic study of a genetic leukocyte defect. *N Engl J Med* 1970;282(5):250-3.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Sastry J, Kakakios A, Tugwell H, Shaw P. Allogeneic bone marrow transplantation with reduced intensity conditioning for chronic granulomatous disease complicated by invasive *Aspergillus* infection. *Pediatr Blood Cancer* 2006;47(3):327-9.

Saulsbury FT. Successful treatment of *Aspergillus* brain abscess with itraconazole and interferon- γ in a patient with chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis*. 2001;32(10):e137-9.

Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 1989;83(3):865-75.

Sbarra AJ, Karnovsky ML. The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 1959;234(6):1355-62.

Schapiro BL, Newburger PE, Klempner MS, Dinauer MC. Chronic granulomatous disease presenting in a 69-year-old man. *N Engl J Med* 1991;325(25):1786-90.

Schilirò G, Russo A, Mauro L, Pizzarelli L, Marino S. Leukocyte function and characterization of leukocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase in Sicilian mutants. *Pediatr Res* 1976;10(8):739-42.

Schopf RE, Mattar J, Meyenburg W, Scheiner O, Hammann KP, Lemmel EM. Measurement of the respiratory burst in human monocytes and polymorphonuclear leukocytes by nitro blue tetrazolium reduction and chemiluminescence. *J Immunol Methods* 1984;67(1):109-17.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill; 2001.

Segal AW. Nitroblue-tetrazolium tests. *Lancet* 1974;2(7891):1248-52.

Segal AW, Coade SB. Kinetics of oxygen consumption by phagocytosing human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;84(3):611-7.

Segal AW, Jones OTG. Novel cytochrome *b* system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature* 1978;276(5687):515-7.

Segal AW, Jones OTG, Webster D, Allison AC. Absence of a newly described cytochrome *b* from neutrophils of patients with chronic granulomatous disease. *Lancet* 1978;2(8087):446-9.

Segal AW, Jones OTG. Identification of a previously undescribed cytochrome *b* in human neutrophils and its relationship to phagocytosis-induced oxidase activity. *Biochem Soc Trans* 1979;7(1):187-8.

Segal AW, Garcia R, Goldstone AH, Cross AR, Jones OTG. Cytochrome *b*₂₄₅ of neutrophils is also present in human monocytes, macrophages and eosinophils. *Biochem J* 1981;196(1):363-7.

Segal AW, Cross AR, Garcia RC, Borregaard N, Valerius NH, Soothill JF, Jones OTG. Absence of cytochrome *b*₂₄₅ in chronic granulomatous disease. A multicenter European evaluation of its incidence and relevance. *N Engl J Med* 1983;308(5):245-51.

Segal AW. Absence of both cytochrome *b*₂₄₅ subunits from neutrophils in X-linked chronic granulomatous disease [letter]. *Nature* 1987;326(6108):88-91.

Segal AW, West I, Wientjes F, Nugent JHA, Chavan AJ, Haley B, Garcia RC, Rosen H, Scrace G. Cytochrome *b*₂₄₅ is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochem J* 1992;284(Pt 3):781-8.

Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)* 2000;79(3):170-200.

Seger RA, Baumgartner S, Tiefenauer LX, Gmünder FK. Chronic granulomatous disease: effect of sulfamethoxazole/trimethoprim on neutrophil microbicidal function. *Helv Paediatr Acta* 1981;36(6):579-88.

Seger RA, Mühlebach T. Interaction of phagocytic cells with antibiotics: uptake and intracellular killing activity. *Acta Paediatr Hung* 1988-89;29(1-2):153-8.

Seger RA, Gungor T, Belohradsky BH, Blanche S, Bordigoni P, Di Bartolomeo P, Flood T, Landais P, Müller S, Ozsahin H, Passwell JH, Porta F, Slavin S, Wulffraat N, Zintl F, Nagler A, Cant A, Fischer A. Treatment of chronic granulomatous disease with myeloablative conditioning and an unmodified hemopoietic allograft: a survey of the European experience, 1985-2000. *Blood* 2002;100(13):4344-50.

Shurin SB. Pathologic states associated with activation of eosinophils and with eosinophilia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1988;2(1):171-9.

Sieff CA. Hematopoietic growth factors. *J Clin Invest* 1987;79(6):1549-57.

