## Die Regulation der Expression von CD177 auf neutrophilen Granulozyten

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

> vorgelegt von Litmeyer, Anne-Sophie aus Fulda Gießen 2021

Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin

> Gutachter: Prof. Dr. med. Gregor Bein Gutachter: PD Dr. biol. hom. Zakrzewicz Tag der Disputation: 02. Dezember 2021

## Inhaltsverzeichnis

1	Einl	eitung		1
	1.1	Neutro	phile Granulozyten	1
		1.1.1	Struktur, Funktion und Eigenschaften	1
		1.1.2	Granulozytäre Antigene	4
	1.2	Alloim	munisierung, neonatale Alloimmunneutropenie und TRALI	5
	1.3	CD177	,	7
		1.3.1	Struktur und Funktion	7
		1.3.2	Interaktion mit PR3 und PECAM-1	12
		1.3.3	Isoformen von CD177	14
2	Ziel	e der Ai	rbeit	17
3	Mat	erial un	d Methoden	18
	3.1	Materi	al	18
	3.2	Metho	den	23
		3.2.1	Phänotypische Untersuchung von Blutspendern hinsichtlich ihrer	
			CD177 Expression mittels quantitativer Durchflusszytometrie	23
		3.2.2	DNA Isolation aus Vollblut	24
		3.2.3	DNA Isolation aus Granulozyten	24
		3.2.4	Agarosegelelektrophorese	25
		3.2.5	Long-Range-PCR	25
		3.2.6	Nested-PCR	25
		3.2.7	PCR-Produktaufreinigung	26
		3.2.8	DNA Extraktion aus Agarosegelen	26
		3.2.9	Sequencing PCR	26
		3.2.10	Aufreinigung des Sequenzierproduktes	26
		3.2.11	Next Generation Sequencing	27
		3.2.12	Qubit-Messung	27
		3.2.13	Nanodrop-Messung	28
		3.2.14	Isolierung von Granulozyten mit Dextran aus EDTA Blut	28
		3.2.15	Herstellung von Granulozytenlysat	28
		3.2.16	Herstellung von biotinmarkiertem Granulozytenlysat und Preclea-	
			ren des Lysats	28
		3.2.17	Photometrische Messung der Proteinkonzentration von Granulo-	
			zytenlysat/BCA Assay	29
		3.2.18	RNA Isolation aus Granulozyten	29
		3.2.19	Reverse Transkription - Umschreiben der RNA in cDNA	30
		3.2.20	PCR/mRNA Analyse zur Identifikation der CD177delEx7 Isoform	30
		3.2.21	PCR zur Testung verschiedener cDNA hinsichtlich des Vorhan-	
			denseins von CD177delEx7 Isoform	30
		3.2.22	Ortsspezifische Mutagenese	30
		3.2.23	Testen der Klonkolonien	31
		3.2.24	Plasmid Isolation	31
		3.2.25	Auftauen der Zellen	32
		3.2.26	Vorbereitung der Transfektion	32
		3.2.27	Transfektion der Zellen	32

		3.2.28	Erstellen und Preclearen von Zellkulturlysat	33
		3.2.30	Ininitial prazipitation des Granulozyteiniysats bzw. des Zenkultur-      lysats      Western Blot	33 33
		3.2.31	Testen von Granulozyten und Zellkulturzellen mit verschiedenenSeren	34
4	Erge	bnisse		35
	4.1 4.2	Die CI Granul Ergebn	D177 Expression zeigt eine bimodale Verteilung an neutrophilen ozyten. Einige Personen zeigen keine CD177 Expression isse des Next Generation Sequencing	35 37
	4.3	Phänot Codon	yp assoziiert. Die Variante CD177 c.787A / rist init dem CD177 Nun in Exon 7	40
	4.4	Die Var dem Cl	riante CD177 c.787T ist durch Austausch von DNA Sequenzen mit D177 Pseudogen entstanden	41
	4.5	Einige c.787T andere	Personen mit dem CD177 Null Phänotyp sind heterozygot für das Allel. Auf dem zweiten Chromosom liegt bei allen Personen eine Variante: CD177 c 1291G>A	42
	4.6	Die Va	riante CD177 c.1291A führt zu einer Störung der GPI Verankerung.	43
	4.7	Die Var	riante CD177 c.787T ist mit alternativem mRNA Splicing assoziiert.	45
	4.8 4.9	Ein CD Person	0177delEx7 Konstrukt wird in HEK-Zellen exprimiert	49
	4.10	te mRN Es wur	de kein Antikörper gegen Isoform CD177delEx7/Isoform 5 gefunden.	51 52
5	Disk	ussion		54
Ab	kürz	ungsver	zeichnis	65
Ab	bildu	ngsverz	zeichnis	67
Ta	beller	werzeic	hnis	68
Lit	Literaturverzeichnis			
Publikationsverzeichnis			85	
Etl	Ethikvotum 8			86
Er	Erklärung zur Dissertation 8			
Da	Danksagung 88			

## 1 Einleitung

#### 1.1 Neutrophile Granulozyten

#### 1.1.1 Struktur, Funktion und Eigenschaften

Neutrophile Granulozyten gehören zur Gruppe der Leukozyten (Borregaard et al. 1997). Sie sind Teil der angeborenen Immunabwehr.  $1 - 2 \ge 10^{11}$  neutrophile Granulozyten werden täglich im Knochenmark neu produziert (Borregaard 2010). Die Granulopoese umfasst die Bildung von basophilen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten (Borregaard et al. 1997).

In neutrophilen Granulozyten können auf Basis ihrer Farbstoffaffinität zwei Typen von Granula unterschieden werden: azurophile Granula und spezifische Granula (Borregaard et al. 1997). Azurophile bzw. primäre Granula entsprechen den Lysosomen der neutrophilen Granulozyten und enthalten saure Mucopolysaccharide und Enzyme wie beispielsweise die Myeloperoxidase, Elastase, die Neutrophilen Serinprotease 4 (NSP4) (Perera et al. 2013) und Defensine (Borregaard et al. 1997). Sie lassen sich mittels Azure A anfärben (Borregaard et al. 1997). Spezifische Granula bzw. sekundäre Granula werden als sekretorische Granula charakterisiert. Sie lassen sich nicht mit den Standardfärbemitteln anfärben (Borregaard et al. 1997). Die Existenz einer dritten Klasse an Granula ist mittels Elektronenmikroskopie identifiziert worden/entdeckt worden (Spicer et al. 1969; Borregaard et al. 1997). Die Granula enthalten neben proteolytischen und bakteriziden Proteinen auch Membranproteine, die durch Exozytose auf die Oberfläche der Granulozyten gelangen (Borregaard et al. 1997). Auf funktioneller Ebene lassen sich die Granula der neutrophilen Granulozyten in Peroxidase-positive und Peroxidase-negative Granula einteilen (Borregaard et al. 1997). Die Peroxidase-positiven Granula entsprechen den azurophilen bzw. primären Granula, deren Charakteristikum das Vorhandensein der Myeloperoxidase ist (Borregaard et al. 1997). Die Peroxidasenegativen Granula lassen sich in spezifische bzw. sekundäre und gelatinasehaltige bzw. tertiäre Granula unterteilen (Borregaard et al. 1997). Die sekundären Granula sind durch ihren hohen Gehalt an Lactoferrin und die tertiären Granula durch den größten prozentualen Anteil an Gelatinase B (= Matrixmetalloproteinase 9) definiert (Borregaard et al. 1997; Kolaczkowska et al. 2013). Neben den primären, sekundären und tertiären Granula enthalten neutrophile Granulozyten sekretorische Vesikel. Ihre Membran enthält eine Fülle an Rezeptoren wie beispielsweise Mac-1 (macrophage-1 antigen/macrophage integrin), den fMLF Rezeptor (formyl-Met-Leu-Phe-Rezeptor) und CD16 (Cowland et al. 2016). Hauptsächlicher Bestandteil der sekretorischen Vesikel sind Plasmaproteine (Borregaard et al. 1992; Borregaard et al. 1997). Als Marker dieser Zellorganellen fungiert der Komplement-Rezeptor 1 (CR1) (Sengelov et al. 1994). Die Mobilisation der sekretorischen Vesikel erfolgt nach Kontakt der neutrophilen Granulozyten mit dem

aktivierten Endothel (Borregaard et al. 1997).

Bei einer Entzündungsreaktion verlassen die neutrophilen Granulozyten das Gefäßsystem in Richtung des betroffenen Gewebes (Phillipson et al. 2011). Die Extravasation der neutrophilen Granulozyten aus dem Gefäßsystem besteht aus den folgenden Phasen: Initiale Kontaktaufnahme und Rollen, Adhäsion, intraluminales Krabbeln/Kriechen, parazelluläre und transzelluläre Migration sowie Migration durch die Basalmembran (Ley et al. 2007). Der Kontakt entsteht durch P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten, welcher mit P-Selektin interagiert, welches vom Endothel exprimiert wird (Moore et al. 1995). Für die Adhäsion am Endothel ist neben P-Selektin auch E-Selektin verantwortlich, welches mit dem E-Selektin-Ligand 1 (ESL-1) auf der Oberfläche leukozytärer Mikrovilli interagiert (Steegmaier et al. 1997). Der Kontakt mit Selektinen führt zum Rollen der neutrophilen Granulozyten (Zimmermann et al. 1992; Zimmerman et al. 1996). Durch endothelial freigesetzte Chemokine werden im rollenden neutrophilen Granulozyten Integrine aktiviert, die an Adhäsionsmoleküle auf dem Endothel binden können (Zimmerman et al. 1996). Wichtige Integrine während der Adhäsion sind lymphocyte function associated antigen 1 (CD11a/CD18; LFA-1), macrophage-1-antigen (CD11b/CD18; Mac-1) und very late antigen 4 (VLA-4), die an Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1 (ICAM-1), Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 2 (ICAM-2) und vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) binden (Arnaout 1990; Wagner et al. 2000; Ley et al. 2007; Filippi 2019). Durch die Bindung an ICAM-1 kommt es zu Veränderungen im epithelialen Zytoskelett. Zellen, die migrieren, weisen eine Polarisation auf. F-Aktin in den neutrophilen Granulozyten polymerisiert und bildet Lamellopodien auf dem in Richtung des chemotaktischen Gradienten ausgerichteten Anteils der Plasmamembran aus (Weiner et al. 1999; Ridley et al. 2003; Stephens et al. 2008; Williams et al. 2011; Filippi 2019). Die Transmigration erfolgt entweder mittels Transzytose oder zwischen zwei benachbarten Endothelzellen hindurch (parazellulär) (Feng et al.1998). Ein wichtiges Protein bei der Transmigration ist platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1), welches sich auf Leukozyten und dem Endothel befindet (Muller et al. 1993). Das endotheliale PECAM und das leukozytäre PECAM bilden eine homophile Bindung aus (Muller et al. 1993). Durch die PECAM Interaktion werden auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten  $\alpha 6\beta 1$  Integrine vermehrt exprimiert (Dangerfield et al. 2002). Das Integrin  $\alpha 6\beta 1$  fungiert als Leukozytenrezeptor für das Basalmembranprotein Laminin (Dangerfield et al. 2002). Weitere neben PECAM an der Transmigration beteiligte Proteine sind JAM-C, welches in interendothelialen junctions lokalisiert ist (Chavakis et al. 2004), sowie CD99 auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten (Muller 2002).

Blutgefäß



Abbildung 1: Extravasation der neutrophilen Granulozyten aus dem Gefäßsystem ins Interstitium. "1": Initiale Kontaktaufnahme und Rollen durch Interaktion von PSGL-1 und P-Selektin. "2": Endothelial freigesetzte Chemokine aktivieren Integrine auf dem neutrophilen Granulozyten. "3": Adhäsion und intraluminales Krabbeln durch Kontakt der Integrine LFA-1, VLA-4 und Mac-1 mit ICAM-1, ICAM-2 und VCAM-1. "4": Parazelluläre oder transzelluläre Transmigration. Strukturen, die Interzellularkontakte vermitteln, sind beispielsweise Tight Junction, Zonula adhaerens, Gap Junction sowie Desmosomen. *Quelle: Eigene Darstellung (angelehnt an Muller 2002; Ley et al. 2007; Borregaard 2010; Kolaczkowska 2013; Filippi 2019).* 

Neutrophile Granulozyten können Erreger über drei Mechanismen abtöten: Phagozytose, Degranulation und neutrophil extracellular traps (NETs) (Kolaczkowska et al. 2013). Als Phagozytose wird die Aufnahme von Partikeln in die Zelle bezeichnet (Rassow et al. 2016). Die Zellmembran umschließt den Partikel und bildet ein Phagosom (Rassow et al. 2016). Das Phagosom verschmilzt mit einem primären Lysosom zu einem sekundären Lysosom, in dem der Inhalt des Phagosoms unschädlich gemacht wird (Rassow et al. 2016). Degranulation ist als Prozess der Exozytose cytoplasmatischer Granula definiert (Lodge et al. 2020). NETs sind vom neutrophilen Granulozyten produzierte extrazelluläre Fasern bestehend aus Chromatin-DNA, Histonen und Granulaproteinen, in welchen sich Mikroorganismen verfangen und abgetötet werden (Brinkmann et al. 2004). Antimikrobielle Bestandteile der NETs sind unter anderem Myeloperoxidase, Neutrophile Elastase, Proteinase 3, Cathepsin G, Gelatinase, Tryptase et cetera (etc.) (Papayannopoulos 2009). NETs fangen, neutralisieren und töten Bakterien (Brinkmann et al. S. 43), Pilze (Urban et al. 2006), Viren (Saitoh et al. 2012) und Parasiten (Abdallah et al. 2012; Papayannopoulos 2018). NETs werden durch einen Zelltodprozess freigesetzt, der als NETose bezeichnet wird (Fuchs et al. 2007; Papayannopoulos 2018). Während der NETose verliert der Nucleus seine Form, das Eu- und das Heterochromatin homogenisieren, die Kernhülle und die Membran der Granula desintergrieren, was zu einer Vermischung der einzelnen NET Bestandteile führt (Fuchs et al. 2007). Eine zweite Variante ist die nicht-lytische Form der NETose, bei der bei Kontakt mit beispielsweise Staphylococcus aureus eine Degranulation und ein Herausschleudern von nukleärem Chromatin zur Bildung von NETs führt, ohne dass dabei der neutrophile Granulozyt zu Grunde geht (Papayannopoulos 2018).

Protein	Gen	Ursprünglicher Antigen-Name	HNA
FCGRIIIb / CD16	FCGR3B	NA1	HNA-1a
		NA2	HNA-1b
		SH	HNA-1c
			HNA-1d
CD177	<i>CD177</i>	NB1	HNA-2 positiv
			HNA-2 negativ
CTL2	SLC44A2	5b	HNA-3a
			HNA-3b
Mac-1/CD11b	ĪTGAM	Mart	HNA-4a
			HNA-4b
LFA-1/CD11a	ĪTGĀL	Ond	HNA-5a
			HNA-5b

Tabelle 1: Übersicht über die unterschiedlichen granulozytären Antigene. Quelle: Eigene Darstellung (angelehnt an Bux 1999; Stroncek 2002; Bux 2008; Muschter et al. 2011; Flesch et al. 2018).

#### 1.1.2 Granulozytäre Antigene

Die ersten granulozytären Antigene wurden von Lalezari et al. in den 60er Jahren beschrieben (Lalezari et al. 1966; Bux 2008). Die Antigene wurden mit dem Anfangsbuchstaben "N" für neutrophiler Granulozyt gekennzeichnet, nach Lokalisation und Entdeckungszeitpunkt mit einem arabischen Buchstaben versehen und das Allel in Reihenfolge der Entdeckung nummeriert (Lalezari et al. 1971; Stroncek et al. 2002). Die Granulozyten Antigen Working Party der ISBT (International Society of Blood Transfusion) hat 1998 eine neue Nomenklatur für granulozytäre Alloantigene festgesetzt/etabliert. Laut dieser seitdem bestehenden Nomenklatur sollen granulozytäre Antigene human neutrophil alloantigens (HNA) genannt werden (Bux 1999). Die Lokalisation des Antigens auf einem Glykoprotein wird durch eine arabische Zahl hinter dem Akronym HNA definiert (Bux 1999). Unterschiedliche Antigene auf demselben Glykoprotein sollten alphabetisch abhängig vom Publikationsdatum gekennzeichnet werden (Bux 1999). Für neue Antigene, die noch nicht in die HNA Nomenklatur aufgenommen waren, wurde ein Akronym verwendet (Bux 1999). Basierend auf dieser Nomenklatur sind aktuell 12 Allele von insgesamt fünf HNAs identifiziert (Tabelle 1). Antikörper gegen granulozytäre Antigene spielen bei einer Reihe von Erkrankungen wie der neonatalen Immunneutropenie, der transfusionsassoziierten akuten Lungeninsuffizienz (transfusion-related acute lung injury (TRALI)), febrilen Transfusionsreaktionen, Immunneutropenien nach Knochenmarktransplantationen, Autoimmunneutropenien und medikamenteninduzierten Immunneutropenien eine Rolle (Bux 2008).

# 1.2 Alloimmunisierung, neonatale Alloimmunneutropenie und TRALI

Unter Alloimmunisierung ist die Bildung von Antikörper gegen ein körperfremdes Antigen zu verstehen, welches von einem anderen Organismus derselben Spezies stammt (Gehrie et al. 2014). Die neonatale Neutropenie ist eine Erkrankung des Neugeborenen. Sie ist bedingt durch mütterliche Antikörper, die gegen kindliche Granulozyten gebildet wurden (Lalezari et al. 1971). Die Immunneutropenie ist charakterisiert durch ein kurzzeitiges Fehlen von segmentkernigen neutrophilen Granulozyten im Blut und im Knochenmark der betroffenen Neugeborenen (Lalezari et al. 1971). Die Mutter entwickelt bei dieser Erkrankung Alloantikörper gegen ein bestimmtes granulozytäres Antigen, welches der Fetus vom Vater vererbt bekommen hat (Porcelijn et al. 2018). Die mütterlichen Iso-/Alloantikörper passieren die Plazenta und verursachen im Neugeborenen eine Zerstörung der neutrophilen Granulozyten (Lalezari et al. 1971). Die Antikörper können zudem die Granulozytopoese des Fetus inhibieren (Arneth 2020). Es sind Fälle beschrieben, in denen bereits das erstgeborene Kind eine neonatale Alloimmunneutropenie aufwies (Lalezari et al. 1971). Dies zeigt, dass mütterliche Immunisierung bereits während der Schwangerschaft oder sogar vor einer ersten Schwangerschaft stattfinden kann (Porcelijn et al. 2018).

Klinisch äußert sich die neonatale Alloimmunnneutropenie durch Symptome, die von milden Hautinfektionen und einer Omphalitis bis zu schweren Infektionen wie Pneumonie, Sepsis und Meningitis reichen (Bux et al. 1989; Porcelijn et al. 2018). Die Symptome der neonatalen Alloimmunneutropenie werden hauptsächlich antibiotisch behandelt (van den Tooren et al. 2014).

Eine weitere Erkrankung, die mit der Bildung von Alloantikörpern gegen granulozytäre Antigene, wie unter anderem HNA-2, in Zusammenhang steht, ist TRALI. An der TRALI-Pathogenese sind häufig Alloantikörper im Spenderplasma beteiligt (immunogenes TRALI, siehe unten).

Das Auftreten eines Lungenödems nach Transfusionen ist erstmals 1936 beschrieben worden (Plummer 1936). 2004 wurde TRALI von der Consensus Conference definiert als neue Episode von akutem Lungenversagen, das innerhalb von 6 Stunden nach einer Transfusion auftritt und durch das Vorhandensein einer Hypoxämie und Auffälligkeiten in der Bildgebung vom Thorax gekennzeichnet ist (Kleinman et al. 2004).

Laut International Hemovigilance Network kann die Diagnose TRALI gestellt werden, wenn Patienten unter einem innerhalb von 6 Stunden nach Transfusion neu aufgetretenem akuten Lungenversagen leiden. Folgende fünf Kriterien müssen für die Diagnosestellung erfüllt sein: pötzlicher Beginn, Hypoxämie mit PaO2/FiO2 < 300 Millimeter Quecksilbersäule (mmHg) oder einer Sauerstoffsättigung von < 90 % oder anderer klinischer Evidenz für ein akutes Lungenversagen, bilaterale Infiltrate im Röntgen Thorax, kein Nachweis einer linksatrialen Hypertonie sowie kein zeitlicher Bezug zu alternativen Risikofaktoren für ein akutes Lungenversagen/Lungeninsuffizienz. Diese Definition gilt nur für Patienten, die vor der Transfusion keinen Nachweis eines akuten Lungenversagens hatten (International Haemovigilance Network 2011). Bei den alternativen Risikofaktoren unterscheidet die Definition zwischen Risikofaktoren für eine direkte Lungeninsuffizienz/Lungenversagen und für eine indirekte Lungeninsuffizienz/indirektes Lungenversagen. Alternative Risikofaktoren für ein direktes Lungenversagen sind Aspiration, Pneumonie, toxische Inhalation, Lungenkontusion und das Beinaheertrinken. Risikofaktoren für ein indirektes Lungenversagen sind schwere Sepsis, Schock, Polytrauma, Verbrennung, eine akute Pankreatitis, ein kardiopulmonaler Bypass sowie eine Medikamentenüberdosis (International Haemovigilance Network 2011). Laut International Haemovigilance Network ist TRALI ein klinisches Syndrom und bedarf für die Diagnosestellung weder eines Nachweises des Vorhandenseins von Anti-HLA oder Anti-HNA Antikörpern im Spenderplasma noch des Nachweises des zugehörigen Antigens bei den Empfängern (International Haemovigilance Network 2011).

Vlaar et al. haben eine differenziertere Definition vorgeschlagen. Unterschieden werden zwei Typen von TRALI, wobei TRALI Typ I ohne das Vorhandensein von Risikofaktoren für ARDS und TRALI Typ II durch Risikofaktoren eines ARDS oder eines bereits mild existierenden ARDS definiert ist (Vlaar et al. 2019). Um einen Fall als TRALI Typ II zu klassifizieren, muss er drei Kriterien erfüllen:

- 1. Er muss dieselben Kriterien erfüllen wie TRALI Typ I.
- 2. Der Beginn eines posttransfusionsbedingten pulmonalen Ödems tritt in der Anwesenheit eines ARDS Risikofaktors oder eines milden ARDS auf.
- Der Patient weist einen stabilen pulmonalen Status (basierend auf der PaO2/FiO2 Ratio) in den 12 Stunden vor der Transfusion auf (Vlaar et al. 2019).

Fälle, bei denen die ersten beiden aber nicht das dritte Kriterium zutreffen, dürfen als ARDS klassifiziert werden (Vlaar et al. 2019).

Es kann zwischen antikörpervermitteltem TRALI und antikörperunabhängigen TRALI unterschieden werden.  $^{4}/_{5}$  aller TRALI Fälle sind antikörpervermittelt (Middelburg et al. 2008).

Die Häufigkeiten von immunvermitteltem TRALI betrugen vor Einführung prophylaktischer Maßnahmen (male only plasma; siehe unten) bei therapeutischem Plasma 1 : 66.000, bei Erythrozytenkonzentraten 1: 2,86 Millionen und bei Thrombozytenkonzentraten 1: 420.000 (Keller-Stanislawski et al. 2010). Die Häufigkeit von TRALI vermittelten Todesfällen betrug laut Studie 1: 285.000 für therapeutisches Plasma (Keller-Stanislawski et al. 2010). Die Daten zeigen die Bedeutung einer stattgehabten Schwangerschaft bei den Spenderinnen der implizierten Plasmen für die Entwicklung von Antikörper getriggertem TRALI (Keller-Stanislawski et al. 2010). Seit 2009 darf therapeutisches Plasma in Deutschland daher nur von Frauen mit zeitlich unbegrenzt negativer Schwangerschaftsanamnese für den Verkehr freigegeben werden (Bundesanzeiger 84:2064 (10.06.2009)).

Antileukozytäre Antikörper, insbesondere Antikörper gegen HNA-2 (Sachs et al. 2006), ebenso wie Antikörper gegen HNA-3a (Davoren et al. 2003; Ganguly et al. 2004; Silliman et al. 2007) können TRALI verursachen. HLA Klasse I Antikörper sind schwache Trigger für TRALI verglichen mit HNA oder HLA Klasse II Antikörpern (Reil et al 2008). Das Ausmaß und die Induktion von TRALI durch Anti-HNA-2 Antikörper stehen laut Sachs et al. im Zusammenhang mit dem Vorhandensein von Anti-HNA-2 Antikörpern, der Anzahl an CD177 exprimierenden neutrophilen Granulozyten, der Dichte des CD177 Antigens auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten und der antikörpervermittelten Aktivierung der neutrophilen Granulozyten mit konsekutiver Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Sachs et al. 2006). Die Interaktion von Antikörpern mit granulozytärem Antigen aktiviert den neutrophilen Granulozyten und sorgt konsekutiv für die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und Proteasen sowie für die Bildung von NETs (Roubinian 2018), die das pulmonale vaskuläre Endothelium schädigen und damit zum *capillary leak*, Lungenödem und TRALI führen (Fung et al. 2009).

Elevationen von IL-6, IL-8 und CRP vor einer Transfusion sind mit dem Auftreten von TRALI assoziiert (Roubinian 2018). Das heißt, vor der Transfusion gibt es bei Patienten, die TRALI entwickeln, den Nachweis/Hinweis einer systemischen Inflammation (Roubinian et al. 2015). Die TRALI-Pathogenese wird daher mit einem "2-HIT" Modell beschrieben. Im ersten Schritt erfolgt eine Aktivierung des pulmonalen Endothels, im zweiten Schritt führt ein Antikörper im transfundierten Plasma direkt oder indirekt zur Störung der endothelialen Integrität mit konsekutiver Lungeninsuffizienz (Bux 2011).

#### 1.3 CD177

#### **1.3.1** Struktur und Funktion

Anti-NB1 ist erstmals 1971 im Zusammenhang mit einem Fall einer neonatalen Alloimmunneutropenie beschrieben worden (Lalezari et al. 1971). NB1 wird auf neutrophilen Granulozyten exprimiert (Lalezari et al. 1971). 87 - 97 % aller Kaukasier, 5 % aller afrikanischen Amerikaner (Stroncek et al. 2004) und 88 - 99,5 % aller Japaner exprimieren NB1/CD177 (Matsuo et al. 2000; Taniguchi et al. 2002).

NB1/CD177 wird während der Granulopoese erstmals auf Ebene der Myelozyten exprimiert (Stroncek et al. 1998). Der ursprüngliche Name des Antigens war NB1. Es folgte die Bezeichnung HNA-2 (Stroncek 2002). 2002 wurde NB1 als CD177 in die *cluster of differentiation* – Systematik aufgenommen (Mason et al. 2002).

Typisch für CD177 ist sein bimodales Verteilungsmuster: Die meisten Menschen haben eine Population an neutrophilen Granulozyten, die CD177 auf ihrer Oberfläche exprimieren können und eine zweite Population, die CD177 nicht tragen. 3 - 5 % aller Kaukasier exprimieren CD177 nicht (Lalezari et al. 1971). Dieser Phänotyp wird CD177 Null genannt.

CD177 negative Individuen neigen zur Produktion von Alloantikörpern, welche Erkrankungen wie TRALI (Bux 2011) und neonatale Immunneutropenien (Bux 2002) verursachen können.

