Verteilung der FCGR3B*1-, FCGR3B*2- und FCGR3B*3- Allele und der Zahl der FCGR3B- Gene in verschiedenen Populationen

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus- Liebig- Universität Giessen

Vorgelegt von Gittinger, Fleur Sophie
aus London

Giessen, 2004

Aus dem Medizinischen Zentrum für Klinische Chemie, Klinische Immunologie und Humangenetik,
Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin
des Universitätsklinikums Giessen

Leiter: Prof. Dr. med. G. Bein

Gutachter: Prof. Dr. J. Bux

Gutachter: Prof. Dr. U. Müller

Tag der Disputation: 05.05.2004

Verteilung der FCGR3B*1-, FCGR3B*2- und FCGR3B*3- Allele und der Zahl der FCGR3B- Gene in verschiedenen Populationen

Widmung:

Diese Arbeit ist meinem Doktorvater Prof. Dr. J. Bux gewidmet, dem ich für seine Unterstützung und Anregungen für diese Arbeit sehr zu Dank verpflichtet bin.

„Wir sind geboren, um nach der Wahrheit zu suchen; sie zu besitzen ist das Vorrecht einer höheren Macht."

Montaigne

1.	Einleitung und Problemstellung	S.5
1.1	Einleitung	S.5
1.2	Problemstellung	S.6
2.	Literaturübersicht	S.7
2.1	Granulozyten und ihre Membranproteine	S.7
2.1.1	Die Fc- Rezeptoren (FcR)	S.7
2.1.2	Die Fcγ- Rezeptoren (FcγR)	S.8
2.1.2.1	Der Fcγ- Rezeptor I (FcγRI)	S.9
2.1.2.2	Der Fcγ- Rezeptor II (FcγRII)	S.9
2.1.2.3	Der Fcγ- Rezeptor III (FcγRIII)	S.10
2.1.2.4	Der Fcγ- Rezeptor IIIa (FcγRIIIa)	S.11
2.1.3	Polymorphismen des Fcγ- Rezeptor IIIb (FcγRIIIb)	S.12
2.1.3.1	Das HNA (NA)- System	S.12
2.1.3.2	Das FCGR3B*3 (SH)- Allel	S.14
2.1.3.3	Die FcγRIIIb- Defizienz	S.15
2.2	Die Neonatale Isoimmune Neutropenie (NIN)	S.16
2.3	Die Evolution des Menschen	S.17
2.3.1	Die Entwicklung des Homo sapiens	S.17
2.3.2	Hypothesen zur Herkunft und Entwicklung des modernen Menschen	S.19
2.3.2.1	Die „Out of Africa“- Theorie der menschlichen Evolution	S.20
2.3.2.2	Die „Multiregionale“ Theorie der menschlichen Evolution	S.21
2.4	Introns und Hypothesen zu ihrer Funktion	S.21
3.	Material und Methoden	S.22
3.1	Material und Bezugsquellen	S.22
3.1.1	Geräte	S.22
3.1.2	Kits	S.23
3.1.3	Kleinmaterial	S.23
3.1.4	Reagenzien	S.24
3.1.5	Oligonucleotide und Primer	S.25
3.2	Methoden	S.25
3.2.1	Isolierung von DNA aus Vollblut	S.25
3.2.1.1	Puregene ® DNA- Isolation Kit	S.25
3.2.1.2	Extra Gene© Kit	S.26
3.2.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA	S.26
3.2.3	Fällung von DNA	S.27
3.2.4	Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)	S.27
3.2.4.1	Ansatz für eine 5x dNTP- Lösung	S.29
3.2.4.2	Reaktionsansatz für eine HNA-1a/ -1b- spezifische PCR	S.29
3.2.4.3	Reaktionsansatz für eine HNA-1c- spezifische PCR	S.29
3.2.4.4	Reaktionsansatz für den Nachweis von drei FCGR3B- Genen/ HNA-1b-spezifische PCR	S.30
3.2.4.5	Reaktionsansatz zur Amplifikation des FcγIIIb- Rezeptors	S.31

3.2.4.6	Reaktionsansatz zur Amplifikation des Intron III	S.31
3.2.4.6.1	Reaktionsansatz zur Amplifikation des Intron III ohne Hotstart	S.31
3.2.4.6.2	Reaktionsansatz zur Amplifikation des Intron III mit Hotstart	S.32
3.2.5	Auftrennung der PCR- Produkte auf einem Agarosegel	S.33
3.2.6	Aufreinigung von DNA- Fragmenten	S.34
3.2.7	Die Präparation von Granulozyten	S.34
3.2.8	Isolierung von RNA aus Granulozyten	S.35
3.2.8.1	Isolierung von RNA aus Granulozyten mit dem Roti©- Quick Kit	S.36
3.2.8.2	Isolierung von RNA aus Granulozyten mit Trizol	S.36
3.2.9	Umschreibung von RNA in cDNA	S.37
3.2.10	Die Sequenzierung	S.37
3.2.10.1	PCR- Ansatz und Programm für die Sequenzierung	S.38
3.2.10.2	Aufbereitung der Proben für die Sequenzanalyse	S.38
3.2.11	Der Light- Cycler	S.39
3.2.11.1	Beschreibung des Light- Cycler Gerätes	S.40
3.2.11.2	Bedienung der Software und Einstellungen am Computer	S.41
3.2.11.3	Herstellung einer Verdünnungsreihe	S.42
3.2.11.4	Light- Cycler PCR- Ansatz, Programm und Einstellungen am Gerät	S.42
4.	Ergebnisse	S.43
4.1	Untersuchung der Verteilung von HNA-1a, HNA-1b und HNA-1c mit Hilfe einer sequenzspezifischen PCR in den Proben der Populationsstudie	S.43
4.1.2	Sequenzspezifische PCR für HNA-1a, HNA-1b und HNA-1c	S.43
4.1.2.1	Sequenzspezifische PCR für HNA-1a und HNA-1b	S.44
4.1.2.2	Sequenzspezifische PCR für HNA-1c	S.45
4.1.3	Verteilung der FCGR3B*1-, -*2- und -*3- spezifischen Allele in den Proben der Populationsstudie	S.46
4.2	Frequenz von zwei oder drei FCGR3B- Genen in 37 HNA-1c- positiven Proben bestehend aus 33 ausgesuchten HNA-1c- positiven Proben der Populationsstudie sowie 4 als HNA-1c- positiv typisierten Patienten	S.48
4.2.1	Sequenzierung der 33 ausgesuchten HNA-1c- positiven Proben der Populationsstudie sowie den 4 als HNA-1c- positiv typisierten Patienten	S.48
4.2.2	Unterscheidung zwischen den FCGR3B*2- und FCGR3B*3- Allelen in HNA-1a/ HNA-1b/ HNA-1c- heterozygoten Proben mittels sequenzspezifischer PCR	S.49
4.2.3	Verteilung und Auswertung der Anzahl von zwei oder drei FCGR3B-Genen in den 33 ausgesuchten HNA-1c- positiven Proben der Populationsstudie sowie 4 als HNA-1c- positiv typisierten Patienten	S.50

4.2.4	Verteilung der FCGR3B*1-, -*2- und -*3- Allele in den Proben der Populationsstudie unter Berücksichtigung der Genotypenverteilung der HNA-1c- positiven Proben	S.53
4.3	Vererbungsmodus des FCGR3B*3- Allels in einer Stammbaumanalyse der Familien A, B, C und D	S.54
4.3.1	Sequenzierung der Proben	S.54
4.3.2	Differenzierung zwischen den FCGR3B*2- und FCGR3B*3- Allelen mit einer sequenzspezifischen PCR	S.54
4.3.3	Stammbaumanalyse	S.54
4.4	Quantitative Untersuchung zweier FcγRIIIb- defizienter Patientinnen und ihrer Familien mit dem Light- Cycler	S.55
4.4.1	Verwendete Primer	S.56
4.4.2	Ausgangskonzentration der DNA- Proben	S.56
4.4.3	Verdünnungsreihe	S.56
4.4.4	Analyse der FcγRIIIb- defizienten Patientinnen und ihrer Familien	S.58
4.5	Sequenzanalyse der FcγIIIb- Rezeptoren von Patientin 1, Fall 1 und Patientin 2, Fall 2 aus cDNA	S.60
4.5.1	Herstellung von cDNA	S.61
4.5.1.1	Isolierung von Granulozyten aus Frischblut	S.61
4.5.1.2	Extraktion von mRNA aus Granulozyten und Umschreibung in cDNA	S.61
4.5.2	Herstellung eines PCR- Produktes des FcγIIIb- Rezeptors aus cDNA	S.61
4.5.2.1	Amplifikation des FcγRIIIb aus cDNA	S.61
4.5.2.2	Aufreinigung des PCR- Produktes	S.62
4.5.3	Sequenzanalyse des FcγIIIb- Rezeptors von Patientin 1, Fall 1 und von Patientin 2, Fall 2	S.62
4.5.3.1	Für die Sequenzanalyse verwendete Primer	S.62
4.5.3.2	Sequenzanalyse des FcγIIIb- Rezeptors von Patientin 1, Fall 1 und von Patientin 2, Fall 2	S.63
4.5.3.3	Ergebnisse der Sequenzanalyse	S.63
4.6	Sequenzierung und Erschliessung des Intron III/ FcγRIIIb	S.64
4.6.1	Erstellung eines PCR- Produkts von Intron III	S.64
4.6.1.1	PCR- Reaktion	S.64
4.6.1.2	Aufreinigung des PCR- Produktes	S.65
4.6.2	Sequenzierung des Intron III	S.65
4.6.2.1	Für die Sequenzierung verwendete Primer	S.66
4.6.2.2	Sequenz des Intron III	S.66
5.	Diskussion	S.68
5.1	Ergebnisse der HNA-1a-, -1b-, -1c- Typisierung der Populationsstudie	S.68
5.2	Anzahl der FCGR3B- Gene in 33 ausgesuchten HNA-1c- positiven Proben der Populationsstudie sowie 4 als HNA-1c- positiv typisierten Patienten	S.74

5.3	Vererbungsmodus des FCGR3B*3- Allels	S.75
5.4	Quantitative Untersuchung zweier FcγRIIIb- defizienter Patientinnen und ihrer Familien mit dem Light- Cycler	S.76
5.5	Sequenzanalyse der FcγIIIb- Rezeptoren von Patientin 1, Fall 1 und Patientin 2, Fall 2 aus cDNA	S.78
5.6	Sequenzierung des Intron III/ FcγRIIIb	S.79
6.	Zusammenfassung	S.80
7.	Ausblick	S.82
8.	Literaturverzeichnis	S.83
9.	Anhang	S.94
10.	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	S.97
11.	Danksagungen	S.99

1. Einleitung und Problemstellung

1.1 Einleitung

Das Immunsystem des Menschen dient der Abwehr körperfremder oder pathogener Strukturen. Dringen derartige Substanzen in den Organismus ein, so werden sie als solche erkannt und in einer Vielzahl von Reaktionsketten eliminiert oder eingedämmt. Am Anfang vieler Immunreaktionen steht zunächst eine unspezifische Abwehrreaktion, erst später entwickelt sich eine gezielte Abwehr. Diese ist durch das Antikörper- Antigenprinzip gekennzeichnet, in dem ein Antikörper eine spezifische Struktur der körperfremden Substanz, das Epitop, zu erkennen und sich an diesem zu binden vermag. Strukturen, die ein Epitop aufweisen, heißen Antigene. Hat sich der Antikörper an das Epitop gebunden, so kann der Antikörper- Antigen- Komplex wiederum von zellgebundenen Rezeptoren erkannt und mittels eines Rezeptors in die Zelle internalisiert werden. Die in der unspezifischen Reaktion in die Zelle phagozytierten Antigene können dann durch zelleigene Mechanismen unschädlich gemacht werden. Aus den Bruchstücken des Antigens, die dabei in der Zelle entstehen, kann eine spezifische und wiederholbare Immunantwort in Form der Antikörper- Produktion aufgebaut werden. Diese Antikörper stehen dem Organismus bei erneutem Kontakt bereits zur Verfügung, so dass die Abwehr der Fremdproteine zu einem früheren Zeitpunkt stattfinden kann (67).
Obwohl das Immunsystem dem Körper hilft, sich vor schädlichen Einflüßen zu schützen, können sich überschießende Reaktionen des komplexen Systems gegen den eigenen Organismus richten. Dieses Phänomen ist auch als Autoimmunreaktion bekannt. Doch auch unterschiedliche Formen einer vom Körper selber produzierten Struktur können als fremd gedeutet und entsprechend bekämpft werden. So führen transplantierte Organe und Blutprodukte, die denen des Organismus nicht vollständig gleichen, zu Immunreaktionen. In der Schwangerschaft können übergetretene Strukturen des Kindes- in den mütterlichen Organismus eingetreten- ebenfalls zur Antikörperbildung der Mutter gegen kindliche Antigene führen.
Das Immunsystem ist kein starres Konstrukt, sondern ist immer im Wandel begriffen. Änderungen in dem System dienen der Anpassung des Organismus an sein äußeres Milieu und helfen ihm, sich dort zu behaupten. So kommt es vor, dass eine Grundstruktur infolge kleinster Veränderungen auf genomischer Ebene in verschiedenen Zustandsformen auftreten kann. Diese differenten Zustandsformen eines Gens werden als Allele bezeichnet. Die Entwicklung von Allelen erfolgte im Laufe der Evolution, das Beibehalten einer neuen Struktur ist meist durch eine bessere Anpassung an die Umwelt begründet.
Die auf Granulozyten lokalisierten Neutrophilen Antigene (NA) stellen ein System dar, welches eine derartige allelische Varianz aufweist. Aufgrund dieser Tatsache sind granulozytäre Antikörper für eine Vielzahl von Immunreaktionen verantwortlich zu machen, so für die Neonatale Isoimmune Neutropenie (NIN) (74), die Autoimmunneutropenie (AIN) (10; 17; 18; 20; 76) und die Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI) (23; 118; 154). Obwohl granulozyten- spezifische Antikörper als Auslöser immunologischer Erkrankungen schon seit 1960 bekannt waren (74), konnten Werner et al. erst 1986 das Neutrophilen- spezifische Antigen A (NA) auf dem FcγIIIb- Rezeptor lokalisieren (148). Nach der Entschlüsselung der Sequenz einer Copy- DNA (cDNA) des FCGR3- (FcγIII) Gens (111) wurden auch die für den NA- Polymorphismus verantwortlichen Basenaustausche identifiziert (101; 102). Neben dem HNA-1a (NA1), -1b (NA2) Polymorphismus gibt es noch eine dritte allelische Zustandsform des FcγIIIb- Rezeptors, das sogenannte „FCGR3B*3- (SH) Allel“ (26). Die Zusammensetzung der Auftretenshäufigkeit der genannten drei allelischen Varianten des FcγIIIb- Rezeptors ist

populationsabhängig. So zeigen sich erhebliche Unterschiede bezüglich der Verteilung von HNA-1a (NA1), HNA-1b (NA2) und HNA-1c (SH), wenn beispielsweise Populationen aus Afrika mit Proben von in Taiwan beheimateten Chinesen verglichen werden (69). Unterschiede der regionalen Verteilung der Allele sind in den zeitlich versetzten Wanderungsbewegungen der afrikanischen Urbevölkerung zu suchen, die nach derzeitigem Forschungsstand den Grundstein für unsere heutige Bevölkerung lieferte.
In letzter Zeit werden zunehmend mehr Mutationen oder veränderte Zustandsformen der FCGR3B*1- (NA1), -*2- (NA2), -*3- (SH) Allele des FcγIIIb- Rezeptors nachgewiesen; meist betreffen sie nur wenige Individuen (87). Sie sind jedoch ein geeigneter Anzeiger, um regionalspezifische Veränderungen von Populationen und ihren jeweiligen Anpassungen an ihre Umgebung zu dokumentieren.
Alle drei Allele des HNA- Systems, das FCGR3B*1 (NA1)-, FCGR3B*2 (NA2)- und FCGR3B*3 (SH)- Allel, werden kodominant vererbt, d.h. ein Individuum, welches ein FCGR3B*1 (NA1)- und ein FCGR3B*2 (NA2)- Allel trägt, weist die phänotypischen Merkmale beider Allele auf. Gleiches gilt auch für das FCGR3B*3 (SH)- Allel. Eine Besonderheit zeigt sich bei HNA-1a/ -1b- und HNA-1c- positiven Individuen. Sie können Träger dreier FCGR3B-(FcγRIIIB) Gene sein, die die Allele FCGR3B*1 (NA1), FCGR3B*2 (NA2) und FCGR3B*3 (SH) aufweisen (71). Anhand von Familienstudien wurde kürzlich die Hypothese aufgestellt, das FCGR3B*3(SH-) Allel werde in Kombination mit dem FCGR3B*1 (NA1)- Allel vererbt. (129).
Seit 1999 besteht eine neue Nomenklatur der Neutrophilen Antigene NA1, NA2 und SH (66), welche die vorherige Nomenklatur von Lalezari ablöst (75; 122). Dabei entsprechen nun NA1→ HNA-1a, NA2→ HNA-1b und SH→ HNA-1c. Ihre auf dem FCGR3B-(FcγRIIIB)- Gen gelegenen Allele entsprechen NA1→ FCGR3B*1, NA2→ FCGR3B*2 und SH→ FCGR3B*3. Im Folgenden wurden das System der Neutrophilen- Antigene nach der neuen Nomenklatur bezeichnet.

1.2 Problemstellung

Im Mittelpunkt der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit standen folgende Themen:

Die regionale Verteilung der drei Allele FCGR3B*1 (NA1), FCGR3B*2 (NA2) und FCGR3B*3 (SH) des HNA- Systems sollte in noch unbekannten Bevölkerungen untersucht werden. Die gewonnenen Daten sollten dann mit schon vorhandenen HNA- Typisierungen verschiedener Populationen verglichen und in einen Kontext zur Entwicklung und regionalen Verteilung der erwähnten Allele gebracht werden. Die Ergebnisse wurden im Hinblick auf die Evolutionsgeschichte des Menschen ausgewertet. Weiterhin sollten mögliche Populationsunterschiede für HNA-1c (SH)- positive Träger dreier FCGR3B (FcγIIIB)- Gene aufgedeckt werden.

- → Untersuchung von DNA- Proben als Populationsstudie aus Bangladesch, Papua- Neu Guinea, Ghana, Simbabwe, und Chinesen aus Taiwan sowie von Südafrikanern asiatischer Herkunft, farbigen Südafrikanern und Amerikanern afrikanischer Herkunft mit einer sequenzspezifischen PCR auf ihre FCGR3B*1-, -*2-, -*3- Allelzugehörigkeit.
- → Bestimmung der Anzahl von FCGR3B (FcγIIIB)- Genen in ausgesuchten HNA-1c (SH)-positiven Proben der Populationsstudie sowie vier HNA-1c- positiver Patienten mit einer Sequenzanalyse und sequenzspezifischer PCR.

Anhand von Familienstudien sollte der Vererbungsmodus des FCGR3B*3 (SH)- Allels untersucht werden, um zu klären, ob das FCGR3B*3 (SH)- Allel nur an das FCGR3B*1 (NA1)- Allel gekoppelt ist oder ob es auch als eigenständiges Allel weitervererbt werden kann.

→ Analyse des Vererbungsmodus des FCGR3B*3 (SH)- Allels anhand von Familienstammbäumen mittels Sequenzierung und sequenzspezifischer PCR.

Eine quantitative PCR unter der Verwendung der Light- Cycler Technik sollte Aufschluss darüber geben, ob die Kinder von Müttern, die ein vollständiges Fehlen des FCGR3B- Gens aufweisen, auch tatsächlich nur ein FCGR3B- Gen besitzen. Dieses setzt voraus, dass der Vater Träger von zwei FCGR3B- Genen ist.

→ Quantifizierung der Anzahl von FCGR3B (FcγRIIIB)- Genen mit dem Light- Cycler in Familien mit FcγRIIIb- defizienten Müttern.

Im Rahmen bereits vorbekannter Mutationen des FCGR3B (FcγRIIIB)- Gens, welche zu einer Neonatalen isoimmunen Neutropenie des Kindes führen können, sollte anhand zweier Patientinnen das mögliche Auftreten einer neuen Mutation überprüft werden. Bei den Kindern beider Patientinnen war es zu einer NIN gekommen, ohne, daß eine der bisher als ursächlich bekannten Mutationen gefunden wurde.

→ Sequenzanalyse des FCGR3B (FcγRIIIB)- Gens zweier Patientinnen, deren Kinder eine NIN aufwiesen.

Schließlich sollte das Intron III des FcγRIIIb- Rezeptors sequenziert werden, um bei bekannter Struktur Primer in das Intron legen zu können und so womöglich einen neuen Ansatzpunkt in der Diagnostik der HNA- Typisierung zu schaffen.

→ Sequenzanalyse des Intron III, FCGR3B (FcγRIIIB)- Gen.

2. Literaturübersicht

2.1 Granulozyten und ihre Membranproteine

2.1.1 Die Fc- Rezeptoren (FcR)

Fc- Rezeptoren sind Glykoproteine der Zelloberfläche, die das Fc- Stück von Antikörpern zu binden vermögen. Der eigentliche Antikörper setzt sich zusammen aus einem genetisch variablen Anteil, Fab, der bei der Bindung eines Antigens von entscheidender Bedeutung ist und einem genetisch wenig veränderlichem Anteil, dem Fc- Stück. Das Fc- Stück dient unter anderem der Internalisierung des Antigen- Antikörper- Komplexes in eine zur Phagozytose befähigten Zelle, wenn es an einen entsprechenden Fc- Rezeptor gebunden ist (67). Es gibt drei Hauptgruppen von Fc- Rezeptoren, die nach dem Antikörper benannt werden, zu dem sie eine spezifische Affinität haben. So bindet der Fcα- Rezeptor IgA, der Fcε- Rezeptor IgE und der Fcγ- Rezeptor IgG (138; 150).

2.1.2 Die Fcγ- Rezeptoren (FcγR)

Die Fcγ- Rezeptoren gehören, mit Ausnahme des FcγIIIb- Rezeptors, der Familie der Multichain Immune Recognition Rezeptoren (MIRR) an, zu der auch die B- und T-Zell- Rezeptoren gehören (36). Sie werden in drei Unterklassen eingeteilt (Tab. 2.1), erstens dem FcγRI (CD64), zweitens dem FcγRII (CD32) und drittens dem FcγRIII (CD16) (36; 46). Diese drei Rezeptoren binden mit einer variablen Affinität an den Fc- Anteil von monomerem oder komplexiertem IgG (149) und sind auf dem langen Arm von Chromosom 1, Bande q 23- 24, kodiert (112). Fast alle Fcγ- Rezeptoren sind hetero- oligomere Komplexe, bestehend aus einer Liganden- bindenden α- Kette, deren extrazelluläre Regionen Disulfidbrücken aufweisen und eine immunglobulinartige Domänen aufweisen. Weiterhin besitzen sie eine aus β-, γ-, und ζ- Ketten zusammengesetzte Signalkomponente (36), wobei die γ- ζ- Komponente für die Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielt (68). Außer dem FcγIIIb- Rezeptor, der lediglich durch eine Glycophosphoinositol (GPI)- Struktur an die Zellmembran verankert ist (124), kommen alle Fcγ- Rezeptoren in einer transmembranär verankerten Form vor. Die Funktion der Fcγ- Rezeptoren besteht hauptsächlich in der Beseitigung zirkulierender Immunkomplexe. Weiterhin fördern sie die Phagozytose von IgG- beschichteten Partikeln durch Makrophagen (145), die Antigen Präsentation durch immunkompetente Zellen (86) sowie die Elimination von IgG- beladener Zellen (Antibody dependant Cellular Cytotoxity /ADCC) (107; 42). In Natürlichen Killerzellen führt eine Aktivierung und Quervernetzung der Fcγ- Rezeptoren zur Mobilisierung intrazellulärer Calciumspeicher (65), in deren Folge eine vermehrte Zytokin- Produktion auftritt. Fcγ- Rezeptoren können in zwei Zustandsformen auftreten, zum einen als zellgebundener Rezeptor, zum anderen in einer gelösten Form (soluble) (34; 58).

Die Fcγ- Rezeptoren spielen in der Pathophysiologie einer Vielzahl von Krankheiten eine entscheidende Rolle (144). So ist für Patienten mit Multipler- Sklerose (MS) eine verminderte Anzahl von FcγIII- Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Granulozyten nachgewiesen worden, die vermutlich mit einer veränderten Phagozytosefähigkeit von Immunkomplexen einhergehen (32; 41). Eine verringerte Phagozytosefähigkeit der Granulozyten liegt auch bei Patienten mit paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie (PNH) vor (58). Bei dieser Erkrankung liegt ein Defekt der Phosphoinositolverankerung vor, so dass in diesem Falle der phosphoinositolgebundene FcγIIIb- Rezeptor auf den Granulozyten stark vermindert ist (19; 58). Jedoch kann auch das Vorkommen verschiedener Allelkombinationen des FcγIIIb- Rezeptors den Verlauf von Krankheiten beeinflussen, so zum Beispiel bei der MS. So zeigen Studien an MS- Patienten, die HNA-1a (NA1)- Homozygotie für den FcγRIIIb aufweisen, dass der Krankheitsverlauf weniger schwerwiegend ist als der HNA-1b (NA2)- homozygoter MS- Patienten (96).

	FcγRI (CD64)	FcγRII (CD32)	FcγRIII (CD16)
Molekulare Masse	72 kDa	40 kDa	50- 80 kDa
Affinität für IgG (Ka)	Hoch (10^8- 10^9 M^{-1})	Niedrig (<10^7 M^{-1})	IIIa: Mittel (~3x10^7 M^{-1}) IIIb: Niedrig (<10^7 M^{-1})
Rezeptor-Untereinheiten	γ- Kette	IIa: γ- Kette	IIIa: γ- Kette, ξ- Kette, β-Kette
Verteilung, grundsätzlich	CD34+ myeloische Vorstufen, Monozyten, Makrophagen,	Monozyten, Makrophagen, B- Zellen, Plättchen, basophile-,	IIIa: Makrophagen, NK Zellen, Monozyten (Subpopulation), T Zellen

Induziert	dendritische Zellen Neutrophile (IFN-γ, G-CSF)	neutrophile-, eosinophile Granulozyten, Langerhans Zellen, Endothel Zellen (Subpopulation), T- Zellen (Subpopulation), dendritische Zellen	(Subpopulation) IIIb: Neutrophile IIIa: Monozyten (TGF-β)
Modulation	↑: G-CSF, IFN-γ, IL-10 ↓: IL-4, IL-13	↓: IL-4	↑: TGF-β ↓: IL-4
Affinität Murines IgG Humanes IgG	 2a=3>>>1,2b 3>1>4>>>2	 1,2b>>2a 3>1*	 2a>2b>>1 1=3>>>2,4

(Tab. 2.1:) Kurze Zusammenfassung der Fcγ- Rezeptoren nach Deo et al. (36). *= *Die drei Subklassen des FcγRII haben unterschiedliche Affinitäten für humanes IgG: FcγRIIa-R131, 3>1>>2,4; FcγRIIa-H131, 3>1=2>>>4; FcγRIIb1, 3>1>4>>2*

2.1.2.1 Der Fcγ- Rezeptor I (FcγRI)

Mit einem Molekulargewicht von 72 kDa bindet der stark glycosylierte FcγRI (105) monomere IgG- Moleküle mit hoher Affinität (5). Drei Formen von cDNA sind beschrieben worden (3), die alle eine extrazelluläre Region von 292 AS kodieren. Diese enthält drei immunglobulinartige Domänen (149), eine transmembranäre Region von 21 AS, sowie eine cytoplasmatische Domäne von entweder 61 oder 31 AS. Der FcγRI ist auf Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen lokalisiert und bewirkt unter anderem auch die Generation von Superoxiden als auch die Sekretion von TNFα, IL-1 und IL-6. Seine Expression auf neutrophilen Zellen wird insbesondere durch IFNγ induziert (36; 138; 150).

2.1.2.2 Der Fcγ- Rezeptor II (FcγRII)

Das 40kDa große FcγRII- Molekül bindet komplexierte IgG- Moleküle mit niedriger Affinität. Der Rezeptor wird ebenfalls in drei Untergruppen eingeteilt, dem FcγRIIa (zwei allotypische Formen R131 und H131), dem FcγRIIb (Unterformen -b_1, -b_2, -b_3) und dem FcγRIIc (109). Der extrazelluläre Anteil des FcγRII beherbergt nur zwei immunglobulinartige Domänen (140). Er ist auf fast allen immunhämatologischen Zellen zu finden, so auch auf Monozyten, Makrophagen, B- Zellen, Subpopulationen von T-Zellen, Thrombozyten, Granulozyten, Endothelzellen als auch dendritischen Zellen (36). Die Funktionen des FcγRII gleichen weitgehend denen aller Fcγ-Rezeptoren, lediglich der FcγRIIb_1 und der FcγRIIb_2 dienen einer Minimierung und Desaktivierung von B- Lymphozyten. Die kodominant vererbten Allotypen des FcγRIIa unterscheiden sich durch einen Austausch einer einzigen Aminosäure (Arg→His) in der Position 131 (146). Der Austausch von Arg→His liegt in einer für die Bindung von IgG- relevanten Region und führt so zu einer veränderten Reagibilität mit bestimmten Isoformen von murinem oder humanem IgG. Träger der Histidin enthaltenden Alloform FcγRIIa H131 werden als „High Responder“ bezeichnet, entsprechend die der Arginin enthaltenden Form FcγRIIa R131 als „Low Responder“ (2; 135).

2.1.2.3 Der Fcγ- Rezeptor III (FcγRIII)

Die Gruppe der 50- 70kDa großen, als Glykoproteine klassifizierten (43) FcγIII- Rezeptoren unterteilt sich in zwei Untergruppen, dem FcγIIIa- Rezeptor und dem FcγIIIb- Rezeptor (38; 111). Beide sind niedrig- affine Rezeptoren für komplexiertes IgG und besitzen wie die FcγRII nur zwei immunglobulinartige extrazelluläre Domänen. Dabei scheint die zweite immunglobulinartige Domäne des FcγIII- Rezeptors wichtig für die Bindung der Fc- Region des IgG zu sein (56). Der FcγRIIIb ist im Gegensatz zum transmembranären FcγRIIIa (111) ein mit Glykophosphoinositol (GPI) an die Zelloberfläche verankertes Protein (58; 119; 123), dessen intracytoplasmatischer Anteil aus vier Aminosäuren besteht (111). Entscheidend für die Ausbildung der GPI- Bindung des FcγIIIb- Rezeptors ist eine T→C Mutation in Position 641 des Rezeptors, wodurch die im FcγRIIIa enthaltene Aminosäure Phenylalanin in Serin umgewandelt wird (72). Die zytoplasmatische Domäne des FcγRIIIa ist um 21 Aminosäuren länger als die des FcγRIIIb (111; 119). Aufgrund einer T→C Substitution im Stoppcodon TGA (Position 733) des FcγIII- Rezeptors kommt es zu unterschiedlichen Mechanismen der Verankerung in der Zellmembran. Es entsteht anstatt des mRNA- Transkriptes UGA des FcγRIIIb das Transkript CGA, wodurch sich die Aminosäuresequenz des FcγIIIa- Rezeptors um weitere 21 Aminosäuren verlängert (111). Eine aus der GPI- Bindung resultierende Besonderheit des FcγRIIIb ist seine hohe Mobilität innerhalb der Zellmembran (99), welche ihn insbesondere zur Beseitigung von Immunkomplexen befähigt.
Insgesamt unterscheiden sich der FcγRIIIa und FcγRIIIb durch 10 unterschiedliche Basenpaare voneinander, wobei nur 5 der Austausche auch zu einer unterschiedlichen Aminosäuresequenz führen (Tab. 2.2).

Rezeptor	bp 141	AS 36	bp 147	AS 38	bp 227	AS 65	bp 277	AS 82
FcγRIIIa	AGG	Arg	CTC	Leu	AGC	Ser	GAC	Asp
FcγRIIIb/ HNA-1a	AGG	Arg	CTC	Leu	A**A**C	**Asn**	GAC	Asp
FcγRIIIb/ HNA-1b	AG**C**	**Ser**	CT**T**	Leu	AGC	Ser	**A**AC	**Asn**
Rezeptor	bp 349	AS 106	bp 473	AS 147	bp 505	AS 158	bp 559	AS 176
FcγRIIIa	ATC	Ile	G**G**C	**Gly**	**T**AC	**Tyr**	**T**TT	**Phe**
FcγRIIIb/ HNA-1a	**G**TC	**Val**	GAC	Asp	CAC	His	GTT	Val
FcγRIIIb/ HNA-1b	ATC	Ile	GAC	Asp	CAC	His	GTT	Val
Rezeptor	bp 641	AS 203	bp 733	AS 234				
FcγRIIIa	T**T**T	**Phe**	**C**GA	**Arg**				
FcγRIIIb/ HNA-1a	TCT	Ser	TGA	Stop				
FcγRIIIb/ HNA-1b	TCT	Ser	TGA	Stop				

(Tab. 2.2:) Austausche von Basen des FcγRIIIa und FcγRIIIb, die zu einer veränderten Aminosäuresequenz führen; nach Watanabe et al. (147).

Der FcγRIII teilt sich insgesamt in 5 kodierende Abschnitte auf, den Exons, und 4 nicht kodierenden Abschnitten, den Introns. Ihre Anordnung ist im Folgenden anhand eines cDNA-Abschnittes näher erläutert. Das Exon 1 (5´UT/S_1) erstreckt sich von bp1- 73, Exon 2 (S_2) von

bp 74- 94, Exon 3 (EC_1) von bp 95- 352, Exon 4 (EC_2) von bp 353- 611, Exon 5 (TM/C) von bp 612- 887 (109; 111) (Abb. 2.2). Der FcγIII- Rezeptor selbst liegt in enger Nachbarschaft zu den FcγII- Rezeptoren auf dem Chromosom 1 (106; 109). Gerade diese enge Beziehung zueinander läßt ein gemeinsames Entstehen aus einer Grundform vermuten (109).

(Abb. 2.1) Die Exon-/ Intron- Grenzen des FCGR3B (FcγRIIIB)- Gens. *5´ und 3´stehen jeweils für das 5´ beziehungsweise 3´ Ende des DNA-Stranges; UT entspricht untranslated, S entspricht Signal, EC entspricht extrazellulär, TM entspricht transmembranär und C entspricht zytoplasmatisch. * zeigt den Beginn der Translation an. Kodierende Abschnitte sind als gefüllte Rechtecke, transkribierte und unübersetzte Regionen sind als offene Rechtecke dargestellt. (109)*

Die FcγRIII sind auf Natürlichen Killerzellen, Gewebsmakrophagen und Polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) lokalisiert, auf denen sie in einer Kopienanzahl von etwa 100.000- 300.000 pro Zelle vorhanden sind (59). Nach Stimulation mit IFNγ wird der FcγRIII auch von eosinophilen Granulozyten exprimiert (52). Werden die Rezeptoren aktiviert, so kommt es unter anderem zur Expression von IL-2- und Transferrin- Rezeptoren, sowie der Ausschüttung von IFNγ und TNF (6). Rückkoppelnd führt IFNγ selbst zu einer Hochregulation der Rezeptorzahl auf den betreffenden Immunzellen. Es hat sich gezeigt, dass die auf den PMN gelegenen FcγIII- und FcγII- Rezeptoren bei der Zellaktivierung synergistisch miteinander wirken (15; 39; 97; 115). Möglicherweise sind ebenfalls Komplementrezeptoren involviert (39; 132). FcγIII- Rezeptoren können sowohl in einer membranständigen als auch in einer löslichen Form vorkommen, die in verschiedenen Körperflüssigkeiten, so zum Beispiel in Lymphe, Plasma und Aszites, nachzuweisen ist. Die lösliche Form des FcγRIIIb (sFcγRIIIb) entsteht durch proteolytische Spaltung einer Serin- Protease von der Oberfläche aktivierter Neutrophiler Granulozyten (63) und weist ebenfalls die allelischen Zustandsformen von HNA-1a, HNA-1b und HNA-1c auf. Ihrerseits beeinflussen die HNA- Phänotypen den Gehalt an löslichem FcγRIIIb im Plasma (70). sFcγRIIIb vermag sich an das zytophile IgG auf B- Lymphozyten zu binden und beeinflußt so die Produktion von IgG durch die B-Zellen (45). Huizinga formulierte daher, dass die Fc- Rezeptoren womöglich eine Brücke im Immunsystem bilden, bei der sowohl die durch IgG induzierte Zerstörung von Zielzellen als auch eine Regulation der IgG- Produktion ermöglicht wird (62). Plasma- Konzentrationen des löslichen FcγRIIIb sind abhängig von ihrer Produktion durch neutrophile Granulozyten (64). Die für den FcγRIIIa nachgewiesene lösliche Form stammt vermutlich von NK- Zellen ab (34).

2.1.2.4 Der Fcγ- Rezeptor IIIa (FcγRIIIa)

Der FcγRIIIa weist zwei Allotypen auf, FcγRIIIa-V158 (Val) und FcγRIIIa-F158 (Phe), die durch einen Austausch in der Position 158 der Aminosäurensequenz bedingt sind. Seine Nucleotidsequenz gleicht bis auf wenige Basenaustausche dem des FcγRIIIb (Tab. 2.2). Der heterooligomere Komplex des FcγRIIIa ist aus Homo-/ Heterodimeren zusammengesetzt, die die

γ- Untereinheit des FcεRI und/ oder auf NK- Zellen die ζ- Untereinheit des T-Zell Rezeptors (CD3) enthalten (68; 79; 80). Der FcγRIIIa ist hauptsächlich auf Monozyten und Natürlichen Killerzellen zu finden (58; 68; 79; 80; 119), auf letzteren er den einzigen Fc- Rezeptor darstellt und hier für die ADCC verantwortlich zu machen ist.

2.1.3 Polymorphismen des Fcγ- Rezeptor IIIb (FcγRIIIb)

2.1.3.1 Das HNA (NA)- System

Der FcγIIIb- Rezeptor weist insgesamt drei allelische Zustandsformen auf, die durch entsprechende Änderungen auf molekularer Basis erklärt werden können. Die zwei zuerst entdeckten Allele, als „neutrophiles Antigen 1" (NA1) (74) und „neutrophiles Antigen 2" (NA2) bezeichnet (75), kommen ausschließlich auf dem FcγIIIb- Rezeptor neutrophiler Granulozyten vor. Sie unterscheiden sich durch insgesamt fünf Basenaustausche innerhalb der Nucleotidsequenz mit vier unterschiedlichen Aminosäuren voneinander (Tabelle 2.3). Folge dieser Basenaustausche ist eine veränderte Zahl N- gebundener Glycosylierungsstellen, deren Zahl bei HNA-1a (NA1) vier und bei HNA-1b (NA2) sechs beträgt. Für die zwei zusätzlichen Glycosylierungsstellen im FCGR3B*2 (NA2)- Allel sind zum einen der Austausch Asparagin→Serin im Codon 65 der Aminosäuresequenz und der Austausch Asparaginsäure→Asparagin im Codon 82 verantwortlich zu machen. Die derart veränderte Aminosäure- Abfolge führt zu erwähnten Glycosylierungsstellen (102) und damit einem unterschiedlichen Kohlenhydratanteil der Proteine. Bemerkbar macht sich dieses in einem differenten Molekulargewicht, welches HNA-1a als ein 50- 65kDa, HNA-1b als ein 65- 80kDa schweres Protein im Western Blot erscheinen läßt (60). Weiterhin determinieren die Austausche der Aminosäuren die Allelität des HNA- Systems, die Aminosäure Ser^{65} determiniert das FCGR3B*2- Allel, die Aminosäure Val^{106} hingegen das FCGR3B*1 (NA1)- Allel (111).

	Basenaustausche in der Nucleotidsequenz				
Positionen: (NC/ AS Sequenz)	bp141/Cd.36	bp 147/ Cd.38	bp227/Cd.65	bp277/Cd.82	bp 349/Cd.106
HNA-1a	AG**G**	CT**C**	A**A**C	**G**AC	**G**TC
Aminosäuren	Arg	Leu	Asn	Asp	*Val*
HNA-1b	AG**C**	CT**T**	A**G**C	**A**AC	**A**TC
Aminosäuren	Ser	Leu	*Ser**	Asn*	Ile

(Tab. 2.3:) Nucleotid- (NC) bzw. Aminosäurenaustausche (AS) im FcγIIIb- Rezeptor, die zu dem Polymorphismus der HNA-Antigene führen. *Die Basen, in denen sich HNA-1a von HNA-1b unterscheidet, sind **fett** gedruckt; zusätzliche N-Glycosylierungsstellen sind mit einem * markiert. Kursiv geschriebene Aminosäuren zeigen die für das jeweilige Allel determinierende Aminosäure an.*

Eine weitere Konsequenz des HNA- Polymorphismus ist funktioneller Art und bewirkt eine veränderte Phagozytosefähigkeit der PMN. So haben die PMN HNA-1a- homozygoter Individuen eine quantitativ höhere Phagozytosefähigkeit als die HNA-1b- homozygoter Individuen, welche nicht mit einer quantitativ unterschiedlichen Expression des FcγRIIIb zu begründen ist. Hingegen lässt die FcγRIIIb unabhängige Phagozytose von Immunzellen HNA-1a- und HNA-1b- homozygoter Individuen keine Unterschiede erkennen, so dass erwähnte

Differenzen der Phagozytose in einem intrinsichen Faktor der FcγIIIb- Rezeptoren HNA-1a bzw. HNA-1b tragender Individuen zu suchen sind (13; 114; 116).
Durch die allelische Varianz der FcγIIIb- Rezeptoren können auch Immunreaktionen mit der nachfolgenden Bildung von Allo- oder Autoantikörpern ausgelöst werden, hat sich ein Individuum entsprechend sensibilisiert. Ein Beispiel dafür ist die auf Unverträglichkeiten des HNA- Systems von Mutter und Kind beruhende Neonatale Immunneutropenie (NIN), bei der es zur Bildung von Alloantikörpern durch die Mutter gegen HNA- Antigene des Kindes kommt. Dabei kann es durch Mutationen innerhalb des FCGR3B- Gens der Betreffenden zu Unverträglichkeiten kommen (26).
Eine weitere klinisch relevante Immunreaktion, die sich bei Unverträglichkeiten des HNA-Systems ergeben kann, ist eine Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI). Diese kann einerseits durch Inkompatibilitäten der Empfänger Granulozyten mit im Blutprodukt des Spenders enthaltenen, präformierten granulozytären Antikörpern hervorgerufen werden. Andererseits kann es aber auch zu Unverträglichkeiten zwischen den im Blutprodukt des Spenders enthaltenen Granulozyten und granulozytären Antikörpern, welche im Blut des Empfängers vorhanden sind, kommen (23; 118; 154).
Die Verteilung der FCGR3B*1-, -*2-, -*3- Allele innerhalb der Weltbevölkerung weist starke regionale Unterschiede auf. Trotz dieser Unterschiede lassen sich bestimmte Populations-Kollektive ermitteln, die eine ähnliche Verteilung der FCGR3B* 1-, -*2-, -*3- Allele aufweisen. Eine grobe Vereinfachung zeigt, dass das FCGR3B*2- Allel in kaukasischen und afrikanischen Bevölkerungsgruppen ein höheres Auftreten zeigt als in asiatischen oder von diesen hergeleiteten Bevölkerungen, bei denen das FCGR3B*1- Allel dominiert (Tab. 2.4).

