

Antigenität des Fc γ IIIb-Rezeptors: Immunologische und funktionelle Charakterisierung

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

vorgelegt von **Carmen Naumann** (geborene Bauer)
aus Wetter/Hessen

Gießen 2011

Aus dem Institut für klinische Immunologie und
Transfusionsmedizin am Klinikum der Justus-Liebig-Universität
Gießen

Leiter: Professor Dr. med. Gregor Bein

Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Ulrich Sachs

Gutachter: Prof. Dr. Lienhard Schmitz

Tag der Disputation: 30.08.2011

Meinen Eltern

Abkürzungen

ADCC	antikörperabhängige Zytotoxizität
AIN	Autoimmunneutropenie
Aqua dest	destilliertes Wasser
BCECF	compound 2'-7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	c-Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
D-PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Durchflusszytometer
FCS	Fetal calf serum
FNTHR	nichthämolytische Transfusionsreaktion
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HLA	Human Leucocyte Antigen
HNA	Human Neutrophil Antigen
HRP	Meerrettichperoxidase
INnKMT	Immunneutropenie nach Knochenmarktransplantation
IP	Immunpräzipitation
Kb	Kilobase
kDa	kiloDalton
MAIGA	Monoclonal antibody-specific immobilisation of granulocyte antigens- Assay
MFI	Mittlere Immunfluoreszenz
MHN	Morbus hämolyticus neonatorum
MiIN	Medikamenten induzierte Immunneutropenie
MFI	Mittlere Immunfluoreszenz
MPO	Myeloperoxidase
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphatase
NIN	Neonatale Immunneutropenie
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-chain-reaction
P/S	Benzylpenicillin-Procaïn und Dihydrostreptomycin

RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
SDS	Sodium dodecylsulfate
SSP	sequenz specific primer
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametylendiamin
TRALI	transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1 – 17
1.1 Granulozyten: Morphologie und Funktion	1
1.2 Neutrophile Granulozyten	1
1.3 Klinische Bedeutung granulozytärer Antigene und ihrer korrespondierenden Antikörper	3
1.3.1 Neonatale Immunneutropenie	4
1.3.2 Autoimmunerkrankungen mit Beteiligung granulozytärer Antikörper	6
1.3.3 Transfusionsreaktionen und granulozytenspezifische Antikörper	7
1.3.3.1 <i>Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI)</i>	7
1.3.3.2 <i>Febrile nichthämolytische Transfusionsreaktion (FNHTR)</i>	8
1.3.3.3 <i>Immunneutropenie nach Knochenmarktransplantation (INnKMT)</i>	8
1.4 Leukozyten- und granulozytenspezifische Antigene	9
1.4.1 Antigene und Antikörper	9
1.4.2 Leukozytäre Antigene	9
1.4.2.1 <i>Das HNA-4a-Antigen</i>	9
1.4.2.2 <i>Das HNA-5a-Antigen</i>	10
1.4.2.3 <i>Humane Leukozyten Antigene der Klasse I</i>	10
1.4.3 Granulozytenspezifische Antigene	10
1.4.3.1 <i>Seltene granulozytenspezifische Antigene</i>	10
1.4.3.2 <i>Das HNA-2-Antigen</i>	11
1.5 Granulozytenspezifische Antigene im Besonderen: Die Antigene HNA-1a und HNA-1b	12
1.5.1 Entdeckung der Antigene HNA-1a und HNA-1b	12
1.5.2 Die Fc γ -Rezeptoren	12

1.5.3 Aminosäurenaustausche auf CD16b: HNA-1a und HNA-1b	14
1.5.4 Aufbau und funktionelle Bedeutung der HNA-1a und HNA-1b Epitope	15
1.6 Zielsetzung der Arbeit	16

2. Material und Methoden **18 – 41**

2.1 Herstellung der Konstrukte	18
2.1.1 Granulozytenisolierung	18
2.1.2 Isolierung von RNA aus Granulozyten	19
2.1.3 Umschreibung von RNA in cDNA	19
2.1.4 Amplifikation der gesamten cDNA von FcγRIIIb	20
2.1.5 Separation von Nukeinfragmenten mittels Agarosegel-Elektrophorese	21
2.1.6 Isolierung und Reinigung von cDNA-Fragmenten	21
2.1.7 Restriktionsenzymverdau	22
2.1.8 Klenow-Reaktion	22
2.1.9 Ligation der FcγRIIIb-Fragmente in den Expressionsvektor pCDNA3.1	23
2.1.10 Transformation der Ligation in Escherichia coli Bakterien	23
2.1.11 Identifizierung inserttragender Klone	24
2.1.12 Mini- und Midi-Plasmidpräparation	24
2.1.13 Sequenzier-Reaktion	25
2.1.14 Mutagenese	26
2.2 Bearbeitung der Konstrukte	27
2.2.1 Transfektion in 293 Zellen	27
2.2.2 Klonierung und Kultivierung	28
2.2.3 Durchflusszytometrie	29
2.2.4 Messung der Klone am FACS	29
2.2.5 Biotinmarkierung von 293 F Zellen	30
2.2.6 Preclear von Zell-Lysaten	31
2.2.7 2fach Probenpuffer für SDS-Gele	31
2.2.8 Immunpräzipitation	31
2.2.9 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
2.2.10 Immunoblot (Semidryblot)	34

2.2.11 Monoclonal antibody-specific immobilisation of granulocyte antigens (MAIGA)-Assay	36
2.2.12 IgG-Bindungs-Assay (BCECF-Adhäsionstest)	37
2.3 Screening für Anti-Ond	38
2.3.1 DNA-Isolierung	38
2.3.2 PCR-SSP	38
2.3.3 Serologische Typisierung durch Lymphozytenimmunfluoreszenztest	39
2.4. EBV-Transformation	40
3. Ergebnisse	42 – 68
3.1 Antigenität des FcγIIIb-Rezeptors	42
3.1.1 Herstellung der Varianten	42
3.1.2 Epitopmapping: Charakterisierung der allelspezifischen monoklonalen Antikörper	47
3.1.3 Epitopmapping der Varianten des FcγRIIIb in der Durchflusszytometrie	50
3.1.4 Epitopmapping der Varianten des FcγRIIIb in der Immunpräzipitation	53
3.1.5 Funktionelle Relevanz der Epitope im Hinblick auf die Bindung von IgG	55
3.2 Ond	57
3.3 EBV-Zellen	59
4. Diskussion	60 – 68
4.1 Epitopmapping des FcγIIIb-Rezeptors	60
4.2 Funktionelle Bedeutung der Stammformen und Varianten	65
4.3 Ond	66

4.4 EBV-Zellen	68
5. Literaturliste	69 – 75
6. Anhang	76 – 80
6.1 Deutsche Zusammenfassung	76
6.1.1 Epitopbildung und IgG-Bindung von HNA-1a und HNA-1b	76
6.1.2 OND	77
6.1.3 EBV-Zellen	78
6.2 Abstract (englische Zusammenfassung)	79
6.2.1 Epitopes and IgG binding properties of HNA-1a and HNA-1b	79
6.2.2 OND	80
6.2.3 EBV-Cells	80
7. Selbstständigkeitserklärung	81
8. Danksagung	82

1. Einleitung

1.1 Granulozyten: Morphologie und Funktion

Granulozyten gehören zur Gruppe der Leukozyten und machen mit etwa 60 bis 70 % den größten Anteil der Blutleukozyten aus. Ausgehend von einer myeloiden Vorläuferzelle werden sie im Knochenmark über mehrere Differenzierungsstadien gebildet. Alle Granulozyten enthalten Myeloperoxidase sowie leukozytäre Enzyme (Phosphatasen, Oxidasen, Lipasen und Amylasen). Leukozyten besitzen besondere Fähigkeiten, wozu insbesondere die Adhärenz an das vaskuläre Endothel, die chemotaxis-vermittelten Migration (Diapedese) in das Gewebe sowie die Phagocytose gehören. Die Lebensdauer der Granulozyten beträgt dabei nur zwei bis drei Tage, danach gehen sie in den programmierten Zelltod (Apoptose). Zahlreiche Granula innerhalb des Zytoplasmas gaben den Granulozyten ihren Namen. Entsprechend der Anfärbbarkeit ihrer spezifischen Granula mit panoptischen Färbemethoden unterscheidet man neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten.

1.2 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile bilden mit 90 % die größte Gruppe der Granulozyten. Die Bezeichnung „neutrophil“ ist historisch hergeleitet aus der Anfärbbarkeit der massenhaft vorhandenen Granula mit neutralen Farbstoffen. Die Granula selbst werden, basierend auf der Nachweisbarkeit des Proteins Myeloperoxidase, nach Paul Ehrlich in zwei Gruppen unterteilt: solche, die Myeloperoxidase enthalten, werden als primäre (azurophile Granula), solche, die das Protein nicht enthalten, als sekundäre (spezifische Granula) bezeichnet. Daneben kennt man heute die sekretorischen Vesikel sowie zahlreiche weitere Unterkompartimente (Borregaard et al., 1997).

Die Funktionen der granulären Kompartimente sind vielfältig und greifen ineinander über. In den *azurophilen* Granula (Lysosomen) finden sich „saure Hydrolasen“ wie Elastasen, Defensine, Myeloperoxidase sowie Muraminidase. Sie

1. Einleitung

sind demnach reich an bakteriziden und hydrolytisch aktiven Proteinen. Durch ihren Anteil an Myeloperoxidase sind sie besonders wichtig, um reaktive Sauerstoffmetabolite zu generieren. Die *spezifischen* Granula enthalten keine Myeloperoxidase, dafür aber Lactoferrin. In ihrer Membran finden sich zudem Rezeptorproteine wie die β 2-Integrine; weiterhin Gelatinase und Kollagenase. Diese Proteine spielen gemeinsam eine wichtige Rolle bei der Transmigration: einerseits, indem sie die Adhäsion an die Endothelzellen ermöglichen, andererseits, indem sie zum Abbau der extrazellulären Matrix befähigt sind. In der Membran der spezifischen Granula liegt auch das Protein Fc γ RIIIb (CD 16b), das exklusiv auf neutrophilen Granulozyten exprimiert wird (vgl. 1.5.2).

Die Hauptaufgabe der neutrophilen Granulozyten besteht in der Phagozytose und dem intrazellulären Abtöten von pathogenen Mikroorganismen und Gewebetrümmern. Neutrophile stellen die erste, schnell mobilisierbare Leukozytenbarriere gegen bakterielle Infektionserreger dar, wobei hier eher ihre große Anzahl als ihre Fähigkeit zu langfristigen Auseinandersetzungen von Bedeutung sein dürfte. Bei chronischen Infekten kommen daher eher Makrophagen zum Einsatz.

Im Gegensatz dazu sind neutrophile Granulozyten, wie oben erwähnt, besonders schnell und in großer Zahl an einen Ort bakterieller Infektion oder zerfallenden Gewebes, wie beispielsweise bei einem Myokardinfarkt, zu mobilisieren. Ursache dafür ist, dass sie auf chemotaktische Reize sehr sensibel reagieren. Chemotaktische Stimuli sind unter anderem die Komplementfaktoren C5a und C3a (Chemotaxine), beziehungsweise auch C3b (Opsonin), die nach Komplementaktivierung entstehen, sowie Interleukine (insbesondere IL-8). Für ihre Hauptaufgabe, die Phagozytose und das Abtöten von Bakterien, ist eine Opsonisierung der Keime durch Immunglobulin (IgG) und Komplement (C3b) am effektivsten. Allerdings können neutrophile Granulozyten auch unabhängig von IgG/C3b Bakterien phagozytieren und diese abtöten. Phagozytose- und Abtötungsmechanismen erfolgen in ähnlicher Weise wie bei Makrophagen. Der grundsätzliche Unterschied ist aber, dass Neutrophile nach Aktivierung der Enzyme Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphatase (NADPH) und Myeloperoxidase die zur Abtötung der Bakterien genutzten reaktiven Sauerstoffmetaboliten (Superoxidanionen, Hydroxylradikale sowie Wasserstoffperoxid) in wesentlich stärkerem Ausmaß bilden können. Im Allgemeinen folgt

1. Einleitung

darauf eine (mehr oder weniger starke) Verdauung der abgetöteten Keime durch Hydrolasen und anderer Verdauungsenzyme, die in den azurophilen und spezifischen Granula bevorratet werden. Um die Beweglichkeit der Granulozyten im Rahmen der Abwehr zu erhöhen, kommt es auch zum Abbau der extrazellulären Matrix. Dazu werden granulozytäre Enzyme wie Kollagenase, Cathepsin G, Gelatinase, Elastase und Phospholipase A freigesetzt. Ausgeschüttete Zytokine hingegen sind chemotaktisch aktiv: sie stimulieren die autokrine Sekretion und können weitere Effektorzellen des Immunsystems aktivieren.

1.3 Klinische Bedeutung granulozytärer Antigene und ihrer korrespondierenden Antikörper

Die für die Adhäsion und Phagozytose wesentlichen Rezeptoren auf der Granulozytenoberfläche (β 2-Integrine; CD16b, CD177) weisen Polymorphismen auf. So kann es unter geeigneten Umständen zur Immunisierung und damit zur Antikörperbildung kommen. Antikörper gegen granulozytenspezifische Antigene können eine Vielzahl von Erkrankungen und Transfusionsreaktionen verursachen. Bei diesen Antikörpern handelt es sich um Allo- und Autoantikörper. Erstere rufen die häufigste aller Erkrankungen im Bereich der granulozytenspezifischen Antikörperreaktionen hervor, die Neonatale Alloimmunneutropenie (NIN), doch können die Alloantikörper auch eine transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI), die febrile, nichthämolytische Transfusionsreaktion (FNTHR) und die Immunneutropenie nach Knochenmarktransplantationen verursachen. Autoantikörper gegen Granulozytenantigene sind ursächlich für Autoimmunneutropenien (AIN). Folgende Tabelle, modifiziert nach Bux (1996), zeigt eine Übersicht der bekannten immunogenen Strukturen auf Granulozyten und die klinische Relevanz der korrespondierenden Antikörper. Auf die einzelnen Erkrankungen soll in den nächsten Kapiteln näher eingegangen werden. Sie sollen hinsichtlich ihrer Entstehung, des typischen Krankheitsbildes und der Therapiemöglichkeiten näher beleuchtet werden.

1. Einleitung

Rezeptor	Antigen	Klinische Bedeutung der korrespondierenden Antikörper	Antigenfrequenz (Europäer)
CD 11a	HNA-5a	(NIN)	99%
CD 11b	HNA-4a	NIN	96%
CD16b	HNA-1°	NIN, AIN, TRALI	54 %
	HNA-1b	NIN, AIN, TRALI	88 %
	HNA-1c	NIN	5 %
	NC1	(NIN)	Unbekannt
	ND 1	AIN	Unbekannt
	LAN	NIN	>99%
	SAR	NIN	>99%
CD 177	HNA-2	NIN, TRALI, AIN, INnKMT, MiIN	97%
CTL2	HNA-3a	TRALI, FNHTR	95%
Unbekannt	NB 2	FNHTR, TRALI, NIN	32%
Unbekannt	NE 1	AIN	Unbekannt
Unbekannt	9a	NIN	58%

Tabelle 1/1: Zusammenstellung granulözytärer Antigene

Tabelle modifiziert nach Bux (1996). Abkürzungen: AIN = Autoimmunneutropenie, NIN = neonatale Alloimmunneutropenie, TRALI = transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz, INnKMT = Immunneutropenie nach Knochenmarkstransplantation, FNHTR = febrile, nichthämolytische Transfusionsreaktion, MiIN = Medikamenten-induzierte Immunneutropenie.

1.3.1 Neonatale Immunneutropenie

Die ersten Berichte über diese Erkrankung stammen aus den Jahren 1950 (Slobody et al.) sowie 1956 (Luhby et al.). Beide vermuteten bereits ein immunologisches Geschehen als Ursache der Erkrankung.

1. Einleitung

Auf eines von zweitausend Neugeborenen kommt ein Fall von neonataler Immuneutropenie. Es handelt sich um ein klinisches Syndrom mit vergleichbarer Pathogenese wie der Morbus haemolyticus neonatorum (MHN). Ursache ist, dass es während der Schwangerschaft zu einer Immunisierung gegen granulozytenspezifische, paternale Antigene auf den kindlichen weißen Blutzellen kommt, mit entsprechender Ausprägung von Alloantikörpern. In etwa 0,1 bis 0,4 % aller Schwangerschaften lassen sich solche spezifischen Antikörper nachweisen (Verheugt et al., 1979; Clay et al., 1984; Bux et al., 1992).

Die häufigsten beschriebenen Entitäten sind gegen die Antigene HNA-1a, HNA-1b, HNA-1c und HNA-2a gerichtet (Lalezari et al., 1960; Lalezari et al., 1971; Bux et al., 1992b). Jedoch wurden auch NIN-Fälle durch Antikörper gegen die granulozytären Antigene CN1, LEA und SL (Madyastha et al., 1983; Rodwell et al., 1991; Stroncek et al., 1994) beschrieben. Anders als beim MHN ist eine Immunisierung und Ausbildung von Antikörpern mit klinischer Manifestation beim Neugeborenen bereits während der ersten Schwangerschaft einer Frau beschrieben. Die von der Mutter gebildeten Antikörper gelangen diaplazentar in den fetalen Kreislauf und reagieren dort mit den kindlichen Granulozyten. Vermutlich werden die beladenen Granulozyten im retikuloendothelialen System durch Phagozytose „gemausert“ (Boxer und Stossel, 1974). Das Blut des Kindes weist oft eine normale bis verminderte Gesamtleukozytenzahl bei isolierter Neutropenie mit kompensatorischer Monozytose und (häufig) absoluter Eosinophilie auf. Im Knochenmarkausstrich zeigt sich meist ein hyperzelluläres Mark mit Anstieg vorangehender Differenzierungsstufen der Granulozyten (Linksverschiebung). Kommt das Kind mit einer NIN zur Welt, ist es infektanfällig. Bei den klinisch manifesten Infekten dominieren Infektionen der Haut und des Respirationstraktes, ferner finden sich auch Entzündungen des Urogenital- und Gastrointestinaltraktes. In sehr schweren Fällen kann es zur Sepsis kommen. Es kommt binnen 3 bis 28 Wochen, durchschnittlich innerhalb von 11 Wochen, zu einem Abbau der passiv erworbenen Antikörper mit nachfolgender spontaner Remission der Neutropenie (Mc Cullough et al., 1989). In der Therapie der NIN ist die gezielte antibiotische Behandlung der Infektionen vorrangig. Die Gabe von Granulozyten-Kolonie-wachstumsstimulierendem Faktor (G-CSF) ist schwersten Verläufen vorbehalten.

Neben der diaplazentaren Übertragung von Alloantikörpern kann in seltenen Fällen auch die Übertragung von mütterlichen Autoantikörpern zu einem NIN-ähnlichen Bild führen.

Noch seltener ist die Ausbildung von so genannten Isoantikörpern. Sie können von Personen gebildet werden, die einen Defekt für eine gewöhnlich in der Granulozytenmembran vertretenen Struktur aufweisen. Der die Immunreaktion auslösende Kontakt mit dem Protein erfolgt in der Regel in der Schwangerschaft, seltener im Rahmen der Bluttransfusion. Die häufigste beschriebene Isoimmunisierung erfolgt bei Frauen, die selbst den Rezeptor CD16b nicht besitzen. Sie sind augenscheinlich klinisch gesund, d. h. eine Störung der granulozytären Funktion ist nicht bekannt (Huizinga et al., 1990; Stronceck et al., 1991; Carton et al., 1992). Dieser Phänotyp wird als NA_{null} bezeichnet und wird in der kaukasischen Bevölkerung mit einer Häufigkeit von etwa 0,12 % gefunden (Fromont et al., 1992). Aus letztlich nicht geklärtem Grund bildet aber nicht jede Frau mit diesem Phänotyp Antikörper in der Schwangerschaft aus, obwohl das Neugeborene ein intaktes CD16b-Allel vom Vater geerbt hat (de Haas et al., 1995).

Die immunologische Diagnose einer NIN erfordert den Nachweis von Alloantikörpern im mütterlichen Serum sowie den Nachweis der entsprechenden Merkmalskombinationen bei Mutter und Kind.

1.3.2 Autoimmunerkrankungen mit Beteiligung granulozytärer Antikörper

Bei der Autoimmunneutropenie kommt es zu einem stark erhöhten Umsatz von neutrophilen Granulozyten durch eine gesteigerte Mauserung nach Beladung mit Autoantikörpern. Dabei unterscheidet man primäre von sekundären Formen. Erstmals als klinische Entität beschrieben wurde die Autoimmunneutropenie durch Stahlie (1965) und Zuelzer und Bajoghli (1964).

Bei der *primären* Form kommt es zu einer mäßig bis sehr stark ausgeprägten (absoluten) Neutropenie mit oder ohne begleitende Infekte, definitionsgemäß liegt aber keine weitere Erkrankung vor, die mit einer immunologisch bedingten Neutropenie einhergehen kann. Die primäre Autoimmunneutropenie ist in aller Regel eine pädiatrische Erkrankung, das Alter der Patienten bei Erstmanifestation

1. Einleitung

liegt zwischen dem fünften und fünfzehnten Lebensmonat. Mädchen sind dabei häufiger betroffen als Knaben (McCullough et al., 1987b). Die Dauer der neutropenischen Phase beträgt meist zwischen dreizehn und zwanzig Monaten (Lalezari et al., 1986). In fünfundneunzig Prozent der Fälle kommt es zu einer spontanen Remission (Bux et al., 1998). Gelegentlich weisen die granulozytenspezifischen Autoantikörper eine Pseudo-Spezifität für HNA-1a auf, gelegentlich auch für HNA-1b oder HNA-2. Die Ursache ist, wie bei den meisten primären Autoimmunreaktionen, unbekannt. Auch das häufige Phänomen der Spontanremission ist immunologisch unverstanden.

Die *sekundäre* Form der AIN liegt vor, wenn die Neutropenie in Verbindung mit einer anderen Autoimmunerkrankung auftritt, häufig ist dies ein Lupus erythematodes (Bux und Mueller-Eckhardt, 1992).

Da in beiden Fällen die Ursachen der Autoimmunisierung unbekannt sind, ist keine kausale Therapie möglich. Häufig wird durch prophylaktische Antibiose einem Infekt vorgebeugt oder ein akuter Infekt durch Antibiotikagabe behandelt. Der Stellenwert von G-CSF ist umstritten.

1.3.3 Transfusionsreaktionen und granulozytenspezifische Antikörper

1.3.3.1 Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI)

Voraussetzung für eine transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI) ist in der Regel die Transfusion eines plasmahaltigen Blutprodukts, das granulozytenspezifische Antikörper oder solche, die gegen das HLA-System gerichtet sind, enthält. In der Regel stammen solche Blutkomponenten von weiblichen Blutspendern mit positiver Schwangerschaftsanamnese. Seltener wird ein TRALI durch Antikörper ausgelöst, die sich im Blut des Empfängers befinden und sich gegen granulozytäre Merkmale auf den Zellen des Blutspenders richten (Sachs und Bux, 2003; Popovsky et al., 1983; Yomtovian et al., 1984; Bux et al., 1994). Tritt einer der beiden Fälle auf, kommt es zu einem nichtkardiogenen Lungenödem (Popovsky, 2001). Es wurde zunächst vermutet, dass es durch die Antikörperbindung an Granulozyten zu einer Komplementaktivierung kommt; die so aktivierten Granulozyten produzieren daraufhin Sauerstoffmetabolite und setzen lysosomale Enzyme frei. Diese Substanzen schädigen das Gefäßendothel, ermöglichen den Austritt von Plasma in das Interstitium und führen so zum

1. Einleitung

Lungenödem (Seeger et al., 1990; Sacks et al., 1978). Mittlerweile ist es aber gesichert, dass anti-leukozytäre Antikörper des Spenders, seltener des Empfängers, eine unmittelbare Leukozytenaktivierung und Leukozytenagglutination auslösen können (Sachs et al., 2006). Der eigentliche Pathomechanismus ist jedoch bisher noch nicht hinreichend erforscht.

Die klinischen Symptome der TRALI sind unspezifisch. Häufig kommt es ein bis sechs Stunden nach Transfusion zu akutem Husten und Dyspnoe. Ferner kann es zum systolisch-diastolischen Blutdruckabfall kommen, bei normalem zentralem Venendruck. Auch Fieber, Schüttelfrost, Übelkeit oder Erbrechen sind beschrieben (von dem Borne et al., 1995). Das Lungenödem bedingt, dass in etwa 80 % der Fälle eine Intubation und maschinelle Beatmung des Patienten erforderlich wird. In etwa 5 bis 20 % der Fälle verstirbt der Patient an den Folgen der TRALI. Gegenwärtig gilt die TRALI daher als die häufigste Todesursache bei Zwischenfällen im Rahmen der Bluttransfusion (Toy et al., 2005).

1.3.3.2 Febrile nichthämolytische Transfusionsreaktion (FNHTR)

Im Unterschied zu den meisten TRALI-Fällen reagieren beim Krankheitsbild der febrilen nicht-hämolytischen Transfusionsreaktion nicht die Antikörper des Spenders mit den Zellen des Empfängers, sondern der Empfänger besitzt Antikörper, die dann mit den Zellen des Spenders reagieren. In den meisten Fällen handelt es sich hierbei um Antikörper des HLA-Systems oder um thrombozytenspezifische Antikörper. Jedoch sind auch Fälle von FNHTR durch Granulozytenantikörper berichtet (Huang et al., 1992). Bei den Patienten kommt es zu Fieber (definiert als ein Temperaturanstieg um mehr als ein 1 °C) binnen einer Stunde nach Transfusion. Seit Einführung der generellen Leukozytendepletion für zelluläre Blutkomponenten wird die FNHTR in Deutschland kaum mehr beobachtet.

1.3.3.3 Immunneutropenie nach Knochenmarktransplantation (INnKMT)

Über Immunneutropenien nach Knochenmarktransplantation wurde in der Literatur mehrfach berichtet (Herzog et al., 1987; Stroncek et al., 1993). Während im ersten berichteten Fall der Patient einen Antikörper gegen HNA-1a entwickelte, ist der

1. Einleitung

zweite Fall auf einen Anti-HNA-2-Antikörper zurückzuführen. In einer Studie zeigte sich, dass 44 % der Empfänger von Knochenmark oder Stammzellen neutrophilenspezifische Antikörper entwickeln. Von diesen entwickelten etwa 25 % vorübergehend eine Neutropenie (Klumpp et al., 1996). Über den Pathomechanismus, die niedrige klinische Penetranz und geringe Persistenz der Alloimmunisierung gibt es keine hinreichenden Erkenntnisse.