Eulenberg-Gustavus et al. beschrieben eine monoallelische Expression von CD177 als Ursache dafür, dass CD177 positive neutrophile Granulozyten nur ein CD177 Allel entweder das mütterlichen oder das väterlichen Ursprungs - exprimieren (Eulenberg-Gustavus et al. 2017). Eines von zwei CD177 Allelen wird während der neutrophilen Differenzierung stillgelegt, was zu einer monoallelischen Expression in reifen neutrophilen Granulozyten führt (Eulenberg-Gustavus et al. 2017). Laut Eulenberg-Gustavus et al. sind CpG und Histon Methylierung sowie das Binden von AP-1 Transkriptionsfaktoren (c-Jun/c-Fos) an den Promotor von CD177 positiven neutrophilen Granulozyten für das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen neutrophilen Subpopulationen - das bimodale Verteilungsmuster - verantwortlich (Eulenberg-Gustavus et al. 2017). CpG Methylierung der Promotorsequenz legt die Expression eines CD177 Allels still (Eulenberg-Gustavus et al. 2017). Die Subpopulation der CD177 exprimierenden neutrophilen Granulozyten zeigt anders als die Subpopulation der CD177 negativen Granulozyten einen euchromatischen CD177 Promotor und unmethylierte CpGs (Eulenberg-Gustavus et al. 2017). In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass Demethylierung monoallelische CD177 Expression in eine biallelische CD177 Expression konvertierte, was demonstriert, dass CpG Methylierung für das Stilllegen eines CD177 Allels verantwortlich ist (Eulenberg-Gustavus et al. 2017). Die CD177 negative Subpopulation in CD177 positiven Individuen exprimiert weder messenger ribonucleic acid (mRNA) noch Protein; CD177 Protein und mRNA Expression finden sich nur in der CD177 positiven Subpopulation (Wolff et al. 2003; Eulenberg-Gustavus et al. 2017).

Eine aktuelle Studie von Flesch et al. konnte dahingegen *complementary desoyribonucleic acid* (cDNA) in voller Länge in beiden - der negativen und positiven - Subpopulationen nachweisen (Flesch et al. 2020).

Das NB1-Antigen befindet sich auf einem 58 - 64 kilo Dalton (kD) schweren Glykoprotein (Stroncek et al. 1990). Das NB1-Antigen hat unter reduzierenden Bedingungen eine Größe von 56 - 62 kD und unter nicht-reduzierenden Bedingungen von 49 - 55 kD (Goldschmeding et al. 1992). CD177 findet sich auf der Plasmamembran der neutrophilen Granulozyten und in Sekundärgranula (Stroncek et al. 1990). Die Subpopulation der CD177 tragenden neutrophilen Granulozyten exprimiert CD177 sowohl intrazellulär als auch auf der Plasmamembran (Goldschmeding et al. 1992).

CD177 gehört zur uPAR/CD59/Ly6 *snake toxin* Superfamilie (Kissel et al. 2002). Gene der uPAR/CD59/Ly6 *snake toxin* Superfamilie kodieren GPI verankerte Proteine, welche Domänen aus 70 - 100 Aminosäuren und 8 - 10 Cysteinen besitzen (Stroncek et al. 2004).

Glycosylphosphatidylinositole agieren als Membrananker verschiedener eukaryontischer Oberflächenproteine. Ein GPI Anker besteht aus Ethanolaminphosphat, drei Mannosemolekülen, einem nicht-N-acetylierten Glucosamin sowie einem Inositolphospholipid (Abbildung 2) (Fankhauser et al. 1993; Kinoshita et al. 2016). GPIs sind an Proteine durch eine Amidbindung zwischen der C-terminalen Carboxylgruppe und einer Aminogruppe des Ethanolaminphosphates gebunden (Kinoshita et al. 2016). Ein GPI verankertes Protein verfügt über eine GPI Signalsequenz, welche aus Elementen wie einer Omega Position (die Position, an die der GPI Anker geknüpft wird) besteht (Kinoshita et al. 2016). Es gibt bestimmte Software-Programme, die Vorhersagen über eine mögliche GPI Verankerung bestimmter Proteine inklusive Omega-Position treffen (Caro et al. 1997; Eisenhaber et al. 1999; Eisenhaber et al. 2004; Kinoshita et al. 2016).



Abbildung 2: Schematische Darstellung des in der Plasmamembran mittels GPI Anker befestigten CD177 Proteins. Das CD177 Protein ist mittels GPI Anker in der Plasmamembran der neutrophilen Granulozyten befestigt. Der GPI Anker besteht aus einem Inositolphopholipid (grün), Glucosamin (dunkelrot), drei Mannosemolekülen (orange) sowie aus Ethanolaminphosphat (gelb). Die Omegaposition beschreibt die Position des Proteins, an die der GPI Anker gebunden wird. *Quelle: Eigene Darstellung*.

Das CD177 Protein wird durch das CD177 Gen auf Chromosom 19 an Position 19q13.31 kodiert (Kissel et al. 2001). Ursprünglich wurde CD177 als Allel des PRV-1 Gens beschrieben (Bettinotti et al. 2002; Carrucio et al. 2004; Caruccio et al. 2006b). Die Nukleotidsequenz von CD177 und PRV-1 weisen Homologien auf (Bettinotti et al. 2002).

CD177 unterscheidet sich von PRV-1 in 4 Nukleotiden (Caruccio et al. 2006).

PRV-1 ist auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten bei 95 % aller Polycythaemia vera Patienten überexprimiert (Temerinac et al. 2000; Stroncek et al. 2004; Caruccio et al. 2006).

Der häufigste Polymorphismus des CD177 Gens ist G42C in Exon 1, welcher zu einer Aminosäuresubstitution (Alanin zu Prolin) führt (Carrucio et al. 2004). Die CD177 Expression ist in 42 C/C höher als in 42 G/G Spendern (Carrucio et al. 2004).

Das CD177 Gen besteht aus 9 Exonen mit insgesamt 1311 Basenpaaren (Kissel et al. 2001; Bettinotti et al. 2002). CD177 besitzt ein Pseudogen (Bettinotti et al. 2002). Das Pseudogen befindet sich unmittelbar neben dem CD177 Gen und weist in seiner Sequenz deutliche Homologien zu der CD177 Sequenz zwischen Exon 4 und Exon 9 auf, jedoch in reverser Orientierung (19q13.31) (Bettinotti et al. 2002; Caruccio et al. 2006). Das CD177 Gen ist durch 8,4 Kilobasenpaare (kb) nicht-kodierende Sequenz vom CD177P1 Pseudogen getrennt (Wu et al. 2016).

Die cDNA von CD177 umfasst 1614 Basenpaare (bp), wovon 1311 bp die kodierende Region darstellen. Die 5' UTR besteht aus 27 bp und die 3' UTR aus 276 bp (Kissel et al. 2001). Die mRNA kodiert für 437 Aminosäuren, von denen 21 das Signalpeptid bilden. Die restlichen 416 Aminosäuren bilden ein N-terminales extrazelluläres Protein mit zwei cysteinreichen Domänen (aa12-195 und 209-388) (Kissel et al. 2001), drei potentiellen Glykosylierungstellen und einem GPI Anker (Kissel et al. 2001).

Innerhalb des Glykoproteins von CD177 befindet sich 25 - mal die Aminosäure Cystein, welche Disulfidbrücken bilden kann (Kissel et al. 2001).

Die antigene Determinante von CD177 beruht auf der durch Disulfidbrücken herbeigeführten Tertiärstruktur des Proteins und ist unabhängig von den durch N-Glykosylierung angehängten Kohlenhydraten (Kissel et al. 2001). Dies konnte dadurch gezeigt werden, dass CD177 im Immunoblot auch nach Behandlung mit N-glycosidase F - das heißt nach Entfernung der Zuckermoleküle - mit 7D8 und Anti-CD177 reagiert, wohingegen sich nach Reduktion der Disulfidbrücken keine Reaktion mit Alloantikörpern zeigte (Kissel et al. 2001).

Die CD177 Expression ist während der Schwangerschaft erhöht (Caruccio et al. 2003). Neugeborene weisen eine höhere CD177 Expression auf als Erwachsene (Strince et al. 1998; Wolff et al. 2006).

Die CD177 Expression bei Frauen ist höher als bei Männern (Matsuo et al. 2000). Die CD177 Expression fällt mit zunehmendem Alter bei Frauen ab, jedoch nicht bei Männern (Matsuo et al. 2000). Östrogen scheint einen Einfluss auf die CD177 Expression zu haben. Eine hohe Expression im Nabelschnurblut resultiert daher aus erhöhten Östrogenwerten

der Mutter während der Schwangerschaft (Matsuo et al. 2000).

Durch die Gabe von G-CSF kann die CD177 Expression erhöht werden (Stroncek et al. 1998).

Die CD177 Expression ist bei einer Reihe von Erkrankungen verändert:

CD177 wird überexprimiert in Patienten mit chronisch myeloproliferativen Erkrankungen wie der Polycythaemia vera, essentieller Thrombozythämie oder Myelofibrose (Passamonti et al. 2004). Ein niedriger Prozentsatz CD177 exprimierender Granulozyten ist mit dem myelodysplastischen Syndrom und der chronisch myeloischen Leukämie assoziiert (Meyerson et al. 2013).

Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen haben erhöhte CD177 Werte bzw. weisen ihre neutrophile Granulozyten eine erhöhte CD177 Expression auf (Göhring et al. 2004). Bei schwerem Verlauf der COVID-19 Erkrankung wurde eine Überexpression von CD177 beobachtet (Aschenbrenner et al. 2021).

Es konnte gezeigt werden, dass die CD177 Expression bei Patienten mit Helicobacter Pylori Gastritis signifikant höher war als bei Patienten mit nicht Helicobacter assoziierter Gastritis (Yang et al. 2017). Der CD177 Expressionsscore hat eine direkte Korrelation mit dem Entzündungsgrad. Der Entzündungsgrad ist angelehnt an die Helicobacter Kolonisierung (Yang 2019).

Der Spiegel der CD177 Expression gilt als Prognosemarker beim Magenkarzinom (Toyoda et al. 2013). Die CD177 Expression ist beim Magenkarzinom mit einer guten Prognose und Überlebensrate nach einem chirurgischen Eingriff korreliert (Toyoda et al. 2013). CD177 ist ebenfalls bei Patienten, die unter der Kawasaki Erkrankung leiden, hochreguliert (Huang et al. 2019).

Die CD177 Expression ist mit einer guten Prognose bei verschiedenen soliden Tumoren wie Prostata-, Zervix- und Bronchialkarzinomen assoziiert (Kluz et al. 2020). Kluz et al. haben 2020 festgestellt, dass normale Brustepithelzellen CD177 exprimieren, wohingegen die CD177 Expression bei den Epithelzellen von invasiven Mammakarzinomen deutlich reduziert ist (Kluz et al. 2020). Der Verlust von CD177 führt zu einer Modulation des Wnt/ $\beta$ -Cateninsignalweges, das heißt zu einem verstärkten  $\beta$ -Cateninsignal durch Komplexbildung von CD177 und  $\beta$ -Catenin (Kluz et al. 2020) und damit zur einer Hyperproliferation des Mammaepithels (Kluz et al. 2020).

Es konnte gezeigt werden, dass die G-CSF-Produktion und konsekutiv die CD177 Expression bei Patienten nach einer Lebendnierentransplantation erhöht sind (Volkmann et al. 2020). ABO Blutgruppeninkompatible Transplantatempfänger wiesen eine höhere CD177 Expression auf (Volkmann et al. 2020). Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und unter Nierenersatztherapie war die CD177 Expression unverändert (Volkmann

et al. 2020).

#### 1.3.2 Interaktion mit PR3 und PECAM-1

CD177 interagiert mit Proteinase 3, einer Serinprotease, die sowohl auf der Plasmamembran der neutrophilen Granulozyten als auch in sekretorischen Vesikeln und spezifischen Granula lokalisiert ist (Witkow-Sarsat et al. 1999; Korkmaz et al. 2008). PR3 ist das Zielantigen von antineutrophilen cytoplasmatischen Autoantikörpern, die bei Patienten mit Granulomatose mit Polyangiitis gefunden werden (Korkmaz et al. 2008). CD177 und PR3 werden auf der Plasmamembran von neutrophilen Granulozyten koexprimiert (Bauer et al. 2007). Durch enzymatische Entfernung des GPI Ankers von CD177 nimmt auch die PR3 Expression auf den Zellen ab (Vietinghoff et al. 2007). Zellen sind simultan für PR3 und CD177 positiv. Zellen, die für PR3 negativ sind, sind ebenfalls für CD177 negativ (Bauer et al. 2007). Die Expression von membrangebundenen PR3 und CD177 auf der Plasmamembran ist gleichermaßen erhöht oder erniedrigt während der Zellstimulation oder spontanen Apoptose (Bauer et al. 2007). PR3 ist in primären Granula und CD177 hauptsächlich in sekundären Granula gespeichert (Bauer et al. 2007). Die PR3 Expression wird durch den CD177 Rezeptor gesteuert (Vietinghoff et al. 2007).

CD177 bindet an PECAM-1; CD177 ist ein heterophiler Bindungspartner von PECAM-1 (Sachs et al. 2007). Die Interaktion zwischen PECAM-1 und CD177 beeinflusst den Phosphorylierungsstatus von PECAM-1 und erleichtert somit die Transmigration der neutrophilen Granulozyten aus dem Gefäßsystem (Bayat et al. 2010). Die PR3 Expression und Aktivität sind signifikant erhöht bei transmigrierenden neutrophilen Granulozyten (Kuckleburg et al. 2012). Die Hemmung der PR3 Aktivität bzw. die Blockade der CD177-PECAM-1 Interaktion inhibiert die Transmigration der neutrophilen Granulozyten (Kuckleburg et al. 2012).

In MAIGA hat der falsch-positive Nachweis von Anti-FCGR3B \* 2 (HNA-1b) in Seren, die Anti-HNA-2-Isoantikörper enthalten, dazu geführt, eine CD177/PR3-Wechselwirkung mit FCGR3B \* 2 zu identifizieren (Flesch et al. 2020).

Jerke et al. zeigten hingegen, dass die Migration der neutrophilen Granulozyten unabhängig von der Höhe der PR3-Expression ist (Jerke et al. 2017). Die CD177 positive, PR3 tragende Subpopulation der neutrophilen Granulozyten zeigten *in vivo* und *in vitro* keinen Migrationsvorteil gegenüber der CD177 negativen und PR3 negativen Subpopulation (Jerke et al. 2017). Der Komplex von PR3 und CD177 ist jedoch wichtig für die Expression von PR3 als Autoantigen und für seine Aktivität als Serinprotease (Jerke et al. 2017). PR3 ist gemeinsam mit Fc $\gamma$  FIIIB und und p22phox -einer Untereinheit von Cytochrom b558 der NADPH Oxidase- in der Plasmamembran in neutrophilen Lipidflößen lokalisiert (David et al. 2005). Membrangebundenes PR3, CD177 und das Adhäsionsmolekül CD11b/CD18 ( $\beta$ 2 Integrin) sind ebenfalls kolokalisiert (David et al. 2003; Jerke et al. 2011). Der Komplex aus Proteinase 3 und CD177 fungiert unter anderem als Mediator der Interaktion zwischen CD11b/CD18 und Fc $\gamma$ FIIIB in Lipidflößen. Autoantikörper gegen PR3 (ANCA = Antineutrophile cytoplasmatische Antikörper) stimulieren die Degranulation und Superoxid-Produktion in den neutrophilen Granulozyten, die eine hohe Expression an CD177 und PR3 aufweisen (Jerke et al. 2011). Die Blockierung des PR3-CD177 Komplexes könnte zukünftig eine Strategie sein, die ANCA vermittelte Aktivierung neutrophiler Granulozyten zu verhindern (Jerke et al. 2011). Deng et al. konnten zeigen, dass die Interaktion von CD177 mit PECAM-1 die PR3 Expression vermindert und damit die Anti-PR3 ANCA vermittelte Aktivierung des neutrophilen Granulozyten mit konsekutiver Endothelschädigung abschwächt (Deng et al. 2018).



Abbildung 3: Interaktionen von CD177 mit PR3, CD11b/CD18, Fc $\gamma$ RIIIb und PECAM-1. Auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten ermöglicht CD177 die Expression von PR3. Die CD177 Interaktionen werden in cis- und trans-Interaktionen kategorisiert. CD177/PR3 verfügt über eine cis-Interaktion mit CD11b/CD18 und Fc $\gamma$ IIIb und eine trans-Interaktion mit PECAM-1. *Quelle: Bayat 2020.* 



Abbildung 4: **Transmigration neutrophiler Granulozyten aus dem Gefäßsystem ins Interstitium.** Im Rahmen einer Infektion wird CD177 hochreguliert. Während der Migration interagiert CD177 mit PECAM-1. Zu sehen ist außerdem die Koexpression von CD177 und der Serinprotease PR3. *Quelle: Eigene Darstellung*.

#### 1.3.3 Isoformen von CD177



Abbildung 5: Schematische Darstellung der mRNA der Isoformen von CD177. Die Zahlen über den Balken stehen für die Aminosäureposition bzw. die Größe des Proteins nach Translation der hier abgebildeten mRNA. Der rote Balken bei Isoform 6 markiert das Stop-Codon. Die längeren roten Balken bei Isoform 2 und Isoform 3 stellen die Insertionen dar, die zu einem Frameshift führen und jeweils mit einem Stop-Codon enden. Die Existenz eines Stop-Codons bei Isoform 6, Isoform 2 und Isoform 3 führt während der Translation zum Abbruch der Proteinsynthese und damit zu einer verkürzten Variante von Isoform 1. Isoform 1 ist die einzige bislang beschriebene Isoform, die auf mRNA Ebene über eine GPI Anker Sequenz und als Protein über einen GPI Anker verfügt. Ly6 steht für eine Lysin6 Domäne - eine cysteinreiche Domäne. Mitglieder der Ly6 Proteinfamilie, zu der auch CD177 gehört, neigen dazu, Splicing-Varianten zu bilden. *Quelle: Eigene Darstellung.* 

Es sind unterschiedliche Isoformen von CD177 identifiziert worden, die zu dem CD177 negativen Phänotyp führen. Kissel et al. untersuchten die neutrophilen Granulozyten von 2 Frauen, welche während ihrer Schwangerschaft CD177-spezifische Alloantikörper gegen intra- und extrazelluläres CD177 gebildet haben (Kissel et al. 2002). Die mRNA der CD177 negativen Frauen verfügte jeweils über eine off-frame-Insertion, welche ein Stop-Codon "tga" aufwies (Kissel et al. 2002). Die mRNA von Spenderin 1 wies eine kodierende Sequenz für 248 Aminosäuren auf, wobei die ersten 21 Aminosäuren die Signalsequenz bildeten (Kissel et al. 2002). Die verbliebenen 227 Residuen kodierten für ein NH2-terminales Protein mit einer Domäne (homolog zu Ly6) und mit 2 potentiellen N- Glykosylierungsstellen (Kissel et al. 2002) (Abbildung 5). Die mRNA der anderen Patientin kodierte für 145 Aminosäuren, wobei 21 Aminosäuren das Signalpeptid und 124 Aminosäuren das NH2-terminale Protein bestehend aus einer Ly6 homologen Domäne und einer N-Glykosylierungstelle bildeten (Kissel et al. 2002). Beiden vorhergesagten Proteinen fehlten GPI Anker und Transmembransegmente (Kissel et al. 2002).

Li et al. (2015) identifizierten eine CD177 Nonsensemutation (SNP c.787A>T), welche ein Stop-Codon an Aminosäureposition 263 (Lysin => Stop-Codon) innerhalb der CD177 kodierenden Region erzeugt (Li et al. 2015). Alle c.[787T];[787T] homozygoten Spender waren phänotypisch negativ für CD177 (Li et al. 2015). Die CD177 Expression der heterozygoten Spender war geringer als diejenige der homozygoten c.[787A];[787A] Spender. C.787A>T heterozygote Personen mit CD177 Null Phänotyp wiesen in der von Li et al. untersuchten Kohorte zusätzlich eine 955G Deletion auf (Li et al. 2015). Die CD177 Expression wird außerdem durch Methylierung des CD177 Promotors beeinflusst (Li et al. 2015).

Das von Li et al. beschriebene Stop-Codon, welches für die fehlende CD177 Expression verantwortlich ist, entsteht laut Wu et al. dadurch, dass Exon 7 des CD177 Gens vollständig vom CD177 Pseudogen durch Genkonversion ausgetauscht wird. Das heißt, der CD177 Null Phänotyp resultiert aus der Insertion einer Pseudogen-Sequenz in den CD177 Locus (Wu et al. 2016). Wu et al. identifizierten drei Populationen von neutrophilen Granulozyten dem Ausmaß der CD177 Expression entsprechend: negative, intermediäre und CD177 hoch exprimierende Granulozyten (Wu et al. 2016).



Abbildung 6: **CD177 Gen und das Pseudogen.** Das Pseudogen entspricht der CD177 Sequenz zwischen Exon 4 und Exon 9 in reverser Orientierung. Das Pseudogen ist 8,4 kb entfernt vom CD177 Gen. Die c.787A>T Variante entsteht durch Konversion bzw. Insertion von Exon 7 des Pseudogens in das CD177 Gen. Der CD177 Null Phänptyp ist also das Resultat der Insertion von Exon 7 des Pseudogen abgeleiteten Exon 7 Sequenz und dem Entstehen eines Stop-Codon auf mRNA Ebene an Position c.787. Ein hoher Anteil an CD177 hoch exprimierenden Granulozyten korreliert mit einer Homozygotie für das CD177 Referenzallel; wohingegen eine Heterozygotie für das ektope Pseudogen mit vermehrt CD177 negativen neutrophilen Granulozyten einhergeht, in welchen sowohl das intakte als auch das Pseudogen transkribiert wird. Die Heterogenität und Variabilität der CD177 Expression ensteht also durch allelische Genkonversion. *Quelle: Eigene Darstellung.* 

Alle CD177 negativen Personen sind nach Wu et al. homozygot für die vom Pseudogen abgeleitete Exon 7 Sequenz (Wu et al. 2016). CD177 negative Zellen verfügen also über zwei Transkripte der vom Pseudogen abgeleiteten Exon 7 Sequenz. CD177 hochexprimierende Zellen exprimieren nur Transkripte, welche sich von Exon 7 des CD177 Gens und nicht des Pseudogens ableiten (Wu et al. 2016). Der Anteil an CD177 tragenden neutrophilen Granulozyten innerhalb eines Individuums ist genetisch determiniert und wird durch das Verhältnis von intakten und konvertierten CD177 Allelen bestimmt (Wu et al. 2016). Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass CD177 ein Antigen ist, welches auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten exprimiert wird. Frauen mit einem CD177 Null Phänotyp können während einer Schwangerschaft Anti-CD177 Antikörper bilden, wenn der Fetus das CD177 Antigen von seinem Erzeuger ererbt hat. Es gibt zwei Erkrankungen, die mit Alloantikörpern gegen CD177 assoziiert sind: Die neonatale Alloimmunneutropenie und TRALI. Die komplexe Regulation der CD177 Expression durch genetische Faktoren (Allele, die zu einem Null Phänotyp führen) und epigenetische Faktoren (monoallelic silencing) ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

## 2 Ziele der Arbeit

3-5 % aller Kaukasier können CD177 nicht exprimieren (Lalezari et al. 1971). Li et al. identifizierten eine Variante (c.787A>T), welche für ein Stop-Codon kodiert und damit für eine fehlende CD177 Expression verantwortlich sein kann (Li et al. 2015).

Hieraus leiteten sich folgende Fragen ab:

- Ist die durch Genkonversion aus dem CD177 Pseudogen hervorgegangene Genvariante c.787A>T bei allen Personen mit CD177 Null Phänotyp in homozygoter Anlage nachweisbar?
- Gibt es bei Personen mit heterozygoter Anlage andere genetische Varianten, die mit dem CD177 Null Phänotyp assoziiert sind?

Zur Beantwortung dieser Fragestellung soll der CD177 Phänotyp bei einer Kohorte von 220 Personen ermittelt werden. Bei CD177 negativen Personen soll das CD177 Gen durch *next generation sequencing* resequenziert werden. Unbekannt ist, ob die bislang beschriebenen Isoformen von CD177 (Kissel et al. 2002) immunogen sind (zum Beispiel Kissel et al. 2002). Diese Isoformen könnten bei Erkrankungen wie der neonatalen Alloimmunneutropenie und TRALI eine Rolle spielen. Es sind Fälle beschrieben, in denen CD177 positive Mütter CD177 Alloantikörper gegen die Granulozyten ihrer Kinder gebildet haben, welche zu einer Alloimmunneutropenie geführt haben (Lalezari 2017). CD177 Alloantikörper, die von CD177 positiven Personen gebildet werden, könnten gegen CD177 Isoformen gebildet werden (Lalezari 2017).

Diese Beobachtung führte zu folgenden Fragestellungen:

- Gibt es weitere bisher nicht beschriebene Isoformen von CD177?
- Werden potentiell neu entdeckte Isoformen als Protein exprimiert, weisen sie einen GPI Anker auf und sind sie immunogen?

Zur Beantworung dieser Fragestellung soll die mRNA verschiedener Spender untersucht werden, das Protein einer möglichen neu entdeckten Isoform in der Zellkultur exprimiert und im Western Blot detektiert werden. Um eine Vorhersage bezüglich einer GPI Verankerung zu treffen, soll ein bioinformatischer Algorithmus angewandt werden. Die Beantwortung der Fragestellungen dieser Arbeit könnte künftig die Diagnostik der neonatalen Alloimmunneutropenie und der TRALI verbessern.

## 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

Antikörper	Herkunft/Firma
7D8 (Überstand)	Institut für klinische Immunologie
	und Transfusionsmedizin, Gießen
	(ursprünglich Geschenk von Stroncek)
Anti-NB1 (Serum)	Institut für klinische Immunologie
	und Transfusionsmedizin, Gießen
7D8 (Anti-NB1)	Institut für klinische Immunologie
	und Transfusionsmedizin, Gießen
CD16	Fa. Immunotech
mIgG	Fa. Ancell
Alexa Fluor Donkey anti-mouse	Fa. Eugene
FITC	Fa. Daco
Anti GFP	Fa. Biolegend
Anti V5	Fa. Biolegend

Tabelle 2: Verwendete Antikörper. Quelle: Eigene Darstellung.

Kit	Firma
QIAGEN Long-Range-PCR Kit (100)	Fa. QIAGEN
peqGOLD HP Total RNA Kit	Fa. peqlab VWR
QIAquick PCR Purification Kit	Fa. QUIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	Fa. QUIAGEN
Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit	Fa. New England Biolabs
Qubit dsDNA BR Assay Kit, 500 assays	Fa. Eugene
Pierce BCA Protein Assay Kit	Fa. Thermoscientific
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Fa. Thermoscientific Fisher
Hi Speed Plasmid Midi Kit	Fa. QIAGEN
AutoSeq G-50 Dye Terminator Removal Kit	Fa. Healthcare
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up DNA,	Fa. Macherey-Nagel
RNA and protein purification	
QIAmp DNA Blood Mini Kit	Fa. QIAGEN

Tabelle 3: Kits. Quelle: Eigene Darstellung.

Sonstige Materialien	Firma
Transfection Reagent	Fa. QIAGEN
DMEM High Glucose	Fa. Capricorn Scientific
Dulbecco's PBS	Fa. Capricorn Scientific
Methanol	Fa. Honeywell Riedel de Haen
Albumin Bovine Fraction V, pH 7,0	Fa. SERVA
Standard PageRuler <sup>TM</sup>	Fa. Thermoscientific Fisher
Prestained Protein Ladder	
Immobilon-P Membran	Fa. Merck
Immobilon Western	Fa. Millipore
Chemiluminescent HRP Substrate	
Accutase	Fa. Sigma
Restore Western Blot Stripping Buffer	Fa. Thermoscientific Fisher
Ethanol	Fa. Sigma-Aldrich
Streptavidin-Horseradish-Peroxidase Substrat	Fa. Healthcare
BD Pharm Lyse Lysing Buffer	Fa. BDBioscience
1kb DNA ladder	Fa. PEQLAB
PEQ GOLD Universal Agarose	Fa. PEQLAB
SYBR Safe DNA Gel Stain	Fa. Invitrogen
Triton X 100	Fa. Roth
Tween	Fa. Roth
Protein G	Fa. GERBU
Bovine Albumin 22 %	Fa. Ortho-Clinical Diagnostics
Ficoll-Paque	Fa. Healthcare
Gel Loading Purple	Fa. Biolabs
100bp ladder	Fa. Biolabs
NaCl 0.9 %	Fa. Braun
Aqua	Fa. Braun
2-Mercaptoethanol	Fa. Sigma
Chloroform	Fa. Merck
Dextran 500	Fa. Roth
Qubit dsDNA BR Standard	Fa. Eugene
peqGOLD TriFast	Fa. PEQLAB
peqGOLD RNA Pure FL	Fa. PEQLAB

 Tabelle 4: Sonstige Materialien. Quelle: Eigene Darstellung.