Population	Genfrequenz von HNA-1a	Genfrequenz von HNA-1b
Äthiopier (139)	0.260	0.740
Spanier (136)	0.290	0.710
Asiatische Inder (54)	0.300	0.700
Spanier (95)	0.306	0.614
Afrikaner, USA (54)	0.310	0.690
Tunesier (1)	0.313	0.632
Franzosen (8)	0.322	0.645
Franzosen (44)	0.325	0.640
Kaukasier (81)*	0.334	0.666
Weiße Amerikaner (8)	0.337	0.663
Deutsche (25)	0.350	0.650
Polen (51)	0.350	0.650
Norweger (139)	0.360	0.640
Dänen (129)	0.365	0.635
Norweger (110)*	0.367	0.633
Holländer (95)	0.374	0.625
Afrikaner, USA (81)*	0.402	0.598
Afrikaner, USA (69)*	0.410	0.590
Afrikaner, Ghana (69)*	0.426	0.500
Afrikaner, Südafrika (69)*	0.444	0.545
Eingeborene Amerikaner (54)	0.550	0.450
Brasilianer (73)	0.580	0.420
Japaner (100)	0.651	0.302

Indianer aus Amazonien (73)	0.670	0.210
Festland- Chinesen (82)	0.680	0.309
Chinesen aus Taiwan (69)	0.681	0.319

(Tab. 2.4:) Verteilung der HNA-1a- und -1b- Genfrequenzen in ausgewählten Bevölkerungen. *Die Anordnung der Populationen ist für HNA-1a mit ansteigenden, für HNA-1b mit abnehmenden Zahlenwerten verbunden. *Genfrequenzen sind aus den angegebenen Zahlenwerten berechnet*

Die Diagnostik der FCGR3B*1-, -*2-, -*3- Allele hat sich in den letzten Jahren zunehmend vereinfacht und kann, inzwischen als PCR- Methode verfügbar, eine schnelle Typisierung innerhalb des klinischen Alltags ermöglichen (25). Daneben können die FCGR3B*1-, -*2-, -*3- Allele auch durch Restriktions- Fragment Längen- Polymorphismus (130) oder sequenzspezifische Oligonucleotide (131) nachgewiesen werden. Die entsprechenden Phänotypen können durch Granulozyten- Immunfluoreszenz- und Agglutinations- Tests mittels HNA- spezifischen Humanseren (84) oder einem antigenspezifischen Enzymimmunassay („MAIGA- Assay“) (21) nachgewiesen werden. Die Phänotypisierung ist allerdings sehr zeit- und arbeitsaufwendig.

2.1.3.2 Das FCGR3B*3 (SH)- Allel

Ein weiterer, auf dem FcγRIIIb gelegener Polymorphismus ist das FCGR3B*3 (SH)- Allel, welches erstmals bei der Untersuchung von vier Fällen einer NIN entdeckt wurde. Er ist durch eine Punktmutation Cytosin→Adenin in der Position 266 des FCGR3B*2- Allels des FCGR3B- Gens charakterisiert. Hieraus resultiert ein Austausch der Aminosäure Alanin→Asparagin im Codon 68 der Aminosäuresequenz (26). Da sich das FCGR3B*3- Allel in nur einer Base von dem FCGR3B*2- Allel unterscheidet, ist die Trägerschaft dieses Allels immer mit dem Phänotyp HNA-1b korreliert. Genotypisierungen HNA-1c- positiver Proben weisen daher immer den Phänotyp HNA-1b auf, wenn sie nicht mit einem für das FCGR3B*3- Allel- spezifischen Primerpaar untersucht werden.
Eine weitere Besonderheit ergibt sich daraus, dass genotypisch HNA-1a/ HNA-1b- heterozygote Individuen, die zusätzlich HNA-1c besitzen, auch Träger dreier FCGR3B- Gene sind. Sie besitzen je einen FCGR3B- Gen für das FCGR3B*1-, -*2- und -*3- Allel. Diese Genduplikation ist vermutlich Folge eines ungleichen Crossing- Over in der Meiose, wodurch zwei Gene auf einem Chromosom zu liegen kommen (71). Kürzlich wurde anhand von Familienstudien die Hypothese aufgestellt, dass das FCGR3B*3- Allel eng an das FCGR3B*1- Allel gekoppelt ist und als derartige Einheit weiter vererbt wird (129).
Das FCGR3B*3- Allel kann ebenfalls für die Entstehung von Allo- und Autoantikörpern verantwortlich gemacht werden. Bislang sind aber Unverträglichkeiten des FCGR3B*3- Allels nur im Zusammenhang mit einer NIN beschrieben worden (26).
Auch in der regionalen Verteilung des FCGR3B*3- Allels zeigt sich, ähnlich dem HNA- System, eine unterschiedliche Frequenz innerhalb verschiedener Bevölkerungen. In asiatischen oder von diesen abstammenden Populationen ist das FCGR3B*3- Allel bislang noch nicht nachgewiesen worden, hingegen zeigen afrikanische Bevölkerungen eine mitunter sehr hohe Frequenz des FCGR3B*3- Allels an. Kaukasische Populationen nehmen eine Mittelstellung ein (Tab. 2.5).

Population	Häufigkeit des *FCGR3B*3 Allels* (%)
Afrikaner, Südafrika (69)	38.38
Afrikaner, USA (81)	25.00

Afrikaner, USA (69)	23.21
Afrikaner, USA (55)	22.50
Afrikaner, Ghana (69)	22.22
Inder (55)	15.90
Äthiopier (139)	15.60
Polen (51)	14.67
Brasilianer mit Sichelzellanämie (73)	11.60
Brasilianer (73)	10.60
Stichprobe aus Milwaukee, USA (55)	10.00
Deutsche (26)	5.0
Kaukasier (55)	4.5
Kaukasier (81)	3.8
Eingeborene Amerikaner (55)	1.1
Norweger (139)	1.1
Indianer aus Amazonien (73)	0
Chinesen aus Taiwan (69)	0
Koreaner (55)	0

(Tab. 2.5:) Verteilung des FCGR3B*3- Allels in ausgewählten Populationen.

2.1.3.3 Die FcγRIIIb- Defizienz

Im Zusammenhang mit einer NIN ist auch das Auftreten von Individuen mit einem vollständigen Fehlen eines FCGR3B (FcγRIIIB)- Gens beschrieben worden, ein sogennanter „NA- Null" Phäno- und Genotyp (35; 61; 143). Es wird angenommen, dass die Deletion des FCGR3B- Gens Folge eines ungleichen Crossing- Over zwischen den zwei Genen nach einer Fehlpaarung der homologen Chromosomen während der Meiose ist. Beim Crossing- Over kommt es zur Überkreuzung homologer Chromosomen, die zum Bruch und anschliessend zum Wiederanwachsen der vertauschten Stücke führt. Beim ungleichen Crossing- Over hingegen kommt es zu einer Fehlpaarung der beiden FCGR3B- Gene auf einem Chromosom, wodurch das korrespondierende Chromosom leer bleibt (61). Individuen, denen der FcγIIIb- Rezeptor fehlt, weisen zusätzlich ein Fehlen des FcγIIc- Rezeptors auf, welches sowohl durch die enge Lage als auch durch die Homologie beider Rezeptoren mitbedingt sein dürfte (35). Mütter, denen der FcγIIIb- Rezeptor fehlt, bilden bei Sensibilisierung Antikörper gegen den FcγIIIb- Rezeptor des Kindes aus (35; 61; 90; 134). Es wird angenommen, dass Kinder FcγRIIIb- defizienter Mütter nur das FCGR3B- Gen des Vaters tragen, der andere Genort hingegen ist „leer". Schätzungen bestimmen die Vorkommenshäufigkeit NA- Null hemizygoter Individuen in der kaukasischen Bevölkerung bei 3%, das der vollständigen FcγRIIIb- Defizienz mit einer Häufigkeit von 0,1% (44). Afrikanische Bevölkerungsgruppen dagegen zeigen ein weitaus höheres Vorkommen des Genotyps NA- Null (Tab. 2.6). Obwohl ein Fall von aplastischer Anämie im Zusammenhang mit einer FcγRIIIb- Defizienz berichtet wurde (137), sind die meisten Individuen mit dem Phänotyp NA- Null klinisch unauffällig (35). Auch tritt nicht bei jeder Schwangerschaft einer FcγRIIIb- defizienten Mutter eine NIN auf (108).

Population	Genotypfrequenz von NA- Null
Stamm der Ami, Taiwan (31)	0.280
Spanier (95)	0.080
Afrikaner, Ghana (69)	0.070
Japan (100)	0.047
Afrikaner, Südafrika (69)	0.010
Franzosen (8; 44)	0.001- 0.028
USA (134)	0.000
Chinesen aus Taiwan (69)	0.000
Festland Chinesen (82)	0.000

(Tab. 2.6:) Verteilung des Phänotyps NA- Null (FcγRIIIb- Defizienz) in ausgewählten Populationen mit Angabe der Genotypfrequenzen.

2.2 Die Neonatale Isoimmune Neutropenie (NIN)

Die Neonatale Isoimmune Neutropenie ist eine Folge mütterlicher Alloimmunisierung gegen väterlichen Granulozytenmerkmale, die beide auf den Granulozyten des Kindes exprimiert werden. Eine Erstbeschreibung dieser Krankheit findet sich bei Slobody et al (126). Luhby und Slobody, 1956 (85), als auch Payne und Rolfs, 1960 (104), vermuteten, dass ein immunologisches Geschehen hinter dieser Erkrankung steht.
Es kann bei Übertritt fetaler Granulozyten über die Plazenta in den maternalen Blutkreislauf zu einer Alloimmunisierung kommen. Dabei wird die Bildung von IgG, welches die Plazenta zu passieren vermag, seltener von IgM- und IgA-Antikörpern induziert (74; 142). Die Antikörper gelangen über die Plazenta wieder in den fetalen Blutkreislauf. Weitaus seltener kann die Übertragung mütterlicher Autoantikörper zu einer NIN führen (128; 141). Nach der Geburt des Kindes äußert sich die NIN in einer erhöhten Infektanfälligkeit desselben, da es vor der Geburt durch den maternalen Organismus vor Infektionen geschützt wurde. Bux und Mitabeiter (21) geben die Häufigkeit für eine NIN in Deutschland mit unter 0,1 % an. Die Letalität der NIN wird mit ungefähr 5% angegeben (75). Viele Neutropenien bleiben jedoch klinisch unerkannt (125).
Eine weitere Ursache für die Entstehung einer NIN ist die Bildung sogenannter Isoantikörper. Diese können bei Individuen auftreten denen eine bestimmte Struktur fehlt, die normalerweise auf den Granulozyten exprimiert wird. Kommen sie beispielsweise durch eine Schwangerschaft oder eine Transfusion in Kontakt mit der ihnen fehlenden Struktur, so werden Antikörper gegen das ihnen unbekannte Antigen gebildet. Dieses Phänomen ist seit kurzem bei klinisch unauffälligen Frauen mit einer FcγRIIIb- Defizienz der Granulozyten bekannt (28; 61; 134).
Die Zerstörung der antikörperbeladenen Granulozyten im Rahmen einer antikörperinduzierten Neutropenie geschieht vermutlich im retikuloendothelialen System durch Phagozytose (9), da die meisten im Rahmen einer NIN gefundenen Alloantikörper kein Komplement aktivieren (78). HLA-Antikörper scheinen die Granulozytenzahl nur wenig zu beeinflussen. Zum einen filtert das an HLA-Merkmalen reiche Plazentagewebe Antikörper heraus, zum anderen greifen die HLA-Antikörper nicht spezifisch die Granulozyten an, sondern verteilen sich im Fetus auf alle HLA-tragenden Organe (77).
Die serologische Diagnose einer NIN erfordert den Nachweis von Antikörpern im maternalen Serum, welche nur mit den Granulozyten des Kindes und des Vaters reagieren. Eine Reaktion des

maternalen Serums mit autologen Zellen sollte nicht auftreten. Durch Typisierungen der Eltern oder Austestung des Antikörpers an typisierten Zellreihen läßt sich gegebenenfalls die Spezifität des Antikörpers ermitteln. In der Therapie der NIN ist die gezielte antibiotische Behandlung der Infektionen vorrangig. Der Einsatz von humanen i.v. Immunglobulinen kann, wie bei der Autoimmunen Neutropenie, Erfolge erzielen (16).

2.3 Die Evolution des Menschen

Die Evolution des modernen Menschen (Homo sapiens) ist bislang nur in hypothetischen Modellen ansatzweise erklärt worden und trotz zahlreicher Fossilienfunde und molekularbiologischer Mutationsmodelle zum größten Teil immer noch unklar. Viele der formulierten Vermutungen lassen sich jedoch in zwei Haupthypothesen unterbringen, zum einen die „Out of Africa"- Theorie (133), zum anderen die Theorie der „Multiregionalen Entwicklung" auch „Multiregionale" Theorie genannt (153). Faktoren, die für die Entwicklung und regionale Verteilung des Menschen von Bedeutung sind und bei erwähnten Theorien eine tragende Rolle spielen, sind Mutation und Selektion. Mutationen sind zufällig auftretende Ereignisse auf Ebene der Nucleotide. Über das Fortbestehen einer Mutation in einem Organismus entscheidet jedoch die Selektion, die eine Auslese der Individuen bewirkt. Nur erfolgreiche Mutationen, die dem Organismus ein besseres Überleben in seiner Umwelt ermöglichen, werden im Genpool belassen. Gut dokumentiert ist dieses Phänomen am Beispiel der in Afrika vorkommenden Sichelzellanämie, bei dem eine Punktmutation T→A in der für die β- Kette des Hämoglobin A kodierenden Sequenz zu einem Austausch der Aminosäure Glutamin→Valin in der Position 6 führt. Heterozygote Träger des entstandenen Hämoglobin- S weisen eine höhere Resistenz gegen den von der Anopheles- Mücke übertragenen Parasiten Plasmodium auf (33). Die höchste Genfrequenz ist in Zentral-, West- und Ostafrika zu verzeichnen, in Nigeria sind bis zu 30% der einheimischen Bevölkerung entsprechende Genträger (120).

2.3.1 Die Entwicklung des Homo sapiens

Die frühesten Formen der Hominoidea erscheinen in Afrika in der Basis des mittleren Miozän (Tabelle 2.7) in Form der Dryopitheciden. Nachdem die Afrikanische Platte vor ca. 20 Mio. Jahren mit der Europäischen Platte kollidierte, ist anzunehmen, dass Wanderungsbewegungen nach Europa stattfanden, wie ungefähr 16 Mio. Jahre alte Funde nahelegen. Aus den Dryopitheciden entwickelten sich sehr wahrscheinlich die Ramapitheciden, deren fossile Funde aus Afrika bis zu 17 Mio. Jahren zurückreichen. Erst sehr viel später erscheinen die höher entwickelten Australopitheciden in Afrika (Tab. 2.8). Dem Australopithecus afarensis zugeordnete Funde lassen sich nach derzeitigem Forschungsstand bis auf ca. 3.8 Mio. Jahre zurückdatieren. Die Australopitheciden lebten bis vor ungefähr 1.2 Mio. Jahren, der letzte ihrer Art war der Australopithecus boisei, ein in Nordafrika beheimateter Hominide. Fast zeitgleich mit dem Rückgang der Australopitheciden entstand der Homo habilis, dessen fossile Funde bis zu 2 Mio. Jahre alt sind. Wenig später treten schon die ersten Frühformen des Homo erectus auf, dessen erstmaliges Erscheinen mit mindestens 1.6 Mio. Jahren angenommen wird. Homo erectus entwickelte sich ursprünglich in Afrika, breitete sich jedoch sehr schnell in Europa und China aus und gelangte sogar bis nach Java. Seine älteste in Europa gefundene Form ist der Homo heidelbergensis, der vor ungefähr 400.000- 600.000 Jahren gelebt haben dürfte (127). Etwa 300.000 Jahre später erfolgten weitere Auswanderungen, in diesem Falle nach Südafrika. Im

mittleren Pleistozän, traten gegen Ende der Holstein- Warmzeit die ersten Homo sapiens Formen auf. Auch die als Homo neanderthalensis bezeichnete Form läßt sich am Ende des mittleren Pleistozän nachweisen (14). Viele Funde deuten daraufhin, dass sowohl Homo sapiens als auch Homo neanderthalensis zeitgleich nebeneinander existierten. Es wird angenommen, daß der Typ des Homo neanderthalensis bis vor etwa 35.000 Jahren existent war. Neuere Radiokarbon-Datierungen jedoch verlegen diesen Zeitpunkt in die Weichsel- Kaltzeit zurück (127), die vor ungefähr 70.000 Jahren anfing (14).
Homo sapiens breitete sich rasch auf der Erde aus. Vor ca. 150.000 Jahren fingen die ersten Wanderungszüge aus dem Gebiet um Äthiopien und Kenya nach Südafrika an. Weitere Wanderungsbewegungen in Richtung Europa traten vermutlich erst 50.000 Jahre später auf und fanden erst vor ca. 40.000 Jahren mit dem Erreichen der spanischen Westküste ein Ende. Zeitgleich brachen weitere Gruppen nach China auf. Es wird vermutet, daß diese Wanderungen sich vor etwa 60.000- 30.000 Jahren über das Indonesische Archipel nach Australien fortsetzten. Erst sehr viel später, vor ca. 35.000- 15.000 Jahren, folgten weitere Wanderungen des Homo sapiens über die Behring Straße nach Amerika (88). Neueren Hypothesen zufolge, gelangten einige Homo sapiens- Formen aus Spanien, über den Atlantik nach Amerika (57). Nach dieser Theorie wäre die amerikanische Urbevölkerung aus spanischen und asiatischen Anteilen zusammengesetzt (57).

ZEITTAFEL					
Zeitalter		(Jahre, in Millionen)	Zeitalter		(Jahre, in Millionen)
Känozoikum	Quartär				
				Holozän	0.0103- heute
				Pleistozän	1.8- 0.0103
	Tertiär	1.8 ↓ 23 ↓ 65		Pliozän	5.3- 1.8
			Neogen	Miozän	23- 5.3
				Oligozän	37- 23
			Paläogen	Eozän	53- 37
				Paleozän	65- 53

(Tab. 2.7:) Zeittafel des Känozoikum bis heute (127).

Zeitalter		Jahre, in Millionen	Vorherrschende Hominidenart					
Pleistozän	Holozän	0.0103-heute						Hs
								Hs
	Jung	0.14- 0.0103					Hn	Hs
							Hn	Hs

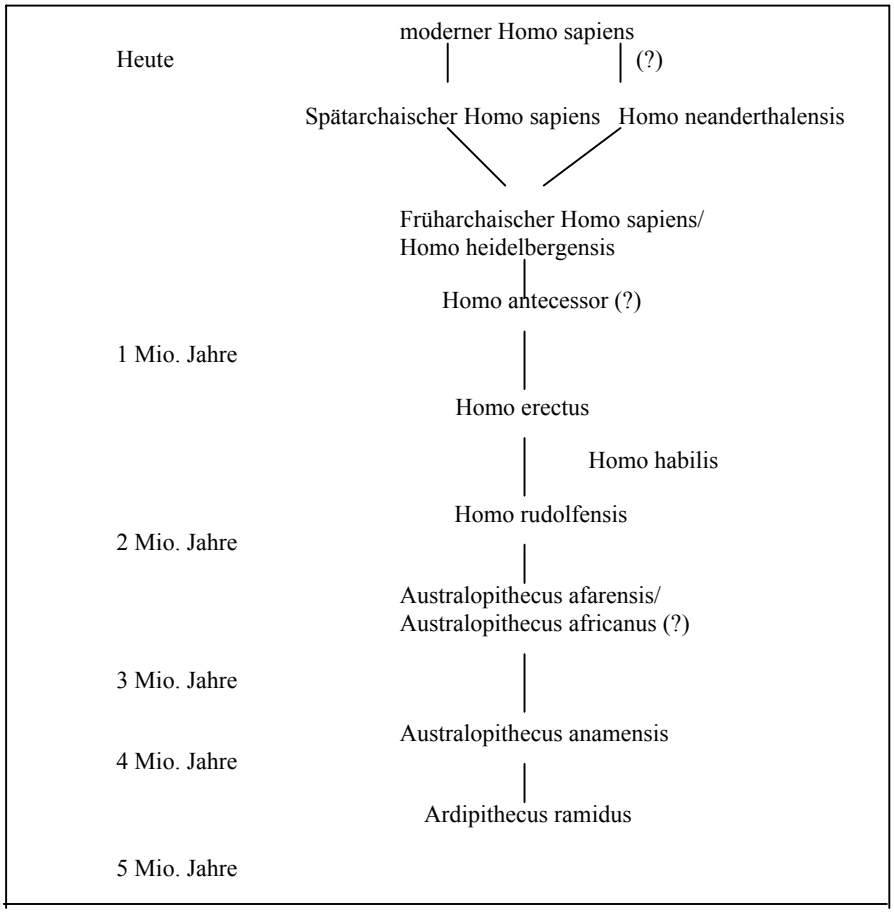
	Mittel	0.2- 0.14				He	Hn	Hs
Pliozän		*5.3- 1.8*				He		*Hs*
	Alt	0.8- 0.2			Hh	He		
			Rp	Ap	Hh			
	Ältest	1.8- 0.8	Rp	Ap	Hh			
			Rp					

(Tab. 2.8:) Zeittafel des Pleistozän und vorherrschende Art der Hominiden. Modifiziert nach Brinkmann (14). *Rp: Ramapithecus; Ap: Australopithecus; Hh: Homo habilis; He: Homo erectus; Hn: Homo neanderthalensis; Hs: archaische Form des Homo sapiens; Hs: Homo sapiens.*

Allerdings ist immer noch umstritten, aus welchen Frühformen sich Homo sapiens entwickelt hat. Zwar weisen alle fossile Funde eine Zeitkontinuität auf, jedoch sind die verwandtschaftlichen Beziehungen der jeweiligen Formen unklar und lassen sich in mannigfaltiger Form auslegen.

2.3.2 Hypothesen zur Herkunft und Entwicklung des modernen Menschen

Es ist anzunehmen, dass sich vor 4 Mio. Jahren die Australopitheciden aus den Ardipitheciden entwickelt haben. Der erste ihrer Art war der Australopithecus afarensis, von der wohl die 1974 in der Steinwüste Äthiopiens gefundene „Lucy“ der bekannteste Vertreter sein dürfte. Die Australopitheciden beschritten einen weiteren Entwicklungsgang. Die folgenden Arten der Australopitheciden, also Australopithecus aethiopicus, Australopithecus robustus und Australopithecus boisei, bilden sehr wahrscheinlich jeweils eigene Gattungen. Aus den Australopitheciden entwickelte sich die Gattung Homo, wobei Unklarheit darüber besteht, ob nun die Form des Australopithecus afarensis oder die Form des Australopithecus africanus direkter Vorfahr des Homo ist. Sicher ist, dass Homo rudolfensis der erste Vertreter der Gattung Homo war und damit direkter Vorfahr des Homo erectus ist. Homo rudolfensis divergierte vor ca. 2 Mio. Jahren in zwei Arten, den Homo habilis und etwas später in den Homo erectus. Aus diesem entstand über eine noch sehr umstrittene Zwischenform, dem Homo antecessor, der früharchaische Homo heidelbergensis. Man geht davon aus, dass dieser nach Europa auswanderte und sich dort vor ca. 100.000 Jahren in den Homo neanderthalensis weiterentwickelte. In Afrika entstand jedoch aus dem Homo heidelbergensis, über den spätarchaischen Homo sapiens, der anatomisch moderne Mensch, der sich von hier aus über die ganze Welt ausbreitete (88) (Abb. 2.3).



(Abb. 2.2:) *Vermutete Entwicklung des modernen Menschen. Fragliche oder strittige Entwicklungsgänge sind mit einem (?) sowie einer gestrichelten Linie markiert. Modifiziert nach Meister (88).*

2.3.2.1 Die „Out of Africa"- Theorie der menschlichen Evolution

Die „Out of Africa"- Theorie oder auch „Garten Eden"- Hypothese besagt, dass alle heute lebenden Menschen ursprünglich von Homo sapiens- Gruppen abstammen, die in mehreren Schüben aus Afrika ausgewandert sind. Allerdings zerfällt die Theorie in zwei separate Hypothesen eines afrikanischen Ursprungs (53): Die erste Hypothese geht von dem „African Hybridization and Replacement Model" oder Modell des afrikanischen Ursprungs mit Hybridisierung aus (12) .Der zweiten Hypothese liegt das Modell eines rezenten afrikanischen Ursprungs ohne Hybridisierung zugrunde (133). Ob eine Verdrängung oder eine Hybridisierung mit den archaischen Populationen in Europa und Asien stattfand, bleibt dabei offen.
Dem „African Hybridization and Replacement Model" zufolge soll sich der moderne Homo sapiens im späten Mittelpleistozän über Zwischenformen aus dem früharchaischen Homo sapiens in Ost- und Südafrika entwickelt haben. Bereits im Jungpleistozän (Tab. 2.7) soll er weite Teile Afrikas besiedelt haben, von denen aus Populationen nach Europa, dem Nahen Osten und Asien auswanderten. Einwandernde Gruppen haben dann zunehmend die archaische Bevölkerung verdrängt, so dass ihr Einfluß auf den Genpool des heutigen Menschen als verschwindend gering einzuschätzen ist (12; 53).

Das Modell eines rezenten afrikanischen Ursprungs ohne Hybridisierung hingegen besagt, dass Afrika die Urheimat des modernen Homo sapiens ist und somit alle heute lebenden Menschen genealogisch auf einen monogenetisch afrikanischen Ursprung zurückzuführen sind. Voraussagen des Migrationsmodelles ohne Hybridisierung sind (53; 133):

→ Der anatomisch moderne Mensch ist eindeutig zu definieren. Er unterscheidet sich von Frühformen durch einen einzigartigen Merkmalssatz, der in den Bevölkerungen aller Regionen nachzuweisen ist;
→ Übergangsformen sind lediglich auf Afrika beschränkt;
→ Die ersten modernen menschlichen Populationen müssen in Afrika gelebt haben und weisen eindeutig afrikanische Merkmale auf, bevölkerungsspezifische Merkmale treten erst sehr viel später in der Entwicklung auf.

2.3.2.2 Die „Multiregionale“ Theorie der menschlichen Evolution

Im Gegensatz zur „Out of Africa“- Theorie setzt die „Multiregionale“ Theorie der menschlichen Evolution eine kontinuierliche Entwicklung des Homo sapiens aus Frühformen an verschiedenen Orten der Welt voraus (153). Demnach wären alle regionalspezifischen Merkmale als Folge einer ortspezifischen Evolution und Anpassung zu werten. Grundzüge der Theorie beinhalten im wesentlichen (53; 121):

→ Es gibt keine einzige morphologische Definition des modernen Homo sapiens, die auf die Bevölkerungen aller Regionen gleichermaßen anwendbar ist;
→ Übergangsformen archaischer Homo sapiens Formen werden in den meisten Regionen der Welt erwartet;
→ Regionale, populationsspezifische Merkmale treten bereits sehr früh in der menschlichen Evolution auf.

2.4 Introns und Hypothesen zu ihrer Funktion

Introns entsprechen nicht kodierenden Abschnitten eines Genoms, welche zwischen den funktionstragenden Exons interponiert sind. Über Ursprung und Aufgabe der Introns ist bislang noch wenig bekannt, seit ihrer Entdeckung im Jahre 1977 haben sich darüber zwei Theorien entwickelt.
Die erste Theorie wird als „introns early“ oder auch „exon theory of genes“bezeichnet. Sie postuliert, dass Introns bei der Zusammensetzung frühzeitlicher Gene beteiligt waren (37; 47; 48). Die ersten Gene, so nimmt man dabei an, setzten sich aus ca. 15- 20 Aminosäuren- langen Fragmenten zusammen und wurden durch Introns unterbrochen. Eine derartige Aufteilung ermöglicht eine effektivere Rekombination der Exon- Anteile und dadurch eine grössere Auswahl an verfügbaren Protein- Strukturen. Mit der Zeit wurden die Exon- Fragmente unter Verlust von Introns zu größeren Stücken fusioniert, ohne dabei die Proteinstruktur zu verändern. In diesem Modell sind die Introns wesentlich an der heutigen Vielfalt der Proteine beteiligt. Organismen wie Prokaryoten, die unter einem hohen Replikationsdruck stehen, entfernten die Introns vollständig aus ihrem Genom, da diese für sie unnötiges genetisches Material darstellten. Nur die Eukaryoten, in ihrer Replikationszeit vergleichsweise langsamer, behielten die alt-evolutionären Strukturen bei.

Die zweite Theorie, die sogenannte „introns late theory“ besagt dagegen, dass Introns das Produkt einer willkürlichen Insertion in einen kontinuierlichen DNA- Strang sind (29; 103). Ihre Herkunft, so wird angenommen, resultiert aus einer Coevolution von Gruppe II-selbstspleissenden Introns mit eukaryotischen Proteinen. Diese Coevolution fand nach der Abtrennung von Pro- und Eukaryoten statt, so dass das Vorkommen von Introns lediglich auf die Eukaryota beschränkt ist. Vertreter der „introns late“- Theorie lehnen die Hypothese der „introns early“- Theorie, nach der Introns im Laufe der Evolution verloren gingen, strikt ab, mit der Schlussfolgerung, dass Introns verwandter Proteine, die an unterschiedlichen Stellen gelegen sind, nicht homolog sind.

3. Material und Methoden

3.1 Material und Bezugsquellen

3.1.1 Geräte

- Analysenwaage AE 100	Mettler, Gießen
- Autoklav Melag, Typ 23	Kahlensee, Gießen
- Elektrophorese Geräte	Keutz; Reiskirchen
- Feinwaage Mettler AE100	Mettler, Gießen
- Light Cycler™, Rapid Thermal- Cycler	Roche, Mannheim
- Magnetrührer IKA MAG- RET	IKA, Staufen
- PCR- Maschine „Trio Thermoblock“	Biometra, Göttingen
- PCR- Maschine „Thermal- Cycler Modell 2400“	Perkin Elmer, Weiterstadt
- PCR- Maschine „Thermal- Cycler Modell 9600“	Perkin Elmer, Weiterstadt
- PCR- Maschine Hybaid, „PCR Express“	Hybaid, Middlesex, England
- Pipetten, Eppendorf Typ 4710; 0.5µl -10µl; 10µl- 100µl; 100µl-1000µl	Eppendorf/ Netheler- Hinz GmbH, Hamburg
- Schüttelwasserbad Julabo	Kahlensee, Gießen
- Sequenzierer Abi Prism 310, Genetic Analyser	Perkin Elmer, Weiterstadt
- Spektralphotometer ZEISS PM 4	Zeiss, Stuttgart
- Tischzentrifuge, Biofuge A	Heraeus, Osterode
- Tischzentrifuge, Biofuge 22R	Heraeus, Osterode
- UV Transilluminator	IBI, New Haven, USA
- Vortex Schüttler VM3 IKA	Witeg Electric, Staufen
- Wärmeschrank	Heraeus, Osterode
- Wasserbad (bis 100°C) GFL	Kahlensee, Gießen
- Wasserstrahlpumpe	Kahlensee, Gießen
- QIAvac 6S Manifold	Qiagen GmbH, Hilden
- Zentrifuge, Rotixa A	Hettich, Tuttlingen

3.1.2 Kits

- Extra Gene, Kit zur Isolierung von DNA	BAG, Lich
- Gene Amp®, XL- PCR Kit	Perkin Elmer Applied Biosystems, USA
- Light- Cycler™, DNA Master SYBR® Green I	Roche, Mannheim
- Puregene DNA- Isolation Kit	Gentra Systems, Inc., USA
- QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
- Roti© Quick Kit zur RNA Isolierung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

3.1.3 Kleinmaterial

- Glaspipetten (5, 10, 20ml)	Brand, Wertheim
- Isolierband	Klinikumsapotheke, Giessen
- Light- Cycler™ Capillaries	Roche, Mannheim
- Microcentrifuge Tubes, Safe seal, 1.7ml	Sorenson Bio Science, Inc., USA
- Parafilm©	American Can Company USA
- Pasteurpippetten	Kahlensee, Gießen
- PCR- Tubes, 0.2 ml, nonsterile	Robbins Scientific Corporation, USA
- PCR- Tube Caps, nonsterile	Robbins Scientific Corporation, USA
- Pipettenspitzen, autoklavierbar für weiße, blaue und gelbe Spitzen	Eppendorf, Hamburg
- Pipettenspitzen steril, gestopft für 0.5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	ART© Molecular Bio Products USA
- Poly- Röhrchen	Sarstedt
- Sample Tubes, 0.5 ml for Genetic Analyser, Abi Prism	Perkin Elmer Applied Biosystems, CA, USA
- Septa for 0.5ml Sample Tubes, Abi Prism	Perkin Elmer Applied Biosystems, CA, USA
- Skalpelle, steril	Feather Industries LTD, Japan
- Sofortbild Polaroid Typ 667	Sigma, Deisenhofen
- Vacutainer Blutröhrchen (EDTA und Heparin), 5 ml	Becton Dickinson, USA
- Wägepapier, 100x100mm	Schleicher und Schnell, Dassel

3.1.4 Reagenzien

- Ammoniumchlorid Lösung	8.3g NH_4Cl, 1.0g $KHCO_3$, 0.037g Na_2EDTA Titriplex, dd H_20 ad 1l
- Agarose (Biozym DNA Agarose)	Biozym, Hessisch Oldendorf
- Aqua ad injectabila	Braun, Melsungen
- Big Dye®	Perkin Elmer, USA
- Bromphenolblau	Biorad, München
- Chloroform	Merck, Darmstadt
- DEPC (Pyrokohlensäurediäthylester)	Aldrich, Steinheim
- Dextran 200 Pyrogen free, Mr 200.000- 300.000	SERVA, Heidelberg
- dNTP Set „Ultrapure“ 100mM	Pharmacia Freiburg
- DTT, 0.1M	Gibco BRL©, Eggenstein
- Ethylendiamintetraacetat	Merck, Darmstadt
- Essigsäure, 98%	Merck, Darmstadt
- Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
- Ethanol 70%	Merck, Darmstadt
- Ethidium Bromide Solution, Ultra Pure	Gibco BRL©, Eggenstein
- Ficoll Paque	Pharmacia, Freiburg
- 5x First Strand Buffer	Gibco BRL©, Eggenstein
- Glucose	Merck, Darmstadt
- HCl, 1N	Merck, Darmstadt
- Isopropanol	Riedel de Haen, Seelze
- Isopropanol	Merck, Darmstadt
- Loading Buffer	40% (w/v) Saccharose 0.25% (w/v) Bromphenolblau 0.05M EDTA
- Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
- Molecularweight- marker VI, - Molecularweight- marker VII	Boeringer, Mannheim
- 100bp DNA Ladder	New England Biolabs
- Natriumacetat	Merck, Darmstadt
- PBS ohne Calcium u. Magnesium	Gibco BRL©, Eggenstein
- Proteinase K	Boeringer, Mannheim
- Rnase H	Gibco BRL©, Eggenstein
- Rnase Inhibitor	Gibco BRL©, Eggenstein
- Seakem™ GTG Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
- Superscript™II RT	Gibco BRL©, Eggenstein
- TAE- Puffer, 50x (Tris- Acetat EDTA)	2M Tris, 1M Essigsäure 100mM EDTA, pH 8.0
- Taq DNA Polymerase Amplitaq und Inkubationspuffer 10x	Perkin Elmer Überlingen
- Template Suppression Reagent, Abi Prism	Perkin Elmer, Applied

	Biosystems, USA
- TE- Puffer	10mM TRIS/HCl pH 8.0; 1mM EDTA
- TRIzol- Reagenz	Gibco BRL©, Eggenstein

3.1.5 Oligonucleotide und Primer

- Primerbestellungen, Sequenzspezifische Primer	Oligo MWG, Biotech, Ebersdorf

3.2 Methoden

3.2.1 Isolierung von DNA aus Vollblut

Das Prinzip der DNA- Isolierung (modifiziert) aus kernhaltigen Zellen in antikoaguliertem Vollblut beruht auf einem von Miller et al. entwickelten Prinzip (89). Dabei werden die im Vollblut enthaltenen Erythrozyten selektiv lysiert und verbleibende Protein- und Hämoglobinreste, die den PCR- Vorgang hemmen können, durch Aussalzen entfernt. Mögliche Kontaminationen der gDNA mit unerwünschten Fremdstoffen (zum Beispiel RNA oder DNasen) werden durch Zusatz von Rnasen und Enzymen, die die DNasen in ihrer Aktivität einschränken, eliminiert. Soll die extrahierte DNA für eine PCR verwandt werden, so sollte als Antikoagulans für das Vollblut EDTA oder Citrat eingesetzt werden, da Heparin die PCR zu stark hemmen würde.

Durchführung:

Für die Isolierung von DNA aus Granulozyten wurden sowohl das Puregene® DNA- Isolation Kit als auch das Extra Gene Kit angewandt.

3.2.1.1 Puregene® DNA- Isolation Kit

Zu 300µl Vollblut in einem 1.7ml Eppendorf Tube werden 900µl Red Blood Cell Lysis Solution hinzugefügt und 10min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Probe wird dann für 20sec bei 13.000-16.000 xg zentrifugiert, wodurch die lysierten Erythrozyten als bodenständiges Pellet zurückbleiben. Zu dem nun abpipettierten Überstand, der nur noch weisse Blutzellen enthält, werden 300µl Cell Lysis Solution hinzugefügt und mehrmals durch eine Pipettenspitze geschert. Dadurch werden die verbliebenen weissen Blutzellen vollständig lysiert. In der Lösung vorhandene RNA- Reste können sich in nachfolgenden Reaktionen als störend erweisen, deshalb wird dem Ansatz 5µl RNase A Lösung hinzugefügt, um die durch enzymatische Lösung verbliebenen RNA- Reste zu entfernen. Der Ansatz wird anschließend gut gemischt und für 15min. bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlen der Lösung erfolgt die Aussalzung von Proteinen mit der Protein Precipitation Solution. Erneutes Zentrifugieren der

Probe bei 13.000-16.000 xg für 3min. lässt die Proteinreste als Pellet zurück. Der erhaltene Überstand wird in ein neues Gefäß gegeben und mit 100%-igem Isopropanol vermischt. Nach erneutem Zentrifugieren (1min., 13.000-16.000 xg) wird die DNA als kleines, weißes Pellet sichtbar. Das Pellet wird in absteigender Reihenfolge mit 100%- und 70%-igem Ethanol gewaschen und am Ende des Vorgangs gründlich von dem Ethanol befreit. Je nach gewünschter Konzentration kann die DNA in 50-100µl sterilem Wasser gelöst werden und sollte zur vollständigen Rehydrierung der DNA am besten über Nacht bei 4°C gelagert werden. Sie kann jedoch auch bei 56°C für ca. 5min. inkubiert werden, um das Lösen der DNA mit dem Aqua dest. zu bewirken. Während des gesamten Arbeitsablaufes ist darauf zu achten, dass nur sterile Pipettenspitzen gebraucht werden. Auch sollten Lösungsmittel und Enzyme nur mit dafür vorgesehenen Pipetten bearbeitet werden. Die im Durchschnitt erreichte Reinheit der DNA liegt im Bereich des Extinktionsverhältnisses von OD 260/ OD280: 1.5-1.6. Sollte das Extinktionsverhältnis über dem Wert 2.0 liegen, so liegt eine Verunreinigung mit RNA vor. Erneute Inkubation der DNA- Lösung mit RNase A und anschließender Fällung nach oben genanntem Prinzip beseitigt verbliebene RNA- Reste.

3.2.1.2 Extra Gene© Kit

Das Prinzip der DNA- Isolation mit dem Extra Gene Kit gleicht in den meisten Punkten dem des Puregene® DNA- Isolation Kit, allerdings wird bei diesem Kit auf eine Entfernung von in der Lösung verbliebenen RNA- Resten verzichtet.
0.5µl Vollblut werden in ein 1.7ml Eppendorf Tube mit 0.9ml Erythrozyten- Lyse- Puffer versetzt und für 3min. bei 12.000-13.000Upm zentrifugiert. Erneutes Waschen des Leukozyten- Sedimentes mit dem Erythrozyten- Lyse- Puffer erhöht die Reinheit des Endproduktes indem alle Erythrozytenreste entfernt werden. Das Leukozyten- Sediment wird nun in 235µl Aqua dest. resuspendiert, mit 120µl Extraktionspuffer und 15µl Proteinase K versetzt und für 20min. bei 56°C inkubiert. In diesem Schritt werden die Proteinreste in der Lösung angedaut und sind damit leichter zu fällen. Eine nachfolgende Inkubation für 10min. bei 96°C denaturiert die der Probe zugesetzten Enzyme. Nach Abkühlen der Lösung, gibt man 120µl Protein-Fällungs-Reagenz hinzu und zentrifugiert erneut bei 12.000-13.000Upm für 5min. Der klare Überstand wird nun vorsichtig vom Proteinpellet am Boden des Gefäßes abgehoben und in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. Es folgt das Waschen der Probe in zwei Schritten mit 100%- und 70%- igem Ethanol. Die vom Ethanol befreite Probe wird in der Folge mit 50µl Aqua dest. rehydriert und zum vollständigen Lösen der DNA über Nacht bei 4°C inkubiert.

