

Primärstruktur der Humanen Neutrophilen Antigene 1a und 1b

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt

von Clemens Radke, geborener Hetzer

aus Berlin

Gießen, 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin

Gutachter: Professor Dr. med. Ulrich Sachs

Gutachter: Professor Dr. med. Tilman Borggrefe

Tag der Disputation: 15.09.2021

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Themenerläuterung.....	1
1.2	Neutrophile Granulozyten.....	1
1.3	Fc _γ Rezeptor IIIb	2
1.3.1	Physiologische Eigenschaften.....	2
1.3.2	Antigenität und Nomenklatur	2
1.3.3	Antikörper gegen HNA-1 und klinische Relevanz	3
1.3.4	Unterschiede zwischen HNA-1a und HNA-1b	4
1.3.5	Morphologie des Fc _γ Rezeptor IIIb	5
1.4	Ziel der Untersuchungen	7
2	Material und Methoden	8
2.1	Herstellung der Zellen.....	8
2.1.1	Herstellung von HNA-1a und HNA-1b-Plasmiden	8
2.1.2	Herstellung der Mutanten.....	9
2.1.3	Transfektion in 293F Zellen	11
2.2	Zellkultivierung	11
2.3	Zellfixierung	12
2.4	HNA-Antikörper aus Patientenseren.....	12
2.5	Monoklonale Antikörper	12
2.5.1	monoklonaler Antikörper LNK16.....	13
2.5.2	monoklonaler Antikörper 3G8.....	13
2.6	Modifizierter MAIGA	13
2.7	Durchführung der Versuche	14
2.8	Überprüfung der internen Validität	15
2.9	Zusammenfassung des Versuchsablaufs	15

3	Ergebnisse	16
3.1	Versuchsreihen	16
3.1.1	HNA-1a-Antikörper und MOAB LNK16.....	17
3.1.2	HNA-1a-Antikörper und MOAB 3G8.....	18
3.1.3	HNA-1b-Antikörper und MOAB LNK16.....	19
3.1.4	HNA-1b-Antikörper und MOAB 3G8.....	20
3.1.5	Ergebnisse zur Validitätsüberprüfung	21
3.2	Interpretation der Ergebnisse.....	24
3.2.1	Auswertung zu Versuchen mit HNA-1a-Antikörpern	24
3.2.2	Fazit für die Antigenität von HNA-1a.....	26
3.2.3	Auswertung zu Versuchen mit HNA-1b-Antikörpern	27
3.2.4	Fazit für die Antigenität von HNA-1b	29
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	33
4	Diskussion	34
4.1	Klinische Bedeutung.....	34
4.1.1	Single-Nucleotid-Exchange bei HNA-1a und HNA-1b.....	34
4.1.2	Phänotypisierung bekannter Varianten	35
4.2	Neueinordnung bisheriger Ergebnisse	37
4.3	Hypothese zur Phylogenese des Fc γ Rezeptor IIIb.....	38
4.4	Limitation und weiterführende Forschung.....	41
5	Zusammenfassung.....	42
5.1	Zusammenfassung (Deutsch).....	42
5.2	Abstract (English)	43
6	Tabellen-, Abbildungs- und Diagrammverzeichnis	44
7	Literaturverzeichnis	45
8	Anhang	49
8.1	Einverständnis zur Nutzung der Abbildungen	49
9	Selbstständigkeitserklärung	50

10	Danksagung.....	51
----	-----------------	----

1 Einleitung

1.1 Themenerläuterung

Die Untersuchungen zur ‚Primärstruktur der Humanen Neutrophilen Antigene 1a und 1b‘ beschäftigen sich mit dem Oberflächenprotein CD16b, welches ein Rezeptor auf neutrophilen Granulozyten ist. Speziell soll evaluiert werden, welche Aminosäureaustausche die Varianten HNA-1a und HNA-1b ausmachen. Die genaue Identifikation der epitopbildenden Aminosäuren ermöglicht im Zuge der immer häufiger eingesetzten DNS-Sequenzierung von Genabschnitten eine genaue Beurteilung der Antigenität von Patienten.

1.2 Neutrophile Granulozyten

Im peripheren Blut lassen sich physiologischerweise ca. 4.000- 10.000 Leukozyten pro μl finden, unter welchen die neutrophilen Granulozyten mit ca. 60% den größten Anteil ausmachen (Lüllmann-Rauch, 2009, p. 265). Die Bezeichnung ‚neutrophil‘ bezieht sich dabei darauf, dass ihre Granula im Gegensatz zu eosinophilen und basophilen Granulozyten in der Pappenheim-Färbung nicht anfärbbar sind (Lüllmann-Rauch, 2009, p. 272). Ihre Lebensdauer beträgt nach achttägiger Reifung im Knochenmark mit nur kurzem Aufenthalt von einigen Stunden im Blutkreislauf etwa ein bis zwei Tage im Interstitium, wonach Neutrophile in Apoptose gehen (Lüllmann-Rauch, 2009, p. 267). Neutrophile Granulozyten sind wie alle Leukozyten Bestandteil des Immunsystems. Ihre primäre Funktion besteht in der Eliminierung pathogener Keime, die sie mithilfe ihrer Rezeptoren identifizieren, phagozytieren und lysieren können (Lüllmann-Rauch, 2009, p. 272). Dazu speichern sie in ihren lysosom-verwandten „azurophilen“ Granula und ihren neutrophilen-spezifischen „spezifischen“ Granula verschiedene Enzyme wie Myeloperoxidasen, Elastasen, Kollagenasen und diverse lysosomale Enzyme (Lüllmann-Rauch, 2009, p. 269).

1.3 Fc_γ Rezeptor IIIb

1.3.1 Physiologische Eigenschaften

Für die Identifizierung von Antigenen sind eine Reihe von Oberflächenproteinen notwendig. Dabei wird die Familie der IgG-Rezeptoren bei Zellen des Immunsystems durch drei Subtypen der Fc_γ-Rezeptoren, Fc_γRI (auch CD64 nach der Einteilung Cluster of Differentiation), Fc_γRII (CD32) und Fc_γRIII (CD16), gebildet (Anderson & Looney, 1986). Während mittlerweile bei den Fc_γI-Rezeptoren und Fc_γII-Rezeptoren drei Subtypen bekannt wurden (CD64a, CD64b und CD64c (Ernst, et al., 1992)) sowie CD32a, CD32b und CD32c (Anania, et al., 2019)), existieren bei Fc_γIII-Rezeptoren zwei Subtypen (CD16a und CD16b (Zhang, et al., 2000)). Im Gegensatz zu Fc_γRI, welche hoch-affine IgG-Rezeptoren sind, gehören Fc_γII-Rezeptoren und die in dieser Arbeit untersuchten Fc_γIII-Rezeptoren zu den niedrig-affinen IgG-Rezeptoren (Kurlander & Batker, 1982). Fc_γ Rezeptoren IIIb können IgG1 und IgG3 binden. Nur auf neutrophilen Granulozyten werden sie in einer großen Anzahl von 100 000 – 400 000 pro Zelle exprimiert (Bux, et al., 1992). Der Rezeptor bindet in seiner Funktion polymerisiertes IgG und ist an der Phagozytose von opsonierten Mikroorganismen beteiligt. Außerdem eliminiert er freie Immunkomplexe (Bux, 2008).

1.3.2 Antigenität und Nomenklatur

Die erste klinische Bedeutung des Fc_γRIIIb wurde 1960 von Parviz Lalezari beschrieben, der mithilfe eines Granulozyten-Agglutinationstests eine neonatale Alloimmunneutropenie (NAIN) nachweisen konnte (Lalezari, et al., 1960). Bald darauf konnte die Relevanz der Immunisierung gegen Leukozytenantigene für die Transfusionsmedizin aufgezeigt werden, da zuvor insbesondere AB0-Oberflächenproteine für Immunisierungen vermutet wurden (Kelton & Bebenek, 1985). Die Nomenklatur dieser Antigene lehnte sich an den Nachweis der Antigene an, die auf neutrophilen Granulozyten gefunden wurden, sodass die Antigen-Varianten für Neutrophile (N) nacheinander Buchstaben (NA, NB) erhielten und dann die Allelvariante mit Zahl (NA1 und NA2) angefügt wurde (McCullough, 1983). Hinzu wurde im Jahr 1997 die, je nach Bevölkerungsgruppe seltenere, dritte Allel-Variante SH gefunden (Bux, et al., 1997). Im Jahr 1998 einigte sich die International Society of Blood Transfusion (ISBT) in Anlehnung an die etablierte Thrombozyten-Nomenklatur für Plättchen-Antigene human platelet antigen (HPA) auf eine neue Nomenklatur für Neutrophile, die human neutrophil antigens (HNA). Somit wurde NA1 in HNA-1a umbenannt, NA2 zu

HNA-1b und SH zu HNA-1c. Die Abwesenheit des Fc γ RIIIb wird als HNA-1-null bezeichnet (ISBT Working Party on Platelet and Granulocyte Serology, 1999). Die Häufigkeit der verschiedenen HNA-1-Allele ist in den verschiedenen Ethnien unterschiedlich verteilt. So wird zum Beispiel die Antigenhäufigkeit von HNA-1c bei Menschen afrikanischer Herkunft mit bis zu 31% angegeben, während sie bei Kaukasiern bei ca. 5% liegt (siehe Tabelle 1.1). Die klinische Bedeutung dessen ist noch nicht abschließend geklärt. Jedoch gibt es erste Erkenntnisse, dass die HNA-1c-Rezeptorvariante eine höhere Bindungsfähigkeit von IgG aufweist, und zudem dass in Anwesenheit von opsoniertem Plasmodium falciparum eine stärkere Immunreaktion bei HNA-1c-positiven Neutrophilen stattfindet als bei HNA-1a bzw. -1b (Simtong, et al., 2018).

Tabelle 1.1 Häufigkeiten der Antigene bei verschiedenen Bevölkerungsgruppen in %

HNA-Varianten	Kaukasier	Afrikaner	Ureinwohner Amerikas
HNA-1a	57-62	46-66	83-91
HNA-1b	88-89	78-84	36-80
HNA-1c	5	23-31	0-1
HNA-1 null	0,15	4	<1

(Bux, et al., 1995) (Kissel, et al., 2000) (Hessner, et al., 1996)
(Hessner, et al., 1999)

1.3.3 Antikörper gegen HNA-1 und klinische Relevanz

Gegen die drei Varianten des HNA-1 (HNA-1a, -1b und -1c) können vier mögliche und nachgewiesene Antikörpervarianten gebildet werden, die als Anti-HNA-1a, -1b, -1c und -1d bezeichnet werden. Die vierte Variante, Anti-HNA-1d, wurde dabei erst kürzlich entdeckt und stellt einen Spezialfall bei HNA-1b-negativen Müttern dar (Reil, et al., 2013). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Epitope von HNA-1b und HNA-1c, bilden diese Patientinnen keine regulären HNA-1b-Antikörper aus, sondern nur gegen die in diesem Spezialfall auftretende Antigen-Kombination Alanin an der Stelle 78 und Asparagin an der Stelle 82. Die Antikörper definieren also eine eigene Subgruppe.

In der Immunologie hat die Ausbildung von Anti-HNA-Antikörpern als Alloantikörper Relevanz, insbesondere als Auslöser der neonatalen Immunneutropenie (NIN). Bei diesem Krankheitsbild werden gebildete HNA-Antikörper schwangerer Frauen plazentär auf ihre Feten übertragen, sodass bei HNA-Inkompatibilität eine Neutropenie bei dem

Neugeborenen verursacht werden kann (Lalezari, et al., 1960). Eine im Alltag untergeordnete klinische Bedeutung für HNA-1-Antikörper liegt außerdem in Form einer transfusionsassoziierten akuten Lungeninsuffizienz (transfusion-related acute lung injury, TRALI) (Yomtovian, et al., 1984) vor. Diese Komplikation mit hoher Letalität von ca. 10% wird primär von Frischplasma multiparer Spenderinnen verursacht (Reil & Bux, 2007). Andere Immunerkrankungen gegen granulozytäre Antigene, wie die Febrile Transfusionsreaktion oder Immunneutropenien nach Knochenmarkstransplantationen sind eher den anderen HNA- und HLA-Antigenen zuzuschreiben.

1.3.4 Unterschiede zwischen HNA-1a und HNA-1b

Die Unterschiede zwischen den Allelen HNA-1a, -1b und -1c liegen an fünf Nukleinsäurepositionen. HNA-1a und HNA-1b unterscheiden sich folglich an den Aminosäure-Positionen 36, 65, 82 und 106, wobei eine zusätzliche stumme Mutation der DNS an Position 38 vorliegt (Ory, et al., 1989). HNA-1a trägt an diesen Positionen die Aminosäuren Arginin, Asparagin, Asparaginsäure und Valin, während HNA-1b die Aminosäuren Serin, Serin, Asparagin und Isoleucin trägt (ebd.).

Die HNA-1c-Variante entspricht der Variante HNA-1b, nur dass zusätzlich die Position 78 verändert ist (Bux, et al., 1997). Für diese fünf relevanten Aminosäurepositionen sind die Polymorphismen der Nukleinsequenzen, also die Punktmutationen, die die Rezeptoren ergeben, ebenso bekannt (Ravetch & Perussia, 1989) (Bux, et al., 1997). Die jeweiligen Unterschiede mit den jeweiligen Aminosäuren sind in Tabelle 1.2 aufgelistet.