1.4 Leukozyten- und granulozytenspezifische Antigene

1.4.1 Antigene und Antikörper

Jede Substanz, die eine spezifische Immunantwort auslösen beziehungsweise mit Komponenten einer bereits ablaufenden Immunantwort reagieren kann, ist ein Antigen. Antikörper hingegen sind Plasmaproteine, die spezifisch an Antigene binden und als Reaktion auf eine Immunisierung mit dem spezifischen Antigen entstehen. Jedes Antikörpermolekül besitzt eine einzigartige Struktur, die es ihm ermöglicht, ein ganz bestimmtes Antigen zu erkennen. Antikörper werden auch als Immunglobuline bezeichnet.

1.4.2 Leukozytäre Antigene

Neben Antigenen, die ausschließlich auf Granulozyten (aber nicht auf anderen Blutzellen) nachgewiesen werden (auf diese soll später genauer eingegangen werden), gibt es eine Vielzahl von immunogenen Strukturen, die zusätzlich auf anderen Zellen vorkommen. Dazu zählen die Antigene HNA-4a (auf CD11b), HNA-5a (auf CD11a) sowie HNA-3 (auf CTL2), ferner das 9a-Antigen sowie die humanen Leukozytenantigene (HLA) der Klasse I und II.

1.4.2.1 Das HNA-4a-Antigen

Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten sind Träger des HNA-4a-Antigens (alte Nomenklatur: Mart-Antigen), das erstmals 1986 beschrieben wurde (Kline et al., 1986). Das Epitop befindet sich auf der α L-Kette (CD11b) des Leukozytenadhäsionskomplexes CD11b/CD18 (Mac-1). Antikörper gegen diese Struktur wurden im Blut von nichttransfundierte, multiparen Frauen gefunden

(van der Schoot, 1996). Mittlerweile ist nachgewiesen, dass diese Antikörper eine neonatale Immuneutropenie auslösen können (Sachs et al., 2004).

1.4.2.2 Das HNA-5a-Antigen

Auch HNA-5a (alte Nomenklatur: Ond-Antigen) findet sich auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Das Antigen ist auf der α M-Kette (CD11a) des Leukozytenadhäsionskomplexes CD11a/CD18 (LFA-1) lokalisiert. Antikörper gegen das Antigen sollen ebenso wie solche gegen das HNA-4a-Antigen Alloimmunneutropenien (Conway et al., 1987; Hartmann und Wright, 1991) auslösen können. Die Antigenhäufigkeit war bisher unklar und wurde erst im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht.

1.4.2.3 Humane Leukozytenantigene der Klasse I

Moleküle, die der HLA-Klasse I angehören, finden sich auf allen kernhaltigen Zellen und auf Thrombozyten. Sie bestehen aus einer membrangebundenen α -Kette mit drei Domänen, die die HLA-Regionen kodieren, und einer nicht kovalent gebundenen β -Kette. HLA-Klasse I-Merkmale sind vor allem bei der Erkennung von körpereigenem beziehungsweise körperfremdem Gewebe wichtig und spielen medizinisch somit eine wichtige Rolle bei Transplantationen.

1.4.3 Granulozytenspezifische Antigene

1.4.3.1 Seltene granulozytenspezifische Antigene

In der Literatur gibt es einige Antigene, die nicht besonders häufig beschrieben worden sind und deren molekulare Charakterisierung nicht gelungen ist. Dazu zählt das NC1-Antigen, das 1970 im Rahmen einer serologischen Untersuchung erstmals entdeckt wurde (Lalezari et al., 1970). Erst 1995 zeigten Bux und Mitarbeiter, dass das NC1-Antigen identisch mit dem HNA-1b-Antigen ist. Auf CD16c lokalisiert sind das über Isoantikörper definierte Antigen ND1 (McCulloch et al., 1987) sowie die hochfrequenten Antigene LAN und SAR (Metcalf und Waters, 1992; Bux et al., 1994). Ein weiteres, bisher nicht weiter biochemisch charakterisiertes Antigen, ist das NE-Antigen. Es wurde im Serum eines AIN-Patienten gefunden (Claas et al., 1979).

Ähnliches gilt für das NB2-Antigen, dessen Erstbeschreibung 1982 durch Huang und Mitarbeiter erfolgte. Es sind Fälle von NIN und TRALI durch Antikörper gegen NB2 bekannt (Lalezari et al., 1982; van Buren et al., 1990). Eine biochemische Charakterisierung des Antigens ist jedoch nicht erfolgt, allerdings bestehen bereits Zweifel daran, dass es sich um das antithetische Allel zu HNA-2 (NB1) handelt (Stroncek et al., 1993a). Im Jahr 1965 wurde das 9a-Antigen erstmals im Serum einer Frau beschrieben, die mehrfach schwanger war. Das Antigen soll sowohl identisch mit dem NB2-Antigen (Lalezari et al., 1982) als auch mit dem Monozytenantigen-1 (Jager et al., 1984) sein. Eine nähere Charakterisierung erfolgte bisher aber ebenfalls nicht.

Eine ganze Gruppe seltener Antigene gehören zu denen der „5-Antigene“. Lymphozyten, Thrombozyten, Endothelzellen, Placenta- und Nierengewebe (McCulloch et al., 1987) sind Träger der 1964 erstmals (Leeuwen et al., 1964) beschriebenen Antigene 5a (neue Nomenklatur: HNA-3bW) und 5b (neue Nomenklatur: HNA-3a). Deren Epitope befinden sich möglicherweise auf einem 70-95kDa Glykoprotein (de Haas et al., 1995). Sie sind klinisch besonders bei TRALI-Reaktionen von Bedeutung (Lalezari et al., 1975; Nordhagen et al., 1986; Seeger et al., 1990). Weiterhin gibt es noch zwei weitere hochfrequente Antigene, LAN und SAR. Erstes wurde bei einer Untersuchung auf NIN im Serum einer australischen Frau gefunden (Rodwell et al., 1991). Das SAR-Antigen wurde im Serum einer türkischen Frau gefunden, deren Säugling an NIN erkrankte (Bux et al., 1994).

1.4.3.2 Das HNA-2-Antigen

Beim HNA-2-Antigen handelt es sich neben den Polymorphismen auf CD16b um eines der wichtigsten der granulozytenspezifischen Antigene. Eine Alloimmunisierung gegen HNA-2 stellt die zweithäufigste Ursache der NIN dar. Außerdem können HNA-2-spezifische Antikörper eine TRALI-Reaktion auslösen (Bux et al., 1996; Leger et al., 1999), und es kann zu verlängerter Neutropenie nach Knochenmarktransplantation (Stroncek et al., 1993) kommen. Außerdem kann das HNA-2-Antigen die Zielstruktur medikamentös induzierter granulozytärer Antikörper (Stroncek et al., 1993a, 1993b) sowie Autoantikörper (Eastlund et al., 1992) sein.

Erstmals beschrieben wurde das Antigen 1971 während einer Untersuchung bezüglich einer NIN. HNA-2 ist neutrophilenspezifisch und wird nicht auf anderen Leukozyten exprimiert (Goldschmeding et al., 1992; Stroncek et al., 1998). Innerhalb der Granulozytenpopulation eines Individuums tragen allerdings nicht alle neutrophilen Granulozyten das Antigen (Lalezari et al., 1971; Verheugt et al., 1978). Das HNA-2-Antigen entspricht dem granulozytären Glykoprotein CD 177 (alte Nomenklatur: NB1) (Stroncek et al., 1990; Skubitz et al., 1991) und ist mit einer GPI-Verankerung (Skubitz et al., 1991; Goldschmeding et al., 1992) befestigt.

1.5 Granulozytenspezifische Antigene im Besonderen: Die Antigene HNA-1a und HNA-1b

1.5.1 Entdeckung der Antigene HNA-1a und HNA-1b

Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts machten Wissenschaftler die Entdeckung, dass Seren mancher Personen, zumeist die von Frauen nach mehreren Schwangerschaften, Agglutinationen von Leukozyten *in vitro* hervorrufen können. Lalezari und Mitarbeiter entdeckten in einem solchen Serum das erste granulozytäre Antigen, HNA-1a (NA1 der alten Nomenklatur), im Serum der Mutter eines Patienten mit NIN. Vierzehn Jahre später zeigten Lalezari und Radel (1974) das dazugehörige antithetische Allel HNA-1b (NA2 der alten Nomenklatur). Später zeigte sich, dass beide Antigene auf CD16b (Werner et al., 1986) der neutrophilen Granulozyten lokalisiert sind.

1.5.2 Fc γ -Rezeptoren

Die in dieser Arbeit im Mittelpunkt stehenden Antigene HNA-1a und HNA-1b liegen auf einem Fc γ Rezeptor, dem Fc γ -Rezeptor IIIb (Fc γ RIIIb). Er wird wie alle anderen Fc γ Rezeptoren aufgrund seiner Disulfidbrücken und den sich daraus ergebenden IgG-ähnlichen beiden Domänen zur Immunglobulinsuperfamilie gezählt. Während die zur Membran proximale Domäne kritisch für die Ligandenbindung ist, ist die genaue Funktion der distalen Domäne noch nicht bekannt. Die Rezeptoren sind in der Lage, IgG-Moleküle über ihren Fc-Anteil mit sehr niedriger Affinität zu binden. Dies hat zur Folge, dass sie insbesondere an der Entfernung von Immunkomplexen, an der Phagozytose von opsonierten Antigenen, an der Signalgebung zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren und

1. Einleitung

an der Regulation der Immunglobulinsynthese beteiligt sind (Huizinga et al., 1990; Wallace et al., 1994). Außerdem spielen sie in der Pathophysiologie verschiedener Krankheitsbilder eine zentrale Rolle (Witte und Schmidt, 1992; Kimberley et al., 1995).

Der Fc γ III-Rezeptor (CD 16) ist ein Molekül mit einem Gewicht von 50-80kDa. Er wird auf Neutrophilen, NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen und einigen T-Zellen exprimiert. Grundsätzlich werden zwei Formen des Fc γ -Rezeptors unterschieden: während Fc γ RIIIa als transmembranöses, heterooligomeres Glykoprotein auf NK-Zellen und Monocyten zu finden ist (Huizinga et al., 1988; Scallon et al., 1989; Lanier et al., 1989 und 1991; Kinet et al., 1992), kommt Fc γ RIIIb, auf dem HNA-1a und HNA-1b liegen, ausschließlich auf neutrophilen Granulozyten vor. Pro Granulozyt werden etwa 100 000 bis 300 000 Rezeptoren exprimiert (Huizinga et al., 1990). CD16b ist per Glykosylphosphatidylinositolbrücke auf der Membran verankert. Zu den Funktionen gehört die „Mithilfe“ bei der Beseitigung von Immunkomplexen aus dem Organismus. Er verbindet die humorale und zelluläre Abwehr und wirkt bei der antikörperabhängigen Zytotoxizität (ADCC) mit.

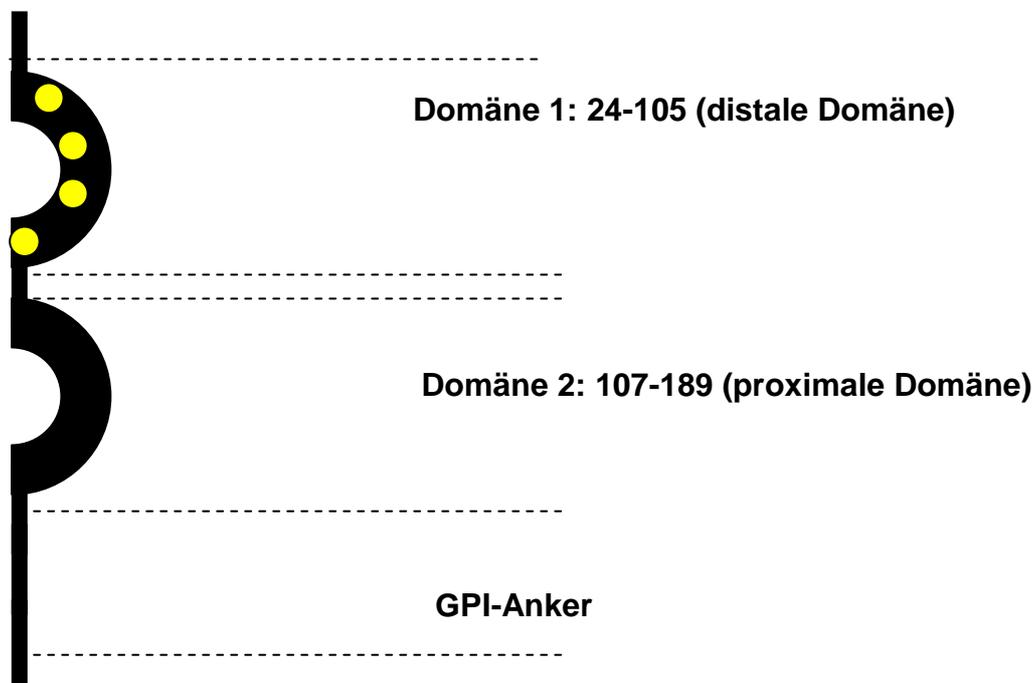
Ferner findet sich eine lösliche Variante von CD16b in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie Plasma, Aszites, Lymphe oder Tränenflüssigkeit (Huizinga et al., 1990b). Diese lösliche Form des Rezeptors ist ein gutes Maß für die Gesamtzahl der Granulozyten eines Individuums und hat bei Entzündungsreaktionen einen wichtigen Einfluss (de Haas et al., 1995b).

Die kodierenden Gene für Fc γ Rezeptoren liegen auf Chromosom 1. Beide Rezeptoren unterscheiden sich lediglich in 12 Basenpaaren, die zu sechs Aminosäureaustauschen führen, wobei eine Punktmutation ein Stoppcodon in ein kodierendes Codon verwandelt; Fc γ RIIIa ist dadurch am N-Terminus um 21 Aminosäuren länger als Fc γ RIIIb. Auf die weiteren fünf Aminosäureaustausche soll in Kapitel 1.7.3 näher eingegangen werden. Das Fehlen von Fc γ RIIIb auf Granulozyten ist in der Literatur beschrieben und scheint, nach gegenwärtigem Erkenntnisstand, nicht mit einer Krankheitsentität verbunden zu sein (Huizinga et al., 1990a; Stroncek et al., 1991; vgl. auch 1.3.1).

1.5.3 Aminosäureaustausche auf CD16b: HNA-1a und HNA-1b

Es sind bisher drei Varianten des FcγRIIIb-Rezeptors beschrieben worden: HNA-1a (NA1 der alten Nomenklatur), HNA-1b (NA2 der alten Nomenklatur) sowie HNA-1c (SH der alten Nomenklatur), die alle auf der distalen Domäne des Rezeptors liegen. Die Antigene HNA-1a und HNA-1b spielen in der Granulozytenimmunologie eine herausragende Rolle, da sie für den allergrößten Teil der Alloimmunisierungen verantwortlich sind; die Isoform HNA-1c unterscheidet sich von HNA-1b lediglich durch einen weiteren Aminosäureaustausch an Position 78; Alloimmunisierungen gegen HNA-1c sind beschrieben, aber rar. Sequenzvergleiche von Individuen mit den Phänotypen HNA-1a und HNA-1b zeigen, dass sich die Merkmalsträger in fünf Basenaustauschen im codierenden Abschnitt der distalen Domäne von FcγRIIIb unterscheiden (Ory et al., 1989, 1989b). Einer der Basenaustausche ist stumm, so dass sich die Merkmalsträger in vier Aminosäurepositionen unterscheiden: diese liegen an den Positionen 36, 65, 82 und 106 des Proteins.

N-Terminus



C-Terminus

Abbildung 1/1: Schema eines FcγRIIIb-Rezeptors

Die vier Aminosäureaustausche liegen an der distalen Domäne des Rezeptors.

1. Einleitung

Die vier Aminosäureaustausche sind in Tabelle 2/1 zusammengefasst. Die Austausche bedingen zwei unterschiedlich glykosilierte Fc γ RIIIb-Formen. Die HNA-1a Form besitzt vier, die HNA-1b Form sechs mögliche N-Glykosilierungsstellen (Ory et al., 1989; Ravetch et al., 1989): durch die Aminosäureaustausche an den Positionen 65 und 82 entstehen in der HNA-1b Isoform zwei zusätzliche N-Glykosilierungsstellen. Daraus resultieren die unterschiedlichen Gewichte der beiden Isoformen; während HNA-1a zwischen 50 und 65 kDa schwer ist, ist HNA-1b mit 65 und 80 kDa etwas schwerer.

Aminosäureposition	HNA-1a	HNA-1b
36	Arg	Ser
65	Asn	Ser
82	Asp	Asn
106	Val	Ile

Tabelle 2/1 : Unterschiede in der Primärstruktur zwischen den Isoformen HNA-1a und HNA-1b des Fc γ RIIIb (CD16b)

Die vier Aminosäureaustausche für die Isoformen HNA-1a und HNA-1b des Fc γ RIIIb (CD16b) sind in dieser Tabelle zusammengefasst.

1.5.4 Aufbau und funktionelle Bedeutung der HNA-1a- und HNA-1b-Epitope

Der genaue Aufbau und die funktionelle Bedeutung der Epitope der beiden Isoformen sind nicht bekannt. Weder ist bekannt, welche Aminosäureaustausche für den Epitopaufbau relevant sind, noch ist bekannt, ob alle vier Austausche nötig sind, um eine Isoform zu bilden. Wie bereits beschrieben, kann es unter geeigneten Umständen zu einer Alloantikörperbildung kommen. Diese Antikörper können die bereits beschriebenen Erkrankungen auslösen. Zudem können die HNA-Antigene Zielstrukturen von granulozytären Autoantikörpern sein (Lalezari et al., 1974 und 1975, u. a.), die teilweise eine (scheinbare) Präferenz für eine der beiden Isoformen besitzen (Pseudospezifität).

Ziel dieser Arbeit wird es daher sein, zunächst die Epitope der Isoformen zu untersuchen und dabei festzustellen, welche Aminosäurepositionen für die Ausbidung der Epitope verantwortlich sind und ob alle Austausche für die

1. Einleitung

Ausprägung der einen oder der anderen Isoform von zentraler Bedeutung sind. Funktionelle Studien die Isoformen HNA-1a und HNA-1b betreffend liegen derzeit nur wenige vor. Jedoch gibt es Hinweise, dass Granulozyten, die die Isoform HNA-1a tragen, opsonierte Erythrozyten besser phagozytieren können als solche, die die Isoform HNA-1b tragen. Allerdings sind diese Untersuchungen *in vitro* unter Verwendung humaner Granulozyten durchgeführt worden (Salmon et al., 1990). Bei Individuen, die den NA_{null} Phänotyp tragen (also kein CD16b auf den neutrophilen Granulozyten exprimieren), konnten jedoch keine gehäuften Infektionen beobachtet werden (de Haas et al., 1995).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

HNA-1a und HNA-1b sind die beiden wesentlichen Isoformen des $Fc\gamma RIIIb$ -Rezeptors. Merkmalsträger unterscheiden sich grundsätzlich durch vier Aminosäureaustausche in der distalen Domäne des Rezeptors. Bisher ist nicht geklärt, welcher dieser Austausche für die Ausprägung des jeweiligen Antigens verantwortlich ist. Diese Information ist neben ihrer grundsätzlichen Bedeutung für das Verständnis der antigenen Strukturen auf $Fc\gamma RIIIb$ von medizinischer Relevanz im Rahmen des Nachweises von Allo- und Autoantikörpern gegen Granulozyten. Vor allem für ein automatisierbares Screening von Blutspendern auf granulozytäre Antikörper wird zukünftig auf rekombinante Proteine zurückgegriffen werden, deren Komposition gute Sensitivitäten und Spezifitäten sicherstellen müssen. Geeignete Peptide könnten sich aber auch für das Autoantikörperscreening bei Kindern mit Neutropenie als hilfreich erweisen. Um die Beteiligung der Aminosäuren am Aufbau der Epitope untersuchen zu können, war beabsichtigt, alle vier Aminosäuren zu „permutieren“, d. h. CD16b in allen jeweils möglichen Ausprägungen, in denen sich die vier Positionen zwischen HNA-1a und HNA-1b unterscheiden, zu exprimieren. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, insgesamt $4^2 = 16$ Varianten herzustellen, von denen je eine den bekannten Isoformen HNA-1a bzw. HNA-1b entspricht, die übrigen 14 jedoch Mischformen zwischen HNA-1a und HNA-1b darstellen. Mithilfe geeigneter allelspezifischer Antikörper für HNA-1a und HNA-1b soll dann geprüft werden,

1. Einleitung

unter welchen Bedingungen das Epitop für HNA-1a bzw. HNA-1b auf dem rekombinanten Protein vorhanden ist.

Im zweiten Teil der Arbeit soll eine zuverlässige PCR-SSP-Methode für den Genotyp HNA-5 auf CD11a entwickelt werden, um dessen Frequenz in verschiedenen Populationen ermitteln zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Herstellung der Konstrukte

2.1.1 Granulozytenisolierung

Die Isolierung der Granulozyten wurde modifiziert nach Boyum (1967) aus frisch entnommenen EDTA-Vollblut (Endkonzentration 2,69 mM) durchgeführt. Das Prinzip der Isolation beruht auf einer Sedimentierung der Erythrozyten und der Trennung von im Überstand verbleibenden Leukozyten. Dazu wurden zunächst 2,5 ml Dextranlösung (5% in „phosphate buffered saline“ ohne Calcium und Magnesium; PBS; pH 7,2) zu dem entnommenen EDTA-Blut gegeben, vermischt und für 30 min bei 37°C in 45° Schräglage inkubiert. So erfolgte die Sedimentierung der Erythrozyten. Der leuko- und thrombozytenreiche Plasmaüberstand wurde abgenommen und auf 2,5 ml Ficoll-Hypaque (Dichte 1,077g/cm³, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) geschichtet. Die Auftrennung der Blutkomponenten, bestimmt durch ihr unterschiedliches Gewicht, erfolgte durch anschließende Zentrifugation bei 300 g für 20 min. Im Sediment befanden sich nun die Granulozyten und Reste agglutiniertes Erythrozyten. Der gesamte Überstand (mit Monozyten, Lymphozyten und Thrombozyten) wurde abgesaugt und verworfen. Um die agglutinierten Erythrozyten zu lysieren, wurden 2 ml hypotone Ammoniumchloridlösung (1,55 M NH₄CL; 0,1 M KHCO₃; 1 mM Na₂-EDTA; pH 7,4) zum Sediment gegeben und 5 min im Eisbad inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension zwei Mal bei 130 g für 5 min mit PBS gewaschen. Zur Fixierung der Granulozytenmembran wurde das Zellpellet in 2 ml Paraformaldehydlösung (PFA 1% in PBS; pH 7,2) resuspendiert und 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Suspension zwei Mal für 5 min mit PBS bei 130 g gewaschen. Die Zellen wurden dann maschinell am Hämatologie-Analyzer (Sysmex) gezählt und die benötigte Zellkonzentration in PBS eingestellt. Für die Isolierung von RNA wurden die Granulozyten unfixiert weiterverwendet.

2.1.2 Isolierung von RNA aus Granulozyten

Die Isolierung der RNA erfolgte über RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aus unfixierten Granulozyten von Spendern, die für die Merkmale HNA-1a bzw. HNA-1b reinerbig positiv im Granulozytenlabor des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin unter Verwendung der Immunfluoreszenz mit Hilfe charakterisierter Antiseren phänotypisiert wurden. Insgesamt 5×10^6 Granulozyten wurden mit 350 μ l RLT-Puffer versetzt, gevortext und so lysiert. Das Lysat wurde nun in eine QIAshredder column überführt und für 2 min bei 12 000 rpm zentrifugiert. Dies bewirkte, dass das Lysat homogenisiert wurde. Die QIAshredder column wurde verworfen und zum homogenisierten Lysat wurden 350 μ l 70% Ethanol hinzu pipettiert und gut resuspendiert. Der Ethanol bewirkte eine bessere Bindung bei der anschließenden Zentrifugation an die Membran des Säulchens. 700 μ l des Lysat/Ethanol-Gemischs wurden auf eine Silicamembran gegeben, die die RNA bindet, und bei 12 000 rpm für 15 s zentrifugiert. Die Membran wurde nun zweimal gewaschen, um sämtliche Kontaminationen zu entfernen. Die Membran wurde nun in ein frisches Eppendorfgefäß überführt, von dem zuvor der Deckel entfernt wurde. Um die Membran zu trocknen, wurde sie für 1 min bei 12 000 rpm zentrifugiert. Dies sorgte dafür, dass eventuelle Ethanol-Reste entfernt wurden und so spätere Reaktionen der RNA nicht beeinflussen konnten. Die Membran wurde nun in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Um die RNA von der Membran zu lösen, wurden 37 μ l RNase-freies Wasser direkt auf die Membran pipettiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 1 min bei 12 000 rpm. Die RNA befand sich nun im Wasser, ihre Qualität und Quantität wurde am Nanodrop (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA) getestet und die RNA wurde sofort bei -80°C eingefroren oder direkt in cDNA umgeschrieben.

2.1.3 Umschreibung von RNA in cDNA

Zur Identifikation und Amplifizierung der HNA-1a- und HNA1b-kodierenden Sequenzen mit Hilfe molekularbiologischer Methoden, wurde die granulozytäre mRNA mit dem Ready-To-Go You Prime First Strand Beads Kit (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde die RNA zunächst für 10 min bei 65°C erhitzt und anschließend für 2 min auf Eis gestellt. Die abgekühlte, 33 μ l fassende RNA wurde nun in ein Reaktionsgefäß mit zwei First-Strand-Reaktion

Mix Beads gegeben, die sich am Boden des Gefäßes befinden sollten. Anschließend wurden 2 µl random hexamer pd(N)₆ Primer (Pharmacia, Piscataway, USA) zugegeben und das Gemisch für 1 min bei RT stehen gelassen und anschließend gevortext. Es folgte eine 60 minütige Inkubation bei 37°C, während dieser die Umschreibung erfolgte. Die fertige cDNA wurde bei -80°C gelagert.