3.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentration der DNA kann durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260nm bestimmt werden. Dabei gilt für gDNA, dass ein Wert von 1 bei einer OD von 260nm einer Konzentration von 50µg/ml entspricht.

Durchführung:

Für die photometrische Bestimmung wurden 15µl der DNA- Proben mit 285µl Aqua dest. versetzt, so dass eine Verdünnung von 1:20 entsteht. Der Leer- oder Referenzwert wird in einer Glasküvette mit Aqua dest. bestimmt. Dazu werden von 300µl Aqua dest. die OD bei 260nm und 280nm gemessen und als Nullpunkt in das Photometer eingegeben. Bei der OD von 260nm wird die Konzentration der in der Probe vorhandenen DNA ermittelt. Wird die Verdünnung der DNA- Proben berücksichtigt, so ergibt sich für einen Wert von 1 bei der OD260 eine Konzentration von 1000µg DNA pro ml Probe. Die Reinheit der DNA kann durch das Verhältnis der OD260/ OD280 ermittelt werden. Reine DNA sollte ein Extinktionsverhältnis zwischen 1.6- 2.0 aufweisen. Werte über 2.0 deuten auf eine Verunreinigung mit RNA-, Werte unter 1.6 auf Kontamination mit Proteinresten hin. Nach Messung jeder DNA- Probe ist die Glasküvette gründlich mit Aqua dest. zu spülen- daran haftende DNA- Reste könnten die OD der nachfolgenden Proben verfälschen. Zu Fehlinterpretationen der OD führen auch Verschmutzungen der Glasküvette, deshalb sollte diese nur mit trockenen und sauberen Handschuhen angefasst werden.

3.2.3 Fällung von DNA

Soll die Konzentration eines PCR- Produktes bzw. einer DNA erhöht werden, bedient man sich einer Ethanolfällung. Dazu werden 10µl Natriumacetat (pH 5.1, 3M), 90µl H_2O und 250µl Ethanol absolut mit dem PCR- Produkt für 15 min. bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend mit 250µl 70%- igem Ethanol gewaschen. Das nach Entfernen des Ethanols verbleibende PCR- Produkt wird mit der gewünschten Volumenmenge an Lösungsmittel rehydriert. Als Lösungsmittel können Aqua dest., HPLC Wasser, RNA- Lösungen oder Template Suppression Reagent verwendet werden.

3.2.4 Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die von Mullis et al. von der Firma Cetus, Kalifornien, USA im Jahre 1985 entwickelte Methode zur in vitro- Amplifizierung von DNA- Abschnitten, kurz Polymerase Chain Reaction (PCR), hat sich inzwischen in vielen klinischen Bereichen als eine effiziente Vorgehensweise in der Diagnostik von Erkrankungen und Mutationen bewährt (40). Mit diesem Prinzip der enzymatischen DNA- Synthese wird der in jeder Zelle stattfindende Zellteilungszyklus auf durchaus einfache Weise imitiert.
Zunächst werden kleine Oligonucleotide (sogenannte „Primer“) als genomische Sonden in den Bereich des interessierenden DNA- Abschnittes gelegt. Die Primer sind dem aufgetrennten DNA- Abschnitt komplementär- ihre Lage bestimmt nachher die Größe des DNA- Amplifikates. Die Polymerase bindet an die Enden der Primer und synthetisiert aus den beigefügten Nucleotiden einen der DNA- Matritze komplementären Strang. Jedoch kann die Polymerase den DNA- Strang nur in der 5´→3´ Richtung ablesen und verlängern. Bei der Durchführung der PCR sind einige Punkte zu beachten, damit die gewonnenen PCR- Produkte möglichst spezifisch sind (92; 93; 94).

Der Reaktionsablauf der DNA- Amplifikation folgt einem festgelegten Schema, in dem sich die Schritte Denaturierung, Annealing und Prolonging zyklisch wiederholen. Zunächst wird der Doppelstrang bei 95°C denaturiert, wobei die Wasserstoffbrückenbindungen, die den DNA- Strang zusammenhalten, gelöst werden. In dem nun folgenden Schritt, dem Annealing, bindet der Primer an den einzelnen komplementären DNA- Strang. Die Annealing- oder Schmelztemperatur ist für jeden Primer spezifisch und lässt sich aus seinem unterschiedlichen Gehalt der vier Basen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T) berechnen. (Abb. 3.1) Dabei ist der errechnete Wert für die Tm lediglich ein Anhaltspunkt für die Annealing Temperatur zu Beginn eines Versuches, sie kann 3°C- 12°C über dem errechneten Wert liegen (98).

Formel zur Berechnung der Schmelztemperatur eines Primers:
[(Anzahl von A + T)x 2°C +(Anzahl von G + C)x 4°C]

(Abb. 3.1:) *Formel zur Berechnung der Schmelztemperatur eines Primers/ Oligonucleotids (98).*

Im letzten Schritt, dem Prolonging, werden die Primer bei 72°C verlängert. Ein Zyklus der PCR umfaßt alle drei Schritte, wobei die meisten PCR- Programme insgesamt 30 Zyklen beinhalten. Innerhalb dieser 30 Zyklen entstehen am Ende der Reaktion ca. $2x10^6$ Kopien des gewünschten DNA- Abschnittes.
Dem Reaktionsansatz werden Primer und Nucleotide im Überschuss, DNA, welche die Matritze darstellt, und Polymerase und Magnesiumchlorid als Puffer beigefügt. Um mögliche Kontaminationen der Reaktionsansätze mit Fremd- DNA zu erkennen, wird immer eine Negativkontrollen mitgeführt, die anstatt genomischer DNA lediglich Aqua dest. enthält. Um das Vorhandensein einer Reaktion nachzuprüfen, wird dem Reaktionsansatz eine interne Positivkontrolle beigefügt. Das häufig verwendete Primerpaar für das humane Wachstumshormon (Human Growth Hormone= HGH) eignet sich hierfür sehr gut, da es in der menschlichen DNA übiquitär nachgewiesen werden kann.
Damit jedoch Kontaminationen des Reaktionsansatzes mit Fremd- DNA oder Plasmiden vermieden werden, sollte nur mit autoklavierten Reagenzien und Geräten gearbeitet werden. Es empfiehlt sich, den Reaktionsansatz an einer sterilen Werkbank anzusetzen und die DNA anschließend an einem gesonderten, dafür vorgesehenen Ort hinzuzufügen. Vor dem Ansetzen sollten die Pipetten und Pipettenspitzen 15min. mit UV- Licht bestrahlt werden, um mögliche anhaftende DNA zu entfernen. Insbesondere Plasmide neigen dazu, in der Luft Aërosole zu bilden und sich dann an Geräten und Reagenzien festzusetzen. Umgehen lässt sich dieses mit sogenannten gestopften Pipettenspitzen, die in ihrem Lumen einen Luftfilter aufweisen.
Die lyophilisierten Primer werden nach den Konzentrationsangaben der Firma Biotech zunächst mit Aqua dest. auf 100pmol/µl verdünnt. Für den unmittelbaren Gebrauch in der PCR wird diese Lösung noch einmal mit Aqua dest. auf 1:20, also eine Konzentration von 5µmol/l, verdünnt. Die dNTPs werden in einer Konzentration von 12.5mM/ je Nucleotid angesetzt. (3.2.4.1) Da häufiges Auftauen den dNTPs schadet, wird die Lösung anschließend auf kleinere Portionen aufgeteilt und eingefroren.
Die gewonnenen PCR- Produkte werden nach der Reaktion wie in Kapitel (3.2.5) beschrieben auf einem 1.5%-igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und können nach Anfärbung mit Ethidiumbromid unter einer UV- Lampe sichtbar gemacht werden.

3.2.4.1 Ansatz für eine 5 x dNTP- Lösung

-Adenin: 12.5µl
-Guanin: 12.5µl
-Thymin: 12.5µl
-Cytosin: 12.5µl
mit 950µl Aqua dest. auf insgesamt 1000µl dNTP- Lösung auffüllen.

3.2.4.2 Reaktionsansatz für die HNA-1a/ -1b- spezifische PCR

Die PCR für die HNA-1a/ -1b- Typisierung wurde nach den von Bux et al. beschriebenen Methoden durchgeführt (25). Dabei ist das Primerpaar SSP1/ SSP3 für HNA-1b, das Paar SSP5/ SSP3 für HNA-1a- spezifisch.

Aqua dest.	8µl
Puffer	5µl
dNTP	8µl
SSP1/ SSP5	5µl
SSP3	5µl
HGH1	5µl
HGH2	5µl
TAQ Polymerase (1:10)	4µl

Testvolumen: 22.5µl +2.5µl genomische DNA; Gesamtvolumen: 25µl.

PCR- Programm:

Denaturierung : 95°C, 2min.

Denaturierung : 95°C, 30sec
Annealing : 57°C, 1min.
Verlängerung : 72°C, 30sec
} 30 Zyklen

Verlängerung: 72°C, 5min.

3.2.4.3 Reaktionsansatz für die HNA-1c-spezifische PCR

Die PCR für die HNA-1c- Typisierung wurde nach den von Bux et al. beschriebenen Methoden durchgeführt (26).

Aqua dest.	8µl
Puffer	5µl
dNTP	8µl

VP 8	5µl
RP 9	5µl
HGH1	5µl
HGH2	5µl
TAQ Polymerase (1:10)	4µl

Testvolumen: 22.5µl +2.5µl genomische DNA; Gesamtvolumen: 25µl.

PCR- Programm:

Denaturierung :	95°C, 2min.		
Denaturierung :	95°C, 30sec	}	30 Zyklen
Annealing :	60°C, 1min.		
Verlängerung :	72°C, 30sec		
Verlängerung:	72°C, 5min.		

3.2.4.4 Reaktionsansatz für den Nachweis von drei FCGR3B- Genen/ HNA-1b- spezifische PCR

Der Reaktionsansatz für die HNA-1b- spezifische PCR wurde nach einer von Steffensen et al. beschriebenen Methode durchgeführt (129).

Aqua dest.	8µl
Puffer	5µl
dNTP	8µl
SSP1	5µl
RP 14	5µl
HGH1	5µl
HGH2	5µl
TAQ Polymerase (1:10)	4µl

Testvolumen: 22.5µl +2.5µl genomische DNA; Gesamtvolumen: 25µl.

PCR- Programm:

Denaturierung :	95°C, 2min.		
Denaturierung :	95°C, 30sec	}	30 Zyklen
Annealing :	60°C, 1min.		
Verlängerung :	72°C, 30sec		
Verlängerung:	72°C, 5min.		

3.2.4.5 Reaktionsansatz zur Amplifikation des FcγIIIb- Rezeptors

Aqua dest.	27µl
Puffer	5µl
dNTP	8µl
VP492	2.5µl
RP1	2.5µl
Taq- Gold Polymerase (1:10)	4µl

Testvolumen: 49µl +1µl genomische DNA; Gesamtvolumen: 50µl.

PCR- Programm:

Denaturierung sowie reaktionseinleitende Schritte:
-98°C, 10 min.
-75°C, 3 min.
-45°C, 2 min.
-72°C, 40 min.

Denaturierung :	94°C, 1 min.	40 Zyklen
Annealing :	45°C, 1 min.	
Verlängerung :	72°C, 3 min.	

Verlängerung : 72°C, 15 min.

3.2.4.6 Reaktionsansatz zur Amplifikation des Intron III

3.2.4.6.1 Reaktionsansatz zur Amplifikation des Intron III ohne Hotstart

Für die Amplifikation des Intron III wurde das Gene Amp®, XL- PCR Kit benutzt, mit dem DNA- Fragmente hergestellt werden können, die ≥5- 40 kb lang sind. Die PCR- Reaktion wurde in der Hybaid, „PCR- Express“ (Hybaid, GB) durchgeführt.

Aqua dest.	12.6µl
Puffer, 33x	15µl
dNTP	4µl
SSP1	5µl
RP6	5µl
$MgCl_2$	2.4µl
Taq– Polymerase	1µl

Testvolumen: 45µl +5µl genomische DNA; Gesamtvolumen: 50µl.

PCR- Programm:
Denaturierung : 94°C, 2min.

Denaturierung :	94°C, 15 sec	} 35 Zyklen
Annealing, :	62°C, 5 min.	
Verlängerung :	72°C, 10 min.	

3.2.4.6.2 Reaktionsansatz zur Amplifikation des Intron III mit Hotstart

Ziel des Hotstart ist es, möglichst viele spezifische DNA- Produkte und wenige unspezifische Oligonucleotide zu erhalten. Dazu wird die TAQ- Polymerase erst nach Denaturierung der DNA zu der Reaktion hinzugefügt, so dass alle PCR- Reaktionen zur gleichen Zeit beginnen.
Da die Reaktionspartner erst aufeinander treffen, wenn die Temperatur des Gemisches hoch genug ist (55°C- 58°C), binden nur wenige Primer unspezifisch an falsche DNA- Sequenzen. Die Reagenzien können entweder durch ein Wachskügelchen oder Mineralöl voneinander getrennt werden. Bei der entsprechenden Temperatur schmilzt die Trennschicht und schwimmt aufgrund geringerer Dichte an die Oberfläche des PCR- Gemisches. Dadurch werden beide Reaktionsgemische miteinander vermengt und die Amplifikation der Matrize kann anfangen.

Durchführung:
Zunächst werden alle Reagenzien mit Ausnahme der Polymerase und der DNA in sterile PCR-Stripes pipettiert. Auf den Mastermix wird vorsichtig ein Tropfen Mineralöl geschichtet. Darüber kommt dann das Gemisch aus Puffer, XL- TAQ- Polymerase und DNA- Matrize.

Mastermix ohne Polymerase:

Aqua dest.	12.6µl
Puffer, 33x	6.0µl
dNTP (10mM)	4µl
SSP1	5µl
RP6	5µl
$MgCl_2$ (25mM)	2.4µl

Testvolumen: 35.0µl.

TAQ- Polymerase und DNA- Matrize:

Puffer, 33x	9.0µl
TAQ, XL- Kit	1.0µl
DNA- Matrize	5.0µl

Gesamtvolumen: 35.0µl+ 15.0µl (bestehend aus DNA, Puffer und Polymerase)= 50µl
PCR- Programm:

Hotstart :	95°C, 5min.	
Denaturierung :	95°C, 15sec	} 35 Zyklen
Annealing :	62°C, 5min.	
Verlängerung :	72°C, 10 min.	

3.2.5 Auftrennung der PCR- Produkte auf einem Agarosegel

Um die in einer PCR entstandenen Amplifikate nachweisen zu können, werden zunächst die PCR- Produkte in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Bei der Gelelektrophorese sind folgende Kriterien von entscheidender Bedeutung, denen in der Auswahl von angelegter Spannung und verwendeter Agarose Rechnung getragen werden muss. In der Elektrophorese müssen die DNA- Fragmente durch die Poren des Agarosegels wandern, so dass sich zwangsläufig eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit für große Fragmente ergibt. Kleine Fragmente wandern dementsprechend schneller. Je nach Fragmentgröße empfiehlt es sich, eine für die geschätzte Größe der aufzutrennenden Fragmente geeignete Agarose zu nehmen. Eine weitere Möglichkeit, die Auftrennung von Fragmenten bestimmter Größe zu beeinflußen, ist die Konzentration des Agarosegels. Als Faustregel gilt, dass je größer das DNA- Fragment ist, desto niedriger muß die Konzentration des Gels angesetzt werden. Ein 1.5%-iges Agarosegel zum Beispiel trennt lineare DNA- Moleküle auf, deren Größe 0.2- 3kb ist. Ebenfalls wird die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA durch die Zusammensetzung und elektrische Leitfähigkeit des Elektrophorese- Puffers beeinflusst. Für alle durchgeführten Gelelektrophoresen wurde 1x TAE- Puffer gebraucht. Der 1x TAE- Puffer wurde aus einer 50x Stammlösung in einem Verhältnis von 20ml 50x TAE- Puffer und 1000ml Aqua dest. angesetzt. Auch die angelegte Spannung ist von grosser Bedeutung. Zwar nimmt die Elektrophorese bei niedrig angelegter Spannung mehr Zeit in Anspruch, garantiert aber eine bessere Auftrennung der Fragmente.
Damit später die aufgetrennten DNA- Fragmente sichtbar gemacht werden können, wird das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt. Ethidiumbromid interkaliert mit der doppelsträngigen DNA und sendet bei Bestrahlung mit UV- Licht Fluoreszenz aus. Das Arbeiten mit dem Ethidiumbromid sollte an einem eigens dafür vorgesehenen Platz erfolgen, um mögliche Verschleppung der mutagen und giftig wirkenden Substanz zu vermeiden. Auch auf persönlichen Schutz und dem anderer vor der Substanz muss geachtet werden. Alle mit Ethidiumbromid in Kontakt gekommenen Gegenstände werden in den Sondermüll gebracht.
Zu der elektrophoretischen Auftrennung der DNA- Fragmente wird auch ein Längenmarker mitgeführt. Die gebrauchsfertigen molekularen Längenmarker enthalten DNA- Fragmente einer bekannten Größe, die es einem ermöglichen, die Größe des eigenen Fragments durch optischen Vergleich abschätzen zu können. Vielfach besteht für die Längenmarker eine Konzentrationsangabe der einzelnen Fragmente, so dass gleichzeitig die ungefähre Konzentration des Produktes bestimmt werden kann.
Um während der Elektrophorese die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente beurteilen zu können, wird dem PCR- Produkt noch eine optische Kontrolle in Form des Auftragungspuffers (Loading- Buffer) Bromphenolblau beigemengt. So kann bestimmt werden, ob die DNA- Fragmente weit genug gelaufen sind und das Gerät abgestellt werden kann.

Durchführung:

Herstellung eines 1.5%-igen Agarosegels

0.3g Agarose werden mit 25ml 1x TAE- Puffer in einem Erlenmeyerkolben unter ständigem Rühren durch einen Magnetrührer aufgekocht. Nach Abkühlen der Agarose auf 70°C werden 2.5µl Ethidiumbromid beigefügt und gut vermischt. In einen mit Kämmen bestückten

Gelschlitten, der an den Seiten mit Isolierband abgedichtet wurde, wird die noch flüssige Gellösung eingegegossen. Es ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen im Gel gebildet haben. Entstandene Luftblasen können mit einer Pipettenspitze entfernt werden. Nach ca. 15min. ist die Agarose erkaltet und auspolymerisiert, die Kämme können jetzt vorsichtig aus der Agarose herausgelöst werden. Dort, wo der Kamm die Agarose verdrängt hat, sind nun kleine Taschen entstanden, in die später das PCR- Produkt hinein pipettiert werden kann. Von den in der PCR entstandenen Amplikons werden 5µl mit 1µl Loading- Buffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. 1µl des Längenmarkers wird mit 4µl Aqua dest. und 1µl Loading-Buffer vermischt und ebenfalls in eine Geltasche gegeben. Das Gel wird anschließend für 30min. bei 250 mA und 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend kann das Gel unter einer UV- Lampe ausgewertet werden. Das Ergebnis kann mit einer Sofortbildkamera festgehalten werden, die Belichtungszeit beträgt 2sec, bei auf 11 eingestellter Blende. Innerhalb von 45sec ist das Bild entwickelt.

3.2.6 Aufreinigung von DNA- Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA- Fragmenten dient der Isolierung des gewünschten PCR-Produktes aus einem Verband von Zusatzprodukten. Es sollte dabei mit einer genügend großen Menge an PCR- Produkt gearbeitet werden, da bei der Elution des Produktes aus dem Agarosegel ein erheblicher Anteil der DNA verloren geht. Für die Aufreinigung wurde das Qiaquick Gel Extraction Kit benutzt.

Durchführung:

Zunächst wird das PCR- Produkt auf einem 1%-igem Seakem GTG Agarosegel (0.2g Seakem Agarose +20ml TAE- Puffer) elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wird das Gel unter einer UV- Lampe ausgewertet und mit einem sterilen Skalpell die gewünschte Bande herausgeschnitten, deren Größe und Lage mittels des mitgeführten Längenmarkers ermittelt wird. Beim Arbeiten unter der UV- Lampe muß für UV- Schutz unbedeckter Körperpartien gesorgt werden, da bereits nach wenigen Minuten ein Erythem die Folge ist. Die isolierten DNA- Fragemente werden mit Hilfe der Qiavac 6s Manifold und dem Qiaquick Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers aus der Agarose eluiert und in 30-50µl Aqua dest. gelöst. Damit nach der Elution die Konzentration des DNA- Fragments bestimmt werden kann, lässt man 1µl des PCR- Produktes +1µl Loading- Buffer auf einem 1.5%-igem Agarosegel laufen. Für den mitgeführten Längenmarker bestehen bereits Konzentrationsangaben, so dass sich die Konzentration des isolierten PCR- Produktes durch optischen Vergleich abschätzen läßt.

3.2.7 Die Präparation von Granulozyten

Die Isolierung von Granulozyten erfolgt nach einer modifizierten Methode der ursprünglich von Bøyum im Jahre 1968 entwickelten Vorgehensweise (11). Granulozyten mit ihrer Fähigkeit zur Exo- und Endozytose beherbergen eine Vielzahl von lytischen Enzymen. Werden Granulozyten durch exogene Reize aktiviert, wie das schon bei der Blutentnahme der Fall sein kann, so beginnt eine Kaskade enzymatischer Reaktionen innerhalb der Zellen, die

letztendlich eine Zellyse zur Folge haben. Aufgrund dieser Tatsache sind Granulozyten nur für kurze Zeit lagerbar und die Isolierung der Zellen aus dem Frischblut sollte eine Zeitdauer von maximal anderthalb Tagen nicht überschreiten.

Ammoniumchloridlösung:	-1.55 M NH_4Cl
	-0.1 M $KHCO_3$
	-1mM Na_2-EDTA, pH 7.4
Dextran Lösung:	-10g Dextran T 250 ad 200ml
	-PBS o. Ca^{2+} und Mg^{2+} pH 7.2
PBS o. Ca^{2+} und Mg^{2+}	-10ml PBS Ca^{2+} und Mg^{2+} (10x) ad 1000ml H_2O

Durchführung:

Zu einem Probenröhrchen mit 10 ml Heparinblut (10ml Vollblut +100µl Heparin) werden 2.5ml einer 5%-igen Dextranlösung hinzugefügt. Es folgt eine Inkubationszeit von 30 min. bei 37°C, wobei die Röhrchen schräg in einen Ständer gestellt werden. Die Dextranlösung bewirkt eine Sedimentation der Erythrozyten, die Leukozyten hingegen bleiben im Plasma suspendiert. Pro Probe werden je zwei Poly- Röhrchen mit 2.5ml einer Ficoll-Paque Lösung vorbereitet. Jetzt wird der leukozytenhaltige Überstand vorsichtig mit einer Pasteur Pipette auf das Ficoll-Paque geschichtet und für 20 min. bei 1200 U/min. zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren wird die Probe ihrer Dichte entsprechend in verschiedene Schichten unterteilt: am Boden des Röhrchens liegt ein Pellet aus Erythrozyten, über diesem befinden sich Granulozyten. Es folgt eine Schicht aus Ficoll, an die wiederum eine Schicht aus Plasma angrenzt. Zwischen Ficoll und Plasma ist die sogenannte Interphase, die T- und B-Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten enthält. Nach Absaugen des Überstandes wird das verbleibende Granulozyten- und Erythrozyten- haltige Pellet mit 2ml einer Ammoniumchlorid- Lösung versetzt und für 5min. in ein Eisbad gelegt. Die verbliebenen Erythrozyten werden so lysiert. Anschließendes Waschen der Granulozyten in PBS ohne Calcium entfernt dann verbleibende Erythrozyten und Proteinreste. Die Granulozyten können nun in autoklavierte, silikonisierte 1.7ml Eppendorf Tubes überführt werden.

3.2.8 Isolierung von RNA aus Granulozyten

Die Isolierung intakter DNA aus Granulozyten basiert auf der von Chomczynski im Jahre 1987 entwickelten Methode (30). Dabei wird Guanidinisothiocyanat hinzugefügt, welches als stark denaturierende Substanz die Degradation der RNA durch RNasen verhindert. Die Isolierung selber erfolgt aus Granulozyten, die aus 10ml Heparinblut (10ml Vollblut + 100µl Heparin) gewonnen wurden. Bei der RNA- Isolierung sollte darauf geachtet werden, dass an einer sterilen Werkbank mit autoklavierten Gerätschaften gearbeitet wird, um mögliche Kontaminationen mit RNasen oder Fremd- DNA zu vermeiden. Für die RNA- Isolierung wurde sowohl eine Fällung mit Trizol als auch eine Fällung mit dem Roti©- Quick Kit vorgenommen.

3.2.8.1 Isolierung von RNA aus Granulozyten mit dem Roti ©- Quick Kit

Pro 0.2g Zellmaterial werden 2.0ml Lösung1 (Gunanidinisothiocyanat) hinzugefügt und zur Lyse durch eine Pipettenspitze geschert. Nach diesem Schritt kann das Zellysat bei -70°C für unbestimmte Zeit gelagert werden. Zu den Granulozyten werden nun im nächsten Schritt 2.6ml 4°C kalte Lösung 2 (Phenol/ Chloroform- Suspension) hinzugefügt und gut gevortext. Dieser Schritt dient der Entfernung von im Lysat enthaltenen Proteinresten. Anschließend wird der Ansatz für 10min. auf Eis inkubiert und danach bei 10000rpm für 15min. bei 4°C zentrifugiert. Die entstandene obere, wässrige Phase ist RNA- haltig. Sie wird abgehoben und zum Fällen der RNA mit 2.0ml Lösung 3 (Isopropanol) vermischt. Es folgt erneutes Zentrifugieren bei 10000rpm für 15min. bei 4°C. Nach der Zentrifugation wird der Überstand verworfen und das RNA- haltige Pellet in je 600µl Lösung 1 und 3 gelöst. Der Ansatz wird für 30min. bei -20°C inkubiert. Um die RNA zu sedimentieren wird eine 30- minütige Zentrifugation bei 13000rpm und 4°C Außentemperatur angeschlossen. Noch verbliebene Proteinreste werden durch zweimaliges Waschen des RNA- Pellets mit 70%-igem Ethanol entfernt. Schließlich sollte das RNA- Pellet gründlich vom Ethanol befreit und in 50µl DEPC (Pyrokohlensäurediäthylester) Wasser gelöst werden. Die OD der gewonnenen RNA kann in 200µl sterilem Wasser mit dem Photometer bestimmt werden. Sie sollte nur kurzfristig bei -70°C gelagert werden.

3.2.8.2 Isolierung von RNA aus Granulozyten mit Trizol

Für die Isolierung wurden Granulozyten genommen, die zuvor, wie in Kapitel (3.2.7) beschrieben, präpariert wurden. Pro Eppendorf- Gefäß werden ca. 5- 10x 10^6 Granulozyten gebraucht. Zu den auf Eis gelagerten Granulozyten wird 1ml TRIzol- Reagenz hinzugefügt. Durch mehrmaliges Scheren der Zellen durch eine Pipettenspitze werden diese lysiert und anschließend 5min. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Um die RNA von anhaftenden Proteinen zu befreien, werden zum Zellysat 200µl Chloroform hinzugegeben und gut gevortext. Es folgt eine erneute Inkubation für 5min. bei Zimmertemperatur, nach der die Lösung für 20min. bei 12000rpm und 4°C zentrifugiert wird. Vorsichtig wird nun die entstandene RNA- haltige, wässrige Phase in ein neues Eppendorf- Gefäß umgefüllt. Dabei sollte die DNA- haltige Interphase nicht berührt werden. Zur Fällung der RNA werden zu der wässrigen Lösung 0.5ml Isopropanol hinzugefügt und für 10min. bei Zimmertemperatur inkubiert. Nachdem die Lösung für 10min. bei 4°C und 12000rpm zentrifugiert wurde, wird der entstandene Überstand vorsichtig vom präzipitierten Pellet abgegossen. Im zweiten Waschschritt wird das verbliebene Pellet in 1ml 70%-igem Ethanol gelöst, gut gevortext und für 10 min. bei 4°C und 12000rpm zentrifugiert. Der verbliebene Überstand wird vorsichtig abgegossen und das RNA- Pellet bei geöffnetem Deckel 15min. im Eppendorf- Gefäß getrocknet. Jetzt kann das Pellet in 20µl- 60µl TE- Puffer gelöst bei -70°C kurzfristig gelagert werden.

3.2.9 Umschreibung von RNA in cDNA

Die Umschreibung von RNA in cDNA erfolgt mit dem Enzym Reverse Transkriptase (RT). Das Enzym katalysiert die Bindung eines komplementären DNA- Stranges an eine mRNA-Matrize. Dazu benötigt es als Startpunkt eine doppelsträngige Nucleinsäure, die in Form eines synthetischen Oligonucleotids beigefügt wird. Das Oligonucleotid besteht aus einer Kette von 15 Thymidinmonophosphatresten (Oligo- dT_{15}), die an den Poly (A)- Schwanz der mRNA komplementär binden.

Durchführung:

Zu 10µl RNA in einem sterilen Eppendorf- Gefäß werden 2µl Oligo- dT NB2 und 8µl Aqua dest. hinzugefügt und für 10min. bei 70°C inkubiert. Dadurch wird eine Auflösung der Sekundärstrukturen bewirkt. Nachdem die Lösung abgekühlt ist, werden

- 7µl Aqua dest.,
- 10µl Strang- Puffer (5x),
- 5µl DTD
- 2µl RNAsin (80U)
- 3µl dNTP- Mix, mit 25mM eines jeden Nucleotids

dazugegeben. Der Ansatz wird für 2min. bei 42°C inkubiert. Anschließend werden noch 3µl Superscript hinzupipettiert. Die Reaktionslösung wird in folgender Temperatur Reihenfolge inkubiert:

60min. bei 42°C, in diesem Schritt erfolgt die Polymerisationsreaktion;
10min. bei 50°C;
15min. bei 70°C, in diesem Schritt werden die Enzyme denaturiert.

Im letzten Schritt werden die Enzyme denaturiert. Nachdem die Lösung abgekühlt ist, werden noch 1µl RNAse H hinzugefügt und für 20min. bei 37°C inkubiert. Noch verbliebene RNA-Reste werden in diesem Schritt entfernt. Die entstandene cDNA kann bei -20°C gelagert werden.

3.2.10 Die Sequenzierung

Das von Sanger 1977 entwickelte Prinzip der Sequenzierung beruht auf dem der PCR (117). Bei der Sequenzierung werden neben dNTPs sogenannte dNTP- analoge Didesoxynucleosidtriphosphate (ddNTP), gebraucht. Da den ddNTPs die 3´- Hydroxylgruppe fehlt, kann mit der 5´- Triphosphatgruppe des nachfolgenden Nucleotids keine Phosphodiesterbindung hergestellt werden. Es kommt daher beim Einbau der ddNTPs in die naszierende Kette zu einem vorzeitigen Kettenabbruch. Somit entstehen, je nach Zeitpunkt des Einbaus, DNA- Fragmente unterschiedlicher Größe. Jedes ddNTP ist mit einem Marker versehen, der früher aus einer radioaktiv markierten Base, heutzutage aus einem mit Fluoreszenz versehenem Farbstoff besteht.
Anfänglich musste für jede der Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin eine getrennte Sequenzierungsreaktion durchgeführt werden, die anschliessend manuell elektrophoretisch

aufgetrennt wurde. Inzwischen bedient man sich unterschiedlich gefärbter Fluoreszein-Farbstoffe, die eine Spezifität für jede Base aufweisen. Damit kann die Sequenzanalyse in einer Reaktion vollzogen werden.
Die handelsfertige Fluoreszenzlösung Big Dye® von ABI PRISM enthält nebst Puffern und Polymerase die vier unterschiedlich markierten ddNTPs. Nach erfolgter PCR- Reaktion werden die Amplikons im Sequenziergerät vollautomatisiert in einer Elektrophorese aufgetrennt. Dabei wird das Polyacrylamidgel in eine dünne Glaskapillare aufgezogen und in das Probengefäß eingeführt. Eine an die Kapillare angebrachte Spannung bewirkt eine Auftrennung der Amplikons ihrer Größe nach. Anschliessend tastet der im Gerät enthaltene Laser die Kapillare ihrer Länge nach ab und registriert die Signale der enthaltenen fluoreszenzmarkierten Basen. An den Sequenzierer ist ein Computer angeschlossen, mit dessen Software die ermittelten Signalausschläge verarbeitet und als zusammenhängende Sequenz widergegeben werden (4).

3.2.10.1 PCR- Ansatz und Programm für die Sequenzierung

Big Dye© Termination Ready Reaction Mix (dNTP, ddNTP und Polymerase):	4µl
Primer (VP/ RP):	1µl
PCR- Produkt:	Menge je nach Konzentration des PCR-Produktes
Aqua dest.:	auf insgesamt 20µl Endprodukt auffüllen

Der PCR- Ansatz wird in sterile PCR- Stripes pipettiert und sollte nach Möglichkeit vor Lichteinfluß geschützt werden, um die Fluoreszenz der markierten ddNTP nicht zu schwächen. Die zu untersuchende DNA sollte eine Mindestkonzentration von 20ng/µl aufweisen, da sowohl zu niedrige als auch zu hohe Konzentrationen der DNA zu Fehlern im Ablesemechanismus führen. Die Konzentrationsbestimmung kann sowohl im Photometer als auch im optischen Vergleich mit einem Agarosegel bestimmt werden.

PCR- Programm für die Sequenzierung:

Denaturierung :	96°C, 10sec	25 Zyklen
Annealing :	45°C- 60°C, 5 sec	
Verlängerung :	60°C, 4min.	

3.2.10.2 Aufbereitung der Proben für die Sequenzanalyse

Nach der Sequenzierungs- PCR folgt eine Ethanolfällung, wie bereits in Kapitel (3.2.3) beschrieben. Die gründlich vom Ethanol befreiten Produkte werden anschließend in 25µl Template Suppression Reagent (TSR) gelöst. Der TSR soll bei der Sequenzanalyse auftretende Störfaktoren wie schlechte Fragmentauftrennung und Hintergrundfluoreszenz minimieren. Unmittelbar vor der Sequenzierung für 2min. bei 95°C werden sie denaturiert und für 5min. auf Eis abgekühlt. Die zu sequenzierenden Produkte werden in eigens für den Sequencer konzipierte Gefäße umgefüllt und können dann in die Maschine gestellt werden.

3.2.11 Der Light- Cycler

Mit dem Light- Cycler lassen sich sowohl quantitative als auch qualitative PCR- Analysen durchführen. Die Light- Cycler Technologie bietet zwei Vorteile, zum einen eine zeitliche Verkürzung des PCR- Prozesses durch sogenanntes „rapid thermal cycling“, zum anderen die Möglichkeit, die Amplifikation der Produkte während des eigentlichen PCR- Vorganges zu verfolgen.
Rapid thermal cycling ermöglicht eine Amplifikation spezifischer DNA- Sequenzen innerhalb von 10- 15min. Dabei wird die in dem Gerät erzeugte temperierte Luft mit einem Ventilator in die zylindrische Probenkammer geleitet, wodurch eine gleichmässige Umgebungstemperatur für die verschiedenen PCR- Schritte ermöglicht wird. Auch die als dünne Glaskapillare konzipierten Gefäße tragen zu einem schnellen Temperaturübergang zwischen den einzelnen Reaktionsabläufen bei, da die Wärmeübertragung zwischen Umgebung und den in der Kapillare enthaltenen Reagenzien erleichtert wird (151).
Das Prinzip des Light- Cyclers beruht aus der Emission von Fluoreszenz, welche von dem Reaktionsstoff SYBR Green I abgegeben wird. SYBR Green I ist ein dsDNA- spezifischer Farbstoff, bei dem die Emission von Fluoreszenz durch Interkalierung mit doppelsträngiger DNA verstärkt wird. Da die Menge an Fluoreszenz von der vorhandenen Konzentration an dsDNA abhängig ist, verstärkt sich die im Laufe des PCR- Prozesses gemessene Signalintensität. Gemessen wird die Fluoreszenz, indem die Spitze der Kapillare mit gefiltertem Licht der Wellenlänge 450- 490nm bestrahlt wird. Von hier aus wird auch das vom SYBR Green emittierte Licht aufgenommen. Nach jedem Annealing- Schritt wird die Fluoreszenz bei einem vorgegebenen Temperaturplateau ermittelt (151; 152). Es hat sich gezeigt, dass die Menge an gemessener Fluoreszenz von der Temperatur abhängig ist. Damit ist ein für diesen Schritt angepasstes Temperaturmillieu unabdingbar (91).
Ein an den Light- Cycler angeschlossener Computer zeichnet die Fluoreszenz (F1) in Abhängigkeit von der Zahl der erfolgten PCR- Zyklen auf und wandelt sie in eine Graphik um. Die Vermehrung der DNA- Amplikons verläuft ab einer bestimmten Zykluszahl exponentiell, bis sie an ihrem Maximum angelangt, stagniert. Es resultieren typische sigmaförmigen Kurven, die in späteren Zyklen in einem Plateau auslaufen. Je nach vorhandener Menge findet bei einer hohen Konzentration an DNA das exponentielle Wachstum der Kurven schon zu einem frühen Zeitpunkt der Reaktion statt, oder erst sehr spät, wenn wenig DNA in der Probe vorhanden ist. Allerdings werden von dem Gerät auch die Lichtemissionen unspezifischer Produkte erfasst, die in Form von Oligonucleotiden und Primerkomplexen (Primer- Dimer) vorhanden sein können. Die Fluoreszenz unspezifischer Produkte kann bei der Auswertung zu Fehlinterpretationen führen, wird sie nicht als solche erkannt (151; 153).
Um zwischen spezifischen und unspezifischen Amplikons unterscheiden zu können, wird am Ende der PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Schmelzkurve eines jeden Amplikons ist von dessen GC/ AT- Verhältnis, Länge und Sequenz abhängig. Wird ein Amplikon auf 95°C erhitzt, so wird die Fluoreszenz bei Erreichen des für ihn spezifischen Schmelzpunktes, welches mit seinem Zerfall in Einzelstränge gleichzusetzen ist, rapide abnehmen. Es entsteht ein scharfer Knick in der Fluoreszenz- Kurve, die zumeist im Bereich hoher Temperaturen liegt. Unspezifische Produkte hingegen weisen einen eher flachen Kurvenverlauf auf, auch ist ihr Schmelzpunkt bei einer niedrigeren Temperatur erreicht. Anschliessend werden die gewonnenen Ergebnisse durch die Light- Cycler Software aufgearbeitet und die ermittelte Fluoreszenz als negative Ableitung in Abhängigkeit zur

Temperatur darstellt. Es ergeben sich die sogenannten „melting peaks“, die ein Maximum ihrer Fluoreszenz in Höhe des für das Amplikon spezifischen Schmelzpunktes aufweisen (113).
Grundlage einer quantitativen DNA- Analyse einzelner Proben bildet eine Verdünnungsreihe, die aus DNA- Standards hergestellt wurde. Diese Standards enthalten DNA einer bekannten Konzentration und werden anschliessend in mehreren Potenzschritten verdünnt. Anhand einer Formel wird die zu erwartende Anzahl an DNA- Kopien in den Standards berechnet (Abb. 3.2).

$$\text{Anzahl (Kopien/µl)} = 6 \times 10^{23}\ \text{(Kopien/mol)} \times \text{Konzentration (g/µl)} \times \text{MW (g/mol)}^{-1}$$

(Abb. 3.2:) Formel zur Berechnung der zur erwartenden DNA- Kopienanzahl in einer DNA- Standardprobe.

Die errechneten Kopiezahlen werden als logarhytmische Funktion der vom Gerät gemessenen Kopienzahlen aufgetragen. Aus der entstehenden Gerade werden dann durch die Software Korrelationskoeffizient und Standardabweichung ermittelt. Standardkurven dienen der Konzentrationsbestimmung noch unbekannter DNA- Proben. Je mehr Standards zur Konzentrationsanalyse herangezogen werden, desto genauer wird das resultierende Ergebnis.
Ein Nachteil des Light- Cyclers ergibt sich aus der Titrierung und Verarbeitung der DNA. Sowohl bei der photometrischen DNA- Konzentrationsbestimmung als auch bei anschliessender Verdünnung der Proben ergeben sich unweigerlich Pipettierfehler, die sich in Schwankungen der DNA- Konzentrationen niederschlagen. Damit diese Fehler möglichst gering bleiben beziehungsweise vermieden werden, müssen die Proben vor jedem Versuch gründlich gevortext werden, da sich die DNA bei längerem Stehen am Boden eines Gefässes absetzt. Ferner sollte darauf geachtet werden, dass keine Flüssigkeit an Pipettenspitze oder Wand des Reaktionsgefässes haften bleibt, da auch kleinste Konzentrationsänderungen das Ergebnis erheblich beeinflussen können.

3.2.11.1 Beschreibung des Light- Cycler Gerätes

Die Probenkammer des Light- Cyclers befindet sich im oberen, die Optik für die Fluoreszenzmessung am unteren Anteil des zylindrisch aufgebauten Gerätes. Alle Proben werden in einen drehbaren Aufsatz eingefügt, wodurch sie abwechselnd über die Optik gefahren werden können. Die Lichtquelle der Optik besteht aus einer Diode, welche blaues Licht emittiert. Abgestrahltes Licht wird in meheren Schritten gefiltert und gebündelt der Spitze der Probenkapillare zugeführt, von wo es auch wieder gesammelt und an Photoreteptoren weitergelenkt wird. Filter und Lichtquelle lassen sich individuell verstellen. Ein mittig gelegenes Heizgerät erzeugt temperierte Luft, die durch die vom benachbarten Ventilator ausgehenden Zentrifugalkräfte gleichmässig über die Probenkammer verteilt werden. An den Light- Cycler ist ein Computer angeschlossen, der mit einer auf das Gerät zugeschnittenen Software betrieben wird. Gewonnene Informationen werden gesammelt und anschliessend von der Software verarbeitet.