Tabelle 1.2 Polymorphismen der Aminosäuresequenzen des FcγRIIIb

HNA-Variante	Aminosäuren (Einbuchstabencode)		
Allelbezeichnung	HNA-1a	HNA-1b	HNA-1c
	FCGR3B*01	FCGR3B*02	FCGR3B*03
Aminosäureposition Basenposition			
36 141	Arginin (R) AGG	Serin (S) AGC	Serin (S) AGC
38 147	Leucin (L) CTC	Leucin (L) CTT	Leucin (L) CTT
65 227	Asparagin (N) AAC	Serin (S) AGC	Serin (S) AGC
78 266	Alanin (A) GCT	Alanin (A) GCT	Asparagin- säure (D) GAT
82 277	Asparagin- säure (D) GAC	Asparagin (N) AAC	Asparagin (N) AAC
106 349	Valin (V) GTC	Isoleucin (I) ATC	Isoleucin (I) ATC

Eigene Darstellung nach (Ory, et al., 1989), (Bux, et al., 1997) und (Ravetch & Perussia, 1989)

1.3.5 Morphologie des Fcγ Rezeptor IIIb

Der Fcγ Rezeptor Typ IIIb ist über ein Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) in der Membran verankert. Damit hat er im Gegensatz zu den anderen IgG-Rezeptoren des Immunsystems ein Alleinstellungsmerkmal, da ihm die intrazelluläre Domäne fehlt, die üblicherweise über das Zytoskelett oder G-Protein-gekoppelt die Immunreaktion hervorruft. Dennoch konnte gezeigt werden, dass sowohl alleinig als auch zusammen mit FcγRIIa eine zelluläre Reaktion stattfinden kann (Kimberly, et al., 1990).

Auf den Membrananker folgt eine proximale und anschließend eine distale Protein-Domäne, die jeweils selbst morphologisch ähnlich zu Immunglobulinen sind. Die proximale Domäne fungiert als Bindungsstelle für Fc von IgG, während auf der distalen Domäne die HNA-1-Antigene liegen (Zhang, et al., 2000). Eine dedizierte Funktion der distalen Domäne ist derzeit nicht bekannt (Bux, 2008). Die Größe des Rezeptors beläuft

sich auf 50-65 kDa für die HNA-1a-Variante und 65-80 kDa für die HNA-1b-Variante des Rezeptors (Ory, et al., 1989). Eine wahrscheinliche dreidimensionale Darstellung mit Beschriftung der Anteile und der relevanten Aminosäuren ist in Abbildung 1.1 gezeigt.

Abbildung 1.1 Aufbau des Fcγ Rezeptor IIIb

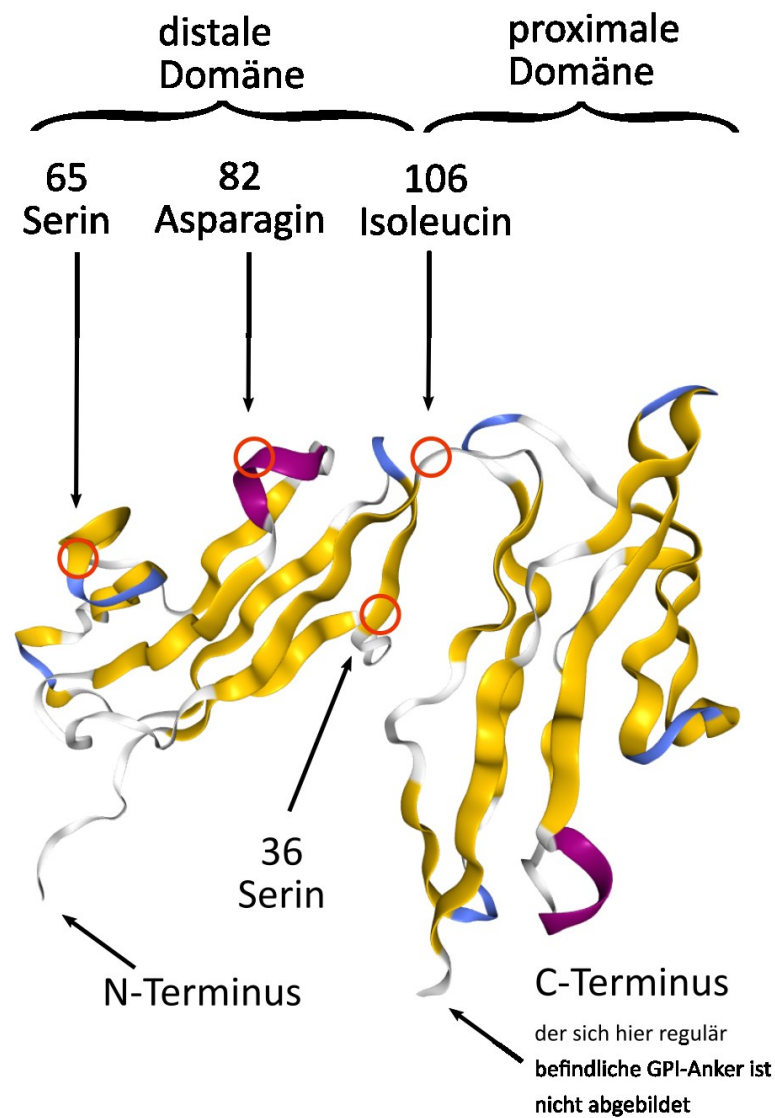


Abbildung nach: 1FNL (Zhang, et al., 2000) , NGL Viewer (Rose, et al., 2018) and RCSB PDB. RCSB PDB (rcsb.org)

Die Farbbildgebung orientiert sich anhand der Sekundärstruktur:
 weiß- keine erkennbare Sekundärstruktur (Coil)
 rot- α-Helix
 gelb- β-Faltblatt
 blau- β-Schleife

Markant sind die multiplen Polymorphismen zwischen HNA-1a und HNA-1b, die zu nur einer Merkmalsausprägung führen (Abbildung 1.2). Schon am Beispiel des Unterschieds zwischen HNA-1b und HNA-1c lässt sich zeigen, dass oftmals bereits solitäre Aminosäureaustausche zu einer bestimmten Antigenität führen können. Im Fall der HNA-1a-Antigene bzw. HNA-1b-Antigene sind es vier Aminosäureaustausche.

1.4 Ziel der Untersuchungen

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, welcher Aminosäureaustausch bei den vier Aminosäureunterschieden zwischen HNA-1a und HNA-1b genau für das jeweilige HNA-1-Antigen verantwortlich ist.

Dafür sollen bei Patientenseren mit modifizierten 293F-Zellen mittels eines modifizierten MAIGA-Protokolls (MAIGA für monoclonal antibody-specific immobilisation of granulocyte antigens) überprüft werden, welche Rezeptorvarianten mit HNA-1a bzw. HNA-1b-Antikörpern reagieren.

2 Material und Methoden

Für die Überprüfung der Reaktivität der Patientenseren wurden verschiedene 293F-Zellkultur-Zellen produziert, die jeweils eine der möglichen Rezeptorvarianten exprimieren. Da sich HNA-1a und HNA-1b in vier Aminosäuren unterscheiden, gibt es insgesamt 16 mögliche Varianten, da jede Kombination aus den Aminosäuren von HNA-1a und -1b berücksichtigt werden muss. Diese wurden anschließend entsprechend eines modifizierten MAIGA-Protokolls mit anti-HNA-1a- bzw. anti-HNA-1b-Patientenseren inkubiert. Dem Protokoll folgend wurden die monoklonalen Antikörpern LNK 16 und 3G8 verwendet. Die folgenden Abschnitte 2.1.1, 2.1.2 und 2.1.3 sind der methodischen Vollständigkeit halber hier zusammenfassend dargestellt, wurden allerdings nicht im Rahmen dieser Arbeit angefertigt.

2.1 Herstellung der Zellen

2.1.1 Herstellung von HNA-1a und HNA-1b-Plasmiden

Für die Herstellung der 293F-Zell-Varianten wurden zunächst Granulozyten aus EDTA-Vollblut von Spendern, die HNA-1a bzw. HNA-1b reinerbig typisiert wurden, mit einer modifizierten Methode nach Bøyum (Bøyum, 1976) isoliert. Die phänotypische Reinerbigkeit der Spender wurde im Granulozytenlabor des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin mit Hilfe charakterisierter Antiseren überprüft und bestätigt. Von diesen unfixierten, isolierten Granulozyten wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) RNA isoliert und am Nanodrop (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA) qualitativ und quantitativ überprüft. Anschließend wurde die gewonnene mRNA mit dem Ready-To-Go You Prime First Strand Beads Kit (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) in cDNA umgeschrieben. Nun konnte die cDNA des Fc γ IIIb-Rezeptors durch die passenden Primer 5'-TCTTTGGTGACTTGTCCA-3' und 5'-AGAGGCCTGAGGATGAT-3' (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland), basierend auf den Daten von Ravetch und Perussia (Ravetch & Perussia, 1989) mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden. Dazu wurde das Gene-Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer, Vaterstetten) verwendet. Mit einer Agarosegelelektrophorese mit einer Agarosekonzentration von 1,5% und einer 30-minütigen konstanten Spannung von 120 V wurde die Probe aufgetrennt. Zur Gewichtsabschätzung für das Auffinden der gewünschten Banden der Nukleinsäurefragmente der Rezeptoren diente ein Molekulargewichtsstandard (MW VI oder MW VII, Boehringer Mannheim, Deutschland). Mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) konnte nun die gewünschte cDNA isoliert und aufgereinigt werden. Am

Nanodrop wurde die Konzentration der cDNA bestimmt. Insgesamt konnte so die cDNA von HNA-1a- bzw. HNA-1b-Neutrophilen isoliert und amplifiziert werden.

Die amplifizierte cDNA wurde anschließend in einen Plasmidvektor eingebracht. Dazu wurde der Plasmidvektor pCDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, USA) zuerst mit dem Enzym ECO RV (Promega, Mannheim, Deutschland) linearisiert und geöffnet und mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Das Enzym ECO RV erzeugte dabei glatte Enden (blunt-ends). Um an den entstandenen glatten Enden des Plasmidvektors eine blunt-blunt-Ligation zu ermöglichen, wurde jeweils die cDNA mit HNA-1a und HNA-1b mit einer abgewandelten DNA-Polymerase, dem Klenow-Enzym (Klenow-Fragment, Biolabs, Bad Schwalbach, Deutschland) mit Nukleotiden aufgefüllt, damit hier ebenfalls Blunt-ends entstehen konnten. Anschließend erfolgte die blunt-blunt-Ligation durch die T4 DNA-Ligase (MBI Fermentas, Vilnius).

Die entstandenen HNA-tragenden Plasmide wurden nun jeweils kompetenten E.coli-Bakterien (E.coli; Max Efficiency DH5 α ™ Competent Cells, GIBCO, Karlsruhe, Deutschland) mittels Transformationsreaktion zugeführt. Aus den per PCR positiv identifizierten Bakterienkulturen wurden die vermehrten Plasmide mittels Mini-Plasmidpräparation mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) und Midi-Plasmidpräparation mit dem Hi Speed Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) gewonnen und am Nanodrop überprüft. Über den ABI PRISM™373 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Weiterstadt) wurde für jeweils eine modifizierte HNA-1a-Plasmid-Probe und eine HNA-1b-Plasmid-Probe analysiert und als Qualitätsbestätigung mit der bekannten Sequenz verglichen.

2.1.2 Herstellung der Mutanten

Anschließend wurden mit den entstandenen E.coli-Bakterien die gewünschten Mutanten hergestellt. Ziel war es, alle 16 permutativ möglichen Mischformen der Fc γ IIIb-Rezeptoren, inklusive der ursprünglichen HNA-1a- und HNA-1b-Varianten, herzustellen (Tabelle 2.1). Dabei wurden die cDNA-Plasmide mit Hilfe des site-directed mutagenesis-Kits (Stratagene, USA) mit jeweils spezifischen Primern so modifiziert, dass alle 16 Mischformen der Fc γ IIIb-Rezeptoren entstanden. Die Varianten 2, 3, 4 und 5 wurden direkt aus der HNA-1a-Variante erzeugt. Anschließend wurde die Variante 6 aus der Variante 2 erzeugt, die Variante 7 aus der Variante 3 und die Variante 8 aus der Variante 2. Die Varianten 12, 13, 14 und 15 wurden mit spezifischen Primern aus der HNA-1b-Variante erzeugt. Die Varianten 9 und 10 anschließend aus der Variante 12 und die Variante 11 aus Variante 13. Zuletzt wurden auch diese Konstrukte sequenziert, um die gewünschte Mutation sicherzustellen.

Tabelle 2.1 Mutanten des Fcy Rezeptor IIIb

Variante	Aminosäure Nukleotidposition				Ausgangs-Variante	verwendete Primer
	36 141	65 227	82 277	106 349		
1 HNA-1a	Arginin AGG	Asparagin AAC	Asparaginat GAC	Valin GTC		
2	Arginin AGG	Asparagin AAC	Asparaginat GAC	Isoleucin ATC	HNA-1a	Vorwärts: 5'-GTG CAG CTA GAA GTC CAT ATC GGC TGG CTG TTG CTC-3' Rückwärts: 5'-GAG CAA CAG CCA GCC GAT ATG GAC TTC TAG CTG CAC-3'
3	Arginin AGG	Asparagin AAC	Asparagin AAC	Valin GTC	HNA-1a	Vorwärts: 5'-GAC GCT GCC ACA GTC AAC GAC AGT GGA GAG TAC AGG-3' Rückwärts: 5'-CCT GTA CTC TCC ACT GTC GTT GAC TGT GGC AGC GTC-3'
4	Arginin AGG	Serin AGC	Asparaginat GAC	Valin GTC	HNA-1a	Vorwärts: 5'-GTG GTT TCA CAA TGA GAG CCT CAT CTC AAG CCA GG-3' Rückwärts: 5'-CCT GGC TTG AGA TGA GGC TCT CAT TGT GAA ACC AC-3'
5	Serin AGC	Asparagin AAC	Asparaginat GAC	Valin GTC	HNA-1a	Vorwärts: 5'-GAG CCT CAA TGG TAC AGC GTG CTC GAG AAG GAC AG-3' Rückwärts: 5'-CTG TCC TTC TCG AGC ACG CTG TAC CAT TGA GGC TC-3'
6	Arginin AGG	Asparagin AAC	Asparagin AAC	Isoleucin ATC	Variante 2	wie bei Variante 3
7	Arginin AGG	Serin AGC	Asparagin AAC	Valin GTC	Variante 3	wie bei Variante 4
8	Serin AGC	Asparagin AAC	Asparaginat GAC	Isoleucin ATC	Variante 2	wie bei Variante 5
9	Serin AGC	Serin AGC	Asparaginat GAC	Valin GTC	Variante 12	wie bei Variante 13
10	Serin AGC	Asparagin AAC	Asparagin AAC	Valin GTC	Variante 12	wie bei Variante 14
11	Arginin AGG	Serin AGC	Asparaginat GAC	Isoleucin ATC	Variante 13	wie bei Variante 15
12	Serin AGC	Serin AGC	Asparagin AAC	Valin GTC	HNA-1b	Vorwärts: 5'-GTG CAG CTA GAA GTC CAT GTC GGC TGG CTG TTG CTC-3' Rückwärts: 5'-GAG CAA CAG CCA GCC GAC ATG GAC TTC TAG CTG CAC-3'
13	Serin AGC	Serin AGC	Asparaginat GAC	Isoleucin ATC	HNA-1b	Vorwärts: 5'-GAC GCT GCC ACA GTC GAC GAC AGT GGA GAG TAC AGG-3' Rückwärts: 5'-CCT GTA CTC TCC ACT GTC GTC GAC TGT GGC AGC GTC-3'
14	Serin AGC	Asparagin AAC	Asparagin AAC	Isoleucin ATC	HNA-1b	Vorwärts: 5'-GTG GTT TCA CAA TGA GAA CCT CAT CTC AAG CCA GG-3' Rückwärts: 5'-CCT GGC TTG AGA TGA GGT TCT CAT TGT GAA ACC AC-3'
15	Arginin AGG	Serin AGC	Asparagin AAC	Isoleucin ATC	HNA-1b	Vorwärts: 5'-GAG CCT CAA TGG TAC AGG GTG CTT GAG AAG GAC AG-3' Rückwärts: 5'-CTG TCC TTC TCA AGC ACC CTG TAC CAT TGA GGC TC-3'
16 HNA-1b	Serin AGC	Serin AGC	Asparagin AAC	Isoleucin ATC		