Primer	Sequenz
Long-Range	5'-CTGAAAAAGCAGAAAGAGATTACCA
Vorwärtsprimer	GCCACAG-3'
Long-Range	5'-GTCCAAGGCCATTAGG
Rückwärtsprimer	TTATGAGGTCAGA-3'
Nested Vorwärtsprimer	5'-TGACCCAGCAGTTGTGATCA-3'
Nested Rückwärtsprimer	5'-AGCGCCTCCTCCGGA-3'
reverse Transkription	5'-GACTCGAGTCGACATCGA
Primer	TTTTTTTTTTTTTTT-3'
Q5SDM-CD177F	5'-CTGCCCTGTCCCAGGAG-3'
Q5SDM-CD177R	5'-CTACATCTAGGAGCAGCAGCG-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
BGH	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'
GFP	5'-CACAATCTGCCCTTTCGAAA-3'
CD177F601	5'-AGCCAGTTTGCAACCTGCTCA-3'
CD177RdelEx 6-8	5'-CAGGGGCAGCTACATCTAGGAGCA-3'
CD177Rex7-8	5'-ACAGGGGCAGCTTGAGGAGGGA-3'
25-47 Kozak	5'-GTCATGGGCCCGGTATTACTGCT-3'
HNA-2 Rges	5'-GCAGGAAGGGCAAACCACTCCCC-3'
GinVP5	5'-GGCATCTTCTCCAATCTGAGA-3'

Tabelle 5: **Primer.** *Quelle: Eigene Darstellung.* 

Geräte	Firma
Durchflusszytometer BD FacsCanto II	Fa. BD Bioscience
NGS-Gerät	Fa. Illumina
Sanger Sequenziergerät	ABI Sequencer 3300
PCR Maschine	Fa. Eppendorf
PCR Maschine	Fa. Peqlab
Zellcounter Sysmex KX-21N	Fa. Sysmex
CASY Zellcounter	Fa. Schärfe Sytem
BCA Assay Gerät/SmartSpec	Fa. Bio-Rad
Plus Spectrophotometer	
Wärmewasserbad	Fa. Julabo
Rüttler	Fa. Eppendorf
Wippender Plattformschüttler Duomax 1030	Fa. Heidolph Instruments
Thermomixer Comfort	Fa. Eppendorf

Vortexer MS1 Minishaker	Fa. IKA
Blottkammer	Fa. Biometra
Microcomputer Electrophoresis Power Supply E452	Fa. Consort
Phero.stab. 500 Electrophoresis Powersupply	Fa. Biotec Fisher
Ultraschallbad	Fa. Elma
Abzug	Fa. Thulab
Eiswürfelmaschine	Fa. Mantiwoc
Waage	Fa. Mettler Toledo
Waage	Fa. Sartorius
Incubating Orbital Shaker	Fa. VWR
Phero-stab.500 Elektrophorese Netzteil	Fa. Biotec-Fisher
Mikrowelle	Fa. Sharp
NanoDrop	Fa. Thermoscientific Fisher
EZ1 Advanced XL DNA Isoliermaschine	Fa. Quiagen
Zentrifuge	Fa. Mettich & Fa. Heraeus
Sterilbank Hera Safe	Fa. Heraeus Christ
Zellkulturbrutschrank	Fa. Heraeus
Kühlschrank	Fa. Heraeus Instruments
DNA Isoliergerät EZ1 Advanced XL	Fa. Qiagen
Mikroskop	Fa. Labovert
Pipetboy Pipettierhelfer	Fa. Biosciences

Tabelle 6: Geräte. Quelle: Eigene Darstellung.

Materialien	Firma
Stabpipetten	Fa. Greiner Bio
Pipettenspitzen	Fa. Sarstedt AG & Co.
Eppendorfgefäße	Fa. Sarstedt
Tubes	Fa. Sarstedt
Zellkulturflaschen mit und ohne Filter	Fa. Greiner Bio-one
Mikroplatte	Fa. Greiner Bio-one
Cellstar Tubes	Fa. Greiner Bio-one
Petrischalen/12 Kulturplatten	Fa. Greiner Bio-one
Skalpell	Fa. Feather
Parafilm	Fa. Bemis
Röhren Tubes	Fa. Sarstedt

Tabelle 7: Materialien. Quelle: Eigene Darstellung.

#### Lösungen für SDS-Gele

- Lösung A: fertig käuflich erworben =>Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) (Fa. Roth); bei 4 Grad Celsius (°C) aufbewahren
- Lösung B (3 Molar (M) Tris-Puffer pH 8,8): 36,3 Gramm (g) gelöst in 75 Milliliter (ml) Aqua dest; mit HCL auf einen pH-Wert von 8,8 einstellen (Gesamtvolumen 100 ml); bei 4 °C aufbewahren
- Lösung C (10 % SDS): 10 g SDS in 100 ml Wasser lösen bei 37 °C; bei RT aufbewahren
- Lösung D (0,5 M Tris-Puffer pH 6,8): 3 g Tris in 40 ml Aqua dest einstellen und mit HCL auf einen pH-Wert von 6,8 einstellen (Gesamtvolumen 50 ml); bei 4 °C aufbewahren
- APS: zu 312,5 Milligramm (mg) Ammoniumpersulfat 25 ml Aqua dest geben; bei 4 °*C* in brauner Flasche aufbewahren
- Temed: fertig käuflich erworben (Fa. AppliChem)

#### Lösungen für SDS-Page und Blotten

- ECL-Waschlösung: 7,269 g Tris mit NaCl-Lösung 0,9 % (Fa. Fresenius) versetzen und den pH-Wert auf 7,4 einstellen; im Anschluss 1,5 ml Tween (Fa. Roth) dazugeben und fehlende NaCl-Lösung ergänzen (Gesamtvolumen 3000 ml)
- Blockierungslösung: 1,5 g BSA Pulver/Albumin Bovine Fraction (Fa. Serva) mit 100 ml ECL-Waschlösung versetzen
- Laufpuffer: Rotiphorese 10x SDS-PAGE (Fa. Roth) bestehend aus 0,25 M Tris, 1,92 M Glycin und 1 % SDS mit Aqua dest auf 1 l auffüllen
- Probenpuffer: Ansatz für 8 ml: 4 ml 4 % SDS, 1,5 ml 15 % Glycerol, 1,25 ml 62,5 Millimolar (mM) Tris-HCl, 0,5 ml 0,0005 % Bromphenolblau und 0,75 ml Aqua dest mischen, in 400 Mikroliter (μl) Aliquots aufteilen und bei 4 °*C* lagern; immer frisch dazu geben: non reduced: 100 μl Aqua dest zu den 400 μl Probenpuffer geben, reduced: 100 μl 1 M zu den 400 μl Probenpuffer geben

#### Transferpuffer für Semidry-Blot

- Puffer A (pH 10,4): 36,3 g Tris + 800 ml Aqua dest + 200 ml Methanol
- Puffer B (pH 10,4): 3,03 g Tris + 800 ml Aqua dest + 200 ml Methanol
- Puffer C: 5,2 g epsilon-Aminocapronsäure + 800 ml Aqua dest + 200 ml Methanol
- Restore Western Blot Stripping Buffer: käuflich erworben (Fa. Thermoscientific)

- Ammoniumchlorid: 8,3 g Ammoniumchlorid und 1,0 g Kaliumhydrogencarbonat und 0,037 g Titriplex in 700 ml Aqua dest auflösen und einen pH-Wert von 7,4 einstellen (Gesamtvolumen 1.000 ml)
- HCL: 37 %
- NaOH: 3 M oder 10 M
- IPB: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, pH = 7,4
- Solulibilsationspuffer: 25 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % Triton X-100, pH = 7,4
- Sephadex: Sephadex Superfine (Fa. GE Healthcare)

#### Zellkulturmedien

- serumfreies Medium DMEM High Glucose (Fa. Capricorn Scientific GmbH)
- Zellmedium DMEM mit 10 % FCS (fetal calf dserum) und 1 % P/S (Benzylpenicillin-Procain und Dihydrostreptomycin)
- Zellmedium DMEM mit 10 % FCS und 1 % P/S und 800  $\mu$ g/ml Geneticin

#### 3.2 Methoden

# 3.2.1 Phänotypische Untersuchung von Blutspendern hinsichtlich ihrer CD177 Expression mittels quantitativer Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie können Zellen und Partikel bzw. deren Oberflächenmerkmale und intrazelluläre Proteine quantifiziert werden (Renz 2018). Dabei werden verschiedene Eigenschaften wie die relative Granularität, die relative Größe und die relative Fluoreszenzintensität als Parameter zur Quantifizierung herangezogen (Renz 2018). Die Zellen werden mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper beladen, in einem Flüssigkeitsstrom transportiert und von einem Laserstrahl getroffen (Renz 2018). Das entstehende Vorwärtsstreulicht ("forward scatter") gibt Hinweis auf die Größe der Zelle und das Seitwärtsstreulicht ("side scatter") auf die Granularität (Renz 2018). Die Antikörper werden zur Fluoreszenz angeregt und die dabei emittierten Wellenlängen detektiert und analysiert (Renz 2018). Die Charaktereigenschaften der detektierten Emissionswellen, das heißt deren Intensität und spektrale Zusammensetzung, geben Rückschluss auf den relativen Anteil der in einer Zelle untersuchten Struktur (Renz 2018). Mittels quantitativer Durchflusszytometrie wurden 220 Blutspender hinsichtlich ihrer CD177 Expression untersucht. Die Auswahl der Spender erfolgte zufällig. Jeweils 100  $\mu$ l Vollblut wurden mit 3 Mikrogramm ( $\mu$ g) 7D8 Überstand und als Negativkontrolle mit 1  $\mu$ g Maus IgG für 30 Minuten (min) bei 4 °C inkubiert. Nach Hinzugabe von 2

ml Zelllysepuffer (Verdünnung 1:10 mit Aqua Dest) und einer Inkubation von 10 min erfolgten die zweimalige Waschung mit 2 ml 1 % PBS/BSA Lösung (500  $\mu$ l BSA und 50 ml PBS) und Zentrifugation (5 min, 400 g). Dem gewonnenen Granulozytenpellet wurden 100  $\mu$ l markierte sekundäre Antikörper Anti-Maus-Alexa Fluor 488 (Verdünnung 1:50) hinzugefügt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4°*C*, Waschen mit PBS/BSA und Entfernung des Überstandes wurden die verbliebenen Granulozyten mit 200  $\mu$ l BD Cellfix (Verdünnung 1:10) fixiert und am Durchflusszytometer gemessen.

#### 3.2.2 DNA Isolation aus Vollblut

Die DNA Isolation aus Vollblut erfolgte mittels des DNA-Isoliergerätes EZ1 advanced XL der Firma Quiagen. Die Reagenzien für die Isolierung und Aufreinigung der DNA befinden sich in einem länglichen Probensytem, welches im hinteren Bereich des Gerätes platziert wird (QIAGEN 2015). Die Reagenzgläser des Probensystems beinhalten einen Lysierpuffer, einen Waschpuffer, einen Elutionspuffer sowie magnetische Partikel (QIA-GEN 2015). Die Arbeitsfläche des Gerätes besteht aus vier Reihen. In die erste Reihe werden Elutionsreagenzgläser gesetzt, in die zweite Reihe Pipettenhalter und in die vierte Reihe Proben-Reagenzgläser (QIAGEN 2015). 300  $\mu$ 1 Vollblut wurden in ein Proben-Reagenzgläser (QIAGEN 2015). 300  $\mu$ 1 Vollblut wurden in ein Proben-Reagenzglas pipettiert. Das Prinzip des DNA Isoliergerätes ist das Folgende: Magnetische Partikel werden dem lysierten Vollblut hinzugefügt. Die Nukleinsäuren werden magnetisch an die Oberfläche der Partikel gebunden und somit von den restlichen Blutbestandteilen separiert. Die DNA wird im Anschluss gewaschen, aufgereinigt und in einem Elutionspuffer gelöst (QIAGEN 2015). Die Konzentration der DNA wurde mittels eines Nanodrop-Messgerätes bestimmt.

#### 3.2.3 DNA Isolation aus Granulozyten

Die DNA-Isolation erfolgte mittels eines QIAGEN-Kits. Hierzu wurden ca.  $5 \times 10^6$  Granulozyten in 200  $\mu$ l PBS mit 20  $\mu$ l Quiagen Protease und 200  $\mu$ l Buffer AL versetzt. Nach kurzem Vortexen und einer Inkubationszeit von 10 min bei 56 °*C* wurden 200  $\mu$ l Ethanol hinzugefügt. Das Gemisch wurde im Anschluss in eine QIAamp Mini Spin Säule überführt und zentrifugiert (1 min, 6.000 g). Nach dem Hinzufügen von 500  $\mu$ l Buffer AW1, der erneuten Zentrifugation (1 min, 6.000 g), dem Hinzufügen von 500  $\mu$ l Buffer AW2 mit anschließender Zentrifugation (3 min, 20.000 g) konnte die Säule in ein neues unbenutztes Eppendorfgefäß gesetzt werden. Zum Eluieren der DNA wurde auf die Säule 200  $\mu$ l destilliertes Wasser pipettiert, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und zum Abschluss zentrifugiert (6.000 g, 1 min). Die DNA Konzentration wurde mittels Nanodrop gemessen und zur Aufbewahrung bei -20 °*C* eingefroren.

#### 3.2.4 Agarosegelelektrophorese

Um das Gel zu gießen, wurden 50 ml 0,5 TBE mit 0,75 g Agarosepulver (Fa. peqlab) versetzt und das Gemisch im Anschluss in der Mikrowelle bis zur vollständigen Auflösung des Pulvers erhitzt. Nach Zugabe von 5  $\mu$ l SYBR Safe (Fa. invitrogen), dessen Farbstoff an die DNA bindet, wurde die noch flüssige Lösung zur Polymerisation in einen Gelschlitten gegossen. Nach 30 min konnten 8  $\mu$ l *polymerase chain reaction* (PCR) Produkt und 2  $\mu$ l Loading Dye (Gel Loading Dye Purple (6x) BioLabs) in die dafür im Gel vorgesehenen Taschen pipettiert werden und gelektrophoretisch bei einer konstanten Spannung von 120 Volt (V) aufgetrennt werden. Ein Standard (je nach Größe des PCR Produktes 1 kb oder 100 bp DNA ladder der Firma BioLabs) wurde ebenfalls im Gel mitgeführt. Nach Auftrennung konnten die einzelnen DNA Fragmente mittels ultravioletten Lichtes unter einem Transilluminator visualisiert und mit einer Sofortbildkamera dokumentiert werden.

#### 3.2.5 Long-Range-PCR

Aufgrund der Größe des zu amplifizierenden CD177 Gens wurde mit einem Long-Range-PCR Kit gearbeitet. Für die PCR wurden die von Li et al. konstruierten Primer verwendet: Vorwärtsprimer 5'-CTGAAAAAGCAGAAAGAGATTACCAGCCACAG-3' und Rückwärtsprimer 5'-GTCCAAGGCCATTAGGTTATGAGGTCAGA-3' (Li et al. 2015). Der Mastermix setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen: 2,5  $\mu$ l Puffer, 1,25  $\mu$ l Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP), jeweils 1  $\mu$ l Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 5  $\mu$ l Q-Solution und 0,4  $\mu$ l Taq Polymerase. Nach Mischung des Mastermix mit 250 Nanogramm (ng) DNA lief die PCR unter den folgenden Bedingungen ab: initial 3 min Denaturierung bei 93 °C, im Anschluss 38 Amplifikationszyklen mit Denaturierung (93 °C, 15 Sekunden (s)), Annealing (62 °C, 30 s) und Extension (68 °C, 9 min). Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese.

#### 3.2.6 Nested-PCR

Für die PCR wurden die von Bayat et al. konstruierten Primer mit folgender Sequenz eingesetzt: Vorwärtsprimer 5'-TGACCCAGCAGTTGTGATCA-3' (Bayat et al. 2016) und Rückwärtsprimer 5'-AGCGCCTCCTCCCTCGGA-3' (Bayat et al. 2016). Ein Mastermix wurde aus 14,5  $\mu$ l Aqua dest, 2,5  $\mu$ l Puffer, 4  $\mu$ l dNTP, jeweils 1,25  $\mu$ l Vorwärtsund Rückwärtsprimer und 0,5  $\mu$ l Taq erstellt. Als Template wurde 1  $\mu$ l des Long-Range-PCR Produktes hinzugefügt. Für die PCR wurden folgende Einstellungen gewählt: Nach einer initialen Denaturierung (95 °*C*, 5 min) folgten 33 Zyklen mit jeweils Denaturierung (95 °*C*, 1 min), Annealing (56 °*C*, 1 min) und DNA-Synthese (72 °*C*, 1 min). Der letzte PCR Schritt erfolgte für 7 min bei 72 °*C*. Die Proben wurden bei 8 °*C* gekühlt und im Anschluss elektrophoretisch aufgetrennt.

#### 3.2.7 PCR-Produktaufreinigung

Für die Aufreinigung des PCR-Produktes wurde das QIAquick PCR Purification Kit (Fa. Quiagen) verwendet. Zum Volumen des PCR-Produktes wurde die fünffache Menge an Puffer PB hinzugefügt. Die Gesamtmenge wurde in eine im Kit vorgesehene Säule pipettiert und bei 130.000 *revolutions per minute* (rpm) 45 s zentrifugiert. Zum Waschen wurde 750  $\mu$ l Buffer BE in die Säule gegeben und erneut 45 s bei 130.000 rpm zentrifugiert. Nach einer erneuten Zentrifugation, die zum Ziel hatte, den restlichen Waschpuffer zu entfernen, wurde die QIAquick Säule in einem Eppendorfgefäß platziert. Die DNA wurde mit 35  $\mu$ l Aqua dest durch erneute Zentrifugation (13.000 rpm, 45 s) eluiert.

#### 3.2.8 DNA Extraktion aus Agarosegelen

Als Alternative zur PCR-Produktaufreinigung wurde die Methode der Gelextraktion angewandt. Hierfür wurde das QIAquick Gelextraktion Kit (Fa. Quiagen) verwendet. Nach der Agarosegelelektrophorese konnten die Banden, welche sich auf der richtigen Größe befunden haben, mit einem Skalpell ausgeschnitten und gewogen werden. Zum Gel wurde das dreifache Volumen an Buffer QG hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation von 10 min bei 50 °*C* und das Mischen mit einem äquivalenten Volumen Isopropanol. Nach dem Hinzufügen von 500  $\mu$ l Buffer QG, einer Zentrifugation (13.000 rpm, 1 min), dem Waschen mit 750  $\mu$ l Buffer PE und der erneuten zweimaligen Zentrifugation (jeweils 13.000 rpm, 1 min) wurde die QIAquick column in einem sauberen Eppendorfgefäß platziert und DNA mit 30  $\mu$ l Aqua dest eluiert.

#### 3.2.9 Sequencing PCR

Für die Sequencing PCR wurden die Primer des jeweiligen aufgereinigten PCR Produktes verwendet. 50 ng DNA/PCR Produkt wurden mit jeweils 2  $\mu$ l Big Dye, 2  $\mu$ l Puffer und 1  $\mu$ l Primer und HPLC Aqua Dest gemischt. Die PCR mit einem Gesamtvolumen von jeweils 20  $\mu$ l mit Vorwärtsprimer und 20  $\mu$ l einschließlich Rückwärtsprimer lief unter folgenden Bedingungen ab: 25 Zyklen mit jeweils Denaturierung (95 °*C*, 10 min), Annealing (50°*C*, 5 min) und Elongation (60 °*C*, 2 min). Nach Beendigung der PCR wurde das PCR-Produkt aufgereinigt.

#### 3.2.10 Aufreinigung des Sequenzierproduktes

700  $\mu$ l Sepharose wurde in eine Säule pipettiert (GE Healthcare illustra<sup>TM</sup> AutoSeq G-50 Säulen). Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation (2 min, 2.500 rpm). Die Säule wurde in ein Eppendorfgefäß mit 10  $\mu$ l HiDi-Formamid überführt und das Sequencing PCR Produkt in die Säule pipettiert. Eine erneute Zentrifugation (2 min, 2.500 rpm) bildete den Abschluss der Aufreinigung des Sequenzierproduktes.

#### 3.2.11 Next Generation Sequencing

Das Prinzip des next generation sequencing beruht auf mehreren Teilabläufen: In einem ersten Schritt wird die DNA des Long-Range-PCR-Produkts fragmentiert und Adapter an das 5'- und 3'- Ende ligiert (Illumina 2017). Die Amplifikation erfolgt mittels Brücken-PCR. Die adaptergebundenen Fragmente werden an eine flow cell gebunden. Die auf der flow cell gebundenen Oligos sind komplementär zur Adapterregion (Illumina 2017). Jedes Fragment wird mithilfe einer DNA Polymerase amplifiziert der neu entstandene Doppelstrang denaturiert und das ursprüngliche DNA template entfernt (Illumina 2017). Die DNA Stränge werden durch Brückenbildung amplifiziert, indem der DNA Strang mit seinem freien Ende an das andere sich auf der flow cell befindliche Oligo bindet (Illumina 2017). Die Oligos fungieren als Primer (Illumina 2017). Es entsteht eine doppelsträngige Brücke, die abermals denaturiert, wodurch zwei einzelsträngige gebundene DNA Stränge entstehen (Illumina 2017). Dieser Vorgang wird mehrfach wiederholt, wodurch klonale *cluster* entstehen (Illumina 2017). Die Rückwärtsstränge werden jeweils entfernt, wodurch nur der Vorwärtsstrang bestehen bleibt (Illumina 2017). Das 3'-Ende der Oligos wird blockiert, wodurch eine unerwünschte Amplifikation verhindert wird (IIlumina 2017). Fluoreszenzmarkierte Nukleotide werden hinzugefügt und binden komplementär an den DNA Strang (Illumina 2017). Die Emission jedes clusters wird aufgenommen, wobei die Emissionswellenlänge und Intensität genutzt werden, um die Basen zu identifizieren (Illumina 2017). Nach dem Lesen des Vorwärtsstrangs wird wiederum der komplementäre Rückwärtsstrang synthetisiert, der Vorwärtsstrang entfernt und die Basenpaarabfolge des Rückwärtsstranges bestimmt (Illumina 2017). Im letzten Schritt findet das alignment der unterschiedlichen reads mit einer Referenzsequenz statt (verwendete Referenzsequenz in der hier vorliegenden Arbeit: CD177 NC<sub>0</sub>00019.10) (Illumina 2017). Die Datenanalyse wurde mittels des sequencing Programms "Geneious" durchgeführt (IIlumina 2017).

#### 3.2.12 Qubit-Messung

Die Qubit-Messung diente der Bestimmung der DNA Konzentration im Long-Range-PCR-Produkt. Hierfür wurde das molecular probes life technologies Qubit *doublestranded desoxyribonucleic acid* (dsDNA) BR Assay Kit verwendet (Fa. Eugene). Als Mastermix pro Probe wurden 199  $\mu$ l dsDNA BR Buffer und 1  $\mu$ l Qubit dsDNA concentrate gemischt. Zu Beginn wurde das Gemisch aus jeweils 190  $\mu$ l Mastermix und 10  $\mu$ l Standard und im Anschluss die Kombination aus 198  $\mu$ l Mastermix und 2  $\mu$ l PCR-Produkt gemessen.

#### 3.2.13 Nanodrop-Messung

Für die Nanodrop-Messung wurde ein Gerät der Firma Thermoscientific Fisher verwendet. Das Gerät wurde zu Beginn mittels Aqua dest auf 0,0 ng/ $\mu$ l geeicht. Im Anschluss konnte die DNA-Messung durchgeführt werden, indem 2  $\mu$ l der eluierten DNA auf die vorgesehene Messfläche appliziert wurde.

#### 3.2.14 Isolierung von Granulozyten mit Dextran aus EDTA Blut

Ausgewählte Spender wurden nochmals zur Blutspende einbestellt. Von diesen wurden Granulozyten isoliert und erneut durchflusszytometrisch untersucht, um die Ergebnisse der CD177 Expression zu verifizieren. Zur Granulozytenisolation wurden 10 Milliliter (ml) EDTA-Blut mit 2,5 ml Dextran gemischt und im Anschluss zur Beschleunigung der Sedimentation der Erythrozyten in Schräglage 30 min bei 37 °*C* stehen gelassen. Während der Inkubation wurden pro Röhrchen mit 10 ml EDTA Blut zwei Ficoll-Gradienten durch Vorlage von 2 ml Ficoll-Plaque Plus in ein Polyröhrchen vorbereitet. Nach Überschichtung des Überstands von einem Röhrchen Blut auf die beiden Ficoll-Röhrchen erfolgte die Zentrifugation (20 min, 1.200 rpm) und im Anschluss das Absaugen des Überstandes. Die Granulozyten waren am Boden des Röhrchens als Pellet sichtbar. Die Lyse der noch verbliebenen Erythrozyten konnte durch Zugabe von jeweils 2,5 ml Ammoniumchlorid pro Röhrchen, Resuspension und 5-minütiger Inkubation auf Eis erzielt werden. Nach Zugabe von 5 ml PBS, Zentrifugation (5 min, 800 rpm), Absaugen des Überstands und zweimaligem Waschen mit jeweils 3 ml PBS war die Granulozytenisolation abgeschlosssen. Die Zellzahl konnte am Sysmex-Counter bestimmt werden.

#### 3.2.15 Herstellung von Granulozytenlysat

Zwecks quantitativer Aussagekraft wurde als Richtwert  $1 \times 10^7$  Granulozyten pro 100  $\mu$ l Lysepuffer festgesetzt. Um den Lysepuffer zu erstellen, wurden 3,2 ml 20 mM Tris, 100  $\mu$ l Proteaseinhibitor-Cocktail, 25  $\mu$ l Tritonx-100 und 75  $\mu$ l 5 % EDTA gemischt. Die Granulozyten konnten durch Zentrifugation (3 min, 12.000 rpm) vom PBS getrennt, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit dem Lysepuffer versetzt werden. Die Inkubation erfolgte im Kühlraum bei 4 °*C* für 30 min auf einem Rüttler und im Anschluss zur weiteren Lyse und Fragmentation im Ultraschallbad für 3 min. Nach erfolgter Zentrifugation bei 4 °*C* (30 min; 13.000 rpm) wurde der Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei einer Temperatur von -80 °*C* gelagert.

#### 3.2.16 Herstellung von biotinmarkiertem Granulozytenlysat und Preclearen des Lysats

Um die Biotinstocklösung herzustellen, wurden 27,83 mg NHS-LC-Biotin in 1 ml PBS gelöst. Zu den Granulozyten  $(1x10^7)$  wurde Biotinlösung hinzugefügt (Verhältnis Bio-

tinlösung zu Granulozyten 1:10). Nach einer 30-minütigen Inkubation wurden die Granulozyten mit PBS zweimal gewaschen und das verbliebene Pellet mit 100  $\mu$ l Granulolysepuffer - bestehend aus 1,6 ml 20 mM Tris, 12,5  $\mu$ l Tx-100, 37,5  $\mu$ l 5 % EDTA und 50  $\mu$ l Proteaseinhibitorcocktail - versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei 4 °*C* auf dem Rüttler, 3 min Ultraschallbad und einer Zentrifugation (30 min; 130.000 rpm) bei 4 °*C* wurde der Überstand abgenommen. Zum Peclearen des Lysats wurden 50  $\mu$ l Protein G Beads in einem neuen Eppendorfgefäß vorgelegt und 500  $\mu$ l IPB zugegeben. Nach einer Zentrifugation (1 min; 2.000 rpm) wurde der Überstand abgesaugt und zu den Beads 20  $\mu$ l AB-Serum, 40  $\mu$ l 100 mg/ml BSA und 200  $\mu$ l biotinmarkiertes Granulozytenlysat zugegeben. Das Lysat und die Beads wurden 60 min auf dem Rotator inkubiert und im Anschluss zentrifugiert (1 min; 2.000 rpm). Der Überstand wurde abgenommen und mit 10  $\mu$ l AB-Serum, 50  $\mu$ l 100 mg/ml BSA auf 50  $\mu$ l neu gewaschene Protein G-Beads gegeben. Nach einer erneuten 60-minütigen Inkubation auf dem Rotator und einer Zentrifugation (1 min; 2.000 rpm) konnte der preclearte Überstand abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung eingefroren werden.