2.1.4 Amplifikation der gesamten cDNA von FcγRIIIb

Um FcγRIIIb in seiner vollen cDNA-Länge herzustellen, wurden zunächst Primer für die später folgende PCR ausgesucht. Die Primer wurden, basierend auf den Daten von Ravetch und Perussia (1989), wie folgt gesetzt: 5`-TCTTTGGTGACTIONGTCCA-3` und 5`-AGAGGCCTGAGGATGAT-3` (Synthesen beider Oligonukleotide durch MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland). 5 µl cDNA aus Granulozyten von jeweils einem HNA-1a und HNA-1b typisierten Spender wurde wie folgt mit den weiteren PCR-Reagenzien gemixt: 8 µl Gene Amp 10× PCR Buffer, 200µmol/L dNTP (Ultrapure dNTP Set: je 1,25 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (beide Pharmacia, Erlangen, Deutschland), 0,5 µl in der Konzentration von 5 µmol/L beider bereits beschriebenen sequenz-spezifischer Primer und 0,5 U AmpliTaq Gold DNA-Polymerase (Perkin Elmer, Vaterstetten). Es folgte die PCR mit dem Gene-Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer, Vaterstetten) in 39 Zyklen, die so gewählt wurden: zunächst ein Zyklus zur Aktivierung der Polymerase für 5 min bei 95°C, dann 39 Zyklen wobei 1 min bei 95°C denaturiert wurde, für das Annealing wurde 1.30 min bei 47°C gewählt und für die Polymerisation 1 min bei 72°C. 5 µl des so entstandenen PCR-Produkts wurden in eine nested PCR eingesetzt, für die folgende Primer ausgesucht und genutzt wurden: 5`-CCACTCCAGTGTGGCATIONC-3` und 5`-GCCACTGCTCTTATIONACT-3`. Der PCR Ansatz glich, abgesehen von den Primern, dem ersten. Die Bedingungen der PCR waren folgende: 95°C für 5 min, Denaturierung bei 95°C für 45 s, Annealing bei 49°C für 50 s, Polymerisation bei 72°C für 1 min in 39 Zyklen. Der finale Zyklus belief sich auf 10 min bei 72°C, die Probe wurde anschließend auf 4°C abgekühlt und in einem 1,5%igen analytischen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe eines Transluminators im UV-Licht sichtbar gemacht.

2.1.5 Separation von Nukeinfragmenten mittels Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Auftrennung unterschiedlich großer DNA- bzw. RNA-Fragmente eingesetzt. Je nach der zu erwartenden Größe des Fragments wurden Agarosegelkonzentrationen zwischen 1,0 und 3,0 % gewählt. Je größer die zu erwartenden Produkte, desto niedriger sollte die Agarosekonzentration gewählt werden. Bei einem Fragment in der Größe von 0,2 bis 4,0 kB, wie im Fall von Fc γ R1IIb zu erwarten, wurde eine Konzentration von 1,5 % verwendet. Es wurden zum einen analytische Gele (ultra pure Agarose, GIBCO, Karlsruhe, Deutschland), zum anderen präparative Agarosegele (SeaKem GTG-Agarose, FMC Bioproducts, Rockland, USA) eingesetzt. Agarosepulver wurde dazu abgewogen und mit entsprechender Menge an 1 \times TAE (40mM TRIS-HCL; 1mM EDTA; 0,12% Eisessig) versetzt und durch Kochen gelöst. Nach einer kurzen Abkühlzeit wurde Ethidiumbromid (GIBCO, Karlsruhe) im Verhältnis 1:10.000 zugegeben und die noch flüssige Lösung in die gewünschten Gelschlitzen gegossen. Das Gel polymerisierte dann binnen 20 min aus. Anschließend wurden 5 μ l des zu testenden Produkts mit 1 μ l eines 6-fach konzentrierten Probenpuffers (40% Saccharose; 0,25% Bromphenolblau; 50mM EDTA) versetzt und aufgetragen. Als Standard zur Gewichtsschätzung des Probe diente ein Molekulargewichtsstandard (MW VI oder MW VII, Boehringer Mannheim, Deutschland), der ebenfalls auf dem Gel mitgeführt wurde. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte dann 30 min lang in 1 \times TAE unter konstanter Spannung bei 120 V. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die mit Ethidiumbromid interkalierenden Fragmente mit Hilfe eines Transluminators im UV-Licht sichtbar gemacht. Die Dokumentation der Reaktion erfolgte durch Aufnahme mittels einer Sofortbildkamera.

2.1.6 Isolierung und Reinigung von cDNA-Fragmenten

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Nukleinsäurenfragmente in einem präparativen 1,5%igen Agarosegel wurden die Banden, die später zur Direktsequenzierung oder Ligation eingesetzt werden sollten, mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die sich im ausgeschnittenen Agarosegel befindliche DNA wurde dazu zunächst mit dem 3-fachen Volumen des im

Kit enthaltenen Puffers QC versetzt und für 10 min bei 50°C aufgelöst. Es wurde 1 Gelvolumen 100 % Isopropanol zugegeben und die Lösung auf die QIAquicksäule pipettiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation von 1 min bei 13 000 rpm an die in der Säule befindliche Membran gebunden und zwei Mal mit 750 µl eines ethanolhaltigen Puffers für 1 min bei 13 000 rpm gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution der DNA durch Inkubation von 1 min mit Aqua dest. und Zentrifugation von 1 min bei 13 000 rpm. Konzentration und Qualität der DNA wurden maschinell am Nanodrop überprüft.

2.1.7 Restriktionsenzymverdau

1 µg des Plasmidvektors pCDNA3.1 mit Geneticinresistenz (Invitrogen, San Diego, USA) wurde mit 2 µl 10-fach konzentriertem BSA, 2 µl 10 × ECO RV Buffer (Promega, Mannheim, Deutschland) sowie 0,2 µl des Enzyms ECO RV (Promega, Mannheim) gemixt und mit Aqua dest auf 20 µl aufgefüllt. Das Enzym sorgte bei den Plasmidschnittstellen für glatte Enden (blunt-end). Der eigentliche Verdau erfolgte dann für 16 h bei 37°C. Nach diesem wurde der linearisierte Vektor gelelektrophoretisch vom unvollendeten, verdauten Vektor getrennt, ausgeschnitten und per QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

2.1.8 Klenow-Reaktion

Mit Hilfe einer abgewandelten DNA-Polymerase (Klenow-Fragment, Biolabs, Bad Schwalbach, Deutschland) wurden an den gereinigten FcγRIIIb-Fragmentenden Nukleotide aufgefüllt, um später eine blunt/blunt-Ligierung in den geöffneten Vektor zu ermöglichen. Für die Klenow-Reaktion wurden 91 ng cDNA (FcγRIIIb, HNA-1a oder HNA-1b) mit 1 µl dNTP, 1 µl Klenow-Puffer (beides New England Biolabs, Schwalbach) und 1 µl Klenow-Enzym (5U/µl, New England Biolabs, Schwalbach) gemischt und in einem Totalvolumen von 10 µl für 20 min bei 25°C inkubiert. Danach folgte die Inaktivierung des Enzyms, indem das Gemisch 10 min auf 75°C erhitzt wurde.

2.1.9 Ligation der Fc γ RIIIb-Fragmente in den Expressionsvektor pCDNA3.1

Durch die Ligationsreaktion wurde die cDNA in den linearisierten Vektor eingebracht. 100 ng ECO RV-geöffneter pCDNA3.1-Vektor wurden mit 3 μ l HNA-1a beziehungsweise HNA-1b cDNA sowie 1 μ l Ligationspuffer (10 \times , MBI Fermentas, Vilinus, Litauen), 1 μ l Polyethylenglykol (50%, MBI Fermentas, Vilinus, Litauen) und 4 U T4 DNA-Ligase (MBI Fermentas, Vilinus) in einem Totalvolumen von 10 μ l für 16 h bei 22°C inkubiert. Das molekulare Verhältnis von Fremd- zu Wirts-DNA bei der Ligationsreaktion betrug 3:1.

2.1.10 Transformation der Ligation in Escherichia coli Bakterien

Die Konstrukte, die durch die Ligation entstanden, wurden per Transformationsreaktion in kompetente Escherichia coli Bakterien (E. coli; Max Efficiency DH5 α ™ Competent Cells; GIBCO, Karlsruhe) eingebracht. Dazu wurden 2 μ l des Ligationsansatzes, entsprechend 250 bis 300 ng DNA, zu 50 μ l Bakteriensuspension pipettiert und das Gemisch vorsichtig für 20 min auf Eis gestellt. Zum Abschluss der Reaktion wurde das Bakterien-Ligationsgemisch für 45 s im Wasserbad auf 42°C erwärmt. Anschließend wurde die Probe für 2 min auf Eis gestellt. 950 μ l SOC-Medium (GIBCO, Karlsruhe) wurden hinzugegeben und die Probe wurde für 1 h bei 37°C in den Schüttelinkubator gestellt. Nach dieser Zeit wurden 50, 100 und 200 μ l der Bakteriensuspension auf Carbenizillin-Selektivagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Carbenizillin-Selektivagarplatten wurden wie folgt hergestellt: 500 ml Luria-Bertani Medium pH 7,5 (LB-Medium: 1% Bacto-Trypton, 0,5% Bacto-Yeast-Extract, 1% NaCl) wurden mit 7,5 g Bacto-Agar (Roth, Karlsruhe, Deutschland) vermischt und 30 min bei 2 bar autoklaviert. Erst dadurch erfolgte die Lösung des Agars. Nach dem Autoklavieren wurde die Lösung auf 45°C abgekühlt und es wurden 50 mg des Antibiotikums Carbenizillin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) zugegeben. Jeweils 25 ml fertiger Agar wurden dann auf Petrischalen mit 10 cm Durchmesser gegeben. Nach dem Erkalten des Agars wurden die Platten für 2 h bei RT gelagert. Eine weiterführende Lagerung erfolgte bei 4°C.

2.1.11 Identifizierung insertrager Klone

Von den Klonen wurde zunächst nur die Hälfte eines Klons mit einer Pipettenspitze gepickt und in 10 µl Aqua dest gelöst und, um das Konstrukt freizusetzen, wurde das Gemisch für 10 min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurde es für 1 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Überprüfung, welche Klone positiv waren, wurde mit dem Überstand eine Kontroll-PCR angesetzt. Der Master-Mix setzte sich dazu wie folgt zusammen: 18 µl Aqua dest, 5 µl Puffer (Perkin Elmer), 8 µl dNTP, 5 µl Vorwärts-Primer 5`- CAC TCC AGT GTG GCA TCA TG – 3` und 5 µl Rückwärts-Primer 5`- CCA GTC TCT TGT TGA GCT TCA – 3` und 4 µl Taq Polymerase (Perkin Elmer). Die andere Hälfte der in der PCR positiv getesteten Klone wurde zur Vermehrung in ein Bakterienröhrchen gefüllt, mit 3 ml LB-Medium sowie mit 100 µg/ml Carbenizillin versetzt und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

2.1.12 Mini- und Midi-Plasmidpräparation

Die Bakterien der Übernachtskultur wurden zunächst durch Zentrifugation von 15 min bei 1800g und 4°C pelletiert. Die Mini-Plasmidpräparation erfolgte über das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden). Sie basiert, wie die Midi-Plasmidpräparation auch, grundsätzlich auf einer alkalischen Lyse der Bakterien mit anschließender Neutralisation des Lysates. Nach Einstellung einer hohen Salzkonzentration wird die DNA an die Membran der QIA-Säulen gebunden, zwei Mal gereinigt und mit Aqua dest. eluiert. So wurde das Pellet zunächst in 250 µl kaltem Puffer P1 (50mM TRIS/HCL, 10mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0) resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Dann wurden 250 µl Puffer P2 (200mM NaOH, 1%SDS) hinzugegeben und das Eppendorfgefäß vier bis sechs Mal gemischt. Zu diesem Gemisch wurden 350 µl Puffer N3 (3M Kaliumacetat, pH 5,5) zugegeben, vier bis sechs Mal gemischt und das Ganze wurde für 10 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Es entstand ein Pellet. Der Überstand der Zentrifugation wurde abgenommen und auf eine QIAprep Säule gegeben. Diese wurde 1 min bei 13 000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf wurde verworfen. Die Säule wurde anschließend mit 500 µl Puffer PB für 1 min bei 13 000 rpm gewaschen. Ein Waschschrift gleicher Weise erfolgte nun mit 750 µl Puffer PE. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule per Zentrifugation für 1 min bei 13 000 rpm getrocknet. Die auf der Membran

befindliche DNA wurde in 50 µl Aqua dest gelöst und durch 1 minütige Zentrifugation bei 13 000 rpm in ein frisches Eppendorfgefäß überführt.

Die Midi-Plasmidpräparation zur Gewinnung größerer DNA-Mengen erfolgte über das Hi Speed Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden). Eine Bakterienübernachtskultur von 30 ml wurde angesetzt. Diese wurde am folgenden Tag für 15 min bei 4°C und 1 800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet in 4 ml kaltem Puffer P1 resuspendiert. Es wurden nun 4 ml Puffer P2 hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 4 ml Puffer N3 wurde die Lösung neutralisiert. Durch eine Säule mit Membran wurden denaturierte Proteine, Zelltrümmer und chromosomale DNA aus der Suspension entfernt. Während einer 15 minütigen Inkubation in der Säule, wurden die Anionenaustauschersäulen mit 10 ml QBT Puffer (750mM NaCl, 50mM MOPS, 15% Isopropanol, 0.15% Triton X 100, pH 7,0) äquilibriert. Der gesäuberte Überstand der ersten Säule wurde nun in die vorbereitete Anionenaustauschersäule gegeben, die enthaltene DNA band per Durchlauf an die Membran der Säule. Die gebundene Plasmid-DNA wurde mit 20 ml Puffer QC (1M NaCl, 50mM MOPS, 15% Isopropanol, pH 8,5) gewaschen und anschließend mit Puffer QF (1,25M NaCl, 50mM TRIS-HCL, 15% Isopropanol, pH 8,5) eluiert. Es wurden 0,7 Volumenteile Isopropanol reinst hinzugegeben und das Gemisch mit Hilfe einer Spritze durch eine Membran gedrückt. In dieser blieb die Plasmid-DNA zurück. Sie wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend mit 500 µl Aqua dest eluiert. Es wurden Konzentration und Reinheit am Nanodrop bestimmt.

2.1.13 Sequenzier-Reaktion

Sequenzierreaktionen wurden eingesetzt, um die Orientierung der eingebauten cDNA im Vektor zu verifizieren und um sicherzustellen, dass die eingebaute cDNA vollständig der veröffentlichten Sequenz entspricht. Alle Ursprungsplasmide und alle Plasmide nach Mutagenese (2.1.14) wurden vollständig in 5'- und 3'-Richtung sequenziert. Dazu wurden 200 bis 500 ng des Plasmids, 2 µl Big Dye 3.0 (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland), 1 µl sequenzspezifischer Primer (10 pmol/µl), aufgefüllt auf 20 µl mit Aqua dest gemixt und in PCR-Stripes gegeben. Die Position des sequenzspezifischen Primers wurde für die Überprüfung der Orientierung so gewählt, dass er im Plasmid 5' vor der ECO RV-Stelle lag; für die Überprüfung der Gesamtsequenz wurden Primer so gewählt, dass die gesamte codierende Sequenz

in 5'- und in 3'-Richtung komplett gelesen werden konnte. Die eigentliche Sequenzierungsreaktion bestand aus 25 Zyklen: Denaturierung 96°C für 10 s, Annealing 50°C für 5 s und Polymerisation 60°C für 4 min. Das Produkt wurde anschließend über eine Sepharosesäule aufgereinigt und mit 20 µl HIDIFormamid (Applied Biosystems, Weiterstadt) versetzt. Das Polymerisationsprodukt wurde mit dem ABI PRISM™373 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Weiterstadt) analysiert und mit der publizierten Sequenz verglichen.

2.1.14 Mutagenese

Ausgehend von den Konstrukten HNA-1a und HNA-1b wurden insgesamt 14 Mutagenesen mit Hilfe des site-directed mutagenesis-Kits (Stratagene, USA) durch Verwendung sequenzspezifischer Primern durchgeführt. Ziel der Mutagenese war es, alle denkbaren Zwischenformen zwischen HNA-1a und HNA-1b herzustellen, d. h., alle vier Positionen der cDNA zu permutieren. Daraus ergeben sich 16 mögliche Varianten, von denen je eine dem Typ HNA-1a bzw. HNA-1b entspricht, die 14 übrigen stellen entsprechend Mischformen dar.

Dazu wurde immer das gleiche Mastermix-Rezept eingesetzt: 5 µl Puffer, 10 ng Plasmid, jeweils 1,25 µl sequenzspezifischer Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 1 µl dNTP, 1 µl Pfu-Polymerase, das Gesamtvolumen wurde mit Aqua dest auf 50 µl aufgefüllt. Die Primer sind in Tabelle 1/2 zusammengefasst. Des Weiteren wurde eine Kontrolle wie folgt angesetzt: 5 µl Puffer, 2 µl Kontrollplasmid, 1,25 µl Primer #1, 1,25 µl Primer #2, 1 µl dNTP, 1 µl Pfu Polymerase, aufgefüllt mit 39 µl Aqua dest auf 50 µl. Die PCR wurde nach folgenden Bedingungen angesetzt: Aktivierung der Polymerase 95°C, 30 s; Denaturierung 95°C, 30 s; Annealing 55°C, 1 min; Polymerisation 68°C, 1 min pro kb des zu mutierenden Plasmides. Nach der Mutagenese-PCR musste das Produkt sofort für 5 min auf Eis gestellt werden. Erst nach der Abkühlung wurde 1 µl DpnI zur Verdauung der Parental-DNA hinzugegeben und die Probe für 1h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Transformation in superkompetente Zellen, die Herstellung größerer Mengen des mutierten Plasmids und eine Sequenzierung zur Überprüfung, ob die gewünschte Stelle der DNA mutiert wurde.

2. Material und Methoden

Mutation 2	Vorwärts: 5` - GTG CAG CTA GAA GTC CAT ATC GGC TGG CTG TTG CTC – 3` Rückwärts: 5` - GAG CAA CAG CCA GCC GAT ATG GAC TTC TAG CTG CAC – 3`
Mutation 3	Vorwärts: 5` - GAC GCT GCC ACA GTC AAC GAC AGT GGA GAG TAC AGG – 3` Rückwärts: 5` - CCT GTA CTC TCC ACT GTC GTT GAC TGT GGC AGC GTC – 3`
Mutation 4	Vorwärts: 5` - GTG GTT TCA CAA TGA GAG CCT CAT CTC AAG CCA GG – 3` Rückwärts: 5` - CCT GGC TTG AGA TGA GGC TCT CAT TGT GAA ACC AC – 3`
Mutation 5	Vorwärts: 5` - GAG CCT CAA TGG TAC AGC GTG CTC GAG AAG GAC AG – 3` Rückwärts: 5` - CTG TCC TTC TCG AGC ACG CTG TAC CAT TGA GGC TC – 3`
Mutation 6	Der erste Austausch erfolgte mit den Primern der Mutation 2, der zweite Austausch mit Primern der Mutation 3.
Mutation 7	Der erste Austausch erfolgte mit den Primern der Mutation 3, der zweite Austausch mit Primern der Mutation 4.
Mutation 8	Der erste Austausch erfolgte mit den Primern der Mutation 2, der zweite Austausch mit Primern der Mutation 5.
Mutation 9	Der erste Austausch erfolgte mit den Primern der Mutation 12, der zweite Austausch mit den Primern der Mutation 13.
Mutation 10	Der erste Austausch erfolgte mit den Primern der Mutation 12, der zweite Austausch mit den Primern der Mutation 14.
Mutation 11	Der erste Austausch erfolgte mit Primern der Mutation 13, der zweite Austausch erfolgte mit den Primern der Mutation 15.
Mutation 12	Vorwärts: 5` - GTG CAG CTA GAA GTC CAT GTC GGC TGG CTG TTG CTC – 3` Rückwärts: 5` - GAG CAA CAG CCA GCC GAC ATG GAC TTC TAG CTG CAC – 3`
Mutation 13	Vorwärts: 5` - GAC GCT GCC ACA GTC GAC GAC AGT GGA GAG TAC AGG – 3` Rückwärts: 5` - CCT GTA CTC TCC ACT GTC GTC GAC TGT GGC AGC GTC – 3`
Mutation 14	Vorwärts: 5` - GTG GTT TCA CAA TGA GAA CCT CAT CTC AAG CCA GG – 3` Rückwärts: 5` - CCT GGC TTG AGA TGA GGT TCT CAT TGT GAA ACC AC – 3`
Mutation 15	Vorwärts: 5` - GAG CCT CAA TGG TAC AGG GTG CTT GAG AAG GAC AG – 3` Rückwärts: 5` - CTG TCC TTC TCA AGC ACC CTG TAC CAT TGA GGC TC – 3`

Tabelle 1/2: Übersicht über die Strategie zur Herstellung der Varianten von FcγRIIIb (CD16b).

2.2 Bearbeitung der Konstrukte

2.2.1 Transfektion in 293F Zellen

Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Zunächst wurden 1×10^6 293F Zellen (GIBCO, Karlsruhe) pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät. Die Zellen wurden in DMEM high Glucose (GIBCO, Karlsruhe) mit 10 % FCS (PAA, Paschin, Österreich), 1% NEAA (GIBCO, Mannheim), 1% P/S (PAA, Paschin) kultiviert. Die Transfektion, die am Tag nach der Aussaat erfolgte, wurde mit Lipofectamin 2000 (GIBCO, Karlsruhe) durchgeführt. Dazu wurden je Ansatz zwei Eppendorfgefäße mit je 250 µl Opti-MEM (GIBCO, Karlsruhe) befüllt. In das erste

Gefäß wurden 12,5 µl Lipofectamin 2000 gegeben und das Gemisch wurde für 5 min inkubiert. In das zweite Reaktionsgefäß wurden 4 µg des zu transfizierenden Plasmids gegeben. Nach der Inkubation wurde der Inhalt des zweiten Gefäßes zu dem im ersten gegeben und für 20 min bei RT inkubiert. 5 min vor Ende dieser Inkubation wurden die ausgesäten 293F Zellen zwei Mal mit warmem D-PBS gewaschen. Zu diesen Zellen wurden 2,5 ml Opti-MEM gegeben und nach Ablauf der Inkubation auch die 500 µl Transfektionsgemisch. Es folgte eine 24-stündige Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden zweimal mit warmem D-PBS vorsichtig gewaschen. In jede Vertiefung wurden 500 µl Accutase (PAA, Paschin) gegeben und die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch vorsichtiges Klopfen an der Platte wurden die Zellen abgelöst und in 1,5 ml Medium DMEM high Glucose mit 10% FCS, 1% NEAA, 1% P/S resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 200 µl in die Vertiefung einer frischen 6-Loch-Platte gegeben. Dazu wurden 2,8 ml des genannten Mediums gegeben. Es folgte eine weitere Inkubation von 24 h. Darauf wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden zwei Mal mit warmem D-PBS vorsichtig gewaschen. Nun folgte die Zugabe von Geneticin (Bioprom AG, Stuttgart, Deutschland). Dem genannten Medium wurden 700 µg/ml Geneticin zugesetzt. Davon wurden 3 ml auf die Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte gegeben. Das Antibiotikum sorgte nun dafür, dass nur die Zellen erhalten blieben, die ein Insert trugen.

2.2.2 Klonierung und Kultivierung

Nach ca. zwei bis drei Wochen sind auf der Kulturplatte kleine Zellhaufen inserttragender 293F-Zellen herangewachsen. Diese wurden am Boden der 6-Loch-Platte markiert. Mit einer Pipettenspitze wurde vorsichtig über den markierten Klon gefahren. Der Klon wurde zunächst in eine Vertiefung einer 24-Loch-Platte mit 1,5 ml Medium DMEM high Glucose mit 10 % FCS, 1% NEAA, 1% P/S plus 700 µg/ml Geneticin inkubiert. War der Klon so stark gewachsen, dass er diese Vertiefung ausfüllte, wurde er, nach zweimaligem Waschen mit warmem D-PBS, mit Hilfe von 250 µl Accutase abgelöst, mit dem genannten Medium resuspendiert und zur weiteren Anzucht in die Vertiefung einer 6-Loch-Platte gegeben und dort für zwei bis drei Wochen unter den bereits genannten Bedingungen inkubiert.

2.2.3 Durchflusszytometrie

Die Expression von CD16b auf der Oberfläche der transfizierten 293F-Zellen wurde durchflusszytometrisch getestet. Unter Verwendung monoklonaler Antikörper, die CD16b unabhängig von seiner Isoform erkennen, weil sie im Bereich der membranproximalen Domäne binden, wurde die Expression als solche untersucht. Das Testprinzip entsprach einer indirekten Immunfluoreszenz, d. h., die Bindung des monoklonalen Antikörpers wurde durch einen FITC-markierten Sekundärantikörper nachgewiesen. Für die Untersuchung der Epitope wurden dann unter Verwendung von 293F-Zellen mit vergleichbarer Expression von CD16b in seinen jeweiligen Varianten in Abwandlung des Testprinzips monoklonale Antikörper eingesetzt, die aus der Literatur als spezifisch für die Isoform HNA-1a bzw. HNA-1b beschrieben sind.

2.2.4 Messung der Klone am FACS

Um zu überprüfen, ob Klone das gewünschte Insert tragen und CD16b auf der Zelloberfläche exprimiert wird, wurden diese mit einem CD16-spezifischen Antikörper am Durchflusszytometer FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) überprüft. Zur Vorbereitung dazu wurden die Zellklone zunächst zweimal mit warmem D-PBS gewaschen und durch Zugabe von Accutase, wie oben bereits beschrieben, abgelöst und in 3 ml Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Blue-Cap, das bereits mit 5 ml D-PBS gefüllt war, gegeben. Das Blue-Cap wurde nun für 5 min bei 1 200 rpm zentrifugiert. So setzten sich die Zellen am Boden ab und der Überstand wurde abgekippt. Dieser Waschschrift mit D-PBS wurde noch zweimal wiederholt. 600 000 Zellen wurden dann in 100 µl D-PBS aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Es wurden 25 µl CD16b-spezifischer monoklonaler Antikörper, Klon DJ130c (DAKO, Glostrup, Dänemark) hinzugegeben und das Antikörper-Zell-Gemisch für 30 min bei RT dunkel inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal wie oben beschrieben mit D-PBS gewaschen und anschließend mit FITC-markiertem Ziege-anti-Maus-IgG (DAKO), 1:10.000 verdünnt, für 30 min inkubiert. Nach drei weiteren Waschschriften wurden die Klone am Durchflusszytometer gemessen. Als Negativprobe wurden bei allen Messungen mitgeführt: untransfizierte 293F-Zellen und transfizierte 293F-

Zellen, die statt mit Primärantikörper mit Maus-IgG (Becton Dickinson) inkubiert worden waren.