3.2.11.2 Bedienung der Software und Einstellungen am Computer

Zusammenfassend soll noch auf einige wichtige Punkte eingegangen werden. Die Messdaten-Erfassung durch den Light- Cycler wird durch „Acquisition Mode“ definiert. Es existieren verschiedene Einstellungen, mit denen jede Kapillare entweder einmal oder kontinuierlich im entsprechenden Programmsegment gemessen wird, letzteres wird bei Erstellung einer Schmelzkurve benötigt. Vor dem PCR- Lauf werden unter „Analysis Modi“ die Analysearten der Reaktion festgelegt, wobei zwischen „Quantification“ (Quantifizierung), „Melting Curves“ (Schmelzkurvenerstellung) oder „None“ (keine Analyse) gewählt werden kann. Weiterhin müssen unter „Fluorimeter Gains“ die Verstärkungsfaktoren der Fluoreszenz einzelner Messkanäle festgelegt werden. Die Verstärkungsfaktoren sind von den eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffen abhängig und können dem jeweils verwendeten Kit entnommen werden. Vor jedem Probenlauf müssen die berechneten Konzentrationen der Standards sowie ihre Bezeichnung unter „Edit Samples“ in den Computer eingegeben werden.
Nach dem Lauf können die quantifizierten Proben ausgewertet werden. Unter „Analysis“ wird die Quantifizierungsmethode der Proben ausgewählt. Die Methode „Fit Points“ ist weitgehend manuell, „Second Derivative Maximum“ hingegen läuft vollautomatisiert ab. Prinzipiell gilt, dass „Fit Points“ für jede Art der Quantifizierung geeignet ist, während „Second Derivative Maximum“ besonders bei Proben mit Kopiezahlen von >1000 Kopien/ Ansatz eingesetzt werden sollte. Bevor die Quantifizierung durchgeführt wird, sollte ein sogenanntes „Baseline Adjustment“ durchgeführt werden, um unspezifische Fluoreszenzemissionen, die als Hintergrundrauschen auftreten, zu entfernen. Von den vier möglichen Optionen wird die Einstellung „Arithmetic“ für Experimente mit SYBR Green empfohlen.
Bei einer Quantifizierung mit der Fit Points- Methode können mit Hilfe eines sogenannten „Noise Bands“ die Daten ohne Informationsgehalt, zum Beispiel ein Hintergrundrauschen, manuell abgetrennt werden. Dabei wird nur noch der Teil der sigmoiden Kurve dargestellt, mit dem quantifiziert wird, während Störfaktoren ausgeblendet sind. An den logarhytmisch-linearen Bereich der Kurve wird nun eine nicht sichtbare Gerade angelegt. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der x- Achse wird als „Crossing Point“ bezeichnet. Unter „Number of points“ wird die Anzahl der Messpunkte festgelegt, die im logarhytmisch- linearen Bereich verwendet werden, um die Gerade anzulegen. Die Vorgabe, mit der in der Regel gute Ergebnisse erzielt werden, sind zwei Punkte. Zur Quantifizierung wird eine Standardkurve erstellt. Dazu werden die „Crossing points“ der Standardproben gegen die bekannten Konzentrationen der Standardproben aufgetragen. Anhand dieser Standardgeraden werden die unbekannten Proben quantifiziert. Die Güte der Standardgeraden wird charakterisiert durch „Slope“, der Steigung der Geraden, „Intercept“, der Zykluszahl, bei der die Gerade die y-Achse schneidet, „Error“, dem Standardfehler als Summe des Quadrats der Fehler und „r“, dem linearen Korrelationskoeffizienten. Die berechneten Werte werden unter „Calculated Copies“ in einer vom Computer erstellten Tabelle zusammen mit den Probennnamen aufgelistet. Bei dem Analyse- Modus „Second Derivative Maximum“ werden die „Crossing Points“, die Standardkurve sowie die Konzentration weitgehend automatisiert mit Hilfe der zweiten Ableitung der Fluoreszenzkurve ermittelt.

3.2.11.3 Herstellung einer Verdünnungsreihe

Als DNA- Standards dienten gereinigte als HNA-1b typisierte FcγRIIIb- Plasmide, die nach einer von Bux et al. beschriebenen Methode hergestellt wurden (27). Dazu wurde aufgereinigte cDNA mit Klenow DNA- Polymerase (Biolabs, Bad Schwalbach) gespült und anschliessend in den *Eco*RV locus des Säugetier Expressionsvektors pcDNA3 (Invitrogen, Leek, Nederlande) subkloniert. Um eine regelrechte Insertion zu überprüfen, wurden die Konstrukte mit der Endonuclease Kpn 1 verdaut und mit PCR und Restriktionsanalyse auf ihre FCGR3B*1-, -*2- und -*3- Allele hin untersucht.
Ausgehend von der Stammlösung des FcγRIIIb- Plasmids, deren Konzentration 2ng Plasmid/µl betrug, wurden Verdünnungsreihen in Zehnerpotenz Abständen hergestellt. Dazu wurden 10µl Plasmid der Stammlösung mit 90µl Aqua dest. vermischt und über mindestens 2min. gevortext. Mit der entstandenen 0.2ng/µl haltigen Plasmidlösung wurde ebenso verfahren, so dass am Ende eine Verdünnungsreihe der Plasmidlösung von 2ng/µl bis hin zu $2x10^{-8}$ng/µl entstand.

3.2.11.4 Light- Cycler PCR- Ansatz, Programm und Einstellungen am Gerät

Das Programm bestand aus einem Denaturierungsschritt sowie vierzig Amplifikationsschritten. Am Ende eines jeden Laufes wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Nach jedem Zyklus der Amplifikationsphase wurde die Fluoreszenzmessung (F) einmal gemessen, während der Erstellung der Schmelzkurve hingegen wurde sie kontinuierlich durchgeführt.

Segment 1, Denaturierung, (1x)
D: 95°C, 2min.; Temperaturübergangszeit 20°C/sec

Segment 2, Amplifikation, (40x)
D: 95°C, 0sec, Temperaturübergangszeit 20°C/ sec
A: 58°C, 7sec, Temperaturübergangszeit 20°C/ sec
P: 72°C, 10sec, Temperaturübergangszeit 20°C/ sec
F: 82°C, 5sec, Temperaturübergangszeit 5°C/ sec

Segment 3, Schmelzkurve, (1x)
D: 95°C, 0sec, Temperaturübergangszeit 20°C/ sec
70°C, 10sec, Temperaturübergangszeit 20°C/ sec
F: 95°C, 0sec, Temperaturübergangszeit 0.2°C/ sec, kontinuierlich

PCR- Ansatz:

Aqua dest.:	11.6µl
$MgCl_2$, 4mM:	2.4µl
VP:	1µl

RP:	1µl
Light- Cycler DNA Master SYBR Green I:	2µl
Gesamtvolumen Mastermix:	18µl
Hinzugefügte DNA:	2µl

Der Light- Cycler DNA Master SYBR Green I enthält 1.25U Fast Start TAQ- Polymerase, 10x TAQ- Puffer, 2mM von jedem dNTP und 10x SYBR Green I.

PCR- Durchführung

Der Mastermix wird gründlich gevortext und je 18µl an den Rand der Light- Cycler Glaskapillare pipettiert. Die Kapillaren werden während des Ansetzens in einem dafür vorgesehenen, auf 4°C vorgekühlten Thermoblock gelagert. Das Ansetzen erfolgt unter einer sterilen Werkbank. Anschliessend wird an einem gesondertem Ort die gründlich gevortexte DNA hinzugefügt, die Kapillaren mit einem Plastikstopfen versiegelt und bei 1000rpm für 30sec gefugt. Dadurch wird der Mastermix ausreichend mit der DNA vermengt und gelangt durch die Zentrifugation in die tiefer gelegenen Anteile der Kapillare. Die Kapillaren werden dann vorsichtig in den Rotor des Light- Cycler- Gerätes eingebracht und der PCR- Lauf kann gestartet werden. Während Herstellung und nachfolgender Verarbeitung des Mastermix sollte darauf geachtet werden, dass die Proben vor Licht geschützt sind.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Verteilung von HNA-1a, HNA-1b und HNA-1c mit Hilfe einer sequenzspezifischen PCR in den Proben der Populationsstudie

Die Untersuchung der Allelverteilung von FCGR3B*1, -*2 und -*3 erfolgte mit zufällig ausgewählten Rhesus- negativen DNA- Proben aus Bangladesch, Ghana, Papua- Neu Guinea, Simbabwe sowie von in Südafrika beheimateten Populationen asiatischen Ursprungs, farbigen Spendern aus Südafrika und Amerikanern afrikanischer Herkunft. Die in ihrer Menge 20µl entsprechenden Proben waren von unterschiedlicher Konzentration und Reinheit. Sie wurden uns freundlicherweise von Dr. G. Daniels, Bristol, England, zur HNA- Typisierung überlassen. Außerdem wurden noch DNA- Proben von Chinesen aus Taiwan untersucht. Die aus Taiwan stammenden Proben wurden uns freundlicherweise von Frau M. Lin, National Health Research Institue, Taipei, Taiwan überlassen.

4.1.2 Sequenzspezifische PCR für HNA-1a, HNA-1b und HNA–1c

Die HNA-1a-, -1b- und HNA-1c- Typisierung erfolgte mit Primern, die in ihrer Zusammensetzung eine Spezifität für die Allele FCGR3B*1, FCGR3B*2 und FCGR3B*3

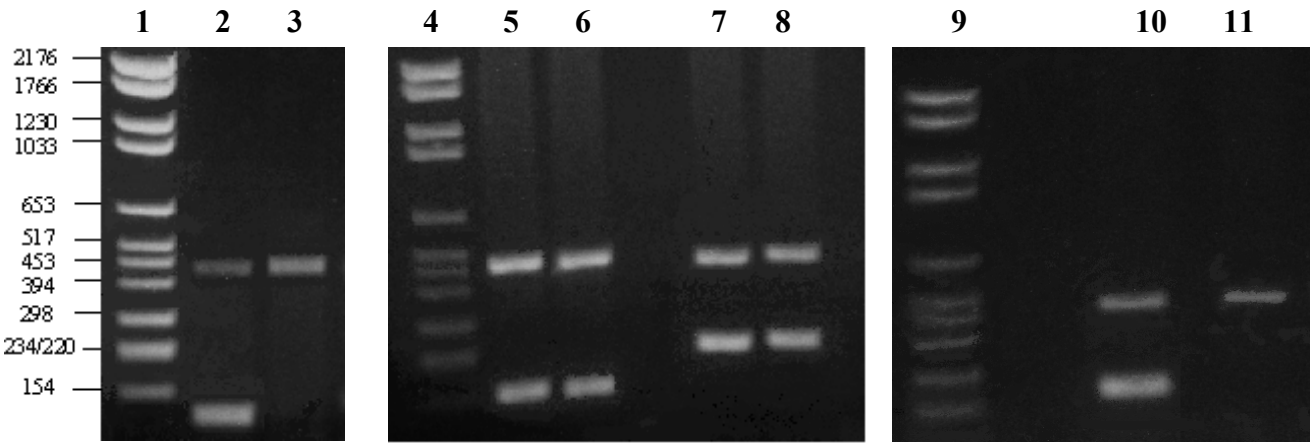
gewährleisten (Tab. 4.1). Die Vorwärtsprimer SSP1 (HNA-1b) und SSP5 (HNA-1a) sind für das jeweilige HNA- Allel spezifisch, der für die HNA-1a- als auch für die HNA-1b-Typisierung angewandte Rückwärtsprimer SSP3 dagegen ist nur für den FcγRIII spezifisch. Um die in der PCR gewonnenen Ergebnisse sichtbar zu machen, wurden die PCR- Produkte auf einem
1.5%-igen Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid angefärbt. Unter UV- Licht zeigten sich dann die für die jeweiligen Allele spezifischen Banden. Als interne Positivkontrolle diente das HGH- Gen.

Primer	Nucleotidsequenz, 5´→3´	Position	Spezifität	Annealing
HNA-1a Primer, SSP5	CAGTGGTTTCACAATG**T**GA<u>A</u>	208 –277	FcγRIIIb/ HNA-1a	57°C
HNA-1b Primer, SSP1	CAATGGTACAG<u>C</u>GTGCT<u>T</u>	130 –147	FcγRIIIb/ HNA-1b	57°C
Rückwärtsprimer, SSP3	ATGGACTTCTAGCTGCAC	348 –331	FcγRIIIa, -b	57°C
HNA-1c Vorwärtsprimer, VP9	AAGATCTCCCAAAGGCTGTG	95-115	FcγRIIIa, -b	60°C
HNA-1c Rückwärtsprimer, RP8	ACTGTCGTTGACTGTGTCA<u>T</u>	285-266	FcγRIIIb/ HNA-1c	60°C
HGH 1	CAGTGCCTTCCCAACCATTCCCTTA		HGH 1	57°C
HGH 2	ATCCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTTC		HGH 2	57°C

(Tab. 4.1:) PCR- Primer für die HNA-1a-, -1b- und HNA-1c- Typisierung mit sequenzspezifischen Primern (SSP). *Basen, die den HNA- Polymorphismus markieren, sind <u>unterstrichen</u>, Basen, welche zusätzliche, beabsichtigte Fehlpaarungen markieren, sind **fett** gedruckt.*

4.1.2.1 Sequenzspezifische PCR für HNA-1a und HNA-1b

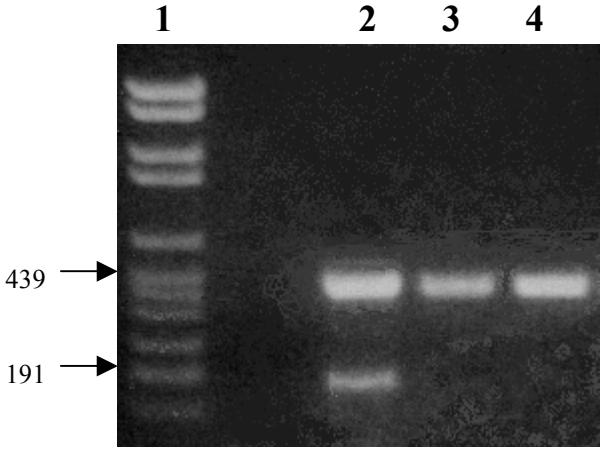
Um ein Individuum vollständig auf seinen HNA- Genotyp hin zu untersuchen, müssen zwei getrennte Reaktionsansätze für HNA-1a und HNA-1b, angesetzt werden. Das spezifische PCR- Produkt für HNA-1a beträgt 141bp, das für HNA-1b 219bp. Die Größe der Bande des als interne Positivkontrolle verwandte HGH misst 439bp.
Wird nun eine HNA-1a- homozygote Probe auf ihre Allelzugehörigkeit hin typisiert, so zeigt sich in dem HNA-1a- spezifischen Reaktionsansatz sowohl das 141bp große, HNA-1a-spezifische Produkt, als auch die 439bp große Bande des HGH- Gens. In dem HNA-1b-spezifischen Reaktionsansatz dagegen ist lediglich die Anwesenheit des HGH- Gens nachzuweisen, die das Vorhandensein von DNA anzeigt, ein spezifisches Produkt jedoch fehlt.
Eine HNA-1b- homozygote Probe hingegen zeigt in dem HNA-1b- spezifischen Ansatz die für
HNA-1b typische 219bp große Bande sowie die interne Positivkontrolle. In dem HNA-1a-spezifischen Ansatz aber ist nur die interne Positivkontrolle nachweisbar. Dementsprechend lassen sich für die HNA-1a/HNA-1b- heterozygote Probe in beiden Reaktionsansätzen die für die jeweiligen Allele spezifischen Produkte als auch die Produkte des HGH- Gens nachweisen (Abb.4.1).



(Abb.4.1:) Auftrennung der PCR- Produkte von HNA-1a- homozygoten, HNA-1a/ HNA-1b- heterozygoten und HNA-1b- homozygoten Proben. *In den Reihen 1, 4, 9 ist der Molekulare Längenmarker VI von Boeringer- Mannheim mit den entsprechenden Längenabschnitten zu sehen; Reihe 2 zeigt das Ergebnis einer HNA-1a- homozygoten Probe mit dem für HNA-1a- spezifischen Primerpaar SSP5 und SSP3 sowie der internen Positivkontrolle für das HGH- Gen. Die HNA-1a- spezifische Bande liegt bei ungefähr 141 bp, die der internen Positivkontrolle liegt bei 439bp. In Reihe 3 ist die gleiche HNA-1a- homozygote Probe mit dem für HNA-1b- spezifischen Primerpaar SSP1 und SSP3 und der internen Positivkontrolle für HGH bearbeitet worden. Zu sehen ist nur das Produkt für das HGH- Gen. In den Reihen 5, 6, 7 und 8 sind die Produkte für ein HNA-1a/ HNA-1b- heterozygotes Individuum aufgeführt. Reihen 5 und 6 zeigen das HNA-1a- spezifische Produkt bei 141 bp. Reihen 7 und 8 zeigen das HNA-1b- spezifische Produkt bei 219bp. Die interne Positivkontrolle ist in allen Reihen zu sehen. Reihe 10 zeigt das HNA-1b- spezifische Produkt mit SSP1 und SSP3 bei 219bp, die interne Positivkontrolle ist ebenfalls zu sehen. In Reihe 11 ist das gleiche Individuum mit dem für HNA-1a- spezifischen Primerpaar SSP5 und SSP3 bearbeitet worden. Zu sehen ist lediglich die interne Positivkontrolle.*

4.1.2.2 Sequenzspezifische PCR für HNA-1c

Die HNA-1c- positive Probe zeichnet sich durch ein 191bp großes, spezifisches PCR- Produkt aus, in der HNA-1c- negativen Probe ist nur die interne Positivkontrolle nachweisbar. (Abb.4.2)



(Abb.4.2:) Auftrennung einer HNA-1c- positiven und zwei HNA-1c- negativen Proben. *In Reihe 1 ist der Molekulare Längenmarker VI von Boeringer- Mannheim zu sehen. Reihe 2 zeigt eine mit dem Primerpaar VP9 und RP8 bearbeitete HNA-1c- positive Probe mit der 191bp großen spezifischen Bande für HNA-1c. Die interne Positivkontrolle für das HGH- Gen ist bei 439bp zu sehen. Reihen 2 und 3 zeigen HNA-1c- negative Proben, in der lediglich das 439bp grosse Produkt für das HGH-Gen nachzuweisen ist.*

4.1.3 Verteilung der FCGR3B*1-, -*2- und -*3- Allele in den Proben der Populationsstudie

Hinsichtlich der Häufigkeit der Allele FCGR3B*1, -*2 und -*3 ist die Verteilung derselben abhängig von der Population, aus der die Proben entnommen wurden (Tab. 4.2 und 4.3). So ist in Bevölkerungsgruppen, die aus Afrika stammen (Ghana, Simbabwe, farbige Südafrikaner, Amerikaner afrikanischer Herkunft) oder sich mit Afrikanern vermischt haben (Südafrikaner asiatischer Herkunft), eine im Vergleich zu HNA-1a höhere Anzahl von Individuen zu erkennen, die das FCGR3B*2- Allel entweder in homozygoter oder in heterozygoter Form tragen. Die Genotypfrequenzen in Prozent betragen für Ghana 0.44 (HNA-1a) und 0.44 (HNA-1b), für Simbabwe 0.36 (HNA-1a) und 0.64 (HNA-1b), für die Amerikaner afrikanischer Herkunft 0.41 (HNA-1a) und 0.59 (HNA-1b) und für die farbigen Südafrikaner 0.37 (HNA-1a) und 0.63 (HNA-1b). Die Proben der Südafrikaner asiatischer Herkunft zeigen ebenfalls eine höhere Frequenz des FCGR3B*2- Allels mit Genotypfrequenzen von 0.48 (HNA-1a) und 0.52 (NA2). In den Proben aus Ghana wurden vier Individuen gefunden, die sich durch das Fehlen des FCGR3B- Gens auszeichnen. Bei Proben aus dem asiatischen Raum oder entsprechender Herkunft (Chinesen aus Taiwan, Papua- Neu Guinea, Bangladesch) lässt sich dagegen eine höhere Frequenz des FCGR3B*1- im Vergleich zum FCGR3B*2- Allel nachweisen. So waren die Genotypfrequenzen wie folgt verteilt: Papua- Neu Guinea 0.33 (HNA-1a) und 0.67 (HNA-1b), Bangladesch 0.57 (HNA-1a) und 0.43 (HNA-1b) sowie den Chinesen aus Taiwan 0.68 (HNA-1a) und 0.32 (HNA-1b).
Hinsichtlich der Verteilung des FCGR3B*3- Allels läßt sich ein vermehrtes Vorkommen des FCGR3B*3- Allels in den Proben afrikanischer Herkunft nachweisen. Keine der aus Papua-Neu Guinea oder Taiwan stammenden Proben zeigte das Vorkommen des FCGR3B*3- Allels an. Die Häufigkeit des FCGR3B*3- Allels in den Proben aus Bangladesch und denen der Südafrikaner asiatischer Herkunft ist annähernd gleich und nimmt einen Mittelwert zwischen den afrikanischen und taiwanesischen Proben ein. Die Verteilung des FCGR3B*3- Allels in Abhängigkeit von der Probenanzahl ist wie folgt: Ghana 7/34 (21.0%), Bangladesch 7/52 (13.5%), Südafrikaner asiatischer Herkunft 3/23 (13.0%), Simbabwe 6/14 (42.9%), farbige Südafrikaner 3/43 (6.9%), Amerikaner afrikanischer Herkunft 13/56 (23.2%). Die Verteilung von HNA-1c, entsprechend den verschiedenen Genotypen der HNA-1a/ -1b Verteilung, ist in (Tab. 4.4) aufgeführt. In keiner mit dem Primerpaaren SSP1/ SSP5 und SSP3 untersuchten Proben wurde ein HNA-1a- homozygoter Träger des FCGR3B*3- Allels gefunden.

Population	(n)	Anzahl der verschiedenen Genotypen			
		HNA-1a/HNA-1a	HNA-1a/HNA-1b	HNA-1b/HNA-1b	NA null
Papua- Neu Guinea	34	5	13	16	∅
Ghana	34	6	18	6	4
Bangladesch	52	16	27	9	∅
Südafrikaner asiatischer Herkunft	23	2	18	18	∅
Simbabwe	14	∅	10	4	∅
Farbige Südafrikaner	43	1	30	12	∅
Amerikaner afrikanischer Herkunft	56	13	20	23	∅
Chinesen aus Taiwan	138	63	62	13	∅

(Tab. 4.2:) Verteilung der Genotypfrequenzen HNA-1a- homozygoter, HNA-1a/HNA-1b- heterozygoter und HNA-1b-homozygoter Proben in den verschiedenen Bevölkerungen. *(n) gibt die Anzahl der bearbeiteten Proben an, die Zahlenwerte unter den jeweiligen Genotypen zeigen die Menge der entsprechend der PCR- SSP typisierten Proben. Der Genotyp „NA- Null" steht für das Fehlen des FcγRIIIb in dem dazugehörigen Individuum, d.h. es konnte kein FcγRIIIb nachgewiesen werden. Das Zeichen ∅ bedeutet, daß das jeweilige Allel in keiner der untersuchten Proben der entsprechenden Bevölkerungsgruppe gefunden wurde. Alle Proben wurden mit den von Bux (24) beschriebenen Primern SSP1, SSP5 und SSP3 untersucht, siehe auch (Tabelle 4.1).*

Population	Häufigkeit der Genotypen in Prozent (%)				Genotyp-Frequenzen	
	HNA-1a/ HNA-1a	HNA-1a/ HNA-1b	HNA-1b/ HNA-1b	NA- null	HNA-1a	HNA-1b
Papua- Neu Guinea	14.7	38.2	47.0	∅	0.33	0.67
Ghana	17.6	52.9	17.6	11.7	0.44*	0.44*
Bangladesch	30.7	51.9	17.3	∅	0.57	0.43
Südafrikaner asiatischer Herkunft	8.7	78.2	13.0	∅	0.48	0.52
Simbabwe	∅	71.4	28.6	∅	0.36	0.64
Farbige Südafrikaner	2.3	69.7	27.9	∅	0.37	0.63
Amerikaner afrikanischer Herkunft	23.2	35.7	41.1	∅	0.41	0.59
Chinesen	45.7	44.9	9.4	∅	0.68	0.32

(Tab. 4.3:) Prozentuale Auswertung der in Tabelle (4.2) aufgeführten Genotypenhäufigkeit. *Im rechten Teil der Tabelle sind die Genotypfrequenzen für HNA-1a und HNA-1b angegeben. *Wird zu den aufgeführten Genotypfrequenzen von HNA-1a und HNA-1b noch die Häufigkeit der FcγRIIIb- defizienten Proben hinzugerechnet, so erhält man den Ausgangswert (1.0).*

Population	(n)	Prozentuale Häufigkeit des FCGR3B*3-Allels	Genotypen		
			HNA-1a/ HNA-1a	HNA-1a/ HNA-1b	HNA-1b/ HNA-1b
Papua- Neu Guinea	∅	∅	∅	∅	∅
Ghana	7/34	21.0%	∅	5	2
Bangladesch	7/52	13.5%	∅	3	4
Südafrikaner asiatischer Herkunft	3/23	13.0%	∅	3	∅
Simbabwe	6/14	42.9%	∅	4	2
Farbige Südafrikaner	3/43	6.9%	∅	2	1
Amerikaner afrikanischer Herkunft	13/56	23.2%	∅	5	8
Chinesen aus Taiwan	∅	∅	∅	∅	∅

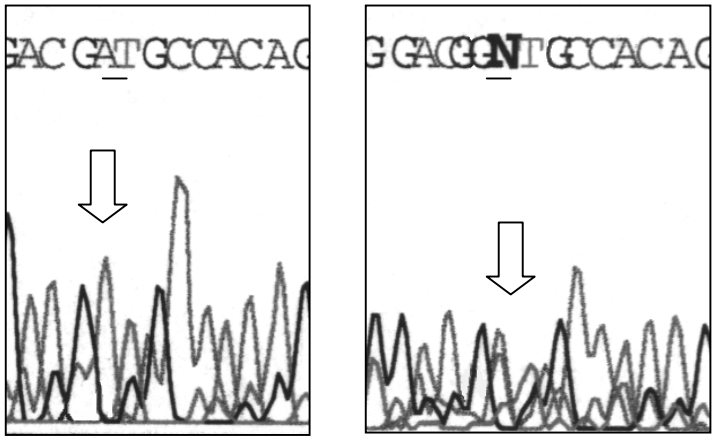
(Tab. 4.4:) Verteilung der Genotyp- Häufigkeiten der HNA-1c- positiven Proben. *(n) gibt die Anzahl der bearbeiteten Proben an, die Zahlenwerte unter den jeweiligen Genotypen zeigen die Menge der entsprechend der in der PCR mit den sequenzspezifischen Primern typisierten Proben. Das Zeichen ∅ bedeutet, dass das jeweilige Allel in keiner der untersuchten Proben der entsprechenden Bevölkerungsgruppe gefunden wurde.*

4.2 Frequenz von zwei oder drei FCGR3B- Genen in 37 HNA-1c-positiven Proben bestehend aus 33 ausgesuchten HNA-1c-positiven Proben aus der Populationsstudie sowie 4 als HNA-1c-positiv typisierten Patienten

Es wurden 37 HNA-1c- positive Proben nach der Anzahl ihrer FCGR3B- Gene hin untersucht. Die Proben setzten sich aus 4 HNA-1c- positiven Patienten und 33 HNA-1c- positiven Proben aus der Populationsstudie zusammen. Um die Anzahl der vorhandenen FCGR3B- Gene bestimmen zu können, wurden sowohl eine Sequenzanalyse als auch eine sequenzspezifische PCR (PCR- SSP) durchgeführt.

4.2.1 Sequenzierung der 33 ausgesuchten HNA-1c- positiven Proben der Populationsstudie sowie den 4 als HNA-1c- positiv typisierten Patienten

Die Sequenzierung der HNA-1c- positiven Proben erfolgte an einem DNA- Fragment des FcγRIIIb, welches mit dem für die HNA-1b- Typisierung verwendeten Primern vervielfältigt wurde. Das 219 bp lange Fragment wurde anschließend unter der Zugabe von Didesoxynucleotiden erneut amplifiziert. Als Vorwärtsprimer für die Sequenzierungs- PCR wurde der HNA-1b- spezifische Primer SSP1 und der Rückwärtsprimer SSP3 benutzt (Tab. 4.1). Nach entsprechender Aufbereitung der Amplikons konnten sie der Sequenzanalyse im ABI- Prism 310 Sequencer zugeführt werden. Ob im betreffenden Fall zwei oder drei Gene vorliegen, läßt sich anhand des Vorhandenseins von einem oder zwei Signalausschläge („Peaks“) an der Stelle der HNA-1c- Punktmutation 266bp, C→A, FCGR3B) unter Berücksichtigung des Genotyps bestimmen. Liegen drei FCGR3B- Gene vor, so zeigt sich an der Stelle 266bp ein Peak sowohl für die Base Cytosin, die der Sequenz des FcγRIIIb/ HNA-1b entspricht, als auch ein Peak für Adenin, dem Produkt der HNA-1c- Punktmutation. In der Probe ist demnach ein Gen für FCGR3B/ HNA-1b und eines für FCGR3B/ HNA-1c vorhanden. Man nennt dieses Phänomen auch „Double peak“. Sind jedoch nur zwei Gene enthalten, so läßt sich lediglich ein Peak für Adenin nachweisen, es liegt also ein „Single peak“ vor (Abb. 4.3).



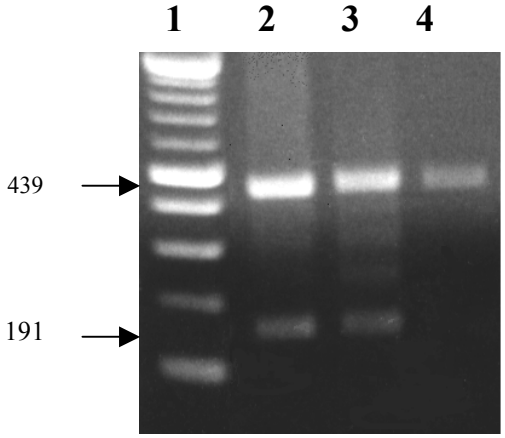
(Abb. 4.3:) Darstellung eines „Single-„ bzw. „Double peaks“ in der Folge einer Sequenzierung. *Die Peaks sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die HNA-1c- Punktmutation ist unterstrichen. Im Falle des „Single peaks“ ist nur die Base Adenin gelesen worden. Beim „Double peak“ ist der Signalausschlag für Adenin als auch für Cytosin gleich stark, so dass das Sequenzierungsgerät lediglich ein „N“ (entsprechend „nicht lesbar“) ausgedruckt hat.*

4.2.2 Unterscheidung zwischen den FCGR3B*2- und FCGR3B*3-Allelen in HNA-1a/ HNA-1b/ HNA-1c- heterozygoten Proben mittels sequenzspezifischer PCR

Die sequenzspezifische PCR mit dem HNA-1b- spezifischem Vorwärtsprimer SSP1 und dem Rückwärtsprimer SSP3 läßt zwar eine genaue Genotypisierung von HNA-1a/HNA-1b-heterozygoten HNA-1c- negativen Proben zu, ist aber nicht spezifisch für die HNA-1c-Punktmutation. Da die HNA-1c- Mutation innerhalb des Bereiches der angegebenen Primer liegt und immer mit dem Phänotyp HNA-1b einhergeht, wird der sie umgebende Bereich in einer PCR mit dem Primerpaar SSP1/ SSP3 amplifiziert und lässt das FCGR3B*3- Allel als vermeintlich HNA-1b- spezifisches Produkt in der PCR erscheinen. Eine eigentlich HNA-1c-positive, aber HNA-1b- negative Probe wird so mutmaßlich als eine HNA-1b- enthaltende Probe typisiert. Genotypisch läge jedoch eine HNA-1b- negative, HNA-1c- positive Probe vor. Um unterscheiden zu können, ob im Fall einer HNA-1a/ -1b- heterozygoten/ HNA-1c-positiven Probe auch tatsächlich Heterozygotie für HNA-1a und HNA-1b vorliegt, wurden die von Steffensen et al. (129) entwickelten sequenzspezifischen Primerpaare benutzt. Der Vorwärtsprimer ist der für HNA-1b- spezifische SSP1, der Rückwärtsprimer RP14 (bp266-bp285) enthält an seinem 3´- Ende ein Guanin, entsprechend der HNA-1b- Sequenz in Position 266 des FcγRIIIb (Tab. 4.5). Damit wird der FcγIIIb- Rezeptor, der die HNA-1c-Punktmutation enthält, mit diesem Primerpaar nicht amplifiziert. HNA-1a/ -1b/ -1c-heterozygote Individuen werden also ein spezifisches Produkt für HNA-1b aufweisen; HNA-1a/ -1c- positive Individuen hingegen nicht. Das spezifische Produkt hat eine Länge von 191bp. Als interne Positivkontrolle wurde das Primerpaar für das HGH- Gen genommen (Tabelle 4.5). Das PCR- Produkt wurde auf 1.5%-igem Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und durch UV Licht sichtbar gemacht (Abb. 4.4).

Primer	Nucleotidsequenz, 5´→3´	Position	Spezifität	Annealing
HNA-1b Rückwärtsprimer, RP14	ACTGTCGTTGACTGTGTCA**G**	266 -285	FcγRIIIb/ HNA-1b	60°C
HNA-1b Vorwärtsprimer, SSP1	CAATGGTACAG<u>C</u>GTGCT<u>T</u>	130 –147	FcγRIIIb/ HNA-1b	57°C

(Tab. 4.5:) Der HNA-1b- spezifische Rückwärtsprimer RP14 mit seiner Nucleotidsequenz. *Basen, die den HNA-Polymorphismus markieren, sind <u>unterstrichen</u>; Basen, die im Vergleich zu HNA-1c für HNA-1b spezifisch sind, sind **fett** gedruckt.*



(Abb. 4.4:) Auftrennung von DNA- Fragmenten, die mit den HNA-1b spezifischen Primern RP14 und SSP1 (129) amplifiziert wurden. *Mit dem Primerpaar RP14 und SSP1 kann das FCGR3B*2- Allel von dem Phänotypisch als HNA-1b erscheinendem FCGR3B*3- Allel unterschieden werden. In Reihe 1 ist ein molekularer Längenmarker mit Banden im Abstand von 100bp dargestellt. Die Proben von Reihen 2-4 sind alle als HNA-1c- positiv typisiert worden. In Reihen 2 und 3 ist eine HNA-1b-spezifische Bande mit einer Grösse von 191bp sowie das HGH- Gen als interne Positivkontrolle (439bp) gezeigt. Beide Proben enthalten sowohl ein FCGR3B*2- und FCGR3B*3- Allel. Reihe 4 zeigt eine HNA-1c- positive Probe. Sie enthält kein FCGR3B*2- Allel.*

4.2.3 Verteilung und Auswertung der Anzahl von zwei oder drei FCGR3B- Genen in den 33 ausgesuchten HNA-1c- positiven Proben der Populationsstudie sowie den 4 HNA-1c- positiv typisierten Patienten

In den 37 HNA-1c- positiven Proben war mit dem Primerpaar SSP1/ SSP3 folgende Genotypenverteilung zu erkennen: HNA-1a- homozygote Proben: 0, HNA-1a/HNA-1b-heterozygote Proben: 21, HNA-1b- homozygote Proben: 16 (Tabelle 4.4). Wurden diese Genotypisierungen aber mit den Sequenzierungsergebnissen und den Ergebnissen mit der SSP- PCR mit SSP1 und RP14 verglichen, so zeigte sich folgende Verteilung: HNA-1a-homozygote Proben: 8, HNA-1a/HNA-1b- heterozygote Proben: 14, HNA-1b- homozygote Proben: 13. Unter den Proben waren zwei in denen sich nur HNA-1c nachweisen liess (Tab. 4.6). Die Genotypenbestimmung der Proben mit den Ergebnissen der PCR- SSP mit RP14 und SSP1 und den Sequenzierungsergebnissen erfolgte nach folgendem Prinzip: Proben, die aufgrund der Genotypisierung mit SSP1/ SSP3 ein Produkt für HNA-1b und –1c aufweisen, müssen in der Sequenzierung ein „Double peak“ und in der PCR- SSP mit RP14 und SSP1 ein HNA-1b- spezifisches Produkt aufweisen. Findet sich aber in den beiden oben genannten

Analysen kein Hinweis auf ein spezifisches Produkt für HNA-1b, so wurde in der PCR mit SSP1 und SSP3 lediglich HNA-1c amplifiziert und als vermeintliches FCGR3B*2- Allel interpretiert. Die Proben AA754 und AA620 wurden zwar in der PCR mit SSP1/ SSP3 als HNA-1b- homozygot typisiert, zeigten hingegen weder in der Sequenzierung noch in der PCR- SSP mit RP14/ SSP1 ein spezifisches Produkt für HNA-1b. Daraus läßt sich folgern, dass beide Proben nur ein einziges Allel enthalten, nämlich das FCGR3B*3- Allel. Die Anzahl der FCGR3B- Gene eines HNA-1c- positiven Individuums ist nach vollständiger Analyse der Sequenzierungs- und Genotypisierungsergebnisse wie folgt zu bewerten: HNA-1a/ HNA-1b- heterozygote Proben sind Träger dreier FCGR3B- Gene, HNA-1a- bzw. HNA-1b- homozygote Proben enthalten zwei oder drei FCGR3B- Gene. Die genaue Anzahl der FCGR3B- Gene lässt sich hier nur durch eine quantitative PCR festlegen. Proben, in denen nur HNA-1c nachzuweisen war, können sowohl ein als auch zwei FCGR3B- Gene enthalten (Tab. 4.7).

		Genotypisierung mit		Sequenzierung		Genotypisierung mit
Proben-nummer	HNA-1c-positive Probe	SSP1/5+ SSP3		„Peak“- Anzahl		SSP1+ RP14
		HNA-1a	HNA-1b	Single peak	Double peak	Spezifisches Produkt
1)	Patient 1	∅	+	∅	+	+
2)	Patient 2	+	+	∅	+	+
3)	Patient 3	+	+	∅	+	+
4)	Patient 4	+	+	∅	+	+
5)	B 433	+	+	+	∅	∅
6)	B 435	∅	+	∅	+	+
7)	B 437	+	+	+	∅	∅
8)	B 465	∅	+	∅	+	+
9)	B 507	+	+	∅	+	+
10)	G 555	+	+	∅	+	+
11)	G 559	∅	+	∅	+	+
12)	G 560	+	+	∅	+	+
13)	G 574	+	+	∅	+	+
14)	G 577	∅	+	∅	+	+
15)	SAA 593	+	+	+	∅	∅
16)	SAA 594	+	+	∅	+	+
17)	Z 406	+	+	∅	+	+
18)	Z 409	∅	+	∅	+	+
19)	Z 412	+	+	+	∅	∅
20)	Z 413	+	+	+	∅	∅
21)	Z 415	+	+	+	∅	∅
22)	Z 420	∅	+	∅	+	+
23)	SAC 599	∅	+	∅	+	+
24)	SAC 692	+	+	∅	+	+
25)	SAC 743	+	+	∅	+	+
26)	AA 614	+	+	∅	+	+

27)	AA 620	∅	+	+	∅	∅
28)	AA 621	∅	+	∅	+	+
29)	AA 624	∅	+	∅	+	+
30)	AA 668	∅	+	∅	+	+
31)	AA 670	+	+	∅	+	+
32)	AA 719	+	+	+	∅	∅
33)	AA 722	∅	+	∅	+	+
34)	AA 723	∅	+	∅	+	+
35)	AA 754	∅	+	+	∅	∅
36)	AA 759	∅	+	∅	+	+
37)	AA 760	+	+	+	∅	∅

(Tab. 4.6:): Ergebnisse der Sequenzierung und der PCR- SSP- Typisierung der 37 HNA-1c- positiven Proben mit dem spezifischen Primerpaar SSP1 und RP14 für HNA-1b. *Angegeben sind auch die Genotypisierungsergebnisse mit dem Primerpaar SSP1/5 und SSP3, welche zwar für die FCGR3B*1-, -*2- Allele, jedoch nicht für die HNA-1c- Mutation spezifisch sind. Positive Ergebnisse sind mit einem (+) markiert, negative Ergebnisse sind mit einem ∅ markiert.*

Proben-nummer	HNA-1c- positive Probe	Genotyp nach der Auswertung	Anzahl der FCGR3B- Gene
1)	Patient 1	HNA-1b, -1c	2 oder 3
2)	Patient 2	HNA-1a, -1b, -1c	3
3)	Patient 3	HNA-1a, -1b, -1c	3
4)	Patient 4	HNA-1a, -1b, -1c	3
5)	B 433	HNA-1a, -1c	2 oder 3
6)	B 435	HNA-1b, -1c	2 oder 3
7)	B 437	HNA-1a, -1c	2 oder 3
8)	B 465	HNA-1b, -1c	2 oder 3
9)	B 507	HNA-1a, -1b, -1c	3
10)	G 555	HNA-1a, -1b, -1c	3
11)	G 559	HNA-1b, -1c	2 oder 3
12)	G 560	HNA-1a, -1b, -1c	3
13)	G 574	HNA-1a, -1b, -1c	3
14)	G 577	HNA-1b, -1c	2 oder 3
15)	SAA 593	HNA-1a, -1c	2 oder 3
16)	SAA 594	HNA-1a, -1b, -1c	3
17)	Z 406	HNA-1a, -1b, -1c	3
18)	Z 409	HNA-1b, -1c	2 oder 3
19)	Z 412	HNA-1a, -1c	2 oder 3
20)	Z 413	HNA-1a, -1c	2 oder 3
21)	Z 415	HNA-1a, -1c	2 oder 3
22)	Z 420	HNA-1b, -1c	2 oder 3
23)	SAC 599	HNA-1b, -1c	2 oder 3
24)	SAC 692	HNA-1a, -1b, -1c	3
25)	SAC 743	HNA-1a, -1b, -1c	3
26)	AA 614	HNA-1a, -1b, -1c	3
27)	AA 620	HNA-1c	1 oder 2

28)	AA 621	HNA-1b, -1c	2 oder 3
29)	AA 624	HNA-1b, -1c	2 oder 3
30)	AA 668	HNA-1a, -1b, -1c	3
31)	AA 670	HNA-1a, -1b, -1c	3
32)	AA 719	HNA-1a, -1c	2 oder 3
33)	AA 722	HNA-1b, -1c	2 oder 3
34)	AA 723	HNA-1b, -1c	2 oder 3
35)	AA 754	HNA-1c	1 oder 2
36)	AA 759	HNA-1b, -1c	2 oder 3
37)	AA 760	HNA-1a, -1c	2 oder 3

(Tab. 4.7:) Anzahl der FCGR3B- Gene einer jeweiligen HNA-1c- positiven Probe. *Die aufgeführten Genotypen entsprechen denen, die mit der PCR- SSP mit dem HNA-1b- spezifischen Primerpaar SSP1 und RP14 ermittelt wurden.*

4.2.4 Verteilung der FCGR3B*1-, -*2- und -*3- Allele in den Proben der Populationsstudie unter Berücksichtigung der Genotypenverteilung der HNA-1c- positiven Proben

Unter Berücksichtigung der Genotypisierungsergebnisse der HNA-1c- positiven Proben mit RP14/ SSP1 ergibt sich folgendes Verteilungsmuster für die Proben der verschiedenen Bevölkerungen (Tab. 4.8):

Population	(n)	Anzahl der Genotypen			Allelfrequenzen	
		HNA-1a/HNA-1a	HNA-1a/HNA-1b	HNA-1b/HNA-1b	FCGR3B*1	FCGR3B*2
Papua- Neu Guinea	34	5	13	16	0.33	0.67
Ghana	34	6	18	6	0.44	0.44
Bangladesch	52	17	26	9	0.58	0.42
Südafrikaner asiatischer Herkunft	23	3	17	3	0.5	0.5
Simbabwe	14	3	7	4	0.46	0.54
Farbige Südafrikaner	23	2	18	3	0.37	0.63
Amerikaner afrikanischer Herkunft	56	14	19	21	0.42	0.54
Chinesen aus Taiwan	138	63	62	13	0.68	0.32

(Tab. 4.8:) Unter Berücksichtigung der Genotypisierungsergebnisse der HNA-1c- positiven Proben (Kapitel 4.1.3) erneute Auswertung der Allelfrequenzen. *Für die Allelfrequenzen von HNA-1a und HNA-1b findet für Papua- Neu Guinea, Ghana, den Chinesen aus Taiwan und den farbigen Südafrikanern keine Änderung statt.*

An den Werten für Papua- Neu Guinea, Ghana, für die Chinesen aus Taiwan und für die farbigen Südafrikaner ist keine Änderung zu verzeichnen (Tab. 4.8). Für Bangladesch ist die Allelfrequenz für FCGR3B*1 von 0.57 auf 0.58 gestiegen, für FCGR3B*2 von 0.43 auf 0.42 gesunken; für die Südafrikaner asiatischer Herkunft ist die Allelfrequenz von FCGR3B*1 von 0.48 auf 0.5 gestiegen, für FCGR3B*2 von 0.52 auf 0.5 gesunken. Für die Werte aus Simbabwe ist die Allelfrequenz von FCGR3B*1 von 0.36 auf 0.46 gestiegen, für FCGR3B*2 von 0.64 auf 0.54 gesunken. Die Allelfrequenz der Amerikaner afrikanischer Herkunft ist für FCGR3B*1 von 0.41 auf 0.42 gestiegen, für FCGR3B*2 von 0.59 auf 0.54 gesunken. Hinzu

kommen hier noch 2 Individuen, deren Genotyp nur das Vorkommen von HNA-1c anzeigt, so daß sich die Gesamtzahl der Allelfrequenzen auf (1.0) addieren läßt.