2.1.3 Transfektion in 293F Zellen

Die entstandenen Plasmide wurden nun jeweils per Transfektion mit Lipofectamin 2000 (GIBCO, Karlsruhe) 293F Zellen (GIBCO, Karlsruhe) zugefügt. Anschließend konnten die 293F Zellen kultiviert werden. Den Kulturen wurde zuvor Geneticin (Bioprom AG, Stuttgart, Deutschland) hinzugefügt, damit ausschließlich inserttragende 293F Zellen überlebten. Nach einer mehrwöchigen Kultivierung der Zellen wurde die Expression der Fc γ IIIb-Rezeptoren durchflusszytometrisch überprüft. Dazu wurden an 293F Zellen gebundene monoklonale Antikörper, Klon DJ130c (DAKO, Glostrup, Dänemark), mit einer Bindungsstelle am unmutierten proximalen Rezeptorteil mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper, Goat-anti-Mouse-IgG (DAKO), nachgewiesen. Für die Messungen am Durchflusszytometer FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) wurden als Negativprobe untransfizierte 293F-Zellen sowie transfizierte mit Maus-IgG (Becton Dickinson) statt des Klon DJ130c mitgeführt.

2.2 Zellkultivierung

Die entstandenen 293F Zellen wurden für die Testansätze langfristig kultiviert. Das Arbeiten erfolgte stets unter sterilen Bedingungen. Dazu wurde DMEM high Glucose mit 10 % aufgetautem fetal bovine serum (FCS/FBS) und 5 % Penicillin-Streptomycin (P/S) versetzt. Zu dem Nährmedium der transfizierten Zellen wurde außerdem Geneticin (400 μ l/ml) hinzugefügt. Die Zellen wurden nun in einer Anzuchtflasche mit 12 ml des Nährmediums bei 37 °C mit 5 % CO₂ gezüchtet, bis sie den Boden des Zuchtgefäßes vollständig besiedelten. Danach konnten sie für die Versuche geerntet werden. Dazu wurde die Flasche zwei Mal mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Accutase abgelöst. Nach fünf minütiger Inkubation der Accutase wurden die Zellen durch leichtes Klopfen mobilisiert und es wurden 6 ml des frischen Nährmediums hinzugegeben. 5 ml der Zellen mit Nährmedium wurden für die weiteren Schritte genutzt und in ein Blue Cap überführt, während zu den verbleibenden circa 2 ml 12 ml frisches Nährmedium für die weitere Kultivierung hinzugefügt wurden. Die weitere Kultivierung fand wieder im Brutschrank bei 37°C mit 5 % CO₂ statt.

2.3 Zellfixierung

Die durch die Kultivierung gewonnenen Zellen in 5 ml Nährmedium wurden als nächstes fixiert und auf eine Zellzahl von 3×10^6 Zellen/ μ l eingestellt. Dafür wurden die gewonnenen Zellen in den jeweiligen Blue Caps 5 Minuten bei 1200 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit 6 ml PBS. Nach erneuter Zentrifugation mit dem Verwerfen des Überstandes erfolgte die Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd 4%. Das Zellpellet wurde mit 1,5 ml PBS und 0,5 ml des PFA resuspendiert. Anschließend erfolgte eine 5-minütige Inkubation im Dunklen bei Raumtemperatur. Nun folgten zwei weitere Waschschriffe mit 6 ml PBS. Zuletzt wurden zu dem Zellpellet 2 ml PBS/BSA 0,2% gegeben und die Konzentration lebender Zellen am Zellcounter gemessen, sodass eine Einstellung auf die gewünschten 3×10^6 Zellen / μ l möglich war.

2.4 HNA-Antikörper aus Patientenseren

Für die Versuche mit den 293F-Zellen mit ihren jeweiligen Rezeptoren wurden anti-HNA-1-Seren von Patienten genutzt. Die Seren stammten von Müttern, bei deren Kindern neonatale Alloimmunneutropenie diagnostiziert worden war. Alle verwendeten Seren wurden in zwei Referenzlaboren der International Society of Blood Transfusion (ISBT) in Gießen, Deutschland und Hagen, Deutschland mithilfe des standardisierten monoclonal antibody immobilization of granulocyte specific antigens (MAIGA) -assays auf ihre Antikörper bestätigt. Außerdem wurde als Negativkontrolle ein Serum eines gesunden Blutspenders ohne spezifische Antiseren gegen weiße Blutkörperchen verwendet.

2.5 Monoklonale Antikörper

Wie im Abschnitt 2.6 beschrieben wird, wurden zudem die monoklonalen CD16-Antikörper LNK16 und 3G8 im Rahmen des modifizierten MAIGA genutzt. Beide sind Antikörper gegen CD16b, aber an unterschiedlichen Stellen. Sie haben also nicht-überlappende Epitope.

2.5.1 monoklonaler Antikörper LNK16

Der monoklonale Antikörper LNK16 (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, USA) ist ein monoklonaler Mouse-anti-Human-Antikörper gegen CD16a- und CD16b-Oberflächenproteine. LNK16 ist ein IgG-Antikörper vom Subtyp IgG₁.

2.5.2 monoklonaler Antikörper 3G8

Der monoklonale Antikörper 3G8 (Beckman Coulter, Marseille, Frankreich) ist ebenfalls ein monoklonaler Mouse-anti-Human-Antikörper gegen CD16a und CD16b-Oberflächenproteine. Auch 3G8 ist ein IgG-Antikörper vom Subtyp IgG₁.

2.6 Modifizierter MAIGA

Für den Versuch wurde die Bindungsfähigkeit von HNA-Antikörpern aus Patientenseren an die 16 verschiedenen transfizierten 293F Zellen, sowie als Negativprobe an untransfizierte 293F Zellen mit Hilfe der beschriebenen monoklonalen Antikörper überprüft. Dazu wurde der MAIGA-Test (monoclonal antibody-specific immobilisation of granulocyte antigens (Bux, et al., 1993)) wie folgt modifiziert.

Die benötigten Mikrotiterplatten mit 96 Wells wurden zunächst geccoatet. Dazu wurden 100µl eines Gemischs aus coating buffer (1 l Aqua dest., 0,3975g Natriumcarbonat, 0,7325g Natriumhydrogencarbonat, 0,05g Natriumazid) und Goat-anti-Mouse-IgG (Dianova, Hamburg, Deutschland, Konzentration 3 µl Goat-anti-Mouse-IgG pro ml, coating buffer) zu jedem Well hinzugegeben. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten für 12 Stunden bei 4 °C inkubiert.

Die zuvor fixierten Zellen wurden mit PBS auf eine Zellzahl von $3,0 \times 10^6/\mu\text{l}$ eingestellt. Für den Testansatz wurden pro Ansatz 50 µl des Patientenserums zu 100 µl der fixierten Zellen gegeben. Nach kurzem Vortexen erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C. Nun wurden mit 50 µl PBS/ Bovin Serum Albumin (BSA) 0,2 % gewaschen. Anschließend wurde in der Plattenzentrifuge 30 Sekunden bei 1200 g der Überstand abzentrifugiert und verworfen. Zu den entstandenen Pellets wurden jetzt 50 µl 2% BSA/D-PBS, sowie 10 µl des monoklonalen Antikörpers (Konzentration 0,02 mg/ml) gegeben. Nach erneutem kurzem Vortexen wurden die Ansätze erneut 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nun erfolgten drei Waschschrte mit 100 µl PBS/BSA 0,2 %, der 30-sekündigen Zentrifugation mit 1200 g und dem jeweiligen Verwerfen des Überstandes. Zu dem letzten Pellet wurden 100 µl eines Lysepuffers (1 l Aqua dest., 2,4 g TRIS (Trishydroxymethyl-aminomethan), 8,76 g NaCl, 9,5 ml Triton x-100 (Polyethylenglycol-

[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]-ether), 1,86 g EDTA, pH 7,4 eingestellt) mit Proteaseinhibitoren (950 µl lysis buffer, 50 µl Proteaseinhibitoren) gegeben und in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden diese 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nun wurde die gecoatete Mikrotiterplatte für eine Stunde bei 4°C geblockt, indem 200 µl PBS/BSA 0,2% pro Well hinzugefügt wurden. Anschließend wurde die Platte fünf Mal mit PBS/Tween20 0,05% gewaschen. Auch wurde pro Testansatz ein weiteres Eppendorfgefäß mit 180 µl eines MAINA-Waschpuffers (1,21 g TRIS, 9,5 ml Triton x-100, 4,5 ml Tween20, 72,5 mg CaCl₂ 2H₂O, 1 l NaCl-Lösung, pH 7,4 eingestellt) vorbereitet und bei 4°C inkubiert.

Die inkubierten Eppendorfgefäße mit den Zell-Antikörper-Pellets mit Lysepuffer wurden bei Raumtemperatur weitere 30 Minuten bei 13000 g abzentrifugiert. 70 µl des Überstandes wurden nun in die Eppendorfgefäße mit MAINA-Waschpuffer gegeben. Jetzt wurden 200 µl des Gemischs auf die blockierte gecoatete Mikrotiterplatte gegeben. Als Leerwert für die anschließende Photometermessung wurden 200 µl MAINA-Waschpuffer verwendet. Die Platte wurde erneut 12 Stunden bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde die Platte erneut fünf Mal mit PBS/Tween20 0,05% gewaschen. Anschließend wurden 100 µl eines HRP-markierten (HRP für Meerrettichperoxidase CA1) Goat-anti-Human-IgG-Antikörpers (Dianova, Hamburg, Deutschland), welcher in MAINA-Waschpuffer/BSA 0,2% gelöst wurde, hinzu pipettiert. Nachdem die Ansätze zwei Stunden bei 4 °C inkubiert wurden, wurden sie sechs Mal mit PBS/Tween20 0,05% gewaschen. Nun wurden pro Well 100 µl eines Substratpuffers (3 ml Aqua dest., 1 Tablette OPD (o-Phenylenediamin Dihydrochlorid), 1,25 µl H₂O₂) dazugegeben und die Mikrotiterplatte 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurde die Reaktion mit 50 µl 4N H₂SO₄ abgestoppt und am Plattenphotometer (Tecan Sunrise Plattenphotometer, Tecan, Grödig/Salzburg, Österreich) bei 492 nm gemessen.

2.7 Durchführung der Versuche

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden acht Patientenseren, die Anti-HNA-1a-positiv getestet worden waren, mit dem monoklonalen Antikörper 3G8, sowie acht Patientenseren wurden mit Anti-HNA-1a-Antikörpern mit dem monoklonalen LNK16 überprüft. Des Weiteren wurden jeweils elf Patientenseren, die Anti-HNA-1b-positiv getestet wurden, einmal mit 3G8 und einmal mit LNK16 getestet. Die Versuche erfolgten jeweils mit allen 16 Varianten der 293F-Zellen. Somit konnte eine Aussage darüber getroffen werden, welche Rezeptorvariante als HNA-1a-Rezeptor bzw. welche als HNA-1b-Rezeptor reagiert.

2.8 Überprüfung der internen Validität

Bei den Versuchsreihen wurden die monoklonalen Antikörper und die Patientenseren so gewählt, dass vier Patientenseren mit HNA-1a-Antikörpern mit beiden monoklonalen Antikörpern, also mit 3G8 und auch mit LNK16 überprüft wurden. Ebenso wurde die Hälfte der Patientenseren mit HNA-1b-Antikörpern mit beiden monoklonalen Antikörpern getestet. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass die Ergebnisse nicht durch die unterschiedlichen verwendeten monoklonalen Antikörper erklärt wurden.

Zuletzt wurde von jeder Versuchsvariante, also 3G8 und LNK16 bzw. Anti-HNA-1a und Anti-HNA-1b, der Versuch mit einem Serum dreifach wiederholt. So konnte sichergestellt werden, dass die Schwankungsbreite innerhalb des Tests keinen wesentlichen Einfluss auf das Ergebnis hatte.