Sillevis Smitt JH, Weening RS, Krieg SR, Bos JD. Discoid lupus erythematosus-like lesions in carriers of X-linked chronic granulomatous disease. *Br J Dermatol* 1990;122(5):643-50.

Smith JA, Weidemann MJ. Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1993;162(2):261-8.

Spielberg SP, Boxer LA, Oliver JM, Allen JM, Schulman JD. Oxidative damage to neutrophils in glutathion synthetase deficiency. *Br J Hematol* 1979;42(2):215-23.

Spitznagel JK. Bactericidal mechanisms of the granulocyte. *Prog Clin Biol Res* 1977;13:103-31.

Spitznagel JK, Shafer WM. Neutrophil killing of bacteria by oxygen-independent mechanisms: a historical summary. *Rev Infect Dis* 1985;7(3):398-403.

Squier MKT, Sehnert AJ, Cohen JJ. Apoptosis in leukocytes. *J Leukoc Biol* 1995;57(1):2-10.

Stamatoyannopoulos G, Fraser GR, Motulsky AG, Fessas P, Akrivakis A, Papayannopoulou T. On the familial predisposition to favism. *Am J Hum Genet* 1966;18(3):253-63.

Stein S, Siler U, Ott MG, Seger R, Grez M. Gene therapy for chronic granulomatous disease. *Curr Opin Mol Ther* 2006;8(5):415-22.

Stuart J, Gordon PA, Lee TR. Enzyme cytochemistry of blood and marrow cells. *Histochem J* 1975;7(5):471-87.

Takizawa T, Huang IY, Ikuta T, Yoshida A. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: primary structure and cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(12):4157-61.

Tauber AI, Borregaard N, Simons E, Wright J. Chronic granulomatous disease: a syndrome of phagocyte oxidase deficiencies. *Medicine (Baltimore)* 1983;62(5):286-309.

The International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group. A controlled trial of interferon gamma to prevent infection in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med* 1991;324(8):509-16.

Tönz O, Rossi E. Morphological demonstration of two red cell populations in human females heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Nature* 1964;202(4932):606-7.

Toniolo D, Persico MD, Battistuzzi G, Luzzatto L. Partial purification and characterization of the messenger RNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Mol Biol Med* 1984;2(2):89-103.

Tonon L, Bergmaschi G, Dellavecchia C, Rosti V, Lucotti C, Malabarba L, Novella A, Vercesi E, Frassoni F, Gazzola M. Unbalanced X-chromosome inactivation in haemopoietic cells from normal women. *Br J Haematol* 1998;102(4):996-1003.

Town M, Bautista JM, Mason PJ, Luzzatto L. Both mutations in G6PD A- are necessary to produce the G6PD deficient phenotype. *Hum Mol Genet* 1992;1(3):171-4.

Trautmann M, Meincke C, Vogt K, Ruhnke M, Lajous-Petter AM. Intracellular bactericidal activity of fosfomycin against staphylococci: a comparison with other antibiotics. *Infection* 1992;20(6):350-4.

Tsumura N, Akasu Y, Yamane H, Ikezawa S, Hirata T, Oda K, Sakata Y, Shirahama M, Inoue A, Kato H. *Aspergillus* osteomyelitis in a child who has p67-phox-deficient chronic granulomatous disease. *Kurume Med J* 1999;46(1):87-90.

Tzortzatou-Stathopoulou F, Zannos-Mariolea L, Karayannis P, Constantas N, Matsaniotis N. Leukocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) activity in G-6-PD deficient subjects. *Eur J Pediatr* 1980;135(1):37-9.

Undritz E. The Alius-Grignaschi anomaly: the hereditary constitutional peroxidase defect of the neutrophils and monocytes. *Blut* 1966a;14(3):129-36.

Undritz E. Die Alius-Grignaschi-Anomalie: der erblich-konstitutionelle Peroxydasedefekt der Neutrophilen und Monocyten. *Schweiz Med Wochenschr* 1966b;96(38):1273-4.

Valaes T, Karaklis A, Stravarakakis D, Bavela-Stravarakakis K, Perakis A, Doxiadis SA. Incidence and mechanism of neonatal jaundice related to glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 1969;3(5):448-58.