Nach der Überprüfung aller Klone auf Expression von CD16b mit dem genannten Antikörper wurden Klone gleicher Expressionsstärke ausgewählt und expandiert. Diese wurden mit verschiedenen HNA-1a- und HNA-1b-spezifischen monoklonalen Antikörpern getestet. Folgende monoklonale Antikörper wurden nach dem genannten Prinzip verwendet: Gran 11, CLB-541, Leu-11c, Leu11a, CLBFCRgran1, PEN1, TAG (alle bereitgestellt von Dr. Masja de Haas, Sanquin Research, Amsterdam, Niederlande). Einzelheiten sind im Kapitel Ergebnisse zusammengefasst.

2.2.5 Biotinmarkierung von 293F-Zellen

Drei Tage vor der Biotinmarkierung wurden transfizierte 293F-Zellen in Petrischalen ausgesät. War die Petrischale mehr als 80% bewachsen, konnten die Zellen markiert werden. Zunächst wurde eine 5 mM ImmunoPureBiotin, NHS-LC-Biotin (Pierce, München, Deutschland) Lösung in D-PBS hergestellt und anschließend durch einen 0,45 µm Filter filtriert. Danach wurde das Zellkulturmedium aus der Petrischale abgesaugt und die Zellen wurden dreimal mit je 7 ml D-PBS gewaschen. Auf eine Petrischale wurden dann 2 ml der NHS-LC-Biotinlösung gegeben und die gut bedeckten Zellen wurden 30 min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Petrischale 2 bis 3 Mal geschwenkt. Nach der Inkubation mit NHS-LC-Biotin wurden die Zellen erneut drei Mal mit 7 ml D-PBS gewaschen und es wurde 1 ml Lysispuffer (50mM Tris, 150mM NaCl, 1% Triton x-100 = IPB; auf 4,9 ml IPB werden zudem 100 µl des Proteaseinhibitors 100mM PMSF (0,174g PMSF in 10 ml Isopropanol) zugegeben = Lysispuffer) auf die Petrischale pipettiert. Mit einem Gummistempel einer 1 ml Spritze wurden die Zellen abgeschabt und das Lysat mit Hilfe einer Pipette in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Dieses wurde für 30 min auf Eis inkubiert und während dieser Zeit 2 bis 3 Mal gevortext. Nach dieser Inkubation wurde das Lysat bei 13 000 rpm für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der so entstandene Überstand wurde etwas über dem Pellet abgenommen und in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Nun konnte direkt das Preclear des Lysates erfolgen.

2.2.6 Preclear von Zell-Lysaten

Zunächst mussten die zur Aufreinigung nötigen Protein A Sepharose Beads (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) vorbereitet werden: Dazu wurde 1 g der Beads abgewogen und in 10 ml Wasser 30 min bei Raumtemperatur in einem Blue-Cap quellen gelassen. Im Anschluss daran wurden die gelösten Beads für 3 min bei 2 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Beads wurden zwei Mal mit 4 ml IBP wie zuvor gewaschen. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. Eine 50%ige Aufschwemmung wurde durch Zugabe von 20%igem Ethanol erreicht. 100 µl der vorbereiteten Protein A Sepharose Beads wurden nun in ein Safe-Lock-Eppendorf-Gefäß gegeben und mit 500 µl IPB 1 min bei 2 000 rpm gewaschen. Der Überstand wurde verworfen. 600 µl des Lysates wurden auf die gewaschenen Beads gegeben und es wurden 20 µl Normal Human Serum sowie 80 µl BSA (100mg/ml/Wasser) hinzu pipettiert. Das Gemisch wurde kurz aufgeschüttelt und für 30 min auf einem Rotator bei RT inkubiert und anschließend für 1 min bei 2 000 rpm zentrifugiert. Der gesamte Schritt des Preclears wurde nun mit frischen Protein A Sepharose Beads, allerdings ohne Zugabe von humanem Serum, wiederholt. Es folgte eine Zentrifugation für 1 min bei 2 000 rpm und eine weitere für 1 min bei 13 000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und bei -80°C eingefroren oder direkt in der im Folgenden beschriebenen Immunpräzipitation eingesetzt.

2.2.7 2-fach Probenpuffer für SDS-Gele

Es wurden je 8 ml Probenpuffer (Krieger, 1990) wie folgt angesetzt: 4 ml 4 % SDS; 1,5 ml 15 % Glycerol; 1,25 ml 62,5mM Tris-HCL, pH 6,8; 0,5 ml 0,005 % Bromphenolblau; 0,75 ml Aqua dest. Eine Lagerung erfolgte bei 4°C. Um einen nicht-reduzierenden Probenpuffer herzustellen, wurden zu 400 µl Probenpuffer 100 µl Aqua dest zugegeben. Um einen reduzierenden Probenpuffer herzustellen, wurden zu 400 µl Probenpuffer 100 µl 1M DTT zugegeben.

2.2.8 Immunpräzipitation

300 µl des preclearten Zell-Lysates wurden mit 5 µl monoklonalem Antikörper (Konzentration 1 mg/ml) in einem Eppendorf-Gefäß gemischt und für 16 h bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Es wurden 5 µl Rabbit-anti-Mouse-Ig-Antikörper

2. Material und Methoden

hinzugegeben und das Gemisch wurde für 1 h bei RT auf dem Rotator inkubiert und danach bei 13 000 rpm kurz scharf abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf 50 µl vorgewaschene Protein A Sepharose Beads gegeben. Dieses Gemisch wurde nun wiederum für 1 h bei RT auf dem Rotator inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe fünf Mal für 1 min bei 2 000 rpm mit 500 µl IPB gewaschen, wobei der Überstand stets verworfen wurde. (Nach dem 4. Mal Waschen wurde ein frisches Eppendorf-Gefäß verwendet.) Nun wurden 50 µl zweifacher nicht-reduzierender SDS-Puffer zu den Beads gegeben und für 5 min im Wasserbad bei 100°C denaturiert. Anschließend wurde 1 min bei 13 000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde bei -20°C eingefroren.

2.2.9 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Lösung A	300 g Acrylamid und 8 g Bisacrylamid wurden abgewogen und auf 1 L Wasser aufgefüllt, filtriert und in eine braune Flasche gegeben, Lagerung bei 4 °C
Lösung B (3M Tris-Puffer, pH 8,8)	36,3 g Tris wurden abgewogen und auf 100 ml Wasser aufgefüllt. Mit 12 N HCL (rauchende HCL) wurde der pH auf 8,8 eingestellt, Lagerung bei 4 °C
10% SDS	10 g SDS wurden in 100 ml Wasser aufgelöst, Aufbewahrung bei 37°C
Lösung D (0,5M Tris-Puffer, pH 6,8)	3 g Tris wurden auf 50 ml Wasser aufgefüllt und mit N HCL wird der pH auf 6,8 eingestellt, Lagerung bei 4 °C
APS	312,5 mg Ammoniumpersulfat wurden auf 25 ml Wasser aufgefüllt, Lagerung bei 4 °C
Laufpuffer	100 ml Rotiphorese SDS-Page (Roth, Karlsruhe) wurden zu 900 ml Wasser gegeben.

Tabelle 2/2: Übersicht über Gellösungen und Trenngele für SDS-PAGE

Zum Proteinnachweis in den Proben aus der Immunpräzipitation wurde SDS-PAGE eingesetzt. Zunächst wurden die fünf Gellösungen für die Trenngele sowie der Laufpuffer hergestellt. Nach Herstellung der Puffer wurden zunächst die Vorbereitungen zum Gießen zweier 10%iger Trenngele getroffen. Es wurde das Biometra-Minigel-System (Biometra, Göttingen, Deutschland) genutzt. Es wurden die zwei aufeinander passenden Glasplatten mit Isopropanol und einem fusselfreien Tuch gereinigt. Die U-förmige Gummidichtung wurde so auf die Glasplatte gelegt, dass die Spacer innen lagen. Die zweite Glasplatte wurde bündig aufgelegt und mit Klammern so fixiert, dass das Gestell gerade aufgestellt werden konnte. Ein Kamm, der später 10 Vertiefungen im Gel bildete, wurde angelegt und die Höhe des Kamms wurde etwa 1 cm unterhalb des Kamms markiert. Nun wurden zwei 10%ige Trenngele wie folgt gegossen und in das Glasgestell gegeben:

Aqua dest	7,47 ml
Lösung A	4,78 ml
Lösung B	1,743 ml
10% SDS	140,7 μ l
Temed	18,75 μ l
APS	468,75 μ l

Tabelle 3/2: Übersicht über das Gießen eines Trenngels für SDS-PAGE

Die Trenngele wurden während des Polymerisationsvorgangs mit Butanol überschichtet, damit sie nicht austrockneten. Nun mussten sie 45 min polymerisieren. Nach der Polymerisation wurde das Butanol gut mit Aqua dest. abgespült. Es durften keine Schlieren mehr sichtbar sein. Eventuelle Wasserreste wurden mit einem Filter herausgesaugt, dabei durfte das Gel aber nicht berührt werden. Auf jedes Trenngel wurde nun das Sammelgel wie folgt gegossen und ein 10er Kamm eingesetzt.

Aqua dest	1,75 ml
Lösung A	0,5 ml
Lösung D	312,5 µl
10% SDS	25 µl
Temed	7,5 µl
APS	93,75 µl

Tabelle 4/2: Übersicht über das Gießen eines Sammelgels für SDS-PAGE

Die Gele mussten nun für 30 min polymerisieren, dann wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen. Gelreste wurden mit einem Tuch entfernt. Die Vertiefungen wurden nun mit Laufpuffer gefüllt, der mit einer Pipettenspitze vorsichtig wieder abgesaugt wurde. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Nun wurden die Klammern sowie die Gummidichtung von den Glasplatten entfernt und die Gele wurden mit der Aussparung nach hinten in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Klammern fixiert. Laufpuffer wurde dann so in die Kammer gefüllt, dass beide Gele davon bedeckt waren. Luftblasen am unteren Gelrand wurden entfernt, indem die Elektrophoresekammer vorsichtig zur Seite gekippt wurde. In die jeweils erste Vertiefung des Gels wurden 5 µl eines Proteinmarkers („Rainbow-Marker“, Biorad, Deutschland) gegeben. In die weiteren Vertiefungen wurden 20 µl der in der Immunpräzipitation hergestellten, zu analysierenden Proben gegeben. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Proben sauber in die Vertiefungen pipettiert wurden und nicht in andere Vertiefungen „überschwappten“. Die Laufzeit betrug durchschnittlich etwa 1 h. Die Spannung wurde auf maximaler Volt- und Wattzahl sowie 15mA gehalten.

2.2.10 Immunoblot (Semidryblot)

Das Western-blotting-Verfahren diente der Identifizierung und Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen. Hierbei wurden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond TM-C extra, Amersham, Braunschweig) geblottet. Der Nachweis eines gebundenen Antigen-Antikörperkomplexes erfolgte durch die Zugabe eines enzymkonjugierten Antikörpers und nachfolgender Substratumsetzung. In der SDS-PAGE aufgetrennte Proteine

2. Material und Methoden

wurden 45 min in Transferpuffern auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Benötigt wurden dazu drei verschiedene Puffer.

Puffer A	36,3 g Tris wurden auf 800 ml Aqua dest aufgefüllt und der pH auf 10,4 eingestellt. Es wurden 200 ml Methanol hinzugegeben. Lagerung bei 4 °C
Puffer B	3,03 g Tris wurden auf 800 ml Aqua dest aufgefüllt und der pH auf 10,4 eingestellt. Es wurden 200 ml Methanol hinzugegeben. Lagerung bei 4 °C
Puffer C	5,2 g ϵ -Aminocaprinsäure (Sigma, Deisenhofen) wurden auf 800 ml Aqua dest aufgefüllt. 200 ml Methanol wurden hinzugegeben. Lagerung bei 4 °C

Tabelle 5/2: Übersicht über die verwendeten Puffer im Semidryblot

Es wurden Filter passend zur Größe der Nitrocellulose zurechtgeschnitten und jeweils drei Filterpapiere wurden in Lösung A, B und C so lange eingelegt, bis sie vollständig durchtränkt waren. An die Kathode wurden die drei Filter aus A, darauf die drei Filter aus B, die Membran, das Gel und darauf die drei Filter aus C, an der Anode, gegeben. Es wurden ca. 84 mA, 10 Watt und volle Voltzahl als Spannung angelegt. Die Zeit des Blottens belief sich auf 45 min. Die Nitrocellulose wurde anschließend mit 10 ml Blockierungslösung (1,5% BSA in Waschpuffer (20mM Tris-HCL; 154mM NaCl; 0,05% Tween 20; pH 7,4) für 60 min bei 60 rpm auf der Wippe inkubiert. Anschließend wurde die Blockierungslösung abgesaugt, es erfolgte eine Inkubation mit 10 μ l monoklonalem Antikörper (Konzentration 1 mg/ml) 10 ml in Blockierungslösung für 60 min bei 60 rpm und 4°C. Anschließend wurde mit einem Kaninchen-Anti-Maus-IgG-HRP-Antikörper (1:100.000, Dianova) in Blockierungslösung erneut für 45 min bei 60 rpm inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Nitrozellulose drei Mal für wenige s, einmal für 15 min und zwei Mal für 5 min mit Waschpuffer gewaschen und auf einem Filterpapier getrocknet. Es wurde ECL-Substrat (Amersham) hinzugegeben und 5 min inkubiert. Dabei wurde H_2O_2 enzymatisch zu H_2O reduziert sowie Luminol zu 3-Aminophtalat oxidiert. Bei dieser Reaktion wurden Sauerstoff und Licht frei. Letztes wurde durch 0,5 bis 2 minütige Exposition auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

2.2.11 Monoclonal antibody-specific immobilisation of granulocyte antigens (MAIGA)-Assay

Der Test entspricht einem modifizierten ELISA-Verfahren zum Nachweis einer Antikörperbindung an granulozytäre Membranproteine und wurde durchgeführt wie von Bux et al. (1993) beschrieben, mit geringen Modifikationen. Zunächst erfolgte eine Sensibilisierung der Zellen. Dazu wurden 50 µl Testserum mit 500.000 Zellen in 100 µl PBS ohne Calcium plus 0,2 % BSA für 30 min auf Mikrotiterplatten bei 37°C inkubiert. Für Blockierungsversuche wurden vorher 10 µl eines monoklonalen Maus-Antikörpers (0,01 mg/ml PBS) zugegeben und für 30 min inkubiert; als Kontrollansatz dieselbe Menge eines irrelevanten monoklonalen Antikörpers (Gi5 gegen thrombozytäres GP IIb/IIIa; Dr. Sentot Santoso, Gießen). Während dieser Zeit wurde das Gemisch dreimal suspendiert. Nach der Inkubation wurde jeder Ansatz mit je 200 µl PBS/0,2% BSA gewaschen und bei 1200 rpm für 30 s ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nach der Zentrifugation wurden 50 µl PBS/0,2% BSA und 10 µl des glykoproteinspezifischen, immobilisierenden Antikörpers (Klon 3G8 gegen CD16b, Konzentration 0,02mg/ml) hinzugegeben und kurz vorsichtig gevortext. Das Gemisch wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend wie beschrieben dreimal mit PBS/0,2% BSA gewaschen. Damit waren die Antigene der Zellen mit dem Immobilisierungsantikörper gegen das spezifische Glykoprotein und gegebenenfalls mit dem Testantikörper (monoklonal oder human aus Serum) auf dem gleichen Glykoprotein besetzt. Zu dem Pellet wurden 100 µl Lysepuffer (2,4g Tris, 8,76 g NaCl, 9,5 ml Triton x-100, 1,86 g EDTA auf 1 l Aqua dest, pH 7,4) mit Proteaseinhibitoren gegeben, gut resuspendiert, in Eppendorf-Gefäße überführt und dann bei 4°C für 30 min inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die zuvor mit Coating-Puffer und 3 µg/ml Ziege-anti-Maus-IgG (DAKO) gecoatete Flachbodenplatte (4°C, 12 h) mit 200 µl PBS/0,2% BSA pro Vertiefung für eine Stunde bei 4°C blockiert und den Ansätzen entsprechend viele Eppendorf-Gefäße wurden mit 180 µl MAINA Waschpuffer (1,21 g Tris, 9,5 ml Triton X-100, 4,5 ml Tween 20, 72,5 mg CaCl₂·2H₂O auf 1 l NaCl, pH 7,4)/0,2% BSA gefüllt und ebenfalls bei 4°C inkubiert. Die Eppendorf-Gefäße mit den Ansätzen wurden nun für 30 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert. Dadurch verblieben die Zellreste im Gefäß und die beladenen Glykoproteine verblieben im Überstand. 70 µl davon wurden in die mit 180 µl Puffer gefüllten Eppendorf-Gefäße überführt und gut durchgemischt.

Davon wurden für einen doppelten Ansatz je zweimal 100 µl auf die gecoatete und zuvor fünf Mal mit PBS/0,2% BSA/0,05% Tween gewaschene Mikrotiterplatte gegeben. Als Leerwert wurde MAINA Waschpuffer verwendet und die Platte dann bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Platte fünf Mal mit PBS/0,2% BSA/0,05% Tween 20 gewaschen. Die mit monoklonalem Antikörper besetzten Glykoproteine waren jetzt auf dem Boden der Platte fixiert. Pro Vertiefung wurden nun 100 µl Sekundärantikörper (goat anti human-IgG/HRP oder goat anti mouse-IgG/HRP, Konzentration 1 : 4 000, von Dianova) in Waschpuffer pipettiert und die Platte wurde für 2 h bei 4°C inkubiert. Gegen die immobilisierten Glykoproteine gerichteten Antikörper wurden so durch die enzymmarkierten monoklonalen Antikörper nachgewiesen. Anschließend wurde die Platte sechs Mal mit PBS/0,2% BSA/ 0,005% Tween 20 gewaschen. Pro Vertiefung wurden nun 100 µl Substratpuffer (3 ml Aqua dest, 1 OPD-Tablette, 1,25 µl H₂O₂) gegeben und die Platte wurde für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl 4N H₂SO₄ abgestoppt und die Proben wurden am Photometer bei 492 nm gemessen.

2.2.12 IgG-Bindungs-Assay (BCECF-Adhäsionstest)

Eine Flachbodenplatte wurde zunächst mit 3 µg humanem Immunglobulin G pro well (Octagam®, Octapharma, Lachen, Schweiz) in 75 µl Coatingpuffer für 2h bei 37°C gecoatet. Pro zu untersuchender Zelllinie wurde eine konfluent bewachsene Petrischale Zellen geerntet. Diese wurden zweimal mit DPBS für 5 min bei 1 200 rpm gewaschen. Die Zellen wurden am Hämatologie-Analyzer (Sysmex) gezählt und auf 2,5 Millionen Zellen pro ml eingestellt. Zu den Zellen wurden 10 µl BCECF (Merck, Darmstadt) gegeben und die Suspension wurde für 45 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit je 5ml Medium ohne FCS für 5 min bei 1 200 rpm gewaschen. Die Zellzahl wurde erneut bestimmt. Die gecoatete Platte wurde nun dreimal mit DPBS gewaschen. Im Anschluss wurden 200 000 Zellen in 150 µl Zellkulturmedium (DMEM; Amersham) pro well pipetiert (Dreifachansätze). Die Platte wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Direkt nach der Inkubation wurde die erste Messung am Fluoreszenzreader (Flx 800, Biotec, Neufahrn) durchgeführt (Anregung, 485 nm; Messung, 528 nm). Es folgten Messungen vor dem ersten Waschschrift und nach dem ersten, zweiten und dritten Waschen. Als Referenzzelle wurde HNA-1a gewählt, die gemessene Fluoreszenz nach dem dritten Waschschrift

für die HNA-1a Zelle wurde auf 100% gesetzt und die Fluoreszenz der weiteren Zellen in Bezug zu dieser Messung gesetzt.

2.3. Screening für Anti-Ond

2.3.1 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgte mit einem Kit (Qiagen, Hilden). 300 µl Vollblut wurden in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und 900 µl RBC Lysis Solution wurden dazugegeben. Das Gemisch wurde für 10 min bei RT inkubiert, wobei das Gefäß in dieser Zeit einige Male vorsichtig geschüttelt wurde. Anschließend wurde das Gemisch für 20 s bei 12 000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde vorsichtig abgekippt, sodass 10 bis 20 µl Überstand im Gefäß verblieben. Dieser wurde nun gut gevortext und es wurden 300 µl Cell Lysis Solution sowie 1,5 µl RNaseA Solution hinzugegeben. Die Probe wurde 15 Mal über Kopf gemischt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde sie auf RT gebracht und es wurden 100 µl Protein Precipitation Solution dazu pipettiert und die Probe wurde für 20 s auf höchster Stufe gevortext. Anschließend wurde die Probe für 3 min bei 12 000 rpm zentrifugiert, die Proteine wurden nun als braun-schwarzes Pellet sichtbar. Der Überstand, der die DNA enthielt, wurde in ein weiteres Eppendorf-Gefäß überführt und es wurden 300 µl Isopropanol reinst hinzugefügt. Das Gefäß wurde etwa 50 Mal vorsichtig auf den „Kopf“ gedreht, die DNA fiel aus. Die Probe wurde nun für 1 min bei 12 000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde vorsichtig auf einem flusenfreien Tuch abgetupft. Zur DNA wurden 300 µl 70% Ethanol hinzugefügt und das Gefäß wurde einige Male über „Kopf“ gemischt und anschließend für 1 min bei 12 000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig auf ein flusenfreies Tuch getupft, die DNA war als Pellet auf dem Grund des Gefäßes sichtbar und musste 15 min bei RT trocknen. Dann wurden 50 µl Aqua dest hinzu pipettiert und die DNA löste sich über Nacht bei RT.

2.3.2 PCR-SSP

Um den kodierenden Basenaustausch für HNA-5 (Ond) per PCR-SSP nachweisen zu können, wurden spezifische Primer für die Allele G2466 und C2446 ausgesucht. Als spezifischen Primer für HNA-5a wurde der Primer 5`-CAG TTA GAC GCA GGG

CTC -3', als spezifischen Primer für HNA-5a der Primer 5'- CAG TTA GAC GCA GGG CTG -3' ausgesucht. Der Rückwärtsprimer für beide Phänotypen war 5'- AGG TTG AGG CAG GAG AAT GG -3' (Synthesen der Oligonukleotide durch MWG Biotech, Ebersberg). 60 ng der DNA wurden mit folgenden PCR-Reagenzien gemixt: 0,5 pmol jedes Primers, 0,2 mmol dNTP, 2,0 U Taq GOLD in einem Volumen von 20 µl. Es folgte die PCR mit dem Gene-Amp PCR System 9600 unter folgenden Bedingungen: 1 Zyklus 10 min Vorlauf bei 95°C, 10 Zyklen 30 s Denaturierung bei 95°C, 40 s Annealing bei 64°C, 30 s Polymerisation bei 72°C, 20 Zyklen 30 s Denaturierung bei 95°C, 40 s Annealing bei 59°C, 30 s Polymerisation bei 72°C. Es folgte ein Nachlauf für 5 min bei 72°C. Als positive Kontrolle wurde ein Fragment des human growth hormone (HGH) mitgeführt. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte durch Agarosegelelektrophorese (2.1.5).

2.3.3 Serologische Typisierung durch Lymphozytenimmunfluoreszenztest

In den Untersuchungen wurde der Lymphozytenimmunfluoreszenztest (modifiziert nach Verheugt et al., 1977) zur Bestimmung der Expression des HNA-5a-Antigens (Ond) auf Lymphozyten eingesetzt. Dazu wurden 2×10^5 PFA-fixierte Lymphozyten pro Vertiefung einer 96-Loch-Rundbodenplatte (Greiner) in 20 µl PBS mit 100 µl humanem Anti-Ond-Serum (bereitgestellt von Dr. Masja de Haas, Sanquin Reserach, Amsterdam, Niederlande und Dr. Brian Curtis, Blood Research Institute, Milwaukee, Wisconsin, USA) und für 30 min bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde Serum eines gesunden männlichen Blutspenders eingesetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit je 200 µl PBS ohne Calcium für 30 s bei 220 g gewaschen und mit 40 µl FITC-markiertem sekundärem Ak (Kaninchen-anti-human IgG (DAKO, Glostrup, Dänemark), 1:40 in PBS) erneut für 30 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch anschließendes Waschen, 30 s bei 220 g, entfernt und die Zellen wurden in je 20 µl PBS/Glycerin (3:1) suspendiert und auf einen Objektträger überführt. Die Probe wurde nun mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Leitz, Wetzlar, Deutschland) bei 500-facher Vergrößerung nach der Stärke ihrer gebundenen Fluoreszenz beurteilt.

2.4. EBV-Transformation

Als Virusquelle dienten EBV-infizierte Zellen von *Sanguinis oedipus* (B95-8, ATCC, Rockville, Maryland, USA). Die Zellen wurden 3 bis 6 Wochen bei 37°C, 5% CO₂, in folgendem Medium kultiviert: Isoves modifiziertes D-MEM (IMDM) mit Glutamax I, 4% MEM alpha Medium mit L-Glutamin, Ribonucleotiden und Desoxyribonucleotiden (GIBCO, Eggenstein), 15% fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert (Eurobio, Les Ulis Cedex, Frankreich), 0,5% Penicillin/Streptomycin (GIBCO), 7,7 mM Insulin (Sigma, Deisenhofen) und 1,5 mM Oxalacetat (Sigma), sterilfiltriert. Zur Ernte des infektiösen Materials werden die Zellen im überstehenden Medium resuspendiert und in Zentrifugenröhrchen bei -20 °C für 2 h eingefroren. Sofort nach dem Auftauen bei 37°C im Wasserbad wird der Zelldedritus durch Zentrifugation bei 4,000 g, 30 min, bei 4 °C vom Überstand getrennt. Der Überstand wird zur Entfernung von Membranresten durch einen 0,45 µm Filter gegeben und Aliquots des infektiösen Materials werden bei -70°C bis zum Gebrauch gelagert.

Zur Gewinnung der zu transfizierenden Humanlymphozyten wurde 1 ml EDTA-antikoaguliertes Vollblut mit 1 ml RPMI (Amersham) verdünnt und gut durchgemischt. 500 µl Ficoll wurden in Eppendorfhütchen pipetiert und mit 1,5 ml der Blut-/RPMI-Mischung überschichtet und 1 min in einer Eppendorfschleuse zentrifugiert. Anschließend wurde der Lymphozytenring mit einer Pipette abgenommen und in ein steriles 5 ml Röhrchen überführt und mit RPMI auf 5 ml aufgefüllt. Die Suspension wurde zwei Mal bei 230 g für 10 min gewaschen. Nun wurde das Lymphozytenpellet in 300 µl infektiösem Material aus EBV-Kultur resuspendiert und anschließend bei 37°C für 1h schüttelnd inkubiert.