2.9 Zusammenfassung des Versuchsablaufs

Es wurden die 16 möglichen Varianten der vier Aminosäuren des $\text{Fc}\gamma\text{RIIIb}$ -Rezeptors verwendet, die für die spezifische Reaktion als HNA-1a bzw. HNA-1b verantwortlich sind (vergleiche Tabelle 2.1). Anschließend wurde zu den jeweiligen Zellen Serum von Patienten mit bekannten HNA-1a- bzw. HNA-1b-Antikörpern gegeben, um deren Bindungsfähigkeit an den hergestellten $\text{Fc}\gamma\text{RIIIb}$ zu überprüfen. Dies geschah mit einem HRP-markierten Goat-anti-Human-IgG-Antikörper, der mit einem Plattenphotometer detektiert wurde. Dem modifizierten MAIGA-Protokoll gemäß, welches wiederum einem modifizierten ELISA-Test entspricht, wurde der $\text{Fc}\gamma\text{RIIIb}$ -Rezeptor mit einem anderen, monoklonalen Antikörper LNK16 bzw. 3G8 gebunden. Diese monoklonalen Antikörper waren Mouse-anti-Human-Antikörper, welche über Goat-anti-Mouse-Antikörper an die gecoatete Mikrotiterplatte gebunden wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Versuchsreihen

Die in den nachfolgenden Tabellen dargestellten Ergebnisse sind jeweils die Angaben der Absorptionswerte (OD-Werte) des modifizierten ELISA-Tests. Ein hoher Wert spricht für eine starke Reaktion, während niedrige Werte keine Reaktion anzeigen. Für die Interpretation wurde als Cut-off für eine positive Reaktion der doppelte Wert der Reaktion der untransfizierten 293F-Zellen gewählt.

Die Tabellen umfassen jeweils die Varianten mit den Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code, wobei sich der erste Buchstabe (R für Arginin oder S für Serin) auf die Aminosäureposition 36 des Rezeptors bezieht, der zweite Buchstabe (N für Asparagin bzw. S für Serin) auf die Position 65, der dritte Buchstabe (D für Asparaginsäure oder N für Asparagin) auf die Position 82 und der vierte Buchstabe (V für Valin oder I für Isoleucin) auf die Position 106 des Rezeptors.

Eindeutig als positiv zu wertende Ergebnisse im Sinne des Überschreitens des doppelten Wertes mit untransfizierten Zellen sind gelb markiert, grenzwertige Ergebnisse sind blau markiert.

3.1.1 HNA-1a-Antikörper und MOAB LNK16

Tabelle 3.1 OD-Werte der Tests der erzeugten Mutanten mit 8 verschiedenen Anti-HNA-1a-Patientenseren und dem Monoklonalen Antikörper LNK16

HNA-1a-Antikörper, Serum-Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8
Mutante	Aminosäure-Kombination								
1	RNDV	3	1,9	0,9	3	3	3	3	5,2
2	RNDI	3	1,8	0,3	3	3	0,54	3	4,6
3	RNNV	0,82	1,7	0,45	3	2,4	0,45	3	3
4	RSDV	0,39	0,5	0,22	3	0,3	0,4	2,8	0,44
5	SNDV	2,92	2,6	0,97	3	3	3	3	3
6	RNNI	0,48	1	0,5	3	0,87	0,48	1,7	4,3
7	RSNV	0,05	0,2	0,11	3,5	0,3	0,4	0,26	0,4
8	SNDI	1,21	2,45	0,4	5,8	4	2,2	5,5	5,2
9	SSDV	0,3	0,4	0,28	4,3	0,38	0,42	4,2	0,38
10	SNNV	0,68	0,7	0,19	4,5	0,87	3	5	3,1
11	RSDI	0,37	0,13	0,26	1,8	0,35	0,3	0,43	0,33
12	SSNV	0,38	0,18	2,9	0,45	0,38	0,38	0,49	0,26
13	SSDI	0,34	0,11	0,2	0,35	0,29	0,56	0,33	0,35
14	SNNI	0,38	0,63	0,6	1,57	0,68	0,79	1,7	3,3
15	RSNI	0,44	0,18	0,09	0,32	0,39	0,28	0,24	0,3
16	SSNI	0,4	0,37	0,26	0,4	0,17	0,26	0,16	0,3
untransf.		0,4	0,48	0,39	0,28	0,3	0,3	0,3	0,2

3.1.2 HNA-1a-Antikörper und MOAB 3G8

Tabelle 3.2 OD-Werte der Tests der erzeugten Mutanten mit 8 verschiedenen Anti-HNA-1a-Patientenseren und dem Monoklonalen Antikörper 3G8

HNA-1a-Antikörper, Serum-Nr.		5	6	7	8	9	10	11	12
Mutante	Aminosäure-Kombination								
1	RNDV	0,58	0,42	2,8	3,8	3,2	0,7	0,6	3,2
2	RNDI	0,78	0,32	3	4	3,3	2,6	0,74	3,1
3	RNNV	1,16	0,54	3	3	2,3	0,8	0,3	3,2
4	RSDV	0,2	0,4	0,28	0,5	0,3	0,3	0,1	0,3
5	SNDV	0,95	0,37	3	3	3	0,9	0,5	3,2
6	RNNI	0,39	0,47	2,8	3,9	1,8	1	0,3	3,2
7	RSNV	0,32	0,7	0,31	0,52	0,4	0,2	0,1	0,1
8	SNDI	0,48	0,6	4	4	3,1	1,3	0,4	3,3
9	SSDV	0,57	1	0,3	0,32	0,5	0,2	0,1	0,1
10	SNNV	0,9	0,92	4,4	3,8	2,3	0,7	0,35	3,1
11	RSDI	0,45	0,84	0,68	0,38	0,4	0,2	0,2	0,2
12	SSNV	0,4	1	0,24	0,4	0,3	0,2	0,1	0,1
13	SSDI	0,83	0,88	0,26	0,4	0,4	0,2	0,2	0,1
14	SNNI	0,46	0,5	2,1	3	2,5	0,7	0,4	2,9
15	RSNI	1,3	0,53	0,27	0,39	0,3	0,2	0,09	0,1
16	SSNI	0,2	0,34	0,27	0,3	0,4	0,1	0,1	0,2
untransf.		0,22	0,3	0,19	0,3	0,2	0,1	0,1	0,05

3.1.3 HNA-1b-Antikörper und MOAB LNK16

Tabelle 3.3 OD-Werte der Tests der erzeugten Mutanten mit 11 verschiedenen Anti-HNA-1b-Patientenseren und dem Monoklonalen Antikörper LNK16

HNA-1b-Antikörper, Serum-Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Mutante	Aminosäure-Kombination											
1	RNDV	0,49	0,47	0,6	0,35	0,12	0,4	0,18	0,37	0,25	0,2	0,1
2	RNDI	0,2	0,28	0,5	0,59	0,15	0,18	0,18	0,2	0,27	0,15	0,13
3	RNNV	3	2,8	3	3	0,6	2,2	2,8	1	3	0,31	2,9
4	RSDV	0,35	0,47	0,57	0,7	0,13	0,15	0,14	0,24	0,35	0,26	0,11
5	SNDV	3	2,7	3	3	2,57	2,87	0,67	2,8	0,34	0,41	2,9
6	RNNI	3	1,8	4,7	3	0,1	0,28	3	0,87	3	0,32	3
7	RSNV	4	5,5	4,3	4,8	0,1	0,6	3	4,3	4,5	0,43	3
8	SNDI	4,2	1,26	2,3	4,5	2,8	3,1	0,5	3	0,68	0,39	3
9	SSDV	4	5,9	4,35	4,3	2,75	2,8	0,5	4,2	0,38	0,34	2,7
10	SNNV	4,1	3,1	4,5	5,3	2,56	2,9	3,4	4,1	4,4	0,31	2,5
11	RSDI	0,47	0,48	0,4	0,4	0,2	0,3	0,2	0,15	0,18	0,31	0,2
12	SSNV	4,8	4,8	4,7	4,9	2,74	2,5	3,4	4,1	4,2	1,49	3,2
13	SSDI	4,3	5,4	5,5	4,6	2,64	2,7	1,3	2,5	0,35	0,42	2,7
14	SNNI	5,3	2,5	5,5	4,2	3	3	3,4	3	4,9	0,45	0,2
15	RSNI	4,1	5,9	4,3	4,4	0,15	0,2	3,4	4,1	4,2	0,21	3
16	SSNI	3	3	4,4	3	2,6	2,9	2,9	3	3	1,08	3,3
untransf.		0,46	0,4	0,47	0,4	0,1	0,3	0,2	0,3	0,38	0,03	0,2

3.1.4 HNA-1b-Antikörper und MOAB 3G8

Tabelle 3.4 OD-Werte der Tests der erzeugten Mutanten mit 11 verschiedenen Anti-HNA-1b-Patientenseren und dem Monoklonalen Antikörper 3G8

HNA-1b-Antikörper, Serum-Nr.		1	2	3	5	8	12	13	14	15	16	17
Mutante	Aminosäure-Kombination											
1	RNDV	0,25	0,45	1	0,23	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1
2	RNDI	0,36	0,8	0,9	0,2	0,15	0,35	0,34	0,1	0,1	0,3	0,2
3	RNNV	0,67	0,82	3	0,32	0,3	2,5	2,3	1,9	0,4	0,4	0,4
4	RSDV	0,42	1,23	1	0,22	0,1	0,3	0,3	0,2	0,1	0,3	0,2
5	SNDV	3	3	3	2,8	2,7	2,9	2,6	2,8	3,2	3,2	2,7
6	RNNI	0,47	0,57	3,9	0,24	0,1	0,2	0,6	0,3	0,3	1,5	0,3
7	RSNV	5,9	5,9	1	0,25	2,5	0,3	0,4	0,2	0,4	3	2,4
8	SNDI	5,7	5	4,9	4,5	2,5	3	3	2,9	3	3,1	2,6
9	SSDV	5,8	5,7	5,4	4,1	2,4	3	2,8	3	3,2	3,1	2,4
10	SNNV	5,8	5,8	5,9	4,2	2,7	2,9	2,8	2,8	3,2	3	2,6
11	RSDI	0,35	0,49	0,64	0,2	0,1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2
12	SSNV	5,4	5,7	5,7	4,4	2,8	2,9	3	3,3	3,1	3,2	2,3
13	SSDI	5,8	5,4	5,8	4,7	2,9	3	2,9	3	3,1	3,1	2,8
14	SNNI	4,8	4,8	5,4	4,5	2,3	2,8	2,9	2,8	3,1	3	1,8
15	RSNI	5,9	5,9	1	0,2	2,8	0,3	0,2	0,3	0,4	0,38	0,39
16	SSNI	3	3	4,5	2,6	3,1	3,1	2,7	2,9	3,2	3,1	2,7
untransf.		0,3	0,4	0,5	0,24	0,3	0,28	0,3	0,28	0,38	0,35	0,3

3.1.5 Ergebnisse zur Validitätsüberprüfung

Tabelle 3.5 Übersicht über die mit den Monoklonalen 3G8 und LNK16 getesteten Anti-HNA-1b-Patientenseren

HNA-1b-Antikörper, Serum-Nr.		1		2		3		5		8	
		3G8	LNK16	3G8	LNK16	3G8	LNK16	3G8	LNK16	3G8	LNK16
Mutante	Aminosäure-Kombination										
1	RNDV	0,25	0,49	0,45	0,47	1	0,6	0,23	0,12	0,1	0,37
2	RNDI	0,36	0,2	0,8	0,28	0,9	0,5	0,2	0,15	0,15	0,2
3	RNNV	0,67	3	0,82	2,8	3	3	0,32	0,6	0,3	1
4	RSDV	0,42	0,35	1,23	0,47	1	0,57	0,22	0,13	0,1	0,24
5	SNDV	3	3	3	2,7	3	3	2,8	2,57	2,7	2,8
6	RNNI	0,47	3	0,57	1,8	3,9	4,7	0,24	0,1	0,1	0,87
7	RSNV	5,9	4	5,9	5,5	1	4,3	0,25	0,1	2,5	4,3
8	SNDI	5,7	4,2	5	1,26	4,9	2,3	4,5	2,8	2,5	3
9	SSDV	5,8	4	5,7	5,9	5,4	4,35	4,1	2,75	2,4	4,2
10	SNNV	5,8	4,1	5,8	3,1	5,9	4,5	4,2	2,56	2,7	4,1
11	RSDI	0,35	0,47	0,49	0,48	0,64	0,4	0,2	0,2	0,1	0,15
12	SSNV	5,4	4,8	5,7	4,8	5,7	4,7	4,4	2,74	2,8	4,1
13	SSDI	5,8	4,3	5,4	5,4	5,8	5,5	4,7	2,64	2,9	2,5
14	SNNI	4,8	5,3	4,8	2,5	5,4	5,5	4,5	3	2,3	3
15	RSNI	5,9	4,1	5,9	5,9	1	4,3	0,2	0,15	2,8	4,1
16	SSNI	3	3	3	3	4,5	4,4	2,6	2,6	3,1	3
untransf.		0,3	0,46	0,4	0,4	0,5	0,47	0,24	0,1	0,3	0,3

Tabelle 3.6 Mit den Monoklonalen 3G8 und LNK16 dreifach getestetes HNA-1a-Serum Nr. 8

HNA-1a-Antikörper, Serum-Nr.		8	8	8	8	8	8
		3G8	3G8	3G8	LNK16	LNK16	LNK16
Mutante	Aminosäure-Kombination						
1	RNDV	3,8	3,7	3,9	5,2	5	2,1
2	RNDI	4	3,9	3,8	4,6	4,5	4,5
3	RNNV	3	2,9	2,8	3	3,1	3,2
4	RSDV	0,5	0,3	0,28	0,44	0,3	0,35
5	SNDV	3	2,8	2,8	3	3,1	3,2
6	RNNI	3,9	3,8	3,9	4,3	4,3	4,4
7	RSNV	0,52	0,35	0,4	0,4	0,35	0,33
8	SNDI	4	3,9	3,8	5,2	5,1	5,3
9	SSDV	0,32	0,29	0,31	0,38	0,29	0,33
10	SNNV	3,8	3,8	3,6	3,1	3,2	3,3
11	RSDI	0,38	0,3	0,3	0,33	0,28	0,3
12	SSNV	0,4	0,3	0,3	0,26	0,25	0,24
13	SSDI	0,4	0,3	0,3	0,35	0,3	0,3
14	SNNI	3	3,1	3,1	3,3	3,4	3,5
15	RSNI	0,39	0,3	0,32	0,3	0,25	0,28
16	SSNI	0,3	0,3	0,28	0,3	0,2	0,27
untransf.		0,3	0,31	0,35	0,2	0,3	0,27