#### 3.2.17 Photometrische Messung der Proteinkonzentration von Granulozytenlysat/BCA Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit verwendet (Fa. Thermoscientific). Hierfür wurde eine Standardreihe aus BSA und Solubilisationspuffer erstellt (9 verschiedene Verdünnungen zwischen 0 - 2.000  $\mu$ g/ml). Das BCA-Reagenz wurde aus 50 Teilen Reagenz A und 1 Teil Reagenz B angesetzt. Jeweils 500  $\mu$ l BCA Reagenz wurde mit 25  $\mu$ l Standard oder Probe versetzt. Nach einer Inkubation bei 37 °*C* für 30 min wurden die Standards und die Proben bei 562 nm im Photometer gemessen.

#### 3.2.18 RNA Isolation aus Granulozyten

Zur RNA Isolation aus neutrophilen Granulozyten wurde das peqGOLD HP Total RNA Kit (peqlab VWR) verwendet. Jeweils  $10 \times 10^6$  Granulozyten wurden mit 1 ml peqGOLD TriFast versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min, Zugabe von 0,2 ml Chloroform, 15 s schütteln und erneuter Inkubation von 7 min erfolgte die Zentrifugation der Probe (5 min; 12.000 g). Ergebnis der Zentrifugation war die Phasenauftrennung in eine sich am Boden des Eppendorfgefäßes befindliche rosafarbene Chloroform-Phenol-Phase, eine mittlere Interphase und eine obere durchsichtige wässrige Phase. Das Gemisch aus der wässrigen Phase und dem äquivalenten Volumen 70 % Ethanol wurde in eine PerfectBind RNA Column überführt, zentrifugiert (15 s; 10.000 g) und der Durchfluss verworfen. Nach Waschen der Säule mit 500  $\mu$ l RNA Wash Buffer I, Zentrifugation (15 s; 10.000 g), zweimaligem Waschen mit 600  $\mu$ l RNA Wash Buffer II mit jeweils nachfolgender Zentrifugation (15 s; 10.000 g) wurde die Säule zum Trocknen erneut zentrifugiert (1 min; 10.000 g). Die Elution der RNA erfolgte mit 38  $\mu$ l RNase freiem Wasser durch Zentrifugation (1 min; 10.000 g).

#### 3.2.19 Reverse Transkription - Umschreiben der RNA in cDNA

#### 3.2.20 PCR/mRNA Analyse zur Identifikation der CD177delEx7 Isoform

Für die PCR wurden Primer mit folgender Sequenz verwendet: Vorwärtsprimer (NB1 25-47Kozak) 5'-GTCATGGGCCCGGTATTACTGCT-3' (VP5) 5'-GGCATCTTCTCCAATCTGAGA-3' und Rückwärtsprimer (HNA-2a RPgesamt) 5'-GCAGGAAGGGCAAACCACTCCCC-3'. Der Mastermix setzte sich aus folgenden Substanzen zusammen: 20  $\mu$ l Aqua dest, 5  $\mu$ l Puffer, 8  $\mu$ l dNTP, jeweils 2,5  $\mu$ l Primer, 10  $\mu$ l Q-Solution, 1  $\mu$ l Taq. Nach dem Hinzufügen von 1  $\mu$ l cDNA lief die PCR mit einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l unter folgenden Bedingungen ab: Vorlauf (95 °*C*; 5 min), 38 Zyklen mit jeweils Denaturierung (95 °*C*; 30 s), Annealing (59,8 °*C*; 40 s) und Polymerisation (72 °*C*; 1,5 min).

#### 3.2.21 PCR zur Testung verschiedener cDNA hinsichtlich des Vorhandenseins von CD177delEx7 Isoform

Die Primer dieser PCR hatten die folgende Sequenz: Vorwärtsprimer CD177F601 5'-AGCCAGTTTGCAACCTGCTCA-3' und der Rückwärtsprimer CD177RdelEx 6-8 5'-ACAGGGGCAGCTACATCTAGGAGCA-3'. Das Gesamtvolumen von 25  $\mu$ l setzte sich zusammen aus 12,6  $\mu$ l Aqua dest, 2,5  $\mu$ l Puffer, 4  $\mu$ l dNTP, 0,5  $\mu$ l Taq, 3  $\mu$ l Template und jeweils 0,6  $\mu$ l Primer. Nach einem Vorlauf (95 °*C*; 5 min) liefen 40 Zyklen mit Denaturierung (95 °*C*; 30 s), Annealing (58 °*C*; 30 s) und Polymerisation (72 °*C*; 30 s) ab. Der Nachlauf erfolgte 7 min bei 72 °*C*.

#### 3.2.22 Ortsspezifische Mutagenese

Zum Klonieren wurde das Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (Fa. New England Biolabs) verwendet. Mithilfe des Kits war es möglich, die gewünschte Deletion - das Fehlen von Exon 7 - in doppelsträngiger Plasmid DNA in nur wenigen Stunden zu erzeugen (New England Biolabs 2017). Zur exponentiellen Amplifikation wurden in einem ersten Schritt 12,5  $\mu$ l Q5 Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix - bestehend aus Polymerase Buffer,

dNTPs, Magnesium und einer DNA-Polymerase - jeweils  $1,25 \ \mu l \ 10 \ \mu M$  Vorwärtsprimer und Rückwärtsprimer, 1  $\mu$ l Template DNA und 9  $\mu$ l Nuklease-freies Wasser gemischt. Der Vorwärtsprimer hatte die Sequenz 5'-CTGCCCCTGTCCCAGGAG-3' und der Rückwärtsprimer 5'-CTACATCTAGGAGCAGCAGCG-3'. Die Primer wurden so konstruiert, dass sie die gewünschte Deletion flankieren. Als DNA Template wurden zwei unterschiedliche Plasmide eingesetzt: plasmid cloning deoxyribonucleic acid (pcDNA) 3.1/V5-His-TOPO (5.523 bp) und pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO (6.176 bp). Die PCR lief unter folgenden Bedingungen ab: Initiale Denaturierung (98 °C; 30 s), 25 Zyklen mit jeweils Denaturierung (98 °C; 10 s), Annealing (60 °C; 10-30 s), Polymerisation (72 °C; 20-30 s/kb) und Finaler Extension (72 °C; 2 min). Nach Ablauf des PCR Zyklus wurde 1 µl PCR Produkt zu 5 µl 2x KLD Reaction Buffer, 1 µl 10x KLD Enzyme Mix -bestehend aus Kinase, Ligase und DpnI -und 3 µl Nuklease-freien Wassers pipettiert und das Gemisch 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend zu 50 µl kompetenten E-Coli Zellen hinzugefügt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 30 s erfolgte eine erneute Inkubation für 5 min auf Eis. Nach Zugabe von 950  $\mu$ l SOC Medium wurden die E-Coli bei 37 °C 60 min gerüttelt und im Anschluss jeweils 50 - 100  $\mu$ l auf einer Agarplatte verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 3.2.23 Testen der Klonkolonien

Um zu überprüfen, welche von den gewachsenen Kolonien die Deletion tragen, wurde eine Kontroll-PCR angesetzt. Die auf dem Agar gewachsenen Kolonien wurden mittels einer Pipettenspitze gepickt und in einem Eppendorfgefäß in 50 µl Aqua dest gelöst, bei 95 °C für 5 min erhitzt und zentrifugiert (1 min; 13.000 rpm). 5  $\mu$ l Überstand wurde abgenommen und mit diesem die Kontroll-PCR angesetzt. Hierfür wurden die 5 µl Überstand als Template mit 10,8  $\mu$ l Aqua dest, 2,5  $\mu$ l Puffer, 4  $\mu$ l dNTP, 0,2  $\mu$ l Tag Polymerase und jeweils 1,25 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer. Für den pcDNA 3.1/V5-His-TOPO (5.523 bp) Vektor wurden die Primer T7 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' und BGH 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3' und für den pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO (6.176 bp) Vektor die Primer GFP 5'-CACAATCTGCCCTTTCGAAA-3' und BGH verwendet. Die Bedingungen der PCR waren die folgenden: initiale Denaturierung (95  $^{\circ}C$ ; 5 min), 35 Zyklen mit Denaturierung (95 °C; 1 min), Annealing (57 °C; 1 min) und Polymerisation (72  $^{\circ}C$ ; 1,5 min). Der letzte PCR Schritt erfolgte bei 72  $^{\circ}C$  für 7 min. Die positiv getesteten Klone, die die Deletion tragen, wurden zur Vermehrung mit 3 ml LB-Media und 3  $\mu$ l 100 mg/ml Carbenicillin in ein Bakterienröhrchen gefüllt und über Nacht auf dem Rüttler mit 200 - 225 rpm bei 37 °C inkubiert.

#### 3.2.24 Plasmid Isolation

Die über Nacht gewachsene Kultur wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und 1 min high speed zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands und Zugabe von 100  $\mu$ 1 Buffer P1

(Resuspension buffer Fa. Quiagen) wurde das Zellpellet resuspendiert und im Anschluss 100  $\mu$ l Lysepuffer/Buffer P2 (Fa.Quiagen) hinzugefügt und das Eppendorfgefäß 5-6 mal invertiert. Nach Lyse der Bakterien, der Zugabe von 150  $\mu$ l Neutralisierungslösung/Buffer P3 (Fa. Quiagen), Zentrifugation (10 min; 13.000 rpm), der Zugabe von 450  $\mu$ l 100 % Ethanol und der erneuten Zentrifugation (10 min; 13.000 rpm) wurde der Überstand entfernt und das DNA Pellet/Präzipitat mit 20  $\mu$ l H20 resuspendiert.

#### 3.2.25 Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank genommen, aufgetaut, nach Zugabe von 10 ml Medium gelöst und in Zellkulturflaschen überführt.

#### 3.2.26 Vorbereitung der Transfektion

Am Tag vor der Transfektion wurde das Medium aus den Flaschen verworfen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen im Anschluss mit 1,5 ml Accutase (Fa. Sigma) gelöst. Nach 2-3 min wurde 5 ml Medium (ohne Antibiotikum) zugegeben und die Zellen mitsamt des Mediums in ein Blue Cap überführt, zentrifugiert (4 min; 12.000 rpm) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und die Zellsuspension am Sysmex-Counter gemessen. Dazu wurde 10 ml Casyton mit 10  $\mu$ l Zellsuspension versetzt und die Zellzahl somit gemessen. In 10 cm Petrischalen wurde 10 ml Medium pipettiert und die Zellen hinzugefügt (Hek-Zellen: 2x10<sup>6</sup> Zellen/Petrischale; Cos-Zellen: 1x10<sup>6</sup> Zellen/Petrischale).

#### 3.2.27 Transfektion der Zellen

Zu 10  $\mu$ g DNA wurde serumfreies Medium DMEM High Glucose (Fa. Capricorn Scientific GmbH) hinzugefügt (Gesamtvolumen 300  $\mu$ l). Für eine 1:10 Verdünnung wurde 100  $\mu$ l SuperFect (Fa. Qiagen), für eine 1:5 Verdünnung 50  $\mu$ l SuperFect der DNA-Mediumsuspension zugefügt. Während der Inkubationszeit von 10 min wurden die Zellen vom Vortag zweimal mit PBS gewaschen und im Anschluss 3.000  $\mu$ l Zellmedium DMEM mit 10 % FCS (fetal calf dserum) und 1 % P/S (Benzylpenicillin-Procain und Dihydrostreptomycin) auf die Zellen gegeben. Die Mischung aus DNA, SuperFect, Serumfree Medium wurde auf die Platten getropft. Die Platten wurden bei 37 °C, 5 % C02 3 Stunden inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml DMEM (mit 10 % FCS und 1 % P/S) wurden die Zellen wieder in den Brutschrank gestellt. Bei den Cos Zellen wurde die Kultur nach 2 Tagen beendet. Die Zellen standen für weitere Analysen zur Verfügung. Bei den Hek Zellen wurde nach 2 Tagen das Medium gewechselt und mit Gentamicin versetzt. Die Hek Zellen wurden alle 2-3 Tage gesplittet und das Medium neu ausgewechselt.
### 3.2.28 Erstellen und Preclearen von Zellkulturlysat

Für das Zellkulturlysat wurde ein Lysepuffer - bestehend aus 2.88 ml IBP; 100  $\mu$ l Protease Inhibitor Cocktail und 30  $\mu$ l PMSF - angefertigt. 1 ml des Lysepuffers wurde auf die Petrischale pipettiert und der Puffer inklusive Zellen in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach einer 30 - minütigen Inkubationszeit auf Eis und einer darauffolgenden Zentrifugation (30 min, 4 °*C*, 13.000 rpm) konnte ein klarer Überstand abgetragen worden und in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert werden. Um das Lysat zu preclearen, wurden 100  $\mu$ l Beads mit 500  $\mu$ l IPB gewaschen. Auf die gewaschenen Beads wurden 1 ml Zellkulturlysat, 30  $\mu$ l AB-Serum und 130  $\mu$ l 100 mg/ml BSA in Aqua pipettiert. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf dem Rotator und einer Zentrifugation (1 min, 2.500 rpm) wurde der Preclear wiederholt. Es wurde erneut 30  $\mu$ l AB-Serum zugegeben, das Gemisch 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, zentrifugiert (1 min, 2.500 rpm und im Anschluss 1 min, 13.000 rpm), der Überstand abgenommen und das Lysat eingefroren (-80 °*C*).

### 3.2.29 Immunpräzipitation des Granulozytenlysats bzw. des Zellkulturlysats

Für die Immunpräzipitation wurden 50  $\mu$ l biotinmarkiertes precleartes Granulozytenlysat mit 5  $\mu$ l 1 mg/ml Antikörper bzw. 30  $\mu$ l Serum und 300  $\mu$ l Zellkulturlysat mit 5  $\mu$ g Antikörper über Nacht bei 4 °*C* auf dem Rotator inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Lysate kurz anzentrifugiert. Nach dem Waschen von 50  $\mu$ l Protein G Beads mit IPB konnten die über Nacht inkubierten Lysate zu den Beads gegeben und für 1h bei Raumtemperatur auf dem Rotator inkubiert werden. Die inkubierten Beads wurden fünfmal mit 500  $\mu$ l IPB gewaschen und im Anschluss 50  $\mu$ l 2xSDS-Probenpuffer (reduzierend bzw. nicht-reduzierend) zugegeben. Die Beads und der Probenpuffer wurden 5 min bei 95 °*C* gekocht, zentrifugiert (1 min; 2.000 rpm), der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, nochmal zentrifugiert (1 min; 13.000 rpm) und der Überstand erneut in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

### 3.2.30 Western Blot

Zwei Glasplatten wurden mit Isopropanol und einem fusselfreien Tuch gereinigt und mittels Klammer aneinander fixiert. Ein Kamm wurde eingesetzt und die Höhe des Trenngels markiert (ca. 1 cm unter dem Kamm). Für das Trenngel wurden 3,735 ml Aqua dest, 2,39 ml Lösung A, 871,5  $\mu$ l Lösung B, 70,35  $\mu$ l 10 % SDS, 9,4  $\mu$ l Temed und 234,4  $\mu$ l APS gemischt. Das Trenngel wurde bis zur Markierung zwischen die Glasplatten eingefüllt und zur Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Nach 30 min konnte das Isopropanol entfernt, das Sammelgel gegossen und der Kamm eingesetzt werden. Das Sammelgel setzte sich aus den folgenden Substanzen zusammen: 1,75 ml Aqua dest, 0,5 ml Lösung A, 312,5  $\mu$ l Lösung D, 25  $\mu$ l 10 % SDS, 7,5  $\mu$ l Temed und 93,8  $\mu$ l APS. Nach Entfernung des Kamms konnte das Gel in die Kammer mit bereits darin vorhandenem Laufpuffer Rotiphorese 10 x SDS-PAGE (Fa. Roth) eingesetzt und mit Klammern fixiert werden. Die Proben (Granulozytenlysate/Zelkulturlysate/Proteine) wurden gemeinsam mit dem Probenpuffer bzw. als fertiges Immunpräzipitat und einem Standard PageRuler<sup>™</sup> Prestained Protein Ladder (Fa.Thermoscientific Fisher) in die Taschen pipettiert. Die Laufzeit betrug 1,5 - 2 Stunden (h) bei einer Spannung von 500 V und einer Stromstärke von 15 - 20 Milliampere (mA).

Für das Blotten wurde eine Immobilon-P Membran (Fa. Merck) verwendet, die zu Beginn mit Methanol aktiviert wurde. Es wurden drei Schälchen A, B und C vorbereitet, wobei jeweils drei Filterpapiere mit Puffer A, mit Puffer B und mit Puffer C befeuchtet wurden. Die Membran und das darauf liegende Gel wurden zwischen den mit Puffer B und Puffer C getränkten Filterpapieren positioniert. Das Blotten lief für 45 min unter folgenden Bedingungen ab: 45 mA, max. Voltzahl und 8 - 10 Watt. Nach Beendigung des Blottens wurde die Membran 10 - 15 min in Aqua dest und darauffolgend 60 min in einer Lösung aus 1,5 g BSA Pulver und 100 ml ECL Puffer geblockt. Es folgte die Inkubation mit einem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C, ein Waschvorgang mit ECL Puffer und die Inkubation über 45 min mit einem Sekundärantikörper. Folgende Kombinationen aus Primär- und Sekundärantikörper fanden Verwendung: 7D8 als Primärantikörper und Donkey-Anti-Mouse (DAM) als Sekundärantikörper, V5 als Primärantikörper und Donkey-Anti-Rabbit (DAR) als Sekundärantikörper sowie GFP als Primärantikörper und DAM als Sekundärantikörper. Nach einem weiteren Waschvorgang wurde die Membran für 5 min in jeweils 2 ml beider Lösungen der Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Fa. Millipore) geschwenkt. Die Entwicklung erfolgte nach Markierung des Längenstandards mit einem Fluorezenzstift am FluorChem2 Gerät in der Dunkelkammer.

#### 3.2.31 Testen von Granulozyten und Zellkulturzellen mit verschiedenen Seren

 $3x 10^4$  Zellkulturzellen bzw. Granulozyten wurden mit 40 µ1 Serum, wie zum Beispiel AB Serum, NB2 Serum, verschiedene Anti-NB1 Seren, für 30 min bei 4 °*C* inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/BSA wurden 2 µg/ml eines sekundären Antikörpers wie Polyclonal Rabbit Anti-Human IgG/FITC auf die Zellen pipettiert. Nach einer erneuten 30 - minütigen Inkubation bei 4 °*C*, einem weiteren Waschvorgang mit 250 µl PBS/BSA und einer Zentrifugation wurden die Zellen mit 150 µl Cellfix fixiert.

### 4 Ergebnisse

## 4.1 Die CD177 Expression zeigt eine bimodale Verteilung an neutrophilen Granulozyten. Einige Personen zeigen keine CD177 Expression.

Mittels Durchflusszytometrie wurden 220 Blutspender hinsichtlich ihrer CD177 Expression untersucht. Die Untersuchungen erfolgten an Vollblut. Für diese Untersuchung wurden der monoklonale Antikörper 7D8 und als Negativkontrolle murines IgG (mIgG) eingesetzt. Unter diesen 220 Blutspendern konnten 3 als CD177 negativ identifiziert werden, was einer Häufigkeit von ca. 1,4 % entspricht. Aus den Granulozyten der 3 negativ identifizierten Spender sowie weiterer vom Labor zuvor bereits typisierten Spender wurden Lysate erstellt, DNA und RNA isoliert und durchflusszytometrische Untersuchungen mit monoklonalem Anti-CD177 (Klon 7D8), mIgG als Negativkontrolle und Anti-CD16 als Positivkontrolle durchgeführt. Es wurde ein cut off-Wert von 5 % definiert, das heißt als CD177 negativ wurden alle diejenigen bezeichnet, deren CD177 Expression unter 5 % der Negativkontrolle lag. Als positiv wurden konsekutiv diejenigen bezeichnet, die eine Fluoreszenzintensität >95 % aller Ereignisse der Negativkontrolle aufwiesen. Die durchflusszytometrische Untersuchung zeigte, dass die CD177 Expression hinsichtlich der Verteilung der einzelnen Subpopulationen deutliche Unterschiede aufweist (Abbildung 8). Die Häufigkeit der Neutrophilen-Fraktion mit CD177 Expression reichte von 21,03 % bis 90,08 %. Der MFI der CD177 exprimierenden neutrophilen Granulozyten zeigte eine Variationsbreite von 16 bis 137,32. Eine trimodale Verteilung wurde bei den CD177 positiven Spendern nicht beobachtet. Die untere Reihe (Abbildung 8) stellt eine Auswahl an CD177 negativen Spendern dar. Die CD177 Expression lag bei den CD177 negativen Spendern zwischen 0,19 % und 0,38 % und der MFI bei 15,6 - 28,27. Um das durchflusszytometrische Ergebnis bezüglich einer vorhandenen oder fehlenden CD177 Expression zu verifizieren, wurde ein Immunoblot angefertigt, der mit Anti-CD177 und GAPDH detektiert wurde (Abbildung 9). Bei den durchflusszytometrisch CD177 exprimierenden Spendern erschien das Protein im Immunoblot als Bande bei einer Größe von ca. 55 kDa (Abbildung 9). Bei den durchflusszytometrisch CD177 negativen Spendern zeigte sich nur die Positivkontrolle mit GAPDH (Abbildung 9).



Abbildung 7: Häufigkeitsverteilung CD177 positiver Granulozyten bei Personen mit CD177 Expression und bei Personen mit CD177 Null Phänotyp. Es ist eine Auswahl an durchflusszytometrischen Histogrammen von Untersuchungen an Granulozyten dargestellt, wobei die schwarze Kurve die Untersuchung mit mIgG, die rote Kurve diejenige mit Anti-7D8 und die blaue die mit Anti-CD16 repräsentiert. Y-Achse: Häufigkeit. X-Achse: Fluoreszenzintensität. Als "cut-off" zwischen positiv und negativ wurde eine Grenze bei 5 % der Negativkontrolle definiert. In der oberen Reihe sind die CD177 positiven Spender abgebildet. Es sind jeweils zwei Peaks zu sehen, die die Subpopulationen - also diejenigen Granulozyten, die CD177 auf ihrer Oberfläche tragen (rechter Peak) und die, die das Antigen nicht exprimieren (linker Peak) - darstellen. Die untere Reihe stellt CD177 negative Spender dar. Es wird sichtbar, dass die Histogramme der CD177 negativen neutrophilen Granulozyten - unabhängig davon, ob sie mit Anti-7D8 oder mit Anti-CD16 detektiert wurden - beinahe deckungsgleich sind. Als primäre Antikörper wurden 7D8, mIgG und CD16 verwendet. Als Sekundärantikörper fungierte Anti-Maus-Alexa Fluor 488. *Quelle: Eigene Darstellung.* 



Abbildung 8: Immunoblot der CD177 Expression bei CD177 positiven und CD177 negativen Spendern. Bei den CD177 exprimierenden Spendern (rechts abgebildet) erscheint eine Bande bei ca. 55 kDa. Der Immunoblot diente neben der Durchflusszytometrie als zusätzlicher Nachweis einer fehlenden CD177 Expression (links dargestellt). Bei den CD177 negativen Spendern fehlt die Bande bei 55 kDa; hier erscheint nur die Positivkontrolle mit GAPDH. Links im Bild ist der Größenstandard zu sehen. Der Immunoblot wurde mit 7D8 als Primärantikörper gegen CD177, mit donkey-anti-mouse als Sekundärantikörper und GAPDH als Negativkontrolle detektiert. *Quelle: Eigene Darstellung*.

						2 Spender, di Variante het	e hinsichtlich der c.787A>T erozygot (AT) sind
Nukleotid-	Nukleotid-	Codon	Amino-	bekannte Variante/	rs-Nummer	CD177	CD177
nummer	austausch		säure	neue Variante		positiv	positiv
-54	A>T	nicht kodierend	nicht kodierend	neu		homo	homo
-51	$\overline{A} > \overline{C}$	nicht kodierend	nicht kodierend	neu		homo	homo
-46	TTT>GAC	nicht kodierend	nicht kodierend	neu		homo	homo
43	$\overline{CCT} > \overline{ACA}$	nicht kodierend	nicht kodierend	neu		homo	homo
-40	G>delG	nicht kodierend	nicht kodierend	neu		homo	homo wild
- 7	$\overline{G} > \overline{C} = -$	$\overline{GCG} > \overline{CCG}$	A3R	bekannt	rs45441892	homo wild	homo wild
114	- <u>G</u> >A	CTG>CTA	- <u>L</u> 38L	bekannt	rs45571738	homo wild	homo wild
178	- A>T	ATG>TTG -		neu		homo wild	homo wild
200		CAA>CGA	_ Q67R	neu		homo wild	homo wild
551	- T>G	$\overline{GTT} > \overline{GGT}$ $\overline{GTT}$		bekannt	rs12981714	homo	homo
610		$\overline{GAT} > \overline{AAT}$	D204N	bekannt	rs12980412	homo	homo
614		ATG>AGG	M205R	bekannt	rs12981771	homo	homo
751	- <u>C</u> > <u>A</u>	CTA>ATA		bekannt	rs10425835	hetero	homo wild
782	$\overline{G} > \overline{C}$ $\overline{C}$	$\overline{G}G\overline{G} > \overline{G}C\overline{G}$	G261A	bekannt (Pseudogen)	rs200660811	hetero	hetero
786		$\overline{ACA} > \overline{ACC}$	T262T	bekannt (Pseudogen)	rs587670082	hetero	hetero
787	A>T	AAA>TAA	K263X	Li Mutation	rs201821720	hetero	hetero
790	G>A	GGC>AGC	G264S	bekannt (Pseudogen)	rs1555741369	hetero	hetero
799		$\overline{ACT} > \overline{GCT}$	T267A	bekannt (Pseudogen)	rs587684898	hetero	hetero
- 939	- <del>C</del> > <del>T</del>	$\overline{CCT} > \overline{CCC}$	- <u>P</u> 313P	bekannt/neu		homo wild	homo wild
1042		$\overline{GCC} > \overline{ACC}$		bekannt	rs17856829	homo wild	homo wild
1291	G>A	GGA>AGA	G431R	bekannt	rs78718189	homo wild	homo wild

### 4.2 Ergebnisse des Next Generation Sequencing.

						2 Spender, di homozygot fi	e an Position c.787 ür den Wildtyp (AA) sind
Nukleotid-	Nukleotid-	Codon	Amino-	bekannte Variante/	rs-Nummer	CD177	CD177
nummer	austausch		säure	neue Variante		positiv	positiv
-54	A>T	nicht kodierend	nicht kodierend	neu		homo	homo
-51	$\overline{A} > \overline{C} = -$	nicht kodierend	nicht kodierend	neu		homo	homo
-46	TTT>GAC	nicht kodierend	nicht kodierend	neu – – – – – – – –		homo	homo
43	$\overline{CCT} > \overline{ACA}$	nicht kodierend	nicht kodierend	neu		homo	homo wild
-40	G>delG	nicht kodierend	nicht kodierend	neu		homo wild	homo
- 7	- <u>G</u> > <u>C</u>	$\overline{GCG} > \overline{CCG}$	- <u>A</u> 3 <u>R</u>	bekannt	rs45441892	homo wild	hetero
114	$\overline{G} > \overline{A}$	CTG>CTA		bekannt	rs45571738	homo wild	homo wild
178	$\overline{A} > \overline{T}$ $\overline{T}$	ATG>TTG	M60L	neu		homo wild	homo wild
- 200	- Ā>G	CAA>CGA	- Q67R	neu – – – – – – – –		homo wild	homo wild
551	T>G	GTT>GGT		bekannt	rs12981714	homo	homo
610	$\overline{G} > \overline{A}$	GAT>AAT	D204N	bekannt	rs12980412	homo	homo
614		ATG>AGG	M205R	bekannt	rs12981771	homo	homo
751	- C > A	CTA>ATA		bekannt	rs10425835	hetero	homo
782	$\overline{G} > \overline{C}$ $\overline{C}$	GGG>GCG	G261A	bekannt (Pseudogen)	rs200660811	homo wild	homo wild
786	- Ā>Ē	$\overline{ACA} > \overline{ACC}$	T262T	bekannt (Pseudogen)	rs587670082	homo wild	homo wild
787	A>T	>TAA	K263X	Li Mutation	rs201821720	wild	wild
790	G>¿A	GGC>AGC	G264S	bekannt (Pseudogen)	rs1555741369	homo wild	homo wild
799		$\overline{ACT} > \overline{GCT}$	T267A	bekannt (Pseudogen)	rs587684898	homo wild	homo wild
939	- <del>C</del> >T	$\overline{CCT} > \overline{CCC}$	P313P	bekannt/neu		homo wild	homo wild
1042	$\overline{G} > \overline{A}$	$\overline{GCC} > \overline{ACC}$	A348T	bekannt	rs17856829	hetero	homo wild
1291	G>A	GGA>AGA	G431R	bekannt	rs78718189	homo wild	homo wild

Tabelle 8: Übersicht über die Ergebnisse der Resequenzierung des CD177 Gens mit allen gefundenen Varianten in den Exonen und in dem Bereich vor Exon 1, der zugehörigen Nukleotidnummer und Aminosäure. In der roten Zeile ist die von Li et al. publizierte c.787A>T Variante zu erkennen. Gelb markiert ist die in der hier vorliegenden Arbeit neu gefundene c.1291G>A Variante. Die in diesen Tabellen sichtbaren CD177 positiven Spender wiesen alle die c.1291G>A Variante nicht auf. "homo" = hinsichtlich der Variante homozygot; "homo wild" = auf beiden Allelen den Wildtyp tragend; "hetero" = hinsichtlich der Variante heterozygot. **Oben:** Es wurden 2 hinsichtlich der c.787A>T Variante heterozygote durchflusszytometrisch CD177 positive Proben untersucht (hellrot hinterlegt). **Unten:** Es wurden 2 hinsichtlich der c.787A>T Variante für den Wildtyp homozygote durchflusszytometrisch CD177 negative Proben untersucht (hellrot hinterlegt). *Quelle: Eigene Darstellung*.