Danach wurden 500 µl der Schüttellösung in ein steriles 5 ml-Kultur-Röhrchen gegeben und mit Transformationsmedium (RPMI, 20% FCS, 0,1% Gentamicin, 0,5% Cyclosporin) aufgefüllt und stehend im Brutschrank inkubiert. Nach zwei Tagen Inkubation wurden 700 µl Medium (siehe oben; zusätzlich mit 0,25% Cyclosporin), nach vier Tagen weitere 500 µl zugegeben. Nach ein bis zwei Wochen wurde 1 ml des gleichen Mediums hinzugegeben. Nach drei Wochen wurden die Zellen in eine kleine Kulturflasche überführt und mit 5 ml des genannten Mediums ohne Cyclosporin aufgefüllt. Der weitere Bedarf an Medium orientiert sich an der Zelldichte, der Zahl der toten Zellen und dem pH-Wert des Mediums (Umschlag des

Phenolrotfarbstoffs von rot nach gelb weist eine Anreicherung saurer Stoffwechselmetabolite nach).

Die lymphoblastoiden Zellen können ca. 4 bis 6 Wochen nach Transformation eingefroren werden. Dazu werden die Zellen vorsichtig resuspendiert und die Gesamtzellzahl in Neubauerkammer bestimmt. Die Suspension wird in ein 50 ml-Gefäß überführt, bei 250 g für 10 min abzentrifugiert, der Überstand (nach Autoklavieren) verworfen. Das Zellpellet wird in Kulturmedium mit 10% DMSO resuspendiert, in Einfrierampullen überführt (mind. 1×10^7 Zellen pro Ampulle), bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 2 h eingefroren und danach zur weiteren Lagerung über Nacht bei -70°C , anschließend in flüssigem Stickstoff, aufbewahrt.

3. Ergebnisse

3.1. Antigenität des Fc γ RIIIb-Rezeptors

3.1.1 Herstellung der Varianten

Zentraler Ausgangspunkt für diese Arbeit war die Expression der verschiedenen Varianten des Fc γ RIIIb-Rezeptors. Dazu wurden Granulozyten zuvor für das Merkmal HNA-1 typisierter Spender isoliert (siehe 2.1.1). Im Anschluss daran wurde die RNA der jeweiligen Granulozyten isoliert und in cDNA umgeschrieben (siehe 2.1.2/2.1.3). Diese cDNA wurde in eine PCR (siehe 2.1.4) eingesetzt, um den gesamten Fc γ RIIIb-Rezeptor in den jeweiligen in der Humanpopulation beschriebenen Isoformen HNA-1a und HNA-1b zu amplifizieren. Die aus dieser PCR entstandenen Produkte wurden in eine nested PCR eingesetzt (siehe 2.1.2). Die entstandenen Produkte wurden aufgereinigt und sequenziert. Um das entstandene Produkt nun in den Vektor pCDNA3.1 einbringen zu können, musste dieser zunächst in einem Restriktionsenzymverdau linearisiert werden; es entstanden dabei zwei glatte Schnittstellen am Vektor. Um nun die amplifizierte cDNA von Fc γ RIIIb einbringen zu können, mussten zunächst die vorhandenen PCR-Amplifikate durch eine Klenow-Reaktion mit Nukleotiden aufgefüllt werden (siehe 2.1.8). Es folgte die Ligation der Amplifikate in den geschnittenen Vektor (siehe 2.1.9) und die Vermehrung des Plasmids in kompetenten *Escherichia coli*-Bakterien (siehe 2.1.10). Die Bakteriensuspension wurde anschließend auf Carbenizillin-Agarplatten ausgestrichen und nach Inkubation wurden Klone gepickt. Zur Überprüfung, ob die gepickten Klone das gewünschte Plasmid enthielten, wurden diese zunächst mit einer PCR-SSP getestet (siehe 2.1.11). Positiv getestete Klone wurden anschließend in beide Richtungen sequenziert (2.1.13), um sicherzustellen, dass das Insert mit korrekter Orientierung und ohne zusätzliche Basenaustausche eingebaut worden ist. Einwandfreie Klone wurden in *Escherichia coli*-Bakterien vermehrt (siehe 2.1.11) und die Plasmid-DNA aufgereinigt (siehe 2.1.12). Damit war die Herstellung der Plasmide von Fc γ RIIIb in den Isoformen HNA-1a und HNA-1b abgeschlossen.

Merkmalsträger mit dem Phänotyp HNA-1a bzw. HNA-1b unterscheiden sich in vier Aminosäurepositionen (36, 65, 82 und 106). Es ist nicht gezeigt, ob alle dieser Aminosäuren für den Phänotypwechsel benötigt werden und, falls nicht, welche der Aminosäureaustausche am Aufbau des Epitops für HNA-1a bzw. HNA-1b beteiligt

3. Ergebnisse

sind. Eine serologische Untersuchung (Phänotypisierung) wurde mit dem Ziel durchgeführt, diese Fragestellung zu beantworten. Dazu wurden die Plasmide an den vier Aminosäurepositionen permutiert, d. h. es wurden alle denkbaren Varianten im Übergang zwischen HNA-1a und HNA-1b unter Verwendung der site-directed-Mutagenese (siehe 2.1.14) hergestellt. Rechnerisch ergeben sich $4^2 = 16$ Variationsmöglichkeiten (im Folgenden „Varianten“ genannt), von denen zwei den in der Humanpopulation beschriebenen Isoformen HNA-1a und HNA-1b entsprechen, während 14 Varianten Zwischenformen darstellen. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über alle Varianten.

Variante Nr.	Aminosäure an Position 36	Aminosäure an Position 65	Aminosäure an Position 82	Aminosäure an Position 106
1 (HNA-1a)	Arg (AGG)	Asn (AAC)	Asp (GAC)	Val (GTC)
2	Arg (AGG)	Asn (AAC)	Asp (GAC)	Ile (ATC)
3	Arg (AGG)	Asn (AAC)	Asn (AAC)	Val (GTC)
4	Arg (AGG)	Ser (AGC)	Asp (GAC)	Val (GTC)
5	Ser (AGC)	Asn (AAC)	Asp (GAC)	Val (GTC)
6	Arg (AGG)	Asn (AAC)	Asn (AAC)	Ile (ATC)
7	Arg (AGG)	Ser (AGC)	Asn (AAC)	Val (GTC)
8	Ser (AGC)	Asn (AAC)	Asp (GAC)	Ile (ATC)
9	Ser (AGC)	Ser (AGC)	Asp (GAC)	Val (GTC)
10	Ser (AGC)	Asn (AAC)	Asn (AAC)	Val (GTC)
11	Arg (AGG)	Ser (AGC)	Asp (GAC)	Ile (ATC)
12	Ser (AGC)	Ser (AGC)	Asn (AAC)	Val (GTC)
13	Ser (AGC)	Ser (AGC)	Asp (GAC)	Ile (ATC)
14	Ser (AGC)	Asn (AAC)	Asn (AAC)	Ile (ATC)
15	Arg (AGG)	Ser (AGC)	Asn (AAC)	Ile (ATC)
16 (HNA-1b)	Ser (AGC)	Ser (AGC)	Asn (AAC)	Ile (ATC)

Tabelle 1/3: Übersicht über die hergestellten Varianten des Fc γ RIIIb

Aus den Plasmiden mit den aus humaner Granulozyten-RNA gewonnenen Inserts, die für die „natürlichen“ Isoformen HNA-1a und HNA-1b des Fc γ RIIIb codieren, wurden durch ein oder zwei Mutageneseschritte die 14 verschiedenen Varianten hergestellt. Spalte 1 gibt die Bezeichnung der Varianten an, Spalten 2 bis 5 die Aminosäuren an den vier Positionen 36, 65, 82 und 106 sowie in Klammern das dazugehörige Basentriplett. Zeile 1 (Variante 1) entspricht dabei der Isoform HNA-1a, Zeile 16 (Variante 16) der Isoform HNA-1b, die Zeilen 2 bis 15 den hergestellten Zwischenformen (Varianten).

Aus dem Ausgangskonstrukt HNA-1a wurden durch Mutagenese mit einem Austausch die Variante 2 (verwendete Primer: Vorwärtsprimer 5'- GTG CAG CTA

3. Ergebnisse

GAA GTC CAT ATC GGC TGG CTG TTG CTC – 3', Rückwärtsprimer 5' - GAG CAA CAG CCA GCC GAT ATG GAC TTC TAG CTG CAC – 3'), die Variante 3 (verwendete Primer: Vorwärtsprimer 5' - GAC GCT GCC ACA GTC AAC GAC AGT GGA GAG TAC AGG – 3', Rückwärtsprimer 5' - CCT GTA CTC TCC ACT GTC GTT GAC TGT GGC AGC GTC – 3'), die Variante 4 (verwendete Primer: Vorwärtsprimer 5' - GTG GTT TCA CAA TGA GAG CCT CAT CTC AAG CCA GG – 3', Rückwärtsprimer 5' - CCT GGC TTG AGA TGA GGC TCT CAT TGT GAA ACC AC – 3') und die Variante 5 (verwendete Primer: Vorwärtsprimer 5' - GAG CCT CAA TGG TAC AGC GTG CTC GAG AAG GAC AG – 3', Rückwärtsprimer 5' - CTG TCC TTC TCG AGC ACG CTG TAC CAT TGA GGC TC – 3') hergestellt. Mit einer zweiten Mutagenese wurden aus der Variante 3 die Variante 7 (verwendete Primer: Primer der Mutation 4), aus der Variante 2 die Variante 8 (verwendete Primer: Primer der Mutation 5) und aus der Variante 2 die Variante 6 (verwendete Primer: Primer der Mutation 3) hergestellt. Aus dem Ausgangskonstrukt HNA-1b wurden zunächst mit einer Mutagenese die Varianten 12 (verwendete Primer: Vorwärtsprimer 5' - GTG CAG CTA GAA GTC CAT GTC GGC TGG CTG TTG CTC – 3', Rückwärtsprimer 5' - GAG CAA CAG CCA GCC GAC ATG GAC TTC TAG CTG CAC – 3'), 13 (verwendete Primer: Vorwärtsprimer 5' - GAC GCT GCC ACA GTC GAC GAC AGT GGA GAG TAC AGG – 3', Rückwärtsprimer 5' - CCT GTA CTC TCC ACT GTC GTC GAC TGT GGC AGC GTC – 3'), 14 (verwendete Primer: Vorwärtsprimer 5' - GTG GTT TCA CAA TGA GAA CCT CAT CTC AAG CCA GG – 3', Rückwärtsprimer 5' - CCT GGC TTG AGA TGA GGT TCT CAT TGT GAA ACC AC – 3'), und 15 (verwendete Primer: Vorwärtsprimer 5' - GAG CCT CAA TGG TAC AGG GTG CTT GAG AAG GAC AG – 3', Rückwärtsprimer 5' - CTG TCC TTC TCA AGC ACC CTG TAC CAT TGA GGC TC – 3') hergestellt. Mit einer zweiten Mutagenese wurden aus der Variante 12 die Variante 9 (verwendete Primer: Primer der Mutation 13), aus der Variante 12 die Variante 10 (verwendete Primer: Primer der Mutation 14) und aus der Variante 13 die Variante 11 (verwendete Primer: Primer der Mutation 15) hergestellt. Um sicher zu gehen, dass sämtliche Mutationen an den richtigen Positionen lagen, wurden alle Konstrukte per Sequenzierung überprüft. Mit einem positiven Befund war die Konstrukt-Herstellung abgeschlossen.

Nun folgte der nächste Arbeitsschritt, bei dem die Plasmide in 293F-Zellen transfiziert wurden (siehe 2.2.1), um später Versuche am Durchflusszytometer (siehe 2.2.3) durchführen zu können. Die transfizierten Zellen wurden kultiviert und die

3. Ergebnisse

Selektion von positiven Zellen erfolgte über das Antibiotikum Geneticin. Daraufhin wurden Zellklone gepickt und expandiert (siehe 2.2.2). Um die erfolgreiche Transfektion zu überprüfen, wurden die expandierten Subklone nach einigen Wochen in Kultur auf die Expression von CD16 am Durchflusszytometer überprüft (siehe 2.2.4).

Abbildung 1/3: Durchflusszytometrischer Nachweis der Oberflächenexpression von FcγRIIb auf 293F-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz

Mit dem Expressionsvektor für CD16b in den Varianten 1 bis 16 transfizierte 293F-Zellen wurden auf die Expression von CD16b in der indirekten Immunfluoreszenz unter Verwendung eines monoklonalen Primärantikörpers gegen die membran-proximale Domäne (Klon DJ130c) untersucht. Zellsuspensionen wurden mit dem monoklonalen Antikörper und einem FITC-markierten Sekundärantikörper (rote Histogramme) und parallel mit Maus-IgG und einem FITC-markierten Sekundärantikörper (weiße Histogramme; Kontrolle) inkubiert und im FL-1-Kanal am Durchflusszytometer gemessen.

Durch die Messungen am Durchflusszytometer wurde nachgewiesen, dass die 293F-Zellen CD16b exprimieren.

3.1.2 Epitopmapping: Charakterisierung der allelspezifischen monoklonalen Antikörper

Zur Vorbereitung des Epitopmappings mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, die in der Literatur als spezifisch für die Isoform HNA-1a bzw. HNA-1b beschrieben sind (sogenannte „allelspezifische“ monoklonale Antikörper), wurde zunächst überprüft, ob die Spezifität für eine Isoform serologisch bestätigt werden kann.

Dazu wurde der MAIGA-Assay (2.2.11) wie folgt eingesetzt: üblicherweise verwendet man murine monoklonale Antikörper, um ein Membran-Glykoprotein einer Testzelle über einen an die Platte immobilisierten Sekundärantikörper an die ELISA-Platte zu fixieren; die Bindung eines humanen Antikörpers gegen das Glykoprotein wird dann durch einen spezifischen Anti-Human-Sekundärantikörper nachgewiesen (Sandwich-Technik). Der für die Immobilisierung eingesetzte murine monoklonale Antikörper wird so gewählt, dass er die Epitope, an die die humanen Antikörper binden sollen, nicht blockiert – im Falle von CD16b sind dies in der Regel murine monoklonale Antikörper, die an die membran-proximale Domäne binden (z. B. Klon DJ130c), denn die relevanten Austauschstellen liegen membran-distal. Humane Antikörper gegen HNA-1a oder HNA-1b sind so im Test zuverlässig nachweisbar. Dieses Nachweisverfahren kann modifiziert werden, in dem man die Testzellen vor der Serumzugabe mit einem murinen monoklonalen Antikörpern inkubiert, der als spezifisch für HNA-1a bzw. HNA-1b gilt. Ist dieser in der Tat spezifisch für HNA-1a oder HNA-1b, so wird er das Epitop belegen, die humanen Antikörper können nicht binden und der Test fällt negativ aus, da die humanen Antikörper nicht an ihr Zielantigen binden und der spezifische Anti-Human-Sekundärantikörper nicht

3. Ergebnisse

gebunden wird; damit fehlt das substratumsetzende Enzym für den Farbumschlag. Mit dieser Modifikation wurde die Allospezifität der murinen monoklonalen Antikörper nachgewiesen (Tabelle 2/3).

Nr.	Epitop-blockierender monoklonaler Antikörper						Phänotyp der Testzelle	Serum
	Gi5 (GPIIb/IIIa)	3G8 (CD16b)	5D7 (HNA-1a)	Leu 11c (HNA-1a)	CLB 541 (HNA-1b)	GRM1 (HNA-1b)		
1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	HNA-1aa	HNA-1b*
2	1,4	1,3	0,1	0,1	1,3	1,3		HNA-1a
3	2,5	2,5	0,1	0,2	2,4	2,4		HNA-1a
4	2,4	2,3	0,3	0,2	1,8	2,3		HNA-1a
5	2,2	2,4	0,3	0,2	1,5	2,0		HNA-1a
6	2,6	2,3	0,2	0,2	2,2	2,1		HNA-1a
X ₂₋₆	2,2	2,2	0,2	0,2	1,8	2,0		
S ₂₋₆	0,5	0,5	0,1	0,1	0,5	0,4		

7	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	HNA-1bb	HNA-1a*
8	1,7	1,9	1,8	1,8	0,2	0,2		HNA-1b
9	2,3	2,4	1,7	1,8	0,2	0,2		HNA-1b
10	1,7	2,5	1,8	2,2	0,2	0,2		HNA-1b
11	2,2	2,7	2,1	2,2	0,2	0,2		HNA-1b
12	1,8	2,4	2,3	2,2	0,2	0,2		HNA-1b
X ₈₋₁₂	2,0	2,4	2,0	2,0	0,2	0,2		
S ₈₋₁₂	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1		

Tabelle 2/3: Nachweis der Allospezifität muriner monoklonaler Antikörper durch Epitopblockade

Für das Testverfahren wurden Humangranulozyten mit bekanntem Geno- und Phänotyp (obere Tabellenhälfte, HNA-1a und untere Tabellenhälfte, HNA-1b) verwendet. Diese wurden zunächst mit einem Epitop-blockierenden monoklonalen Antikörper vorinkubiert (Klone 5D7, Leu11c, CLB 541 und GRM1), zur Kontrolle auch mit monoklonalen Antikörpern gegen irrelevante Glykoproteine (Klon Gi5) bzw. solchen, die keine Allospezifität besitzen, aber gegen CD16b gerichtet sind (Klon 3G8). Danach erfolgte die Inkubation mit je fünf verschiedenen Humanseren mit bekannter Allospezifität gegen HNA-1a oder HNA-1b (Zeilen 1 bis 6 und 7 bis 12; Seren aus dem Serumdepot des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Gießen, Granulozytenlabor – Referenzlabor der International Society for Blood Transfusion (ISBT)). Danach wurde der MAIGA wie üblich durchgeführt. Die Angaben in den Zeilen 1 bis 6 und 7 bis 12 entsprechen der mittleren OD bei 492 nm berechnet aus den Ergebnissen im Doppelansatz in drei unabhängigen Experimenten. Fehlende Alloreaktivität bei mismatch zwischen Testzelle und Serum (Zeile 1 und Zeile 7) entspricht dem Leerwert oder Hintergrundwert. Die zur Kontrolle eingesetzten, nicht blockierenden monoklonalen Antikörper Gi5 und 3G8 (Spalten 2 und 3) entsprechen der zu erwartenden maximalen OD für ein spezifisches Humanserum. Die monoklonalen Antikörper 5D7 und Leu11c (Spalten 4 und 5) blockieren zuverlässig das Epitop für HNA-1a (obere Tabellenhälfte), aber nicht für HNA-1b (untere Tabellenhälfte). Die monoklonalen Antikörper CLB 541 und GRM1 blockieren zuverlässig das Epitop

3. Ergebnisse

für HNA-1b (untere Tabellenhälfte), aber nicht für HNA-1a (obere Tabellenhälfte). Grau hinterlegt, Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (s) für die Messwerte (OD_{492}) zur Orientierung.

Diese Untersuchung zeigt, dass die jeweiligen monoklonalen Antikörper zuverlässig die Epitope von HNA-1a (Klone 5D7 und Leu 11c) und HNA-1b (Klone CLB 541 und GRM1) erkennen und für ein Epitopmapping eingesetzt werden können.

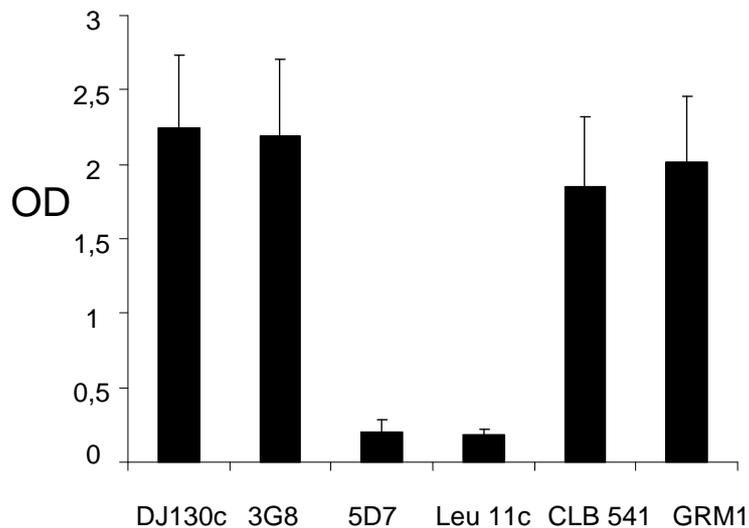


Abbildung 2/3: Grafische Darstellung der Blockade im MAIGA für HNA-1a

Mittlere OD +/- Stabw. für die Reaktion von 5 humanen Antiseren der Spezifität Anti-HNA-1a im MAIGA bei Verwendung verschiedener monoklonaler Antikörper für die Blockade des HNA-1a-Epitops.

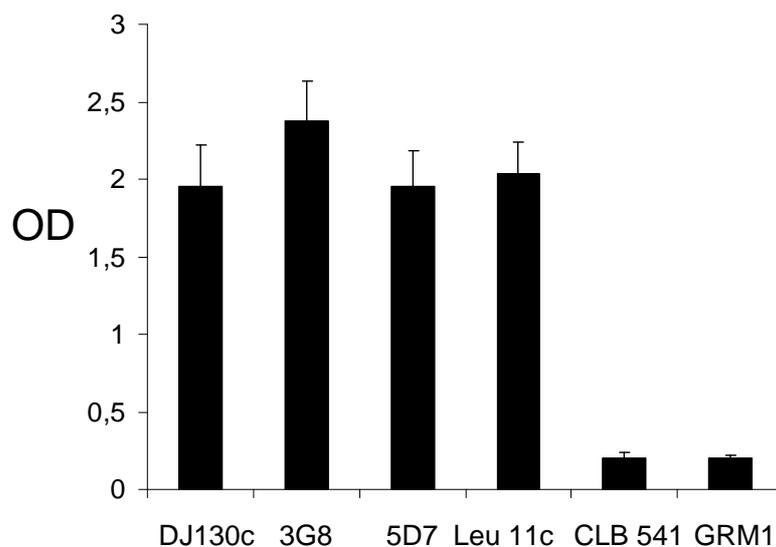


Abbildung 3/3: Grafische Darstellung der Blockade im MAIGA für HNA-1b

Mittlere OD +/- Stabw. für die Reaktion von 5 humanen Antiseren der Spezifität Anti-HNA-1b im MAIGA bei Verwendung verschiedener monoklonaler Antikörper für die Blockade des HNA-1b-Epitops.

3.1.3 Epitopmapping der Varianten des Fc γ RIIIb in der Durchflusszytometrie

Nachdem die Allospezifität der monoklonalen Antikörper im MAIGA überprüft worden war, konnten nun 293F-Zellen, die die entsprechenden Varianten 1 bis 16 des Fc γ RIIIb exprimieren, am Durchflusszytometer unter Verwendung dieser monoklonalen Antikörper getestet werden. Da sich die Isoformen HNA-1a und HNA-1b durch die vier Aminosäuren an den Positionen 36, 65, 82 und 106 unterscheiden, müssen diese Aminosäurenaustausche für die spezifischen Epitope verantwortlich sein. Für die Epitopanalyse wurden je Variante 600 000 293F-Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz unter Verwendung der in Tabelle 3/3 zusammengestellten monoklonalen Antikörper am Durchflusszytometer untersucht.

Monoklonaler Antikörper	Reaktivität
DJ 130c	Panreaktiv (Anti-CD16b)
Leu11a	Panreaktiv (Anti-CD16b)
Leu 11c	HNA-1a-reaktiv
5D7	HNA-1a-reaktiv
CBL 541	HNA-1b-reaktiv
GRMI	HNA-1b-reaktiv
Gi5	Thrombozytäres GP IIb/IIIa

Tabelle 3/3: Übersicht über die zur Epitopcharakterisierung am FACS verwendeten Antikörper

Mit Hilfe von sechs verschiedenen monoklonalen Antikörpern, davon je zwei panreaktive, zwei HNA-1a-reaktive und zwei HNA-1b-reaktive, wurden die Varianten am Durchflusszytometer überprüft. Zu Kontrollzwecken (Leerwert) wurde ein irrelevanter monoklonaler Antikörper gegen Glykoprotein IIb/IIIa auf Thrombozyten verwendet.

3. Ergebnisse

Monoklonaler Antikörper	Variante Nr.							
	HNA-1a	HNA-1b	2	3	4	5	6	7
DJ130C	1860 +/- 160	1985 +/- 170	1683 +/- 143	1784 +/- 155	1564 +/-126	1699 +/- 154	1872 +/- 163	1733 +/- 150
Leu 11a	1980 +/- 165	1934 +/- 173	1564 +/- 140	1761 +/- 150	1887 +/- 163	1755 +/- 149	1887 +/- 164	1557 +/- 147
5D7	2067 +/- 187	36 +/- 3	1745 +/- 157	23 +/- 2	1737 +/- 164	1912 +/- 156	15 +/- 3	41 +/- 2
Leu 11c	1865 +/- 170	45 +/- 2	1956 +/- 169	16 +/- 2	2056 +/- 179	1756 +/- 130	47 +/- 3	32 +/- 2
CBL 541	21 +/- 3	2003 +/- 187	41 +/- 2	16 +/- 2	1765 +/- 158	32 +/- 3	34 +/- 3	1887 +/- 160
GRMI	48 +/- 2	1789 +/- 151	23 +/- 2	45 +/- 2	1567 +/- 148	52 +/- 3	34 +/- 2	1789 +/- 161

Monoklonaler Antikörper	Variante Nr.							
	8	9	10	11	12	13	14	15
DJ130C	1697 +/- 148	1880 +/- 166	1743 +/- 153	1925 +/- 171	1624 +/- 159	1787 +/- 157	1927 +/- 184	1656 +/- 158
Leu 11a	1855 +/- 184	1898 +/- 165	1539 +/- 156	1618 +/- 152	1920 +/- 172	1909 +/- 192	1718 +/- 150	1686 +/- 195
5D7	1622 +/- 148	1789 +/- 167	27 +/- 2	2045 +/- 204	1843 +/- 171	1634 +/- 157	31 +/- 3	42 +/- 3
Leu 11c	1745 +/- 156	1823 +/- 166	36 +/- 3	1852 +/- 174	1765 +/- 159	1534 +/- 133	28 +/- 4	22 +/-3
CBL 541	26 +/- 2	1866 +/- 171	22 +/- 3	1782 +/- 175	1777 +/- 167	1945 +/- 184	48 +/- 2	1833 +/- 164
GRMI	27 +/- 2	1745 +/- 155	12 +/- 2	1956 +/- 179	1856 +/- 159	1734 +/-155	49 +/- 3	1699 +/- 150

Tabelle 4/3: Durchflusszytometrische Epitopcharakterisierung am FACS

Aufgeführt ist die durchflusszytometrische Messung am FACS mit sechs verschiedenen monoklonalen Antikörpern als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) im FL-1-Kanal \pm Standardabweichung. Die Kontrollmessung mit Gi5 ergab Messwerte zwischen 5 und 50 und ist nicht gesondert aufgeführt. Alle Angaben sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. Die Messergebnisse zeigen drei Hauptmuster: Varianten, die ausschließlich HNA-1a-reaktiv sind (Nummer 5, 2, 8), Varianten, die ausschließlich HNA-1b-reaktiv sind (Nummer 7, 12, 15), Varianten, die panreaktiv sind (Nummer 4, 9, 11, 13) und Varianten, die nicht reaktiv sind (Nummer 3, 6, 10, 14).