Tabelle 3.7 Mit den Monoklonalen 3G8 und LNK16 dreifach getestetes HNA-1b-Serum Nr. 5

HNA-1b-Antikörper, Serum-Nr.		5	5	5	5	5	5
Mutante	Aminosäure-Kombination	3G8	3G8	3G8	LNK16	LNK16	LNK16
1	RNDV	0,23	0,21	0,25	0,12	0,1	0,15
2	RNDI	0,2	0,2	0,21	0,15	0,1	0,12
3	RNNV	0,32	0,33	0,28	0,6	0,45	0,52
4	RSDV	0,22	0,25	0,27	0,13	0,1	0,15
5	SNDV	2,8	3	3,1	2,57	3	2,85
6	RNNI	0,24	0,2	0,25	0,1	0,1	0,15
7	RSNV	0,25	0,25	0,23	0,1	0,1	0,12
8	SNDI	4,5	4,1	4,3	2,8	2,9	3,1
9	SSDV	4,1	4,3	3,9	2,75	2,9	3,1
10	SNNV	4,2	3,9	4	2,56	2,85	3
11	RSDI	0,2	0,25	0,27	0,2	0,1	0,18
12	SSNV	4,4	4,3	4,4	2,74	2,9	3,2
13	SSDI	4,7	4,5	4,4	2,64	2,8	3,1
14	SNNI	4,5	4,6	4,6	3	3,2	2,9
15	RSNI	0,2	0,21	0,25	0,15	0,1	0,14
16	SSNI	2,6	2,9	3,3	2,6	2,9	3
untransf.		0,24	0,29	0,3	0,14	0,25	0,28

3.2 Interpretation der Ergebnisse

3.2.1 Auswertung zu Versuchen mit HNA-1a-Antikörpern

Die Ergebnisse für die Versuchsreihe mit HNA-1a-Antikörpern sind aus der Tabelle 3.1 für die Versuche mit LNK16 zu entnehmen und aus der Tabelle 3.2 für die Versuche mit 3G8. Die Patientenseren waren wie bereits beschrieben durch zwei standardisierte Referenzlabore auf ihre HNA-1a- bzw. -1b-Antikörper bestimmt worden. Alle acht in dem Test verwendeten Anti-HNA-1a-Patientenseren erkannten die CD16b RNDV-Rezeptorvariante, welche dem HNA-1a-Wildtyp entspricht.

Insgesamt lässt sich folgende Positiv-Negativ-Tabelle aus den Ergebnissen ableiten (siehe Tabelle 3.9).

Tabelle 3.8 Positiv-negativ-Tabelle der HNA-1a-Antikörper

HNA-1a-Antikörper, Serum-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	5	6	7	8	9	10	11	12	insgesamt
MOAB	LNK16	LNK16	LNK16	LNK16	LNK16	LNK16	LNK16	LNK16	3G8	3G8	3G8	3G8	3G8	3G8	3G8	3G8	
Mutante Aminosäure-Kombination																	
1 RNDV	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	15/15
2 RNDI	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	13/15
3 RNNV	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	13/15
4 RSDV	neg	neg	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	2/15
5 SNDV	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	14/15
6 RNNI	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	14/15
7 RSNV	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	2/15
8 SNDI	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	15/15
9 SSDV	neg	neg	neg	pos	neg	neg	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	3/15
10 SNNV	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	14/15
11 RSDI	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	2/15
12 SSNV	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	2/15
13 SSDI	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	3/15
14 SNNI	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	14/15
15 RSNI	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	2/15
16 SSNI	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0/15

3.2.2 Fazit für die Antigenität von HNA-1a

Die Ergebnisse zeigen, dass je nach Änderung der Aminosäure an den HNA-1-spezifischen Aminosäurestellen 36, 65, 82 und 106 der Fc γ IIIb-Rezeptor seine Reaktionsfähigkeit mit humanen Anti-HNA-1-Patientenseren behält bzw. verliert.

Aus der Tabelle 3.9 geht hervor, dass Zellen mit folgenden Aminosäureaustauschen an den für HNA-1a- bzw. HNA-1b-relevanten Stellen zumeist positiv auf Anti-HNA-1a-Patientenseren reagieren: RNDV, RNDI, RNNV, SNDV, RNNI, SNDI, SNNV und SNNI. Negativ reagierten folgende Anti-HNA-1a-Seren: RSDV, RSNV, SSDV, RSDI, SSNV, SSDI, RSNI und der HNA-1b-Wildtyp SSNI.

Um nun ein Epitop zu eruieren, wird jede mögliche Mutationsstelle betrachtet. Es stellt sich für jede Aminosäurestelle die Frage, ob ausgehend vom Wildtyp ein Aminosäureaustausch dazu führt, dass diese Rezeptorvariante negativ reagiert, bzw. ob die Anwesenheit dieser speziellen Aminosäure zu einem positiven Testergebnis führt.

Für die Aminosäurestelle 36 gibt es sowohl für Arginin (R), als auch für Serin (S) mehrere Varianten, welche positiv reagieren. Für Arginin sind das die Varianten 1, 2, 3 und 6, für Serin die Varianten 5, 8, 10 und 14. Außerdem gibt es ebenso mehrere Varianten mit Arginin bzw. Serin, die negativ reagieren. Für Arginin sind das die Varianten 4, 7, 11 und 15, für Serin die Varianten 9, 12, 13 und 16. Dementsprechend kommt die Aminosäurestelle 36 nicht für das Epitop von HNA-1a infrage.

Für die Aminosäurestelle 65 ergibt sich, dass alle Rezeptorvarianten, welche Asparagin (N) an dieser Stelle besitzen, positiv reagieren, während alle CD16-Varianten mit Serin (S) an der Aminosäurestelle 65 tragen, negativ reagieren. Für Asparagin sind das die Varianten 1, 2, 3, 5, 6, 8, 10 und 14, während die Varianten 4, 7, 9, 11, 12, 13, 15 und 16 Serin tragen. Somit ist Asparagin an der Aminosäurestelle 65 für die HNA-1a-Epitopbildung des Fc γ IIIb-Rezeptors anzunehmen.

An der Stelle 82 gibt es wieder positive und negative Rezeptorvarianten mit Asparagin, sowie positive und negative Varianten mit Asparaginsäure. Asparagin (N) an der Stelle 82 tragen die Varianten 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15 und 16, von denen 3, 6, 10 und 14 positiv reagieren, während 7, 12, 15 und 16 negativ reagieren. Asparaginsäure tragen die anderen Rezeptorvarianten: 1, 2, 4, 5, 8, 9, 11 und 13. Von denen reagieren 1, 2, 5 und 8 positiv und 4, 9, 11 und 13 negativ. Also ist auch diese Aminosäurestelle als HNA-1a-Epitop auszuschließen.

Zuletzt gibt es auch für die Aminosäurestelle 106 von CD16b positive und negative Rezeptorvarianten mit Valin, positiv die Varianten 1, 3, 5 und 10, negativ die Varianten 4, 7, 9 und 12. Ebenso gibt es positive Varianten mit Isoleucin, 2, 6, 8 und 14, und

negative Varianten mit Isoleucin, 11, 13, 15 und 16. So kann auch die Stelle 106 nicht epitop-bildend sein.

Die Aminosäure, die das HNA-1a-Epitop definiert, ist also alleinig Asparagin an der Stelle 65.

3.2.3 Auswertung zu Versuchen mit HNA-1b-Antikörpern

Die Ergebnisse für die Versuchsreihe mit HNA-1b-Antikörpern sind aus der Tabelle 3.3 für die Versuche mit LNK16 zu entnehmen und aus der Tabelle 3.4 für die Versuche mit 3G8. Dabei haben alle elf Seren positiv mit den Zellen reagiert, die dem HNA-1b-Wildtyp SSNI entsprechen.

Insgesamt lässt sich folgende Positiv-Negativ-Tabelle aus den Ergebnissen ableiten (Tabelle 3.10)

Tabelle 3.9 Positiv-negativ-Tabelle der HNA-1b-Antikörper

HNA-1b-Antikörper, Serum-Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	1	2	3	5	8	12	13	14	15	16	17	insgesamt
Aminosäure- Mutante Kombination	MOAB	LNK16	LNK16	LNK16	LNK16	LNK16	LNK16	LNK16	LNK16	LNK16	LNK16	LNK16	3G8	3G8	3G8	3G8	3G8	3G8	3G8	3G8	3G8	3G8	3G8	
1 RNDV		neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0/22
2 RNDI		neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	1/22
3 RNNV		pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg	16/22
4 RSDV		neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	1/22
5 SNDV		pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	20/22
6 RNNI		pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	pos	pos	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	10/22
7 RSNV		pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos	pos	14/22
8 SNDI		pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	21/22
9 SSDV		pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	20/22
10 SNNV		pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	21/22
11 RSDI		neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0/22
12 SSNV		pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	22/22
13 SSDI		pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	20/22
14 SNNI		pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	21/22
15 RSNi		pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	11/22
16 SSNI		pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	22/22

3.2.4 Fazit für die Antigenität von HNA-1b

Auf Basis der Versuche mit den Anti-HNA-1b-Patientenseren konnte gezeigt werden, dass neben der Rezeptorvariante mit den Wildtyp-Aminosäuren SSNI auch Rezeptoren mit den Aminosäurevarianten RNNV, SNDV, RNNI, RSNV, SNDI, SSDV, SNNV, SSNV, SSDI, SNNI und RSNi positive Reaktionen auslösten. Die Rezeptoren dieser Zellvarianten reagieren demnach wie die FcγIIIb-Rezeptoren von Menschen mit HNA-1b.

Bei den Zellvarianten mit den Rezeptoren RNNV, RNNI, RSNV und RSNi gab es jeweils mehrere Anti-HNA-1b-Patientenseren, die keine Reaktion zeigten. Diese negativen Reaktionsergebnisse traten etwas vermehrt mit dem monoklonalen Antikörper 3G8 auf. Insgesamt negativ reagierten nur die Seren mit den Kombinationen RNDV (Wildtyp HNA-1a), RNDI, RSDV und RSDI.

Um die Aminosäurestelle zu finden, welche das HNA-1b-Epitop bildet, werden wieder die einzelnen mutierten Stellen betrachtet.

An der Stelle 36 reagieren alle Varianten mit Serin (S) positiv, also die Varianten 5, 9, 10, 12, 13, 14 und 16. Allerdings reagieren mit dem monoklonalen Antikörper LNK16 die Varianten RNNV, RNNI, RSNV und RSNi mit Arginin (R) an der Stelle 36 ebenfalls positiv (3, 6, 7 und 15), während nur die Varianten 1, 2, 4 und 11 mit Arginin negativ reagieren. Alle Varianten mit Serin an Stelle 36 reagieren positiv. Dies zeigt, dass Serin an der Stelle 36 epitopbildend ist. Dass hingegen einige Varianten ohne Serin nicht negativ sind, deutet an, dass Serin nicht allein für das HNA-1b-Epitop verantwortlich ist. Für die Aminosäurestelle 65 gibt es sowohl Varianten mit Serin (S), die positiv reagieren (7, 9, 12, 13, 15 und 16) als auch andere mit Serin, die negativ reagieren (4 und 11). Auch gibt es Varianten mit Asparagin (N), die positiv reagieren (3, 5, 6, 8, 10 und 14) und welche, die negativ reagieren (1 und 2). Folglich ist die Aminosäurestelle 65 nicht für das HNA-1b-Epitop entscheidend.

Für die Aminosäurestelle 82 finden sich Varianten mit Asparaginsäure (D), welche positiv reagieren (5, 8, 9 und 13), als auch Varianten, die negativ reagieren (1, 2, 4 und 11). Wenn sich an der Aminosäurestelle 82 allerdings Asparagin (N) wie im Wildtyp HNA-1b befindet, reagieren alle Varianten positiv (3, 6, 7, 10, 12, 14, 15 und 16). Dass die Anwesenheit von Asparagin nur zu positiven Ergebnissen führt impliziert, dass Asparagin an der CD16-Aminosäurestelle 82 das HNA-1b-Epitop bildet. Die Abwesenheit hingegen führt nicht zu ausschließlich negativen Ergebnissen, was erneut darauf hindeutet, dass HNA-1b mehr als nur ein Epitop hat.

Als letzte Betrachtung an der Stelle 106 gibt es für Isoleucin (I) Varianten, die positiv reagieren (6, 8, 13, 14, 15 und 16), als auch welche, die negativ reagieren (2 und 11). Die Anwesenheit von Valin bringt ebenso positive (3, 5, 7, 9, 10 und 12) wie negative (1 und 4) Ergebnisse hervor. Dementsprechend bildet die Stelle 106 wiederum nicht das HNA-1b-Epitop.

In Anbetracht der Positiv- und Negativergebnisse bleibt die Annahme, dass HNA-1b zwei für die Merkmalsausprägung relevante Zentren hat. Diese sind Serin an der Stelle 36 und Asparagin an der Stelle 82. Beide sind im Wildtyp der HNA-1b-Variante des Fc γ IIIb-Rezeptors enthalten. Wird nur eine dieser beiden Stellen verändert, reagiert der Rezeptor weiterhin im Test positiv als HNA-1b-Variante.

Einige Aminosäurekombinationen des Rezeptors mit Arginin an Stelle 36 bzw. Asparaginsäure an der Stelle 82 führen zum Teil zu negativen Ergebnissen, wobei dieser Effekt bei den untersuchten Seren bei dem Epitop alleinig 82 Asparagin stärker ausgeprägt ist. Bei den Varianten mit R*N* reagierten lediglich 58% der Seren, während bei dem 36 Serin-Epitop (S*D*) 92% der Seren reagierten. Beides zeigt eine statistische Signifikanz, bei S*D* mit einem p-Wert von 0,0170 und bei R*N* mit einem p-Wert von 0,0008. Demnach hätten die beiden HNA-1b-Epitope jeweils alleinig eine schwächere Affinität zu HNA-1b-Antikörpern als die Kombination aus beiden Epitopen. Eine statistische Auswertung dazu ist in Abbildung 3.11 zu sehen.