4.3 Vererbungsmodus des FCGR3B*3- Allels in einer Stammbaumanalyse der Familien A, B, C und D

Es wurden vier in Deutschland beheimatete Familien (Familien A, B, C und D) auf den Vererbungsmodus des FCGR3B*3- Allels hin untersucht. Eine der Familien (Familie D) war wegen einer Neutropenie des Kindes nach der Geburt auffällig geworden. Die Neutropenie resultierte aus einer Antikörperbildung der Mutter gegen das FCGR3B*3- Allel des Kindes. Bei den anderen Familien war das Vorhandensein des FCGR3B*3- Allels bei einer Typisierung zufällig entdeckt worden. Alle Proben sind mit den HNA-1a/ HNA-1b- spezifischen Vorwärtsprimern SSP1, SSP5 und dem Rückwärtsprimer SSP3 zunächst genotypisiert worden. Die HNA-1c- Typisierung erfolgte mit dem HNA-1c- spezifischen Primerpaar VP9 und RP8. Als interne Positivkontrolle diente das Primerpaar für das HGH-Gen.

4.3.1 Sequenzierung der Proben

Die Sequenzierung der HNA-1c- positiven Proben erfolgte mit dem HNA-1b- spezifischen Vorwärtsprimer SSP1 und dem FcγRIII- spezifischen Rückwärtsprimer SSP3. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde auf das Vorhandensein von „Double-„ bzw. „Single peaks“ geachtet.

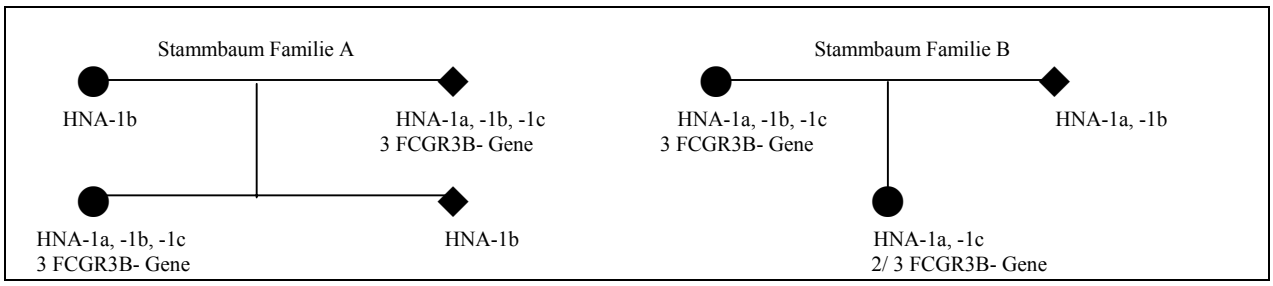
4.3.2 Differenzierung zwischen den FCGR3B*2- und FCGR3B*3- Allelen mit einer sequenzspezifischen PCR

Eine Differenzierung zwischen dem FCGR3B*2- und dem FCGR3B*3- Allel wurde mit Hilfe des Primerpaares RP14 und SSP1 erreicht. Die komplementäre Sequenz des Primers zum FCGR3B*2- Allel an der Position 266 des FcγRIIIb zeigt bei Vorhandensein des FCGR3B*2- Allels ein spezifisches Produkt und läßt somit eine Unterscheidung zwischen dem FCGR3B*2- und dem FCGR3B*3- Allel zu. Die PCR- Produkte wurden nach ihrer Auftrennung auf 1.5%-igem Agarosegel mit Ethidiumbromid angefärbt und unter dem UV Licht sichtbar gemacht.

4.3.3 Stammbaumanalyse

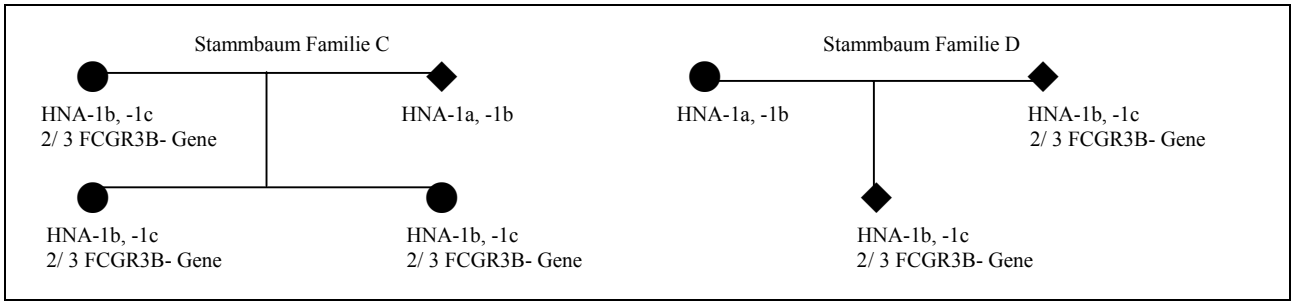
In Familie A ist der HNA-1a/ HNA-1b- heterozygote Vater Träger des FCGR3B*3- Allels, die HNA-1b- homozygote Mutter hingegen ist HNA-1c- negativ. Von den Kindern ist nur die Tochter Trägerin des FCGR3B*3- Allels. Beide, Vater und Tochter, haben drei FCGR3B-Gene. Der Sohn ist wie die Mutter HNA-1b- homozygot. In Familie B ist sowohl die HNA-1c-positive Mutter als auch der HNA-1c- negative Vater HNA-1a/ HNA-1b- heterozygot. Die Tochter ist eine HNA-1a- homozygote Trägerin des FCGR3B*3- Allels. Auch hier ist die

HNA-1c- positive Mutter Trägerin von drei FCGR3B- Genen, die Tochter könnte zwei oder drei FCGR3B- Gene haben.



(Abb. 4.5:) Vererbung des FCGR3B*3- Allels, welches in beiden Fällen an das FCGR3B*1- Allel gekoppelt ist. *Die Genotypen und die Anzahl der FCGR3B- Gene der HNA-1c Positiven Familienmitglieder sind unter jeder Person aufgeführt.*

Die Mutter von Familie C ist eine HNA-1b- homozygote Trägerin des FCGR3B*3- Allels, der HNA-1c- negative Vater ist HNA-1a/ HNA-1b- heterozygot. Beide Töchter sind HNA-1b- homozygot und Trägerinnen des FCGR3B*3- Allels. Mutter als auch Töchter könnten demnach zwei oder drei FCGR3B- Gene haben. Familie D weist einen HNA-1c- positiven, HNA-1b- homozygoten Vater sowie eine HNA-1a/ HNA-1b- heterozygote, HNA-1c- negative Mutter auf. Das Kind ist HNA-1b- homozygoter Träger des FCGR3B*3- Allels. Sowohl Vater als auch Kind können demnach Träger zweier oder dreier FCGR3B- Gene sein.



(Abb. 4.6:) Vererbungsmodus, in dem nur das FCGR3B*3- Allel weitergegeben wurde. *Die Genotypen und die Anzahl der FCGR3B- Gene der HNA-1c- positiven Familienmitglieder sind unter jeder Person aufgeführt.*

4.4 Quantitative Untersuchung zweier FcγRIIIb- defizienter Patientinnen und ihrer Familien mit dem Light- Cycler

Die zu untersuchenden Proben kommen von zwei Familien, bei denen die Mutter als FcγRIIIb- defizient im Rahmen einer NIN des Kindes diagnostiziert wurde. Familie 1 besteht aus Vater, Mutter und einem Kind, entsprechend bezeichnet als MkV, MkM und MkK. Familie 2 zeigt eine entsprechende Konstellation und wird als RuV, RuM und RuK bezeichnet. Als Positivkontrolle diente eine HNA-1b- homozygote Probe, von der bekannt war, dass ihr Träger 2 FCGR3B- Gene besitzt. Die Standards wurden aus einer Lösung hergestellt, die 2ng/µl FcγRIIIb/ HNA-1b- Plasmid enthielt. Sie wurden in Zehnerpotenz-Schritten verdünnt, die Kopienanzahl in jeder Probe wurde mit genannter Formel errechnet.

4.4.1 Verwendete Primer

Für die Analyse wurden FcγRIIIb- spezifische Primer gewählt, die ausserhalb der Loci von HNA-1a, HNA-1b und HNA-1c liegen. Diese Lokalisation beschränkte die Analyse auf den FcγRIIIb, auf enthaltene Allelvarianten musste keine Rücksicht genommen werden. Der Vorwärtsprimer FCGRIIIBVP1 liegt in Position bp451- 473, das T in Position 1 vom 3‘ Ende zeichnet die Spezifität für den FcγRIIIb aus (5‘- ACATATTTACAGAATGGCAAAGA-3‘). Die Spezifität des von bp 580- 561 liegenden Rückwärtsprimers FCGRIIIBRP1 ist durch das C in Position 1 des 3‘ Endes bestimmt (5‘- AAGACACATTTTTACTCCCAAC-3‘). Beide Primer umschliessen ein 130bp langes Fragment (Tab. 4.9).

Primer	Nucleotidsequenz, 5´→3´	Position	Spezifität	Annealing
Vorwärtsprimer FCGRIIIBVP1	ACATATTTACAGAATGGCAAAG**A**	451 –473	FcγRIIIb	60°C
Rückwärtsprimer FCGRIIIBRP1	AAGACACATTTTTACTCCCAA**C**	580- 561	FcγRIIIb	60°C

(Tab. 4.9:) Vorwärts- und Rückwärtsprimer die für die quantitative Genanalyse der FcγRIIIb- defizienten Patientinnen und ihrer Familien gebraucht wurden. ***Fett*** *gedruckte Basen zeichnen eine Spezifität für den FcγIIIb- Rezeptor aus.*

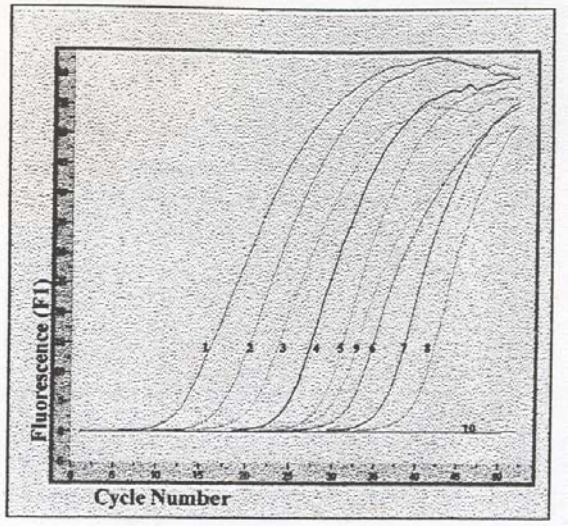
4.4.2 Ausgangskonzentrationen der DNA- Proben

Die Konzentrationen der verwendeten DNA- Proben wurden mit dem Photometer bestimmt. Die Konzentration der FcγRIIIb- Stammlösung betrug 2ng/µl. Die Proben MkV, MkK, MkM und Bu wurden alle auf den willkürlichen Wert von 0.00925ng/µl titriert. Um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei anderen Konzentrationen gewährleisten zu können, wurden die Proben RuV, RuK und RuM auf den willkürlichen Wert 0.0346ng/µl verdünnt.

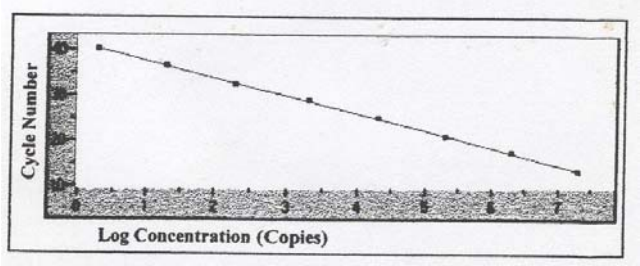
4.4.3 Verdünnungsreihe

Eine Optimierung der Reaktionsbedingungen der FcγRIIIb- PCR erfolgte an einer Reihe mit neun Verdünnungsstufen. Aus der Stammlösung wurden in absteigender Reihenfolge Verdünnungen in Zehnerpotenz- Schritten angefertigt. Als Positivkontrolle wurde eine HNA-1b- homozygote Probe gewählt, von der angenommen wurde, dass sie von einem Individuum mit zwei FCGR3B- Genen stammte (Abb. 4.7). Die Negativkontrolle bestand aus Aqua dest. Die Ergebnisse der gemessenen Kopien sind neben den errechneten Werten in (Tab. 4.10) angegeben. Schwankungen der gemessenen Kopiezahlen sind auf unvermeidbare Fehler beim Pipettieren zurückzuführen. Es zeigt sich, dass jede Verdünnung der Stammlösung um eine Zehnerpotenz zu einem um vier Zyklen späteren Anstieg der exponentiellen DNA-Amplifikation führt. In (Abb. 4.8) ist der Logarhytmus der Konzentration in Abhängigkeit zur Zykluszahl dargestellt, der Korrelationskoeffizient beträgt 1.00, der systemische Fehler ist mit 0.276 gering. Die Auswertung der Proben erfolgte im „Second Derivative Maximum“ Modus, da hier Proben mit hoher DNA- Konzentration verwendet wurden. Bei der Schmelzkurvenanalyse zeigten die spezifischen Produkte einen Temperaturgipfel bei 82°C an,

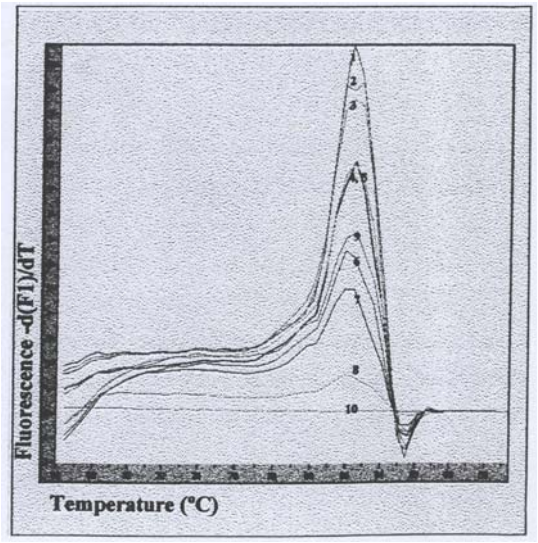
unspezifische Produkte in Form von Primer- Dimeren sind wenig vorhanden. Sie sind daran zu erkennen, dass sie bei niedrigen Temperaturen ihren Schmelzpunkt haben und sich nicht als scharf abgrenzbaren Peak darstellen lassen.(Abb.4.9).



(Abb. 4.7:) Standard DNA- Proben bestehend aus einem FcγRIIIb- Plasmid, einer Kontrollprobe und einer Negativkontrolle. *Die Kurven 1-8 stellen die FcγRIIIb- Plasmid Standardproben dar, die in Zehnerpotenz-Schritten von einer Konzentration von 20000000 DNA- Kopien bis hin zu 20 DNA- Kopien herunter verdünnt wurde. Kurve 9 stellt eine Kontrollprobe dar, von der angenommen wurde, dass ihr Träger zwei FCGR3B-Gene besitzt. Kurve 10 stellt die Negativkontrolle bestehend aus Aqua dest. dar.*



(Abb. 4.8:) Darstellung des Logarhytmus der Konzentration der DNA- Standardproben in Abhängigkeit zur Zykluszahl.



(Abb. 4.9:) Schmelzkurven- Analyse der DNA- Produkte. *Das Maximum der Melting- peaks liegt bei 82°C. Je nach Konzentration ist die gemessene Fluoreszenz unterschiedlich hoch. Kurven 1-8 stellen die DNA- Standardproben*

bestehend aus einem FcγRIIIb- Plasmid dar. Kurve 9 ist die Kontrollprobe, Kurve 10 ist die aus Aqua dest. bestehende Negativkontrolle.

FcγRIIIb Plasmid, Konzentration	Errechnete Kopienanzahl	Gemessene Kopienanzahl
10^{-2}	20000000	22.340.000
10^{-3}	2000000	1.727.000
10^{-4}	200000	209.000
10^{-5}	20000	19.080
10^{-6}	2000	1.802
10^{-7}	200	247,2
10^{-8}	20	19,08
Bu, 0.00925ng/µl		724,4
Aqua dest.		Ø

(Tab. 4.10:) Verdünnungsreihe einer FcγRIIIb- plasmidhaltigen Stammlösung mit einer Ausgangskonzentration von 2ng/µl in Zehnerpotenz- Schritten. *Die erste Probe der Verdünnungsreihe hat eine Verdünnung von 10^{-2} der Ausgangslösung, entsprechend einer Konzentration von 0.02ng Plasmid/µl. Alle weiteren Proben sind in absteigender Konzentration aufgelistet. Als unbekannte Probe wurde eine HNA-1b- homozygote Probe gewählt, von der angenommen wurde, dass entsprechendes Individuum Träger zweier FCGR3B- Gene ist. Aqua dest. wurde als Negativkontrolle genommen. Angegeben sind sowohl errechnete als auch gemessene Kopienzahlen. Ø= kein Nachweis von Amplikons.*

4.4.4. Analyse der FcγRIIIb- defizienten Patientinnen und ihrer Familien

Für die Analyse der FcγRIIIb- defizienten Familien 1 und 2 wurden Standards in einer Verdünnungreihe von 10^{-1} bis 10^{-6} gewählt. Die Negativkontrolle bestand aus Aqua dest. In der Optimierungs- PCR weist ein Individuum mit zwei FCGR3B- Genen mit einer Probenkonzentration von 0.00925ng/µl eine Kopienanzahl von 724.4/µl auf. Deswegen müssen in der Schlussfolgerung die Proben der Familienväter von Familie 1 (MkV) und Familie 2 (RuV) eine ähnliche Anzahl von FCGR3B- Genkopien aufweisen. Vernachlässigt man den vorhandenen Pipettierfehler bei der Positivkontrolle, die ca. 100 Kopien beträgt, so ergeben sich Kopienzahlen von 2341 Kopien/µl für RuV, Probenkonzentration 0.0346ng/µl und 619.2 Kopien/µl für MkV, Probenkonzentration 0.00925ng/µl. Die entsprechenden Kinder hingegen weisen eine um die Hälfte verringerte Kopienanzahl auf, da ihnen nur ein Gen vererbt wurde. Für das Kind von Familie 1 (MkK) wurde eine Konzentration von 360.4 Kopien/µl gemessen, für das Kind von Familie 2 (RuK) eine Kopienanzahl von 1352 Kopien/µl. Bei beiden Müttern von Familie 1 (MkM) und Familie 2 (RuM) konnte kein spezifisches Produkt für den FcγRIIIb nachgewiesen werden(Tab. 4.11, Tab. 4.12 und Tab. 4.13). Alle Proben wurden im „Fit Points“ Modus gemessen, da das bei den Experimenten aufgetretene Hintergrundrauschen eine genaue Auswertung gestört hätte.

FcγRIIIb- Plasmid, Konzentration	Errechnete Kopienanzahl	Gemessene Kopienanzahl
10^{-1}	200000000	236.400.000
10^{-2}	20000000	18.380.000
10^{-3}	2000000	1.971.000
10^{-4}	200000	156.600
10^{-5}	20000	20.710
10^{-6}	2000	2.304
Aqua dest.		Ø
MkV (0.00925ng/µl)		619.2
MkK (0.00925ng/µl)		360.4
MkM (0.00925ng/µl)		Ø

(Tab. 4.11:) Quantitative Untersuchung von Familie 1. FcγRIIIb- Plasmid Standards der Konzentration 10^{-1} bis 10^{-6} einer 2ng/µl Stammlösung. Quantitative Genanalyse der Familie 1 mit einer FcγRIIIb- defizienten Mutter. Vater (MkV), Kind (MkK), Mutter (MkM); Aqua dest. diente als Negativkontrolle. Ø= kein Nachweis von Amplikons.

FcγRIIIb- Plasmid, Konzentration	Errechnete Kopienanzahl	Gemessene Kopienanzahl
10^{-1}	200000000	315700000
10^{-2}	20000000	18580000
10^{-3}	2000000	1131000
10^{-4}	200000	183900
10^{-5}	20000	17940
10^{-6}	2000	2926
Aqua dest.		Ø
RuV (0.0346ng/µl)		2341
RuK (0.0346ng/µl)		1352
RuM (0.0346ng/µl)		0

(Tab. 4.12:) Quantitative Untersuchung von Familie 2. FcγRIIIb- Plasmid Standards der Konzentration 10^{-1} bis 10^{-6} einer 2ng/µl Stammlösung. Quantitative Genanalyse der Familie 2 mit einer FcγRIIIb- defizienten Mutter. Vater (RuV), Kind (RuK), Mutter (RuM); Aqua dest. diente als Negativkontrolle. Ø= kein Nachweis von Amplikons.

	Probe	Gemessene Ausgangskonzentration	Gemessene Kopienanzahl	Anzahl der FCGR3B- Gene
Familie 1	MkV	0.00925ng/µl	619.2	2
	MkK	0.00925ng/µl	360.4	1
	MkM	0.00925ng/µl	Ø	0
Familie 2	RuV	0.0346ng/µl	2341	2
	RuK	0.0346ng/µl	1352	1
	RuM	0.0346ng/µl	Ø	0

(Tab. 4.13) Vergleich der gemessenen Kopienzahlen der Familien 1 und 2 sowie die Anzahl der FCGR3B- Gene des entsprechenden Individuums. *Die Ausgangskonzentrationen der DNA- Proben sind ebenfalls angegeben. Die*

Väter der Familie 1 (MkV) und Familie 2 (RuV) weisen doppelt soviel gemessene Kopien auf als ihre Kinder (MkK, RuK). In den Proben der Mütter (MkM, RuM) waren keine Amplikons nachweisbar.

Die enstandenen Amplikons wurden aus den Kapillaren herauszentrifugiert und durch Sequenzanalyse bestätigt. Die Fluoreszenz des SYBR- Greens interagierte nicht mit dem Sequenziervorgang.

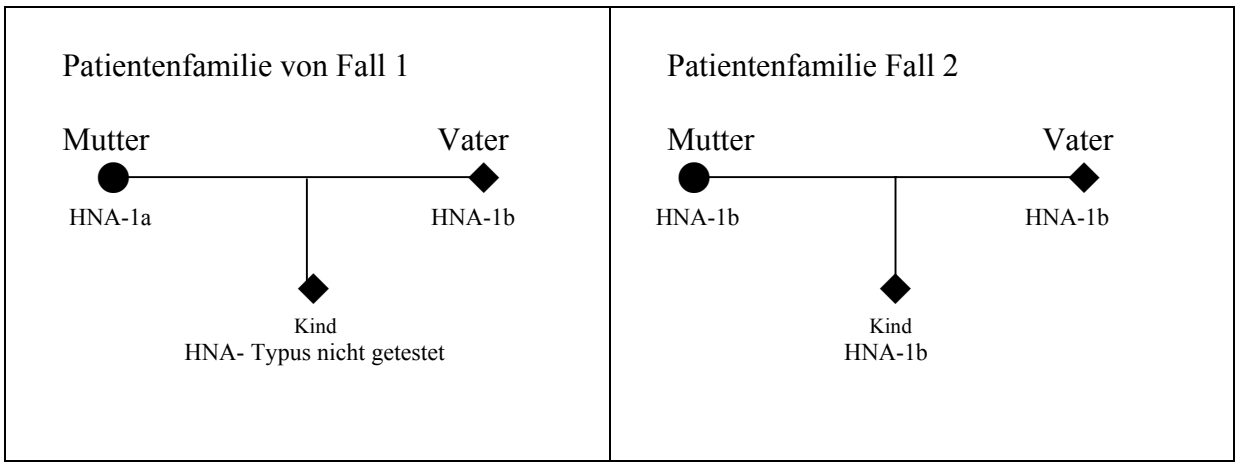
4.5 Sequenzanalyse der FcγRIIIb- Rezeptoren von Patientin 1, Fall 1 und Patientin 2, Fall 2 aus cDNA

Aufgrund einer unklaren Neonatalen Isoimmunen Neutropenie (NIN) der Kinder zweier Patientinnen sollte der FcγRIIIb der betreffenden Mütter vollständig untersucht und nach möglichen Mutationen hin abgeklärt werden. In beiden Fällen wurden Eltern und Kind mit der PCR- SSP nach Bux (25) HNA-1a, -1b und –1c typisiert und ihr Serum auf granulozytäre Antikörper getestet. Dabei lag in beiden Fällen ein positiver Antikörpernachweis seitens der Mütter vor. Aus dem Frischblut der Patientinnen wurden deswegen Granulozyten isoliert, aus denen in mehreren Arbeitsschritten cDNA gewonnen wurde, die anschliessend einer Sequenzanalyse unterzogen werden konnte.

Fallbeschreibungen:

Fall 1: Im ersten Fall konnte im Granulozytenimmunfluoreszenztest (GIFT) bei Mutter und Kind eine schwache bis starke Reaktion der Granulozyten nachgewiesen werden, welches auf das Vorhandensein von granulozytären Antikörpern schließen liess. Eine genaue Bestimmung der Antikörperspezifität wurde jedoch unterlassen, da sich die Neutropenie innerhalb von zwei Monaten zurückbildete.Die Ergebnisse der HNA-1a, -1b und –1c- Typisierung sind in (Abb. 4.10) aufgeführt. Für die HNA- Typisierung des Kindes war nicht mehr genügend Material vorhanden. Aus einer Stammbaum- Analyse kann jedoch auf den Genotyp HNA-1a/ -1b geschlossen werden. Somit bestünde eine mögliche Inkompatibilität zwischen den granulozytären Antikörpern von Mutter und Kind.

Fall 2: In diesem Fall zeigte nur die Mutter das Vorhandensein granulozytärer Antikörper, ihr GIFT reagierte stark positiv. Ein anschliessender Lymphozytenimmunfluoreszenztest (LIFT) der Mutter fiel ebenfalls positiv aus, so dass ein Vorhandensein von HLA- Antikörpern, die die NIN ausgelöst hatten, sehr wahrscheinlich ist. Hier bildete sich der Befund des Kindes ebenfalls innerhalb von zwei Monaten zurück. Es wurde deshalb ebenfalls auf eine weitere Diagnostik verzichtet. In der HNA- Typisierung zeigte sich keine Inkompatibilität zwischen den granulozytären Antigenen von Mutter und Kind, beide haben den Genotyp HNA-1b.



(Abb. 4.10:) Familienstammbaum der Patientenfamilien von Fall 1 und Fall 2. *Das Kind aus der Patientenfamilie von Fall 1 wurde mangels an Probenmaterial nicht HNA-1a, -1b und –1c typisiert, jedoch kann aus dem Stammbaum auf den Genotyp HNA-1a/ -1b geschlossen werden.*

4.5.1 Herstellung von cDNA

4.5.1.1 Isolierung von Granulozyten aus Frischblut

Zunächst wurden anhand der in Kapitel (3.2.7.) beschriebenen Arbeitsanleitung Granulozyten aus EDTA- Frischblut isoliert und gewaschen. Die gereinigten Granulozyten wurden anschließend einer Zellyse unterzogen.

4.5.1.2 Extraktion von mRNA aus Granulozyten und Umschreibung in cDNA

Aus den lysierten Granulozyten konnte mit dem Roth©- Quick Kit mRNA isoliert werden. Die mRNA- Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Danach wurde mit einer Reverse Transkriptase die mRNA in cDNA umgeschrieben.

4.5.2 Herstellung eines PCR- Produktes des FcγRIIIb aus cDNA

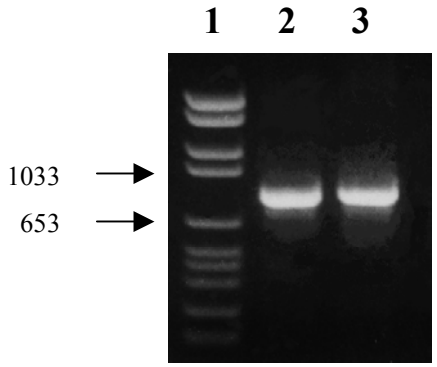
4.5.2.1 Amplifikation des FcγRIIIb aus cDNA

Bei den beiden Patientinnen (1 und 2) sollte der gesamte FcγRIIIb sequenziert werden, so dass mit einem entsprechenden Primerpaar, das den gesamten Rezeptor umfaßt, amplifiziert werden musste. Dazu wurden der FcγRIII- spezifische Vorwärtsprimer VP 492 und der FcγRIIIb- spezifische Rückwärtsprimer RP1 ausgewählt. Primersequenz und Lokalisation sind in (Tab. 4.14) aufgeführt. Das von beiden Primern eingerahmte Stück hat eine Länge von 831bp und wurde mit der TAQ Gold DNA- Polymerase amplifiziert, die sich für DNA-

Fragmente dieser Größe gut eignet. Das fertige PCR- Produkt konnte nach seiner Auftrennung auf 1.5%-igem Agarosegel mit Ethidiumbromid Färbung unter einer UV- Lampe sichtbar gemacht werden. Als Standard Längenmarker diente der MWVI von Boeringer- Mannheim. (Abb. 4.11)

Primer	Sequenz	Position	Spezifität	Annealing
VP 492	TCTTTGGTGACTTGTCCA	1- 17	FcγRIII	43.0°C
RP 1	GCCACTGCTCTTATTACT	831- 814	FcγRIIIB	38.5°C

(Tab. 4.14:) Das zur Amplifikation des FcγRIIIb benutzte Primerpaar. *Die Positionsangaben beziehen sich auf den FcγRIIIb.*



(Abb. 4.11:): Der aus cDNA mit dem Primerpaar VP 492 und RP 1 amplifizierte FcγRIIIb der Mütter von Fall 1 und Fall 2. *In der Reihe 1 ist der Standard Längenmarker VI von Boeringer- Mannheim zu sehen. Reihe 2 zeigt das PCR- Produkt der Patientin von Fall 1, Reihe 3 das PCR- Produkt der Patientin von Fall 2. Der aus cDNA amplifizierte FcγRIIIb liegt in einer Höhe von 831bp.*

4.5.2.2 Aufreinigung des PCR- Produktes

Mögliche Unreinheiten des PCR- Produktes können in der Sequenzanalyse zu Fehlinterpretationen führen, so dass die Aufreinigung des PCR- Produktes unerläßlich war. Nach Auftrennung des Amplifikates auf 1%-igem Agarosegel konnte die gewünschte Bande exzidiert und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aus der Agarose eluiert werden. Das Eluat wurde dann in 30µl Aqua dest. aufgelöst.

4.5.3 Sequenzanalyse der FcγIIIb- Rezeptoren von Patientin1, Fall 1 und von Patientin 2, Fall 2

4.5.3.1 Für die Sequenzanalyse verwendete Primer

Die für die Sequenzanalyse verwandten Primer sind in (Tab. 4.15) aufgeführt. Bezüglich der Qualität der abgelesenen Sequenzen zeigten sich erhebliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Primern, d.h. dass die DNA- Sequenzen mit manchen Primern schlechter oder nur über kürzere Strecken lesbar waren. In solchen Fällen mussten die Primer in kürzeren Abständen zueinander gelegt werden.

Primer	Sequenz, 5´→3´	Position	Spezifität	Annealing
VP 7	AGCTGCTCCTCCCAACTG	41- 58	FcγRIII	58.2°C
SSP 1	CACCAAAGTGTTACTCTT	130- 147	FcγRIIIb/ HNA-1b	53.7°C
SSP 5	CAGTGGTTTCACAATGTGAA	208- 277	FcγRIIIb/ HNA-1a	53.2°C
SSP 3	ATGGACTTCTAGCTGCAC	348- 331	FcγRIII	53.7°C
VP 8	CCTCTCCACCCTCAGTGA	309- 326	FcγRIII	47.2°C
RP 7	GGTACCCAGGTGGAGAGA	655- 338	FcγRIIIb	58.0°C
RP 1	GCCACTGCTCTTATTACT	831- 814	FcγRIIIb	38.5°C

(Tab. 4.15:) Für die Sequenzanalyse der FcγIIIb- Rezeptoren der beiden Patientinnen von Fall 1 und 2 verwendete Primer.

4.5.3.2 Sequenzanalyse der FcγIIIb- Rezeptoren von Patientin 1, Fall 1 und von Patientin 2, Fall 2

Die Sequenzanalyse wurde mit dem Amplifikat als Matrize durchgeführt, welches mit dem Primerpaar VP 492 und RP 1 gewonnen wurde. Zu der jeweiligen Sequenzierungs- PCR wurden dann die entsprechenden Primer (Tab. 4.15) hinzugefügt. Die Sequenzanalyse wurde nach den bereits beschriebenen Methoden durchgeführt.

4.5.3.3 Ergebnisse der Sequenzanalyse

Nach vollständiger Sequenzanalyse des FcγRIIIb beider Mütter (Patientinnen 1 und 2) konnten keine Abweichungen vom Rezeptor in Form von Mutationen nachgewiesen werden. Auch konnte der mit der PCR- SSP erhobene HNA-1a-, -1b- und –1c- Typisierungsbefund in beiden Fällen bestätigt werden.
Bei der Patientin 1 von Fall 1 erstreckte sich die Lesbarkeit der Sequenz von Position 65- Position 760 des FcγRIIIb; bei der Patientin 2 von Fall 2 war die Sequenz von Position 65- Position 789 des FcγRIIIb lesbar. Die mit den Primern abgedeckten Strecken sind in (Tab. 4.16) aufgeführt, die vollständige Sequenz des FcγRIIIb ist im Anhang aufgezeichnet.

	Patientin 1, Fall 1	Patientin 2, Fall 2
Primer	Position	Position
VP 7	67- 290	67- 290
SSP 3	65- 319	100- 300
RP 7	220- 590	130- 280
SSP 5	251- 490	161- 380
VP 8	360- 740	310- 550
RP 1	530- 760	530- 789

(Tab. 4.16:) Von den Primern in der Sequenzierung abgedeckte Strecke des FcγRIIIb. *Die Position gibt die Lokalisation innerhalb des Rezeptors wieder (siehe auch Sequenz des FcγRIIIb, Anhang)*

4.6 Sequenzierung und Erschliessung des Intron III/ FcγRIIIb

Das zu dem Zeitpunkt noch unbekannte Intron III sollte in seiner Gesamtheit sequenziert werden. Die Sequenzierungsarbeit wurde im September 1999 begonnen. Bis zu der Publikation der Basensequenz des Intron III im Internet im Juli 2000 waren insgesamt 2350bp sequenziert worden. Die betreffende Sequenz ist unter der Accessionnumber AC013305 im BLAST® Programm des NCBI Homepage zu finden. Als Homo sapiens Clone RP11- 4M15 ist die von Birren et al. (vom Whitehead Institute, MIT Center for Genome Research, Cambridge,USA) schon im September 1999 eingereichte Sequenz aufgeführt. In dem angegebenen Klon sind auch die Sequenzen des Intron I, II und IV sowie die Sequenz des FCGR3B- Gens enthalten.

4.6.1 Erstellung eines PCR- Produktes von Intron III

4.6.1.1 PCR- Reaktion

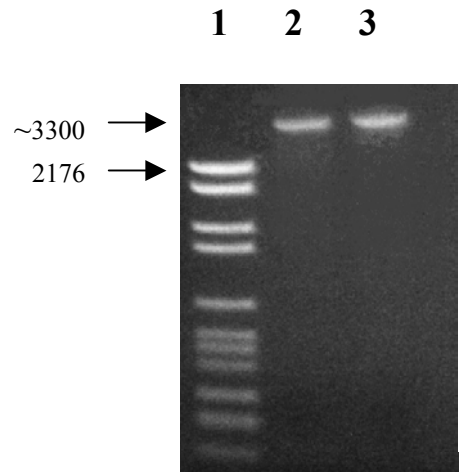
Die geschätzte Größe des Intron III liegt bei etwa 3000bp. Mit den umgebenden Exonfragmenten, die aufgrund der Lage der Primer mit amplifiziert werden, ergibt sich daraus eine geschätzte Länge von ca. 3300bp. Da die üblicherweise verwendete TAQ- Polymerase von Perkin Elmer ein Fragment dieser Größe nicht mehr zu amplifizieren vermag, wurde auf das XL- Kit von Perkin Elmer zurückgegriffen. Das Kit ist speziell für die Vervielfachung größerer DNA- Fragmente konzipiert worden. Der PCR- Ansatz wurde den Angaben des Herstellers entsprechend fertiggestellt. Als Primer wurden der HNA-1b- spezifische Vorwärtsprimer SSP1 und der FcγRIII- spezifische Rückwärtsprimer RP6 genommen (Tab. 4.17). Die Größe des von dem Primerpaar vervielfältigten DNA- Fragmentes beträgt ohne das Intron III 266bp, mit dem Intron III entsprechend ca. 3266bp. Da der Vorwärtsprimer SSP1 spezifisch für HNA-1b ist, wurden entsprechend nur HNA-1b- homozygote oder HNA-1a/ HNA-1b- heterozygote DNA zur Amplifikation verwendet. Damit mögliche Mutationen innerhalb der Intronsequenz ausgeschlossen werden konnten, wurden DNA Proben unterschiedlicher Individuen sequenziert und miteinander verglichen.

Primer	Nucleotidsequenz, 5´→3´	Position	Spezifität	Annealing
HNA-1b Vorwärtsprimer, SSP1	CAATGGTACAG**C**GTGCT**T**	130 –147	FcγRIIIb/ HNA-1b	57°C
FcγRIII Primer, RP6	CTCCTTGAACACCCACCG	376 -393	FcγRIII	58°C

(Tab. 4.17:) Primerpaar für die Amplifizierung des Intron III. *Basen, die den HNA- Polymorphismus markieren, sind unterstrichen, Basen, welche zusätzliche, beabsichtigte Fehlpaarungen markieren, sind **fett** gedruckt.*

Um ein möglichst spezifisches Produkt zu erhalten, wurde zunächst die Annealing-Temperatur optimiert und bei 62°C festgelegt. Eine Erhöhung der Verlängerungszeit auf 5min. gewährleistete eine vollständige Amplifikation des gesamten DNA- Fragmentes. Dennoch ließ sich infolge der langen Verlängerungszeit das Auftreten unspezifischer PCR- Produkte nicht

vollständig vermeiden. Damit die Anzahl dieser unspezifischen DNA- Fragmente vergleichsweise klein blieb, wurde die XL- PCR im Hotstart- Verfahren durchgeführt. Anschliessend konnte das PCR- Produkt auf 1.5%-igem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt unter einer UV- Lampe sichtbar gemacht werden. Als molekularer Längenmarker diente der MWVI von Boeringer- Mannheim (Abb. 4.12).