Valerius NH, Stendahl O, Hartwig JH, Stossel TP. Distribution of actin-binding protein and myosin in polymorphonuclear leukocytes during locomotion and phagocytosis. *Cell* 1981;24(1):195-202.

van Bruggen R, Bautista JM, Petropoulou T, de Boer M, van Zwieten R, Gómez-Gallego F, Belohradsky BH, Hartwig NG, Stevens D, Mason PJ, Roos D. Deletion of leucine 61 in glucose-6-phosphate dehydrogenase leads to chronic nonspherocytic anemia, granulocyte dysfunction, and increased susceptibility to infections. *Blood* 2002;100(3):1026-30.

van der Auwera P, Prinz G, Petrikos G. Activity of intracellular antibiotics. *Infection* 1991;19 Suppl 4:S216-23.

van Noorden CJF, Vigels IMC, James J, Tas J. A sensitive cytochemical staining method for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in individual erythrocytes. I. Optimization of the staining procedure. *Histochemistry* 1982;75(4):493-506.

van Pelt LJ, van Zwieten R, Weening RS, Roos D, Verhoeven AJ, Bolscher BGJM. Limitations on the use of dihydrorhodamine 123 for flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst. *J Immunol Methods*. 1996;191(2):187-96.

van Rensburg CEJ, Joone G, Anderson R. Interactions of the oxygen-dependent antimicrobial system of the human neutrophil with difloxacin, ciprofloxacin, pefloxacin and fleroxacin in the intraphagocytic eradication of *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 1990;32(1):15-7.

Verhoeven AJ, Bolscher BG, Meerhof LJ, van Zwieten R, Keijer J, Weening RS, Roos D. Characterization of two monoclonal antibodies against cytochrome *b₅₅₈* of human neutrophils. *Blood* 1989;73(6):1686-94.

Vickers MA, McLeod E, Spector TD, Wilson IJ. Assessment of mechanism of acquired skewed X inactivation by analysis of twins. *Blood* 2001;97(5):1274-81.

Virella G. Diagnostic evaluation of phagocytic function. *Immunol Ser* 1993;58:311-27.

Vives Corrons JL, Feliu E, Pujades MA, Cardellach F, Rozman C, Carreras A, Jou JM, Vallespi MT, Zuazu FJ. Severe glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency associated with chronic hemolytic anemia, granulocyte dysfunction, and increased susceptibility to infections: description of a new molecular variant (G6PD Barcelona). *Blood* 1982;59(2):428-34.

von Planta M, Ozsahin H, Schroten H, Stauffer UG, Seger RA. Greater omentum flaps and granulocyte transfusions as combined therapy of liver abscess in chronic granulomatous disease. *Eur J Pediatr Surg* 1997;7(4):234-6.

Vowells SJ, Sekhsaria S, Malech HL, Shalit M, Fleisher TA. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J Immunol Methods* 1995;178(1):89-97.

Vowells SJ, Fleisher TA, Malech HL. Testing for chronic granulomatous disease [letter]. *Lancet* 1996;347(9007):1048-9.

Vulliamy TJ, Knight SW, Dokal I, Mason PJ. Skewed X-inactivation in carriers of X-linked dyskeratosis congenita. *Blood* 1997a;90(6):2213-6.

Wahn V, Seger R. Septische Granulomatose. *Monatsschr Kinderheilkd* 1998;146(10):995-1004.

Warner HR, Athens JW. An analysis of granulocyte kinetics in blood and bone marrow. *Ann N Y Acad Sci* 1964;113(2):523-36.

Weber ML, Abela A, de Repentigny L, Garel L, Lapointe N. Myeloperoxidase deficiency with extensive candidal osteomyelitis of the base of the skull. *Pediatrics* 1987;80(6):876-9.

Weening RS, Roos D, Loos JA. Oxygen consumption of phagocytizing cells in human leukocyte and granulocyte preparations: a comparative study. *J Lab Clin Med* 1974;83(4):570-7.

Weening RS, Kabel P, Pijman P, Roos D. Continuous therapy with sulfamethoxazole-trimethoprim in patients with chronic granulomatous disease. *J Pediatr* 1983;103(1):127-30.

Weening RS, Adriaansz LH, Weemaes CMR, Lutter R, Roos D. Clinical differences in chronic granulomatous disease in patients with cytochrome b-negative or cytochrome b-positive neutrophils. *J Pediatr* 1985a;107(1):102-4.