Tabelle 3.10 Statistische Auswertung zu den Bindungsstellen von HNA-1b

Mutante	S*D*				R*N*				S*N*			
	5	8	9	13	3	6	7	15	10	12	14	16
Aminosäuren	SNDV	SNDI	SSDV	SSDI	RNNV	RNNI	RSNV	RSNI	SNNV	SSNV	SNNI	SSNI
Positive Reaktionen	20	21	20	20	16	10	14	11	21	22	21	22
Insgesamt	81/88 (92,0%)				51/88 (58,0%)				86/88 (97,7%)			
p-Wert (im Verhältnis zu S*N*)	0,0170				0,0008							

Die p-Wert-Berechnung erfolgte mittels ANOVA-Einfaktor Varianzanalyse mit dem Microsoft Excel-Analysetool (Microsoft Office Professional Plus 2016, Excel Version 1912, Microsoft, Redmond, WA, USA).

Der p-Wert beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass das Ergebnis nur zufällig zustande kam. Ab einem p-Wert $<0,05$ widerlegt man allgemein die Nullhypothese, dass die Abweichung lediglich zufällig entstanden sei. Ein p-Wert von 0,0008 impliziert somit eine schwächere Affinität von Asparagin an der Stelle 82. Ebenso zeigt der p-Wert von 0,017 bei nur Serin an der Stelle 36 eine statistisch signifikante Varianz.

Um auszuschließen, dass es sich bei der signifikant geringeren Affinität der einzelnen Bindungsstellen um eine Abweichung aufgrund der verwendeten monoklonalen Antikörper handelt, wurde im Folgenden noch einmal die Subgruppe der Patientenseren betrachtet, die mit beiden monoklonalen Antikörpern LNK16 und 3G8 getestet wurden, also die Seren Nr. 1, 2, 3, 5 und 8 (Tabelle 3.11). Des Weiteren wurden die Subgruppen der elf Seren betrachtet, die nur mit LNK16 getestet wurden (Tabelle 3.12) und die elf Seren, welche nur mit 3G8 getestet wurden (Tabelle 3.13).

Die Auswertungen zeigen bei allen Subgruppen mit dem alleinigen Epitop Asparagin an der Stelle 82 einen p-Wert von $<0,05$, also besteht eine statistisch signifikante schwächere Affinität dieser Rezeptoren, während die statistische Abweichung des Epitops Serin an der Stelle 36 nur mit dem monoklonalen Antikörper LNK16 besteht (p-Wert 0,017), während bei den anderen Subgruppen kein Unterschied zwischen alleinig Serin an der Stelle 36 (S*D*) oder beiden Epitopen (S*N*) besteht.

Tabelle 3.11 Statistische Auswertung zu doppelt getesteten Seren

	S*D*				R*N*				S*N*			
Mutante	5	8	9	13	3	6	7	15	10	12	14	16
Aminosäuren	SNDV	SNDI	SSDV	SSDI	RNNV	RNNI	RSNV	RSNI	SNNV	SSNV	SNNI	SSNI
Positive Reaktionen	10	10	10	10	8	5	7	7	10	10	10	10
Insgesamt	40/40 (100%)				27/40 (67,5%)				40/40 (100%)			
p-Wert (im Verhältnis zu S*N*)	- ^{*1}				0,0021							

^{*1}: Eine Wahrscheinlichkeitsberechnung, ob die Unterschiede in den Gruppen S*D* und S*N* zufällig entstanden sind, ist nicht möglich, da keine Unterschiede in diesen Gruppen bestehen.

Die p-Wert-Berechnung erfolgte mittels ANOVA-Einfaktor Varianzanalyse mit dem Microsoft Excel-Analysetool (Microsoft Office Professional Plus 2016, Excel Version 1912, Microsoft, Redmond, WA, USA).

Tabelle 3.13 Statistische Auswertung zu Seren, die mit 3G8 getestet wurden

Mutante	S*D*				R*N*				S*N*			
	5	8	9	13	3	6	7	15	10	12	14	16
Aminosäuren	SNDV	SNDI	SSDV	SSDI	RNNV	RNNI	RSNV	RSNI	SNNV	SSNV	SNNI	SSNI
Positive Reaktionen	11	11	11	11	6	2	5	3	11	11	11	11
Insgesamt	44/44 (100%)				16/44 (36,4%)				44/44 (100%)			
p-Wert (im Verhältnis zu S*N*)	- [*] 1				0,0003							

^{*}1: Eine Wahrscheinlichkeitsberechnung, ob die Unterschiede in den Gruppen S*D* und S*N* zufällig entstanden sind, ist nicht möglich, da keine Unterschiede in diesen Gruppen bestehen.

Die p-Wert-Berechnung erfolgte mittels ANOVA-Einfaktor Varianzanalyse mit dem Microsoft Excel-Analysetool (Microsoft Office Professional Plus 2016, Excel Version 1912, Microsoft, Redmond, WA, USA).

Tabelle 3.12 Statistische Auswertung zu Seren, die mit LNK16 getestet wurden

Mutante	S*D*				R*N*				S*N*			
	5	8	9	13	3	6	7	15	10	12	14	16
Aminosäuren	SNDV	SNDI	SSDV	SSDI	RNNV	RNNI	RSNV	RSNI	SNNV	SSNV	SNNI	SSNI
Positive Reaktionen	9	10	9	9	10	8	9	8	10	11	10	11
Insgesamt	37/44 (84,1%)				35/44 (79,5%)				42/44 (95,5%)			
p-Wert (im Verhältnis zu S*N*)	0,0170				0,020							

Die p-Wert-Berechnung erfolgte mittels ANOVA-Einfaktor Varianzanalyse mit dem Microsoft Excel-Analysetool (Microsoft Office Professional Plus 2016, Excel Version 1912, Microsoft, Redmond, WA, USA)

Somit kann eine schwächere Affinität des alleinigen Epitops Serin an der Stelle 36 nicht angenommen werden, da diese durch den verwendeten monoklonalen Rezeptor bedingt sein könnte. Die schwächere Affinität des zweiten Epitops zu Patientenseren mit Asparagin an der Stelle 82 kann hingegen angenommen werden, da hier der p-Wert in allen Auswertungen unter 0,05 liegt.

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungsergebnisse, dass Serin an der Stelle 36 und Asparagin an der Stelle 82 voneinander unabhängige Epitope für HNA-1b bilden, während Asparagin an der Stelle 65 das Epitop für HNA-1a bildet. Die Aminosäurestelle 106 des Fc γ IIIb-Rezeptors ist für die HNA-1a- und HNA-1b-Epitope nicht relevant.

In der Kasuistik der Antigene des Fc γ IIIb-Rezeptors ist die gefundene Antigenlokalisation eine Besonderheit. So gibt es zwei voneinander unabhängige Mutationsstellen, die die HNA-1b-Epitope bilden. Entfernt man eines der beiden Epitope, bleibt die HNA-1b-Merkmalsausprägung erhalten. Da HNA-1a und HNA-1b ihre Epitope an unterschiedlichen Stellen des Fc γ IIIb-Rezeptors bilden, sind auch Mutationen denkbar, die einerseits beide Epitope ausbilden, sowie Mutationen, die gar kein Epitop tragen. Dieser Punkt wird im Diskussionsabschnitt 4.2 näher beleuchtet.

4 Diskussion

4.1 Klinische Bedeutung

4.1.1 Single-Nucleotid-Exchange bei HNA-1a und HNA-1b

Klinisch bedeutsam sind die Ergebnisse insbesondere im Rahmen der Diagnostik von neonatalen Alloimmun-Neutrozytopenien. Wenn im Plasma einer Mutter Antikörper gegen ein HNA-Merkmal des Vaters nachgewiesen wurden, wird zur Bestätigung die HNA-1-Inkompatibilität des Neugeborenen gegenüber der Mutter durch einen einzelnen Basenaustausch gezeigt. Da die Merkmalsausprägung von HNA-1a zu HNA-1b und umgekehrt allerdings nicht antithetisch durch einen Single-Nucleotid-Exchange ineinander wandelbar sind, kann es hier zu fehlerhaften Einschätzungen kommen.

Dementsprechend muss für ein HNA-1a-Antigen die Anwesenheit von A227 bewiesen werden, da alle Varianten des Fc γ IIIb-Rezeptors mit dem Codon AAC, also mit Asparagin an Position 65 (*N**) mit anti-HNA-1a-Antikörpern reagieren. Eine Abwesenheit von A227 (also im Allgemeinen das Codon AGC mit G227 und somit Serin an Position 65 *S**) in der neonatalen DNS führt nicht automatisch zur Ausprägung von HNA-1b-Antigenen.

Für die Merkmalsausprägung des HNA-1b-Antigens muss für beide Epitope die relevante Aminosäure, Serin an Position 36 (S***), welches durch Cytosin an der Rezeptor-DNS-Stelle 141 bedingt wird (Codon AGC), und Asparagin an Position 82 (**N* durch A277 im Codon AAC), unabhängig voneinander überprüft werden.

Es gibt keine Hinweise darauf, dass die letzte heterogene Rezeptoraminosäure 106 mit Valin oder Isoleucin einen Einfluss auf das HNA-1-Antigen hätte. Eine Überprüfung der 349. Nukleotidstelle auf Adenosin oder Guanin ist für die Phänotypisierung der HNA-1-Antigene also irrelevant.

Allerdings sind die am weitesten verbreiteten Rezeptorvarianten bei genotypisierten kaukasischen Europäern die Aminosäurekombination RNDV für HNA-1a und SSNI für HNA-1b. Von einer allgemeinen Fehlerhaftigkeit beim Nachweis nur eines Nukleotidaustauschs ist dementsprechend nicht auszugehen. Dennoch gibt es Genotypisierungsergebnisse der letzten zwei Jahrzehnte, deren phänotypische Erscheinung bisher nicht hinreichend erklärt werden konnte.

4.1.2 Phänotypisierung bekannter Varianten

Bereits im Jahr 2000 hatten Matsuo et al. neben den „Wildtypen“ für HNA-1a eine zusätzliche Variante und für HNA-1b vier zusätzliche Varianten sequenziert (Matsuo, et al., 2000). Fortgeführt wurde die Liste durch mehrere Publikationen Anfang der 2000er Jahre, in denen einerseits weitere Varianten gefunden wurden und andererseits bekannte Varianten bestätigt wurden (Flesch, et al., 2002) (Tong, et al., 2003) (Covas, et al., 2005) (Xu, et al., 2007) (Terzian, et al., 2012). Unter anderem fanden Blum et al. bei nur 19 Spendern fünf Varianten von HNA-1a, eine Variante von HNA-1b und sogar eine Variante, die genotypisch ungenau einzuordnen war, bei der phänotypisch nach derzeitigen Ergebnissen sogar alle bekannten HNA-1a-, -1b- und -1c-Epitope zu erwarten sind (Blum, et al., 2009). Eine Zusammenstellung der bekannten Varianten ist in Tabelle 4.1 dargestellt.

Dank der genauen Lokalisierung der Epitope lässt sich für die bekannten Mutationen anhand der Sequenzierung der Phänotyp bestimmen. Als Beispiel sei die Variante HNA-1b G227A (HNA-1b*02 nach Matsuo et al.) aufgeführt, die genotypisch HNA-1b zugeordnet wurde. Tatsächlich bildet allerdings genau die Punktmutation Guanin zu Adenosin an der Basenstelle 227 die Aminosäure Asparagin an der Aminosäurestelle 65 aus, welche das Epitop für HNA-1a bildet. Da die HNA-1b-Epitope gleichzeitig erhalten blieben, trägt der Spender phänotypisch sowohl das HNA-1a-, als auch das HNA-1b-Epitop. So gibt es für viele gefundenen Varianten, insbesondere bei HNA-1a-Allelen, Diskrepanzen zwischen den Genotypen und ihrer phänotypischen Erscheinung.

Bei genauerer Analyse der Tabelle 4.1 lässt sich ebenso ablesen, dass jede theoretisch mögliche Aminosäure-Variante der epitopbildenden Aminosäuren 36, 65 und 82 auch tatsächlich bei Spendern sequenziert wurde. Dem ist hinzuzufügen, dass die einmalig beschriebene Variante HNA-1b G227T (Matsuo, et al., 2000) nur unter Vorbehalt zugeordnet werden kann, da in dieser Arbeit der Einfluss von Tyrosin an der Aminosäureposition 65 nicht untersucht wurde.

Tabelle 4.1 Einordnung der aus der Literatur bekannten Ergebnisse

Autor	HNA-Varianten	Nucleotide				Aminosäuren				Phänotypen
		141	227	277	349	36	65	82	106	HNA
	HNA-1a									
Matsuo	*01 ("Wildtyp")	G	A	G	G	R	N	D	V	1a
	G349A	G	A	G	A	R	N	D	I	1a
Flesch	G277A	G	A	A		R	N	N		1a + 1b
	G141C	C	A	G		S	N	D		1a + 1b
Tong	G141C	C	A	G		S	N	D		1a + 1b
Covas	A227G	G	G	G		R	S	D		kein Antigen
Blum	G277A	G	A	A		R	N	N		1a + 1b (+ 1c)
	G141C	C	A	G		R	N	D		1a + 1b
Terzian	A227G	G	G	G		R	S	D		kein Antigen
	HNA-1b									
Matsuo	*01 ("Wildtyp")	C	G	A	A	S	S	N		1b
	G227A	C	A	A	A	S	N	N		1a + 1b
	A277G	C	G	G	A	S	S	D		1b
	C141G	G	G	A		R	S	N		1b
	G227T	C	T	A		S	Y	N		(1b)
Tong	A277G	C	G	G		S	S	D		1b
	G227A	C	A	A		S	N	N		1a + 1b
Covas	A277G	C	G	G		S	S	D		1b
Xu	A277G	C	G	G		S	S	D		1b
	C141G	G	G	A		R	S	N		1b
Blum	C141G	G	G	A		R	S	N		1b
	A277G	C	G	G		S	S	D		1b
	C141T	C	G	A		S	S	N		1b

Tabelle nach (Matsuo, et al., 2000) (Flesch, et al., 2002) (Tong, et al., 2003) (Covas, et al., 2005) (Xu, et al., 2007) (Blum, et al., 2009) (Terzian, et al., 2012)

Auch wenn das Epitop von HNA-1c in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, wurde für die Zusammenfassung in Tabelle 4.1 davon ausgegangen, dass HNA-1c ein von HNA-1a und HNA-1b unabhängiges Epitop mit Adenosin statt Cytosin an der Stelle 266 ist. Bis zur Klärung der Frage, ob diese in vitro-Ergebnisse mit den Rezeptorvarianten auf 293F-Zellen auch bei den Neutrophilen eines Patienten mit Mutation eine Immunantwort hervorruft, sollten bei bekannten genomischen Varianten dementsprechend Plasmaspenden nur unter besonderer Vorsicht und von Spendern ohne die Gefahr einer stattgehabten Immunisierung erfolgen.