(Abb. 4.12:) Auftrennung des mit dem Primerpaar SSP1 und RP6 amplifizierten PCR- Produkts von Intron III. *In Reihe 1 ist der molekulare Längenmarker VI von Boeringer- Mannheim zu sehen. In Reihen 2 und 3 ist das entsprechende PCR-Produkt des Intron III zu sehen.*

4.6.1.2 Aufreinigung des PCR- Produktes

Unspezifische Produkte führen in der Sequenzierung zu Überlagerungsphänomenen mit dem Resultat einer schlechteren Lesbarkeit der Sequenz. Eine Möglichkeit unspezifische Produkte von dem gewünschten Produkt zu entfernen, ist die Aufreinigung der PCR- Amplifikate. Dazu wurde die Bande, die Berechnungen nach dem Intron III entspricht, zunächst auf 1%-igem Seakem Agarosegel aufgetrennt und anschliessend aus dem Gel exzidiert. Die Elution und Aufreinigung der DNA- Fragmente aus dem Gel erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers. Nach Lösung des aufgereinigten Produktes in 30µl sterilem Aqua dest. wurde die Konzentration des DNA- Amplifikates durch optischen Vergleich bestimmt.

4.6.2 Sequenzierung des Intron III

Für die Sequenzierungs- PCR des Intron III wurde das aus dem Primerpaar SSP1 und RP6 gefertigte Template als Matrize verwendet. Für die erste Sequenzierung wurde der Vorwärtsprimer SSP1 benutzt. Danach wurden die Vorwärtsprimer in die jeweils neu erschlossenen Sequenz gelegt. Es zeigte sich, dass der Rückwärtsprimer RP6 für eine Sequenzanalyse ungeeignet ist und keine lesbaren Ergebnisse erbrachte. Vergleichbare, FcγRIIIb- spezifische Primer liegen jedoch zu weit von der zu analysierenden Sequenz entfernt, so dass auf einen Rückwärtsprimer verzichtet wurde (Tab. 4.17).

4.6.2.1 Für die Sequenzanalyse verwendete Primer

Die Wahl der Primer für die Sequenzierung richtete sich nach folgenden Kriterien. Zunächst sollte im Primer ein möglichst ausgewogenes Verhältnis zwischen den Basen Guanin, Cytosin, Adenin und Thymin vorhanden sein. Je höher der Gehalt an Guanin und Cytosin im Primer ist, desto höher ist auch seine Schmelztemperatur und folglich seine Spezifität. Weiterhin sollten sich Anfang und Ende des Primers nicht komplementär zueinander verhalten, um das Auftreten von Primer- Dimeren zu verhindern, die als mögliche Störfaktoren beim Ablesen der Sequenz auftreten könnten. Letzlich sollte die Länge des Primers eine Anzahl von mindestens 15bp nicht unterschreiten, um eine spezifische Bindung an die Matrize zu gewährleisten. Sämtliche Primer stammen von der Firma Oligo MWG, Ebersberg (Tab. 4.18).

Primer	Nucleotidsequenz, 5´→3´	Position (bp)	Spezifität	Annealing
VP Int. III-1	TCCATATCGGTGAGTTGATG	Exon 3, 344- Intron III, 12; FcγRIIIb	FcγRIIIb/ Intron 3	57.3°C
VP Int. III-2	CTGTCAGACAGTAGATATAG	178- 197	Intron III	53.2°C
VP Int. III-3	TGACCTCAGGTGATTCGC	545- 571	Intron III	56.0°C
VP Int. III-4	ACAATCTTACCACATAGGC	938- 953	Intron III	52.4°C
VP Int. III-5	GAAGGCAGGGGTCTT	971- 982	Intron III	50.6°C
VP Int. III-6	GCATAAGGAGGTGGATCT	1082- 1099	Intron III	53.7°C
VP Int. III-7	TCACTCTCCAGAGCTACAA	1190- 1209	Intron III	54.5°C
VP Int. III-8	TAAACTTCTGAGCAT	1423- 1437	Intron III	39.6°C
VP Int. III-9	AGACAGGGTTTCACGGCATT	1701- 1720	Intron III	57.3°C
VP Int. III-10	GCTTGATGAAATATCAC	2029- 2045	Intron III	45.5°C
VP Int. III-11	GATATCTCTTAATAGGTAAT	2221- 2240	Intron III	47.1°C

(Tab. 4.18:) Für die Sequenzierung des Intron III verwendetet Vorwärtsprimer. *Basen, die einen HNA- Polymorphismus ausdrücken, sind unterstrichen. Die angegebenen Annealing- Temperaturen sind von den Herstellern übernommen worden. Die Positionsangaben beziehen sich auf den FcγRIIIb und die weiter unten aufgeführte Sequenz des Intron III.*

4.6.2.2 Sequenz des Intron III

Die durch eigene Sequenzierungsarbeit erschlossene Sequenz des Intron III ist in (Abb 4.13) aufgeführt.

BP	←Exon 3 bp351↓	↓1bp Intron III→	**BP**
	GAAGTCCATATC	ggtgagttga tgaaggggaa gaggaaaatc accaataaag	40
41	ggtgaaacaa agggtcctga aatacttggt aagagccaga gatgatattc ttagagataa		100
101	aagctaagat gagatgatgt gtggcccact gaatggtatc agagttgtag tcctagctct		160
161	aagtaggtct tggcaaaatg tcaaagcctg tcagacagta gatataggac tgctgcattg		220
221	acaattccaa gaatcccata tggagtgcat acaatgtgaa tgtgtcatgt gaagttaggc		280
281	catggcatag atgctcaata atagttattt atttatttat tttcattttt cttaatttta		340
341	ttttttgaga cagagtatca ctctctcacc caggctggag ttgcaatgcc ggcaatctca		400
401	gcttacttgc aaccttctgc ccccttgggt ttgaaggtga ttctcctgcc ttaagcctcc		460

401	gcttacttgc aaccttctgc ccccttgggt ttgaaggtga ttctcctgcc ttaagcctcc	460
461	cgagtagctg agattacagg cacccgccac cacgcccagc taattttgta tttttagtag	520
521	agacagggtt tcaccatgtt ggtcaagtct ggtctcaaac tcctgacctc aggtgattcg	580
581	cccggccttg gcttcccaaa gtgctgggcc tacaggcgtg agccaccaca cctggggcca	640
641	ataatttta taggaataaa ttaatgaatt tggtgttagg gacctcaatc tccttctcgc	700
701	tctcagacat gtaatgccct aagccacctc ccaaagcaat cctagtggcc tagaatcata	760
761	tctttctgtc tcctcatcaa tgctatactc aaacctataa ttaagcataa atttgggtaa	820
821	tgtgatagct cttcccatag aggcagatac atgttcagcc tgcacattaa tcatgacatg	880
881	aaagtccttg gtgtactatt taacagaatt attaggacat cagaccacca ggtaggaaga	940
941	aatattttga aggcaggggt ctttcctggg tctgtgcctc atcttaccca tagcctggtc	1000
1001	cctgcagtgt cgccctgcaa acctaattct acttccacgg ctgttccatt catacaatgt	1060
1061	ttatgggtgg aacaagcttt gggggaagaa gggcataagg aggtggatct gcaagagagc	1120
1121	tccatggaat tgggcctctg aaactgattt ttgtgggctc tttgggcctc tgacagtacc	1180
1181	actcaactgg acatgggtct tcactctcca gagctacaag aagggtatgt ccatttctag	1240
1241	ctaggtaaga gatgccacct acaaccaaat aataatcgag cacggattac caagcagaaa	1300
1301	gcagtagcat aatatcagct ctaggagtta gctacgttta gccttgaact tggcatctag	1360
1361	aaactggctt tagaagtcta gccaatcaag gctatattaa actgtgacca tgagaattag	1420
1421	cttcaccagt gtaaacttct gagcatcact ttattccttt aggacccatt tgacttatgt	1480
1481	cctcctctga gaagcacttt ttacttcttt gtttgtttgt ttgtttttgt ttttgttttt	1540
1541	gagacagagt ttctctctgt cacccaagct ggagtgcagt ggcgcaatct tggttcactg	1600
1601	caacctccac ctcccgggtt ccagcgattc tcctgcttca gcctcccaac tagctgggac	1660
1661	tacaggtgca tgccaccacg cccggctaat tttttgtatt tttagtagag acagggtttc	1720
1721	acggcattag ccaggatggt cttgatctcc tgactcgcga tctgctactt catcctcccc	1780
1781	aagtactagg attacagatg tgagccaccg cgcccagcct gcatttttta cttctttcag	1840
1841	gcagaatttc tttattccaa tctagtcggc cccgcagtcc tttattctta gcctgttgta	1900
1901	gcactcgtca tattgtattg tgattatttc tgaatattta tgtttctatg tctaggctgt	1960
1961	agattctttg aggctgagaa ctatatgtcc catcatctgg gtatctccag tccacagtgt	2020
2021	gtcatacata gtgagtgctt gatgaaatat cacttgaagg aatatacaca tgggcattca	2080
2081	ctgagtccat gacaggacag attcgaacaa gaatgttcct ccaaaggcca ccagactata	2140
2141	tactaaccat gactttatgc taataatgat tcatctcttt gctgaaaaag taagtggata	2200
2201	gataggcaca tggcttcttt tgataaatga tatctcttaa taggtaatga agattacttt	2260
2261	ctgtttggca aatctttgtg ttagagaatc atgaccaaca cacgtcctac caattttgtt	2320
2321	tagcatca	2380

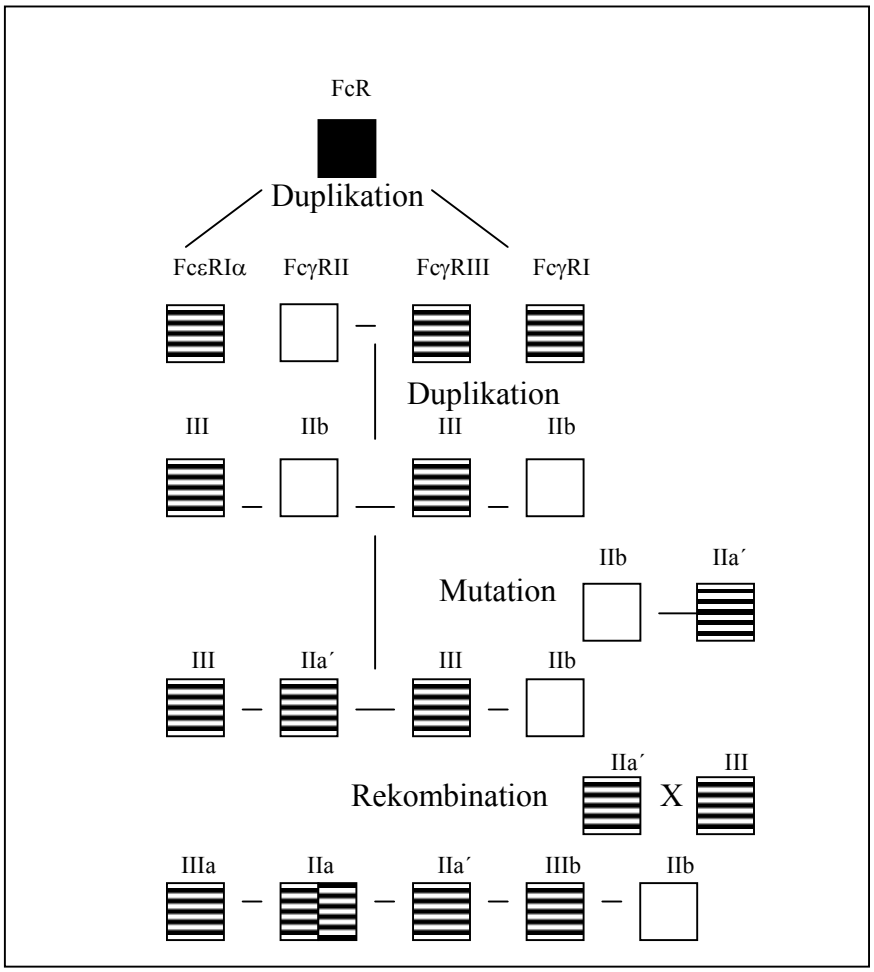
(Abb. 4.13:) Sequenz des Intron III. *Die zum Exon 3 gehörigen Basen sind GROSS-, die Basen des Intron III sind kleingeschrieben. Die Basen sind jeweils in Blöcken von 10bp angeordnet. Die eigene Sequenz befindet sich in den mit Positionsangaben markierten Spalten.*

5. Diskussion

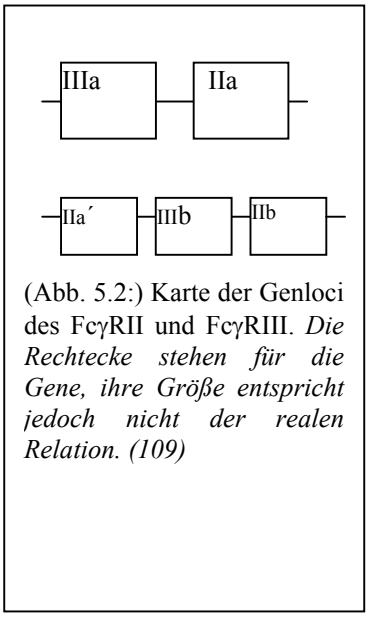
5.1 Ergebnisse der HNA-1a-, -1b-, -1c- Typisierung der Populationsstudie

Die Ergebnisse der HNA- Typisierung der verschiedenen Populationen zeigen eine gute Übereinstimmung mit bereits vorhandenen Typisierungsdaten.
Vereinfachend lässt sich sagen, dass die Frequenz der Allele FCGR3B*1 und FCGR3B*2 in afrikanisch stämmigen Populationen eine geringes Überwiegen des FCGR3B*2- Allels aufweist. In anderen Studien konnten Genfrequenzen von 0.59 (69) für afrikanische Amerikaner, 0.50 bei Ghanaern und 0.545 für Südafrikaner (69) nachgewiesen werden. In manchen afrikanischen, beziehungsweise von ihr abstammenden Populationen, zeigt sich jedoch ein deutliches Überwiegen der Genfrequenzen für HNA-1b mit Werten von 0.69 (54) für afrikanische Amerikaner und 0.74 (139) für Individuen aus Äthiopien. Die Häufigkeit des FCGR3B*3- Allels ist allerdings im Vergleich zu anderen Bevölkerungen erhöht. Sie liegt bei Werten zwischen 23.21% (69) und 22.50% (55) für afrikanische Amerikaner und 22.22% bei Ghanaern (69). Ebenfalls konnte ein erhöhtes Vorkommen von FcγRIIIb- defizienten Individuen in einigen Proben afrikanischen Ursprungs nachgewiesen werden (69).
In den kaukasischen Bevölkerungsgruppen ist die Frequenz des FCGR3B*2- Allels bei weitem höher als die von FCGR3B*1 und zeigt nicht die gleichmässige Verteilung beider Allele wie in manchen afrikanischen Populationen. Vergleicht man bereits vorhandene Daten miteinander, ist erkennbar, dass die Frequenz des FCGR3B*2- Allels in den kaukasischen Bevölkerungen vorherrschend ist. In Spanien beträgt diese 0.614 (95), in Frankreich 0.64 (44), in Deutschland 0.65 (25), in Dänemark 0.635 (129) und in Holland 0.625 (95). Jedoch ist die Frequenz des FCGR3B*3- Allels mit Werten zwischen 4.5% (55) und 5% (26) im Vergleich mit Werten aus Afrika als niedrig anzusehen. Eine Mittelstellung nimmt die Häufigkeit der FcγRIIIb- defizienten Individuen ein. Fromont fand bei seiner in Frankreich angesiedelten Studie eine Häufigkeit des Auftretens von etwa 0,1% (44), Muniz- Diaz konnte dagegen Häufigkeiten des Auftretens von 0.8% in einem spanischen Kollektiv nachweisen (95). Populationsstudien anderer kaukasischer Bevölkerungen konnten keine den Werten von Muniz- Diaz entsprechende finden, so dass- unter Berücksichtigung vorhandener Werte- zum jetzigen Zeitpunkt von einer geringen Auftretenshäufigkeit des Phänotyps NA- Null in Europa ausgegangen werden muß. Interessanterweise zeigen Proben aus Polen Besonderheiten bezüglich ihrer Allelverteilung auf. Zwar ist die Verteilung ihrer FCGR3B*1- und FCGR3B*2- Allele durchaus mit der in kaukasischen Populationen vergleichbar, allerdings ist die Häufigkeit des FCGR3B*3- Allels mit 14.67% für die polnischen Proben höher, als die Verteilung in Europa erwarten liesse. In dem Kollektiv konnten keine Individuen mit dem Phänotyp NA- Null gefunden werden (51).
Asiatische Populationen hingegen zeigen eine Umkehrung der Allelverteilung, mit einem erhöhtem Vorkommen des FCGR3B*1- Allels. In Japan beträgt die Genfrequenz für HNA-1a 0.651 (100), in aus Taiwan stammenden chinesischen Populationen beträgt sie bis zu 0.681 (69). Eine Studie von Lin zeigt eine Genfrequenz mit Werten von ebenfalls 0.68 für Festland-Chinesen (82). Bislang wurden in den untersuchten asiatischen Proben keine Träger von HNA-1c gefunden (55; 69). Die Häufigkeit von Individuen mit dem Phänotyp NA- Null ist jedoch recht unterschiedlich. Für Japan wurden Werte von 0.047 gefunden (95), in einem von dem chinesischen Festland stammenden Kollektiv konnten jedoch keine FcγRIIIb- defizienten Individuen gefunden

werden (82). Anders hingegen eine Studie von Chu et al. (31). Sie konnten in dem in Taiwan endemischen Stamm der Ami eine Häufigkeit von 0.28 für das Fehlen des FcγIIIb- Rezeptors finden.
Die Untersuchung von Proben einer indischstämmigen Population zeigte ein Überwiegen des FCGR3B*2- Allels gegenüber dem FCGR3B*1- Allel. Das FCGR3B*3- Allel ist mit einer Häufigkeit von 15.90% vorhanden (55). Bisher liegen noch keine Daten über die Verteilung der FcγRIIIb- Defizienz vor.
Die bearbeiteten Proben der verschiedenen Populationen in dieser Arbeit entsprechen, mit Ausnahme der aus Bangladesch stammenden, den bisher erhobenen Daten verschiedener HNA-Typisierungen. Alle Proben, die afrikanischer Herkunft sind, weisen eine etwas erhöhte Genfrequenz des FCGR3B*2- Allels auf, mit Ausnahme der Proben aus Ghana und den Südafrikanern asiatischer Abstammung, bei denen die Genfrequenzen von HNA-1a und HNA-1b gleich sind. Auch die Proben aus Papua- Neu Guinea zeigten ein Überwiegen des FCGR3B*2-Allels. In den Proben der Chinesen aus Taiwan und auch Bangladesch dagegen überwiegt das FCGR3B*1- Allel. Hessner (54) hingegen hatte in seiner Typisierungsstudie ein Überwiegen des FCGR3B*2- Allels in einem indischen Kollektiv gefunden, welches sich aus indischstämmigen Individuen aus Milwaukee und Bangalore zusammensetzte (54).
Die Verteilung der Häufigkeit des FCGR3B*3- Allels in den bearbeiteten Proben zeigte eine vergleichbare Verteilung zu bereits erhobenen Daten. Am höchsten war die Häufigkeit des FCGR3B*3- Allels in den Proben aus Simbabwe nachzuweisen, welches möglicherweise durch die geringe Probenanzahl mitbedingt ist. Eine Mittelstellung zwischen der afrikanischen und der kaukasischen Bevölkerung nimmt die Verteilung des FCGR3B*3- Allels in Bangladesch ein. In den Proben der Chinesen aus Taiwan waren erwartungsgemäß keine HNA-1c- positiven Individuen nachzuweisen. Ebenfalls konnte in der bearbeiteten DNA aus Papua- Neu Guinea kein FCGR3B*3- Allel nachgewiesen werden.
Mit Hilfe dieser Daten können Rückschlüsse auf die Verbreitung des Homo sapiens gezogen werden. Geht man von der „Out of Afrika"- Theorie aus, wonach der Ursprung des modernen Menschen in Afrika zu suchen ist, hätte sich die heutige Verteilung der Allele FCGR3B*1, -*2 und -*3 innerhalb der verschiedenen Populationen aus einer afrikanischen Grundgesamtheit entwickelt. Voraussetzung für diese Annahme ist, dass sich die Allelformen in den jeweiligen Bevölkerungen erhalten haben.
Um die regionalen Verteilungen der Allele besser verstehen zu können, muss man auch ihre Entstehung und Entwicklung berücksichtigen. Die auf dem Chromosom 1 gelegenen Fc-Rezeptoren entwickelten sich vermutlich aus einer Urform, die hier als „FcR" bezeichnet wird. Im Laufe der Entwicklung könnten durch Genduplikation der FcεRIα, der FcγRI und die in enger Beziehung zueinander stehenden FcγRII und FcγRIII (106) entstanden sein. Genduplikation und Mutation hätten anschliessend die Formen FcγIIb und FcγIIa´ hervorgebracht. Nachfolgende Rekombinationen des FcγRIII mit dem FcγRIIa´ würden zu den heute vorliegenden Formen des FcγRIIIa und FcγRIIIb geführt haben. Gestützt wird diese Hypothese durch die enge Beziehung der FcγRII- und FcγRIII- Genloci zueinander. Das Gen des FcγIIIa- Rezeptors ist eng mit dem des FcγIIa- Rezeptors verbunden, während das Gen des FcγIIIb- Rezeptors von denen des FcγRIIa´und FcγRIIb flankiert ist (109) (Abb. 5.1.).



(Abb 5.1:) Hypothetische Entwicklung der Fc- Rezeptoren. *Das Modell basiert auf einer Charakterisierung der Struktur sowie der Beziehung des Fc RII zum FcγRIII. Die Rechtecke stellen Gene dar, ihre Beziehung zueinander ist durch den Grad der Schraffierung gekennzeichnet.*



(Abb. 5.2:) Karte der Genloci des FcγRII und FcγRIII. *Die Rechtecke stehen für die Gene, ihre Größe entspricht jedoch nicht der realen Relation. (109)*

Vermutlich ist das FCGR3B*2- Allel als Grundform des FcγRIIIb anzusehen. Aus ihr hat sich im Laufe der Zeit das FCGR3B*1- Allel entwickelt. Folgende Hinweise lassen diese Hypothese zu. Lalezari konnte in HNA- Typisierungen bei Primaten nur das FCGR3B*2- Allel finden, weder das FCGR3B*1- noch das FCGR3B*3- Allel liessen sich nachweisen (77). Die Familie des Menschen, die Hominiden, entwickelte sich zwar nicht aus der Familie der modernen Affen, den Pongiden, da beide Familien getrennten Entwicklungslinien folgten. Trotzdem ist nicht auszuschliessen, dass die Hominiden und die Pongiden sich unabhängig voneinander aus einer einzigen Familie primitiver Menschenaffen entwickelt haben. Es ist schwierig zu sagen, wann der gemeinsame Vorfahr von Hominiden und Pongiden gelebt haben dürfte. Fossile Funde zeigen das Vorkommen der Dryopitheciden, von denen man annimmt, dass sie die möglichen gemeinsamen Vorfahren von Menschenaffe und Mensch sind, bereits an der Basis des Miozäns (vor ungefähr 23 Mio. Jahren) an (127). Zu diesem Zeitpunkt muss bereits ein dem FCGR3B*2- Allel zumindestens ähnlicher FcγIIIb- Rezeptor vorgelegen haben. Die für das FCGR3B*2- Allel kennzeichnenden Basenaustausche an den entsprechenden Stellen des FCGR3B- Gens scheinen jedoch innerhalb beider Gruppen erhalten geblieben zu sein. Im Verlauf der Entwicklung ereigneten sich vermutlich Punktmutationen, die letztendlich zur Entstehung des FCGR3B*1- Allels beigetragen haben. Mutationen werden in der Evolution beibehalten, wenn sie dem jeweiligen Organismus einen Überlebensvorteil durch eine bessere Anpassung an die Umwelt bieten. HNA-1a- homozygote Individuen zeichnen sich durch eine verbesserte Phagozytosefähigkeit ihrer Granulozyten aus, bieten also einen besseren Schutz des Individuums vor Infektionen. Weshalb trotz einer verbesserten Immunabwehr dennoch die Allelform

FCGR3B*2 in den afrikanischen und kaukasischen Populationen vorherrschend ist, bleibt unklar. Ein weiterer Hinweis auf die Entstehung des FCGR3B*1- Allels ist in den Ergebnissen einer HNA- Typisierungsstudie von Matsuo et al, 2000 (87) zu finden. Sie untersuchten zufällig ausgewählte Spender aus afrikanischen, japanischen und europäischen Grundgesamtheiten mittels PCR- und RFLP- Analyse. Dabei fanden sie verschiedene, noch nicht beschriebene Polymorphismen des FCGR3B- Gens. Vier afrikanische Proben hatten FCGR3B*2- Allele mit einer G→A Substitution in Position 227, sieben weitere, afrikanische Proben hatten eine A→G Substitution in Position 277. Eine Probe aus Japan wies eine C→G Substitution in Position 141 sowie eine G→T Substitution in Position 227 auf. Adenin in Position 227, Guanin in Position 277 als auch Guanin in Position 141 entsprechen jedoch den spezifischen Nucleotidaustauschen für das FCGR3B*1- Allel. Lediglich ein FCGR3B*1- Allel eines Afrikaners zeigte eine G→A Substitution in der Position 349, wobei das Adenin einen HNA-1b- spezifischen Basenaustausch darstellt.
Die Tatsache, dass gerade das FCGR3B*2- Allel der afrikanischen Individuen im Vergleich zu den aus Japan und Europa stammenden Proben derart viele Polymorphismen aufweist, mag durch die ungleiche Stichprobenanzahl bedingt sein, bei der die Anzahl der aus Afrika stammenden Proben ungleich höher war, als die aus Japan und Europa. Ein Großteil der hier gefundenen Polymorphismen ist auf das FCGR3B*2- Allel beschränkt, dieses bildet mit den Basenaustauschen ein chimärisches Produkt zwischen dem FCGR3B*2- und dem FCGR3B*1- Allel. So könnte sich das FCGR3B*1- Allel graduell aus der Ursprungsform HNA-1b entwickelt haben, die Übergänge dieser Entwicklung wurden in manchen Individuen konserviert.
Inzwischen sind weitere Polymorphismen in Form von Punktmutationen des FCGR3B- Gens bekannt geworden, die oftmals nur in einer Populationsgruppe nachweisbar sind (100). In wieweit noch andere regionalspezifische Mutationen des FCGR3B- Gens in anderen Populationen zu finden sind, muss noch geklärt werden. Da sie meist für die jeweilige Population spezifisch sind, haben sie sich nach den Wanderungen entwickelt und sind, je nach Vermischungsgrad der Bevölkerungsgruppe, auch nur in ihr nachweisbar. In gewissem Maße sind sie daher als möglicher genetischer Marker zur Bestimmung von zeitlichen Abläufen anwendbar. Es ist gut vorstellbar, dass nach dem Auftreten des FCGR3B*1- Allels in Afrika sich die Genfrequenzen in einigen der afrikanischen Populationen einander annäherten. Die Verteilung der HNA- Allele in den übrigen Populationen würden sich durch die aus Afrika entspringenden Migrationszüge erklären. In dem folgenden Modell werden Faktoren wie Umweltbedingungen und Infektionen, die zu einer Selektion der HNA- Veretilung geführt haben könnten, außer acht gelassen.
Wanderungsbewegungen von Gruppen aus Afrika über das heutige Russland nach Osten, bei denen das FCGR3B*1- Allel vorherrschend vertreten war, würden dann zu der heute in Asien dominierenden Verteilung führen. Getrennt davon müssen Züge über Indien und nachfolgend zu dem Indonesischen Archipel bis nach Papua- Neu Guinea gelangt sein. In ihrem Genpool muss das FCGR3B*2- Allel stärker vertreten gewesen sein als in den Gruppen, die nach China und Japan wanderten. Vorstellbar wäre auch eine zeitlich versetzte Wanderungsbewegung als die nach China. Sollte die australische Urbevölkerung sich aus Individuen entwickelt haben, die von Papua- Neu Guinea nach Australien migriert sind, so müsste sie eine diesen vergleichbare Allelverteilung aufweisen. Untersuchungen der HNA- Verteilung in Taiwan zeigten, dass hier das FCGR3B*1- Allel überwiegt, in Papua- Neu Guinea hingegen das FCGR3B*2- Allel. Hinweise auf eine mögliche Abstammung der Austronesier liefern HLA Klasse 1- Typisierungen einheimischer Stämme aus Taiwan (83). Dort leben sowohl einheimische „Urstämme“, deren Existenz auf der Insel bis zu dem Zeitpunkt zurückzuverfolgen ist, als Taiwan noch an das chinesische Festland angebunden war. Diese Stämme blieben durch ihre geographische und soziokulturelle Lage isoliert und vermischten sich auch nicht mit den viel später einwandernden

Festland- Chinesen, deren letzte größere Migration im 17. Jahrhundert a.d. stattfand. Lin et al. (83) konnten in ihrer Studie, entsprechend der Verteilung der HLA Klasse 1- Merkmalen, eine Verwandschaft der einheimischen Taiwanesen zu Ozeanischen Völkern, so auch Maori, Individuen aus Papua- Neu Guinea und Austronesiern nachweisen. So ist es möglich, dass Wanderungen in besagte Gebiete über Taiwan stattfanden. Es zeigten sich auch verwandschaftliche Beziehungen zu den Nordasiaten, also Japanern, Inuit und Mongolen. Allerdings weisen die einheimischen Stämme wenig Gemeinsamkeiten zu den heutigen Han-Chinesen auf. Damit scheint Taiwan mit einer Drehscheibe für insbesondere auf die Küstenregionen beschränkte Wanderungen vergleichbar zu sein, die sowohl nach Süden als auch nach Norden gerichtet war, deren Individuen sich jedoch deutlich von der chinesischen Bevölkerung abheben. In wieweit aber die verwandtschaftlichen Beziehungen der Taiwanesen zu den in Papua- Neu Guinea lebenden Populationen reichen, ist allerdings schwierig zu sagen. Es zeigt sich nämlich eine deutliche Diskrepanz der Verteilung der HNA- Allele, mit einem Überwiegen des FCGR3B*1- Allels in Taiwan und einem Überwiegen des FCGR3B*2- Allels in Papua- Neu Guinea. Beiden gemeinsam ist das Fehlen der HNA-1c- Punktmutation. Letztendlich würde nur eine umfassende Typisierung möglichst vieler Gruppen aus Papua- Neu Guinea, Indonesien, den australischen Aborigines sowie benachbarter Populationen mehr Klarheit in die Abstammungsfolge erbringen.

Bislang ist in den asiatischen Bevölkerungen noch kein FCGR3B*3- Allel nachgewiesen worden. Somit müssen die Wanderungen vor dem Auftreten der HNA-1c- Punktmutation stattgefunden haben, die sich dadurch anhand einer Zeitkarte eingrenzen lässt. Nach den Abwanderungen in den asiatischen Raum muss sich die HNA-1c- Punktmutation in Afrika ereignet haben. Individuen, die jetzt aus Afrika ausgewandert sind, weisen zu einem gewissen Prozentsatz das FCGR3B*3- Allel auf. Spätere Migrationszüge nach Europa bildeten den jetzt vorhandenen Anteil an HNA-1c- positiven Trägern. Dabei scheinen weniger HNA-1c- positive Individuen den Grundstock des kaukasischen Genpools gebildet zu haben als es beispielsweise in Indien der Fall gewesen ist. Eine mögliche Erklärung wäre in zeitlich versetzten Wanderungsbewegungen zu suchen, die sich zu verschiedenen Zeitpunkten der Ausbreitung des FCGR3B*3- Allels ereigneten. Die Wanderungen nach Europa fanden statt, als die Verteilung des FCGR3B*3- Allels in der afrikanischen Urbevölkerung noch gering war. Erst später, nachdem sich die Punktmutation weiter ausgebreitet hatte, gelangten erneut Individuen nach Indien und vermischten sich mit womöglich schon dort ansässigen Homo sapiens, die sich in den früheren Zügen nach Asien bereits dort niedergelassen hatten.

Geht man davon aus, dass in der asiatischen Bevölkerung das FCGR3B*3- Allel nicht auftritt, so stellt sich die Frage nach der Herkunft des FCGR3B*3- Allels in der amerikanischen Urbevölkerung. Dort findet sich eine Häufigkeit des FCGR3B*3- Allels von 1.1% in den DNA-Proben. Bislang ist die Theorie weitverbreitet, dass Amerika vor ungefähr 11000 Jahren während der Eiszeit über die Behringstrasse von Nordasien aus bevölkert wurde (127). Vor kurzem wurde hingegen die Hypothese aufgestellt, dass sich die amerikanische Urbevölkerung aus verschiedenen Populationsanteilen zusammensetzt, die sowohl ihren Ursprung in Asien als auch in Spanien haben (57). Diese wären dann vermutlich über den Atlantik nach Amerika gelangt. Derartige Migrationszüge würden das Vorkommen besagter Punktmutation erklären. Dieses Modell setzt voraus, dass die untersuchten amerikanischen Indianer sich nur unter ihresgleichen fortgepflanzt haben und keine Vermischung mit anderen Populationen stattfand.

Interessanterweise konnte bei den in Brasilien lebenden, einheimischen Xikrin- Kayapo Indianern aus dem südöstlichen Amazonas Becken bislang noch kein FCGR3B*3- Allel nachgewiesen werden. Sie haben sich nicht mit anderen Populationen vermischt wie ein Großteil der brasilianischen Bevölkerung, die sich aus Indianern, Afrikanern und Europäern

zusammensetzt (73). Auch ist bei ihnen, wie auch bei den einheimischen Indianern Amerikas, ein Überwiegen des FCGR3B*1- Allels nachweisbar. Man nimmt an, dass die Besiedlung Südamerikas von Nordamerika aus erfolgte. Die Urbevölkerung Südamerikas müßte sich daher aus den Migrationszügen zusammengesetzt haben, die aus Asien über die Behringstrasse eingewandert sind. Die später aus Spanien nach Amerika gelangten Individuen hätten sich dann in Nordamerika niedergelassen und sich mit den aus Asien eingetroffenen vermischt. Man kann davon ausgehen, daß die HNA-1c- Punktmutation nach der Entwicklung des FCGR3B*1- Allels aufgetreten ist (26).

Über den Zeitpunkt des ersten Auftretens einer FcγRIIIb- Defizienz lassen sich wenig genaue Aussagen machen. Kürzlich wurde in einer von Chu et al. (31) durchgeführten Studie zur Bestimmung der Allelfrequenzen von FCGR3B*1 und FCGR3B*2 in verschiedenen asiatischen Populationen drei Individuen mit dem Genotyp NA- Null gefunden. Sie gehören alle dem Stamm der Ami an, der in Taiwan beheimatet ist. Insgesamt beträgt die Genfrequenz FcγRIIIb-defizienter Individuen in besagtem Stamm 28% (31). Damit scheint das Auftreten von NA- Null schon zu Zeiten der ersten Wanderungen nach Asien stattgefunden zu haben. Auch Werte von 0.047 für die japanische Bevölkerung belegen ihr Auftreten in der asiatischen Bevölkerung (95). Interessanterweise fanden Kuwano et al. in ihrer HNA- Typisierungsstudie der Amazonas Indianer 11 von 92 Proben (~11%), die weder mit den für HNA-1a- noch für HNA-1b-spezifischen Primern reagierten (73). Ob es sich bei diesen Individuen auch um solche mit einer FcγRIIIb- Defizienz handelt, muss noch geklärt werden. Schätzungen der Genotypfrequenzen für die kaukasische Bevölkerung liegen bei 0.001 (44) und 0.080 (95). Die Werte für unterschiedliche afrikanische Gruppen liegen bei Werten von 0.010 bis hin zu 0.070. Bei der sehr hohen Häufigkeit von 28% der FcγRIIIb- Defizienz im Stamm der der Ami, einer in Taiwan endemischen Bevölkerungsgruppe, lässt sich vermuten, dass dieser Stamm durch seine abgeschottete Lage zu eben dieser Verteilung gekommmen ist. In Analogie dazu ist eine Interpretation der variierenden Werte in manchen afrikanischen Gruppen zu sehen. Auch sie könnten einer mangelhaften Durchmischung mit anderen Volksstämmen erlegen sein. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das Auftreten von Individuen mit dem Phänotyp NA- Null bereits vor dem Auftreten der HNA-1c- Punktmutation stattgefunden haben muß bzw. unabhängig von ihr stattgefunden hat.

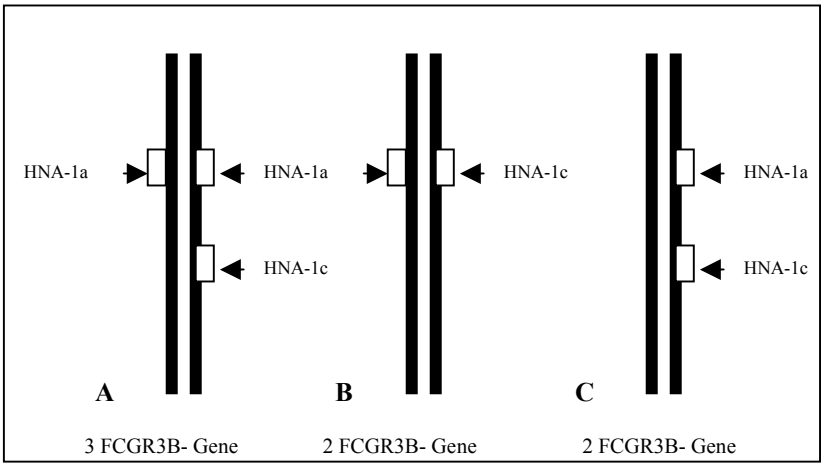
Nach der Theorie der „Multiregionalen Entwicklung“ des Menschen hätten sich die Allelformen FCGR3B*1, -*2 und -*3 zeitgleich in verschiedenen Stämmen des Homo erectus entwickelt und sich in der jeweiligen populationsspezifischen Verteilung bis zum Homo sapiens erhalten haben. Die regionalspezifischen Verteilungen wären demnach als eine Anpassung an die vorherrschenden Umweltbedingungen zu werten. Allerdings wären bei einer derartigen Entwicklung mehr populationsspezifische Varianten des FcγRIIIb innerhalb der untersuchten Bevölkerungen zu erwarten. Es ist kaum vorstellbar, dass im Laufe der menschlichen Entwicklung, wie die „Multiregionale“ Theorie es beschreibt, der FcγIIIb- Rezeptor sich innerhalb der verschiedenen Völker derart gut erhalten konnte und seine Struktur und Varianten innerhalb der verschiedenen Populationen so gut vergleichbar sind. Die vorliegenden Daten zeigen jedoch an, dass ein Zusammenhang der Bevölkerungen untereinander besteht. Die Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse läßt eher den Schluss einer Entwicklung des modernen Homo sapiens entsprechend der „Out of Africa“- Theorie zu.

5.2 Anzahl der FCGR3B- Gene in 33 ausgesuchten HNA-1c- positiven Proben der Populationsstudie sowie 4 als HNA-1c- positiv typisierten Patienten

Fast jede Zelle, mit Ausnahme der für die Fortpflanzung bestimmten Zellen, besitzt einen gedoppelten Chromosomensatz, sie ist diploid (33). Dementsprechend besitzt fast jeder Mensch auch zwei Gene für den FcγIIIb- Rezeptor. Manche Menschen weisen aber drei Gene für den FcγRIIIb auf. Wahrscheinlich infolge eines ungleichen Crossing- over in der Meiose entstanden Individuen mit drei FCGR3B- Genen, ihre bislang am häufigsten nachgewiesene Form des Auftretens mit jeweils einem Gen für HNA-1a, HNA-1b und HNA-1c. Der Nachweis erfolgte erstmalig durch Koehne et al. durch eine quantitative Southern Blot- Analyse (71). Erst kürzlich konnten Matsuo et al. in einer HNA- Typisierungsstudie zeigen, dass es ebenfalls HNA-1c-negative Individuen mit drei FCGR3B- Genen gibt (87). Sie besitzen jeweils ein FCGR3B*1-, FCGR3B*2- und einem FCGR3B*2- Allel mit einer G→A Punktmutation in der Position 227. Die ungefähre Häufigkeit von Individuen mit drei FCGR3B- Genen ist nicht bekannt, im Licht der Studie von Matsuo et al. muss man wahrscheinlich aber von einem verbreiteterem Auftreten als bisher angenommen ausgehen (87). Inzwischen kann in vielen Fällen der Nachweis durch Sequenzanalyse und sequenzspezifische PCR mit Primern nach Bux (25, 26) und Steffensen (129) durchgeführt werden. Insbesondere die von Steffensen et al. entwicketen Primer erlauben eine Unterscheidung zwischen dem FCGR3B*2- und dem FCGR3B*3- Allel, welches mit den bislang vorhandenen Primern für die HNA- Typisierung nicht möglich war. Das FCGR3B*3- Allel tritt zwingenderweise mit dem Phänotyp HNA-1b auf, so dass bei einer HNA- Typisierung ohne Primer mit dem für HNA-1b- spezifischen Basenaustausch Cytosin in der Position 266 des FcγIIIb- Rezeptors, das FCGR3B*3- Allel fälschlicherweise als FCGR3B*2- Allel ausgelegt wird. Mit dem für die HNA-1b- Typisierung verwendetem Primerpaar SSP1 und SSP3 werden zwar HNA-1b- spezifische Basenpaare erfasst, diese umgeben jedoch die Region der HNA-1c-Punktmutation, können also nicht zwischen dem FCGR3B*2- und FCGR3B*3- Allel unterscheiden. Folge davon ist eine HNA- Typisierung mit der Annahme von mehr FCGR3B-Genen, als eigentlich vorhanden sind. Die Auswertung von 33 zufällig aus der Populationsstudie gewählten HNA-1c- positiven Proben sowie 4 HNA-1c- positiven Patienten zeigte nach Bearbeitung derselben mit Sequenzanalyse, HNA- Typisierung nach Bux et al. (25) und den HNA-1b spezifischen Primern nach Steffensen (129), dass bei der vorherigen HNA- Typisierung erwähnter Trugschluss aufgetreten war. Von den 21 ursprünglich als HNA-1a/ HNA-1b-heterozygot typisierten Proben erwiesen sich acht als HNA-1a- homozygot. Die Proben zeigten zwar in der HNA- Typisierung mit SSP1 und SSP3 ein vermeintliches FCGR3B*2- Allel an, dieses stellte sich aber in einer Typisierung mit HNA-1b- spezifischen Primern als das FCGR3B*3- Allel heraus. In der Sequenzanalyse war nur ein „Single peak“ zu sehen, so dass es sich um Individuen mit einem FCGR3B*1- und einem FCGR3B*3- Allel handeln muss. Auch bei den HNA-1b- homozygoten Proben fielen zwei Individuen auf, bei denen lediglich das FCGR3B*3- Allel nachweisbar war. Weder in der HNA-1b- spezifischen PCR- Analyse noch in der Sequenzanalyse zeigten sich Hinweise auf ein HNA-1b- spezifisches Produkt. Daraus lässt sich schliessen, dass hier nur das FCGR3B*3- Allel vorhanden ist.