Mit den panspezifischen monoklonalen Antikörpern DJ130c und Leu11a reagieren, wie erwartet, alle Varianten des Fc γ RIIIb. Die Isoform HNA-1a (= Variante 1) sowie die Varianten 2, 5 und 8 reagierten darüber hinaus nur mit den monoklonalen Antikörpern Leu11c und 5D7, also solchen mit HNA-1a-Spezifität. Im Gegensatz zeigten die Varianten 7, 12 und 15 (sowie die Isoform HNA-1b = Variante 16) neben Reaktionen mit den panspezifischen Antikörpern nur Reaktionen mit den monoklonalen Antikörpern mit Allelspezifität für HNA-1b (CBL541, GRM1). Vier

3. Ergebnisse

Varianten (Nummer 4, 9, 11 und 13) reagierten sowohl mit den HNA-1a- als auch mit den HNA-1b-allelspezifischen monoklonalen Antikörpern. Schließlich zeigten vier Varianten keine Reaktion mit irgendeinem der vier allelspezifischen monoklonalen Antikörper, obwohl sie mit DJ130c und Leu11a reaktiv waren (Nummer 3, 6, 10 und 14). Folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse in der Übersicht:

HNA-1a- Reaktiv	HNA-1b- reaktiv	HNA-1a- und HNA-1b-reaktiv	nicht reaktiv
Variante 1 (= HNA-1a)	Variante 16 (= HNA-1b)	Variante 4	Variante 3
Variante 2	Variante 7	Variante 9	Variante 6
Variante 5	Variante 12	Variante 11	Variante 10
Variante 8	Variante 15	Variante 13	Variante 14

Tabelle 5/3: Tabellarische Zusammenfassung der Epitopcharakterisierung am FACS

Die Analyse unter Berücksichtigung der vier Aminosäureaustausche ergibt folgende Schlussfolgerung (vgl. auch Tabelle 1/3): HNA-1a-reaktiv zeigten sich neben der Isoform HNA-1a alle die Varianten, die an der Position 65 die Aminosäure Asparagin und an der Position 82 die Aminosäure Asparaginsäure aufwiesen. HNA-1b-reaktiv zeigten sich neben der Isoform HNA-1b alle die Varianten, die an Position 65 die Aminosäure Serin und an Position 82 die Aminosäure Asparagin aufwiesen. Solche Varianten, die sowohl mit den HNA-1a- als auch mit den HNA-1b-spezifischen monoklonalen Antikörpern reagierten, hatten an Position 65 die Aminosäure Serin und an Position 82 die Aminosäure Asparaginsäure. Eine Null-Reaktion wiesen alle die Mutanten auf, die sowohl an Position 65 als auch an Position 82 die Aminosäure Asparagin trugen. Das jeweilige Reaktionsmuster war unabhängig von der Aminosäure an den Außenpositionen 36 und 106. Folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse auf einen Blick:

3. Ergebnisse

Aminosäureposition	Epitop (Allospezifität)			
	HNA-1a	HNA-1b	HNA-1a und HNA-1b	nicht reaktiv
36	Arg, Ser	Arg, Ser	Arg, Ser	Arg, Ser
65	Asn	Ser	Ser	Asn
82	Asp	Asn	Asp	Asn
106	Val, Ile	Val, Ile	Val, Ile	Val, Ile

Tabelle 6/3: Epitopkomposition von HNA-1a und HNA-1b

Die mittelständigen Aminosäuren kodieren die Epitope von HNA-1a und HNA-1b. Die äußeren beiden Aminosäuren sind am Epitopaufbau nicht beteiligt.

Daraus lässt sich schließen, dass die beiden mittelständigen Aminosäurepositionen die Epitope von HNA-1a und HNA-1b kodieren. Die beiden randständigen Aminosäuren an Position 36 und 106 spielen für die Epitopbildung nach diesen Ergebnissen keine Rolle.

3.1.4 Epitopmapping der Varianten des Fc γ RIIIb in der Immunpräzipitation

Die transfizierten 293F-Zellen wurden im Immunoblot mit jeweils einem panreaktiven und jeweils einem spezifischen monoklonalen Antikörper getestet. Dazu wurden zunächst Zellen aller Varianten einschließlich der Isoformen HNA-1a und HNA-1b biotinmarkiert (siehe 2.2.5), um das Antigen zu markieren, und anschließend lysiert. Ein Preclear (siehe 2.2.6) zur Beseitigung von Zellresten wurde durchgeführt und eine Immunpräzipitation (siehe 2.2.8) erfolgte nun wie beschrieben. Dabei werden die Antigene mit Hilfe von Antikörpern ausgefällt. Die Antigene aus den Proben wurden dann in einem SDS-Polyacrylamidgel (siehe 2.2.9) nach ihrer Größe aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Dabei werden die Proteine durch ein elektrisches Feld auf der Membran fixiert. Anschließend wird die Membran in Blockierungslösung inkubiert, um freie Bindungsstellen der Membran zu blockieren und somit unspezifische Bindungen des später hinzugegebenen spezifischen monoklonalen Antikörpers zu verhindern. Dann wird die Membran mit dem angesprochenen spezifischen monoklonalen Antikörper inkubiert, der an die geblotteten Proteine bindet. Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgt dann mit Hilfe eines an den monoklonalen Antikörper gekoppelten Enzyms. So sollte zum

3. Ergebnisse

einen eine Identifizierung der Proteine und zum anderen eine Molekulargewichtsbestimmung erreicht werden.

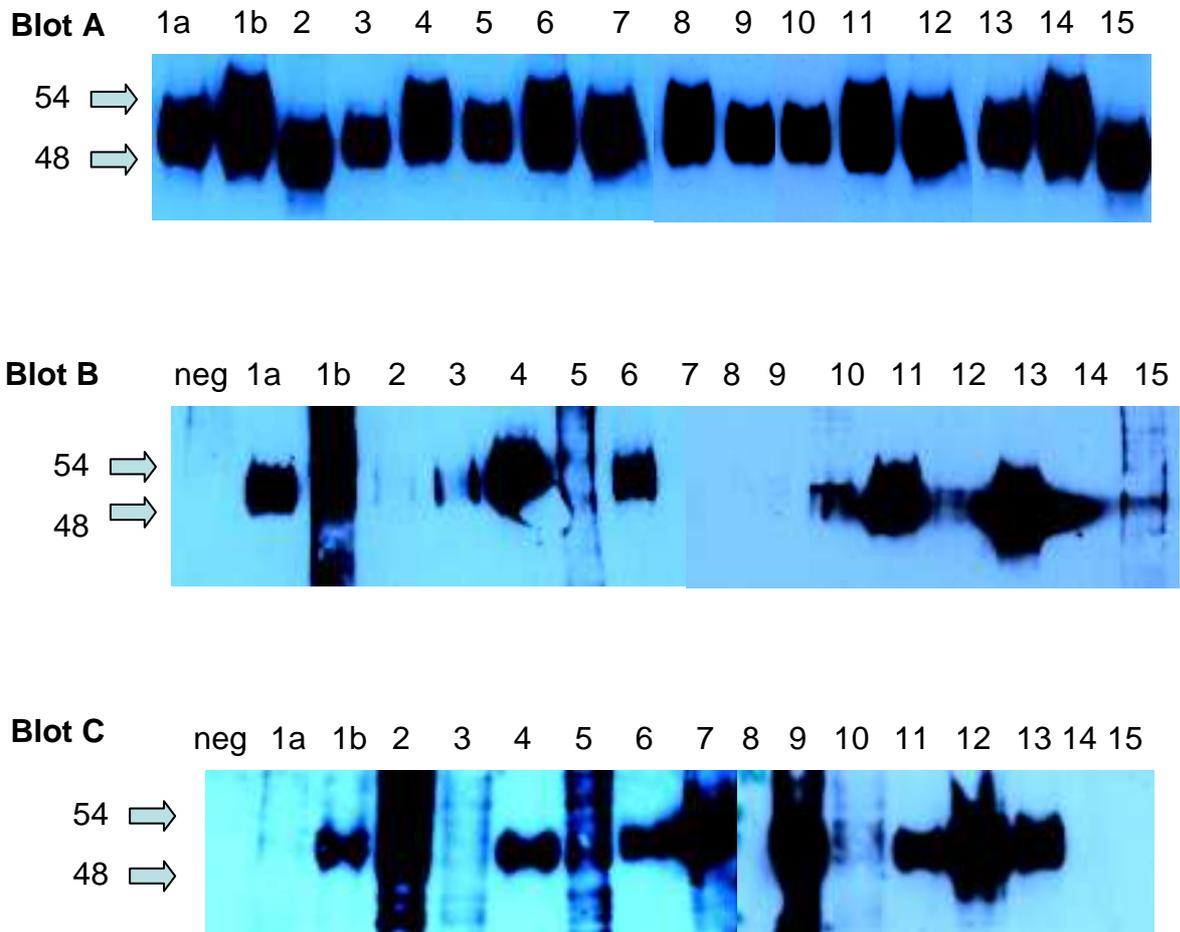


Abbildung 4/3: Immunpräzipitation mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern

Blot A zeigt die Formen HNA-1a an Position 1 und HNA-1b an Position 2, die Positionen 3 bis 15 zeigen die Mutanten nach laufender Nummer aufgetragen. Die Negativkontrolle ist hier nicht gezeigt. Verwendet wurde Klon DJ130. Blot B und C zeigen an Position „neg“ die Negativkontrolle, alle anderen Positionen entsprechen denjenigen von Blot A. Blot B wurde mit Klon Leu11c (HNA-1a allelspezifisch), Blot C mit dem monoklonalen Antikörper GRM1 (HNA-1b allelspezifisch) durchgeführt.

Es ist zu sehen, dass alle Mutanten sowie die Stammformen mit dem pan-reaktiven (CD16b) monoklonalen Antikörper DJ130c reagieren. Wie erwartet, reagierte HNA-1a mit dem monoklonalen Antikörper Leu11c stark im Immunoblot. Bei HNA-1b ist keine Reaktion zu erkennen und wurde auch nicht erwartet. Wie bei der Messung am Durchflusszytometer reagierten die Varianten 4, 11 und 13 auch in der Immunchemie. Allerdings reagierten die Varianten 2, 5, 8 und 9 wider Erwarten nicht, obwohl diese im Durchflusszytometer stark positiv waren. Doch gab es auch

3. Ergebnisse

Varianten, die im Durchflusszytometer nicht reagierten, wohl aber in der Immunpräzipitation. Dies waren die Varianten 3, 6 und 10. Wie erwartet reagierten die Varianten 7, 12 und 15 nicht in der Immunpräzipitation, allerdings konnte eine starke Reaktion der Isoform HNA-1b mit GRM1 im Blot nachgewiesen werden, ebenso reagierten die Varianten 4, 7, 9, 11, 12 und 13. Wie erwartet reagierte HNA-1a nicht, genauso wie die Varianten 2, 3, 5, 8, 10 und 14. Anders als im Durchflusszytometer reagierten die Varianten 6 und 15 allerdings nicht in der Immunpräzipitation.

3.1.5 Funktionelle Relevanz der Epitope im Hinblick auf die Bindung von IgG

Es ist in der Literatur beschrieben, dass HNA-1a und HNA-1b unterschiedlich gut IgG binden (Bredius et. al., 1994; Drescher. et. al., 2003).

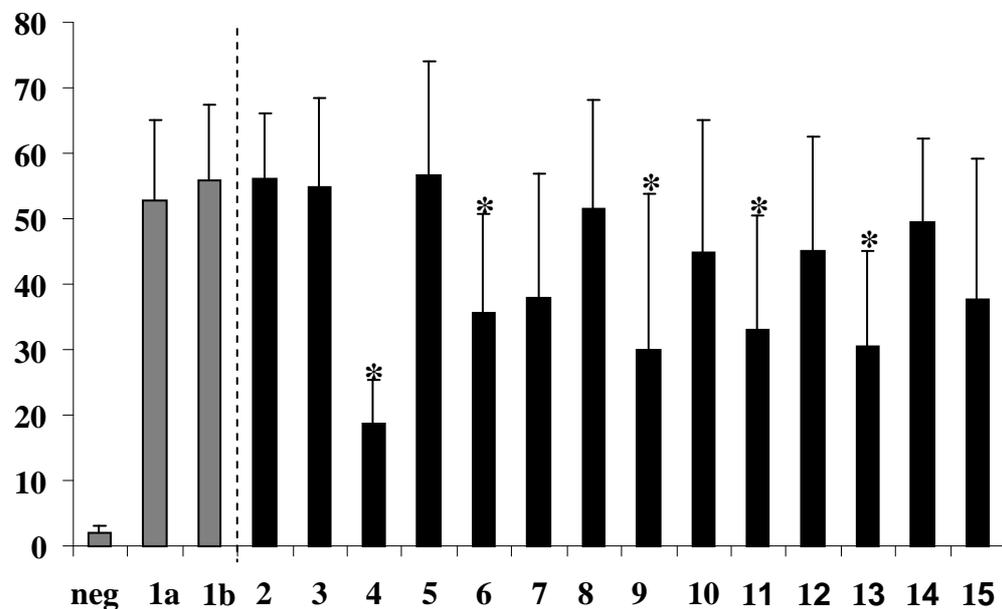
Variante	1	2	3	4	5	x	s	P
293F (untransfiziert)	2,4	2,7	1,4	0,7	2,9	2,02	0,9	<0,01
Variante 1 (= HNA-1a)	37	66	43	62	56	52,8	12,4	-
Variante 16 (= HNA-1b)	47	72	59	43	59	56	11,4	ns
Variante 2	44	56	49	68	64	56,2	10,0	ns
Variante 3	38	64	44	69	60	55	13,3	ns
Variante 4	10	21	16	28	19	18,8	6,6	<0,01
Variante 5	47	50	36	76	74	56,6	17,6	ns
Variante 6	23	46	19	55	35	35,6	15,2	<0,01
Variante 7	19	21	40	65	45	38	19,0	ns
Variante 8	28	56	43	71	60	51,6	16,6	ns
Variante 9	15	12	12	63	48	30	24,0	0,04
Variante 10	43	71	58	33	19	44,8	20,4	ns
Variante 11	23	15	24	56	47	33	17,5	0,03
Variante 12	49	21	38	68	50	45,2	17,3	ns
Variante 13	40	22	15	51	25	30,6	14,6	<0,01
Variante 14	27	58	49	57	56	49,4	13,0	ns
Variante 15	33	13	24	65	54	37,8	21,4	ns

Tabelle 7/3: Übersicht über die IgG-Bindungsfähigkeit der 16 Varianten von FcγRIIIb

In der ersten Spalte sind die Mutationen mit laufender Nummer, in den fünf weiteren Spalten die fünf Messungen, die an verschiedenen Tagen stattgefunden haben, aufgetragen (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen pro Messung; Angaben in arbiträren Einheiten (relative Einheiten)). Die sechste Spalte zeigt den Mittelwert aus allen fünf Messungen, es folgen die Standardabweichung und der statistische Vergleich zur Bindung von HNA-1a (Mann-Whitney-U-Test; Signifikanzniveau 0,05). ns= nicht signifikant.

3. Ergebnisse

Es ist daher denkbar, dass die Varianten, die zur Charakterisierung der Epitope hergestellt worden sind, auch einen Einfluss auf die IgG-Bindung haben; zum Beispiel, dass HNA-1a-ähnliche Varianten besser IgG binden als HNA-1b-ähnliche Varianten. Um dies feststellen zu können, wurde ein IgG-Bindungs-Assay (siehe 2.2.12) entwickelt und durchgeführt. Das Prinzip beruht auf einem BCECF-Adhäsionstest. Dazu werden zunächst die zu untersuchenden 293F-Zellen mit dem Fluoreszenzindikator BCECF inkubiert und anschließend auf eine mit humanem IgG gecoatete Flachbodenplatte gegeben und inkubiert. Mit Hilfe des Fluoreszenzreaders wurde zu einem definierten Zeitpunkt gemessen, wie gut die 293F-Zellen via CD16b/IgG-Interaktion an die Platte adhären. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.



* = $p < 0.05$; $n = 5$

Abbildung 5/3: Grafische Darstellung der IgG-Bindungsfähigkeit

Die Adhäsion von 293F-Zellen, die CD16b in 16 verschiedenen Varianten tragen, an immobilisiertes humanes IgG wurde in einem modifizierten Adhäsionstest geprüft. Auf der x-Achse ist an Position 1 die Negativkontrolle aufgetragen (untransfizierte 293F-Zellen), die Positionen 2 und 3 sind die beiden Isoformen HNA-1a und HNA-1b, es folgen die Varianten 2 bis 15. Auf der Y-Achse ist das Messergebnis in arbiträren Einheiten aufgetragen (Mittelwert aus 5 Messungen + Standardabweichung). * kennzeichnet eine statistische signifikante Abweichung zum Bindungsverhalten von HNA-1a ($p < 0,05$).

Es ist zu erkennen, dass in diesem Testansatz keine statistisch signifikante Abweichung der IgG-Bindungsfähigkeit zwischen HNA-1a und HNA-1b

3. Ergebnisse

nachgewiesen werden kann. Allerdings fällt sofort ins Auge, dass die Varianten 4, 9, 11 und 13 eine deutlich schlechtere IgG-Bindung aufweisen als HNA-1a. Dabei handelt es sich exakt um die vier Varianten, die in der Epitopcharakterisierung sowohl mit HNA-1a- als auch mit HNA-1b-allelspezifischen Antikörpern reagiert haben und als „panreaktiv“ charakterisiert wurden. Deutlich schlechter als HNA-1a bindet ebenfalls die Variante 6 humanes IgG. Grafisch dargestellt und zusammengefasst sind die Ergebnisse in Abbildung 5.

3.2 OND

Um eine Genotypisierung durchführen und die Gen-Frequenz für HNA-5a (Ond) und HNA-5b ermitteln zu können, wurde eine PCR-SSP entwickelt (siehe 2.3.2). Genotypisiert wurden 259 Individuen unterschiedlicher Abstammung.

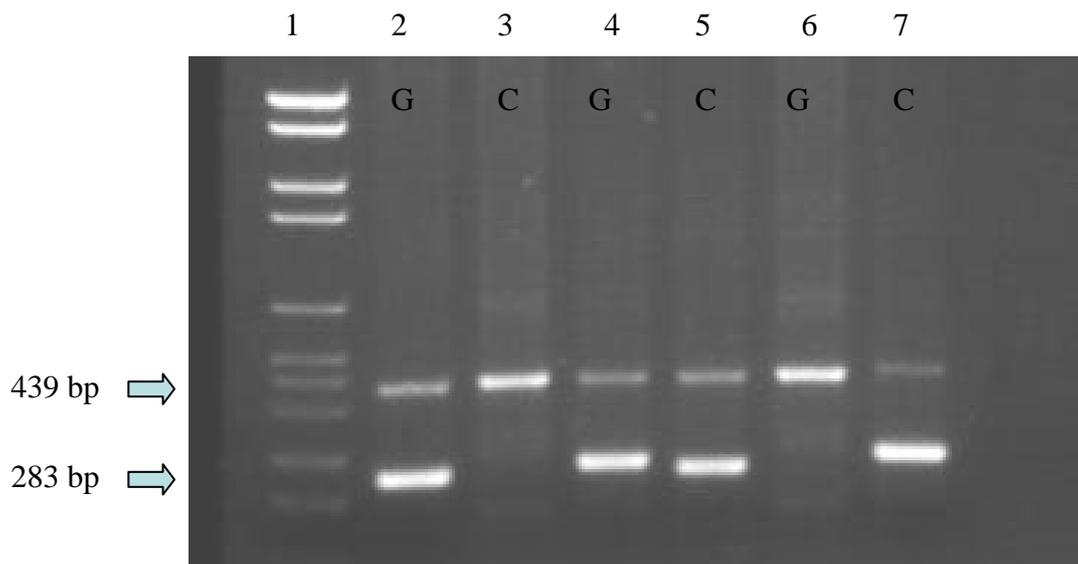


Abbildung 6/3: PCR-SSP für Ond

DNA wurde aus Vollblut von Kauskasiern, Indianern, Schwarzafrikanern und Chinesen isoliert. Eine PCR-SSP wurde wie beschrieben etabliert. Sie erbrachte ein Produkt der Größe von 283 Basenpaaren. Auf der Höhe von 439 bp liegt die HGH-Kontroll-Bande (Verwendete Primer: Vorwärtsprimer 5`-CAG TGC CTT CCC AAC CAT TCC CCT A-3`, Rückwärtsprimer 5`-ATC CAC TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT C-3`). Position 1 zeigt den Molekulargewichtsmarker, die Positionen 2 und 3 zeigen das Ergebnis für eine homozygot positive Probe (HNA-5aa; = GG = Ond-homozygot positiv), die Positionen 4 und 5 eine heterozygote Probe (HNA-5ab; = GC = Ond-heterozygot) und die Positionen 6 und 7 eine homozygot negative Probe (HNA-5bb; CC = Ond-homozygot negativ) Probe.

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse ergaben keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gesetz. Insgesamt waren 16.5% der Individuen Ond-negativ.

Population	N	GG (HNA-5aa)	CC (HNA-5bb)	GC (HNA-5ab)	Antigenfrequenz
Kaukasier	138	64	20	54	0.855
Indianer	67	26	14	27	0.791
Schwarzafrikaner	67	28	6	31	0.881
Chinesen	48	23	9	16	0.813

Tabelle 8/3: Genotypisierung per PCR-SSP

Aufgeführt ist die Genotypisierung per PCR-SSP für Ond und die Antigenfrequenz von HNA-5a. In der ersten Spalte befindet sich die Population, aus der die verwendete DNA stammt, in den vier folgenden Spalten der Austausch und in der letzten Spalte ist die Antigenfrequenz aufgeführt.

Um die Übereinstimmung zwischen der genetischen Typisierung und dem Phänotyp sicherzustellen, wurden von ausgewählten Personen zusätzlich zur DNA auch Granulozyten isoliert, die im MAIGA unter Verwendung von bekannten humanen Anti-Ond-Seren phänotypisiert wurden.

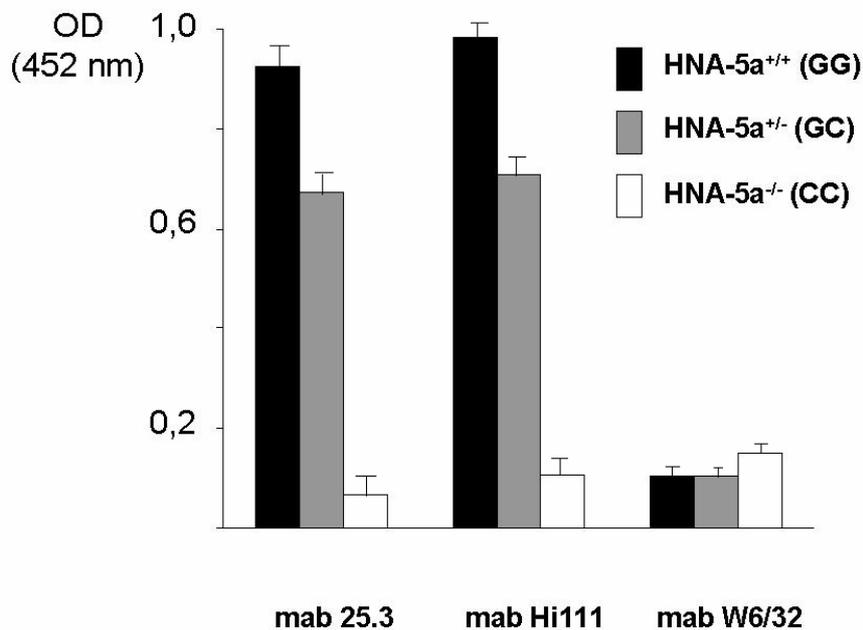


Abbildung 7/3 Phänotypisierung von Spendern mit Anti-Ond

Granulozyten von Personen, die mit Hilfe der etablierten PCR-SSP genotypisiert wurden, wurden isoliert und im MAIGA eingesetzt. Zur Immobilisierung von CD11a wurden die monoklonalen Antikörper 25.3 und Hi111 verwendet. Zur Kontrolle wurde mit w6/32 auch HLA Klasse I der eingesetzten Granulozyten immobilisiert. Ond-Seren wurden von nationalen Referenzlaboratorien der

3. Ergebnisse

ISBT in den Niederlanden (Amsterdam) und den USA (Milwaukee, Wisconsin) zur Verfügung gestellt. Zusammengefasst sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Messungen. Schwarz, Ond-homozygot positive Individuen; grau, heterozygote Individuen; weiß, Ond-homozygot negative Individuen. Auf der y-Achse ist die OD bei 452 nm aufgetragen.

Wie zu erwarten, zeigten Zellen von Personen, die reinerbig Träger des Merkmals Ond sind, die stärkste Extinktion; Personen, die das Merkmal Ond heterozygot tragen, zeigten eine abgeschwächte Reaktion. Merkmalsnegative Individuen reagierten nicht mit Anti-Ond. Die Untersuchung zeigt, dass die etablierte PCR-SSP in der Lage ist, den für den Phänotyp Ond ursächlichen Basenaustausch zu erkennen.

3.3 EBV-Zellen

Die Referenzdatei für granulozytäre Blutgruppen der „International Society for Blood Trasfusion“ (ISBT) wurde mithilfe der EBV-Transformation von Lymphozyten von geeigneten Spendern um die Merkmale HNA-4a und HNA-5a erweitert. Der Nachweis der erfolgreichen Transformation erfolgte nach Abernten immortalisierter Lymphozyten über PCR-SSP für HNA-4 (vgl. Sachs et al., 2004) und für HNA-5 wie in dieser Arbeit beschrieben.

4. Diskussion

4.1 Epitopmapping des FcγIIIb-Rezeptors

Der in dieser Arbeit hinsichtlich seiner Epitope für die granulozytären Blutgruppenmerkmale HNA-1a und HNA-1b näher untersuchte Rezeptor FcγIIIb ist Mitglied der Fc-Rezeptor Familie. FcγIIIb-Rezeptor ist ein so genannter low-affinity-IgG-Rezeptor, der die zelluläre und humorale Abwehr miteinander verbindet. Ihm werden Aufgaben in der Phagocytose und in der Freisetzung von Mediatoren zugeordnet. FcγRIIIb wird ausschließlich auf neutrophilen Granulozyten exprimiert.