4.2 Neueinordnung bisheriger Ergebnisse

Bislang wurden Versuche zur Identifizierung der Epitope des Fc γ IIIb-Rezeptors vor allem mit monoklonalen Antikörpern durchgeführt. Eine Bestätigung der Ergebnisse mit Patientenseren stand bis zum jetzigen Zeitpunkt noch aus. Da monoklonale Antikörper nicht die gesamte Variation an Antiseren widerspiegeln, zeigen die vorliegenden Untersuchungen Fortschritte hinsichtlich der Annahmen bezüglich der Epitope. Zusammengefasst ergab die bisherige Hypothese, dass nur die Aminosäuren an den Stellen 65 und 82 epitopbildend seien (Naumann, 2011). Demnach würden ausschließlich die Kombination aus Asparagin an Position 65 und Asparaginsäure an der Position 82 (Kombination *ND*) zu HNA-1a führen sowie die Kombination aus Serin an der Position 65 und Asparagin an der Position 82 (Kombination *SN*) zu HNA-1b. Keine Reaktion in den Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern zeigten die Kombinationen mit Asparagin an beiden Positionen (*NN*), bzw. panreaktiv waren die Kombinationen mit Serin und Asparaginsäure (*SD*) (Naumann, 2011). Demzufolge würde die Anwesenheit von Serin an der Stelle 65 HNA-1b bilden und die von Asparaginsäure an der Stelle 82 HNA-1a.

Allgemein betrachtet reagieren Seren von Patienten mit den Rezeptorvarianten häufiger als monoklonale Antikörper, also stehen die jetzigen Erkenntnisse den vorherigen Erkenntnissen entgegen. So führt bereits die isolierte Anwesenheit von Asparagin an der Stelle 65 (*N**) zu HNA-1a, die Position 82 ist für HNA-1a hingegen nicht relevant. Die Anwesenheit von Serin an der Stelle 32 (S***) und die Anwesenheit von Asparagin an der Stelle 82 (**N*) führen bei Patientenseren unabhängig voneinander zur HNA-1b-Variante, während bei den Versuchen mit Monoklonalen die Aminosäureposition 36 irrelevant und die Aminosäureposition 65 epitopbildend ist. Bestätigt wurde, dass die Position 106 keinen Einfluss auf das Epitop hat.

4.3 Hypothese zur Phylogenese des Fc_γ Rezeptor IIIb

Da sich das Wissen über die Epitope von HNA-1a und HNA-1b gewandelt hat, kann auch die Hypothese über die evolutionäre Entwicklung der beiden Varianten erneut betrachtet werden. Hierzu ist es hilfreich, die Allel-Häufigkeit von HNA-1c, welches sich in einer Punktmutation an der Basensequenzstelle 266 (Bux, et al., 1997) unterscheidet, mit einzubeziehen.

In den letzten Jahren ist ein immer vollständigeres Bild von der weltweiten Verteilung der HNA-1-Allele entstanden. Dabei ist auffällig, dass Bevölkerungsgruppen, die historisch-anthropologisch den afrikanischen Kontinent früher verlassen haben, (fast) keine HNA-1c-Allele besitzen, während heutige afrikanische Bevölkerungsgruppen eher häufig HNA-1c-Allele aufweisen. Als Beispiele seien die Allel-Häufigkeiten von Chinesen (Tong, et al., 2003) und brasilianischen Ureinwohnern (Covas, et al., 2005) genannt, bei denen kein wesentlicher Anteil an HNA-1c-Allelen vorhanden ist, im Gegensatz zu Afrikanern mit bis zu 23-30% HNA-1c-Allelen (vergleiche Tabelle 1.1). In Verbindung mit der weitgehend akzeptierten Theorie über die weltweite Ausbreitung des *Homo sapiens sapiens* in mehreren Auswanderungswellen aus Afrika, ist das HNA-1c-Allel wahrscheinlich erst später entstanden. Ähnliche Verschiebungen lassen sich bezüglich HNA-1a und HNA-1b beobachten. Auch wenn gewisse Effekte durch Genshifts bei Gründerpopulationen erklärbar sind, lässt sich ein gewisser Selektionsdruck von HNA-1a zu vermehrtem HNA-1b-Vorkommen und wiederum zu vermehrtem HNA-1c-Vorkommen erkennen, je länger die jeweilige Population auf dem afrikanischen Kontinent verblieben ist. Auch wenn die klinische Bedeutung der Unterschiede zwischen HNA-1a, -1b und -1c noch nicht abschließend geklärt ist, könnten eine oder mehrere Erkrankungen, wie kürzlich beim *Plasmodium falciparum* gezeigt (Simtong, et al., 2018), durch HNA-1b oder HNA-1c günstig beeinflusst werden.

Nach der bisherigen Hypothese wurde die Epitopbildung lediglich an den Aminosäurestellen 65 Serin für HNA-1b (*S[N]*) und 82 Asparaginsäure für HNA-1a (*[N]D*) gesehen und eine nicht-reaktive Variante als Ausgangstypus mit Asparagin an den Stellen 65 und 82 als „Wildtyp“ (*NN*) vermutet, was bei einzelnen Patienten bestätigt werden konnte.

In Anbetracht der jetzigen Ergebnisse führt eine solche Variante zu einer Panreaktivität und nicht zu einer null-reaktiven Variante, was der ursprünglichen Hypothese konträr entgegensteht.

Auf der Suche nach einem nicht-reaktiven Urtyp müssten die Aminosäuren wie folgt zusammengesetzt sein: 32 Arginin (R), 65 Serin (S), 82 Asparaginsäure (D), während die Stelle 106 irrelevant wäre. Sehr auffällig an dieser hypothetischen Rezeptorvariante ist, dass sie dem Fc γ IIIa-Rezeptor bis zu diesen Aminosäurepositionen genau entspricht (vergleiche hierzu Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2 Nukleotidabweichungen mit resultierender Aminosäureheterogenität von Fc γ Rezeptor IIIa und Fc γ Rezeptor IIIb

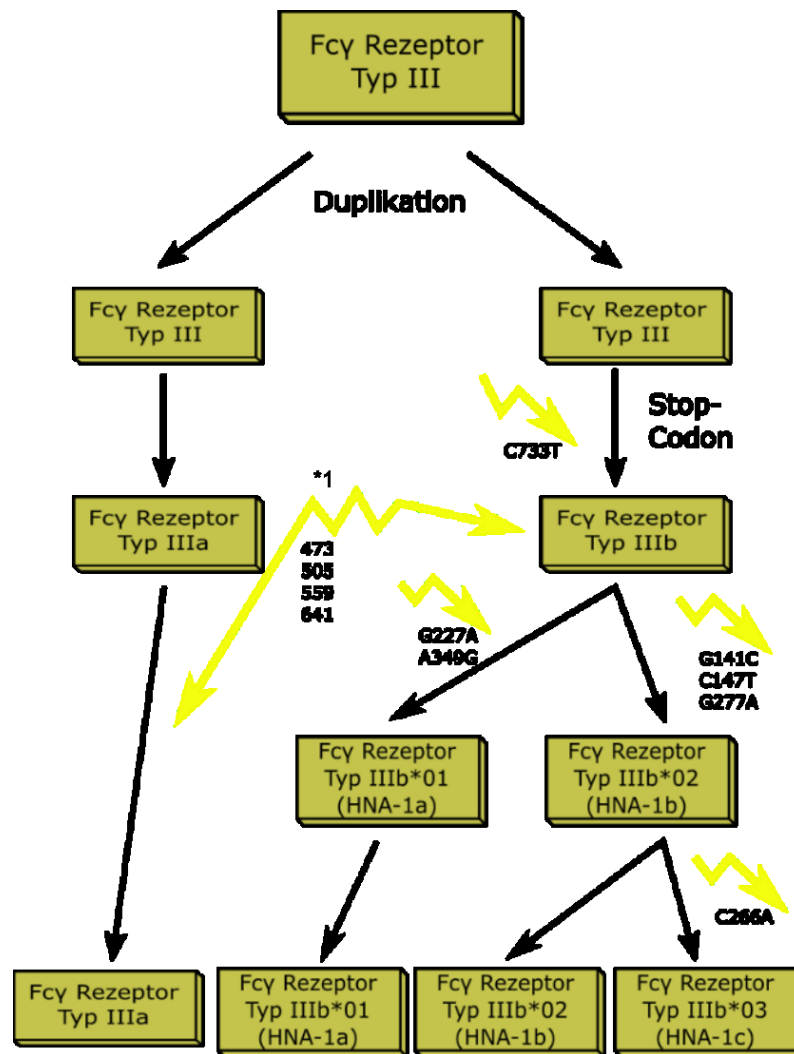
Fc γ RIII	Nucleotide									
	141	147	227	277	349	473	505	559	641	733
HNA-1a (Fc γ RIIIa)	G	C	A	G	G	A	C	G	C	T
HNA-1b (Fc γ RIIIa)	C	T	G	A	A	A	C	G	C	T
Fc γ RIIIa	G	C	G	G	A	G	T	T	T	C
Fc γ RIII	Aminosäuren									
	36	38	65	82	106	147	158	176	203	234
HNA-1a (Fc γ RIIIa)	R	L	N	D	V	D	H	V	S	Stop
HNA-1b (Fc γ RIIIa)	S	L	S	N	I	D	H	V	S	Stop
Fc γ RIIIa	R	L	S	D	I	G	Y	F	F	R

Tabelle nach (Matsuo, et al., 2000)

Man kann ursprünglich die Hypothese dahingehend aktualisieren, dass der Fc γ IIIa-Rezeptor und der Fc γ IIIb-Rezeptor derselben Gensequenz entspringen, aus der erst eine nicht-reaktive Fc γ IIIb-Rezeptor-Variante hervorgegangen ist, aus der sich anschließend HNA-1a und HNA-1b, sowie später HNA-1c gebildet haben (Abbildung 4.1).

Um diese Frage besser beantworten zu können, sind weitergehende Erkenntnisse hinsichtlich der Funktionsunterschiede zwischen den Fc γ IIIb-Rezeptor-Varianten erforderlich.

Abbildung 4.1 Hypothese zur Entstehung der Fcγ-Rezeptorvarianten



*1: An diesen Stellen sind zwischenzeitliche Mutation einer Vor-Form des Fcγ-RIIIa als auch des Fcγ-RIIIb aus einem möglichen gemeinsamen Ur-Fcγ-RIII denkbar. Eine genaue Zuordnung, ob zum Beispiel die Mutation A473G zu Fcγ-RIIIa führte oder die Mutation G473A zu Fcγ-RIIIb, ist an dieser Stelle nicht möglich.

4.4 Limitation und weiterführende Forschung

Aufgrund dieser Arbeit konnten mithilfe von Patientenseren und modifizierten 293F-Zellen weitreichende Antworten bezüglich der Epitope von HNA-1a und HNA-1b gefunden werden. Letztendlich wurden für die Versuche jedoch optimierte Zellreihen verwendet, während die Expression des Rezeptors auf Neutrophilen variieren kann und sogar innerhalb eines Individuums mehrere Genvarianten des $\text{Fc}\gamma\text{RIIIb}$ gefunden wurden. Eine allgemeingültige Übertragbarkeit auf den klinischen Alltag ist also nur bedingt möglich. Zudem gab es Anti-HNA-Seren, die nicht immer auf ihr dazugehöriges Epitop reagierten. Eine Einordnung dieser Abweichungen und welche anderen Einflussfaktoren auf die Entstehung von anti-HNA-1-Antikörpern bestehen, könnte Gegenstand weiterführender Forschung sein.

Des Weiteren wurden nur Seren von Patienten verwendet, die doppelt mittels eines MAIGA auf ihre Antikörper bestätigt wurden. Eine genaue Genotypisierung der Mütter und ihrer Neugeborenen konnte jedoch nicht realisiert werden.

Weiterführende Untersuchungen könnten ebenfalls klären, warum es statistisch signifikante Abweichungen in der Antikörperausbildung gegen das einzelne HNA-1b-Epitop Asparagin an der Stelle 82 (**N*) gibt, da manche HNA-1b-Antiseren offenbar keine Antikörper gegen dieses Epitop enthalten.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung (Deutsch)

Hintergrund: Der neutrophilen-spezifische Fc γ Rezeptor IIIb (CD16b) ist ein niedrig-affiner IgG-Rezeptor. Die Polymorphismen des Rezeptors bedingen die Humanen Neutrophilen Antigene der Kategorie 1 (HNA-1). HNA-1a und HNA-1b unterscheiden sich in vier Aminosäuren. Eine Immunisierung kann zur Bildung von Alloantikörpern führen. Jedoch ist die genaue Zusammensetzung der HNA-1a- bzw. HNA-1b-Epitope bei gleich vier Aminosäureaustauschen derzeit unbekannt.

Material und Methoden: Für die Untersuchung wurden vorbestehende HEK293-Zellen verwendet, die jeweils eine der permutativ möglichen Varianten des CD16b exprimieren. Diese 16 Varianten wurden mit insgesamt 29 verschiedenen Patientenseren mittels eines modifizierten MAIGA-Protokolls getestet. Die Antikörper der Patientenseren wurden jeweils in zwei Referenzlaboren mit einem standardisierten MAIGA bestätigt.