Genaue Aussagen bezüglich der Anzahl der FCGR3B- Gene einer jeden Probe lassen sich nur mit Genauigkeit für die HNA-1a-/ HNA-1b-/ HNA-1c- heterozygoten Individuen machen. Hier lassen sich alle drei Allele nachweisen, was auf drei Gene schliessen lässt. Allerdings lassen sich diese Schlussfolgerungen nicht für HNA-1a- oder HNA-1b- homozygote/ HNA-1c- positive

Individuen ziehen. Da alle verwendeten Methoden qualitativer Natur sind, lassen sich nur die Phänotypen und daraus die Genotypen bestimmen, über die genaue Anzahl der Gene lässt sich nichts sagen. So könnte z.B. ein HNA-1a- homozygotes/ HNA-1c- positives Individuum ein gekoppeltes oder ein ungekoppeltes FCGR3B*3- Allel tragen. Dieses würde zur Folge haben, dass zwei oder gar drei Gene vorlägen. Bei Vorhandensein eines Genlocus, der kein FCGR3B-Gen enthält, würden in diesem Falle nie weniger als zwei Gene nachweisbar sein (Abb. 5.1). Analog stellen sich ähnliche Kombinationsmöglichkeiten für HNA-1b- homozygote/ HNA-1c-positive Individuen dar. Im Falle der beiden Proben, bei denen nur das FCGR3B*3- Allel nachweisbar ist, lassen sich folgende Kombinationsmöglichkeiten konstruieren. Entweder es ist nur ein einziges FCGR3B- Gen mit einem korrespondierendem leeren Genlocus vorhanden, oder es liegen HNA-1c- homozygote Individuen vor. Die entsprechende Anzahl der FCGR3B- Gene würde ein oder zwei betragen. Ähnliche Ergebnisse zeigen auch Studien von Lehrnbecher et al. (81). In einer HNA-1a-, HNA-1b- und HNA-1c- Typisierungsstudie fanden sie 14 afroamerikanische Individuen und einen Kaukasier, in denen nur das FCGR3B*3- Allel nachweisbar gewesen ist. Phänotypisch imponierten die Proben als HNA-1b, jedoch konnte in einem Verdau mit der endonuclease SfaN1 nur ein HNA-1c- spezifisches Produkt nachgewiesen werden (81).
Genaue Aussagen bezüglich der Anzahl der FCGR3B- Gene würde nur eine quantitative PCR-Analyse, z.B. mit dem Light- Cycler erbringen, welches in dem vorliegenden Fall mangels genügendem Probenmaterial nicht mehr durchgeführt werden konnte.
Trotz einer Korrektur der HNA-1a- und -1b- Genotypen nach der HNA- Typisierung mit den von Steffensen entwickelten Primern (129) hatten sich die Allelfrequenzen von HNA-1a und HNA-1b nicht wesentlich verändert und entsprechen noch den für die jeweilige Population zu erwartenden Allelfrequenzen.



(Abb. 5.3:) *Mögliche Zusammenstellungen der FCGR3B-Gene bei HNA-1a- homozygoten/ HNA-1c- positiven Individuen. Beispiel* **A** *zeigt eine Koppelung mit HNA-1a. In Abbildung* **B** *ist ein ungekoppeltes FCGR3B*3- Allel abgebildet;* **C** *zeigt hypothetisch einen FcγRIIIb- defizienten Genlocus, der andere Genlocus enthält ein an HNA-1a gekoppeltes FCGR3B*3- Allel. Die Anzahl der FCGR3B- Gene ist unter jedem Beispiel geschrieben.*

5.3 Vererbungsmodus des FCGR3B*3- Allels

Über den Vererbungsmodus des FCGR3B*3- Allels gibt es bislang unterschiedliche Hypothesen. Man geht davon aus, dass es den HNA- Allelen entsprechend, also kodominant, vererbt wird. Eine mögliche Koppelung des FCGR3B*3- Allels an das FCGR3B*2- Allel kann jedoch nicht ausgeschlossen werden (71). Steffensen et al. stellten 1999 entsprechend den von ihnen durchgeführten Familienstudien die Hypothese auf, dass das FCGR3B*3- Allel nur in

Kombination mit dem FCGR3B*1- Allel weitergegeben wird (129). Steffensen et al. hatten in ihrer Studie Individuen gefunden, die entweder die Allele FCGR3B*1, -*2 und -*3 oder nur FCGR3B*1 und -*3 trugen, jedoch keine mit der Allelkombination FCGR3B*2 und FCGR3B*3. Bei einem ungleichen Crossing- over in der Meiose, so vermuteten sie, würde das FCGR3B*3- an das FCGR3B*1- Allel gekoppelt und könne nur in dieser Kombinationsmöglichkeit weitervererbt werden (129). In verschiedenen Populationsstudien (25; 51; 69; 73) wurden Proben mit den Allelen FCGR3B*2 und FCGR3B*3 gefunden, so dass ein alternativer Vererbungsmodus zu dem von Steffensen beschriebenen vorliegen muss. Anhand von vier Familienstudien konnte dieser alternative Vererbungsmodus aufgezeigt werden (49). Bei zwei der vier Familien wird das FCGR3B*3- Allel an das FCGR3B*1- Allel gekoppelt weitervererbt. Der HNA-1c- positive Elternteil beider Familien ist HNA-1a/ HNA-1b- heterozygot. In der ersten Familie (Familie A) ist ein Kind Träger des FCGR3B*3- Allels und weist beide Allele FCGR3B*1 und FCGR3B*2 auf. Demnach stammt das FCGR3B*2- Allel vom HNA-1c- negativen Elternteil ab, das an das FCGR3B*1- gekoppelte FCGR3B*3- Allel jedoch stammt von dem HNA-1c- positiven Träger ab. Das entsprechende Geschwister ist jedoch HNA-1b- homozygot und hat je ein FCGR3B*2- Allel von beiden Eltern. Ebenfalls deutlich tritt der gekoppelte Vererbungsmechanismus in der zweiten Familie (Familie B) hervor. Das HNA-1c- negative Elternteil ist ebenfalls HNA-1a/ HNA-1b- heterozygot. Ihr Kind ist jedoch HNA-1a- homozygoter Träger des FCGR3B*3- Allels, besitzt also das an das FCGR3B*1- gekoppelte FCGR3B*3- Allel und vermutlich auch das FCGR3B*1- Allel vom HNA-1c- negativen Elternteil, trägt demnach zwei oder drei Gene. Hier haben die HNA-1c- positiven, HNA-1a/ HNA-1b- heterozygoten Individuen insgesamt drei FCGR3B- Gene.
Ein alternativer Vererbungsmodus ist die Weitergabe eines ungekoppelten FCGR3B*3- Allels, wie aus den beiden anderen Familien ersichtlich wird. In der dritten Familie (Familie C) ist ein Elternteil Träger des FCGR3B*3- Allels und HNA-1b- homozygot, der andere HNA-1c- negative Elternteil ist HNA-1a/ HNA-1b- heterozygot. Beide Kinder des Elternpaares von Familie C sind Träger des FCGR3B*3- Allels, welches von dem HNA-1c positiven Elternteil weitervererbt wurde und haben von dem anderen Elternteil ein FCGR3B*2- Allel übertragen bekommen. Eine vergleichbare Konstellation liegt bei der vierten Familie (Familie D) vor. Obwohl anzunehmen ist, dass hier die HNA-1c- positiven Träger nur zwei FCGR3B- Gene besitzen, kann dieses nur durch eine quantitative PCR belegt werden. Analog der Koppelung des FCGR3B*3- Allels an FCGR3B*1 könnte auch eine Koppelung an FCGR3B*2 vorliegen, so dass auch hier Individuen mit drei FCGR3B- Genen vorlägen.
Aus den oben beschriebenen Familienanalysen lässt sich erkennen, dass das FCGR3B*3- Allel sowohl an FCGR3B*1 gekoppelt weitervererbt werden kann, als auch als einzelnes Allel übertragen werden kann (49). Für das FCGR3B*3- Allel existieren demnach zwei verschiedene Vererbungsmodi. Allerdings kann nur aus einer Genotypenanalyse mit sequenzspezifischen Primern geschlossen werden, ob ein gekoppeltes oder ein ungekoppeltes FCGR3B*3- Allel vorliegt. Ebenso kann über die genaue Anzahl von Genen bei den HNA-1b- homozygoten/ HNA-1c- positiven Träger nur eine quantitative PCR Auskunft geben.

5.4 Quantitative Untersuchung zweier FcγRIIIb- defizienter Patientinnen und ihrer Familien mit dem Light- Cycler

Eine ebenfalls quantitative Fragestellung findet sich auch bei den Familien 1 und 2, deren Mütter als FcγRIIIb- defizient typisiert wurden. Das Entstehen einer FcγRIIIb- Defizienz wird durch ein ungleiches Crossing- over zwischen zwei FCGR3B- Genen nach einer Fehlpaarung der

homologen Chromosomen während der Meiose erklärt (61). Insgesamt sind die Häufigkeiten FcγRIIIb- defizienter Individuen recht unterschiedlich, für die kaukasische Bevölkerung schwankt sie zwischen 0.080 und 0.001 (44; 95). Schätzungen gehen davon aus, dass die Anzahl der hemizygoten Träger des FcγRIIIb- leeren Genlocus bei etwa 3% liegen (44). Im Falle der betreffenden Familien geht man davon aus, dass die Väter dieser Familien Träger zweier FCGR3B- Gene sind. Demnach können die Nachkommen dieser Familien lediglich ein FCGR3B- Gen besitzen, da der von der Mutter vererbte Genlocus leer ist. Um die Aussagekraft dieser Hypothese klären zu können, wurden zwei Familien mit FcγRIIIb- defizienten Müttern mit dem Light- Cycler quantitativ untersucht. In der quantitativen Auswertung müsste sich also ein Mengenverhältnis amplifizierter sequenzspezifischer DNA von 2:1:0 für jeweils Vater, Kind und Mutter zeigen. Dazu mussten Primer konstruiert werden, die von den für die HNA- Allele kennzeichnenden Basenaustauschen unabhängig sind, um trotz unterschiedlicher HNA-Genotypen eine Vergleichbarkeit der Proben untereinander gewährleisten zu können. Weiterhin müsste ihre Spezifität für den FcγRIIIb gewährleistet sein. Dazu wurden der Vorwärts- und Rückwärtsprimer so gelegt, dass die an ihrem Ende gelegene Base Spezifität für den FcγRIIIb zeigt. Im Falle des Vorwärtsprimers FCGRIIIBVP1 wurde die Spezifität durch ein in Position 473 gelegenes T und für den Rückwärtsprimer FCGRIIIBRP1 ein in Position 561 gelegenes C gewährleistet. Ansonsten wäre der FcγRIIIa zusätzlich amplifiziert worden und hätte die quantitative Auswertung der Ergebnisse unmöglich gemacht. Nach entsprechender PCR-Optimierung der Standardproben sowie der internen Positivkontrollen konnten die Familien untersucht werden. Als interne Positivkontrolle wurde die DNA eines HNA-1b- homozygoten Individuums genommen, von dem angenommen wurde, dass es Träger von zwei FCGR3B-Genen ist. Betrachtet man nun das Verhältnis der ermittelten Kopienanzahlen zueinander, so zeigt sich, dass das erwartete Ergebnis eingetreten ist, nämlich ein Mengenverhältnis an gemessenen DNA- Kopien von 2:1:0 für Vater, Kind und Mutter. Es kann also davon ausgegangen werden, dass Kinder von als NA- Null- typisierten Müttern nur ein FCGR3B- Gen enthalten. Die Schmelzpunktanalyse der amplifizierten Produkte zeigt sequenzspezifische Amplikons bei 82°C von Vater und Kind an, hingegen sind keine derartigen Amplikons in den als NA- Null typisierten Proben nachweisbar. Hier kann von einem vollständigen Fehlen des FCGR3B- Gens ausgegangen werden, da weder die im Anfangsteil des FcγIIIb- Rezeptors gelegenen Primer für die HNA- Typisierung , noch die im mittleren Teil des Rezeptors gelegenen Primer für die quantitative PCR- Analyse zu der Amplifikation eines spezifischen Produktes geführt haben. Dieses Ergebnis liegt in Konkordanz mit den Ergebnissen von de Haas et al., die bei ihrer Studie FcγRIIIb- defizienter Patienten ebenfalls keinen FcγIIIb- Rezeptor nachweisen konnten (35).

Der Nachweis von Individuen mit einem FCGR3B- Gen ist bereits durch de Haas et al. in einer Southern Blot- Analyse gelungen (35). Der Light- Cycler stellt jedoch eine schnelle Methode zum quantitativen Gennachweis dar. Individuen mit nur einem FCGR3B- Gen fallen in einer qualitativen PCR nicht als solche auf, da sie als homozygote Träger entweder des FCGR3B*1- oder des FCGR3B*2- Allels klassifiziert werden. Obwohl angenommen wird, dass ungefähr 3% der kaukasischen Bevölkerung hemizygoter Träger des FCGR3B- Gens sind (44), also jeweils ein FCGR3B- Gen und einen leeren Genlocus tragen, dürfte die Dunkelziffer weitaus höher liegen. Sie dürften in den meisten Fällen ebenso klinisch inapparent bleiben, wie Personen, denen das FCGR3B- Gen vollständig fehlt (35). Auch tritt nicht bei jeder Schwangerschaft einer FcγRIIIb-defizienten Patientin eine NIN auf (108), welches die Erfassung betroffener Individuen und ihrer hemizygoten Nachkommen und damit eine Schätzung der Vorkommenshäufigkeit betroffener Individuen erheblich erschwert. Dementsprechend unterschiedlich können die gefundenen

Häufigkeiten des Phänotyps NA- Null in Studien ausfallen. Torio fand in seiner in Spanien basierenden HNA- Typisierungsstudie kein Individuum mit dem Phänotyp NA- Null (136), dagegen hat Muniz- Diaz eine Vorkommenshäufigkeit von 0.080 gefunden (95). Es zeigt sich also, dass die Verteilung FcγRIIIb- defizienter Individuen noch nicht ausreichend untersucht ist und weitere, umfassende Bevölkerungsuntersuchungen notwendig sind. Mit dem Nachweis von Individuen mit nur einem Gen (35), werden die unter den HNA-1c- positiven Proben der Populationsstudie sowie der 4 Patienten vorgestellten Kombinationsmöglichkeiten wahrscheinlicher und verständlicher. Wenn bedacht wird, dass das Auftreten einer FcγRIIIb-Defizienz durch ein ungleiches Crossing- over bedingt ist, so kann an die Nachkommen entweder kein oder aber zwei FCGR3B- Gene weitergegeben werden. Der Chromosomensatz des Menschen ist aus je einem maternalem und einem paternalen Anteil zusammengesetzt, also eine jede Zelle, mit Ausnahme der Ei- und Spermazelle, ist diploid (33). Die Möglichkeit, dass Individuen mit drei FCGR3B- Genen vorliegen, ist bereits am Beispiel der HNA-1a/ HNA-1b-heterozygoten/ HNA-1c- positiven Trägern gezeigt worden (71). Ebenso zeigte Matsuo in seiner Studie Individuen auf, die ebenfalls drei FCGR3B- Gene tragen, das dritte Gen bestehend aus einem HNA- Allel, welches eine Mutation enthält (87). Bei dieser Betrachtung erscheint es durchaus möglich, dass es weitaus mehr Individuen gibt, deren Anzahl von FCGR3B- Genen sich, entgegen der bisherigen Annahme, auf mehr oder weniger als zwei beläuft (71). Problematisch ist jedoch der Nachweis dieses Phänomens. Hier ist der Einsatz einer quantitativen PCR- Untersuchung durchaus gerechtfertigt (50).

5.5 Sequenzanalyse des FcγIIIb- Rezeptoren von Patientin 1, Fall 1 und Patientin 2, Fall 2 aus cDNA

Varianten des FcγRIIIb, Inkongruenzen von maternalen und kindlichem Rezeptor oder das Fehlen des FcγIIIb- Rezeptors der Mutter mit nachfolgender Sensibilisierung können unter anderem an der Entstehung einer Neonatalen Isoimmunen Neutropenie beteiligt sein (22; 26; 35; 61; 77; 134). Eine Charakterisierung des FcγIIIb- Rezeptors der betroffenen Personen ist daher von grösster Wichtigkeit, um eine mögliche Erklärung für das Auftreten dieses Phänomens geben zu können. Man schätzt die Auftretenshäufigkeit der NIN mit ungefähr 1 pro 2000 Neugeborenen ein (143). NIN können durch verschiedene Mechanismen entstehen. Zum einen durch eine Alloimmunisierung der Mutter gegen granulozytäre Antigene des Kindes. Zum anderen kann die Mutter an einer autoimmunen Neutropenie leiden und plazentagängige IgG- Antikörper auf das Kind übertragen (128; 141). Letzteres ist aber ein seltenes Ereignis. Auch HLA- Antikörper sind im Zusammenhang mit einer NIN beschrieben worden. Sie scheinen jedoch die Granulozytenzahlen nur mässig zu beeinflussen, da sie auch diese nicht spezifisch angreifen, sondern sich gleichmässig auf alle HLA- tragenden Organe des Föten verteilen (77).
Bei den Patientinnen 1 und 2 (Fall 1 und Fall 2), deren Kinder nach der Geburt eine NIN aufwiesen, wurde mittels HNA- Typisierung und Sequenzanalyse eine Untersuchung des FcγRIIIb auf eventuelle Mutationen hin durchgeführt. Beide Mütter zeigten im GIFT das Auftreten granulozytärer Antikörper an, im Fall der Patientin von Fall 1 waren diese auch beim Kind nachweisbar. Die HNA- Typisierung zeigte für Fall 1, dass die Mutter HNA-1a-, der Vater jedoch HNA-1b- homozygot ist. Leider konnte eine HNA- Typisierung des Kindes nicht durchgeführt werden, da nicht genügend Material zugänglich war. Ein FCGR3B*3- Allel konnte bei beiden Eltern von Fall 1 nicht nachgewiesen werden. Bei den Proben von Fall 2 stimmten die Genotypen von Mutter und Kind überein und wurden in beiden Fällen als HNA-1b- homozygot/

HNA-1c- negativ bestimmt. In der Auswertung der Sequenzanalyse der FcγIIIb- Rezeptoren beider Mütter von Fall 1 und 2 waren keine Mutationen nachweisbar, die Basensequenz der Rezeptoren zeigten die für ihr jeweiliges Allel typischen Basenaustausche an den entsprechenden Stellen. Bei den Proben von Fall 2 wurden HLA- spezifische Antikörper der Mutter im LIFT nachgewiesen. Es ist daher anzunehmen, dass die NIN des Kindes unter anderem darauf begründet ist. Die auslösende Ursache der NIN ist jedoch im Fall 1 anders. Obwohl keine Variation des FcγIIIb- Rezeptors der Mutter vorliegt, könnte dennoch eine Unverträglichkeitsreaktion die Ursache gewesen sein. Das Kind müsste den Genotyp HNA-1a/ HNA-1b- heterozygot aufweisen, da beide Eltern homozygot für das jeweilige Allel sind. Jedoch könnte der Genotyp des Kindes auch HNA-1b homozygot sein. Bei dieser Konstellation müsste die Mutter hemizygot für das FCGR3B*1- Allel sein, einer ihrer Genloci für das FCGR3B- Gen wäre also leer. Den leeren Genlocus hätte sie in der Folge an ihre Nachkommenschaft vererbt, das FCGR3B*2- Allel des Kindes stammt vom Vater ab. In diesem Fall wäre es also zu einer Unverträglichkeitsreaktion zwischen den Allelen FCGR3B*1- und -*2 gekommen, die durch die Hemizygotie der Mutter begünstigt würde. Eine durch Unverträglichkeit des FCGR3B*1- und FCGR3B*2- Allels bedingte NIN ist bereits von Bux et al. beschrieben worden (24). Dabei fiel das Neugeborene einer Multipara ebenfalls durch eine NIN auf. In dem Serum der Mutter wurden Antikörper mit einer Spezifität für HNA-1b nachgewiesen. Die Mutter war als HNA-1a- homozygot typisiert worden, der Vater als HNA-1a/ HNA-1b- heterozygot. Demnach müßte das Kind entweder HNA-1a- homozygot oder HNA-1a/ HNA-1b- heterozygot sein. Die Granulozyten des Kindes zeigten jedoch den Phänotyp HNA-1b auf. Bux et al. folgerten daraus, dass die Mutter eine hemizygote Trägerin des FcγRIIIb (HNA-1a/ NA- Null) sein müsste, und den FcγRIIIb- defizienten Genlocus an das Kind weitergegeben haben muss. Das vom Vater stammende FCGR3B*2- Allel des Kindes jedoch löste bei der Mutter eine Unverträglichkeitsreaktion mit Antikörperbildung aus (24).

5.6 Sequenzierung des Intron III/ FcγRIIIb

Die Sequenzierungsarbeit und Erschliessung des Intron III/ FcγRIIIb, wurde im September 1999 angefangen und im Juli 2000 bei der Anzahl von 2350 Basenpaaren beendet. Gleichzeitig war im Juli 2000 der von Birren et al. sequenzierte Homo sapiens- Klon RP11- 4M15, der die Sequenz der Exon- Anteile des FcγRIIIb sowie die Basenfolgen der im Gen enthaltenen Introns I,II,III und IV beinhaltete, im Internet unter der NCBI Homepage zugänglich. Die Sequenz war am September 1999 eingereicht worden. Vergleiche der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Sequenz des Intron III und betreffender Sequenzabschnitte des von Birren et al. untersuchten Klons zeigten eine 61% Übereinstimmung beider Sequenzen. Dabei ist die Übereinstimmung beider Sequenzen in dem Anfangsteil am höchsten, später jedoch zeigen sich deutliche Inkongruenzen, die sich zum Teil über Abschnitte einiger hundert Basenpaare belaufen. Obwohl Introns als nicht kodierende Abschnitte nicht dem evolutionären Druck der Exons unterliegen, ist es dennoch unwahrscheinlich, dass sie innerhalb des Homo sapiens derartige Polymorphismen aufweisen, insbesondere über derart lange Strecken. Welche der beiden Sequenzen bezüglich der unterschiedlichen Abschnitte dem eigentlichen Intron III entsprechen, ist schwer zu definieren. Allerdings muss bedacht werden, dass bei der Sequenzierung des Intron III im Rahmen dieser Doktorarbeit die DNA unterschiedlicher Individuen benutzt wurde, um mögliche interindividuelle Unterschiede erkennen zu können. Dadurch werden auch Mutationen als solche erkannt und der Fehler, diese als allgemeingültiger Bestandteil des Intron anzuerkennen, wird

minimiert. Weiterhin wird der von Birren et al. sequenzierte Klon in seiner Rohfassung gezeigt, d.h., dass auch Basen abgebildet werden, die vom Sequenzierungsgerät nicht erkannt wurden. Ein weiteres Problem der Sequenzierung, welches ebenfalls zu berücksichtigen ist, stellt die oft schlechte Lesbarkeit von Sequenzen am Anfang und am Ende eines DNA- Fragmentes dar. Gleiches Problem war auch bei der eigenen Sequenzierung aufgetreten und konnte oftmals nur dadurch gelöst werden, dass die Primer in kleineren Abständen zueinander gelegt wurden. Diese unvermeidbaren Fehlerquellen haben sehr wahrscheinlich zu den Inkongruenzen der eigenen und der von Birren gefundenen Sequenz einiger Abschnitte des Intron III geführt.
Die Sequenzierung des Intron III bezweckte sowohl dessen Erschliessung als auch die Möglichkeit, innerhalb des Introns neue Primer für die Amplifikation oder Typisierung des FcγRIIIb zu legen. Aufgrund der Grösse des Intron III eignen sich lediglich Anfang und Ende für die Primerplanung. Obgleich es sehr unwahrscheinlich ist, dass sich das Intron III des FcγRIIIb von dem des FcγRIIIa unterscheidet, sollte dennoch eine Sequenzierung des Intron III/ FcγRIIIa erfolgen, um mögliche rezeptorspezifische Unterschiede aufzudecken, die bei einem späteren Einsatz des Primers Probleme bereiten könnten.
Nicht destoweniger stellt sich die Frage nach der Funktion der Struktur. Auf diese Frage kann noch keine Antwort gegeben werden, da bisher immer noch zu wenig über die Funktion der Introns im Allgemeinen bekannt ist. Jedoch ist zu festzustellen, dass das Intron III innerhalb der verschiedenen DNA- Proben keinerlei Unterschiede oder Mutationen zeigte. Obwohl die Stichprobe mit fünf Proben sehr klein ist, kann dennoch eine Konstanz der Sequenz angenommen werden. Vergleiche mit anderen Arbeiten zeigen, dass sich die Introns verschiedener Tier- oder Pflanzengruppen meist nur minimal voneinander unterscheiden. Sie haben sich demnach also innerhalb der Entwicklung als relativ unveränderlich dargestellt, obwohl sie nicht von derartiger Wichtigkeit sind wie die Exons.

6. Zusammenfassung

Ein Ziel der Doktorarbeit war es, die Verteilung der Allele FCGR3B*1, -*2 und -*3 mittels sequenzspezifischer PCR anhand von Proben aus Bangladesch, Papua- Neu Guinea, Ghana, Zimbabwe, sowie von in Südafrika beheimateten Asiaten, Afrikanern aus Amerika und Chinesen aus Taiwan zu untersuchen. Die gewonnenen Daten sollten in einen Kontext zur menschlichen Entwicklung gebracht werden. Vergleiche mit bereits bestehenden HNA- Typisierungsstudien zeigten eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse. Gegenüberstellungen mit bereits bekannten HNA- Typisierungsergebnissen weiterer Populationen sowie Einbeziehung von Mutationsanalysen lassen Vermutungen zu, die der „Out of Africa“- Theorie der Entwicklung des modernen Homo sapiens entsprechen, nach der sich dieser aus Afrika in mehreren Wanderungen über die gesamte Welt verbreitet haben soll.
Es ist bekannt, dass HNA-1a/ HNA-1b- heterozygote/ HNA-1c- positive Individuen Träger dreier FCGR3B- Gene sein können. Um ihre Verteilung überprüfen zu können, wurden insgesamt 37 HNA-1c- positive Proben mit Sequenzanalyse und sequenzspezifischer PCR bearbeitet, um die Anzahl der in den Individuen vorhandenen FCGR3B- Gene zu ermitteln. Die Untersuchung ergab, dass insgesamt 13 der Proben drei FCGR3B- Gene enthalten, mit je einem Allel für FCGR3B*1, -*2 und -*3. 8 Proben stellten sich als HNA-1a- homozygote, 14 als HNA-1b- homozygote Träger des FCGR3B*3- Allels dar. Zwei Proben enthielten nur das FCGR3B*3- Allel. Mit Ausnahme der HNA-1a/ HNA-1b- heterozygoten/ HNA-1c- positiven Proben kann in den übrigen die Genanzahl nur durch eine quantitative PCR bestimmt werden. Bei der Untersuchung der HNA-1a- bzw. HNA-1b- heteroyzgoten/ HNA-1c- positiven Proben fiel auf,

dass in 7 der 21 Proben das FCGR3B*3- Allel mit den für das FCGR3B*2- Allel gebrauchten Primern amplifiziert worden war. Die zur Amplifikation des FCGR3B*2- Allels benützten Primer berühren nicht die für das FCGR3B*3- Allel bezeichnende Punktmutation, so daß hier dennoch ein PCR Produkt entstanden ist, obwohl die Probe eigentlich kein FCGR3B*2- Allel enthält.
In dieser Arbeit sollte weiterhin der Vererbungsmodus des FCGR3B*3- Allels genauer untersucht werden. Bislang wurde angenommen, dass das FCGR3B*3- Allel nur an das FCGR3B*1- Allel gekoppelt weitergegeben würde. Eine Studie über vier Familien, in denen das FCGR3B*3- Allel nachgewiesen wurde, aber konnte einen alternativen Vererbungsmodus aufdecken. Die Studie konnte belegen, dass das FCGR3B*3- Allel auch in seiner einfachen Form, dass heisst ungekoppelt, an die Nachkommenschaft vererbt werden kann.
Eine ähnliche Fragestellung lag auch bei der quantitativen PCR- Untersuchung zweier Familien vor, in denen beide Mütter durch eine FcγRIIIb- Defizienz aufgefallen waren. Die Nachkommenschaft müsste den Überlegungen nach nur das FCGR3B- Gen des Vaters aufweisen, der entsprechende mütterliche Genlocus wäre leer. Beide Kinder würden demnach in einer quantitativen PCR nur halb soviel DNA- Kopien aufweisen wie ihre Väter, bei beiden Müttern wären keine DNA- Kopien nachweisbar. Für diese Fragestellung wurde ein FcγRIIIb- spezifisches Primerpaar konstruiert, welches ein 160 bp langes Fragment umschließt. Mit Hilfe einer quantitativen PCR- Analyse mittels Light- Cycler Technik konnte nach Ermittlung einer Standardkopienanzahl einer Probe, von der angenommen wurde, dass sie zwei FCGR3B- Gene enthält, ein Kopienverhältnis von Vater, Kind und Mutter als 2:1:0 belegt werden. Teile der Ergebnisse sind in Tissue Antigens publiziert (50).
Ebenfalls sollte eine Sequenzanalyse des FcγIIIb- Rezeptors zweier Patientinnen, deren Kinder postpartal einen Neonatale Isoimmune Neutropenie entwickelt hatten, mögliche neue Mutationen des FcγRIIIb- Rezeptors offenlegen. In beiden Fällen konnten keine Mutationen gefunden werden und die mit der PCR durchgeführten HNA- Typisierungen stimmten mit der Sequenzanalyse überein.
Weiterhin sollte eine Sequenzanalyse des Intron III/ FcγRIIIb durchgeführt werden, um hier neue Primer für die HNA- Typisierung in dieses Gebiet legen zu können. Das Intron III stellte sich in der Gelelektrophorese als etwa 3300 bp lang dar. Es wurde bis zum bp 2350 sequenziert, als die von Birren et al. publizierte Sequenz des Introns auf dem Homo sapiens- Klon RP11- 4M15 im Internet zugänglich wurde. Vergleiche mit der Sequenz von Birren zeigten eine 61% Übereinstimmung mit der eigenen Sequenz.

Summary:

In this doctoral thesis the regional distribution of the alleles FCGR3B*1, -*2 and -*3 contained in samples from Bangladesh, Papua New Guinea, Ghana, Zimbabwe as well as South African Asians, African Americans and Chinese from Taiwan was to be evaluated by means of sequence-specific PCR. The results were then to be asessed in context with different hypotheses of human evolution. The data found were in good concordance to already existing studies, and, when combined with results from mutation analyses, support the “Out of Africa”- theory, by which modern Homo sapiens evolved from Africa.
HNA-1a/ HNA-1b- heterozygous/ HNA-1c- positive individuals are known to carry either two or three FCGR3B- genes. Using a primer pair in which only one primer is specific for HNA-1b often leads to misinterpretation of the alleles present. In order to determine the amount of genes present in 37 HNA-1c- positive samples, these were processed in a PCR with sequence specific

primers: thirteen samples had three FCGR3B- genes with one allele for FCGR3B*1, -*2 and -*3, respectively. Eight samples were HNA-1a- homozygous, fourteen HNA-1b- homozygous carriers of the FCGR3B*3- allele. Two samples only had the FCGR3B*3- allele. With exception of the thirteen samples mentioned earlier on, the exact number of genes in the remaining samples can only be ascertained by quantitative PCR.
The FCGR3B*3- allele is supposed to be linked to the FCGR3B*1- allele and to be inherited in this manner. However, in a study of four families, an alternative mode of inheritance could be ascertained, by which the FCGR3B*3- allele can be passed down on its own.
Two mothers, who had been determined to be deficient of the FcγIIIb- receptor and their families had been subjected to a quantitative PCR- analysis. After construction of a primer pair specific for the FcγRIIIb and developement of a suitable programme in the Light- Cycler, quantification showed the father to have two FCGR3B-genes, the child only one and the mother, as expected, to have none. Some of the results have been published in Tissue Antigens (50).
Additionally, the FcγIIIb- receptors of two mothers, whose children suffered from Neonatal Isoimmune Neutropenia, were examined by means of sequence analysis for possible mutations causing aforementioned illness. Both samples did not show any mutations.
Finally, a sequence analysis of Intron III/ FcγRIIIb was made, under the idea of possibly being able to construct new primers within this site. Intron III comprises 3300bp; sequence analysis was done up to bp2350. By this time, the full sequence was made public on the internet by Birren et al. Own results showed a concordance of 61% with Birren´s sequence.

7. Ausblick

Mit zunehmenden Anzahl der HNA- Typisierungsstudien verschiedener Populationen werden die verwandschaftlichen Beziehungen einzelner Bevölkerungsgruppen untereinander immer besser ersichtlich. Je mehr über die Verbreitung der Allele FCGR3B*1, -*2 und -*3 als auch ihrer Varianten und Mutationen bekannt wird, desto eher ist es möglich, die Wanderungsbewegungen des Homo sapiens abschätzen zu können. Obwohl die Verfolgung der HNA- Typisierung verschiedener Populationen nicht den Anspruch erheben kann, als einzelnes Teilstück betrachtet, die Entwicklung des modernen Menschen aufklären zu können, so kann sie doch bereits bestehende Vermutungen stützen. Dazu müssen weiterhin umfassende HNA-Typisierungsstudien unterschiedlicher Populationen durchgeführt und miteinander verglichen werden. Ein weiterer Schwerpunkt sollte auch auf die Erfassung regional- spezifischer Mutationen des FcγIIIb- Rezeptors gelegt werden.
Auch ist noch viel zu wenig über die Verteilung von Individuen mit drei FCGR3B- Genen bekannt. Mit dem Light- Cycler kann die vorliegende Fragestellung einfach geklärt werden. Das Problem ist lediglich die Beschaffung einer genügend grossen Anzahl HNA-1c- positiver Proben.
Bei entsprechend optimiertem PCR- Programm könnte der Light- Cycler eine schnelle Diagnosefindung einiger Krankheitsbilder ermöglichen, die auf Veränderungen des FcγRIIIb beruhen. Je nach verwendetem Primer wäre so das Aufdecken FcγRIIIb- defizienter Mütter im Rahmen einer Neonatalen Isoimmunen Neutropenie oder Veränderungen innerhalb der HNA-spezifischen Basenaustausche ein Vorgang von weniger als einer Stunde. Allerdings müssen dazu geeignete PCR- Programme konzipiert werden, da im Augenblick die derzeit für den Light-Cycler gebrauchten Arbeitsmethoden sich lediglich für die Grundlagenforschung als für den Gebrauch innerhalb der Klinik eignen.

8. Literaturverzeichnis

(1) Abid S, Nsiri B, Sall A, Joudi K, Jenhani F, Boukef K: NA antigen frequencies in the Tunisian population. Pathol Biol (Paris), **48**:562, 2000

(2) Abo T, Tilden AB, Balch CM, Kumagai K, Troup GM, Cooper MD: Ethnic differences in the lymphocyte proliferative response induced by a murine IgG1 antibody, Leu-4, to the T3 molecule. J Exp Med, **160**:303, 1984

(3) Allen JM, Seed B: Isolation and expression of functional high- affinity Fc receptor complementary DNAs. Science, **243**:378, 1989

(4) Alphey, L: DNA- Sequenzierung. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin; 1998

(5) Anderson CL: Isolation of the receptor for IgG from a human monocyte cell line (U937) and from human peripheral blood monocytes. J Exp Med, **156**:1794, 1982

(6) Anegón I, Cuturi MC, Trinchieri G, Perussia B: Interaction of Fc receptor (CD16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. J Exp Med, **167**:452, 1988

(7) Barclay AN, Brown MH, Law SKA, Mc Knight AJ, Tomlinson MG, van der Merwe PA; eds.: The Leukocyte Antigen, Facts Book. 2nd Edition, Academic Press, New York, 1997

(8) Bierling P, Poulet E, Fromont P, Seror T, Bracq C, Duedari N: Neutrophil- specific antigen and gene frequencies in the French population. Transfusion, **30**:848, 1990

(9) Boxer LA, Stossel TP: Effects of anti-human neutrophil antibodies in vitro: Quantitative studies. J Clin Invest **53**:1534, 1974

(10) Boxer LA, Greenberg MS, Boxer GJ, Stossel TP: Autoimmune neutropenia. N Engl J Med, **293**:748, 1975

(11) Bøyum A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand J Clin Lab Invest, **21**, supp79:77, 1968

(12) Bräuer G. Africa´s place in the evolution of homo sapiens. In: Continuity or Replacement? Controversies in Homo sapiens Evolution. Bräuer G, Smith FH (Hrsg.). Rotterdam, Niederlande

(13) Bredius RGM, Fijen CAP, de Haas M, Kuijper EJ, Weening RS, van de Winkel JGJ, Out TA: Role of neutrophil FcγRIIa (CD 32) and FcγRIIIb (CD 16) polymorphic forms in phagocytosis of human IgG1- and IgG3- opsonized bacteria and erythrocytes. Immunology, **83**:624, 1994

(14) Brinkmann: Abriß der Geologie, Band II; Historische Geologie, Erd- und Lebensgeschichte. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart; 14 Aufl.; 1991

(15) Brunkhorst BA, Strohmeier G, Lazzari K, Weil G, Melnick D, Fleit HB, Simons ER: Differential roles of the Fc gamma RII and Fc gamma RIII in immune complex stimulation of human neutrophils. J Biol Chem, **267**:20659, 1992

(16) Bux J, Mueller-Eckhardt C: Immungranulozytopenien im Kindesalter. Klinische Pädiatrie **201**:431, 1989

(17) Bux J, Kissel K, Nowak K, Spengel U, Mueller-Eckhardt C: Autoimmune neutropenia: Clinical and laboratory studies in 143 patients. Ann Hematol, **63**:249, 1991

(18) Bux J, Mueller-Eckhardt C: Autoimmune neutropenia. Semin Hematol, **29**:45, 1992

(19) Bux J, Sohn M, Hachmann R, Mueller-Eckhardt C: Quantitation of granulocyte antibodies in sera and determination of their binding sites. Br J Haematol, **82**:20, 1992

(20) Bux J, Jung KD, Kauth T, Mueller- Eckhardt C. Serological and clinical aspects of granulocyte antibodies leading to alloimmune neonatal neutropenia. Transfus Med, **2**:143, 1992

(21) Bux J, Kober B, Kiefel V, Mueller- Eckhardt C: Analysis of granulocyte- reactive antibodies using an immunoassay based upon monoclonal- antibody- specific immobilisation of granulocyte antigens. Transfusion Med, **3**:157, 1993

(22) Bux J, Hartmann C, Mueller-Eckhardt C: Alloimmune neonatal neutropenias resulting from immunization to a high frequency antigen on granulocyte Fc gamma receptor III. Transfusion, **34**:608, 1994

(23) Bux J, Hoch J, Bindl L, Müller A, Mueller-Eckhardt C: Transfusions assoziierte Lungeninsuffizienz. Dtsch Med Wochenschr, **119**:19, 1994

(24) Bux J, Behrens G, Leist M, Mueller-Eckhardt C: Evidence that the granulocyte-specific antigen NC1 is identical with NA2. Vox Sang, **68**:46, 1995

(25) Bux J, Stein E-L, Santoso S, Mueller-Eckhardt C: NA frequencies in the German population, determined by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. Transfusion, **35**:54, 1995

(26) Bux J, Stein E-L, Bierling P, Fromont P, Clay M, Stroncek D, Santoso S: Characterization of a new alloantigen (SH) on the human neutrophil Fc-γ Receptor IIIb. Blood, **89**:1027, 1997

(27) Bux J, Kissel K, Hofmann C, Santoso S: The Use of Allele- Specific Recombinant Fcγ Receptor IIIb Antigens for the detection of Granulocyte Antibodies. Blood, **93**:357, 1999

(28) Cartron J, Celton JL, Gane P, Astier A, Fridman WH, Boissinot G, Cartron JP: Iso-immune neonatal neutropenia due to an anti-Fc receptor III (CD16) antibody. Eur J Pediatr, **151**:438, 1992

(29) Cavalier- Smith CCF: Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection of cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C- value paradox. J Cell Sci, 1978

(30) Chomczynski P, Sacchi N: Single- step Method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanatephenolchloroform extraction. Anal Biochem, **162**:156, 1987

(31) Chu CC, Lee HL, Chu TW, Lin M: Genotyping Of Human Platelet Antigen System 1-5 And Neutrophil Antigen In Taiwan. Vox Sang, **78**(suppl. 1):P038, 2000

(32) Clark MR, Liu L, Clarkson SB, Ory PA, Goldstein IM: An abnormality of the gene that encodes neutrophil Fc receptor III in a patient with systemic lupus erythematosus. J Clin Invest, **86**:341, 1990

(33) Czihak G, Langer H, Ziegler H. Biologie- Ein Lehrbuch. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 5. Auflage, 1992

(34) de Haas M, Kleijer M, Minchinton RM, Roos D, von dem Borne AEGKr: Soluble FcRIIIA is present in plasma and is derived from natural killer cells. J Immunol **152**:900, 1994