Der FcγIIIb-Rezeptor besteht aus 233 Aminosäuren und ist GPI-verankert. Es existieren zwei hauptsächliche Isoformen des Rezeptors in der Humanpopulation, HNA-1a (50-65 kDa) und HNA-1b (65-80 kDa); die Rezeptoren der Merkmalsträger für HNA-1a und HNA-1b unterscheiden sich durch vier Aminosäuren an den Positionen 36, 65, 82 und 106; Ursache sind vier Einzelbasenaustausche (SNP) in der codierenden Sequenz für FcγRIIIb. Alle vier dadurch bedingten Aminosäureaustausche liegen in der ersten (membran-distalen) Domäne des Rezeptors. Die Merkmalsträger für HNA-1a und HNA-1b unterscheiden sich genetisch ferner durch einen fünften Nucleotidaustausch, der jedoch keinen Aminosäureaustausch bedingt (stille Mutation). Bisher war nicht bekannt, welche der vier Aminosäuren die Epitope des jeweiligen Rezeptor-Typs kodieren. Für eine Vielzahl bekannter humaner Blutgruppensysteme sind es Einzelbasenaustausche, die einen einzelnen Aminosäureaustausch bewirken, auf dessen Grundlage dann Blutgruppenmerkmale entstehen (zum Beispiel das wichtigste Blutgruppenmerkmal auf Thrombozyten, Humanes Plättchenantigen 1 (HPA-1); zum Beispiel das Blutgruppenmerkmal K (Kell) auf Erythrozyten).

Die Untersuchung zum Epitopaufbau von HNA-1a und HNA-1b hat zwei wesentliche Berechtigungen: zum einen ist es von Interesse in Erfahrung zu bringen, welche der vier Aminosäuren überhaupt für den Epitopaufbau von Bedeutung sind; zum anderen besteht der Bedarf nach einfachen Screeningsystemen mit großem Durchsatz von Spenderproben, um das Vorhandensein granulozytärer Antikörper ausschließen zu können, da diese Antikörper neben HLA Klasse I- und HLA Klasse II-Antikörpern wesentlich an der häufigsten tödlichen Nebenwirkung der Transfusion plasmareicher Blutkomponenten, der TRALI, beteiligt sind. Ein rekombinantes Peptid, das sowohl

HNA-1a- als auch HNA-1b-Antikörper erkennen kann, wäre von großem Vorteil für eine solche Strategie (Sachs, 2010).

Um die Aminosäuren, die für den Aufbau der Epitope von HNA-1a und HNA-1b verantwortlich sind, identifizieren zu können, wurden rekombinante Varianten des Fc γ RIIIb in allen $4^2 = 16$ denkbaren Permutationen an den vier bekannten, zwischen HNA-1a und HNA-1b unterschiedlichen, Aminosäurepositionen hergestellt. Mit der Hilfe sogenannter *pan*spezifischer monoklonaler Antikörper (also Antikörpern, die Fc γ RIIIb unabhängig von der Isoform erkennen können) und der Hilfe so genannter *allelspezifischer* monoklonaler Antikörper (also Antikörpern, die Fc γ RIIIb nur in einer der Isoformen, d. h., HNA-1a oder HNA-1b erkennen), die zunächst in Blockierungsversuchen in einem modifizierten Sandwich-ELISA-Verfahren auf ihre Pan- bzw. Allospezifität getestet worden sind, wurden die hergestellten Varianten des Fc γ RIIIb dann charakterisiert. Die Charakterisierung ergab, dass alle Varianten, die an den inneren beiden Aminosäurepositionen (65 und 82) die Kombination Asn und Asp trugen, mit Antikörpern gegen HNA-1a reagierten (nicht aber mit solchen gegen HNA-1b). Im Gegensatz dazu reagierten alle Varianten, die an den beiden inneren Aminosäurepositionen (65 und 82) die Kombination Ser und Asn trugen, mit Antikörpern gegen HNA-1b, nicht aber mit Antikörpern gegen HNA-1a. Dabei nahmen die äußeren beiden Aminosäuren keinen Einfluss auf die Reaktion. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass das Epitop für HNA-1a und HNA-1b durch die beiden Aminosäuren in Position 65 und 82 bestimmt wird. In der Tat zeigten rekombinante Formen mit den Aminosäuren Ser und Asp an den beiden Zentralpositionen unabhängig von den äußeren Aminosäurepositionen Reaktionen mit Antikörpern sowohl gegen HNA-1a als auch gegen HNA-1b, so dass weiter geschlussfolgert werden kann, dass die beiden inneren Aminosäuren für den Epitopaufbau verantwortlich sind, wobei Asn in Position 82 für die Spezifität HNA-1a benötigt wird und Ser in Position 65 für die Spezifität HNA-1b. Varianten mit Asp an beiden Positionen (Asp65, Asp82) waren tatsächlich mit keinem der allelspezifischen Antikörper reaktiv, ein Befund, der die Schlussfolgerung zum Aufbau der Epitope für HNA-1a und HNA-1b weiter stützt. Diese Befunde sind in der Durchflusszytometrie erhoben worden. Nachfolgende Untersuchungen in der Immunpräzipitation waren nicht vollständig mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie in Deckung zu bringen, ohne dass hierfür eine schlüssige Erklärung vorliegt.

Es lässt sich in jedoch in jedem Falle festhalten, dass durch die Herstellung der Mutanten und der Transfektion der Stammformen in stabile Zelllinien eine enorme Arbeitserleichterung für die Diagnostik geleistet wurde. Waren für eine Untersuchung auf zum Beispiel Antikörper bisher nur Zellen aus Frischblut, für das passende Spender benötigt wurden, geeignet, wird man in Zukunft auf die Zellen der stabilen Zelllinien jederzeit und ohne größeren Aufwand zurückgreifen können. Die Beschreibung von Varianten, die in der Lage sind, HNA-1a und HNA-1b zu erkennen, wird auch einen möglichen Einfluss auf die Durchführung von Screeninguntersuchungen im Großdurchsatz haben, denn diese Proteine ermöglichen es vermutlich, HNA-1a und HNA-1b in einem Reaktionsansatz zu erkennen. Dazu sind jedoch weitere Untersuchungen mit humanen Seren in einem geeigneten Testansatz erforderlich. Insbesondere wird es sich anbieten, die Proteine nicht auf Zelllinien, sondern löslich (etwa in Insektenzellkulturen) zu exprimieren, damit sie unmittelbar für die Kopplung an Mikrotiterplatten oder Beads bereitstehen. Auch muss bei der Untersuchung mit humanen Antiseren erwogen werden, ob die Funktionalität des FcγRIIIb (nämlich Bindung von Immunglobulinen) durch erhöhtes „Hintergrundrauschen“ die Spezifität eines Testverfahrens mit Verwendung von Humanserum stören kann und ob zusätzlich zu den erfolgten Modifikationen es beispielsweise sinnvoll ist, die IgG-Bindungsstelle durch Mutagenese so zu modifizieren, dass die Rezeptorfunktion aufgebohen ist.

Nachdem die Primärsequenz der Epitope von HNA-1a und HNA-1b als geklärt gelten dürfte, stellt sich die Frage, ob die vorliegenden Untersuchungen nicht auch etwas über die denkbare Evolution zur Entstehung der beiden Varianten in der Humanpopulation aussagen können. Bisher ging man in der Literatur stets davon aus, dass nur drei Varianten des FcγIIIb-Rezeptors existieren, eben die beiden genannten (HNA-1a und HNA-1b) und eine dritte Form (HNA-1c), die der HNA-1b Form bis auf einen zusätzlichen Aminosäureaustausch gleicht (Bux et. al., 1997) und die daher als Unterform von HNA-1b betrachtet wird.

Flesch und Mitarbeiter (2002), Matsuo und Mitarbeiter (2000) sowie Covas und Mitarbeiter (2005) berichteten jedoch in verschiedenen Arbeitsansätzen von weiteren Varianten des FcγIIIb-Rezeptors, die sie auf molekularer Ebene identifiziert haben. PCR-SSP-Methoden, die einen der fünf bekannten Austausch zwischen HNA-1a und HNA-1b nutzen, um den Genotyp vorherzusagen, sind nur bedingt dazu

geeignet, abweichende Zwischenformen zu identifizieren – hier wird aus einem Austausch geschlussfolgert, dass das Individuum an allen anderen Positionen die beschriebenen SNPs der Isoform HNA-1a oder HNA-1b besitzt, ohne diese jedoch tatsächlich nachgewiesen zu haben. Hessner und Mitarbeiter (1996) berichteten unter Verwendung einer PCR-SSP bei Kaukasiern Häufigkeiten für HNA-1a von 0.30 bis 0.37, für HNA-1b von 0.63 bis 0.70. HNA-1b überwiegt also. Bei Latinos und Indianern allerdings beträgt die Häufigkeit für HNA-1a 0.53 bis 0.55 und für HNA-1b 0.45 bis 0.47, das Verhältnis ist demnach relativ ausgeglichen. Bei Japanern jedoch beträgt die Häufigkeit von HNA-1a 0.65 zu einer Häufigkeit von HNA-1b von 0.30. Serologische Studien zeigten, dass die HNA-1a- und die HNA-1b-Frequenz in den einzelnen Populationen nicht immer einen Wert von 1.0 gibt. Matsuo folgerte daraus, dass es noch weitere Varianten des Fc γ IIIb-Rezeptors geben muss. Durch eine spezielle PCR-SSP, mit Hilfe derer vier von fünf Aminosäureaustausche amplifiziert werden konnten, und RFLP stellte er fest, dass es Antigene gab, die weder HNA-1a noch HNA-1b mit Sicherheit zugeordnet werden konnten. Er sequenzierte die DNA der entsprechenden Individuen und fand weitere Varianten des Fc γ IIIb-Rezeptors. Diese Abweichungen bezogen sich auf zehn schwarze Individuen und einen Japaner. Vier der Schwarzen, die fälschlicherweise als HNA-1b getestet worden waren, wiesen einen Austausch an Position 227 auf. Hier fand sich wider Erwarten ein Austausch von A nach G, was einen Aminosäureaustausch von Asparagin zu Serin zur Folge hat, was an dieser Position dem Merkmal von HNA-1a gleicht (statt HNA-1b). Ferner fand Matsuo bei sechs weiteren Individuen, die ebenfalls an vier Positionen HNA-1b Merkmale aufwiesen, an Position 277 einen Austausch von A nach G, was dem Merkmal von HNA-1a gleicht und eine Änderung der Aminosäure von Asparagin statt Asparaginsäure mit sich bringt. Ein japanisches Individuum wies einen Basenaustausch an Position 141 auf, was eine Aminosäureänderung von Serin nach Arginin bedeutet, dies dürfte nach den mit dieser Arbeit vorliegenden Daten aber phänotypisch nicht von Bedeutung sein, da sich das Epitop der Varianten auf die Aminosäurepositionen 65 (Basenposition 227) und 82 (Basenposition 277) beschränkt. Flesch und Mitarbeiter sowie Covas und Mitarbeiter fanden die eben beschriebenen Austausche auch bei Deutschen, Europäern und Brasilianern. Zudem sind in verschiedenen Populationen Doppel- und Null-Phänotypen belegt (Matsuo et. al., 2000). Setzt man nun diese Ergebnisse mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in Beziehung, wäre folgendes Evolutionsmodell denkbar:

-----Ser65-----Asp82----- HNA-1a + HNA-1b
----- Ser65-----Asn82----- HNA-1b

-----Asn65-----Asn82----- **(möglicher) Wildtyp**
-----Asn65-----Asp82----- HNA-1a
-----Ser65-----Asp82----- HNA-1a + HNA-1b

Da die beiden mittleren Positionen nach dieser Arbeit ausschlaggebend für die Epitobildung und die Reaktivität sind und die Veränderungen der Aminosäuren in den genannten Arbeiten sich genau auf diese beiden Positionen beziehen, kann man die Vermutung anstellen, dass der ursprünglich existente Wildtyp an Position 65 und 82 die Aminosäuren Asparagin trug. Dies deckt sich auch in sofern mit den vorliegenden Untersuchungen, da die hergestellten Mutanten mit genau diesen Merkmalen null-reaktiv waren. Der Wildtyp wird sich dann vermutlich in der Form weiterentwickelt haben, dass im Falle von HNA-1a zunächst eine Basenmutation an Position 277 stattfand, welche wiederum zu der bekannten Variante mit Aminosäure Asn 82 statt Asp 82 als Merkmal von HNA-1a führte. Dies wird von der Untersuchung gestützt, da diese Position für das Epitop und damit für die Reaktivität maßgeblich ist. Im Falle von HNA-1b wird eine Basenmutation an Position 227 stattgefunden haben, die zu einem Aminosäureaustausch von Asn 65 zu Ser 65 führte. Serin an Position 65 ist den Ergebnissen dieser Arbeit nach zu urteilen für die Epitobildung und Reaktivität von HNA-1b maßgeblich. „Panreaktive“ Varianten entstünden nach dieser modellhaften Vorstellung durch je eine weitere Mutation an Position 65 bzw. 82.

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass mehr als die drei „klassischen“ Varianten des FcγIIIb-Rezeptors existieren und gerade die atypischen Formen bisher unterschätzt worden sind. Diagnostisch stellt sich je nach Art der verwendeten Genotypisierungsmethode das Problem, dass Individuen, die über einen Einzelbasenaustausch als HNA-1a oder HNA-1b identifiziert worden sind, phänotypisch eventuell abweichen können, falls weitere SNP vorliegen die, wie in

dieser Arbeit gezeigt, den Phänotyp beeinflussen können. Hinsichtlich der Immunisierungsmöglichkeit gibt es gegenwärtig keine Belege aus Fallstudien, denkbar ist aber, dass eine scheinbar HNA-1a-positive Frau einen Antikörper gegen HNA-1a bildet, weil die genetische Untersuchung auf HNA-1 mit kommerziellen PCR-SSP-Verfahren durchgeführt wurde, bei der ein SNP nachgewiesen wird, der eine der beiden äußeren, nicht am Epitopaufbau beteiligten Aminosäuren nachweist. Hier sind auf der Grundlage dieser Arbeit weitere Studien erforderlich.

4.2 Funktionelle Bedeutung der Stammformen und Varianten

Welche funktionelle Bedeutung die verschiedenen Varianten des FcγRIIIb-Rezeptors haben, ist derzeit noch offen. Bei Individuen, die den NA_{null} Phänotyp tragen, d. h., keinen FcγRIIIb-Rezeptor besitzen, konnten laut einer Studie von de Haas (1995) bisher in vivo keine gehäuften Infektionen beobachtet werden. Dies weist darauf hin, dass der Rezeptor Aufgaben hat, die in aller Regel von anderen Rezeptoren mit übernommen werden können. Es gibt allerdings Hinweise, dass Granulozyten, die die HNA-1a-Isoform tragen, opsonierte Erythrozyten besser phagozytieren als solche, die die HNA-1b Isoform tragen (Salmon et. al., 1990). FcγRIIIb hat seine eigentliche Funktion darin, die humorale und zelluläre Abwehr miteinander zu verbinden. Das geschieht in der Form, dass der Rezeptor, der ausschließlich auf neutrophilen Granulozyten vorzufinden ist, in der Lage ist, IgG zu binden. IgG kann dabei als eine Art Übermittler dienen. Es bedeckt dann die Oberfläche von Fremdpartikeln und bietet somit eine Bindungsstelle für die FcγRIIIb-Rezeptoren und somit für den neutrophilen Granulozyt; die Phagozytose des Fremdpartikels kann erfolgen. Auch andere Arbeitsgruppen (Bredius et. al., 1994; Drescher. et. al., 2003), konnten experimentell zeigen, dass die Isoform HNA-1a IgG besser bindet als die Isoform HNA-1b. Unsere Untersuchungen unter Verwendung der 16 Varianten des FcγRIIIb sind nicht geeignet, die Vorbefunde anderer Gruppen zu bestätigen. Im Gegenteil: HNA-1b zeigte in unseren Händen sogar eine geringfügig, aber nicht signifikant, bessere Bindung von IgG als HNA-1a. Lediglich einige der Varianten zeigten ein im Vergleich zu HNA-1a signifikant schlechteres Bindungsverhalten an IgG. Interessant ist, dass vier der fünf funktionell schlechteren Varianten die Kombination Ser65 Asn82 tragen und serologisch als HNA-1a/HNA-1b-panreaktiv typisiert worden sind. Ob diese Befunde klinische Relevanz besitzen, ist aufgrund der Seltenheit, mit der diese Zwischenformen zwischen HNA-1a und HNA-1b

vorkommen, kaum abzuschätzen. Auch muss kritisch angemerkt werden, dass die beschriebene IgG-Bindungsstelle nicht auf der membran-distalen, sondern auf der membran-proximalen Domäne zu finden ist. Sollten die Austausch im Bereich der distalen Domäne tatsächlich einen Effekt auf die IgG-Bindung haben, kann dieser nicht durch die unmittelbare (physikalische) Nähe zur Bindungsstelle zu erklären sein, sondern müsste durch Einflussnahme auf die Tertiärstruktur bedingt sein.

4.3 Ond

Antikörper gegen Antigene auf der Membran von Neutrophilen können zu schwerwiegenden Erkrankungen wie NIN oder TRALI führen. Antigene, die das Ziel von Antikörpern werden können, sind in zwei Kategorien unterteilbar. Die erste Kategorie umfasst Antigene, die exklusiv auf Neutrophilen gefunden werden, dazu gehören der Fc γ RIIIb-Rezeptor (CD16b) sowie NB1 (CD 177). Die zweite Kategorie umfasst solche Antigene, die auf β_2 -Integrinen auf verschiedenen Populationen von Neutrophilen vorkommen. Als zwei neutrophile Alloantigene, die auf der α_M - und der α_L -Untereinheit der β_2 -Integrine MAC-1 und LFA-1 liegen, wurden HNA-4a (Mart) und HNA-5a beschrieben (Simsek, 1996). HNA-5a (Ond) wurde 1979 erstmals beschrieben und findet sich auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Antikörper gegen das Antigen sollen Neutropenien (Conway et al., 1987; Hartmann und Wright, 1991) auslösen. Ferner sollen Antikörper gegen HNA-5a die Abstoßung von Hauttransplantationen unterstützen (Simsek, 1996). Belegt ist bereits, dass Alloantikörper gegen HNA-4a mit zellulären Strukturen von MAC-1 reagieren und neonatale Immunneutropenien auslösen können (Fung, 2003; Sachs, 2004).

Davon abgesehen sind Antikörper gegen β_2 -Integrine aufgrund ihres breiten Reaktionsspektrums sehr schwer zu detektieren. Im Normalfall werden in der Granulozyten-Diagnostik Immunfluoreszenz-Assays, basierend auf der Verwendung frischer Blutzellen, durchgeführt. Das Problem dabei ist, dass Seren, die sowohl mit Granulozyten, als auch mit Lymphozyten reagieren, als Antikörper gegen HLA Klasse I verkannt werden können. Hier könnten sich jedoch auch Alloantikörper gegen β_2 -Integrine hinter verbergen. Insbesondere Alloantikörper gegen Strukturen von HNA-5a könnten hier angesprochen werden, da sich herausgestellt hat, dass diese in 92% aller Fälle eine Reaktivität mit Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten aufwiesen (Decary, 1979). Zusammenfassend lässt sich damit feststellen: Um in Zukunft zuverlässige Diagnosen stellen zu können, ist ein Panel an HNA-5-typisierten Zellen

unerlässlich. Da Seren mit Alloantikörpern gegen HNA-5a aber mehr als rar sind, war eine Typisierung bisher praktisch nicht möglich. Im Rahmen dieser Arbeit ist es aber gelungen, eine robuste PCR-SSP-Methode mit sequenzspezifischen Primern zu entwickeln. Damit lässt sich der HNA-5a Genotyp zuverlässig ermitteln.

Getestet wurden 320 Individuen verschiedener Volkszugehörigkeiten: Europäer, Indianer, Chinesen und Afrikaner. Die Antigenhäufigkeit betrug 0.659, 0.59, 0.646 und 0.64, sie war also in allen Populationen ähnlich, und es gab keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gesetz. In allen Populationen fand sich jedoch auch das HNA-5a-negative Allel (HNA-5bW; w = workshop, da Alloantikörper gegen die Form HNA-5b nicht beschrieben sind). Daraus lässt sich schließen, dass es sich um eine (evolutionär) alte Mutation handeln muss und Alloimmunisierungen gegen HNA-5a möglicherweise alle Rassen betreffen könnten. Abgesehen von der Genotypisierung wurden Zellen je eines der drei Genotypen im MAIGA getestet, um zu überprüfen, ob der Phänotyp entsprechend dem Genotyp ist. Dies traf zu.

Eine Diskrepanz zeigte sich jedoch in Bezug auf frühere Studien in Bezug auf die Häufigkeit des Ond-negativen Allels. Bei den vorliegenden Studien zeigte sich eine Häufigkeit von 15,3%, frühere Studien wiesen lediglich eine Häufigkeit zwischen 5% und 8% auf (Decary, 1979; Pischel, 1987). Da diese alten Daten aus Immunfluoreszenz-Assays mit anti-Ond stammen, unterstreicht das noch einmal die Gefahr einer Fehldiagnose durch diese Art der serologischen Diagnostik und die Wichtigkeit der Genotypisierung durch PCR-SSP. Hier kommt außerdem noch hinzu, dass manche Anti-Ond-Seren zusätzlich HLA-Klasse-I-Antikörper enthalten, was bisher zu einer falsch hohen Rate von Ond-positiv getesteten Seren geführt haben mag.

Es lässt sich also aufgrund der vorliegenden Ergebnisse folgern, dass das Ond-negative Allel doch häufiger vorkommt, als bisher angenommen und damit eine Alloimmunisation gegen HNA-5a doch häufiger vorkommen könnte, als bisher in der Literatur beschrieben. Es ist anzunehmen, dass in Zukunft in Fällen von neonataler Immunneutropenie oder TRALI auch Alloantikörper gegen HNA-5a berücksichtigt werden müssen. Das wird durch die Möglichkeit der sicheren Genotypisierung von HNA-5a erleichtert werden.

4.4 EBV-Zellen

Viele im Labor übliche diagnostische Methoden, wie zum Beispiel Immunfluoreszenztests oder MAIGA, sind zur sicheren Durchführung auf frische und vor allem vortypisierte Blutzellen angewiesen. Das ist nicht immer unproblematisch, benötigt man doch stets passende Spender. Mit der Herstellung der EBV-transformierten Lymphozyten mit den Merkmalen HNA-4a und HNA-5a ist es möglich, stets auf Zellen aus Kultur zurückzugreifen und mit diesen zuverlässige Tests durchzuführen, so ist man nicht mehr von passenden Spendern abhängig und die Zellen können auch über mehrere Jahre aufbewahrt und vermehrt werden.