						3 Spender, Variante c.'	welche hinsic 787A>T hete	htlich der rozygot (AT) sind
Nukleotid-	Nukleotid-	Codon	Amino-	bekannte Variante/	rs-Nummer	CD177	CD177	CD177
nummer	austausch		säure	neue Variante		negativ	negativ	negativ
-54	A>T	nicht kodierend	nicht kodierend	neu		homo	homo	homo
-51	Ā>C	nicht kodierend	nicht kodierend	neu		homo	homo	homo
-46	TTT>GAC	nicht kodierend	nicht kodierend	neu		homo	homo	homo
-43	CCT>ACA	nicht kodierend	nicht kodierend	neu		homo	homo	homo wild
-40	G>delG	nicht kodierend	nicht kodierend	neu		homo	homo	homo wild
7	G>C	GCG>CCG	A3R	bekannt	rs45441892	hetero	hetero	hetero
114	G>A	CTG>CTA	L38L	bekannt	rs45571738	homo wild	hetero	homo wild
178	Ā>T	ATG>TTG	M60L	neu		homo wild	homo wild	hetero
200	Ā>G	ĊĀĀ-ĊĠĀ	Q67R	neu		hetero	homo wild	hetero
551	$\overline{T} > \overline{G}$	GTT>GGT	V184G	bekannt	rs12981714	homo	homo	hetero
610	G>A	GAT>AAT	D204N	bekannt	rs12980412	homo	homo	hetero
614	$\overline{T} > \overline{G}$	ATG>AGG	M205R	bekannt	rs12981771	homo	homo	hetero
751	C>A	CTA>ATA	L251I	bekannt	rs10425835	hetero	hetero	hetero
782	- G>C	GGG>GCG	G261A	bekannt (Pseudogen)	rs200660811	hetero	hetero	hetero
786	Ā>Ē	ĀĊĀ>ĀĊĊ	T262T	bekannt (Pseudogen)	rs587670082	hetero	hetero	hetero
787	A>T	AAA>TAA	K263X	Li Mutation	rs201821720	hetero	hetero	hetero
790	G>A	GGC>AGC	G264S	bekannt (Pseudogen)	rs1555741369	hetero	hetero	hetero
799	Ā-Ā-	ĀCT>GCT	T267A	bekannt (Pseudogen)	rs587684898	hetero	hetero	hetero
939	$\bar{C} > \bar{T}$	CCT>CCC	P313P	bekannt/neu		homo wild	homo wild	homo wild
1042	$\bar{G} > \bar{A}$	- GCC-ACC -	Ā348T	bekannt	rs17856829	homo wild	homo wild	homo wild
1291	G>A	GGA>AGA	G431R	bekannt	rs78718189	hetero	hetero	hetero

Tabelle 9: Übersicht über Ergebnisse der Resequenzierung des CD177 Gens mit allen gefundenen Varianten in den Exonen und in dem Bereich vor Exon 1, der zugehörigen Nukleotidnummer und Aminosäure. Es wurden 3 hinsichtlich der c.787A>T Variante heterozygote durchflusszytometrisch CD177 negative Proben untersucht (blau hinterlegt). In der roten Zeile ist die von Li et al. publizierte c.787A>T Variante zu erkennen. Gelb markiert ist die in der hier vorliegenden Arbeit neu gefundene c.1291G>A Variante. Alle CD177 negativen Spender, welche heterozygot für c.787A>T sind, weisen ebenfalls eine Heterozygotie gegenüber c.1291G>A auf. "homo" = hinsichtlich der Variante homozygot; "homo wild" = auf beiden Allelen den Wildtyp tragend; "hetero" = hinsichtlich der Variante heterozygot. *Quelle: Eigene Darstellung*.

						5 Spender, d für die Varia	ie an Position nte (TT) sind	c.787 homoz	ygot	
Nukleotid-	Nukleotid-	Codon	Amino-	bekannte Variante/	rs-Nummer	CD177	CD177	CD177	CD177	CD177
nummer	austausch		säure	neue Variante		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
-54	A>T	n. k.	n. k.	neu		homo	homo	homo	homo	homo
-51	A>C	n. k.	n. k.	neu		homo	homo	homo	homo	homo
-46	TTT>GAC	_n. k	n. k.	neu		homo	homo	homo	homo	homo
-43	CCT>ACA	n. k	n. k.	neu		homo wild	homo	homo	homo wild	homo
-40	G>delG	n. k.	n. k.	neu		homo wild	homo	homo	homo wild	homo wild
7	G>C	GCG>CCG	A3R	bekannt	rs45441892	homo	homo	homo wild	homo wild	homo wild
114	G>A	CTG>CTĀ	L38L	bekannt	rs45571738	homo wild	homo wild	homo	homo wild	homo wild
178	A>T	ĀTG>TTG	M60L	neu		homo wild	homo wild	homo wild	homo wild	homo wild
200	A>G	CAA>CGA	$\overline{Q67R}$	neu		homo wild	homo wild	homo wild	homo	hetero
551	$T > \overline{G}$	GTT>GGT	V184G	bekannt	rs12981714	homo	homo wild	homo	homo	homo
610	G>A	GAT>AAT	D204N	bekannt	rs12980412	homo	homo wild	homo	homo	homo
614	T>G	ĀTG>ĀGG	M205R	bekannt	rs12981771	homo	homo wild	homo	homo	homo
751	C>A	CTA>ATA	L251I	bekannt	rs10425835	homo wild	homo wild	homo wild	homo wild	homo wild
782	G>C	GGG>GCG	G261A	bekannt (Pseudogen)	rs200660811	homo	homo	homo	homo	homo
786	A>C	ACA>ACC	T262T	bekannt (Pseudogen)	rs587670082	homo	homo	homo	homo	homo
787	A>T	AAA>TAA	K263X	Li Mutation	rs201821720	homo	homo	homo	homo	homo
790	G>A	GGC>AGC	G264S	bekannt (Pseudogen)	rs1555741369	homo	homo	homo	homo	homo
799	A>G	ĀCT>GCT	T267A	bekannt (Pseudogen)	rs587684898	homo	homo	homo	homo	homo
939	$\overline{C} > \overline{T}$	$\overline{C}\overline{C}\overline{T}$	P313P	bekannt/neu		homo	homo wild	homo wild	homo wild	homo wild
1042	G>A	<u>GCC</u> >ACC	A348T	bekannt	rs17856829	homo wild	homo wild	homo wild	homo wild	homo wild
1291	G>A	GGA>AGA	G431R	bekannt	rs78718189	homo wild	homo wild	homo wild	homo wild	homo wild

Tabelle 10: Übersicht über die Ergebnisse der Resequenzierung des CD177 Gens mit allen gefundenen Varianten in den Exonen und in dem Bereich vor Exon 1, der zugehörigen Nukleotidnummer und Aminosäure. Es wurden 5 hinsichtlich der c.787A>T Variante homozygote durchflusszytometrisch CD177 negative Proben untersucht (blau hinterlegt). In der roten Zeile ist die von Li et al. publizierte c.787A>T Variante zu erkennen. Gelb markiert ist die in der hier vorliegenden Arbeit neu gefundene c.1291G>A Variante. Von den CD177 negativen hinsichtlich der c.787A>T Variante homozygoten Spender wies keiner die Variante c.1291G>A auf. "n. k." = nicht kodierend; "homo" = hinsichtlich der Variante homozygot; "homo wild" = auf beiden Allelen den Wildtyp tragend; "hetero" = hinsichtlich der Variante heterozygot. *Quelle: Eigene Darstellung*.

4.3 Homozygotie für die Variante CD177 c.787A>T ist mit dem CD177 Null Phänotyp assoziiert. Die Variante CD177 c.787T kodiert für ein Stop-Codon in Exon 7.



Abbildung 9: **Agarosegel des CD177 Gens.** Das Bild der Agarosegelelektrophorese zeigt auf der linken Seite das Long-Range-PCR-Produkt und auf der rechten Seite den Größenstandard. Die Primer amplifizieren die gesamte kodierende Region des CD177 Gens (von Exon 1 bis Exon 9), was einer Größe von 8729 bp entspricht. Das CD177 Gen wurde mittels Long-Range-PCR amplifiziert mit dem Ziel, das CD177 Gen und nicht das Pseudogen zu vervielfältigen. Das CD177 Pseudogen besteht aus Exon 4 bis Exon 9 in reverser Orientierung. *Quelle: Eigene Darstellung*.

12 DNA Proben wurden mittels Long-Range-PCR mit Primern, welche die Region zwischen Exon 1 und Exon 9 flankieren, amplifiziert. Ein kleiner Teil des PCR- Produktes wurde zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen (Abbildung 9). Der andere Teil des PCR-Produktes wurde aufgereinigt, eine Qubit-Messung durchgeführt, im NGS-Gerät sequenziert und mittels des Programmes "Genious" analysiert. Wie in den Tabellen sichtbar ist, wurden acht CD177 negative und vier CD177 positive Spender sequenziert. Von den acht CD177 negativen Spender waren hinsichtlich der Variante c.787A>T 5 homozygot (TT) und drei heterozygot (AT). Unter den CD177 positiven Spendern wurde keine Homozygotie hinsichtlich dieser Variante beobachtet. Die Variante c.787A>T wandelt das Codon AAA (Lysin, K) in das Stop-Codon TAA um (ochre) (Abbildung 10).



Abbildung 10: Schematische Darstellung der Konsequenzen der Homozygotie für c.787A>T. Das Vorhandensein von 2 T Allelen an Position c.787 führt zu einem Stop-Codon auf mRNA Ebene und damit zum Proteinsyntheseabbruch an Position 263. Alle in dieser Kohorte untersuchten Personen, die diese Homozygotie (TT) hinsichtlich c.787A>T aufwiesen, waren CD177 defizient. *Quelle: Eigene Darstellung*.

### 4.4 Die Variante CD177 c.787T ist durch Austausch von DNA Sequenzen mit dem CD177 Pseudogen entstanden.



Abbildung 11: **A: Die Pseudogenhypothese kann bestätigt werden. B: Das CD177 Gen und das Pseudogen.** Dargestellt ist die Gensequenz rund um die c.787A>T Variante. Bei der Probe, welche heterozygot für die c.787A>T Variante ist, sind die Veränderungen durch Konversion von Exon 7 des Pseudogens in das Gen durch die Buchstaben unterhalb der Gensequenz dargestellt. *Quelle: Eigene Darstellung erstellt mittels Chromas 2021.* B: Sichtbar ist die Sequenz des CD177 Gens und des Pseudogens. Durch die Pfeile markiert sind die Varianten, die durch die Genkonversion entstehen. *Quelle: Eigene Darstellung angelehnt an Wu et al. 2016.* 

Um zu überprüfen, ob das T-Allel der c.787A>T Variante tatsächlich wie in der Einleitung beschrieben durch Konversion aus dem Pseudogen entstanden ist, wurden die Sequenz des CD177 Gens rund um die c.787A>T Variante und die Sequenz des Pseudogens miteinander verglichen. Die unmittelbar an c.787A>T angrenzenden Varianten c.782G>C, c.786A>C, c.790G>A und c.799A>G (Tabellen 8 - 10, Abbildung 11 A Probe AT und Abbildung 11 B) wurden in der in dieser Studie untersuchten Kohorte gefunden. Das heißt, die Pseudogenkonversionshypothese – also die Konversion von Exon 7 inklusive c.787A>T Variante des Pseudogens in das CD177 Gen mit daraus resultierendem CD177 negativen Phänotyp – kann in dieser Studie bestätigt werden.

### 4.5 Einige Personen mit dem CD177 Null Phänotyp sind heterozygot für das c.787T Allel. Auf dem zweiten Chromosom liegt bei allen Personen eine andere Variante: CD177 c.1291G>A.

Von den acht durchflusszytometrisch negativen Spendern waren fünf bezüglich der c.787A>T Variante homozygot und drei heterozygot (Tabellen 8 - 10). Bei den drei CD177 negativen Spendern, die hinsichtlich der c.787A>T Variante heterozygot waren, konnte zusätzlich eine neue Variante identifiziert werden: c.1291GGA>AGA (Tabelle 9).



Abbildung 12: Chromatogramme der 3 möglichen SNP c.1291G>A Genotypen (homozygot 1291 A/A, heterozygot 1291 A/G und homozygot 1291 G/G). Im oberen Bereich der Abbildung ist das CD177 Gen dargestellt, welches aus 9 Exonen besteht. Im unteren Bereich der Abbildung erkennt man die Gensequenz rund um die Variante c.1291G>A. Der CD177 SNP c.1291G>A ist für die 431G zu 431R Substitution verantwortlich (sichtbar in der ersten und zweiten Zeile). Der CD177 SNP c.1291G>A befindet sich innerhalb des hydrophoben Segmentes des GPI Signals. *Quelle: Wu et al. 2019*.

CD177 negative Kohor	rte (n=8)	CD177 positive Kohort	e (n=4)
Genotypen:		Genotypen: :	
787T-1291G	5 (62.5)	787A-1291G	2 (50.0)
787T-1291G (TG/TG)		787T-1291G (AG/TG)	
787A-1291A/	3 (37.5)	787A-1291G/	2 (50.0)
787T-1291G (AA/TG)		787A-1291G (AG/AG)	

Tabelle 11: Häufigkeiten der Genotypen in absoluten Zahlen und in Prozent (in Klammern) der in dieser Studie untersuchten NGS Kohorte. Links sind die CD177 negativen Spender und rechts die CD177 exprimierenden Spender abgebildet. Es sind die Genotypen in absoluten und relativen Zahlen dargestellt. Es wird sichtbar, dass bei den CD177 negativen Spendern die Allelkombination c.[787T;1291G] und bei den CD177 positiven Spendern die Kombination c.[787A;1291G] am häufigsten auftritt. Alle drei CD177 negativen Spender, welche an Position c.787 ein A-Allel aufweisen, tragen auf dem gleichen Allel die Variante c.1291G>A. *Quelle: Eigene Darstellung.* 

TG/TG konnte in der mittels NGS untersuchten Kohorte unter den CD177 negativen Spendern als häufigste Allelkombination identifiziert werden (0.81) (Tabelle 11). Unter den CD177 exprimierenden Spendern zeigten sich sowohl die Allelkombinationen AG/TG als auch AG/AG.

### 4.6 Die Variante CD177 c.1291A führt zu einer Störung der GPI Verankerung.

Um zu überprüfen, ob die Variante c.1291G>A zu einer Änderung der GPI Verankerung führt, wurde die Aminosäuresequenz des Wildtyps sowie der Variante mit einem Algorithmus für die Vorhersage von GPI Ankersequenzen (Eisenhaber et al. 1998; Eisenhaber et al. 1999; Sunyaev 1999; Eisenhaber et al. 2000; Eisenhaber et al. 2004) untersucht (Tabelle 12). Für die Wildtypsequenz wurde eine GPI Modifikationsstelle identifiziert (Tabelle 12). Als Omega-Position - als Position, an welche der GPI Anker an das Protein angebracht wird - benennt das Programm die Position 408 (Tabelle 12). Für die Variante c.1291G>A mit konsekutivem Aminosäureaustausch wurde keine potentielle GPI Modifikationsstelle gefunden (Tabelle 12).

	Wildtyp	Variante c.1291G>A
Aminosäure-	MSAVLLLALLGFILPLPG	MSAVLLLALLGFILPLPG
sequenz	VQALLCQFGTVQHVWK	VQALLCQFGTVQHVWK
	VSDLPRQWTPKNTSCDS	VSDLPRQWTPKNTSCDS
	GLGCQDTLMLIESGPQVS	GLGCQDTLMLIESGPQVS
	LVLSKGCTEAKDQEPRVT	LVLSKGCTEAKDQEPRVT
	EHRMGPGLSLISYTFVCR	EHRMGPGLSLISYTFVCR
	QEDFCNNLVNSLPLWAP	QEDFCNNLVNSLPLWAP
	QPPADPGSLRCPVCLSME	QPPADPGSLRCPVCLSME
	GCLEGTTEEICPKGTTHC	GCLEGTTEEICPKGTTHC
	YDGLLRLRGGGIFSNLRV	YDGLLRLRGGGIFSNLRV
	QGCMPQPVCNLLNGTQEI	QGCMPQPVCNLLNGTQEI
	GPVGMTENCDMKDFLTC	GPVGMTENCDMKDFLTC
	HRGTTIMTHGNLAQEPTD	HRGTTIMTHGNLAQEPTD
	WTTSNTEMCEVGQVCQE	WTTSNTEMCEVGQVCQE
	TLLLLDVGLTSTLVGTKG	TLLLLDVGLTSTLVGTKG
	CSTVGAQNSQKTTIHSAP	CSTVGAQNSQKTTIHSAP
	PGVLVASYTHFCSSDLCN	PGVLVASYTHFCSSDLCN
	SASSSSVLLNSLPPQAAPV	SASSSSVLLNSLPPQAAPV
	PGDRQCPTCVQPLGTCSS	PGDRQCPTCVQPLGTCSS
	GSPRMTCPRGATHCYDG	GSPRMTCPRGATHCYDG
	YIHLSGGGLSTKMSIQGC	YIHLSGGGLSTKMSIQGC
	VAQPSSFLLNHTRQIGIFS	VAQPSSFLLNHTRQIGIFS
	AREKRDVQPPASQHEG <mark>G</mark>	AREKRDVQPPASQHEGG
	GAEGLESLTWGVGLALA	GAEGLESLTWGVGLALA
	PALWWGVVCPSC	PALWWRVVCPSC
	Eine mögliche GPI Modifikations-	Es wurde keine potenzielle GPI
	stelle wurde gefunden.	Modifikationsstelle gefunden.
Sequenz-	408	
position		
der Omega-		
Stelle:		
Punktzahl	$5.50 \text{ (P-Wert} = 6.21 \times 10-4)$	
der besten		
Seite		

Tabelle 12: Bioinformatorische Analyse der GPI Verankerung des CD177 Wildtyps und der Variante c.1291G>A. Oben links ist die Aminosäuresequenz des CD177 Wildtyps (Isoform 1) und rechts die Aminosäuresequenz der Variante c.1291G>A zu erkennen. Die bioinformatische Analyse zeigt, dass für den Wildtyp eine mögliche GPI Modifikationsstelle an Aminosäureposition 408 gefunden wurde, wohingegen für die Sequenz der Variante c.1291G>A keine potenzielle GPI Modifikationsstelle detektiert werden konnte. Der rote Buchstabe innerhalb der Aminosäuresequenz entspricht der Aminosäure, die durch den Wildtyp (links) und die Variante (rechts) kodiert wird. Der blaue Buchstabe innerhalb der Aminosäuresequenz (links) markiert die Sequenzposition der Omegaposition. *Quelle: Eigene Darstellung erstellt mittels big-PI Predictor GPI Modification Site Prediction angelehnt an Eisenhaber et al. 1998; Eisenhaber et al. 1999; Sunyaev 1999; Eisenhaber et al. 2000.* 

# 4.7 Die Variante CD177 c.787T ist mit alternativem mRNA Splicing assoziiert.

Das CD177 Gen, welches für ein neutrophilenspezifisches Antigen kodiert, gehört zur Ly6 Familie. Die Ly6 Familie ist dafür bekannt, dass sie durch alternative Splicing Mechanismen unterschiedliche Splicing-Varianten des gleichen Proteins kodiert (Mallya et al. 2002). Um neue Splicing-Varianten von CD177 zu identifizieren, wurde die mRNA des CD177 Gens mittels PCR amplifiziert und das Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Primer der PCR flankierten die Region von Exon 1 bis Exon 9. Nach Auftrennung des mRNA-PCR Produktes wurden zwei Banden bzw. zwei Transkripte im Gel mit einer Länge von ca. 1400 und 1200 Basenpaaren sichtbar. Die PCR-Banden wurden ausgeschnitten und sequenziert (Abbildung 13). Das neue CD177 Transkript, bei welchem Exon 7 auf mRNA Level fehlt, ist etwas kürzer (1125bp) als das CD177 PCR Produkt mit voller Länge (Abbildung 13) und entspricht dementsprechend der neuen Splicing-Variante (Isoform 5 bzw. IsoformdelEx7).

Die untersuchten Spender mit Isoform 5 wiesen alle die c.787T (entspricht der Position auf DNA Ebene) Variante auf, was andeutet, dass das Fehlen von Exon 7 mit diesem Polymorphismus bzw. dem Vorhandensein eines T-Allels auf DNA-Ebene assoziiert sein könnte. Alternatives Splicing wird durch Proteine der SR-Familie (SR = Ser/Arg-reich) reguliert, die an Kontrollsequenzen auf der RNA binden (Graveley 2000). Ein Vorhersagealgorithmus (Wang et al. 2006), welcher nach alternativen *splicing sites* sucht, identifizierte c.787T als Variante (entsprechend 895 in Tabelle 13), die eine *splicing site* verändert, konsekutiv aus einem *"unclassified donor"* an Position c.777 ein *"constitutive donor"* macht und damit zum alternativen Splicing führen kann. Die Software unterscheidet zwischen *"constitutive exons"* = Exone, welche am normalen Splicing beteiligt sind; *"skipped exons"* = Exone, welche ausnahmsweise nicht am Splicing beteiligt sind; *"cryptic exons"* = Exone, welche ausnahmsweise am Splicing beteiligt sind; *"Exon isoforms"* = verlängerte oder trunkierte Exonisoformen, welche durch eine alternative *splicing site* bedingt sind (Wang et al. 2006).

	GACTCACATC	AACCCTGGTGG	GG	GACTCACATC	AACCCTGGTGG	GG	
	ACAAAA GGC	TGCAGCACTGTT		ACATAA GGCTGCAGCACTGTT			
	GGGGCTCAAA	ATTCCCAGAAGA	4	GGGGCTCAAA	ATTCCCAGAAGA	A	
	CCACCATCCAC	CTCAGCCCCTCC	Т	CCACCATCCAC	CTCAGCCCCTCC	Г	
	GGGGTGCTTG	TGGCCTCCTATA		GGGGTGCTTG	TGGCCTCCTATA		
	CCCACTTCTGC	CTCCTCGGACCT	GT	CCCACTTCTGC	CTCCTCGGACCT	GT	
	GCAATAGTGC	CAGCAGCAGCAG	GCG	GCAATAGTGCCAGCAGCAGCAGCG			
	TTCTGCTGAAG	CTCCCTCCCTCC	ГСААG	TTCTGCTGAAG	CTCCCTCCCTCCT	ГCAAG	
Position	Vermutliche	Reihen-	Ergebnis	Vermutliche	Reihen-	Ergebnis	
(bp)	Spleißstelle	folge	_	Spleißstelle	folge	-	
860	Alt. isoform/	cccagcccag	2.796	Alt. isoform/	cccagcccag	2.796	
	cryptic acceptor	CTTTCCCTCT		cryptic acceptor	CTTTCCCTCT		
879	Constitutive	tcaccctcagG	9.922	Constitutive	tcaccctcagG	9.922	
	acceptor	ACTCACATC		acceptor	ACTCACATC		
895	unclassified	ATCAACCCTG	8.773	Constitutive	ATCAACCCTG	9.075	
	donor			1			
	donor	giggggacaa		donor	gtggggacat		
960	Alt. isoform/	atccactcag	2.870	Alt. isoform/	atccactcag	2.87	
960	Alt. isoform/ cryptic acceptor	atccactcag CCCCTCCTGG	2.870	Alt. isoform/ cryptic acceptor	atccactcag CCCCTCCTGG	2.87	
960 - <u>1064</u>	Alt. isoform/ cryptic acceptor Constitutive	atccactcag CCCCTCCTGG CCTCCTCAAG	2.870 - 12.476	Alt. isoform/ cryptic acceptor Constitutive	atccactcag CCCCTCCTGG CCTCCTCAAG	2.87 -12.476	

Tabelle 13: **Ergebnis der bioinformatischen Analyse möglicher** *splicing sites* **im Bereich von Exon 7.** Oben in der Abbildung ist die Nukleotidsequenz von Exon 7 sichtbar. Der rote Buchstabe innerhalb der Sequenz markiert den Austausch von c.787A (links) zu c.787T (rechts). Durch diesen Austausch wird aus einem unclassified donor an Position c.777 ein constitutive donor (Position 895, welche grün hinterlegt ist, entspricht Position c.777). Das heißt, die Variante c.787A>T induziert alternatives Splicing. *Quelle: Eigene Darstellung erstellt mittels Alternative Splice Site Predictor angelehnt an Wang et al. 2006*. Die Proteinsequenz der Isoform 5 besteht aus 375 Aminosäuren mit 25 Cysteinen (Abbildung 15 und Abbildung 16). Die ungerade Anzahl an Cysteinen bzw. das eine freie Cystein, das keine Disulfidbrücke bildet, deutet an, dass die Isoform immunogen sein könnte. Das heißt, dass bei Exposition des für die Isoform negativen Individuums eine Immunantwort und die Produktion von Alloantikörpern gegen diese Isoform möglich sein könnte. Die neu entdeckte Isoform weist eine GPI Verankerung auf (blaue GPI Sequenz auf Abbildung 15).



Abbildung 13: **Agarosegel einer Splicing-Variante von CD177.** Zu erkennen ist das Agarosegel einer PCR mit CD177 positiven und CD177 negativen Spendern auf mRNA/cDNA-Level. Bei den CD177 positiven Spendern sind zwei Banden sichtbar. Die kürzere Bande weist eine Länge von 1125 bp auf. Nach dem Sequenzieren zeigte sich, dass die kürzere Bande eine Splicing-Variante kodiert, welcher Exon 7 komplett fehlt. Legende: "-": CD177 negativer Spender, "+": CD177 positiver Spender, "K": Kontrolle, "S": Standard, "bp": Basenpaare. *Quelle: Eigene Darstellung*.