(35) de Haas M, Kleijer M, Van Zwieten R, Roos D, Von dem Borne AEGKr: Neutrophil FcγRIIIb deficiency, nature, and clinical consequences: a study of 21 individuals from 14 families. Blood, **86**:2403, 1995

(36) Deo YM, Graziano RF, Repp R, Van de Winkel JGJ: Clinical significance of IgG Fc receptors and FcγR-directed immunotherapies. Immunology Today, **18**:127, 1997

(37) Doolittle WF. Nature (London) **272**:581, 1978

(38) Edberg JC, Redecha PB, Salmon JE, Kimberly RP: Isoforms with distinct allelic expression, extracellular domains and membrane linkages on polymorphonuclear and natural killer cells. J Immun, **143**:1642, 1989

(39) Edberg JC, Kimberley RP: Modulation of Fcγ and complement receptor function by the glycosyl-phosphatidylinositol-anchored form of FcγRIII. J Immunol, **152**:5826, 1994

(40) Eisenstein BI: The Polymerase Chain Reaction- A New Method of Using Molecular Genetics for Medical Diagnosis. N Engl J Med, **322**:178, 1990

(41) Enekel B, Jung D, Frey J: Molecular basis for IgG Fc receptor III defect in a patient with systemic lupus erythematosus. Eur J Immunol, **21**:659, 1991

(42) Fanger MW, Shen L, Graziano RL, Guyre PM: Cytotoxicity mediated by Fc receptors for IgG. Immunol Today, **10**:92, 1989

(43) Fleit HB, Kuhnle M: Biochemical characterization of an Fcγ receptor purified from human neutrophils. J Immunol, **140**:3120, 1988

(44) Fromont P, Bettaieb A, Skouri H, Flouch C, Poulet E, Duedari N, Bierling P: Frequency of the polymorphnuclear Fc gamma receptor III deficiency in the French population and its involvement in the development of neonatal alloimmune neutropenia. Blood, **79**:2131, 1992

(45) Fridman WH, Teillard JL, Amigorena S, Daëron M, Blank V, Neauport- Sautès C: The isotype circuit: Immunoglobulins, Fc receptors and immunoglobulin- binding factors. Int Rev Immunol, **2**:19, 1986

(46) Fridman WH, Bonnerot C, Daeron M, Amigorena S, Teillaud J-L, Sautes C: Structural bases of Fcγ Receptor functions. J Immun Rev, **125**:49, 1992

(47) Gilbert W: The exon Theory of genes. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol, **52**:901, 1987

(48) Gilbert W, de Souza SJ, Long M: Origin of genes. Proc Natl Acad Sci USA, **94**:7698, 1997

(49) Gittinger FS, Bux J: Study of four families concerning the linkage and inheritance of the allele encoding the granulocyte- specific antigen HNA- 1c (SH). Transfusion, **41**:847, 2001

(50) Gittinger FS, Schindler-Wupper L, Kissel K, Bux J: Quantitative determination of Fc gamma receptor genes by means of fluorescence- based real- time polymerase chain reaction. Tissue Antigens, **60**:64, 2002

(51) Guz K, Brojer E, żupanska B: Implications of NA1, NA2 and SH genotyping results in the Polish population with regard to the new nomenclature of granulocyte antigens. Transfusion, **40**:490, 2000

(52) Hartnell A, Kay AB, Wardlaw AJ: INF-γ induced expression of FcγRIII (CD16) on human eosinophils. J Immunol, **148**:1471, 1992

(53) Henke W, Rothe H: Paläoanthropologie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1994

(54) Hessner MJ, Curtis BR, Endean DJ, Aster RH: Determination of neutrophil antigen Frequencies in five ethnic groups by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. Transfusion, **36**:895, 1996

(55) Hessner MJ, Shivaram SM, Dinauer DM, Curtis BR, Endean DJ, Aster RH: Neutrophil Antigen (FcγRIIIB) SH Gene Frequencies in Six Racial Groups. Blood, **93**:1115, 1999

(56) Hibbs ML, Tolvanen M, Carpén O: Membrane-proximal Ig-like domain of FcγRIII (CD16) contains residues critical for ligand binding. J Immunol, **152**:4466, 1994

(57) Holden C: Were Spaniards Among the First Americans? Science, **286**: 1467, 1999

(58) Huizinga TWJ, van der Schoot CE, Jost C, Klassen R, Kleijer M, von dem Borne AEGKr, Roos D, Tetteroo PAT: The PI-linked receptor FcRIII is released on stimulation of neutrophils. Nature, **333**:667, 1988

(59) Huizinga TWJ, Kerst M, Nuijens JH, Vlug A, von dem Borne AEGKr, Roos D, Tetteroo PAT: Binding characteristics of dimeric IgG subclass complexes to human neutrophils. J Immunol, **142**:2359, 1989

(60) Huizinga TWJ, Kleijer M, Teteroo PAT, Roos D, Von dem Borne AEGKr: Biallelic neutrophil NA-antigen system is associated with a polymorphism on the phospho-inositol-linked Fcγ receptor III (CD 16). Blood, **75**:213, 1990

(61) Huizinga TWJ, Kuijpers RWAM, Kleijer M, Schulpen TWJ, Cuypers HTM, Roos D, Von dem Borne AEGKr: Maternal genomic neutrophil FcRIII deficiency leading to neonatal isoimmune neutropenia. Blood, **76**:1927, 1990

(62) Huizinga TWJ, Roos D, Von dem Borne AEGKr: Neutrophil Fc-γ Receptors: a two- way bridge in the immunesystem. Blood, **75**:1211, 1990

(63) Huizinga TWJ, de Haas M, Kleijer M, Nuijens JH, Roos D, von dem Borne AEGKr: Soluble Fc-γ Receptors III in human plasma originates from release by neutrophils. J Clin Invest, **86**:416, 1990

(64) Huizinga TW, de Haas M, van Oers MH, Kleijer M, Vile H, van der Wouw PA, Moulijn A, van Weezel H, Roos D, von dem Borne AEGKr: The plasma concentration of soluble Fc-gamma RIII is related to the production of neutrophils. Br J Haematol **87**:459, 1994

(65) Hundt M, Schmidt RE: The glycophosphatidylinositol- linked Fc gamma receptor III represents the dominant structure for immune complex activation of neutrophils. Eur J Immunol, **22**:911, 1992

(66) ISBT Granulocyte Antigen Working Party: Nomenclature of granulocyte antigens. Transfusion, **39**:662, 1999

(67) Janeway CA und Travers P: Immunologie, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH; Heidelberg, Berlin, Oxford 1997

(68) Kinet JP: The gamma-zeta dimers of Fc receptors as connectors to signal transduction. Curr Opin Immunol **4**:43, 1992

(69) Kissel K, Hofmann C, Gittinger FS, Daniels G, Bux J: HNA-1a, HNA-1b, and HNA-1c (NA1, NA2; SH) frequencies in African and American Blacks and in Chinese. Tissue Antigens, **56**:143, 2000

(70) Koehne HR, de Haas M, Kleijer M, Roos D, von dem Borne AEGKr: NA- phenotype-dependant differences in neutrophil FcγRIIIb expression cause differences in plasma levels of soluble FcγRIII. Br J Haematol, **93**:235, 1996

(71) Koehne HR, Kleijer M, Roos D, De Haas M, Von dem Borne AEGKr: FcγRIIIb gene duplication: evidence for presence and expression of three distinct FcγRIIIb genes in NA (1+,2+)SH(+) individuals. Blood, **91**:673, 1998

(72) Kurosaki T, Ravetch JV: A single amino acid in the phosphoinositol attachment domain determines the membrane topolgy of Fcγ RIII. Nature, **342**:805, 1989

(73) Kuwano ST, Bordin JO, Chiba AK, Mello AB, Figueiredo MS, Vieira- Filho JPB, Fabron Jr A, Kerbauy J: Allelic polymorphisms of human Fcγ receptor IIa and Fcγ receptor IIIb among distinct groups in Brazil. Transfusion, **40**:1388, 2000

(74) Lalezari P, Nussbaum M, Gelman S, Spaet T: Neonatal neutropenia due to maternal isoimmunization. Blood, **15**: 236, 1960

(75) Lalezari P, Radel E: Neutrophil-specific antigens: Immunology and clinical significance. Semin Hematol, **11**:281, 1974

(76) Lalezari P, Siang AF, Yegen S, Santorineou M: Chronic autoimmune neutropenia due to anti NA2 antibody. N Engl J Med, **293**:744, 1975

(77) Lalezari P: Neutrophil antigens: immunology and clinical implications. In: Greenwalt TJ, Jamieson GA (eds). The granulocyte: function and clinical utilization. Progress in Clinical and Biological Research. Vol **13**, Liss, New York, 209, 1977

(78) Lalezari P: Alloimmune neonatal neutropenia. In: Engelfriet CP, von dem Borne AEGKr (eds) Bailliere's Clinical Immunology and Allergy. Vol **1**, Bailliere Tindall, London, 443, 1987

(79) Lanier LL, Ruitenberg JJ, Phillips JH: Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. J Immunol, **141**:3478, 1988

(80) Lanier LL, Yu G, Phillips JH: Analysis of FcγRIII (CD16) membrane expression and association with CD3ζ and FcεRI-γ by site-directed mutagenesis. J Immunol, **146**:1571, 1991

(81) Lehrnbecher T, Foster CB, Zhu S, Leitman SF, Goldin LR, Huppi K, Chanock SJ: Variant Genotypes of the Low- Affinity Fcγ Receptors in Two Control Populations and a Review of Low- Affinity Fcγ- Receptor Polymorphisms in Control and Disease Populations. Blood, **94**:4220, 1999

(82) Lin M, Chen CC, Wang CL, Lee HL: Frequencies of Neutrophil- Specific Antigens among Chinese in Taiwan. Vox Sang, **66**:247, 1994

(83) Lin M, Chu CC, Lee HL, Chang SL, Ohashi J, Tokunaga K, Akaza T, Juji T: Heterogeneity of Taiwan's indigenous population: possible relation to prehistoric Mongoloid dispersals. Tissue Antigens, **55**:1, 2000

(84) Lucas GF, Carrington PA: Results of the first international granulocytes serology workshop. Vox Sang, **59**:251, 1990

(85) Luhby AL, Slobody LB: Transient neonatal agranulocytosis in two siblings: Transplanental isoimmunization to a leucocyte factor? Am J Dis Child, **92**:496, 1956

(86) Manca F, Fenoglio D, Li Pira G, Kunkl A, Celada F: Effect of antigen/ antibody ratio on macrophage uptake, processing, and presentation to T cells of antigen complexed with polyclonal antibodies. J Exp Med, **173**:37, 1991

(87) Matsuo K, Procter J, Stroncek D: Variations in genes encoding neutrophil antigens NA1 and NA2. Transfusion, **40**:645, 2000

(88) Meister M, Engeln H, Frenz L, Henschel U, Tügel H: Die Evolution des Menschen. Geo Wissen, September 1998

(89) Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res, **16**:1215, 1988

(90) Minchinton RM: A family studie of the "NA NULL" neutrophil phenotype causing alloimmune neonatal neutropenia. Blood, **80**(suppl. 1):478a, 1992

(91) Morrison TB, Weiss JJ, Wittwer CT: Quantification of Low- Copy Transcripts by continuos SYBR© Green I Monitoring during Amplification. Biotechniques, **24**:954, 1998

(92) Mullis KB, Fallona FA, Scharf S, Saiki RK, Horn GT, Erlich HA: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol., **51**:263, 1986

(93) Mullis KB, Fallona FA: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase- catalyzed chain reaction. Methods Enzymol, **155**:335, 1987

(94) Mullis KB: Eine Nachtfahrt und die Polymerase- Kettenreaktion. Spektrum der Wissenschaft, Juni 1990

(95) Muñiz-Diaz E, Madoz P, de la Calle Martin O, Puig L: The Polymorphnuclear Neutrophil FcγRIIIb Deficiency Is More Frequent Than Hitherto Assumed. Blood, **86**:3999, 1995

(96) Myhr K-M, Raknes G, Nyland H, Vedeler C: Immunglobulin G Fc- receptor (FcγR) IIA and IIIB polymorphisms related to disability in MS. Neurology, **52**:1771, 1999

(97) Naziruddin B, Duffy BF, Tucker J, Mohanakumar T: Evidence for cross-regulation of Fc RIIIB (CD16) receptor-mediated signaling by Fc gamma RII (CD32) expressed on polymorphonuclear neutrophils. J Immunol, **149**:3702, 1992

(98) Newton CR, Graham A: PCR. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, Heidelberg 1994

(99) Noda M, Yoon K, Rodan GA, Koppel DE: High lateral mobility of endogenous and transfected alkaline phosphatase: a phosphatidylinositol- anchored membrane protein. J Cell Biol, **105**:1671, 1987

(100) Otho H, Matsuo Y: Neutrophil- specific antigens and gene frequencies in Japanese. Transfusion, **29**:654, 1989

(101) Ory PA, Goldstein IM, Kwoh EE, Clarkson SB: Characterization of polymorphic forms of Fc Receptor III on human neutrophils. J Clin Invest, **83**:1676, 1989

(102) Ory PA, Clark MR, Kwoh EE, Clarkson SB, Goldstein IM: Sequences of complementary DNA´s that encode the NA1 and NA2 Forms of Fc Receptor III on human neutrophils. J Clin Invest, **84**:1688, 1989

(103) Palmer JD, Logson JMJ: The recent origins of introns. Curr Opin Genet Dev, **1**:470, 1991

(104) Payne R, Rolfs MR: Further observation on leukoagglutinin transfusion reactions, with special reference to leukoagglutinin transfusion reactions in women. Am J Med, **29**:449, 1960

(105) Peltz G, Frederick K, Anderson CL, Peterlin BM: Characterization of the human monocyte high affinity Fc receptor (hu FcRI). Mol Immunol, **25**:243, 1988

(106) Peltz GA, Grundy HO, Lebo RV, Yssel H, Barsh GS, Moore KW: Human FcγRIII: cloning, expression and identification of the chromosomal locus of two Fc receptors for IgG. Immunol, **86**:1013, 1989

(107) Perussia B, Acuto O, Terhorst C, Faust J, Lazarus R, Fanning V, Trinchieri G: Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking FcR functions. II Studies of B73.1 antibody- antigen interaction on the lymphocyte membrane. J Immunol, **130**:2141, 1983

(108) Puig N, de Haas M, Kleijer M, Montoro JA, Pérez A, Villalba JV, Gomez I, von dem Borne AEGKr: Isoimmune neonatale neutropenia caused by FcγRIIIb antibodies in a Spanish child. Transfusion, **35**:683, 1995

(109) Qiu WQ, de Bruin D, Brownstein BH, Pearse R, Ravetch JV: Organization of the human and mouse low-affinity FcγR genes: duplication and recombination. Science, **248**:732, 1990

(110) Raknes G, Skeie GO, Gilhus NE, Aadland S, Vedeler C: FcgammaRIIA and FcgammaIIIB polymorphisms in myasthenia gravis. J Neuroimmunol, **81**:173, 1998

(111) Ravetch JV, Perussia B: Alternative membrane forms of FcγRIIIb(CD 16) on human natural killer cells and neutrophils- Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. J Exp Med, **170**:481, 1989

(112) Ravetch JV, Kinet J-P: Fc Receptors. Annu Rev Immunol, **9**:457, 1991

(113) Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT: Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. Anal Biochemistry, **245**:154, 1997

(114) Salmon JE, Edberg JC, Kimberly RP: Fcγ receptor III on human neutrophils- Allelic variants have functionally distinct capacities. J Clin Invest, **85**:1287, 1990

(115) Salmon JE, Brogle NL, Edberg JC, Kimberly RP: Fc gamma receptor III induces actin polymerization in human neutrophils and primed phagocytosis mediated by Fc gamma receptor II. J Immunol, **146**:997, 1991

(116) Salmon JE, Edberg JC, Brogle NL, Kimberly RP: Allelic polymorphisms of human Fcγ receptor IIa and Fcγ receptor IIIb- Independant mechanisms for differences in human phagozyte function. J Clin Invest, **89**:1274, 1992

(117) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc Nat Acad Sci USA, **74**:5463, 1977

(118) Santamaria A, Moya F, Martinez C, Martino R, Martinez- Perez J, Muñiz-Diaz E: Transfusion- related acute lung injury associated with an NA1- specific antigranulocyte antibody. Haematologica, **83**:951, 1998

(119) Scallon BJ, Scigliano E, Freedman VH, Miedel MC, Pan Y-CE, Unkeless JC, Kochan JP: A human immunglobulin G receptor exists in both polypeptide anchored and phosphoinositol- glycan- anchored forms. Immunology, **86**:5079, 1989

(120) Schettler G, Greten H: Innere Medizin, Verstehen- Lernen- Anwenden. Thieme Verlag, 9. Auflage, 1998

(121) Schrenk F: Die Frühzeit des Menschen- der Weg zum Homo sapiens. Beck´sche Reihe, Beck Verlag München, 1997

(122) Shows TB, Mc Alpine PJ, Boucheix C et al.: Guidelines for human gene nomenclature. Cytogenet Cell Genet, **46**:11, 1987

(123) Selvaraj P, Carpen O, Hibbs ML, Springer TA: Natural killer cell and granulocyte Fc-gamma-receptor III (CD16) differ in membrane anchor and signal transduction. J Immunol, **143**:3283, 1989

(124) Simmons D, Seed B: The Fcγ Receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein. Nature, **333**:568, 1988

(125) Skacel PO, Stacey TE, Tidmarsh EF, Contreras M: Maternal alloimmunization to HLA, platelet and granulocyte-specific antigens during pregnancy: its influence on cord blood granulocyte and platelet counts. Br J Haematol, **71**:119, 1989

(126) Slobody LB, Abramson H, Loizeaux LS: Agranulocytosis of the newborn infant. J Am Med Ass, **142**:25, 1950

(127) Stanley SM: Historische Geologie- eine Einführung in die Geschichte der Erde und des Lebens. Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Oxford, Berlin, 1994

(128) Stefanini M. Mele RH, Skinner D: Transitory congenital neutropenia: a new syndrome, a report of two cases. Am J Med, **25**:749, 1958

(129) Steffensen R, Gulen T, Varming K, Jerslid C: FcgammaRIIIb polymorphism: evidence that NA1/NA2 and SH are located in two closely linked loci and that the SH allele is linked to the NA1 allele in the Danish population. Transfusion, **39**:593, 1999

(130) Stein EL, Bux J, Santoso S, Mueller-Eckhardt C: Typing of the granulocyte-specific NA antigens by restriction fragment length polymorphism analysis. Br J Haematol, **87**:428, 1994

(131) Stein EL, Santoso S, Behrens G, Mueller-Eckhardt C, Bux J: Genotyping of the granulocyte-specific NA antigens from small quantities of blood or serum. Tissue Antigens, **45**:69, 1995

(132) Stöckl J, Majdic O, Pickl WF, Rosenkranz A, Prager E, Gschwantler E, Knapp W: Granulocyte activation via a binding site near the c-terminal region of complement receptor type 3 α-chain (CD11b) potentially involved in intramembrane complex formation with glycosylphosphatidylinositol-anchored FcγRIIIb (CD16) molecules. J Immunol, **154**:5452, 1995

(133) Stringer CB, Andrews P: Genetic and fossil evidence for the origin of modern humans. Science, **239**1263, 1988

(134) Stroncek DF, Skubitz KM, Plachta LB, Shankar RA, Clay ME, Herman J, Fleit HB, Mc.Cullough J: Alloimmune neonatal neutropenia due to an Antibody to the neutrophil Fcγ receptor III with maternal deficiency of CD16 antigen. Blood, **77**:1572, 1991

(135) Tax WJ, Willems HW, Reekers PP, Capel PJ, Koehne RA: Polymorphism in mitogenetic effect of IgG1 monoclonal antibodies against T3 antigen on human T cells. Nature, **304**:445, 1983

(136) Torio A, Marin L, Muro M, Alvarez- Lopez MR, Garcia- Alonso AM: Determination of NA gene frequencies in the Spanish population by polymerase chain reaction with sequence- specific primers. Eur J Immunogenet, **25**:393, 1998

(137) Tournilhac O, Kiladjian J-J, Cayuela J-M, Noguera M-E, Zini J-M, Daniel M-T, Maarek O, Gluckman E, Socié G, Sigaux F: Aplastic anaemia in a case of hereditary netrophil Fcγ receptor IIIb deficiency. Br J Haematol, **99**:422, 1997

(138) Unkeless JC: Function and heterogeneity of human Fc Receptors for Immunoglobulin G. J Clin Invest, **83**:355, 1989

(139) van den Berg L, Myhr K-M, Kluge B, Vedeler CA: Fcγ receptor polymorphisms in populations in Ethiopia and Norway. Immunol, **104**:87, 2001

(140) van de Winkel JGK, Anderson CL: Biology of human Immunoglobulin G Fc receptors. J Leuk Biol, **49**:511, 1991

(141) van Leeuwen EF, Roord JJ, De Gast GC, van der Plas-van Dalen, C: Neonatal neutropenia due to maternal autoantibodies against neutrophils. Br Med J, **287**:94, 1983

(142) Verheugt FWA, von dem Borne AEGKr, van Noord-Bokhorst JC, Engelfriet CP: Autoimmune granulocytopenia: the detection of granulocyte autoantibodies with the immunofluorescence test. Br J Haematol, **39**:339, 1978

(143) Veys PA, Wilkes S, Hoffbrand AV: Deficiency of neutrophil FcRIII. Blood, **78**:852, 1991

(144) von dem Borne AEGKr: Neutrophil alloantigens- nature and clinical relevance. Vox Sang, **67**(suppl. 3):105, 1994

(145) Walker WS: Mediation of macrophage cytolytic and phagocytic activities by antibodies of different classes and class- specific Fc- receptors. J Immunol, **119**:367, 1977

(146) Wamerdam PA, van de Winkel JG, Vlug A, Westerdaal NA, Capel PJ: A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma receptor II is critical for human IgG2 binding. J Immunol, **147**:1338, 1991

(147) Watanabe Y, Shimada E, Fuliwara K, Niihara H, Shimano K, Mitsunaga S, Tadokoro K, Juji T: Nucleotide sequence of a new Fc gamma receptor IIIb allele that codes for a neutrophil antigen. Tissue Antigens, **56**:272, 2000

(148) Werner G, von dem Borne AEGKr, Bos MJE, Tromp JF, van der Plas-van Dalen CM, Visser FJ, Engelfriet CP, Tetteroo PAT: Localization of the human NA1 alloantigen on neutrophil Fc-gamma-receptors. Leucocyte Typing II, Vol. 3 (ed. by E. L. Reinherz, B.F. Haynes, L.M. Nadler), Springer, New York, 109, 1986

(149) Williams AF, Barclay AN: The immunoglobulin superfamily- domains for cell surface recognition. Annu Rev Immunol, **6**:381, 1988

(150) Witte T, Schmidt RE: Fcγ-Rezeptoren: Struktur, Funktion und klinische Bedeutung. Immun Infekt, **20**:76, 1992

(151) Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP: Continous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. Biotechniques, **22**:130, 1997

(152) Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ: The Light Cycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. Biotechniques, **22**:176, 1997

(153) Wolpoff MH, Spuler JN, Smith FH, Radovčič J, Pope G, Frayer DW, Eckhardt R, Clark G: Modern human origins. Science, **241**:772, 1988

(154) Yomtovian R, Press C, Engman H, Kline W, Clay M, Mc Cullough J: Severe pulmonary hypersensitivity associated with passive transfusion of a neutrophil- specific antibody. Lancet, **1**:244, 1984

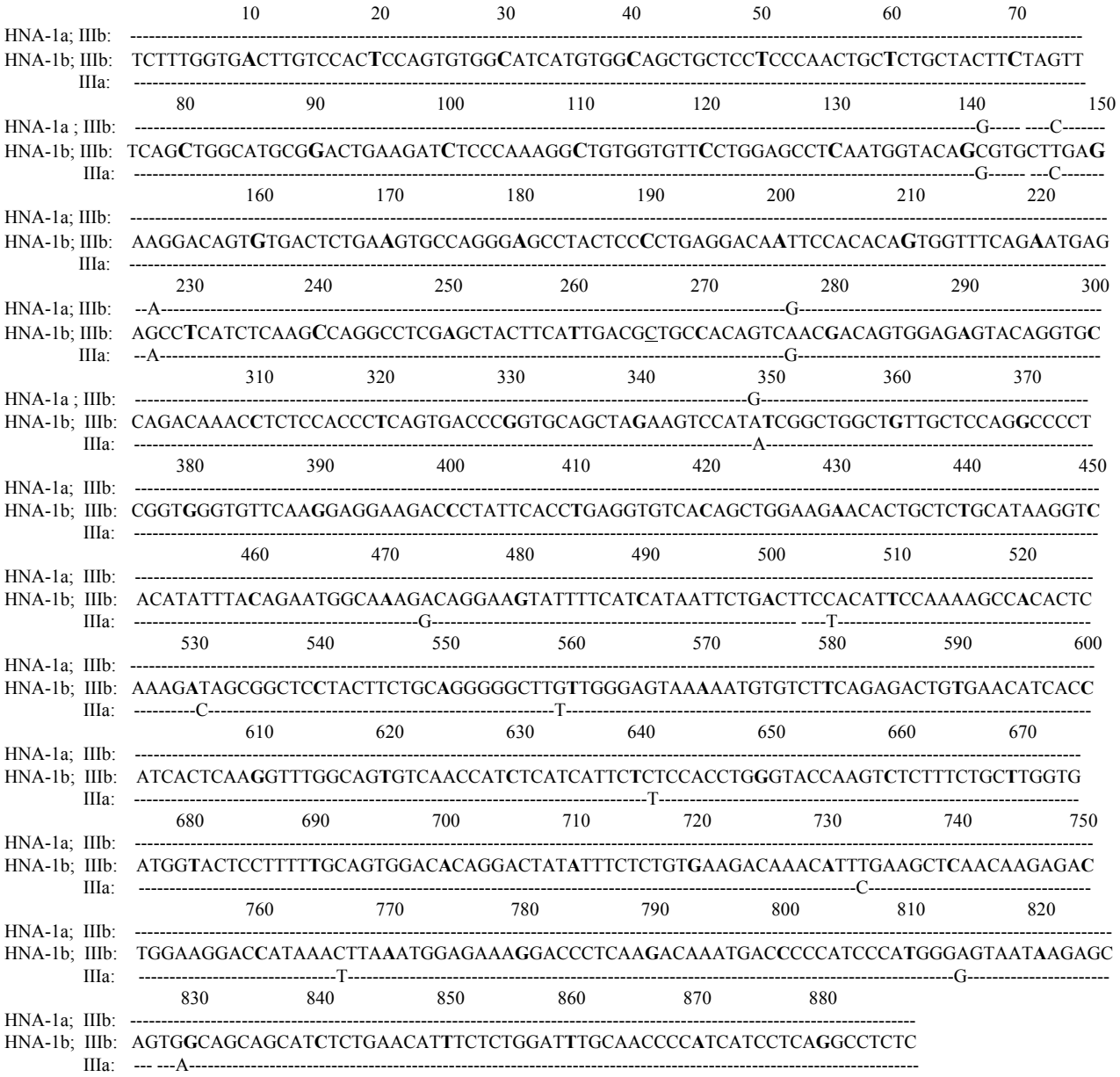
9. Anhang

Abkürzungen

A	Adenin
ADCC	Antibody Dependant Cellular Cytotoxity (Antikörper abhängige Zellgebundene Zytotoxizität)
AIN	Autoimmune Neutropenie
bp	Basenpaar
C	Cytosin
DNA	Desoxyribonucleicacid (Desoxyribonukleinsäure)
cDNA	Complementary DNA (Komplementär DNA)
dNTP	Dinucleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynucleotidtriphosphat
FcγRIIIb	FcγIIIb Rezeptor
FCGR3B	FcγIIIb Gen
FCGR3B*1, -*2, -*3	Allelform von HNA-1a, -1b, -1c; Vormals NA1, NA2, SH
G	Guanin
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor (Granulozyten Kolonie Stimulierender Faktor)
GIFT	Granulozyten Immunfluoreszenz Test
GPI	Glykophosphoinositol
HGH	Human Growth Hormone (Humanes Wachstumshormon)
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HNA-1a, -1b, -1c	Human Neutrophil Antigen-1a, -1b, -1c; Vormals NA1, NA2, SH
IFNγ	Interferon Gamma
IgA, IgD, IgG, IgE, IgM	Immunglobulin A, D, E, G, M
Il-4, -10	Interleukin -4, -10
kDa	Kilo Dalton, Maß für Molekulare Masse
LIFT	Lymphozyten Immunfluoreszenz Test
mRNA	Messenger RNA

MW	Molecular Weight (Moleculares Gewicht)
NA1, NA2	Neutrophiles Antigen 1, 2
NA Null	FcγRIIIb Defizienz
NIN	Neonatale Isoimmune Neutropenie
NK	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasechainreaction
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
RFLP	Restriktionsfragment Längenpolymorphismus
RNA	Ribonucleicacid (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
sFcγR	soluble (löslicher) FcγR
SSP1, 3, 5	Sequenzspezifischer Primer 1, 3, 5
T	Thymin
TAQ	Thermophilus Aquaticus
TNF	Tumornekrose Faktor
TRALI	Transfusion Related Acute Lunginsufficency (Transfusionsassoziierte Lungeninsuffizienz)
UV	Ultraviolett

FcγRIII- Basensequenz nach Ravetch und Perussia (111):



(Abb. 9.1:) Die Basensequenz des FcγIII- Rezeptors, so wie sie von Ravetch und Perussia angegeben wurde. *Zwischen den Rezeptoren übereinstimmende Basensequenzen sind lediglich durch Striche angegeben, HNA-1a oder HNA-1b allelspezifische Basenaustausche sind in der entsprechenden Position mit der entsprechenden Base angegeben. Die Position der HNA-1c Punktmutation (Bp 266, C→A) ist unterstrichen.*

Verwendete Primer

SSP1 : 5′-CAA TGG TAC AGC GTG CTT-3′
SSP3 : 5′-ATG GAC TTC TAG CTG CAC-3′
SSP5 : 5′-CAG TGG TTT CAC AAT GTG AA-3′
RP1 : 5′-GCC ACT GCT CTT ATT ACT-3′
RP6 : 5′-CTC CTT GAA CAC CCA CCG-3′
RP7 : 5′-GGT ACC CAG GTG GAG AGA-3′
RP8 : 5′-ACT GTC GTT GAC TGT GTC AT-3′
RP14 : 5′-ACT GTC GTT GAC TGT GTC AG-3′
VP7 : 5′-AGC TGC TCC TCC CAA CTG-3′
VP8 : 5′-CCT CTC CAC CCT CAG TGA-3′
VP9 : 5′-AAG ATC TCC CAA AGG CTG TG-3′
VP492 : 5′-TCT TTG GTG ACT TGT CCA-3′
VP492^{+} : 5′-TCT TTG GTG ACT TGT CCA CTC CAG-3′

10. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellen

(Tab.2.1), S.9 Kurze Zusammenfassung der Fcγ- Rezeptoren nach Deo et al. (36)
(Tab.2.2), S.10 Austausche von Basen des FcyRIIIa und FcyRIIIb,die zu einer veränderten Aminosäuresequenz führen;nach Watanabe et al. (147)
(Tab.2.3), S.12 Nucleotid- (NC) bzw. Aminosäurenaustausche(AS) im FcγRIIIb-Rezeptor ,die zu dem Polymorhismus der NA-Antigene führen.
(Tab.2.4), S.13/14 Verteilung der HNA-1a- und -1b- Genfrequenzen in ausgewählten Bevölkerungen.
(Tab.2.5), S.14/15 Verteilung des *FCGR3B*3- Allels* in ausgewählten Populationen.
(Tab.2.6), S.16 Verteilung des Phänotyps NA- Null (-FcyRIIIb-Defizienz)in ausgewählten Populationen mit Angabe der Genotypfrequenzen.
(Tab.2.7), S.18 Zeittafel des Känozoikum bis heute (127).
(Tab.2.8), S.18/19 Zeittafel des Pleistozän und vorherrschende Art der Hominiden.Modifiziert nach Brinkmann(14).
(Tab.4.1), S.44 PCR- Primer für die HNA-1a-, -1b- und –1c- Typisierung mit sequenzspezifischen Primern (SSP).
(Tab.4.2), S.46/47 Verteilung der Genotypfrequenzen von HNA-1a-homozyter, HNA- 1a/ HNA-1b-heterozygoter und HNA-1b-homozygoter Proben in den verschiedenen Bevölkerungen.
(Tab.4.3), S.47 Prozentuale Auswertung der in Tabelle (4.2) aufgeführten Genotypenhäufigkeit.
(Tab.4.4), S.47 Verteilung der Genotyp- Häufigkeiten der HNA-1c- positiven Proben.
(Tab.4.5), S.50 Der HNA-1b- spezifische Rückwärtsprimer RP14 mit seiner Nucleotidsequenz.
(Tab.4.6), S.51/52 Ergebnisse der Sequenzierung und der PCR- SSP- Typisierung der 37

HNA-1c- positiven Proben mit dem Primerpaar SSP1 und RP 14 für HNA-1b.
(Tab.4.7), S.52/53 Anzahl der FCGR3B- Gene einer jeweils HNA-1c- positiv Probe.
(Tab.4.8), S.53 Unter Berücksichtigung der Genotypisierungsergebnisse der HNA-1c- positiven Proben (Kapitel 4.1.3) erneute Auswertung der Allelfrequenzen.
(Tab.4.9), S.56 Vorwärts- und Rückwärtsprimer die für die quantitative Genanalyse der FcγRIIIb-defizienten Patientinnen und ihrer Familien gebraucht wurden.
(Tab.4.10), S.58 Verdünnungsreihe einer FcγRIIIb- plasmidhaltigen Stammlösung mit einer Ausgangskonzentration von 20ng/ul in Zehnerpotenz- Schritten.
(Tab.4.11), S.59 Quantitative Untersuchung von Familie 1.
(Tab.4.12) ,S.59 Quantitative Untersuchung von Familie 2.
(Tab.4.13), S.59 Vergleich der gemessenen Kopienzahlen der Familien 1 und 2 sowie die Anzahl der FCGR3B- Gene das entsprechenden Individuums.
(Tab.4.14), S.62 Das zur Amplifikation des FcγRIIIb benutzte Primerpaar.
(Tab.4.15), S.63 Für die Sequenzanalyse der FcγRIIIb-Rezeptoren der beiden Patientinnen von Fall1 und 2 verwendete Primer.
(Tab.4.16), S.63 Von den Primern in der Sequenzierung abgedeckte Strecke des FcγRIIIb.
(Tab.4.17), S.64 Primerpaar zur Amplifikation des Intron III.
(Tab.4.18), S.66 Für die Sequenzierung des Intron III verwendete Vorwärtsprimer.

Abbildungen

(Abb.2.1), S.11 Die Exon/ Intron- Grenzen des FCGR3B (FcγRIIIB)- Gens.
(Abb.2.2), S.20 Vermutete Entwicklung des modernen Menschen.
(Abb.3.1), S.28 Formel zur Berechnung der Schmelztemperatur eines Primers /Oligonucleotids (98).
(Abb.3.2), S.40 Formel zur Berechnung der zur erwartenden DNA- Kopienanzahl in einer DNA- Standardprobe.
(Abb.4.1), S.45 Auftrennung der PCR- Produkte von HNA-1a- homozygoten, HNA1a/ HNA-1b- heterozygoten und HNA-1b- homozygoten Proben.
(Abb.4.2), S.45 Auftrennung einer HNA-1c- positiven und zwei HNA-1c- negativen Proben.
(Abb.4.3), S.49 Darstellung eines “Single”- bzw. “Double peaks” in der Folge einer Sequenzierung.
(Abb.4.4), S.50 Auftrennung von DNA- Fragmenten, die mit dem HNA-1b spezifischen Primern RP14 und SSP1 (129) amplifiziert wurden.
(Abb.4.5), S.55 Vererbung des *FCGR3B*3- Allels*, welches in beiden Fällen an das *FCGR3B*1- Allel* gekoppelt ist.
(Abb.4.6), S.55 Vererbungsmodus, in dem nur das *FCGR3B*3- Allel* weitergegeben wurde.
(Abb.4.7), S.57 Standard DNA- Proben bestehend aus einem FcγRIIIb- Plasmid, einer Kontrollprobe und einer Negativkontrolle.
(Abb.4.8), S.57 Darstellung des Logarhytmus der Konzentration der DNA- Standardproben in Abhängigkeit zur Zykluszahl.
(Abb.4.9), S.57 Schmelzkurven- Analyse der DNA- Produkte.
(Abb.4.10), S.61 Familienstammbaum der Patientenfamilien von Fall 1 und Fall 2.
(Abb.4.11), S.62 Der aus cDNA mit dem Primerpaar VP492 und RP1 amplifizierte FcγRIIIb der Mütter von Fall 1 und Fall 2.

(Abb.4.12), S.65 Auftrennung des mit dem Primerpaar SSP1 und RP6 amplifizierten PCR-Produkts von Intron III.
(Abb.4.13), S.66/67 Sequenz des Intron III.
(Abb.5.1), S.70 Hypothetische Entwicklung der Fc- Rezeptoren.
(Abb.5.2), S.70 Karte der Gen- Loci des FcγRII und FcγRIII.
(Abb.5.3), S.75 Mögliche Zusammenstellung der FCGR3B- Gene bei HNA-1a-homozygoten/ HNA-1c- positiven Individuen.
(Abb. 9.1), S.96 Basensequenz des FcγIII- Rezeptors

11. Danksagungen

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Jürgen Bux für die freundliche Überlassung der Thematik dieser Arbeit bedanken. Ferner bedanke ich mich für seine Unterstützung und seinen Rat während der Erstellung dieser Arbeit. Gedankt sei auch dem Leiter des Institus für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Prof. Dr. G. Bein, für die zur Verfügungstellung der Materialien und der Geräte, die zur Erstellung der Arbeit benötigt wurden. Ich möchte mich auch bei der deutschen Forschungsgemeinschaft bedanken, die durch ihre finanzielle Unterstützung diese Arbeit ermöglichten. Herrn Dr. G. Daniels, Bristol Institute for Transfusion Sciences, Bristol, England und Dr. M. Lin, National Health Research Institue, Taipei, Taiwan danke ich für die freundliche Überlassung der Proben verschiedener Populationen. Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt den Mitarbeitern des Leukozyten Labors, insbesondere Dr. L. Schindler, C. Hofmann und K. Kissel. Zuletzt soll meinen Freunden und Bekannten für ihre Unterstützung gedankt sein, ein besonderer Dank gilt S. R. Kantelhardt.

Curriculum vitae

Name: Fleur Sophie Gittinger
Geboren am: 05.04.1976
Geburtsort: London
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulausbildung:
Grundschule:
1979-1981 : Glendour Preparatory School for Girls, London, England
1981-1984 : British International School, Cairo, Ägypten
1984-1986 : Brehm- Schule, Ev. Grundschule, Düsseldorf

Höhere Schule:
1986-1995 : Humboldt- Gymnasium, Humanistisches Gymnasium, Düsseldorf
1992-1993 : Kent College, Secondary School for Girls, Pembury, England
1995 : Allgemeine Hochschulreife; Abitur (Endnote: 1.8)

Universitäre Ausbildung:
1995 : Studium der Humanmedizin an der Justus- Liebig Universität, Gießen
1998 : Erstes Staatsexamen; Note: 2.0
2001 : Zweites Staatsexamen; Note: 1.0

2002 : Drittes Staatsexamen; Note 1.0; Abschluß des Medizinsstudiums mit der Endnote: 1.16

Doktorarbeit:

1999- 2001 : Praktischer Laborteil der Doktorarbeit; Titel: „Verteilung der FCGR3B*1-, FCGR3B*2- und FCGR3B*3- Allele und der Zahl der FCGR3B- Gene in verschiedenen Populationen.

Weitere Ausbildung/ Tätigkeit:

2002- 2003 : Ärztin im Praktikum, Abteilung Innere Medizin/ Gastroenterologie, Universitätsklinikum Tübingen

2004 Assistenzärztin, Abteilung für Hals- Nasen- Ohrenheilkunde, Klinikum Minden

Wissenschaftliche Arbeiten:

Kissel K, Hofmann C, Gittinger FS, Daniels G, Bux J. HNA-1a, HNA-1b, and HNA-1c (NA1, NA2, SH) frequencies in African and American Blacks and in Chinese. Tissue Antigens 2000; 56: 143

Gittinger, FS, Bux, J. Study of four families concerning the linkage and inheritance of the allele encoding the granulocyte- specific antigen HNA-1c (SH). Transfusion 2001; 41:847

Gittinger FS, Schindler-Wupper L, Kissel K, Bux J: Quantitative determination of Fc- gamma receptor genes by means of fluorescence- based real- time polymerase chain reaction. Tissue Antigens 2002; 60:64

Klump B, Nehls O, Okech T, Hsieh CJ, Gaco V, Gittinger FS, Sarbia Borchard F, Greschniok A, Gruenagel HH, Porschen R, Gregor M. Molecular lesion in colorectal cancer: impact on prognosis. Original data and review of the literature. Int J Colorectal Dis 2003

Praktisches Jahr:

2001 : Abteilung für Innere Medizin, Universitätsspital Zürich

2001 : Abteilung für Chirurgie, St. Vinzenz Krankenhaus Limburg

2001-2002 : Abteilung für HNO, Universitäts Klinikum Giessen

Publikationsliste in Zusammenhang mit der Doktorarbeit

Kissel K, Hofmann C, Gittinger FS, Daniels G, Bux J. HNA-1a, HNA-1b, and HNA-1c (NA1, NA2, SH) frequencies in African and American Blacks and in Chinese. Tissue Antigens 2000; 56: 143

Gittinger, FS, Bux, J. Study of four families concerning the linkage and inheritance of the allele encoding the granulocyte- specific antigen HNA-1c (SH). Transfusion 2001; 41:847

Gittinger FS, Schindler-Wupper L, Kissel K, Bux J: Quantitative determination of Fc- gamma receptor genes by means of fluorescence- based real- time polymerase chain reaction. Tissue Antigens 2002; 60:64