5. Literatur

Boxer LA, Stossel, TP: Effects of anti-human neutrophil antibodies in vitro: Quantitative studies. *J Clin Invest.* 1974; 53: 1534-1545

Borregard N, Cowland JB: Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. *Blood.* 1997; 89: 3503 – 3521

Bredius RG, Fijen CA, De Haas M, Kuijper EJ, Weening RS, Van de Winkel JG, Out TA: Role of neutrophil Fc gamma RIIa (CD32) and Fc gamma RIIIb (CD16) polymorphic forms in phagocytosis of human IgG1- and IgG3-opsonized bacteria and erythrocytes. *Immunology,* 1994; 83: 624-630

Bux J, Mueller-Eckhardt, C: Autoimmune neutropenia. *Semin Hematol.* 1992; 29: 45-53

Bux J, Jung KD, Kauth T, Mueller-Eckhardt C: Serological and clinical aspects of granulocyte antibodies leading to alloimmune neonatal neutropenia. *Transf. Med.* 1992b; 2: 143-149

Bux J, Kober B, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C: Analysis of granulocyte-reactive antibodies using an immunoassay based upon monoclonal antibody-specific immobilization of granulocyte antigens (MAIGA). *Transfusion Med* 1993; 3: 157-162

Bux J, Hartmann C, Mueller-Eckhardt C: Alloimmune neonatale neutropenias resulting from immunization to a high frequency antigen on granulocyte Fc-gamma-receptor III. *Transfusion.* 1994; 34: 608-611

Bux J: Alloantigene auf Granulozyten. In: *Transfusionsmedizin.* Mueller-Eckhardt. Springer-Verlag. Heidelberg. 1996; 164-171

Bux J, Stein EL, Bierling P: Characterization of a new alloantigen (SH) on the human neutrophil FcγReceptorIIIb. *Blood.* 1997; 89: 1027-1034

Bux J, Behrens G, Jäger G, Welte K: Diagnosis and clinical course of autoimmune neutropenia in infancy: analysis of 240 cases. *Blood.* 1998; 91: 181-186

Bux J, Ernst-Schlegel M, Rothe B, Schäfer H, Santoso S: Carbimazol-dependent antibodies in patients with carbimazol-induced anemia and neutropenia. *Blood.* 1998a; 92: 524a (abstract)

Bux J: Granulocyte antibody-mediated neutropenias and transfusion reactions. *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin.* 1999; 26: 152-157

Carton J, Celton JL, Gane P, Astier A, Fridman WH, Boissinot G, Cartron JP: Isoimmune neonatal neutropenia due to an anti-Fc receptor III (CD16) antibody. *Eur J Pediatr.* 1992; 151: 438-441

Claas FHJ, Langerak J, Sabbe LJM, van Rood JJ: NE1 a new neutrophil specific antigen. *Tissue Antigens.* 1979; 13: 129-134

5. Literaturliste

Clay ME, Kline W, Mc Cullogh L: The frequency of granulocyte-specific antibodies in post partum sera and a family study of the 6B antigen. *Transfusion* 1984; 24: 252 - 255

Conway LT, Clay ME, Kline WE, Ramsay NKC, Krivit W, Mc Cullough J: Natural history of primary autoimmune neutropenia in infancy. *Pediatrics*. 1987; 79: 728-733

Covas DT, Kashima S, Guerreiro JF, dos Santos SEB, Zago MA: Variation in the FcγR3B gene among distinct Brazilian population. *Tissue Antigens*. 2005; 65: 178-182

Decary, F, Verheugt, FWA, van Helden-Henningheim, L: Recognition of non HLA-ABC antigen present on B and T lymphocytes and monocytes only detectable with the immunfluorescence test. *Vox Sanguis*. 1979; 36: 150-158

De Haas M, Kleijer M, van Zwieten R, Roos D, von dem Borne AEGKr: Neutrophil FcRIIIb deficiency, nature and clinical consequences: A study of 21 individuals from 14 families. *Blood*. 1995; 86: 2403

De Haas M, Vosseveld PFM, von dem Borne AEGKr, Roos D: Fcγ receptors of phagocytes. *J Lab Clin Med*, 1995b; 126: 330-341

Drescher B, Witte T, Schmidt RE: Glycolisation of FcγRIII in N163 as mechanism of regulation receptor affinity. *Immunology*, 2003; 110: 335-340

Eastlund DT, Charbonneau TT, Steinmetz J: Granulocyte antibody detection to diagnose immune granulocytopenia and transfusion reaction due to leucocyte incompatibility. *Hematol Rev*. 1992; 6: 201-205

Flesch BK, Doose S, Siebert R, Ntambi E, Neppert J: FCGR3 variants and expression of human neutrophil antigen-1a, -1b, -1c in the populations of northern Germany and Uganda. *Transf*. 2002; 42: 469-475

Fromont P, Bettaib A, Skouri A, Floch C, Poulet E, Duedari N, Bierling P: Frequency of the polymorphonuclear neutrophil Fc-gamma-receptor III deficiency in thr french population and ist involment in the development of neonatal alloimmune neutropenia. *Blood*. 1992; 79: 2131-2134

Fung, YL, Pitcher, LA, Willett, JE, Reed, C, Mison, L, Buy, J, Eiber, G, Minchinton, RM: Alloimmune neonatal neutropnenia linked to anti-HNA-4a (Mart). *Transfusion Medicine*. 2003; 13: 49-52

Goldschmeing R, van Dalen CM, Faber N: Further characterization of the NB1-antigen as a variably expressed 56-62kD GPI-linked glycoprotein of plasma membranes and specific granules. *Br J Haematol*. 1992; 81: 336-345

Hartmann KR, Wright DG: Autoantibodies to Cd11b/CD18 from patients with autoimmune neutropenia alter neutrophil adhesion and opson receptor function in vitro. *Blood*. 1991; 76: 720

5. Literaturliste

Hessner MJ, Curtis BR, Edean DJ, Aster H: Determination of neutrophil antigen gene frequencies in five ethnic groups by polymerase chain reaction with sequence-specific-primers. *Transf.* 1996; 36: 895-899

Herzog P, Korinkova P, Stambergova P, Lukasova M: auto Anti A2 and auto anti-Na1 after bone marrow transplantation. *Folia Haematol (Leipzig)*. 1987; 114: 874-880

Huang, ST, Lin J, McGowan EI, Lalezari P: NB2, a new allele of NB1 involved in febrile transfusion reactions. *Transfusion*. 1992; 22: 426

Huizinga TWJ, van der schoot CE, Jost CE, Klaassen RJL, Kleijer M, van der Borne AEGKr, Roos D, Tetteroo PAT: PI-linked receptor is released on activation. *Nature*. 1988; 333: 667-669

Huizinga, TWJ, Kuijpers, RWAM, Kleijer, Schulpem, TWJ, Cuypers, HTM, Roos, D, von dem Borne, AEGKr: Maternal Genomic Neutrophil FcRIII Deficiency Leading to Neonatal Isoimmune Neutropenia. *Blood*. 1990; 76: 1927-1932

Huizinga TWJ, kuijpers RWAM, Kleijer M, Schulpen TWJ, Cuypers HTM, Roos D, von dem Borne AEGKr: Maternal genomic neutrophil FcRIII deficiency leading to neonatal isoimmune neutropenia. *Blood*. 1990a; 76: 1927-1932

Huizinga TWJ, de Haas M, Kleijer M, Nuijens JH, Roos D, von dem Borne AEGKr: Soluble Fc γ receptor III in human plasma originates from release by neutrophils. *J Clin Invest*. 1990b; 86: 416-423

Huizinga TWJ, de Haas M, van oers MH, Kleijer M, Vile H, van der wouw PA, Moulijn A, van weezel H, Roos D, von dem Borne AEGKr: The plasma concentration of soluble Fc-gamma RIII is related to the production of neutrophils. *Br J Haematol*. 1994; 87: 459-463

Kimberley RP, Salmon JE, Edberg JC : Receptors for Immunglobulin G. *Molecular diversity and implications for disease. Arthritis Rheum*. 1995; 3: 306-314

Kinet JP: the gamma-zeta dimers of Fc receptors as connectors to signal transduction. *Curr Opin immunol*. 1992; 4:43-48

Kline WE, Press C, Clay ME, Keashen-Schnell M, Hackel E, Mc Cullough J : Three sera defining a new granulocyte-monocyte-T-lymphocyte antigen. *Vox Sang*. 50; 181-186, 1986

Kriegler, Michael: *Gene Transfer and Expression; a Laboratory Manual*, New York: Freeman, 1990

Klumpp TR, Herman JK, Schnell MK, Goldberg SL, Mangan KF: Assoziation between antibodies reactive with neutrophils, rate of neutrophil engraftment, and incidence of postengraftment neutropenia following BMT. *Bone Marrow Transplant*. 1996; 18: 559-564

Lalezari P, Nussbaum M, Gelman S, Spaet T: Neonatal neutropenia due to maternal isoimmunization. *Blood*. 1960; 15: 236-243

5. Literaturliste

- Lalezari P, Thalenfeld B, Weinstein WJ: The third neutrophil antigen. In Terasaki PI (ed) *Histocompatibility Testing*, Williams and Wilkins, Baltimore. 1970; 319-322
- Lalezari P, Murphy GB, Allen FH: NB1, a new neutrophil antigen involved in the pathogenesis of neonatal neutropenia. *J Clin Invest.* 1971; 50: 1108 – 1115
- Lalezari P, Radel E : Neutrophil-specific antigens: Immunology and clinical significance. *Semin Hematol.* 1974; 11: 281-290
- Lalezari P, Jiang AF, Yegen L, Santorineou M: Chronic autoimmune neutropenia due to anti-NA2 antibody. *N Engl J Med.* 1975; 293: 744-747
- Lalezari P, Petrosova M, Jiang AF: NB2, an allele of NB1 neutrophil specific antigen: relationship to 9a. *Transfusion.* 1982; 22: 433 (abstract)
- Lalezari P, Khorshidi M, Petrosova M: Autoimmune neutropenia of infancy. *J Pediatr.* 1986, 109: 764-769
- Lanier LL, Yu G, Phillips JH: Co-association of CD3 with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature.* 1989; 342: 803-806
- Lanier LL, Yu G, Phillips JH: Analysis of FcγRIII (CD16) membrane expression and association with CD3 and FcR1γ by site-directed mutagenesis. *J Immunol.* 1991; 146: 1571-1576
- Leger R, Palm S, Wulf H, Vosberg A, Neppert J: Transfusion-related lung injury with leukopenic reaction caused by fresh frozen plasma containing anti-NB1. *Anesthesiology.* 1999; 91: 1529-1532
- Lucas GF, Metcalf P: Platelet and granulocyte glycoprotein polymorphisms. *Transf Med.* 2000, 10: 157-174
- Luhby AL, Slobody LB: Transient neonatal agranulocytosis in two siblings: Transplental isoimmunization to a leukocyte factor? *Am J Dis Child.* 1956; 92: 496-498
- Madyastha P, Glassmann A, Levine D, Genco P, Fudenberg K: Identification of a new neutrophil antigen (CN1) more prevalent among american blacks. *Transfusion.* 1983; 426 (abstract)
- Matsuo K, Procter J, Stroncek D: Variations in genes encoding neutrophil antigens NA1 and NA2. *Transf.* 2000; 40: 645-653
- McCullough J, Clay M, Kline W: Granulocyte antigens and antibodies. *Transf Med Rv.* 1987; 1: 150-160
- McCullough J, Clay M, Thompson HW: Autoimmune granulocytopenia. *Bailliere`s Clinical Immunology and Allergy.* 1987b. 1; 303-326
- McCullough J, Clay M, Press C, Kline W: *Granulocyte Serology: A Clinical laboratory guide.* Chicago: ASCP Press, 1989

5. Literaturliste

Metcalf P, Waters AH: Location of the granulocyte-specific antigen LAN on the Fc-receptor III. *Transfusion Med.* 1992; 2: 293-287

Nordhagen R, Conradi M, Drömtorp SM: Pulmonary reaction associated with transfusion plasma containing anti-5b. *Vox Sang.* 1986; 51: 102-107

Ory PA, Clark MC, Kwoh EE, Clarkson SB, Goldstein IM: Sequences of complementary DNAs that encode the NA1 and Na2 forms of Fc Receptor III on human neutrophils. *J Clin Invest* 1989; 84: 1688-1691

Ory PA, Goldstein IM, Kwoh EE, Clarkson SB: Characterization of polymorphic forms of Fc receptor III on human neutrophils. *J Clin Invest.* 1989b. 83: 1676-1681

Pischel, KD, Marlin SD, Springer, TA, Woods, VL, Bluestein, HG: Polymorphism of lymphocyte function-associated antigen-1 demonstrated by a lupus patient's alloantiserum. *Journal of clinical investigation.* 1987; 79: 1607-1614

Popovsky MA, Abel MD, Moore SB: Transfusion-related acute lung injury associated with passive transfer of anti-leucocyte antibodies. *Am rev Resp Dis.* 1983; 128: 185-189

Popovsky MA: Transfusion and lung injury. *Transfus Clin Biol.* 2001; 8: 272-277

Ravetch JV, Perussia B: Alternative membrane forms of Fc-gamma-R III (CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J Exp Med* 1989; 170: 481-497

Rodwell RL, Tudehope DI, O'Regan PO, Minchinton R, Waters AH: Alloimmune neonatal neutropenia in Australian Aboriginals: an unrecognized disorder?. *Transf Med.* 1991; 1: 63-67

Sachs UJ, Chavakis, T, Fung, L, Lohrenz, A, Bux, J, Reil, A, Ruf, A, Santoso, S: A human alloantibody (anti-Mart) interferes with MAC-1-dependent leucocyte adhesion. *Blood.* 2004; 104: 727-734

Sachs UJ, Hattar K, Weissmann N, Bohle RM, Weiss T, Sibelius U, Bux, J: Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an ex vivo rat lung model. *Blood.* 2006; 107, 3: 1217-1219

Sachs UJ. Non-infectious serious hazards in plasma transfusion. *J Apher Sci.* 2010; 43 : 381-386.

Sacks T, Moldow CF, Craddock PR, Bowers TJ, Jacob HS: Oxygen radical mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes. *J Clin Invest.* 1978; 61: 1161-1167

Salmon JE, Brogle NL, Edberg JC, Kimberly RP: Functional consequences of allelic variants of Fcγ receptors (FcγR) on human phagocytes. *FASEB J.* 1991; 5: A1718 (abstract)

5. Literaturliste

Scallon BJ, Scigliano E, Freedman VH, Miedel MC, Pan YE, Unkeless JC, Kochan JP: A human immunoglobulin G receptor exists in both polypeptide-anchored and phosphatidylinositol-glycan-anchored forms. *Proc Natl Acad Sci.* 1989; 86:5079-5083

Seeger W, Schneider U, Kreuzler B, von Witzleben E, Walmrath D, Grimminger F, Neppert J: Reproduction of transfusion-related acute lung injury in an ex vivo lung model. *Blood.* 1990; 76: 1438-1444

Simsek, S, van der Schoot, CE, Daams, M, Huiskes, E, Clay, M, McCullough, J, van Dalen, C, Stroncek, D, van dem Borne, AE: Molecular characterization of antigenic polymorphism (Ond^a and Mart^a) of the β 2 family recognized by human leucocyte alloantisera. *Blood.* 1996; 88: 1350-1358

Skubitz KM, Stroncek DF, Sun B: Neutrophil specific antigen NB1 is anchored via a glycosyl-phosphatidylinositol linkage. *J Leuko Biol.* 1991; 49: 163-171

Slobody LB, Abramson H, Loizeaux LS: Agranulozytosis of the newborn infant. *J Am Med Ass.* 1950; 142: 25-26

Stahlie TD: Chronic benign neutropenia in infancy and early childhood. *J Pediatr.* 1956; 48: 710-721

Stroncek DF, Skubitz KM, McCullough JJ: Biochemical characterization of the neutrophil-specific antigen NB1. *Blood.* 1990; 75: 744-755

Stroncek DF, Skubitz KM, Plachta LB, Shankar RA, Jakob HS, Clay ME, Herman J, Fleit HB, McCullough J. Alloimmune neonatal neutropenia due to an antibody to the neutrophil Fc-gamma-receptor III with maternal deficiency of CD 16 antigen. *Blood.* 1991; 77: 1572-1580

Stroncek DF, Shapir RS, Filipovich AH, Plachta LB, Clay ME, Dalmaso AP: Prolonged neutropenia resulting from antibodies to neutrophil-specific antigen NB1 following marrow transplantation. *Transfusion.* 1993; 33: 158-163

Stroncek DF, Shankar RA, Plachta LB, Clay ME, Dalmaso AP: Polyclonal antibodies against NB1-bearing 58-64kDa glycoprotein of human neutrophils do not identify an NB2-bearing molecule. *Transfusion.* 1993a; 33: 399-404

Stroncek DF, Shankar RA, Herr GP: Quinine-dependent antibodies to neutrophils react with a 60-Kd glycoprotein on which neutrophil-specific antigen NB1 is located and an 85Kd glycosyl-phosphatidylinositol-linked N-glycosylated plasma membrane glycoprotein. *Blood.* 1993b; 81: 2758-2766

Stroncek DF, Ramsey G, Herr GP, Eiber G, Clay ME, Ketyer EC: Identification of a new white cell antigen. *Transfusion.* 1994; 34: 706-711

Stroncek DF, Shankar R, Litz C, Clement L: The expression of NB1 antigen on myeloid precursors and neutrophils from children and umbilical cords. *Transfusion Medicine.* 1998; 8: 119-123

5. Literaturliste

Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1979; 4350-4354

Toy P, Popovsky MA, Abraham E, Ambruso DR, Holness LG, Kopko PM: Transfusion-related acute lung injury: definition and review. *Critical care Medicine.* 2005; 33:721-726

Van Buren NL, Stroncek DF, Clay ME, McCullough J, Dalmasso A: Transfusion-related acute lung injury caused by an NB2 granulocyte-specific antibody in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion.* 1990; 30: 42-45

Van der Schoot CE, Daams M, Huiskes E, Clay M, McCullough J, van Dalen CM, von dem Borne AEGKr: Antigenic polymorphism of the Leu-CAM family recognized by human leukocyte alloantisera. *Blood.* 1996; 15; 88: 1350-1358

Verheugt FWA, von dem Borne AEGKr, Decary, F. Engelfried CP: The detection of granulocyte alloantibodies with an indirect immunofluorescence test. *Br J Haematol.* 1977; 36: 533

Verheugt FWA, von dem Borne AEGKr, von Noord-Bockhort JC, van elven EH, Engelfried CP: Serological, immunochemical and immunocytological properties of granulocyte antibodies. *Vox Sang.* 1978; 39: 339-350

Verheugt FWA, von dem Borne AEGKr, van Noord-Bokhorst JC, Engelfriet CP: A family with alloimmune neutropenia: Group specific pathogenicity of maternal antibodies. *Vox Sang.* 1979; 36: 1-8

Von dem Borne AEGKr, de Haas M, Roos D, Homburg CHE, van der Schoot CE: Neutrophil antigens, from bench to bedside. *Immunol. Invest.* 1995; 24: 245-272

Wallace PK, Howell AL, Fanger MW: Role of Fc γ receptors in cancer and infectious disease. *J Leukocyte Biol.* 1994; 55: 816-826

Werner G, von dem Borne AEGKr, Bos MJE, Tromp JF, van der Plasvan Dalen CM, Visser FJ, Engelfriet CP, Tetteroo PAT: Localization of the human NA1 alloantigen on neutrophil Fc-gamma-receptors. *Leucocyte Typing II, Vol 3, Springer, New York,* 109-121

Witte T, Schmidt RE: Fc γ -Rezeptoren: Struktur, Funktion und klinische Bedeutung. *Immun Infekt.* 1992; 20: 76-80

Yomotovian R, kline W, Press C, Clay M, engmann H, Hammerschmidt D, McCullough J: Severe pulmonary hypersensitivity associated with passive transfusion of an neutrophil-specific antibody. *Lancet.* 1984; 1: 244-246

Zuelzer WW, Bajoghli M: Chronic granulocytopenia in childhood. *Blood.* 1964; 23: 359-374

6. Anhang

6.1 Deutsche Zusammenfassung

6.1.1 Epitopbildung und IgG-Bindung von HNA-1a und HNA-1b

Speziell erstmals in der Literatur erwähnt ist das Antigen HNA-1a 1960, es fand sich im Rahmen eines Granulozytenagglutinationstests im Serum eines Patienten mit NIN. Es war somit das erste granulozytenspezifische Antigen, das beschrieben wurde. 14 Jahre später wurde das dazugehörige antithetische Allel HNA-1b erstmals beschrieben. Beide Antigene finden sich auf CD16b auf neutrophilen Granulozyten und können ursächlich für Allo- und Autoantikörper sein. Die Epitopbildung dieser beiden Antigene steht im Mittelpunkt dieser Arbeit. Gesichert war bisher nur, dass sich HNA-1a und HNA-1b durch vier Aminosäureaustausche an der distalen Domäne des Fc γ RIIIb unterscheiden. Diese liegen an den Positionen 36 (Arginin/Serin), 65 (Asparagin/Serin), 82 (Asparaginsäure/ Asparagin) und 106 (Valin/Isoleucin). Welche der Austausch für den Epitopaufbau erforderlich sind, war bisher unbekannt. Zunächst wurden Expressionsvektoren für beide Antigene hergestellt. Anschließend wurden Mutationen an vier Positionen der jeweiligen Konstrukte durchgeführt und so alle denkbaren 14 Zwischenstufen der beiden Antigene hergestellt, sequenziert und in 293F-Zellen transfiziert. Um nun feststellen zu können, welche Aminosäuren die Epitope bilden, wurden die Zelllinien zunächst auf Expression und anschließend mit HNA-1a- und HNA-1b-spezifischen Antikörpern auf Reaktivität getestet. HNA-1a-reaktiv waren alle Varianten, die Asn65 und Asp82 trugen, HNA-1b-reaktiv waren alle Varianten, die Ser65 und Asn82 aufwiesen. Solche Varianten, die sowohl mit dem HNA-1a- und dem HNA-1b-spezifischen Antikörpern reagierten, wiesen Ser65 und Asp82 auf; Varianten, die an beiden Positionen Asparagin (Asn65 Asn82) aufwiesen, waren null-reaktiv. Die beiden randständigen Aminosäuren haben nach diesen Ergebnissen für den Epitopaufbau keine Bedeutung. Es lässt sich anhand dieser Ergebnisse folgern, dass das HNA-1a/-1b-Epitop des Fc γ RIIIb-Rezeptor von den beiden mittleren Aminosäuren kodiert wird. Weiter ist festzustellen, dass das Epitop von HNA-1a von den beiden Aminosäuren Asparagin und Asparaginsäure kodiert wird und das Epitop von HNA-1b von den beiden Aminosäuren Serin und Asparaginsäure kodiert wird. Da jedoch solche Varianten, die an Position 65 Serin trugen und an Position 82 Asparaginsäure

eine Doppelreaktion zeigten, ist davon auszugehen, dass die Position 65 mit Serin verantwortlich für die Spezifität HNA-1b und die Position 82 mit Asparaginsäure verantwortlich für die Spezifität HNA-1a ist. Insbesondere die identifizierten „panreaktiven“ Formen stellen einen vielversprechenden Ausgangspunkt zur Verbesserung der serologischen Diagnostik, vor allem im Rahmen der Prävention der TRALI dar.

Bisher ungeklärt ist die funktionelle Bedeutung der beiden Isoformen HNA-1a und HNA-1b. Im IgG-Bindungstest konnte nachgewiesen werden, dass HNA-1b IgG geringfügig, aber nicht signifikant, besser bindet als HNA-1a; dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu publizierten Ergebnissen. Allerdings zeigen die funktionellen Untersuchungen, dass einige Varianten, insbesondere alle, die Ser65 Asp82 trugen, signifikant schlechter an IgG binden konnten, als die Isoform HNA-1a. Damit erscheint es weiterhin vorstellbar, dass der Allotyp die Funktion beeinträchtigt, jedoch bleibt offen, ob *in vivo* ein Unterschied in der Funktionsfähigkeit der Granulozyten vorliegt.

6.1.2 OND

Antikörper gegen Antigene auf der Membran von Neutrophilen können zum Teil zu schwerwiegenden Erkrankungen wie NIN oder TRALI führen. Zu den neutrophilen Alloantigenen gehört auch HNA-5a, das zu den β 2-Integrinen zählt und sich auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten befindet. Antikörper gegen das Antigen sollen Autoimmunneutropenien auslösen und zur Abstoßung von Hauttransplantationen führen. β 2-Integrine sind aufgrund ihres breiten Reaktionsspektrums schwer zu detektieren. Es wurde eine zuverlässige PCR-SSP-Methode mit sequenzspezifischen Primern entwickelt, mit der sich der HNA-5a-Genotyp zuverlässig ermitteln lässt. Getestet wurden 320 Individuen verschiedener Volkszugehörigkeiten: Europäer, Indios, Chinesen und Afrikaner. Die Antigenhäufigkeit betrug 0.659, 0.59, 0.646 und 0.64, sie war also in allen Populationen ähnlich. In allen Populationen fand sich auch das HNA-5a-negative Allel (HNA-5bW). Die Häufigkeit betrug 15,3%; dies weicht von früheren Studien, die auf Immunfluoreszenz-Assays basieren, deutlich ab. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Genotypisierung durch PCR-SSP.

6.1.3 EBV-Zellen

Es wurden EBV-transformierte Lymphozyten mit den Merkmalen HNA-4a und HNA-5a hergestellt, um für Labortests auf Zellen aus Kulturen zurückgreifen zu können.

6.2 Abstract (englische Zusammenfassung)

6.2.1 Epitopes and IgG binding properties of HNA-1a and HNA-1b

HNA-1a is mentioned in literature for the first time in 1960, when it was described by granulocyte agglutination in the serum of a patient with neonatal alloimmune neutropenia. HNA-1a is therefore the first human neutrophil antigen (HNA). Only 14 years later, its corresponding allele, HNA-1b, was described. Both antigens reside on CD16b on neutrophils and are able to trigger the formation of allo- and autoantibodies.

Formation of the HNA-1a and -1b epitopes is in the focus of this thesis. It has long been known that HNA-1a and HNA-1b differ by four amino acid exchanges in the distal domain of FcγRIIIb: 36 (arginin/serin), 65 (asparagines/serin), 82 (aspartic acid/asparagines) and 106 (valines/isoleucines). If all or only some of these amino acids take part in epitope formation was unknown.

In my thesis, I produced all possible 16 isoforms that can be made by permutation of these 4 positions, by recombinant protein technology. After expressing these isoforms in 293F cells, there reactivity with monoclonal antibodies specific for HNA-1a and HNA-1b was tested, respectively.

Exclusive reaction with monoclonals specific for HNA-1a were seen with mutants carrying Asn65 and Asp82, whereas Ser65 and Asn82 mutants were exclusively reactive with HNA-1b. Isoforms showing pan-reactivity had Ser65 and Asp82, and mutants carrying Asp65 and Asp82 where non-reactive. It appears that both outer amino acid (36 and 106) are not part of the epitope.

It was concluded that amino acids 65 and 82 are responsible for the formation of the HNA-1a and HNA-1b epitopes.

These results could not be confirmed by westernblot, most likely because the epitope structure is lost by denaturing the protein.

Beside the hitherto unknown epitope formation of HNA-1a and HNA-1b, the functional capacity of both isotopes with regard of IgG binding is also unclear in literature. Using recominant cell lines, HNA-1b was demonstrated to have slightly better IgG binding capacities than HNA-1a, but this difference did not reach the level of statistical significance. It remains currently unclear whether HNA-1a and HNA-1b neutrophils have different impact on neutrophil function in vivo.

6.2.2 OND

Antibodies to human neutrophil alloantigens (HNA) can cause immune-mediated neutropenias and transfusion complications. The diagnosis of antibodies to the HNA-5a (Ond) isoform of the α Lb2 integrin is hampered by the lack of reliable methods for HNA-5a antigen typing. We have devised a polymerase chain reaction sequence-specific primer method (PCR-SSP) and used it to determine the HNA-5a gene frequencies in 320 individuals from different ethnicities. 15,3% were found to be HNA-5a negative, with no significant deviation between the populations. Results of HNA-5a genotyping were in accordance with phenotyping. Availability of HNA-5a PCR-SSP will facilitate the diagnosis of Ond antibody-mediated clinical conditions.

6.2.3 EBV-Cells

EBV-transformed lymphocytes with the signs HNA-1a, HNA-1b, HNA-4a and HNA-5a were produced to be able to fall back for lab tests on cells from cultures.

7. Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.

8. Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. Ulrich Sachs danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten und wichtigen Themas, für seine stets freundliche und umsichtige Betreuung, für seine Hilfestellungen und für seine Unterstützung dabei, eigene Ideen entwickeln und umsetzen zu können.

Dem Direktor des Institutes für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Gregor Bein, danke ich für die Möglichkeit, in seinem Institut zu arbeiten und für sein Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Dr. Sentot Santoso danke ich für seine konstruktive Kritik und stetige Diskussionsbereitschaft, welche sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein herzliches Dankeschön gilt Frau Christine Hofmann für ihre kompetente und gründliche Einarbeitung in die Leukozytenserologie und für Ihre Unterstützung sowie für ihre zahlreichen Hilfestellungen. Ferner bedanke ich mich herzlich für das angenehme Arbeitsklima im Leukozyten-Labor bei dessen Mitarbeitern Frau Ingrid Wallon und Frau Steffanie Plott-Scheffler, die mich ebenfalls stets unterstützt haben.

Frau Silke Werth danke ich für die Einweisung in Arbeitstechniken - die Organisation der Laborarbeit und die Durchführung zahlreicher Versuche wären ohne ihre Unterstützung nur schwer möglich gewesen. Im gleichen Sinne danke ich Frau Heike Berghöfer.

Frau Masja de Haas, Sanquin Research, Amsterdam, Niederlande, danke ich für das Überlassen von monoklonalen Antikörpern.

Allen weiteren, hier namentlich nicht genannten Mitarbeitern des Institutes, gilt für ihr freundliches Entgegenkommen und ihre ständige Hilfsbereitschaft mein ausdrückliches Dankeschön.