Abbildung 14: **Ausschnitt aus der mRNA Sequenz des CD177 Gens.** Die obere Zeile zeigt die mRNA-Sequenz des CD177 Gens in voller Länge (CD177 Isoform 1) am Übergang von Exon 6 zu Exon 7. In der unteren Reihe ist die neu identifizierte Isoform (CD177delEx7) mit Fehlen von Exon 7 und damit direktem Übergang von Exon 6 zu Exon 8 dargestellt. *Quelle: Eigene Darstellung erstellt mittels Chromas 2021*. MSAVLLLALLGFILPLPGVQALLCQFGTVQHVWKVSDLPRQWTPKNTSCDSGLGC QDTLMLIESGPQVSLVLSKGCTEAKDQEPRVTEHRMGPGLSLISYTFVCRQEDFCN NLVNSLPLWAPQPPADPGSLRCPVCLSMEGCLEGTTEEICPKGTTHCYDGLLRLRG GGIFSNLRVQGCMPQPGCNLLNGTQEIGPVGMTENCNRKDFLTCHRGTTIMTHGN LAQEPTDWTTSNTEMCEVGQVCQETLLLLDVGLTSTLVGTKGCSTVGAQNSQKTTI HSAPPGVLVASYTHFCSSDLCNSASSSSVLLNSLPPQAAPVPGDRQCPTCVQPLG TCSSGSPRMTCPRGATHCYDGYIHLSGGGLSTKMSIQGCVAQPSSFLLNHTRQIGI FSAREKRDVQPPASQHEGCGAEGLESLTWGVGLALAPALWWGVVCPSC

Abbildung 15: Aminosäuresequenz der neu identifizierten Isoform CD177delEx7. Das translatierte Protein umfasst 437 Aminosäuren mit 28 Cysteinen. Die Proteinsequenz der Isoform CD177delEx7 besteht aus 375 Aminosäuren mit 25 Cysteinen. Legende: "rot": Exon 7 (Sequenz, die der neuen Isoform durch Splicing fehlt), "blau": GPI Anker-Sequenz. *Quelle: Eigene Darstellung angelehnt an National Center for Biotechnology Information 2021.* 

701	BYRDYRYR RYDVYR HYVK KR	200
665	ACTTGGCTGAAGAACCCACTGATTGGACCACATCGAATACCGAGATGTGCGAGGTGGGGC	780
222		241
222	N-L-A-Q-E-F-I-D-W-I-& S-N-I-E-M-C-E-V-G-	241
781		840
725		784
242		261
	* , ; <b>*</b> = 1 = # # # # = ; ; ; = 1 = ; ; ;	201
	**	
841	CAAAAGCCTGCAGCACTGTTGGGGCTCAAAATTCCCAGAAGACCACCATCCACTCAGCCC	900
785	CAAAAGGCTGCAGCACTGTTGGGGCTCAAAATTCCCAGAAGACCACCATCCACTCAGCCC	844
262	TKGCSTVGAQNSQKT <u>T</u> IHSA	281
	* YR	
901	CTCCTGGGGTGCTTG GGCCTCCTATACCCACTTCTGCTCCTCGGACCTGTGCAATAGTG	960
845	CTCCTGGGGTGCTTGTGGCCTCCTATACCCACTTCTGCTCCTCGGACCTGTGCAATAGTG	904
282	PPGVLVASYTHFCSSDLCNS	301
	<u>*** MY XM YXX*W RR</u>	
961	COACCAGCAGCAGCGTTCTGCTGAACTCCCTCCTCAAGCTGCCCCCCAGGAG	1020
905	CCAGCAGCAGCAGCGTTCTGCTGAACTCCCTCCTCCTCAAGCTGCCCCTGTCCCAGGAG	964
302	AS <u>S</u> - <u>S</u> -VL- <u>L</u> -N-S- <u>L-P-</u> <u>P</u> - <u>Q</u> - <u>A-A</u> - <u>P-V-</u> P- <u>G</u> -	321
	<u>RYR Y M* R MY R Y R S</u> MW Y Y**	
1021	ACCGCCAGTGTCCTACCTGTGTGCAGCCCCTTGGAACCTGTTCAAGTGG <mark>CT</mark> CCCCCC <mark>CGA</mark> A	1080
965	ACCGGCAGTGTCCTACCTGTGTGCAGCCCCTTGGAACCTGTTCAAGTGGCTCCCCCCGAA	1024
322	DRQCPTCVQPLGTCSSGSPR	341
	M * RYR Y Y K W	
1081	TGACCTGCCCAGGGGCGCCACTCATTGTTATGATGGGTACATTCATCTCTCAGGAGGTG	1140
1025	TGACCTGCCCCAGGGGGCGCCACTCATTGTTATGATGGGTACATTCATCTCTCAGGAGGTG	1084
342	MT-CP-R-G-A-T-H-C-Y-D-G-Y-I-H-L-S-G-G-G-	361

Abbildung 16: Ausschnitt der mRNA- und Aminosäuresequenz des CD177 Gens. Die erste Zeile zeigt die komplette mRNA Sequenz; die zweite Zeile die mRNA Sequenz beginnend ab dem ATG Triplet, welches für Methionin kodiert und die dritte Zeile die Aminosäuren, welche durch Translation entstehen. Blau hinterlegt in der ersten Zeile ist Exon 7. Die vereinzelten blauen Buchstaben oberhalb der ersten Zeile repräsentieren bekannte SNPs. *Quelle: Eigene Darstellung erstellt mittels Ensembl Genome Browser (Howe et al. 2021).* 



### 4.8 Ein CD177delEx7 Konstrukt wird in HEK-Zellen exprimiert.

Abbildung 17: **Agarosegel der ortsspezifischen Mutagenese.** Die Plasmide wurden mittels PCR amplifiziert, um zu überprüfen, ob die Transfektion funktioniert hat. Vorwärtsprimer Vp5 und Rückwärtsprimer BGH. Vektor pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO. Probe 1: leere Probe/Wasser. Probe 2 bis Probe 5: positiv getestete E-Coli-Kolonien, bei denen die ortsspezifische Mutagenese funktioniert hat. Das PCR Produkt hat eine Größe von 1617 bp. Links im Bild ist der Größenstandard zu erkennen. *Quelle: Eigene Darstellung*.

Um das Protein, welches von der neuen CD177 Splicing-Variante kodiert wird, zu charakterisieren, wurde die kodierende Region in den pcDNA 3.1/V5-His-TOPO und pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO (6176 bp) Vektor integriert und die Vektoren im Anschluss in HEK Zellen transfiziert/transferiert. Der Erfolg der ortsspezifischen Mutagenese wurde mittels PCR getestet (Abbildung 17). Die Expression von CD177 sowie der Splicing-Variante wurde mittels Immunoblot analysiert. Es wurden Zellkulturlysate von untransfizierten HEK-Zellen, HEK-Zellen mit CD177 in voller Länge und HEK-Zellen, welche die Isoform exprimieren, jeweils mit V5 und GFP Vektor unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen verglichen.

Der mit Anti-V5 detektierte Immunoblot (Abbildung 18) zeigte eine stabile Expression der CD177 Splicing-Variante in den transfizierten HEK - Zellen. Es wird sichtbar, dass die Isoform unter reduzierenden Bedingungen ein Gewicht von ca. 55 - 70 kDa und unter nicht-reduzierenden Bedingungen ein Gewicht von ca. 45 - 50 kDa aufweist. Das Protein der Isoform exprimierenden HEK - Zellen zeigte keine Reaktion mit monoklonalen Antikörpern gegen CD177 wie beispielsweise 7D8, MEM166 und iB5 (Abbildung 19). Polyklonale Antikörper gegen CD177 - extrahiert aus dem Serum von Müttern, deren Kinder bei Geburt eine neonatale Alloimmunneutropenie aufwiesen - reagierten ebenfalls nicht mit der CD177 Splicing-Variante.



Abbildung 18: **Immunoblot der neuen IsoformdelEx7/von Isoform 5.** Immunoblot, der mit dem Antikörper Anti-V5 detektiert wurde. Sekundärantikörper: Donkey-Anti-Mouse. Es wurden untransfizierte HEK-Zellen, HEK-Zellen mit CD177 in voller Länge (HEKCD177), HEK-Zellen mit einem V5-Plasmid, die die Isoform exprimieren (HEKDelx-V5) sowie HEK-Zellen mit einem GFP-Plasmid, welche die Isoform exprimieren (HEKDelx-GFP), unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen verglichen. "SM": Size Marker. *Quelle: Eigene Darstellung*.



Abbildung 19: Immunoblot von Isoform 1 (unten im Bild) und Isoform 5 (oben im Bild). Die Isoform und das CD177 Protein in voller Länge wurden mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern gegen CD177 (7D8, MEM166, 1B5) detektiert. Es wird deutlich, dass die IsoformdelEx7/Isoform 5 (oben im Bild) keine Reaktion auf Antikörper gegen CD177 zeigt. Das Protein in voller Länge = Isoform 1 (unten im Bild) reagiert unter anderem mit 7D8. Sekundärantikörper: Donkey-Anti-Mouse und Donkey-Anti-Human. Als Negativkontrolle diente mIgG. "SM": Size Marker. *Quelle: Eigene Darstellung*.

# 4.9 Personen mit der Variante CD177 c.787T besitzen die alternativ gespleißte mRNA Isoform CD177delEx7.



Abbildung 20: **PCR Agarosegel zur Detektion von IsormdelEx7/Isoform 5.** Alle Spender, welche über Isoform 5 vefügen, zeigen sich durch eine Bande mit einer Größe von 231 bp. Der Vorwärtsprimer bindet an Exon 6 und der Rückwärtsprimer an die Stelle zwischen Exon 6 und Exon 8. Aktin diente als interne Kontrolle. "SM": Size Marker. "bp": Basenpaare. *Quelle: Eigene Darstellung*.

Um auf mRNA Ebene zu detektieren, ob ein Patient/Spender die Isoform 5/IsoformdelEx7 aufweist, wurde ein Isoform-spezifischer Rückwärtsprimer konstruiert, der an die Verbindungsstelle zwischen Exon 6 und Exon 8 bindet. Bei allen Spendern, bei denen Exon 7 nicht vorhanden ist, zeigte sich im Agarosegel eine Bande in Größe von 231 Basenpaaren (Abbildung 20). Bei den Patienten, die CD177 in voller Länge auf der Oberfläche ihrer neutrophilen Granulozyten exprimieren und dementsprechend über alle 9 Exone des CD177 Gens verfügen, konnte der Rückwärtsprimer nicht binden. Das Agarosegel (Abbildung 20) zeigt, dass sowohl CD177 positive als auch CD177 negative Spender die Isoform exprimieren. Nach Ausschneiden der PCR-Banden und Sequenzierung der Banden fiel auf, dass alle Spender mit Isoform 5 auf einem Allel die c.787A>T Variante aufwiesen (Abbildung 20).

# 4.10 Es wurde kein Antikörper gegen Isoform CD177delEx7/Isoform 5 gefunden.

Isoform 5/IsoformdelEx7 exprimierende Zellen, Isoform 1 exprimierende Zellen sowie untransfizierte Zellen wurden mit verschiedenen Seren wie dem von Lalezari gestifteten NB2 Serum und Anti-NB1 Seren = Anti-CD177 Seren getestet. Als Negativkontrolle fungierte ein AB-Serum. Das NB2 Serum stammt von einer CD177 positiven Mutter, deren CD177 negatives Kind eine neonatale Alloimmunneutropenie aufwies. Mit den untransfizierten Zellen zeigt das NB2 Serum keine Reaktion (Abbildung 21). Die transfizierten Zellen, die Isoform 5 exprimieren, weisen eine leichte unspezifische Reaktion mit dem NB2 Serum auf (Abbildung 21). Ein signifikanter Histogrammshift nach rechts konnte bei den Isoform 5 exprimierenden Zellen bei keinem der getesteten Seren beobachtet werden, das heißt die Isoform 5 exprimierenden Zellen haben keine Reaktivität gegenüber den in den Seren enthaltenen Anti-CD177 Antikörpern (Abbildung 21). Als Positivkontrolle fungierten Zellen, welche CD177 in voller Länge exprimieren. Diese Zellen zeigten eine deutlich positive Reaktivität gegenüber den verschiedenen Anti-NB1 Seren mit einem ausgeprägten Histogrammshift nach rechts.



Abbildung 21: **Histogramme von untransfizierten sowie transfizierten Zellen, welche deren Reaktivität gegenüber verschiedenen Anti-NB1-Seren abbilden.** In der ersten Reihe links sind untransfizierte Zellen getestet mit AB Serum sowie NB2 Serum sichtbar. In der ersten Reihe rechts sowie in der zweiten Reihe sind Isoform 5/Isoformde-IEx7 exprimierende Zellen, welche mit verschiedenen Anti-NB1 Seren sowie AB Serum als Negativkontrolle getestet wurden, dargestellt. Es wird deutlich, dass die deIEx7 Zellen keine Reaktvität gegenüber den verschiedenen Anti-NB1 Seren aufweisen. Die dritte Reihe zeigt als Positivkontrolle Zellen, welche CD177 in voller Länge exprimieren und über eine ausgeprägte Reaktivität gegenüber den Anti-NB1 Seren verfügen. Y-Achse: Häufigkeit. X-Achse: Fluoreszenz-Intensität. Anti-NB1 Seren = Anti-CD177 Seren. "Untr.": untransfizierte Zellen; "deIEx7": Zellen, welche die IsoformdeIEx7 / Isoform 5 exprimieren; "NB1fulllength": Zellen, welche die Isoform 1 exprimieren, das heißt CD177 in voller Länge.

### 5 Diskussion

CD177, NB1 bzw. HNA-2 ist ein Granulozyten-spezifisches Antigen (Lalezari et al. 1971). 3 - 5 % aller Kaukasier exprimieren CD177 nicht auf der Oberfläche ihrer neutrophilen Granulozyten (Xia et al. 2011). Diese CD177 negativen Personen neigen bei Kontakt mit CD177 exprimierenden Granulozyten (während der Schwangerschaft, Transfusion oder Transplantation) dazu, immunisiert zu werden und produzieren daher Isoantikörper gegen CD177. Es ist bekannt, dass diese Isoantikörper am Pathome-chanismus von Erkrankungen wie TRALI oder der alloimmunen Neutropenie bei Neugeborenen während der Schwangerschaft beteiligt sind (Bux 2011). CD177 vermittelt die Membran- expression von Proteinase 3 (Korkmaz et al. 2008; Flesch et al. 2018). Der CD177/Proteinase 3-Komplex ist an der Transmigration neutrophiler Granulozyten von der vaskulären Endothelbarriere zum Interstitium beteiligt (Kuckleburg et al. 2012). CD177/PR3 auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten interagiert mit CD11b/CD18 in Lipidflößen (Jerke et al. 2011; Flesch et al. 2018).

Kissel et al. haben zwei mRNA Isoformen beschrieben, die durch das CD177 Gen in CD177 Null Individuen kodiert werden: Eine mRNA Isoform kodierte für 248 Aminosäuren und die andere kodierte für 145 Aminosäuren, von denen jede nur eine Ly6ähnliche Domäne enthält (Kissel et al. 2002). Die Analyse dieser Isoformen hat das Fehlen einer GPI Domäne in beiden Isoformen gezeigt (Kissel et al. 2002). In dieser Untersuchung blieb unklar, welcher Mechanismus zu den Splice-Isoformen führte.

Kürzlich haben Li et al. eine c.787A>T-Variante beschrieben, die für die Erzeugung eines Stop-Codons an Aminosäureposition 263 und die Produktion des verkürzten Proteins verantwortlich ist, das vor der GPI Domäne in CD177 negativen Spendern endete (Li et al. 2015). Später zeigten Wu et al., dass die c.787A>T-Variante durch Konversion von Exon 7 des CD177 Pseudogens in das CD177 Gen entsteht (Wu et al. 2016). Dementsprechend fehlt allen bisher beschriebenen Isoformen eine Membranverankerung. Die Isoform wird daher nicht auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten exprimiert. Es ist unbekannt, ob diese Varianten als lösliche Proteine vorliegen oder nach der Synthese abgebaut werden.

Die genetische Grundlage des CD177 Null Phänotyps ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Im Rahmen dieser Dissertation sollte daher nach CD177 negativen Spendern gesucht und untersucht werden, ob es Polymorphismen gibt, welche bei einer Heterozygotie für c.787A>T (c.[787A];[787T]) für eine fehlende CD177 Expression verantwortlich sind. Ziel war außerdem, zu überprüfen, ob es noch weitere bislang nicht beschriebene Isoformen von CD177 gibt.

In der vorliegenden Studie wurden 220 Blutspender bezüglich ihrer CD177 Expression untersucht, wovon 3 - also 1,4 % - negativ waren. Li et al. untersuchten 294 kaukasi-

sche Blutspender, von denen 11 CD177 defizient waren, was einem Prozentsatz von 3,7 % entspricht (Li et al. 2015). In der Literatur ist beschrieben, dass 3 - 5 % aller Kaukasier CD177 nicht exprimieren können (Lalezari et al. 1971; Stroncek et al. 2004). Die Häufigkeit der CD177 Defizienz in dieser Kohorte ist dementsprechend etwas geringer als in vorherigen Untersuchungen. Die Ursache des niedrigeren Prozentsatzes an CD177 defizienten Individuen in dieser Studie ist unklar.

Anders als beim durchflusszytometrischen Spenderscreening von Li et al. und Wu et al. wurde für diese Studie der monoklonale Antikörper 7D8 eingesetzt. Li et al. und Wu et al. haben den monoklonalen Antikörper MEM-166 (Li et al. 2015; Wu et al. 2016) verwendet. Im Unterschied zu den Ergebnissen von Wu et al. wurde in dieser Studienkohorte keine trimodale CD177 Expression - also 3 Untergruppen mit negativer, intermediärer und hoher CD177 Expression - gefunden (Wu et al. 2016; Wu et al. 2019).

Das Screening für diese Studie wurde für Vollblut konzipiert. In den meisten früheren Studien wurde die Bestimmung des CD177 Phänotyps jedoch an isolierten Granulozyten durchgeführt. Darüber hinaus wurden die Spender nach dem Zufallsprinzip ausgewählt, ohne den ethnischen Hintergrund zu berücksichtigen. Die 3 in dieser Studie als CD177 negativ identifizierten Spender waren kaukasischen Ursprungs. Diese 3 CD177 negativen Spender waren hinsichtlich der c.787A>T Variante alle heterozygot.

Bei Li et al. hingegen waren von 11 negativen Spendern 9 hinsichtlich der c.787A>T homozygot (c.[787T];[787T]) und 2 heterozygot (c.[787A];[787T]). Die zwei heterozygoten Spender wiesen zusätzlich eine 955G Deletion auf (Li et al. 2015).

In einer von Bayat et al. untersuchten Kohorte kaukasischer Abstammung waren 5 der CD177 negativen Spender hinsichtlich der c.787A>T Variante homozygot und 5 heterozygot (Bayat et al. 2016). Bayat et al. wiesen die von Li et al. beschriebene 955delG Variante nicht nach.

Die in dieser Studie untersuchten Personen mit CD177 Null Phänotyp wiesen die 955delG Deletion ebenfalls nicht auf. Auch in der von Flesch et al. untersuchten Kohorte konnte die 955delG Deletion nicht gefunden werden.

In der aktuellen/hier vorliegenden Studie identifizierte die Resequenzierung des CD177 Gens von CD177 negativen Spendern, welche heterozygot für c.787A>T waren, eine zusätzliche Variante in Exon 9: c.1291G>A. Diese Variante ersetzt die Aminosäure Glycin durch Arginin. Diese Variante wurde zeitgleich sowohl in einer amerikanischen als auch in der in dieser Arbeit beschriebenen deutschen Kohorte nachgewiesen (Wu et al. 2019). Das Vorhandensein eines 1291A-Allels beeinflusst wahrscheinlich die Expression von CD177 auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten. Die amerikanische Arbeitsgruppe Wu et al. konnte zeigen, dass der SNP c.1291G>A die primäre genetische Ursache einer trimodalen CD177 Expression ist (Wu et al. 2019). In der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kohorte wurde anders als bei Wu et al. trotz des Vorhandenseins von c.1291G>A keine trimodale CD177 Expression beobachtet.

Der SNP c.1291G>A ist in der C-terminalen hydrophoben Region des CD177 GPI Signals lokalisiert (Wu et al. 2019). Zur GPI Verankerung bedarf es eines hydrophoben Segmentes, welches am C-Terminus des Proteins lokalisiert ist (Galian et al. 2012). Durch den Aminosäureaustausch bzw. die Substitution der Aminosäure Glycin durch Arginin verändert sich die Hydrophobizität des GPI Signals, da Arginin anders als Glycin über eine hydrophile Seitenkette verfügt (Wu et al. 2019). Diese Substitution könnte nach Translation des Proteins zu einer Instabilität des GPI Ankers und damit zu einer Destabilisierung von CD177 auf der Plasmamembran und konsekutiv zu einer niedrigen oder fehlenden CD177 Expression führen (Wu et al. 2019).

Die Variante c.1291G>A könnte zu einer löslichen Variante von CD177 führen. Basierend darauf würden die CD177 Null Individuen in zwei Gruppen eingeteilt: eine Gruppe mit c.[787T];[787T] ohne vollständig kodiertes Protein aus dem CD177 Gen und eine zweite Gruppe an Individuen mit c.787T-Heterozygotie, die c.1291A auf ihrem Wildtyp-Allel tragen (c.787A) (Abbildung 22). Die CD177 Transkription in der zweiten Gruppe würde zur Produktion einer Kopie des CD177 Vollproteins führen, jedoch in löslicher Form. Daher wird angenommen, dass sich diese beiden CD177 Nullgruppen unterschiedlich verhalten, wenn sie CD177 positiven Zellen ausgesetzt werden. Die erste Gruppe hätte eine hohe Immunisierungschance. Eine Immunisierung könnte in der zweiten Gruppe durch die Gegenwart von löslichem CD177 Protein in voller Länge verhindert werden. Das Screening von Anti-HNA-2-Antikörpern bei immunisierten Personen, die homozygot für c.787T oder heterozygot sind und ein c.1291T-Allel tragen, kann zur weiteren Klärung dieses Mechanismus beitragen.

Beim Vergleich der putativen Haplotypen war sowohl in der von Wu et al. untersuchten amerikanischen Kohorte als auch in der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kohorte zu erkennen, dass die Spender, welche für die beiden Varianten c.[787T;1291G] (TG/TG) homozygot waren, keine CD177 Expression aufwiesen und folglich als CD177 Null bezeichnet werden konnten (Wu et al. 2019). Spender, die für die 787T Variante heterozygot und für die 1291G Variante homozygot waren (TG/AG) zeigten eine deutlich niedrigere CD177 Expression als die Spender, die hinsichtlich der c.[787A;1291G] (AG/AG) Variante homozygot waren (Wu et al. 2019). Die Spender mit den Varianten AG/AG, AG/AA und AA/AA wiesen in etwa die gleiche Menge an CD177 Expression bei AA/AA Spendern deutlich geringer ist als bei Spendern mit der Allelkombination TG/AA geringer ausgeprägt war als bei Spendern mit der Kombination TG/AG (Wu et al. 2019).

AG/AA Spender exprimierten weniger CD177 als AG/AG Spender (Wu et al. 2019). Spender, die hinsichtlich der c.[787A;1291A] homozygot waren (AA/AA), exprimierten kaum CD177 auf der Oberfläche ihrer neutrophilen Granulozyten (Wu et al. 2019). Die Allelkombinationen c.[787T;1291G] (TG/TG) sowie c.[787T;1291G];[787A;1291A] (TG/AA) können also mit einer fehlenden CD177 Expression assoziiert sein (Wu et al. 2019). Umgekehrt gilt: Kein Spender, der CD177 exprimiert, ist homozygoter Träger des TG Allels (Wu et al. 2019). Flesch et al. haben in ihrer multizentrischen Studie an 6 von 12 CD177 Nullspendern, die heterozygot für c.787T waren, ebenfalls die c.1291T-Variante gefunden (Flesch et al. 2020).

Kürzlich hat eine Studie zur thailändischen Bevölkerung den SNP c.1254G>A im Exon 9 des CD177 Gens identifiziert (Siriphanthong et al. 2019). Der SNP c.1254G>A wandelt Tryptophan (1254G Allel) in ein Stop-Codon (1254A Allel) an Position 418 (Siriphanthong et al 2019). C.1254G>A kann in Kombination mit c.787A>T mit dem CD177 Null Phänotyp in der thailändischen Bevölkerung assoziiert sein (Siriphanthong et al. 2019).

Alle diese Studien bestätigen, dass der CD177 Null Phänotyp am häufigsten durch homozygotes Vorliegen eines Stop-Codons (c.787A>T) hervorgerufen wird. In vielen Fällen ist der SNP c.1291G>A zusätzlich für die fehlende oder niedrige CD177 Expression verantwortlich (Bayat et al. 2016; Wu et al. 2019; Siriphanthong et al. 2019; Flesch et al. 2020). Die Variante CD177 c.1291A kodiert vermutlich für ein Protein mit verminderter/fehlender GPI Verankerung von CD177 an der Zellmembran. Ob Personen mit dieser Variante in homozygoter Anlage oder in heterozygoter Anlage dieser Variante mit dem häufigen Null-Allel CD177 c.787T Antikörper gegen CD177 bilden können, ist nicht bekannt. Untersuchungen an größeren Kollektiven von Personen mit CD177 Null Phänotyp, die Anti-CD177 gebildet haben, sind notwendig, um diese Frage beantworten zu können.



Abbildung 22: Schematische Darstellung der Varianten c.787A>T und c.1291G>A. Das Vorhandensein von c.787T in Kombination mit c.1291G führt zum Stop-Codon an Aminosäureposition 263 und damit zum Translationsabbruch. Die Kombination aus c.787A und c.1291A sorgt für eine Aminosäuresubstitution in der GPI Region an Stelle 431 und damit vermutlich zu einer löslichen Variante von CD177 in voller Länge. Eine Immunisierung könnte durch das Vorhandensein von einer löslichen Variante von CD177 verhindert werden. *Quelle: Eigene Darstellung*.

Die Ly6-Proteinfamilie, zu der auch CD177 gehört, zeichnet sich durch ihre cysteinreichen Domänen aus (Stroncek et al. 2004). Eine Untergruppe der Ly6-Familie codiert GPI verankerte Glykoproteine (Plesner et al. 1997) und die andere Untergruppe sekretorische Proteine ohne GPI Anker (Stroncek et al. 2004).

Gene der humanen Ly6 Familie - zu der auch CD177 gehört - neigen dazu, Splicing-Varianten zu bilden (Mallya et al. 2002).

Im Verlauf dieser Arbeit wurde ein neues Transkript des CD177 Gens identifiziert: Isoform 5/IsoformdelEx7. Unsere Studie zeigte, dass dem Transkript des c.787T-Allels nach der Posttranskriptionsverarbeitung die kodierende Region von Exon 7 fehlte (Abbildung 23).

Die Transfektion dieser neuen CD177 Isoform (Isoform 5) führte zur Produktion eines Peptids mit 375 Aminosäuren. Im Vergleich zum CD177 Protein voller Länge, das 28 Cysteine enthält, weist die neue Isoform nur 25 Cysteine auf.

Generell dienen Disulfidbrücken der Stabilisierung und der Konformitätsänderung eines Proteins (Liu et al. 2016). Die ungerade Anzahl an Cysteinen bzw. das Vorhandensein eines freien Cysteins ohne Disulfidbrücke sowie die Existenz des GPI Ankers deuten die Immunogenität von Isoform 5 an - also deren Prädisposition zur Alloantikörperbildung (Qin et al. 2015; Liu et al. 2016; Robinson et al. 2017).

Dieser Wechsel der Cysteinzahl zwischen beiden Proteinen (CD177 in voller Länge und Isoform 5) kann die Bildung von Disulfidbindungen in Isoform 5 beeinflussen und daher die Konformationsstruktur der neuen Isoform auf der Neutrophilenoberfläche verändern.

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Isoformen enthält die neue Isoform eine GPI Domäne und kann voraussichtlich auf der Neutrophilenoberfläche exprimiert werden (Abbildung 23). Daher könnte das Vorhandensein des Isoform 5 Proteins auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten eine Immunisierung bei Personen induzieren, deren Immunsystem dieses Protein als Antigen erkennt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden transfizierte Zellen entwickelt, die Isoform 5 exprimieren. In Abwesenheit eines spezifischen monoklonalen Antikörpers gegen diese CD177 Variante war die Charakterisierung des Proteins auf den Nachweis des Proteins durch spezifische Antikörper gegen Plasmid-Tags (wie His oder V5) beschränkt. Um das Vorhandensein dieser CD177 Variante auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten weiter zu analysieren, ist die Herstellung eines spezifischen monoklonalen Antikörpers erforderlich.

Das Vorhandensein von Isoform 5 auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten, obwohl derzeit nicht nachweisbar, könnte jedoch die Terminologie von CD177 Null ändern. Es scheint also neutrophile Granulozyten zu geben, welche CD177 Varianten exprimieren, die mit monoklonalen Antikörpern wie 7D8 und MEM166 nicht nachgewiesen werden können. Dies bedeutet, dass CD177 Null nicht als Abwesenheit eines Proteins definiert werden sollte, sondern durch das Vorhandensein verkürzter Varianten des Proteins gekennzeichnet sein könnte, die nicht mit den bekannten Antikörpern reagieren. Derzeit ist die Identifizierung dieser Isoform auf die Charakterisierung von CD177-mRNA-Bibliotheken unter Verwendung der beschriebenen Primer beschränkt, die die Isoform 5 spezifisch amplifizieren. Um die Isoform 5 in CD177 Null Individuen weiter zu identifizieren, sind jedoch weitere Labortests erforderlich.