Ergebnisse: Die Reaktionen zeigten, dass anti-HNA-1a-Antikörper an den Fc γ Rezeptor IIIb binden, wenn an der Position 65 Asparagin präsent ist und zwar unabhängig von den weiteren drei polymorphen Aminosäuren (CD16b *N**). Anti-HNA-1b-Antikörper hingegen binden an den Rezeptor, wenn Serin an der Position 36 vorhanden ist (CD16b S***), Asparagin an der Position 82 (CD16b **N*) oder beide Aminosäuren existieren (CD16b S*N*). Somit exprimieren CD16b-Varianten mit 65 Arginin und 36 Serin und/oder 82 Arginin (wie zum Beispiel die Variante CD16b SNN*) beide Epitope und binden sowohl anti-HNA-1a-, als auch anti-HNA-1b-Antikörper. Wenn diese spezifischen Aminosäuren abwesend sind (wie bei CD16b RSD*), können keine Alloantikörper binden.

Diskussion: Die Primärstruktur von HNA-1a und HNA-1b unterscheidet sich in vier Aminosäuren, jedoch sind die Epitope nicht „antithetisch“ zueinander. Die Position 65 Asparagin allein definiert das Vorhandensein des HNA-1a-Epitops und 36 Serin und/oder 82 Asparagin repräsentiert das HNA-1b-Epitop. Die Position 106 ist an keinem der Antigene beteiligt. Diese Ergebnisse haben eine maßgebliche Relevanz, um aus dem HNA-1 Genotyp den Phänotyp herzuleiten.

5.2 Abstract (English)

Background: Neutrophil specific Fc γ receptor IIIb (CD16b) is a low-affinity IgG receptor. Its polymorphic variants are associated with human neutrophil antigens (HNA). HNA-1a and HNA-1b differ in four amino acids. Immunization can lead to the production of alloantibodies. The exact contribution of four amino acid exchanges for the formation of HNA-1a, -1b epitopes is currently unknown.

Study design and methods: Existing permutation of each polymorphic amino acid from wild-type CD16b cDNA constructs expressed on HEK293 cells were used. All 16 receptor variants were tested against 29 well-characterized HNA antisera in an antigen capture assay.

Results: Analyzing the reaction pattern revealed that anti-HNA-1a antibodies can bind whenever asparagine (N) is present in position 65, regardless of the three other positions (CD16b *N**). Anti-HNA-1b antibodies can bind when serine (S) is present in position 36 (CD16b S***), when N is present in position 82 (CD16b **N*), or both (CD16b S*N*). CD16b variants with N65 and S36 and/or N82 (such as CD16b SNN*) bind both, anti-HNA-1a and anti-HNA-1b alloantibodies. If these specific amino acids are missing (as in CD16b RSD*), no antibodies will bind.

Conclusion: Whereas the primary structure of HNA-1a and HNA-1b usually differs in four amino acids, epitope composition is not “antithetical”. N65 alone determines the presence of HNA-1a, and S36 and/or N82 determine the presence of HNA-1b. Amino acid 106 does not participate in epitope formation. Our findings are of specific relevance when an HNA-1 phenotype is predicted from a genotype.

6 Tabellen-, Abbildungs- und Diagrammverzeichnis

Tabelle 1.1 Häufigkeiten der Antigene bei verschiedenen Bevölkerungsgruppen in %..3	
Tabelle 1.2 Polymorphismen der Aminosäuresequenzen des FcγRIIIb	5
Tabelle 2.1 Mutanten des Fcγ Rezeptor IIIb	10
Tabelle 3.1 OD-Werte der Tests der erzeugten Mutanten mit 8 verschiedenen Anti-HNA-1a-Patientenseren und dem Monoklonalen Antikörper LNK16	17
Tabelle 3.2 OD-Werte der Tests der erzeugten Mutanten mit 8 verschiedenen Anti-HNA-1a-Patientenseren und dem Monoklonalen Antikörper 3G8.....	18
Tabelle 3.3 OD-Werte der Tests der erzeugten Mutanten mit 11 verschiedenen Anti-HNA-1b-Patientenseren und dem Monoklonalen Antikörper LNK16	19
Tabelle 3.4 OD-Werte der Tests der erzeugten Mutanten mit 11 verschiedenen Anti-HNA-1b-Patientenseren und dem Monoklonalen Antikörper 3G8	20
Tabelle 3.5 Übersicht über die mit den Monoklonalen 3G8 und LNK16 getesteten Anti-HNA-1b-Patientenseren.....	21
Tabelle 3.6 Mit den Monoklonalen 3G8 und LNK16 dreifach getestetes HNA-1a-Serum Nr. 8	22
Tabelle 3.7 Mit den Monoklonalen 3G8 und LNK16 dreifach getestetes HNA-1b-Serum Nr. 5	23
Tabelle 3.8 Positiv-negativ-Tabelle der HNA-1a-Antikörper	25
Tabelle 3.9 Positiv-negativ-Tabelle der HNA-1b-Antikörper	28
Tabelle 3.10 Statistische Auswertung zu den Bindungsstellen von HNA-1b	30
Tabelle 3.11 Statistische Auswertung zu doppelt getesteten Seren.....	31
Tabelle 3.12 Statistische Auswertung zu Seren, die mit 3G8 getestet wurden	32
Tabelle 3.13 Statistische Auswertung zu Seren, die mit LNK16 getestet wurden	32
Tabelle 4.1 Einordnung der aus der Literatur bekannten Ergebnisse	36
Tabelle 4.2 Nukleotidabweichungen mit resultierender Aminosäure-heterogenität von Fcγ Rezeptor IIIa und Fcγ Rezeptor IIIb	39
Abbildung 1.1 Aufbau des Fcγ Rezeptor IIIb.....	6
Abbildung 4.1 Hypothese zur Entstehung der Fcγ-Rezeptorvarianten	40

7 Literaturverzeichnis

Anania, J. C., Chenoweth, A. M., Wines, B. D. & Hogarth, P. M., 2019. The Human FcγRII (CD32) Family of Leukocyte FcR in Health and Disease. *Frontiers in Immunology*.

Anderson, C. L. & Looney, R. J., 1986. Human leukocyte IgG Fc Receptors. *Immunology Today*; Volume 7, pp. 264-266.

Berman, H. et al., 2001. *Protein Data Bank*. [Online] Available at: <http://www.rcsb.org/pdb/> [Zugriff am 22 Januar 2020].

Blum, K. S. et al., 2009. Evidence for gene recombination in FCGR3 gene variants. *Vox Sanguinis*, Volume 97, pp. 69-76.

Bøyum, A., 1976. Isolation of Lymphocytes, Granulocytes and Macrophages. *Scand. J. Immunol.*, Volume 5, pp. 9-15.

Bruin, M. et al., 2005. Primary autoimmune neutropenia in children: a study of neutrophil antibodies and clinical course. *Vox Sanguinis*, Volume 88, pp. 52-59.

Bux, J., Sohn, M., Hachmann, R. & Mueller-Eckhardt, C., 1992. Quantitation of granulocyte antibodies in sera and determination of their binding sites. *British Journal Of Haematology*, Volume 82, pp. 20-25.

Bux, J., Kober, B., Kiefel, V. & Mueller-Eckhardt, C., 1993. Analysis of granulocyte-reactive antibodies using an immunoassay based upon monoclonal-antibody-specific immobilization of granulocyte antigens. *Transfusion Medicine*, Volume 3, pp. 157-162.

Bux, J., Stein, E.-L., Santoso, S. & Mueller-Eckhardt, C., 1995. NA gene frequencies in the German population determined by polymerase chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP). *Transfusion*, Volume 35, pp. 54-57.

Bux, J. et al., 1997. Characterization of a New Alloantigen (SH) on the Human. *Blood*, Volume 89, pp. 1027-1034.

Bux, J., Behrens, G., Jäger, G. & Wel, K., 1998. Diagnosis and Clinical Course of Autoimmune Neutropenia in Infancy: Analysis of 240 Cases. *Blood*, Volume 91, pp. 181-186.

Bux, J., 2008. Human neutrophil alloantigens. *Vox Sanguinis*, Volume 92, 16 Januar, pp. 277-285.

Covas, D. T. et al., 2005. Variation in the FcγR3B gene among distinct Brazilian populations. *Tissue Antigens*, Volume 65, pp. 178-182.

Ernst, L. K., Winkel, J. G. J. v. d., Chiu, I.-M. & Anderson, C. L., 1992. Three Genes for the Human High Affinity Fc Receptor for IgG (FcγRI) Encode Four Distinct Transcription Products. *The Journal of Biological Chemistry*; Volume 267, pp. 15692-15700.

Flesch, B. K. et al., 2002. FCGR3 variants and expression of human neutrophil antigen-1a, -1b, and -1c in the populations of northern Germany and Uganda. *Transfusion*, Volume 42, pp. 469-475.

Hessner, M. J., Curtis, B. R., Endean, D. J. & Aster, R. H., 1996. Determination of neutrophil antigen gene frequencies in five ethnic groups by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Transfusion*, Volume 36, pp. 895-899.

Hessner, M. J. et al., 1999. Neutrophil Antigen (FcγRIIIB) SH Gene Frequencies in Six Racial Groups. *Blood*; Volume 93, pp. 1115-1116.

ISBT Working Party on Platelet and Granulocyte Serology, G. A. W. P., 1999. Nomenclature of Granulocyte Alloantigens. *Vox Sanguinis*; Volume 77, p. 251.

Kelton, J. G. & Bebenek, G., 1985. Granulocytes do not have surface ABO antigens. *Transfusion*, Volume 25, pp. 567-569.

Kimberly, R. P., Ahlstrom, J. W., Click, M. E. & Edberg, J. C., 1990. The glycosyl phosphatidylinositol-linked Fc gamma RIIPMN mediates transmembrane signaling events distinct from Fc gamma RII. *Journal of Experimental Medicine*, pp. 1239-1255.

Kissel, K. et al., 2000. HNA-1a, HNA-1b, and HNA-1c (NA1, NA2, SH) frequencies in African and American Blacks and in Chinese. *Tissue Antigens*, Volume 56, pp. 143-148.

Kurlander, R. J. & Batker, J., 1982. The Binding of Human Immunoglobulin G1 Monomer and Small, Covalently Cross-Linked Polymers of Immunoglobulin G1 to Human Peripheral Blood Monocytes and Polymorphonuclear Leukocytes. *Journal of Clinical Investigation*; Volume 69, pp. 1-8.

Lalezari, P., Nussbaum, M., Gelman, S. & Spaet, T. H., 1960. Neonatal Neutropenia Due to Maternal Isoimmunization. *Blood*, Volume 15, pp. 236-243.

Lüllmann-Rauch, R., 2009. Taschenlehrbuch Histologie, 3. Aufl., Stuttgart: Thieme.

Matsuo, K., Procter, J. & Stroncek, D., 2000. Variations in genes encoding neutrophil antigens NA1 and NA2. *Transfusion; Volume 40*, pp. 645-653.

McCullough, J., 1983. Granulocyte Antigen Systems and Antibodies and Their Clinical Significance. *Human Pathology, Volume 14*, pp. 228-234.

Naumann, C., 2011. *Antigenität des FcγIIIb-Rezeptors: Immunologische und funktionelle Charakterisierung (Dissertation Fachbereich Medizin)*. Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen.

Ory, P. A. et al., 1989. Sequences of Complementary DNAs That Encode the NA1 and NA2 Forms of Fc Receptor III on Human Neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation; Volume 84*, pp. 1688-1691.

Ory, P. A., Goldstein, I. M., Kwoh, E. E. & Clarkson, S. B., 1989. Characterization of Polymorphic Forms of Fc Receptor III on Human Neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation, Volume 83*, pp. 1676-1681.

Ravetch, J. V. & Perussia, B., 1989. Alternative Membrane Forms of FcγRIII (CD16) on Human Natural Killer Cells and Neutrophils. *Journal of Experimental Medicine, Volume 170*, pp. 481-497.

Reil, A. & Bux, J., 2007. Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz. *Deutsches Ärzteblatt; Volume 104*, pp. 1018-1023.

Reil, A. et al., 2013. HNA-1d: a new human neutrophil antigen located on Fcγ receptor IIIb associated with neonatal immune neutropenia. *Transfusion, Volume 53*, pp. 2145-2151.

Rose, A. S. et al., 2018. NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes. Bioinformatics doi:10.1093/bioinformatics/bty419. *Bioinformatics, Volume 34*, p. 3755–3758.

Simtong, P. et al., 2018. Molecular and Functional Characterization of Fcγ Receptor IIIb-Ligand Interaction: Implications for Neutrophil-Mediated Immune Mechanisms in Malaria. *Infection and Immunity, Volume 86, Issue 8*, pp. 1-11.

Terzian, C. C. et al., 2012. FCGR3B*03 allele inheritance pattern in Brazilian families and some new variants of gene FCGR3B. *Transfusion; Volume 52*, pp. 629-634.

Tong, Y. et al., 2003. FCGR3B gene frequencies and FCGR3 variants in a Chinese population from Zhejiang Province. *Annals of Hematology; Volume 82*, pp. 574-578.

Xu, G. et al., 2007. NA1/NA2 Heterozygote of Fcgr3b is a Risk Factor for Progression of IgA Nephropathy in Chinese. *Journal of Clinical Laboratory Analysis; Volume 21*, pp. 298-302.

Yomtovian, R. et al., 1984. Severe Pulmonary Hypersensitivity associated with Passive Transduction of a Neutrophil-Specific Antibody. *The Lancet*, Volume 323, pp. 244-246.

Zhang, Y. et al., 2000. Crystal structure of the extracellular domain of a human Fc gamma RIII. *Immunity*, Volume 13, pp. 387-395.

Zhang, Y. et al., 2000. Crystal Structure of the Extracellular Domain of a Human FcγRIII. *Immunity*; Volume 13 , p. 387–395.

8 Anhang

8.1 Einverständnis zur Nutzung der Abbildungen

Die enthaltenen Abbildungen wurden zur freien kommerziellen und nicht-kommerziellen Verwendung zur Verfügung gestellt.

<http://www.rcsb.org/pages/usage-policy> (Berman, et al., 2001)

9 Selbstständigkeitserklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

10 Danksagung

Widmung

Ich widme diese Arbeit meiner Frau Thea Radke
und meinen Eltern Steffi und Dirk Hetzer.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Sachs und der
medizinisch-technischen Laboratoriumsassistentin Frau Heike Berghöfer, ohne die
diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.