Weening RS, Corbeel L, de Boer M, Lutter R, van Zwieten R, Hamers MN, Roos D. Cytochrome *b* deficiency in an autosomal form of chronic granulomatous disease. A third form of chronic granulomatous disease recognized by monocyte hybridization. *J Clin Invest* 1985b;75(3):915-20.

Weening RS, Leitz GJ, Seger RA. Recombinant human interferon-gamma in patients with chronic granulomatous disease - European follow up study. *Eur J Pediatr* 1995;154(4):295-8.

Weiss J, Victor M, Stendhal O, Elsbach P. Killing of gram-negative bacteria by polymorphonuclear leukocytes. Role of an O₂-independent bactericidal system. *J Clin Invest* 1982;69(4):959-70.

Weiss J, Kao L, Victor M, Elsbach P. Oxygen-independent intracellular and oxygen-dependent extracellular killing of *Escherichia coli* S15 by human polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* 1985;76(1):206-12.

Whitin JC, Cohen HJ. Disorders of respiratory burst termination. *Hematol Oncol Clin North Am* 1988;2(2):289-99.

WHO Scientific Group. Standardization of procedures for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Report of a WHO Scientific Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1967;366:1-53.

WHO Working Group. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bull World Health Organ* 1989;67(6):601-11.

Williams CK, Ogunmola GB, Abugo O, Ukaejiofo EO, Esan GJ. Polycythaemia rubra vera associated with unbalanced expression of the X chromosome and monoclonality of T lymphocytes. *Acta Haematol* 1983;70(4):229-35.

Williams CK, Esan GJ, Luzzatto L, Town MM, Ogunmola GB. X-linked somatic-cell selection and polycythemia rubra vera. *N Engl J Med* 1984;310(19):1265.

Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB, Boyle J, Curnutte J, Gallin JI, Malech HL, Holland SM, Ochs H, Quie P, Buckley RH, Foster CB, Chanock SJ, Dickler H. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)* 2000;79(3):155-69.

Winterbourn CC, Vissers MCM, Kettle AJ. Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol* 2000;7(1):53-8.

Wolach B, Ashkenazi M, Grossmann R, Gavrieli R, Friedman Z, Bashan N, Roos D. Diurnal fluctuation of leukocyte G6PD activity. A possible explanation for the normal neutrophil bactericidal activity and the low incidence of pyogenic infections in patients with severe G6PD deficiency in Israel. *Pediatr Res*. 2004;55(5):807-13.

Wolach B, Scharf Y, Gavrieli R, De Boer M, Roos D. Unusual late presentation of X-linked Chronic Granulomatous Disease in an adult female with a somatic mosaic for a novel mutation in CYBB. *Blood* 2005;105(1):61-6.

Xu W, Westwood B, Bartsokas CS, Malcorra-Azpiazu JJ, Indr k K, Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations and haplotypes in various ethnic groups. *Blood* 1995;85(1):257-63.

Yamauchi A, Yu L, P tgens AJG, Kuribayashi F, Nuno H, Kanegasaki S, Roos D, Malech HL, Dinauer MC, Nakamura M. Location of the epitope for 7D5, a monoclonal antibody raised against human flavocytochrome *b*₅₅₈, to the extracellular peptide portion of primate gp91^{phox}. *Microbiol Immunol* 2001;45(3):249-57.

Yang KD, Hill HR. Neutrophil function disorders: pathophysiology, prevention, and therapy. *J Pediatr* 1991;119(3):343-54.

Yang KD, Quie PG, Hill HR. Phagocytic system. In: Ochs HD, Smith CIE, Puck JM, editors. *Primary Immunodeficiency diseases: a molecular and genetic approach*. New York: Oxford University Press; 1999. p. 82-96.

Yeaman GR, Froebel K, Galea G, Ormerod A, Urbaniak SJ. Discoid lupus erythematosus in an X-linked cytochrome-positive carrier of chronic granulomatous disease. *Br J Dermatol* 1992;126(1):60-5.

Yoshida A. Hemolytic anemia and G6PD deficiency. Physiologic activity, not in vitro activity, of enzymes is related to the severity of genetic disease. *Science* 1973;179(73):532-7.

Zeiss H. *Elias Metschnikow: Leben und Werk*. Jena: Fischer; 1932.