Die Produktion eines spezifischen monoklonalen Antikörpers, der mit Isoform 5 reagiert, könnte dazu beitragen, den diagnostischen Test zum Nachweis von mit diesem Protein reaktiven menschlichen Antikörpern zu etablieren. Ein solcher Test könnte die Diagnose der Neonatalen Alloimmunneutropenie (NAIN) verbessern und kann auch zur Verhinderung von TRALI oder einer Transplantatabstoßung beitragen.





Zusammenfassend gesagt, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei neue Isoformen des CD177 Proteins identifiziert:

 Die c.1291G>A-Variante könnte zur Produktion einer löslichen Form des CD177 Proteins in voller Länge führen. Bei Personen mit CD177 Null Phänotyp könnte das Vorhandensein von CD177-löslichem Protein die Immunisierung verhindern, wenn sie CD177 positiven neutrophilen Granulozyten ausgesetzt werden.  Die Spleißvariation von CD177-mRNA führt zur Produktion einer neuen CD177 Isoform (Isoform 5), die auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten exprimiert werden kann. Eine Änderung der Anzahl der Aminosäure Cystein in Isoform 5 beeinflusst die Konformationsstruktur dieses Proteins und könnte daher zu einer Immunisierung bei CD177 positiven Personen führen, die diese Isoform nicht exprimieren.

Zur Charakterisierung der mit diesen beiden neuen Isoformen reaktiven Antikörper sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Die Identifizierung dieser neuen Isoformen kann die Nomenklatur des CD177 Antigens und der damit verbundenen Antikörper beeinflussen.

Diese Arbeit hat einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung des CD177 Null Phänotyps geleistet. Es bedarf unter Würdigung dieser Arbeit einer Neudefinition des Begriffes CD177 Null: CD177 Null ist nicht zwangsläufig durch die Abwesenheit des CD177 Antigens definiert, sondern könnte durch das Vorhandensein von Isoformen - verkürzten und veränderten Varianten des Vollproteins - oder durch das Vorhandensein von löslichen Varianten des Vollproteins gekennzeichnet sein.

### Zusammenfassung

NB1/CD177/HNA-2 ist ein GPI verankertes Protein, welches auf neutrophilen Granulozyten exprimiert wird. 3 – 5 % aller Kaukasier sind CD177 defizient. CD177 negative Individuen neigen zur Alloantikörperbildung. Alloantikörper gegen CD177 können zwei Krankheitsbilder hervorrufen: Die Transfusion von antikörperhaltigem Plasma kann eine transfusions-assoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI) auslösen. Während einer Schwangerschaft können Anti-CD177 Antikörper durch Transfer der mütterlichen Antikörper in die fetale Zirkulation eine neonatale Alloimmunneutropenie auslösen. Die genetische Grundlage des CD177 Null Phänotyps ist unvollständig aufgeklärt. Eine genetische Variante (c.787A>T), die für ein Stop-Codon kodiert, ist bei einem Teil der Personen mit CD177 Null Phänotyp in homozygoter Anlage nachweisbar. Heterozygote Personen (CD177:c.[787A];[787T]) können ebenfalls einen CD177 Null Phänotyp aufweisen, dessen genetische Grundlage bisher unbekannt ist.

Ziele der vorliegenden Arbeit waren: 1) die Resequenzierung des CD177 Gens bei Personen mit CD177 negativem Phänotyp, um bisher nicht bekannte genetische Ursachen des CD177 Null Phänotyps zu identifizieren; 2) die Identifikation möglicher neuer Isoformen von CD177; 3) die Expression der Protein-Isoform durch transiente Transfektion von Zellen; 4) die Etablierung eines RT-PCR Tests zum Nachweis der neu entdeckten Isoform auf mRNA Ebene.

Als Methoden wurden unter anderem die Durchflusszytometrie, Granulozytenisolation, *next generation sequencing*, Sanger Sequenzierung, PCR, ortsspezifische Mutagenese, Zellkultur, Western Blot und Immunpräzipitation durchgeführt.

Im Rahmen des Spenderscreenings wurden 3 CD177 negative Spender identifiziert. Im anschließenden *next generation sequencing* des CD177 Gens wurden insgesamt 12 DNA Proben untersucht, von denen 8 mit CD177 negativem Phänotyp und 4 mit CD177 positivem Phänotyp assoziiert waren. Es wurde eine bisher nicht bekannte genetische Variante (c.1291G>A) bei den CD177 negativen Spendern gefunden, die durch Disruption der GPI Verankerung des CD177 Protein an der Zellmembran zu einer löslichen Form des CD177 Proteins führen könnte. Bei negativen Individuen mit c.787A>T-Heterozygotie führt das Vorhandensein der c.1291G>A-Variation auf dem c.787A-Allel zum Fehlen von CD177 Protein auf der neutrophilen Oberfläche.

Damit konnten in dieser Arbeit die beiden wichtigsten Varianten, die zu einem CD177 Null Phänotyp führen, charakterisiert werden: Die bereits zuvor beschriebene Variante c.787A>T konvertiert das Codon für Lysin (AAA) in ein Stop-Codon (TAA, ochre). Die Variante c.1291G>A führt zur Disruption der GPI Verankerung.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analyse des CD177 mRNA-Musters bei

CD177 negativen Individuen identifizierte eine neue CD177 Isoform. Diese Isoform 5 wurde in Hek293F-Zellen exprimiert und anschließend im Western Blot mit Anti-V5 nachgewiesen. Isoform 5 ist die erste GPI verankerte Isoform von CD177. Sie besteht aus 375 Aminosäuren mit 25 Cysteinen. Bekannte monoklonale anti-CD177 Antikörper und anti-CD177 Antiseren zeigten keine Bindung an Isoform 5. Für weitere Untersuchungen zur Expression und Biologie der Isoform 5 wäre es erforderlich, monoklonale Antikörper gegen diese Isoform herzustellen.

Es wird deutlich, dass es einer Neudefinition der Nomenklatur des CD177 Alloantigens bedarf. CD177 negative Individuen zeichnen sich nicht zwangsläufig durch das komplette Fehlen des Proteins aus. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass CD177 negative Personen membrangebundene oder lösliche Isoformen des Proteins exprimieren können. Vermutlich exprimieren Personen, die Alloantikörper gegen CD177 bilden, eine Isoform mit Deletion des immunogenen CD177 Epitops. Personen mit CD177 Null Phänotyp, die vermutlich keine Alloantikörper bilden, könnten das intakte CD177 Protein in löslicher Form exprimieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit leisten einen wichtigen Beitrag zur verbesserten Diagnose der Krankheitsbilder TRALI und neonatale Alloimmunneutropenie.

### Summary

NB1/CD177/HNA-2 is a GPI anchored protein expressed on neutrophil granulocytes. 3-5 % of Caucasians are CD177 deficient. CD177 negative individuals are prone to alloantibody formation. Alloantibodies to CD177 can cause two clinical pictures: Transfusion of plasma containing antibodies can cause transfusion-associated acute lung injury (TRA-LI). During pregnancy, anti-CD177 antibodies can cause neonatal alloimmune neutropenia by transfer of maternal antibodies into the fetal circulation. The genetic basis of the CD177 null phenotype is incompletely elucidated. A genetic variant (c.787A>T) encoding a stop codon is detectable in a proportion of individuals with CD177 null phenotype in homozygous predisposition. Heterozygous individuals (CD177:c.[787A];[787T]) may also exhibit a CD177 null phenotype. The genetic basis of this remains unknown.

The aims of the present work were: 1) to resequence the CD177 gene in individuals with CD177 negative phenotype to identify previously unknown genetic causes of the CD177 null phenotype; 2) to identify possible new isoforms of CD177; 3) to express the protein isoform by transient transfection of cells; 4) to establish an RT-PCR assay to detect the newly discovered isoform at the mRNA level.

Methods performed included flow cytometry, granulocyte isolation, next generation sequencing, Sanger sequencing, PCR, site-directed mutagenesis, cell culture, western blot and immunoprecipitation.

Donor screening identified 3 CD177 negative donors. Subsequent next generation sequencing of the CD177 gene examined a total of 12 DNA samples, 8 of which were associated with CD177 negative phenotype and 4 with CD177 positive phenotype. A previously unknown genetic variant (c.1291G>A) was found in the CD177 negative donors, which could lead to a soluble form of the CD177 protein by disrupting the GPI anchoring of the CD177 protein to the cell membrane. In negative individuals with c.787A>T heterozygosity, the presence of the c.1291G>A variation on the c.787A allele results in the absence of CD177 protein on the neutrophil surface.

Thus, the two major variants leading to a CD177 null phenotype were characterized in this work: The previously described variant c.787A> T converts the codon for lysine (AAA) to a stop codon (TAA, ochre). The variant c.1291G>A leads to disruption of the GPI anchoring. Analysis of the CD177 mRNA pattern in CD177 negative individuals performed as part of this work identified a novel CD177 isoform. This isoform 5 was expressed in Hek293F cells and subsequently detected by Western blot with anti-V5. Isoform 5 is the first GPI anchored isoform of CD177. It consists of 375 amino acids with 25 cysteines.

Known anti-CD177 monoclonal antibodies and anti-CD177 antisera did not show binding to isoform 5. Further studies on the expression and biology of isoform 5 would require

monoclonal antibodies against this isoform.

Clearly, there is a need to redefine the nomenclature of the CD177 alloantigen. CD177 negative individuals are not necessarily characterized by the complete absence of the protein. The results of this work indicate that CD177 negative individuals may express membrane-bound or soluble isoforms of the protein. Presumably, individuals who form alloantibodies to CD177 express an isoform with deletion of the immunogenic CD177 epitope. Individuals with CD177 null phenotype, who presumably do not form alloantibodies, may express the intact CD177 protein in soluble form. The results of this work make an important contribution to improved diagnosis of TRALI and neonatal alloimmune neutropenia.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANCA	Antineutrophile cytoplasmatische Antikörper
Anti-NB1 Serum	Anti-CD177 Serum
ARDS	acute respiratory distress syndrome
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cDNA	complementary desoyribonucleic acid
CD11a/CD18	(LFA-1) lymphocyte function associated antigen 1
CD11b/CD18	(Mac-1) macrophage antigen alpha polypeptide
CpG	5'-C-Phosphat-G-3'
CR1	complement receptor 1
DAM	donkey-anti-mouse
DAR	donkey-anti-rabbit
DNA	deoxyribonucleic acid
dsDNA	double-stranded desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
engl.	Englisch
ESE	exon splicing enhancer
ESL-1	E-Selektin-Ligand 1
et al.	et alii
etc.	et cetera
Fa	Firma
g	Gramm
GPI	Glycosyl-Phosphatidylinositol
h	Stunden
HNA	human neutrophil antigen
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
ICAM-2	intercellular adhesion molecule 2
ISBT	International society of Blood Transfusion
JAM-C	junctional adhesion molecule
kb	Kilobasenpaare
kD	kilo Dalton
Ly6	leukocyte antigen 6
MAC-1	macrophage-1-antigen/macrophage integrin
MAIGA	monoclonal antibody immobilization of granulocyte antigens
MFI	mean fluorescence intensity
mA	Milliampere

mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
Μ	Molar
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger ribonucleic acid
NAIN	Neonatale Alloimmunneutropenie
ng	Nanogramm
NET	neutrophil extracellular traps
NGS	next generation sequencing
NSP4	neutrophil serine protease 4
pcDNA	plasmid cloning deoxyribonucleic acid
PCR	polymerase chain reaction
PECAM-1	(CD31) platelet/endothelial cell adhesion molecule 1
PR3	Proteinase 3
PRV-1	polycythemia rubra vera 1 gene
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
rpm	revolutions per minute
S	Sekunden
S.	Seite
Tab.	Tabelle
TRALI	transfusion-related acute lung injury
V	Volt
VLA-4	very late antigen 4
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
$\mu \mathbf{g}$	Mikrogramm
μl	Mikroliter
°C	Grad Celsius

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Extravasation der neutrophilen Granulozyten aus dem Gefäßsystem	2
A.h.h. ()	Schemetische Derstellung des in der Diesmemernhaur mittele CDI	3
A00. 2	Ankenkafastisten CD177 Destaine	0
A11 0	Anker belestigten CD1// Proteins.	9
Abb. 3	Interactionen von CD1// mit PR3, CD11b/CD18, Fc7RIIIb und	10
	PECAM-1	13
Abb. 4	Transmigration neutrophiler Granulozyten aus dem Gefäßsystem ins	1.4
		14
Abb. 5	Schematische Darstellung der mRNA der Isoformen von CD177	14
Abb. 6	CD177 Gen und das Pseudogen	16
Abb. 7	Häufigkeitsverteilung CD177 positiver Granulozyten bei Personen	
	mit CD177 Expression und bei Personen mit CD177 Null Phänotyp	36
Abb. 8	Immunoblot der CD177 Expression bei CD177 positiven und CD177	
	negativen Spendern.	36
Abb. 9	Agarosegel des CD177 Gens.	40
Abb. 10	Schematische Darstellung der Konsequenzen der Homozygotie für	
	c.787A>T	41
Abb. 11	A: Die Pseudogenhypothese kann bestätigt werden. B: Das CD177	
	Gen und das Pseudogen.	41
Abb. 12	Chromatogramme der 3 möglichen SNP c.1291G¿A Genotypen (ho-	
	mozygot 1291 A/A, heterozygot 1291 A/G und homozygot 1291 G/G).	42
Abb. 13	Agarosegel einer Splicing-Variante von CD177	47
Abb. 14	Ausschnitt aus der mRNA Sequenz des CD177 Gens	47
Abb. 15	Aminosäuresequenz der neu identifizierten Isoform CD177delEx7	48
Abb. 16	Ausschnitt der mRNA- und Aminosäuresequenz des CD177 Gens.	48
Abb. 17	Agarosegel der ortsspezifischen Mutagenese.	49
Abb. 18	Immunoblot der neuen IsoformdelEx7/von Isoform 5	50
Abb. 19	Immunoblot von Isoform 1 (unten im Bild) und Isoform 5 (oben im	
	Bild)	51
Abb. 20	PCR Agarosegel zur Detektion von IsormdelEx7/Isoform 5	51
Abb. 21	Histogramme von untransfizierten sowie transfizierten Zellen, wel-	
	che deren Reaktivität gegenüber verschiedenen Anti-NB1-Seren ab-	
	bilden	53
Abb. 22	Schematische Darstellung der Varianten c.787A>T und	
	c.1291G>A	57
Abb. 23	Schematische Darstellung der zwei möglichen Splicing-Varianten	
	der c.787A>T Variante.	59

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Übersicht über die unterschiedlichen granulozytären Antigene	4
Tab. 2	Verwendete Antikörper.	18
Tab. 3	Kits.	18
Tab. 4	Sonstige Materialien.	19
Tab. 5	Primer	20
Tab. 6	Geräte	21
Tab. 7	Materialien.	21
Tab. 8	Übersicht über die Ergebnisse der Resequenzierung des CD177 Gens	
	mit allen gefundenen Varianten in den Exonen und in dem Bereich	
	vor Exon 1, der zugehörigen Nukleotidnummer und Aminosäure	37
Tab. 9	Übersicht über Ergebnisse der Resequenzierung des CD177 Gens mit	
	allen gefundenen Varianten in den Exonen und in dem Bereich vor	
	Exon 1, der zugehörigen Nukleotidnummer und Aminosäure	38
Tab. 10	Übersicht über die Ergebnisse der Resequenzierung des CD177 Gens	
	mit allen gefundenen Varianten in den Exonen und in dem Bereich	
	vor Exon 1, der zugehörigen Nukleotidnummer und Aminosäure	39
Tab. 11	Häufigkeiten der Genotypen in absoluten Zahlen und in Prozent (in	
	Klammern) der in dieser Studie untersuchten NGS Kohorte	43
Tab. 12	Bioinformatorische Analyse der GPI Verankerung des CD177 Wild-	
	typs und der Variante c.1291G>A	44
Tab. 13	Ergebnis der bioinformatischen Analyse möglicher splicing sites im	
	Bereich von Exon 7	46
### Literaturverzeichnis

Abdallah, D. S. A. / Lin, C. / Ball, C. J. / King, M. R. / Duhamel, G. E. / Denkers, E. Y. (2012): Toxoplasma gondii triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. In: Infection and immunity 80 (2), S. 768–777. DOI: 10.1128/IAI.05730-11.

Arnaout, A. (1990): Structure and Function of the Leukocyte Adhesion Molecules CD11/CD18. In: Blood.

Arneth, B. (2020): Neonatal Immune Incompatibilities between Newborn and Mother. In: Journal of clinical medicine 9 (5). DOI: 10.3390/jcm9051470.

Aschenbrenner, A. C. / Mouktaroudi, M. / Krämer, B. / Oestreich, M. / Antonakos, Ni. / Nuesch-Germano, M. / Gkizeli, K. / Bonaguro, L. / Reusch, N. / Baßler, K. / Saridaki, M. / Knoll, R. / Pecht, T. / Kapellos, T. S. / Doulou, S. / Kröger, C. / Herbert, M. / Holsten, L. / Horne, A. / Gemünd, I. D. / Rovina, N. / Agrawal, S. / Dahm, K. / van Uelft, M. / Drews, A. / Lenkeit, L. / Bruse, N. / Gerretsen, J. / Gierlich, J. / Becker, M. / Händler, K. / Kraut, M. / Theis, H. / Mengiste, S. / Domenico, E. / Schulte-Schrepping, J. / Seep, L. / Raabe, J. / Hoffmeister, C. / ToVinh, M. / Keitel, V. / Rieke, G. / Talevi, V. / Skowasch, D. / Aziz, N. A. / Pickkers, P. / van de Veerdonk, F. L. / Netea, M. G. / Schultze, J. L. / Kox, M. / Breteler, M. M. B. / Nattermann, J. / Koutsoukou, A. / Giamarellos-Bourboulis, E. J. / Ulas, T. (2021): Disease severity-specific neutrophil signatures in blood transcriptomes stratify COVID-19 patients. In: Genome medicine 13 (1), S. 7. DOI: 10.1186/s13073-020-00823-5.

Bauer, S. / Abdgawad, M. / Gunnarsson, L. / Segelmark, M. / Tapper, H. / Hellmark, T. (2007): Proteinase 3 and CD177 are expressed on the plasma membrane of the same subset of neutrophils. In: Journal of leukocyte biology 81 (2), S. 458–464. DOI: 10.1189/jlb.0806514.

Bayat, B. (2020): Molecular basis of human neutrophil antigen 2 (HNA -2) expression. In: VOXS 15 (1), S. 77–81. DOI: 10.1111/voxs.12536.

Bayat, B. / Bein, G. / Sachs, U. J. (2016): A sequence-specific polymerase chain reaction method for HNA-2 genotyping. Homozygous c.843AT mutation predicts the absence of CD177. In: Transfusion 56 (8), S. 2127–2132. DOI: 10.1111/trf.13689.

Bayat, B. / Werth, S. / Sachs, U. J. H. / Newman, D. K. / Newman, P. J. / Santoso, S. (2010): Neutrophil transmigration mediated by the neutrophil-specific antigen CD177 is influenced by the endothelial S536N dimorphism of platelet endothelial cell adhesion molecule-1. In: Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 184 (7), S. 3889–3896. DOI: 10.4049/jimmunol.0903136.

Bettinotti, M. P. / Olsen, A. / Stroncek, D. (2002): The use of bioinformatics to identify the genomic structure of the gene that encodes neutrophil antigen NB1, CD177. In: Clinical immunology (Orlando, Fla.) 102 (2), S. 138–144. DOI: 10.1006/clim.2001.5154.

Borregaard, N. (2010): Neutrophils, from marrow to microbes. In: Immunity 33 (5), S. 657–670. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.11.011.

Borregaard, N. / Cowland, J. B. (1997): Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. In: Blood 89 (10), S. 3503–3521.

Borregaard, N. / Kjeidsen, L. / Rygaard, K. / Bastholm, L. / Nielsen, M. / Sengelev, H. / Bjerrum, O. / Johnsen, A. H. (1992): Stimulus-dependent Secretion of Plasma Proteins from Human Neutrophils. In: Journal of Clinical Investigation.

Brinkmann, V. / Reichard, U. / Goosmann, C. / Fauler, B. / Uhlemann, Y. / Weiss, D. S. / Weinrauch, Y. / Zychlinsky, A. (2004): Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. In: Science.

Bux, J. (1999): Nomenclature of granulocyte alloantigens. In: Transfusion.

Bux, J. (2002): Molecular nature of antigens implicated in immune neutropenias. In: International Journal of Hematology.

Bux, J. (2008): Human neutrophil alloantigens. In: Vox sanguinis 94 (4), S. 277–285. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2007.01031.x.

Bux, J. (2011): Antibody-mediated (immune) transfusion-related acute lung injury. In: Vox sanguinis 100 (1), S. 122–128. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2010.01392.x.

Bux, J. / Mueller-Eckhardt, C. (1989): Immungranulozytopenien im Kindesalter. In: Klinische Pädiatrie.

Caro, L. / Tettelin, H. / Vossen, J. / Ram, A. / van den Ende, H. / Klis, F. (1997): In silicio identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of Saccharomyces cerevisiae. In: Yeast Functinal Analysis Reports.

Carrucio, L. / Walkovich, K. / Bettinotti, M. / Schuller, R. / Stroncek, D. (2004): CD177 polymorphisms: correlation between high-frequency single nucleotide polymorphisms and neutrophil surface protein expression.

Caruccio, L. / Bettinotti, M. / Director-Myska, A. E. / Arthur, D. C. / Stroncek, D. (2006): The gene overexpressed in polycythemia rubra vera, PRV-1, and the gene encoding a neutrophil alloantigen, NB1, are alleles of a single gene, CD177, in chromosome band 19q13.31. In: Transfusion 46 (3), S. 441–447. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2006.00741.x.

Caruccio, L. / Bettinotti, M. / Matsuo, K. / Sharon, V. / Stroncek, D. (2003): Expression of human neutrophil antigen-2a (NB1) is increased in pregnancy. In: Transfusion 43 (3), S. 357–363. DOI: 10.1046/j.1537-2995.2003.00320.x.

Chavakis, T. / Keiper, T. / Matz-Westphal, R. / Hersemeyer, K. / Sachs, U. J. / Nawroth, P. P. / Preissner, K. T. / Santoso, S. (2004): The junctional adhesion molecule-C promotes neutrophil transendothelial migration in vitro and in vivo. In: The Journal of biological chemistry 279 (53), S. 55602–55608. DOI: 10.1074/jbc.M404676200.

Cowland, J. / Borregaard, N. (2016): Granulopoiesis and granules of human neutrophils. In: Immunological reviews.

Chromas (2021): Chromas. http://technelysium.com.au/wp/chromas/ (letzter Abruf 08. Mai 2021).

Dangerfield, J. / Larbi, K. Y. / Huang, M.-T. / Dewar, A. / Nourshargh, S. (2002): PECAM-1 (CD31) homophilic interaction up-regulates alpha6beta1 on transmigrated neutrophils in vivo and plays a functional role in the ability of alpha6 integrins to mediate leukocyte migration through the perivascular basement membrane. In: The Journal of experimental medicine 196 (9), S. 1201–1211. DOI: 10.1084/jem.20020324. David, A. / Fridlich, R. / Aviram, I. (2005): The presence of membrane Proteinase 3 in neutrophil lipid rafts and its colocalization with FcgammaRIIIb and cytochrome b558. In: Experimental cell research 308 (1), S. 156–165. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.03.034.

David, A. / Kacher, Y. / Specks, U. / Aviram, I. (2003): Interaction of proteinase 3 with CD11b/CD18 (beta2 integrin) on the cell membrane of human neutrophils. In: Journal of leukocyte biology 74 (4), S. 551–557. DOI: 10.1189/jlb.1202624.

Davoren, A. / Curtis, B. / Shulman, I. / Mohrbacher, A. / Bux, J. / Kwiatkowska, B. / McFarland, J. / Aster, R. (2003): TRALI due to granulocyte-agglutinating human neutrophil antigen-3a (5b) alloantibodies in donor plasma: a report of 2 fatalities. In: Transfusion.

Deng, H. / Hu, N. / Wang, C. / Chen, M. / Zhao, M.-H. (2018): Interaction between CD177 and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 downregulates membranebound proteinase-3 (PR3) expression on neutrophils and attenuates neutrophil activation induced by PR3-ANCA. In: Arthritis research & therapy 20 (1), S. 213. DOI: 10.1186/s13075-018-1710-0.

Eisenhaber, B. / Bork P. / Eisenhaber, F. (1998): Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega-site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. In: Protein Engineering 11, No.12, S. 1155-1161.

Eisenhaber, B. / Bork, P. / Eisenhaber, F. (1999): Prediction of Potential GPI-modification Sites in Proprotein Sequences. In: Journal of Molecular Biology.

Eisenhaber, B. / Bork, P. / Yuan, Y. / Loeffler, G. / Eisenhaber, F. (2000): Automated annotation of GPI anchor sites: case study C.elegans. In: TIBS 25 (7), S. 340-341.

Eisenhaber, B. / Schneider, G. / Wildpaner, M. / Eisenhaber, F. (2004): A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for Aspergillus nidulans, Candida albicans, Neurospora crassa, Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe. In: Journal of Molecular Biology 337 (2), S. 243–253. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.01.025. Eulenberg-Gustavus, C. / Bähring, S. / Maass, P. G. / Luft, F. C. / Kettritz, R. (2017): Gene silencing and a novel monoallelic expression pattern in distinct CD177 neutrophil subsets. In: The Journal of experimental medicine 214 (7), S. 2089–2101. DOI: 10.1084/jem.20161093.

Feng, D. (1998): Neutrophils Emigrate from Venules by a Transendothelial Cell Pathway in Response to FMLP. In: Journal of Experimental Medicine.

Filippi, M. (2019): Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives. In: Blood.

Flesch, B. K. / Reil, A. (2018): Molecular Genetics of the Human Neutrophil Antigens. In: Transfusion medicine and hemotherapy: offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie 45 (5), S. 300–309. DOI: 10.1159/000491031.

Flesch, B. K. / Reil, A. / Nogués, N. / Canals, C. / Bugert, P. / Schulze, T. J. / Huiskes, E. / Porcelijn, L. / Höglund, P. / Ratcliffe, P. / Schönbacher, M. / Kerchrom, H. / Kellershohn, J. / Bayat, B. (2020): Multicenter Study on Differential Human Neutrophil Antigen 2 Expression and Underlying Molecular Mechanisms. In: Transfus Med Hemother, S. 1–11. DOI: 10.1159/000505523.

Fankhauser, C. / Homans, S. W. / Thomas-Oates, J. E. / McConville, M. J. / Desponds, C.
/ Conzelmann, A. / Ferguson, M. A. (1993): Structures of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from Saccharomyces cerevisiae. In: Journal of Biological Chemistry 268 (35), S. 26365–26374. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)74324-5.

Fuchs, T. A. / Abed, U. / Goosmann, C. / Hurwitz, R. / Schulze, I. / Wahn, V. / Weinrauch, Y. / Brinkmann, V. / Zychlinsky, A. (2007): Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. In: The Journal of Cell Biology 176 (2), S. 231–241. DOI: 10.1083/jcb.200606027.

Fung, Y. L. / Silliman, C. C. (2009): The role of neutrophils in the pathogenesis of transfusion-related acute lung injury. In: Transfusion medicine reviews 23 (4), S. 266–283. DOI: 10.1016/j.tmrv.2009.06.001.

Galian, C. / Björkholm, P. / Bulleid, N. / Heijne, G. (2012): Efficient glycosylphosphatidylinositol (GPI) modification of membrane proteins requires a C-terminal anchoring signal of marginal hydrophobicity. In: The Journal of biological chemistry 287 (20), S. 16399–16409. DOI: 10.1074/jbc.M112.350009.

Ganguly, S. / Carrum, G. / Nizzi, F. / Heslop, H. E. / Popat, U. (2004): Transfusion-related acute lung injury (TRALI) following allogeneic stem cell transplant for acute myeloid leukemia. In: American journal of hematology 75 (1), S. 48–51. DOI: 10.1002/ajh.10452.

Gehrie, E. A. / Tormey, C. A. (2014): The Influence of Clinical and Biological Factors on Transfusion-Associated Non-ABO Antigen Alloimmunization. Responders, Hyper-Responders, and Non-Responders. In: Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie 41 (6), S. 420–429. DOI: 10.1159/000369109.

Göhring, K. / Wolff, J. / Doppl, W. / Schmidt, K. L. / Fenchel, K. / Pralle, H. / Sibelius, U. / Bux, J. (2004): Neutrophil CD177 (NB1 gp, HNA-2a) expression is increased in severe bacterial infections and polycythaemia vera. In: British journal of haematology 126 (2), S. 252–254. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2004.05027.x.

Goldschmeding, R. / Dalen, C. M. / Faber, N. / Calafat, J. / Huizinga, T. W. J. / Schoot, C. E. / Clement, L. T. / Borne, A. E. G. (1992): Further characterization of the NB 1 antigen as a variably expressed 56–62 kD GPI-linked glycoprotein of plasma membranes and specific granules of neutrophils. In: Br J Haematol 81 (3), S. 336–345. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1992.tb08237.x.

Graveley, B. R. (2000): No Job Name // Sorting out the complexity of SR protein functions. In: RNA (New York, N.Y.) 6 (9), S. 1197–1211. DOI: 10.1017/s1355838200000960.

Howe, K. L. / Achuthan, P. / Allen, J. / Allen, J. / Alvarez-Jarreta, J. / Ridwan Amode, M.
/ Armean, I. M. / Azov, A. G. / Bennett, R. / Bhai, J. / Billis, K. / Boddu, S. / Charkhchi,
M. / Cummins, C. / Da Rin Fioretto, L. / Davidson, C. / Dodiya, K. / El Houdaigui, B.
/ Fatima, R. / Gall, A. / Garcia Giron, C. / Grego, T. / Guijarro-Clarke, C. / Haggerty,
L. / Hemrom, A. / Hourlier, T. / Izuogu, O. G. / Juettemann, T. / Kaikala, V. / Kay, M./
Lavidas, I. / Le, T. / Lemos, D. / Gonzalez Martinez, J. / Marugán, J. / Maurel, T: /
McMahon, A. C. / Mohanan, S. / Moore, S. / Muffato, M. / Oheh, D. N. / Paraschas,
D. / Parker, A. / Parton, A. / Prosovetskaia, I. / Sakthivel, M. P. / Salam, A. / Schmitt,
B. M. / Schuilenburg, H. / Sheppard, D. / Steed, E. / Szpak, M. / Szuba, M. / Taylor,
K. / Thormann, A. / Threadgold, G. / Walts, B. / Winterbottom, A. / Chakiachvili, M. /
Chaubal, A. / De Silva, N. / Flint, B. / Frankish, A. / Hunt, S. E. / IIsley, G. R. / Langridge,
N. / Loveland, J. E. / Martin, F. J. / Mudge, J. M. / Morales, J. / Perry, E. / Ruffier, M. /
Tate, J. / Thybert, D. / Trevanion, S. J. / Cunningham, F. / Yates, A. D. / Zerbino, D. R. /
Flicek, P. (2021): Ensembl 2021. In: Nucleic Acids Res. 2021 / vol. 49 (1). S. 884–891.
DOI: 10.1093/nar/gkaa942.

Huang, Y-H. / Lo, M-H. / Cai, X-Y. / Liu, S-F. / Kuo, H-C. (2019): Increase expression of CD177 in Kawasaki disease. In: Pediatric rheumatology online journal 17 (1), S. 13. DOI: 10.1186/s12969-019-0315-8.

Illumina (2017): An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology. International Haemovigilance Network (2011): Working Party on Haemovigilance. proposed standard definitions for surveillance of non infectious adverse transfusion reactions.

Jerke, U. / Marino, S. F. / Daumke, O. / Kettritz, R. (2017): Characterization of the CD177 interaction with the ANCA antigen proteinase 3. In: Scientific reports 7, S. 43328. DOI: 10.1038/srep43328.

Jerke, U. / Rolle, S. / Dittmar, G. / Bayat, B. / Santoso, S. / Sporbert, A. / Luft, F. / Kettritz, R. (2011): Complement receptor Mac-1 is an adaptor for NB1 (CD177)-mediated PR3-ANCA neutrophil activation. In: The Journal of biological chemistry 286 (9), S. 7070–7081. DOI: 10.1074/jbc.M110.171256.

Keller-Stanislawski, B. / Reil, A. / Günay, S. / Funk, M. B. (2010): Frequency and severity of transfusion-related acute lung injury-German haemovigilance data (2006-2007). In: Vox sanguinis 98 (1), S. 70–77. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2009.01232.x.

Kinoshita, T. / Fujita, M. (2016): Biosynthesis of GPI-anchored proteins. Special emphasis on GPI lipid remodeling. In: Journal of lipid research 57 (1), S. 6–24. DOI: 10.1194/jlr.R063313.

Kissel, K. / Santoso, S. / Hofmann, C. / Stroncek, D. / Bux, J. (2001): Molecular basis of the neutrophil glycoprotein NB1 (CD177) involved in the pathogenesis of immune neutropenias and transfusion reactions. In: Eur. J. Immunol. 31 (5), S. 1301–1309. DOI: 10.1002/1521-4141(200105)31:5<1301:AID-IMMU1301>3.0.CO;2-J.

Kissel, K. / Scheffler, S. / Kerowgan, M. / Bux, J. (2002): Molecular basis of NB1 (HNA-2a, CD177) deficiency. In: Blood 99 (11), S. 4231–4233. DOI: 10.1182/blood.V99.11.4231.

Kleinman, S. / Caulfield, T. / Chan, P. / Davenport, R. / McFarland, J. / McPhedran, S. / Meade, M. / Morrison, D. / Pinsent, T. / Robillard, P. / Slinger, P. (2004): Toward an understanding of transfusion-related acute lung injury: statement of a consensus panel. In: Transfusion.

Kluz, P. N. / Kolb, R. / Xie, Q. / Borcherding, N. / Liu, Q. / Luo, Y. / Kim, M.-C. / Wang, L. / Zhang, Y. / Li, W. / Stipp, C. / Gibson-Corley, K. N. / Zhao, C. / Qi, H. H. / Bellizzi, A. / Tao, A. W. / Sugg, S. / Weigel, R. J. / Zhou, D. / Shen, X. / Zhang, W. (2020): Cancer cell-intrinsic function of CD177 in attenuating  $\beta$ -catenin signaling. In: Oncogene. DOI: 10.1038/s41388-020-1203-x.

Kolaczkowska, E. / Kubes, P. (2013): Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. In: Nature reviews. Immunology 13 (3), S. 159–175. DOI: 10.1038/n-ri3399.

Korkmaz, B. / Kuhl, A. / Bayat, B. / Santoso, S. / Jenne, D. E. (2008): A hydrophobic patch on proteinase 3, the target of autoantibodies in Wegener granulomatosis, mediates membrane binding via NB1 receptors. In: The Journal of biological chemistry 283 (51), S. 35976–35982. DOI: 10.1074/jbc.M806754200.

Kuckleburg, C. J. / Tilkens, S. M. / Santoso, S. / Newman, P. J. (2012): Proteinase 3 contributes to transendothelial migration of NB1-positive neutrophils. In: Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950) 188 (5), S. 2419–2426. DOI: 10.4049/jimmunol.1102540. Lalezari, P. (2017): Neutrophil-specific antigens, immunobiology, and implications in transfusion medicine and blood disorders. In: Transfusion 57 (9), S. 2066–2073. DOI: 10.1111/trf.14102.

Lalezari, P. / Bernard, G. (1966): An Isolgous Antigen-Antibody Reaction with Human Neutrophiles, Related to Neonatal Neutropenia. In: Journal of Clinical Investigation.

Lalezari, P. / Murphy, G. B. / Allen, F. H. (1971): NB1, a new neutrophil-specific antigen involved in the pathogenesis of neonatal neutropenia. In: The Journal of clinical investigation 50 (5), S. 1108–1115. DOI: 10.1172/JCI106582.

Ley, K. / Laudanna, C. / Cybulsky, M. I. / Nourshargh, S. (2007): Getting to the site of inflammation. The leukocyte adhesion cascade updated. In: Nature reviews. Immunology 7 (9), S. 678–689. DOI: 10.1038/nri2156.

Li, Y. / Mair, D. C. / Schuller, R. M. / Li, L. / Wu, J. (2015): Genetic mechanism of human neutrophil antigen 2 deficiency and expression variations. In: PLoS genetics 11 (5), e1005255. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005255.

Lodge, K. M. / Cowburn, A. S. / Li, W. / Condliffe, A. M. (2020): The Impact of Hypoxia on Neutrophil Degranulation and Consequences for the Host. In: International journal of molecular sciences 21 (4). DOI: 10.3390/ijms21041183.

Mallya, M. / Campbell, R. D. / Aguado, B. (2002): Transcriptional analysis of a novel cluster of LY-6 family members in the human and mouse major histocompatibility complex. Five genes with many splice forms. In: Genomics 80 (1), S. 113–123. DOI: 10.1006/geno.2002.6794.

Mason, D. / Pascale, A. / Bensussan, A. / Buckley, C. / Civin, C. / Clark, E. / Haas, M. / Goyert, S. / Hadam, M. / Hart, D. / Horejsí, V. / Meuer, S. / Morrissey, J. / Schwartz-Albiez, R. / Shaw, S. / Simmons, D. / Uguccioni, M. / van der Schoot, E. / Vivier, E. / Zola, H. (2002): CD antigens 2002. In: Blood 99 (10), S. 3877–3880.

Matsuo, K. / Lin, A. / Procter, J. L. / Clement, L. / Stroncek, D. (2000): Variations in the expression of granulocyte antigen NB1. In: Transfusion 40 (6), S. 654–662. DOI: 10.1046/j.1537-2995.2000.40060654.x.

Meyerson, H. J. / Osei, E. / Schweitzer, K. / Blidaru, G. / Edinger, A. / Balog, A. (2013): CD177 expression on neutrophils. In search of a clonal assay for myeloid neoplasia by flow cytometry. In: American journal of clinical pathology 140 (5), S. 658–669. DOI: 10.1309/AJCPDFBEBQZW10I7.

Middelburg, R. A. / van Stein, D. / Briët, E. / van der Bom, J. G. (2008): The role of donor antibodies in the pathogenesis of transfusion-related acute lung injury. A systematic review. In: Transfusion 48 (10), S. 2167–2176. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2008.01810.x.

Moore, K. / Patel, K. / Bruehl, R. / Fugang, L. / Johnson, D. / Lichenstein, H. / Cummings, R. / Bainton, D. / McEver, R. (1995): P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 Mediates Rolling of Human Neutrophils on P-Selectin. In: The Journal of Cell Biology.

Muller, W. (2002): Leucocyte-Endothelial Cell Interactions in the Inflammatory Response. In: Laboratory Investigation.

Muller, W. / Weigl, S. / Deng, X. / Phillips, D. (1993): PECAM-1 Is Required for Transendothelial Migration of Leukocytes. In: Journal of Experimental Medicine.

Muschter, S. / Berthold, T. / Greinacher, A. (2011): Developments in the definition and clinical impact of human neutrophil antigens. In: Current Opinion in Hematology 18 (6), S. 452–460. DOI: 10.1097/MOH.0b013e32834babdd.

National Center for Biotechnology Information (2021): CD177 molecule [ Homo sapiens (human) ]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/57126 (letzter Abruf 08. Mai 2021).

New England Biolabs (2017): Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual.

Papayannopoulos, V. (2018): Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. In: Nature reviews. Immunology 18 (2), S. 134–147. DOI: 10.1038/nri.2017.105.

Papayannopoulos, V. / Zychlinsky, A. (2009): NETs. A new strategy for using old weapons. In: Trends in immunology 30 (11), S. 513–521. DOI: 10.1016/j.it.2009.07.011.

Passamonti, F / Pietra, D. / Malabarba, L. / Rumi, E. / Della Porta, M. G. / Malcovati, L. / Bonfichi, M. / Pascutto, C. / Lazzarino, M. / Cazzola, M. (2004): Clinical significance of neutrophil CD177 mRNA expression in Ph-negative chronic myeloproliferative disorders. In: British journal of haematology 126 (5), S. 650–656. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2004.05098.x.

Perera, N. C. / Wiesmüller, K. H. / Larsen, M. T. / Schacher, B. / Eickholz, P. / Borregaard, N. / Jenne, D. E. (2013): NSP4 is stored in azurophil granules and released by activated neutrophils as active endoprotease with restricted specificity. In: Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 191 (5), S. 2700–2707. DOI: 10.4049/jimmunol.1301293.

Phillipson, M. / Kubes, P. (2011): The neutrophil in vascular inflammation. In: Nature medicine 17 (11), S. 1381–1390. DOI: 10.1038/nm.2514. Plummer N (1936): Blood Transfusion: A report of six fatalities. In: The British Medical Journal.

Porcelijn, L. / Haas, M. (2018): Neonatal Alloimmune Neutropenia. In: Transfusion medicine and hemotherapy: offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie 45 (5), S. 311–316. DOI: 10.1159/000492949.

QIAGEN (2015): EZ1 DNA Blood Handbook.

Rassow, J. / Hauser, K. / Netzker, R. / Deutzmann, R. (2016): Biochemie. 4. Auflage. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).

Reil, A. / Keller-Stanislawski, B. / Günay, S. / Bux, J. (2008): Specificities of leucocyte alloantibodies in transfusion-related acute lung injury and results of leucocyte antibody screening of blood donors. In: Vox sanguinis 95 (4), S. 313–317. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2008.01092.x.

Renz, H. (Hg.) (2018): Praktische Labordiagnostik. Lehrbuch zur Laboratoriumsmedizin, klinischen Chemie und Hämatologie. 3., aktualisierte und erweiterte Auflage. Berlin, Boston: De Gruyter (De Gruyter Studium).

Ridley, A. / Schwartz, M. / Burridge, K. / Firtel, R. / Ginsberg, M. / Borisy, G. / Parsons, J. / Horwitz, A. (2003): Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. In: Science.

Roubinian, N. (2018): TACO and TRALI: biology, risk factors, and prevention strategies.

Roubinian, N. H. / Looney, M. R. / Kor, D. J. / Lowell, C. A. / Gajic, O. / Hubmayr,
R. D. / Gropper, M. A. / Koenigsberg, M. / Wilson, G. A. / Matthay, M. A. / Toy,
P. / Murphy, E. L. (2015): Cytokines and clinical predictors in distinguishing pulmonary transfusion reactions. In: Transfusion 55 (8), S. 1838–1846. DOI: 10.1111/trf.13021.

Sachs, U. J. H. / Andrei-Selmer, C. L. / Maniar, A. / Weiss, T. / Paddock, C. / Orlova, V. V. / Choi, E. Y. / Newman, P. J. / Preissner, K. T. / Chavakis, Tr. / Santoso, S. (2007): The neutrophil-specific antigen CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). In: The Journal of biological chemistry 282 (32), S. 23603–23612. DOI: 10.1074/jbc.M701120200.

Sachs, U. J. H. / Hattar, K. / Weissmann, N. / Bohle, R. M. / Weiss, T. / Sibelius, U. / Bux, J. (2006): Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an ex vivo rat lung model. In: Blood 107 (3), S. 1217–1219. DOI: 10.1182/blood-2005-04-1744.

Saitoh, T. / Komano, J. / Saitoh, Y. / Misawa, T. / Takahama, M. / Kozaki, T. / Uehata, T. / Iwasaki, H. / Omori, H. / Yamaoka, S. / Yamamoto, N. / Akira, S. (2012): Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. In: Cell host & microbe 12 (1), S. 109–116. DOI: 10.1016/j.chom.2012.05.015.

Sengelov, H. / Kjeldsen, L. / Kroeze, W. / Berger, M. / Borregaard, N. (1994): Secretory Vesicles Are the Intracellular Reservoir of Complement Receptor 1 in Human Neutrophils. In: The Journal of Immunology.

Silliman, C. C. / Curtis, B. R. / Kopko, P. M. / Khan, S. Y. / Kelher, M. R. / Schuller, R. M. / Sannoh, B. / Ambruso, D. R. (2007): Donor antibodies to HNA-3a implicated in TRALI reactions prime neutrophils and cause PMN-mediated damage to human pulmonary microvascular endothelial cells in a two-event in vitro model. In: Blood 109 (4), S. 1752–1755. DOI: 10.1182/blood-2006-05-025106.

Siriphanthong, K. / Petvises, S. / Thanongsaksrikul, J. / Intharanut, K. / Nathalang, O. (2019): A novel nonsense mutation found in the CD177 gene of Thai individuals with the HNA-2 null phenotype. In: Transfusion medicine (Oxford, England). DOI: 10.1111/tme.12650.

Steegmaier, M. / Borges, E. / Berger, J. / Schwarz, H. / Vestweber, D. (1997): The E-selectin-ligand ESL-1 is located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface. In: Journal of Cell Science.

Stephens, L. / Milne, L. / Hawkins, P. (2008): Moving towards a better understanding of chemotaxis. In: Current biology : CB 18 (11), R485-94. DOI: 10.1016/j.cub.2008.04.048.

Stroncek, D. F. / Jaszcz, W. / Herr, G. P. / Clay, M. E. / McCullough, J. (1998): Expression of neutrophil antigens after 10 days of granulocyte-colony- stimulating factor. In: Transfusion 38 (7), S. 663–668. DOI: 10.1046/j.1537-2995.1998.38798346635.x.

Stroncek, D. / Bux, J. (2002): Is it time to standardize granulocyte alloantigen nomenclature? In: Transfusion.

Stroncek, D. F. / Carrucio, L. / Bettinotti M. (2004): CD177: A member of the Ly-6 gene superfamily involved with neutrophil proliferation and polycythemia vera. In: Journal of Translational Medicine.

Stroncek, D. F. / Shankar, R. / Litz, C. / Clement, L. (1998): The expression of the NB1 antigen on myeloid precursors and neutrophils from children and umbilical cords. In: Transfus Med 8 (2), S. 119–123. DOI: 10.1046/j.1365-3148.1998.00136.x.

Stroncek, D. F. / Skubitz, K. M. / McCullough, J. J.(1990): Biochemical characterization of the neutrophil-specific antigen NB1. In: Blood 75 (3), S. 744–755.

Sunyaev, S.R. / Eisenhaber, F. / Rodchenkov, I.V. / Eisenhaber, B. / Tumanyan, V.G. / and Kuznetsov, E.N. (1999): PSIC: Profile extraction from sequence alignments with position-specific counts of independent observations. In: Protein Engineering 12, No.5, S. 387-394.

Taniguchi, K. / Kobayashi, M. / Harada, H. / Hiraoka, A. / Tanihiro, M. / Takata, N. / Kimura, A. (2002): Human neutrophil antigen-2a expression on neutrophils from healthy adults in western Japan. In: Transfusion.

Temerinac, S. / Klippel, S. / Strunck, E. / Roder, S. / Lubbert, M. / Lange, W. / Azemar, M. / Meinhardt, G. / Schaefer, H. E. / Pahl, H. L. (2000): Cloning of PRV-1, a novel member of the uPAR receptor superfamily, which is overexpressed in polycythemia rubra vera. In: Blood (95).

Toyoda, T. / Tsukamoto, T. / Yamamoto, M. / Ban, H. / Saito, N. / Takasu, S. / Shi, L. / Saito, A. / Ito, S. / Yamamura, Y. / Nishikawa, A. / Ogawa, K. / Tanaka, T. / Tatematsu, M. (2013): Gene expression analysis of a Helicobacter pylori-infected and high-salt diet-treated mouse gastric tumor model. Identification of CD177 as a novel prognostic factor in patients with gastric cancer. In: BMC gastroenterology 13, S. 122. DOI: 10.1186/1471-230X-13-122.

Urban, C. F. / Reichard, U. / Brinkmann, V. / Zychlinsky, A. (2006): Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans yeast and hyphal forms. In: Cellular microbiology 8 (4), S. 668–676. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2005.00659.x.

van den Tooren-de Groot, R. / Ottink, M. / Huiskes, E. / van Rossum, A. / van der Voorn, B. / Slomp, J. / Haas, M. / Porcelijn, L. (2014): Management and outcome of 35 cases with foetal/neonatal alloimmune neutropenia. In: Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992) 103 (11), e467-74. DOI: 10.1111/apa.12741.

Vietinghoff, S. / Tunnemann, G. / Eulenberg, C. / Wellner, M. / Cardoso, M. C. / Luft, F. C. / Kettritz, R. (2007): NB1 mediates surface expression of the ANCA antigen proteinase 3 on human neutrophils. In: Blood 109 (10), S. 4487–4493. DOI: 10.1182/blood-2006-10-055327.

Vlaar, A. P. J. / Toy, P. / Fung, M. / Looney, M. R. / Juffermans, N. P. / Bux, J. / Bolton-Maggs, P. / Peters, A. L. / Silliman, C. C. / Kor, D. J. / Kleinman, S. (2019): A consensus redefinition of transfusion-related acute lung injury. In: Transfusion 59 (7), S. 2465–2476. DOI: 10.1111/trf.15311.

Volkmann, J. / Schmitz, J. / Nordlohne, J. / Dong, L. / Helmke, A. / Sen, P. / Immenschuh, S. / Bernhardt, W. M. / Gwinner, W. / Bräsen, J. H. / Schmitt, R. / Haller, H. / Vietinghoff von, S. (2020): Kidney injury enhances renal G-CSF expression and modulates granulopoiesis and human neutrophil CD177 in vivo. In: Clinical and experimental immunology 199 (1), S. 97–108. DOI: 10.1111/cei.13372.

Wagner, J. / Roth, R. (2000): Neutrophil Migration Mechanisms, with an Emphasis on the Pulmonary Vasculature. In: Pharmacological Reviews. Wang M, Marín A (2006): Characterization and prediction of alternative splice sites. In: Gene 366 (2), S. 219–227. DOI: 10.1016/j.gene.2005.07.015.

Wang, Q. / Doerschuk, C. M. (2001): The p38 mitogen-activated protein kinase mediates cytoskeletal remodeling in pulmonary microvascular endothelial cells upon intracellular adhesion molecule-1 ligation. In: Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 166 (11), S. 6877–6884. DOI: 10.4049/jimmunol.166.11.6877.

Wang, M. / Marín, A. (2006): Characterization and Prediction of Alternative Splice Sites. In: Gene 366, S. 219-227.

Weiner, O. D. / Servant, G. / Welch, M. D. / Mitchison, T. J. / Sedat, J. W. / Bourne, H. R. (1999): Spatial control of actin polymerization during neutrophil chemotaxis. In: Nature cell biology 1 (2), S. 75–81. DOI: 10.1038/10042.

Williams, M. / Azcutia, V. / Newton, G. / Alcaide, P. / Luscinskas, F. W. (2011): Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. In: Trends in immunology 32 (10), S. 461–469. DOI: 10.1016/j.it.2011.06.009.

Witkow-Sarsat, V. / Cramer, E. / Hieblot, C. / Guichard, J. / Nusbaum, P. / Lopez, S. / Lesavre, P. / Halbwachs-Mecarelli, L. (1999): Presence of Proteinase 3 in Secretory Vesicles: Evidence of a Novel, Highly Mobilizable Intracellular Pool Distinct From Azurophil Granules. In: Blood.

Wolff, J. / Brendel, C. / Fink, L. / Bohle, R. / Kissel, K. / Bux J. (2003): Lack of NB1 GP (CD177/HNA-2a) gene transcription in NB1 GP- neutrophils from NB1 GP-expressing individuals and association of low expression with NB1 gene polymorphisms. In: Blood.

Wolff, J. / Goehring, K. / Heckmann, M. / Bux, J. (2006): Sex-dependent upregulation of CD177-specific mRNA expression in cord blood due to different stimuli. In: Transfusion.

Wu, J. / Li, Y. / Schuller, R. M. / Li, L. / Litmeyer, A-S. / Bein, G. / Sachs, U. J. / Bayat, B. (2019): The nonconservative CD177 single-nucleotide polymorphism c.1291GA is a genetic determinant for human neutrophil antigen-2 atypical/low expression and deficiency. In: Transfusion. DOI: 10.1111/trf.15222.

Wu, Z. / Liang, R. / Ohnesorg, T. / Cho, V. / Lam, W. / Abhayaratna, W. P. / Gatenby,
P. A. / Perera, C. / Zhang, Y. / Whittle, B. / Sinclair, A. / Goodnow, C. C. / Field, M.
/ Andrews, T. D. / Cook, M. C. (2016): Heterogeneity of Human Neutrophil CD177
Expression Results from CD177P1 Pseudogene Conversion. In: PLoS genetics 12 (5),
e1006067. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006067.

Xia, W. / Bayat, B. / Sachs, U. / Chen, Y. / Shao, Y. / Xu, X. / Deng, J. / Ding, H. / Fu, Y. / Ye, X. / Santoso, S. (2011): The frequencies of human neutrophil alloantigens in the Chinese Han population of Guangzhou. In: Transfusion 51 (6), S. 1271–1277. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2010.02979.x.

Yang, X. / Wang, Z. / Chen, L. / Zhou, G. / Chen, Y. / Liu, Z. (2017): Increased CD177 expression is associated with helicobacter pylori-related gastritis. In: International Journal of Clinical and Experimental Pathology.

Yang, X-T. / Wang, Z-J. (2019): CD177 Expression and Inflammation Grade in Helicobacter pylori-Infected Wild-Type and CD177-/- C57BL/6 Mice. In: Analytical cellular pathology (Amsterdam) 2019, S. 9506863. DOI: 10.1155/2019/9506863.

Zimmerman, G. / McIntyre, T. / Prescott, S. (1996): Perspectives Series: Cell Adhesion in Vascular Biology. In: Journal of Clinical Investigation.

Zimmermann, G. / Prescott, S. / McIntyre, T. (1992): Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. In: Immunology today.

# Publikationsverzeichnis

#### Publikation

Wu, J. / Li, Y. / Schuller, R. M. / Li, L. / **Litmeyer, A-S.** / Bein, G. / Sachs, U. J. / Bayat, B. (2019): The nonconservative CD177 single-nucleotide polymorphism c.1291G>A is a genetic determinant for human neutrophil antigen-2 atypical/low expression and deficiency. In: Transfusion 59 (5), S. 1836-1842. doi: 10.1111/trf.15222.

#### Poster

Bayat, B. / Litmeyer, A-S. / Wienzek, S. / Wolff, J. C. / Santoso, S. / Sachs, U. J. / Bein, G. (2017): Next generation sequencing analysis of CD177 gene in CD177 negative and positive donors., 50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI), Köln, 24.-27. Oktober 2017.

### Ethikvotum

Die Experimente dieser Dissertation basieren auf dem von der Ethik-Kommssion des Fachbereichs 11 Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen genehmigtem Votum **05/2000 vom 15.02.2000** bezüglich der Verwendung von Restblut, das bei der Herstellung und Prüfung von Blutprodukten anfällt und mit Einverständnis der Spenderinnen und Spender und nach Anonymisierung für Forschungszwecke eingesetzt werden darf.

### **Erklärung zur Dissertation**

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

Ort/Datum: Gießen, den 02. Dezember 2021

.....

(Unterschrift)

## Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Gregor Bein für die Überlassung des Themas, die umsichtige Betreuung, den fachlichen Rat und die Unterstützung. Durch seine Zuverlässigkeit, seine Korrekturen und Anmerkungen war es mir möglich, diese Arbeit abzuschließen. Ich möchte mich außerdem bei Frau Dr. rer. nat. Behnaz Bayat bedanken, die bei den Experimenten, bei der Auswertung und bei der Weiterentwicklung des Themas stets eine große Stütze war. Durch sie durfte ich sehr viel über neutrophile Granulozyten, Genetik, Bioinformatik und über zahlreiche Labormethoden lernen. Bei Herrn Dr. med. PhD Jens-Christian Wolff, Annalena Traum und allen MTAs des Institutes für klinische Immunlogie und Transfusionsmedizin am Standort Gießen möchte ich mich für die Einarbeitung, Einweisung und Hilfestellung bei den Arbeitstechniken ganz herzlich bedanken.