Zimmerli W, Lew PD, Suter S, Wyss M, Waldvogel FA. In vitro efficacy of several antibiotics against intracellular *S. aureus* in chronic granulomatous disease. *Helv Paediat Acta* 1983;38(1):51-61.

8 DANK

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernd H. Belohradsky, Leiter der Abteilung für Antimikrobielle Therapie und Infektionsimmunologie der Universitätskinderklinik München im Dr. von Haunerschen Kinderspital, für die Vergabe des Themas der vorliegenden Arbeit und seine freundliche Betreuung und Anleitung. Für seine stetige Unterstützung und für die Möglichkeit an der Universitätskinderklinik München eine umfassende Ausbildung im Bereich der Pädiatrischen Immunologie, insbesondere der Granulozytendefekte, zu erhalten und dort wissenschaftlich arbeiten zu dürfen, bin ich sehr dankbar. Ein herzliches Dankeschön gilt dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) und der I. Latsis-Stiftung Athen, die meine Weiterbildung an der Ludwig-Maximilians-Universität durch ein Stipendium unterstützt haben und somit die Erstellung der vorliegenden Dissertation ermöglichten.

Den Mitarbeiterinnen des Immunologischen Labors im Dr. von Haunerschen Kinderspital, insbesondere Frau Otilie Bieberle, Frau Eva Eisl, Frau Irmgard Eckerlein und Frau Anett Bader, möchte ich meinen herzlichen Dank für die mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft aussprechen. Frau Dr. Luciana Husfeld und Herrn Dr. Johannes Liese danke ich für die nette Zusammenarbeit bei der Einführung und Etablierung der durchflußzytometrischen Granulozytenfunktionstests.

Prof Dr. Dirk Roos, Central Laboratory of the Netherlands Blood Transfusion Service (CLB), Amsterdam, möchte ich besonders für die Zusammenarbeit bei den biologischen und molekulargenetischen Untersuchungen der Familie H danken.

Bei allen Mitarbeitern der Immundefektambulanz im Dr. von Haunerschen Kinderspital, insbesondere bei Frau Dr. Carolin Engelhorn, möchte ich mich für die freundliche Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. S. Müller-Weihrich, Frau Dr. A. Häbler und Herrn Dr. S. Leiz aus der Kinderklinik München Schwabing danke ich für die Bereitstellung wichtiger Patienten-Daten.

9 LEBENS LAUF

Name: Theoni Petropoulou

Geburtsdatum: 4 Juni 1964

Geburtsort: Tripolis/Arkadien, Griechenland

Nationalität: Griechisch

Schulbildung: 1970-1976 Grundschule
1976-1979 griechisches Gymnasium
1979-1982 griechisches Lyzeum
1982 griechisches Abitur

Studium: 1982-1983 Zahnmedizin, Nationale und Kapodistria Universität Athen
1983-1989 Medizin, Aristoteles-Universität Thessaloniki
Studienaufenthalt-Famulatur an den Universitäten Graz, Wien und München
31.01.1990 Diplom der Medizin (Aristoteles-Universität Thessaloniki)

08.1990 - 06.1991 Assistenzärztin, Krankenhaus „Laiko“, Athen, Griechenland

06.1991 - 01.1992 Assistenzärztin, Kinderklinik der Technischen Universität München, Schwabing

02.1992 - 11.2000 Assistenzärztin und ab 10.1998 Fachärztin, Kinderklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Dr. von Haunersches Kinderspital, Schwerpunkt Pädiatrische Immunologie - Infektionsimmunologie, primäre Immundefekte

21.10.1998 Anerkennung als Fachärztin für Kinder- und Jugendmedizin (München)

11.2000 - 12.2001 Krankenhaus Korinth - Gesundheitszentrum Loutraki, Griechenland

08.2002 - 04.2003 Oberärztin - stellvertretende Chefärztin, Kinderklinik St. Johann in Tirol, Österreich

Seit April 2003 Oberärztin, I. Kinderklinik der Universität Athen, „Aghia Sophia“ Kinderspital, Griechenland

Stipendien: DAAD - Deutscher Akademischer Austauschdienst
I. Latsis-Stiftung

Approbation: 1990 Erlaubnis zur Ausübung des ärztlichen Berufs, Griechenland
1991 Approbation als Ärztin, Deutschland